

Trabajo de fin de grado



Diferenciación de la línea celular MED 17.11 a nociceptores

Imanol Rodrigo Quintanar

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Universidad Miguel Hernández de Elche

Curso 2016-2017

Director:

Dr. Antonio Vicente Ferrer Montiel

Tutora:

Maite Artero Morales

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Índice

Abreviaturas y Acrónimos	1
Resumen	3
Summary	3
Introducción	4
Nocicepción y dolor	4
Sistema Nervioso	5
Nociceptores, propioceptores y mecanorreceptores	5
Familia TRP	7
TRPV1	10
Antecedentes y objetivos	12
Materiales y métodos	13
Cultivo celular	13
Recogida de células	13
Extracción y aislamiento de ARN	14
Cuantificación de ARN	15
<i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	15
Imagen de calcio	17
Resultados	19
Diferencias morfológicas	19
Expresión de marcadores	20
Análisis de funcionalidad	23
Discusión	27
Conclusión y proyecciones futuras	30
Bibliografía	31

Abreviaturas y Acrónimos

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero.

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico Complementario.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

Brn3a: *Brain-specific homeobox/POU domain protein 3A*.

CGRP: Gen Relacionado con el Péptido de la Calcitonina.

DMEM: Medio de Eagle Modificado por Dulbecco.

DRG: Ganglios de la Raíz Dorsal.

KROX20/EGF2: Factor de crecimiento epidérmico 2.

FOXS1: Factor de transcripción *forkhead*.

FBS: Suero Bovino Fetal.

GDNF: *Glial cell line-derived neurotrophic factor*, Factor neurotrófico derivado de línea celular de glía.

HBSS: Solución Salina Equilibrada de Hank.

IBMC: Instituto de Biología Molecular y Celular.

Kv: Canales de potasio dependientes de voltaje.

MED 17.11: *Mouse Embryonic Dorsal Root Ganglion*.

NaV: Canales de sodio dependientes de voltaje.

NGF: Factor de Crecimiento Nervioso.

NGN1/NGN2: Factor de transcripción neurogenina 1/2.

P/S: Penicilina/Estreptomicina.

PB: Pares de Bases.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RT-PCR: Retrotranscripción seguida de una Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RUNX1/RUNX3: Factor de transcripción relacionado con Runt 1/3.

SDS: Dodecil Sulfato Sódico.

SNP: Sistema Nervioso Periférico.

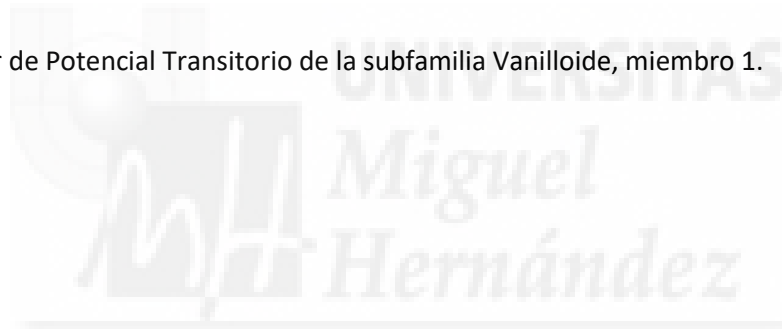
SNC: Sistema Nervioso Central.

SOX10: *SRY-related HMG-box*.

TrkA/TrkB/TrkC: Receptor de Tropomiosina Kinasa A/B/C

TRP: Receptor de Potencial Transitorio.

TRPV1: Receptor de Potencial Transitorio de la subfamilia Vanilloide, miembro 1.



Resumen

El ser humano es capaz de detectar este daño mediante la nocicepción, que es el proceso por el cual las fibras nerviosas aferentes (sensitivas) primarias del sistema somatosensorial detectan los estímulos nocivos. Estas fibras nerviosas aferentes son conocidas como nociceptores o receptores del dolor. La excitabilidad de estas neuronas nociceptivas se encuentra regulada por diferentes canales iónicos. Tanto estas terminaciones nerviosas encargadas de captar y procesar la señal de dolor, como los diversos canales iónicos que regulan su actividad, se han convertido en dianas terapéuticas con la finalidad de la creación de nuevos fármacos frente al dolor.

En este trabajo se ha diferenciado la línea celular MED17.11 a nociceptores. Se ha buscado la expresión de ARNm de algunos marcadores neuronales mediante técnicas de RT-PCR, aunque no se ha observado expresión de marcadores de nociceptores adultos. También se ha investigado la funcionalidad de TRPV1 mediante imagen de calcio, obteniendo alguna respuesta a capsaicina y ATP pero sin respuesta a despolarización por pulsos de KCl, indicándonos que el protocolo de diferenciación usado no se traduce en un fenotipo neuronal completo.

Para conseguir una expresión fija de marcadores de nociceptores adultos, así como funcionalidad neuronal estable, es necesario adaptar los protocolos de diferenciación para conseguir una diferenciación a nociceptores óptima.

Summary

The human are able to detect and prevent tissue damage through nociception, which is the process by which the primary afferent (sensory) nerve fibers of the somatosensory system detect harmful stimuli. These afferent nerve fibers are known as nociceptors or pain receptors. The excitability of these nociceptive neurons is regulated by different ion channels. Both these nerve endings in charge of capturing and processing the pain signal, as well as the various ion channels that regulate its activity, have become therapeutic targets for the purpose of creating new drugs against pain.

In this study the cell line MED17.11 has been differentiated to nociceptors. The expression of mRNA of several neuronal markers has been investigated by RT-PCR techniques, although expression of adult nociceptor markers has not been observed; and the functionality of the TRPV1 channels was examined by calcium image, obtaining few response to capsaicin and ATP but without response to KCl pulses, indicating that differentiated neurons lack in terms of action potential neuronal functionality.

To achieve expression of adult nociceptor markers as well as stable neuronal functionality, it will be necessary to customize the differentiation protocols for achieving proper nociceptor differentiation.

Introducción

Nocicepción y dolor

La capacidad del ser humano para detectar el dolor es indispensable para la salud y el bienestar del mismo, ya que se considera como una señal de alarma o de defensa de que nuestro organismo está siendo dañado. El dolor es una percepción localizada y subjetiva que puede ser más o menos intensa resultado de una excitación o estimulación de terminaciones nerviosas sensitivas especializadas con un posible o ya producido daño tisular. (Fernández-Carvajal et al. 2012).

Eliminando el componente subjetivo inherente al dolor, se encuentra la nocicepción, que es el proceso por el cual las fibras nerviosas aferentes (sensitivas) primarias del sistema somatosensorial detectan estímulos nocivos (Basbaum et al. 2009). Los nociceptores o receptores del dolor sólo responden a estímulos de naturaleza química, mecánica o térmica que provoquen cambios por encima del umbral. Existen dos tipos de anomalías dentro del dolor, el dolor crónico (dolor permanente) o la ausencia de percepción dolorosa. Referido a la ausencia de dolor, se incluyen dos cuadros clínicos bien diferenciados: cuando el estímulo doloroso no es transmitido adecuadamente al sistema nervioso central debido a un defecto en las vías sensitivas (insensibilidad congénita al dolor o analgesia congénita) y cuando la vía sensorial se encuentra íntegra pero el paciente no identifica el estímulo doloroso como desagradable (indiferencia congénita al dolor) (Vicente-Fatela et al. 2004). El dolor crónico se define como un dolor que se extiende más de 3 o 6 meses de su aparición o que se extiende más allá del período de curación de una lesión tisular. En esta patología, podemos encontrar el dolor crónico nociceptivo (producido por la activación de nociceptores en respuesta a un estímulo nocivo) y el dolor crónico neuropático (referido a un dolor que se origina debido a una lesión o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial). En el caso del dolor crónico neuropático, es referido a casos en los que no hay presencia de estímulos nocivos continuos pero la lesión nerviosa desencadena cambios en el sistema nervioso central (SNC), provocando que un dolor neuropático sea desproporcionado en comparación con el estímulo, como es el caso de la hiperalgesia. Otro ejemplo del dolor crónico neuropático es la alodinia, referido a una percepción anormal del dolor, nacido de un estímulo mecánico o térmico que de manera normal es indoloro. En esta patología, los nociceptores pueden activarse independientemente de que les llegue algún estímulo nocivo.

Sistema Nervioso

El sistema nervioso del ser humano, con su unidad funcional llamada neurona, es un sistema complejo. Trata de responder a todo estímulo externo con la mayor rapidez y coordinación gracias a la red neuronal en la cual se basa.

El sistema nervioso se divide en sistema nervioso central y sistema nervioso periférico. El sistema nervioso central (SNC) se define como el encéfalo, formado por el prosencéfalo o cerebro anterior (dividido en telencéfalo y diencefalo), el mesencéfalo o cerebro medio y el rombencéfalo o cerebro posterior (dividido en metencéfalo, formado por la protuberancia y el cerebelo, y el mielencéfalo, donde se encuentra el bulbo raquídeo) y la médula espinal. El sistema nervioso periférico (SNP) está formado por nervios y neuronas que se extienden fuera del sistema nervioso central hacia los miembros y órganos. Se puede dividir en el sistema nervioso periférico autónomo y somático.

El sistema nervioso periférico autónomo (SNPA) es la parte que controla las funciones viscerales del organismo y trata de mantener la homeostasia del organismo en respuesta a alteraciones tanto del medio interno como a estímulos exteriores, afectando directa o indirectamente a todos los órganos y sistemas (Barash et al. 2013). En cambio, el sistema nervioso periférico somático (SNPS) está constituido por receptores internos, que contribuyen a mantener la homeostasis del cuerpo, y por neuronas sensitivas. Estas neuronas llevan la información desde las terminaciones nerviosas especializadas (ubicadas en los órganos sensoriales donde captan la información del medio externo) hasta el SNC. El SNP se encuentra formado por los nervios espinales, formados por una rama sensitiva aferente y otra motora eferente, y los nervios craneales, que envían la información sensorial procedente del cuello y la cabeza hacia el sistema nervioso central (Young et al. 2012).

Nociceptores, propioceptores y mecanorreceptores

En esta rama sensitiva aferente es donde encontramos los nociceptores, terminaciones nerviosas que detectan las sensaciones de dolor y las transmiten al sistema nervioso central, además de los propioceptores y los mecanorreceptores. Los nociceptores se pueden dividir en dos tipos: nociceptores peptidérgicos, neuronas capaces de sintetizar péptidos que actúan como neurotransmisores o neuromoduladores de la actividad eléctrica u hormonal de otras neuronas, o nociceptores no peptidérgicos, neuronas incapaces de sintetizar estos péptidos. Los propioceptores informan acerca de la contracción y relajación de los músculos, además de la posición de los músculos respecto a sus músculos contiguos mediante el huso muscular, que detecta cambios en la longitud del músculo (Vanucci et al. 2017). Los mecanorreceptores nos informan acerca de estímulos mecánicos, tales como el tacto, la presión, la vibración o la tensión cutánea.

