



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Estandarización y caracterización de un protocolo de reprogramación celular directa desde fibroblastos a neuronas siguiendo una estrategia farmacológica”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Camila Andrea Gudenschwager Ruiz

Director del Seminario de Título:

Christian González-Billault

Septiembre 2018
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por

Camila Gudenschwager Ruiz

“Estandarización y caracterización de un protocolo de reprogramación celular directa desde fibroblastos a neuronas siguiendo una estrategia farmacológica”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular

Dr. Christian González-Billault _____
Director Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Marco Tulio Nuñez _____
Presidente Comisión

Dra Verónica Palma _____
Evaluador

Santiago de Chile, Septiembre 2018

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a mi mamá y mis hermanas (incluida mi prima Katalina, que es como una), que estuvieron siempre conmigo durante este largo proceso.

Agradecimientos

Gracias infinitas a mi familia, por todo el apoyo que me han dado durante todo este tiempo, en especial a mi mamá y hermanas, con las que, pese a los tiempos difíciles, hemos ido cerrando etapas y saliendo adelante.

También quiero agradecer al director de mi seminario de título, Dr. Christian González-Billault, por confiar en mí y darme la oportunidad de participar de su laboratorio donde he aprendido mucho más que cómo hacer ciencia, y dónde a través de las personas y los experimentos, me he reencantado con ella. Gracias a todos los miembros del laboratorio (los que quedan y los que ya tomaron otros rumbos), por enseñarme y estar siempre dispuestos a ayudar y a conversar, especialmente a la Cristi, por su alegría, cariño y apañe, a Felipe, con el que empecé a trabajar en este proyecto hace ya casi un año y me ha acompañado y guiado en este proceso y al Seba, por ese invierno de bicicleta y sopas chinas, donde jamás pensábamos dónde estaríamos ahora.

A mis amigas y amigos, los de la universidad, los del colegio y los de siempre, menciones honrosas para ustedes, sin los que nada de nada sería lo mismo.

Índice de contenidos

Índice de contenidos	x
Índice de tablas	xii
Índice de figuras	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
Resumen	1
Abstract	3
Introducción:	5
Neuronas, sistema nervioso y enfermedades neurodegenerativas	5
Identidad y reprogramación celular.....	6
Reprogramación celular hacia la pluripotencia.....	7
Reprogramación directa mediante sobreexpresión de factores de transcripción.....	9
Reprogramación directa mediante el uso de fármacos.....	11
Mantenimiento de la edad celular durante la reprogramación directa	13
Objetivos generales y específicos	17
Materiales y métodos:	18
Materiales	18
Anticuerpos	18
Fármacos	19
Animales	19
Métodos.....	20
Cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón	20
Cultivo primario de fibroblastos dermales	21
Cultivo primario de neuronas hipocámpales.....	23
Inmunocitoquímica.....	23
Obtención y análisis de imágenes.....	24
Reprogramación directa mediada por fármacos.....	24
Resultados:	26
Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón.....	26
Obtención de fibroblastos dermales murinos	28
Caracterización del cultivo de fibroblastos dermales	31
Reprogramación directa mediada por fármacos	34
Cambios morfológicos y caracterización mediante inmunocitoquímica	34

Expresión de proteínas de citoesqueleto neuronal.....	37
Determinación de la eficiencia de las inducciones:	43
Comparación de la eficiencia de reprogramación entre fibroblastos dermales y MEF.....	47
Disminución de la concentración de I-BET151	49
Discusión:	51
Eficiencia de la inducción neuronal con fármacos.....	51
Citoesqueleto y cambios morfológicos	53
Disminución de la cantidad de I-BET151.....	55
Potencialidad inicial de las células.....	56
Edad de las células	57
Epigenética	58
Proyecciones	63
Conclusiones:	66
Bibliografía:	67

Índice de tablas

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunocitoquímica 18

Tabla 2. Fármacos utilizados en el protocolo de inducción neuronal..... 19

Índice de figuras

Figura 1. Distintas estrategias para la obtención de neuronas funcionales	9
Figura 2 Reprogramación directa mediada por fármacos.....	12
Figura 3. Esquema del cultivo de fibroblastos dermales.	22
Figura 4. Cultivos de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) utilizados para inducción química no presentan neuronas contaminantes.....	28
Figura 5. Migración de los fibroblastos desde los explantes de piel.	30
Figura 6. Cultivos de fibroblastos dermales utilizados para inducción química no presentan neuronas contaminantes.	33
Figura 7. Tratamiento farmacológico genera neuronas inducidas químicamente....	36
Figura 8. Neuronas inducidas a partir de MEF expresan marcadores neuronales de citoesqueleto: pE-tubulina.....	40
Figura 9. Neuronas inducidas a partir de MEF expresan marcadores neuronales de citoesqueleto: MAP2 y tau-1	41
Figura 10. Neuronas inducidas a partir de MEF no expresan marcadores de madurez neuronal	42
Figura 11. Determinación de la eficiencia según la presencia de β III-tubulina	44
Figura 12. Determinación de la eficiencia según parámetros morfológicos	46
Figura 13. MEF presentan mayor eficiencia de inducción en comparación a fibroblastos dermales a los 12 dpi	48
Figura 14. Menor concentración de I-BET aumenta sobrevida y disminuye grado de inducción a los 10 dpi	50

Lista de abreviaturas

BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro

bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblasto

ciN: neurona inducida químicamente

FBS: suero fetal bovino

DMSO: dimetil sulfóxido

GDNF: factor neurotrófico derivado de glía

iN: neurona inducida

iPSC: célula troncal pluripotente inducida

MAP2: proteína asociada a microtúbulos 2

MEF: fibroblastos embrionarios de ratón

pE: poli-glutamilada

Resumen

La comprensión del funcionamiento del sistema nervioso humano se ha dificultado por la inaccesibilidad del tejido y la incapacidad de los modelos celulares y animales de recapitular su fisiología. Adicionalmente, el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen al envejecimiento y a las enfermedades neurodegenerativas asociadas a él, se ha realizado históricamente utilizando animales jóvenes modificados genéticamente, que no han logrado reproducir con exactitud las patologías ni los fenotipos asociados a la vejez. Actualmente existen alternativas como la diferenciación de iPSC (del inglés *induced pluripotent stem cell*) o la reprogramación directa de células somáticas para obtener neuronas funcionales. Existe evidencia que la reprogramación directa permite que las células mantengan características asociadas a la edad de las células de inicio, lo que la convierte en una alternativa atractiva para el estudio del envejecimiento. Además de las estrategias de reprogramación directa basadas en la sobreexpresión de factores de transcripción, se han desarrollado alternativas como la reprogramación mediada por fármacos. Se ha reportado que es posible diferenciar directamente fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, del inglés *mouse embryonic fibroblast*) a partir de un cóctel de fármacos (FICSB: Forskolina, ISX-9, CHIR990210, SB431542, I-BET151) que actúan sobre distintas vías de señalización y producen el cambio en el destino celular. Este seminario tiene como objetivo principal la estandarización de un protocolo de reprogramación directa aplicable a MEF y fibroblastos dermales murinos, que permitan caracterizar este proceso y desarrollar una prueba de concepto para posteriormente aplicar este protocolo a células derivadas de humanos. Con este objetivo, se realizaron cultivos primarios de MEF y la estandarización de un protocolo de obtención de fibroblastos dermales a partir de biopsias de piel de ratón. Se logró obtener poblaciones de MEF y de fibroblastos dermales, que son proliferativas y

susceptibles a la inducción neuronal. Posteriormente, las poblaciones obtenidas se sometieron a la reprogramación mediada por los fármacos FICSB y se obtuvieron neuronas inducidas. Se observó que las células experimentan cambios morfológicos drásticos, se determinó la eficiencia de la inducción a partir de la expresión de β III-tubulina, que fue de aproximadamente 15% para los MEF. Se analizó mediante inmunocitoquímica la expresión de marcadores neuronales de citoesqueleto a los 7 y 12 días post inducción y se obtuvo que las neuronas inducidas a partir de MEF expresan los marcadores neuronales β III-tubulina, pE-tubulina, MAP2 y tau-1, no obstante, su expresión es diferente a la que presentan las neuronas hipocampales primarias y no se observó expresión de marcadores de sinapsis, asociados a la madurez neuronal. Las inducciones sólo duraron 12-14 días debido a la alta tasa de muerte celular, por lo que se intentó disminuir la concentración de I-BET151, uno de los compuestos más citotóxicos del cóctel de fármacos. Se observó que, si bien aumenta la sobrevivencia, disminuye la eficiencia de la inducción. Adicionalmente, se comparó la eficiencia de la inducción entre MEF y fibroblastos dermales y se observó que los MEF son más susceptibles a la inducción neuronal. En conjunto, estos resultados aportan al desarrollo de una novedosa herramienta que nos permitirá estudiar el envejecimiento neuronal.

Abstract

The comprehension of the human nervous system function so far has been difficult mainly due to the inaccessibility of the brain and live neurons and the lack of suitable animal and cellular models. Additionally, the study of the molecular mechanisms underlying aging and associated neurodegenerative diseases has been done historically in genetically modified young animal, that haven't been able to reproduce these pathologies and other age-related phenotypes. There are strategies like iPSC differentiation or direct reprogramming to convert somatic cells into functional neurons. Moreover, directly reprogrammed cells retain aging-associated hallmarks and transcriptomic signatures, which make them an attractive alternative to study aging. Besides direct reprogramming based on ectopic expression of transcription factors, pharmacological approaches have been examined. Direct conversion of mouse embryonic fibroblasts (MEF) into functional neurons mediated by a small molecule cocktail (FICSB: Forskolin, ISX-9, CHIR990210, SB431542, I-BET151) has been reported, that targets different signaling pathways and allow the cell fate change. The main aim of this seminar is to standardize a direct reprogramming protocol in our laboratory that mediates MEF and mouse dermal fibroblasts conversion to induced neurons, to characterize the process and develop a proof of concept to eventually achieve direct reprogramming of human cells. First, we obtained primary MEF cultures and standardized a protocol to obtain dermal fibroblasts from mouse skin biopsies. We obtained proliferative MEF and dermal fibroblast populations, which are suitable for the neuronal induction protocol. Second, MEF and dermal fibroblast were treated with the induction medium and the small molecule cocktail and we obtained induced neurons (iN). We observed early and drastic morphological changes based on β III-tubulin immunostaining and we estimated a 15% induction efficiency. Furthermore, other neuronal cytoskeleton markers expression were evaluated with

immunohistochemical analysis at day 7 and 12 post induction and we detected pE-tubulin, MAP2/tau-1 expression. Nevertheless, iN expression of these markers is lower than in primary neurons used as control and we did not detect synaptic markers expression, which are linked to neuronal maturation. To date, our chemical-based inductions have lasted 12-14 days due to high cell death rate during the reprogramming protocol. To promote higher cell survival and longer induction periods we decreased the I-BET151 concentration, which has been reported as the most cytotoxic compound of the cocktail. Indeed, we observed greater cell survival but also less efficiency. To evaluate the differences between MEF and dermal fibroblast induction we analyzed efficiency in both populations and observed that MEF are more likely to reprogram with this protocol. Together, these results contribute to developing a powerful strategy to study neuronal aging.

Introducción:

Neuronas, sistema nervioso y enfermedades neurodegenerativas

El sistema nervioso está compuesto principalmente por dos clases de células: las neuronas y las células gliales. Desde un punto de vista morfológico, en una neurona se pueden distinguir tres compartimentos subcelulares: el soma o cuerpo celular, el axón y las dendritas. En el soma neuronal se encuentra el núcleo y se sintetizan la mayoría de las proteínas; el axón es una prolongación larga y delgada a través de la cual se transmite el impulso nervioso en forma de potencial de acción, y las dendritas son prolongaciones de mayor calibre y altamente ramificadas, capaces de recibir la información que se transmite a través del potencial de acción. Las neuronas se comunican entre sí a través de contactos sinápticos que están formados por un terminal presináptico axonal, donde se liberan neurotransmisores en respuesta a la llegada de un potencial de acción, y un terminal postsináptico dendrítico que posee la maquinaria molecular necesaria para recibir la señal neuroquímica y propagar el impulso nervioso.

El citoesqueleto determina la morfología de las neuronas y es el responsable de la distribución asimétrica de los organelos en el citoplasma. El citoesqueleto neuronal está formado por tres estructuras filamentosas: microtúbulos, filamentos intermedios o neurofilamentos y microfilamentos de actina. Los microtúbulos forman andamios que se extienden por toda la neurona y juegan un rol clave en el desarrollo y mantención de los procesos neuronales. Los microtúbulos son polímeros formados por la adición de subunidades de α y β -tubulina. En el cerebro, existen más de 20 isotipos de tubulina y algunas de ellas se encuentran presentes sólo en neuronas y por tanto se utilizan como marcadores neuronales, como la β III-tubulina (Sullivan y Cleveland 1986). También existen modificaciones post-traduccionales de la tubulina

que son específicas de las neuronas; un ejemplo de ello es la adición de residuos de ácido glutámico (E), generando la tubulina poliglutamilada (pE-tubulina) (Larcher et al. 1996). Otros componentes del citoesqueleto que se utilizan como marcadores neuronales son proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, del inglés: *microtubule associated protein*) tales como MAP2 y tau-1 (Bodaleo et al. 2016; Dehmelt y Halpain 2005).

Uno de los principales obstáculos en el estudio del desarrollo y función del sistema nervioso central humano ha sido cómo obtener distintos tipos celulares funcionales. Actualmente existe mucho interés en las enfermedades neurodegenerativas que aumentan cada año en la población mundial como la enfermedad de Parkinson (PD, del inglés *Parkinson's disease*) que consiste en una pérdida de las neuronas dopaminérgicas presentes en la sustancia *nigra*, o la enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer's disease*), caracterizada por un deterioro progresivo de la memoria. Hasta el momento la mayoría de la investigación se ha desarrollado utilizando modelos celulares y animales, pero es importante tener en cuenta de hasta qué punto son comparables o extrapolables los resultados obtenidos, en cuanto a su comportamiento a nivel celular y funcional, a las células neuronales humanas (Mertens et al. 2016).

Identidad y reprogramación celular

La potencialidad celular es la habilidad de las células de diferenciarse en otros linajes celulares. Existen tres tipos de potencialidad celular: totipotencial, pluripotencial y multipotencial. El cigoto es una célula totipotente, que da origen a todos los tipos celulares: tanto al tejido embrionario (células somáticas y gametos) como al tejido extraembrionario. Las células pluripotentes son aquellas que pueden diferenciarse a cualquier célula de las tres capas germinales que dan origen al organismo: endodermo (tracto gastrointestinal, pulmones, estómago), mesodermo (músculo,

hueso, sangre, sistema urogenital, dermis) y ectodermo (tejido epidermal y sistema nervioso). Las células multipotentes, son capaces de dar origen a algunos tipos celulares, como por ejemplo las células troncales mesenquimáticas que pueden dar origen a osteoblastos, condrocitos, adipocitos y miocitos.

Las células somáticas diferenciadas han perdido la potencialidad y su identidad de linaje es considerada muy estable debido a las configuraciones rígidas de la cromatina, las modificaciones epigenéticas del DNA, y las redes de factores de transcripción que refuerzan el linaje (Vierbuchen y Wernig 2012). Se ha acumulado evidencia de que los cambios que ocurren durante la diferenciación celular son reversibles mediante estrategias experimentales: los experimentos de transferencia nuclear somática de Gurdon (1958), la diferenciación espontánea de fibroblastos hacia células musculares y adipocitos al ser tratadas con inhibidores de la metilación del DNA (5-azacitidina) (Taylor and Jones, 1979), la conversión de fibroblastos en miocitos al sobreexpresar uno de los factores de diferenciación claves durante el establecimiento del linaje muscular MyoD (Davis, 1987), entre otros. No solamente se ha logrado modificar el destino de células diferenciadas hacia otros linajes cercanos, sino también modificar el destino celular de células somáticas hacia el estado pluripotente capaz de diferenciarse en células de las 3 capas germinales, mediante una estrategia experimental conocida como reprogramación celular.

Reprogramación celular hacia la pluripotencia

Hace más de una década, se observó por primera vez que la sobreexpresión de una combinación de cuatro factores de transcripción OSKM (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) es suficiente para generar células troncales pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés: *induced pluripotent stem cells*) a partir de fibroblastos embrionarios de ratón, que son equivalentes a las células troncales embrionarias de ratón (ESC, del inglés:

embryonic stem cells) en su potencialidad, siendo capaces de dar origen a los tres linajes: mesodermo, endodermo y ectodermo (Takahashi y Yamanaka 2006).

El estado pluripotente se ha conceptualizado como el “estado basal” de la identidad celular, por lo que la pluripotencia podría ser considerada el resultado de la eliminación de las marcas adquiridas epigenéticamente a lo largo del desarrollo (Silva y Smith 2008). Según esta lógica, la reprogramación hacia otro linaje celular requeriría una eliminación específica de la marca epigenética y un establecimiento de nuevas marcas características del otro tipo celular. Dado que tipos celulares estrechamente relacionados, como fibroblastos-miocytes o astrocitos-neuronas, tienen un progenitor común, es más probable que compartan ciertas características epigenéticas y esto proveería de un ambiente de cromatina más permisivo para la unión y actividad de los factores de transcripción, por lo que se asumía que la reprogramación celular era posible solo entre linajes relacionados (Graf y Enver 2009; Vierbuchen y Wernig 2011).

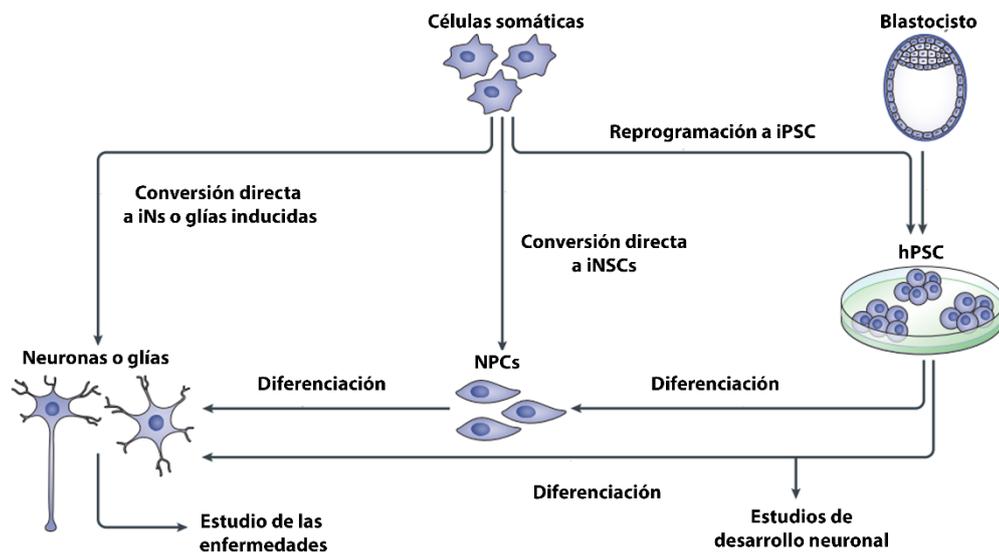
Una vez obtenidas, las iPSC pueden ser diferenciadas a células de distintos linajes mediante factores de diferenciación o crecimiento necesarios al medio de cultivo celular en el que se mantienen y se ha logrado obtener neuronas a partir de estas células (Tao y Zhang 2016; Y. Zhang et al. 2013). Sin embargo, la generación de iPSC y la obtención de otros tipos celulares a partir de ellas presentan una serie de desventajas tales como: el alto costo de generación y mantención, la baja eficiencia de reprogramación, la gran cantidad de tiempo necesario y la naturaleza estocástica de algunos eventos requeridos para la adquisición de la pluripotencia (Hanna, Saha, y Jaenisch 2010). De esta manera, la reprogramación directa o transdiferenciación, que es el proceso mediante el cual una célula somática diferenciada se convierte en otro tipo de célula somática diferenciada sin pasar por un estado pluripotente, se ha posicionado como una alternativa rápida y atractiva de manipular el destino celular.

