



TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

CURSO 2023-24

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

CONVERSIÓN DIRECTA DE FIBROBLASTOS HUMANOS A NEURONAS DEL SISTEMA SOMATOSENSORIAL

Autora: Lucía Pérez Arévalo

Tutora académica: Profa. Asia Fernández Carvajal

Co-tutora: Dra. Verónica Rivero Hernández

DECLARACIÓN DEL TUTOR

Dña. ASIA FERNÁNDEZ CARVAJAL, Doctora y Profesora Titular del área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“CONVERSIÓN DIRECTA DE FIBROBLASTOS HUMANOS A NEURONAS DEL SISTEMA
SOMATOSENSORIAL”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

Dña. LUCÍA PÉREZ ARÉVALO

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 1 de septiembre de 2024.

Fdo.: Profa. Asia Fernández Carvajal

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
Palabras Clave:	6
ABSTRACT	7
Keywords	7
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	8
DOLOR	8
Dolor crónico	9
SISTEMA SOMATOSENSORIAL	10
Nocicepción	12
ANTECEDENTES	21
OBJETIVOS	23
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	24
Diseño Experimental.	24
Vectores lentivirales.	25
Líneas celulares	26
Protocolo de conversión de fibroblastos pulmonares fetales (IMR90).	27
Imagen de calcio.....	29
RESULTADOS	31
PROTOCOLO 2ªGENERACIÓN	31
PROTOCOLO 3ªGENERACIÓN	33
Medio de inducción.....	33
Mantenimiento de 11 días <i>In Vitro</i>	35
Mantenimiento de 18 días <i>In Vitro</i>	37
Desarrollo de medio de Inducción tardío.....	39
Mantenimiento de las células 25DIV.....	41
RESULTADO GLOBAL	44

DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXO 1	53

ABREVIATURAS

AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BMP	Proteína morfogenética ósea
Ca ²⁺	Catión calcio
CaV	Canales de calcio dependientes de voltaje
Cav	Canales de calcio dependiente de voltaje
Cl ⁻	Anión Cloruro
DIV	Días <i>in vitro</i>
DRG	Raíz del ganglio dorsal
ESC	Célula madre embrionaria
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
iPSCs	Células madre pluripotentes inducidas
K ⁺	Catión potasio
Kir	Canales de potasio rectificadores internos
LTV	Lentivirus
Mg ⁺	Catón Magnesio
Na ⁺	Catión sodio
Nav	Canales de sodio dependientes de voltaje
NGF	Factor de crecimiento nervioso
Ngn1	Neurogenina 1
Ngn2	Neurogenina 2
NP	Neuropático
PFA	Paraformaldehido
RT	Temperatura ambiente
rtTA	Transactivador
SM	Pequeñas moléculas
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TG	Ganglios del trigémino
TRP	Receptor de potencial transitorio
TRPA	Receptor de potencial transitorio de anquirina
TRPM	Receptor de potencial transitorio de melastina
TRPV	Receptor de potencial transitorio vaniloide

RESUMEN

Las neuronas sensoriales son células especializadas responsables de detectar y transmitir estímulos del entorno al sistema nervioso central mediante la conversión de señales mecánicas, térmicas y nociceptivas en potenciales de acción. Su morfología distintiva, caracterizada por dendritas que capturan estímulos y axones que transmiten información, es fundamental para la percepción sensorial. No obstante, la investigación en neuronas sensoriales supone desafíos importantes debido a la limitada translacionalidad de los modelos animales al sistema somatosensorial humano.

En este contexto, el presente estudio se centra en la transdiferenciación celular, un proceso que permite la conversión de fibroblastos en neuronas funcionales. Empleando células IMR-90, células derivadas del tejido pulmonar de un feto femenino, el objetivo principal es desarrollar y optimizar un protocolo eficaz para la conversión de fibroblastos en neuronas sensoriales humanas, además de la comparación de un protocolo ya establecido. Mediante la expresión dirigida de factores de transcripción y la aplicación de moléculas pequeñas, se busca aumentar la eficiencia de la transdiferenciación y establecer un modelo *in vitro* ético y relevante para el estudio de la neurobiología sensorial y las neuropatías periféricas.

Los resultados preliminares indican que se puede conseguir una transdiferenciación directa de células IMR-90 a neuronas sensoriales utilizando el protocolo de 3ª Generación. Las células mantienen una buena funcionalidad neuronal tras 25 días *in vitro*, con respuestas robustas a capsaicina, mentol, AITC y KCl. Este trabajo no solo profundiza en la comprensión de la diferenciación celular, sino que también permite la creación de modelos *in vitro* que replican la fisiología humana. Esto facilita la investigación de enfermedades neurológicas y el desarrollo de terapias personalizadas, representando un avance significativo en los campos de la medicina regenerativa y la biotecnología.

Palabras Clave:

Palabras clave: Conversión directa; Fibroblastos; Neuronas sensoriales; Pequeñas moléculas; Imagen de calcio.

ABSTRACT

Sensory neurons are specialized cells responsible for detecting and transmitting environmental stimuli to the central nervous system by converting mechanical, thermal, and nociceptive signals into action potentials. Their distinctive morphology, characterized by dendrites that capture stimuli and axons that transmit information, is essential for sensory perception. However, research on sensory neurons poses significant challenges due to the limited translatability of animal models to the human somatosensory system.

In this context, the present study focuses on cellular transdifferentiation, a process that enables the conversion of fibroblasts into functional neurons. Using IMR-90 cells, derived from the lung tissue of a female fetus, the main objective is to develop and optimize an effective protocol for converting fibroblasts into human sensory neurons, in addition to comparing it with an already established protocol. By targeted expression of transcription factors and the application of small molecules, the study aims to increase the efficiency of transdifferentiation and establish an ethical and relevant in vitro model for studying sensory neurobiology and peripheral neuropathies.

Preliminary results indicate that direct transdifferentiation of IMR-90 cells into sensory neurons can be achieved using the 3rd Generation protocol. The cells maintain good neuronal functionality after 25 days in vitro, showing robust responses to capsaicin, menthol, AITC, and KCl. This work not only deepens the understanding of cellular differentiation but also enables the creation of in vitro models that replicate human physiology. This facilitates the investigation of neurological diseases and the development of personalized therapies, representing a significant advancement in the fields of regenerative medicine and biotechnology.

Keywords

Keywords: Direct conversion; Fibroblasts; Sensory neurons; Small molecules; Calcium imaging.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

DOLOR

La definición de dolor ha supuesto un reto para la comunidad científica siendo la más aceptada la definida en el 2020 por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, conocida por sus siglas en inglés como IASP, “el dolor se conceptualiza como una experiencia sensorial y emocional desagradable vinculada con daño tisular actual o potencial o expresada en términos de dicha lesión” [1]. A pesar de ser una sensación desagradable, el dolor ha sido reconocido como un mecanismo esencial para la supervivencia. Funciona como un sistema de alerta fundamental que activa respuestas protectoras para preservar la integridad del organismo y asegurar su bienestar, como alejarse de una fuente de calor intenso o cuidar un brazo lesionado para facilitar su recuperación [2]. Aquellas personas que no pueden experimentar dolor tienen una tendencia a autolesionarse y a desarrollar infecciones persistentes, lo que conduce a una reducción en la esperanza de vida [3]. Así pues, el dolor es un fenómeno que implica gran complejidad intrínseca y que abarca tanto mecanismos somáticos como influencias psicológicas.

Hay múltiples clasificaciones para el dolor, atendiendo a diferentes aspectos como por ejemplo su duración, patogenia, localización, curso, intensidad y factores pronósticos de control del dolor así como según la farmacología asociada[4]. Según su 1) **duración**, encontramos el dolor agudo el cual es de corta duración y el dolor crónico que persiste durante un periodo de tiempo prolongado; 2) **patogenia**, se distingue el dolor nociceptivo, el neuropático o nociplásico según su mecanismo de producción; 3) **localización**, el dolor se puede clasificar en somático, visceral o referido; 4) **curso** del dolor, este puede ser un dolor continuo, es decir que está presente de manera constante o dolor intermitente el cual aparece y desaparece en periodos de tiempo determinados; 5) **intensidad**, el dolor puede variar de leve a severo, interfiriendo más o menos con las actividades diarias y la calidad de la vida; 6) **respuesta al tratamiento**, el dolor puede ser clasificado como controlable si responde de forma correcta al tratamiento e incontrolable si es difícil de manejar; 7) **farmacología**, se puede encontrar dolor resistente a opioides, sensible a opioides o sensibles a antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)[5].

Estas clasificaciones proporcionan una visión integral del dolor permitiendo una mejor comprensión y manejo adecuado según sus características subyacentes, siendo la más utilizada la clasificación relativa al tiempo de duración. El dolor agudo, también conocido como dolor fisiológico, cumple una función protectora crucial en animales y seres humanos al advertir sobre la presencia de estímulos nocivos. En contraste, el dolor crónico, denominado dolor patológico, persiste más allá de los límites

temporales normales de curación, generando sufrimiento sin razón fisiológica y con escasos beneficios evolutivos [1, 5]. Este dolor puede persistir incluso después de tratar y curar la causa inicial, destacando la importancia de distinguir entre estas modalidades para abordar adecuadamente las implicaciones clínicas asociadas.

Dolor crónico

El dolor crónico, el cual se considera una patología en sí misma, es definido como persistente por al menos tres meses, frecuentemente multifactorial, involucrando a menudo un componente neuropático (NP) y causando un sufrimiento significativo [6, 7]. Afecta gravemente la calidad de vida, especialmente en mujeres y personas mayores [8], impactando todos los aspectos personales, sociales y profesionales [7, 9]. Este dolor crónico, motiva la búsqueda de atención médica por más del 30% de la población mundial, puesto que alrededor del 50% de los pacientes que sufren dolor crónico han declarado que sus actividades cotidianas se veían afectadas, y el 70% de estos pacientes sufría ansiedad o angustia psicológica debido a su dolor crónico, erosionando la percepción global de salud con costos económicos sustanciales [1, 10].

Atendiendo a su patogenia, se destacan tres tipos de dolor crónico: 1). **El dolor nociceptivo**, es el más frecuente, causado por daño a los tejidos del cuerpo y se experimenta cuando los nociceptores (receptores de dolor) en la piel, los músculos, los huesos o los órganos internos detectan estímulos dañinos y envían señales al cerebro. Este tipo de dolor puede ser somático si proviene de la piel, músculos, huesos o articulaciones, o visceral si proviene de órganos internos [7, 11]. 2). **El dolor neuropático**, causado por daño o disfunción en el sistema nervioso, ya sea a nivel central (cerebro y médula espinal) o periférico (nervios y médula espinal). Este dolor se produce en el 15-25% de los casos. 3). **El dolor nociplásico**, es debido a un procesamiento anormal de señales de dolor sin evidencia de daño tisular o patología somatosensorial [4, 12]. Los mecanismos fisiopatológicos de este último incluyen un aumento del procesamiento sensorial y una disminución de las vías inhibitoras [1].

A pesar de las clasificaciones, en la mayoría de los casos el dolor crónico se presenta con causas y efectos distintos, surgiendo otros tipos como mixto, oncológico, idiopático o sin clasificación específica. La falta de conocimiento sobre tratamientos efectivos y los posibles efectos adversos de los tratamientos actuales plantea desafíos clínicos. Un enfoque multidisciplinario es esencial, con opciones de tratamiento que incluyan fármacos, intervenciones inyectables o quirúrgicas, terapia psicológica y fisioterapia. La colaboración interdisciplinaria entre profesionales especializados se considera crucial para abordar la complejidad del dolor crónico.

Para comprender con mayor profundidad el funcionamiento y la generación del dolor en el organismo, es esencial explorar los sistemas y vías fisio(pato)lógicas a través de las cuales se produce la conducción de estas señales. Estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a las dolencias crónicas emerge como una pieza clave para mejorar la calidad de vida de millones de personas, dado que el dolor es un fenómeno complejo que abarca componentes sensoriales, cognitivos y emocionales.

SISTEMA SOMATOSENSORIAL

El sistema somatosensorial es un componente esencial del sistema nervioso (SN) que se encarga de procesar la información sensorial mediante una serie de receptores especializados ubicados en la periferia del organismo que se transmite a través de los nervios periféricos hasta el sistema nervioso central (SNC) donde se integra [2]. Estos receptores captan estímulos externos e internos, permitiendo la percepción consciente de sensaciones como el tacto, la temperatura, el dolor y la propiocepción (conciencia de la posición y movimiento del propio cuerpo). Algunos de los receptores más importantes incluyen los corpúsculos de Meissner para el tacto ligero, los corpúsculos de Paccini para la vibración, los receptores de temperatura y los nociceptores, que son responsables de detectar estímulos potencialmente dañinos o dolorosos [13]. El sistema somatosensorial desempeña un papel crucial en la adaptación y supervivencia del organismo al proporcionar información vital sobre el entorno y el estado interno del cuerpo.

Los receptores periféricos especializados y primer paso de las vías somatosensoriales, se conocen como neuronas aferentes primarias, cuyos somas se localizan en los ganglios de la raíz dorsal (DRG) o en los ganglios del trigémino (TG) (**Figura 1A y 1B**). Las fibras somatosensoriales que sobresalen de la DRG forman los nervios que inervan el cuerpo, el cuello y la parte posterior de la cabeza, mientras que las fibras del trigémino inervan la parte anterior de la cabeza y las meninges. La estructura y morfología de estas neuronas son muy variables dependiendo de su función específica, pero típicamente consisten en un cuerpo celular con múltiples prolongaciones como las dendritas y el axón periférico, que reciben señales de los receptores sensoriales periféricos y el axón central comunica con la médula espinal y eventualmente hacia el cerebro (**figura 1C**)[14-16].

Respecto a las fibras nerviosas periféricas, las encontramos de diversos diámetros y velocidades de conducción eléctrica y de transmisión de distintas modalidades sensoriales. Estas fibras pueden categorizarse como **tipo A (A α , A β y A δ)** y **tipo C**, clasificación que se basa en su anatomía y función como se resume en la **tabla 1**. La clasificación con mayor aceptación distingue las fibras aferentes por ser mielinizadas o no, con presencia de mielina en las fibras tipo A, a diferencia de las de tipo C que no están mielinizadas[17, 18].

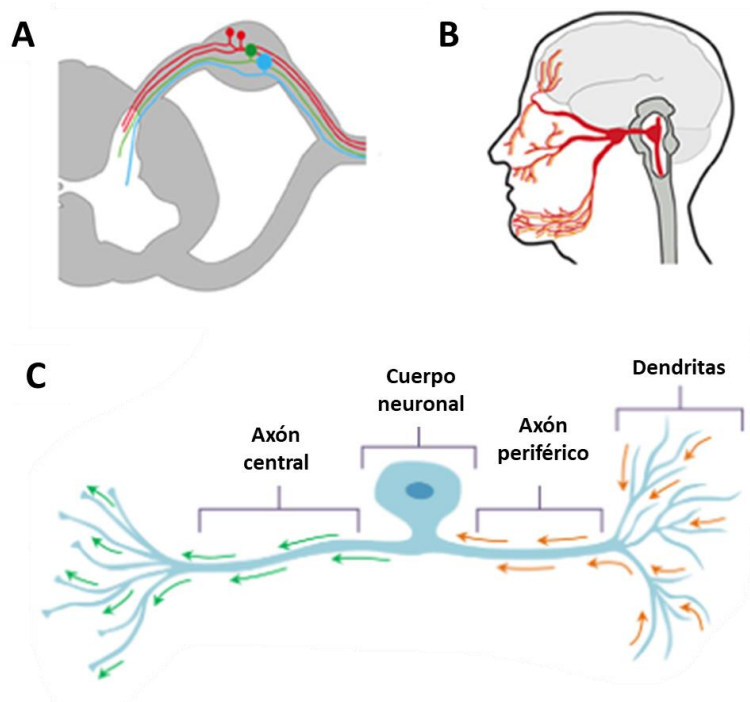


Figura 1: (A) La anatomía de las neuronas somatosensoriales muestra el soma dentro de los ganglios de la raíz dorsal, DRGs, en el exterior de la espina dorsal. Desde aquí las prolongaciones alcanzan el tejido periférico y el Sistema Nervioso Central. (B) El nervio trigémino alberga las neuronas sensoriales que inervan la parte anterior de la cabeza y las meninges (Adaptado de Le Pichon et al, 2014)[16] (C). Imagen esquemática de una neurona pseudounipolar donde se pueden ver las distintas partes que la componen[15] (Adaptado de Peña et al., 2020).

Tabla 1: Clasificación de las fibras nerviosas somatosensoriales[17, 18].

Tipos Fibras Nerviosas	Mielinización	Modalidad y estímulo sensorial	Diámetro de fibras (μm)	Velocidad conducción (m/s)
Aα	Gruesa	Mecanorreceptores: Tacto, presión y propiocepción	12-20	70-120
Aβ	Alta-Media	Mecanorreceptores: Tacto, presión y vibración	5-12	30-70
Aδ	Ligera	Mecanorreceptores y termorreceptores: Dolor agudo, temperatura fría y tacto fino	1-5	5-30
C	NO	Termorreceptores y Nociceptores: Dolor crónico, temperatura caliente y tacto grueso	0,1 -1,3	0,6-2

Entre las de tipo A, las **fibras Aα** destacan por ser las fibras de mayor diámetro y grado de mielinización, siendo las más rápidas y cuya función principal es la propiocepción [17]. Estas fibras son mecanorreceptores para el tacto y otros estímulos mecánicos, además de propioceptores, características que comparten con las **fibras Aβ**, las cuales son de un tamaño mediano y tienen un menor grado de mielinización que las Aα, y a parte de compartir las características mencionadas. Otras fibras tipo A son las que se llaman **Aδ**, las cuales son de pequeño diámetro y finamente mielinizadas, por ello tienen una velocidad de trasmisión menor[19]. Estas fibras son receptores térmicos,

quimiorreceptores y nociceptores que median el dolor rápido localizado, conduciendo los impulsos más lentamente que otras fibras mielinizadas.

Las **fibras de tipo C**, son las más pequeñas y sin mielina, siendo las más lentas en la transmisión. La diferencia de conducción entre fibras permite que los estímulos mecánicos e inoocuos sean percibidos antes que los nociceptivos. La principal función de estas células es la transmisión de las sensaciones de dolor, temperatura y picor [17, 18].

Nocicepción

El dolor comienza como una respuesta protectora del organismo frente a estímulos que pueden producir daño en los tejidos, también conocidos como estímulos nocivos. El proceso neural por el que se detectan y transmiten los estímulos nocivos al cerebro se denomina nocicepción [20]. La nocicepción comprende la activación de múltiples componentes fisiológicos y puede dividirse en 4 pasos: transducción, transmisión, modulación y percepción (**Figura 2A**).

