



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Estudio de la expresión y modulación de los reguladores del ciclo celular y microARNs en la auto-renovación y diferenciación neuronal de células madre pluripotentes humanas

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de

Buenos Aires en el área de Química Biológica

María Soledad Rodríguez Varela

Director de tesis: Dr. Leonardo Romorini

Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Investigación Aplicada a Neurociencias (LIAN) – FLENI - Conicet

Buenos Aires, 2022

Resumen

Estudio de la expresión y modulación de los reguladores del ciclo celular y microARNs en la auto-renovación y diferenciación neuronal de células madre pluripotentes humanas

Las células madre pluripotentes humanas (CMPhs) consisten en las células madre embrionarias humanas (CMEhs) y las células madre pluripotentes inducidas humanas (CMPihs). Las mismas ofrecen oportunidades extraordinarias para varios aspectos de la salud humana dadas su capacidad de auto-renovación (habilidad de dividirse casi ilimitadamente sin perder sus propiedades) y pluripotencia (habilidad de diferenciarse y dar origen a todos los tipos celulares de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo).

El programa genético que controla el mantenimiento de las propiedades de las CMPhs está estrictamente ligado a la regulación del ciclo celular. Si bien estas células exhiben las cuatro fases canónicas del ciclo celular (G1, S, G2 y M), presentan una regulación muy peculiar del mismo, con un tiempo de duplicación corto debido a una fase G1 abreviada. Entre los reguladores maestros del ciclo celular encontramos a las ciclinas y los factores de transcripción E2F (E2Fs), involucrados en la progresión del ciclo celular.

Los microARNs (miRNAs) son moléculas de ARN no codificantes de aproximadamente 18-24 nucleótidos que regulan la expresión génica a un nivel post-transcripcional. Numerosos estudios han demostrado que los miRNAs desempeñan roles críticos en el mantenimiento de la auto-renovación y la diferenciación de las CMPhs, para lo que la regulación del ciclo celular resulta esencial.

Una gran fracción de los miRNAs conocidos se expresa en el cerebro humano y, por lo tanto, están emergiendo como fuertes mediadores del desarrollo neuronal, desde la inducción neuronal de progenitores neurales hasta la expansión, diferenciación y especificación de subtipos neuronales.

Es sabido que la duración de la fase G1 contribuye a la determinación del destino celular de las CMPhs, dado que en este momento las células son receptivas a las señales de diferenciación. En este proceso, las ciclinas y los factores de transcripción E2F son esenciales. Además, numerosos miRNAs presentan transcriptos blanco que, directa o indirectamente, coordinan el ciclo celular y diferenciación de las CMPhs. En este sentido, el objetivo de esta tesis consistió en analizar tanto la expresión y regulación de los complejos que operan en la fase G1 del ciclo celular a lo largo de la diferenciación de las CMPhs a neuroprogenitores; como también dilucidar la participación de los miRNAs tanto en la regulación del ciclo celular, en particular aquellos regulados por los factores de transcripción E2F, como en el proceso de diferenciación celular a neuronas.

Previamente determinamos el perfil de expresión temporal de las principales ciclinas y E2F en CMEhs H9 y en progenitores neurales derivados a partir de las mismas. En el presente trabajo, pudimos profundizar dicho estudio centrándonos en el análisis de la expresión de la *CICLINA E1*. Mediante la sincronización de cultivos celulares, determinamos que los niveles de expresión del ARNm y proteína de

la *CICLINA E1* aumentan en la fase G1 tardía tanto en las CMPhs como en los progenitores neurales. Además, demostramos que los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* en CMPhs se hallan regulados por la activación de la vía de MEK/ERK y los factores de transcripción c-MYC y E2F. Asimismo, observamos una marcada disminución (degradación) de los niveles proteicos de la *CICLINA E1* en G2/M y determinamos que la misma está mediada por el proteosoma por un mecanismo que requiere de una CDK2 funcional pero no de la actividad de GSK3 β .

Con estos cultivos sincrónicos también pudimos demostrar cómo son expresados temporalmente los miR-145, miR-296 y la familia del miR-302 a lo largo del ciclo celular de las CMPhs. Los miR-145 y miR-296 son miRNAs que se inducen durante la diferenciación y silencian el programa de auto-renovación y pluripotencia. La familia del miR-302 es esencial para la pluripotencia de las CMPhs y su expresión disminuye durante la diferenciación. En particular, determinamos que la expresión de la familia miR-302 se induce en la transición G1/S y alcanza su punto máximo en las fases S-tardía y G2/M-temprana, posiblemente para impedir el comienzo de la diferenciación. Además, por medio de un análisis de ontología génica confirmamos que muchos de los genes blanco de la familia del miR-302 están involucrados en la regulación del ciclo celular.

A su vez, derivamos y caracterizamos progenitores neurales a partir de las CMPhs y neuronas diferenciadas a partir de estos progenitores neurales. Luego, por medio de una secuenciación masiva de pequeños ARNs determinamos el miRNoma de estas poblaciones celulares como así también el que caracteriza a CMPhs tratadas con un inhibidor general de los E2Fs (inhibidor pan-E2F) en comparación con CMPhs control.

En ambas caracterizaciones estudiamos los miRNAs expresados diferencialmente y luego validamos algunos candidatos. Por un lado, pudimos concluir que los niveles de expresión de los miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-4454, miR-1260a, miR-1260b, miR-454-3p y miR-301a-3p estarían regulados por los E2Fs canónicos. Por el otro, al analizar los miRNAs expresados diferencialmente durante la diferenciación neuronal, centramos nuestra atención en el clúster de los miR-216/217, el cual se expresa exclusivamente en los progenitores neurales y neuronas, y su expresión no es detectable en las CMPhs. Además, al analizar datos bioinformáticos publicados de diferenciaciones a mesodermo y endodermo, no encontramos una inducción en los niveles de expresión de los miRNAs de este clúster en éstas diferenciaciones específicas de linaje. Asimismo, modulamos la expresión del miR-217-5p (uno de los miembros del cluster) mediante ensayos con moléculas exógenas (mimic/inhibitors). Encontramos que la sobre-expresión del miR-217-5p en CMPhs aumentó el porcentaje de células en la fase G1 del ciclo celular. En contraste, no observamos diferencias en el perfil del ciclo celular en los progenitores neurales tratados tanto con las moléculas exógenas que inhiben como con las que sobre-expresan al miR-217-5p. Además, encontramos por un lado una disminución significativa en la expresión del transcripto del marcador de pluripotencia *OCT-4* y del gen blanco candidato del miR-217-5p: *GRIA3*; y por el otro una disminución significativa en los genes blanco candidatos del miR-217-5p: *WEE1*, *SIRT1* y *CICLINA D1* en las CMEhs y CMPihs respectivamente, que sobre-expresan este miRNA en relación al control en cada línea celular. Consideramos que sería interesante profundizar este estudio, en especial determinar si esta modulación

en la expresión de los transcriptos ocurre a nivel proteico, y si la misma se asocia al cambio en el perfil del ciclo celular que observamos en las CMPhs que sobre-expresan el miR-217-5p.

Creemos que los resultados de este trabajo pueden contribuir al entendimiento de los procesos moleculares que regulan tanto al ciclo celular como la diferenciación neuronal de CMPhs. Además, el identificar la relevancia biológica de los factores reguladores del ciclo celular de las CMPhs, como así también de cierto microARNs involucrados en la diferenciación neuronal de éstas células permitirá diseñar estrategias para obtener una población celular dotada de una alta capacidad proliferativa inicial y de un total compromiso hacia el linaje específico, plausibles de emplear en un futuro en terapias de reemplazo.

Palabras claves: *CICLINA E1*, ciclo celular, factores de transcripción E2F, células madre pluripotentes humanas, progenitores neurales, diferenciación neuronal, microARNs, miR-302, miR-145, miR-296, clúster miR-216/217.

Abstract

Study of cell cycle regulators and microRNAs expression and modulation in human pluripotent stem cells self-renewal and neuronal differentiation

Human pluripotent stem cells (hPSCs) consist of human embryonic stem cells (hESCs) and induced pluripotent stem cells (hiPSCs). These cells offer extraordinary opportunities for several aspects of human health given its capacity of self-renewal (ability to divide almost unlimitedly without losing their properties) and pluripotency (ability to differentiate and give rise to all types of cells derived from the three germ layers; endoderm, mesoderm and ectoderm).

The genetic program that controls the maintenance of the hPSCs properties is strictly linked to the cell cycle regulation. Although these cells exhibit the four-cell cycle canonic phases (G1, S, G2 and M), they have a peculiar regulation, such as a short doubling time due to an abbreviated G1 phase. Between the cell cycle master regulators, we can find cyclins and the E2F transcription factors (E2Fs).

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs molecules of 18-24 nucleotides that regulate gene expression at a post-transcriptional level. Several studies have shown that miRNAs play key roles in hPSCs self-renewal and pluripotency for what cell cycle regulation is essential.

A large fraction of the known miRNAs are expressed in the human brain and are therefore emerging as strong mediators throughout neural development from neural induction to neural progenitor's expansion, differentiation and neuronal subtype specification.

It is known that G1 phase duration contributes to hPSCs fate determination, as in this moment cells are receptive to differentiation cues. In this process, cyclins and E2F transcription factors are essential. Besides, numerous miRNAs target transcripts that directly or indirectly coordinate hPSCs cell cycle and differentiation. In this sense, the objective of this thesis consisted in analyzing both the expression and regulation of the complexes that operate in the G1 phase of the cell cycle throughout the differentiation of hPSCs to neuroprogenitors; as well as elucidating the participation of miRNAs both in the regulation of the cell cycle, in particular those regulated by the E2F transcription factors, and in the process of cell differentiation into neurons.

Previously, we demonstrated the temporal expression pattern of the major cyclins and E2Fs in H9 hESCs and neural progenitors derived from these cells. In the present work we deepen this study focusing on *CYCLIN E1* analysis. By generating synchronized cultures, we determined that *CYCLIN E1* mRNA and protein expression levels increased in late G1 phase in both hPSCs and neural progenitors. Additionally, we demonstrated that *CYCLIN E1* mRNA expression levels involve the activation of MEK/ERK pathway and the transcription factors c-MYC and E2Fs in hPSCs. In addition, we observed a marked down-regulation (degradation) of *CYCLIN E1* protein in G2/M and determined that it is mediated by the proteasome by a mechanism that requires a functional CDK2 but not GSK3 β activity.

Furthermore, with these synchronized cultures, we could demonstrate how miR-145, miR-296 and miR-302 family are temporally expressed along hPSCs cell cycle. miR-145 and miR-296 are miRNAs that are induced during differentiation and silence the self-renewal and pluripotency program. miR-302 family is essential for hPSCs stemness and its expression decreases during differentiation. Particularly, we determined that miR-302 family expression is induced at G1/S transitions and peaked at late S-early G2/M phases, presumably to impede differentiation onset. Besides, we confirmed by a gene ontology analysis that many validated miR-302 family target genes are involved in cell cycle regulation.

Also, we derived and characterize neural progenitors from hPSCs, and differentiated neurons from these neural progenitors. Next, through massive sequencing of small RNAs we determined the miRNoma of these cell population as well as the one that characterize hPSCs treated with a E2Fs general inhibitor (pan-E2F inhibitor) in comparison with control hPSCs.

In both characterizations, we studied the differentially expressed miRNAs and then validated some candidates. On the one hand, we could conclude that canonical E2Fs would regulate miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-4454, miR-1260a, miR-1260b, miR-454-3p and miR-301a-3p expression levels. On the other, when we analyze the miRNAs differentially expressed during neuronal differentiation, we focused our attention to the miR-216/217 cluster, which was highly expressed in neural progenitors and neurons, without measurable expression levels in hPSCs. Furthermore, when we analyzed published bioinformatics data of mesoderm and endoderm differentiations, we did not find an induction in the expression levels of this miRNA cluster among these lineage specific differentiations. In addition, we modulate the expression levels of miR-217-5p (one of the cluster members) in hPSCs and neural progenitors using exogenous molecules (mimic/inhibitors). We found that over-expression of miR-217-5p in hPSCs increased the percentage of cells residing in the G1 phase of the cell cycle. In contrast, we did not observe differences in the cell cycle profile in neural progenitors treated with either the exogenous molecules that inhibit or overexpress miR-217-5p. In addition, we found, on one hand, a significant decrease in the expression of the pluripotent marker transcript *OCT-4* and the miR-217-5p candidate target gene *GRIA3*; and on the other, a significant decrease in the miR-217 candidate target genes: *WEE1*, *SIRT1* and *CYCLIN D1* in hESCs and hiPSCs treated with the miR-217-5p mimic, respectively, versus each cell line control.

We consider that it would be interesting to deepen this study, especially to determine if this modulation in the mentioned transcripts expression occurs at the protein level, and if its associated to the observed change in the cell cycle profile in the hPSCs that overexpress the miR-217-5p.

We believe that the results of this work can contribute to the knowledge of the molecular processes that regulate both the cell cycle and neuronal differentiation of hPSCs. In addition, identifying the hPSCs cell cycle regulators biological relevance, as well as certain miRNAs involved in the neuronal differentiation of these cells, will allow to design strategies to obtain a cell population endowed with a high initial proliferative capacity and a total commitment towards the specific lineage, plausible to use in the future in replacement therapies.

Keywords: *CYCLIN E1*, cell cycle, E2F transcription factors, stem cells, human pluripotent stem cells, neural progenitors, neuronal differentiation, microRNAs, miR-302, miR-145, miR-296, miR-216/217 cluster.

Agradecimientos

Esta tesis fue el resultado de un largo proceso en el que me acompañaron muchas personas y a las cuales me gustaría agradecer.

En primer lugar quisiera agradecerle a mi director Leo, el cual me brindó esta oportunidad y me formó profesionalmente desde mi tesina de licenciatura, primero, hasta el doctorado después. Gracias por acompañarme y guiarme todos estos años, por estar siempre predispuesto a ayudarme y no solo apoyarme en mis decisiones, sino también bancarme en mis frustraciones, tratándome siempre de la mejor manera. Por darme confianza y libertad para aprender a tener un criterio científico. Considero que fuiste un gran director que hizo que este camino fuera mucho más sencillo.

A Marie, mi directora en Conicet, gracias por la buena predisposición, por estar siempre dispuesta a ayudar y aconsejar, además de siempre ofrecer palabras de aliento y buena onda.

A Gustavo, gracias por el apoyo de todos estos años desde que inicié en Fleni, donde siempre me sentí muy acompañada, y por darme la oportunidad de formarme todos estos años en el laboratorio.

Si hay algo que destaco, es el grupo con el que me crucé trabajando y que se convirtió en mi familia. Agradezco a todas las chicas del grupo neuro, Sofi, Luli, Marie y Kira, quienes me ayudaron siempre que lo necesité, además de las charlas de catarsis y crisis existenciales compartidas.

Quiero mencionar a Gabi y Xime quienes en los primeros años, y Ari después, me recibieron de la mejor manera, y con quienes terminé compartiendo horas de viajes, charlas y muchas salidas. Gracias por su incondicionalidad y su amistad, realmente son de oro y de lo más lindo que tuve durante estos años. La última parte del doctorado tuve la suerte de hacerme de un grupo de amigas increíbles: Anto, Celes, Guada, Mike y Caro, gracias por hacer de la ida a trabajar cada día sea algo lindo, por tener siempre palabras de aliento y oídos dispuestos a escuchar y aconsejar. Anto, que decirte, te transformaste en mi hermana del alma. Es increíble todo lo que compartimos estos años adentro y fuera del laboratorio, y lo incondicional y buena que sos. Te voy a extrañar tanto. Celes, sin vos y nuestras juntadas de escritura creo que no habría podido enfrentar esto. Gracias por la compañía, las charlas, y el aliento todo este último tiempo. Me encantó poder compartir este proceso juntas y el grupo de catarsis doctoral fue un salvavidas en esos momentos que estábamos muy cansadas.

Agradezco a todo el resto del grupo también, porque realmente siempre me sentí muy contenida. En cada mate compartido, after, o charla compartida. Dari, Lu, Charly, Willy, Ale, Agus, Alan, Oli, Fede, Cami, Marian, Joaco, Shei, Nel, y perdonen si me olvido de alguien, sepan que son un grupo humano increíble.

Quisiera agradecerle a mi Tutor, Juan Carlos Calvo, que siempre fue muy atento y cálido conmigo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que me permitió cruzarme con grandes profesionales y por ser mi hogar durante toda mi carrera.

A toda la gente que conocí en la UCSF y en San Francisco, experiencia que me permitió abrir la cabeza. Al Dr. Blelloch que me recibió en su laboratorio y a The Company of Biologist y FLENI que me financiaron la pasantía.

A mi grupo de amigas, que son mis pilares en todo. Sepan que son de las mujeres que más admiro, las 18, cada cual a su manera. Si bien nos desparramamos por el mundo, los años compartidos en capital fueron de los más lindos que viví y las juntadas que generamos ahora me llenan de energía. Gracias por estar en todo, apoyarme y acompañarme durante todos estos años por más que no entiendan en que trabajo. Las quiero infinito y su amistad es de lo más valioso que tengo.

Entre ellas le agradezco a Anto, quien vivió conmigo el último tramo de este proyecto y me aguantó en todos mis momentos, sos la mejor roomie que pude haber tenido y nuestra convivencia fueron los años más divertidos; y a Juli, mi fiel compañera de capital, que estuvo durante todo el trayecto, tu compañía en capital fue esencial. Las extraño todos los días, son de mis personas preferidas.

A mis amigxs de toda la vida desde que tengo uso de razón. Por habernos encontrados de chicos y haber mantenido esta amistad después de todos estos años.

A mis amigas de la facu, que si bien no nos vemos tan seguido, el tiempo parece no pasar cuando nos reencontramos. En especial a Liz, que me hace reír como nadie.

A mis papas. Gracias por su incondicionalidad. Por sostenerme en mis momentos de estrés, y siempre tener palabras de aliento y cariño. Por apoyarme y acompañarme en todos mis proyectos. Son un gran ejemplo para mí, y sé que soy muy afortunada en tener padres como ustedes que me enseñaron valores que hoy en día me son fundamentales.

A mis hermanxs y cuñadxs, que siempre me cuidaron. Es difícil decir con palabras todo lo que son para mí. Gracias por estar siempre y de manera tan incondicional. Los quiero muchísimo.

A mis sobrinos que son de lo más lindo que tengo y disfruto.

Por último, quisiera agradecerla a las instituciones que aportaron los fondos para este trabajo: Conicet y FLENI.

A Flor, que siempre está conmigo

Publicaciones

Los contenidos presentes en este trabajo de tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

- Rodríguez Varela MS, Mucci S, Videla Richardson GA, Morris Hanon O, Furmento VA, Miriuka SG, Sevlever GE, Scassa ME, Romorini L. Regulation of cyclin E1 expression in human pluripotent stem cells and derived neural progeny. *Cell Cycle*. 2018;17(14):1721-1744. doi: 10.1080/15384101.2018.1496740. Epub 2018 Aug 10. PMID: 29995582; PMCID: PMC6133309.
- Rodríguez-Varela MS, Mucci S, Videla-Richardson GA, Isaja L, Sevlever GE, Scassa ME, Romorini L. miR-302 family, miR-145 and miR-296 temporal expression profile along the cell cycle of human pluripotent stem cells. *Gene Expr Patterns*. 2021 Jun;40:119168. doi: 10.1016/j.gep.2021.119168. Epub 2021 Jan 24. PMID: 33503507.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
AGRADECIMIENTOS.....	7
PUBLICACIONES	10
ABREVIATURAS	16
INTRODUCCIÓN	18
Células madre humanas: Definición y características	18
Diferenciación celular	21
Desarrollo embrionario del sistema nervioso central	22
Células madre neurales.....	23
Diferenciación <i>in vitro</i> al linaje neural.....	25
Sistema en neuroesferas	26
Sistema en monocapa.....	26
Diferenciación <i>in vitro</i> a neuronas	27
Organoides Cerebrales	29
Ciclo celular	29
Modelo clásico del ciclo celular en células somáticas.....	30
Ciclo celular en CMP.....	32
Factores de transcripción E2Fs.....	40
Ciclo celular y neurogénesis.....	45
Pequeños ARNs: los microARNs como reguladores de la expresión génica	45
Regulación de la biogénesis de los miRNAs	47
Los miRNAs y la regulación de la expresión génica.....	50
Nomenclatura y clasificación de los miRNAs	52

Análisis de los genes target: predicciones bioinformáticas y enfoques experimentales..	54
miRNAs en los procesos de pluripotencia y diferenciación	55
miRNAs y neurogénesis.....	57
miRNAs y el ciclo celular	60
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	62
MATERIALES Y MÉTODOS	64
Líneas celulares	64
Diferenciación de CMPhs mediante la formación de cuerpos embrioides.....	64
Diferenciación de CMEhs a progenitores neurales (PN)	65
Propagación y criopreservación de PN	66
Diferenciación de PN a neuronas	66
Diferenciación de CMPhs a células madres neurales (CMN).....	67
Diferenciación de CMN a Neuronas.....	67
Diferenciación de CMN a Astroцитos.....	67
Diferenciación de CMN a Oligodendrocitos.....	68
Cultivo y criopreservación de FH	68
Cultivo y criopreservación de CMPhs con medios comerciales definidos	69
Cultivo y criopreservación de CMN.....	69
Extracción de ADN genómico	70
Detección de contaminación con <i>Mycoplasma sp.</i>	70
Extracción de ARN total.....	71
Extracción de ARN total para secuenciación de nueva generación (NGS)	71
Retrotranscripción de microARNs maduros	72
Retrotranscripción de ARNm	73

Diseño de primers para analizar los ARNm	73
Diseño de primers para analizar los microARNs maduros	75
PCR a punto final.....	77
PCR en tiempo real.....	77
Inmunomarcaciones y microscopía de fluorescencia	78
Análisis de proteínas.....	80
Preparación de extractos proteicos y Western Blot	80
Inhibidores utilizados.....	82
Ensayo de ciclo celular con ioduro de propidio (IP).....	82
Análisis del marcador de indiferenciación OCT-4 por citometría de flujo	83
Ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina	83
Ensayo de viabilidad celular: azul de Tripán	84
Ensayo de viabilidad celular: XTT/PMS.....	84
Transfección con pequeñas moléculas comerciales de ARN (<i>mimics/inhibitors</i>)	84
Secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq)	85
Análisis de secuenciación masiva de pequeños ARNs.....	85
Análisis estadístico.....	86
RESULTADOS	87
CAPÍTULO 1.....	87
1.1 Modelo de CMPhs y PN.....	87
1.2 Análisis de los niveles de expresión de factores reguladores del ciclo celular en CMPhs y en su progenie neural	94
1.3 Análisis del perfil de expresión temporal de la familia del miR-302, el miR-145 y el miR-296 en el ciclo celular de CMPhs.....	121
Conclusiones parciales del capítulo	129

CAPÍTULO 2.....	132
1.1 Modelo de CMN y Neuronas a partir de CMPhs.....	132
1.1.1 Generación y validación de CMN	132
1.2 Secuenciación masiva de ARNs pequeños en CMPhs tratadas con un pan-iE2F y en su diferenciación neuronal.....	148
1.2.1 Secuenciación masiva de ARN pequeños en CMPhs tratadas con un pan-iE2F	149
1.2.2 Secuenciación masiva de ARN pequeños en CMPhs, CMN generadas a partir de las mismas y neuronas diferenciadas a partir de estas CMN	166
CONCLUSIONES PARCIALES DEL CAPÍTULO.....	180
CAPÍTULO 3.....	183
1.1 Validación experimental de la expresión del clúster miR-216/217 en la diferenciación neuronal	184
1.2 Análisis <i>in silico</i> del clúster miR-216/217.....	187
1.2.1 Expresión del clúster miR-216/217 en otras especies, células pluripotentes y diferenciaciones a otros linajes.....	187
1.2.2 Análisis <i>in silico</i> de los genes <i>target</i> del clúster miR-216/217.....	190
1.2.3 Análisis <i>in silico</i> de genes expresados diferencialmente en diferenciaciones neuronales a partir de CMPhs.....	192
1.3 Análisis experimental de la expresión de los genes <i>blanco</i> candidatos del clúster miR- 216/217	201
1.4 Modulación de la expresión del miR-217-5p en CMPhs y en CMN.....	204
1.4.1 Análisis de la sobre-expresión/inhibición del miR-217-5p en CMN	204
1.4.2 Análisis de la sobre-expresión del miR-217-5p en CMPhs.....	207
Conclusiones Parciales del capítulo.....	212
DISCUSIÓN	214
Perfil de expresión de los factores reguladores del ciclo celular en CMPhs y en su progenie neural	214
Regulación de la <i>CICLINA E1</i> en CMPhs y en su progenie neural.....	218

Perfil de expresión temporal de la familia del miR-302, el miR-145 y el miR-296 en el ciclo celular de CMPhs	221
Generación de CMN y diferenciación neuronal a partir de las mismas	223
Identificación del miRNoma en CMPhs tratadas con un inhibidor general de los factores de transcripción E2Fs	225
Identificación del miRNoma en la diferenciación neuronal y generación de CMN a partir de CMPhs	228
Estudio del clúster miR-216/217 en la diferenciación neuronal a partir de CMPhs	231
CONCLUSIONES	243
BIBLIOGRAFÍA	246

Abreviaturas

AGO: Argonauta

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

b-FGF: *basic fibroblast growth factor*

BMP: Bone morphogenetic protein

CMEhs: Células Madre Embrionarias humanas

CMPhs: Células Madre Pluripotentes humanas

CMPIhs: Células Madre Pluripotentes Inducidas humanas

CME_m: Célula madre embrionaria murina

CMN: Células Madre Neurales

CDKs: Ciclins Dependent Kinases

EpiSC: Epiblast Stem Cells

EB: Embryoid bodies

EGF: epidermal growth factor

FUCCI: Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator

GDNF: Glial cell-derived neurotrophic factor

G1: Gap 1

G2: Gap 2

GR: Glia radial

LIF: leukemia inhibitory factor

MCI: Macizo celular interno

MEFi: *mouse embryonic fibroblast irradiated*

M: Mitosis

ncRNAs: non-coding RNAs

NGF: Nerve Growth Factor

NT-3: Neurotrophin-3

PNEs: Progenitores neuroepiteliales

PB: Progenitores basales

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

Rb: retinoblastoma

RISC: RNA-induced silencing complex

SVZ: subventricular zone

Introducción

En los últimos años, la medicina regenerativa se ha establecido como una alternativa para la reparación de tejidos y órganos afectados por distintas enfermedades. En este campo se han producido avances muy vinculados con los nuevos conocimientos sobre la biología y las potencialidades de las denominadas células madre. Estas células pueden clasificarse según su potencial de diferenciación, encontrando dentro de esta clasificación a las células totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Las células totipotentes, como el cigoto, son aquellas células capaces de desarrollar tanto tejidos embrionarios como extraembrionarios. Las células pluripotentes, por su lado, son células con el potencial de dar origen a todos los tipos celulares de un individuo adulto. Por el contrario, las células multipotentes tienen la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares, estando los mismos relacionados con el tejido de origen. Este es el caso de las células hematopoyéticas, que dan origen a cualquier tipo de célula sanguínea. Finalmente, las células unipotentes, son aquellas células que pueden dar origen a un único tipo celular. Debido a su capacidad de auto-renovación y de dar origen a un amplio rango de diferentes tipos celulares, las células madre pluripotentes humanas (CMPhs) resultan atractivas como una potencial fuente de células diferenciadas para terapias de reemplazo, así también como modelo de estudio para entender el desarrollo.

En particular, combinar la tecnología de estas células con el avance reciente en edición génica y organoides (pequeñas estructuras en tres dimensiones que buscan simular el desarrollo de los órganos), hace que las plataformas basadas en las CMPhs resulten más prometedoras en cada una de las áreas en las que se aplican [1].

Células madre humanas: Definición y características

Las células madre se caracterizan por su capacidad de dar origen a una variedad de células especializadas mientras mantienen su capacidad de auto-renovación. La capacidad de desarrollo de los órganos durante la embriogénesis depende de estas células y, en el adulto, la pérdida celular frecuente es compensada por la actividad de células madre [2].

Luego de la fecundación, se forma el cigoto el cual se divide para dar origen a un embrión multicelular. El desarrollo embrionario temprano consiste en varias etapas. Luego de la fase de la mórula, dos poblaciones de células se diferencian: el macizo celular interno (MCI), y el trofoblasto (capa de células externas que darán origen a los tejidos extraembrionarios). Ambas poblaciones forman lo que se conoce como blastocisto (Figura 1). Una vez que se genera esta división, las células internas desarrollan un circuito de regulación estable en el cual los factores de transcripción OCT-3/4 (también conocido como POU5F1), SOX2 y NANOG promueven la pluripotencia de estas células [3]. Luego, se da el proceso de gastrulación en el cual las células pluripotentes del macizo celular interno dan origen a las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo); y la tasa de división celular disminuye

dramáticamente [4]. A partir de estas tres capas germinales, de su organización e interacción, se formarán los órganos. Esta fase se denomina organogénesis.

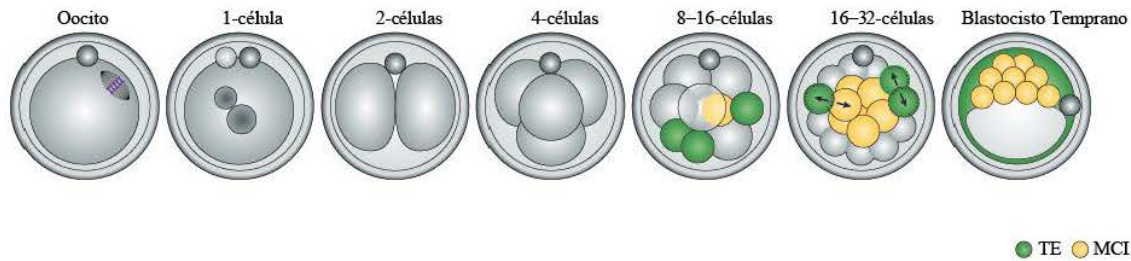


Figura 1. Fases del desarrollo pre-implantatorio En el desarrollo embrionario temprano, el cigoto se divide hasta dar origen al blastocisto. El mismo se divide en el macizo celular interno (MCI) y el trofoblasto o trofoectodermo (TE) (compuesto por la capa de células externas). Las células madre embrionarias que se cultivan *in vitro*, son derivadas del MCI del blastocisto pre-implantatorio. Figura adaptada de [3].

Las células madre embrionarias humanas (CMEhs) se derivan de la masa celular interna del blastocisto y pueden ser cultivadas *in vitro* indefinidamente manteniéndose pluripotentes. Las mismas tienen el potencial de formar derivados de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) *in vivo* al ser trasplantadas en ratones, o *in vitro* bajo condiciones de cultivo apropiadas [5, 6]. Estas células expresan los genes característicos del estado de pluripotencia incluyendo los factores de transcripción *OCT-3/4*, *SOX2* y *NANOG*.

Recientemente, el campo de las CMEhs se vio revolucionado por una nueva forma de obtención de células muy similares a las embrionarias, las células madre pluripotentes inducidas humanas (CMPihs) [7, 8]. Estas células se obtienen a partir de células somáticas adultas tales como fibroblastos, queratinocitos o linfocitos B, entre otras. Las células adultas pueden ser reprogramadas mediante la transducción *in vitro* de partículas virales portando genes que codifican factores de transcripción cruciales para el mantenimiento de la pluripotencia [9]. Los mismos consisten en una combinación de cuatro factores de transcripción (*OCT-3/4*, *KLF4*, *SOX2* y *c-MYC*) denominados los ‘factores de Yamanaka’ en honor a Shinya Yamanaka quien los identificó [10, 11] (Figura 2). Las CMPihs así generadas presentan expresión génica, proteica y modificaciones epigenéticas muy similares a las CMEhs, se diferencian a las tres capas germinales y forman teratomas cuando son implantadas en animales.

Las CMPihs presentan grandes ventajas, las mismas incluyen su origen humano, fácil acceso, expansión, habilidad para dar origen a casi todos los tipos celulares deseados, se evitan preocupaciones éticas asociadas a las CMEhs, y el potencial de desarrollar medicina personalizada utilizando CMPihs específicas de cada paciente [1].

Además, a partir del surgimiento de la tecnología de estas células, se ha logrado un enorme progreso en el campo de la biología de las células madre y su potencial uso en medicina regenerativa. Como ejemplo encontramos el inicio del primer estudio clínico utilizando células epiteliales pigmentarias retinales

derivadas de CMPihs para tratar la degeneración macular. El mismo se realizó en 2014 y fue llevado a cabo por el grupo de Masayo Takahashi [12].

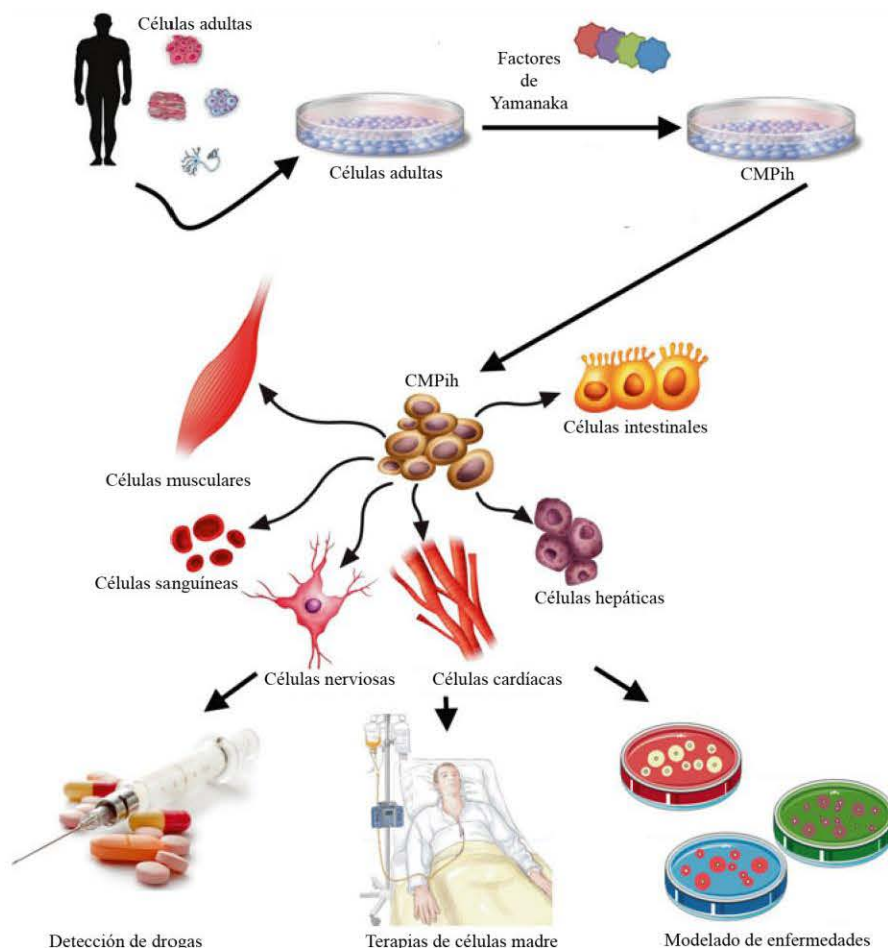


Figura 2. Células madre pluripotentes inducidas humanas Generación y posibles aplicaciones de las CMPihs. Figura adaptada de Stem Cells in Clinical Applications - Stem Cell Processing - New Trends in Clinical Applications of Induced Pluripotent Stem Cells.

Las CMPhs necesitan determinados requerimientos para el crecimiento y mantenimiento del estado indiferenciado. Inicialmente las mismas eran cultivadas en un medio suplementado con el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, del inglés, Basic Fibroblast Growth Factor) sobre una capa nutricia de fibroblastos murinos embrionarios mitóticamente inactivados (por ejemplo mediante irradiación gamma) (MEFi, del inglés irradiated mouse embryonic fibroblasts). La exposición de estas células a productos xenogénicos resultó una preocupación para su uso en aplicaciones clínicas humanas. Además, el uso de productos basados en animales como también en capas nutricias puede introducir variaciones entre lotes. Debido a esto, primero se migró al uso de sustratos definidos libres de componentes derivados de animales como matrigel o laminina junto con medios condicionados por las MEFi. El grupo de Xu *et al.* fue el primero en reportar el primer cultivo exitoso de CMEhs libres de una

capa nutricia. En dicho estudio las CMEhs fueron crecidas en platos con un tratamiento con diversos materiales biológicos activos como lo son la laminina, colágeno y matrigel; con un 100% de medio condicionado por MEFi suplementado con reemplazo de suero y factores de crecimiento como lo es el bFGF [13]. Con el avance de los años, se desarrollaron medios comerciales definidos químicamente que solo cuentan con los factores esenciales para el cultivo y mantenimiento de las CMPhs. La ventaja del uso de medios químicamente definidos es que elimina la influencia de componentes desconocidos del cocktail de factores de crecimiento.