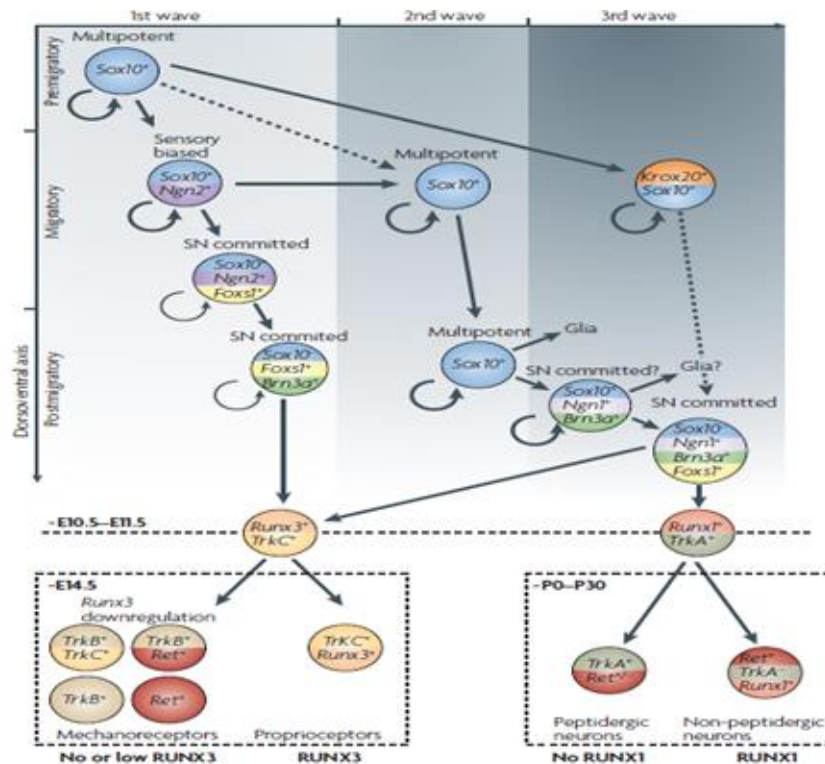


Figura 1. Diferentes cascadas de expresión génica que controlan la generación de neuronas y la especificación en los distintos tipos de receptores aferentes (Marmigère et al. 2007). Eje vertical: estado de la migración en el que se encuentran las células durante el desarrollo, así como la posición dorsoventral. E: día embrionario; P: día post-natal.

Las distintas cascadas de señalización provocan que una neurona vaya por una vía u otra. Existen dos vías (Figura 1), una mediada por el factor de transcripción neurogenina 2 (NGN2) y otra mediada por el factor de transcripción neurogenina 1 (NGN1). Ambos factores son necesarios para que se lleve a cabo la neurogénesis y la especificación de las neuronas sensoriales periféricas (Qiufu et al. 1999). NGN2 inicia la primera vía de la neurogénesis, concluyendo en la producción de solamente mecanorreceptores y propioceptores que expresen receptor de tropomiosina quinasa B y C (TrkB/TrkC); mientras que NGN1 inicia la segunda vía de neurogénesis, produciendo receptor de tropomiosina quinasa A (TrkA), pero también neuronas TrkB/TrkC.

En la primera vía de neurogénesis (Figura 1), células que expresan altos niveles de NGN2 serán en un futuro neuronas sensoriales, definidas por la expresión del factor de transcripción *forkhead* (*Foxs1*) durante la migración. Las células que pasan ya a un estado postmigratorio en la primera vía expresan *brain-specific homeobox/POU domain protein 3A* (*Brn3a*). Este factor, expresado en el inicio de la maduración neuronal (Doran et al. 2015) y durante todo el desarrollo a nociceptor, se requiere para la expresión de TrkC y el mantenimiento de TrkA y TrkB. Además, regula la expresión de TrkA

directamente mediante su unión al promotor *TrkA* por dos sitios distintos (Ma et al. 2003) y también está presente en otros procesos como el crecimiento axonal (Eng et al. 2001). Estas células que expresen *Brn3a* formarán neuronas propioceptoras y mecanorreceptoras una vez que expresen el factor de transcripción relacionado con Runt (*Runx3*, *runt-related transcription factor 3*) y *TrkC* en etapas tempranas del desarrollo neuronal (Chen et al. 2006).

En la segunda vía de neurogénesis (Figura 1), las células se caracterizan por expresar de manera continua *SRY-related HMG-box 10* (*SOX10*, factor de transcripción implicado en la regulación de *NGN1*) durante la migración y en los DRG, donde empiezan a dividirse a mayor velocidad (Montelius et al. 2007). Estas mismas células, cuando se encuentren en el estado postmigratorio, empezarán a expresar *Foxs1*, el cual tiene un rol importante en el procesamiento y la integración de las señales neuronales relacionadas con la pérdida de energía y la función motora (Heglin et al. 2005), *Brn3a* y *Ngn1*, antes de empezar a expresar los factores RUNX. Estas células producirían fenotipos neuronales tanto *TrkA+* y *TrkC+* por la expresión de *Runx1* o *Runx3*, respectivamente (Marmigère et al. 2006; Chen et al. 2006; Inoue et al. 2001).

La tercera vía (Figura 1) surge de una capa de células que expresan *Sox10* y el factor de crecimiento temprano 2 (*EGF2*, también conocido como *Krox20*), y que contribuyen a una población de neuronas y de glía *RUNX1/TrkA* (Maro et al. 2004).

La expresión de distintos genes de la familia RUNX, en especial *Runx1* y *Runx3*, expresados entre los días 10 y 12 embrionarios (Figura 1), controlarán el desarrollo de neuronas sensoriales a un tipo celular u otro: células que mantienen la expresión de *Runx3*, tendrán fenotipo *TrkC+* y se desarrollarán como propioceptores; células que reducen o eliminan la expresión de *Runx3* con fenotipo *TrkB+/TrkC+*, *TrkB+*, *Ret+* o *TrkB+/Ret+* se desarrollarán como mecanorreceptores; células que mantienen la expresión de *Runx1* con fenotipo *TrkA-/Ret+/Runx1+* se desarrollarán como nociceptores no peptidérgicos, mientras que células que eliminan la expresión de *Runx1*, con fenotipo *TrkA+/Ret+/-* se desarrollarán como nociceptores peptidérgicos.

Familia TRP

Existen muchos compuestos naturales que producen una supresión o una estimulación del dolor. Por ejemplo, la morfina o el ácido acetilsalicílico son supresores muy conocidos del dolor, pero algunas plantas generan compuestos que incitan al dolor (Julius. 2013). La capsaicina es un agente proalgésico que le da su gusto al chili picante. La capsaicina y otros compuestos vanilloides excitan selectivamente a neuronas sensoriales aferentes (Jancsó et al. 1977), dando lugar a una sensación de quemazón, acompañado de inflamación y vasodilatación local, además de una hipersensibilidad al

calor y, en algunos casos, también al tacto (Jancsó et al. 1967). Estas consecuencias nocivas son debido a que la capsaicina se une específicamente a uno de los canales de la familia de receptores de potencial transitorio (TRP), el receptor de potencial transitorio vanilloide (TRPV1).

Existen muchos otros proalgésicos, a parte de la capsaicina, que son agonistas de canales de la familia TRP, provocando la activación de estos receptores. Algunos ejemplos de ellos son el mentol, obtenido de la menta, responsable de la sensación de frío o temperaturas bajas; o compuestos como isotiocianato y tiosulfinato, que forman parte del wasabi y le dan su característico sabor picante (Bandell et al. 2004).

Además de la activación por unión de ligando (unión del proalgésico agonista), esta familia de canales tiene una gran variedad de mecanismos de *gating* (activación y desactivación del canal), incluyendo cambios en el voltaje y en la temperatura hasta modificaciones covalentes en sus residuos nucleofílicos (Nilius et al. 2011).

Estos receptores están presentes en todas las membranas celulares, con la excepción de la membrana nuclear y la mitocondria, pero, mayoritariamente, se encuentran en las membranas plasmáticas de casi todo tipo de célula en tejidos tanto excitables como no excitables (Nilius et al. 2011). La mayoría de los canales TRP son canales de cationes no selectivos, solo algunos son muy selectivos para calcio, y algunos son permeables a iones Mg^{2+} muy hidratados (Nilius et al. 2011), teniendo un rol esencial en la maquinaria transcelular que transporta Ca^{2+} , Mg^{2+} e iones metálicos traza.

La familia TRP son muy importantes para procesos fisiológicos, desde funciones sensoriales (como son la nocicepción o la sensación de la temperatura) y funciones homeostáticas (como la reabsorción del Ca^{2+} y Mg^{2+} o la osmorregulación) hasta funciones de movilidad como la contracción muscular y el control vasomotor (Nilius et al. 2011). Esto abre un abanico de posibilidades a la hora de generar estrategias para identificar y tratar diferentes subtipos de neuronas sensoriales que afectan de manera distinta a la nocicepción (Julius. 2013). Además, observando el mecanismo de acción de cada agonista, se pueden identificar proteínas y demás componentes que contribuyan al proceso de generación del dolor (Basbaum et al. 2009).

Se han caracterizado hasta el momento 7 subfamilias de canales TRP (Figura 2): TRPC (TRP-*Canonical*), TRPV (TRP-*Vanilloid*), TRPM (TRP-*Melastatin*), TRPP (TRP-*Polycystin*), TRPML (TRP-*Mucolipin*), TRPA (TRP-*Ankyrin*) y TRPN (TRP-*No mechanoreceptor potential C*),

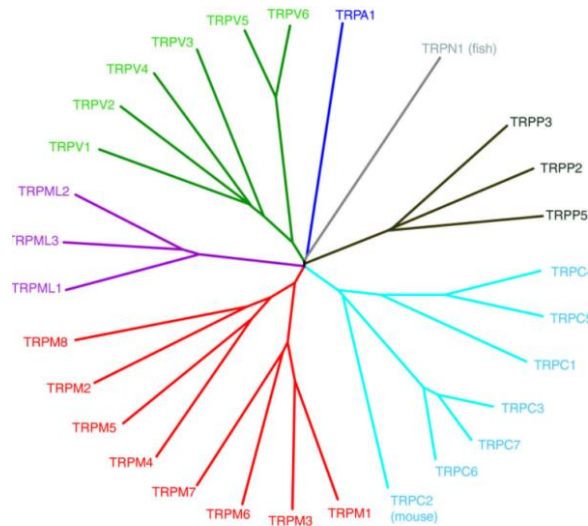


Figura 2. Árbol filogenético de los canales TRP (Nilius et al. 2011).

En esta familia, los distintos subtipos tienen una estructura con características comunes. Todos poseen 6 dominios transmembrana, además del lazo entre el 5º y 6º segmento transmembrana que forma el poro del canal, que permitirá la entrada o salida de los distintos iones. También todos estos canales tienen el N-terminal y el C-terminal intracelular (Minghui et al. 2011).