La transducción, es el primer proceso que sucede en el mecanismo fisiológico del dolor, donde la información que llega a través del sistema sensorial, iniciada por la piel, músculos, articulaciones o vísceras, es captada y convertida en potenciales de acción, transformándose la energía del estímulo en una señal eléctrica. Cuando un estímulo activa un tipo específico de receptor, facilita una corriente catiónica interna (fundamentalmente Ca^{2+} y Na^{+}) que provoca una despolarización parcial de la membrana celular, denominada potencial generador. En caso de que el estímulo tenga la suficiente intensidad, el voltaje de la membrana superará el umbral de activación, desencadenando la apertura de canales dependientes de voltaje y la liberación de calcio, lo que disparará un potencial de acción [14]. A continuación, se producirá **la transmisión**, que es la propagación del estímulo nervioso hasta niveles sensoriales del SNC. La transmisión de la información es necesaria para la propagación activa de la señal eléctrica, puesto que los terminales periféricos están lejos del SNC. Esta transmisión genera potenciales de acción que se propagan a través de las células nerviosas posteriores, llamadas neuronas de primer orden, localizadas en las DRGs, y en los ganglios del TG, hasta las neuronas de segundo orden, en la asta dorsal de la médula espinal o al núcleo de los nervios craneales, en el caso de las neuronas del trigémino, y de aquí a las neuronas de tercer orden que se hallan en el tálamo y se proyectan a la corteza cerebral. [14, 21]. El asta dorsal de la médula espinal, que es la parte posterior de la médula, se encuentra dividida en diferentes láminas, y está compuesta principalmente de neuronas sensoriales. Dependiendo del tipo neuronal y la localización, los nociceptores terminan en distintas partes, tal y como se puede observar en la **figura 2B**, donde se muestran las distintas láminas del asta dorsal y los nociceptores que alcanzan cada una de ellas. Los nociceptores $\text{A}\delta$ alcanzan la

lámina I y las láminas V más profundas, donde la lámina I (marginal) recibe principalmente información de dolor y temperatura y la lámina V además de recibir información de dolor tiene proyecciones ascendentes a otras partes del sistema nervioso central [22]. Los nociceptores C llegan a las láminas I y II, ubicadas más superficialmente[2]. En este caso la lámina II es crucial para la **modulación** del dolor, y en ella se encuentran muchas interneuronas que juegan un papel importante en la inhibición del dolor y la modulación de la señal nociceptiva. Las fibras A β , a pesar de estar asociadas con la percepción sensorial no dolorosa, pueden terminar en varias láminas como son las láminas III y IV, implicadas en la recepción de información sensorial táctil y en la lámina V recibiendo información de presión y vibración pudiendo interactuar con señales de dolor. En estas áreas, los nociceptores liberan neurotransmisores específicos que activan neuronas de segundo orden. Estas células transmiten la información codificada en potenciales de acción al tálamo a través de las neuronas del tracto espinotalámico llamadas de tercer orden. Desde el tálamo, la señal se proyecta hacia las regiones cerebrales anteriores y finalmente llega a la corteza cerebral, donde la compleja **percepción** del dolor se materializa en el cerebro a medida que estos potenciales de acción se traducen[2, 23, 24].

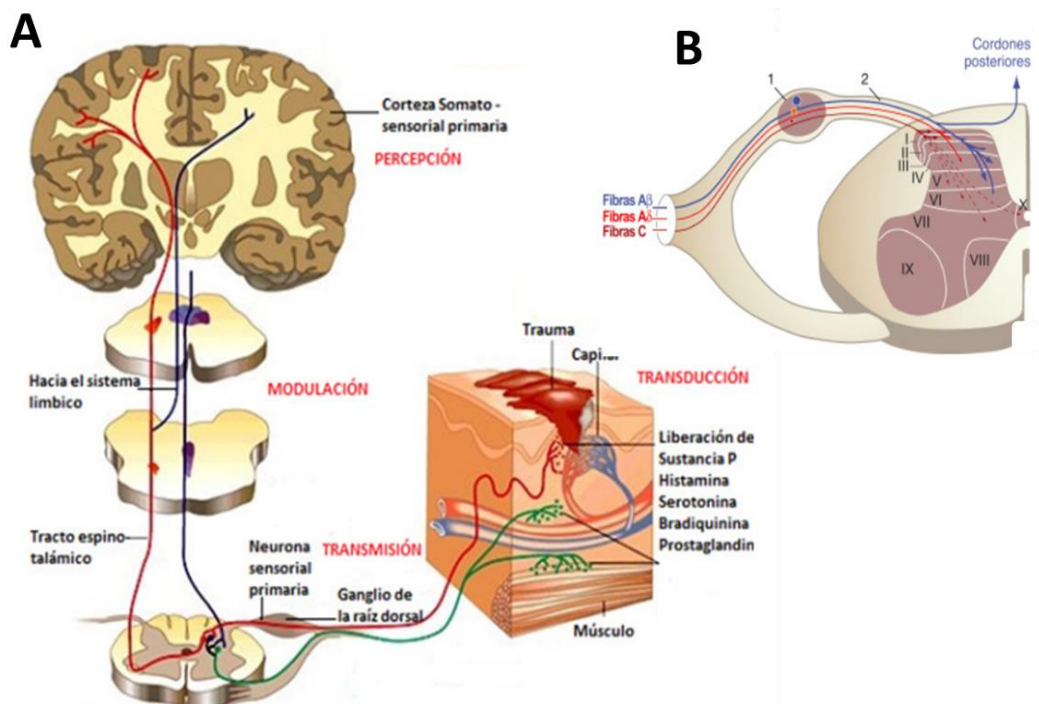


Figura 2: (A) Esquema de las cuatro fases que conforman el mecanismo fisiológico del dolor [21] (B) Representación del asta dorsal de la médula espinal, mostrando la división en las diferentes láminas y cómo interactúan las diversas fibras con cada una de estas láminas[22].

Desarrollo y mecanismos moleculares del sistema nociceptor

El desarrollo del tejido nervioso periférico es un proceso crucial que ocurre en la cresta neural, donde una población efímera de células multipotentes emerge durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Las células madre presentes en esta cresta neural son las precursoras que se diferenciarán en diversos tipos de neuronas y células de soporte glial, incluyendo las neuronas sensoriales. La diferenciación de estas células madre neurales en neuronas sensoriales, así como su destino final en el sistema nervioso periférico o central, está determinada por las regiones específicas de la cresta neural. La migración y diferenciación de las neuronas sensoriales hacia sus ubicaciones finales en la piel, los órganos sensoriales o los órganos internos son dirigidas por señales químicas y factores de crecimiento. Una vez que las neuronas sensoriales alcanzan sus destinos finales, comienzan a diferenciarse en tipos específicos de neuronas sensoriales, bajo la influencia de la señalización química y las interacciones con el entorno circundante[25, 26].

Estas señales son mediadas por diversas vías de señalización, incluyendo aquellas relacionadas con proteínas como Wnt, BMP, FGF y Notch [27]. Estas vías desempeñan un papel fundamental en la inducción, migración y conversión de las células de la cresta neural. En esta fase, las células de la cresta neural migran hacia el área ventral del tubo neural, donde se agrupan en ganglios a intervalos regulares. Durante este proceso, la expresión de factores de transcripción básicos de hélice-bucle-hélice, como Neurogenina 2 (Ngn2) y Neurogenina 1 (Ngn1), impulsa dos oleadas diferentes de neurogénesis, generando neuronas de gran tamaño y neuronas de pequeño tamaño, respectivamente, es decir, esta especificación neuronal está controlada por una red de factores de transcripción, entre los que se incluyen neurogeninas, NeuroD, Islet1, Brn3a, Runx1 y Runx3, que coordinan la expresión génica específica, determinan el destino de las células precursoras hacia la línea neuronal sensorial y conducen a la aparición de algunos sublinajes sensoriales[25, 27].

Esta diferenciación de las células precursoras en neuronas también implica una serie de eventos moleculares morfológicos complejos, además de la expresión de factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y las neurotrofinas, desempeña un papel crucial en la supervivencia, diferenciación y conectividad de las neuronas sensoriales. Estos factores promueven el crecimiento axonal, la formación de sinapsis y la plasticidad sináptica, contribuyendo así a la formación de circuitos neuronales funcionales y a la adaptación de las neuronas sensoriales a su entorno. Estos eventos de neurogénesis temprana conducen a la aparición de sublinajes sensoriales específicos. Tras las fases iniciales de neurogénesis, las neuronas sensoriales en desarrollo pasan por un importante proceso de especificación, marcado por la expresión de proteínas clave como ISL-1 (también conocida como Islet1) y Brn3a (Brain-specific homeobox/POU domain protein 3A)[26, 27]. Estas proteínas desempeñan un papel crucial al definir y consolidar el

destino final de las neuronas sensoriales inmaduras, al mismo tiempo que inhiben el desarrollo hacia otros destinos neuronales alternativos. Este proceso de especificación es fundamental para el desarrollo correcto y la función especializada de las neuronas sensoriales en el sistema nervioso, esquema que se puede observar en la **figura 3** (Con permiso de la Dra. Giorgi [28]).

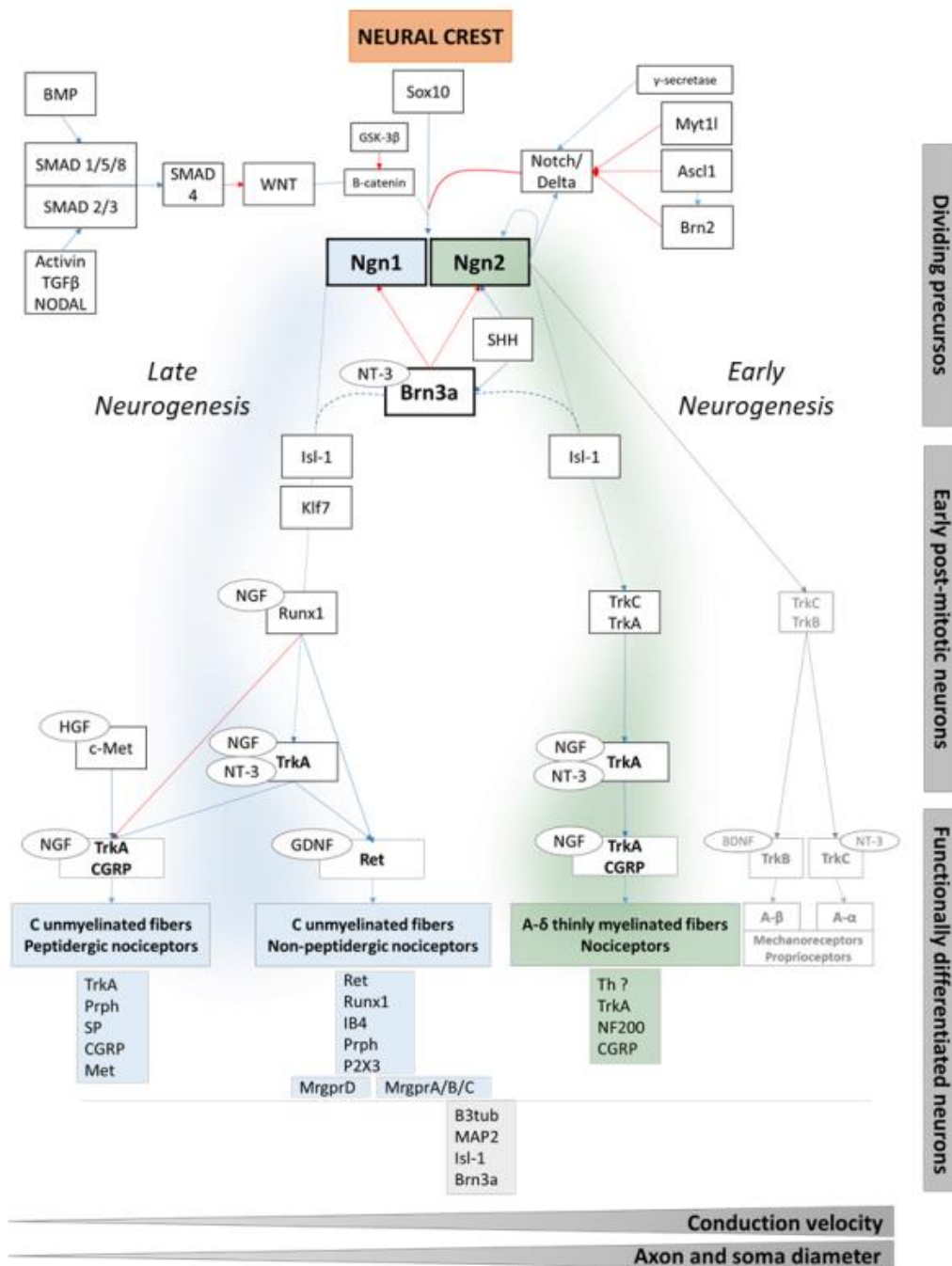


Figura 3: Desarrollo de la cresta neural en neuronas sensoriales maduras. Las líneas rojas indican inhibición y las líneas azules indican inducción. Las líneas discontinuas indican una correlación positiva entre los dos marcadores [28].

Una vez que las neuronas sensoriales han alcanzado su destino final, extienden sus axones hacia objetivos específicos, estableciendo conexiones sinápticas con otras neuronas y células efectoras. La formación de sinapsis y la maduración de las conexiones sinápticas son procesos fundamentales para el desarrollo de circuitos neuronales funcionales que permiten la transmisión eficiente de señales sensoriales. Factores como el BDNF, el NGF y la proteína morfogenética ósea (BMP) son críticos para la supervivencia y el mantenimiento de las neuronas sensoriales, asegurando su funcionalidad a lo largo del ciclo vital.

Además, las neuronas sensoriales exhiben una notable plasticidad sináptica y remodelación neuronal a lo largo de la vida. Esta plasticidad permite que las neuronas se adapten a cambios en el entorno y ajusten sus conexiones sinápticas en respuesta a estímulos sensoriales y experiencias ambientales. Mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN y las modificaciones de histonas, regulan la expresión génica en las neuronas sensoriales, influenciando su desarrollo y función en respuesta a señales intrínsecas y ambientales[29].

Gran parte del conocimiento sobre el sistema somatosensorial proviene del estudio en biología del desarrollo con modelos animales, tanto *in vivo*, como en cultivos primarios *in vitro*, o mediante líneas celulares inmortalizadas de origen tumoral, debido a la dificultad de obtener cultivos primarios de neuronas sensoriales humanas [30, 31]. Sin embargo, estudios recientes han revelado claras evidencias de las diferencias morfológicas y funcionales interespecie, lo que provoca una disminución de la traslacionalidad de los resultados del laboratorio a la clínica, por ejemplo, en el desarrollo y testeo de fármacos [32-34]. Esto sumado al dilema ético que conlleva el uso de animales en investigación y el cumplimiento de las 3R (Reemplazar, Reducir y Refinar), ha llevado a la comunidad científica a incrementar los esfuerzos por desarrollar nuevos modelos que repliquen la fisiología humana. El descubrimiento de las células madre pluripotentes embrionarias (ESCs) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), abrió la posibilidad de generar neuronas sensoriales humanas siendo la técnica más novedosa la reprogramación directa de células adultas mediante vectores virales y pequeñas moléculas [35-39].

Canales iónicos en Nocicepción

Los receptores somatosensoriales son células especializadas que detectan estímulos mecánicos, térmicos y nociceptivos en el cuerpo. Estos receptores están equipados con una diversidad de receptores proteicos específicos y canales iónicos que les permiten traducir estos estímulos en señales eléctricas, conocidas como potenciales de acción.

Los canales iónicos son componentes vitales de las membranas celulares, constituyendo proteínas transmembrana que facilitan el transporte selectivo de iones a través de la barrera lipídica que rodea

la célula. Por lo general, estos canales están compuestos por múltiples subunidades proteicas que se unen para formar un conducto a través de la membrana celular. Es importante destacar que estos canales están sujetos a regulación por una variedad de mecanismos, como cambios en el potencial eléctrico de la membrana o la unión de moléculas señalizadoras, lo que modula su actividad de apertura o cierre [40].

La característica distintiva de los canales iónicos es su capacidad para permitir el paso selectivo de ciertos iones, lo que asegura un control preciso del flujo iónico. Esto se debe a la presencia de regiones específicas dentro de los canales que interactúan con los iones de manera diferencial, determinando qué iones pueden atravesar el canal en condiciones particulares. Estos canales desempeñan un papel fundamental en una variedad de procesos fisiológicos dentro de las células. Por ejemplo, son indispensables para la transmisión de señales nerviosas, la contracción muscular, la secreción de hormonas y neurotransmisores, entre otros. Al regular el flujo de iones como sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), cloruro (Cl^-) y otros[41], los canales iónicos contribuyen al mantenimiento del equilibrio electroquímico necesario para el funcionamiento adecuado de las células y los tejidos en el organismo.

Los mecanismos moleculares involucrados en la transformación de los estímulos nocivos en señales eléctricas generalmente implican la activación de canales iónicos específicos. Por ejemplo, en el caso de los nociceptores, los estímulos nocivos o los productos químicos liberados en respuesta a estos estímulos pueden activar canales iónicos permeables Na^+ y Ca^{2+} , como los canales TRP (receptores de potencial transitorio), entre otros. Cuando estos canales iónicos se activan, permiten el flujo de iones a través de la membrana celular, lo que altera el potencial eléctrico de la célula. Esta alteración en el potencial de membrana puede desencadenar un potencial de acción si alcanza un umbral crítico, lo que resulta en la generación de una señal eléctrica que se propaga a lo largo del axón del nociceptor y luego es transmitida al sistema nervioso central [41, 42].

Una vez que el estímulo ha sido transducido en un potencial generador, los canales dependientes de voltaje entran en juego. En particular, los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) son actores clave en la generación de potenciales de acción en las neuronas DRG. Dentro de la familia de los canales Nav, son de especial interés Nav 1.7, 1.8 y 1.9, puesto que se encuentran involucrados en la señalización del dolor, y se expresan principalmente en el sistema periférico [43, 44]. La activación de estos canales por estímulos dolorosos como la presión, la temperatura o la inflamación, desencadena la generación de potenciales de acción que transmiten la sensación de dolor al cerebro. Por ejemplo, Nav 1.8 se detectó en fibras C amielínicas de pequeño diámetro, involucradas en la nocicepción. Este canal es especialmente importante en la transducción del dolor y la sensación del dolor neuropático, y generación de potenciales de acción a bajas temperaturas[45, 46].

Otros canales iónicos importantes en el equilibrio electrofisiológico de las neuronas sensoriales son los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav) fundamentales para la función neuronal al facilitar la exocitosis de vesículas cargadas de neurotransmisores en las terminaciones sinápticas. Estos canales no solo son esenciales para la transmisión sináptica, sino que también desempeñan un papel crucial en la sensibilidad al dolor al participar en la hiperpolarización neuronal y ser susceptibles a la modulación por ATP [47].

Los canales de potasio también tienen un papel vital en la repolarización posterior a los potenciales de acción. Se dividen en varias familias [14], incluyendo los canales dependientes del voltaje (Kv) o del calcio (KCa), que participan en la repolarización rápida del potencial de membrana [48]. La familia de canales de potasio rectificadores internos (Kir) facilita el flujo de iones de potasio hacia la célula cuando el potencial de membrana es negativo. Por último, los canales de potasio de dominio de dos poros (K2P) mantienen una corriente de potasio de fuga que contribuye al mantenimiento del potencial de membrana en reposo de las neuronas [14].

Canales de Potencial Receptor Transitorio (TRP)

Los canales de potencial receptor transitorio (TRP), son una de las familias de canales iónicos más importantes en la transducción de las distintas señales somatosensoriales [49]. Son canales receptores catiónicos no selectivos, los cuales se expresan en la membrana celular donde participan en la homeostasis de Ca^{2+} , Mg^{+} y Na^{+} entre otros cationes [14]. Estos canales tienen un papel crucial en la fisiología sensorial, por ello estos canales se encuentran en una gran variedad de organismos, entre ellos los humanos. Los TRP se encuentran implicados en la transducción del dolor con sensibilidad a sustancias químicas exógenas y endógenas. Pueden activarse por cambios de temperatura, estrés mecánico como la presión, cambios de osmolaridad, feromonas, incluso sustancias liberadas por los tejidos lesionados. Cambios en la expresión, la función y la regulación de estos canales se ha visto implicada en numerosas condiciones o patologías, entre ellas distintos tipos de dolor, cáncer y enfermedades genéticas [50].