Las células madre (embrionarias humanas o adultas) tienen un rol crítico durante el desarrollo embrionario y en mantener la homeostasis en los individuos adultos. Un mejor entendimiento de la biología de las mismas permitirá a la comunidad científica comprender mejor el desarrollo embrionario y la diferenciación celular, modelar enfermedades, utilizarlas para el descubrimiento de nuevas drogas y posibilitará diseñar nuevos enfoques para su potencial uso en medicina regenerativa.

Diferenciación celular

Como mencionamos previamente, las CMPhs tienen la capacidad de diferenciarse en cultivo a distintos tipos celulares. Durante los últimos 20 años, numerosos estudios se han dedicado a desarrollar las condiciones de cultivo y protocolos adecuados para la generación de un amplio espectro de linajes.

La capacidad de derivar múltiples linajes a partir de estas células abre diversos caminos para su potencial uso. Entre ellos, nuevas oportunidades para modelar el desarrollo embrionario *in vitro*, permitiendo el estudio de los eventos que regulan los estadios tempranos de la inducción y especificación a cada linaje [14]. También, el avance de las terapias regenerativas se ha concentrado en el estudio de éstas células, dado que las mismas podrían utilizarse tanto para una aplicación directa en los sitios dañados como también para ingeniería de tejidos.

La aplicación de las CMPhs en terapias celulares es considerada más ventajosa que el uso de células diferenciadas, dado que éstas células pueden ser obtenidas de manera más fácil y en mayores cantidades, presentan una capacidad proliferativa mayor y toleran un mayor número de pasajes en cultivo [15]. Sin embargo, su diferenciación previa al trasplante sería un paso crítico, dado que células indiferenciadas podrían causar la formación de teratomas *in vivo*. Esto dependería, entonces, de protocolos de diferenciación eficientes para derivar progenitores específicos del tejido deseado [16].

Para ello, un factor importante resulta la composición adecuada de los medios de cultivo celulares, en especial la presencia de factores de crecimiento específicos y otras biomoléculas [15]. De este modo, se puede controlar y restringir las vías de diferenciación hacia progenitores específicos. Además, son necesarias el desarrollo de condiciones adecuadas para promover una diferenciación homogénea [16].

Existen distintas estrategias para diferenciar las CMPhs *in vitro*. Uno de los primeros métodos fue el de cultivar las células en condiciones donde los factores que mantienen el estado de pluripotencia de las células fueron removidos. En esta condición, las CMPhs se diferencian espontáneamente en los derivados

de las tres capas germinales embrionarias, mediante la formación de cuerpos embrioides (EB, del inglés *Embryoid Bodies*) [16].

Se ha demostrado en numerosos estudios que éstos agregados (EB) recapitularían las fases del desarrollo embrionario temprano, por lo que este sistema de cultivo fue explotado para estudiar la diferenciación celular y el patrón de expresión de genes durante la embriogénesis temprana '*in vitro*' [17].

Además de éste método de diferenciación existen otros protocolos que se diferencian entre sí, no solo con los medios de cultivo específicos de acuerdo al tipo celular específico deseado, sino también en el sustrato sobre el cual se crecen las mismas. Encontramos aquellos donde las mismas son co-cultivadas con células estromales murinas; y otro donde las células son crecidas en adhesión sobre proteínas de la matriz extracelular.

Entre los linajes generados a partir de las CMPhs, se encuentra el neural. Las CMPhs, bajo condiciones apropiadas, pueden generar células neurales incluyendo neuronas funcionales, astrocitos y oligodendrocitos [18].

Los trabajos de Reubinoff *et. al* [19, 20] demostraron que las CMEhs pueden dar origen a progenitores neurales '*in vitro*', y que éstos progenitores pueden diferenciarse (también '*in vitro*') a neuronas maduras. En este tipo de diferenciación es en el que nos enfocaremos en el presente trabajo, y la cual describiremos brevemente a continuación.

Desarrollo embrionario del sistema nervioso central

El cerebro humano se origina a partir del ectodermo, y consiste en billones de células formando parte de numerosas estructuras funcionalmente interconectadas. Muchas de estas estructuras son mayores o distintas en comparación con otros mamíferos, en particular la corteza, la capa externa del cerebro humano responsable de la percepción y la cognición [21].

El desarrollo del cerebro humano es un largo proceso que se inicia en la tercera semana gestacional con la diferenciación de los progenitores neurales, y se extiende al menos hasta la adolescencia tardía, posiblemente a lo largo de toda la vida.

El período embrionario humano comienza en la concepción y se extiende hasta la semana gestacional ocho. Hacia el final de este período, las estructuras rudimentarias del cerebro y del sistema nervioso central se encuentran establecidas y los principales compartimientos de los sistemas nerviosos central y periférico son definidos.

Al final de la tercera semana, el embrión es transformado en una estructura de tres capas en el proceso que denominamos anteriormente como gastrulación. Dentro de las líneas de células madre que surgen durante la gastrulación se encuentran las células madre neurales (CMN). Estas células se denominan progenitores neurales dado que pueden dar origen a todos los tipos celulares que originan el sistema nervioso central [22].

Si bien la diferenciación de las líneas de células madre embrionarias hacia cada uno de los distintos linajes involucran complejas cascadas de vías de señalización, en el presente trabajo nos centraremos en la diferenciación de las CMN.

A partir del MCI, se diferencian el endodermo primitivo y el epiblasto. Las células del epiblasto dan origen a las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) y es este ectodermo el que eventualmente formara el epitelio, incluyendo el neuroepitelio (o neuroectodermo) [23].

Al inicio de la gastrulación, las células de la capa del epiblasto que se diferenciarán en los progenitores neurales se localizan en la línea rostro-caudal del embrión de dos capas. Esta región que contiene a los progenitores neurales se denomina plato neural. El mismo, al final de la tercera semana de gestación, comienza a plegarse para formar el tubo neural. El mismo es la primera estructura neural bien definida (Figura 3).

Justo antes de que el tubo neural se cierre, el extremo anterior del mismo comienza a expandirse formando las tres vesículas principales del cerebro. La vesícula más anterior se denomina 'prosencefalo', el cual es el precursor embrionario del cerebro anterior. La vesícula del medio corresponde al 'mesencefalo'. Y la vesícula más posterior es el 'rombencefalo'. Luego, estas estructuras anatómicas, por medio de eventos de segmentación, darán origen a las cinco vesículas secundarias del cerebro. El prosencefalo se dividirá en el 'telencefalo' y 'diencefalo'; y el rombencefalo lo hará en el 'metencefalo' y el 'mielencefalo' [21].

Células madre neurales

Las CMN son poblaciones multipotentes con capacidad de auto-renovación. Las mismas dan origen a las neuronas y la glía del cerebro en desarrollo y, también, aportan al limitado potencial de regeneración del cerebro adulto [23].

Las CMN existen, '*in vivo*', en nichos específicos, siendo los mismos la zona subventricular (SVZ, del inglés subventricular zone) y la zona subgranular (SGZ, del inglés subgranular zone) del giro dentado del hipocampo.

Estos nichos regulan el balance entre la división simétrica, a partir de una CMN se originan dos CMN o dos progenitores comprometidos, y la división asimétrica, se origina una CMN y una célula progenitora comprometida como resultado de la división de una CMN [24].

El proceso de neurogénesis consiste de cuatro fases: proliferación celular, migración, supervivencia celular y diferenciación neuronal. La primera evidencia fuerte de neurogénesis en el cerebro adulto fue presentada en 1965 por Altman y Das [25]. Luego, Goldman y Nottebohm en 1983 detectaron por primera vez este

proceso en pájaros adultos [26]. En 1907, Harrison *et al.* demostraron que células embrionarias del Sistema nervioso central pueden ser mantenidas fuera del cuerpo, utilizando determinados nutrientes [27].

En el cerebro humano, podemos distinguir cuatro tipos principales de CMN o células progenitoras (Figura 3):

Progenitores neuroepiteliales (PNEs): son radialmente alargados y contactan tanto la superficie apical como la basal de la monocapa del neuroepitelio. Los PNEs son responsables de la primera ola de neurogénesis en el tubo neural, luego de la misma, estas células dan origen a la glía radial y a los progenitores basales.

Glía radial (GR): Son originadas a partir de los PNEs al inicio de la neurogénesis y constituyen el principal tipo celular en el cerebro en desarrollo, donde funcionan tanto como progenitores neurales como andamios para la migración de las neuronas recién nacidas.

Su potencial de diferenciación es menos amplio que el de los PNEs. A pesar de que algunos subconjuntos son tripotentes, capaces de generar linajes neuronales, gliales y oligodendrogiales, la mayoría parecería ser bipotente o unipotente.

Progenitores basales (PB): es una población de precursores neurogénicos distinta, presente predominantemente en la SVZ del telencéfalo en desarrollo. Son generados en estadios tempranos del desarrollo a partir de los PNEs, y en estadios más tardíos, a partir de los GR. Los PB son considerados progenitores neurogénicos transitorios para amplificación que aumentan de manera específica la producción de neuronas durante períodos de tiempo restringidos.

Progenitores adultos: son una población de células neurales multipotentes que están presentes principalmente en dos nichos especializados del cerebro de los mamíferos adultos, la SVZ de la pared lateral del ventrículo lateral y la SGZ del giro dentado. Estas células son las que mantienen durante la vida adulta la neurogénesis y la gliogénesis. Las mismas derivan directamente de las GR que en el cerebro postnatal se convierten en CMN similares a astrocitos [23].

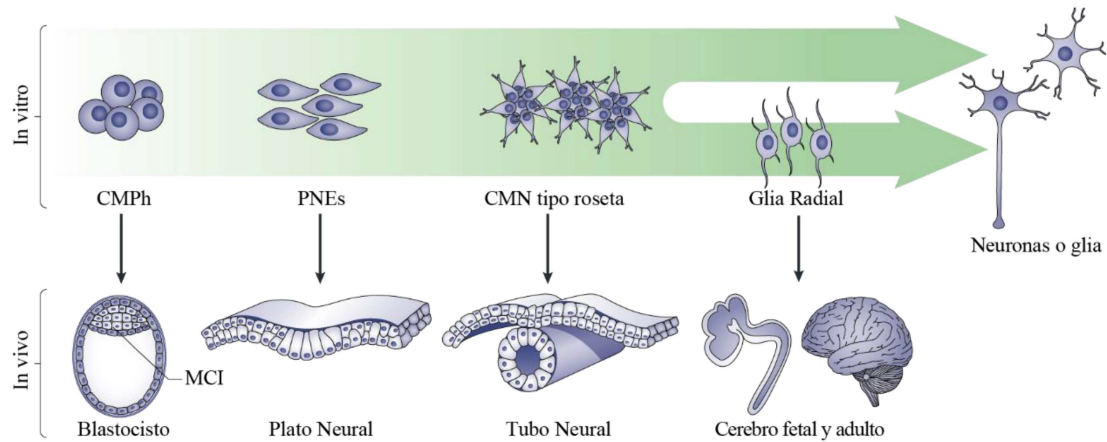


Figura 3. Relación del desarrollo entre las distintas poblaciones de CMN que pueden ser aisladas de los distintos estadios '*in vivo*' o generadas '*in vitro*' | Figura adaptada de [28]

Diferenciación *in vitro* al linaje neural

En la diferenciación al linaje neural, la ausencia de un protocolo óptimo implica la generación de células de otros linajes como contaminantes. Es por esto que uno de los mayores desafíos del campo consiste en una población celular de progenitores neurales homogénea y renovable, fácil de cultivar y comprometida al linaje neural. La misma serviría como una fuente ilimitada de células restringidas a un linaje para terapias de reemplazo y/o otras investigaciones [18].

El aislamiento de CMN de su nicho natural, su purificación y expansión, ha resultado problemática dado que los factores y contactos célula-célula requeridos para mantener estas células en su estado fisiológico no están completamente dilucidados [23].

El descubrimiento de la función del bFGF como inductor de la proliferación de precursores neurales dentro de cultivos de hipocampo embrionario, abrió un nuevo camino en el estudio de la proliferación de los mismos '*in vitro*'. Luego, se descubrió un segundo mitógeno, el factor de crecimiento epidermal (EGF, del inglés epidermal growth factor), capaz de estimular la división de precursores embrionarios capaces de mantener la habilidad de diferenciarse a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Además, se encontraron células en la SVZ y SGZ del cerebro adulto de ratón que proliferan en respuesta a bFGF y EGF, y que parecen ser similares en muchos aspectos a sus contrapartes embrionarias.

Sin embargo, la primera evidencia de que el bFGF puede inducir la proliferación de precursores humanos del sistema nervioso central fue en el trabajo de Buc-Caron. En el mismo utilizaron regiones del cerebro de embriones de entre cinco y doce semanas, y a partir de los mismos lograron expandir células en monocapa con un sustrato de matrigel y en presencia de bFGF. Describieron que un gran porcentaje de células expresaba el marcador de neuroepitelio temprano NESTINA [29].

Poco tiempo después de la derivación de la primera línea celular de CMEhs, Reubinoff *et al.* describieron el aislamiento de progenitores neurales expandibles a partir de CMEhs. Este mismo grupo, mediante la adición del suplemento B27, y los factores de crecimiento EGF y bFGF, optimizó la expansión de CMN derivadas de CMEhs. Las CMN expandidas eran capaces de diferenciarse, tanto '*in vivo*' como '*in vitro*', a las tres capas principales del linaje neural (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) [30].

Durante los últimos 20 años, entonces, se han desarrollado numerosos protocolos basados en el uso de factores de crecimiento. Esto ha permitido el estudio de las propiedades biológicas y moleculares de las CMN (tanto aisladas de tejidos como generadas a partir de CMPhs). A partir de estos protocolos, se ha logrado la expansión de estas células tanto en condiciones en suspensión como adherentes. A continuación describiremos brevemente ambos sistemas (Figura 4).

Sistema en neuroesferas

Las neuroesferas son agregados libres en flotación de progenitores neurales. Cada neuroesfera potencialmente deriva de una simple CMN. Las mismas se generan a partir de microdisección de tejido (o disociación de CMPhs) seguido de exposición a determinados mitógenos.

Si bien la idea de las neuroesferas es la recapitulación '*in vitro*' de una estructura tipo nicho, es necesario enfatizar que un nicho '*in vivo*' representa principalmente un micro dominio con una organización espacial que ayuda a regular la participación de las células madre en la generación, mantenimiento y reparación de tejidos. La regulación de las CMN en el nicho requiere no solo de la interacción entre las células madre sino también de éstas con las células diferenciadas vecinas, esto mediado por moléculas solubles y de adhesión y componentes extracelulares de la matriz.

Sistema en monocapa

Los primeros intentos de cultivar CMN en condiciones de monocapa se basaron en cultivar las mismas en pocillos sobre un substrato de poli-L-ornitina, laminina o fibronectina en medio libre de suero.

La condición primordial para mantener las CMN en este sistema de cultivo consiste en el uso de EGF y bFGF. La adición continúa de ambos factores de crecimiento resulta esencial para la derivación y propagación de las CMN crecidas en monocapa, siendo las mismas derivadas de CMEhs o de cerebro fetal o adulto [23].

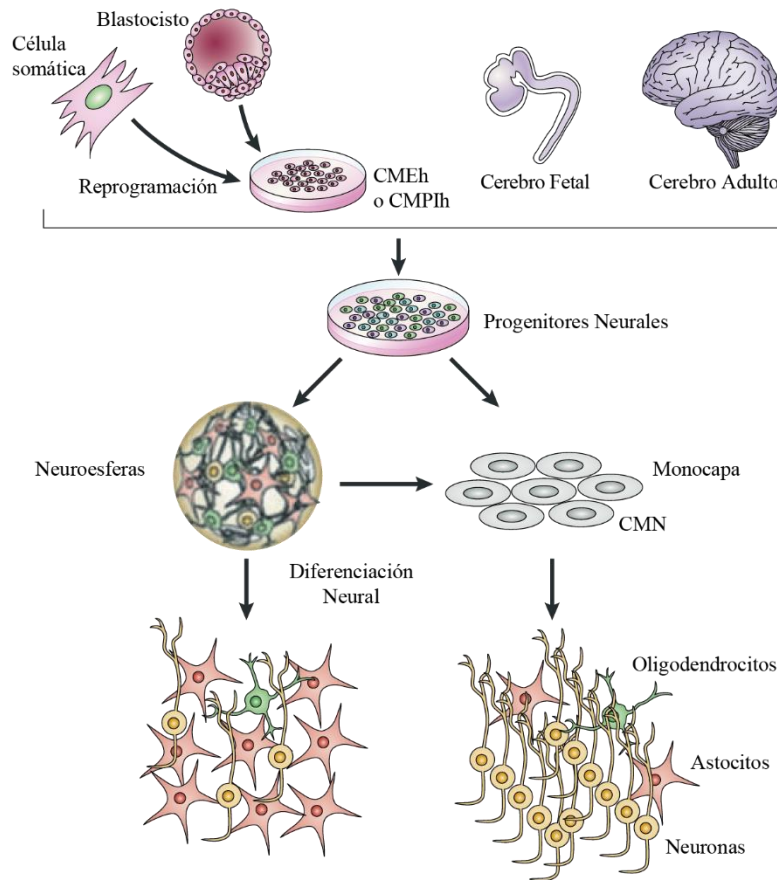


Figura 4. Fuente de CMN en neuroesferas o monocapa y resultado de su diferenciación | CMN generadas a partir de CMPs (CMEhs o CMPIhs) o derivadas de las áreas germinativas del cerebro fetal o adulto. Figura adaptada de [23].

Diferenciación *in vitro* a neuronas

Los estudios funcionales investigando los mecanismos moleculares de las enfermedades neurodegenerativas generalmente están limitados por la falta de modelos de neuronas humanas '*in vitro*'. En este sentido, la generación de neuronas funcionales a partir de CMPs resultan una potencial solución a este problema [31].

Los protocolos actuales de diferenciación neuronal van paso a paso a través de una serie de eventos para generar neuronas. Típicamente, la diferenciación de las CMPs involucra en primer lugar la inducción hacia neuroectodermo, y luego la formación de CMN a través de la inhibición de las vías de señalización de la proteína morfogenética de hueso (BMP, del inglés bone morphogenetic protein) y de Activina/TGF β . Las CMN multipotentes resultantes son luego dirigidas a linajes específicos, seguido de

su diferenciación terminal hacia neuronas post-mitóticas por medio de una combinación de señales moleculares, como lo son pequeñas moléculas y factores de crecimiento y diferenciación en el medio de cultivo celular.

En este sentido, la identificación de las señales externas involucradas en la diferenciación de las CMN resulta esencial para lograr su diferenciación *in vitro*. Algunos de los factores neurotróficos y de diferenciación involucrados en el desarrollo neural en mamíferos son el factor de leucemia inhibitorio (LIF, del inglés leukemia inhibitory factor), FGF1/FGF2, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés Platelet-Derived Growth Factor), factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés Nerve Growth Factor), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés Brain-derived neurotrophic factor), Neurotrofina-3 (NT-3, del inglés Neurotrophin-3), factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF, del inglés Glial cell-derived neurotrophic factor) y ácido retinoico.

El grupo de Van der Kooy, mediante el uso del antagonista del receptor de FGF SU5402 y células embrionarias FGFR1^{-/-}, han demostrado que la señalización por FGF no es requerida para la neuralización de las CME, pero si resulta crucial para la proliferación de CMN primitivas derivadas de CME [32].

En otros estudios, se ha demostrado que BDNF induce el crecimiento de neuronas recién generadas a partir de CMN [29].

Los factores NGF, BDNF, y NT-3 son miembros de la familia neurotrofina, y juegan un rol importante en prevenir la muerte neural y favorecer el proceso de recuperación, regeneración neural y re-mielinización.

El factor GDNF es un factor potente de supervivencia para las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. En el mesencéfalo embrionario, el factor recombinante humano GDNF promueve la supervivencia y diferenciación morfológica de las neuronas dopaminérgicas [32].

Si bien estos procedimientos han sido extensamente utilizados y establecidos, los mismos presentan ciertas limitaciones en cuanto a tiempo y escala. Los procesos involucrados suelen ser lentos, y normalmente se necesitan varias semanas para obtener neuronas funcionales.

Algunos de estos procedimientos conllevan numerosos pasos, incluyendo la formación de EB, lo cual obstruye la producción de grandes cantidades de células homogéneas [33].

Las neuronas creadas a partir de CMN presentan propiedades distintas a las neuronas maduras. Por medio del proceso de maduración, las mismas se convierten en un equivalente a las neuronas maduras luego de varios meses. Las neuronas recién diferenciadas adquieren su maduración morfológica en aproximadamente dos meses, lo cual es esencial en su funcionamiento [24].

Organoides Cerebrales

La habilidad de modelar el desarrollo del cerebro humano *in vitro* representa un paso importante en el estudio de los procesos de desarrollo y desórdenes neurológicos [34].

Tanto la complejidad del cerebro humano, su inaccesibilidad, junto con los problemas éticos involucrados, hacen que su estudio sea un desafío. Si bien los cultivos neurales en dos dimensiones (2D) constituyen una plataforma importante para investigar el Sistema nervioso humano, e incluso a partir de los mismos se pueden formar neuroesferas, los mismos presentan ciertas limitaciones [35]. Debido a esto, era necesario adoptar un nuevo enfoque que pudiera modelar tanto la adecuada organización 3D como el desarrollo del repertorio completo de los tipos celulares de los distintos tejidos [34].

Hoy en día existen protocolos que utilizan las células madre pluripotentes inducidas y embrionarias para generar organoides que pueden reconstruir la compleja composición celular, su organización espacial, y funciones neurales en el cerebro humano [36]. Durante los últimos años, los organoides cerebrales se han utilizado ampliamente para estudiar el desarrollo, normal o anormal, de los procesos del cerebro humano.

Las tecnologías de organoides cerebrales aún enfrentan múltiples desafíos. Entre ellos, la ausencia de vascularización es uno de los problemas críticos, dado que resulta difícil alimentar las capas centrales de los organoides [37]. Sin embargo, algunas características importantes del sistema nervioso se han observado en los organoides cerebrales. Los mismos presentan actividad eléctrica, son sensibles a la estimulación por luz, y pueden conectarse a una médula espinal y enviar impulsos que hacen que un músculo se contraiga [37].

Los organoides cerebrales, hasta el momento, han sido usados de manera exitosa para modelar enfermedades neurológicas como lo son la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, microcefalia, desórdenes del espectro autista y síndrome de Down[38].

Ciclo celular

Las CMPhs presentan un ciclo celular característico, que resulta atípico en comparación con el de los tipos celulares somáticos. En esta sección, en primer lugar, describiremos las propiedades generales de lo que sería un modelo clásico del ciclo celular en células somáticas, para luego describir y profundizar en las características del ciclo celular en las CMPhs.

La función principal del ciclo celular es duplicar de manera correcta el contenido de ADN en los cromosomas y luego segregar de manera precisa las copias en dos células hijas idénticas genéticamente. Estos procesos, entonces, definen las dos principales fases del ciclo celular. Por un lado, la duplicación del ADN ocurre durante la fase de síntesis (fase S) y, luego de la misma, la segregación de los cromosomas

y división celular ocurre en la fase de mitosis (fase M) [248]. Estos eventos claves están separados por las fases G1 y G2 (del inglés, *gap 1* y *gap 2*) que sirven como ventanas regulatorias para asegurar que los eventos del ciclo celular ocurran en el momento adecuado y en el orden correcto. Dependiendo de las señales mitogénicas del ambiente, las células que están atravesando la fase G1 pueden tanto activar el programa de división celular, o salir del ciclo celular (entrar en estado quiescente o estado G0) (Figura 5) [39].

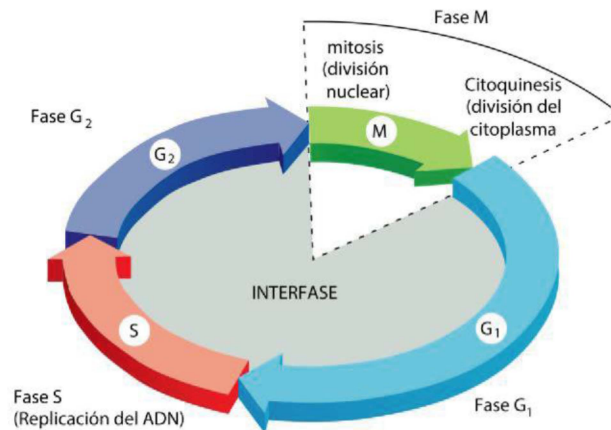


Figura 5. Fases del ciclo celular | La célula crece continuamente durante la interfase (fases G1, S y G2). Durante la mitosis (fase M), el núcleo y luego el citoplasma se divide. Figura adaptada de [248]

Modelo clásico del ciclo celular en células somáticas

Los eventos del ciclo celular están orquestados por la actividad de las ciclinas y una familia de quinasas de serina/treonina a quienes éstas se unen: las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, del inglés *cyclins-dependent of kinases*). Estos complejos ciclinas-CDKs fosforilan los substratos necesarios para las diferentes transiciones del ciclo celular [39].

La primer función de los complejos ciclina-CDKs consiste en la promoción a la entrada al ciclo celular [40]. Se considera que la misma es controlada, clásicamente, por la fosforilación de las proteínas de la familia del retinoblastoma (RB) por medio de los complejos ciclinas-CDKs. Este momento se define como punto de restricción (punto-R). El mismo se da en la fase G1, y una vez que se atraviesa, se desencadena la progresión del ciclo celular. Además, existen otros puntos de control a lo largo del ciclo celular que monitorean una variedad de señales celulares y funcionan como un freno, previniendo así la progresión hacia la fase siguiente hasta que ciertos criterios se cumplan. Junto con el punto-R, entonces, encontramos el punto de control de la fase S (necesario para una replicación del ADN confiable), el

punto de control de daño al ADN (para preservar la integridad genómica), y el punto de control del establecimiento del huso mitótico (para una correcta segregación de los cromosomas) [6].

El mecanismo del punto-R conecta la maquinaria del ciclo celular con las señales mitogénicas de modo que, bajo las condiciones de señalización apropiadas, los genes necesarios para la progresión G1-S son activados. Este mecanismo resulta esencial para el control del crecimiento normal de la célula [39].

Fueron descubiertas cuatro familias principales de ciclinas en mamíferos: tipo-D, -E, -A y -B. Las mismas presentan patrones de localización dinámicos. En las células de mamíferos, las ciclinas tipo-B residen principalmente en el citoplasma, mientras que las ciclinas A, D y E son nucleares [41].

Las ciclinas se expresan periódicamente a través del ciclo celular. A nivel molecular, como resultado de la estimulación con factores promotores del crecimiento, aumenta la expresión de las ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3) las cuales activan a las CDKs 4 y/o 6 [42]. Estos complejos, entonces, durante la fase G1 temprana inician la fosforilación de las proteínas de la familia del retinoblastoma (Rb) (Rb, p107 y p130). Como resultado de esta fosforilación, se liberan factores de transcripción E2F los cuales activan la transcripción de genes necesarios para la progresión del ciclo celular. Entre ellos se encuentran los genes de las *CICLINAS E* y *A*. Durante la fase G1 tardía, se activa CDK2 al unirse a la CICLINA E completando la fosforilación de las proteínas Rb, lo que conduce a una mayor activación de la transcripción mediada por los factores de transcripción E2F. De este modo, se atraviesa el punto-R en la transición de las fases G1/S, y la fase S inicia. El complejo CDK2-CICLINA A promueve la progresión a través de esta fase fosforilando proteínas involucradas en la replicación del ADN. Durante la transición G2/M, es necesaria la actividad del complejo CDK1-CICLINA A para iniciarse la profase. Luego, las ciclinas B son traslocadas al núcleo donde activan a CDK1 para participar en el proceso y finalización de la mitosis [41].

La actividad y función de estos complejos CDKs-ciclinas son regulados por dos familias de inhibidores de CDKs (CKIs, del inglés cyclin-dependent kinase inhibitor). Por un lado se encuentran las proteínas de la familia INK (p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, p19INK4d), las cuales interactúa con CDK4 o CDK6 y bloquea su asociación con las ciclinas D. Por el otro tenemos a las proteínas KIP/CIP (p21Cip1, p27Kip1, p57Kip2), las cuales forman complejos ternarios con las moléculas ciclina-CDK2 y ciclina-CDK1 e inhiben su actividad quinasa [40].

Cierta evidencia sugiere que el punto de decisión para progresar en el ciclo celular o salir del mismo, podría darse en la fase G2 del ciclo celular precedente, lo que modularía los niveles de CDK2 inmediatamente luego de la mitosis (denominado punto de restricción 1). De este modo, se estaría cuestionando que el destino celular se decide en el punto-R (clásico) en la fase G1. Este estudio determina que existe un umbral de CDK2-p21 en el punto-R1: cuando los niveles de p21 son más bajos que este umbral los niveles de CDK2 aumentan luego de la mitosis, lo que permite la progresión del ciclo celular hacia la fase G1. Si, en cambio, los niveles de p21 son elevados, la actividad de CDK2 post mitosis será baja, por lo que la célula entrará en una quiescencia transitoria [43].

Ciclo celular en CMP

Las CMP poseen un ciclo celular atípico, con ciertas particularidades que las diferencian de los tipos celulares somáticos. En esta sección, describiremos las propiedades fundamentales del ciclo celular de CMP, iniciando con el ciclo celular en las CME murinas (CMEms) y su comparación con las células somáticas, para luego poder compararlas y profundizar sobre el ciclo celular en las CMPhs.

Como mencionamos anteriormente, la transición de una fase del ciclo celular a la otra está gobernada por factores reguladores claves: las CDKs. Las mismas son activadas en puntos específicos durante el ciclo celular y su actividad depende de su asociación con subunidades regulatorias: las ciclinas [44, 45]. Sin embargo, en CMEms la mayoría de las ciclinas y CDKs se expresan a lo largo de todo el ciclo celular, con excepción del complejo CDK1-CICLINA B que se activa selectivamente antes de la mitosis (Figura 6). Esta alta actividad de las CDKs en las CMEms se debe, en parte, a la ausencia o baja expresión de los CKIs, lo que resulta en altos niveles de ciclinas presentes durante el ciclo celular [40].

Estas características explican también el comportamiento independiente del punto-R de estas células. Se ha visto que las mismas tienen la proteína RB hiperfosforilada. Además, debido a la ausencia de p21, y bajo la teoría del umbral p21-CDK2, estas células estarían siempre predispuestas a continuar otra ronda de replicación [6]. La inhibición de la actividad de la CDK2 retrasa la transición G1-S, y su silenciamiento lleva a que las CMEms se arresten en G1. Curiosamente, estos eventos son suficientes para inducir la diferenciación de estas células, lo que pone en evidencia la existencia de una conexión regulatoria entre el ciclo celular y la auto-renovación para el mantenimiento de la pluripotencia [40].

Las CMEms y las CMEhs representan estadios diferentes del desarrollo embrionario. Las CMEhs se encuentran en un estado ‘primado’ de pluripotencia, siendo similares a las células madre epiblasticas (EpiSC, del inglés Epiblast Stem Cells) [59]. Estas células son similares a las células del epiblasto post-implantatorio, mientras que las CMEms *naive*, son similares al epiblasto pre-implantatorio.

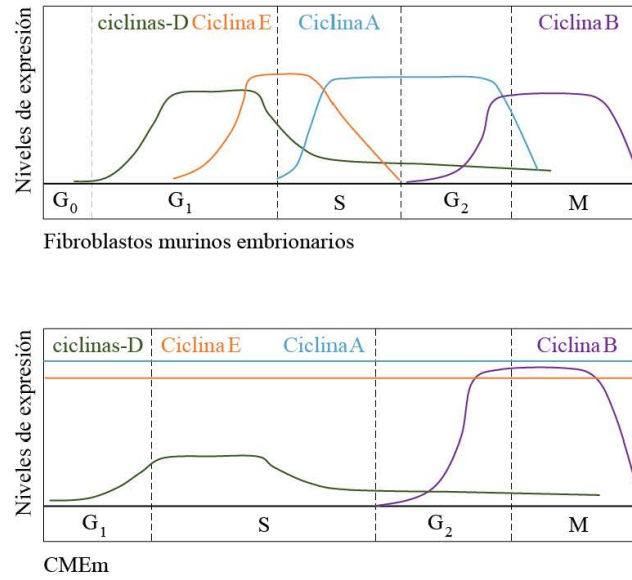


Figura 6. Perfil de expresión de las ciclinas en Fibroblastos murinos embrionarios y en CMEm | Figura adaptada de [42]

Ciclo celular en CMPhs

La habilidad de las CMPhs para mantener su auto-renovación y pluripotencia, evitando el compromiso hacia algún linaje, está asociada con su capacidad de mantener su condición proliferativa. Para lograr esto, las CMPhs presentan un ciclo celular atípico que se caracteriza por la presencia de fases G_1 y G_2 incompletas, y con un alto porcentaje del tiempo (60%) dedicado a la fase de replicación (fase S).

Se vio que las células somáticas al ser reprogramadas adquieren estas características. Por otro lado, el compromiso celular a alguna de las tres capas germinales embrionarias resulta en una fase G_1 extendida lo que incrementa el tiempo de división celular. Estos datos refuerzan el concepto de que la rápida división y acortamiento del ciclo celular son requerimientos para la pluripotencia [40]. Además, a nivel molecular, se han establecido parámetros que apoyan esta relación entre la capacidad de pluripotencia con la proliferación sin restricciones. Por ejemplo, los factores de transcripción MYC, NANOG, SOX2 y OCT4 promueven la pluripotencia mediante la regulación transcripcional de genes del ciclo celular y microARNs (moléculas que describiremos más adelante) que promueven la pluripotencia (Figura 7).

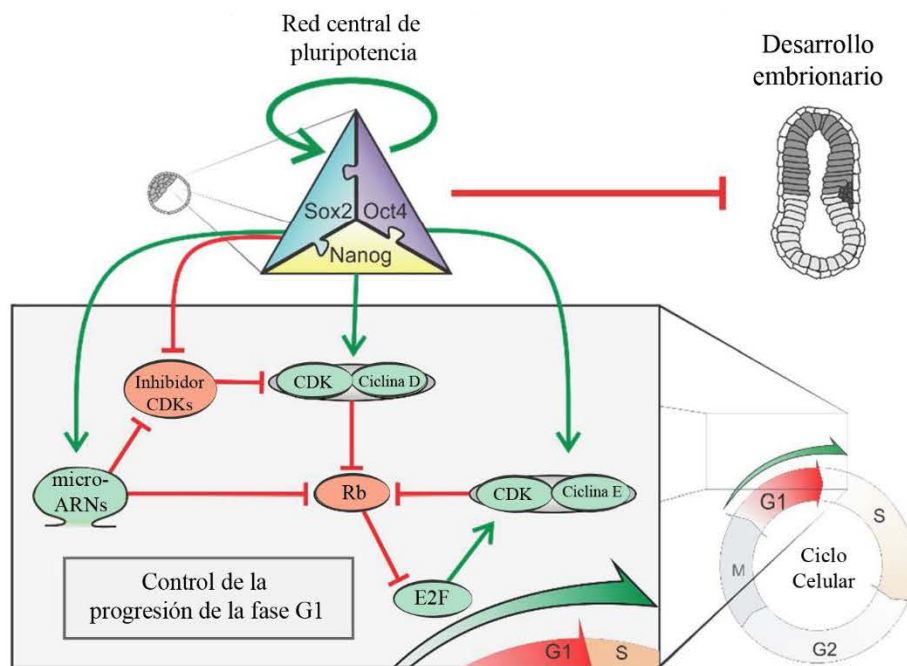


Figura 7. Esquema de la relación entre los mecanismos entre las redes regulatorias de pluripotencia y el ciclo celular [Figura adaptada de [46].