Dentro de la familia TRP, se encuentran 3 subfamilias (Figura 3) que se encuentran estimulados por la temperatura (Vay et al. 2012):

- Receptor vanilloide de potencial transitorio (TRPV): Dentro de esta subfamilia compuesta por 6 miembros, que respondan a temperatura encontramos TRPV1 y TRPV2, activados por temperaturas elevadas dolorosas (por encima de los 43°C) y TRPV3 y TRPV4, activados por temperaturas elevadas no dolorosas (entre los 30°C y los 40°C).
- Receptor de melastina de potencial transitorio (TRPM): Dentro de esta subfamilia compuesta por 8 miembros, que respondan a temperatura encontramos TRPM8, activado por temperaturas frías no dolorosas (entre los 20°C y 30°C).
- Receptor de anquirina de potencial transitorio (TRPA): Esta subfamilia está formada por TRPA1, que responde a temperaturas frías dolorosas (inferiores a 20°C).

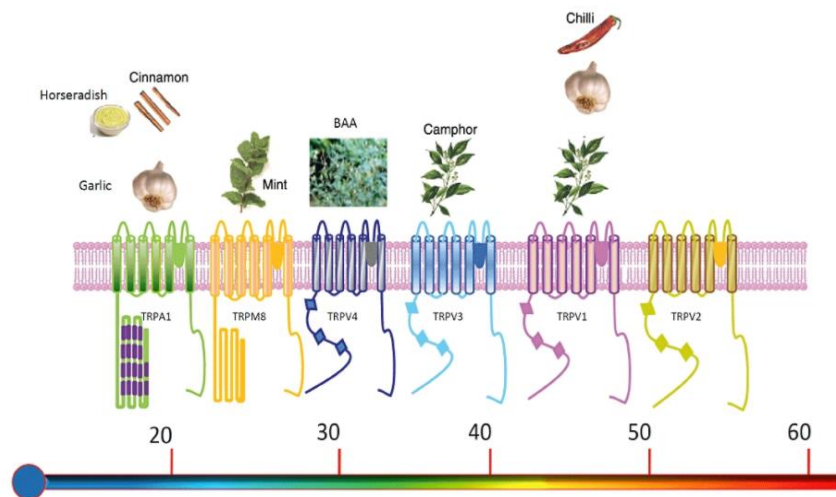


Figura 3. Esquema de los terorreceptores caracterizados, diferenciados por las distintas temperaturas a la cual responde cada uno, que forman parte de la familia TRP (Vay et al. 2012).

TRPV1

El receptor TRPV1 es un objetivo muy recurrente para el estudio y tratamiento del dolor, ya que se expresa en parte de las neuronas de la espina dorsal, así como en neuronas del ganglio del trigémino (Ahluwalia et al. 2000; Guo et al. 1999; Ichikawa et al. 2004; Michael et al. 1999). También se ha comprobado que en las aferencias primarias tanto somáticas como viscerales se expresa este canal, además de en las terminaciones espinales y periféricas (Avelino et al. 2002; Guo et al. 1999; Valtschanoff et al. 2001). TRPV1 es un importante integrador de las respuestas a mediadores inflamatorios. La sensibilización de TRPV1 durante el dolor crónico se cree que contribuye a que un estímulo que normalmente resultaría inocuo, provoque una señalización nociva que dará lugar a ese dolor (Immke et al. 2006).

En cuanto a su estructura (Figura 4), se trata de una proteína de alrededor de 95 kDa (Caterina et al. 1997). El N-terminal, el C-terminal y el amino terminal tienen 3 dominios repetidos de anquirina, además de 6 dominios transmembrana con un lazo intramembrana adicional que conectan los dominios quinto y sexto (Caterina et al. 1997).

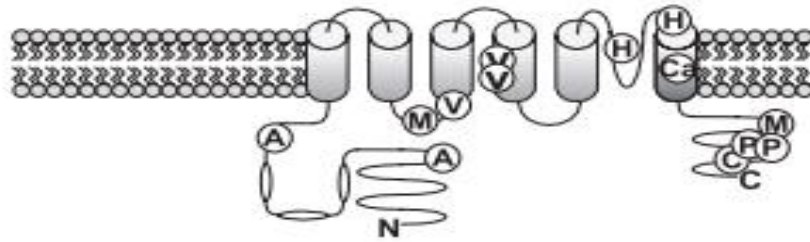


Figura 4. Estructura básica del canal iónico TRPV1 con la localización de los residuos involucrados en la unión a ligandos y las modificaciones post-traduccionales. V: residuos involucrados en la unión vanilloide, H: residuos en la unión de protones, A: residuos que son diana de PKA, C: residuos que son diana de PKC, M: residuos que son diana de CaMKII, P: residuos involucrados en la unión de PtdIns(4,5)P₂ (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato), Ca: residuo involucrado en la regulación de la permeabilidad al calcio. (Nagy et al. 2004)



Antecedentes y objetivos

En los últimos años han aumentado las investigaciones respecto a las dianas terapéuticas para tratamiento de patologías relacionadas con el dolor, así como la propia comprensión de la nocicepción y la percepción del dolor en mamíferos. Aun así, nos encontramos aún muy lejos de conocer plenamente los sensores de los estímulos nocivos, el rol de los nociceptores en el dolor fisiológico y patológico, y la modulación de las vías de señalización del dolor por mecanismos periféricos y centrales. Este aumento en el conocimiento acerca de la nocicepción es, en gran parte, gracias a la identificación de la familia de canales TRP durante estos últimos años, lo que ha provocado grandes avances relacionados con la hiperalgesia y la nocicepción termal (Dubin et al. 2010).

La mayoría de las investigaciones relacionadas con la nocicepción están basadas en neuronas DRG. Estas agrupaciones de somas se obtienen de ratón o rata, y presenta una serie de problemas a la hora de llevar a cabo los experimentos, debido a la gran cifra de animales que han de ser sacrificados, además de que el proceso que se lleva a cabo para obtener los nociceptores es muy lento, además de laborioso y complicado (Doran et al. 2015).

Para estudiar el mecanismo de regulación de las señales del dolor y el desarrollo del sistema nervioso periférico, se ha buscado un sistema de estudio *in vitro* que favoreciera la reducción de sacrificios animales para obtener cultivos primarios para este tipo de investigaciones. El grupo del Dr. Nassar del departamento de Ciencia Biomédica de la Universidad de Sheffield (Inglaterra) ha sido capaz de desarrollar una línea celular denominada MED17.11 (*Mouse Embryonic DRG*) usando la cepa de ratón Immortomouse, que expresa el antígeno T termolábil de un virus de simio. Esta línea, una vez cultivadas las células en un medio específico de diferenciación, es capaz de expresar marcadores maduros de neuronas DRG, así como canales iónicos que responden a compuestos nocivos y mediadores de la inflamación tales como capsaicina o ATP (Doran et al. 2015).

En cuanto a los objetivos de este trabajo como la reproducción de la diferenciación a nociceptores de la línea celular MED 17.11 cedida por el laboratorio del Dr Nassar. Esto incluiría el cambio de morfología de las células no diferenciadas al diferenciarse, la caracterización de la línea celular MED 17.11 y la obtención de nociceptores maduros capaces de expresar el canal iónico activado por ligando TRPV1.

Materiales y métodos

Este trabajo se ha fundamentado en el cultivo de MED 17.11 para la caracterización del proceso de diferenciación a partir del protocolo dado por los investigadores que desarrollaron dicha línea celular. Así, las MED17.11, originarias del laboratorio dirigido por el Dr. Nassar en el departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sheffield (Doran et al. 2015), fueron muy amablemente cedida al laboratorio del Dr. Antonio Vicente Ferrer Montiel.

- **Cultivo celular**

La línea celular MED17.11 requiere 3 medios de cultivo distintos, dependiendo de si buscamos el mantenimiento de las células o la diferenciación a nociceptores. Para el mantenimiento requeríamos un medio de cultivo compuesto por DMEM/F12 (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) enriquecido con Glutamax (Gibco), 10 % de FBS (Suero Bovino Fetal, Gibco), penicilina/estreptomicina (P/S) al 1 % (Gibco), 5 ng/ml de Interferón γ (Peprotech) y 0.5 % de Extracto de Pollo Embrionario (Seralab) a 33°C con 5% de CO₂, renovando este medio de mantenimiento cada 48 horas.

El proceso de diferenciación se dividía en dos etapas. Primero, cambiábamos las células a un medio al que denominamos medio basal, que servía como lavado del interferón presente en el medio de mantenimiento. En este medio, compuesto por DMEM/F12 enriquecido con Glutamax (Gibco), 10% de FBS (Gibco) y P/S al 1% (Gibco), las células estaban 24 horas en incubador a 37°C y 5% de CO₂. Tras el paso por medio basal, cambiábamos a medio de diferenciación, el cual estaba compuesto por: medio basal al que se añaden los factores de diferenciación Forskolina (25 μ M, Sigma), Dibutilil Adenosina-3',5'-Monofosfato (AMPC, 0.5 mM, Sigma), Factor de Crecimiento del Fibroblasto (FGF2, 10 ng/ml, Peprotech), Murine β -NGF (Factor de Crecimiento Nervioso, 100 ng/ml, Peprotech), Murine *Glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF, 10 ng/ml, Peprotech) e Y-67632 (5 μ g/ml, Tocris). Renovábamos el 50% del medio cada 48/72 horas y las mantenemos a 37°C y 5% de CO₂

Si quisiéramos sembrar las células en placa para experimentación, tratábamos la placa previamente con Poly-Ornitina (1 mg/ml) durante dos horas seguidas de 3 lavados con PBS (Tampón Fosfato Salino).

- **Recogida de células**

La recogida de células la realizábamos para un posterior lisado de las células. Tras este lisado y una serie de tratamientos, obteníamos las muestras de proteína y de ARN.

Primero retirábamos el medio de la placa de 6 pocillos donde se encontraban las células (no diferenciadas o diferenciadas), sembradas a 67500 células/pocillo. Después, procedíamos a lavar los pocillos mediante la adición de 2 ml de PBS frío, tratando de eliminar al 100% cualquier resto de medio. Esta adición la hacíamos entre 2 o 3 veces dependiendo de la cantidad de residuos de medio. Tras estos lavados con PBS, lo retirábamos y añadíamos 1 ml de PBS fresco por pocillo. Después, con el ml de PBS en cada pocillo, rascábamos todo el pocillo con una rasqueta hasta despegar todas las células y se quedaban en suspensión en el PBS. Recogíamos todo el PBS con las células y lo añadíamos a un eppendorf. Estos eppendorf, con el PBS y las células, los centrifugábamos durante 5 minutos a 7000 rpm (revoluciones por minuto).

