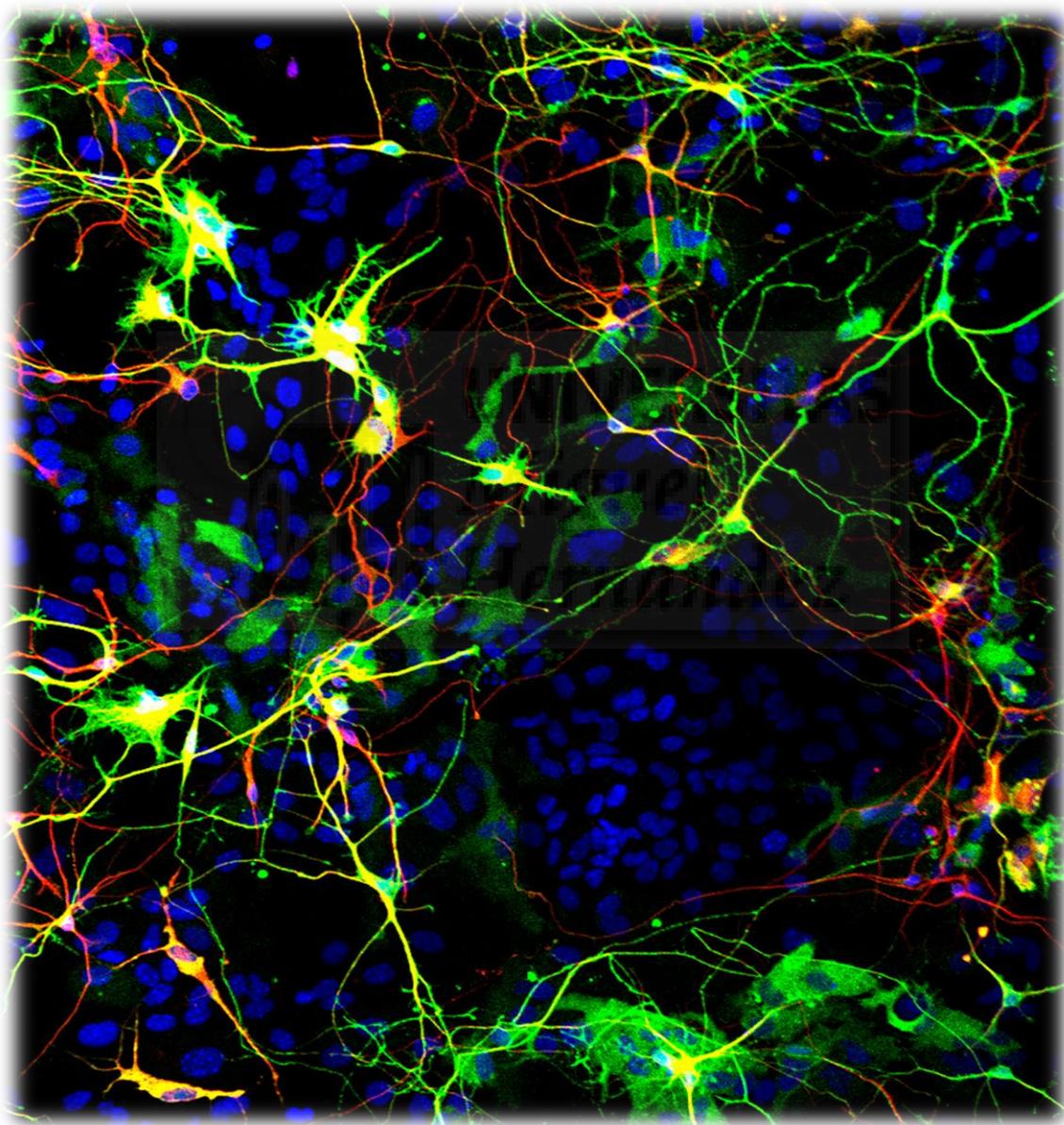


REPROGRAMACIÓN DE ASTROCITOS DE TÁLAMO Y CORTEZA

NATALIA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

TUTORAS:

ASIA FERNÁNDEZ CARVAJAL Y GUILLERMINA LÓPEZ-BENDITO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	4
3. Antecedentes.....	9
4. Objetivos.....	12
5. Materiales y Métodos.....	13
6. Resultados.....	20
7. Discusión.....	25
8. Conclusiones y Proyección futura.....	26
9. Bibliografía.....	27

RESUMEN

En los últimos años, los avances en la ciencia de la reprogramación celular han cuestionado el dogma que se tenía hasta el momento, que afirmaba que las células del sistema nervioso no podían cambiar su identidad una vez diferenciadas.

De hecho, recientes estudios han demostrado que la astrogliá de la corteza de ratones postnatales y adultos, se puede reprogramar *in vitro* e *in vivo* para dar lugar a neuronas.

Esto se consiguió con la sobreexpresión de factores de transcripción neurogénicos, abriendo nuevas posibilidades en el uso de la astrogliá endógena para tratar de reparar daños cerebrales. Por tanto, nuestra hipótesis consiste en que estas células de la glía pueden ser utilizadas para la restauración neuronal tras un daño o pérdida sensorial. En este trabajo, demostramos que los astrocitos del tálamo, una estructura clave en la correcta organización del cerebro y sus conexiones, pueden ser reprogramados *in vitro*, dando lugar a neuronas talamocorticales. Para ello, lo primero que hicimos fue detectar cuál era el factor de transcripción más idóneo para la correcta reprogramación de astrocitotalámicos a neuronastalamocorticales, y lo comparamos con su efecto en astrocitos de la corteza, que sirvieron como control puesto que es una región ya estudiada. Una vez finalizado el proyecto, concluimos que las identidades de las neuronas reprogramadas parecen corresponder a la región de la cual provienen los astrocitos, a pesar de haber utilizado en ambos casos el mismo factor de transcripción, *Neurogenin2*, para reprogramarlos.

Palabras clave: *Reprogramación directa, Astrogliá, Tálamo, Neurogenin2.*

SUMMARY

Advances in the field of cellular reprogramming have challenged the tenet that asserted that the cells from the nervous system are not able to change their identity once they are differentiated.

In fact, recent studies have proved that postnatal and adult mice's cortex's astroglia, can be reprogrammed *in vitro* e *in vivo*, resulting in neurons. This was achieved by the over expression of neurogenic transcription factors, opening new possibilities to the use of endogenous astroglia, helping to treat cerebral damages. Therefore, our hypothesis presents that the glial cells can be used for neural restoration after damage or a sensorial loss. In this essay, we prove that the thalamic astrocytes -a key structure for the right organization of the brain and its connections- can be reprogrammed *in vitro*, resulting on thalamocortical neurons. For that, the first thing we did was detecting which one was the best transcription factor for the right reprogramming of thalamic astrocytes to thalamocortical neurons, comparing it with its effect in cortical astrocytes, that were used as control culture as they are a region studied already. Once the project was finished, we concluded that the identities of the reprogrammed neurons seem to correspond to the region where the astrocytes come from, despite using the same transcription factor -*Neurogenin 2*- for reprogramming in both instances.

Key words: *Direct reprogramming, Astroglia, Thalamus, Neurogenin2.*

INTRODUCCIÓN

Historia

Uno de los principales dogmas de la biología, era aquel que dictaba que la identidad de las células diferenciadas no se puede cambiar. Sin embargo, recientes descubrimientos en el campo de la reprogramación nuclear sugieren que, gracias a la identificación de los mecanismos moleculares encargados de la diferenciación celular, se puede reconfigurar la identidad de una célula madura.

El primero en desafiar este dogma fue el Dr. John B. Gurdon, quien en 1962 (J.B.Gurdon et al., 1962) se dio cuenta de que las células maduras contienen la información genética suficiente para dar lugar a todos los tipos celulares de un individuo. Para llegar a esta conclusión, Gurdon realizó una serie de experimentos con ovocitos de ranas de la especie *Xenopus laevis*, unas con piel coloreada y otras con piel albina. En primer lugar, extrayendo óvulos sin fecundar de la variedad coloreada y destruyendo los núcleos, conseguía eliminar todo el material genético nuclear de esta rana. A continuación, núcleos de células intestinales de un renacuajo de la línea albina fueron trasplantados al óvulo enucleado, dando lugar a un óvulo con toda la carga genética necesaria para poder dar lugar a un individuo completo. Cuando este ovocito de rana fecundado se desarrolló, dio lugar a un renacuajo, y más tarde a un adultoalbino. Estos experimentos demostraron por primera vez que cualquier célula diferenciada contiene toda la información genética necesaria para dar lugar a todos los tipos celulares.