Se ha visto que fibroblastos, que son de origen mesodermal, pueden ser reprogramados a neuronas, derivadas del ectodermo (Vierbuchen et al. 2010) mediante la expresión de factores de transcripción exógenos, sobrepasando las barreras epigenéticas para inducir la reprogramación a un linaje somáticos no relacionados (Graf y Enver 2009; Vierbuchen y Wernig 2011).

Las distintas estrategias experimentales que permiten la diferenciación de células somáticas, principalmente fibroblastos, hacia neuronas, se resumen en la Figura 1.

Reprogramación directa mediante sobreexpresión de factores de transcripción

La reprogramación directa de MEF a neuronas inducidas (iN, del inglés *induced neurons*) se logró mediante la sobreexpresión de la combinación de factores de transcripción BAM (Brn2, Ascl-1, Myt1-1), con eficiencias de hasta 20%. Las células



Modificado de Mertens et al. 2016

Figura 1. **Distintas estrategias para la obtención de neuronas funcionales** Células neuronales pueden ser generadas a partir de células somáticas mediante diferenciación de células pluripotentes inducidas (iPSC) o por conversión directa. Los progenitores neurales (NPC, del inglés *neural progenitor cell*) pueden generarse a partir de la diferenciación de células pluripotentes (hPSC o iPSC) o por conversión directa a partir de fibroblastos. Los NPCs obtenidos pueden ser diferenciados hacia neuronas o glías. Las células neuronales obtenidas permiten estudiar el desarrollo neuronal y también enfermedades que las afectan (Modificado de Mertens et al. 2016).

obtenidas expresan marcadores neuronales como β III-tubulina y MAP2, presentan morfología neuronal y tienen características electrofisiológicas similares a las neuronas primarias, como disparo de potenciales de acción y corrientes espontáneas de sodio y potasio (Vierbuchen et al. 2010). Los factores BAM tienen un rol importante en la determinación del linaje neuronal durante el desarrollo *in vivo* (Guillemot 1993; Lo, 1991) y durante la reprogramación directa, se observó que está mediado por un mecanismo jerárquico en que *Ascl1* exógeno actúa como factor pionero, uniéndose a los genes neuronales durante etapas tempranas de la inducción y facilitando el reclutamiento de *Brn2* y *Myt1l* (Wapinski et al. 2013). Cabe destacar que la generación de iN a partir de fibroblastos adultos de humano tiene una menor eficiencia que con fibroblastos embrionarios de ratón, y requiere la sobreexpresión de factores de transcripción adicionales como *NeuroD1* (Pang et al. 2011).

Se han evaluado otras aproximaciones además de la sobreexpresión de factores de transcripción pro-neurales o neuronales, como la represión de la proteína de unión de tracto de polipirimidina (PTB) en fibroblastos, que fue capaz de promover la expresión de microRNA específicos del linaje neuronal y permitió obtener células de tipo neuronal (Xue et al. 2013). De manera similar, se observó que la sobreexpresión de microRNA específicos de linaje neuronal *miR9/9** y *miR-124* en fibroblastos fue capaz de generar células que pueden expresar MAP2, pero fue necesaria la adición de otros factores de transcripción para obtener neuronas funcionales (Ambasudhan et al. 2011; Yoo et al. 2011).

Una de las posibles complicaciones asociada a esta técnica es la heterogeneidad de las poblaciones neuronales que se generan, no obstante se ha logrado obtener poblaciones específicas como motoneuronas (Son et al. 2011) y neuronas dopaminérgicas (Pfisterer et al. 2011) inducidas a partir de fibroblastos de ratón y de

humano, mediante la expresión ectópica de factores de transcripción característicos de estas poblaciones.

Reprogramación directa mediante el uso de fármacos

La sobreexpresión de factores de transcripción ha sido ampliamente utilizada en los últimos años, pero la baja eficiencia de inducción, los desafíos técnicos asociados y la integración del DNA viral en el material genético de las células receptoras, han cuestionado las futuras aplicaciones de esta tecnología. En respuesta, se han desarrollado estrategias de sobreexpresión que no implican integración de DNA exógeno tales como transfección transiente, uso de vectores virales que no se integran al genoma, escisión de genes mediante sistema Cre-loxP, entre otros (K. Hu 2014) y se han desarrollado alternativas que comprenden la utilización de fármacos o moléculas pequeñas, que generan costos menores y son más fácil de estandarizar y de controlar temporal y espacialmente (Yu et al. 2014). La utilización de fármacos ha ganado terreno rápidamente en el área de la reprogramación, numerosos estudios han complementado los factores de transcripción con moléculas pequeñas para la obtención de linajes neuronales (Kim et al., 2014; Ladewig et al., 2012; Liu et al., 2013; Zhu et al., 2014) y recientemente, se han reportado estrategias que sólo utilizan cócteles de fármacos que han permitido obtener iPSC (Hou et al. 2013), células precursoras neuronales (NPC, del inglés *neuronal precursor cell*) (Cheng et al. 2014) e iN de ratón (Li et al. 2015) y de humano (Hu et al. 2015). En el caso de las iN de ratón, el tratamiento con cinco fármacos: Forskolina, ISX-9, CHIR990210, SB431542 e I-BET151 (FICSB), permite reprogramar directamente MEF hacia neuronas funcionales que se denominaron neuronas químicamente inducidas (ciN, del inglés: *chemically induced neurons*) con un 90% de eficiencia (Figura 2) determinado según la expresión del marcador neuronal β III-tubulina. El mecanismo mediante el cual ocurre la reprogramación se desconoce, pero se atribuye a una acción sinérgica entre

los fármacos. La forskolina promueve la actividad de la adenilil-ciclasa, que se traduce en un aumento de las cantidades cAMP (del inglés *cyclic adenosine monophosphate*), ISX-9 es un inductor del programa genético neuronal, CHIR990210 inhibe GSK-3, que modula la vía Wnt/ β -catenina, SB431542 es un inhibidor de TGF- β y I-BET151 es un inhibidor de bromodominio de proteínas BET e interrumpe el programa genético de los fibroblastos (Li et al. 2015). Las ciN obtenidas a partir de este tratamiento farmacológico expresan marcadores característicos de neuronas como β III-tubulina, MAP2, tau-1, la mayoría son glutamatérgicas y presentan características electrofisiológicas comparables a las neuronas primarias.

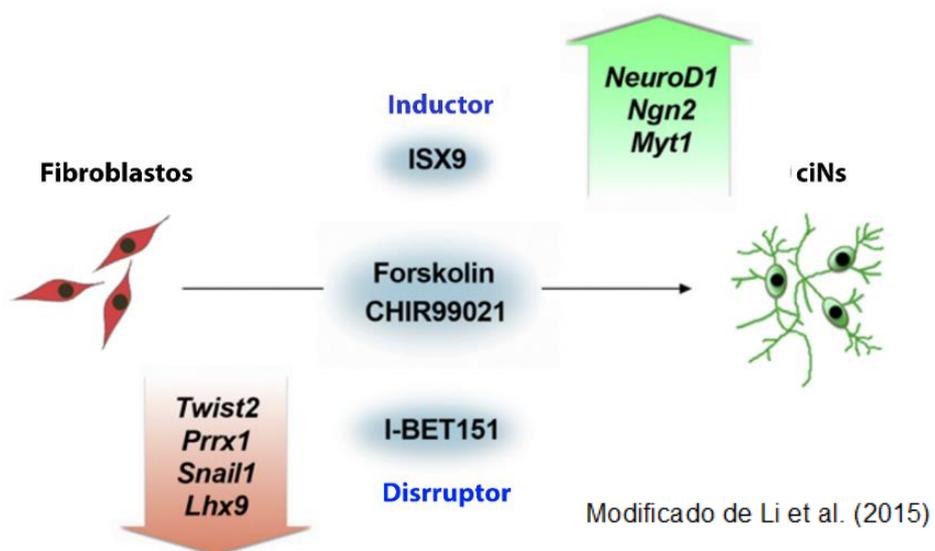


Figura 2 **Reprogramación directa mediada por fármacos.** Los fibroblastos son reprogramados a neuronas mediante un cóctel de fármacos compuesto por ISX9, Forskolina, CHIR99021 y I-BET151, siendo el ISX9 el inductor del programa neuronal y I-BET151 el compuesto que interrumpe el programa genético de los fibroblastos. Se produce una disminución en la expresión de genes asociados a fibroblastos: Twist2, Prrx1, Snail1, Lhx9 y un aumento en la expresión de genes neuronales: NeuroD1, Ngn2 y Myt1.

En el caso de los fibroblastos humanos, se logró la conversión hacia neuronas funcionales utilizando una combinación de siete moléculas: ácido valproico (inhibe desacetilasas de histonas), CHIR99021, Repsox (inhibidor de TGF- β), Forskolina y otros compuestos conocidos por inducir diferenciación neuronal como SP600125

(inhibidor de JNK, del inglés *c-Jun N-terminal kinases*), GO6983 (inhibidor de PKC, del inglés *Protein Kinase C*), Y-27632 (inhibidor de ROCK, del inglés *Rho-associated, Coiled-coil containing Kinase protein*). Las células obtenidas se denominaron células neuronales humanas inducidas químicamente (hCiN, del inglés *human chemically induced Neurons*), que son similares en cuanto a morfología, perfiles de expresión génica y propiedades electrofisiológicas a las neuronas primarias humanas (W. Hu et al. 2015).

En ambos protocolos, tanto a partir de MEF (Li et al. 2015) como a partir de fibroblastos humanos (W. Hu et al. 2015), la conversión es directa (sin un intermediario pluripotente proliferativo), las células resultantes expresan marcadores canónicos neuronales, de las cuales la mayoría de las células son glutamatérgicas y además presentan propiedades electrofisiológicas similares a las neuronas primarias (Babos y Ichida 2015).

Mantención de la edad celular durante la reprogramación directa

El envejecimiento se define como la pérdida progresiva de la integridad física que lleva a un mal funcionamiento fisiológico y aumenta la vulnerabilidad del individuo frente a enfermedades. Se han identificado nueve *hallmarks* del envejecimiento que son comunes en diferentes organismos, entre ellos se encuentran: inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, desregulación en la captación de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, pérdida de la autorenovación de las células troncales y comunicación intercelular alterada (López-Otín et al. 2013).

Se ha reportado que el envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo de diversas patologías entre las que se encuentran las enfermedades neurodegenerativas (Kennedy et al. 2014; López-Otín et al. 2013) como las

enfermedades de Parkinson o Alzheimer. Enmarcado en el contexto mundial de una población que envejece, fenómeno que también está ocurriendo en nuestro país, se vuelve urgente la generación de nuevos modelos y plataformas de estudio que permitan aumentar el conocimiento acerca de los mecanismos moleculares propios del envejecimiento neuronal y las enfermedades neurodegenerativas asociadas a él, cuya naturaleza poligénica y multifactorial ha impedido la generación de organismos modelos que recapitulen los aspectos relevantes de estas enfermedades (Mertens et al. 2016).

Hasta la fecha, estudios han reportado que las neuronas derivadas de iPSC sólo muestran fenotipos tempranos de las enfermedades y no son capaces de recapitular las características severas de la enfermedad en su desarrollo tardío (Nguyen et al. 2011; Patterson et al. 2012). Esto puede deberse a una pérdida de su “estado envejecido”, ya que en su transición hacia el destino celular final deben pasar por un estado pluripotente que viene acompañado de una pérdida de características asociadas a la edad (Lapasset et al. 2011), lo que impide el estudio de las enfermedades neurodegenerativas en estos modelos.

Recientemente, ha surgido evidencia de que la reprogramación directa es capaz de mantener las características asociadas a la edad de las células, tales como los perfiles transcriptómicos o manifestaciones de los *hallmarks* del envejecimiento celular como el acortamiento de los telómeros, el daño en el DNA o la actividad β -galactosidasa, entre otros (Huh et al. 2016; Mertens et al. 2015; Tang et al. 2017), por lo que podría ser una alternativa promisorio para la generación de modelos de estudio de las consecuencias del envejecimiento sobre las neuronas humanas. Mertens y cols. (2015) realizaron un análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq) de fibroblastos dermales humanos jóvenes (0-40 años) y viejos (40-86 años) y de iPSC e iN jóvenes y viejas, obtenidas a partir de las mismas

poblaciones de fibroblastos. Al comparar los tres grupos se observó que las iPSC no tienen expresión diferencial asociada a la edad, mientras que en fibroblastos y neuronas inducidas hay genes que se encuentran diferencialmente expresados. Entre los genes que varían su expresión con la edad, los grupos de genes que se encuentran más representados en fibroblastos son los relacionados a procesos de cicatrización de heridas y respuesta al estrés celular, mientras que en las iN los grupos más representados fueron los de homeostasis de calcio, la generación de neuritas y regulación de la plasticidad sináptica. Además Tang y cols. (2017), analizaron algunos *hallmarks* del envejecimiento celular: morfología y organización del núcleo, daño del DNA, cantidad de heterocromatina y actividad de β -galactosidasa activada por senescencia en neuronas obtenidas a partir de iPSC y directamente a partir de fibroblastos, tanto de individuos jóvenes y viejos, y observaron que neuronas obtenidas de iPSC humanas revierten el estado envejecido de sus donantes de mayor edad a un estado juvenil, como el acortamiento de los telómeros y la senescencia celular, mientras que las células neuronales reprogramadas directamente desde fibroblastos mantienen las características del envejecimiento celular, incluyendo daño en el DNA, pérdida de heterocromatina y de organización nuclear y aumento de la actividad β -galactosidasa activada por senescencia.

Considerando estos antecedentes, la propuesta de este seminario de título radica en la estandarización del protocolo de reprogramación directa mediada por fármacos realizado por Li (2015) utilizando cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón y la posterior caracterización de las células inducidas obtenidas mediante técnicas de inmunocitoquímica. De manera paralela, también considera la estandarización de cultivos primarios de fibroblastos dermales de ratón adulto, para posteriormente someterlos al mismo protocolo de reprogramación. Estos objetivos

constituyen pasos iniciales y necesarios para la realización de un proyecto mayor, enmarcado en nuestro interés por el estudio de los mecanismos moleculares y celulares del envejecimiento y de las enfermedades neurodegenerativas asociadas a él. Una vez que hayamos logrado estandarizar estas técnicas, los siguientes pasos comprenden la obtención de muestras de piel de ratones de mayor edad (mayores a 18 meses) que nos permitan cultivar fibroblastos, que son proliferativos y por tanto virtualmente ilimitados, y la posterior reprogramación de los fibroblastos hacia células neuronales, que dará como resultado una gran cantidad de células que permitirá evaluar características del envejecimiento desde un enfoque novedoso en nuestro laboratorio y en el país, que servirá como modelo de estudio para las diferentes líneas de investigación que se desarrollan en el laboratorio.

Objetivos generales y específicos

Objetivo General

Estandarizar un protocolo de reprogramación celular directa, utilizado para la conversión de fibroblastos murinos primarios en neuronas inducidas químicamente, y caracterizar las células obtenidas siguiendo esta metodología.

Objetivos específicos

1. Estandarizar y caracterizar el cultivo de fibroblastos murinos primarios, específicamente de fibroblastos murinos embrionarios (MEF) y fibroblastos dermales.
2. Evaluar la eficiencia de reprogramación celular directa, y caracterizar morfológicamente las neuronas inducidas químicamente a partir de fibroblastos murinos primarios.
3. Evaluar mediante inmunocitoquímica la expresión de marcadores neuronales canónicos en las neuronas inducidas químicamente.

Materiales y métodos:

Materiales

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunocitoquímica

Anticuerpos	Especie	Dilución	Catálogo	Marca
anti- α -tubulina	ratón	1:1000	T6199	Sigma-Aldrich
anti- β 3-tubulina	ratón	1:1000	G712A	Promega
anti-MAP2	conejo	1:500	AB5622	Millipore
anti-tau1	ratón	1:500	MAB3420	Millipore
anti-homer1	conejo	1:750	160002	Synaptic Systems
anti-synaptophysin	ratón	1:750	101001	Synaptic Systems
anti-vimentina	conejo	1:300	AB92547	Abcam
anti-pE-tubulina	conejo	1:25000	-	Proporcionado por K. Janke
Faloidina conjugada a Alexa Fluor 670	-	1:140	PHDN1	Cytoeskeleton Inc.
DAPI	-	1:1000	D9542	Sigma
Anti-mouse Alexa-Fluor 488	-	1:500	A21202	Thermo Fisher Scientific
Anti-mouse Alexa-Fluor 546	-	1:500	A10036	Thermo Fisher Scientific
Anti-rabbit Alexa-Fluor 488	-	1:500	A21206	Thermo Fisher Scientific
Anti-rabbit Alexa-Fluor 546	-	1:500	A10040	Thermo Fisher Scientific

Fármacos

Los compuestos utilizados y sus características se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Fármacos utilizados en el protocolo de inducción neuronal

Fármaco	Peso molecular (g/mol)	Marca	Solvente	Concentración stock (mM)	Concentración uso (uM)
Forskolina	410,51	Tocris	DMSO	25	100
ISX-9	234,27	Tocris	DMSO	100	20
CHIR990210	465,34	Tocris	DMSO	20	20
SB431542	406,91	Tocris	DMSO	5,34	10
I-BET151	515,39	Tocris	DMSO	10	1
Y27632	333,77	Tocris	H ₂ O	20	2
SB203580	377,44	Tocris	DMSO	10	1
BIRB796	527,66	Tocris	DMSO	10	1
Fasudil	327,83	Tocris	H ₂ O	20	2

Animales

Los ratones (*Mus musculus*, C57BL/6), tanto hembras preñadas como neonatos (P2, P3, P4) fueron obtenidos del Bioterio central de la Universidad Católica. El manejo y los procedimientos experimentales en animales durante este trabajo de seminario de título se realizaron de acuerdo con los protocolos de bioética correspondientes a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Métodos

Cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón

Las hembras preñadas (*Mus musculus*, C57BL/6) fueron eutanasiadas mediante anestesia con CO₂ y posterior dislocación cervical, en el día E14.5 de preñez acorde a los protocolos autorizados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Los cuernos uterinos fueron removidos e inmediatamente los embriones fueron retirados del saco embrionario y sacrificados mediante decapitación. El protocolo descrito fue adaptado de un protocolo de obtención de fibroblastos embrionarios (J. Xu, 2005). Se realizó la disección de la región correspondiente a la zona lumbar baja, teniendo cuidado de no arrastrar órganos internos ni tejido cerebral. El tejido se mantuvo en HBSS (del inglés: *Hanks' Balanced Salt Solution*) frío y fue cortado en trozos pequeños. Se trató con tripsina 0.25% y DNasa I 0.1 gr/ml disueltos en HBSS, a 37°C durante 30 minutos. Luego del tratamiento, el tejido fue lavado dos veces con HBSS a 37°C. Posteriormente, se agregó medio MEF (DMEM alto en glucosa suplementado con 15% suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*), 1% aminoácidos no esenciales (NEAA) y 1% penicilina-estreptomina) y el tejido fue disgregado mecánicamente utilizando una pipeta Pasteur de vidrio, hasta obtener una suspensión homogénea. Mediante conteo celular con cámara de Neubauer, se estimó que por cada embrión se obtiene en promedio $2.5-3.0 \times 10^6$ células. Las células fueron sembradas a la densidad requerida y mantenidas en medio MEF en incubadora a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente, las células fueron lavadas con PBS y se reemplazó el medio MEF por medio fresco. Este paso se repitió cada 2-3 días hasta que las células alcanzaron confluencia, momento en el cual recibieron tratamiento con tripsina para subsecuentes pasajes, o fueron tratadas con el medio de inducción neuronal, dependiendo del experimento.