La estructura de los canales TRP se caracteriza por tener 6 segmentos transmembrana (TM1 a TM6), de los cuales dos de ellos (TM5 y TM6) forman el poro que permiten el flujo de cationes entre los compartimentos exterior e interior de la célula. En cuanto a las regiones amino (NH₂) y carboxilo (COOH) terminales, ambas son intracelulares y contienen sitios de regulación mediante proteínas quinasas, chaperonas y proteínas de anclaje, estando involucrados en la regulación, función y ensamblaje del canal (**figura 4**). Como se ha explicado anteriormente, al detectar un estímulo nocivo, estos canales que forman un poro iónico permiten la entrada de iones Na^{+} y Ca^{+2} , despolarizando la célula y, al llegar al umbral de activación del Nav, desencadenan la generación de un potencial de

acción. La selectividad iónica y los mecanismos de activación de estos canales presentan una fuerte variación entre los diferentes subtipos[50-52].

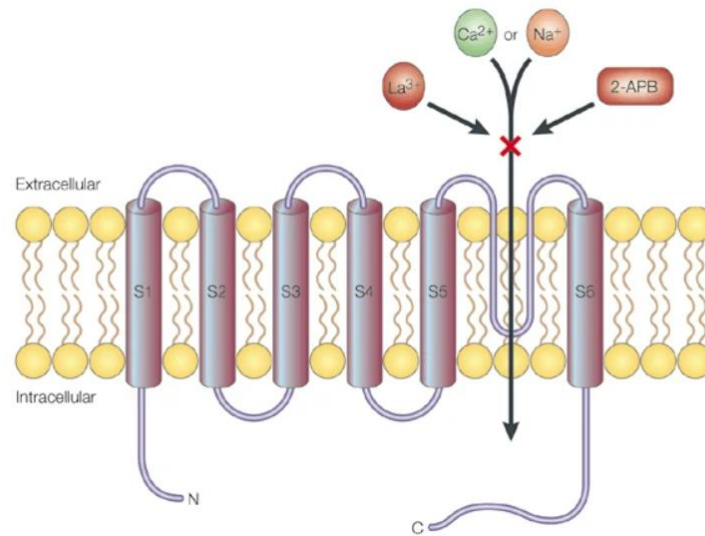


Figura 4: Estructura del canal TRP, donde se pueden observar los 6 segmentos transmembrana, y el poro que se forma entre el segmento 5 y 6 [53].

Los canales TRP constituyen una superfamilia de 30 canales iónicos que se clasifican en 7 familias basadas en la homología de sus secuencias[49, 53-55]:

1. La subfamilia canónica o clásica (TRPC), que está involucrada en la regulación del calcio intracelular y se activa mediante una variedad de estímulos, incluidos los ligandos y los cambios en el potencial de membrana.
2. La subfamilia vaniloide (TRPV), que responde a una amplia gama de estímulos, como la temperatura, los compuestos químicos y la presión osmótica. Algunos canales de esta subfamilia participan en la percepción del dolor y la regulación de la temperatura.
3. La subfamilia melastatina (TRPM), que está implicada en la percepción sensorial, la regulación del calcio intracelular y la homeostasis del magnesio.
4. La subfamilia policistina (TRPP), relacionada con la función renal y la formación de cilios primarios.
5. La subfamilia mucolipina (TRPML), involucrada en el tráfico vesicular y la homeostasis del hierro.
6. La subfamilia anquirina (TRPA), que participa en la percepción del dolor y la respuesta a irritantes.
7. Las subfamilias no-mecanoreceptor potencial C (TRPN) cuyos canales están presentes en células ciliadas y están implicados en la transducción de señales auditivas y en la función sensorial en los organismos, presentes en invertebrados, cómo por ejemplo en el pez cebra.

Las miembros de las tres familias TRPV, TRPM y TRPA debido a su relevancia en la termosensación son conocidos como termoTRPs por su capacidad de detectar un amplio espectro de temperaturas, tanto frías como calientes, desde las más inofensivas hasta las dolorosas [49].

La familia TRPV consta de seis tipos de canales (TRPV1-TRPV6), entre los cuales el receptor transitorio vanilloide 1 (TRPV1) destaca como el canal más estudiado. Este canal fue el primer transductor del dolor identificado y se activa por diversos estímulos conocidos por provocar dolor en condiciones in vivo. Entre estos estímulos se destacan las temperaturas superiores a 43°C y la capsaicina vanilloide, el principio activo responsable de la sensación de picor del chili. Además de estas activaciones, TRPV1 también responde a un pH bajo, cambios de voltaje y otros agentes químicos como el etanol[56]. La función principal de TRPV1 es contribuir a la percepción del dolor térmico agudo y la hiperalgesia tras una lesión tisular[49]. Este canal se encuentra principalmente en las neuronas sensoriales primarias de tamaño mediano y pequeño en las DRG y TG, así como en los ganglios nodosos. Aunque estudios en humanos han confirmado la presencia de TRPV1 en neuronas de todos los tamaños, convirtiéndose TRPV1 en un objetivo terapéutico prometedor para modular el dolor [57].

La familia TRPM también desempeña un papel crucial en la regulación de diversos procesos fisiológicos incluida la sensación térmica, el dolor, el metabolismo y la homeostasis iónica[58]. Esta subfamilia consta de 8 miembros (TRPM1 – TRPM8) que se caracteriza por su capacidad para responder a una amplia gama de estímulos físicos y químicos, teniendo unas propiedades únicas y funciones específicas en el organismo, por ejemplo, TRPM1 está involucrado en la pigmentación de la piel y la visión, mientras que TRPM8 es conocido como el receptor del frío y se activa en respuesta a bajas temperaturas, por debajo de 25°C y al mentol, entre otros agentes refrigerantes. En canal TRPM8 se expresa principalmente en fibras C y A δ [58-60]. Aunque la activación de TRPM8 en condiciones basales no está asociada a la sensación de dolor, su activación en estados sensibilizados sí que podría conducir a hipersensibilidad al frío, y analgesia en otros tipos de dolor[61].

Por otra parte, se identifica la familia TRPA, conformada por un único miembro conocido como TRPA1, el cual desempeña un papel fundamental en la regulación de la respuesta al dolor y la inflamación [62]. Este canal exhibe la capacidad de operar como un sensor químico al interactuar con diversos compuestos, tales como irritantes ambientales y metabólicos, entre ellos el isocitrato de alilo (AITC) que se encuentra en la mostaza o el wasabi, el humo de cigarrillos y el cinamaldehído [63, 64]. Además de su función sensorial química, el TRPA1 también puede actuar como sensor mecánico y térmico, siendo activado a temperaturas de frío nocivo, por ejemplo, inferiores a 17°C, lo que lo vincula a la percepción del dolor asociado a bajas temperaturas.

La presencia de estos canales se ha constatado en diversos tejidos, incluyendo neuronas sensoriales, células epiteliales y células inmunes. Su activación puede desencadenar la liberación de neurotransmisores y mediadores inflamatorios, contribuyendo significativamente a la percepción del dolor, la respuesta inflamatoria y la modulación de la vía nociceptiva [62].

ANTECEDENTES

El estudio del dolor y el desarrollo de nuevos tratamientos se ha basado en estudios y ensayos con modelos animales, proporcionando una información valiosa sobre los mecanismos generales del dolor. Sin embargo, estos modelos presentan limitaciones significativas debido a las diferencias biológicas entre especies, como la expresión genética, la fisiología del sistema nervioso y las respuestas a fármacos, por ello la traslación de estos estudios es bastante problemática puesto que los resultados obtenidos en los animales no siempre son aplicables en los humanos, teniendo así una baja tasa de éxito en el desarrollo de nuevos tratamientos. Para superar estas limitaciones, es importante desarrollar modelos humanos *in vitro* que permitan estudiar los mecanismos moleculares del dolor en un entorno más representativo de la biología humana, por ejemplo, mediante la obtención de neuronas sensoriales derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) o por conversión directa de células somáticas adultas.

La diferenciación es un proceso mediante el cual las células no especializadas, como las células madre se convierten en células especializadas con funciones específicas, es decir es el proceso por el cual las células cambian de un tipo celular a otro, generalmente más especializado. Este proceso es esencial para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de los organismos multicelulares, ya que permite la formación de diferentes tipos de tejidos y órganos a partir de una única célula inicial. Pero para llevar a cabo este proceso la célula sufre una serie de modificaciones en su expresión génica.

Fue en 1962 cuando, por primera vez, el biólogo británico John Gurdon habló de que la especialización de las células podía revertirse y fue en el año 2006 cuando Shinya Yamanaka descubrió que células adultas pueden reprogramarse para convertirse en pluripotentes [65], esto es lo que se conoce como reprogramación celular. Este avance ha permitido crear modelos celulares de enfermedades humanas, facilitando el estudio de patologías y el desarrollo de tratamientos personalizados. Además, las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) se utilizan para regenerar tejidos dañados y en plataformas de cribado de fármacos [66]. Investigaciones actuales mejoran la eficiencia y seguridad de la reprogramación, combinándola con edición genética. Ensayos clínicos están evaluando iPSCs para tratar enfermedades, y su uso en la bioingeniería avanza hacia la creación de

órganos completos para trasplante, pero bien es cierto que la diferenciación a iPSCs y posteriormente la diferenciación a células deseadas tiene ciertas limitaciones, como que es un proceso largo y además no preserva la epigenética.

Este estudio busca avanzar en la diferenciación celular mediante la conversión directa de células fibroblásticas a neuronas sensoriales. Esta técnica, introducida por primera vez en 2008 por el equipo de Marius Wernig y Thomas Vierbuchen en la Universidad de Stanford, demostró que los fibroblastos de ratón podían convertirse directamente en neuronas funcionales utilizando factores de transcripción específicos[67]. Desde entonces, estos estudios han ganado considerable relevancia.

El objetivo de este trabajo es mejorar la eficiencia de la transdiferenciación lograda previamente en el laboratorio y desarrollar un nuevo protocolo[28], empleando en este estudio las células IMR-90, son derivadas del tejido pulmonar de un feto femenino caucásico de 16 semanas. Estas células tienen una morfología típica de fibroblastos. Al tratarse de una línea celular fetal tienen una mayor capacidad proliferativa en comparación con otras células como pueden ser los fibroblastos adultos, esto las hace útiles para una variedad de estudios biológicos, pero con la limitación de que eventualmente dejan de dividirse. En este trabajo se intentará modificar el protocolo actual para conseguir una mayor eficiencia que potencialmente este nuevo protocolo aumente dicha eficiencia.

OBJETIVOS

Desarrollar y optimizar un protocolo de transdiferenciación de la línea celular de fibroblastos fetales de pulmón IMR-90 en neuronas sensoriales humanas funcionales mediante la expresión guiada de factores de transcripción específicos y la aplicación de moléculas pequeñas, con el fin de crear un modelo *in vitro* ético y traslacionalmente relevante para el estudio de la neurobiología sensorial, las neuropatías periféricas y el desarrollo de terapias.

- Implementar protocolos que utilicen Lentivirus (LTVs) como vectores de inserción y moléculas pequeñas para inducir la expresión guiada de Brn3a y Ngn1 en fibroblastos IMR-90, promoviendo su conversión en neuronas sensoriales.
- Caracterización funcional de las neuronas sensoriales obtenidas utilizando técnicas de registro de actividad neuronal y respuesta a estímulos sensoriales para validar la relevancia del modelo.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Diseño Experimental.

Para llevar a cabo la puesta a punto del protocolo de conversión directa de fibroblastos humanos a neuronas sensoriales, se seguirá el siguiente proceso experimental, que se puede ver de forma esquemática en la **figura 5**. Primero, se realizará un cultivo de células IMR-90, las cuales se sembrarán en placas multipocillo. Al día siguiente, se infectarán con los LTVs correspondientes. Tres días después de la siembra, estas células infectadas serán inducidas con un medio de inducción específico. A partir del día 11, dependiendo del protocolo empleado, se podrá realizar un ensayo para medir los parámetros de interés de las células o se continuará el cultivo añadiendo otro medio de inducción tardío.

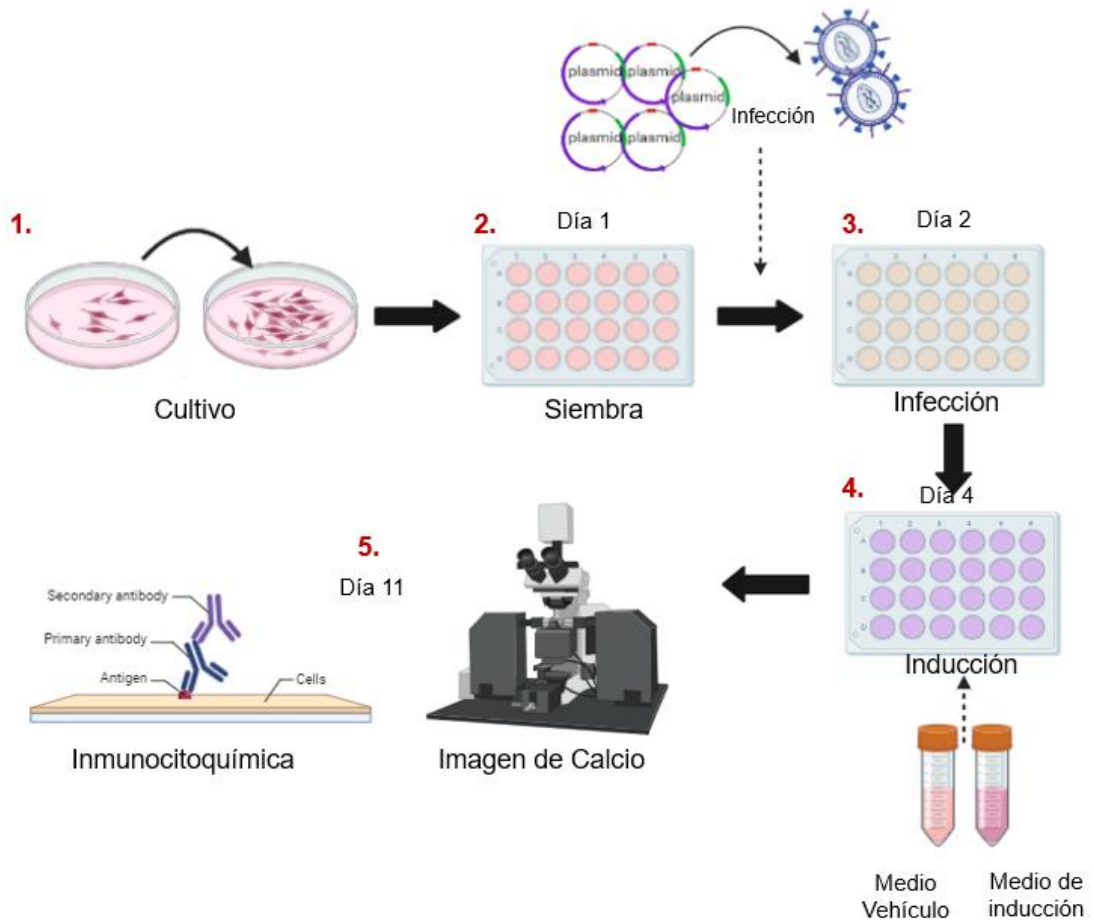


Figura 5: Esquema base del protocolo de transdiferenciación.

Vectores lentivirales.

Para la obtención de los vectores lentivirales con los genes de interés, se utilizarán plásmidos de transferencia TetO Ngn1 y TetO Brn3a. Ngn1 es una neurogenina clave en la especificación neuronal, mientras que BRN3A, o POU4F1, es un factor de transcripción crucial en el desarrollo de neuronas sensoriales periféricas. Estos promotores tetO necesitan un transactivador (rtTA) para la inducción de la transcripción dependiente de doxiciclina de los genes de interés [28]. Los plásmidos de empaquetamiento y envoltura necesarios para generar los virus incluyen pCMV delta R. y pCMV-VSV-G (**Figura 6**). Estos son los plásmidos que se emplearán para desarrollar el protocolo establecido por Simona Giorgi, que es el que se conoce como protocolo de 2ª Generación, fueron diseñados por Dra. Giorgi y están depositados por el laboratorio de la Dra. Kristin Baldwin en el repositorio Addgene.

Por otro lado, para la producción de LTVs 3410 y BN1, se utilizó un sistema de 3ª Generación, empleando como plásmidos de transferencia BN1, el cual codifica para Brn3a, Ngn1 y RFP (proteína fluorescente roja) y 3410, que es otro plásmido de transferencia que codifica en este caso para Ascl1, Brn2 y dos shRNA (small hairpin RNA). Los plásmidos de empaquetamiento y envoltura en este caso son 3043, el cual es un plásmido de envoltura que codifica VSV-G, 3044 y 3045, ambos plásmidos de empaquetamiento que codifican GAG, POL y RRE el plásmido 3044 y REV codificado por el plásmido 3045 (**Figura 6**) [28]. En este caso, los plásmidos también diseñados por la Dra. Giorgi fueron depositados por el laboratorio de la Dra. Karolina Piracs en el repositorio Addgene.

La producción de vectores lentivirales, los cuales se puede ver su construcción en la **figura 5**, se ejecutó mediante transfección de los plásmidos en HEK 293LTV utilizando métodos como fosfato de calcio o lipofectamina. Posteriormente, los virus se recolectaron y purificaron mediante ultracentrifugación. Los vectores lentivirales específicos, se produjeron utilizando el método PEI (polietilenoimina) y fueron titulados mediante qPCR para medir la cantidad de copias virales.

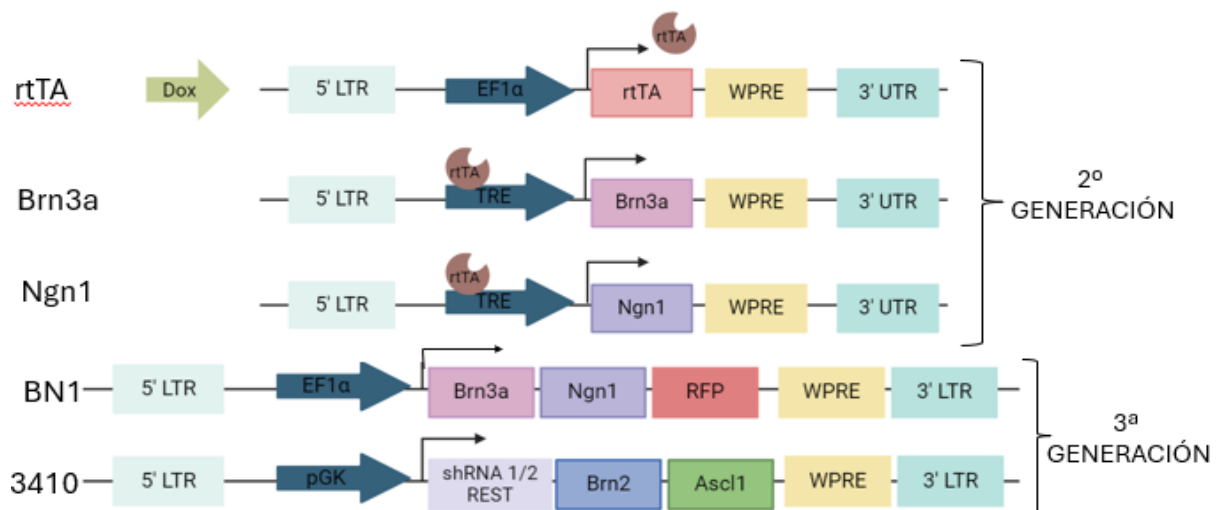


Figura 6: Esquema de las construcciones de los vectores lentivirales que se emplean en los distintos protocolos.