Este descubrimiento supuso una auténtica revolución en el campo, llegando a desembocar en uno de los experimentos de clonación más conocidos, la clonación de mamíferos superiores, como el caso de la oveja Dolly (Campbell et al., 1996). Sin embargo, estos experimentos tenían un grave problema: la mayoría de los animales mostraban anomalías fenotípicas, que parecían deberse a fallos epigenéticos de este método de reprogramación.

Células madre pluripotentes inducidas

Poco tiempo después, comenzaron a aparecer líneas de investigación que buscaban alternativas al método de Gurdon.

Gracias a él se sabía que se conservaba la posible pluripotencialidad de la célula a pesar de la diferenciación. Este descubrimiento dio lugar a la idea de que las células maduras completas pueden ser revertidas a un estado de pluripotencia (Takahashi y Yamanaka, 2006).

En este trabajo se describía cómo los factores de transcripción asociados a la determinación del linaje pueden cambiar el destino de una célula cuando son expresados de manera ectópica en ciertas células heterólogas. **(Figura 1)**

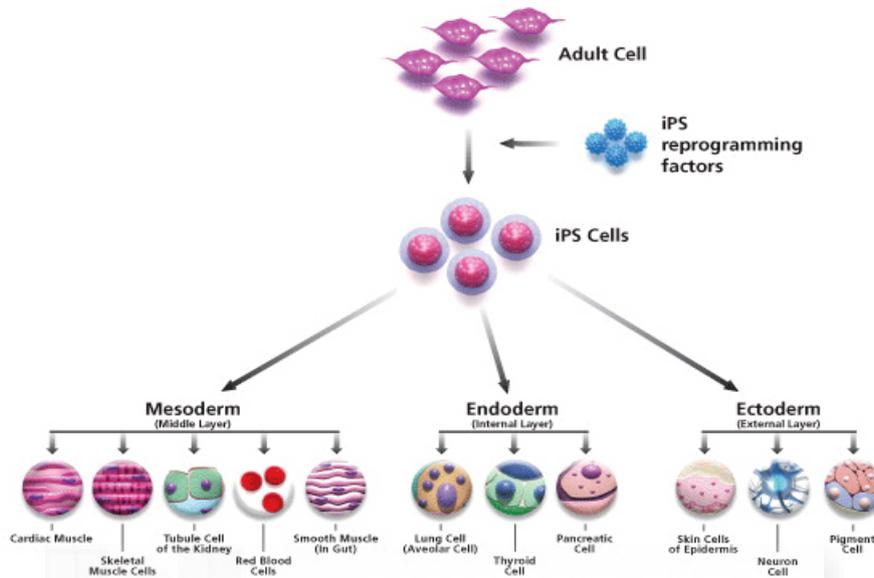


Figura 1: Esquema de reprogramación de células adultas a iPCS.

Fuente: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/stem-cell-biology/ipsc.html>

En este estudio, los factores de transcripción utilizados fueron *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*, dando lugar a reprogramación en células de ratón entre 1-2 semanas y 3-4 semanas en humano. Las células resultantes son las hoy conocidas como Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPSC).

Desde que tuvo lugar este descubrimiento, las iPSC han sido obtenidas a partir de una gran variedad de células iniciadoras procedentes de distintos organismos, incluyendo humanos. A pesar de que esto pueda parecerla solución definitiva a una gran cantidad de enfermedades, hay ciertos problemas que alejan esta técnica de su imagen utópica, como son la eficiencia (en el artículo de Yamanaka apenas conseguían un 1% (S.Yamanaka y M. Takahashi, 2006)), la posibilidad de desarrollar tumores (Nakagawa, et al., 2008), la mutagénesis insercional (Selvaraj, et al., 2010) y una reprogramación incompleta. (Kim, et al., 2011).

La pluripotencialidad de estas células reside en la alteración de la expresión de ciertos protooncogenes que, cuando se ve desestabilizada su transcripción, puede dar lugar a una activación constitutiva de los mismos, pasándose a llamar oncogenes. Esto se traduce en una proliferación descontrolada de las células, pudiendo llegar a producir un tumor.

Dentro del cóctel de factores de transcripción que utilizaba Yamanaka, los genes *cMycy Klf4* eran los responsables del comportamiento tumoral, dado que son protooncogenes. Así se vio que el 20% de los ratones crecidos a partir de iPSC desarrollaban cáncer (Swaminathan, 2007).

Además, el hecho de insertar genes exógenos hace que se ponga en riesgo la integridad del genoma de la propia célula. El gen que se ve a integrar en el genoma, va a hacerlo de manera aleatoria, sin tener en cuenta la continuidad de los genes autóctonos. Eso implica que se puede insertar tanto en espacios intergénicos, sin afectar a los genes colindantes, como dentro de un gen, dando lugar a una mutación del mismo. Al ser afectados de manera indiscriminada, todos los genes corren riesgo de sufrir este tipo de alteración, dando lugar a consecuencias muy dispares.

Incluso si todos estos inconvenientes son sorteados, nos encontramos con otra gran dificultad: Una reprogramación incompleta.

El código epigenético, que tiene un porcentaje de responsabilidad muy alto en la diferenciación celular, debe ser alterado en las células que se van a reprogramar. Recientemente se publicaron unos estudios (K. Hochedlinger et. al., 2010) que mostraban que las células iPS tenían una *memoria epigenética*, que consistía en una serie de modificaciones químicas en el ADN de una célula que provienen de la célula adulta original y que no han sido borradas por la reprogramación. Como consecuencia, también se limita el número de tipos celulares a los que se podrían reprogramar más tarde las células iPS.

Reprogramación directa

A pesar de lo desalentadores que puedan llegar a ser los problemas que surgen de las iPCS, se está estudiando la posibilidad de evitar la gran mayoría de ellos mediante una reprogramación más directa.

La manipulación de señales propias de las células mediante la expresión forzada de factores de transcripción clave, ha demostrado ser una vía muy eficaz para afectar y alterar la identidad celular en una amplia variedad de contextos celulares.

En vez de revertir al estado de pluripotencia, el paso más problemático del proceso, y más tarde forzar una diferenciación de esa célula, se busca realizar el proceso de un solo paso. Pasando directamente de una célula diferenciada a otra célula distinta, también diferenciada, se evitan los riesgos de tumores y otras posibles alteraciones, así como una aceleración del proceso de reprogramación.

¿Qué importancia tiene la reprogramación para el sistema nervioso?

Una de las verdades inamovibles de la neurociencia ha sido la imposibilidad de las neuronas para proliferar. Las únicas células neuronales capaces de replicarse en el cerebro eran las células gliales (o neuroglia), encargadas de dar soporte a las neuronas, siendo unas de las células más abundantes del sistema nervioso central.

Se sabe desde hace ya un tiempo que las células progenitoras neuronales adultas (AdNPC) continuamente están generando nuevas neuronas (de un subtipo específico), astrocitos y oligodendrocitos durante la edad adulta, pero de forma limitada en unas pocas regiones distintas del cerebro: La zona subventricular del ventrículo lateral, la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y el bulbo olfatorio (Gage, 2000; Alvarez-Buylla and Lim, 2004). (**Figura 2**).

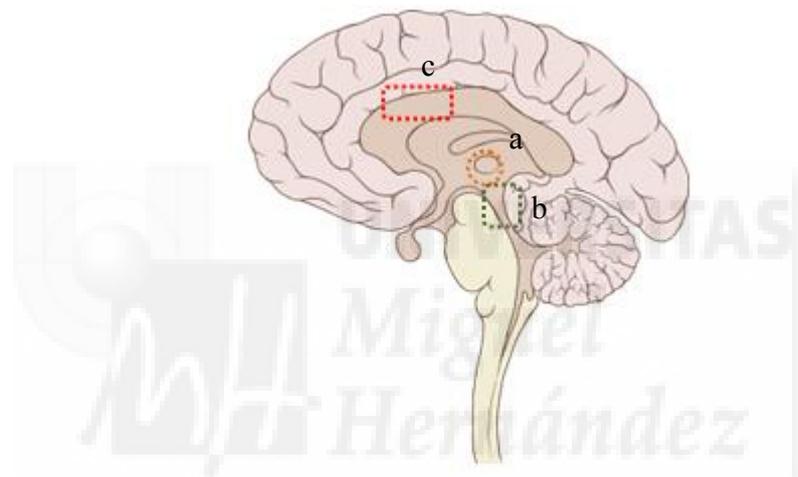


Figura 2. Corte sagital de cerebro humano. Señalado en naranja (a) se encuentra el tálamo, en verde (b) el hipocampo y en rojo (c) el ventrículo lateral.