Cultivo primario de fibroblastos dermales

Los animales (*Mus musculus*, C57BL/6), tanto adultos como neonatos (P1, P2, P3, P4), fueron eutanasiados acorde a los protocolos autorizados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

El siguiente protocolo fue adaptado de Vangipuram, 2013 y en la figura 3 se muestra un esquema del protocolo. Se posicionó el animal sobre una camilla en decúbito dorsal, se roció la piel de animal con etanol 70% y se retiró el pelaje utilizando un bisturí, con cuidado de no realizar cortes ni deteriorar la piel. Posteriormente, utilizando pinzas, tijera y bisturí, se realizó un corte que permite separar la piel del tejido subcutáneo y se obtuvo un trozo de piel de 2x2 cm en el caso de los adultos, y de 0,5x0,5 cm en el caso de los neonatos. Los explantes de piel fueron lavados y mantenidos en PBS 1X estéril a temperatura ambiente. Se realizó el mismo procedimiento para obtener explantes de la zona dorsal del animal. Los siguientes pasos del protocolo se realizaron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar. Sobre una placa p100 abierta y con PBS 1X (para evitar que la piel se seque), cada explante de adulto fue cortado en trozos de 0,4x0,4 cm aproximadamente utilizando bisturíes. En una placa de 6 pocillos, previamente sometida a cortes superficiales realizados con un bisturí con el fin de aumentar la adherencia de los fragmentos, se dispusieron entre 3-5 sobre cada pocillo y se dejó la placa semiabierta durante 5-10 minutos para permitir la evaporación del exceso de PBS.

Luego, se agregó cuidadosamente 50-100 μ l de medio MEF sobre cada uno de los fragmentos. El medio MEF utilizado durante la mantención de los explantes de piel fue complementado con 1% penicilina/estreptomicina y 1% Plasmocin (Invivogen), antibióticos y antimicoplasmas respectivamente, para prevenir la contaminación de

los cultivos, dado su origen cutáneo. Se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂ durante la noche. Al día siguiente, se agregó 1.5 mL de medio a cada pocillo y se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂. Cada 2-3 días se lavaron los explantes con PBS 1X estéril y se cambió todo el medio. A partir de los días 1-2 se observó migración de fibroblastos desde los bordes de los explantes provenientes de neonatos y a partir de los días 3-4 en el caso de los provenientes de adultos. Luego de 15-28 días se retiraron los explantes y fueron eliminados. Las células presentes en los pocillos fueron lavadas con PBS y tratadas con tripsina 0,05% durante 5-7 minutos, posteriormente se inactivó la tripsina con medio MEF, se centrifugó, y se determinó la cantidad de células. Se obtuvieron entre 200.000 y 500.000 células por pocillo. Las células fueron sembradas en placas p100 o sobre cubreobjetos de 13 mm de diámetro dispuestos en una placa de 24 pocillos a la densidad requerida según el experimento, y fueron mantenidas en medio MEF suplementado con 1% Normocin (Invivogen). Se realizaron lavados con PBS 1X estéril y cambios de medio cada 2-3 días hasta que las células alcanzaron confluencia, momento en el cual fueron tratadas con tripsina para subsecuentes pasajes o tratadas con el medio de inducción neuronal, dependiendo del experimento.

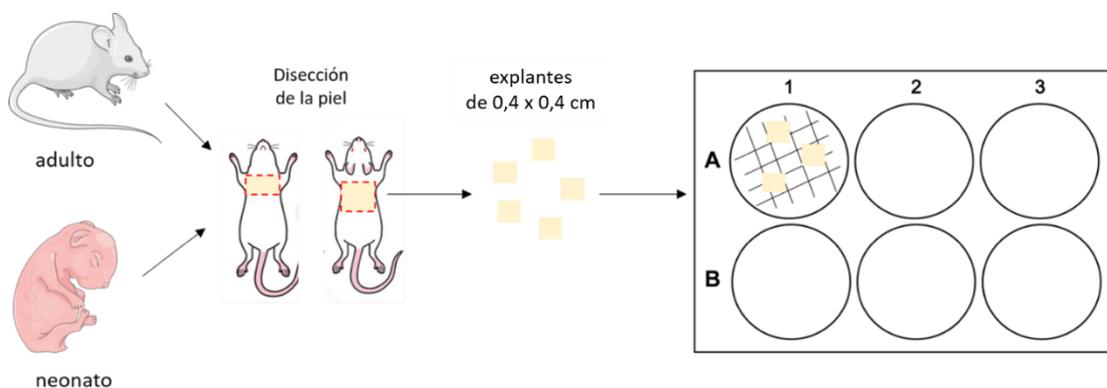


Figura 3. Esquema del cultivo de fibroblastos dermales murinos. Los animales (adultos o neonatos) son sacrificados y posteriormente se obtienen muestras de piel dorsales y ventrales. Las muestras son cortadas en trozos de 4 x 4 mm aproximadamente y se disponen sobre una placa de cultivos plástica, previamente rasgadas con un bisturí y posteriormente se agrega medio de explantes.

Cultivo primario de neuronas hipocampales

Las neuronas fueron obtenidas según se describe en (Kaech y Banker, 2006). Los hipocampos de ratones E18 fueron disectados y tratados con tripsina 2,5% durante 30 minutos, posteriormente se disgregó el tejido y fue sembrado sobre cubreobjetos de 13 mm (100.000 células/cubreobjeto) previamente tratados con poli-lisina, en medio MEM 10% FBS. Una hora más tarde, el medio es reemplazado por Neurobasal de mantención (Neurobasal (Gibco, Life technologies), 1% B27 (Gibco, Life technologies), 1% N2 (Gibco, Life technologies), 1% GlutaMAX (Gibco, Life technologies), 1% piruvato de sodio, 1% penicilina/estreptomicina las neuronas fueron mantenidas hasta 18 DIV, realizando cambios de medio cada 2-3 días.

Inmunocitoquímica

Las células fueron lavadas con PBS 1X y luego fueron fijadas con solución al 4% de paraformaldehído/sacarosa por 30 minutos a 37°C. Luego, fueron lavadas con PBS 1X tres veces durante 5 minutos y permeabilizadas utilizando Triton X-100 al 0.1% en PBS 1X por 5 minutos. Posteriormente, las células se bloquearon utilizando una solución de BSA 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron con las diluciones correspondientes de los anticuerpos en BSA 1% en PBS durante 12 horas a 4°C. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se incubó por 1.5 hrs con anticuerpos secundarios diluidos en BSA 1% en PBS 1X. Se incubaron con DAPI diluido en PBS 1X durante 5 minutos y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X y un lavado con H₂O destilada. Finalmente, se adhirieron los cubreobjetos sobre portaobjetos, utilizando medio de montaje FluorSave (Millipore).

Los anticuerpos utilizados se resumen en la tabla 1.

Obtención y análisis de imágenes

Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 710 y la intensidad de fluorescencia y el análisis de las imágenes se realizó utilizando el software ImageJ. Las imágenes de contraste de fases fueron adquiridas utilizando un microscopio de campo claro TMS Nikon y con una cámara para microscopio USB 9Mp 25 Amscope 9000.

Reprogramación directa mediada por fármacos

Las células, MEF o fibroblastos dermales, fueron sembradas en cubreobjetos de 13 mm, que fueron esterilizados y dispuestos sobre una placa de 24 pocillos para posteriormente analizar los resultados de la inducción mediante inmunocitoquímica. Previo a la siembra de las células, los cubreobjetos fueron tratados con Matrigel (Corning). Para ello, el Matrigel fue mantenido a 4°C durante la noche anterior a los experimentos, luego fue diluido 1:30 en PBS 1X frío y se agregó 300 µl de Matrigel diluido a cada pocillo y se mantuvo por lo menos 30 minutos a 37°C y con 5% CO₂. Las células fueron sembradas a una densidad de 15.000 o 20.000 células (7800-10000 células/cm²) sobre cada pocillo y fueron mantenidas en medio MEF. Una vez que alcanzaron la confluencia (entre 2-5 días), se cambió el medio por medio de inducción neuronal (Neurobasal, 1% N2, 2% B27, 1% GlutaMAX, 1% penicilina-estreptomicina y bFGF (del inglés *basic fibroblast growth factor*) 100 ng/ml) al cual se le agregaron los compuestos ISX-9 (20 µM), Forskolina (100 µM), CHIR99021 (20 µM), I-BET151 (del inglés: *inhibitor of bet bromodomain*) (0.5 µM), y una de las siguientes combinaciones de compuestos para aumentar la sobrevivencia de las células inducidas: Y277632 (2 µM) y BIRB796 (1 µM) o Fasudil (2 µM) y SB203580 (1 µM) (Li et al. 2015). Como control se utilizó medio vehículo, que posee la misma proporción de DMSO (principal disolvente de los reactivos) que el medio con los fármacos. Cada 3-4 días se retiró una proporción del medio (con fármacos y vehículo)

y se agregó medio fresco durante los 10-14 días que duró la inducción.
Posteriormente las células fueron fijadas para realizar el análisis inmunocitoquímico.

Resultados:

Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón

Con el fin de replicar el protocolo de Li (2015) en nuestro laboratorio, el primer paso fue el establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), para obtener células susceptibles a la inducción neuronal con fármacos y poder evaluar la eficiencia y los resultados obtenidos siguiendo este protocolo y posteriormente poder realizarlo en fibroblastos dermales de ratón adulto. Se analizaron poblaciones de células de distintos pasajes y de distinta cantidad de días *in vitro* (DIV) del cultivo. Se evaluó, mediante inmunocitoquímica, la presencia de fibroblastos y de neuronas, utilizando los marcadores canónicos vimentina y β III-tubulina, respectivamente. Se contó la cantidad de células positivas para cada marcador, que a su vez tuviesen tinción de DAPI en el núcleo, en 10 campos de aumento 40X elegidos al azar. En la condición de 2 pasajes 6 DIV no se detectó ninguna célula con señal positiva para β III-tubulina. Se observó que en el pasaje 0 (previo a la primera tripsinización), la proporción de células positivas para β III-tubulina fue 9,33% (Figura 4A y 4C). Estas células presentaron además morfología neuronal, eran negativas para la marca de vimentina y se puede apreciar que se encuentran sobre células vimentina positivas, que son fibroblastos, y no directamente sobre el plástico, consistente con el comportamiento de neuronas *in vitro*, que requieren tratamiento del sustrato con poli-lisina (Figura 4B). La posible fuente de estas células neuronales contaminantes es el tejido nervioso presente en la zona lumbar de los animales, que es utilizada para realizar el cultivo primario. Tras el primer pasaje de las células (tripsinización y siembra), se observa un 3,31% de células positivas para β III-tubulina y luego del segundo pasaje no se observan células positivas para el marcador neuronal (Figura 4A y 4C). Los resultados obtenidos indican que los

cultivos primarios de MEF realizados en nuestro laboratorio no presentan contaminación de células neuronales a partir del primer pasaje, por tanto, las células con características neuronales obtenidas durante el proceso de inducción son producto de la acción de los fármacos sobre las células y no corresponderían a neuronas contaminantes.

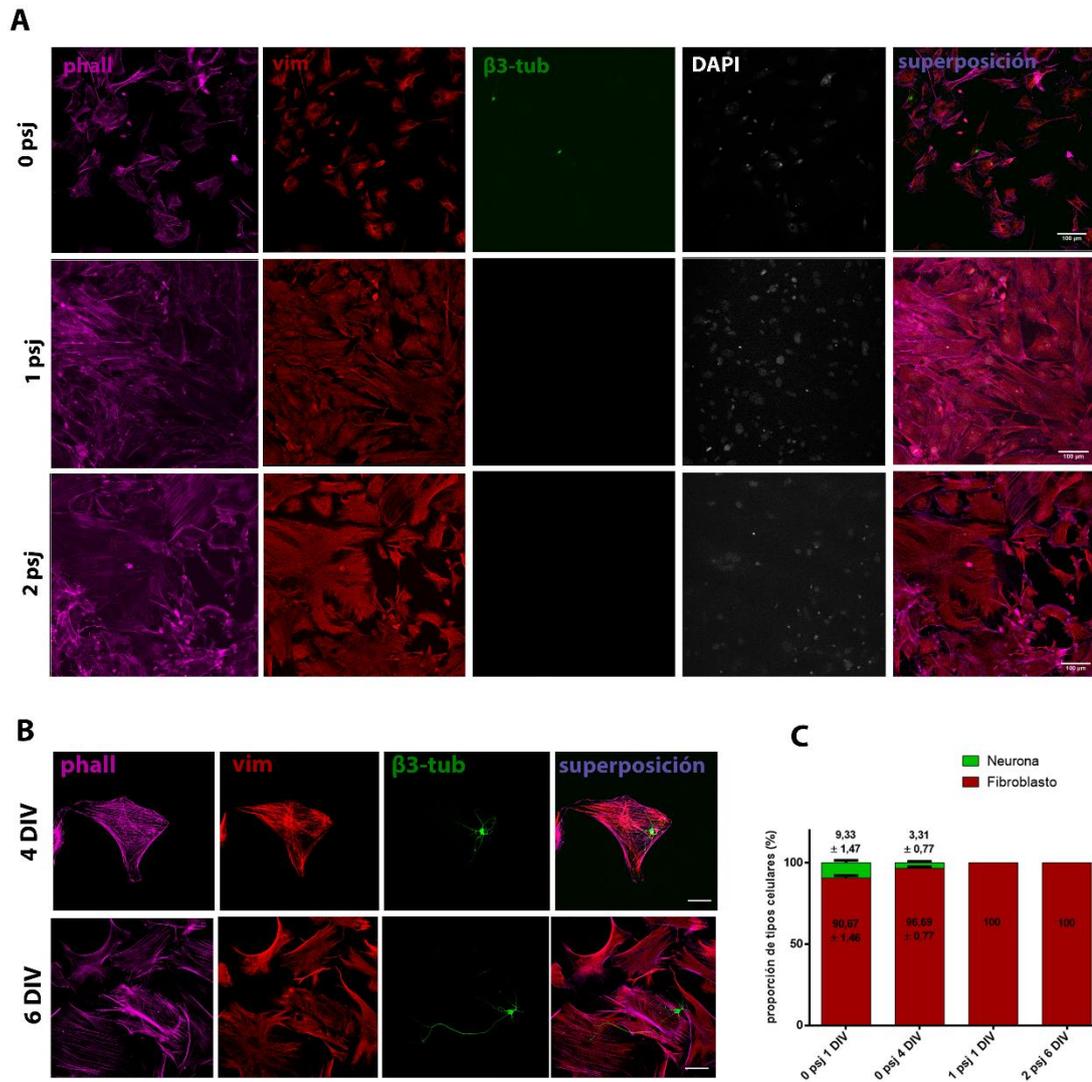


Figura 4. Cultivos de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) utilizados para inducción química no presentan neuronas contaminantes. **A:** Inmunocitoquímica de MEF en pasajes 0, 1 y 2 utilizando anticuerpos contra vimentina y β III-tubulina, aumento 40X, barra de tamaño corresponde a 100 μ m. **B:** Inmunocitoquímica de MEF pasaje (psj) 1 a los 4 y 6 DIV contra vimentina y β III-tubulina. Se observan neuronas contaminantes en estas etapas. Aumento 63X, barra de tamaño corresponde a 50 μ m. **C:** Proporción de neuronas (células β III-tubulina positivas) y fibroblastos (células vimentina positivas) a los 0 psj 1 DIV (34 neuronas y 229 fibroblastos), 0 psj 4 DIV (3 neuronas y 268 fibroblastos), 1 psj 1 DIV (0 neuronas y 313 fibroblastos) 2 psj 6 DIV. Se analizaron 10 campos 40X para cada condición, excepto para 2 psj DIV en que se inspeccionó toda la muestra y no se detectó ninguna célula positiva para β III-tubulina.

Obtención de fibroblastos dermales murinos

La piel de los mamíferos tiene dos capas; la epidermis y la dermis, los fibroblastos presentes en la dermis son capaces de migrar hacia una placa plástica en ciertas condiciones de cultivo celular (Vangipuram et al. 2013). En este seminario, se realizó la estandarización del protocolo utilizando muestras de piel de ratón de distintas edades (adulto y neonato).

Dado que este protocolo de cultivo primario de fibroblastos nunca se había realizado en el laboratorio, fue necesario estandarizar los procedimientos. Durante la totalidad del cultivo, fue de vital importancia que los explantes se mantuviesen adheridos a la superficie plástica de la placa para que los fibroblastos puedan migrar desde la piel hacia la superficie. Entre los factores que promueven la adhesión se encuentran: que la capa de grasa subcutánea sea retirada en su totalidad sin dañar la dermis y que los bordes de los explantes sean rectos, y adicionalmente, las placas deben ser rasgadas con la ayuda de un bisturí, generando surcos, para aumentar la rugosidad y la superficie de contacto.