Eliminábamos el sobrenadante, nos quedábamos con el pellet y lo congelábamos a -80°C para conservar el ARN en óptimas condiciones para su posterior extracción.

- **Extracción y aislamiento de ARN**

Para este proceso empleamos el kit E.Z.N.A. HP Total RNA KIT (Omega Bio-tek, Inc, Norcross, GA, EEUU). Primero, añadíamos GTC Lysis Buffer al eppendorf con la muestra (conservada a -80°C) para lisar las células, tanto no diferenciadas como diferenciadas.

El lisado obtenido era transferido a una columna (RNA Homogenizer Mini Column) colocada dentro de un tubo colector, centrifugando durante un minuto a 13000 g. Esto permitía separar los ácidos nucleicos, que eluían pasando al filtrado, de los residuos celulares (proteínas, membranas, etc.) que quedaban retenidos en la columna.

Se tomaba el filtrado y se le añadía un volumen equivalente de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Tras resuspender bien, los ácidos nucleicos eran transferidos a otra columna (HiBind RNA Mini Column), centrifugando a 10000g durante 1 minuto. Esto permitía separar el ARN del ADN, eluyendo el ADN y quedando el ARN retenido en la columna.

Se tomaba la columna y se le añadía un volumen de 500 μl de buffer de lavado I (*RNA Wash Buffer I*), centrifugando a 10000g durante 30 segundos. Esto permitía eliminar residuos que se encontraran junto al ARN.

Se tomaba la columna y se le añadía 500 μl de buffer de lavado II (*RNA Wash Buffer II*), centrifugando a 10000g durante 1 minuto. Se repetía el lavado con este buffer, centrifugando a máxima velocidad durante 2 minutos. Esto permitía eliminar al completo la presencia de residuos que pudieran interferir con la muestra de ARN.

Tras la última centrifuga, añadíamos 40-70 µl de agua tratada con DEPC (DiÉtil PiroCarbonato) y procedíamos a una última centrifuga a máxima velocidad durante 2 minutos. Por último, almacenábamos el ARN eluido a -80 °C.

- **Cuantificación de ARN**

El software del Nanodrop, aparato que calcula la concentración de ARN de la muestra y mide la absorbancia en un rango de longitudes de onda, nos devolvía un valor de la concentración, el valor del ratio 260/230 (ratio entre las absorbancias a 260 nm y 230 nm) y el valor del ratio 260/280 (ratio entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm). La longitud de onda de 280 nm es la longitud de onda donde las proteínas tienen su valor de absorbancia máximo, mientras que la longitud de onda de 230 nm es donde tanto los residuos de proteínas como los compuestos aromáticos tienen su valor de absorbancia máximo. 260 nm es la longitud de onda donde podemos encontrar los ácidos nucleicos.

El ratio 260/230 indica el nivel de contaminación de la muestra, considerando una muestra no contaminada aquella que tenga un valor mayor a 1.8; mientras que el ratio 260/280 indica el nivel de pureza de ácidos nucleicos respecto a proteínas, considerando una muestra pura aquella que tenga un valor, igual que en el ratio 260/230, mayor a 1.8.

- **Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)**

Esta técnica se utilizó para obtener ADN a partir del ARN obtenido del lisado de las células. Con este ADN, procedente tanto de cultivos no diferenciados como de cultivos celulares a distintos días de diferenciación, preparábamos una reacción buscando la expresión de ARNm de distintos marcadores neuronales.

Cada reacción de retrotranscripción se realizó a partir de 1 µg de ARN de cada muestra a analizar (cultivos no diferenciados y cultivos celulares a distintos días de diferenciación, así como ARN de DRGs que se emplearía más tarde como control). Empleado el kit de retrotranscripción de Applied Biosystems para la obtención del ADNc. Para una reacción, con volumen final de 50 µl, se necesitaban 5 µl de PCR Tampón II 10x (concentración final de 1x), 11 µl de MgCl₂ 25mM (concentración final de 5.5 mM), 10 µl mezcla de dNTPs 10 mM (concentración final de 2 mM de cada dNTP), 2.5 µl de hexámeros aleatoris 50 µM (concentración final de 2.5 µM), 1 µl de inhibidor de la ribonucleasa 20U/µl (20 U) y la transcriptasa inversa MuLV (*Multiscribe Reverse Transcriptase*) 50 U/µl (62.5 U de enzima en cada reacción). El volumen que faltaba hasta llegar a los 50 µl lo completábamos con agua libre de nucleasas.

Tras la síntesis de ADNc (ADN complementario) gracias a la retrotranscripción, se procedía a la PCR a tiempo final para lo cual preparábamos un mix que, para una reacción, incluía 10 µl de GoTaq® FlexiBuffer Green 5x (concentración final de 1x), 2µl de MgCl₂ 25 mM (concentración final de 2 mM), 0.5 µl de la mezcla de dNTPs 10 mM (concentración final de 0.2 mM para cada nucleótido), 1.25 µl del cebador forward 10 mM (concentración final 0.5 µM) y 1.25 µl del cebador reverse 10 mM (concentración final 0.5 µM). A este mix le añadíamos 2.5 µl del molde de ADNc (50 ng de ADNc), y, por último, 0.25 µl de GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) 5u/µl (1.25 U).

Probamos con varios protocolos distintos en el termociclador, con el fin de ajustar las condiciones buscando que éstas fueran las óptimas para la expresión de los genes de interés. El primer protocolo constaba de una desnaturalización previa de 95°C durante 2 minutos, seguida de una amplificación durante 30 ciclos usando 1 minuto a 95°C para la desnaturalización, 30 segundos a 60°C para la hibridación y 1 minuto a 73°C para la elongación. Tras estos 30 ciclos, se producía una elongación final a 73°C durante 3 minutos. En el segundo protocolo variábamos que en vez de 30 ciclos se llevaran a cabo 35, y la temperatura de hibridación la variábamos de 60°C a 57°C. El tercer protocolo era el llevado a cabo en el artículo en el cual se basa este trabajo (Doran et al. 2015), el cual constaba de una desnaturalización previa de 95°C durante 10 minutos, seguido de la amplificación durante 35 ciclos usando 45 segundos a 95°C para la desnaturalización, 30 segundos a 57°C para la hibridación y 30 segundos a 72°C para la elongación. Tras estos 35 ciclos, se llevaba a cabo una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Los cebadores empleados (Tabla 1) para cada marcador neuronal analizado fueron bien extraídos de bibliografía o bien diseñados con el programa online PrimerBlast (NCBI).

Tabla 1. Secuencia 5'-3' de cada pareja de cebadores sentido (FW) y antisentido (RV) empleados para cada marcador neuronal analizado.

Oligonucleótido	Tamaño de banda esperado	Tm°	GC%	Secuencia (5'-3')
Sox10_fw	304 pb	66.8	45.8	TGCTGCTATTCAGGCTCACTACAA
Sox10_rv		67.9	54.1	CAGGTATTGGTCCAGCTCAGTCAC
P75_fw	332 pb	70.0	50	GGGCACATACTCAGATGAAGCCAA
P75_rv		70.2	50	CAGCAGCCAAGATGGAGCAATAGA
FOXS1_fw	328 pb	70.2	56.5	GGCATCTACCGCTACATCATGGG
FOXS1_rv		67.6	52.1	ACAGTCTGCCAGTTGTGGTCTTG
Brn3A_fw	330 pb	67.5	54.1	CCACTTACTGAGGAGGGTGTGAGA
Brn3A_rv		69.1	45.8	TGTGACTCAACATTTATCCCCGGT
cRET_fw	324 pb	69.1	50	AGGAAATGTACCGTCTGATGCTCC
cRET_rv		68.9	50	TACAGAGAGTTGGGATGGTGCAGA
Runx1_fw	346 pb	68.9	54.1	GGTAGCGAGATTCAACGACCTCAG
Runx1_rv		69.5	50	ATCCTGCATCTGACTTTGAGGCTG
CGRP_fw	343 pb	70.6	57.1	CGCTCACCAGGAAGGCATCAT
CGRP_rv		69.0	56.5	GTTGTCCTTCACCACACCTCTG
TrkA_fw	348 pb	69.5	54.1	GGGAGTTGAGAAGCCTAACCATCG
TrkA_rv		69.4	50	CAGAGTCATTGGGCATCTGGATCT
TRPV1_fw	500 pb	63.03	57.14	ACATCTGGAAGCTGCAGCGAG
TRPV1_rv		63.03	60	TTGCGTCCCTCAGAAGGGGA
Nav1.7_fw1	317 pb	66.1	50	AGCAGGAAGAAGCCGAGGTAGTAT
Nav1.7_rv1		69.4	52.1	AATGCTGAGTGGTGACTGGTTGG
Nav1.7_fw2	350 pb	70.6	52.3	TTGCGTCCCTCAGAAGGGGA
Nav1.7_rv2		69.6	57.1	GCGAATGACTCGGAACAGGGT

- **Imágenes de calcio**

Esta técnica se basa en la medida del calcio intracelular. El calcio como segundo mensajero de la célula participa en numerosas cascadas de señalización y aumenta su concentración ante la activación de las células, por ejemplo, con la activación del canal iónico TRPV1 por su agonista, la capsaicina. Empleando sondas fluorométricas que se unen al calcio, como la sonda Fluo4 (usándola a una concentración de 6 μ M para incubar las células), es posible registrar un aumento de la concentración de calcio intracelular a través del aumento de fluorescencia y asociar éste con la activación celular. A través del equipo de imagen de calcio se registraban a lo largo del tiempo los cambios de fluorescencia. Con las medidas de fluorescencia, debido a la unión del calcio con la sonda, podíamos observar si existía funcionalidad en el canal TRPV1.

Para realizar los registros, las células eran sembradas a una concentración de 20000 células/ml sobre cristales de 12 mm de diámetro colocados en placas de 24 pocillos tratados con Poli-Ornitina.

Tomábamos una de estas alícuotas de la sonda Fluo4, y la resuspendemos en 1 ml de solución salina HBSS 1x (*Hank's Balanced Salt Solution*, 8.18 g/L de NaCl, 0.3 g/L de KCl, 0.05 g/L de CaCl₂ 2H₂O,

0.366 g/L de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.382 g/L de HEPES, 0.88 g/L de Glucosa y rellenar hasta 1 l con H_2O para dar lugar a 1 l de HBSS 1x) y 25 μ l de ácido plurónico al 20%. Añadimos 500 μ l de este mix a 2 pocillos vacíos, donde incluiríamos dos de los cristales para incubarlos en contacto con la sonda durante 1 hora a 37°C.

El protocolo seguido para la estimulación y análisis de la funcionalidad en células no diferenciadas y células diferenciadas a distintos días fue 1 minuto con solución externa (HBSS 1x), seguido de un pulso de un minuto de capsaicina 10 μ M, un pulso de un minuto de ATP 10 μ M y un último pulso de 1 minuto de cloruro potásico KCl 40 mM. Entre cada pulso, requeríamos de 4 minutos de lavado con solución externa HBSS.