Si bien existen excepciones, las CMPhs generalmente tienen tiempos cortos de generación de 8-16 horas. Se ha observado que cuando estas células inician procesos de diferenciación, las células se acumulan en la fase G1, alargándose así su ciclo celular (más de 16 horas). Una fase G1 corta limita el tiempo en que las CMPhs pueden ser influenciadas por señales externas de diferenciación, dado que este momento representa el tiempo en el que hay una mayor sensibilidad a las mismas. Además, se ha demostrado que al inhibir la progresión de la fase G1, las CMEhs se comprometen a diferenciarse [47, 48]. La división de redes que mantienen la pluripotencia o promueven la diferenciación entre las distintas fases del ciclo celular resultan una estrategia lógica para activar/silenciar genes del desarrollo y de pluripotencia de una manera coordinada.

En este sentido, durante las últimas dos décadas muchos estudios han demostrado que las CMPhs responden a señales de diferenciación en la fase G1. Sin embargo, esta observación fue demostrada, y su estudio profundizado, utilizando el sistema reportero FUCCI (del inglés, Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator), el cual permite separar las células que se encuentran definidas en las distintas fases del ciclo celular [39, 42].

A partir del uso de este Sistema, Pauklin y Vallier, además de confirmar que las CMPhs definen su destino celular al encontrarse en la fase G1, determinaron que las CMEhs eran sesgadas hacia un linaje en particular de acuerdo al tiempo transcurrido en esta fase [49]. Este grupo identificó que el compromiso

a mesodermo y endodermo ocurre en una fase G1 temprana, mientras que el compromiso a ectodermo ocurre en una fase G1 tardía.

Uno de los mecanismos por el cual se considera que las CMPhs podrían ser receptivas a las señales de diferenciación durante la fase G1 es a través de la expresión de los tres tipos de ciclinas D (D1, D2 y D3). Durante la fase G1 temprana, los niveles de ciclinas D se encuentran bajos, por lo que las proteínas SMAD2/3 (transductoras de señal) se encontrarían libres para unirse y activar genes endodérmicos, facilitando la diferenciación hacia este linaje (esto dependería de la señalización por medio de Activina A). Luego, a medida que la fase G1 progresa, se induce la expresión de las ciclinas D, por lo que los genes endodérmicos son reprimidos y la diferenciación a ese linaje se previene. Los niveles de las ciclinas D durante la mitad o el final de la fase G1 determinan la predisposición de las células a diferenciarse al linaje mesodérmico o ectodérmico.

La diferenciación mesodérmica se correlaciona con un aumento de los niveles de expresión de la CICLINA D2, y un leve aumento de los niveles de expresión de las CICLINAS D1 y D3, mientras que el aumento en los niveles de expresión en las tres ciclinas D lleva a un destino ectodérmico.

Si bien se observó que el silenciamiento individual de cualquiera de los tipos de ciclinas D no afectaba la diferenciación de las CMEhs hacia alguno de los linajes en particular, el doble silenciamiento de las mismas sí demostró una predisposición hacia la diferenciación a endodermo/mesodermo y una capacidad reducida de diferenciación a neuroectodermo. El silenciamiento de las tres ciclinas de tipo D resultó letal en CMEhs, lo que sugiere una función crucial de estas ciclinas en la supervivencia y/o auto-renovación de éstas células. En CMEm, en cambio, este triple silenciamiento no dio un fenotipo detectable [6].

Años después, el mismo grupo reportó que estas ciclinas pueden influenciar el destino celular de manera independiente a SMAD2/3. Este segundo mecanismo de acción requiere de la habilidad de las ciclinas D para reclutar co-activadores y co-represores transcripcionales a genes blanco del desarrollo mientras que se acumulan en la fase G1 [39].

La salida del ciclo celular desde la fase G1 es frecuentemente necesaria para la diferenciación terminal de las células durante el desarrollo. En la mayoría de los casos la diferenciación terminal está relacionada con la expresión y activación de los CKIs, asegurarse la inhibición de las CDKs durante la fase G1 así como también la hipofosforilación de la familia de proteínas Rb, de modo que se repriman los genes target de los factores de transcripción E2F necesarios para la actividad del ciclo celular [39].

Si bien las CMPhs presentan, en ciertas circunstancias, un ciclo celular similar al de las CMEm, existen diferencias evidentes en el control del ciclo celular entre ambos tipos celulares. Esto refleja el hecho que

mencionamos anteriormente, de que las CMEhs son más parecidas a las células pluripotentes ‘primadas’ derivadas del epiblasto tardío post-implantatorio del embrión murino.

Si bien ambos tipos celulares proliferan rápidamente y presentan una fase G1 corta, las CMEhs presentan niveles de expresión apreciables de las ciclinas D y de los inhibidores KIP/CIP, expresión ciclo-dependiente de la quínasa CDK2, y presenta tanto la proteína Rb hiper e hipo fosforilada.

Esto ha llevado a que varios grupos estudien el perfil de expresión de reguladores claves del ciclo celular en CMPhs [50, 51]. En particular y en contraste con las CMEmhs, la mayoría de los reguladores del ciclo celular en las CMPhs presentan una expresión específica de fases (Figura 8). Sin embargo, existe cierta controversia entre los resultados obtenidos por distintos grupos en cuanto a la abundancia y expresión periódica o constitutiva de algunas de estas ciclinas durante el ciclo celular de las CMEhs [52-58], y poca información de cómo las mismas son expresadas o reguladas en las CMPihs [59]. En el trabajo de mi tesina de licenciatura, nos dedicamos a estudiar el perfil de expresión de las ciclinas y factores de transcripción E2F en CMEhs, CMPihs y en la progenie neural derivada de las CMEhs [60]. En el presente trabajo profundizamos dicho estudio, particularmente centrándonos en el estudio de la expresión y regulación de la *CICLINA E*, dado que un estudio reciente demostró que esta ciclina está involucrada en mantener el estado de pluripotencia en CMEmhs, y que la pérdida de su expresión alarga la fase G1 en estas células e induce la diferenciación [61].

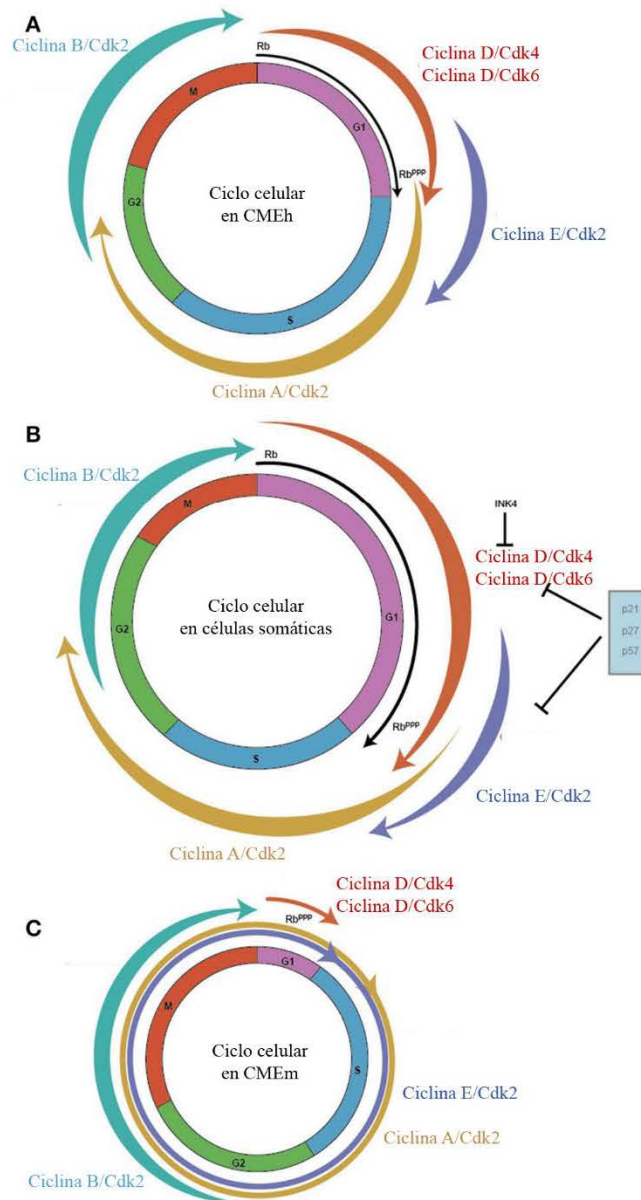


Figura 8. Esquemas del ciclo celular en distintas líneas celulares | Esquema de la estructura y la expresión de distintos reguladores del ciclo celular en A) CMEhs B) Células somáticas y C) CMEms. Figura adaptada de [6].

Análisis del ciclo celular mediante el uso de inhibidores

Cómo mencionamos en la sección anterior, en el estudio de mi tesina de licenciatura, nos dedicamos a estudiar el perfil de expresión de las ciclinas en las CMPihs FN21, CMEh H9, y en la progenie neural (PN) derivada de estas últimas.

En particular, nos centramos en el estudio de las principales ciclinas: *CICLINA A2*, *CICLINA B1*, *CICLINA D1*, *CICLINA D2* y *CICLINA D3*.

En dicho estudio, para poder determinar de manera correcta la diferencia en los niveles de expresión de los ARNm de éstas ciclinas en los distintos tipos celulares, y asegurarnos que los resultados observados no se debían a una diferencia en el porcentaje de células en las distintas fases, arrestamos las células en G1/S y G2/M utilizando dos inhibidores farmacológicos.

Para arrestar las células en G1/S, utilizamos el inhibidor específico de CDK4/6: PD0332991 (PD) (30h 5µM para las CMPhs, 24h 1µM para PN y 48h 1µM para los FH).

Para arrestar las células en la transición G2/M utilizamos el inhibidor Nocodazol, el cual es un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos (24h 100ng/ml para las CMPhs, 54h 200ng/ml para los PN y 72h 200ng/ml para los FH).

Luego de arrestar las distintas líneas celulares, para determinar la fracción de células en cada etapa y comprobar que el arresto fue efectivo, cuantificamos el contenido de ADN mediante una tinción con yoduro de propidio (IP) y lo medimos por medio de una citometría de flujo. En la Figura 9 pueden observarse los histogramas correspondientes a los arrestos con las distintas drogas en las distintas líneas celulares. Puede observarse cómo, en cada caso, aumenta en relación al control (células sin arrestar) el porcentaje de células en G1/S al tratarlas con PD0332991, y en G2/M al tratarlas con Nocodazol (Figura 9).

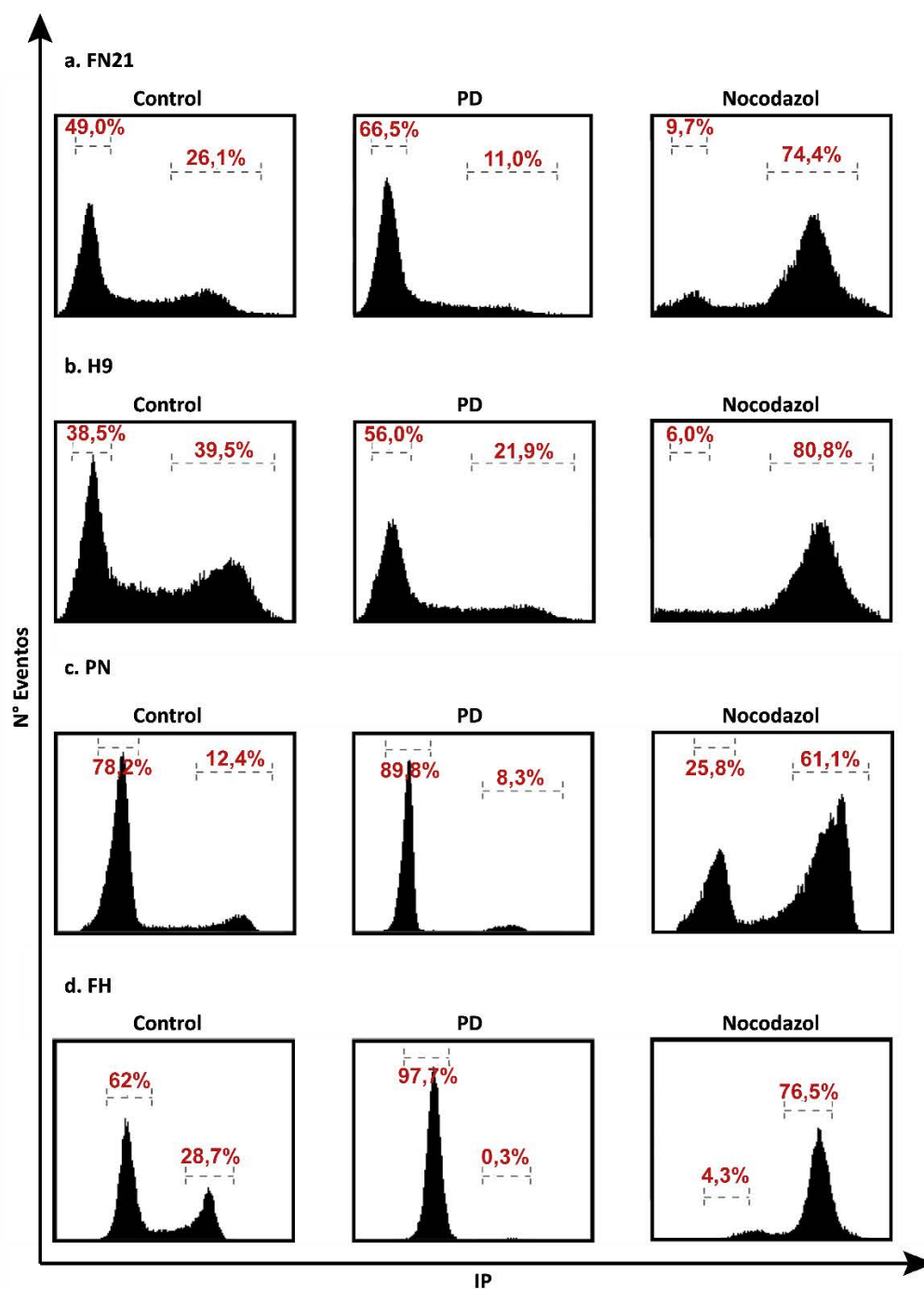


Figura 9. Perfil del ciclo celular de CMPH, PN y FH asincrónicas y arrestadas farmacológicamente Las CMPHs FN21 (a), CMEHs H9 (b) (ambas cultivadas sobre MEFi), PN (c) y FH (d) fueron arrestadas en G1/S con PD0332991, inhibidor específico de CDK4/6 (30h 5 μ M para CMPHs, 24h 1 μ M para NP y 48h 1 μ M para FH) y en G2/M con Nocodazol (24h 100ng/ml para CMPHs, 54h 200ng/ml para NP y 72h 200ng/ml para FH). El perfil del ciclo celular en cada caso se realizó mediante tinción del ADN con yoduro de propidio (IP) y posterior análisis por citometría de flujo.

De este modo, analizamos luego los niveles de expresión de los ARNm de las distintas ciclinas por RT-qPCR en todas las líneas celulares arrestadas, comparando el valor de expresión de cada una de ellas en las líneas tratada con los inhibidores mencionados en comparación con las células control.

Éste análisis reveló diferencias significativas en los niveles de expresión de los transcritos de todas las ciclinas estudiadas a lo largo del ciclo celular, en todas las líneas celulares, sugiriendo un perfil de expresión periódico de las mismas. La única excepción fue la *CICLINA E1* en las CMPhs, la cual presentó un perfil de expresión constitutivo.

Nos pareció importante mencionar estos resultados dado que en el presente trabajo utilizaremos el mismo enfoque metodológico, y profundizaremos éste estudio.

Factores de transcripción E2Fs

Hace dos décadas se descubrió que la proteína retinoblastoma (pRb, del inglés retinoblastoma protein) es un potente supresor de tumores. Desde ese momento, la familia de las proteínas bolsillo (PP, del inglés pocket proteins) que incluyen a pRB, p107 y p130; junto con los factores de transcripción E2Fs (principales factores con los que interactúan), han sido objeto de intensiva investigación [62].

Clasificación dentro de la familia de transcripción E2Fs

Hasta el momento, se han identificado ocho miembros de la familia de los factores de transcripción E2Fs. Los mismos se clasifican, tradicionalmente, en dos sub-categorías: “activadores” y “represores” [6]. La expresión de estos factores a lo largo del ciclo celular es diferencialmente regulada, y algunos de ellos se expresan de una manera tejido-específica.

Cinco de los miembros de esta familia tienen la habilidad de interactuar con las PP. Estos E2Fs presentan tanto dominios de transactivación como de represión (Figura 10).

El modelo tradicional describe que cuando estos factores de transcripción se unen a las PP, regulan la represión transcripcional; y al ser liberados de las PP, estos factores pueden actuar como transactivadores, de modo que sus genes target son expresados [63].

Para la activación transcripcional, estos E2Fs forman complejos con las acetil transferasas de histonas (HATs, del inglés histone acetyl transferases). Para la represión transcripcional, estos factores forman complejos (mediante las PP) con deacetilasas de histonas (HDACs, del inglés histone deacetylases), remodelación de la cromatina y metil transferasas de histonas.

Para poder unirse al ADN, los E2Fs (del 1 al 6) requieren formar heterodímeros con una proteína de dimerización (DP, del inglés dimerization partner) DP-1 o DP-2. Los E2Fs del 1 al 5 contienen tanto dominios de activación como de represión, si bien los E2Fs del 1 al 3a se clasifican como E2Fs activadores mientras que los restantes como represores.

Por el contrario, los E2Fs 7 y 8, recientemente identificados, son considerados atípicos dado que pueden unirse al ADN sin tener que formar dímeros con DP-1 o DP-2. Estos factores son considerados represores transcripcionales.

A nivel estructural, los E2Fs del 1 al 3 contienen su propia señal de localización nuclear, mientras que los E2Fs 4 y 5 presentan una señal de exportación nuclear. Estos últimos factores se localizan principalmente en el núcleo cuando están unidos a las PP y funcionan como complejos represores; al ser liberados (no están unidos a las PP), se excluyen eficientemente del núcleo.

Sin embargo, la clasificación de los factores de transcripción E2Fs 1-3a como activadores es una simplificación dado que estos factores pueden potencialmente formar complejos con RB, permitiendo que haya represión transcripcional [63].

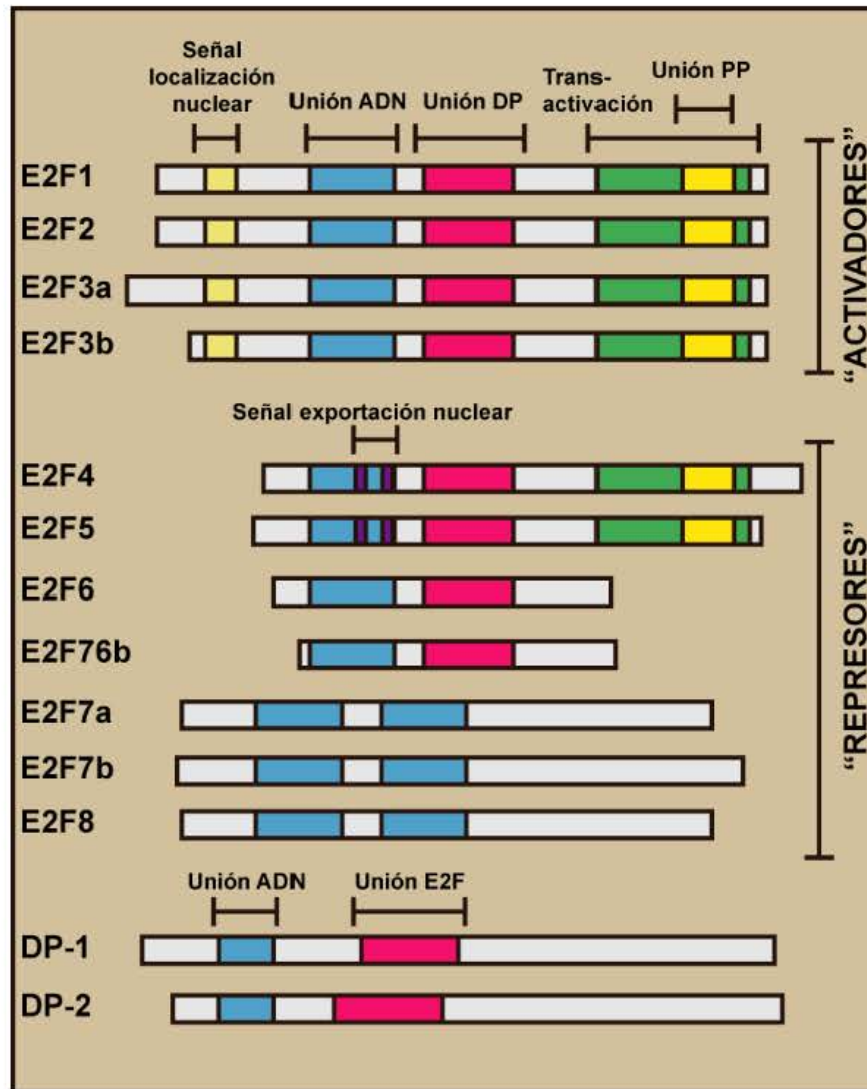


Figura 10. Familia de los factores de transcripción E2Fs Las células de mamífero tienen al menos 8 diferentes factores de transcripción, algunos de los cuales tienen múltiples isoformas. Figura adaptada de [63].

Vía de la familia Rb/E2Fs en CMP

La familia RB es considerada como la guardiana del punto de restricción de la transición G1/S (punto-R), evitando que las células ingresen a la fase S. Este control depende principalmente del estado de fosforilación de ésta proteína.

Como describimos previamente, cuando una célula somática ingresa a la fase G1, Rb se encuentra en su forma activa (no-fosforilada) e impide así la transcripción de genes claves para la transición G1/S, evitando el pasaje por el punto-R. Cuando Rb es fosforilada por los complejos CICLINA D-CDK4/6 y

CICLINA E/CICLINA A-CDK2, se reduce su actividad, y las células atraviesan el punto-R, ingresando a la fase S [64].

Si bien este rol de Rb como un punto de control del ciclo celular está claro, ésta proteína cumple distintos roles en las CMEmS y CMEhS.

En las CMEmS, la proteína Rb está de manera perpetua en su forma hiperfosforilada (inactiva), debido a la alta actividad de las ciclinas-CDKs que la fosforilan, sumado a una reducción en las fosfatasaS.

Desde el punto de vista del modelo canónico, como Rb está inactiva en estas células, no hay una represión de los E2Fs activadores; y los E2Fs represores no forman un complejo represivo con Rb. Esto lleva a altos niveles de expresión de las CICLINAS E y A y CDK2 lo que, a su vez, inhibe aún más a Rb. La pérdida de la actividad represiva de Rb lleva a una inactivación del punto de restricción de la transición G1-S, lo que permite que las CMEmS entren rápidamente a la fase S, casi inmediatamente luego de cada división celular [6].

En las CMEhS, la proteína RB se encuentra tanto hiperfosforilada, pero también hay una pequeña proporción de RB hipofosforilada.

El grupo de Conkliln et al.[64] al sobre expresar una forma constitutivamente activa de Rb (no-fosforilable) en CMEhS, observaron la pérdida de ciertas características de células madre en las células tratadas, junto con una disminución en el crecimiento poblacional y en el número de células en la fase S y un aumento en la muerte celular.

Demostraron que tanto mucha actividad de Rb, como muy poca, resulta perjudicial para la auto-renovación de las CMEhS. Propusieron, a partir de todos sus resultados, un modelo donde la actividad de la familia Rb resulta crítica para mantener el balance entre la proliferación y la supervivencia celular en las CMEhS.

El mismo plantea que cuando RB es activada en estas células, los factores de transcripción E2Fs son inhibidos y las CMEhS salen del ciclo celular para diferenciarse o experimentar muerte celular. Cuando la familia de Rb es inactivada, la alta actividad de los E2Fs dispara tanto el proceso de apoptosis a través de vías tanto dependientes como independientes de p53 (proteína supresora de tumores que puede activar la apoptosis); como también el arresto del ciclo celular por medio de la inducción de p21 (Figura 11).

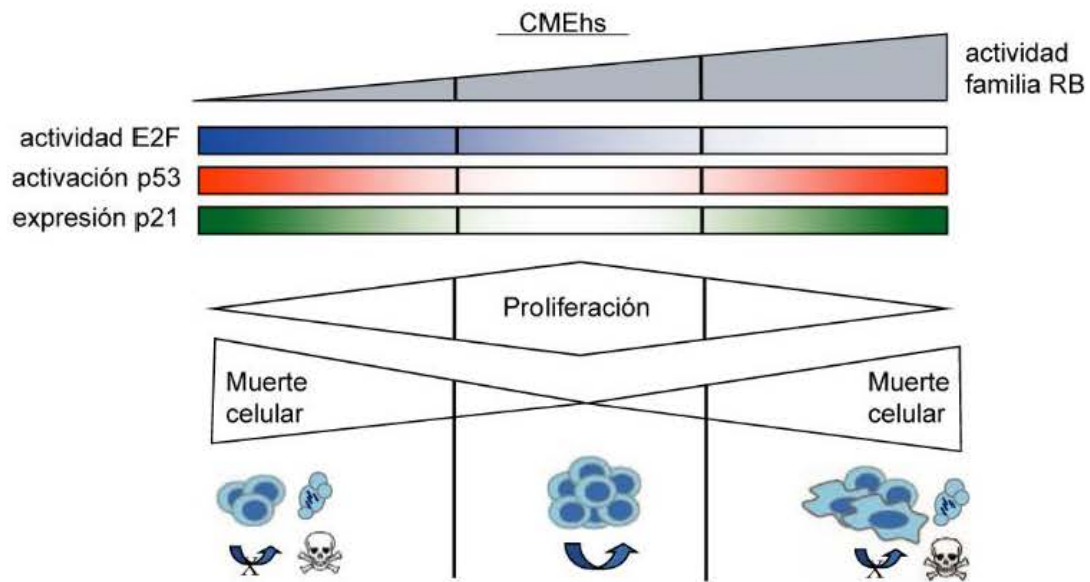


Figura 11. Modelo de la actividad de la familia Rb en las CMEhs | Figura adaptada de [63].

Dentro de las diferencias entre las CMEms y las CMEhs, podemos agregar que las moléculas de Rb en las CMEhs se encuentran menos hiperfosforiladas que en las CMEms. Una especulación en relación a esta diferencia es que las CMEms podrían haberse adaptado a la ausencia completa de la función de los miembros de la familia de Rb, mientras que la inactivación de la familia de Rb en las CMEhs, todavía puede resultar en una activación de targets específicos de los E2Fs, incluyendo genes involucrados en la muerte celular.

Si bien no está muy esclarecido por qué la regulación de Rb en las CMEms y las CMEhs presentan diferencias, una de las posibilidades es que, dado que las éstas células representan estadios diferentes del desarrollo, la familia Rb tendría distintos roles en la auto-renovación y la proliferación, de acuerdo a la etapa del desarrollo en la que se encuentra [6], donde las CMEhs representan un estadio del desarrollo más tardío que las CMEms.

Muchas investigaciones sobre el rol biológico de las proteínas regulatorias del ciclo celular han revelado que esta vía controla un número de procesos celulares, y que varios de ellos impactan en las decisiones claves sobre el destino de las células madre, su mantenimiento y diferenciación, sin afectar de manera simultánea las dinámicas del ciclo celular. La increíble diversidad de funciones que tienen la familia Rb y los E2Fs no puede apreciarse únicamente con el modelo clásico de regulación del ciclo celular. Este hecho sugiere que estas proteínas son reclutadas a genes “del ciclo celular” y a genes “de destino celular” con la ayuda de distintos factores transcripcionales [62].

Ciclo celular y neurogénesis

En 1957, Taylor et al. reportó por primera vez el uso de timidina tritiada para detectar la duplicación del ADN.

Algunos años después, este método fue utilizado no solo para sugerir la presencia de células madre neurales en el cerebro del mamífero adulto sino también para medir los parámetros del ciclo celular de progenitores neurales durante el desarrollo. Esto demostró que las distintas regiones del cerebro contienen progenitores con distintos largos del ciclo celular y que el ciclo celular se alarga durante el desarrollo. En las últimas décadas, se ha confirmado, mediante métodos alternativos para medir el ciclo celular, que a medida que las células madre se diferencian, su ciclo celular se alarga. Se desarrolló así la hipótesis del “largo del ciclo celular”, donde se considera que el tiempo es un parámetro crítico para que ocurra el cambio del destino celular, por el simple hecho de que cualquier determinante del destino celular requiere de tiempo para poder generar un efecto funcional [65]. A su vez, los reguladores del ciclo celular pueden influenciar directamente la actividad de los determinantes del destino celular. Un claro ejemplo fue el descubrimiento de que la actividad de las CDKs controla la fosforilación del factor de transcripción neurogénico NGN2, influenciando en su estabilidad [66].

A lo largo del desarrollo embrionario las células deben proliferar hasta alcanzar un número apropiado, para luego iniciar la diferenciación con un cambio simultáneo en el ciclo celular. El momento preciso en el que una célula cambia el patrón del ciclo celular e inicia su diferenciación es crítico, dado que impacta de manera directa el número total de células y el tipo de célula que se genera. La neurogénesis, entonces, involucra tanto la proliferación como la diferenciación. En términos del ciclo celular, esto significa la entrada y salida del ciclo celular [67]. Sin embargo, el análisis de qué moléculas participan en la salida del ciclo celular de un linaje celular específico no es aún exhaustivo. Además, la relación entre la salida del ciclo celular y la inducción de la diferenciación no ha sido del todo esclarecida aún, y parecería depender del tipo de célula [68].

Pequeños ARNs: los microARNs como reguladores de la expresión génica

Los ARNs mensajeros (ARNm), como templatado para la síntesis de proteínas, fueron foco de estudio por mucho tiempo; mientras que los ARNs no codificantes (ncRNAs, del inglés non-coding RNAs) eran considerados productos residuales de la transcripción masiva sin ninguna importancia biológica.

Hacia finales de 1950, junto con el descubrimiento de los ARNs ribosomales (ARNr) y de transferencia (ARNt), una variedad de especies de ARNs salieron a la luz. Con los inicios de la secuenciación y el análisis del genoma humano y de ratón, se reveló que el 98% del ADN considerado basura puede ser

transcripto. Sin tener en cuenta a los ARNm, se vio que la mayoría de los transcriptos no codifican para proteínas, y a los mismos se los definió como ncRNAs. En general, los mismos participan en múltiples procesos biológicos, regulando procesos fisiológicos y del desarrollo, o incluso enfermedades [69].

Los pequeños ARNs se definen según su largo (entre 20–30 nucleótidos) y su asociación con las proteínas de la familia Argonauta (AGO) [70]. En los animales existen tres tipos de pequeños ARNs no codificantes: los siARNs, los piARNs y los microARNs. Los siRNAs (del inglés small interfering RNA) derivan de ARNs largos de doble cadena, tienen un largo de ~21 nucleótidos y regulan de manera post-transcripcional transcriptos y transposones, y participan de la defensa anti viral. Su procesamiento depende sólo de Dicer pero no de Drosha, enzimas RNAsas que describiremos en mayor profundidad más adelante. Los piARN (del inglés piwi-interacting RNAs), tienen un tamaño de entre 24 a 31 nucleótidos, provienen del procesamiento de moléculas de ARN simple cadena que son clivadas por la enzima Zucchini. Su función es poco conocida en células adultas, pero en las células germinales tienen por función regular los transposones y evitar las alteraciones genéticas durante la recombinación. Su biogénesis no depende de Dicer [71].

Los microARNs (miRNAs), son una pequeña familia de pequeños ARNs no codificantes, simple cadena y evolutivamente muy conservados que regulan la expresión génica de una manera secuencia-específica a un nivel post-transcripcional [72]. El repositorio de miRNAs, conocidos como miRBase (<http://www.mirbase.org>), ha catalogado 2654 miRNAs maduros, si bien la importancia funcional de muchos de ellos no ha sido determinada [73].

En 1993 se identificó el primer miRNA en *Caenorhabditis elegans*: *lin-4* [72, 74]. Su descubrimiento, y la inhibición de la traducción de su gen *target* específico, pusieron en evidencia un nuevo mecanismo de regulación génica durante el desarrollo. En ese primer momento, y dado el rol de *lin-4* en la regulación de las transiciones del desarrollo en *C. elegans*, a éstas moléculas se las denominó stRNAs (del inglés small temporal RNAs)[72]. Siete años después, el primer miRNA de mamíferos fue descubierto: *let-7* [74]. A partir de éstos dos eventos, se desencadenaron una serie de investigaciones genómicas, y cientos de miRNAs fueron identificados en la mayoría de los genomas de los metazoos. Con el paso de los años se determinó que la función de los miRNAs no estaba limitada a la regulación de los eventos temporales del desarrollo, sino que los mismos presentan un patrón de expresión diverso y que regulan muchos aspectos del desarrollo y fisiológicos. Así, quedó claro que los stRNAs eran los prototipos de una familia mayor de pequeños ARNs: los miRNAs [72].

Los mismos reconocen por complementariedad de secuencia a sus ARN mensajeros (ARNm) target y regulan su estabilidad mediante distintos mecanismos. Más del 60% de los genes que codifican para proteínas contienen al menos un sitio de unión a un miRNA conservado y, dado que existen numerosos sitios de unión no conservados, la mayoría de los genes codificantes para proteínas estarían bajo el control de los miRNAs. Es por esto que no resulta sorprendente que la biogénesis y función de los propios miRNAs esté finamente regulada; y que su desregulación generalmente está asociada a distintas

enfermedades, entre las que se encuentran distintos cánceres, hepatitis, enfermedades cardiovasculares y trastornos del desarrollo [70].

A partir del conocimiento sobre las funciones de los miRNAs en el desarrollo y en la enfermedad, los miRNAs se convirtieron en posibles blancos de nuevos enfoques terapéuticos. A partir de estudios funcionales en distintos casos de cáncer, se ha confirmado que muchas veces la desregulación de los miRNAs es la causal de la enfermedad, ya que muchos de ellos actúan como supresores de tumores u oncogenes (en este caso se los denomina oncomiR).

Las alteraciones en los miRNAs, frecuentemente observadas en las enfermedades, suelen deberse a eventos genómicos como lo son mutaciones, o defectos en su biogénesis debido a mutaciones o disminución de la expresión de las enzimas que regulan la misma [74]. Incluso las mutaciones heterocigotas en los factores de la biogénesis tienen consecuencias fenotípicas, poniendo así en evidencia la importancia de la expresión balanceada de los miRNAs [75].

El uso de tratamientos basados en la sobreexpresión de los microARNs con moléculas sintéticas que mimetizan su función (en inglés *mimics*) o bien bloqueando su actividad con antagomiRs (en inglés *inhibitors*), resulta prometedor en el desarrollo pre-clínico. Algunos de estos tipos de tratamientos terapéuticos han alcanzado la fase de desarrollo clínico, como es el caso del uso de un mimic del miR-34 (miRNA supresor de tumores) que alcanzó la fase I de pruebas clínicas para el tratamiento de cáncer; o el uso de un antagomiR para el miR-122 para el tratamiento de la hepatitis que alcanzó la fase II en pruebas clínicas.

En paralelo, hay diversos estudios enfocados en los avances de las tecnologías para transportar las moléculas de ARN *in vivo*. En estudios iniciales, los *mimics* e *inhibitors*, “desnudos” o codificados en vectores virales, se inyectaban sistémicamente o de manera local en los sitios del tejido *target*. Sin embargo, existen ciertos desafíos como la degradación de los mismos en el torrente sanguíneo y el transporte local en el caso de la inyección sistémica. Avances tanto en la química de estas moléculas como en las tecnologías de transporte, incluyendo nano partículas, han permitido el traslado de las posibles terapias basadas en los miRNAs hacia la clínica [74].