Fuente: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Brain_human_sagittal_section.svg

Gracias a la reprogramación directa, se podrían generar neuronas a partir de células que pueden proliferar, como los astrocitos de la neuroglia del sistema nervioso central (SNC), que son capaces de proliferar en regiones dañadas (Buffo et al., 2008). Estas células se podrían reprogramar para dar lugar a neuronas, compensando en número la pérdida de estas debidas a una enfermedad neurodegenerativa o una lesión cerebral (Berninger et. al., 2007, Guo et al., 2014),

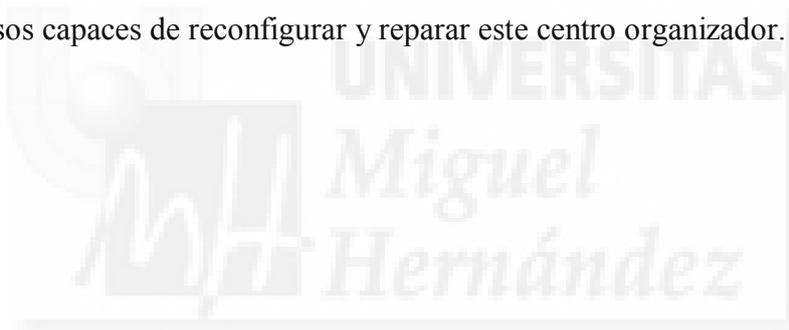
Dentro del SNC, el tálamo (**Figura 2**) es el encargado de recibir los impulsos de los estímulos recogidos por los sentidos (excepto el olfatorio) y redistribuirlos de forma específica a lo largo de la corteza, teniendo un sistema de comunicación bidireccional (corteza-tálamo), conocido como sistema talamocortical (Z. Molnar y C. Blackemore, 1995).

La importancia de tratar estas terapias en el tálamo radica en su función como coordinador sensorial, basado en su división en núcleos según el sentido: Visual, Somato-sensorial y Auditivo (G. López-Bendito y S. Garel, 2014).

De cada núcleo de este complejo salen proyecciones hacia la corteza de cada uno de los sentidos. ¿Pero qué pasa cuando las proyecciones en la corteza de un sentido se ven dañadas?

Al no ser capaces de regenerar las neuronas de ese núcleo específico, el daño en esa zona daría lugar a una privación sensorial. Sin embargo, con el uso de la reprogramación directa en los astrocitos de la zona dañada del tálamo, convirtiéndolos en neuronas específicas de cada sistema sensorial, podría ser posible la restauración de las conexiones neuronales perdidas.

Hasta ahora sólo se han reprogramado, en su mayoría, astrocitos de corteza (J.Frisén y J.P. Magnusson, 2016) dejando al tálamo como un campo desconocido y sin explorar. Dado el potencial y la importancia que tiene este campo en los seres vivos, merece la pena investigar sobre los procesos capaces de reconfigurar y reparar este centro organizador.



ANTECEDENTES

Una vez se decidió seguir el camino de la reprogramación directa, saltándose el paso de la pluripotencialidad, los fibroblastos fueron las células utilizadas por excelencia.

La mayoría de los experimentos de reprogramación directa que se han realizado hasta la fecha han sido con fibroblastos, llevándolos a tipos celulares tales como cardiomiocitos, linajes pancreáticos, células madres neuronales y hepáticas entre otras. A pesar de ello, gracias al potencial de la reprogramación en el Sistema Nervioso Central (SNC), cada vez se están llevando a cabo más experimentos en este campo.

De Fibroblastos A Células Neuronales

En enero de 2010, un grupo de investigadores liderados por T. Vierbunchen (T. Vierbunchen, A. Ostermeier et. al., 2010) publicaron en la revista *Nature* un artículo en el que planteaban poder convertir directamente los fibroblastos en neuronas.

Necesitaban razonar qué y cuántos factores de transcripción serían necesarios para la reprogramación de los fibroblastos. Para ello, clonaron un total de 19 genes bajo los siguientes criterios: su expresión debía ser específica de tejidos neuronales, debían tener un rol significativo en el desarrollo neuronal o debían estar implicados en la reprogramación epigenética.

Un *pool* de lentivirus conteniendo los 19 genes se preparó para infectar fibroblastos de ratón en estado embrionario, de genotipo TauEGFP. Haciendo que se expresase la proteína verde fluorescente específicamente en las neuronas (T. Vierbunchen, A. Ostermeier et. al., 2010).

El hecho de que no se encontrasen ninguna célula de ese tipo previamente a la infección, da a entender que, las que sí se encontrasen después de la reprogramación, serían células nuevas que se han generado gracias a la infección con los factores de transcripción. Rebajaron el número de genes combinados, dando con un conjunto de 5 factores de transcripción, (*Ascl1*, *Brn4*, *Myt1l*, *Zic1* y *Olig2*).

Con este cóctel de factores, tres días después de la infección *in vitro*, ya había células con morfología de neuronas inmaduras positivas para marcadores neuronales, desarrollando una morfología más compleja y madura al quinto día y alcanzando a partir del octavo día un número constante de neuronas inducidas.

A nivel electrofisiológico se vio que la altura del potencial de acción, el potencial de membrana basal y la capacitancia, entre otros factores, mostraban signos de madurez con el tiempo.

Tras muchos experimentos y reduciendo el cóctel de genes a 3 (*Ascl1*, *Brn2* y *Myt1l*), fueron capaces de generar neuronas tanto glutamatérgicas como GABAérgicas, morfológicamente fieles y con capacidad sináptica *in vivo*.

Cambio De Identidad En El Sistema Nervioso Central

En el Sistema Nervioso Central nos podemos encontrar muchos tipos de células, divididas en células de glía (neuroglia) y neuronas. Dentro de la neuroglía se encuentran los astrocitos (tipo celular en el que se centra este trabajo), los oligodendrocitos y la microglía.

Se vio que la expresión forzada de *Pax6* o *Ngn2* en cultivos de astrocitos purificados del neocortex de un ratón pocos días después de nacer es suficiente para convertir a los astrocitos en neuronas inmaduras *in vitro* (Heins et. al., 2002; Berninger et. al., 2007) (**Figura 3**)

Más adelante, los grupos de Götz y Berninger consiguieron mejorar la reprogramación dando lugar a neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas activas electrofisiológicamente, a partir de astrocitos de corteza, *in vitro* (Heins et. al., 2002).

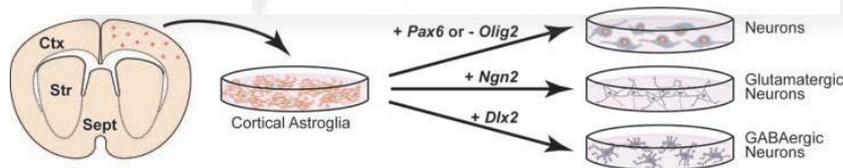


Figura 3: Reprogramación según los factores de transcripción aplicados a la Astroglia Cortical.

Fuente: Adaptación del artículo P. Arlotta et. al., 2014. *Programming and Reprogramming Neuronal Subtypes in the Central Nervous System*

Aunque las neuronas inmaduras que se generan no son capaces de diferenciarse completamente ni de dar lugar a sinapsis funcionales (Berninger et. al., 2007), esta limitación se vio superada por el uso de *Ngn2* o *Dlx2* en vez de *Pax6*. Así se pudo dirigir la reprogramación de los astrocitos de corteza hacia neuronas sinápticas de carácter tanto glutamatérgico como GABAérgico (Heinrich et. al., 2010).

Investigaciones sobre *Ngn2* han visto que este factor es suficiente para instruir ectópicamente el nacimiento de neuronas glutamatérgicas cuando es sobreexpresado en

ciertos progenitores del Sistema Nervioso Central, que normalmente dan lugar a neuronas GABAérgicas. (Wichterle et. al., 2001; Mattar et. al., 2008).