El registro de fluorescencia se realizó a través de un microscopio invertido *Zeiss Axiovert 200* equipado con una cámara *ORCA-ERCCD*. La excitación de la sonda Fluo-4 se produjo a una longitud de onda de 500 nm, mientras que la fluorescencia emitida por la sonda al ser estimulada la filtrábamos con un filtro de paso largo a una longitud de onda de 535 nm.



Resultados

- **Cambios morfológicos**

A lo largo de este trabajo, el protocolo de diferenciación aplicado a las MED17.11 produjo a cambios morfológicos claros debido a la exposición a los distintos factores de diferenciación que provocaban la diferenciación a neurona sensorial. Al estar expuestos a distintos medios, los cultivos no diferenciados mostraban diferencias morfológicas respecto de los cultivos diferenciados (Figura 5). Además, el tiempo que estuvieran expuestos al medio de diferenciación también influía a la hora de observar diferencias morfológicas (Figura 6), de tal manera que, cultivos a día 3 de diferenciación iban a tener diferencias morfológicas respecto a cultivos a día 5, día 7 o día 9 de diferenciación.

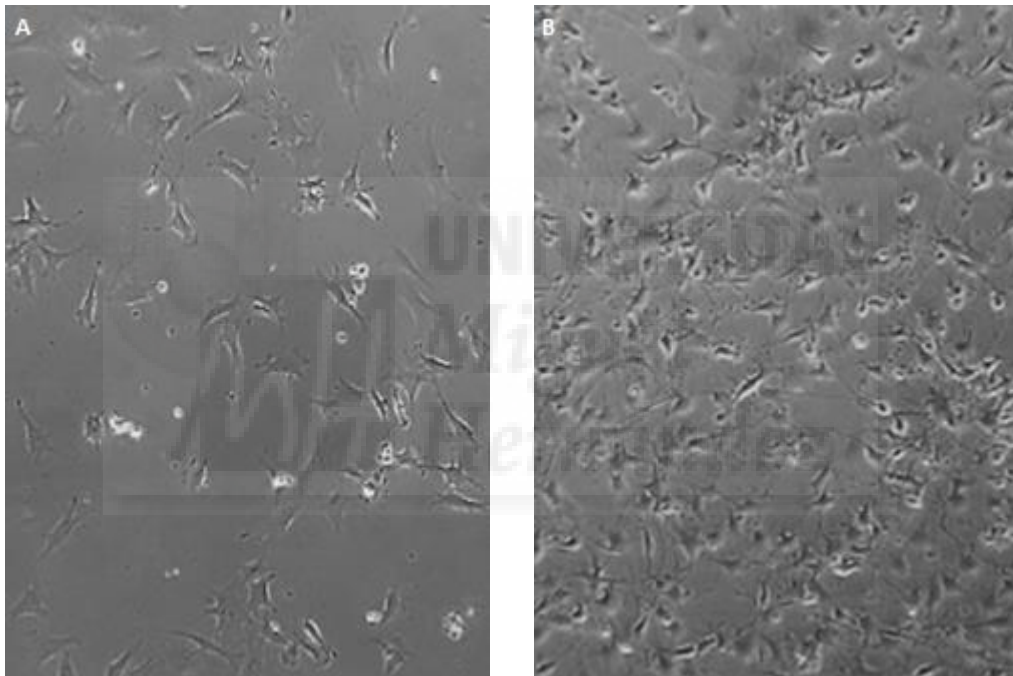


Figura 5. Células no diferenciadas frente a células diferenciadas. A: Cultivo de células no diferenciadas. B: Cultivo de células a día 7 de diferenciación. Imágenes tomadas desde microscopio Zeiss con el objetivo 20x.

En el cultivo de células no diferenciadas (Figura 5A), observamos que tiene una forma más redonda, una morfología menos neuronal y sin prolongaciones axónicas, de tipo casi fibroblástico. A día 7 de diferenciación (Figura 5B), observamos ya la morfología característica neuronal con un soma redondeado, además de las prolongaciones axónicas y dendríticas que forman una red de conexiones. También podemos observar que la confluencia es aún mayor que las células no diferenciadas.

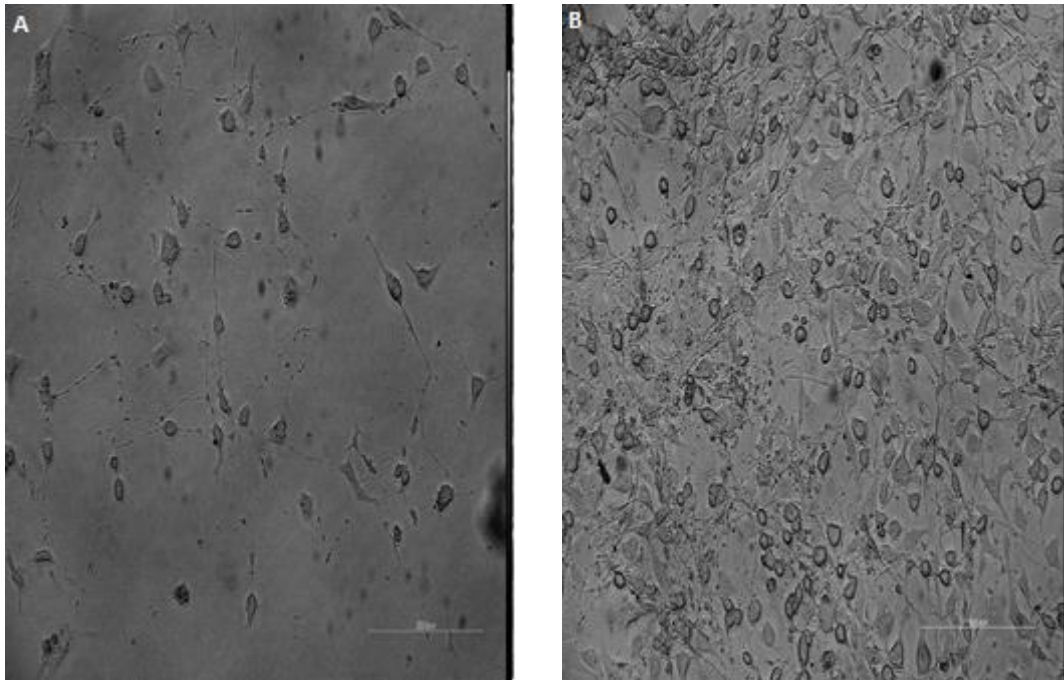


Figura 6. Cambios morfológicas entre cultivos celulares a distintos días de diferenciación. A: Cultivo de células a día 3 de diferenciación. B: Cultivo de células a día 9 de diferenciación (derecha). Imágenes a escala de 1:200 μm , tomadas con el microscopio Zeiss.

Teniendo siempre en cuenta la gran variabilidad tanto de número de células como de tamaño de cada una, a día 3 de diferenciación (Figura 6A), observamos una menor confluencia, así como una estructura menos neuronal, a pesar de ver los primeros inicios de axones y dendritas. En cambio, a día 9 de diferenciación (Figura 6B) observamos una confluencia mucho mayor, además de una forma más reconocible de neurona, pudiendo diferenciar los axones y las dendritas, y formando esa red de conexiones entre ellas.

- **Expresión de marcadores neuronales**

Tras la finalización del protocolo de diferenciación y la posterior recogida de células y extracción y aislamiento de ARN, se procedió a realizar RT-PCR para, primero, obtener el ADN a partir del ARN, y, segundo, amplificar este ADN para observar si existía expresión de diversos marcadores neuronales característicos de los nociceptores.

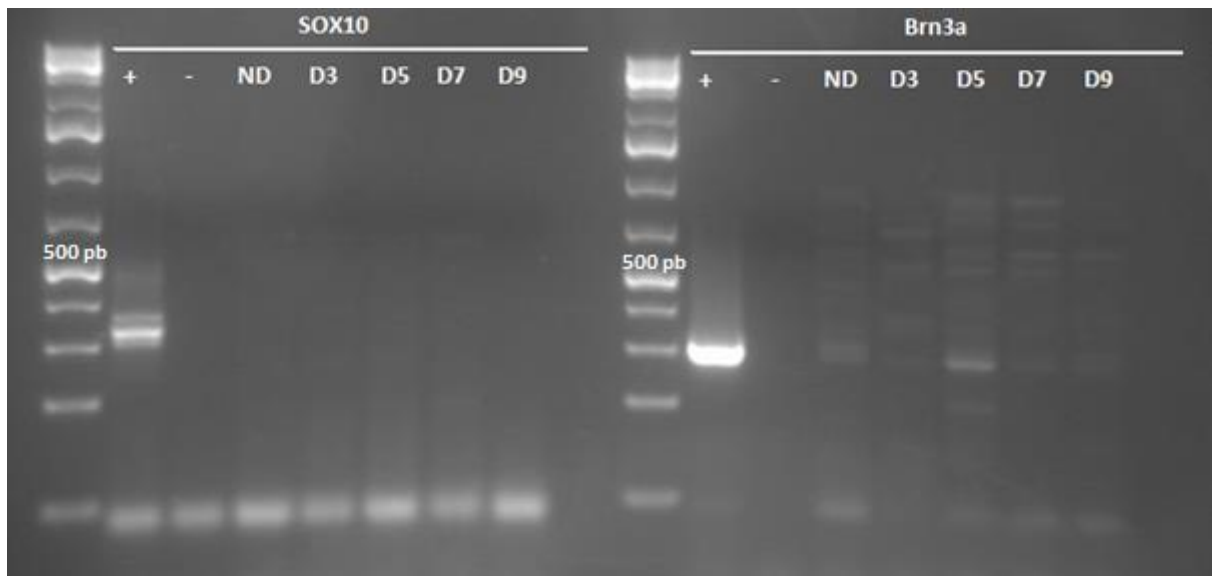


Figura 7. Expresión de los marcadores neuronales Sox10 (izquierda) y Brn3a (derecha). Electroforesis de PCR a partir de ADNc de MED 17.11 no diferenciadas (ND), diferenciadas a día 3 (D3), a día 5 (D5), a día 7 (D7) y a día 9 (D9). Control positivo (+) de DRG de ratón de 8 semanas y control negativo (-) agua.

El análisis de expresión de los marcadores neuronales implicados en el desarrollo de las DRG Sox10 (304 pb) y Brn3a (330 pb) mostró que, en el caso de Sox10 (Figura 7), ni las células diferenciadas ni las no diferenciadas expresaban dicho marcador. En el caso de Brn3a (Figura 7) se apreciaba una amplificación modesta en las células no diferenciadas, y diferenciadas a todos los días de diferenciación analizados, siendo esta amplificación más evidente a día 5 de diferenciación, sin embargo, además de las bandas esperadas, también se observaron amplificaciones inespecíficas.