Líneas celulares

La línea celular utilizada para la transdiferenciación fue IMR90, línea fetal de fibroblastos pulmonares de donante femenina, se cultivó en medio MEM (ATCC) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) y 1% Penicilina/Estreptomicina (P/S) (Gibco). Para el cultivo de mantenimiento se utilizaron frascos de distinta superficie, 75cm² (T75) o 175cm² (T175) según las necesidades del experimento. Las células se levantaron con Tripsina – 0.05% EDTA (Gibco) al alcanzar una confluencia del 80-90%, y para realizar los experimentos de transdiferenciación se sembraron células de pases entre 6 -10, en placas de 24 pocillos a una densidad de 60.000 células por pocillo [28].

HEK 293LTV (Cell Biolabs), línea embrionaria humana de riñón, transformada con ADN del adenovirus humano tipo 5 (serotipo más común dentro del grupo de adenovirus humanos). En estas células, los genes E1 del adenovirus (E1a y E1b) se expresan y facilitan la activación de promotores virales, lo que permite la producción de grandes cantidades de proteínas. Además, 293LTV expresa el antígeno T grande del SV40 y posee el gen de resistencia a la neomicina. Mediante clonación y diversas pruebas para evaluar el rendimiento viral, 293LTV ha sido seleccionada específicamente por su alta capacidad de producción de lentivirus. Las células se cultivaron en DMEM GlutaMAX suplementado con 1% P/S, 10% FBS y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, NEAA (Gibco) y se levantaron con tripsina - 0.05% EDTA(Gibco) al 80 % de confluencia[28].

Protocolo de conversión de fibroblastos pulmonares fetales (IMR90).

Protocolo 2ª Generación

Este protocolo ha sido desarrollado por la Doctora Simona Giorgi, para generar neuronas sensoriales por conversión directa de fibroblastos humanos. Las IMR-90 se cultivaron en frascos de distinta superficie, 75cm² (T75) o 175cm² (T175) según las necesidades del experimento. Las células se siembran en cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos que han sido tratados anteriormente con poli-L-lisina a 8.3 µg/ml y laminina a 20 µg/mL, a una densidad de 50000 células/pocillo. Las células fueron infectadas con los virus Brn3a y Ngn1 con un de MOI 20 y rtTA con MOI 40, y se incubaron durante 48h a 37°C con un 5% de CO₂. Tras esto las células fueron tratadas con medio de inducción preparado de la siguiente manera: medio Neurobasal suplementado con B27 1X, GlutaMax 1X, N2 1X, hFGF 20 ng/ml, Doxyciclina 1 µg/ml, Noggin 100ng/mL, SHH 100 ng/mL, Y27632 5 µM, DAPT 5 µM, LDN193189 0,5 µM, Forskolin 5 µM, CHIR99021 3 µM, SB431542 2,5 mM y VPA 0,1 mM (**Anexo 1**). Debido a la preparación de las moléculas utilizadas, el medio final resulta con 0.18% de DMSO. Por este motivo, las células vehículo fueron tratadas con un medio control compuesto por: medio Neurobasal suplementado con B27 1X, GlutaMax 1X, N2 1X, Doxyciclina 1 µg/ml y un 0,18% de DMSO. Estos medios de inducción se cambiaron cada 2 días hasta el día 11 *in vitro* en el que se procedió a los ensayos funcionales o de inmunocitoquímica (**Figura 7**).

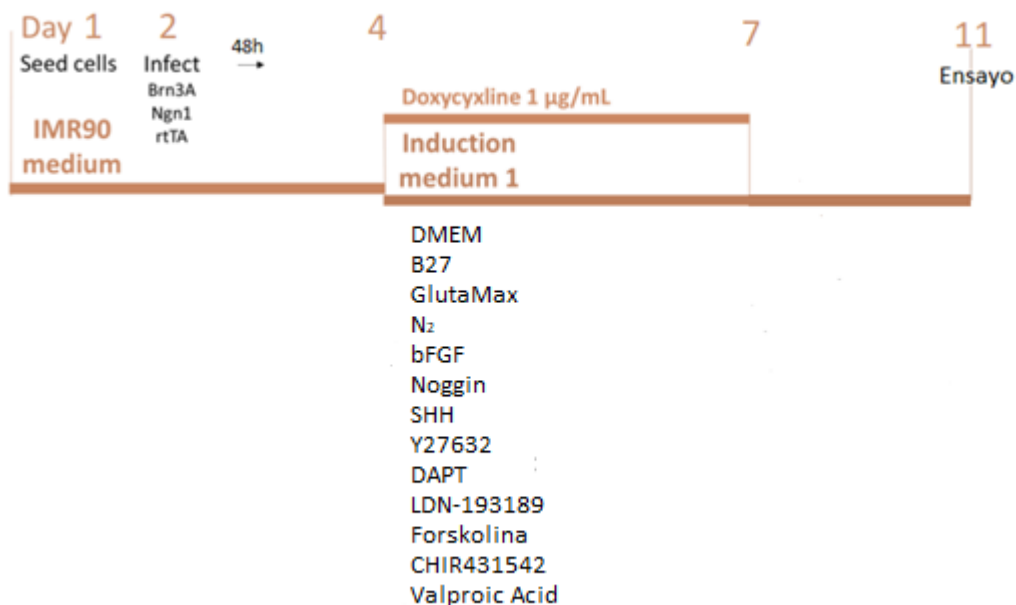


Figura 7: Protocolo de conversión de IMR90 de 2ª Generación de la Dra. Giorgi [28].

Protocolo 3ª Generación

Con el fin de eliminar la toxicidad de sistema TetOn dependiente de doxiciclina, y usar únicamente 2 lentivirus en lugar de 3, se utilizó el protocolo de 3ª Generación utilizado para la transdiferenciación de fibroblastos humanos primarios adultos, y desarrollado por la Dra. Giorgi, adaptándolo a la línea celular IMR90.

Para realizar el protocolo de 3ª generación, las células fueron sembradas en placas transparentes de 24 pocillos a una densidad de 60000 células por pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio tratados anteriormente con poli-L-lisina a 8.3 µg/mL y laminina a 20 µg/mL. Este protocolo se ha realizado modificando el protocolo de Simona Giorgi[28]. Las células fueron infectadas con los virus 3410 MOI 10 y BN1 MOI 10 e incubadas durante 48h a 37°C con un 5% de CO₂. Tras esto las células fueron tratadas con medio de inducción preparado de la siguiente manera: medio Ndiff 227 suplementado con dcAMP 50 mM, VPA 1M, SB 431542 2 0mM, Noggin 100 ng/mL, DAPT 10 mM, LDN193189 1mM, NT3 25 µg/mL, NGF 25 µg/mL, CHIR99021 10 mM, LM-22A4 20 mM, GDNF 25 µg/mL (**Anexo 1**). En este caso las células vehículo fueron cultivadas con medio Ndiff y 0,18% de DMSOa. Estos medios de inducción se cambiaron cada 2 días y el día 11 *in vitro* se cultivaron con de inducción tardío el cual este compuesto por medio Ndiff 227 suplementado con dcAMP 50 mM, NT3 25 µg/mL, NGF 25 µg/mL, LM-22A4 20 mM, GDNF 25 µg/mL, aunque en algunos ensayos este medio ha sufrido alguna modificación [28]. Este medio tardío se refresca cada dos días hasta el día de los ensayos funcionales y de inmunocitoquímica a días 11 DIV, 18 DIV y 25 DIV (**Figura 8**).

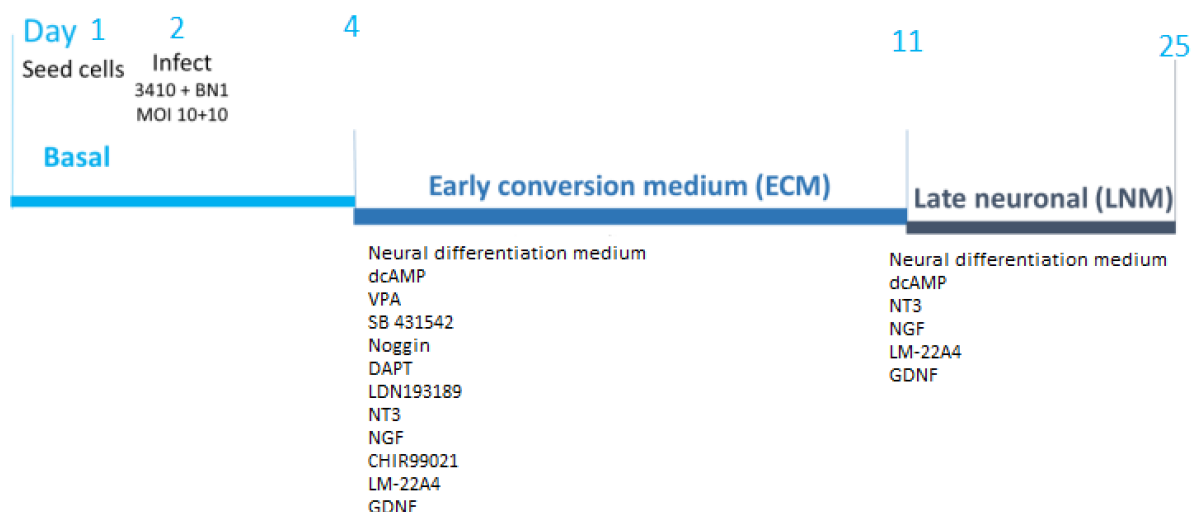


Figura 8: Diseño experimental del protocolo de conversión de la Dra. Giorgi [28]

Imagen de calcio

La fluorimetría por imagen de calcio es una técnica que permite visualizar y medir los cambios en la concentración de iones de calcio citoplasmático (Ca^{2+}) en células vivas en tiempo real. Esta técnica se basa en el uso de indicadores de calcio, que son moléculas fluorescentes que cambian su intensidad de fluorescencia en respuesta a los cambios en la concentración de Ca^{2+} .

Los días de ensayos, las células de estudio se incubaron con una sonda fluorescente, Fluo-4 AM 5 μM , la cual tiene una onda de excitación de 494nm y una onda de emisión de 516nm, y ácido plurónico 0.02% p/v, que facilita la entrada a través de la membrana celular, en 1mL de solución salina equilibrada, que llamaremos solución externa, que consiste en NaCl 140mM, HEPES 10mM, KCl 4 mM, CaCl_2 2mM, MgCl_2 2mM, D-glucosa 5mM, D-Manitol 20mM, a un pH fisiológico de 7,4. Las células se incubaron en presencia de la mezcla durante 1 hora a 37°C y 5% CO_2 . Tras una incubación de 1 hora a 37°C y 5% CO_2 se realizó un lavado con la solución externa durante 30 minutos en las mismas condiciones. Los cubreobjetos se montaron en una cámara RC-25 y se perfundieron continuamente a temperatura ambiente. Se seleccionaron diversas regiones de interés (ROI) de células individuales y se utilizaron para monitorear la variación de fluorescencia a través de un objetivo de aire 10x (microscopio invertido Axiovert 200, Carl Zeiss) con una cámara ORCA Flash LT (Hamamatsu Photonics). Las imágenes se procesaron con el software HC Image package (Hamamatsu Photonics) en un microscopio de epifluorescencia invertida. El campo claro y la fluorescencia se visualizaron con un objetivo de aire 10x. Fluo-4-AM se excitó a 500 nm con un tiempo de exposición de 300 ms y la fluorescencia emitida se filtró a 535 nm (rueda de filtro Lambda-10-2, Sutter Instruments). Tanto los estímulos utilizados mentol 100 μM , capsaicina 1 μM , AITC 100 μM , KCl 40 mM e Ionomicina 1 μM , como la solución externa fueron aplicados mediante un sistema de perfusión. Las imágenes se adquirieron cada 10s durante la fluorescencia basal y lavados de 5 min entre estímulos con solución externa, o 3s durante y después de la aplicación del estímulo, el cual tenía una duración de 20s (**Figura 9**).

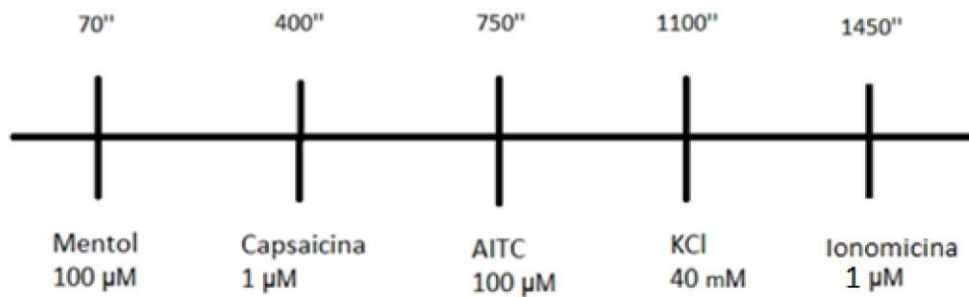


Figura 9: Esquema del protocolo de aplicación de estímulos empleado en el ensayo funcional de imagen de calcio

Tras obtener los datos crudos se trataron en Excel para eliminar el ruido de fondo y ajustar las líneas basales de cada área de interés. Para valorar cada estímulo, se determinó el incremento de fluorescencia y se normalizó por la respuesta a ionomicina (F_{max}), un compuesto que provoca poros en la membrana de células vivas, con entrada de calcio al interior lo que permite comparar entre réplicas biológicas y experimentales ya que tiene en cuenta la supervivencia y el tamaño celular. Posteriormente todos los datos obtenidos se llevaron a GraphPad Prism que es el software que permite organizar, analizar estadísticamente y visualizar datos de manera eficiente, para obtener diferencias entre el número de células que responden a los diferentes estímulos y con el porcentaje de intensidad máxima que lo hacen (% F_{max}). Además, se realizó un segundo tratamiento de los datos teniendo en cuenta únicamente aquellas células con respuesta a los estímulos sensoriales y que han mostrado actividad neuronal por despolarización debido a la presencia de KCl. Las diferencias en la % F_{max} de los diferentes estímulos se representaron como la media \pm SEM de $N=(1-2)$ con un $n_{\text{células control}}=(25-84\text{células})$, $n_{\text{células DC}}=(89-1192\text{células})$, y la variación en el número de células respondedoras como la media \pm SD de $N=(1-2)$ con un $n_{\text{cristales}}=(1-3)$, y se determinó la diferencia estadísticamente significativa de las células tratadas respecto de las células vehículo mediante test múltiple, t-student, con corrección de Welch, que asume que las varianzas entre grupos no son iguales, con una significación estadística del **** $p<0.0001$, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.1$.

RESULTADOS

IMR90 es una línea celular fetal de fibroblastos pulmonares, que va a ser sometida a un tratamiento de inducción mediante la adición de virus y pequeñas moléculas para su conversión directa a neuronas sensoriales.

Se siguieron dos protocolos diferentes para verificar la eficiencia de conversión en cada uno de ellos. Por un lado, se replicó el protocolo de conversión directa realizado por Simona Giorgi, llamado 2ª Generación, en el cual se emplean los virus Brn3a, Ngn1 y rtTA, junto con unas pequeñas moléculas concretas. La eficiencia de este protocolo se va a comparar con el nuevo que se pretende establecer, en base al utilizado por la Dra. Giorgi para conversión de fibroblastos adultos, que se denomina 3ª Generación, en el cual se emplean 3410 y BN1, junto con una combinación de pequeñas moléculas concretas. Para poner a punto este nuevo procedimiento se ensayarán distintas condiciones a fin de seleccionar aquellas que proporcionen un mayor rendimiento de conversión neuronal.

PROTOCOLO 2ª GENERACIÓN

Se llevó a cabo el protocolo de conversión de 2ª Generación de fibroblastos IMR90, infectados con los lentivirus Brn3a, Ngn1 y rtTA, y tratados con un medio de inducción con moléculas pequeñas (SM) y factores neurotróficos.

La observación de los cambios morfológicos entre las células control y las células diferenciadas mostró el comienzo de la aparición de prolongaciones típicas de neuronas maduras, así como interacciones entre estas (**Figura 10**). La evaluación funcional mediante fluorimetría de calcio que se presenta en las **figuras 11 y 12** refleja la respuesta celular bajo diferentes condiciones experimentales comparando dos grupos: un grupo control y un grupo tratado, evaluando la respuesta a KCl, indicativo de perfil neuronal y que además respondan a alguno de los estímulos sensoriales, mentol (MENT), capsaicina (CAPS), AITC.

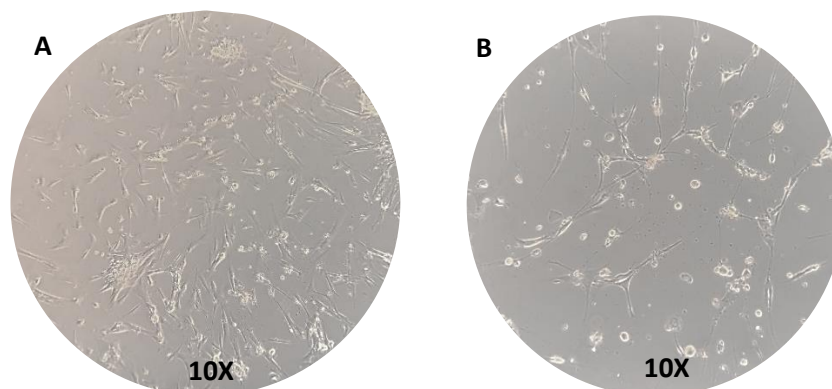


Figura 10: Visualización de las células en el microscopio visible a 10 aumentos. **A:** células que no sufrieron el proceso de diferenciación. **B:** células tras el proceso de diferenciación neuronal de 11 días de duración empleando el protocolo de 2ª Generación.

En la **figura 11** se muestran registros representativos de la respuesta de las células a diversos estímulos. Se puede apreciar como en el caso de las células tratadas (**Figura 11B**) hay un mayor cambio en la intensidad de fluorescencia ante la aplicación de cada uno de los estímulos, que no se observa en las células control (**Figura 11A**), indicando la expresión de los canales TRPM8, TRPV1 y TRPA1 tras el proceso de transdiferenciación.