Los estudios de cambio de astrocitos a neuronas subrayan la poca manipulación necesaria de los factores de transcripción para una reprogramación directa de células diferenciadas del SNC a neuronas (P. Arlotta y R. Amamoto, 2013). (**Figura 4**)

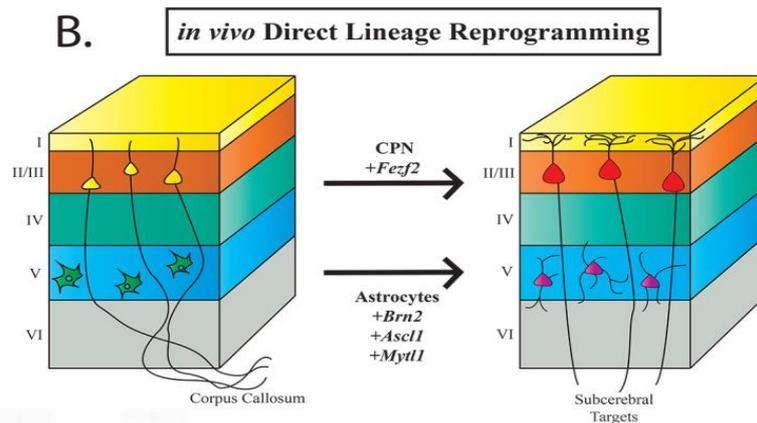


Figura 4: Ejemplo de reprogramación directa *in vivo* de células somáticas a motoneuronas y de astrocitos en neuronas inducidas mediante la expresión de factores *Ascl1*, *Brn2* y *Myt1l*. Fuente adaptada: *Reshaping the brain: direct lineage conversion in the nervous system*, P. Arlotta et. al., 2013.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVO 1: Poner a punto y analizar un cultivo puro de astrocitos del tálamo, y compararlo con cultivos puros de astrocitos corticales, que ya han sido previamente descritos.

Se preparará un cultivo puro de astrocitos para conocer las diferencias entre las poblaciones talámicas y corticales, así como para saber si hay diferencias en su capacidad de reprogramación.

OBJETIVO 2: Comprobar la responsabilidad reprogramadora por parte del factor de transcripción, justificando que con sólo una infección no se reprograman los cultivos.

Cercioraremos que la reprogramación es debida al factor de transcripción, no únicamente al hecho de que sean infectadas, mediante el uso de un virus sin factor de transcripción.

OBJETIVO 3: Determinar las condiciones necesarias para reprogramar astrocitos talámicos en neuronas, usando como control los ya estudiados astrocitos corticales.

Se reprogramarán tanto astrocitos de corteza como de tálamo, para dar lugar a neuronas corticales y talámicas, comparando así la cantidad de células infectadas y reprogramadas, a la vez que sus marcadores. Para ello vamos a utilizar el gen *Ngn2*, que se ha visto suficiente para conseguir la reprogramación celular por sí mismo, sin necesidad de ser complementado con otros factores.

OBJETIVO 4: Analizar las diferencias en cuanto a eficiencia de reprogramación entre los cultivos de ambas regiones

El cerebro no está regido únicamente por un tipo de neuronas, sino que está poblado por neuronas que se encuentran en distintas regiones, como el tálamo y la corteza, con sus correspondientes marcadores y que conectan con diferentes dianas. Para poder estudiar la eficiencia de reprogramación en cada sitio, se cuantifica el porcentaje de neuronas con respecto al total de células infectadas. Una vez estimada la cantidad de células reprogramadas, los diferentes perfiles proteicos se encargan de definir las diferentes identidades de las células de cada entorno.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS DE RATONES ICR

El animal utilizado en los experimentos fue el ratón de fenotipo silvestre en fondo genético ICR (Institute of Cancer Research), a los 4 días de nacer.

Todos los animales de este trabajo fueron tratados según estipula la ley. Dado que no tengo el título de experimentación animal, las partes de los experimentos con animales vivos las realizaron los integrantes del laboratorio.

2. VIRUS PARA LA INFECCIÓN DE ASTROGLÍA

Para la infección de astroglía se generarán retrovirus, a partir de células HEK 293T y tres plásmidos: dos para la cápsula y uno que conformará el genoma del virus.

La infección se hará con dos construcciones diferentes, una con el gen encargado de la reprogramación, *Ngn2*, y otra sin el gen. Esta última construcción nos servirá como control para saber la capacidad de infección del virus.

a. CAG-Ngn2-IRES-TauGFP

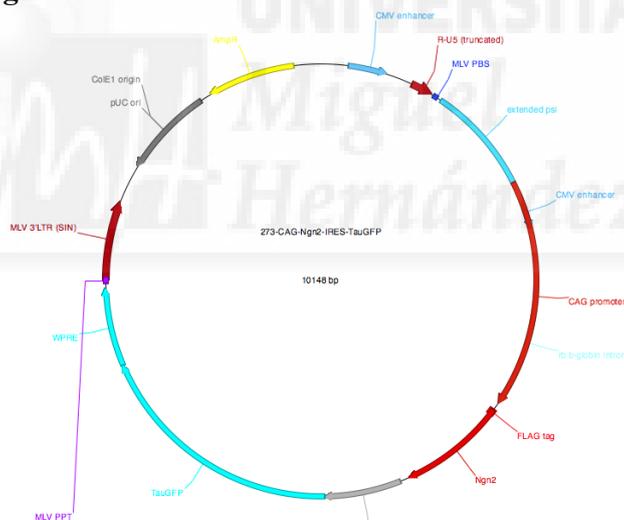


Figura 5: Plásmido contenedor del gen de reprogramación. Se pueden apreciar el promotor CAG (rojo), *Ngn2* (morado), la secuencia IRES (gris claro), TauGFP (turquesa bajo izquierda), el origen de replicación (gris oscuro), la resistencia a Ampicilina (amarillo), PBS (azul oscuro) y la secuencia psi (turquesa arriba derecha).

En la **Figura 4** podemos ver la construcción del plásmido utilizado para la infección de la glía. Los fragmentos del plásmido permiten:

- **CAG:** Promotor constitutivo, mediante el cual se va a regir la expresión de *Ngn2*.
- **Ngn2:** El gen encargado de la reprogramación de los astrocitos a neuronas.

- **Secuencia IRES:** Secuencia que tiene función de ‘puente’, permitiendo que continúe la transcripción una vez se ha terminado de leer el *Ngn2*.
- **TauGFP:** Proteína Tau que se asocia a los microtúbulos axonales, unida a una proteína fluorescente verde.
- **Origen de replicación:** Lugar donde comienza la replicación del plásmido.
- **Resistencia a Ampicilina:** Utilizada para la selección de colonias bacterianas transfectadas.
- **La secuencia psi:** Señal de empaquetamiento que mete al plásmido dentro de la cápside.

b. CAG-IRES-TauGFP

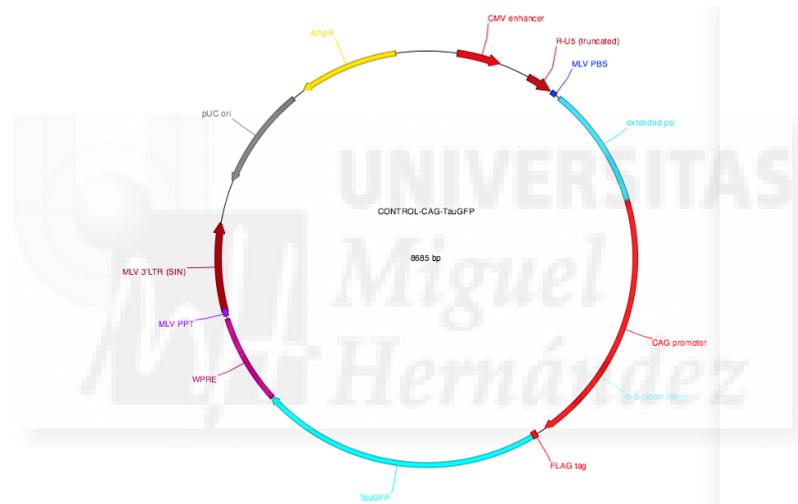


Figura 6: Plásmido control. Se pueden apreciar el promotor CAG (rojo), la secuencia IRES (gris claro), TauGFP (turquesa abajo izquierda), el origen de replicación (gris oscuro), la resistencia a Ampicilina (amarillo), PBS (azul oscuro) y la secuencia psi (turquesa arriba derecha).

Lo único que diferencia a esta construcción de la explicada anteriormente, es la ausencia de gen reprogramador. Esto va a dar lugar a que las células infectadas con este virus no van a ser capaces de transformarse, únicamente mostrarán un color verde debido a la *TauGFP*.

3. CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROGLÍA CORTICAL Y TALÁMICA POSTNATAL

a. Obtención del cultivo primario

Tras extraer el cerebro del ratón al 4 día de nacer, se realiza una incisión por la línea media, dividiendo el cerebro en los dos hemisferios. Una vez tenemos las dos mitades, se pasa a la disección de las zonas necesarias para el cultivo: Corteza y Tálamo. (**Figura 7**)

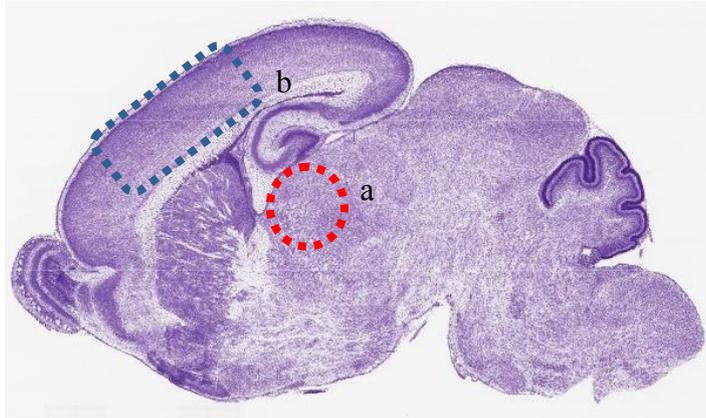


Figura 7: Corte sagital de un cerebro de ratón P4. Tálamo señalado en rojo (a) y corteza en azul (b).

Fuente: <http://developingmouse.brain-map.org/experiment/siv?id=100033295&imageId=100863388&initImage=nissl>

Para poder hacer los cultivos necesitaremos tálamos de tres cerebros distintos, y corteza de un cerebro y medio, debido a que el tálamo es una zona mucho más pequeña que la corteza.

Los bloques de células se disocian mecánicamente con la pipeta en tampón KREBS frío, una solución que contiene NaCl, KCl, NaH₂PO₄, MgCl₂, CaCl₂ y agua destilada y autoclavada.

Después son centrifugados en tubos *Falcon*(*Sigma*) de 15 mL durante 10 minutos a 1.000 rpm, resuspendidas y plaqueadas en botellas de cultivo de 25cm² en el medio de cultivo. Este medio se compondrá de DMEM/F12 (*Gibco*), 3,5 mM de Glucosa (*Sigma*), 10% de suero fetal de ternero (*Gibco*), 5% de suero de caballo (*Gibco*), y suplementado con B27 (*Gibco*), 10 ng/mL de factor epidérmico de crecimiento (EFG, *Roche*) y 10 ng/mL de factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF2, *Roche*).

Una vez el cultivo está confluyente, se preparan cubreobjetos circulares de 12mm² redondos con polilisina (*Sigma*) dentro de placas de 24 pocillos (*BD Biosciences*). Se deja durante toda la noche a temperatura ambiente para que este sustrato se adhiera bien al cubre.

Al día siguiente, la polilisina se lava 4 veces con agua destilada autoclavada y se deja secar en la campana.

Para pasar los cultivos de las botellas de cultivo a los pocillos de las placas, se les da unos golpecitos a la cara donde estaban adheridos los astrocitos. Con esto lo que se consigue es despegar los progenitores y células que no son astrocitos del plástico, dejándolos flotando en el medio.

A continuación, se retira el medio, dejando únicamente a los astrocitos pegados a la base de la botella. Se hacen lavados con PBS a temperatura ambiente, para quitar los restos de medio que puedan quedar, dado que este inhibe la tripsina que se utilizará a continuación.

Una vez esté la botella sin medio y limpia, se echa 1ml de tripsina y se deja incubar durante 5 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo, se recogen las células que estén en la tripsina y se pasan a tubos *Falcon* de 15 mL, donde se añaden 3 mL más de medio (Se añaden 2n+1ml de la tripsina que haya en el tubo).

Centrifugamos a 1000 rpm durante 10 minutos para precipitar las células.

Se quita el sobrenadante y se resuspende en 1 mL de medio. A continuación se cuenta el número de células que tienes en cada uno de los tubos en cámaras de Neubauer. **(Figura 8)**



Figura 8: Cámara de Neubauer junto a contador.

En función del número de células que tengas, se diluye hasta conseguir tener 500,000 células/mL.

Una vez tenemos ese volumen final con la concentración requerida, cogemos 100µl de medio con células y le añadimos 400 µL de medio con proteínas específicas para astrocitos en cada pocillo. Este volumen se echa en las placas con los cubres que, previamente, se han

tratado con polilisina. Se dejan durante dos horas en el incubador para que las células se peguen al fondo.

Pasado el tiempo de incubación, se infectan las células con el virus. Al día siguiente se cambia el medio de astrocitos por medio neurobasal suplementado con glucosa 50mM, Penicilina/Streptomicina 100U/ml, Glutamax 1X y suplemento B27 al 2%. Esto se hace porque como hay astrocitos infectados que van a reprogramarse a neuronas, van a necesitar un medio de cultivo con las propiedades necesarias para que crezcan las neuronas.

Entre 7 y 8 días después de la infección (para darles tiempo a cambiar), las células se fijan con PFA al 4% durante 15 minutos. Se lavan a continuación con PBS para dejarlas listas para comenzar la inmunofluorescencia.

4. INMUNOFLUORESCENCIA

Tras realizar varios lavados con PBS, se procede a incubar las placas, durante una hora a temperatura ambiente, con una solución de bloqueo compuesto por 2% BSA (*Sigma*) y 0.1% Triton (*Sigma*) diluidos en PBS. Este paso se encarga de bloquear, gracias a la albúmina, las uniones inespecíficas con otras proteínas para evitar que los anticuerpos que vamos a utilizar hibriden con ellas y den lugar a señales falsas. Mientras tanto, el Triton se encarga de permeabilizar la membrana celular y permitir el paso de los anticuerpos que se utilizarán a continuación al interior de la célula. Una vez pasado el tiempo, se retira la solución de bloqueo y acto seguido se pasa a poner el anticuerpo primario (**Tabla 1**), diluido en solución de bloqueo, que se incubará siguiendo el método de la *Magic Box*.

Método magic box:

En una caja opaca, con una superficie esponjosa en el interior, es donde se incuban los anticuerpos. Se humedece la superficie esponjosa y se coloca una lámina de Parafilm, ocupando la superficie necesaria para la colocación de los cubres.

Una vez puesta, se colocan gotas de 12 μ L con los volúmenes y concentraciones adecuadas de anticuerpo en la solución de bloqueo, a lo largo del parafilm. Los anticuerpos que estén a una concentración de 1:1000 (GFP, Tuj1 y GFAP) se usarán a un volumen de 1.2 μ L por gota y de 1:500 (Vglut1, Vglut2 y GAD67) a 2.4 μ L por gota.

De cada una de las mezclas, se pipetea los 12 μ L necesarios para cada gota. Una vez puestas las gotas en el parafilm, se ponen encima (por la parte del vidrio en la que están las células) los cubres sobre su correspondiente gota.

Se deja la caja tapada en la nevera, a 4°C durante toda la noche, hasta el día siguiente.

ANTICUERPO PRIMARIO				
Epítopo	Paratopo	Hecho en	Concentración	Referencia
GFP	Anti-GFP	Pollo	1:1000	<i>AveslabsGFP1020</i>
TUJ1	Anti-TUJ1	Ratón	1:1000	<i>CovanceMMS435P</i>
GFAP	Anti-GFAP	Conejo	1:1000	<i>SigmaG9269</i>

Tabla 1: Datos de los anticuerpos primarios de la inmunofluorescencia.

Una vez pasado el tiempo de incubación del anticuerpo primario, este se retira, se vuelven a colocar los cubres con los cultivos en la placa de 24 pocillos y se hacen varios lavados de PBS para retirar los posibles restos de anticuerpo. Una vez se ha limpiado se procede a poner el anticuerpo secundario en solución de bloqueo, alcanzando un volumen total de 300µL por pocillo (**Tabla 2**). La incubación con el anticuerpo secundario se realizará durante dos horas a temperatura ambiente, tapado con papel de plata, evitando así que entre la luz y se desgasten los fluorocromos conjugados a los anticuerpos secundarios.

Tras la incubación, se retira el anticuerpo secundario y se procede a hacer lavados con PBS, eliminando los posibles restos que nos pudiesen dar lugar a fondo.

Para marcar el núcleo celular se incuba cada pocillo con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Se deja durante 3 minutos en la placa, también tapada, a temperatura ambiente.

Tras un par de lavados con PBS, se preparan los portaobjetos escribiendo los detalles de los cubres que se monten ahí. Se pone una gota de 7 µL de Mowiol(*Sigma*) por cada cubre que vaya a ir en el portaobjetos, dejando caer la parte del cultivo celular en contacto con el pegamento. Una vez seco, está listo para observarse en el microscopio.