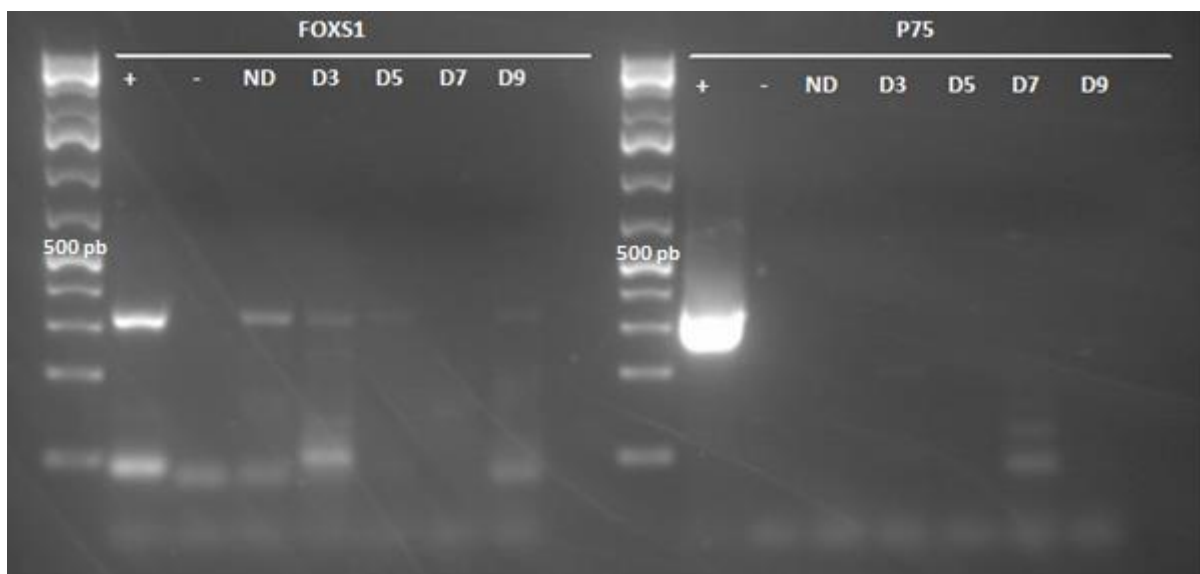


Figura 8. Expresión de los marcadores neuronales FOXS1 (izquierda) y P75 (derecha). Electroforesis de PCR a partir de ADNc de MED 17.11 no diferenciadas (ND), diferenciadas a día 3 (D3), a día 5 (D5), a día 7 (D7) y a día 9 (D9). Control positivo (+) de DRG de ratón de 8 semanas y control negativo (-) agua.

El análisis de expresión de los marcadores neuronales FOXS1 (328 pb) y P75 (332 pb) mostró que, en el caso de FOXS1 (Figura 8), tanto no diferenciadas como a todos los días de diferenciación expresaban dicho marcador, a excepción de la muestra a día 7 de diferenciación, siendo la amplificación más evidente en el cultivo no diferenciado. También podemos observar que existe una disminución de la expresión de este marcador conforme avanza la diferenciación. En el caso de P75 (Figura 8) no se apreciaba amplificación del marcador ni en células diferenciadas ni en no diferenciadas.

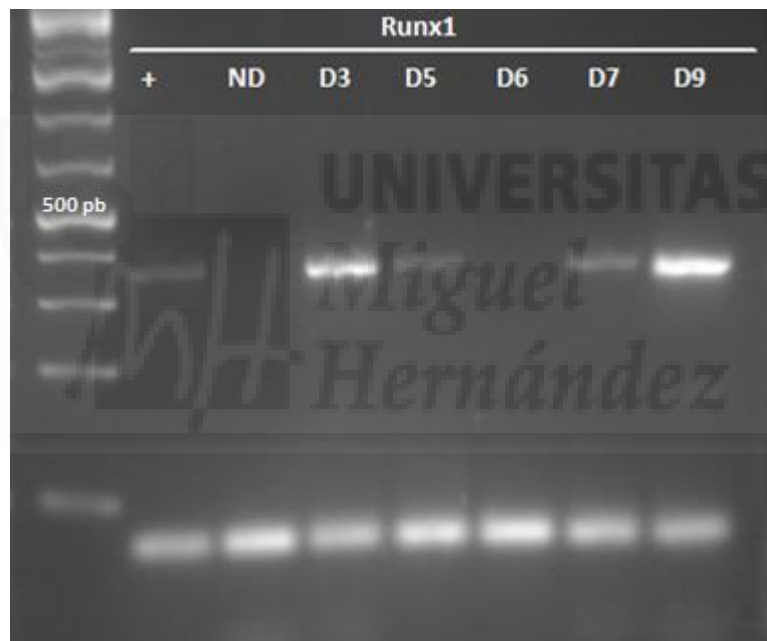


Figura 9. Expresión del marcador neuronal Runx1. Electroforesis de PCR a partir de ADNc de MED 17.11 no diferenciadas (ND), diferenciadas a día 3 (D3), a día 5 (D5), a día 6 (D6), a día 7 (D7) y a día 9 (D9). Control positivo (+) de DRG de ratón de 8 semanas.

El análisis de expresión del marcador neuronal implicado en el último paso previo a la diferenciación a nociceptor Runx1 (346 pb) mostró que existe expresión de dicho marcador en todos los cultivos de células diferenciadas, a excepción de a día 6 de diferenciación. En el cultivo de células no diferenciadas no se muestra amplificación de este marcador.

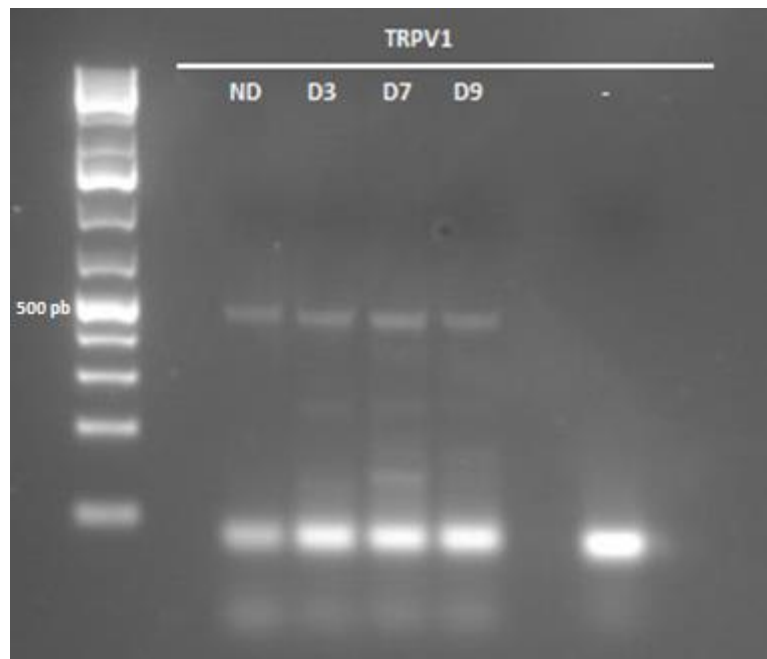


Figura 10. Expresión del marcador neuronal TRPV1. Electroforesis de PCR a partir de ADNc de MED 17.11 no diferenciadas (ND), diferenciadas a día 3 (D3), a día 7 (D7) y a día 9 (D9). Control negativo (-) de agua.

El análisis de expresión del marcador neuronal TRPV1 (500 pb) mostró que existe amplificación en todas las muestras analizadas, tanto no diferenciadas como diferenciadas.

- **Análisis de funcionalidad**

La búsqueda y confirmación de expresión del canal iónico TRPV1 en las MED17.11 en los análisis de RT-PCR llevó a tratar de analizar la funcionalidad de este canal y de las células en general, a través de imagen de calcio.

El protocolo constaba de 3 pulsos de 1 minuto: un primer pulso de capsaicina, un segundo pulso de ATP y un tercer pulso de cloruro potásico. Dejábamos entre 4 y 5 minutos entre pulso y pulso para la recuperación de las células. En este tiempo, se aplica buffer HBSS 1X para el lavado.

La aplicación de capsaicina, agonista de TRPV1, permitía evaluar la funcionalidad de este canal iónico. La aplicación de ATP, factor proinflamatorio, aunque más inespecífico, permitía comprobar la respuesta de las MED17.11 a agentes inflamatorios. Por último, el cloruro potásico, estímulo disparador de potenciales de acción en neuronas, provoca una despolarización en ellas, permitiéndonos evaluar la similitud de la línea celular MED17.11 con neuronas.

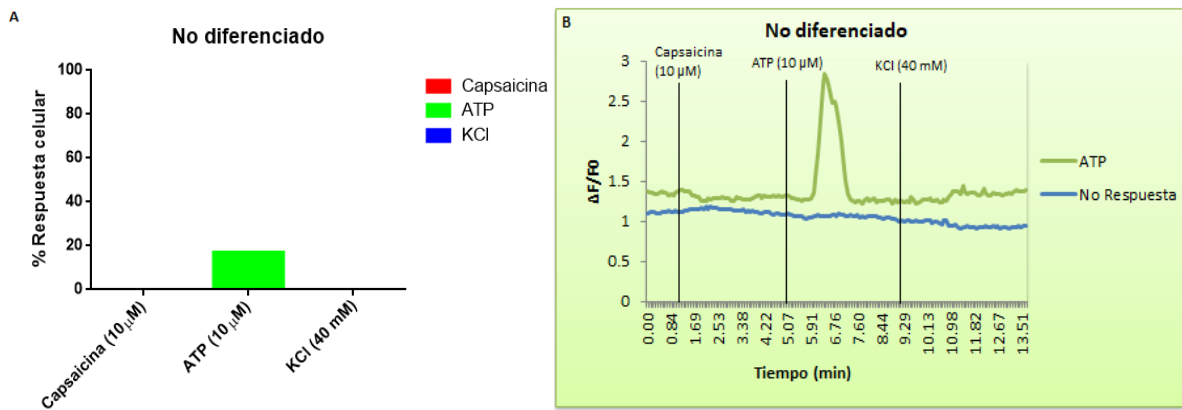


Figura 11. Porcentaje de células que responden a los pulsos de capsaicina, ATP y KCl (Figura 11A). Registros representativos de imagen de calcio para células MED17.11 no diferenciadas (Figura 11B). Cambio de fluorescencia normalizado (eje Y) a lo largo del tiempo del experimento en minutos (eje X) con la aplicación de un pulso de capsaicina (10 µM) al minuto 1, un pulso de ATP (10 µM) al minuto 5 y un pulso de KCl (40 mM) al minuto 10.

El análisis de funcionalidad de las MED17.11 no diferenciadas mostró que, mientras los estímulos de capsaicina y KCl no evocaban ninguna respuesta (Figura 11B), respondiendo el 0% de las células estudiadas (Figura 11A), éstas sí se veían estimuladas con la aplicación del ATP (Figura 11B), respondiendo un 17% de las células analizadas (Figura 11A).