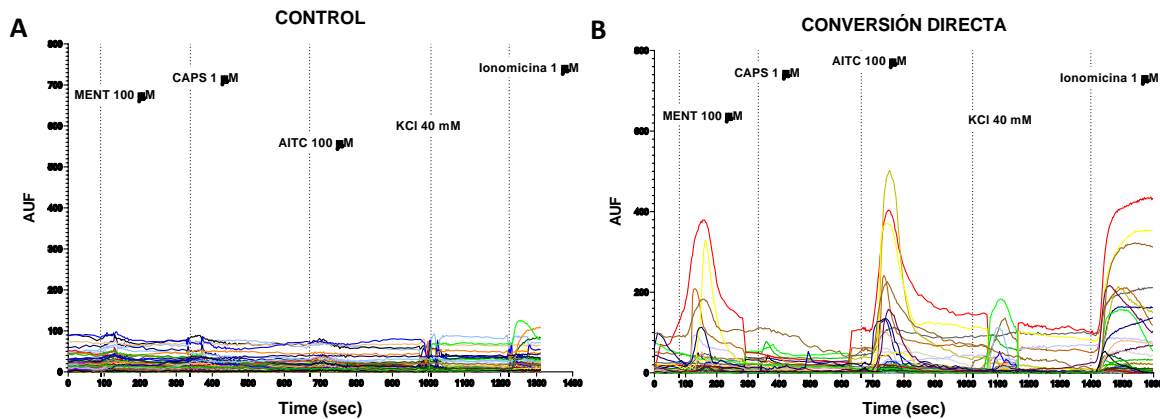


Figura 11: Registro representativo de fluorimetría de calcio de células IMR90 tratadas con el protocolo de conversión de 2^o Generación. Se observan la presencia o ausencia de picos de fluorescencia por respuesta a mentol 100 μM, capsaicina 1 μM, AITC 100 μM, KCl 40 mM e ionomicina 1 μM de **A)** células control **B)** de células diferenciadas.

En la **figura 12**, se representa de porcentaje de respuesta de las células que responden a KCl, un agente despolarizante que indica la transdiferenciación de fibroblastos a neuronas. No se observa ninguna célula control con respuesta a KCl, mientras que el 40% de las células inducidas respondieron a KCl con una respuesta de 45%. Entre un 20-30% de las células que respondieron a KCl también respondieron a los estímulos de mentol, capsaicina y AITC, con un porcentaje de respuesta de un 80%, 45% y 125%, respectivamente.

Los resultados evidencian diferencias distintivas entre las células control y las células transdiferenciadas, puesto que en las tratadas se ve respuesta al KCl, lo cual indica que se ha realizado una conversión hacia un fenotipo neuronal, y además en mayor o menor medida se genera una respuesta a los demás estímulos, lo que sugieren la expresión de canales como TRPM8, TRPV1 y TRPA1.

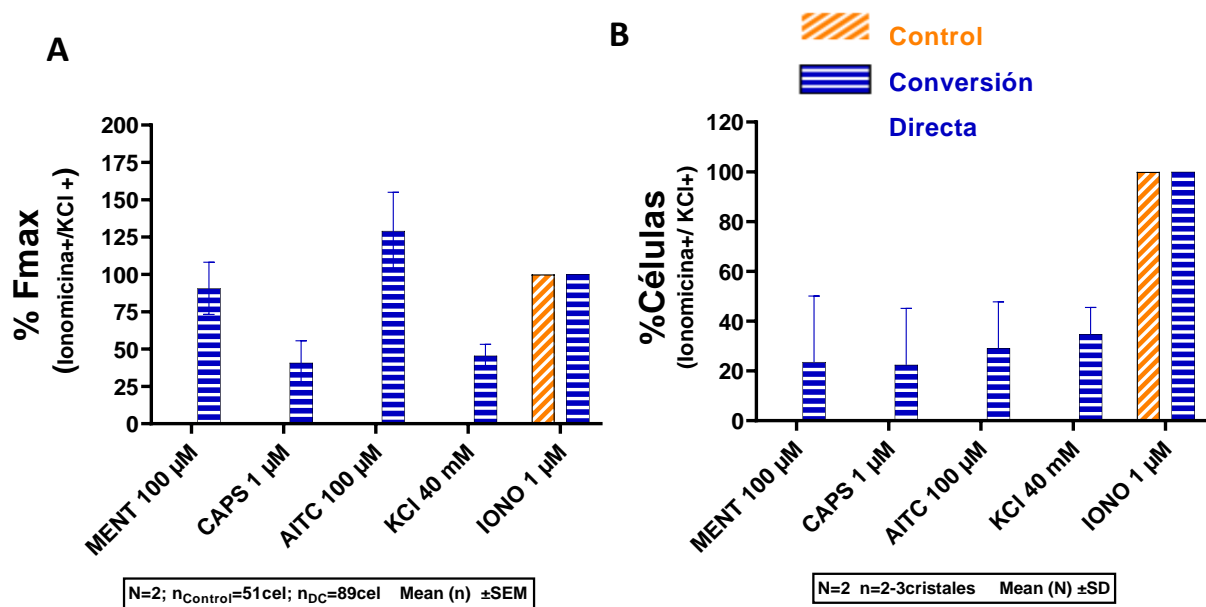


Figura 12: Resultados de fluorimetría de calcio con IMR90 tratadas con el protocolo de conversión de 2º Generación. **A)** y **B)** Intensidad de respuesta y porcentaje de células respondedoras, únicamente de aquellas que muestran despolarización por KCl. Los datos se representan como la media \pm SEM (N= 2, n_{control} =51 células, n_{DC} =89 células) o media \pm SD (N=2, n=2 cristales). El análisis estadístico se realizó mediante un test t-student multiple no pareado, con la corrección de Welch, que asume que las varianzas entre grupos no son iguales, sin obtención de diferencias significativas debido a la ausencia de respuesta en el control.

PROTOCOLO 3ª GENERACIÓN

Siguiendo el protocolo de conversión de 3ª Generación la línea IMR90 se infecta con los virus 3410 y BN1, y se trata con un medio de inducción con moléculas pequeñas (SM, por sus siglas en inglés) y factores neurotróficos. Este protocolo está basado en el de Simona Giorgi utilizado para conversión directa de fibroblastos adultos, introduciendo modificaciones para incrementar el rendimiento.

Medio de inducción.

El medio de inducción utilizado en los protocolos de segunda y tercera generación presenta diferencias importantes, que se reflejan tanto en la composición de SM como en el medio basal empleado. Como se observa en la **figura 13**, el protocolo de tercera generación incorpora nuevas SM, tales como dcAMP, NT3, NGF, LM-22A4 y GDNF. Estas moléculas son fundamentales para potenciar la expresión de genes virales y mejorar la eficiencia del proceso de transdiferenciación de fibroblastos en células con características neuronales.

Una diferencia clave entre ambos protocolos radica en la sustitución del medio basal Neurobasal por Ndiff, que podría deberse a la línea celular utilizada, según se había establecido en los protocolos originales de S. Giorgi. Sin embargo, no estaba claro si la modificación del medio se debía

exclusivamente a la transición hacia una nueva línea celular o si este cambio podría mejorar los resultados de la transdiferenciación en las células IMR-90.

A 2ª Generación

	Final conc.	stock conc.
Neurobasal		
B27	1X	50X
GlutaMAX	1X	100X
N2	1X	100X
hFGF	20 ng/mL	20 ug/mL
DOX	1 ug/mL	1 mg/mL
Noggin	100 ng/mL	100 µg/mL
SHH	100 ng/mL	100 ug/mL
Y 27632	5 uM	10 mM
DAPT	5 uM	10 mM
LDN-193189	0,5 µM	1 mM
Forskolin	5 uM	10 mM
CHIR 99021	3 uM	10 mM
SB 431542	2,5 uM	20 mM
VPA	0,1mM	1M

B 3ª Generación

	Stock conc.	Working conc.
Ndiff 227		
dcAMP	50 mM	0,5 mM
VPA	1 M	1mM
SB 431542	20 mM	10 uM
Noggin	100 ug/ml	50 ng/mL
DAPT	10 mM	5 uM
LDN-193189	1 mM	0,5 uM
NT3	25 ug/mL	10 ng/mL
NGF	25 ug/mL	10 ng/mL
CHIR 99021	10 mM	2 uM
LM-22A4	20 mM	2 uM
GDNF	25 ug/ml	2 ng/mL

Figura 13: Tablas de las pequeñas moléculas empleadas en cada uno de los protocolos de este proyecto. **A)** Pequeñas moléculas empleadas en el protocolo de 2ª Generación. **B)** Pequeñas moléculas que se emplean para hacer el medio de inducción del protocolo de 3ª Generación. En verde se observan las moléculas que se usan únicamente en la 2ª Generación, de azul se muestran las pequeñas moléculas comunes para ambos protocolos, y en morado las pequeñas moléculas que son exclusivas para el protocolo de 3ª Generación (tablas de elaboración propia).

Para abordar esta cuestión, se diseñó un experimento que comparaba el medio de inducción (dcAMP, VPA, SB 431542, Noggin, DAPT 10, LDN193189, NT3 25, NGF, CHIR99021, LM-22A4 y GDNF) con Ndiff y el mismo medio con Neurobasal.

Los resultados del experimento, representados en la **figura 14**, mostraron diferencias claras en la viabilidad y morfología de las células tratadas con los diferentes medios. Las células tratadas con el medio que contenía Ndiff mostraron una morfología neuronal característica, lo que sugiere que este medio es más adecuado para soportar la transdiferenciación de fibroblastos IMR-90 a células neuronales. En contraste, las células tratadas con el medio que contenía Neurobasal no sobrevivieron (**Figura 14**), lo que indica que este medio no es adecuado para este tipo de transdiferenciación en el contexto de las células IMR-90.

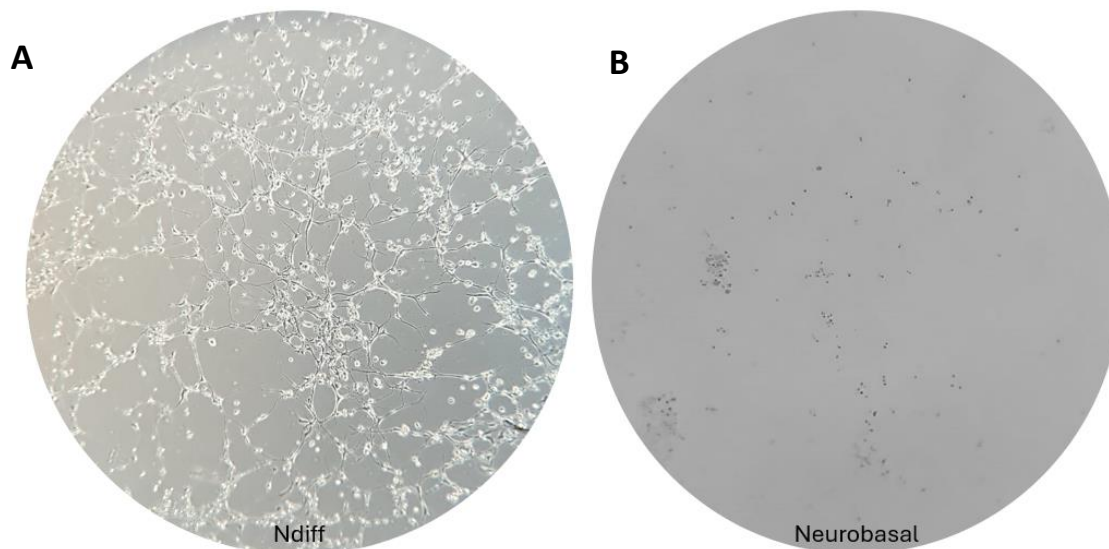


Figura 14: Comparación de la morfología celular de IMR-90 11DIV tratadas con diferentes medios. **A)** Células con medio Ndiff, que presentan la morfología esperada. **B)** Ausencia de células vivas por tratamiento con medio Neurobasal (Imagen de elaboración propia).

Mantenimiento de 11 días *In Vitro*

Una vez que se seleccionó el medio Ndiff para preparar el medio de inducción, se comenzó con la prueba temporal de mantenimiento de 11DIV. Los cambios morfológicos entre las células control y las células inducidas se pueden observar en la **figura 15**, manteniendo las diferencias que ya se daban con el protocolo de 2^o Generación.

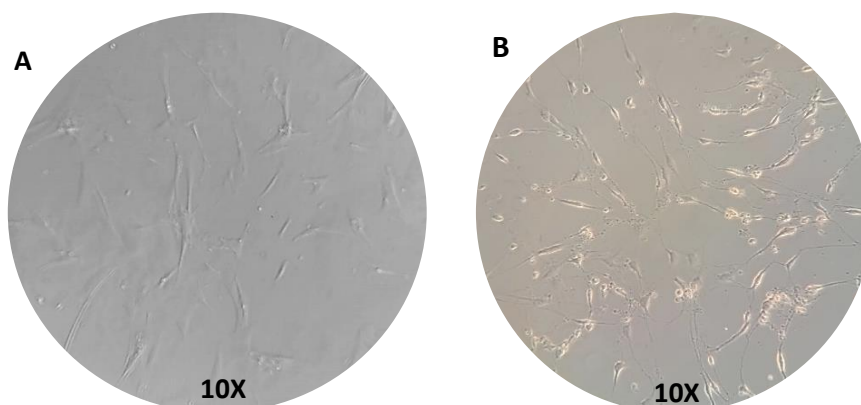


Figura 15: Visualización de las células en el microscopio visible a 10 aumentos. **A)** células control. **B)** células inducidas mediante el protocolo de 3^o generación, observadas tras 11 días *in vitro*

La evaluación funcional se llevó a cabo mediante fluorimetría de calcio presentando un registro en la **figura 16**.

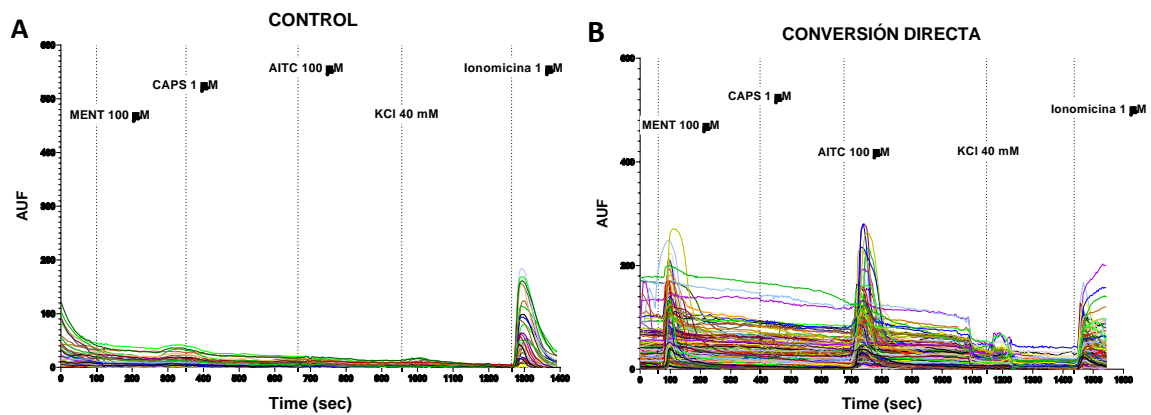


Figura 16: Registro representativo de fluorimetría de calcio de células IMR90 tratadas con el protocolo de conversión de 2^o Generación. Se observan la respuesta a mentol 100 μM, capsaicina 1 μM, AITC 100 μM, KCl 40 mM e ionomicina 1 μM de **A)** células control **B)** de células diferenciadas.

En la **figura 17** se puede ver las respuestas de las células frente a los distintos estímulos tras el tratamiento de los datos crudos, únicamente de aquellas células activadas por KCl, y que han respondido a algún otro estímulo.

El proceso de transdiferenciación mostró la aparición de células activadas por KCl, posible señal de cambio celular y además incrementó el número de células respondedoras a los estímulos. La intensidad de respuesta aumentó significativamente más del 100% ante mentol y AITC, alcanzando el 200% y se consiguió una leve respuesta del 50% a capsaicina.

En las **figuras 17A y 17B**, donde se tiene en cuenta las células que responden a KCl, se aprecian que las células control no presentan ninguna respuesta, ya que no hay ninguna célula que responda a KCl. En contraste, las células transdiferenciadas mantienen una respuesta alta y consistente, alrededor de 200% de respuesta para los estímulos de mentol y AITC, y cerca de un 40% de respuesta a la capsaicina, lo que sugiere una mayor robustez en su capacidad de respuesta tras la transdiferenciación. Además, el porcentaje de células que responden está cerca del 20% en los estímulos, indicando que se ha mejorado el porcentaje de células transdiferenciadas respecto a los protocolos previamente descritos en el laboratorio [28].

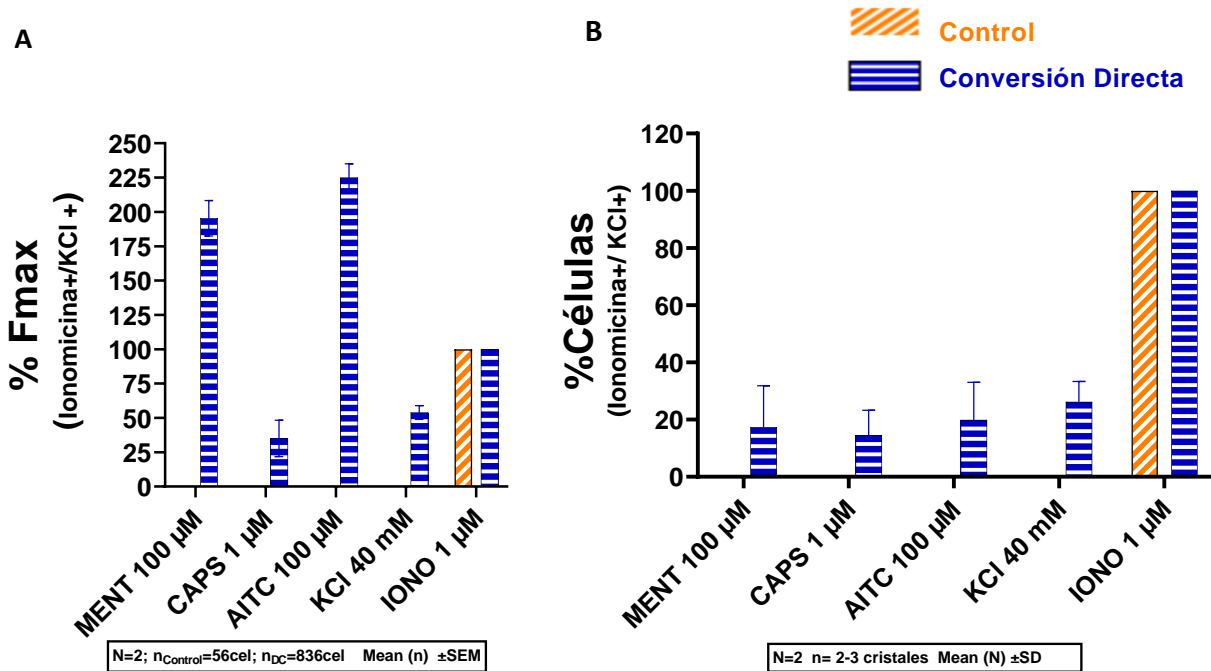


Figura 17: Resultados de fluorimetría de calcio con IMR90 tratadas con el protocolo de conversión de 3^o Generación 11DIV. A) y B) Intensidad de respuesta y porcentaje de células respondedoras, únicamente de aquellas que muestran despolarización por KCl. Los datos se representan como la media \pm SEM (N= 2, n_{control} =56 células, n_{DC} =836 células) o media \pm SD (N=2, n=2 cristales). El análisis estadístico se realizó mediante un test t-student multiple no pareado, con la corrección de Welch, que asume que las varianzas entre grupos no son iguales, que asume que las varianzas entre grupos no son iguales, con una confianza del ****p<0.0001

Mantenimiento de 18 días *In Vitro*

Tras comprobar que el protocolo de conversión directo de 3^a Generación era efectivo, se planteó la posibilidad de mantener las células *in vitro* durante un mayor número de días, y ver si a diferencia de las células tratadas con el protocolo de 2^o generación, estas son capaces de mantenerse más de 11DIV, ya que esto indicaba una limitación en la viabilidad celular a largo plazo con este protocolo. Se obtuvo una nueva comparativa morfológica de las células control frente las inducidas (**Figura 18**), donde, nuevamente, se pueden observar cambios morfológicos, como la aparición de prolongaciones típicas de neuronas maduras en el caso de las células inducidas.