ANTICUERPO SECUNDARIO					
Epítopo	Paratopo	Hecho en	Color	Concentración	Referencia
Anti-GFP (Pollo)	Anti-Pollo	Cabra	Verde (Al-488)	1:500	<i>Mol. Probes A11039</i>
Anti-TUJ1 (Ratón)	Anti-Ratón	Asno	Rojo (Al-546)	1:500	<i>Mol. Probes A10036</i>
Anti-GFAP (Conejo)	Anti-Conejo	Cabra	R. Lejano (Al-647)	1:500	<i>Chemicon</i>

Tabla 2: Datos de los anticuerpos secundarios de la inmunofluorescencia.

5. MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

Se utilizará el microscopio de fluorescencia *Leica DM500 B*, el cual tiene una cámara *Leica DFC550* y está conectado a un ordenador, desde el cual se tomarán las fotos utilizando el software *Leica Application Suite X*.

Se tomarán 10 fotos de cada cubreobjetos, en cuatro canales distintos (azul, verde, rojo y rojo lejano) con un objetivo de 20x. Estas fotos se tomarán para realizar más adelante cuantificaciones.

6. CUANTIFICACIÓN CELULAR

Para la cuantificación celular utilizaremos el programa *ImageJ*, que nos va a permitir contar el número de células positivas para cada marcaje.

7. ESTADÍSTICA

Para la realización de las estadísticas de este trabajo se utilizó el programa *Prisma GraphPad*, sometiendo los datos a los test:

- D'Agostino-Pearson omnibus normality test
- Shapiro-Wilk normality test
- Kolmogorov-Smirnov test with Dalla-Winkinson-Lillefor P value

También se realice un *t-test* no pareado y, dependiendo de si la distribución de los datos resulta ser normal o no, se realizará un test paramétrico o no paramétrico respectivamente.

RESULTADOS

Gran pureza en los cultivos de astrocitos

Cultivos celulares de astrocitos no infectados de ratones P4, tanto de región talámica como cortical, fueron utilizados como controles para conocer la pureza en astrocitos de los cultivos. El hecho de que estos cultivos no hayan sido infectados nos indica que ninguna célula ha sido reprogramada, por tanto, todas pertenecen al cultivo. Estas células han sido cultivadas en un medio específico de astrocito, favoreciendo así únicamente su crecimiento celular, y no el de las neuronas.

Se vio que estos cultivos no presentaban señal en los canales verde (VGFP) y rojo (Tuj1), donde se mostrarían la infección del virus y el axón neuronal respectivamente. En el caso de que se viese alguna señal de neuronas en el cultivo, estas vendrían del propio cultivo y no habrían sido reprogramadas. (**Figuras 9 y 10**)

La inmunofluorescencia de estos cultivos se realizó con anticuerpos Anti-VGFP, Anti-Tuj1 y Anti-GFAP (**Tablas 1 y 2**), usándose el DAPI para teñir los núcleos.

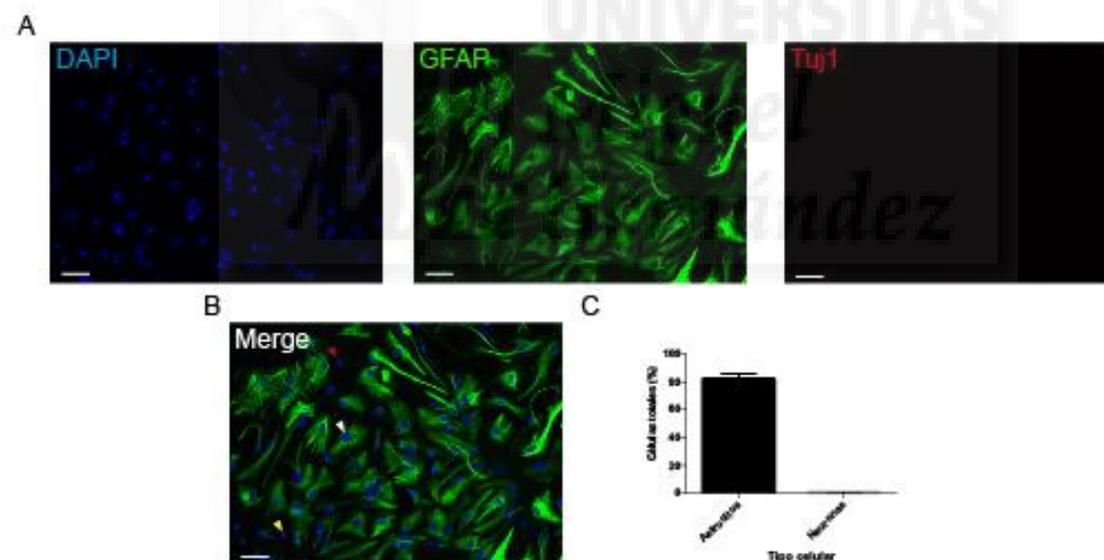


Figura 9: Comprobación de la pureza de los cultivos de astrocitos de Corteza. A) Imagen de la inmunofluorescencia de los astrocitos con las señales de DAPI, GFAP y Tuj1. B) *Merge* de los canales de DAPI, GFAP y Tuj1. C) Estadística comparativa de la cantidad astrocitos y neuronas en el cultivo. Realizada con la media del porcentaje de células de cada tipo celular, más menos el SEM (*Standard error mean*). Barra escala =50 μ m.

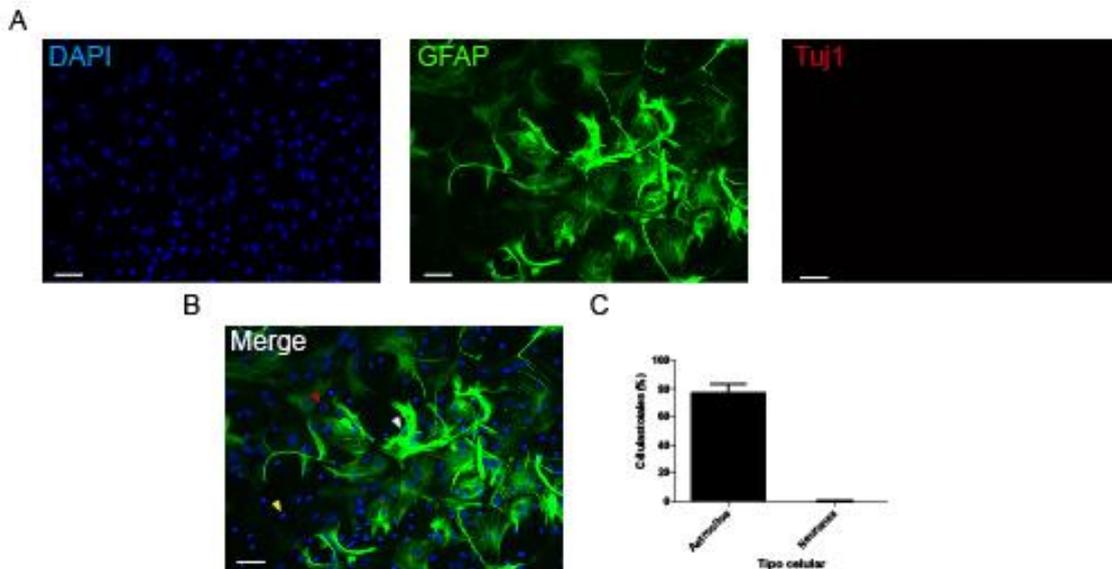


Figura 10: Comprobación de la pureza de los cultivos de astrocitos de Tálamo. A) Imagen de la inmunofluorescencia de los astrocitos con las señales de DAPI, GFAP y Tuj1. B) *Merge* de los canales de DAPI, GFAP y Tuj1. C) Estadística comparativa de la cantidad astrocitos y neuronas en el cultivo. Realizada con la media del porcentaje de células de cada tipo celular, más menos el SEM (*Standard error mean*). Barra escala =50 μ m.