Una vez que los explantes se han adherido exitosamente, comienza la migración de las células. En los explantes de neonatos, la migración comienza generalmente el día 2 o 3 (Figura 5), en algunos casos desde el día 1, mientras que, para los cultivos de adultos, la migración comienza recién desde el día 3, siendo más común entre el 4 o 5. Por lo tanto, se observó que los fibroblastos provenientes de neonatos migran más rápido que los fibroblastos provenientes de adultos.

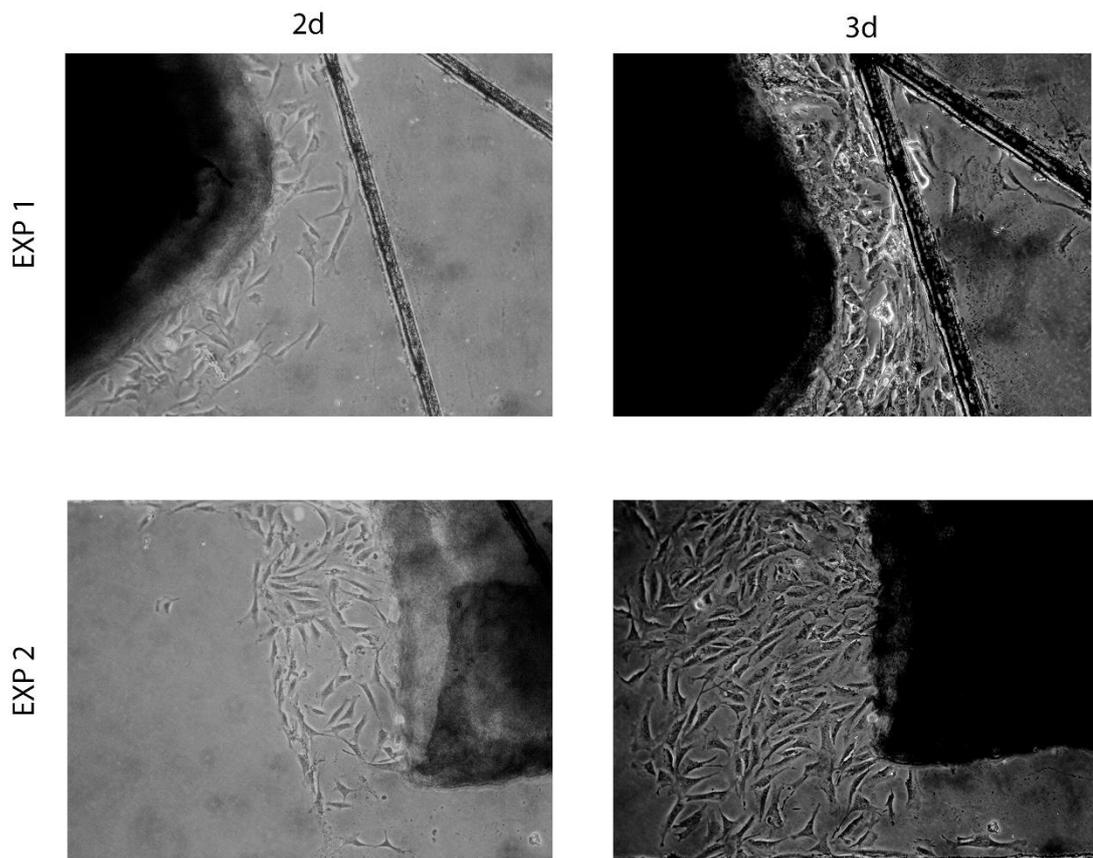


Figura 5. Migración de los fibroblastos desde los explantes de piel. Imagen de contraste de fases donde se observan fibroblastos dermales provenientes de ratones neonatos (cultivo P3) a los 2 y 3 días de cultivo. A modo de ejemplo se eligen dos explantes (EXP 1 y EXP 2) de piel representativos a los que se realiza un seguimiento temporal para observar la tasa de migración de fibroblastos. Las líneas que se observan, en EXP1, corresponden a los surcos realizados sobre las placas de cultivo. Aumento 10X en microscopio de campo claro.

Se realizaron cultivos de explantes de piel dorsal y ventral. No se observaron diferencias en la migración ni en la proliferación de las células. Por lo tanto, se logró estandarizar el cultivo primario de fibroblastos dermales de ratones neonatos y adultos en nuestro laboratorio mediante la adaptación de un protocolo previamente publicado.

Caracterización del cultivo de fibroblastos dermales

Dado que todos los protocolos descritos en este seminario de título son completamente nuevos para nuestro laboratorio, fue necesario realizar una caracterización de los cultivos primarios obtenidos. Se ha descrito que los cultivos primarios de fibroblastos a partir de explantes dermales presentan una baja proporción de tipos celulares contaminantes, dado que las otras células presentes en la dermis no son capaces de migrar, exceptuando a los queratinocitos que sí pueden migrar, pero no son capaces de vivir en las altas condiciones de suero del medio utilizado para los cultivos de fibroblastos (DMEM 15% FBS) (Vangipuram y cols, 2013), de manera que su cantidad inicial se diluye con los pasajes. Cabe destacar que en caso de estar presentes en el cultivo son fácilmente distinguibles por su morfología poligonal y pequeña (entre 10 y 20 μm) (Soroka et al. 2008). En el caso de los cultivos realizados para el seminario, no se observó contaminación con queratinocitos. Dado que el objetivo es evaluar la eficiencia de la reprogramación de la inducción neuronal, en las células iniciales no debe haber células neuronales, de manera que los fibroblastos dermales fueron caracterizados mediante inmunocitoquímica con el objetivo de evaluar la presencia de neuronas. Se utilizó un marcador canónico de fibroblastos: vimentina y un marcador canónico de neuronas: β III-tubulina. Se analizaron células provenientes de explantes dorsales, de 1 y 2 pasajes, y de explantes ventrales, de 1 y 2 pasajes, para confirmar que no existen diferencias entre ellos. Los resultados se resumen en la Figura 6, no se observó presencia de células con marca positiva para β III-tubulina en ninguna de las condiciones analizadas, lo que demuestra que no hay presencia de neuronas en los cultivos de fibroblastos dermales. A partir de los resultados obtenidos, se concluye que los fibroblastos dermales obtenidos en nuestro laboratorio a partir de un protocolo adaptando de

Vangipuram (2013) son una población inicial apropiada para la inducción neuronal con fármacos.

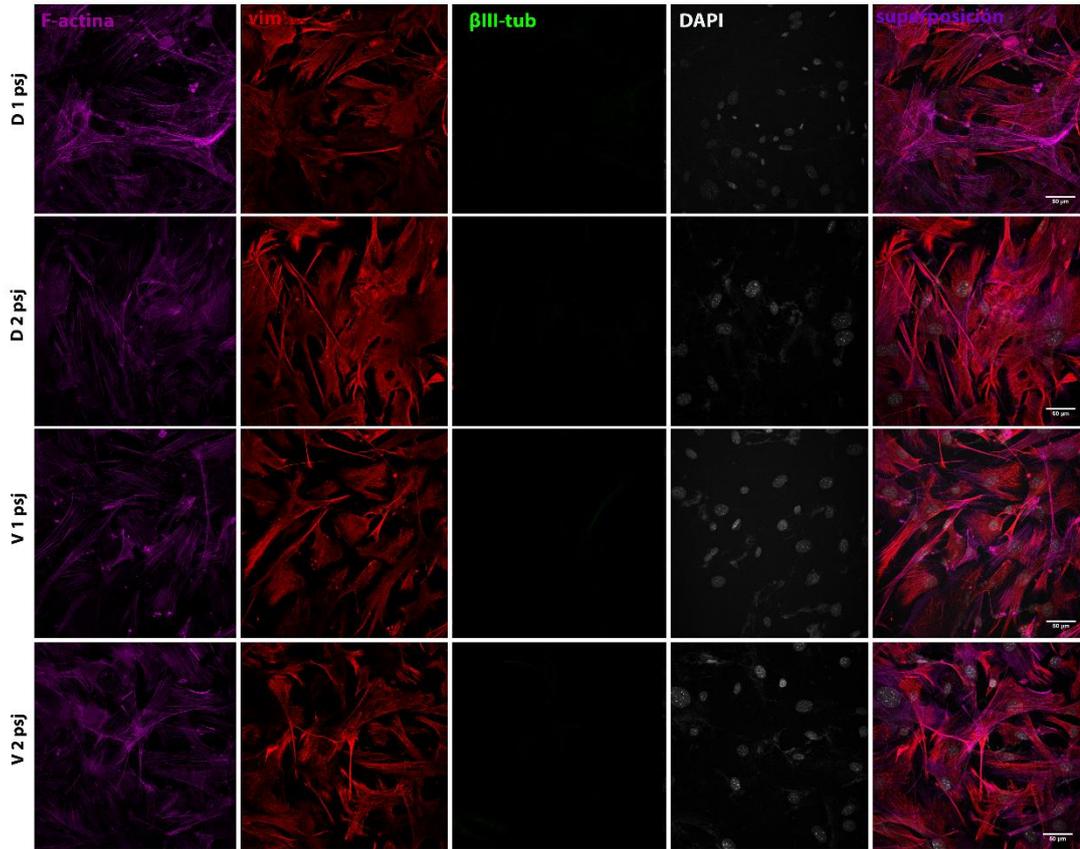
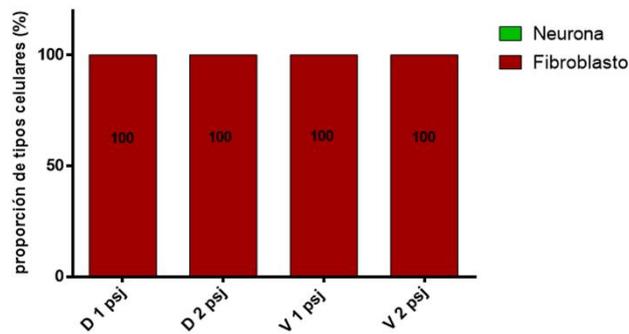
A**B**

Figura 6. Cultivos de fibroblastos dermales de ratón utilizados para inducción química no presentan neuronas contaminantes. A: Inmunocitoquímica de fibroblastos provenientes de explantes dorsales (D) y ventrales (V) en pasajes 1 y 2 utilizando anticuerpos contra vimentina y β III-tubulina, aumento 40X, barra de tamaño corresponde a 50 μ m. **B:** Proporción de fibroblastos (vimentina positivas) y de neuronas (β III-tubulina positivas) en pasaje 1 y 2 (10 campos de 40X para cada condición, número de células analizadas en D 1psj: 223, D 2psj: 242, V 1 psj: 164, V 2 psj: 166).

Reprogramación directa mediada por fármacos

La inducción de fibroblastos hacia células neuronales nunca se había realizado en nuestro laboratorio y tiene una gran relevancia puesto que es una aproximación novedosa para el estudio del sistema nervioso. Los fibroblastos obtenidos a partir de los cultivos primarios, tanto embrionarios como dermales de neonato y adulto, fueron sometidos al protocolo de inducción neuronal con fármacos (FICBS) (Li et al. 2015) con el objetivo de estandarizar y caracterizar la reprogramación directa.

Cambios morfológicos y caracterización mediante inmunocitoquímica

En primer lugar, se realizaron las inducciones de los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) para estandarizar el protocolo de reprogramación, mientras en simultaneo se estandarizaba el cultivo de fibroblastos dermales. Los resultados que se muestran a continuación corresponden a neuronas inducidas a partir de MEF. Lo primero que llamó nuestra atención fueron los cambios morfológicos que sufren los fibroblastos al estar en presencia de los inductores, que se analizaron utilizando un microscopio de contraste de fases y mediante inmunofluorescencia. Los cambios morfológicos comienzan tempranamente, a los 3 días post inducción (dpi) se observa que las células adoptan una morfología más alargada, a los 7 dpi se observa una reducción del tamaño del soma y presencia de prolongaciones, que se extienden y ramifican a los 10 dpi (Figura 7A).

Los cambios morfológicos de los fibroblastos están acompañados por la aparición de la marca de β III-tubulina (Figura 7B), un marcador canónico de neuronas. A los 7 dpi es posible observar células que son positivas para β III-tubulina, que se denominarán neuronas inducidas (iN, del inglés: *induced neurons*), y tanto el número de células que son positivas para la marca de la proteína neuronal β III-tubulina como su intensidad de fluorescencia aumenta a los 12 dpi. Las iN tienen morfologías variadas,

pero tienen en común una reducción del tamaño del soma y extensión de prolongaciones, en comparación a los fibroblastos no inducidos. Hasta la fecha, las inducciones han terminado entre los 10 y 14 dpi debido a la alta tasa de muerte de las células.

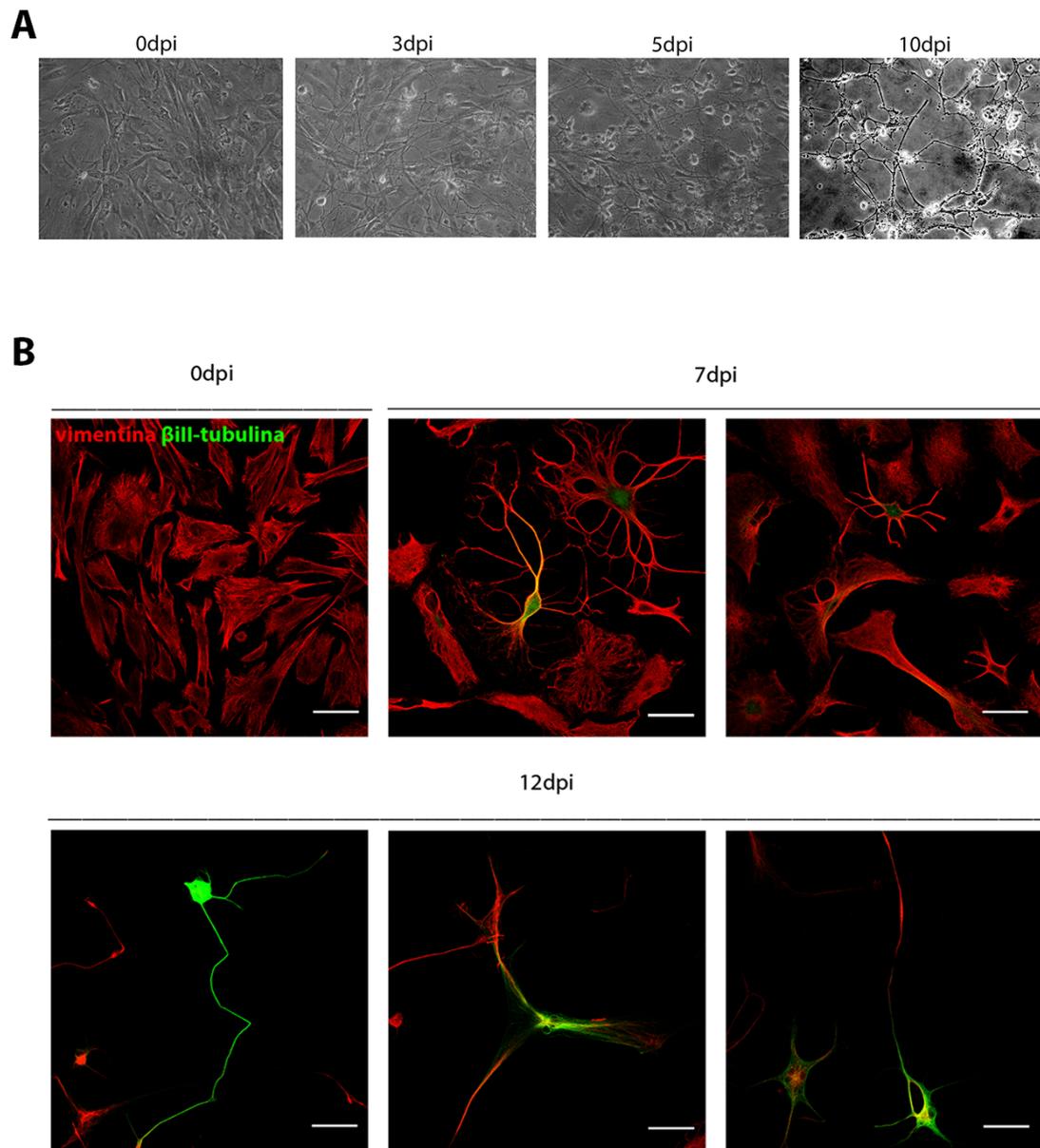


Figura 7. Tratamiento farmacológico genera neuronas inducidas químicamente. A: Imágenes de contraste de fases que muestran los cambios morfológicos que experimentan los MEF a los 3, 5 y 10 dpi, siendo el día 0 el aspecto de los fibroblastos antes de la inducción (aumento 20x). **B:** Imágenes representativas de inmunocitoquímica de MEF sometidas a inducción neuronal a los 0, 7 y 12 dpi contra vimentina y β III-tubulina. Aumento 40X, la barra de tamaño corresponde a 50 μ m.

Expresión de proteínas de citoesqueleto neuronal

Además de los evidentes cambios morfológicos, producto del proceso de reprogramación, las células comienzan a expresar marcadores neuronales, proteínas que se expresan en neuronas. En el apartado anterior se muestran que las iN expresan β III-tubulina, marcador canónico neuronal y usado en distintos trabajos de reprogramación directa hacia linaje neuronal como evidencia del éxito de la inducción.

Adicionalmente, se analizó la presencia de otros marcadores neuronales canónicos en las células inducidas tales como MAP2, tau-1 y pE-tubulina, que aparecen temprano durante el desarrollo neuronal, y de los marcadores de sinapsis: sinaptofisina y homer-1, que corresponden a marcadores sinápticos de madurez neuronal.

La poliglutamilación de la tubulina (pE-tubulina) es una modificación post-traducciona que solo se presenta en neuronas, por lo que fue utilizada como un marcador de identidad neuronal. En la figura 8A se observa la presencia de pE-tubulina a distintos tiempos de inducción neuronal de MEF, como control positivo se muestra en 8B la expresión de pE-tubulina en una neurona hipocampal de 3 días *in vitro* (DIV). Previo a la inducción (0 dpi) no se observa señal y las células, pese a ser heterogéneas en tamaño, poseen una morfología típica de fibroblasto: se caracterizan por ser células planas, fusiformes. A los 7 dpi, los cambios morfológicos están acompañados de una señal de fluorescencia leve de pE-tubulina, y a los 12 dpi se observa una mayor intensidad de fluorescencia, que se asocia a una presencia de esta modificación post-traducciona, no obstante, sigue siendo menor que la de la neurona hipocampal utilizada como control positivo. Es importante notar, que sólo las

células con morfología neuronal presentan esta marca y que aquellas que permanecen con morfología de fibroblasto son negativas para esta tinción.