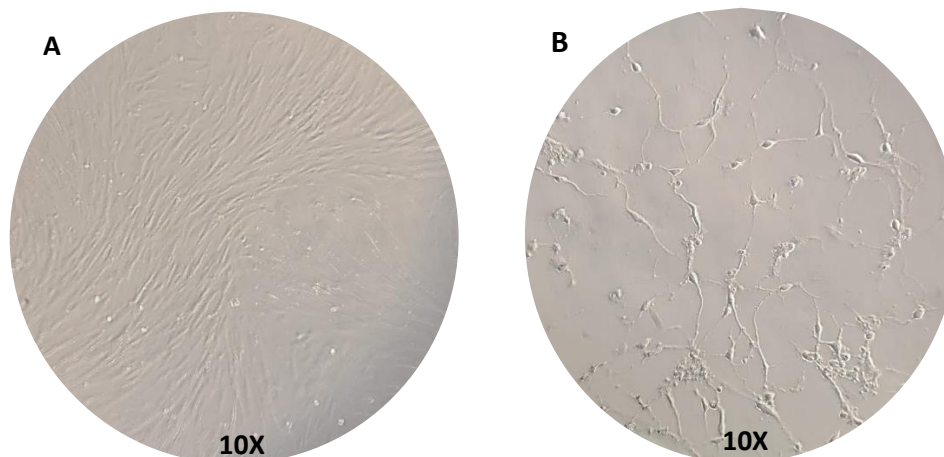


Figura 18: Comparación de la morfología celular de IMR-90 tras 18DIV, visto con microscopio 10X. **A)** Células control. **B)** Células con de conversión directa.

Los resultados de medidas de actividad tras 18 DIV se muestran en la **figura 19**, donde se muestra un trazado representativo de la variación de fluorescencia por respuesta a los estímulos en células IMR90, en la que se aprecia la diferencia de picos por el incremento de fluorescencia entre las células tratadas (**Fig 19B**) y control (**Fig 19A**).

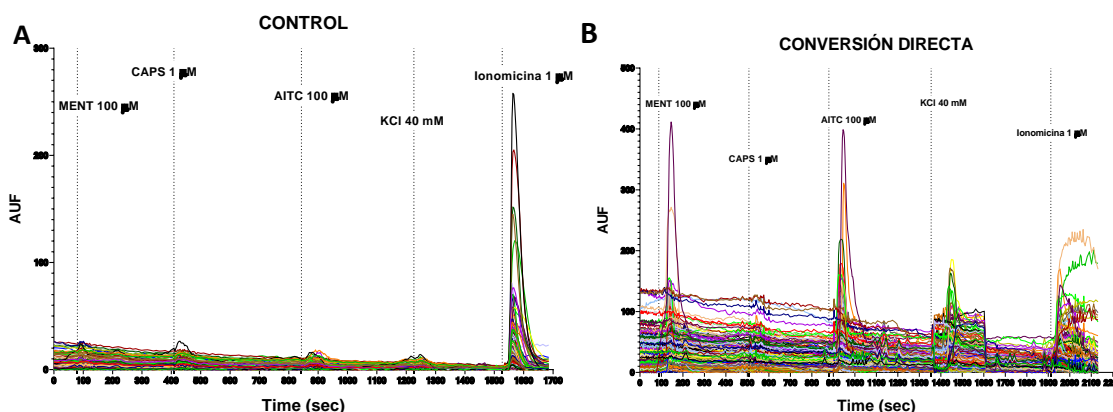


Figura 19: Representación gráfica de las respuestas obtenidas mediante imágenes de calcio de IMR90 tratadas con el protocolo de conversión de 3ª Generación, tras 18DIV. **A)** Células control **B)** Células diferenciadas.

El análisis de los registros de imagen de calcio se muestra en la **figura 20**. En estas figuras, donde se tienen en cuenta las células con respuesta a KCl, que actúa como un control despolarizante, las células control no muestran respuesta a ninguno de los estímulos, puesto que ninguna célula control ha respondido a KCl.

En la **figura 20A**, que muestra la respuesta a diferentes estímulos, se observa que las células transdiferenciadas presentan respuesta a todos los estímulo. Las células tratadas durante 18 días in vitro (18DIV) presentan una alta respuesta al mentol y al AITC, cerca del 250%, mientras que la respuesta a la capsaicina es considerablemente menor, alrededor del 40%. Estas respuestas

corresponden a las células que han reaccionado al KCl; en este caso, las células transdiferenciadas han alcanzado un %Fmax de casi el 100%.

En cuanto al porcentaje de células que responden, que se puede observar en la **figura 20B**, se sigue observando que las células control no hay respuesta a ningún estímulo al seleccionar las células con respuesta al KCl. En el caso de las células transdiferenciadas, se observa que aproximadamente un 20% de células responde a todos los estímulos.

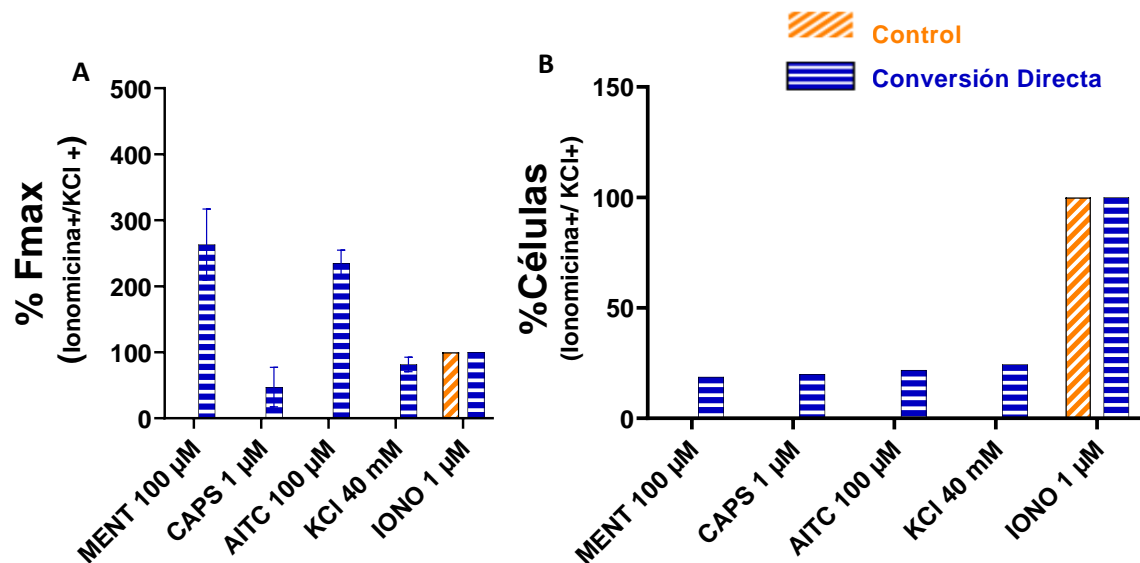


Figura 20: Resultados de imágenes de calcio de IMR90 tratadas el protocolo de conversión de 3ª Generación, tras 18DIV. A) y B) Intensidad de respuesta y porcentaje de células respondedoras, únicamente de aquellas que muestran despolarización por KCl. Los datos se representan como la media ± SEM (N= 2, n_{control} =58 células, n_{DC} =183 células) o media ± SD (N=2, n=2 cristales). El análisis estadístico se realizó mediante un test t-student multiple no pareado, con la corrección de Welch, que asume que las varianzas entre grupos no son iguales, no se encuentran diferencias significativas.

Desarrollo de medio de Inducción tardío.

Tras observar que efectivamente es posible el mantenimiento de estas células un mayor tiempo, se intentó continuar el protocolo establecido, introduciendo un medio de inducción tardío desde los 11DIV, compuesto por Ndiff, LM-22A4, GDNF, NT3, dcAMP, NGF.

Se obtuvieron imágenes donde se pueden observar los cambios morfológicos entre las células control y las células inducidas (**Figura 21**), mostrando mayor madurez neuronal.

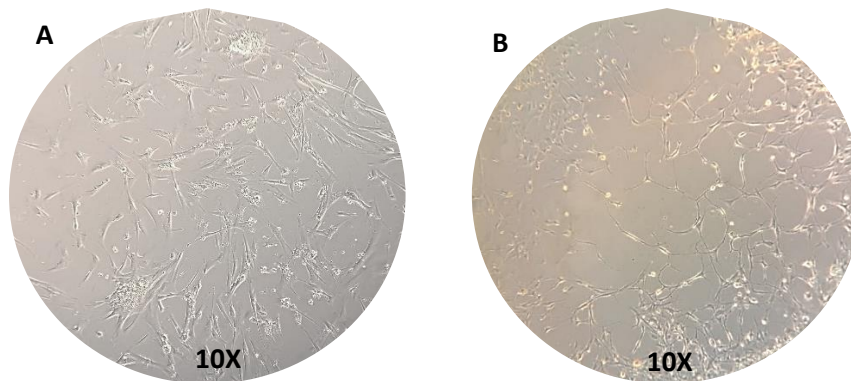


Figura 21: Visualización de las células en el microscopio visible a 10 aumentos. **A:** células que no sufrieron el proceso de diferenciación. **B:** células tras el proceso de diferenciación neuronal de 18 días de duración empleando el protocolo de 3ª Generación y adición de medio tardío.

En la **figura 22** se muestran los resultados de las medidas funcionales. Se puede observar los patrones de respuesta de las células a los diferentes estímulos. Estos resultados han sido analizados en detalle y se muestran de manera más específica en la **figura 23**, donde se resumen las respuestas obtenidas en este experimento.

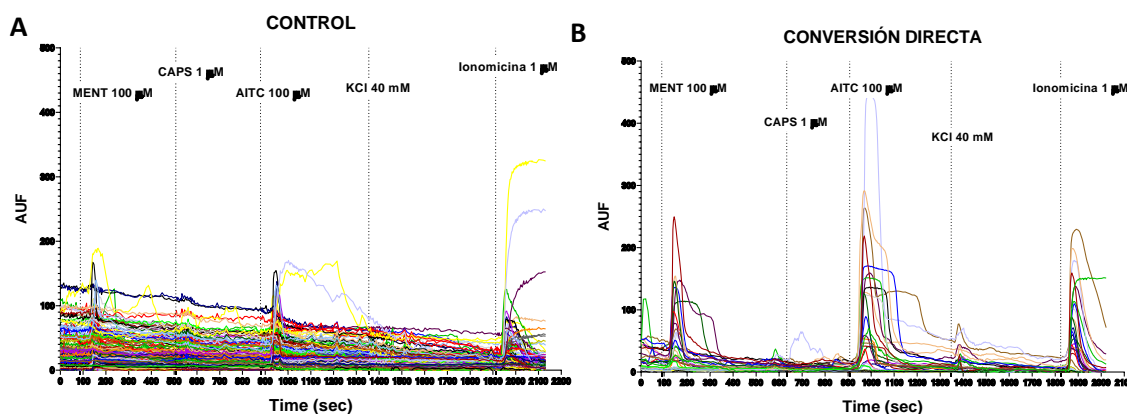


Figura 22: Registro representativo de fluorimetría de calcio de células IMR90 tratadas con el protocolo de conversión de 3ª Generación tras 18 DIV y adición de medio tardío. Se observan la presencia o ausencia de picos de fluorescencia por respuesta a mentol 100µM, capsaicina 1 µM, AITC 100 µM, KCl 40 mM e ionomicina 1 µM de **A)** células control **B)** de células diferenciadas.

Tras el análisis de los resultados de actividad, figuras 23A y 23B, se observa que en este caso las células control muestran una ligera respuesta del 25% a KCl, y también se obtiene respuesta al resto de estímulos. Estas células control responden cerca del 100% a los estímulos de mentol y AITC, y casi un 50% a capsaicina. Esta respuesta de las células control, puede deberse a que a estas también se le adicionó a las 11DIV medio de conversión tardío.

Tras la conversión, las células siguen mostrando una respuesta elevada al mentol y al AITC con un porcentaje que supera el 200% para estos estímulos y una respuesta del 100% para la capsaicina. La mayoría de las células que han dado respuestas a los estímulos anteriores también generan respuesta al KCl. Indicando que estas células transdiferenciadas mantienen una alta reactividad a estos estímulos,

sugiriendo una robusta expresión de los receptores TRPM8, TRPA1 Y TRPV1. La respuesta generada a KCl en este caso es del 90%. Al tener respuestas tanto de células control como de células inducidas sí que se puede llevar a cabo un análisis estadístico en el cual se observa que hay diferencias significativas en el porcentaje de respuesta, y en cuanto al porcentaje de células que responden se observa una tendencia sin significancia debido a a alta variabilidad de las medidas.

En términos de porcentaje de células que responden (**Figura 23B**), los resultados son consistentes, mostrando una cierta diferencia de porcentaje de respuesta a los estímulos de las células transdiferenciadas frente al control.. Estos resultados sugieren que las células que se transdiferencian tiene una cierta tendencia a tener una respuesta mayor frente a los distintos estímulos.

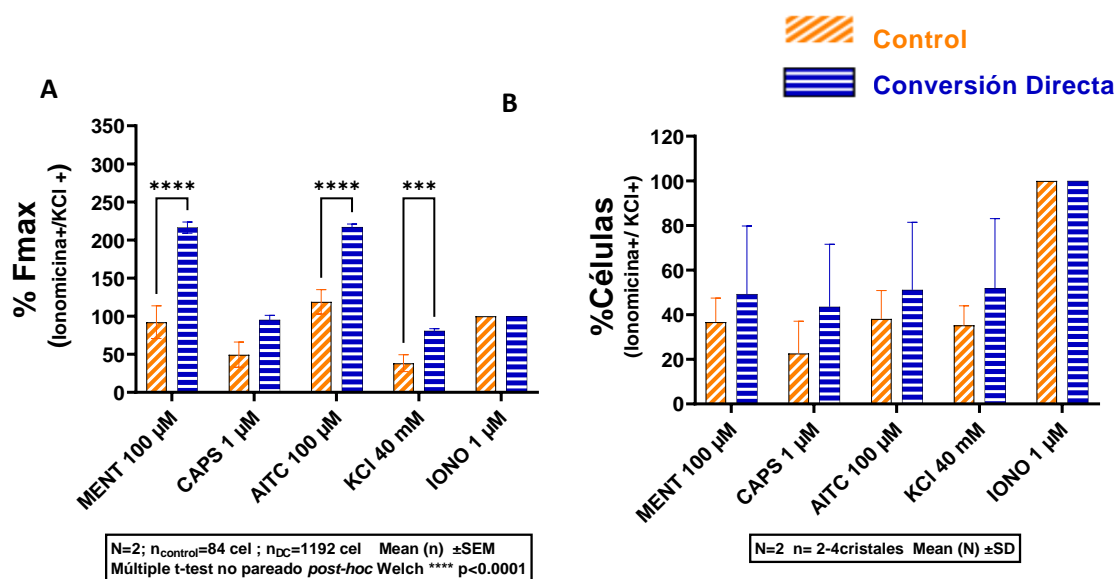


Figura 23: Resultados de imágenes de calcio de IMR90 tratados el protocolo de conversión de 3^o Generación, tras 18DIV y adición del medio tardío. **A)** y **B)** Intensidad de respuesta y porcentaje de células respondedoras, únicamente de aquellas que muestran despolarización por KCl. Los datos se representan como la media \pm SEM (N= 2, n_{control} =84 células, n_{DC} =1192 células) o media \pm SD (N=2, n=2 cristales). El análisis estadístico se realizó mediante un test t-student múltiple no pareado, con la corrección de Welch, que asume que las varianzas entre grupos no son iguales, con una confianza del ****p<0.0001.

Mantenimiento de las células 25DIV.

Después de observar que el mantenimiento de las células de conversión directa era posible por más de 18 días *in vitro* (DIV) utilizando un protocolo de tercera generación modificado, y que la adición del medio tardío mostraba una tendencia a mejorar la eficiencia del proceso de transdiferenciación, se decidió investigar si estas células podían mantenerse *in vitro* durante un período más prolongado.

Para ello se vio una comparativa de la morfología (**Figura 24**). Las células muestran una morfología típica de fibroblastos en la figura 24A. Sin embargo, en la figura 24B, se observa que las células

presentan prolongaciones características de neuronas maduras, lo que indica una mayor similitud con la estructura neuronal.

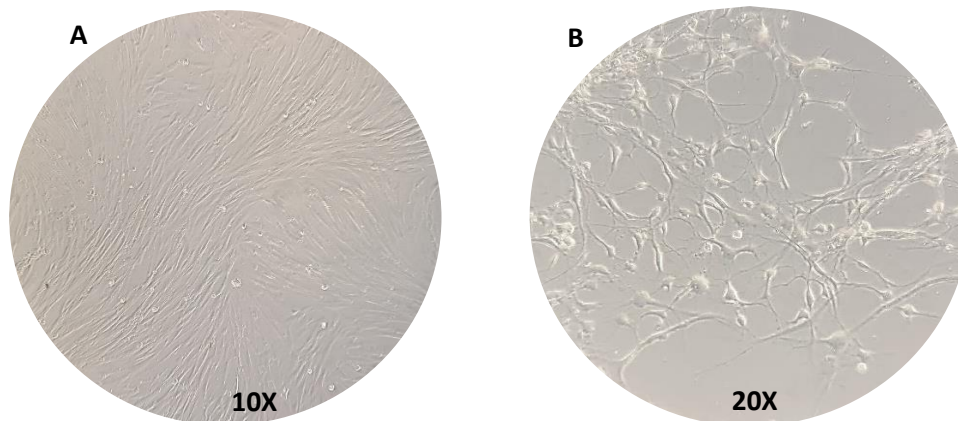


Figura 24: Comparación morfológica de las células IMR-90 tras 25DIV y la adición de medio tardío. Visto con microscopio 10X y 20X. A) Células control. B) Células con de conversión directa.

Los resultados de las medidas de actividad tras 25 DIV se muestran en la **figura 25**, donde se muestra un trazado representativo de la variación de fluorescencia por respuesta a los estímulos en células IMR90.