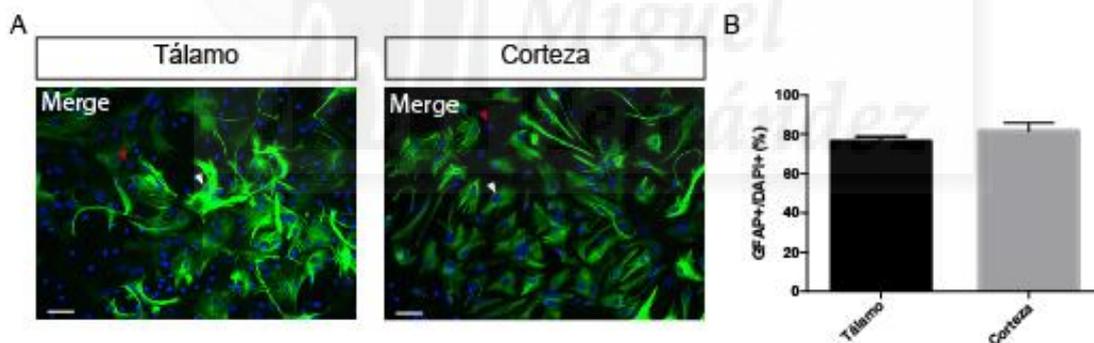


Figura 11: Comparación de la pureza de los cultivos de astrocitos de tálamo y corteza. A) *Merge* de los 3 canales del cultivo de tálamo y corteza. B) Grafica con la media del porcentaje de astrocitos de tálamo y corteza en cada cultivo, más menos el SEM (*Standard error mean*). Barra escala =50 μ m.

La diferencia entre el porcentaje de astrocitos de corteza y tálamo no resultó significativo (Corteza= 81.54% \pm 4.15, n=8, Tálamo=76.19% \pm 18.6, n=8; realizado un t-test no pareado paramétrico con un *P. value*= 0.29).

La infección de astrocitos de tálamo y corteza con una construcción sin factor de transcripción no reprograma las células

Los cultivos infectados con el virus con la construcción **CAG-IRES-TauGFP** (**Figura 7**) presentaron señal verde correspondiente al VGFP, así como señal en el rojo lejano que marcaba a los astrocitos, GFAP. No se observó señal alguna en el canal rojo, donde se debería expresar el marcador de neurona Tuj1.

Se observaron algunas señales celulares en el canal del marcador de astrocitos, que no se veían reflejadas en el canal correspondiente a la infección. Esas células se contaron como astrocitos no infectados. (**Figura 12**)

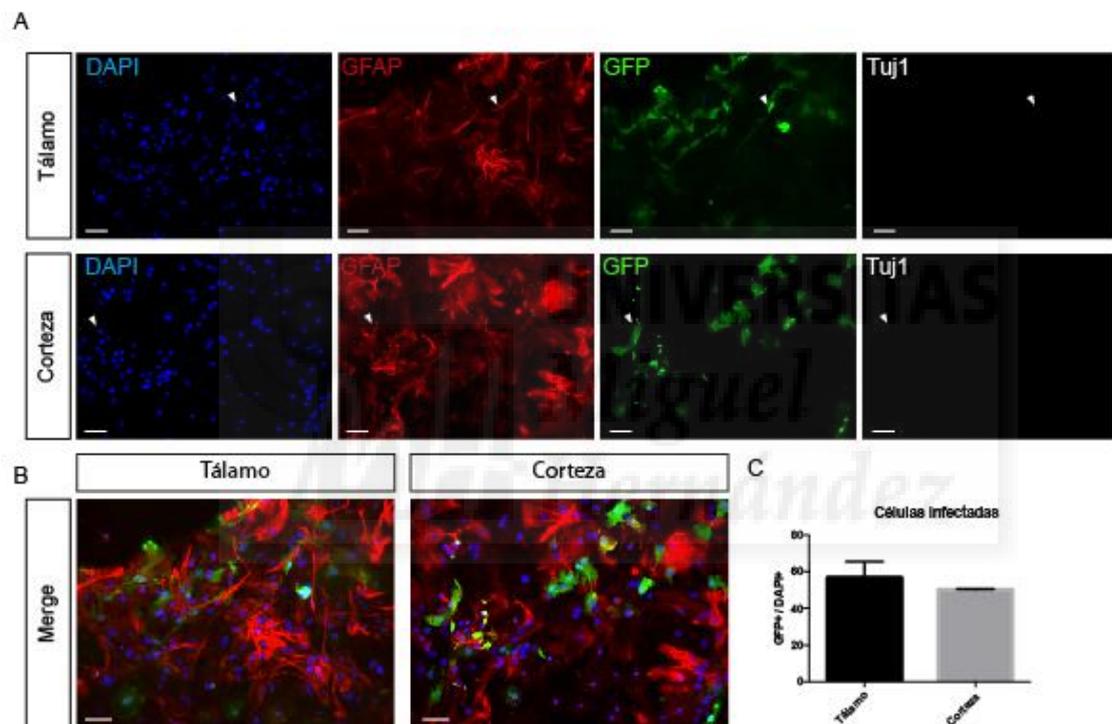


Figura 12: Astrocitos infectados con un virus con la construcción CAG-IRES-TauGFP. A) Imagen de la inmunofluorescencia de los astrocitos de tálamo y corteza con las señales de DAPI, GFAP, GFP y Tuj1. B) *Merge* de los canales de DAPI, GFAP y Tuj1 de los cultivos de tálamo y corteza. C) Estadística comparativa de la cantidad de astrocitos de tálamo y corteza infectados con la construcción CAG-IRES-TauGFP. Realizada con la media del porcentaje de células de cada tipo celular, más menos el SEM (*Standard error mean*). Barra escala =50 μ m.

La diferencia entre las células infectadas no ha sido significativa, por lo que se supone que la infección en las dos zonas es similar. (Corteza= 50.16% \pm 0.33, n=3, Tálamo=56.77% \pm 8.66, n=3; realizado el test de *Mann-Whitney* dado que tenía un n<5. *P. value*= 0.7).

Exitosa reprogramación celular de astrocitos hacia neuronas

Se vio que los astrocitos, tanto talámicos como corticales, son capaces de ser reprogramados en neuronas mediante una expresión forzada de *Ngn2*, usando como vector el retrovirus con la construcción **273-CAG-Ngn2-IRES-TauGFP** (**Figura 6**).

En las células infectadas con este virus se vio una morfología distinta a la de los astrocitos, además de ser positivos para el marcador neuronal Tuj1, una proteína beta-tubulina que marca el axón de las neuronas. (**Figura 13**).

Esa señal no se podía apreciar en los otros cultivos, donde no había habido una reprogramación al faltar el factor de transcripción.