Regulación de la biogénesis de los miRNAs

La biogénesis de los miRNAs es un proceso de múltiples pasos [73]. Los miRNAs se producen a partir de un precursor específico que está codificado en el genoma [72]. La transcripción de los mismos es llevada a cabo principalmente por la ARN polimerasa II como un transcripto primario largo (pri-miRNAs) que presenta una estructura de horquilla donde la secuencia del miRNA está embebida. El pri-miRNA es transformado, luego, en un precursor de miRNA (pre-miRNAs) y, finalmente, en un

dúplex de miRNA maduro. Este miRNA maduro está compuesto por una hebra 5p (originada a partir del brazo 5' de la horquilla del pre-miRNA) y una hebra 3p [70, 73].

Es poca la información que existe sobre cómo es la regulación transcripcional de los pri-miRNAs. Se descubrió que algunos pri-miRNAs se localizan dentro de intrones de genes huésped (incluyendo tanto genes que codifican para proteínas como aquellos que no lo hacen) y probablemente sean regulados transcripcionalmente a partir del promotor de su gen huésped. Algunos miRNAs, también, se agrupan en transcriptos poli-cistrónicos, lo que indica que dichos miRNAs se regulan de manera coordinada durante el desarrollo.

Dos eventos de procesamiento son los que conducen la formación de los miRNAs maduros en animales. El clivaje secuencial de la maduración de los miRNAs está catalizado por dos enzimas de tipo RNasa-III: Drosha y Dicer. Ambas son endonucleasas específicas de ARN doble cadena que generan extremos de dos nucleótidos de largo con un grupo hidroxilo (OH) en el extremo 3' (en inglés denominados *overhangs*) en el sitio de clivaje.

La enzima Drosha se localiza principalmente en el núcleo y forma un complejo microprocesador junto con el dímero de DGCR8 (del inglés, *DiGeorge critical region 8*) [75]. Independientemente de las distintas secuencias primarias y estructuras de los pri-miRNAs, cliva a los mismos generando pre-miRNAs de ~70 pares de bases que forman una estructura de bucle (en inglés *stem-loop*) imperfecta. Luego de este clivaje inicial mediado por Drosha, los pre-miRNAs se exportan del núcleo al citoplasma por medio de Exportina 5, un transportador de carga núcleo/citoplasmático dependiente de Ran-GTP. Una vez en el citoplasma, estos precursores son clivados por Dicer formándose así pequeños e imperfectos dúplex de ARN doble cadena (miRNA: miRNA*) que contienen tanto la hebra madura del miRNA como su hebra complementaria (miRNA*). El clivaje mediado por Dicer genera, entonces, miRNAs maduros con largo de entre 21-25 nucleótidos. Estas diferencias en el largo de los mismos se deben, posiblemente, a la presencia de protuberancias o falta de complementariedad en la secuencia del pre-miRNA.

El complejo efector para los miRNAs comparte componentes centrales con el de los siRNAs. Tal es así, que ambos se denominan de manera colectiva como el complejo de silenciamiento inducido por ARN o RISC (del inglés, RNA-induced silencing complex). La especificidad de un miRNA como así también su eficiencia funcional requiere que la hebra madura (miRNA) del dúplex miRNA: miRNA* se incorpore selectivamente en el complejo RISC para poder así reconocer a su gen target. La hebra miRNA*, también conocida como hebra pasajera, se degrada rápidamente al ser excluida del complejo RISC.

Cuando Dicer procesa el pre-miRNA para formar el dúplex miRNA: miRNA*, la estabilidad del extremo 5' de ambos brazos del mismo suele ser diferente. Si bien los miRNAs maduros pueden residir en cualquiera de las dos hebras del tallo de la horquilla, los mismos suelen derivar en general de la hebra con el extremo 5' menos estable en comparación con la hebra pasajera. Estos descubrimientos indican que la inestabilidad relativa en el extremo 5' del miRNA maduro podría facilitar su incorporación preferencial en el complejo RISC. Este ensamblaje selectivo del miRNA maduro en el complejo RISC

probablemente refleje la facilidad para desenrollarse a partir de un extremo del dúplex miRNA: miRNA*. De este modo, las propiedades termodinámicas del precursor del miRNA determina el ensamblaje asimétrico de RISC y, por ende, la especificidad del *target* para la inhibición post-transcripcional [72]. Los distintos pasos que comprende la biogénesis de los miRNAs pueden verse esquematizados en la Figura 12.

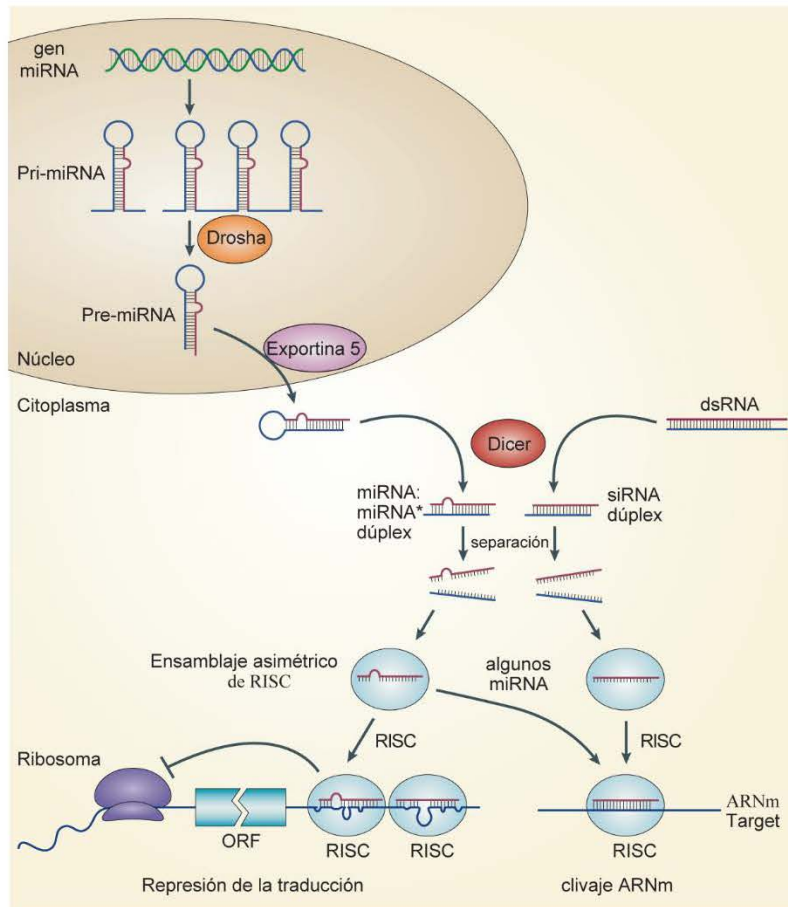


Figura 12. Modelo canónico de la biogénesis de los miRNAs | Modelo actual de la biogénesis y supresión post-transcripcional de los miRNAs y pequeños ARNs interferentes (siRNAs). ORF (Del inglés, open Reading frame); RISC (Del inglés, RNA-induced silencing complex). Figura adaptada de [72].

Aparte de esta vía canónica de biogénesis de los miRNAs, existen varios mecanismos alternativos para generar miRNAs o pequeños ARNs como los miRNAs. A partir de la secuenciación de alta profundidad de los pequeños ARNs de células deficientes en Dgcr8, Drosha o Dicer; se descubrió que había miRNAs no convencionales que pueden formarse de una manera independiente del microprocesador Dgcr8/Drosha o Dicer.

La existencia de estas vías paralelas refleja la flexibilidad evolutiva de la biogénesis de los miRNAs. Sin embargo, es notable que la gran mayoría de los miRNAs funcionales siguen la vía canónica para su biogénesis, y aproximadamente un 1% de los miRNAs conservados (como por ejemplos los miR-320 y miR-451) se producen de manera independiente de Dicer o Drosha en vertebrados. La mayoría de otros miRNAs no canónicos, están poco conservados y son poco abundantes. En conclusión, la importancia funcional de los miRNAs no canónicos debe interpretarse con cuidado [70].

Los miRNAs y la regulación de la expresión génica

Los miRNAs para ejercer su función como guías, actúan por apareamiento de bases con su ARNm target; mientras que las proteínas AGO funcionan como efectoras reclutando factores que, generalmente, inducen la represión de la traducción (tanto inhibiendo su iniciación como su elongación una vez iniciada), deadenilación del ARNm o la degradación del mismo [70, 76].

Si bien la mayoría de los miRNAs de los animales reprimen la traducción de sus targets, se ha encontrado que algunos dirigen el clivaje de sus ARNm target, como lo es el caso del miR-196 con su target *HOXB8* [72]. A su vez, el grupo de Place et al. ha demostrado un mecanismo de inducción de la expresión génica mediada por miRNAs. En dicho estudio, observaron que el miR-373 se une, por complementariedad, directamente al promotor de sus genes target (en este caso *E-CADERINA* y *CSDC2*) induciendo así su expresión [77].

Dentro de la secuencia de los ARNm se encuentran los MRE (del inglés, miRNA Recognition Element), que son sitios de unión al miRNA. Generalmente los ARNm contienen varios MRE reconocidos por uno o más miRNAs.

Se descubrió que el dominio en el extremo 5' de los miRNAs que se extiende desde los nucleótidos en las posiciones 2 a 8 es esencial para el reconocimiento de los target. El mismo se denomina “secuencia semilla” (en inglés, seed sequence) y es considerado el sitio canónico de unión miRNA-target. Los sitios canónicos más fuertes de los genes target son aquellos que son complementarios a la secuencia semilla y que tienen una adenina en oposición al nucleótido 1 del miRNA (conocida como “t1A”). Le siguen, luego, aquellos sitios que son complementarios a la secuencia semilla sin un “t1A”; y aquellos complementarios a los nucleótidos 2-7 sin un “t1A”. El “t1A” no es reconocido por la hebra guía del miRNA sino por un bolsillo de unión de la proteína AGO. Si bien los sitios target que son complementarios a los nucleótidos 2-7 o 3-8 del miRNA son mucho más débiles, son considerados canónicos [73].

Diversos estudios, como fueron ensayos de “cross-linking” entre AGO y los ARNm target, han permitido identificar sitios de unión a los miRNAs no-canónicos (no complementarios a la secuencia semilla). Se determinó, que además de la secuencia semilla, la secuencia 3' del miRNA también contribuye en el reconocimiento del mensajero target [70]. En particular los nucleótidos 13-16, región denominada “región

suplementaria” por algunos trabajos, y puede dirigir a miembros de una misma familia de miRNAs (con la misma secuencia semilla) a distintos sitios de unión de los genes target (Figura 13) [73].

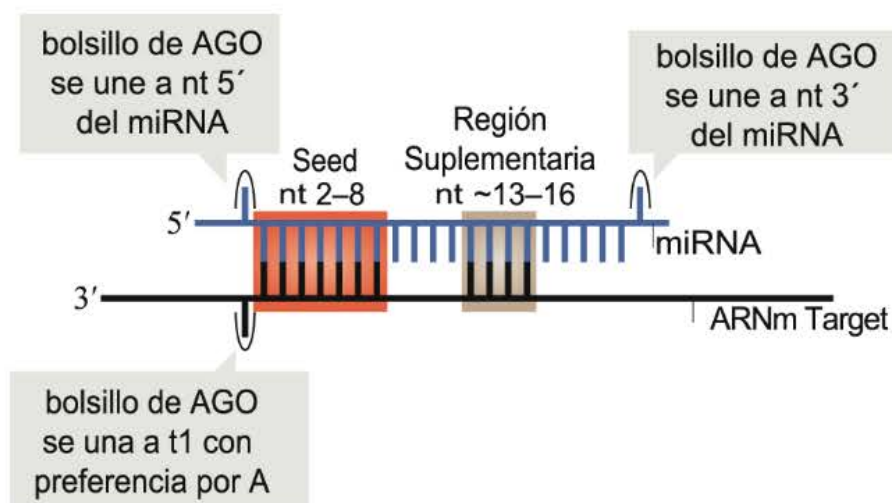


Figura 13. Estructura y función de los miRNAs En la figura puede observarse las distintas regiones de la secuencia de un miRNA, y el apareamiento del mismo con su ARNm target. Figura adaptada de [73].

La unión del complejo AGO-miRNA con un ARNm mediante su secuencia semilla resulta en la represión de la traducción y degradación del mensajero. Aquellos miRNAs que además cuentan con gran complementariedad con su ARNm y el extremo 3' del miRNA pueden ser degradados por una exonucleasa, por medio de un proceso denominado degradación directa del miRNA dirigida por el ARNm target (TDMD, del inglés target RNA-directed miRNA degradation). En el caso en el que el miRNA es totalmente complementario al sitio de unión del ARNm, éste último es clivado al unirse una proteína AGO catalítica o, también, puede ocurrir que esa unión resulte en que el miRNA se descargue de AGO (Figura 14) [73].

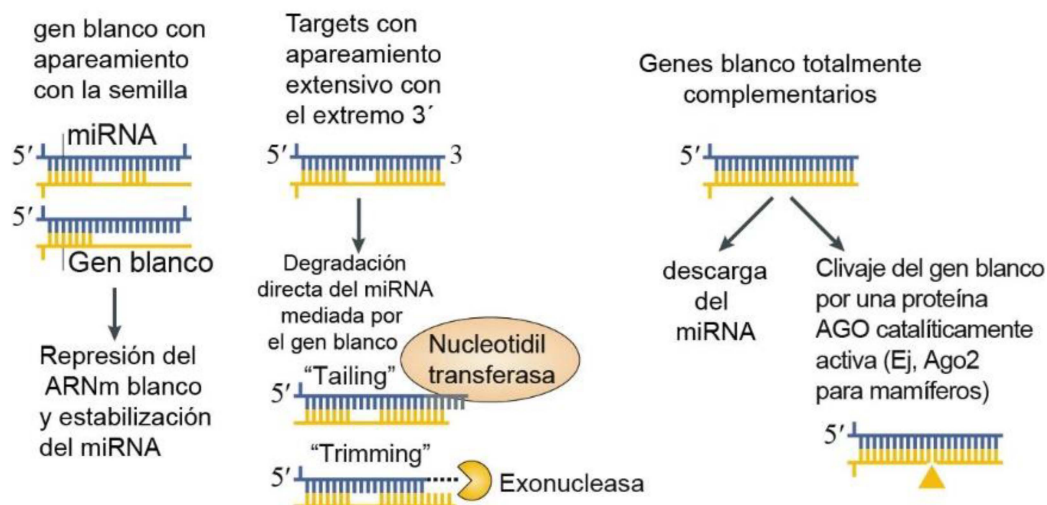


Figura 14. Mecanismos de regulación de los ARNm mediada por miRNAs En la figura puede observarse qué ocurre con el ARNm (represión de la traducción o degradación) dependiendo del tipo de apareamiento que tiene con el miRNA que lo regula. Figura adaptada de [73].

Si bien sitios de unión de los miRNAs están localizados, generalmente, en la región 3' no codificante (UTR, del inglés untranslated region) de los ARNm; se han identificado también sitios de interacción miRNA-ARNm en las regiones 5' UTR e incluso dentro de la secuencia codificante de los mensajeros aunque con menor frecuencia. Por lo tanto, el reconocimiento canónico del 3'UTR debe ser considerado orientador pero no necesariamente el único posible [70, 73].

Nomenclatura y clasificación de los miRNAs

Existen diversos contextos genómicos posibles sobre la localización de las secuencias de los miRNAs. En humanos, la mayoría de los miRNAs canónicos son codificados en intrones de transcritos codificantes o no codificantes, si bien algunos son codificados en regiones exónicas.

Cuando dos o más miRNAs se encuentran ubicados muy próximos en el genoma, se los agrupa en clústeres. Muchas veces, estos miRNAs ubicados tan próximos entre sí constituyen una unidad de transcripción policistónica. Los miRNAs en un mismo clúster son, generalmente, co-transcritos, pero cada uno de ellos puede ser además regulado de manera individual en un nivel post-transcripcional. Dada esta cercanía, estos miRNAs suelen estar bajo el control de los mismos elementos regulatorios (como lo son promotores y enhancers). Los miRNAs de un mismo clúster no necesariamente presentan similitud en su secuencia semilla por lo que no regulan a los mismos genes, sin embargo muchos de los genes que silencian pertenecen a las mismas vías de señalización, actuando de esta manera en cooperación frente a un mismo estímulo [70].

Por otro lado, aquellos miRNAs con una misma secuencia semilla pertenecen a una misma familia de miRNAs. Debido a esto, los miembros de una misma familia van a regular el mismo pool de genes. En un principio, se creía que los miRNAs de una familia regularían la expresión génica de manera redundante, pero luego se determinó que muchas veces los miembros de una familia regulan los mismos genes pero se expresan en diferentes contextos celulares [73].

La nomenclatura de los genes de los miRNAs es algo inconsistente. Aquellos genes descubiertos en los primeros estudios genéticos fueron nombrados de acuerdo a su fenotipo (por ejemplo, *lin-4*, *let-7* y *lsey-6*), mientras que la mayoría de los miRNAs descubiertos a partir de clonaciones o secuenciaciones recibieron nombres numéricos (por ejemplo el homólogo de *lin-4* en otra especie se denomina miR-125).

Cuando los genes codifican miRNAs de una misma familia se indican con letras como sufijos (como por ejemplo miR-125a y miR-125b). En el caso de que un mismo miRNA maduro sea generado por múltiples *loci* por separado, se agrega un sufijo numérico al final del nombre del *loci* del miRNA (como por ejemplo miR-125b-1 y miR-125b-2).

Como mencionamos anteriormente, cada locus produce dos miRNAs maduros a partir de su precursor: uno a partir de la hebra 5' y otro a partir de la hebra 3' (por ejemplo miR-125a-5p y miR-125a-3p). Sin embargo, se ha determinado que una de las hebras (denominada hebra guía) suele ser más predominante (un promedio del 96-99% del total) y biológicamente más activa que la otra hebra (la hebra pasajera, conocida también como miRNA*) [70].

Los miRNAs tienen un patrón de expresión específico de tejidos que está regulado, principalmente de manera transcripcional. Un único miRNA puede silenciar cientos de genes, si bien su efecto en cada gen puede ser moderado; y múltiples miRNAs pueden regular al mismo gen. Además, vías de señalización completas pueden ser reguladas por un solo miRNA o por un clúster de miRNAs (Figura 15) [73].

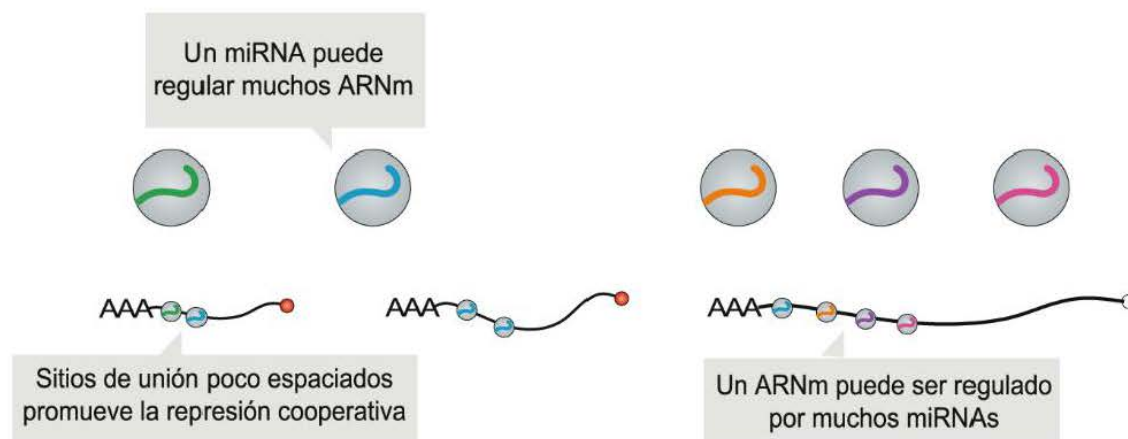


Figura 15. Redes de regulación mediadas por miRNAs | En la figura puede observarse las complejas redes de interacción que forman los miRNAs. Figura adaptada de [73].

Análisis de los genes target: predicciones bioinformáticas y enfoques experimentales

La caracterización funcional de los miRNAs recae fuertemente en la identificación de sus genes target. Esto resulta difícil de caracterizar dado que, como ya mencionamos, cada miRNA tiene múltiples ARNm targets y viceversa. Debido a esto, la identificación de la interacción entre los mismos resulta un desafío. La manera de enfrentar este problema es mediante la predicción de estas interacciones y su posterior validación experimental [78].

En este sentido, las herramientas bioinformáticas han permitido un gran avance. Para las plantas, estas predicciones han sido confiables y poderosas dado que muchos de sus miRNAs son perfectamente complementarios a los sitios de unión en sus genes target. Por otro lado, estas predicciones computacionales resultan ser más difíciles en el caso de los miRNAs de los animales. Esto se debe tanto al largo de los mismos (sólo ~21–25 nt) y a que su apareamiento miRNA-target no es siempre enteramente complementario [72].

Por ello, las predicciones bioinformáticas deben seguir una serie de reglas que se construyeron en base a interacciones miRNA-target conocidas, y que se generalizan para realizar búsquedas en todo el genoma. En concordancia con esto, el grupo de Burge en 2003 desarrolló TargetScan, el primer algoritmo para predecir targets de miRNAs de vertebrados teniendo en cuenta la complementariedad miRNA-target (en particular en la región 5' del miRNA) y la conservación evolutiva entre vertebrados [79].

Con los años, numerosas herramientas para la predicción de targets de miRNAs han sido desarrolladas teniendo en cuenta distintos enfoques para el reconocimiento de la interacción miRNA-target. Cada una de ellas utiliza distintos parámetros y algoritmos. Los parámetros que más se tienen en cuenta son: secuencia semilla y complementaria del miRNA, regiones de unión en el ARNm (3' UTR, 5' UTR o región codificante), principios termodinámicos, conservación de la secuencia entre especies [78].

Con la aparición de todas estas herramientas de predicción, es recomendable utilizar en simultáneo varias de ellas de modo de identificar los genes target con un grado de confianza mayor. Algunos programas disponibles, como el programa miRwalk (<http://mirwalk.uni-hd.de/>) utilizado en el presente trabajo, utilizan la conjunción de los resultados de varios algoritmos (TargetScan, miRDB y miRTarBase) para aumentar la capacidad de predicción.

Dado que ninguno de estos métodos tiene en cuenta la posibilidad de interacciones tejido-específicas, los enfoques experimentales para determinar los target de los miRNAs son esenciales para poder confirmar su relevancia biológica. Además, el enorme número de genes target obtenidos a partir de las predicciones bioinformáticas genera un desafío a la hora de seleccionar cuales valen la pena validar experimentalmente.

En este sentido, se desarrollaron métodos con tecnología *high-throughput* tanto en combinación con sobre-expresión/inhibición de los miRNAs como, en otros casos, el aislamiento bioquímico de los ARNm que se unen a los miRNAs.

Uno de los enfoques más utilizados es el uso de moléculas sintéticas como lo son los *mimics/inhibitors*. Después de la transfección de los mismos, se busca analizar cambios en la expresión de los ARNm mediante análisis high-throughput o de proteínas mediante proteómica.

Algunos métodos utilizados para recuperar los ARNm unidos al complejo RISC-miRNA se llevan a cabo mediante la inmunoprecipitación de alguno de los componentes del complejo, normalmente en combinación con la sobre-expresión/inhibición del miRNA de interés. Luego, los ARNm recuperados pueden ser detectados de manera individual mediante una RT-qPCR o por técnicas de *high-throughput* [80].

miRNAs en los procesos de pluripotencia y diferenciación

Se ha determinado que los miRNAs están implicados en las decisiones sobre el destino celular de las células madre [81]. Esto es particularmente importante durante la embriogénesis, donde los programas de expresión génica cambian dentro de ventanas temporales muy cortas del desarrollo.

Los mecanismos que controlan la pluripotencia y la diferenciación durante el desarrollo temprano han sido mejor estudiados en las células madre embrionarias (CMEs). La primera evidencia sobre el rol esencial de los miRNAs en estos procesos provino del análisis de CME murinas con deleciones en los genes que codifican a Dicer y Dgcr8. Se observó que dichos silenciamientos daban como resultado defectos en la proliferación y diferenciación de las CMEm [82].

La función global de la vía de los miRNAs en el desarrollo se evaluó en ratones mutantes para Dicer (proteína involucrada tanto en la vía de los miRNAs como de los siRNAs) y DGCR8 (proteína involucrada en la vía de los miRNAs) respectivamente. En dichos estudios se observó que la deleción de Dicer era letal embrionaria, lo que indicó un rol esencial de los miRNAs en el desarrollo. Dado el rol de Dicer en la biogénesis de otras especies de pequeños ARNs, la pérdida de los miRNAs podría no ser la única responsable de dicho fenotipo.

A su vez, las CMEm deficientes para Dgcr8 (al igual que aquellas deficientes para Dicer) también presentaban una expresión reducida o retardada de los marcadores de diferenciación como una que forman parte de una red regulatoria compleja [81].

Las CMEs expresan una serie de miRNAs específicos que forman parte de una compleja red regulatoria que controla su fenotipo [82]. Diversos grupos de investigación han buscado definir el perfil de expresión de los miRNAs de las CMPs en comparación con su progenie diferenciada. Ciertos miRNAs están

implicados en la proliferación de las CMEs, entre los que se destaca la familia del miR-302 debido a su abundancia y especificidad celular [83].

La familia del miR-302 es una familia de miRNAs altamente expresados en CMEhs y CMPihs. La misma incluye un clúster de 8 miRNAs (miR-302a/a*/b/b*/c/c*/d, y miR-367). Esta especie de miRNA es la más predominante en las CMPhs. Los factores de transcripción OCT4, SOX2 y NANOG se unen al promotor del miR-302-376 y regulan su transcripción. A su vez, estos miRNAs son necesarios para la expresión de estos factores de pluripotencia formando así un loop positivo de auto regulación en las CMPhs [81].

Además, en 2011, el grupo de Anokye-Danso et al. puso en evidencia la importancia de este clúster en las CMPs al reportar la reprogramación eficiente de células somáticas de ratón y humanas mediante la sobre-expresión del miR-302/367 y sin la necesidad de factores adicionales [84].

Se descubrieron otros miRNAs involucrados en la regulación de la pluripotencia y diferenciación de las CMPhs.

Entre ellos, se determinó que la expresión del miR-145 aumenta de manera significativa durante la diferenciación y reprime la pluripotencia de las CMEhs inhibiendo la expresión de los factores de transcripción *OCT4*, *SOX2* y *KLF4*. Este miRNA, a su vez, es reprimido por OCT4, formándose así un loop de *feedback* negativo. Por otro lado, los miR-134, miR-296 y miR-470 tienen como target los factores *SOX2*, *NANOG* y *OCT4*, regulando así la pluripotencia de las CMPs [81]. Entre ellos, los miR-145 y miR-296 son predominantes debido a su habilidad para restringir la proliferación [83].

En cuanto al proceso de diferenciación, se han descubierto numerosos miRNAs que cumplen un rol importante en la regulación transcripcional de genes del desarrollo involucrados en las diferenciaciones a los distintos linajes y tipos celulares (Figura 16).

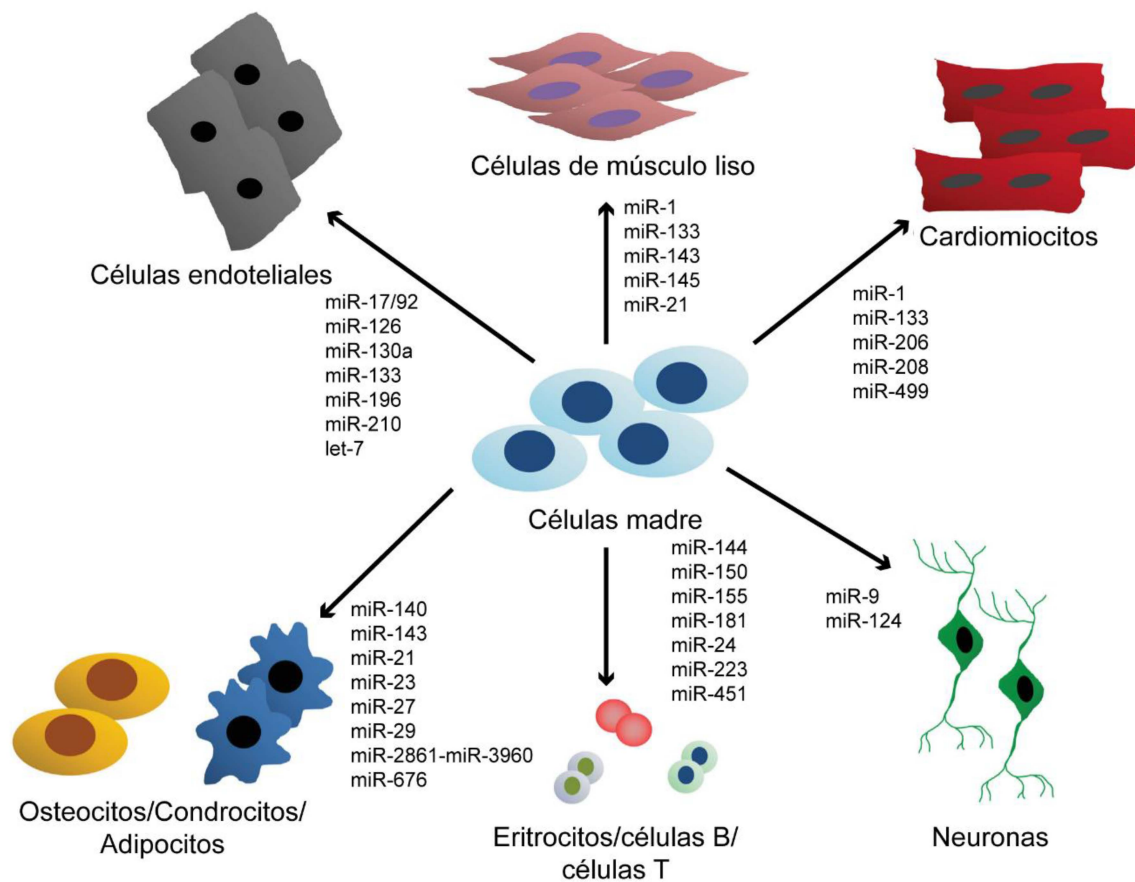


Figura 16. miRNAs en las diferenciaciones celulares En la figura puede observarse los miRNAs involucrados en las diferenciaciones hacia células de cada linaje en particular. Figura adaptada de [81].

miRNAs y neurogénesis

Durante el desarrollo del Sistema nervioso central, la neurogénesis requiere de un patrón de expresión génica precisamente regulado de modo que se generen los distintos tipos celulares en el tiempo y espacio adecuado [85].

Como mencionamos anteriormente, algunos miRNAs se expresan de manera específica en el sistema nervioso [86]. En un estudio se silenció, de manera condicional, la proteína Dicer en ratones, y se observó una disminución en el tamaño del cerebro anterior de los mismos. Este fue el primer indicio de que los pequeños ARNs podrían tener un rol durante el desarrollo del sistema nervioso central [87]. Además, la deficiencia de Dicer en CMN dio como resultado células capaces de auto-renovarse pero con núcleos grandes, diferenciación anormal e inicio de apoptosis al ser retirados los mitógenos del medio. Se observó, también, que la delección de Dicer en células de Purkinje (células neuronales) resultó en la muerte celular neuronal, lo que indicó un rol de los miRNAs en mantener la supervivencia y diferenciación de las CMN y de las neuronas.

Diversos estudios han identificado distintos miRNAs como reguladores importantes durante la neurogénesis (Figura 17). A continuación haremos una breve descripción de cada uno de ellos.

En cuanto a aquellos involucrados en la regulación de las CMN y PN encontramos a los miR-134, miR-137 y miR-25.

El miR-134 pertenece al cluster miR-379/410. El mismo induce la diferenciación de las CMEs, favoreciendo la misma hacia el linaje ectodérmico incluyendo las células neurales. Este miRNA regula de manera directa la expresión de los factores de pluripotencia *NANOG* y *SOX-2*; y de manera indirecta *OCT-4* en combinación con los miR-296 y miR-470 [88, 89].

El miR-137 es un miRNA que se expresa en las CMN adultas. Se observó que la expresión de este miRNA está finamente regulada para mantener la correcta tasa proliferativa de las CMN sin perder su potencial de diferenciación. En este sentido, altos niveles de este miRNA promueven la proliferación de las CMN mientras que bajos niveles promueven su diferenciación [85].

El receptor TLX se expresa particularmente en las CMN ventriculares del cerebro embrionario. Este receptor regula, de manera positiva, la proliferación celular y auto-renovación de las CMN de ratón mediante la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina e inhibición del inhibidor p21 y el gen supresor de tumores PTEN. Se ha demostrado recientemente que el miR-137 tiene como blanco la demetilasa 1 específica de lisina de histona (LSD1, del inglés histone lysine-specific demethylase), la cual es un represor de TLX. De este modo, el miR-137 promueve la expresión de TLX y la auto-renovación de las CMN [90].

El miR-25 forma parte del clúster miR-106-25 evolutivamente conservado. Se ha observado que su sobre-expresión en CMN promueve la proliferación de CMN y PN de ratones adultos en cultivo. Se cree que este efecto se debe, en parte, a que el inhibidor del ciclo celular p57 es un gen target del miR-25. Sin embargo, poco se sabe del rol de este miRNA durante el desarrollo del sistema nervioso central.

El miR-200 también resulta importante en el potencial proliferativo de los PN dado que regula de manera negativa la expresión de *SOX-2* y *E2F3* [85].

El miR-125b promueve la diferenciación neuronal a partir de CMN y PN humanas [91]. Además, se ha descrito que este miRNA modula la proliferación, diferenciación y migración de las CMN/NP, y dicho rol sería mediante la represión de la expresión de *NESTINA* [92].

Además, se han descrito miRNAs con un rol esencial en la diferenciación neuronal. Entre ellos, encontramos tres miRNAs altamente conservados en la evolución: *let-7*, miR-124 y miR-9.

La familia de *let-7* es una de las familias de miRNAs con la expresión más alta en CMN y PN. Se descubrió que *let-7b* favorece la proliferación de las CMN y bloquea su potencial de diferenciación neuronal mediante la regulación negativa que genera sobre distintos genes como lo son la *CICLINA D1* y el receptor nuclear *TLX* [93].

El potencial de que un único miRNA actúe como determinante del destino celular fue demostrado cuando la sobre-expresión del miR-124 indujo un perfil de expresión génica de tipo neuronal en células Hela al tener como blanco genes no-neuronales [94].

Este miRNA es uno de los más expresados en las células neuronales junto con el miR-9. Se ha reportado que los mismos aumentan su expresión durante el desarrollo del cerebro y durante la progresión del linaje de los progenitores neuronales [81].

A partir de experimentos de ganancia y pérdida de función se determinó que la expresión de este miRNA es esencial para la inducción del destino celular neuronal induciendo la salida del ciclo celular de las CMN.

El miR-9, por otro lado, inhibe la migración de los PN al tener como blanco al gen Stathmin (*STMN1*), el cual aumenta la inestabilidad de los microtúbulos lo cual facilita la migración. En este sentido, al sobre-expresarse este miRNA, la proliferación de los PN se promueve y, al mismo tiempo, se inhibe su capacidad migratoria. Esto genera un retraso en el progreso de los PN a un estado más maduro para lo que requieren, no solo salir del ciclo celular, sino también migrar.

Una de las características más remarcables de los miR-9 y miR-124 se determinó en un estudio en el cual se reportó que la expresión de los miR-9/9* y miR-124 en fibroblastos humanos indujo su conversión directa a neuronas, proceso que fue facilitado con la adición de varios factores de transcripción incluyendo a NEUROD2, ASCL1 y MYT1L. Lo más llamativo fue que los autores encontraron que solo con la expresión de los factores de transcripción sin los miRNAs, la conversión era ineficiente. Demostraron así el rol crítico de los miRNAs en la determinación del destino neural [95].