De manera similar sucedió con otros componentes del citoesqueleto neuronal como MAP2/tau-1, como control positivo se utilizó una neurona hipocampal de 3 DIV que se muestra en la figura 9B, donde es posible observar el gradiente típico que se produce por la distribución diferencial de MAP2 en el compartimento somato-dendrítico y de tau-1 en el axón (Bodaleo et al. 2016; Dehmelt y Halpain 2005). En 9A se muestran MEF inducidas a los 12 dpi, se observa marca tanto para MAP2 como para tau-1, pero es de menor intensidad que en las neuronas hipocampales de 3 DIV y, además, no muestra la distribución típica de estos marcadores. Por tanto, las neuronas obtenidas mediante la inducción neuronal presentan proteínas características del citoesqueleto neuronal, pero no existe compartimentalización, al menos a los tiempos de inducción analizados. A su vez, es importante destacar que sólo las células que han cambiado su morfología presentan marcas positivas tanto para MAP2 como para tau-1. No se detectó expresión de MAP2/tau-1 previo a los 12 dpi.

En las células inducidas no se observó expresión de sinaptofisina y homer-1, proteínas pre y postsinápticas respectivamente (Figura 10A), como control positivo se utilizó una neurona hipocampal de 21 DIV que se muestra en 10B, donde se observa la expresión de estas proteínas. Este resultado sugiere que las neuronas inducidas aún no han alcanzado la madurez neuronal, ya que no son capaces de generar contactos sinápticos a los tiempos analizados.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la presencia de los marcadores de linaje neuronal es detectable en las iN en el día 7 de inducción y que la expresión de ellos aumenta mientras mayor es el tiempo de inducción. Queda por resolver con mayor precisión en qué momento comienza su expresión y ver si coincide con lo

descrito en la literatura. Los marcadores de madurez neuronal no son detectables a los 7 ni 12 días de inducción, lo que deja abierta la pregunta de si podrían aparecer producto de un mayor tiempo de inducción o si requieren otros componentes, como la presencia de neurotrofinas en el medio, o el co-cultivo de iN con neuronas o astrocitos primarios.

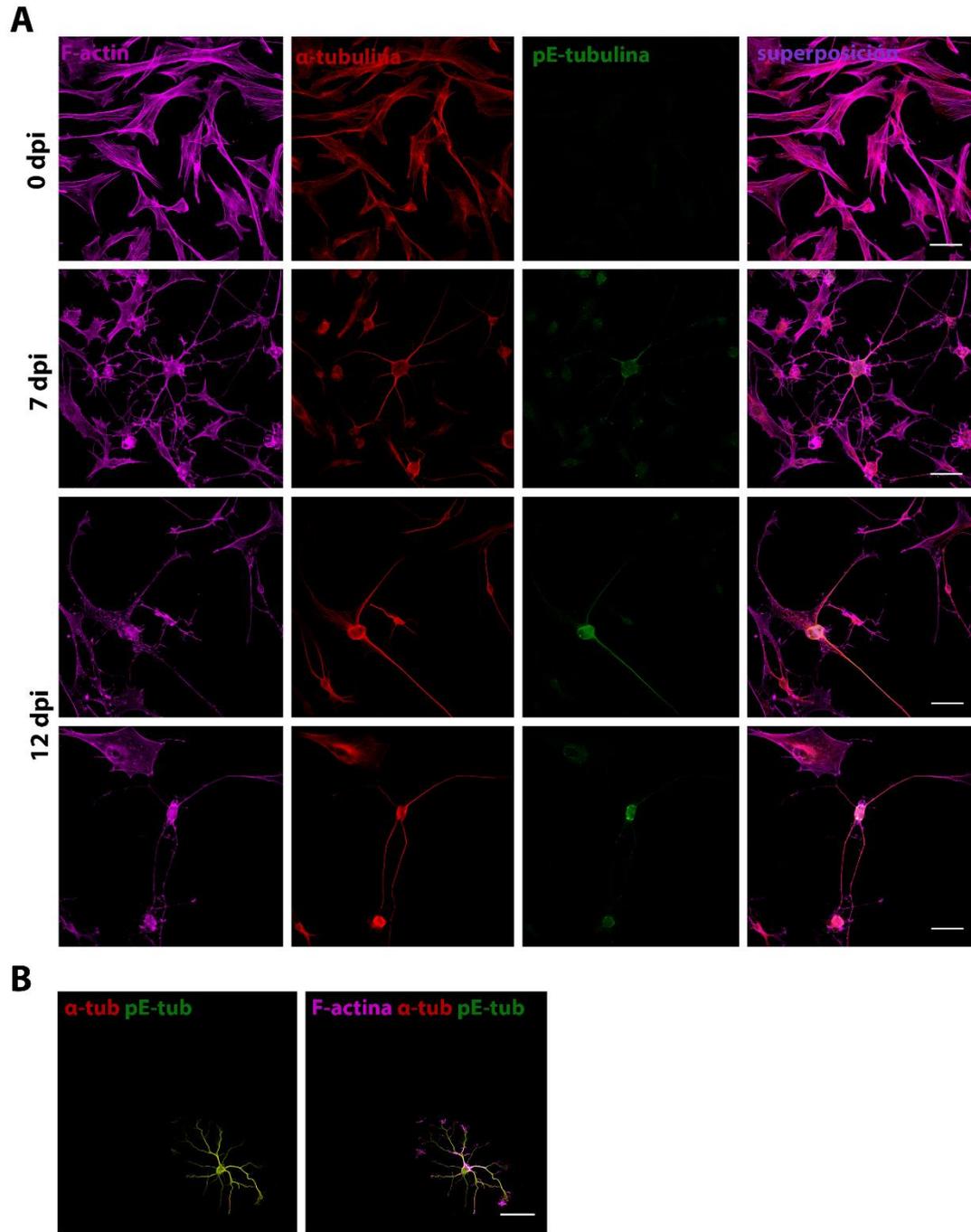


Figura 8. Neuronas inducidas a partir de MEF expresan marcadores neuronales de citoesqueleto: pE-tubulina. Inmunocitoquímica de MEF inducidas a los 0, 7 y 12 dpi contra F-actina, α -tubulina y pE-tubulina. Se muestran dos campos representativos para la condición 12 dpi, debido al menor número de células presentes. Aumento 40X, barra de tamaño corresponde a 50 μ m. **B:** Inmunocitoquímica de neurona hipocampal de 3 DIV contra F-actina, α -tubulina y pE-tubulina. Aumento 40X, la barra de tamaño corresponde a 50 μ m.

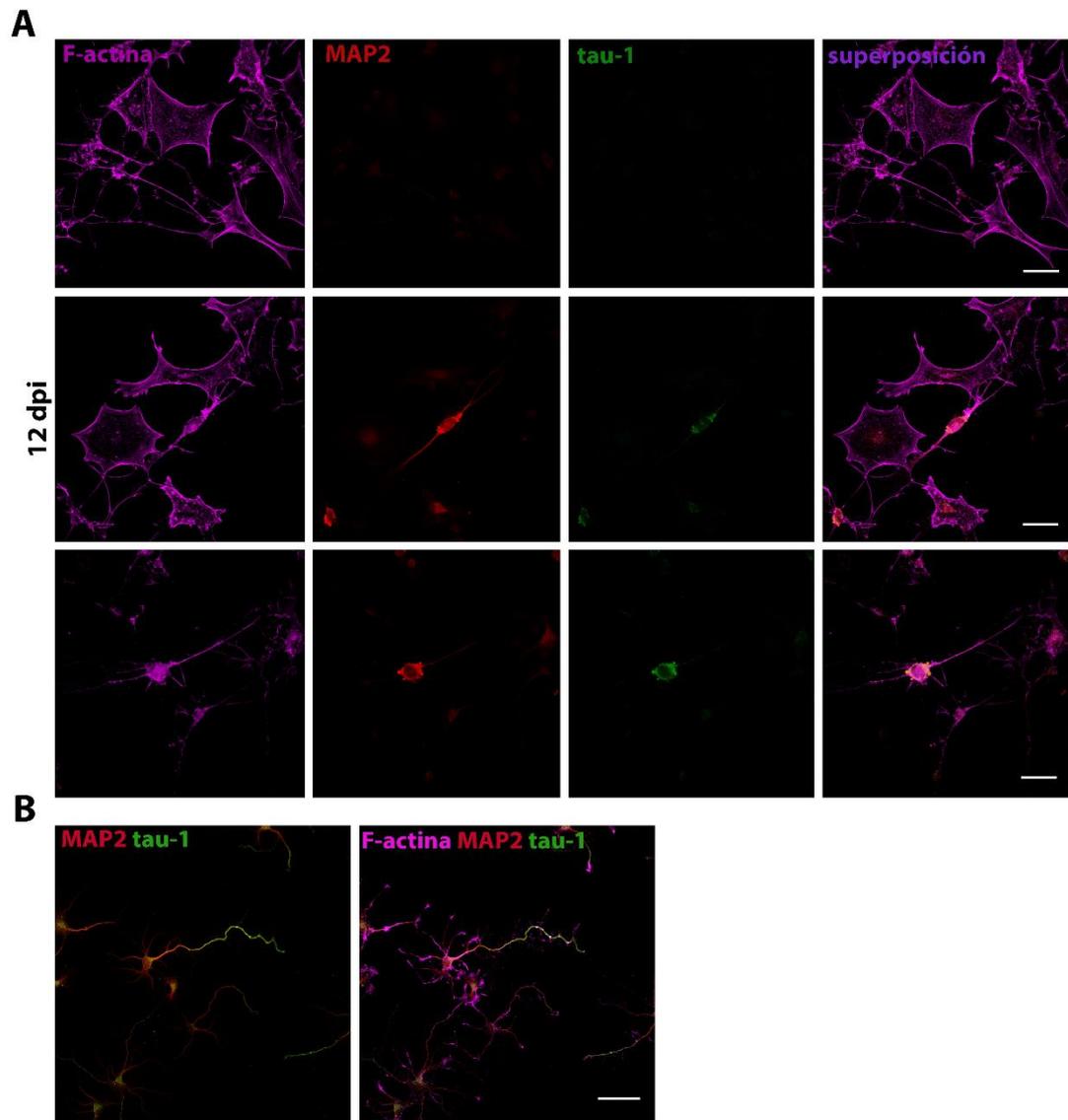


Figura 9. Neuronas inducidas a partir de MEF expresan las proteínas de citoesqueleto neuronal MAP2 y tau-1. A: Inmunocitoquímica de MEF inducidas a los 12 dpi contra F-actina, MAP2 y tau-1. Aumento 40X, barra de tamaño corresponde a 50 μ m. Se muestran tres campos representativos para la condición 12 dpi. **B:** Inmunocitoquímica de neurona hipocampal de 3 DIV contra F-actina, MAP2 y tau-1. Aumento 40X, la barra de tamaño corresponde a 50 μ m.

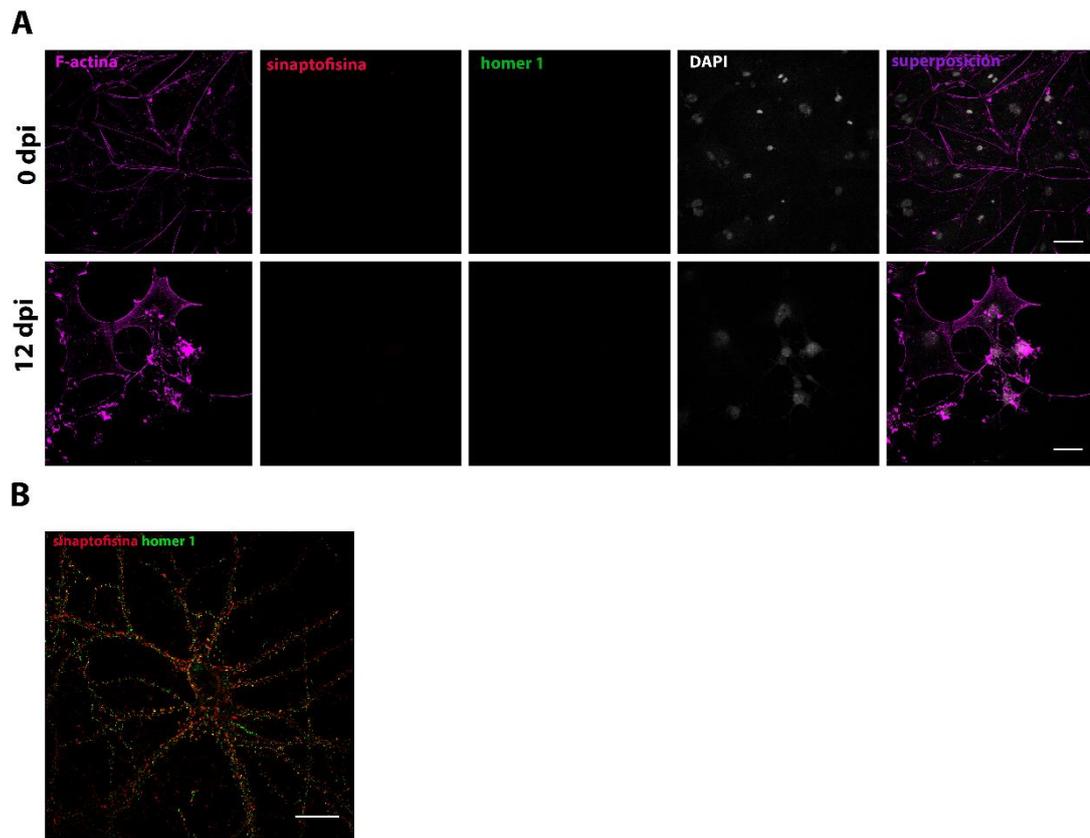


Figura 10. Neuronas inducidas a partir de MEF no expresan proteínas sinápticas a los 12 dpi. A: Inmunocitoquímica de MEF inducidas a los 0 y 12 dpi contra F-actina, sinaptofisina y homer-1, DAPI se utilizó para marcar el núcleo. Aumento 40X, barra de tamaño corresponde a 50 μm . **B:** Inmunocitoquímica de neurona hipocampal de 21 DIV contra sinaptofisina y homer-1. Aumento 40X, la barra de tamaño corresponde a 20 μm .

Determinación de la eficiencia de las inducciones:

Tanto en Vierbuchen y cols. (2010) como en Li y cols. (2015) se determinó la eficiencia de inducción considerando como neuronas inducidas a aquellas células que poseen expresión positiva de β III-tubulina y que morfológicamente tienen el soma redondo y una de sus prolongaciones es al menos tres veces más larga que el diámetro del soma. En nuestros resultados, que consideran inducciones de hasta 12 días de duración, se observa una gran cantidad de células que cumplen con los parámetros morfológicos, pero no así con la expresión del marcador neuronal, por lo que decidimos calcular la eficiencia de inducción de dos maneras distintas: la primera fue a través de la expresión β III-tubulina y la segunda según la morfología de las células inducidas.

Para determinar un umbral desde donde la presencia de β III-tubulina se consideró positiva, se realizó una medición de la intensidad de fluorescencia de células MEF inducidas a los 0, 7, 10 y 12 dpi, utilizando como control una neurona hipocampal primaria en la sesión de microscopía en que se obtuvieron las imágenes. Se observó que el promedio de la intensidad de fluorescencia aumenta con un mayor número de días de inducción (Figura 11A), lo que sugiere que, a una mayor intensidad de fluorescencia, mayor es el progreso de la reprogramación directa. Se determinó que una intensidad de fluorescencia mayor a 10 u.a. se considerará positiva dado que corresponde al límite inferior de la expresión de la marca en los grupos 7, 10 y 12 dpi. Considerando este umbral para la expresión de β III-tubulina, se determinó la eficiencia de la inducción midiendo la cantidad de células que presentan una intensidad de fluorescencia mayor a 10 u.a. y que presentan marca positiva para DAPI. La eficiencia es de alrededor del 15% para ambos grupos tanto 7 como 12 dpi (Figura 11B).

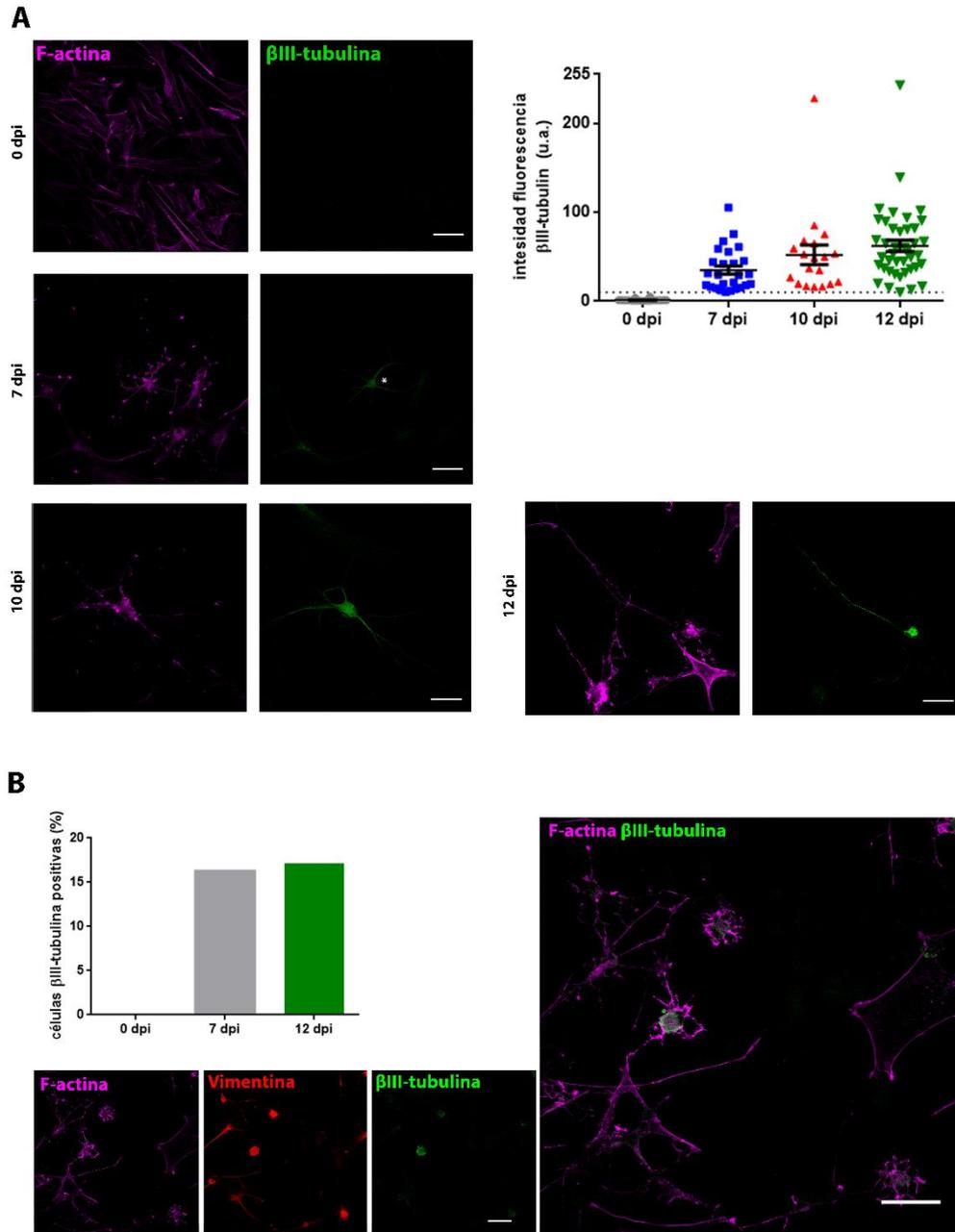


Figura 11. Determinación de la eficiencia de inducción según la expresión de β III-tubulina. **A:** Inmunocitoquímica representativa de MEF inducidas a los 0, 7, 10 y 12 dpi contra F-actina y β III-tubulina. El asterisco señala la célula con marca positiva para β III-tubulina a los 7 dpi. El gráfico muestra la intensidad de fluorescencia correspondientes a cada tiempo de inducción (nº células en 0: 26, 7: 29, 10: 21 y 12 dpi: 45). Aumento 40x, la barra de tamaño corresponde a 50 μ m. **B:** El gráfico muestra la proporción de células MEF inducidas que son β III-tubulina positivas respecto al número total de células a los 0 dpi (0 neuronas de 159 células totales), 7 (37 de 227) y 12 dpi (38 de 221), se analizaron 4, 6 y 16 campos 40X, respectivamente. Las imágenes corresponden a una inmunocitoquímica representativa de la eficiencia a los 12 dpi contra F-actina, vimentina y β III-tubulina. Aumento 40x, la barra de tamaño corresponde a 50 μ m.