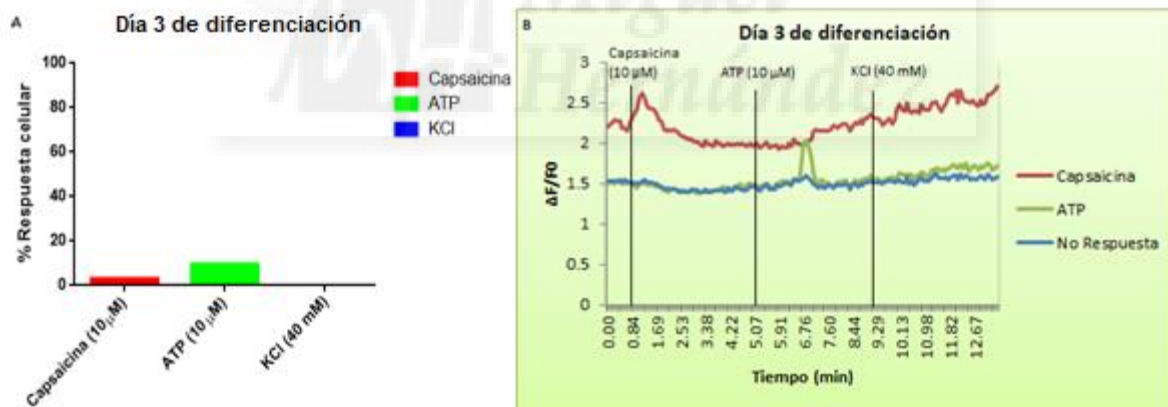


Figura 12. Porcentaje de células que responden a los pulsos de capsaicina, ATP y KCl (Figura 12A). Registros representativos de imagen de calcio para células MED17.11 a día 3 de diferenciación (Figura 12B). Cambio de fluorescencia normalizado (eje Y) a lo largo del tiempo del experimento en minutos (eje X) con la aplicación de un pulso de capsaicina (10 µM) al minuto 1, un pulso de ATP (10 µM) al minuto 5 y un pulso de KCl (40 mM) al minuto 10.

El análisis de funcionalidad de las MED17.11 a día 3 de diferenciación mostró que los estímulos de capsaicina y de ATP estimulaban a las células (Figura 12B), respondiendo un 3.23% y un 9.67% de las

células respectivamente (Figura 12A). En cambio, no se mostró ningún tipo de estimulación por el pulso de KCl (Figura 12B), sin obtener respuesta de ninguna célula (Figura 12A).

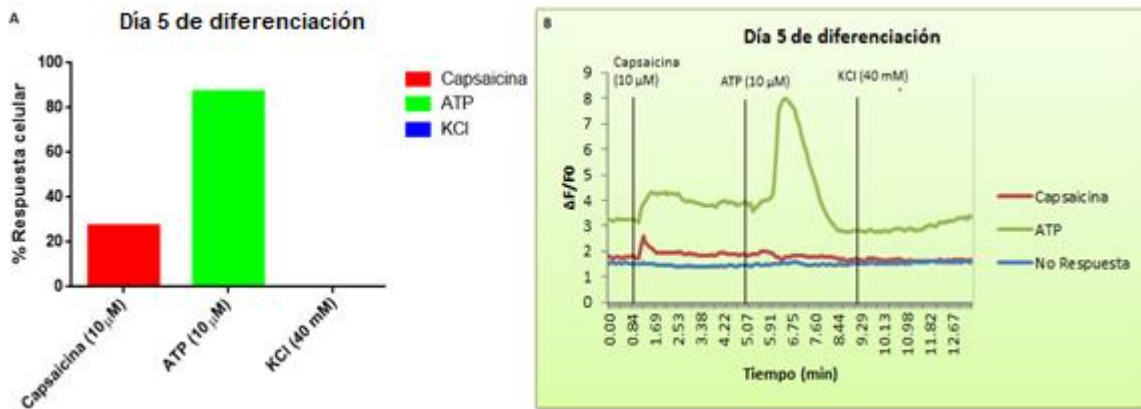


Figura 13. Porcentaje de células que responden a los pulsos de capsaicina, ATP y KCl (Figura 13A). Registros representativos de imagen de calcio para células MED17.11 a día 5 de diferenciación (Figura 13B). Cambio de fluorescencia normalizado (eje Y) a lo largo del tiempo del experimento en minutos (eje X) con la aplicación de un pulso de capsaicina (10 µM) al minuto 1, un pulso de ATP (10 µM) al minuto 5 y un pulso de KCl (40 mM) al minuto 10.

El análisis de funcionalidad de las MED17.11 a día 5 de diferenciación mostró que los estímulos de capsaicina y de ATP estimulaban a las células (Figura 13B), respondiendo un 27.3% y un 87.21% de las células respectivamente (Figura 13A). En cambio, no se mostró ningún tipo de estimulación por el pulso de KCl (Figura 13B), sin obtener respuesta de ninguna célula (Figura 13A).

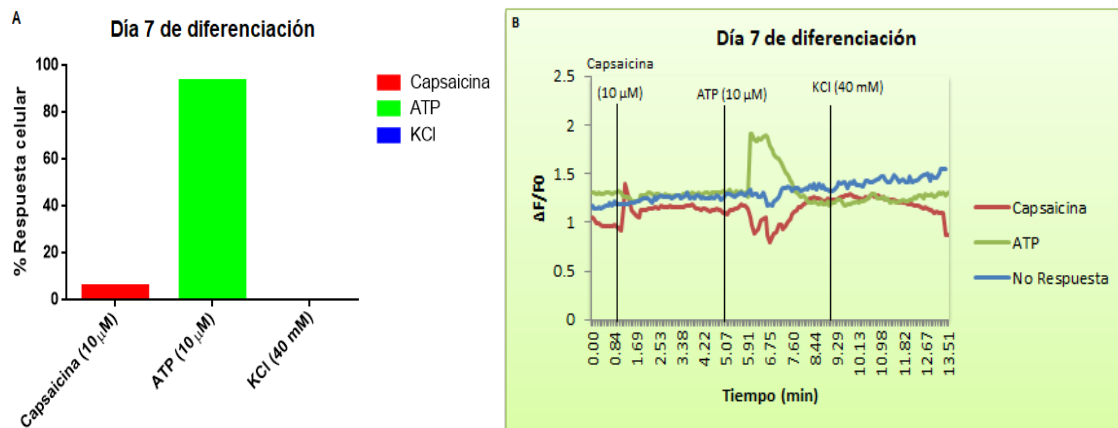


Figura 14. Porcentaje de células que responden a los pulsos de capsaicina, ATP y KCl (Figura 14A). Registros representativos de imagen de calcio para células MED17.11 a día 7 de diferenciación (Figura 14B). Cambio de fluorescencia normalizado (eje Y) a lo largo del tiempo del experimento en

minutos (eje X) con la aplicación de un pulso de capsaicina (10 μ M) al minuto 1, un pulso de ATP (10 μ M) al minuto 5 y un pulso de KCl (40 mM) al minuto 10.

El análisis de funcionalidad de las MED17.11 a día 7 de diferenciación mostró que los estímulos de capsaicina y de ATP estimulaban a las células (Figura 144B), respondiendo un 6.06% y un 93.51% de las células respectivamente (Figura 14A). En cambio, no se mostró ningún tipo de estimulación por el pulso de KCl (Figura 14B), sin obtener respuesta de ninguna célula (Figura 14A).



Discusión

Con la finalidad de obtener *in vitro* nociceptores maduros a partir de la línea celular MED17.11 se reprodujo el protocolo de diferenciación desarrollado por el grupo del Dr. Nassar (Doran et al. 2015). La consecución de este objetivo principal se determinó a partir del análisis de la expresión de marcadores neuronales y la funcionalidad de las células diferenciadas.

A partir de estos cultivos derivados de DRG, se busca forzar una neurogénesis, donde se generen nuevas neuronas a partir de células madre y células progenitoras (Birbrair et al. 2013), entendiendo células progenitoras como células madre que tienen la capacidad de diferenciarse en un solo tipo celular (Hsu et al. 2012).

Diferenciando entre la morfología de las células sin diferenciar y las células forzadas a la neurogénesis, hay cambios apreciables entre cultivos, además de variedad en la morfología y en el tamaño de las células en las distintas fases del proceso. En las células diferenciadas, se pueden observar principios de axones y dendritas, es decir, morfología similar a lo que sería una neurona DRG madura. Para este estudio tenemos en consideración que no hay cambios significantes entre la morfología de todos los distintos subtipos neuronales de DRGs (Repić. 2016),

Sin embargo, durante el proceso de diferenciación, pudimos observar que las neuronas seguían aumentando en número, continuaban duplicándose. Este suceso no debería ocurrir, ya que las neuronas maduras no siguen dividiéndose (Doran et al. 2015). Además, en estudios anteriores (McIntyre et al. 2010), se observó que conforme aumentaba el número de axones, llegando casi hasta a un exceso de axones, aumentaba la expresión de genes implicados en la inhibición del crecimiento. Este aumento de la confluencia observado a lo largo de los distintos días de diferenciación podría ser debido a que no todas las células entren en diferenciación al mismo tiempo, lo cual hace que un grupo se mantenga dividiéndose.

Respecto a los resultados de las PCR llevadas a cabo, en los cultivos de células no diferenciadas encontramos expresión de los marcadores Brn3a y FOXS1. Brn3a se expresa en el inicio de la maduración neuronal (Doran et al. 2015) y durante todo el desarrollo a nociceptor, ya que se requiere para la expresión de TrkC y mantenimiento de TrkA y TrkB (Ma et al. 2003), y para el crecimiento axonal (Eng et al. 2001). Este factor aparece en estadios previos al desarrollo a mecanorreceptor, propioceptor o nociceptor (Marmigère et al. 2007) por lo que es comprensible que aparezca expresión en células no diferenciadas. En el caso de FOXS1, tiene un rol importante en el procesamiento e integración de señales neuronales (Heglin et al. 2005), empezando a expresar este factor en los DRG (Marmigère et al. 2007), por lo que también es comprensible encontrar expresión

en células no diferenciadas. De este marcador, no observamos expresión en la muestra a día 7 de diferenciación, lo que podría estar provocado por una degradación de la muestra o un mal estado de la misma.

En cuanto a los cultivos de células diferenciadas, encontramos expresión de los marcadores Brn3a, FOXS1, Runx1, y TRPV1. Brn3a y FOXS1 se expresan durante todo el proceso, por lo que también aparecerá expresión de estos marcadores en cultivos de células diferenciadas. Runx1 tiene una alta expresión en nociceptores/termorreceptores inmaduros y, las células que expresen este gen, se desarrollarán con un fenotipo TrkA⁻, característico de nociceptores no peptidérgicos (Chen et al. 2006); por lo que se debe encontrar expresión en los cultivos de células diferenciadas. Esto último se cumple, a excepción de la muestra a día 6 de diferenciación, provocado por una degradación de la muestra o un mal estado de la misma. TRPV1 se ha comprobado que en las aferencias primarias tanto somáticas como viscerales se expresa este canal, además de en las terminaciones espinales y periféricas (Avelino et al. 2002; Guo et al. 1999; Valtschanoff et al. 2001). Este canal es un importante integrador de las respuestas a mediadores inflamatorios.