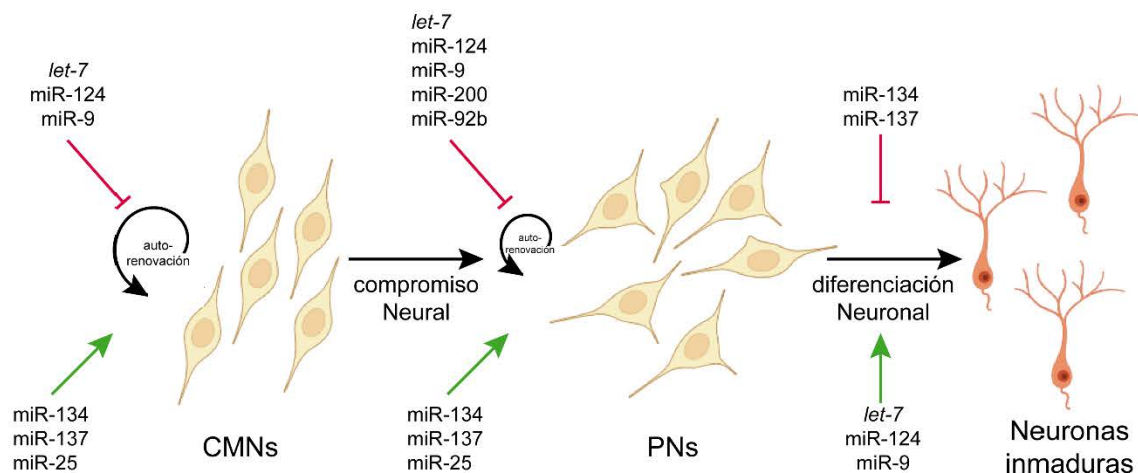


Figura 17. miRNAs descritos en la diferenciación neuronal En la figura pueden observarse los miRNAs que han sido estudiado hasta el momento, involucrados en la regulación de la diferenciación neuronal a partir de CMN. Figura adaptada de [85].

miRNAs y el ciclo celular

Existe gran cantidad de evidencia que demuestra que los miRNAs son agentes importantes en la regulación de muchos genes y vías de señalización involucrados en el ciclo celular [96].

En particular, se determinó que muchos miRNAs tienen como target transcriptos que, directa o indirectamente, coordinan la progresión del ciclo celular de las células madre. Sin embargo, los mecanismos que regulan el ciclo celular en estas células no están aún del todo esclarecidos [97].

Algunos estudios han descubierto que ciertos miRNAs tienen roles compartidos como reguladores de la transición G1/S en las CMEhs. Entre ellos se encuentra el estudio llevado a cabo por el grupo de Deborah et al. que descubrió que los miRNAs del clúster miR-302 (el cual describimos en la sección anterior), promueven la transición G1/S en las CMEhs [98].

Este grupo determinó, además, que dicho clúster reprime la traducción de la *CICLINA D1*, y la inhibición del mismo, conduce a la acumulación de las CMEhs en la fase G1 del ciclo celular [98]. Sin embargo, aún no es claro que la inhibición de la *CICLINA D1* sea lo que promueve la transición G1/S en este tipo celular, por lo que una investigación más profunda es necesaria [96].

Otro estudio llevado a cabo por el grupo de Qi et al., obtuvo resultados que confirman el rol de los miRNAs en el mantenimiento de la división y auto-renovación normal de las células madre. En dicho estudio, utilizando ARN de interferencia, silenciaron las proteínas de procesamiento de los miRNAs: DICER y DROSHA [99]. A partir de estos experimentos, determinaron que la proliferación de las CMEhs se atenuaba cuando la vía de los miRNAs era perturbada. Además, lograron parcialmente restaurar el crecimiento celular normal mediante la introducción en las células de los miRNAs maduros miR-195 y miR-372. Estos miRNAs regulan dos genes supresores de tumores respectivamente: *WEE1*, que codifica una quinasa que modula negativamente la transición G2/M mediante la regulación del complejo CICLINA B/CDK; y *CDKN1A*, que codifica a p21, inhibidor del complejo CICLINA E/CDK regulando así la transición G1/S [96, 99].

Toda esta información respalda un modelo en donde diversos miRNAs controlan el ciclo celular de las CMPs mediante la regulación de moduladores negativos del ciclo celular y, así garantizar, una reposición adecuada de dicha población celular [99].

Por último, y mediante estudios previos, se demostró también que los niveles de expresión de miRNAs alterados pueden contribuir a condiciones patológicas, como el cáncer, debido a la pérdida de la regulación del ciclo celular [97].

A partir de toda esta información, podemos ver la importancia que tienen tanto los factores reguladores del ciclo celular como los miRNAs, en el mantenimiento de la pluripotencia de las CMPs y en su proceso

de diferenciación. Existen, sin embargo, muchas preguntas para responder sobre la regulación y expresión de los mismos en estos tipos celulares, y en su progenie. Consideramos esencial, entonces, profundizar su estudio para desenmarañar los complejos mecanismos e interacciones moleculares de este campo de investigación. Dicho conocimiento permitirá diseñar estrategias efectivas para controlar las redes transcripcionales que regulan dichos procesos y, potencialmente, desarrollar nuevas terapias para la medicina regenerativa.

Hipótesis y objetivos

A lo largo de la introducción se describieron las características y los roles de los microARNs como reguladores post-transcripcionales de un gran número de genes relacionados con numerosos procesos biológicos claves, incluyendo el mantenimiento de la pluripotencia, el ciclo celular y la especificación a un determinado linaje. Además, destacamos la estructura atípica del ciclo celular de las células madre pluripotentes humanas, caracterizada por una fase G1 abreviada y puntos de control ausentes. Mencionamos también la importancia de los complejos de ciclinas/quinasas dependientes de ciclinas (ciclinas/CDKs) y los factores de transcripción E2F como reguladores principales de la progresión del mismo. Numerosos estudios destacan la importancia y estrecha relación entre el control del ciclo celular de las células madre pluripotentes humanas y el mantenimiento de la pluripotencia o el proceso de diferenciación de las mismas. A lo largo del desarrollo las células deben proliferar hasta alcanzar un número apropiado, y luego, deben salir del ciclo celular para iniciar procesos de diferenciación. El momento preciso en el cual una célula debe salir del ciclo celular e iniciar su diferenciación es crítico, dado que impacta directamente tanto en el número total como en el tipo de célula que se genera. Hasta el presente, la forma en la cual los procesos de proliferación y diferenciación son coordinados durante las etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso central no ha podido ser esclarecida por completo. Debido a esto, el objetivo general de esta tesis consiste en analizar y estudiar tanto la expresión y regulación de los complejos que operan en la fase G1 del ciclo celular a lo largo de la diferenciación de las células madre pluripotentes humanas a neuroprogenitores; como también dilucidar la participación de los microARNs tanto en la regulación del ciclo celular, en particular aquellos regulados por los factores de transcripción E2F, como en el proceso de diferenciación celular a neuronas.

A partir de este objetivo general, se desprenden los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Validar el fenotipo de las líneas de células madre pluripotentes humanas (CMPh) (embrionarias e inducidas) utilizadas. Generar progenitores neurales y neuronas diferenciadas a partir de las mismas.

Objetivo 2. Analizar la expresión y actividad de factores reguladores de la fase G1 del ciclo celular tanto en las CMPhs como en los progenitores neurales.

Objetivo 3. Estudiar el perfil de expresión temporal a lo largo del ciclo celular de las CMPhs de microARNs esenciales para mantener la pluripotencia como aquellos que se inducen durante la diferenciación como lo son la familia del miR-302 y los miR-145 y miR-296 respectivamente.

Objetivo 4. Identificar microARNs regulados por los factores de transcripción E2F CMPhs mediante secuenciación masiva de ARN. Utilizar herramientas bioinformáticas para establecer genes blanco, ontología génica y aquellos microARNs expresados diferencialmente.

Objetivo 5. Establecer el miRNoma que caracteriza a las CMPhs, las células madre neurales (CMN) generadas a partir de estas, y las neuronas diferenciadas a partir de las mismas; mediante una secuenciación masiva de ARN. Utilizar herramientas bioinformáticas para establecer genes blanco, ontología génica y aquellos microARNs expresados diferencialmente.

Objetivo 6. Modular la expresión de los microARNs identificados en los objetivos anteriores para dilucidar su función biológica.

Como mencionamos previamente, numerosa evidencia apoya la existencia del papel crítico que poseen los microARNs en la regulación de la diferenciación al linaje neural y la del ciclo celular asociada a la misma; y la importancia y asociación de este último con la pluripotencia de las células madre pluripotentes humanas. En base a lo expuesto, el presente trabajo implicó por un lado el desarrollo de un modelo *in vitro* de neurogénesis con el objetivo de identificar aquellos microRNAs que participan tanto en el ciclo celular de las CMPhs como en el proceso de diferenciación de las mismas a progenitores neurales; y la caracterización de ciertos agentes reguladores del ciclo celular de CMPhs por el otro.

Postulamos entonces como **hipótesis**, que el modelo experimental desarrollado en este trabajo permitirá identificar y caracterizar microARNs aún no asociados a la diferenciación neuronal a partir de CMPhs, y al ciclo celular de las mismas, en particular aquellos regulados por los factores de transcripción E2F.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Para la realización del presente trabajo se utilizaron la línea de CMEhs, WA09 (H9) adquirida del Instituto WiCell de la Universidad de Wisconsin, la línea de CMPihs FN2.1 generada en nuestro laboratorio [100], y fibroblastos dérmicos humanos derivados de prepucio (FH).

La generación de CMPihs no formó parte de los objetivos propuestos en este trabajo de investigación. Las mismas fueron previamente reprogramadas a partir de los FH ya mencionados. Para tal fin se empleó un vector lentiviral [101] que porta la secuencia de los genes *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, y *c-MYC* que codifican para factores de transcripción cruciales para la determinación y mantenimiento de la pluripotencia.

Los FH fueron derivados previamente a partir de tejido sano de un paciente sometido a un procedimiento quirúrgico, bajo el consentimiento informado del donante y aprobación del comité de ética institucional.

La línea de células madre enriquecida en glioma (GSC-ECLs, del inglés stem cell-enriched cell lines), denominada G08, utilizada como control positivo de la marcación de GFAP en la diferenciación astrocitaria, se aisló y caracterizó previamente en nuestro laboratorio. La misma se aisló de biopsias de glioblastoma multiforme (GBM) humana, bajo el consentimiento informado del donante y aprobación del comité de ética institucional, y caracterizó como se describe en informes anteriores [102, 103]. Las mismas fueron cultivadas en medio TSM [Neurobasal (Invitrogen), suplementado con N2 y B27 (Invitrogen), 20ug/ml insulina bovina (Sigma), 75ug/ml seroalbúmina bovina baja en endotoxinas (Sigma), L-Glutamina (2mM concentración final), 50 U/ml P/E; aminoácidos no esenciales (2mM concentración final), 20ng/ml EGF (Invitrogen) y 20ng/ml bFGF]. Las células tumorales fueron cultivadas en placas pre-tratadas con laminina o geltrex por 30 minutos a 37°C.

Diferenciación de CMPhs mediante la formación de cuerpos embrioides

Las CMPhs indiferenciadas cultivadas en co-cultivo con fibroblastos embrionarios murinos irradiados (MEFi), fueron tratadas con una solución 1mg/ml de Colagenasa durante 60 minutos. Una vez que se desprendieron las colonias de CMPhs, fueron diluidas en PBS y colectadas en un tubo cónico de 15 o 50 ml y se las dejó decantar. Luego se procedió a cultivar estas colonias en flotación en medio DMEM suplementado con 20% v/v de suero fetal bovino (SFB). Dichas colonias después de aproximadamente 24 hs forman agregados celulares tridimensionales, denominados cuerpos embrioides (EBs, del inglés embryoid bodies). A estos EBs se los cultivó en suspensión en placas no adherentes en el medio recientemente indicado. Al cabo de 7 días los EBs fueron adheridos en placas pre-tratadas con gelatina 0,1% y se los cultivó en el mismo medio por 7 días más. Este protocolo de diferenciación, sin factores definidos, permite obtener, luego de 14 días, agregados celulares que expresan marcadores de las tres

capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Normalmente entre 2 y 4 días post adhesión se observan estructuras características de la diferenciación como neuro-rosetas, proyecciones neurales y áreas contráctiles que contienen cardiomiocitos.

Diferenciación de CMEhs a progenitores neurales (PN)

La generación de PN no formó parte de los objetivos propuestos en este trabajo de investigación, pero debido a la gran variedad de protocolos disponibles en la literatura se detalla la metodología que fue utilizada para la obtención de los PN en nuestro laboratorio, los cuales se utilizaron en la primer parte de la presente tesis. Para ello, CMEhs H9 indiferenciadas cultivadas en co-cultivo con MEFi, fueron tratadas con Colagenasa durante 40-60 minutos. Una vez que se desprendieron las colonias de CMEhs, las mismas se lavaron y levantaron con PBS, y se dejaron decantar en un tubo cónico. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1-2 ml de HES (DMEM/F12 (Gibco) suplementado con 20% Knock Out Serum Replacement (KSR) (Gibco), aminoácidos no esenciales (2mM concentración final), L-glutamina (2mM concentración final), 50 U/ml P/E, y β -Mercaptoetanol 55mM (Gibco) sin bFGF y colocó en una T75 con 15-18 ml de ese medio. Se dejó incubar la T75 en posición vertical durante 1 día a 37°C y 5% CO₂. En el día 2 de diferenciación se sacó la mitad del medio con la decantación en la arista y se repuso el volumen con HES 10% KSR sin bFGF y se dejó incubar durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego se decantó el medio en la arista, se lo descartó totalmente y reemplazó por el medio de cultivo denominado medio de inducción neural 1 (NIM) compuesto por: DMEM/F12, suplemento N2 1X, amino ácidos no esenciales (2mM concentración final) y 1 µg/ml heparina. Los agregados celulares fueron mantenidos en flotación cambiando el 50% del medio de cultivo cada 24 horas. Luego de realizado un pre-tratamiento con laminina 15-20 µg/ml en gota de 300 µl en una placa multipocillo de 6 pocillos o en una placa p60 se retiró la misma y colocó 300 µl de medio NIM sobre la gota. En cada pocillo se agregaron 30-40 cuerpitos (contados en cámara de Neubauer sin vidrio) y se pusieron a incubar durante 2-3 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, se agregaron 2 ml de NIM y se incubaron nuevamente a 37°C y 5% CO₂ durante toda la noche. Día por medio se cambió el 50% del medio de cultivo. Se dejaron incubando durante 9-12 días hasta la formación de neurorosetas. Luego las mismas fueron seleccionadas mecánicamente con un rascador de células y transferidas a una T25 para ser cultivadas en suspensión en el medio de inducción neural completo [suplementado además con B27 1X (Invitrogen). Las mismas fueron cultivadas cambiando el 50 % del medio cada 2-3 días, durante aproximadamente 12-15 días. Luego se procedió a la disgregación mecánica y enzimática de éstas, utilizando 1:1 de Tripsina/EDTA y Acutasa (Invitrogen). Por último, se lavó la enzima en las células resultantes y las mismas se resuspendieron en medio de cultivo TSM compuesto por: Neurobasal (Invitrogen), suplementos N2 y B27 1X (Invitrogen), 20 µg/ml insulina bovina (Sigma), 75 µg/ml seroalbúmina bovina baja en endotoxinas (Sigma), L-Glutamina (2 mM concentración final), 50 U/ml P/E; aminoácidos no esenciales (2mM concentración final), 20 ng/ml EGF (Invitrogen) y 20 ng/ml bFGF; y plaqueadas en una T25

pre-tratada por 30 minutos a 37°C con Geltrex (matriz extracelular comercial) (Invitrogen). Luego de algunas semanas fue posible detectar una población celular homogénea con características de PN.

Propagación y criopreservación de PN

Los pasajes fueron realizados cuando el cultivo de los PN presentaba una confluencia cercana al 90%. Para ello, se aspiró el medio, se realizó un lavado con PBS y se incubaron las células en 300µl de Acutasa durante aproximadamente 1 minuto a 37°C. Luego de que las células perdieran completamente la adherencia fueron transferidas a un tubo cónico, centrifugadas a 300 x g durante 5 minutos y resuspendidas en el medio de cultivo TSM. Por último la suspensión celular se transfirió a placas de cultivo pre-tratadas con laminina diluida en PBS en una concentración de 10 µg/ml. Las células fueron amplificadas en una proporción 1:3 cada 5 días aproximadamente.

Para la criopreservación de los PN, las células provenientes de una T25 confluyente, fueron disociadas como se describió en el párrafo anterior, y la suspensión fue transferida a un tubo cónico conteniendo 9 ml de medio de cultivo TSM. Luego se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 2ml de TSM con 10% v/v DMSO. La suspensión celular fue fraccionada a razón de 1 ml por criotubo. Los criotubos fueron guardados rápidamente en un contenedor para congelamiento con isopropanol por 24 horas a -80°C. Finalmente se los almacenó en un tanque de nitrógeno líquido. Para descongelar las células, los viales fueron removidos del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente calentados a 37°C mediante inmersión en un baño térmico. Inmediatamente se transfirió el contenido de cada criotubo a un tubo cónico con 10 ml de medio TSM. Se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 300 x g, se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de TSM, sembrándose las células en una botella T25.

Diferenciación de PN a neuronas

Para la diferenciación neuronal, los PN fueron suspendidos en medio Neurobasal suplementado con B-27, N2, 2mM L-glutamina, 2mM de aminoácidos no esenciales, 50 U/ml penicilina/streptomycin (Invitrogen), 20µg/ml insulina de páncreas bovina y 75 µg/ml albúmina sérica bovina de baja endotoxina (Sigma) como agregados flotantes por tres días. Luego, el medio fue reemplazado por medio de inducción neural (DMEM/F12 suplementado con N-2, 2mM de aminoácidos no esenciales y 1 µg/ml heparina) y agregados celulares fueron expandidos por 10 días. El medio fue cambiado cada dos días. Luego de la expansión neural, los agregados (neurosferas) se pusieron a adherir en placas pre-tratadas con laminina 10 µg/ml con medio de diferenciación neural (medio Neurobasal suplementado con B-27, N2, 10 µg/ml BDNF (Gibco), 10 µg/ml GDNF (Gibco), 200 µg/ml ácido ascórbico (Sigma), 0.1 µM AMPc (Sigma) y 20 µg/ml de laminina por 10 días. El medio fue cambiado cada dos días.

Diferenciación de CMPhs a células madres neurales (CMN)

La generación de CMN fue uno de los principales objetivos propuestos en este trabajo de investigación.

Para realizar la inducción de CMPhs a CMN, partimos de CMEhs H9 o CMPihs FN2.1 crecidas sobre placas multipocillo de seis pre-tratadas por una hora a temperatura ambiente con una matriz extracelular comercial rica en Vitronectina (VTN-N, Thermo Fisher), cultivadas con medio definido E8 (Thermo Fisher). Una vez alcanzado un 70-80% de confluencia, las células se disgregaron a estadio unicelular con Acutasa (Invitrogen) por 5 minutos a 37°C y 5% CO₂, y se pasaron con PBS a un tubo cónico de 15 ml; de la suspensión celular de CMPhs, una sexta parte se separó para estimar el número total de CMPhs viables por medio de una tinción con azul de Tripán (solución 0,4%, SIGMA) y posterior recuento celular en cámara de Neubauer. Luego el tubo cónico de 15 ml con la suspensión de células fue centrifugado a 200 x g por 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y se sembró una concentración celular de 30000 células por pocillo sobre placas multipocillo de seis pre-tratadas con la matriz extracelular comercial Geltrex (Thermo Fisher) con medio de cultivo E8 (Thermo Fisher) suplementado con inhibidor de Rock 10µM (necesario para mantener la sobrevida de las células luego del pasaje). A las 24 horas se inició la inducción neural, partiendo de una confluencia del 15-25%. Para ello, se aspiró el medio y se agregó 2,5 ml de medio de inducción neural (compuesto por medio Neurobasal y el suplemento de inducción neural 50X provisto en el kit) a cada pocillo. En el día 2 de inducción neural, se corroboró que la morfología de las células fuera la adecuada, y en el caso de observar colonias diferenciadas a una morfología no-neural, las mismas fueron aspiradas. En el día tres, se les cambió el medio por 2,5 ml de medio de inducción neural pre-calentado. Al cuarto día, se les cambió el medio por 5 ml de medio de inducción neural pre-calentado en cada well. Al quinto día, nuevamente se les cambio el medio por 5 ml de medio de Inducción neural pre-calentado. Al sexto día, las células se diferenciaron a CMN, se expandieron y criopreservaron.

Diferenciación de CMN a Neuronas

Las CMN expandidas fueron disgregadas con Acutasa (Invitrogen) y sembradas en placas multipocillo pre-tratadas por 30 minutos a 37°C con matriz extracelular comercial Geltrex (Thermo Fisher) en una confluencia del ~30%. Para la diferenciación neuronal, las mismas fueron cultivadas en un medio de diferenciación neuronal compuesto por medio Neurobasal (Invitrogen), L-Glutamina (2mM concentración final), aminoácidos no esenciales (2mM concentración final), antibiótico (2 mM concentración final), suplemento B27 1X (Invitrogen), ácido L-ascórbico (200 µM) y los factores BDNF (20 ng/ml) y GDNF (20 ng/ml) por 14 días; cambiando el medio día por medio.

Diferenciación de CMN a Astroцитos

Las CMN expandidas fueron disgregadas con Acutasa (Invitrogen) y sembradas en placas multipocillo pre-tratadas por 30 minutos a 37°C con matriz extracelular comercial Geltrex (Thermo Fisher) en una

densidad de 5×10^4 células por cm^2 . Para la diferenciación a astrocitos, las mismas fueron cultivadas en un medio de diferenciación a astrocitos compuesto por medio DMEM (Invitrogen), suplemento N2 1X (Invitrogen) y 1% de SFB por 21 días, cambiando el medio día por medio.

Diferenciación de CMN a Oligodendrocitos

Las CMN expandidas fueron disgregadas con Acutasa (Invitrogen) y sembradas en placas multipocillo pre-tratadas por 30 minutos a 37°C con matriz extracelular comercial Geltrex (Thermo Fisher) en una densidad de 5×10^4 células por cm^2 . Para la diferenciación a oligodendrocitos, las mismas fueron cultivadas en un medio de diferenciación compuesto por Medio DMEM/F12 (Invitrogen), suplemento N2 1X (Invitrogen) y los factores bFGF (10 ng/ml) y EGF (20 ng/ml) por seis días. Luego, se cambió el medio por el mismo incluyendo el factor de crecimiento PDGF-AA (10 ng/ml) (Invitrogen) por cuatro días. Finalmente, se cambió el medio por el mismo sin los factores de crecimiento y el suplemento N2, e incluyendo T3 (30 ng/ml) (Sigma-Aldrich), NT3 (5 ng/ml) (Invitrogen), ácido ascórbico $200 \mu\text{M}$ y suplemento B27 1X (Invitrogen) por cuatro días.

Cultivo y criopreservación de FH

Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM 10% v/v SFB y mantenidas en incubadora a 37°C y 5% CO_2 . Los sucesivos pasajes se realizaron cuando los FH llegaban a confluencia. Para ello, las células se lavaron con PBS y luego se incubaron durante 5 minutos a 37°C y 5% CO_2 con 1ml de una solución 0,25% de Tripsina/EDTA (Gibco); la tripsina se inactivó agregando 9 ml del medio de cultivo DMEM 10% v/v SFB. Se transfirió la suspensión celular a un tubo cónico de 15 ml. Luego de una centrifugación durante 5 minutos a $200 \times g$, se eliminó el sobrenadante, se realizó un lavado con PBS y se resuspendió en medio de cultivo DMEM 10% v/v SFB. Luego, las células se sembraron en una botella de cultivo T25 o T75 y se colocaron en una incubadora a 37°C y 5% CO_2 .

Para la criopreservación de los FH, las células fueron resuspendidas en 1ml de DMEM y con 20% v/v SFB y 10% v/v dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich). El medio de criopreservación fue agregado a las células de forma lenta y mezclando suavemente. La suspensión celular fue fraccionada a razón de 1ml por criotubo (Corning). Éstos fueron guardados rápidamente en un contenedor para congelamiento con isopropanol por 24 horas a -80°C , permitiendo un descenso de la temperatura a razón de $1^\circ\text{C}/\text{minuto}$. Finalmente se los almacenó en un tanque de nitrógeno líquido. Para su descongelación, los viales fueron removidos del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente calentados a 37°C hasta observarse líquido el medio de criopreservación. Inmediatamente las células se centrifugaron diluyendo el medio de criopreservación con DMEM 20% v/v SFB y posteriormente fueron cultivadas en DMEM 10% v/v SFB.

Cultivo y criopreservación de CMPhs con medios comerciales definidos

Para cultivar las CMPhs (tanto CMEhs como CMPihs), las mismas se crecieron sobre placas multipocillo pre-tratadas 30 minutos a 37°C con Geltrex (Thermo Fisher) o 1 hora a temperatura ambiente con Vitronectina (VTN-N, Thermo Fisher), evitando así el co-cultivo con fibroblastos de embriones de ratón irradiados (MEF, del inglés, murine embryonic fibroblast). Las células fueron mantenidas de ésta manera en estado de indiferenciación cultivándolas con medios totalmente definidos mTeSR1 (Stem Cell Technologies), E8 (Thermo Fisher) o TeSR-E8 (Stem Cell Technologies) en incubadora a 37°C y 5% CO₂. Los sucesivos pasajes fueron realizados una vez alcanzada una confluencia de 70-80%. Para ello, se disgregaron las células con la enzima Accutase (Invitrogen) durante 5 minutos y luego diluidas en PBS; o con PBS-EDTA (Versene, Thermo Fisher) durante 4-5 minutos y luego diluida en medio de cultivo E8 o TeSR-E8. Luego, la suspensión celular se centrifugó a 200 x g, se aspiró el sobrenadante y las células unicelulares fueron cultivadas en mTeSR1, E8 o TeSR-E8 suplementado con inhibidor de Rock 10 µM (necesario para mantener la sobrevida de las células en estado unicelular).

Para la criopreservación de las CMPhs, las células fueron resuspendidas en 1ml del correspondiente medio de cultivo mTeSR1, E8 o TeSR-E8 con inhibidor de Rock 10 µM y con 20% v/v SFB y 10% v/v dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich). El medio de criopreservación fue agregado a las células de forma lenta y mezclando suavemente. La suspensión celular fue fraccionada a razón de 1 ml por criotubo (Corning). Éstos fueron guardados rápidamente en un contenedor para congelamiento con isopropanol por 24 horas a -80°C, permitiendo un descenso de la temperatura a razón de 1°C/minuto. Finalmente se los almacenó en un tanque de nitrógeno líquido. Para su descongelación, los viales fueron removidos del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente calentados a 37°C hasta observarse líquido el medio de criopreservación. Inmediatamente las células se centrifugaron diluyendo el medio de criopreservación con PBS y posteriormente fueron cultivadas en DMEM 10% v/v SFB.

Cultivo y criopreservación de CMN

Para cultivar las CMN (tanto generadas a partir de CMEhs como de CMPihs), las mismas se crecieron sobre placas multipocillo pre-tratadas 30 minutos a 37°C con Geltrex (Thermo Fisher). Las células fueron mantenidas de ésta manera cultivándolas con medio de Expansión Neural completo (Invitrogen) o con un medio de CMN compuesto por DMEM F12 (Invitrogen), L-Glutamina (2 mM concentración final), aminoácidos no esenciales (2 mM concentración final), antibiótico (2 mM concentración final), suplementos N2 y B27 1X (Invitrogen) y los factores EGF (20 ng/ml) y bFGF (20 ng/ml); y mantenidas en incubadora a 37°C y 5% CO₂. Los sucesivos pasajes fueron realizados una vez alcanzada una confluencia de 70-80%. Para ello, se disgregaron las células con la enzima Acutasa (Invitrogen) durante 5 minutos y luego diluida en PBS, centrifugadas a 300 x g por cinco minutos. Se aspiró el sobrenadante y las células unicelulares fueron cultivadas en medio de Expansión Neural o medio CMN con inhibidor

de Rock 5 μM (necesario para mantener la sobrevivencia de las células en estado unicelular, por los primeros cinco pasajes).

Para la criopreservación de las CMN, las células fueron resuspendidas en 1 ml del correspondiente medio de cultivo Medio de Expansión Neural (Invitrogen) o medio NSC con inhibidor de Rock 5 μM y 10% v/v dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich). El medio de criopreservación fue agregado a las células de forma lenta y mezclando suavemente. La suspensión celular fue fraccionada a razón de 1 ml por criotubo (Corning). Éstos fueron guardados rápidamente en un contenedor para congelamiento con isopropanol por 24 horas a -80°C , permitiendo un descenso de la temperatura a razón de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Finalmente se los almacenó en un tanque de nitrógeno líquido. Para su descongelación, los viales fueron removidos del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente calentados a 37°C hasta observarse líquido el medio de criopreservación. Inmediatamente las células se centrifugaron diluyendo el medio de criopreservación con PBS y posteriormente fueron cultivadas en medio de Expansión Neural (Invitrogen) o medio CMN.

Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico, a partir de aproximadamente 2×10^5 células disociadas se realizó un lavado con PBS y se las resuspendió en 100 μl de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.001% gelatina, 0.5% NP-40, 0.5% Tween-20) y se agregó 1 μl de proteinasa K (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Thermo Fisher). Luego de incubar la muestra a 65°C durante 1 hora en agitación se precipitó en frío con 600 μl de isopropanol 100% durante 30 min a -20°C . Se centrifugó la muestra a $12.000 \times g$ durante 15 min a 4°C , se lavó el pellet de ADN con etanol 70% y se lo resuspendió en 30 μl de agua Milli-Q. Se favoreció la solubilización del ADN genómico mediante la incubación de las muestras a 65°C durante 1 h. Conservamos las muestras de ADN genómico a -20°C .

Detección de contaminación con *Mycoplasma sp.*

Controlamos periódicamente los cultivos de células para la detección de contaminación con bacterias del género *Mycoplasma sp.* y, de ser positiva, proceder a descartarlos. Para ello, extrajimos DNA genómico de las distintas líneas celulares a analizar y realizamos reacciones de PCR con primers (Tabla 1) que amplifican una secuencia de ADN de 500 pb conservada en este género de bacterias. Dado que ante la ausencia de contaminación no se obtiene producto de amplificación, utilizamos como control positivo muestras de ADN genómico de *Mycoplasma sp.*

	Primer Forward (5´-3´)	Primer Reverse (5´-3´)
Micoplasma	ACACCATGGGAGYTGGTAAT	CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados para la detección de contaminación por Micoplasmas.

Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se llevó a cabo utilizando el reactivo Trizol (Thermo Fisher) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, se le retiró el medio de cultivo a las células, se lavó con PBS y las mismas fueron colectadas en un volumen óptimo de Trizol según el número de células de las cuales se partió. Luego se realizó la extracción orgánica con cloroformo (Merck), se precipitó el ARN con isopropanol (Merck), se lavó con etanol 75% y se resuspendió en agua deionizada libre de ribonucleasas. En el caso de tener una muestra con poco número de células, se agregó previo a la precipitación con isopropanol en cada tubo, 0,5 µl de glucógeno (15 mg/mg) (Glyco Blue, Thermo Fisher), el cual funciona como carrier favoreciendo la precipitación del ARN. Al final se colocó la solución de ARN en un termobloque a 55°C durante 10 min para favorecer la resuspensión. La concentración del ARN aislado (ng de ARN/µl de solución) se determinó utilizando un espectrofotómetro automático NanoDrop 1000 controlado por el software ND-1000. Se verificó también que la relación OD260/OD280 fuese de entre 1,7 y 2 para asegurar una elevada pureza del ARN total obtenido. Este ARN fue conservado a -80°C hasta el momento de uso.

Extracción de ARN total para secuenciación de nueva generación (NGS)

Para el análisis y estudio de los microARNs por secuenciación masiva (Small RNA-Seq) se realizó la extracción de ARN total utilizando el kit miRvana de Ambion (Life Technologies) para obtener una extracción con una pureza mayor, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células en suspensión fueron lisadas utilizando el buffer de lisis/unión y mediante acción mecánica con vortex o pipeta hasta lograr un aspecto homogéneo en el lisado. Luego, se realizó la extracción orgánica del ARN mediante, en primer lugar, el agregado de 1/10 del volumen del lisado de la solución miRNA Homogenate Additive, y luego igual volumen al del lisado de ácido fenol-cloroformo. Todo se vortexeó y centrifugó a máxima velocidad durante 30 minutos. Seguidamente, se extrajo la fase acuosa (superior) y se colocó en un tubo fresco, midiendo el volumen extraído. Se agregó etanol 100% (1.25 del volumen recuperado) a la fase acuosa y se colocó en una columna que viene con el kit. Se centrifugó hasta que toda la mezcla lisado/etanol hubiera pasado por el filtro. Esta columna se lavó por centrifugación agregando las soluciones 1 y 2/3 (se realizaron dos lavados consecutivos con esta solución). Para remover fluidos residuales se realizó un spin del tubo por 1 minuto. Finalmente se eluyó el ARN con 100 µl de agua Milli-Q (pre-calentada a 95°C) y libre de ARNasas. La concentración del ARN aislado (ng de ARN/µl

de solución) se determinó utilizando un espectrofotómetro automático NanoDrop 1000 y se conservó a -80°C.

Comparamos ambos métodos de extracción (Trizol vs. mirVana). Pudimos observar un porcentaje mayor de la población que correspondería a los microARNs (miRNAs) (pequeños ARNs) en la extracción con el mirVana (Figura 18). Confirmamos así que era mejor utilizar este método de extracción de ARN para generar las muestras para enviar a secuenciar.

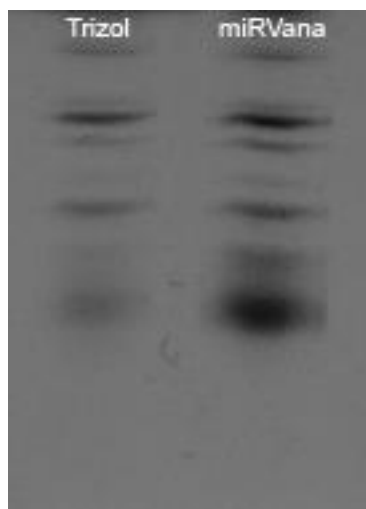


Figura 18. Extracción de microARNs | Gel de poliacrilamida al 15% seguido de una tinción con Bromuro de etidio. La primera calle corresponde a la extracción con el reactivo Trizol y la segunda la realizada con el kit mirVana.

Retrotranscripción de microARNs maduros

La síntesis del ADNc a partir del ARN se llevó a cabo según el siguiente protocolo para retrotranscribir los microARNs. En una primera etapa se preparó la siguiente mezcla por cada tubo: 0,25 µg de oligo dT, entre 500 ng – 1 µg de ARN (tratado o no con ADNasa, según cada caso), dNTPs a una concentración final de 0,4 mM cada uno y el SLO Stem Loop Primer específico para cada microARN o una mezcla de éstos en una concentración final de 1µM. El volumen de la mezcla se completó con agua Milli-Q. La mezcla de reacción se incubó durante 5min a 65°C y a continuación en hielo al menos 1 min. Luego se adicionó a cada tubo de reacción 4 µl de 5X First Strand Buffer, 1 µl de 0,1 M DTT, 1 µl RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen) y 100 U de SuperScript III Reverse Transcriptase. Se mezcló con micropipeta y se llevó a cabo la reacción utilizando el siguiente programa en termocicladora: 30 min a 16°C, luego 30 min a 42°C y una hora a 50°C. Por último se inactivó la reacción mediante la incubación a 70°C durante 15 min. Finalmente el ADNc a usar como molde en la reacciones de amplificación se diluyó al menos 5 veces en agua Milli-Q y almacenadas a -20°C hasta su utilización en PCR en tiempo real.

Retrotranscripción de ARNm

La síntesis del ADNc a partir del ARN se llevó a cabo según el siguiente protocolo para retrotranscribir los ARNm. Para efectuar la transcripción reversa se utilizaron 1 µg o 500 ng de ARN total, 10 ng/ml de oligonucleótidos al azar (random primers) (Invitrogen), dNTPs 1mM y 200U de la transcriptasa reversa MMLV (Promega). Se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, en primer lugar en cada tubo se colocaron los random primers, dNTPs y el ARN de las distintas muestras y se llevó a 15 µl finales con agua Milli-Q. Se desnaturalizó por calentamiento a 65°C durante 5 minutos en termocicladora. Luego, para evitar la renaturalización, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo y se las incubó durante al menos un minuto. Finalmente, en cada tubo se agregaron 5 µl de la mezcla conteniendo el resto de los reactivos mencionados anteriormente (MMLV y Buffer 5X para dicha enzima) y se llevó a cabo la reacción utilizando el siguiente programa en termocicladora: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 37°C para que ocurra la retrotranscripción y 15 minutos a 70°C con el fin de inactivar a la enzima. Finalmente, las muestras de ADNc a usar como molde en la reacciones de amplificación se diluyó al menos 5 veces en agua Milli-Q y almacenadas a -20°C hasta su utilización en PCR en tiempo real.