Se utilizó además un parámetro morfológico para determinar la eficiencia de la inducción, que consiste en considerar inducidas aquellas células que presenten soma redondo y una de sus prolongaciones es al menos tres veces más larga que el diámetro del soma, en la figura 12A se muestran células representativas. La eficiencia según los parámetros morfológicos fue de aproximadamente 60% tanto a los 7 como a los 12 dpi (Figura 12B).

Los resultados obtenidos sugieren que la eficiencia de inducción no fue la misma que la reportada por Li (2015) del 90% de presencia de β III-tubulina a los 16-20 días post inducción, entre las razones posibles más evidentes se encuentran los mayores tiempos de inducción en comparación a nuestro protocolo. Sin embargo, cabe destacar que, si se considera la morfología solamente, la eficiencia alcanza valores cercanos al 60%, lo que sugiere que el cambio morfológico hacia células neuronales ocurre más rápidamente que el cambio en la expresión de los marcadores neuronales.

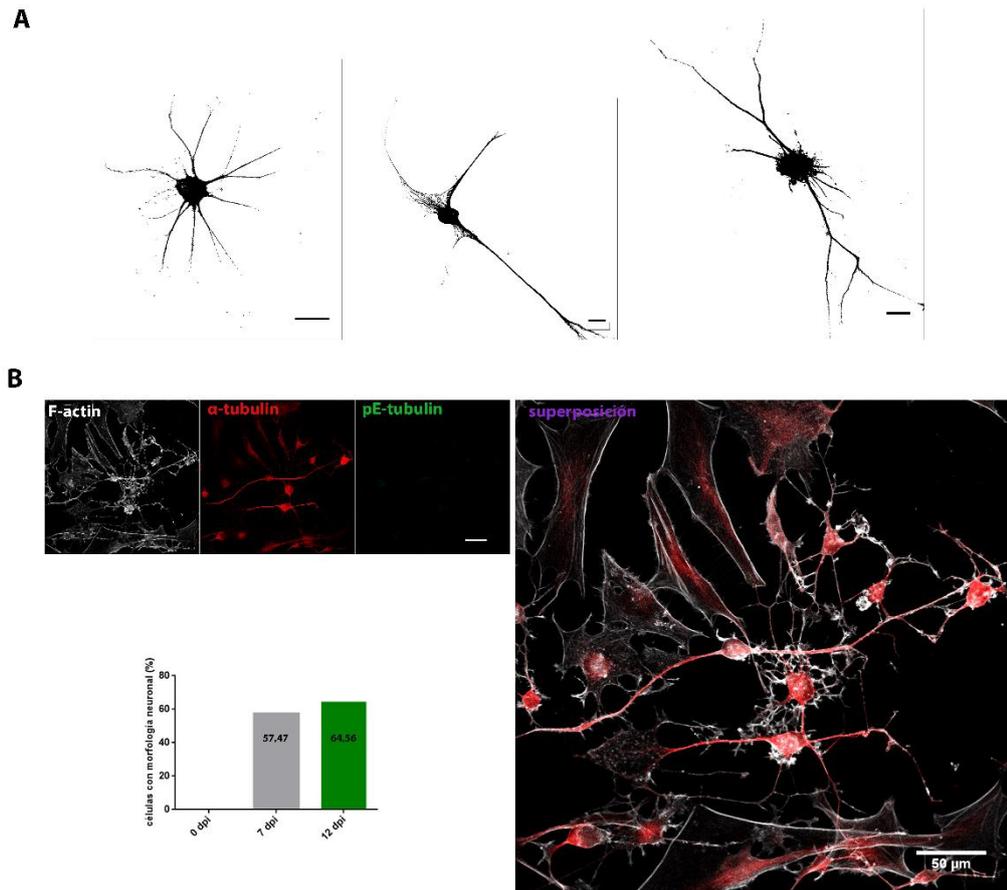


Figura 12. Determinación de la eficiencia de inducción según parámetros morfológicos

A: Inmunocitoquímicas contra α -tubulina tras aplicación de máscara binaria para observar la morfología de las neuronas inducidas obtenidas a los 12 dpi. La barra de tamaño corresponde a 25 μ m. **B:** El gráfico muestra la proporción de células MEF que cumplen los parámetros morfológicos de inducción a los 0, 7 y 12 dpi, se analizaron 4, 6 y 19 campos respectivamente (n° células 0 dpi: 0 de 208, 7dpi: 100 de 174, 12 dpi: 51 de 79). Las imágenes corresponden a una inmunocitoquímica representativa de la eficiencia a los 12 dpi contra F-actina, α -tubulina y pE-tubulina. Aumento 40x, la barra de tamaño corresponde a 50 μ m.

Comparación de la eficiencia de reprogramación entre fibroblastos dermales y MEF

Hasta este momento, este trabajo resume los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de marcadores neuronales, cambios morfológicos y eficiencia de reprogramación de los MEF sometidos al protocolo de inducción neuronal. Sin embargo, una de las proyecciones de este trabajo es realizar la reprogramación directa de células de piel humanas, por lo que es necesario evaluar este protocolo en fibroblastos dermales de ratón. En primera instancia, como una aproximación a la estandarización de este protocolo en nuestro laboratorio, se realizó una comparación de la eficiencia de reprogramación en ambas poblaciones de células, MEF y fibroblastos dermales. Se analizaron 15 campos (40x) elegidos al azar de poblaciones de células que fueron inducidas durante 12 días.

Se observaron tres tipos de células, aquellas que son negativas para β III-tubulina y presentan morfología de fibroblasto, que se denominaron “fibroblastos”, aquellas positivas para β III-tubulina con morfología neuronal (según los parámetros mencionados anteriormente: soma redondo y prolongación al menos tres veces más larga que el diámetro del soma) que se denominaron “neuronas inducidas”, y aquellas con morfología neuronal pero que no presentan marca positiva para β III-tubulina, que se denominaron “tipo neurona”. En el caso de los fibroblastos dermales, se observó un incremento en la cantidad de células “tipo neurona” (Figura 13A), en comparación a las MEF. Además, las “neuronas inducidas” (células que son β III-tubulina positivas) presentaron una intensidad de fluorescencia promedio menor y las intensidades máximas de fluorescencia fueron alrededor de la mitad de las observadas en las MEF (Figura 13B). En conjunto estos resultados sugieren un menor grado de inducción de los fibroblastos dermales bajo el mismo protocolo de inducción con fármacos.

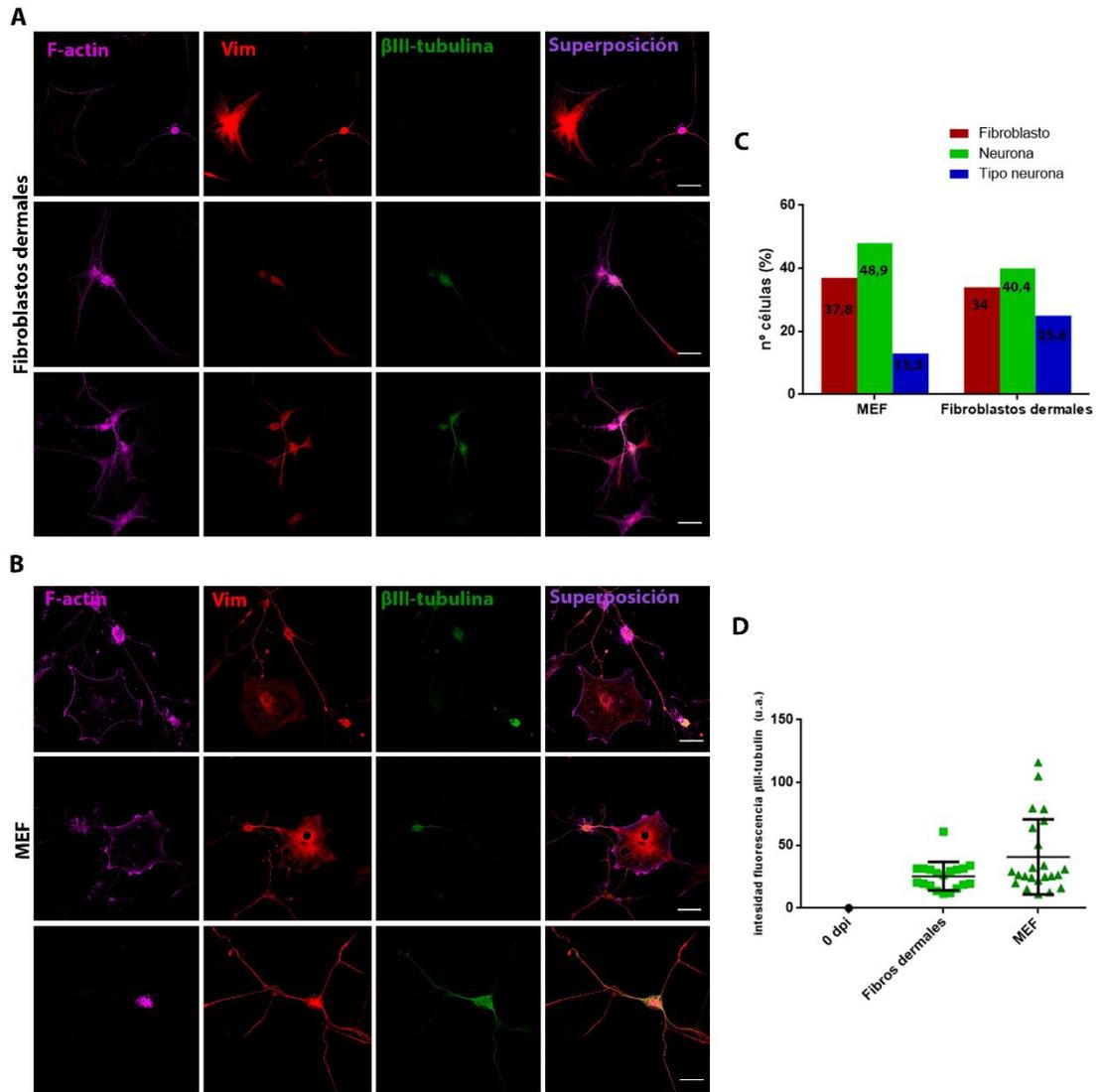


Figura 13. MEF presentan mayor eficiencia de inducción en comparación a fibroblastos dermales a los 12 dpi. **A:** Tres campos visuales representativos de inmunocitoquímicas de fibroblastos dermales a los 12 dpi contra F-actina, vimentina y β III-tubulina. Aumento 40X, la barra de tamaño corresponde a 50 μ m. **B:** Tres campos visuales representativos de inmunocitoquímicas de MEF a los 12 dpi contra F-actina, vimentina y β III-tubulina. Aumento 40X, la barra de tamaño corresponde a 50 μ m. **C:** Proporción de células: fibroblastos (vimentina positiva, β III-tubulina negativa), neurona (β III-tubulina positivo y morfología neuronal) y tipo neurona (β III-tubulina negativo y morfología neuronal) en MEF (17, 22 y 6, respectivamente) y fibroblastos dermales (16, 19 y 12, respectivamente) a los 12 dpi. Se analizaron 10 campos 40X para cada condición. **D:** Intensidad de fluorescencia de β III-tubulina para MEF y fibroblastos dermales de 0 dpi (control), fibroblastos dermales de 12 dpi y MEF de 12 dpi (n° células analizadas 0 dpi: 33, fibroblastos dermales: 19, MEF: 22).

Disminución de la concentración de I-BET151

El protocolo de reprogramación directa utilizado en el desarrollo de este seminario de título (Li y cols., 2015), consiste en una fase de inducción neuronal con fármacos y luego una fase de maduración neuronal, en que las neuronas inducidas se co-cultivan con astrocitos. La primera fase dura 21 días y nosotros hemos logrado llegar a 12 dpi, debido a la alta tasa de muerte de las células que nos ha llevado a detener el protocolo. Los autores señalan que el I-BET151, que es el disruptor del programa genético de los fibroblastos y que aumenta considerablemente la eficiencia de reprogramación en comparación a la misma combinación de fármacos sin este compuesto, es también el compuesto más tóxico del cóctel. Considerando esto, con el fin de aumentar la sobrevivencia de las células y promover la duración de las inducciones, sin perder el efecto en la eficiencia de reprogramación, se modificó la concentración utilizada inicialmente de 0,5 μM I-BET151, disminuyéndola a 0,25 μM y se evaluó el efecto en la inducción durante 10 días, también se incluyó el control con vehículo (Figura 14A), que corresponde a DMSO, para descartar que fuera el responsable de la muerte celular. Se utilizó la misma clasificación que para el experimento anterior, en la que se distinguen tres tipos de células. Se observó que en la condición de 0,25 μM I-BET151 hay un mayor número total de células y también hay un mayor número de células con morfología de fibroblasto (Figura 14A y 14B). Al analizar la intensidad de fluorescencia de la marca de β III-tubulina, se observó que el promedio de fluorescencia es menor para las células que son inducidas con una menor concentración de I-BET151 y también la intensidad de fluorescencia máxima es menor (Figura 14A y 14C). Estos resultados sugieren que, si bien habría una menor tasa de muerte celular, también sería menor el grado de inducción, por lo que es necesario seguir buscando un balance entre la sobrevivencia de las células y la eficiencia de reprogramación.

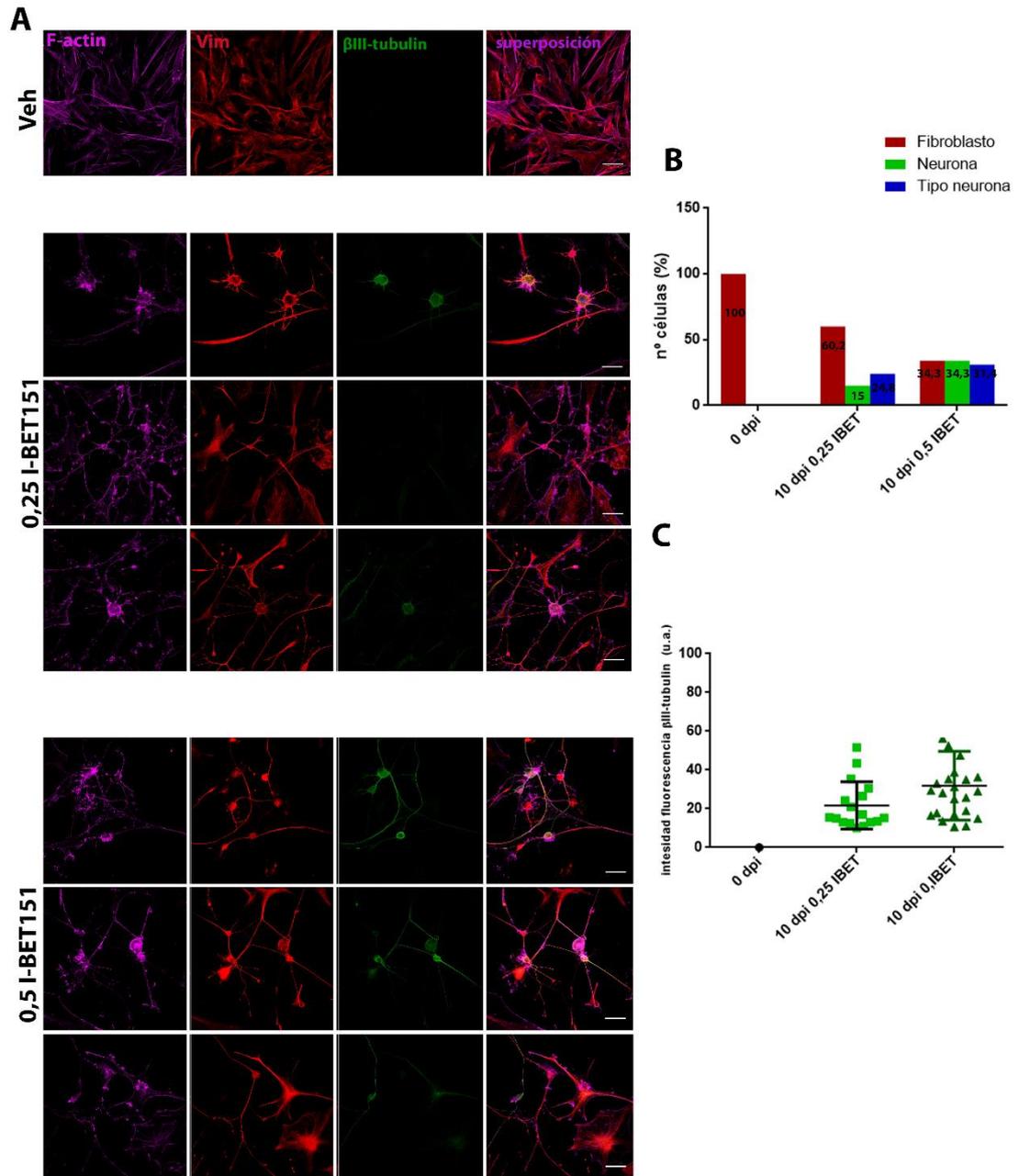


Figura 14. Menor concentración de I-BET aumenta sobrevida y disminuye grado de inducción a los 10 dpi. **A:** Inmunocitoquímicas representativas de MEF tratadas con vehículo, cóctel con 0,25 μ M I-BET151 y cóctel con 0,5 μ M I-BET151 contra F-actina, vimentina y β III-tubulina. Aumento 40X, la barra de tamaño corresponde a 50 μ m. **B:** Proporción de células: fibroblastos (vimentina positiva, β III-tubulina negativa), neurona (β III-tubulina positivo y morfología neuronal) y tipo neurona (β III-tubulina negativo y morfología neuronal) en 0 dpi (17, 22 y 6, respectivamente), MEF 0,25 μ M I-BET151 (68, 17 y 28, respectivamente) y MEF 0,5 μ M I-BET151 (25, 25 y 23, respectivamente). **C:** Intensidad de fluorescencia de β III-tubulina para 0 dpi (control, n= 93), MEF 0,25 μ M I-BET151 (n= 17) y MEF 0,5 μ M I-BET151 (n= 25).