A parte de estos marcadores neuronales, también se analizó la expresión de P75. P75 es un receptor de neurotrofinas implicado en la apoptosis neuronal (Bamji et al. 1998) que se expresa tanto en NCC (*Neural crest cells*, células de la cresta neural) como en neuronas simpáticas (Doran et al. 2015).

Aunque se trataron de realizar análisis de expresión de proteínas a través de *Western blot*, no se obtuvieron resultados analizables. Algunas de las posibles razones que pudieron darse fueron que existiera una concentración demasiado baja en los cultivos celulares utilizados de células que expresaran este canal, por lo que se debería haber aumentado la concentración de extracto, o una posible inespecificidad del anticuerpo provocaron que no se obtuvieran resultados analizables y concluyentes.

Por último, referido a la imagen de calcio, se trató de estudiar la funcionalidad del canal TRPV1 en células que se encontraban a distintos días de diferenciación. A pesar de no obtener unos resultados concluyentes en cuanto a la expresión de proteína se refiere (*Western blot*), se obtuvieron buenas respuestas a los pulsos de capsaicina, activador específico de TRPV1, y a los pulsos de ATP, compuesto proinflamatorio que estimula una mayor variedad de células. En cambio, respecto a los pulsos de KCl, los cuales deberían evocar un potencial de acción en las neuronas de forma específica, no se obtuvieron resultados concluyentes, por lo que podemos concluir que carecemos de funcionalidad neuronal estable.

A partir de estos resultados, concluimos que la diferenciación no es óptima, además de obtener una variabilidad muy alta en los distintos experimentos. Además, no existe expresión de marcadores clave para un nociceptor maduro. Es posible que, a pesar de esta falta de expresión, otros genes con papeles similares se expresen a través de mecanismos compensatorios para mantener la similitud funcional con las neuronas periféricas *in vivo* (Yin et al. 2016).

A pesar de las publicaciones relacionadas con este trabajo, se ha de trabajar en los protocolos de diferenciación y entender el desarrollo neuronal resulta clave en este proceso de optimización.



Conclusión y proyecciones futuras

Este trabajo se ha basado en la reproducción de la diferenciación a nociceptores de la línea celular a MED17.11 (Doran et al. 2015). Como resultados, se obtuvieron diferencias morfológicas entre los cultivos celulares no diferenciados y diferenciados, así como la expresión de marcadores característicos identificada mediante las técnicas de RT-PCR y *Western blot*, centrándonos en TRPV1, del cual se comprobó la funcionalidad del canal mediante microfluorometría de calcio con pulsos de capsaicina.

Como conclusiones generales que se pueden extraer son:

- El protocolo de diferenciación aplicado da lugar a diferencias morfológicas evidentes. Las células no diferenciadas con aspecto más similar a fibroblasto adquieren una morfología de neurona bipolar característica de los nociceptores.
- A pesar del cambio morfológico no todas las células se diferencian por lo que continúan dividiéndose, dando lugar a una población muy heterogénea entre células maduras y precursores o inmaduras.
- Se observa expresión de algunos de los marcadores neuronales como TRPV1, a pesar de no encontrar la expresión de la proteína en el *Western blot*.
- Buscando la funcionalidad neuronal, centrándonos en la funcionalidad de TRPV1, se obtuvieron respuestas a estímulos de capsaicina y de ATP, pero no se obtuvo respuesta a KCl.

En cuanto a perspectivas futuras, la identificación futura de mecanotransductores en neuronas somatosensoriales ayudará e impulsará la dirección de la investigación hacia una mayor comprensión, tanto celular como molecular, de la hiperalgesia mecánica y la alodinia. La aplicación de tecnologías genéticas y enfoques farmacológicos (en ratones, para poder establecer hipótesis que, en última instancia, serían probadas en seres humanos) contribuirán al mejor entendimiento de la vías de señalización y del comportamiento celular frente a estímulos nocivos en estados normales y fisiopatológicos (Dubin et al. 2010).

Bibliografía

1. Fernández-Carvajal A, Fernández-Ballester G, Devesa I, González-Ros JM and Ferrer-Montiel A. New Strategies to Develop Novel Pain Therapies: Addressing Thermoreceptors from Different Points of View. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2012 Jan; 5(1): 16-48.
2. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009 Oct 16;139(2):267-84.
3. Vicente-Fatela L, Acedo MS. Pain reactivity disorders. *Rev Soc Esp Dolor* 2004; 11: 31-37.
4. Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. *Clinical anesthesia 7th edition*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
5. Young KA, Wise JA, DeSaix P, Kruse DH, Poe B, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Betts JG, Womble M et al. *Anatomy and physiology*. Apr 25, 2013. ISBN-10: 1938168135. ISBN-13: 978-1-938168-13-0.
6. Vannucci L, Falotico E and Laschi C. Proprioceptive Feedback through a Neuromorphic Muscle Spindle Model. *Front Neurosci*. 2017; 11; 341.
7. Qiufu Ma, Fode C, Guillemot F and Anderson DJ. NEUROGENIN1 and NEUROGENIN2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev*. 1999 Jul 1; 13(13); 1717-1728.
8. Ma L, Lei L, Eng SR, Turner E, Parada LF. Brn3a regulation of TrkA/NGF receptor expression in developing sensory neurons. *Development* 2003 Aug;130(15):3525-34.
9. Eng SR, Gratwick K, Rhee JM, Fedtsova N, Gan L, Turner EE. Defects in sensory axon growth precede neuronal death in Brn3a-deficient mice. *J Neurosci* 2001 Jan 15; 21(2): 541-9.
10. Chen CL, Broom DC, Liu Y, de Nooij JC, Li Z, Cen C, Samad OA, Jessell TM, Woolf CJ, Ma Q. Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron*. 2006;49:365–377.
11. Montelius A, Mamigère F, Baudet C, Aquino JB, Enerbäck S, Ernfors P. Emergence of the sensory nervous system as defined by *Foxs1* expression. *Differentiation* 2007 Jun;75(5):404-17. Epub 2007 Feb 16.
12. Heglind M, Cederberg A, Aquino J, Lucas G, Ernfors P, Enerbäck S. Lack of the Central Nervous System – and Neural Crest-Expressed Forkhead Gene *Foxs1* Affects Motor Function and Body Weight. *Mol Cell Biol* 2005 Jul; 25(13): 5616-5625.
13. Marmigère F, Montelius A, Wegner M, Groner Y, Reichardt LF, Ernfors P. The Runx1/AML1 transcription factor selectively regulates development and survival of TrkA nociceptive sensory neurons. *Nature Neurosci* 9, 2006; 180-187.

14. Inoue K, Ozaki S, Shiga T, Ito K, Masuda T, Okado N, Iseda T, Kawaguchi S, Ogawa M, Bae SC, Yamashita N, Itohara S, Kudo N, Ito Y. Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nat Neurosci* 2002 Oct;5(10):946-54.
15. Maro GS, Vermeren M., Voiculescu O, Melton L, Cohen J, Charnay P, Topilko P. Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of PNS. *Nat Neurosci* 2004 Sep;7(9):930-8. Epub 2004 Aug 22.
16. Julius D. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2013;29:355-84. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155833
17. Jancsó N., Kiraly E, Jancsó-Gábor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurons. *Nature* 1977 Dec 22-29;270(5639):741-3.
18. Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmac. Chemother* 1967. 31, 138-151.
19. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 2004 Mar 25;41(6):849-57.
20. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009 Oct 16;139(2):267-84. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.
21. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 2011;12(3):218. doi: 10.1186/gb-2011-12-3-218. Epub 2011 Mar 17.
22. Li M, Yu Y, Yang J. Structural biology of TRP channels. *Adv Exp Med Biol* 2011;704:1-23. doi: 10.1007/978-94-007-0265-3_1.
23. Vay L, Gu C, McNaughton PA. The thermos-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* 2012 Feb;165(4):787-801. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x.
24. Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neurosci* 2000;100:685-688.
25. Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X₃ purinoceptor and IB₄ binding sites. *Eur J Neurosci* 1999;11:946-958.
26. Ichikawa H, Sugimoto T. The co-expression of P2X₃ receptor with VR1 and VRL-1 in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res* 2004;998:130-135.
27. Michal GJ, Priestley JV. Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *J Neurosci* 1999;19:1844-1854.

28. Avelino A, Cruz C, Nagy I, Cruz F. Vanilloid receptor I expression in the rat urinary tract. *Neurosci* 2002 109;787-798.
29. Valtschanoff JG, Rustioni A, Guo A, Hwang SJ. Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Comp Neurol* 436 (2), 225-235. 2001 Jul 23.
30. Immke DC, Gavva NR. The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol* 2006 Oct;17(5):582-91. Epub 2006 Sep 24.
31. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen T, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997 Oct 23;389(6653):816-24.
32. Bhawe G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad U.S.A.* 2003 Oct 14;100(21):12480-5. Epub 2003 Oct 1.
33. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest.* 2010 Nov 1; 120(11): 3760-3772.
34. Doran C, Chetrit J, Holley MC, Grundy D, Nassar MA. Mouse DRG Cell Line with Properties of Nociceptors. *PLoS ONE* 2015 Jun 8;10(6):e0128670. doi: 10.1371/journal.pone.0128670. eCollection 2015.
35. Yin K, Baillie GJ, Vetter I. Neuronal cell lines as model dorsal root ganglion neurons: A transcriptomic comparison. *Mol Pain* 2016 Apr 29;12. pii: 1744806916646111. doi: 10.1177/1744806916646111. Print 2016.
36. Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Enikolopov GN, Mintz A, Delbono O. Skeletal muscle neural progenitor cells exhibit properties of NG2-glia. *Exp Cell Res* 2013 Jan 2;319(1):45-63. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.09.008. Epub 2012 Sep 20.
37. Hsu YC, Fuchs E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Jan 23;13(2):103-14. doi: 10.1038/nrm3272.
38. Repić T. Characterization of dorsal root ganglion neurons cultured on silicon micro-pillar substrates for high resolution electrophysiological recordings. *European Pain School* 2016 June 5.
39. McIntyre JC, Titlow WB, McClintock TS. Axon growth and guidance genes identify nascent, immature, and mature olfactory sensory neurons. *J Neurosci Res.* 2010 Nov 15;88(15):3243-56. doi: 10.1002/jnr.22497.

40. Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, Causing CG, Miller FD. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol.* 1998 Feb 23; 140(4): 911-923.