Diseño de primers para analizar los ARNm

Los pares de oligonucleótidos específicos (primers) utilizados en este trabajo para analizar la expresión de los genes estudiados fueron diseñados en el portal BLAST de NCBI con la aplicación primer-BLAST. Para evitar la amplificación espuria de posible ADN geonómico contaminante en las muestras, los primers fueron diseñados de manera tal que cada miembro del par sentido y anti-sentido hibride en un exón diferente del gen en estudio, en los casos en los que esto fue posible. Los primers fueron sintetizados por el servicio de la empresa Invitrogen o Macrogen. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla 2.

Nombre del gen	Primer Forward	Primer Reverse
<i>RPL7</i>	AATGGCGAGGATGGCAAG	TGACGAAGGCGAAGAAGC
<i>OCT4</i>	CTGGGTTGATCCTCGGACCT	CACAGAACTCATACGGCGGG
<i>NANOG</i>	AAAGAATCTTCACCTATGCC	GAAGGAAGAGGAGAGACAGT
<i>BRACHYURY</i>	TCCCAGGTGGCTTACAGATGA	GGTGTGCCAAAGTTGCCAAT

<i>AFP</i>	TGCTGGATTGTCTGCAGGATG	ACGTTCCAGCGTGGTCAGTTT
<i>NESTINA</i>	CAGCTGGCGCACCTCAAGATG	AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG
<i>PAX-6</i>	CAGGTGTCCAACGGATGTG	GTCGCTACTCTCGGTTTACTAC
<i>TUJ-1</i>	TGGATTTCGGTCCTGGATGTG	ACCTTGCTGATGAGCAACGT
<i>NEFL</i>	ACAAGCAGAACGCCGACATC	GGTCTCCTCGCCTTCCAAGA
<i>DCX</i>	AGCAAGTCTCCAGCTGACTC	CGAGTCCGAGTCATCCAAGG
<i>OLIG2</i>	TCGCATCCAGATTTTCGGGT	GCAGAAAAAGGTCATCGGGC
<i>SOX 10</i>	CATCCAGGCCCACTACAAGAGC	ACCAATGTCCACGTTGCCG
<i>NG2</i>	GAGCCCAGGCACGAAAAATG	GTATGTTTGGCCCCCTCCGAA
<i>GALC</i>	ACACAATGGCTGAGTGGCTA	ACTAGAAGTCGGGAGGTTGC
<i>CYCLIN A2</i>	CCTGCAAACCTGCAAAGTTGA	AAAGGCAGCTCCAGCAATAA
<i>CYCLIN B1</i>	CAAGCCCAATGGAAACATCT	GGATCAGCTCCATCTTCTGC
<i>CYCLIN D1</i>	GATCAAGTGTGACCCGGACT	TCCTCCTCCTCTTCCTCCTC
<i>CYCLIN D2</i>	TTGTTCCCGAGCGATAGATG	ACCAGAAGCGAAGAGTAACC
<i>CYCLIN D3</i>	GTGGCCACTAAGCAGAGGAG	TTTGTGAAGGGGGAACAGAC
<i>CYCLIN E1</i>	AGGGGACTTAAACGCCACTT	AGGGGACTTAAACGCCATT
<i>WEE1</i>	CTTGGGGACTTCTGCCATGA	GCTTGGGGACTATCACCCT
<i>RREB1</i>	TGCATCTCTCCTCGGTCTCT	GAATCCGGGGCACGTACTTA
<i>COL4A4</i>	TATTTTCAGGGCCATCCTGGG	TCCTGCATGGGCTTACCTA
<i>GRIA3</i>	CCTGTGTTTCAGTTGTGTGGG	TTCCACCAAAGACTGAGGGC
<i>ANLN</i>	AGCCCCCGTTTTTACCATGT	CTGCGTGAACTCCGCAAATC
<i>SIRT1</i>	CCTGTGAAAGTGATGAGGAGGA	GAATTGTTTCGAGGATCTGTGCC
<i>FGFRL1</i>	AGCCTGAGCGTCAACTACAC	CCTCATCTTGGAGGGCTGTG

Tabla 2. Secuencias de los primers utilizados en la PCR cuantitativa en sentido 5'-3'.

Diseño de primers para analizar los microARNs maduros

Para el análisis de los niveles de expresión de los microARNs, se diseñaron unos primers específicos para la retrotranscripción de los mismos. Estos primers denominados Stem Loop Primers (SLO) consisten en una región de constante de 44 nucleótidos (GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC) y 6 nucleótidos en el extremo 3' que son específicos para cada microARN a estudiar. Luego, para la PCR cuantitativa se diseñan primers forward específicos para cada microARN, el cual consiste en 14 nucleótidos complementarios al extremos 5' del microARN y una región de 7 nucleótidos que funciona como adaptador (GCGGCGG) y permite balancear el contenido GC con el primer reverse y así sus temperaturas de annealing. Este primer reverse es “universal” y se utiliza el mismo para todas las reacciones de q-PCR de los microARNs, ya que reconoce una región del SLO. Todos los primers para analizar los microARNs maduros fueron diseñados con el software miRNA Primer Designer (Tabla 3).

miRNA	SLO Primer	Primer Fw (5'-3')
RNU6B	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG GATACGACAAAATATGGAAC	CGCAAGGATGACACGC AAATTC
mir-27a-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG GATACGACGCGGAA	GCGGCGGTTCACAGTG GCTAAG
mir-16-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG GATACGACCGCCAA	GCGGCGGTAGCAGCAC GTAAAT
mir-302a	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACTCACCA	GCGGCGGTAAGTGCTT CCATG
mir-302b	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACCTACTA	GCGGCGGTAAGTGCTT CCATG
mir-302c	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACCCACTG	GCGGCGGTAAGTGCTT CCATG
mir-302d	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACACACTC	GCGGCGGTAAGTGCTT CCATG
mir-145	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACAGGGAT	GCGGCGGGTCCAGTTT TCCCAG
mir-296	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACACAGGA	GCGGCGGAGGGCCCCC CCTCAATC
mir-19a-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG GATACGACTCAGTT	GCGGCGGTGTGCAAAT CTATGC

mir-19b-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACTCAGTT	GCGGCGGTGTGCAAAT CCATGC
mir-1260a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACTGGTGG	GCGGCGGATCCCACCT CTGCCAC
mir-1260b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACATGGTG	GCGGCGGATCCCACCA CTGCCAC
mir-301a- 3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACGCTTTG	GCGGCGGCAGTGCAAT AGTATTG
mir-454-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACACCCTA	GCGGCGGTACTGCAAT ATTGC
mir-4454	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACTGGTGC	GCGGCGGGGATCCGAG TCACGG
mir-9-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACACTTTC	GCGGCGGATAAAGCTA GATAAC
mir-9-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACTCATAC	GCGGCGGTCTTTGGTT ATCTAG
mir-124-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACGGCATT	GCGGCGGTAAGGCACG CGGTG
mir-128-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACAAAGAG	GCGGCGGTACAGTGA ACCGCTC
mir-125a- 5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACTCACAG	GCGGCGGTCCCTGAGA CCCTTT
mir-125b- 5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACTCACAA	GCGGCGGTCCCTGAGA CCCTAAC
mir-216a- 3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACATAATC	GCGGCGGTACAGTGG TCTCTG

mir-216a-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG GATACGACTCACAG	GCGGCGGTAATCTCAG CTGGCAAC
mir-216b-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG GATACGACTAGAAT	GCGGCGGACACACTTA CCCGTAG
mir-216b-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG GATACGACTCACAT	GCGGCGGAAATCTCTG CAGGC
mir-217-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG GATACGACGGCAAT	GCGGCGGCATCAGTTC CTAATG
mir-217-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG GATACGACTCCAAT	GCGGCGGTAATCTCAG AGGAAC
mir-Reverse	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	
RNU6B Rev	CCAGTGCAGGGTCCGAGGT	

Tabla 3. Secuencias de los primers utilizados para los microARNs en la PCR cuantitativa.

PCR a punto final

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l. Se colocaron los siguientes componentes por tubo de PCR: 2,5 μ l de Buffer de PCR (Tris-HCl 200mM[pH 8.4], KCl 500mM), 1 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 0,5 μ l de una mezcla de los 4 deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Thermo Fisher), 2,5 μ l de oligonucleótido sentido (primer forward) 5 μ M, 2,5 μ l de oligonucleótido antisentido (primer reverse) 5 μ M, 0,2 μ l de la ADN polimerasa PlatinumTaq DNA Polimerasa 5 U/ μ l (Thermo Fisher) y 2 μ l de ADN copia, y completando el volumen a 25 μ l con agua libre de DNasas.

PCR en tiempo real

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 15 μ l. Se colocaron los siguientes reactivos por tubo de PCR: 7,5 μ l de SYBR-Green master mix (contiene dNTPs con dUTP y ROX) (Roche); 1,5 μ l de primer sentido (5 μ M); 1,5 μ l de primer anti-sentido (5 μ M); 3 μ l de agua Milli-Q y 1,5 μ l de una dilución 1/5 del ADNc de ARNm o de microARNs maduro. Se utilizó el termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). Cada muestra a analizar fue determinada por duplicado. En todos los casos el programa utilizado fue el siguiente:

1. Activación de la enzima UDG (uracil-DNA glycosylase) para degradación de posibles amplicones contaminantes (que contienen uracilo): 2 minutos a 50°C
2. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 10 minutos a 95°C
3. Desnaturalización: 15 segundos a 94°C
4. Apareamiento y extensión: un minuto a 60°C

Se realizaron 40 ciclos de los pasos 3-4. La lectura de la fluorescencia fue realizada al finalizar el paso 4 de cada ciclo.

Para cada uno de los ADNc analizados se realizaron curvas de temperatura de apareamiento para verificar la presencia de un único producto de amplificación.

Para microARNs, esto fue confirmado al sembrar los productos de la reacción en geles de agarosa (4%) teñidos con bromuro de etidio, evidenciando una única banda.

Para el análisis de los datos de ARNm se utilizó el método del $\Delta\Delta C_t$ [104], para normalizar los niveles de expresión de los genes o microARNs estudiados se evaluaron como housekeepings el gen *RPL7* y el *RNU6B*, respectivamente. Mientras que el análisis de los resultados de microARNs se realizó utilizando el programa de uso libre LinReg [105], a partir del cual se obtuvieron las eficiencias de la reacción de PCR para cada par de primers y luego se calcularon los niveles teóricos iniciales de cDNA (N0) para cada condición. Todos los experimentos fueron realizados con al menos tres réplicas biológicas.

Inmunomarcaciones y microscopía de fluorescencia

Para las inmunomarcaciones las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning). Luego de la remoción del medio de cultivo, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con una solución 4% m/v de paraformaldehído (PFA) (Sigma) en PBS durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno, con albúmina sérica bovina (ASB) 0,1% v/v (Gibco) en PBS. La permeabilización y el bloqueo se realizó con una solución compuesta por 0,1% v/v Triton X-100 (Sigma); 0,1% v/v ASB; 10% v/v Suero de Cabra Normal (SCN) (Gibco) en PBS, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego de remover la solución de permeabilización y bloqueo se realizaron las inmunomarcaciones incubando las células con el o los anticuerpos primarios específicos en una solución de dilución de anticuerpos compuesta por: 0,1% v/v ASB, 10% v/v SCN en PBS durante una noche a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS, 0,1% v/v ASB. Posteriormente se realizó una incubación de 45 minutos de los preparados con el o los anticuerpos secundarios conjugados a los fluoróforos, en una dilución 1:400 (en la misma solución de dilución empleada para los anticuerpos primarios). Para la tinción de los núcleos se utilizó el 4-6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) (Sigma) en una concentración final de 200 ng/ml, el cual fue agregado simultáneamente con los anticuerpos secundarios. Se realizaron nuevamente 3 lavados durante 5 minutos cada uno, con 0,1% v/v ASB en PBS y finalmente se agregó un volumen apropiado de PBS.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo se detallan en las Tabla 4 y Tabla 5 respectivamente.

El análisis de las imágenes se realizó observando los preparados en un microscopio invertido de fluorescencia con lámpara de mercurio Nikon Eclipse TE2000-S. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital Nikon DXN1200F acoplada al microscopio y controlada por el software EclipseNet versión 1.20.0 Build 61.

Anticuerpo primario	Especie-Tipo	Marca	N° Catálogo	Dilución
α-NANOG	Conejo-Monoclonal	Cell Signaling	D73G4	1/400
α-OCT4	Ratón-Monoclonal	Santa Cruz	SC-5279	1/200
α-VIMENTINA	Ratón-Monoclonal	Dako	M0725	1/200
α-AFP	Ratón-Monoclonal	Santa Cruz	Sc-166325	1/200
α-NESTINA	Conejo-Policlonal	Chemicon	AB5922	1/400
α-CTNT	Ratón-Monoclonal	Santa Cruz	Sc-20025	1/200
α-MAP2	Ratón-Monoclonal	Sigma	M1406	1/400
α-TUB-1	Ratón-Monoclonal	Covance	MMS-435P	1/400
α-NEFL	Ratón-Monoclonal	Abcam	Ab7255	1/200
α-DCX	Ratón-Monoclonal	Santa Cruz	Sc-271390	1/200
α-SOX-1	Conejo-Monoclonal	Us biological	S5364-01	1/200
α-SOX-2	Conejo-Monoclonal	Abcam	Ab59776	1/200
α-PAX-6	Conejo-Monoclonal	Abcam	AB5790	1/50
α-GFAP	Conejo-Policlonal	Millipore	AB5804	1/200
α-ACTINA	Cabra-Monoclonal	Santa Cruz	SC-1616	1/200

α -OLIG2	Conejo-Policlonal	Millipore	AB9610	1/200
α -GALC	Ratón-Monoclonal	Millipore	MAB342	1/200

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en las inmunomarcaciones.

Anticuerpo	Especie	Fluoróforo	Marca	N°Catálogo
α -IgG de ratón	Cabra-Policlonal	Alexa Fluor 568	Invitrogen	A-11031
α -IgG de ratón	Cabra-Policlonal	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11029
α -IgG de conejo	Cabra-Policlonal	Alexa Fluor 555	Invitrogen	A-21429
α -IgM de ratón	Cabra-Policlonal	Alexa Fluor488	Invitrogen	A-21042

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados en las inmunomarcaciones.

Análisis de proteínas

Preparación de extractos proteicos y Western Blot

Detector de quimioluminiscencia (ImageQuant LAS 4000)

Los extractos de proteínas totales fueron obtenidos de las células usando el buffer de extracción RIPA (Sigma) suplementado con inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail set I, Calbiochem). Las muestras se incubaron 10 minutos en hielo y luego se centrifugaron 5 minutos a 200 x g. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método del ácido bicinonínico (BCA, del inglés Bicinchoninic Acid Protein Assay) (Pierce) empleando ASB como patrón. A 40 μ g de proteínas se les agregó solución de siembra y se las calentó 5 minutos a 100°C para completar el proceso de desnaturalización. Posteriormente las proteínas se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE en un gel de 12% o 15% durante 3 horas a 100 Volts. Las muestras se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (General Eelectric) durante 45min a 10 Volts. Finalizada la electrotransferencia se bloqueó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en solución PBS-Tween que contiene 5% m/v de leche. La membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos, preparados en PBS-Tween más el agregado de 3% de leche. Luego se realizaron 2 lavados de 5 minutos y 1 lavado de 20 minutos

en PBS-Tween. Seguidamente se incubaron las membranas durante 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes (acoplado a la enzima peroxidasa) (Tabla 6), diluidos 1/5000. Por último se realizaron 2 lavados de 5 minutos y 1 lavado de 20 minutos con PBS-Tween. El revelado de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo comercial Super Signal West Femto (Thermo Scientific), reacción que fue captada por un detector de quimioluminiscencia (ImageQuant LAS 4000mini). Las soluciones utilizadas en la electroforesis fueron: Solución de siembra: Tris 40 mM pH = 6,8, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,006%, SDS 1% y β -Mercaptoetanol 0,1%; Solución de Corrida: Tris 25 mM pH = 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%; Solución de Transferencia: Tris 25 mM pH = 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%, Metanol 20%, PBS-Tween: Tween20 (SIGMA-Aldrich) 0,1% V/V en PBS. Los geles utilizados fueron de poliacrilamida al 12% o 15% (gel de resolución): -Para gel 12%: 4 ml de acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8% (BIO-RAD), 2,5 ml de TrisHCl 1,5 M pH = 8,8, 200 μ l SDS 10%; 200 μ l de persulfato de amonio 10%, 3,35ml de H₂O destilada y 10 μ l de tetrametiletilendiamina (TEMED) (SIGMA-Aldrich). -Para gel 15%: 5 ml de acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8%, 2,5 ml de Tris-Cl 1,5 M pH = 8,8, 200 μ l SDS 10%; 200 μ l de persulfato de amonio 10%, 2,3 ml de H₂O destilada y 10 μ l de TEMED. -Gel de poliacrilamida concentrador: 0,4 ml de acrilamida 30%-bisacrilamida, 0,8%, 0,375 ml de Tris-Cl 1 M pH = 6,8, 30 μ l SDS 10%, 30 μ l APS 10%, 2,16 ml de H₂O destilada y 4 μ l de TEMED.

Anticuerpo primario	Especie-Tipo	Marca	N° Catálogo	Dilución
α -CYCLIN E1	Monoclonal-Mouse	BD Biosciences	BDB-551159	1/1000
α -CYCLIN D1	Monoclonal-Mouse	Santa Cruz	Sc-8396	1/1000
α -CYCLIN D2	Monoclonal-Mouse	Santa Cruz	Sc-376676	1/1000
α -CYCLIN A	Monoclonal-Mouse	Santa Cruz	Sc-271682	1/1000
α -CYCLIN B1	Monoclonal-Mouse	Santa Cruz	Sc-245	1/1000
α -ACTIN	Polyclonal-Goat	Santa Cruz	Sc-1616	1/1000

Tabla 6. Anticuerpos primario utilizados en Western Blot.

Inhibidores utilizados

Para arrestar el ciclo se utilizaron los siguientes inhibidores: Nocodazol (M1404, Sigma), inhibidor de la polimerización de los microtúbulos y Vincristina (V8879, Sigma), un inhibidor de la formación del huso mitótico, ambos para arrestar en la fase G2/M; PD0332991 (PZ0199, Sigma), inhibidor específico de CDK4/6, para arrestar en la fase G1 temprana; Afidicolina (A0781, Sigma), inhibidor de la ADN polimerasa, para arrestar en la transición G1/S.

Además se utilizaron los siguientes inhibidores: GSK690693 (Sigma), inhibidor de AKT1/2; U0126 (Sigma), inhibidor de MEK1/2; 10,058-F4 (Sigma), inhibidor de c-MYC; HLM006474 (Tocris), inhibidor general de los factores de transcripción E2F; CHIR99021 (Tocris), inhibidor de GSK3 β ; MG-132 (Calbiochem), inhibidor del proteosoma; el inhibidor de CDK2 II (Santa Cruz Biotechnology), inhibidor de CDK2. Los inhibidores fueron disueltos en DMSO o agua (PD0332991 y Vincristina) y guardados a -20°C (GSK690693, HLM006474, MG-132 and CDK2 inhibitor II, Nocodazol, PD0332991, Aphidicolina), 4°C (U0126, 10,058-F4) o temperatura ambiente (PD0332991) protegidos de la luz. Los inhibidores se agregaron a los cultivos celulares de modo que la concentración final del DMSO no fuera mayor a 0.10% (v/v).

Ensayo de ciclo celular con ioduro de propidio (IP)

Para el análisis del perfil del ciclo celular, se analizó el contenido de ADN mediante el ensayo de ioduro de propidio. Las células fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia del 80-90%. Luego, se disgregaron de manera enzimática utilizando la enzima Accutase tal como se explicó anteriormente. El pellet celular fue resuspendido en 300 μ l de Staining buffer (PBS1X, SFB 3%) y las células fueron fijadas con 2 ml de etanol 70%. Es importante que el paso de fijación se realice de manera lenta, incorporando el etanol gota a gota y con las células en constante agitación, para evitar así la formación de dobletes y tripletes de células. Luego se dejaron las muestras en la solución de fijación durante 40 min a 4°C (también es posible dejar las células en ésta solución y en frío, durante varias semanas). Una vez transcurrido el tiempo de fijación, se centrifugaron las células y los pellets se resuspendieron en 1 ml de Staining buffer. Este paso se repitió 3 veces. En el último lavado, se resuspendió las muestras en 500 μ l de Staining buffer, se agregaron 20 μ l de la enzima ARNase A 20mg/ml (Thermo Fisher) y se incubaron 30 min a 37°C, para degradar el ARN. Por último, se agregaron 10 μ l de ioduro de propidio (IP) (1 mg/ml) (Sigma), se incubó 5 min y se analizó el contenido de ADN mediante citometría de flujo en un equipo BD AccuriC6 (Becton Dickinson). El análisis posterior para determinar los % de células en las distintas fases del ciclo celular se realizó en el programa FlowJo, mediante el ajuste al modelo de Watson.

Análisis del marcador de indiferenciación OCT-4 por citometría de flujo

Las CMPhs crecidas sobre Vitronectina con medio E8 fueron disgregadas en células individuales al tratarlas con Acutasa, diluidas en PBS y centrifugadas a 200 x g por 5 min. Luego, las células se fijaron con paraformaldehído 4% a temperatura ambiente por 30 min. Las células fueron lavadas tres veces con PBS/Albumina 0,1 % y luego permeabilizadas (en una solución conteniendo 1% BSA, 10% suero de cabra normal y 0.1% Triton X-100) a temperatura ambiente por 45 min. A continuación, las células fueron incubadas por 2h con el anticuerpo primario contra OCT-4 (1:50 en una solución conteniendo 1% BSA, 10% suero normal de cabra). Las células fueron luego lavadas tres veces con PBS/Albumina 0,1% e incubadas por 45 min con el anticuerpo secundario IgG Alexa Fluor 488-conjugado de cabra anti-ratón (1:400) en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. Luego de centrifugarlas, las células fueron lavadas tres veces con PBS/Albumina 0,1%, y resuspendidas en esta solución, y analizadas en un citómetro de flujo BD Accuri C6. Como control de isotipo se utilizó IgG normal de ratón.

Ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina

Para este ensayo se utilizó el kit APC BrdU flow Kit o kit FITC BrdU flow Kit (BD Pharmigen). Los distintos cultivos celulares recibieron un pulso de 10 μ M de bromodeoxiuridina (BrdU) durante 30 min a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación, las células fueron disgregadas utilizando Acutasa durante 7 min. Luego cada muestra fue pasada a un tubo de hemólisis, centrifugada (por 5 minutos a 360 x g) y resuspendidas en 100 μ l de BD Cytfix/Cytoperm Buffer. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos y se lavaron con 1 ml de 1X BD Perm/Wash Buffer mediante centrifugación. A continuación se resuspendieron las células en 100 μ l de BD Cytoperm Permeabilization Buffer y se las incubó en hielo por 10 min, se las lavó y re-fijo en buffer de fijación por 5 min a temperatura ambiente. Luego de un nuevo lavado, se trató las células con la enzima DNAasa (300 μ g/ml) para exponer la BrdU incorporada en el ADN y se las incubó durante 1 hora a 37°C. Luego, las células fueron lavadas por centrifugación e incubadas durante 20 min a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios específicos anti-BrdU conjugado con el fluorocromo aloficocianina (APC, por su nombre en inglés) o con el fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína (FITC, por su nombre en inglés). Una vez finalizada la tinción con el anticuerpo se realizó un lavado por centrifugación utilizando el buffer 1X BD Perm/Wash y se marcó el contenido de ADN con 20 μ l de 7-AAD durante 1 min a temperatura ambiente. Las células fueron resuspendidas en 300-500 μ l de Staining Buffer de acuerdo al número de células final. Por último, las células fueron analizadas mediante citometría de flujo en el citómetro Accuri C6 de BD y los resultados analizados con el software BDaccuri.

Ensayo de viabilidad celular: azul de Tripán

El azul de Tripán (solución 0,4%, SIGMA) es un colorante utilizado para el recuento de células íntegras por exclusión de dicho colorante. Este método está basado en que las células vivas (viables) no incorporan el azul de Tripán mientras que las células muertas (no viables) si lo hacen. Luego de realizados los tratamientos, las células fueron tratadas enzimáticamente para ser disociadas de la placa de cultivo y obtener una suspensión unicelular. La actividad enzimática se inhibió al diluir las mismas en PBS y luego esta suspensión se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos. Posteriormente se procedió a resuspender las células en una solución azul de Tripán-PBS (1:1) y se cuantificó la viabilidad celular por conteo en cámara de Neubauer, empleando un microscopio de contraste de fases. Se contaron como no viables las células teñidas de azul y como vivas las células refringentes.

Ensayo de viabilidad celular: XTT/PMS

La viabilidad celular fue estimada midiendo los cambios colorimétricos en el ensayo de 2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) (XTT). Este ensayo se basa en la actividad mitocondrial que exhiben las células viables mediante la cual se produce la reducción de la sal de tetrazolio XTT de color amarillo, a una tinción de formazán, de color naranja. Las células se sembraron (60.000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos conteniendo 200 µl de medio de cultivo. Transcurridos los tratamientos se procedió a la determinación de la viabilidad. Para ello, en condiciones de esterilidad, se reemplazó el medio de cultivo por 25 µg/pocillo de XTT (Sigma) disuelto en PBS conteniendo 0,15 µg/pocillo del catalizador Nmetildibenzopirazina metil-sulfato (PMS) en un volumen final de 50 µl, e incubando las células durante 2-4 horas a 37°C y 5% de CO₂. La actividad metabólica fue determinada midiendo la absorbancia de las muestras con un lector de microplacas BioRad-Benchmark a una longitud de onda de 450 nm y substrayendo la absorbancia a 650 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular, calculado a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra y la absorbancia del control correspondiente multiplicado por 100. Los experimentos fueron realizados 3 veces por quintuplicado.

Transfección con pequeñas moléculas comerciales de ARN (*mimics/inhibitors*)

Para modular la expresión de los microARNs, las células CMPhs (CMEhs y CMPihs) y las CMN fueron transfectadas con pequeñas moléculas de ARN sintetizadas comercialmente, conocidas como *mimics* e *inhibitors* ambas de Ambion (Life Technologies), ver los oligos utilizados y sus respectivos códigos más

abajo en la Tabla 7. Para esto, las células fueron crecidas sobre Geltrex con mTeSR1 hasta llegar a una confluencia del 60-70%. Una vez alcanzada la confluencia deseada, las células fueron transfectadas con una mezcla de ARN con lipofectamina (Lipofectamine RNAiMAX Reagent, ThermoFisher) según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se preparó una dilución con el ARN en Opti-MEM (ThermoFisher) y una dilución de igual volumen de lipofectamina en Opti-MEM. Se utilizaron 4 µl de lipofectamina en un volumen final de Opti-MEM de 100 µl. Ambas diluciones se mezclaron, agregando la dilución con ARN gota a gota en la que contenía la lipofectamina y se incubó entre 5-10 min. Luego, ésta mezcla fue agregada gota a gota al well con las células crecidas en adhesión.

Nombre del oligo sintético	Empresa (código)
mirVana miRNA <i>mimic</i> hsa-miR-217-5p	Ambion, Thermo Fisher (4464066)
mirVana miRNA <i>mimic</i> , negative control	Ambion, Thermo Fisher (4464058)
mirVana miRNA <i>inhibitor</i> , hsa-miR-217-5p	Ambion, Thermo Fisher (4464084)
mirVana miRNA <i>inhibitor</i> , negative control	Ambion, Thermo Fisher (4464076)

Tabla 7. Nombre y número de catálogo de los oligos sintéticas de los microARNs.

Secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq)

La secuenciación masiva de pequeños ARNs se realizó en las instalaciones de secuenciación de High Throughput Sequencing de la empresa Macrogen, Corea del Sur (<http://foreign.macrogen.co.kr>). Se utilizó un secuenciador Illumina HiSeq2500, y se corrieron las 12 muestras en un único *lane*, con una profundidad de lectura de 21666667 de *reads* por muestra y en *single-end*. Para armar las librerías se utilizó una cantidad igual o mayor a 3 µg de cada muestra.

Análisis de secuenciación masiva de pequeños ARNs

El análisis inicial de los datos crudos fue realizado por la empresa Macrogen, Corea del Sur. Para ello, los resultados fueron analizados mediante el programa FastQC (v0.10.0) para controlar la calidad de los datos, luego se removieron las secuencias adaptadores y las bases de baja calidad, utilizando el programa Cutadapt (1.9.dev3). Luego se realizó el alineamiento de las secuencias con el programa miRDeep2 2.0.0.7, Bowtie 1.1.1 y las secuencias fueron mapeadas al genoma de referencia (GRCh38) con el programa mirDeep2. Este programa permite identificar las secuencias de microARNs conocidos y

desconocidas (novel microARNs) (se utilizó como base de datos miRBase v21). Por último, los datos fueron normalizados como RPKM (counts per millon, $1000.000 * \text{raw_counts} / \text{total_counts}$) y el análisis de expresión diferencial se realizó con el paquete de R, DESeq2 (Love et al., 2014). La predicción de genes blanco se realizó en la base de datos miRWalk 3.0, el cual utiliza los algoritmos de predicción de miRTarBase, TargetScan y miRDBase. Para ello, seleccionamos aquellos genes blanco para la región 3'UTR, filtrando en primer lugar por bases de datos (intentando que estuvieran en las tres bases de datos), y luego por score (0.8 o mayor). El modelo (modelo random-forest) lo que calcula es la probabilidad de que un sitio target candidato sea un sitio target real. Lo que significa que un p-valor (score) alto es mejor. El análisis de Gene Ontology se realizó con el paquete de Bioconductor Cluster Profiler en R, con las funciones enrichGO y groupGO; o en el programa ShinyGO v0.741.

Análisis estadístico

Las significancias de las diferencias observadas fueron analizadas mediante análisis estadístico (prueba t de Student), utilizando el programa GraphPad PRISM versión 6. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando los valores de p fueron menores a 0,05 entre los tratamientos indicados ($p < 0.05$).

Resultados

Capítulo 1.

1.1 Modelo de CMPhs y PN

1.1.1 Validación del estado indiferenciado

En el presente trabajo, y en esta primer parte del mismo, como líneas celulares pluripotentes utilizamos las CMEhs WA09 (H9) que es una línea comercial establecida [106]. La misma fue adquirida en el instituto WiCell Research. Utilizamos también la línea FN2.1 de CMPihs derivada previamente en el laboratorio a partir de fibroblastos dérmicos de prepucio humano [100]. Como control de célula diferenciada utilizamos fibroblastos humanos dérmicos de prepucio (FH). Los mismos fueron derivados previamente a partir de tejido sano de un paciente sometido a un procedimiento quirúrgico, bajo el consentimiento informado del donante y aprobación del comité de ética institucional.

Como mencionamos en la introducción, existen distintas formas de cultivar las CMPhs. En la primer parte de este proyecto, trabajamos con ambas líneas de CMPhs cultivadas sobre placas pre-tratadas con la matriz extracelular comercial geltrex con medio condicionado por fibroblastos embrionarios murinos mitóticamente inactivos mediante irradiación gamma (MEFi).

Para validar las células cultivadas en éstas condiciones, analizamos los niveles de transcriptos y proteicos de los factores de transcripción asociados al estado indiferenciado *OCT-4* y *NANOG* (Figura 19).

OCT-3/4 (OCT-4; del inglés *octamer-binding transcription factor 4*), es un miembro de la familia de los factores de transcripción POU que tiene una alta expresión en las células pluripotentes y se silencia cuando las mismas inician su diferenciación. Este factor es un agente central en la maquinaria que gobierna la pluripotencia. NANOG, por otro lado, es un factor de transcripción que está involucrado en la proliferación celular, auto-renovación y pluripotencia de las CMPs.

Este análisis lo realizamos mediante inmunofluorescencia indirecta para ambos marcadores en las CMEhs H9 y CMPihs FN2.1 y en los FH que utilizamos como control de célula diferenciada. Por medio de esta misma técnica, se analizó también la expresión de VIMENTINA como marcador mesenquimal (conforma los filamentos intermedios en células mesenquimales), que no debería expresarse en células epiteliales como lo son las CMPh pero sí en FH.

Ambas líneas de CMPhs presentaron una expresión robusta de los marcadores asociados a la pluripotencia OCT-4 y NANOG, y no expresaron el marcador mesenquimal VIMENTINA. Por el contrario, los FH no expresaron OCT-4 y NANOG pero si fueron positivos para VIMENTINA (Figura 19).

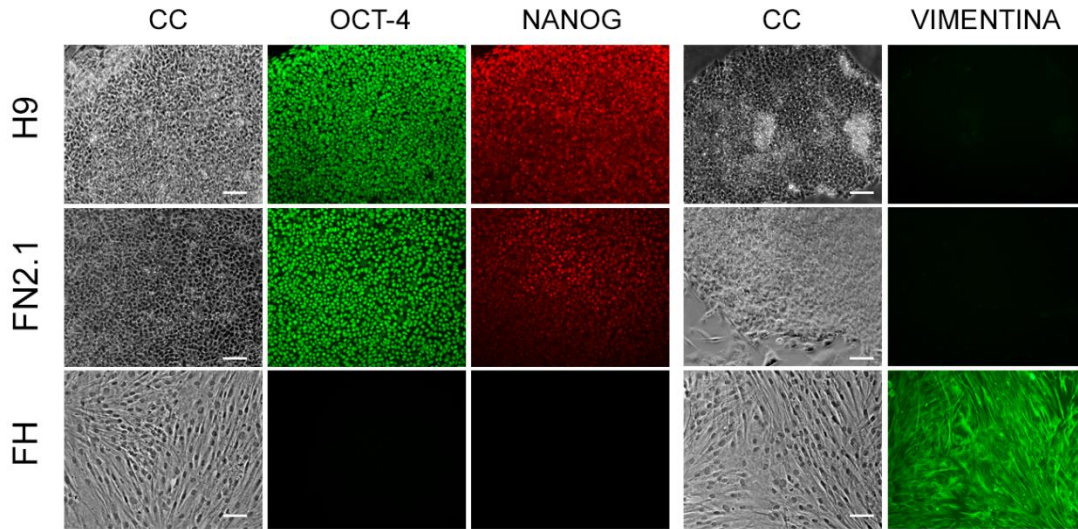


Figura 19. Validación del fenotipo de pluripotencia | Detección por inmunofluorescencia indirecta de los marcadores de pluripotencia OCT-4 y NANOG y el marcador mesenquimal VIMENTINA en CMEhs H9, CMPihs FN2.1 y FH cultivadas sobre geltrex con medio condicionado por MEFi. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 100 μ m.

Para continuar con la confirmación del mantenimiento del estado indiferenciado de las CMPh analizamos luego los niveles de expresión de ARNm de *OCT-4* y *NANOG* por RT-qPCR (PCR en tiempo real) en las CMPhs (embrionarias e inducidas) y en los progenitores neurales (PN) derivados de las CMEh H9. Los valores se expresaron como relativos al valor obtenido en los FH para compararlos con la expresión de dichos marcadores en una célula diferenciada (Figura 20). En este caso se pudo ver de manera cuantitativa que el valor de expresión de estos marcadores en ambas líneas de pluripotentes es significativamente mayor que el valor de estos marcadores en las células diferenciadas (FH), confirmando lo observado por inmunofluorescencia indirecta. Se observa, además, que la expresión de estos dos marcadores en los PN es significativamente menor que la expresión en las células madre embrionarias de las que derivan. Esto es consistente con el hecho de que los progenitores neurales presentan cierto grado de diferenciación (Figura 20).