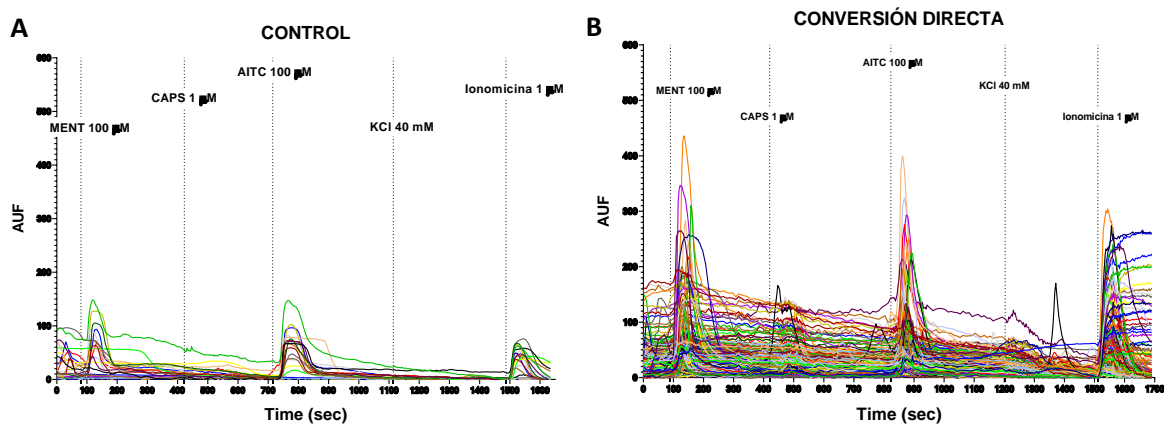


Figura 25: Representación gráfica de las respuestas obtenidas mediante imágenes de calcio de IMR90 tratadas con el protocolo de conversión de 3ª Generación, tras 25 DIV y la adición del medio tardío. A) Células control B) Células diferenciadas.

Se buscó evaluar cómo afectaba el aumento temporal de cultivo a la eficiencia de la transdiferenciación. Por ello se mantuvieron estas células 25DIV y tras este periodo se midió la actividad, obteniendo los resultados que se muestran en la **Figura 26**.

Como en los casos anteriores, se analizan dos parámetros: el porcentaje de respuesta máxima (% Fmax) y el porcentaje de células activadas en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo mentol, capsaicina, AITC, KCl e ionomicina

En la **figura 26A** donde se estudian las células que presentan despolarización por KCl, se observa que las respuestas al mentol y al AITC en las células transdiferenciadas oscila alrededor del 140% y 150% respectivamente. La respuesta a la capsaicina oscila nuevamente alrededor del 100%, mientras que la respuesta al KCl sigue siendo el estándar de comparación, confirmando la capacidad de despolarización neuronal en las células transdiferenciadas. En este caso, tras examinar las células que responden a KCl no se obtiene ninguna respuesta a ningún estímulo en las células control a excepción de la respuesta a ionomicina que funciona como indicativo de viabilidad celular.

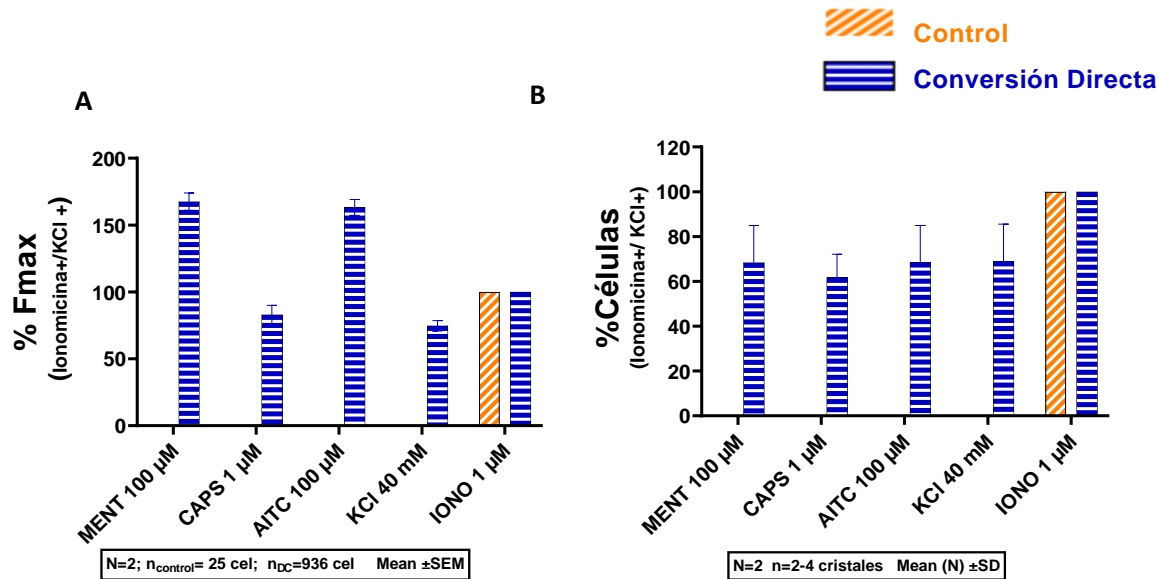


Figura 26: Resultados de imágenes de calcio de IMR90 tratados el protocolo de conversión de 3^o Generación, tras 25DIV y adición de medio tardío. **A) y B)** Intensidad de respuesta y porcentaje de células respondedoras, únicamente de aquellas que muestran despolarización por KCl. Los datos se representan como la media ± SEM (N= 2, n_{control} =25 células, n_{DC} =936 células) o media ± SD (N=2, n=2 cristales). El análisis estadístico se realizó mediante un test t-student múltiple no pareado, con la corrección de Welch, que asume que las varianzas entre grupos no son iguales, no se encuentran diferencias significativas.

El porcentaje de células que responden a KCl es del 65% (**Figura 26B**), con un alto porcentaje de células que responden a mentol, capsaicina y AITC, lo que sugiere que la transdiferenciación ha sido eficaz y que las células mantienen su funcionalidad neuronal tras 25 días *in vitro*. En el caso de las células control, no se observa respuesta a ninguno de los estímulos, en este caso no se adicionó a las 11DIV medio de conversión tardío.

En resumen, estos resultados sugieren que las células IMR-90 transdiferenciadas con el protocolo de 3^a Generación mantienen una buena funcionalidad neuronal tras 25 días *in vitro*, con respuestas robustas a capsaicina y KCl, y una funcionalidad a mentol y AITC. Por estos datos se puede ver que las células siguen mostrando características neuronales, como lo indica la alta respuesta al KCl y a otros

estímulos neuronales. La viabilidad celular es confirmada en todos los experimentos, lo que refuerza la efectividad del protocolo a largo plazo

RESULTADO GLOBAL

Para visualizar de forma más completa las diferencias entre protocolos, se ha estudiado en conjunto el efecto en la respuesta de cada estímulo y el porcentaje de células que responden a cada estímulo (Figura 27).

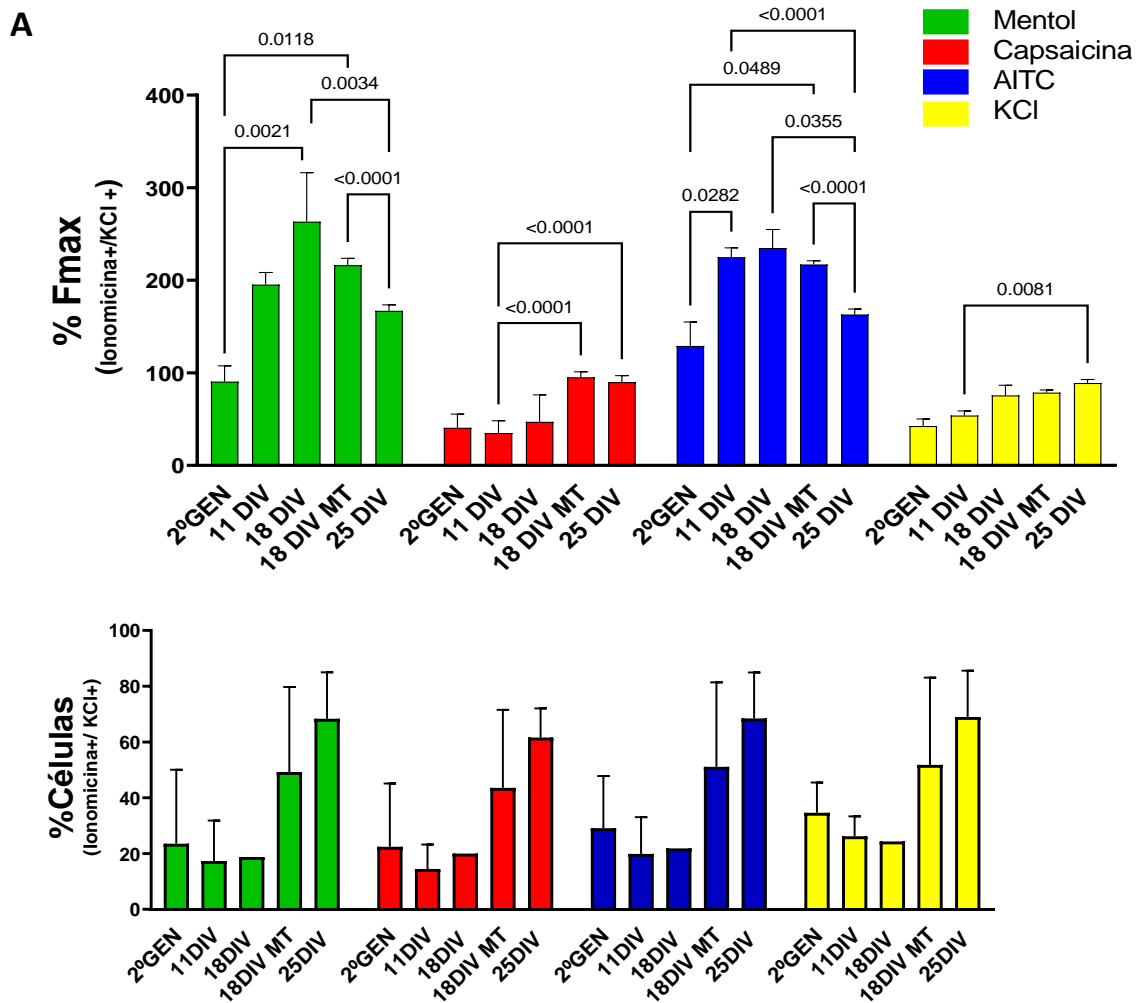


Figura 27: Resumen global de todas las respuestas obtenidas con los diferentes protocolos de conversión directa en IMR90 agrupados por estímulos. **A)** Intensidad de respuesta en porcentaje de la respuesta máxima. **B)** Porcentaje de células que responden a cada estímulo. Se muestran las diferencias significativas obtenidas por análisis two-way ANOVA

En la **figura 27A** se puede observar que las respuestas a los distintos estímulos son significativamente mayores con el protocolo de 3ª Generación en comparación con el protocolo de 2ª Generación. Además, se aprecia un aumento en las respuestas a los estímulos de mentol y AITC a los 18 días *in vitro* (DIV), con un porcentaje de respuesta alrededor del 200%, que disminuye ligeramente a los 25 DIV. La respuesta a la capsaicina muestra una ligera tendencia al aumento en relación con el tiempo de cultivo de las células tratadas; sin embargo, este incremento es más notable cuando se añade el medio tardío, logrando una respuesta cercana al 100%. En cuanto al KCl, que indica si las células se han transdiferenciado, se observa una tendencia creciente conforme aumenta el tiempo de cultivo.

Al examinar los datos de la **figura 27B**, se observa que no hay diferencias significativas debido a la variabilidad, pero se observa una tendencia a un aumento en la respuesta a los diferentes estímulos en el protocolo de 3ª Generación muestran un mayor. A medida que aumentan los días *in vitro*, el porcentaje de células que responden también aumenta. En particular, dentro de este protocolo, las células evaluadas a los 25 DIV con la adición del medio tardío presentan los porcentajes más altos de células que generan una respuesta.

DISCUSIÓN

En este trabajo, se emplearon diversos protocolos de conversión para convertir IMR-90 en neuronas sensoriales. Las células IMR-90 se han escogido como la célula de partida para estos protocolos debido a que es una línea celular inmortalizada, a su facilidad de cultivo, a la falta de estados celulares intermedios, a los tiempos de conversión más rápidos y a que presentan menor riesgo de tumorigénesis en comparación con iPSc [28].

Además, se ha demostrado que las células convertidas directamente mantienen las marcas epigenéticas de los donantes, el envejecimiento y el mosaicismo, lo que permite estudios de medicina personalizada y la producción de poblaciones mixtas de neuronas sensoriales[68] . A lo largo de este trabajo, se llevaron a cabo diferentes protocolos, con el objetivo de desarrollar un protocolo robusto y eficiente de conversión de IMR-90 a neuronas sensoriales.

La fluorimetría por imagen de calcio se eligió como método principal para caracterizar las neuronas sensoriales obtenidas, debido a que permite obtener imágenes y registros de múltiples células simultáneamente, en contraposición a técnicas electrofisiológicas como la electrofisiología, en donde la actividad se detecta célula a célula. Este método permitió descartar aquellos protocolos que no estaban desarrollando neuronas sensoriales putativas funcionales. Los resultados de este método indirecto deben ser validados en un futuro mediante técnicas directas de electrofisiología.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante la conversión de IMR-90 se puede observar que han sido bastante favorables y que estas células demostraron por lo tanto ser un buen modelo para obtener neuronas sensoriales inducidas, puesto que, en las distintas puestas a punto, tras la diferenciación celular se ha obtenido un adecuado porcentaje de respuestas a estímulos característicos de células neuronales como capsaicina, mentol o AITC. Es interesante observar que la mayor diferencia de respuesta a KCl se observa al comparar el protocolo de 2ª Generación frente al de 3ª Generación, obteniendo una respuesta bastante más elevada al KCl, sugiriendo que el protocolo de 3ª Generación es más efectivo y eficiente en cuanto a la conversión directa de las células. Esto podría deberse a la disminución del empleo de virus junto con la eliminación del sistema TetOn dependiente de doxiciclina y por lo tanto la eliminación de ciertas pequeñas moléculas como la doxiciclina que puede resultar bastante tóxica. Además empleando el protocolo de 2ª Generación, tal y como también se observa en los resultados de la Doctora Simona Giorgi, el porcentaje de células que respondieron a AITC se mantuvo alto en las células control como en las transdiferenciadas, y con porcentajes de respuesta al estímulo muy similares, sugiriendo que TRPA1, que está altamente expresado en los fibroblastos

fetales humanos, puede no ser regulado a la baja durante el proceso de conversión, lo que indica que las células resultantes pueden no convertirse completamente en neuronas sensoriales[28] . De esta forma la co-respuesta al mentol y al AITC podría explicarse por la activación del mentol TRPA1 [28]. En cuanto al porcentaje de respuesta de las células, es de destacar que también es más bajo que en el resto de los casos. Además, la mortalidad de las células era alta al tener un bajo número de células que llegaron al final del protocolo de conversión, por lo que no fue posible una mayor maduración de las células de conversión.

En cuanto al nuevo protocolo desarrollado y puesto a punto en este trabajo, 3ª Generación, se pueden observar unos resultados bastante favorables [28]. Lo más relevante es que estas células inducidas presentan una respuesta clara al KCl, lo que indica un cambio exitoso de una línea celular somática a una neuronal. Las células control mantienen una respuesta nula en la mayoría de los casos a los estímulos. Bien es cierto que en el ensayo de 18DIV con adicción de medio tardío sí que se lleva a apreciar un ligero porcentaje de respuesta al KCl. Esto puede deberse a que en este ensayo a las células control se le adicionó medio tardío y esto podría haber alterado su línea celular. En contraste, las células inducidas mediante el protocolo de 3ª Generación muestran diferencias notables al comparar los tiempos de cultivo y las condiciones de cada protocolo. Se observa que, en estas células sometidas a conversión directa, la respuesta a los estímulos es considerablemente más elevada. Estas células prestan una respuesta más alta a los estímulos de mentol y AITC, y también muestran una respuesta significativa a la capsaicina. Cabe destacar que las respuestas muestran variabilidad entre diferentes configuraciones experimentales, aumentando las respuestas a los estímulos con el tiempo de cultivo *in vitro* de las células tratadas. Este incremento sugiere que un periodo prolongado *in vitro* puede favorecer una mayor maduración neuronal durante la transdiferenciación, lo que podría explicar la mayor eficiencia observada con el protocolo de 3ª Generación en comparación con el de 2ª Generación. Además, se encontró que, al aumentar los días de cultivo, también se incrementa el número de células que responden a diferentes estímulos, indicando una mayor proporción de células que adquieren características neuronales funcionales. Sin embargo, se observó que las células inducidas a los 25 *in vitro* mostraron un porcentaje de respuesta ligeramente menor al mentol y al AITC en comparación con las obtenidas a los 18 DIV, a pesar de presentar características morfológicas neuronales más desarrolladas, y de que su porcentaje de células que responden a los estímulos es mayor. Esta disminución podría deberse a que la fluorimetría por imagen de calcio, es una técnica indirecta y la exposición de estas células a los diversos estímulos necesita ser mayor que en las técnicas electrofisiológicas que miden variaciones en el potencial de membrana. Además el registro tiene una duración elevada, ya que al estar en una puesta a punto de un procedimiento de costo elevado económico y temporal , se intentó obtener la mayor información posible probando todos los estímulos

en cada cristal. Esta diferencia en el porcentaje de respuesta también podría sugerir que las células tratadas y mantenidas 25 días en cultivo, están perdiendo por completo sus características de fibroblastos dejando de expresar constitutivamente canales como TRPM8 (canal de expresión constitutiva en IMR90) y TRPA, que se encuentran en la mayoría de este tipo de células.

Este hallazgo sugiere que el protocolo de 3ª Generación no solo facilita la transdiferenciación de células IMR-90 en neuronas, sino que también podría aumentar la eficiencia de este proceso, dado que la respuesta al KCl se reconoce como un marcador clave del fenotipo neuronal. Por lo tanto, sería fundamental realizar más ensayos para confirmar estos hallazgos, teniendo una reproducibilidad experimental adecuada, ya que para un análisis estadístico robusto es necesario un número de muestras mayor ($N \geq 3$). Asimismo, es importante destacar que el número de células que responden presentan variabilidad entre experimentos, lo que puede atribuirse a la variabilidad intrínseca de los experimentos celulares, especialmente cuando se realizan procesos de transdiferenciación. Esta variabilidad puede influir en la interpretación de los resultados y resalta nuevamente la necesidad de un mayor número de réplicas para obtener conclusiones más precisas.

Este nuevo protocolo desarrollado es prometedor para la transdiferenciación celular, ya que ofrece la posibilidad de aumentar la eficiencia del proceso. Para mejorar este rendimiento, como se ha mencionado anteriormente, se requiere incrementar el número de réplicas experimentales y realizar ajustes metodológicos, como podría ser la modificación del medio de cultivo en etapas tardías. Esto podría incluir el diseño de un nuevo medio de maduración con mayor concentración de moléculas pequeñas relacionadas con el crecimiento y desarrollo neuronal, como se ha sugerido en estudios previos[69]. Para la validación final del protocolo de conversión directa, es necesario complementar los resultados obtenidos del ensayo de calcio con el estudio de la expresión génica mediante qPCR e inmunoblots para obtener una caracterización más completa de las células transdiferenciadas. El siguiente paso para desarrollar el objetivo final del proyecto en el que se incluye este trabajo, es el uso de dispositivos microfluídicos para compartimentalización neuronal, separando el soma de las terminaciones neuronales. Esto permitirá obtener un modelo preclínico de neuronas sensoriales humanas que imita las características fisiológicas para su uso en investigación biomédica y farmacológica. A pesar de los desafíos, los resultados preliminares han sido alentadores, y se espera que, con futuras optimizaciones, este protocolo pueda mejorar significativamente la eficiencia de la transdiferenciación celular.