Discusión:

La reprogramación directa de fibroblastos hacia neuronas constituye una herramienta poderosa en el estudio del sistema nervioso, ya que supera las limitaciones relacionadas a la inaccesibilidad del tejido y de células funcionales. Para nuestro laboratorio en particular, la posibilidad de lograr obtener neuronas de pacientes a partir de células somáticas de piel se presenta como una estrategia novedosa para el estudio del envejecimiento humano y las enfermedades neurodegenerativas asociadas a él, ya que por una parte permite prescindir de los modelos animales y de las limitaciones asociadas a ellos y por otra, permite tener acceso a neuronas de individuos de edad avanzada que son imposibles de conseguir de otra manera. En este seminario, lo más importante era evaluar los resultados obtenidos por este protocolo y estandarizar los pasos iniciales necesarios para eventualmente escalarlo a fibroblastos dermales de humanos.

Eficiencia de la inducción neuronal con fármacos

Los cultivos lograron mantenerse durante máximo 14 días con eficiencias de alrededor del 15% según la expresión positiva de β III-tubulina, en comparación a los 21 días con eficiencias del 90% documentados por Li y cols. (2015). En los trabajos de reprogramación directa (W. Hu et al. 2015; Li et al. 2015; Vierbuchen et al. 2010) se utiliza la expresión de β III-tubulina como un marcador del éxito de la reprogramación. De la misma manera, hemos relacionado la intensidad de la fluorescencia al grado de inducción neuronal, porque hemos visto que progresa a partir de cero en las células no inducidas y luego aumenta acorde a la cantidad de días de la inducción. Esto coincide con la correlación existente entre la expresión de *Ascl-1* y β III-tubulina observada en el proceso de reprogramación directa con factores de transcripción (Treutlein et al. 2016). Adicionalmente, se analizaron otros

marcadores como pE-tubulina, que es un marcador de neuronas (Larcher y cols., 1996) y se observó que hay presencia de esta modificación post-traducciona l de la tubulina pero en menor cantidad que en neuronas hipocampales de 3 DIV (Fig. 8). De la misma manera sucedió con MAP2/tau-1, que son componentes del citoesqueleto neuronal, se observa marca para las células inducidas, pero es de menor intensidad que en las neuronas hipocampales de 3 DIV (Fig. 9) y, además, no muestra la compartimentalización típica de ambas proteínas neuronales, que es un gradiente en que tau-1 se concentra en el axón distal y disminuye al acercarse al soma, mientras que MAP2 se localiza preferencialmente en el compartimento somato-dendrítico (Bodaleo et al. 2016; Dehmelt y Halpain 2005). En conjunto, estos resultados sugieren un proceso de inducción en curso e incompleto a los 12-14 días, principalmente porque se detecta expresión marcadores neuronales pero menor o con una distribución diferente que en las neuronas primarias utilizadas como control. Adicionalmente, se utilizaron como marcadores de sinapsis glutamatérgicas, proteínas pre y post-sinápticas, que fueron sinaptofisina y homer-1, respectivamente (Sala et al. 2001). No se observa expresión de estas proteínas en los fibroblastos ni en las células inducidas a los tiempos analizados (Fig. 10). Si se compara con neuronas hipocampales en cultivo, la ausencia de proteínas involucradas en la sinapsis se relaciona con una etapa temprana del desarrollo neuronal. Las neuronas primarias en cultivo comienzan el proceso de maduración a partir del día 7 de cultivo, donde las dendritas se vuelven más ramificadas y se forma una extensa red de conexiones sinápticas, siendo el *peak* del crecimiento y desarrollo de las dendritas y de la formación de sinapsis entre la segunda y tercera semana *in vitro* (Kaech y Banker 2006).

Estos resultados en conjunto refuerzan la idea de que el proceso de inducción inicia el cambio de identidad, pero las iN obtenidas no han alcanzado la madurez neuronal.

Es de vital importancia lograr que las inducciones duren un tiempo superior a los 12-14 días para evaluar la expresión de proteínas neuronales en las iN y posteriormente, someterlas a un proceso que permita su maduración y lograr obtener neuronas inducidas en un período de 5 semanas. Es importante destacar que este protocolo de reprogramación directa supone tiempos considerablemente menores de obtención de células neuronales, respecto a la alternativa de la obtención y diferenciación de iPSC, que requiere de 4-6 meses para generar las iPSC y luego diferenciarlas hacia neuronas funcionales (Mertens et al. 2016).

Citoesqueleto y cambios morfológicos

En los experimentos de reprogramación directa, se observó que hay una gran cantidad de células con morfología neuronal que no presentan señal de β III-tubulina a los 12-14 dpi, por lo tanto, se evaluó la eficiencia de reprogramación según los cambios morfológicos que estas experimentan. Se consideró como células inducidas a aquellas que poseían un soma redondo y una prolongación al menos tres veces más larga que el diámetro del soma y se obtuvo que la eficiencia de reprogramación de las MEF es mayor al 60% a los 12 dpi siguiendo este criterio, comparada con el 15% obtenido al calcular la eficiencia de inducción analizando la expresión de β III-tubulina (Figura 11).

Esta diferencia podría estar relacionada con que los cambios morfológicos que ocurren son dramáticos y comienzan tempranamente (a partir de las 24 horas post-inducción) durante el proceso de reprogramación. Se ha visto que células troncales mesenquimáticas y fibroblastos sometidos a medios de inducción neuronal durante cortos períodos de tiempo experimentan una contracción del citoplasma, mientras se mantienen algunas de las adhesiones focales, lo que genera estructuras que se asemejan a los procesos neuronales, dando lugar a una morfología tipo neurona

(Neuhuber et al. 2004). Se ha propuesto que la morfología tipo neurona se debe a la contracción del citoplasma, y no a la extensión de procesos, lo que resulta en una célula neuronal cuyo tamaño y forma está determinado por la célula de inicio. Esto coincide con la morfología neuronal inmadura reportada por Li (2015), caracterizada por un soma redondo y procesos con ramificación escasa o nula, que se adoptan una mayor complejidad al ser co-cultivadas con astrocitos. Nosotros observamos esta morfología inmadura en una gran cantidad de las neuronas inducidas, sin embargo, también observamos células inducidas que poseen prolongaciones que exceden el tamaño de un fibroblasto, por lo que no podría tratarse de una mera retracción del citoplasma, y queda por evaluar cuál(es) mecanismos permitirían la extensión y ramificación de los procesos presentes en las neuronas inducidas.

En Neuhuber (2004) también se determinó que el dimetil sulfóxido (DMSO) al 2% tiene el mismo efecto sobre las MSC y fibroblastos que el medio de inducción neuronal en la obtención de células tipo neurona a las 24 horas. En el protocolo de reprogramación directa utilizado en este seminario la mayoría de los fármacos están disueltos en DMSO, lo que genera en total un 1,7% de DMSO en el medio de inducción, no obstante, se realizaron controles donde se agregó vehículo, que es medio de inducción 1,7% DMSO y no se observan los cambios morfológicos que experimentan las células inducidas con el cóctel de fármacos (Figura 14A). Por tanto, se descarta que los efectos observados se deban a la presencia de DMSO en el medio de inducción.

En primera instancia, nosotros esperábamos una disminución de la expresión de vimentina y un aumento de la expresión de β III-tubulina en las neuronas inducidas a lo largo del tiempo, sin embargo, las neuronas inducidas mantienen la expresión de vimentina. Esto puede deberse a que el recambio de las proteínas del citoesqueleto demora un tiempo mayor de los que duraron las inducciones, ya que la vimentina

sólo se expresa durante las etapas tempranas del desarrollo neuronal y posteriormente es reemplazada por neurofilamentos (Boyne, Fischer, y Shea 1996) y su expresión en el cerebro adulto está restringida a células vasculares endoteliales y algunas subpoblaciones de células gliales (Levin et al. 2009). No obstante, otros autores han reportado la coexpresión de marcadores de fibroblastos como vimentina con marcadores neuronales como MAP2 en las iN, incluso en 25 días post inducción (Drouin-Ouellet et al. 2017).

Disminución de la cantidad de I-BET151

En el trabajo de Li (2015) inicialmente utilizan el cóctel de compuestos Forskolina, SB431542, ISX-9 y CHIR90210, obteniendo un 30% de eficiencia en la reprogramación directa. Luego realizaron un *screening* de otras moléculas pequeñas que permitieran aumentar la eficiencia de la reprogramación y encontraron que el I-BET151 es capaz de aumentar la eficiencia a un 90% de células inducidas por lo fue incluido en el cóctel. No obstante, también señalan es el compuesto más tóxico, e incluso se agregan otros compuestos para evitar los efectos de su toxicidad, que fueron usados en este seminario (Fasudil, Y27632, SB203580, y BIRB796). Dado que es el compuesto más tóxico, una de las aproximaciones ya realizadas fue disminuir los niveles de I-BET151, sin embargo, se observó que siguiendo esta estrategia disminuye la eficiencia de inducción neuronal siguiendo el protocolo de reprogramación directa. El menor grado de inducción y la presencia de una mayor cantidad de fibroblastos, puede estar relacionado al rol de I-BET151 en el cóctel de fármacos, que es la inhibición de las proteínas BET (del inglés *bromodomain and extra-terminal proteins*). Se ha visto que la asociación de las proteínas BET a la cromatina mitótica contribuye a “marcar” los genes que se encuentran activos, al unirse a las histonas acetiladas, actuando como una memoria transcripcional durante la división celular (Devaiah y Singer 2013) y que su inhibición contribuye al proceso

de reprogramación hacia la pluripotencia (Shao et al. 2016). Además fue identificado como el compuesto que interrumpe el programa de expresión génica de los fibroblastos (Li et al. 2015). Considerando estos antecedentes, una menor concentración de I-BET151 en el medio de inducción podría generar que el proceso de reprogramación directa ocurra más lento y la expresión de marcadores neuronales no sea detectable mediante inmunofluorescencia, que se trunque sin llegar a observar fenotipos observables, o bien que no se genere ningún efecto en los fibroblastos, que podrían incluso seguir proliferando. Estas posibilidades deben estudiarse con el objetivo de encontrar una concentración de I-BET151 que signifique un balance óptimo entre la supervivencia de las células y la eficiencia de reprogramación.

Potencialidad inicial de las células

El cultivo de MEF ha sido ampliamente utilizado en experimentos de reprogramación celular hacia la pluripotencia y reprogramación directa. Las bajas eficiencias en la reprogramación se han asociado, entre otros factores, a la heterogeneidad de las poblaciones de inicio.

En este seminario, tanto los MEF como fibroblastos dermales se han identificado por su morfología, capacidad de migrar y de adherirse al plástico y por la expresión de marcadores como vimentina, no obstante, falta caracterizar con mayor profundidad las poblaciones iniciales para comprender el proceso de reprogramación.

Los MEF son una población heterogénea de células (Singhal et al. 2016) y se ha visto que son capaces de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos o adipocitos, si son sometidas a crecimiento en medios específicos (Dastagir et al. 2014), de la misma manera que las células troncales mesenquimáticas (Haniffa et al. 2009) pero no todas las MEF tienen la misma potencialidad, siendo algunas tripotentes, bipotentes o unipotentes (Chen et al. 2007; Singhal et al. 2016).

De la misma manera, los fibroblastos que conforman la dermis también constituyen una población heterogénea de células (Driskell y Watt 2015), entre los que se encuentran los fibroblastos reticulares y papilares, que difieren en la composición y organización de su matriz extracelular (Sorrell 2004). Se ha visto que fibroblastos dermales humanos comparten la capacidad de diferenciarse en células de distinto linaje como osteoblastos, adipocitos y células tipo cardiomiocitos de manera similar a las células troncales mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo (Blasi et al. 2011). No obstante, los MEF podrían poseer un mayor grado de potencialidad celular en comparación a los fibroblastos dermales, ya que se encuentran en un estado de diferenciación intermedio entre las células troncales embrionarias (pluripotentes) y las células troncales mesenquimáticas (multipotentes) ya que expresan marcadores tanto de multipotencia como de pluripotencia, y son capaces de formar tejidos de los tres linajes al ser trasplantados a ratones Balb/c (Yusuf et al. 2013). Esto podría explicar el mayor grado de inducción neuronal de las MEF al compararlos con los fibroblastos dermales.

Edad de las células

Una de las posibles aplicaciones de este protocolo es la obtención de fibroblastos dermales de ratones y humanos viejos. En el último tiempo ha surgido evidencia de que la reprogramación directa es capaz de mantener las características asociadas a la edad de las células de inicio (Mertens et al. 2015; Tang et al. 2017). Además, la dermis es un tejido post-mitótico que depende de mecanismos de adaptación y de control de daño para mantener su homeostasis. Está formado principalmente por matriz extracelular, que determina sus características mecánicas y estructurales, y por los fibroblastos que secretan y modulan esta matriz. Los fibroblastos presentes en la dermis tienen una tasa muy baja de proliferación y por tanto es difícil que eliminen el daño extrínseco mediante divisiones celulares. Esto hace que las células

de la piel sean una población con largos períodos de vida, que constantemente acumulan daño y adaptaciones asociadas al paso del tiempo, lo que los hace un buen sistema para estudiar el envejecimiento, a diferencia de otras poblaciones que tienen una mayor tasa de división celular (Tigges et al. 2014).

En este seminario, se estandarizó el cultivo primario de fibroblastos dermales de ratones neonatos y adultos y se observó que los fibroblastos de neonatos comienzan a migrar a los 2-3 días, mientras que los de adultos comienzan a migrar al día 4-5, estas diferencias en la tasa de migración pueden estar relacionadas con los cambios que ocurren con la edad como una menor migración y proliferación celular, menor concentración de factores de crecimiento y menor secreción de matriz extracelular (Gosain y DiPietro 2004). Considerando estos antecedentes, la reprogramación celular directa mediada por fármacos parece ser una estrategia experimental apropiada para estudiar el envejecimiento en neuronas químicamente inducidas a partir de fibroblastos.

Epigenética

La generación de iPSC "rejuvenece" las células de inicio. Se ha visto que la reprogramación hacia un estado de pluripotencial, partiendo desde células senescentes, es capaz de resetear características moleculares asociadas a la edad, tales como el tamaño de los telómeros, el perfil de expresión de genes, estrés oxidativo y metabolismo mitocondrial (Lapasset et al. 2011). Mediante una herramienta predictiva de la edad de las células, basado en el estado de metilación del genoma, se determinó que las iPSC pierden el patrón de metilación asociado a la edad y tienen una "edad epigenética" similar a las células embrionarias (Horvath 2013). Recientemente, se analizó mediante RNA-seq el perfil transcriptómico de fibroblastos dermales humanos viejos (mayores de 40 años) y jóvenes (menores de

40) y se observó expresión diferencial de genes entre ambas poblaciones de células (Mertens et al. 2015). Sin embargo, al reprogramarlas hacia iPSCs, se pierde la expresión diferencial asociada a la edad. Con el objetivo de evaluar si la reprogramación directa permite retener los perfiles transcriptómicos de las células de inicio, se obtuvieron neuronas inducidas (iN) a partir de fibroblastos viejos y jóvenes, y se observó que la expresión diferencial de genes se mantiene durante la reprogramación directa, siendo los genes más alterados durante el envejecimiento de fibroblastos los relacionados a la cicatrización de heridas y respuesta al estrés, y los de regulación de la plasticidad sináptica y extensión de procesos, en neuronas inducidas (Mertens et al. 2015).

Existen otras evidencias de que la existe una marca relacionada a la edad de las células de inicio. En el trabajo realizado por Huh (2016), aplicaron el modelo predictivo del “reloj epigenético” de Hovarth (2013) a datos de metilación del DNA y observaron que la edad epigenética de las neuronas inducidas se correlaciona altamente con la edad epigenética de los fibroblastos de origen. Además, analizaron perfiles transcriptómicos y de microRNA y observaron la expresión diferencial de genes en las neuronas inducidas jóvenes y viejas.

En ambos trabajos presentados se utilizan estrategias que incluyen factores de transcripción: En Mertens (2016) la estrategia de reprogramación directa consiste en la sobreexpresión ectópica los factores de transcripción de *Ascl1* y *Ngn2* en conjunto con un cóctel de compuestos compuesto por CHIR990210 (inhibidor de GSK-3 β) y SB431542 y *Noggin* (inhiben la vía de señalización SMAD). En Huh (2016) utilizan una estrategia de reprogramación directa consiste en la transducción de los microRNA miR-9/9*-124 en conjunto con los factores de transcripción CTIP2, DLX1/2, and MYT1L.

Se han realizado algunas aproximaciones con el propósito de comprender el proceso de reprogramación directa mediada por la sobreexpresión de factores de transcripción, se realizó un análisis mediante RNA-seq de la reprogramación directa desde fibroblastos a neuronas utilizando los factores BAM (Treutlein et al. 2016). Se observó que, a partir de etapas tempranas de la reprogramación, Ascl-1 se encuentra altamente expresado en una proporción de los fibroblastos de inicio, también se encuentran altamente expresados los genes blanco de Ascl-1 tales como Zfp238, Hes6, Atoh8, y otros genes involucrados en neuronales como genes de reorganización de citoesqueleto, transmisión sináptica y proyección de neuritas. Esto revela que Ascl-1 induce la expresión de genes involucrados en definir la morfología neuronal desde momentos tempranos de la reprogramación. Posteriormente en la fase de maduración, los factores de transcripción Brn2 y Myt1l promueven la expresión de genes de maduración sináptica. Según los resultados obtenidos en este seminario, en la reprogramación directa mediada por fármacos los cambios morfológicos son también lo primero que se observa. No obstante, los mecanismos mediante los cuales ocurre la reprogramación directa aún se desconocen y la información disponible se relaciona con los blancos o las vías que afectan cada uno de los fármacos utilizados en las inducciones.