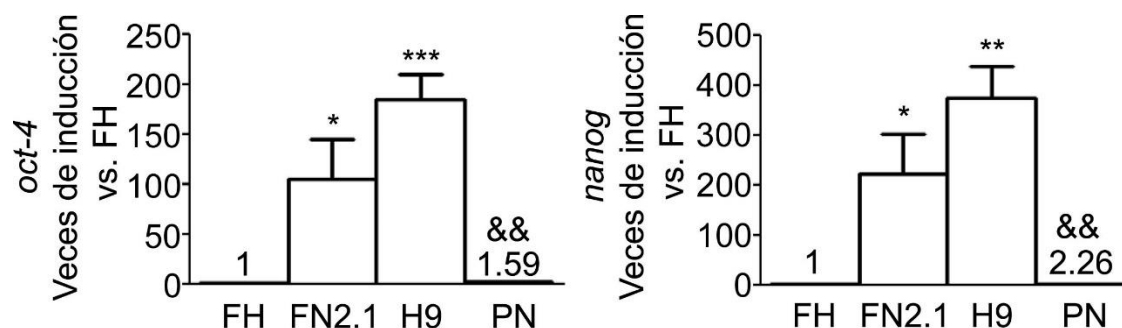


Figura 20. Validación del fenotipo de pluripotencia]. Análisis por RT-q-PCR de los transcritos de los marcadores de pluripotencia *OCT-4* y *NANOG* en CMEhs H9, CMPihs FN2.1 y PN derivados de CMEhs cultivadas sobre geltrex con medio condicionado por MEFi. La expresión de *RPL7* fue utilizada como normalizador. Los gráficos muestran los niveles de inducción relativos a fibroblastos humanos (FH). En el caso de los progenitores neurales (PN), su inducción se relativizó con la de las CMEhs H9. Se muestran el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. FH. (&&) $p < 0.01$ vs. H9.

También, las CMPhs respondieron a un protocolo de diferenciación basado en cuerpos embrioides (EBs). Al día 14 de este protocolo, pudimos observar la formación de neuroectodermo, endodermo y mesodermo (con regiones contráctiles indicativas de diferenciación miocárdica) que fueron positivas, por medio de una inmunofluorescencia indirecta, para NESTINA, ALFA-FETOPROTEÍNA (AFP) y TROPONINA T CARDÍACA (cTnT), respectivamente (Figura 21).

NESTINA es un filamento intermedio de tipo VI involucrado no solo en la organización del citoesqueleto sino también en la señalización celular, organogénesis y metabolismo celular. Este marcador se expresa abundantemente durante la embriogénesis temprana en las células madre neurales pero está ausente en la mayoría de las células maduras del sistema nervioso central. Sin embargo, se ha observado expresión de este marcador, en bajos niveles, los primeros 2-3 días en neuronas recién nacidas y en ciertas neuronas corticales embrionarias [107].

Alfa-fetoproteína (AFP, del inglés *alpha fetoprotein*), es la proteína sérica más abundante en el embrión en desarrollo. La misma constituye uno de los marcadores de endodermo más ampliamente utilizado debido a su expresión característica en células primitivas del endodermo [108].

Por otra parte, la troponina T cardíaca (cTnT, del inglés *Cardiac troponin T*), es un componente del complejo de troponinas, el cual le confiere sensibilidad al calcio para la contracción en el músculo cardíaco y esquelético [109]. Este gen se expresa en el desarrollo embrionario temprano y es utilizado como marcador del mesodermo.

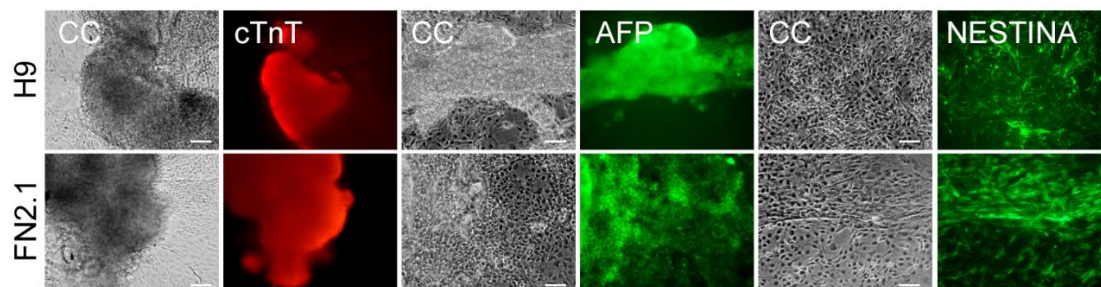


Figura 21. Validación del fenotipo de pluripotencia | Las CMEhs H9 y CMPihs FN2.1 fueron diferenciadas usando un protocolo basado en cuerpos embrioides (EBs) crecidas, desde el día 7 al 14 de diferenciación, en platos con gelatina. Luego las estructuras ectodérmicas (rosetas neurales), mesodérmicas cardíacas (EBs contráctiles) y endodérmicas fueron teñidas con anticuerpos primarios que reconocen a los marcadores NESTINA (ectodermo), cTnT (mesodermo cardíaco) y AFP (endodermo). La escala representa 100 μ m.

Estos resultados, en su conjunto, nos permitieron confirmar el mantenimiento de las características de las CMPhs en las células cultivadas con medio condicionado por MEFi sobre geltrex.

Dado que este modo de cultivo tiene múltiples componentes no definidos como lo son aquellos liberados por las MEFi, en la segunda parte de este capítulo trabajamos con estas líneas celulares cultivadas sobre vitronectina o geltrex con medio Essential 8 (E8), que es un medio completamente definido.

En estas nuevas condiciones de cultivo validamos el mantenimiento de las características de pluripotencia de las líneas celulares utilizadas, midiendo también, los niveles de proteína (Figura 22) y transcritos de *OCT-4* y *NANOG* (Figura 23). A su vez, para poder cuantificar el porcentaje de CMPhs positivas para OCT-4 realizamos análisis indirecto intracelular por medio de una citometría de flujo de dicho marcador (Figura 24).

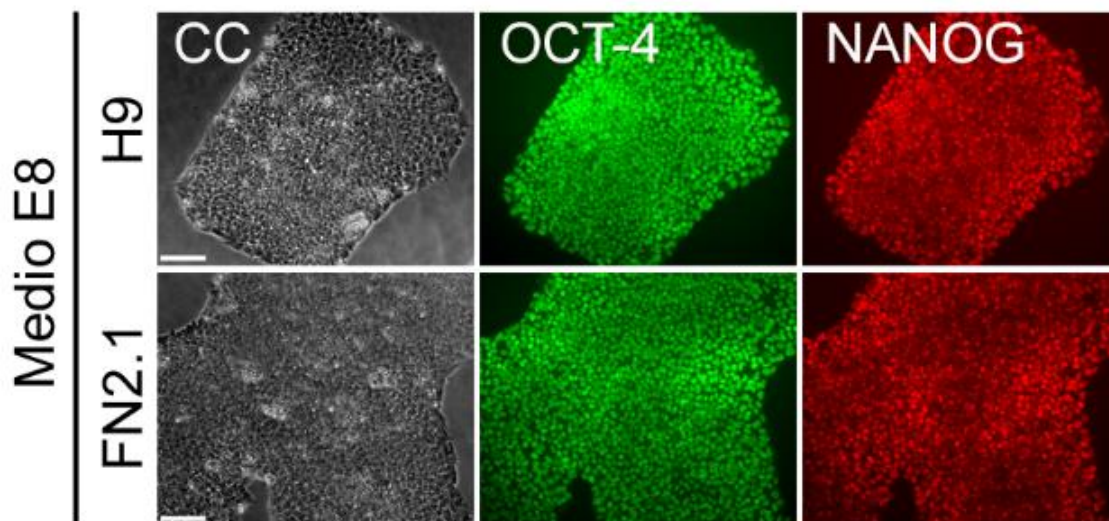


Figura 22. Validación del fenotipo de pluripotencia | Detección por inmunofluorescencia indirecta de los marcadores de pluripotencia OCT-4 y NANOG en (A) CMEhs H9 y (B) CMPihs FN2.1 cultivadas en condiciones de cultivo completamente definidas (placas tratadas con vitronectina y medio E8). La escala representa 100 μ m.

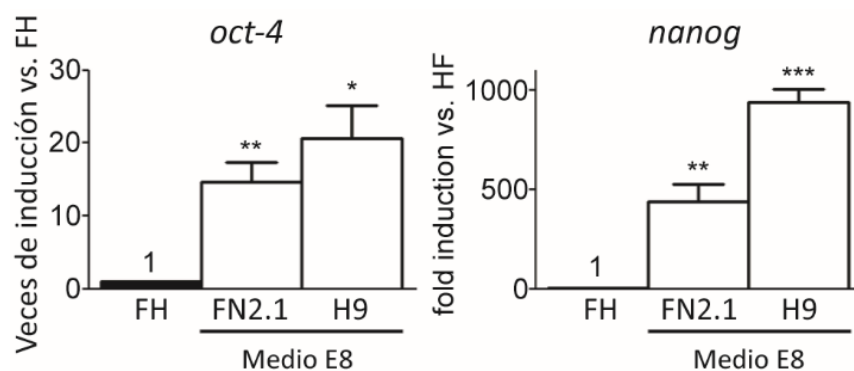


Figura 23. Validación del fenotipo de pluripotencia | Análisis por RT-qPCR de los transcritos de los marcadores de pluripotencia *OCT-4* y *NANOG* en CMEhs H9 y CMPihs FN2.1 cultivadas en condiciones de cultivo completamente definidas (placas tratadas con vitronectina y medio E8). La expresión de *RPL7* fue utilizada como normalizador. Los gráficos muestran los niveles de inducción relativos a fibroblastos humanos (FH). Se muestran el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. FH.

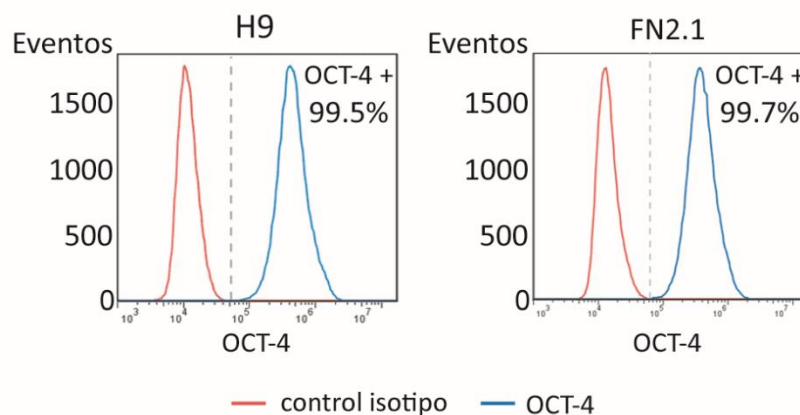


Figura 24. Validación del fenotipo de pluripotencia | Análisis indirecto intracelular por citometría de flujo del marcador de pluripotencia OCT-4 en CMEhs H9 y CMPihs FN2.1. La línea azul representa las células marcadas con el anticuerpo OCT-4, la línea roja representa el control de isotipo. N=3.

Observamos la expresión tanto de la proteína (Figura 22) en ambas CMPhs, como una alta expresión de los transcritos de *OCT-4* y *NANOG* en las mismas relativas a los FH como control de diferenciación (Figura 23). Al cuantificar el porcentaje de células OCT-4 positivas, determinamos que un 99.5% lo son en las CMEhs H9 y un 99.7% lo son en las CMPihs FN2.1 (Figura 24).

1.1.2 Validación de los PN

En cuanto a células con fenotipo neuronal, en esta sección utilizamos progenitores neuronales generados previamente en el laboratorio a partir de la línea de CMEhs H9 [110]. Estas últimas fueron co-cultivadas sobre MEFi, y mediante la realización de un protocolo que incluye un medio de inducción neural y distintos suplementos, las células se cultivaron en suspensión para obtener neurorosetas y, a partir de las mismas, una población homogénea con características de progenitores neuronales a los que mencionaremos y abreviaremos a lo largo del presente trabajo como PN.

Validamos, entonces, estos PN para corroborar que los mismos expresaran los marcadores específicos de éste tipo celular y no expresaran los marcadores de pluripotencia. Para ello, realizamos una inmunofluorescencia indirecta de los marcadores de pluripotencia OCT-4, NANOG y el marcador NESTINA.

Pudimos determinar que los marcadores de estado indiferenciado no se expresan, como era de esperarse debido a que se trata de células con cierto grado de diferenciación, y sí se observa la expresión del marcador de progenitor neural NESTINA (Figura 25).



Figura 25. Validación del fenotipo de los PN-H9 | Detección por inmunofluorescencia indirecta de los marcadores de pluripotencia OCT-4 y NANOG y el marcador de progenitor neural NESTINA en PN obtenidos a partir de CMEhs H9. La escala representa 100 μ m.

Además, pusimos a prueba el potencial de diferenciación neuronal de estos PN sometiéndolos a un protocolo de diferenciación a neuronas y realizando una inmunofluorescencia de las mismas midiendo los marcadores neuronales MAP-2 y TUJ-1. Como resultado de la misma pudimos observar células con fenotipo neuronal y positivas para la marcación con los anticuerpos de las proteínas MAP-2 y β -III-TUBULINA (TUJ-1), específicos de neuronas (Figura 26).

Beta tubulina III (TUJ-1), es un miembro de la clase III de la familia de proteínas beta tubulina. Las mismas son uno de los dos componentes estructurales que forman la red de microtúbulos. En particular TUJ-1 es específico de neuronas, y su expresión se correlaciona con las fases tempranas de la diferenciación neuronal.

MAP-2 (del inglés, microtubule associated proteins) es una proteína de asociación a microtúbulos. MAP-2 se expresa sólo en células neuronales. Su expresión en precursores neuronales es muy débil, y se vuelve fuerte luego de la expresión de TUJ-1.

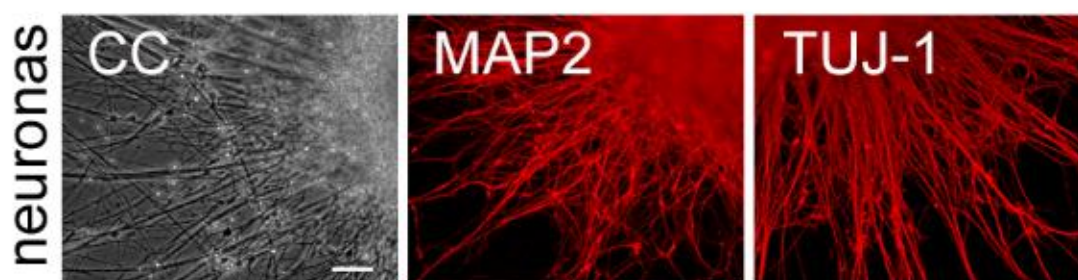


Figura 26. Validación del potencial de diferenciación neuronal de los PN-H9 | Detección por inmunofluorescencia de los marcadores neuronales MAP2 y TUJ-1 en células tipo neuronas diferenciadas a partir de los PN-H9. La escala representa 100 μ m.

1.2 Análisis de los niveles de expresión de factores reguladores del ciclo celular en CMPhs y en su progenie neural

1.2.1 Antecedentes del estudio de la expresión de las principales ciclinas en CMPhs y NP

Previamente, y como mencionamos en la introducción, en mi tesina de licenciatura determinamos el perfil de expresión de los transcritos de las principales ciclinas (*CICLINA A2*, *CICLINA B1*, *CICLINA D1*, *CICLINA D2*, *CICLINA D3* y *CICLINA E1*) a lo largo del ciclo celular de las CMEhs H9 y CMPihs FN2.1 (cultivadas sobre MEFi); y de los PN derivados de las CMEhs H9.

Para ello, y dada las diferencias del porcentaje de células que residen en cada fase del ciclo celular en cualquier momento, dicho análisis lo realizamos tanto en células proliferando de manera asincrónica como en células arrestadas farmacológicamente (arrestamos a las células en la fase G1 temprana con el inhibidor selectivo de las CDK4 y CDK6: PD0332991 (PD); y en G2/M con el inhibidor de la polimerización de los micro túbulos Nocodazol (NOCO) (Figura 9).

Luego, caracterizamos los niveles de expresión de las principales ciclinas en las CMPhs y en los PN derivados de las CMEhs H9. En dicho trabajo, cultivamos las CMPhs sobre MEFi con medio HES o sobre Geltrex con medio condicionado por las MEFi.

A partir de estos cultivos arrestados con PD o NOCO, determinamos los niveles de expresión de las *CICLINAS A2*, *B1*, *D1*, *D2*, *D3* y *E1* en las líneas celulares mencionadas relativizándolas con la expresión de las mismas en FH como control de célula somática. En síntesis, a partir de estos resultados determinamos que hay una mayor expresión de todas las ciclinas en las CMPhs arrestadas en relación a los FH, con excepción de la *CICLINA D1* cuya expresión fue menor en CMPhs.

En el caso de los PN, la expresión de los transcritos de las ciclinas resultó en niveles intermedios entre las CMEhs y los FH, con las excepciones de la *CICLINA D1* cuyo nivel de expresión del ARNm fue similar al observado en los FH arrestados en G1; y la *CICLINA E1* se expresó de manera similar en PN y CMEhs H9 y a niveles mayores que en los FH.

Determinamos también el perfil de expresión temporal de las mismas, nuestros resultados revelaron una expresión periódica de las ciclinas a lo largo del ciclo celular tanto en las CMPhs como en los PN derivados de las CMEhs con excepción de la *CICLINA E* cuya expresión fue constitutiva.

Dado éstos resultados, y como se ha demostrado que la *CICLINA E* está involucrada en mantener la pluripotencia de las CMEh, que su sobreexpresión promueve la auto-renovación de estas células y que pérdida de función elonga la fase G1 e induce la diferenciación [42], en el presente trabajo buscamos profundizar el estudio de su expresión y actividad en CMPhs y en la progenie neural de las CMEhs.

A su vez quisimos completar la caracterización de la expresión de los transcritos de las ciclinas que iniciamos en mi trabajo de licenciatura, y cuantificar también los niveles de expresión proteica de las mismas a lo largo del ciclo celular de las CMPhs.

1.2.2 Análisis de los niveles de expresión de ciclinas en CMPhs y PN sincrónicas y asincrónicas (ARNm y proteínas)

En el presente trabajo, buscamos determinar si hay una correlación entre los niveles de expresión del ARNm de las ciclinas que determinamos previamente, con el de sus proteínas en las distintas líneas celulares estudiadas.

En este caso, cultivamos las CMPhs sobre la matriz extracelular comercial Geltrex con medio de cultivo condicionado por las MEFi. Determinamos, primero entonces, el efecto de ambos inhibidores (PD y NOCO; mismos tiempos y concentraciones puestos a punto previamente) en las CMPhs en estas condiciones de cultivo; en los PN derivados de las células H9 y en los FH nuevamente. Para determinar el porcentaje de células en cada fase, cuantificamos el contenido de ADN por medio de una tinción con ioduro de propidio (IP) seguido de un posterior análisis por citometría de flujo. En todas las líneas arrestadas puede observarse un aumento en el porcentaje de células en la fase G1 del ciclo celular con el arresto con PD; y un aumento en el porcentaje de células en la fase G2 del ciclo celular con el arresto con NOCO (Figura 27).

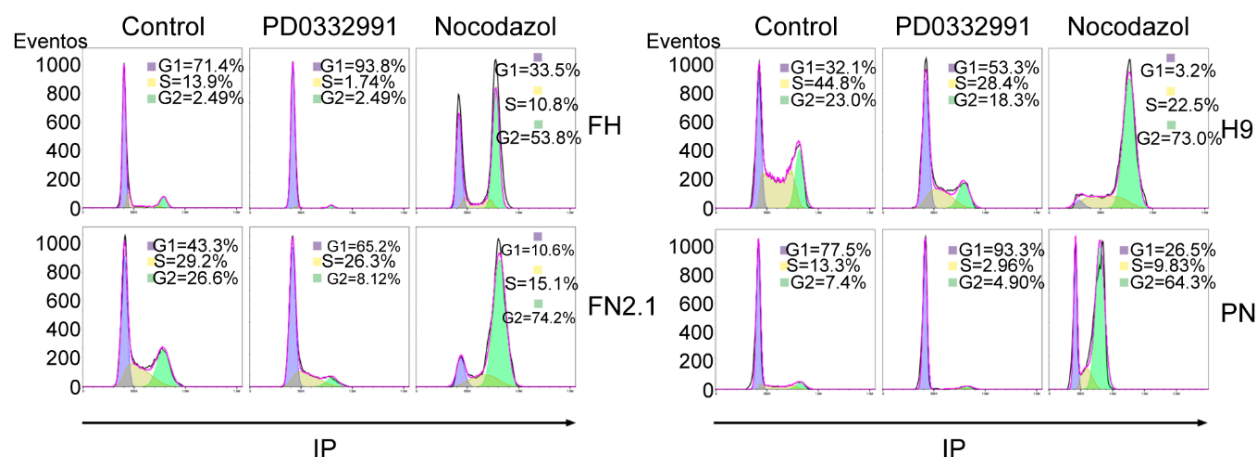


Figura 27. Arrestos farmacológicos CMPhs, PN y FH | Los fibroblastos humanos (FH), CMPihs (FN2.1), CMEhs (H9) (ambas líneas de CMPhs crecidas sobre placas pre-tratadas con geltrex y cultivadas con medio condicionado) y PN derivados de las células H9 fueron arrestados en G1 con PD0332991 (PD) (48h 1 μ M para los FH, 30h 5 μ M para las CMPhs y 24h 1 μ M para los PN) y en G2/M con Nocodazol (NOCO) (72h 200ng/ml para los FH, 24h 100ng/ml para las CMPhs y 54h 200ng/ml para los PN). El perfil del ciclo celular de las células asincrónicas o arrestadas farmacológicamente fue analizado luego de que las células fueran fijadas con etanol frío al 70%. El contenido de ADN fue cuantificado con ioduro de propidio (IP) y su fluorescencia fue determinada con un citómetro de flujo. Se muestra un gráfico representativo con un histograma con la

frecuencia del contenido de ADN para cada condición y línea celular. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular fue calculada con la plataforma Un-variada del programa FlowJo v10.0.7. N° 3.

Luego analizamos los niveles de expresión proteicos de las principales CICLINAS: *A*, *B1*, *D1*, *D2* y *E1* en CMPhs (crecidas sobre geltrex con medio condicionado), PN y FH asincrónicas y arrestadas con PD por medio de la técnica de Western Blot (Figura 28).

A partir de este análisis pudimos determinar que los niveles proteicos de las *CICLINAS A*, *B1* y *E1*, en ambas condiciones, son significativamente mayores en las CMPhs en relación a los FH y PN, y que en PN, los niveles de expresión de estas ciclinas resultan estar en un nivel intermedio entre las CMPhs y los FH.

En el caso de las ciclinas de tipo D, la *CICLINA D1* presenta el mismo comportamiento que su ARNm: mayor expresión en los FH y PN que en las CMPhs. En los PN arrestados en G1, la expresión de las proteínas D1 y D2 fue mayor que en los FH. Sin embargo, la expresión de las ciclinas de tipo D (con excepción de la *CICLINA D2* en PN asincrónicos) en los PN y FH fue significativamente mayor que en las CMPhs, como lo fue también en el caso del ARNm de la *CICLINA D1*. En el caso de las CICLINAS D1 y D2 en los PN arrestados con PD, su expresión fue mayor que en los FH (Figura 28 a y b).

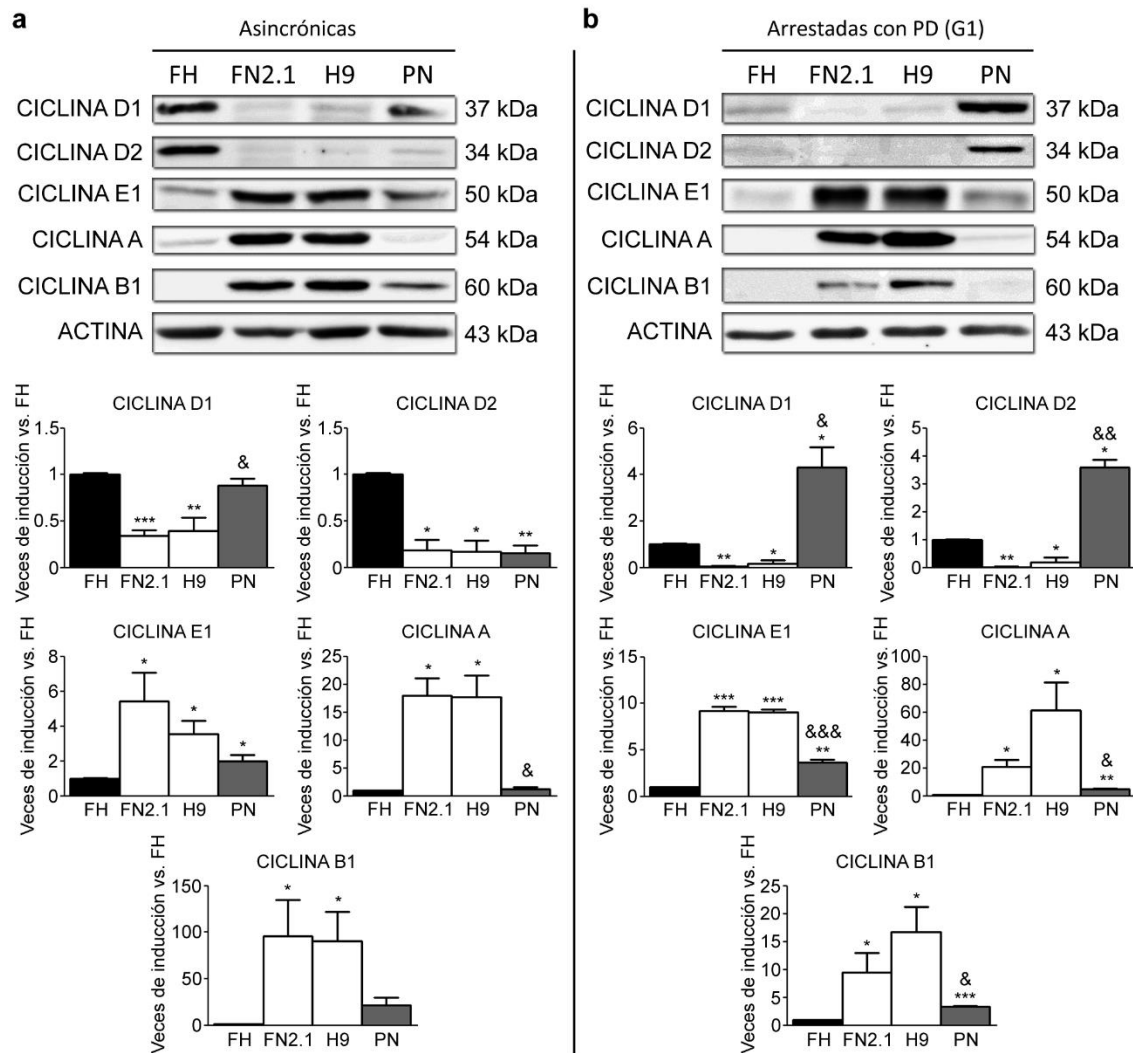


Figura 28. Comparación de los niveles de expresión proteica de las *CICLINAS D1, D2, E1, A y B1* en CMPhs, PN y FH proliferando vs. Arrestadas en G1 | Los niveles proteicos de las *CICLINAS D1, D2, E1, A y B1* fueron analizados por medio Western Blot en CMPhs (H9 y FN21), PN y FH crecidas de manera (a) asincrónica o (b) arrestadas en la fase G1 con PD (1 μ M por 48 h para FH, 5 μ M por 30h para CMPhs y 1 μ M por 24h para PN). Como control de carga se utilizó ACTINA. Los gráficos muestran el promedio \pm error estándar de las veces de inducción de la proteína relativo a FH de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$ vs. FH; (&) $p < 0.05$, (&&) $p < 0.01$ y (&&&) $p < 0.001$ vs. H9.

1.2.3 Análisis de los niveles de expresión y regulación de la *CICLINA E1* a lo largo del ciclo celular de CMPhs y PN

En nuestra investigación previa sobre el perfil de expresión de las ciclinas a lo largo del ciclo celular de las CMPhs y PN derivados de las CMEhs H9 concluimos que la *CICLINA E1* fue la única ciclina que presentaba un perfil de expresión constitutivo.

Debido a la controversia que existe en bibliografía de cómo es regulada esta ciclina a lo largo del ciclo celular de CMPhs, y como se ha reportado que la misma estaría involucrada en mantener el estado de pluripotencia en CMEm [30], nos pareció pertinente profundizar el estudio de su expresión y regulación en CMPhs y en la progenie neural derivada de las CMEhs H9.

Las condiciones de cultivo de CMPhs con medio condicionado por MEFi y Geltrex tienen componentes múltiples que no son completamente definidos, como lo son los factores liberados por las MEFi. Teniendo en cuenta esto, decidimos cultivar las células en un medio completamente definido como lo es el Essential 8 (E8) en placas con un pre-tratamiento de vitronectina. De este modo, buscamos determinar el perfil de expresión (periódico o constitutiva) del ARNm de la *CICLINA E1* a lo largo de las distintas fases del ciclo celular en las CMPhs en estas condiciones de cultivo nuevas, para determinar si las mismas influyen en los resultados obtenidos.

En primer lugar, entonces, validamos el uso de éstos inhibidores (PD y NOCO) bajo las nuevas condiciones de cultivo. Para determinar el efecto de las mismas en el ciclo celular, cuantificamos el contenido de ADN por medio de una marcación con yoduro de propidio (Figura 29), observando, como era de esperarse, un aumento en el porcentaje de células en G1 en las células arrestadas con PD, y en G2 en las células arrestadas con Nocodazol.

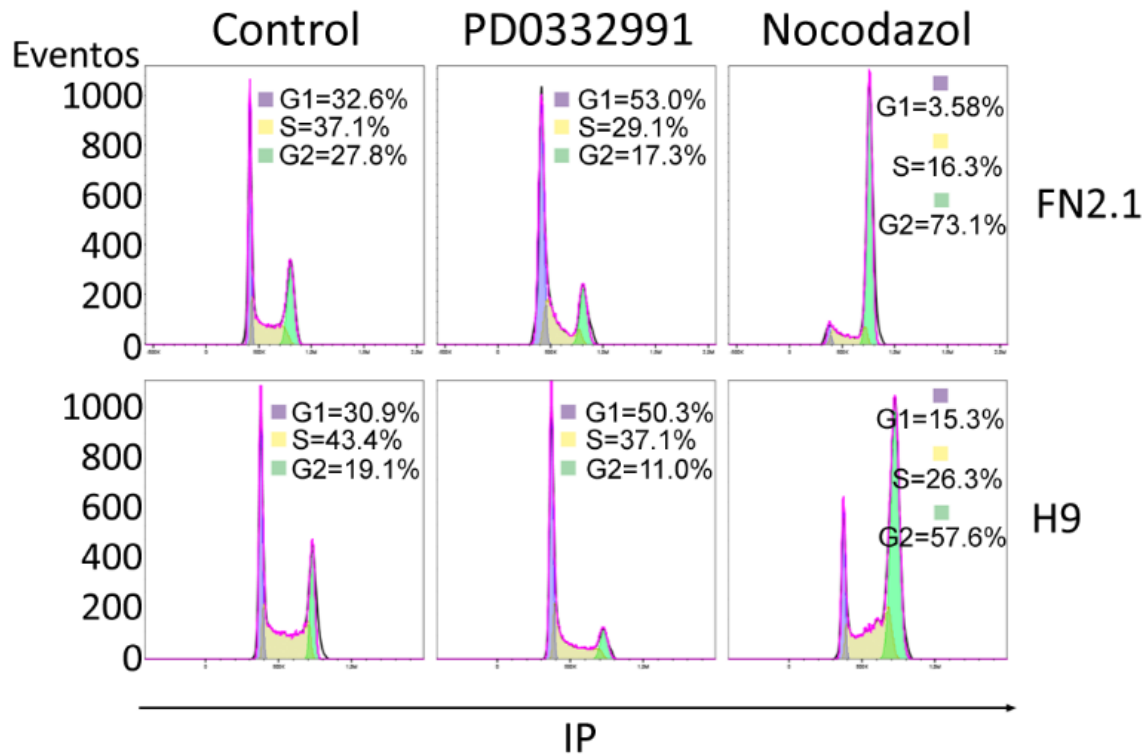


Figura 29. Arresto en las distintas fases del ciclo celular CMPhs CMPhs (CMEhs H9 y CMPihs FN2.1) crecidas y mantenidas en condiciones de cultivo completamente definidas (placas tratadas con vitronectina y medio E8) fueron arrestadas en G1 con PD0332991 (PD) (5 μ M por 30h) y en G2/M con: Nocodazol (100ng/ml por 24h). El perfil del ciclo celular de las células asincrónicas y farmacológicamente arrestadas fue analizado luego de que las células fueran fijadas con etanol 70% frío. El contenido de ADN fue medido con ioduro de propidio (IP) y su fluorescencia determinada con un citómetro de flujo. Se muestra un gráfico representativo con un histograma con la frecuencia del contenido de ADN para cada condición. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular fue calculada con la plataforma Un-variada FlowJo v10.0.7's. N=3.

Luego, analizamos los niveles de expresión de la *CICLINA E1* por RT-qPCR en CMEhs H9 y CMPihs FN21 crecidas asincrónicamente o arrestadas en G1/S con PD o G2/M con NOCO. No encontramos diferencias significativas en la expresión del ARNm de la misma a lo largo del ciclo celular de células asincrónicas o arrestadas en G1 temprano o G2/M, como fue el caso en células plaqueadas sobre un pre-tratamiento de Geltrex y medio condicionado (Figura 30).

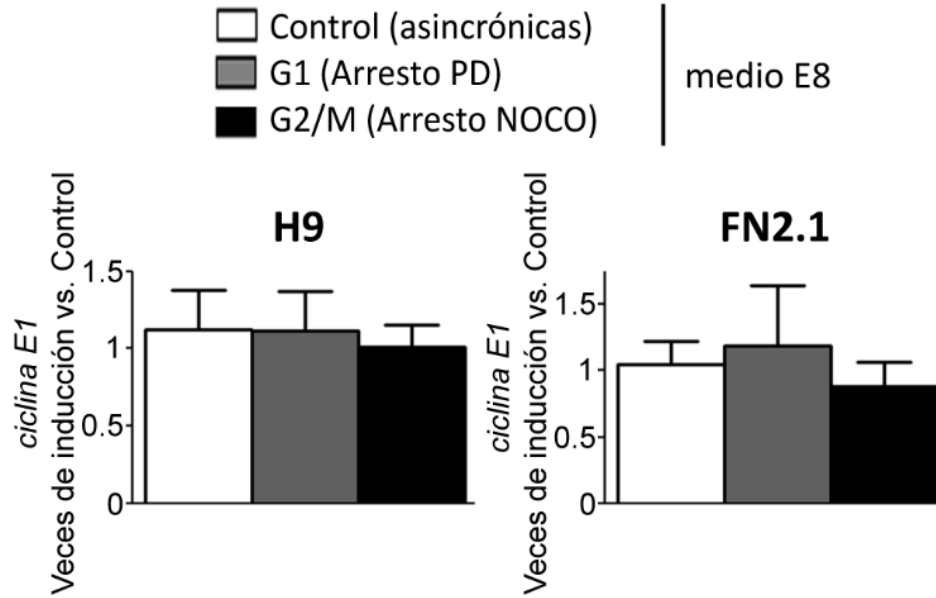


Figura 30. Cambios en los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* a través del ciclo celular de CMPhs crecidas en un medio definido | Análisis de los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* cuantificado por RT-qPCR en G1 asincrónico o sincrónico (arresto PD, 30h 5 μ M) o G2/M (arresto NOCO, 24h 100ng/ml) en (A) CMEhs H9 y (B) CMPihs FN2.1, crecidas y mantenidas en condiciones definidas (placas con pre-tratamiento de vitronectina y medio E8). Los gráficos muestran el promedio + error estándar de las veces de inducción del ARNm relativo a células asincrónicas o células control (definidas arbitrariamente como 1) de al menos tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$ vs. Control.

Uno de los componentes clave de todos los medios de cultivo de las CMPhs, esencial para mantener su pluripotencia, auto-renovación, viabilidad y proliferación, es el factor de crecimiento básico fibroblástico (bFGF). Se ha demostrado su importancia en el ciclo celular, supervivencia, proliferación, y regulación de la pluripotencia de estas células [111].