CONCLUSIONES

1. El protocolo de conversión directa de 2ª Generación, que incluye 3 vectores lentivirales, Brn3a y Ngn1 y rtTA dependientes de doxiciclina, medio neurobasal y pequeñas moléculas, induce la transdiferenciación neuronal de la línea de fibroblastos fetales de pulmón IMR90, aunque con una supervivencia de tan solo 11 días *in vitro* (DIV), posiblemente debido a la toxicidad de la doxiciclina.
2. El protocolo de conversión directa 3ª Generación mediante los lentivirus BN1 y 3410, medio Ndiff y adición de nuevas pequeñas moléculas ha sido replicado utilizando la línea IMR90, superando los 11DIV del anterior protocolo.
3. El nuevo protocolo muestra una mayor eficiencia de conversión, evidenciada por los registros de actividad neuronal obtenidos mediante fluorimetría por imagen de calcio mejorando con el tiempo incubación, bien por aumento de la respuesta tras 18DIV o por aumento del número de células que responden después de 25DIV.
4. Las neuronas generadas con el protocolo de 3ª Generación presentan características morfológicas y funcionales que se asemejan a las neuronas nativas, incluyendo la capacidad de responder a estímulos sensoriales específicos en ensayos prolongados, lo que valida la relevancia del modelo *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cohen, S.P., L. Vase, and W.M. Hooten, *Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances*. The Lancet, 2021. **397**(10289): p. 2082-2097.
2. Basbaum, A.I., et al., *Cellular and molecular mechanisms of pain*. Cell, 2009. **139**(2): p. 267-284.
3. Axelrod, F.B. and M.J. Hilz. *Inherited autonomic neuropathies*. in *Seminars in neurology*. 2003. Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ...
4. Pérez Fuentes, J., *Updated version of the IASP definition of pain: One step forward or one step back*. Rev. Soc. Española Dolor, 2020. **27**: p. 232-233.
5. Puebla Díaz, F., *Tipos de dolor y escala terapéutica de la OMS: Dolor iatrogénico*. Oncología, 2005. **28**(3): p. 33-37.
6. Zhuo, M., *Molecular mechanisms of pain in the anterior cingulate cortex*. Journal of neuroscience research, 2006. **84**(5): p. 927-933.
7. Zolezzi, D.M., L.M. Alonso-Valerdi, and D.I. Ibarra-Zarate, *Chronic neuropathic pain is more than a perception: Systems and methods for an integral characterization*. Neuroscience Biobehavioral Reviews, 2022. **136**: p. 104599.
8. Dahlhamer, J., *Prevalence of chronic pain and high-impact chronic pain among adults—United States, 2016*, in *MMWR. Morbidity mortality weekly report*. 2018.
9. Attal, N., et al., *The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey*. Pain, 2011. **152**(12): p. 2836-2843.
10. Walk, D. and M. Poliak-Tunis, *Chronic pain management: an overview of taxonomy, conditions commonly encountered, and assessment*. Medical Clinics, 2016. **100**(1): p. 1-16.
11. Raja, S., et al., *La revisión Definición de dolor de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor: conceptos, desafíos y compromisos*. Dolor, 2020. **161**(9): p. 1976-82.
12. Fitzcharles, M.-A., et al., *Nociplastic pain: towards an understanding of prevalent pain conditions*. The Lancet, 2021. **397**(10289): p. 2098-2110.
13. Pleger, B. and A. Villringer, *The human somatosensory system: from perception to decision making*. Progress in neurobiology, 2013. **103**: p. 76-97.
14. Kandel, E.R., *Principles of Neural Science, Fifth Edition*. 2013: McGraw-Hill Education.
15. Peña, C.D.I., et al., *Neuropsychological differences between types of multiple sclerosis: relapsing remitting versus primary progressive*. Revista mexicana de neurociencia, 2020. **21**(5): p. 192-198.
16. Le Pichon, C.E. and A.T. Chesler, *The functional and anatomical dissection of somatosensory subpopulations using mouse genetics*. Frontiers in neuroanatomy, 2014. **8**: p. 21.
17. Glatte, P., et al., *Architecture of the cutaneous autonomic nervous system*. Frontiers in neurology, 2019. **10**: p. 970.
18. Julius, D. and A.I. Basbaum, *Molecular mechanisms of nociception*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 203-210.
19. Li, L., et al., *The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons*. Cell, 2011. **147**(7): p. 1615-1627.
20. Kendroud, S., et al., *Physiology, nociceptive pathways*, in *StatPearls [Internet]*. 2022, StatPearls Publishing.
21. Pabón-Henao, T., L.F. Pineda-Saavedra, and Ó.D. Cañas-Mejía, *Fisiopatología, evaluación y manejo del dolor agudo en pediatría*. Saltem Scientia Spiritus, 2015. **1**(2).
22. Plaghki, L., A. Mouraux, and D. Le Bars, *Fisiología del dolor*. EMC-Kinesiterapia-Medicina Física, 2018. **39**(1): p. 1-22.
23. Devor, M., *Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion*. Pain, 1999. **82**: p. S27-S35.
24. Gascon, E. and A. Moqrish, *Heterogeneity in primary nociceptive neurons: from molecules to pathology*. Archives of pharmacal research, 2010. **33**(10): p. 1489-1507.

25. Lallemand, F. and P. Ernfors, *Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons*. Trends in neurosciences, 2012. **35**(6): p. 373-381.
26. Prasad, M.S., R.M. Charney, and M.I. García-Castro, *Specification and formation of the neural crest: Perspectives on lineage segregation*. Genesis, 2019. **57**(1): p. e23276.
27. Marmigère, F. and P. Carroll, *Neurotrophin signalling and transcription programmes interactions in the development of somatosensory neurons*. Neurotrophic factors, 2014: p. 329-353.
28. Giorgi, S., *Direct conversion and microfluidic chambers as tools to study the in-vivo sketch of human sensory neurons*. 2024, Universidad Miguel Hernández de Elche.
29. Mayor, R. and E. Theveneau, *The neural crest*. Development, 2013. **140**(11): p. 2247-2251.
30. Wood, J.N., et al., *Novel cell lines display properties of nociceptive sensory neurons*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 1990. **241**(1302): p. 187-194.
31. Yin, K., G.J. Baillie, and I.J.M.p. Vetter, *Neuronal cell lines as model dorsal root ganglion neurons: A transcriptomic comparison*. Molecular pain, 2016. **12**: p. 1744806916646111.
32. Shiers, S., R.M. Klein, and T.J. Price, *Quantitative differences in neuronal subpopulations between mouse and human dorsal root ganglia demonstrated with RNAscope in situ hybridization*. Pain, 2020. **161**(10): p. 2410.
33. Rostock, C., et al., *Human vs. mouse nociceptors—similarities and differences*. Neuroscience, 2018. **387**: p. 13-27.
34. Koerner, J. and A. Lampert, *Functional subgroups of rat and human sensory neurons: a systematic review of electrophysiological properties*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2022. **474**(4): p. 367-385.
35. Desai, N., P. Rambhia, and A. Gishto, *Human embryonic stem cell cultivation: historical perspective and evolution of xeno-free culture systems*. Reproductive Biology Endocrinology, 2015. **13**: p. 1-15.
36. Maherali, N. and K. Hochedlinger, *Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells*. Cell stem cell, 2008. **3**(6): p. 595-605.
37. Zeidler, M., et al., *NOCICEPTRA2. 0-a comprehensive ncRNA atlas of human native and iPSC-derived sensory neurons*. iScience, 2023. **26**(12).
38. Mertens, J., et al., *Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience*. Nature Reviews Neuroscience, 2016. **17**(7): p. 424-437.
39. Shrigley, S., et al., *Simple generation of a high yield culture of induced neurons from human adult skin fibroblasts*. Journal of Visualized Experiments: JoVE, 2018(132).
40. Ashcroft, F.M., *Ion channels and disease*. 1999: Academic press.
41. Grider, M.H., R. Jessu, and R. Kabir, *Physiology, action potential*. 2019.
42. Romera, E., et al., *Neurofisiología del dolor*. Rev Soc Esp Dolor, 2000. **7**(Supl II): p. 11-17.
43. Coward, K., et al., *Immunolocalization of SNS/PN3 and NaN/SNS2 sodium channels in human pain states*. Pain, 2000. **85**(1-2): p. 41-50.
44. Zimmer, T., V. Haufe, and S. Blechschmidt, *Voltage-gated sodium channels in the mammalian heart*. Global Cardiology Science Practice, 2015. **2014**(4): p. 58.
45. Benarroch, E.E., *Ion channels in nociceptors: recent developments*. Neurology, 2015. **84**(11): p. 1153-1164.
46. Zimmermann, K., et al., *Sensory neuron sodium channel Nav1. 8 is essential for pain at low temperatures*. Nature methods, 2007. **447**(7146): p. 856-859.
47. Haberberger, R.V., et al., *Human dorsal root ganglia*. Frontiers in cellular neuroscience, 2019. **13**: p. 271.
48. Vaiserman, A. and O. Lushchak, *Geroscience*, in *Encyclopedia of Biomedical Gerontology*. 2019. p. 154-159.
49. Montiel, A.F., *Los canales de comunicación sensorial TRPs como dianas farmacológicas*. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2009.

50. Venkatachalam, K. and C. Montell, *TRP channels*. *Annu. Rev. Biochem.*, 2007. **76**(1): p. 387-417.
51. Song, M.Y. and J.X.-J. Yuan, *Introduction to TRP channels: structure, function, and regulation*. *Membrane Receptors, Channels Transporters in Pulmonary Circulation*, 2010: p. 99-108.
52. Zheng, J., *Molecular mechanism of TRP channels*. *Comprehensive Physiology*, 2013. **3**(1): p. 221.
53. Clapham, D.E., L.W. Runnels, and C. Strübing, *The TRP ion channel family*. *Nature Reviews Neuroscience*, 2001. **2**(6): p. 387-396.
54. Fischer, M.J., S.W. Mak, and P.A. McNaughton, *Sensitisation of Nociceptors—What are Ion Channels Doing?* *The Open Pain Journal*, 2010. **3**.
55. Nilius, B. and G. Owsianik, *The transient receptor potential family of ion channels*. *Genome biology*, 2011. **12**: p. 1-11.
56. Hoffstaetter, L.J., S.N. Bagriantsev, and E.O. Gracheva, *TRPs et al.: a molecular toolkit for thermosensory adaptations*. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2018. **470**: p. 745-759.
57. Vay, L., C. Gu, and P.A. McNaughton, *The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications*. *British journal of pharmacology*, 2012. **165**(4): p. 787-801.
58. Clapham, D.E., *TRP channels as cellular sensors*. *Nature*, 2003. **426**(6966): p. 517-524.
59. Dhaka, A., et al., *TRPM8 is required for cold sensation in mice*. *Neuron*, 2007. **54**(3): p. 371-378.
60. Julius, D., *TRP channels and pain*. *Annual review of cell developmental biology*, 2013. **29**(1): p. 355-384.
61. Pérez de Vega, M.J., et al., *Transient receptor potential melastatin 8 channel (TRPM8) modulation: cool entryway for treating pain and cancer*. *Journal of medicinal chemistry*, 2016. **59**(22): p. 10006-10029.
62. Landini, L., et al., *TRPA1 role in inflammatory disorders: what is known so far?* *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(9): p. 4529.
63. Bautista, D.M., et al., *TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents*. *Cell*, 2006. **124**(6): p. 1269-1282.
64. Riquelme, E.M.V., *Investigating chemotherapy-induced peripheral neuropathies and its sexual dimorphism using an in vitro preclinical pain model*. 2023, Universidad Miguel Hernández de Elche.
65. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-676.
66. Kim, C., *Disease modeling and cell based therapy with iPSC: future therapeutic option with fast and safe application*. *Blood research*, 2014. **49**(1): p. 7-14.
67. Vierbuchen, T. and M. Wernig, *Molecular roadblocks for cellular reprogramming*. *Molecular cell*, 2012. **47**(6): p. 827-838.
68. Traxler, L., F. Edenhofer, and J. Mertens, *Next-generation disease modeling with direct conversion: a new path to old neurons*. *FEBS letters*, 2019. **593**(23): p. 3316-3337.
69. Liu, Y., et al., *The pain target NaV1. 7 is expressed late during human iPSC cell differentiation into sensory neurons as determined in high-resolution imaging*. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2024. **476**(6): p. 975-992.

ANEXO 1

2º Generación

	FUNCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL
NEUROBASAL A	El medio Neurobasal-A es un medio basal diseñado para el mantenimiento a largo plazo y la maduración de neuronas postnatales y cerebrales	
B27 sin vitamina A	El suplemento B-27 sin vitamina A es el suplemento de cultivo celular neuronal más citado. Sin suero ideal para el cultivo de progenitor neural y células madre.	1X
GLUTAMAX	Suplemento que es una alternativa a la L-glutamina en una mayor forma estable y mejorada que proporciona una fuente más estable y duradera de este aminoácido en los medios de cultivo celulares. Ayuda a mantener la salud y la proliferación celular durante períodos más largos de tiempo.	1X
N2	El suplemento N-2 es un suplemento sin suero recomendado para el crecimiento y la expresión de neuroblastomas, así como neuronas post-mitóticas en cultivos primarios tanto del sistema nervioso periférico como del sistema nervioso centra	1X
hFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos humanos. Favorece la inducción de plasticidad celular, aumenta la proliferación y supervivencia Ccelular, actua en la modulación del microambiente y además interacciona con otros factores de crecimiento	20ng/mL
DOXICICLINA	Antibiótico del grupo de las tetraciclinas con una actividad antimicrobiana de amplio espectro contra varias bacterias. Inhibe con eficacia la síntesis de proteínas bacterianas y deteniendo así el crecimiento y la replicación. También actúa como un inhibidor de las metaloproteinasas de matriz.	1µM/mL
NOGGIN	Proteína implicada en el desarrollo embrionario y en la regulación de la diferenciación celular. Funciona como antagonista de la proteína morfológica ósea (BMP), bloqueando la señalización de BMPs al unirse a ellos y evitar su interacción con los receptores en la superficie celular. Está asociada con el desarrollo de varios órganos corporales incluyendo el tejido nervioso, promoción de la neurogénesis	100ng/mL
SONIC HEDGEHOG(SHH)	Proteína señalizadora crucial en el desarrollo embrionario y la regulación del destino celular. Juega roles fundamentales en la proliferación celular, la diferenciación, la morfogénesis y la organización del patrón de tejidos. Capacidad para influir en la identidad y el comportamiento celular.	100ng/mL
Y27632	Inhibidor del ROCK (Rho-associated protein kinase). Actúa en la supervivencia celular, facilita la reprogramación celular y además mejora la proliferación celular	5µM

DAPT	Inhibidor de γ -secretasa, que juega un papel crucial en la Vía Notch, causando efectos en la diferenciación celular, promueve la diferenciación de células madre o progenitoras hacia linajes neuronales. Además, facilita la reprogramación celular e interacciona con otras vías de señalización	5 μ M
LDN-193189	Inhibidor selectivo del receptor de las proteínas morfogénicas óseas (BMP). Puede desempeñar roles importantes en la regulación de la diferenciación y la transdiferenciación celular, actuando en la diferenciación neuronal y reprogramación celular al inhibir la señalización de BMP	0,5 μ M
FORSKOLINA	Activador potente, reversible, rápido y permeable a las células de la adenilato ciclasa, una enzima que convierte el ATP en AMPc y pirofosfato. En combinación con otros compuestos, la forskolina permite la reprogramación química de fibroblastos	5 μ M
CHIR99021	Inhibidor altamente selectivo de la GSK-3 (glycogen synthase kinase 3), promoviendo la activación de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, vía crucial en la regulación de la proliferación, diferenciación y pluripotencia celular.	3 μ M
SB 431542	Compuesto químico conocido como un inhibidor selectivo de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). También inhibe la expresión génica, la apoptosis y la supresión del crecimiento.	2,5 μ M
ÁCIDO VALPROICO (VPA)	Medicamento de amplio espectro, ya que actúa en diversos canales del sistema nervioso central. Agente importante debido a su capacidad para inhibir las histonas deacetilasas (HDACs), lo que afecta la epigenética y la expresión génica.	2,5 μ M

3º Generación

	FUNCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL
Ndiff 227	Medio definido, sin suero, que se desarrolló inicialmente para diferenciar células madre embrionarias (ES) de ratón en monocultivo adherente hacia un linaje neuronal. Se emplea para diferenciación de células además de que podría usarse para generar de manera eficiente y reproducible estructuras organoides tridimensionales	
dcAMP	Es un análogo sintético del AMP cíclico (cAMP) que es permeable a la membrana. Activa las vías de señalización de cAMP/PKA, desencadenando una cascada de señalización que puede influir en la expresión génica y actividad celular.	0,5mM
ÁCIDO VALPROICO (VPA)	Medicamento de amplio espectro, ya que actúa en diversos canales del sistema nervioso central. Agente importante debido a su capacidad para inhibir las histonas deacetilasas (HDACs), lo que afecta la epigenética y la expresión génica.	2,5μM
SB 431542	Compuesto químico conocido como un inhibidor selectivo de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β). También inhibe la expresión génica, la apoptosis y la supresión del crecimiento.	2,5μM
NOGGIN	Proteína implicada en el desarrollo embrionario y en la regulación de la diferenciación celular. Funciona como antagonista de la proteína morfológica ósea (BMP), bloqueando la señalización de BMPs al unirse a ellos y evitar su interacción con los receptores en la superficie celular. Está asociada con el desarrollo de varios órganos corporales incluyendo el tejido nervioso, promoción de la neurogénesis	100ng/mL
DAPT	Inhibidor de γ-secretasa, que juega un papel crucial en la Vía Notch, causando efectos en la diferenciación celular, promueve la diferenciación de células madre o progenitoras hacia linajes neuronales. Además, facilita la reprogramación celular e interacciona con otras vías de señalización	5μM
LDN-193189	Inhibidor selectivo del receptor de las proteínas morfogénicas óseas (BMP). Puede desempeñar roles importantes en la regulación de la diferenciación y la transdiferenciación celular, actuando en la diferenciación neuronal y reprogramación celular al inhibir la señalización de BMP	0,5μM
NT3	Factor de crecimiento esencial en la transdiferenciación celular debido a su capacidad para promover la diferenciación neuronal, mejorar la supervivencia y funcionalidad de las neuronas, y modular la plasticidad celular.	10ng/mL
NGF	Neurotrofina crucial que desempeña un papel vital en la supervivencia, desarrollo y función de las neuronas. Tiene la capacidad para promover la diferenciación neuronal,	10ng/mL

	mejorar la supervivencia y funcionalidad de las neuronas, y modular la plasticidad celular	
CHIR99021	Inhibidor altamente selectivo de la GSK-3 (glycogen synthase kinase 3), promoviendo la activación de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, vía crucial en la regulación de la proliferación, diferenciación y pluripotencia celular.	3 μ M
LM-22A4	Compuesto pequeño sintético diseñado para imitar las funciones del factor de crecimiento nervioso (NGF), particularmente en su capacidad para activar los receptores TrkA y TrkB, que son cruciales para la señalización neurotrófica. Utilizado como un agonista de TrkA/TrkB para estudiar y promover la diferenciación y la supervivencia neuronal.	2 μ M
GDNF	Neurotrofina esencial que juega un papel fundamental en la supervivencia, desarrollo y mantenimiento de neuronas, especialmente en las neuronas dopaminérgicas. GDNF ha demostrado ser crucial para la función neuronal y la protección contra el daño neurodegenerativo, y se utiliza para promover la diferenciación neuronal y apoyar la supervivencia celular durante la transdiferenciación.	2 μ M