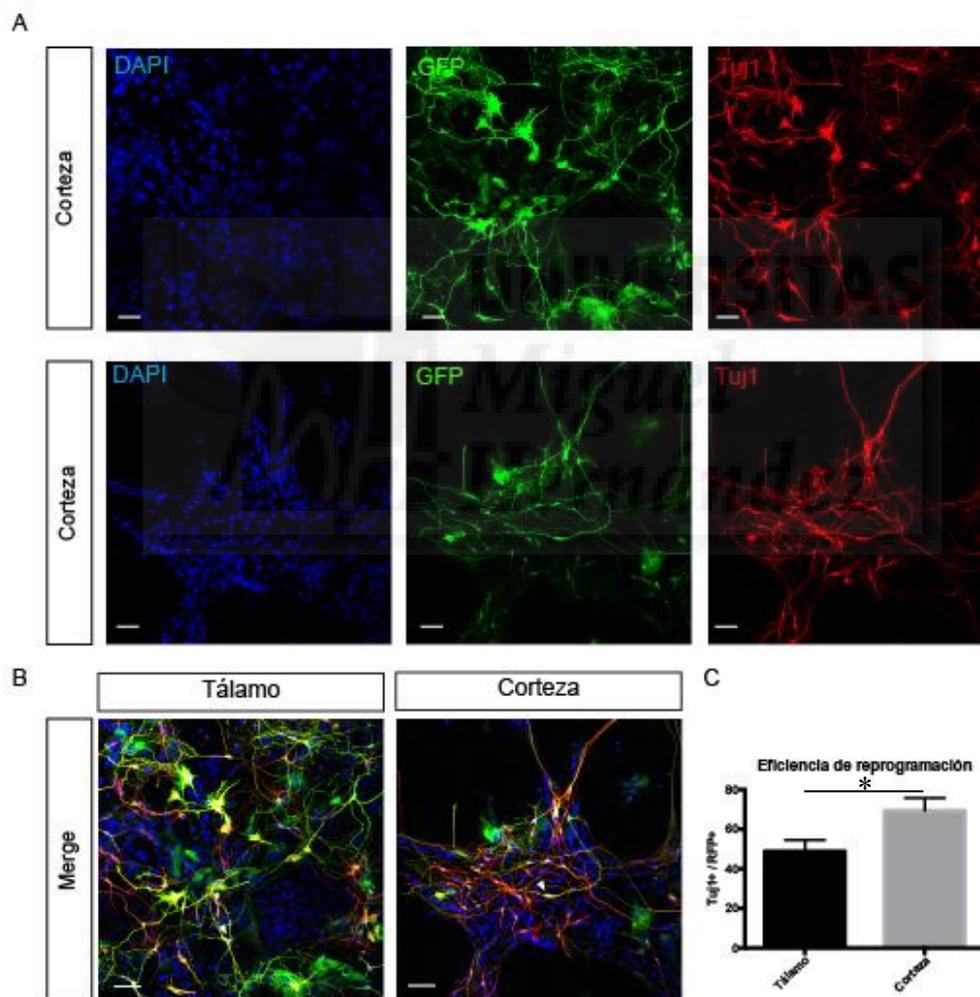


Figura 13: Astrocitos infectados con un virus con la construcción 273-CAG-Ngn2-IRES-TauGFP. A) Imagen de la inmunofluorescencia de los astrocitos de tálamo y corteza con las señales de DAPI, GFAP, GFP y Tuj1. B) *Merge* de los canales de DAPI, GFAP y Tuj1 de los cultivos de tálamo y corteza. C) Estadística comparativa de la cantidad de astrocitos de tálamo y corteza infectados con la construcción 273-CAG-Ngn2-IRES-TauGFP. Realizada con la media del porcentaje de células de cada tipo celular, más menos el SEM (*Standard error mean*). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$) Barra escala = $50\mu\text{m}$.

En este experimento se ha visto una significativa diferencia entre la reprogramación en los astrocitos de corteza y los de tálamo. (Corteza= $69.34\% \pm 6.49$, $n=5$, Tálamo= $48.97\% \pm 5.66$, $n=5$; realizado un t-test no pareado paramétrico con un *P. value* = 0.046). Esto quiere decir, que los astrocitos de corteza son más susceptibles a la hora de la reprogramación que los de tálamo.



DISCUSIÓN

Durante los últimos años, los avances en el campo de la reprogramación han supuesto un paso hacia posibles futuras restauraciones de células y circuitos neuronales. Enfermedades neurodegenerativas, daños cerebrales o privaciones sensoriales son posibles causas para la pérdida de estos circuitos neuronales.

Por ello se procedió a investigar sobre las posibilidades de reprogramación de astrocitos para dar lugar a neuronas. Para ello se tenía que obtener un cultivo puro de astrocitos, someterlos a una infección con el factor de transcripción encargado de la reprogramación, para más adelante analizar los resultados.

El protocolo para obtener un cultivo puro de astrocitos resultó ser exitoso, siendo casi un 80% astrocitos. Se identificaron más núcleos celulares que astrocitos, debido a la posible presencia de otros tipos celulares y astrocitos no vivos.

Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de *Ngn2* en astrocitos talámicos es suficiente para reprogramarlos a neuronas, sin necesidad de utilizar otros factores transcripcionales. Esto se comprobó gracias a que, después de la infección, las células mostraban una morfología diferente a la de antes de la infección, además de ser positivas para el marcador neuronal Tuj1.

Para finalizar, se comprobó que la eficacia de reprogramación en la corteza, era significativamente mayor que en el tálamo, con casi un 20% más de reprogramación.

CONCLUSIONES

- Los cultivos se obtuvieron con porcentaje de pureza de casi del 80% de astrocitos, sin señales de la presencia de neuronas.
- Se ha comprobado que el efecto de la reprogramación lo tiene el factor de transcripción, dado que hemos visto que esta no ocurre si infectamos las células con un virus sin factor de transcripción.
- No hay diferencias significativas en cuanto a la pureza ni a la infección del virus en las dos zonas. Sin embargo, si se ha podido observar una diferencia de capacidad de reprogramación significativa entre el tálamo y la corteza, viéndose esta última más reprogramada.

PROYECCIÓN FUTURA

Este proyecto puede ser complementado gracias a experimentos como:

- **Imágenes de calcio:** Obtendremos información sobre la funcionalidad de estas neuronas reprogramadas, pudiendo así compararlas con la actividad de calcio que tienen las neuronas del propio organismo, es decir, no reprogramadas.
- **Proteoma:** Analizando la expresión proteica de una neurona reprogramada, podemos compararlo con el de una neurona natural del cuerpo.
- **Conocer la identidad de las neuronas reprogramadas:** Mediante la realización de nuevas inmunofluorescencias podemos determinar si las neuronas que se generan son excitatorias o inhibitorias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amamoto, R., & Arlotta, P. (2013). *Reshaping the brain: direct lineage conversion in the nervous system*. 2016, de NCBI, PubMed Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768326/>
2. Bing Yu, Zhi-Ying He, Pu You, Qing-Wang Han, Dao Xiang, Fei Chen, Min-Jun Wang, Chang-Cheng Liu, Xi-Wen Lin, Uyunbilig Borjigin, Xiao-Yuan Zi, Jian-Xiu Li, Hai-Ying Zhu, Wen-Lin Li, Chun-Sheng Han, Kirk J. Wangenstein, Yufang Shi, Li-Jian Hui & Xin Wang. (2013). *Reprogramming Fibroblasts into Bipotential Hepatic Stem Cells by Defined Factors*. Julio 19, 2016, de ScienceDirect Sitio web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590913002750>
3. Erika C. Hayden. (2011, mayo 18). *Stem cells: The growing pains of pluripotency*. Nature, 473, 272-274. 2016, julio 27, De Nature Base de datos.
4. Garel, S.& López-Bendito,G. (2014, Agosto). *Inputs from the thalamocortical system on axon pathfinding mechanisms*. Current Opinion in Neurobiology, 27, 143-150.
5. GeneCardsSuite: *Human Gene DataBase* (s.f.) Recuperado el 02 de Noviembre de 2016. Página web: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NEUROG2>
6. Hedong Li, Gong Chen. (2016, Agosto 17). *In Vivo Reprogramming for CNS Repair: Regenerating Neurons from Endogenous Glial Cells*. CellPress, 91, 728-738. 2016, Agosto 24, De ScienceDirect Base de datos.
7. Heins, N., Malatesta. P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K., Hack, M., Chapouton, P., Barde, Y., & Götz, M.. (2002, Abril 05). *Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6*. Nature Neuroscience, 4, 308-315. 2016, Agosto 05, De F1000Prime Base de datos.
8. K. H. S. Campbell, J. Mcwhir, W. A. Ritchie & I. Wilmut. (1996, Marzo 7). *Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line*. Nature, 380, 64-66.
9. Magnusson,J. & Frisén, J. (2016). *Stars from the darkest night: unlocking the neurogenic potential of astrocytes in different brain regions*. Septiembre 17, 2016, de The Company of Biologists Sitio web: <http://dev.biologists.org/content/143/7/1075.long>

10. Minkel, J. R. (Junio 6, 2007). *Stem Cells from Skin Cells*. Agosto 19, 2013, de Scientific American Sitio web: <https://www.scientificamerican.com/article/stem-cells-from-skin-cells/>
11. Molnár, Z., & Blakemore, C. (1995, Septiembre). *How do thalamic axons find their way to the cortex?*. Trends in Neuroscience, 18, 389-397. 2016, Julio 28, De ScienceDirect Base de datos.
12. Rouaux C, Bhai S, Arlotta P.. (2012). *Programming and reprogramming neuronal subtypes in the central nervous system*. 2016, de NCBI Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22378700>
13. Thomas Vierbuchen, Austin Ostermeier, Zhiping P. Pang, Yuko Kokubu, Thomas C. Südhof & Marius Wernig. (2010, Febrero 25). *Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors*. Nature, 463, 1035-1041. 2016, Julio 22, De Nature Base de datos.
14. Walker, L. (1998). *Problemas de biología celular*. Santiago de Chile: Editorial Universitaria.
15. Yu Zhang, Nan Cao, Yu Huang, C. Ian Spencer, Ji-dong Fu, Chen Yu, Kai Liu, Baoming Nie, Tao Xu, Ke Li, Shaohua Xu, Benoit G. Bruneau, Deepak Srivastava & Sheng Ding . (2016). *Expandable Cardiovascular Progenitor Cells Reprogrammed from Fibroblasts*. Julio 27, 2016, de ScienceDirect Sitio web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590916000631>
16. Zhenga, J., Choib, K., Kanga, P., Hyeona, S., Kwona, S., Moona, J., Hwangb, I., Kimd, Y., Sik Kimd, Y., Sun Yoona, B., Parka, G, Leef, J., Hongb, S., & Youa, S. (2016, Julio 15). *A combination of small molecules directly reprograms mouse fibroblasts into neural stem cells*. ELSEVIER, 476, 42-48. 2016, Agosto 10, De ScienceDirect Base de datos.