A la fecha, se ha logrado obtener iPSC, progenitores neurales, neuronas, cardiomiocitos a partir de fibroblastos mediante tratamiento con moléculas químicas, la mayoría de los compuestos pueden categorizarse en grupos: moduladores epigenéticos, moduladores de transición mesenquimal-epitelial, reguladores metabólicos y compuestos que promueven la autorenovación, entre otros. Un cóctel químico utilizado para reprogramación generalmente contiene tres componentes: moduladores epigenéticos, como inhibidores de deacetilasas de histonas o inhibidores de metiltransferasas de histonas o DNA, para superar la barrera

epigenética entre los diferentes tipos celulares. En segundo lugar, compuestos que suprimen las características de las células de inicio, por ejemplo, si son fibroblastos, algún fármaco que promueva la transición hacia células epiteliales, siendo los más utilizados activadores de la vía Wnt e inhibidores de TGF- β , como CHIR990210. En tercer lugar, compuestos que induzcan las características de las células deseadas, como ISX-9 o dorsomorfinina en el caso de las neuronas. Es importante destacar, que hasta la fecha existe un conjunto de moléculas que son necesarias para reprogramar fibroblastos, independiente de las células resultantes finales. Tanto para obtener iPSC o iN químicamente se han utilizado combinaciones de moléculas que suelen incluir moduladores epigenéticos, como VPA o el I-BET151 y moduladores de la transición mesenquimática-epitelial como inhibidores de TGF- β y CHIR990210, que promueven reprogramación (Xie, Fu, y Liu 2017)

Si bien la reprogramación mediante sobreexpresión de factores de transcripción retiene perfiles transcriptómicos y marcas epigenéticas como metilación del DNA asociados a la edad de las células, está pendiente evaluar si sucede de la misma manera con las estrategias basadas en la utilización de fármacos. Sobre todo, debido a que estas incluyen moduladores epigenéticos como inhibidores de acetilasas de histonas e inhibidores de la metilación de DNA e histonas.

En este contexto, hay que considerar dos fenómenos, por una parte, los mecanismos epigenéticos que permiten mantener una identidad celular (y reprimir las otras), y por otra, las marcas epigenéticas asociadas a la edad de las células, y es de vital importancia estudiar cómo ambos son afectados por los moduladores epigenéticos químicos utilizados en este seminario de título y evaluar si la reprogramación directa mediada por fármacos es una alternativa para obtener poblaciones de células que nos permitan estudiar el envejecimiento.

Proyecciones

Uno de los principales obstáculos que presentó el desarrollo de este seminario, fue los cortos tiempos de inducción neuronal de las células, debido a la alta tasa de muerte celular. Una primera aproximación fue disminuir la concentración de I-BET151, sin embargo, esto disminuye la eficiencia de la reprogramación, por lo que debemos buscar un equilibrio entre la sobrevivencia y la reprogramación.

Además de disminuir la tasa de muerte celular, se vuelve necesario buscar maneras de aumentar la eficiencia de reprogramación. Se ha visto que el tratamiento con inhibidores de las desacetilasas de histonas, como la 5-azacitidina, son capaces de aumentar la eficiencia en varios protocolos de reprogramación (Xu, y cols., 2008). También se ha visto que la inhibición de p53 es suficiente para la diferenciación de fibroblastos hacia células de linaje neuronal (Zhou et al. 2014) y que es capaz de aumentar la eficiencia de la reprogramación mediada por factores de transcripción (Jiang et al. 2015), por lo que una posibilidad es inhibir p53 en las células inducidas y una manera de hacerlo es incluir el compuesto μ -pifitrina en el cóctel de fármacos, que corresponde a un inhibidor reversible de p53, que es capaz de proteger contra agentes genotóxicos (Bulavin 1999) y bloquear la activación de la autofagia mediada por p53 (L. Zhang et al. 2016).

Otro factor que considerar es la maduración de las neuronas. En este seminario se observó que las neuronas expresan marcadores neuronales como β III-tubulina y pE-tubulina pero con menor intensidad que las neuronas primarias, que no presentan la compartimentalización asociada a las proteínas de citoesqueleto MAP2 y tau1 y que no expresan marcadores de sinapsis, sugiriendo en conjunto que las cIN no presentan características atribuidas a neuronas maduras, por lo menos durante los tiempos de inducción analizados. Una manera de madurar las neuronas inducidas es

co-cultivarlas con astrocitos adaptando el protocolo de Li (2015), en el cual las neuronas inducidas, luego de 21 días de inducción, son co-cultivadas con astrocitos o neuronas primarias en un medio de maduración neuronal compuesto por el medio de inducción neuronal más bFGF, Forskolina, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain derived neurotrophic factor*) y factor neurotrófico derivado de glía (GDNF, del inglés *glial derived neurotrophic factor*).

Además de la caracterización por inmunocitoquímica, se están evaluando otras estrategias para caracterizar el proceso de inducción, como separar las poblaciones de fibroblastos y células inducidas, y analizar los patrones de expresión de genes neuronales y de fibroblastos mediante qPCR (del inglés *quantitative polymerase chain reaction*) a partir de muestras de ADNc (ADN complementario) derivadas de neuronas inducidas. Asimismo, es necesario considerar una caracterización electrofisiológica que permita confirmar que las neuronas inducidas obtenidas son funcionales y presentan actividad eléctrica similar a las neuronas primarias, tal como se ha realizado en Vierbuchen (2010) y Li (2015).

De manera paralela, otro de los objetivos es obtener fibroblastos dermales de ratones viejos y someterlos al protocolo de inducción neuronal. Es posible que la edad de las muestras sea una limitación durante el desarrollo de los cultivos y la obtención de un número suficiente de células para realizar los protocolos de inducción neuronal. No obstante, existen otras metodologías para la obtención de fibroblastos dermales que no requieren la migración de las células en caso de que se dificultara este protocolo (Kotton, Mostoslavsky, y Murphy 2010).

Todos estos esfuerzos apuntan, por una parte, a obtener fibroblastos dermales de humanos para someterlos al protocolo de reprogramación directa y generar de esta manera un modelo celular para el estudio de neuronas humanas. En el contexto de la investigación desarrollada por centro Fondap de Gerociencia (GERO) estamos

particularmente interesados en el estudio del envejecimiento neuronal. La oportunidad de contar con neuronas inducidas derivadas de humanos abre la posibilidad de comparar muestras obtenidas de individuos de diferentes edades, sobrepasando la barrera de la inaccesibilidad del tejido neuronal. La reprogramación directa mediada por fármacos constituye la posibilidad de estudiar, y por qué no, eventualmente modificar, los mecanismos que subyacen el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas asociadas a él.

Conclusiones:

Se estandarizó y caracterizó el cultivo de diferentes tipos de fibroblastos murinos, que fueron sometidos exitosamente a un protocolo de reprogramación neuronal basado en el tratamiento con un cóctel de fármacos, para la generación de neuronas inducidas químicamente que expresan marcadores neuronales canónicos y que adoptan morfología neuronal. En particular:

- Tanto los MEF como los fibroblastos dermales son poblaciones iniciales adecuadas para la reprogramación directa.
- El protocolo de inducción neuronal basado en Li (2015) fue replicado exitosamente. Siguiendo esta estrategia experimental fibroblastos murinos fueron reprogramados a neuronas químicamente inducidas.
- Las neuronas inducidas presentan morfología neuronal y expresan proteínas características del citoesqueleto neuronal, ampliamente utilizadas como marcadores neuronales canónicos.
- Las neuronas inducidas no expresan proteínas sinápticas ni presentan compartimentalización subcelular de proteínas del citoesqueleto, sugiriendo que a los tiempos analizados se encuentran en un estado similar al de neuronas no maduras.
- La concentración de I-BET151 juega un rol importante en el proceso de reprogramación y es necesario identificar un equilibrio entre su efecto citotóxico y la eficiencia de la inducción.
- Los MEF son más susceptibles a la inducción neuronal con el cóctel de fármacos FICSB que los fibroblastos dermales.

Bibliografía:

- Ambasudhan, Rajesh et al. 2011. "Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions". *Cell Stem Cell* 9(2): 113–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.002>.
- Babos, Kimberley, y Justin K. Ichida. 2015. "Small Molecules Take a Big Step by Converting Fibroblasts into Neurons". *Cell Stem Cell* 17(2): 127–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.018>.
- Blasi, Antonella et al. 2011. "Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential". *Vascular Cell* 3(1): 5. <http://www.vascularcell.com/content/3/1/5>.
- Bodaleo, Felipe J. et al. 2016. "Microtubule-associated protein 1B (MAP1B)-deficient neurons show structural presynaptic deficiencies in vitro and altered presynaptic physiology". *Scientific Reports* 6(June): 1–15.
- Boyne, Lesley J., Itzhak Fischer, y Thomas B. Shea. 1996. "Role of vimentin in early stages of neurogenesis in cultured hippocampal neurons". *International Journal of Developmental Neuroscience* 14(6): 739–48.
- Bulavin, D. V. 1999. "Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation". *The EMBO Journal* 18(23): 6845–54. <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/18.23.6845>.
- Chen, F. G. et al. 2007. "Clonal analysis of nestin vimentin+ multipotent fibroblasts isolated from human dermis". *Journal of Cell Science* 120(16): 2875–83. <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.03478>.
- Cheng, Lin et al. 2014. "Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia". *Cell Research* 24(6): 665–79. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2014.32>.
- Dastagir, Khaled et al. 2014. "Murine Embryonic Fibroblast Cell Lines Differentiate into Three Mesenchymal Lineages to Different Extents: New Models to Investigate Differentiation Processes". *Cellular Reprogramming* 16(4): 241–52. <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/cell.2014.0005>.
- Davis, R. L., Weintraub, H., & Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51(6), 987–1000. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90585-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-X)
- Dehmelt, Leif, y Shelley Halpain. 2005. "The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins". *Genome Biology* 6(1): 1–10.
- Devaiah, Ballachanda N., y Dinah S. Singer. 2013. "Two faces of BRD4". *Transcription* 4(1): 13–17. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/trns.22542>.
- Driskell, Ryan R., y Fiona M. Watt. 2015. "Understanding fibroblast heterogeneity in the skin". *Trends in Cell Biology* 25(2): 92–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.001>.
- Drouin-Ouellet, Janelle et al. 2017. "Direct Neuronal Reprogramming for Disease Modeling Studies Using Patient-Derived Neurons: What Have We Learned?" *Frontiers in Neuroscience* 11(September). <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2017.00530/full>.
- Gosain, Ankush, y Luisa A. DiPietro. 2004. "Aging and Wound Healing". *World Journal of Surgery* 28(3): 321–26.
- Graf, Thomas, y Tariq Enver. 2009. "Forcing cells to change lineages". *Nature* 462(7273):

587–94. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08533>.

- Gurdon, J. B., T. R. Elsdale, y M. Fischberg. 1958. "Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei". *Nature* 182(4627): 64–65.
- Haniffa, Muzlifah A., Matthew P. Collin, Christopher D. Buckley, y Francesco Dazzi. 2009. "Mesenchymal stem cells: The fibroblasts' new clothes?" *Haematologica* 94(2): 258–63.
- Hanna, Jacob H., Krishanu Saha, y Rudolf Jaenisch. 2010. "Pluripotency and cellular reprogramming: Facts, hypotheses, unresolved issues". *Cell* 143(4): 508–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.008>.
- Horvath, Steve. 2013. "DNA methylation age of human tissues and cell types". *Genome Biology* 14(10).
- Hou, Pingping et al. 2013. "Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds". *Science* 341(6146): 651–54.
- Hu, Kejin. 2014. "All Roads Lead to Induced Pluripotent Stem Cells : The Technologies of iPSC Generation". 23(12).
- Hu, Wenxiang et al. 2015. "Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules". *Cell Stem Cell* 17(2): 204–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.006>.
- Huh, Christine J. et al. 2016. "Maintenance of age in human neurons generated by microRNA-based neuronal conversion of fibroblasts". *eLife* 5(September2016): 1–14.
- Jiang, Houbo et al. 2015. "Cell cycle and p53 gate the direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons". *Nature Communications* 6: 1–14. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10100>.
- Kaech, Stefanie, y Gary Banker. 2006. "Culturing hippocampal neurons". *Nature Protocols* 1(5): 2406–15.
- Kennedy, Brian K. et al. 2014. "Geroscience: Linking aging to chronic disease". *Cell* 159(4): 709–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.039>.
- Kim, Yong Jun et al. 2014. "Generation of multipotent induced neural crest by direct reprogramming of human postnatal fibroblasts with a single transcription factor". *Cell Stem Cell* 15(4): 497–506.
- Kotton, Darrell N., Gustavo Mostoslavsky, y George J. Murphy. 2010. "Human dermal fibroblast isolation". *Center for regenerative medicine*: 10569.
- Ladewig, Julia et al. 2012. "Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts". *Nature Methods* 9(6): 575–78.
- Lapasset, Laure et al. 2011. "Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state". *Genes and Development* 25(21): 2248–53.
- Larcher, Jean-christophe, Dominique Boucher, Sylvie Lazereg, y Philippe Denoulet. 1996. "Interaction of Kinesin Motor Domains with alpha- and beta-Tubulin Subunits at a Tau-independent Binding Site". *Journal of Biological Chemistry* 271(36): 22117–24.
- Levin, Eli C. et al. 2009. "Neuronal expression of vimentin in the Alzheimer's disease brain may be part of a generalized dendritic damage-response mechanism". *Brain Research* 1298: 194–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.08.072>.
- Li, Xiang et al. 2015. "Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons". *Cell Stem Cell* 17(2): 195–203.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.003>.

- Liu, Meng Lu et al. 2013. "Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons". *Nature Communications* 4(May): 1–10. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3183>.
- López-Otín, Carlos et al. 2013. "The hallmarks of aging". *Cell* 153(6).
- Mertens, Jerome et al. 2015. "Directly Reprogrammed Human Neurons Retain Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects". *Cell Stem Cell* 17(6): 705–18.
- Mertens, Jerome, Maria C. Marchetto, Cedric Bardy, y Fred H. Gage. 2016. "Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience". *Nature Reviews Neuroscience* 17(7): 424–37. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2016.46>.
- Neuhuber, Birgit et al. 2004. "Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: Disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype". *Journal of Neuroscience Research* 77(2): 192–204.
- Nguyen, Ha Nam et al. 2011. "LRRK2 mutant iPSC-derived da neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress". *Cell Stem Cell* 8(3): 267–80.
- Pang, Zhiping P. et al. 2011. "Induction of human neuronal cells by defined transcription factors". *Nature* 476(7359): 220–23.
- Patterson, Michaela et al. 2012. "Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny". *Cell Research* 22(1): 178–93. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.133>.
- Pfisterer, U. et al. 2011. "Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(25): 10343–48. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1105135108>.
- Sala, Carlo et al. 2001. "Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer". *Neuron* 31(1): 115–30.
- Shao, Zhicheng et al. 2016. "Reprogramming by De-bookmarking the Somatic Transcriptional Program through Targeting of BET Bromodomains". *Cell Reports* 16(12): 3138–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.060>.
- Silva, Jose, y Austin Smith. 2008. "Capturing Pluripotency". *Cell* 132(4): 532–36.
- Singhal, Prabhat K. et al. 2016. "Mouse embryonic fibroblasts exhibit extensive developmental and phenotypic diversity". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(1): 122–27. <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1522401112>.
- Son, Esther Y. et al. 2011. "Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons". *Cell Stem Cell* 9(3): 205–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.014>.
- Soroka, Yoram et al. 2008. "Aged keratinocyte phenotyping: Morphology, biochemical markers and effects of Dead Sea minerals". *Experimental Gerontology* 43(10): 947–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2008.08.003>.
- Sorrell, J. M. 2004. "Fibroblast heterogeneity: more than skin deep". *Journal of Cell Science* 117(5): 667–75. <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.01005>.
- Sullivan, K F, y D W Cleveland. 1986. "Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83(12): 4327–31. <http://www.pnas.org/content/83/12/4327.abstract>.

- Takahashi, Kazutoshi, y Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors". *Cell* 126(4): 663–76.
- Tang, Yu, Meng-Lu Liu, Tong Zang, y Chun-Li Zhang. 2017. "Direct Reprogramming Rather than iPSC-Based Reprogramming Maintains Aging Hallmarks in Human Motor Neurons". *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10(November): 1–13. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00359/full>.
- Tao, Yunlong, y Su Chun Zhang. 2016. "Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells". *Cell Stem Cell* 19(5): 573–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.10.015>.
- Taylor, S. M., & Jones, P. A. (1979). Multiple new phenotypes induced in 10T 1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*, 17(4), 771–779. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90317-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90317-9)
- Tigges, Julia et al. 2014. "The hallmarks of fibroblast ageing". *Mechanisms of Ageing and Development* 138(1): 26–44.
- Treutlein, Barbara et al. 2016. "Dissecting direct reprogramming from fibroblast to neuron using single-cell RNA-seq". *Nature* 534(7607): 391–95. <http://dx.doi.org/10.1038/nature18323>.
- Vangipuram, Malini et al. 2013. "Skin Punch Biopsy Explant Culture for Derivation of Primary Human Fibroblasts". (July): 9–11.
- Vierbuchen, Thomas et al. 2010. "Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors". *Nature* 463(7284): 1035–41.
- Vierbuchen, Thomas, y Marius Wernig. 2011. "Direct lineage conversions: Unnatural but useful?" *Nature Biotechnology* 29(10): 892–907.
- Vierbuchen, Thomas, y Wernig, Marius. 2012. "Molecular Roadblocks for Cellular Reprogramming". *Molecular Cell* 47(6): 827–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.008>.
- Wapinski, Orly L. et al. 2013. "Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons". *Cell* 155(3): 621–35.
- Xie, Xin, Yanbin Fu, y Jian Liu. 2017. "Chemical reprogramming and transdifferentiation". *Current Opinion in Genetics and Development* 46(M): 104–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2017.07.003>.
- Xu, Jianming. 2005. "Preparation, Culture, and Immortalization of Mouse Embryonic Fibroblasts". *Current Protocols in Molecular Biology*: 1–8. <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142727.mb2801s70>.
- Xu, Yue, Yan Shi, y Sheng Ding. 2008. "A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine". *Nature* 453(7193): 338–44.
- Xue, Yuanhao et al. 2013. "Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated MicroRNA circuits". *Cell* 152(1–2): 82–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.045>.
- Yoo, Andrew S. et al. 2011. "MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons". *Nature* 476(7359): 228–31.
- Yu, Chen, Kai Liu, Shibing Tang, y Sheng Ding. 2014. "Chemical approaches to cell reprogramming". *Current Opinion in Genetics and Development* 28: 50–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2014.09.006>.

Yusuf, Batul et al. 2013. "Embryonic fibroblasts represent a connecting link between mesenchymal and embryonic stem cells". *Development Growth and Differentiation* 55(3): 330–40.

Zhang, Ling et al. 2016. "p53 mediates colistin-induced autophagy and apoptosis in PC-12 cells". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(9): 5294–5301.

Zhang, Yingsha et al. 2013. "Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells". *Neuron* 78(5): 785–98.

Zhou, Di et al. 2014. "Conversion of Fibroblasts to Neural Cells by p53 Depletion". *Cell Reports* 9(6): 2034–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.040>.

Zhu, Saiyong et al. 2014. "Small molecules enable OCT4-mediated direct reprogramming into expandable human neural stem cells". *Cell Research* 24(1): 126–29.

|