Este factor activa las vías de transducción de señales PI3K/AKT y MEK/ERK1/2 [112-114], por lo que quisimos determinar si las mismas podrían estar involucradas en la regulación del ARNm de la *CICLINA E1* en las CMPhs estudiadas (H9 y FN2.1).

Para ello, utilizamos dos inhibidores farmacológicos: GSK690693, inhibidor pan-AKT quinasa, y U0126, bloquea la activación de MAPK (ERK 1/2) al inhibir la actividad quinasa de MAPKK o MEK1/2.

Analizamos, entonces, los niveles de expresión de esta ciclina por RT-qPCR en células asincrónicas de ambas CMPhs (H9 y FN2.1) cultivadas con E8 luego de la inhibición farmacológica de AKT (GSK690693, 10 μ M) o MEK (U0126, 20 μ M) durante 24 horas. Sólo cuando la vía de señalización de MEK/ERK fue inhibida con U0126, observamos una disminución significativa de los niveles de ARNm de la *CICLINA E1* en ambas líneas de CMPhs (Figura 31 a). Por el contrario, no hubieron cambios

significativos en los niveles de expresión de la *CICLINA E1* al tratar las células con el inhibidor pan-AKT quinasa. En un trabajo previo, nuestro grupo demostró que la inhibición farmacológica de AKT con este mismo inhibidor, en CMEhs (H9 y H1) y CMPihs (FN2.1), disminuía la viabilidad celular, aumentaba la translocación de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática (esta translocación desde la cara interna de la membrana hacia la externa es una característica temprana de la apoptosis), aumentaba la fragmentación del ADN, y aumentaba el clivaje de la CASPASA-9, la activación de la CASPASA-3 y la proteólisis del sustrato de la CASPASA-3: PARP (todos ellos componentes de la vía de apoptosis mediada por la mitocondria) [114]. De este modo, podemos concluir que dicho inhibidor funciona en las líneas celulares estudiadas, pero los niveles de expresión de la *CICLINA E1* no estarían siendo regulados por la vía de señalización de PI3K/AKT.

Además, la *CICLINA E1* fue identificada como un target transcripcional del factor de transcripción c-MYC en CMPs y en otros tipos celulares, el cual fue reportado como un potenciador de la reprogramación y se le asigna un rol importante en la regulación de la pluripotencia [115, 116]. Por ello, quisimos ver si c-MYC podría regular los niveles de expresión de esta ciclina. Para determinar esto, inhibimos farmacológicamente a c-MYC con el inhibidor 10058-F4 (24 horas, 100µM), y luego medimos los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* por RT-qPCR. Observamos una disminución significativa de los niveles del ARNm de la *CICLINA E1* en ambas líneas de CMPhs luego de la inhibición de c-MYC (Figura 31 a).

Por otro lado, quisimos determinar si los niveles del ARNm de la *CICLINA E1* eran inducidos por los factores de transcripción de la familia de los E2F. Para ello, cuantificamos dichos niveles por RT-qPCR en CMPhs asincrónicas cultivadas con E8 luego de 7 días de tratamiento con el inhibidor pan-E2Fs HLM006474 (40µM). El mismo es un inhibidor general que inhibe la unión al ADN de todos los complejos de E2Fs. Encontramos una disminución significativa de los niveles de ARNm de la *CICLINA E1* en ambas células CMPhs (Figura 31 b).

En conjunto, todos estos resultados sugieren que MEK/ERK, c-MYC y los E2Fs podrían estar modulando los niveles de expresión de la *CICLINA E1* en las CMEhs H9 y CMPihs FN2.1.

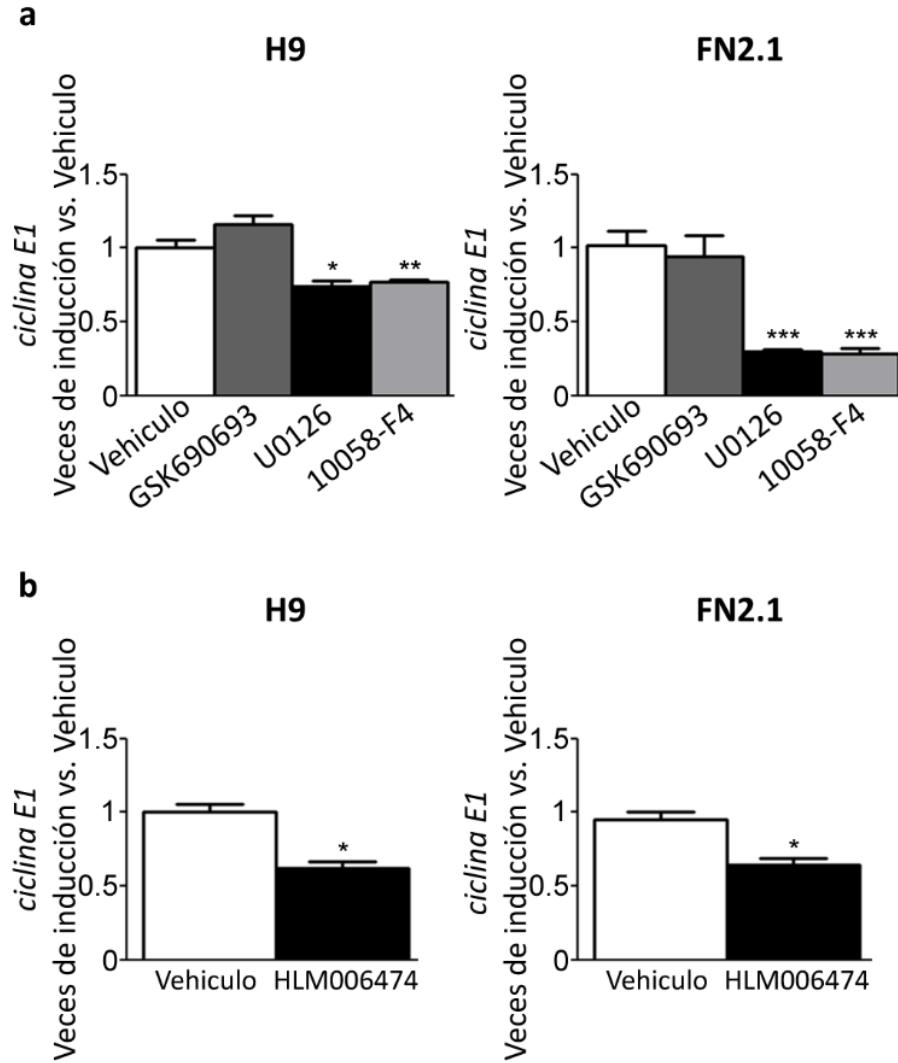


Figura 31. Cambios en los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* en CMPs asincrónicas luego de la inhibición de PI3K/AKT, MEK/ERK, c-MYC y E2Fs | Análisis de los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* cuantificado por RT-qPCR en (a) CMPs asincrónicas crecidas con medio E8, 24 horas post inhibición AKT, MEK1/2 y c-MYC con GSK690693 (10µM), U0126 (20µM) y 10058-F4 (100µM), respectivamente; y (b) CMPs asincrónicas crecidas con medio E8 durante 7 días en la presencia del inhibidor pan-E2Fs HLM006474 (40µM). La expresión de *RPL7* fue utilizada como normalizadora en todos los casos. Los gráficos muestran el promedio + error estándar de las veces de inducción del ARNm relativo a células asincrónicas o células control vehículo (tratamiento con DMSO) (definidas arbitrariamente como 1) de al menos tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$ vs. Vehículo (DMSO).

En células somáticas está bien establecido que la expresión de la *CICLINA E1* aumenta en la fase G1 del ciclo celular y presenta un pico de expresión cerca de la transición G1/S. En nuestros resultados, en cambio, determinamos una expresión constitutiva de la *CICLINA E1* a lo largo del ciclo celular de las CMPs. Teniendo todo esto en cuenta, y considerando que el inhibidor que utilizamos (PD) arresta el

ciclo celular en una fase G1 temprana, nos preguntamos si en nuestro diseño experimental nos estábamos perdiendo la ventana temporal en la que la *CICLINA E1* alcanza sus niveles de expresión más altos.

Decidimos entonces utilizar un inhibidor distinto para arrestar las células en una fase G1 tardía o en la transición G1/S: Afidicolina (Afi.), un inhibidor específico de la ADN polimerasa α . Para medir el efecto de esta droga en el perfil del ciclo celular, cuantificamos el contenido de ADN por medio de una tinción con yoduro de propidio seguido de un análisis por citometría de flujo. Para las CMPhs probamos distintos tiempos y concentraciones (18, 20 y 24 h; y 10 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$), y en el caso de los PN una única concentración (10 $\mu\text{g/ml}$) a distintos tiempos (18, 20, 24, 48, 72 h). Buscamos así determinar el mejor tiempo y concentración de la droga, en cada línea celular, logrando un alto porcentaje de células arrestadas en la fase G1 tardía o transición G1/S y, a su vez, que dichos tiempo/concentración no resulte tóxica para las células. En la figura 18 pueden observarse los tiempos y concentraciones de incubación probados en cada línea celular que no fueron utilizados, y en la figura 19 aquellos seleccionados. Siempre priorizamos seleccionar, frente a un porcentaje de arresto muy similar en G1, las menores concentraciones o tiempos de incubación. Esto puede observarse en el caso de ambas líneas de CMPhs, donde se logró un mejor arresto con 10 $\mu\text{g/ml}$ por 20 horas (Figura 32) que en las células tratadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ por 18 horas, no encontrando diferencias casi con el arresto por 24 horas con 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 32), por eso se seleccionó el tiempo de incubación menor frente a una misma concentración.

En el caso de los PN, el mejor porcentaje de células arrestadas se logró con una incubación de Afidicolina de 10 $\mu\text{g/ml}$ por 48 horas (Figura 33), dado que con un tiempo de incubación mayor (72 h) puede observarse una mayor población de células muertas (debris celular que se observa como una población sub-G1) (Figura 32).

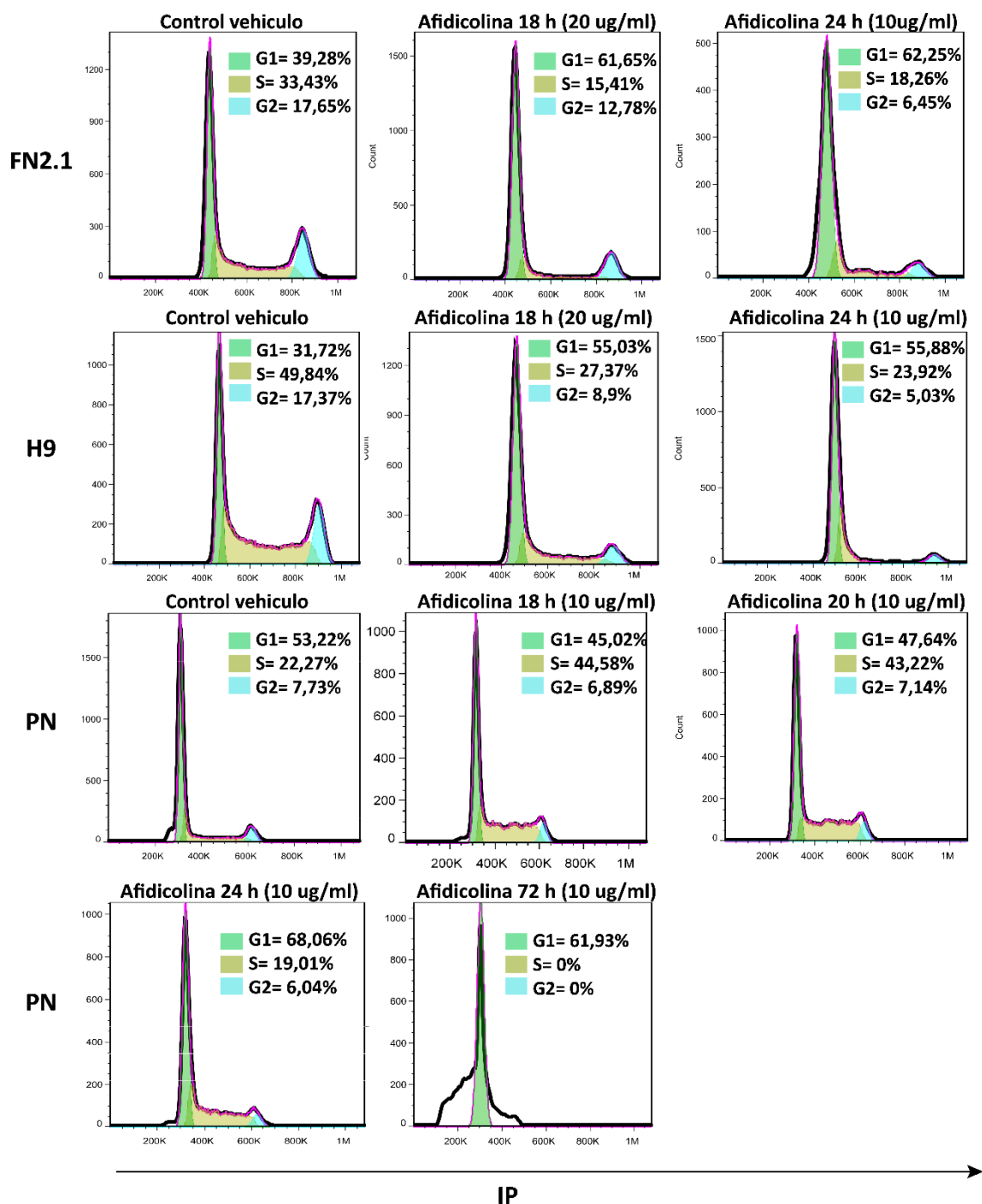


Figura 32. Puesta a punto arresto CMPHs y PN en la transición G1/S CMPihs FN2.1, CMEh H9 (ambas crecidas en medio E8) y PN derivados de éstas CMEhs H9 fueron arrestadas en la G1 tardía o la transición G1/S con Afidicolina. Los tiempos y concentraciones que se muestran fueron aquellos que se probaron pero no los seleccionados finalmente para trabajar (los mismos se encuentran en la Figura 31). El perfil del ciclo celular de las células asincrónicas y las células farmacológicamente arrestadas fue analizado luego de que las células se fijan con etanol 70% frío. El contenido de ADN fue medido por medio de una marcación con yoduro de propidio (IP) y su fluorescencia se determinó a través de una citometría de flujo. Se muestra un histograma con la frecuencia del contenido de ADN para cada línea. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se calculó con la plataforma un-variada del software FlowJo v10.0.7's. N=3.

En los tiempos y concentraciones seleccionadas de este inhibidor para cada línea celular, puede observarse un aumento significativo del porcentaje de células en la fase G1 (Figura 33).

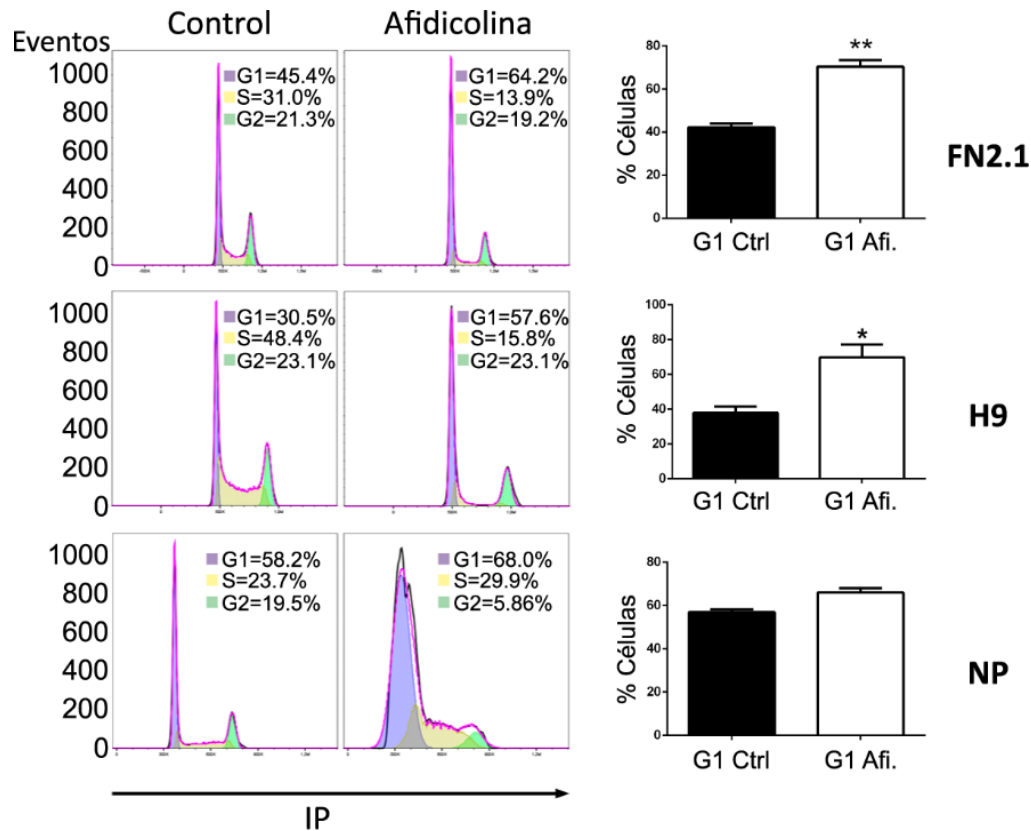


Figura 33. Arresto CMPhs y PN en la transición G1/S | CMPihs FN2.1, CMEh H9 (ambas crecidas en medio E8) y PN derivados de éstas CMEhs H9 fueron arrestadas en la G1 tardía o la transición G1/S con Afidicolina (20h 10µg/ml para las CMPhs y 48h 10µg/ml para los PN). El perfil del ciclo celular de las células asincrónicas y las células farmacológicamente arrestadas fue analizado luego de que las células se fijan con etanol 70% frío. El contenido de ADN fue medido por medio de una marcación con yoduro de propidio (IP) y su fluorescencia se determinó a través de una citometría de flujo. Se muestra un histograma con la frecuencia del contenido de ADN para cada línea. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se calculó con la plataforma un-variada del software FlowJo v10.0.7's. N=3. Los gráficos de barra muestran el promedio + error estándar del porcentaje de células arrestadas en G1 con Afi. Relativo al porcentaje de células en G1 en las células control. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) vs. Fase G1 control de cada línea celular.

Al finalizar la puesta a punto de los tiempos y concentraciones de este inhibidor, arrestamos con el mismo a las CMPhs (CMEh H9 y CMPihs FN2.1), ambas crecidas en placas tratadas con vitronectina y E8, y los PN en la transición G1/S.

Luego, analizamos los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* por una RT-qPCR en las líneas celulares mencionadas, creciendo de manera asincrónica o arrestadas en la transición G1/S debido al tratamiento con Afidicolina. Notablemente, observamos un aumento significativo en los niveles de

expresión del ARNm de la *CICLINA E1* en las células arrestadas en la transición G1/S en comparación con las células asincrónicas (Figura 34). Con este nuevo enfoque experimental, pudimos determinar que el ARNm de la *CICLINA E1* se expresa periódicamente durante el ciclo celular de las CMPhs y los PN.

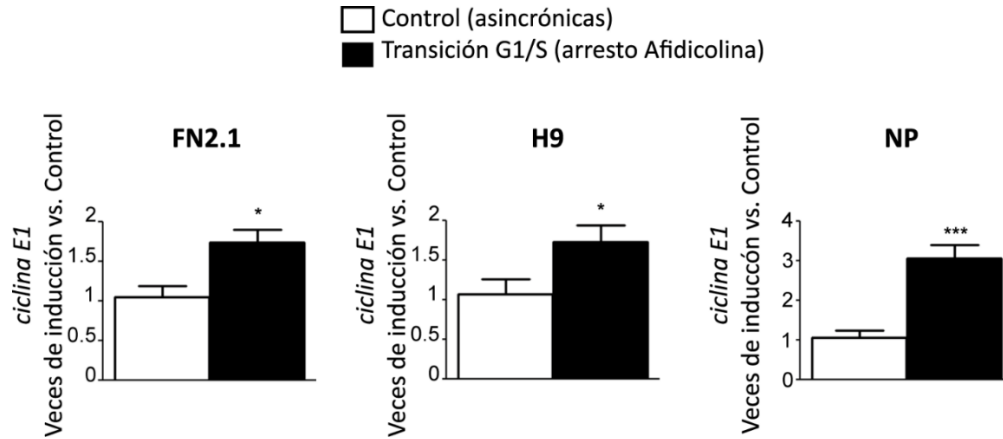


Figura 34. Regulación de los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* en la transición G1/S | Análisis de los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* cuantificado por RT-qPCR en la transición G1/S de CMPhs FN2.1, CMEhs H9 (ambas crecidas y mantenidas en placas pre-tratadas con vitronectina y medio E8) y de PN derivados de éstas últimas, asincrónicas y sincrónicas (Afidicolina). La expresión de *RPL7* fue utilizada como normalizadora en todos los casos. Los gráficos muestran el promedio + error estándar de las veces de inducción del ARNm relativo a células asincrónicas control (definidas arbitrariamente como 1) de al menos tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$ y (***) $p < 0.001$ vs. Control (células asincrónicas)

Una vez analizado el ARNm de la *CICLINA E1*, nos preguntamos si los niveles de expresión de su proteína también fluctúan a través del ciclo celular. Para ello, cuantificamos los niveles proteicos de la *CICLINA E1* por Western blot en CMPhs (CMEhs H9 y CMPihs FN2.1; ambas crecidas en placas con geltrex y medio condicionado) y PN asincrónicas, en G1 (arrestadas con PD) y en G2/M (arrestadas con NOCO). No observamos cambios significativos en los niveles de expresión proteica entre las células asincrónicas y las células arrestadas con PD. Sin embargo, encontramos una reducción en la abundancia de la proteína de la *CICLINA E1* en las células arrestadas en G2/M con NOCO (Figura 35 a).

Nuevamente, para descartar que la regulación de la proteína de la *CICLINA E1* a través del ciclo celular de las CMPhs dependiera de las condiciones de cultivo celular, repetimos los experimentos anteriores en éstas líneas celulares cultivadas en condiciones bien definidas (placas tratadas con vitronectina y medio E8). Sorprendentemente, encontramos un leve pero significativo aumento de los niveles de expresión proteicos en las células arrestadas con PD (Figura 34 b); y, al igual que anteriormente, una disminución de los niveles proteicos en las células arrestadas con NOCO (Figura 35 b).

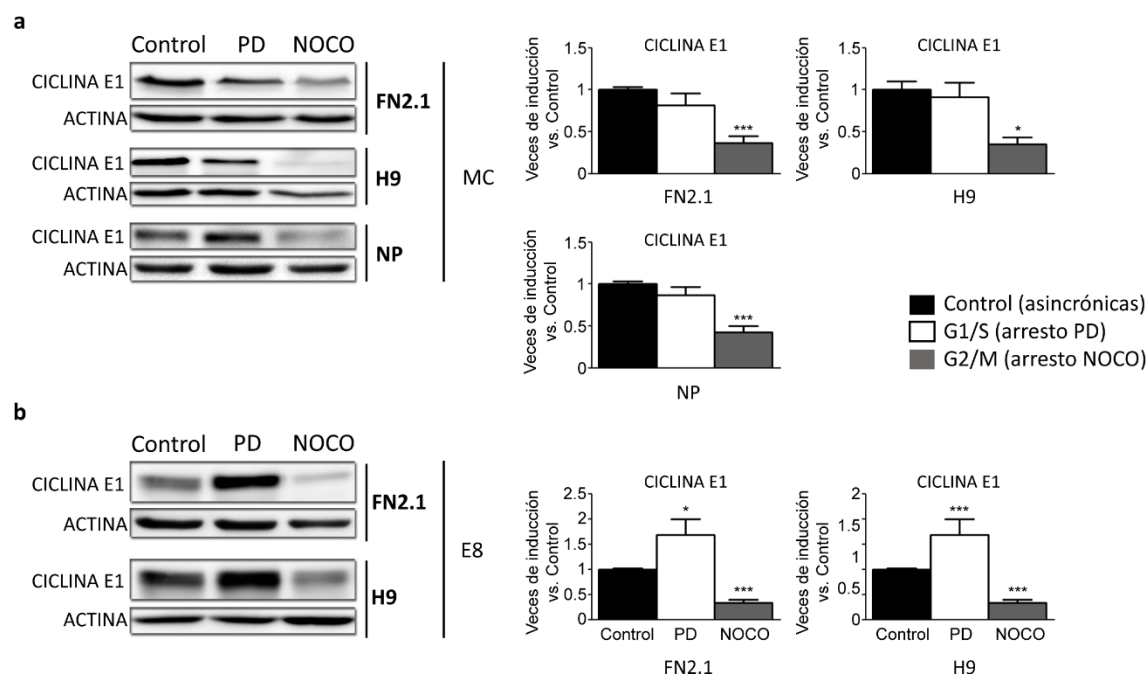


Figura 35. Cambios en los niveles de expresión de la proteína de la *CICLINA E1* a lo largo de la progresión del ciclo celular de CMPhs y PN | Análisis de los niveles de expresión de la *CICLINA E1* cuantificada por Western Blot en asincrónicas (control) o sincrónicas G1/S (arresto PD, 30h 5 μ M para CMPhs y 24h 1 μ M para PN) o G2/M (arresto NOCO, 24h 100ng/ml para CMPhs y 54h 200ng/ml para PN) en (a) CMEhs H9 y CMPihs FN2.1 (crecidas en placas con pretratamiento de geltrex con medio condicionado (MC)) y células PN o (b) CMPhs en placas pre-tratadas con vitronectina con E8. Se utilizó actina como control de carga. Promedio + error estándar de las veces de inducción relativo al Control (células asincrónicas, definidas arbitrariamente como 1). Se muestra un gráfico representativo de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. Control.

Luego, arrestamos también las CMPhs (cultivadas con medio de cultivo definidas) y PN en la transición G1/S con Afidicolina, y cuantificamos los niveles de expresión de la proteína de la *CICLINA E1* por Western blot. En todos los casos observamos un aumento de la expresión de la misma (Figura 37).

Finalmente, y dado que la disminución de los niveles de expresión de la proteína de la *CICLINA E1* en las fases S-G2/M podría deberse a un efecto secundario del inhibidor utilizado, decidimos repetir los experimentos utilizando otro inhibidor farmacológico: Vincristina. Ésta droga es un inhibidor de la formación del huso mitótico que arresta a las células en G2/M. De este modo, buscamos arrestar las células con otro inhibidor distinto a NOCO para asegurarnos que los efectos observados se deben al arresto y no al inhibidor utilizado. Para determinar el efecto de esta droga en el ciclo celular, cuantificamos el contenido de ADN por medio de una marcación con yoduro de propidio, observando, como era de esperarse, un aumento en el porcentaje de células en G2 en las células arrestadas con Vincristina. Previamente, probamos dos concentraciones distintas (250 y 500nM) por 24 horas y, dado que el porcentaje de células arrestadas fue similar en ambas concentraciones, seleccionamos la concentración menor (Figura 36).

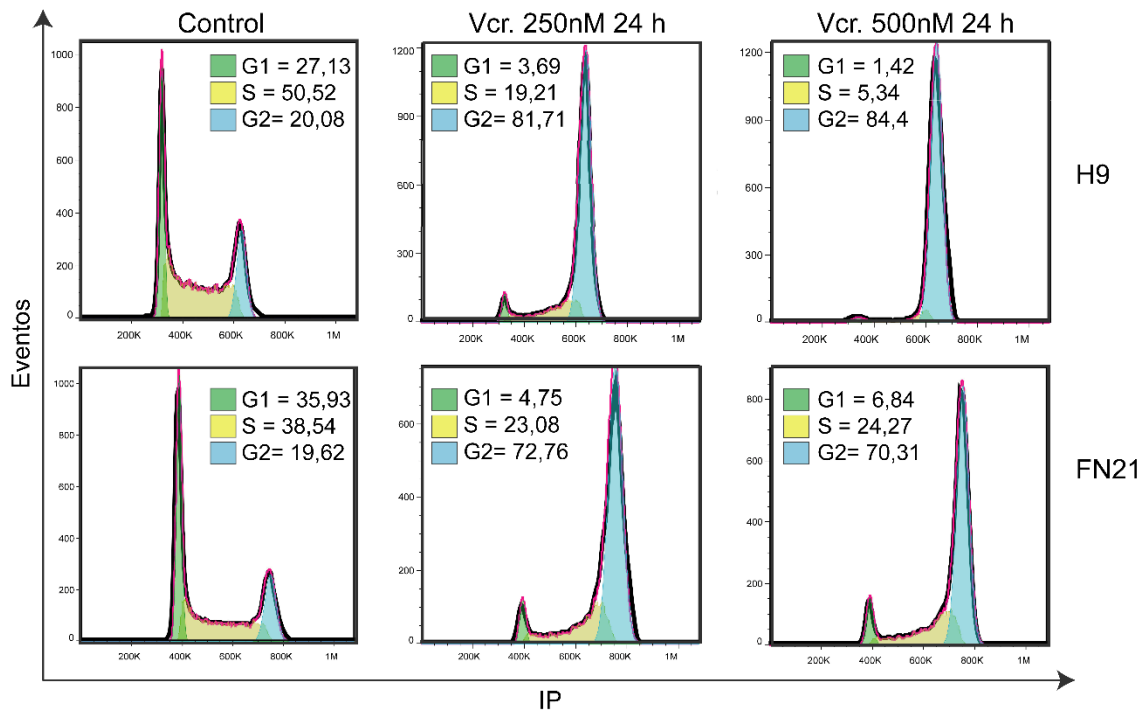


Figura 36. Arresto en las distintas fases del ciclo celular CMPhs | CMPhs (CMEhs H9 y CMPihs FN2.1) crecidas y mantenidas en condiciones de cultivo completamente definidas (placas pre-tratadas con vitronectina y medio E8) fueron arrestadas en G2/M con Vincristina (250nM por 24h). El perfil del ciclo celular de las células asincrónicas y farmacológicamente arrestadas fue analizado luego de que las células fueran fijadas con etanol 70% frío. El contenido de ADN fue medido con yoduro de propidio (IP) y su fluorescencia determinada con un citómetro de flujo. Se muestra un gráfico representativo con un histograma con la frecuencia del contenido de ADN para cada condición. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular fue calculada con la plataforma Un-variada FlowJo v10.0.7's. N=3.

Al analizar los niveles proteicos por Western Blot, observamos una significativa disminución de los mismos en la transición G2/M luego del tratamiento con vincristina (Figura 37).

En conjunto, estos resultados indicarían que los niveles de expresión de la proteína de la *CICLINA E1* son periódicamente regulados a lo largo del ciclo celular de ambas CMPhs (CMEhs H9 y CMPihs FN2.1) y PN, aumentando su expresión (de modo similar que en el ARNm de la *CICLINA E1*) en la transición G1/S y disminuyendo la misma en G2/M.

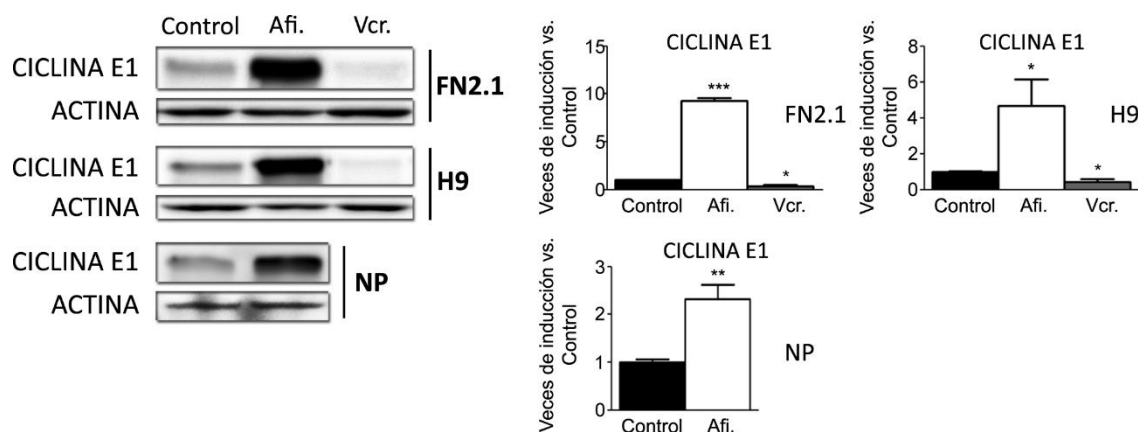


Figura 37. Cambios en los niveles de expresión de la proteína de la CICLINA E1 en las transiciones G1/S y G2/M del ciclo celular de CMPhs y PN | Análisis de los niveles de expresión de la CICLINA E1 cuantificada por Western Blot en células asincrónicas (control) o sincrónicas G1/S tardío [arresto con Afidicolina (Afi.), 20h 10µg/ml para CMPhs y 48h 10µg/ml para PN] o G2/M Vincristina (Vcr.) 24h 250nM para CMPhs y células PN. Se utilizó ACTINA como control de carga. Promedio + error estándar de las veces de inducción relativo al Control (células asincrónicas, definidas arbitrariamente como 1). Se muestra un gráfico representativo de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. Control.

Luego, para confirmar estos resultados, analizamos el perfil de expresión del ARNm y de la proteína de la *CICLINA E1* a lo largo del ciclo celular de las CMPhs luego de sincronizarlas. Esto lo hicimos mediante un experimento de arresto y liberación con Afidicolina.

Para ello, las CMPhs crecidas en condiciones de cultivo definidas fueron sincronizadas en la transición G1/S con Afidicolina (10 µg/ml por 20 h) y luego liberadas de modo que reingresen en el ciclo celular. Para demostrar que las células fueran liberadas del procedimiento de bloqueo de manera correcta, la progresión del ciclo celular fue analizada cada 4 horas luego de la liberación hasta un total de 32 horas (Figura 38), demostrando también cómo las células se liberaron correctamente del arresto.

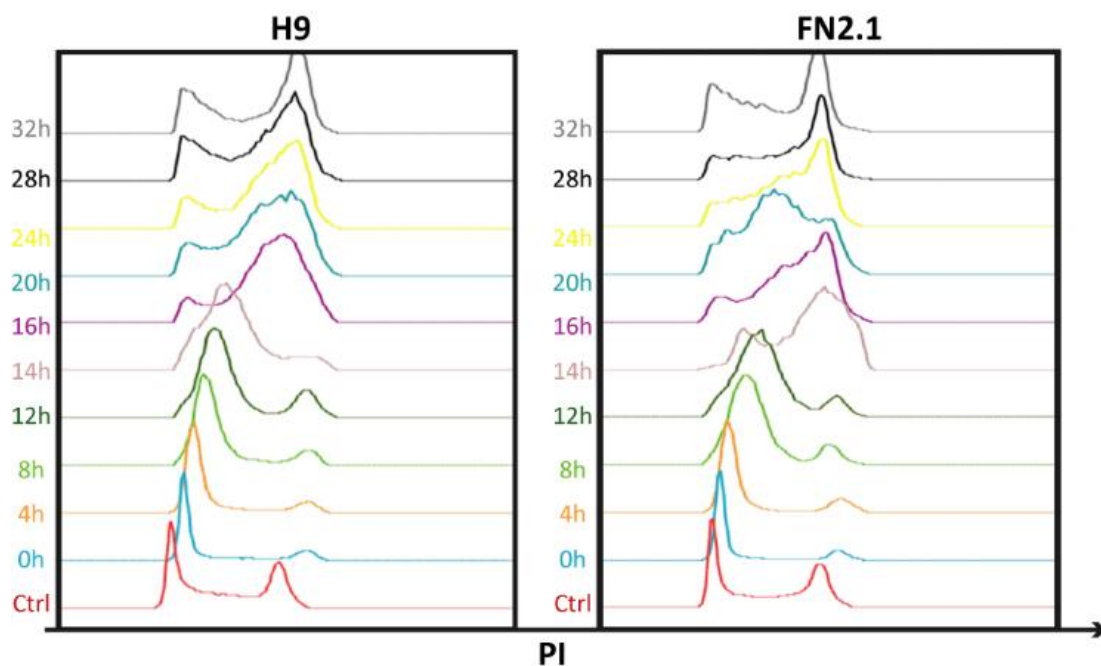


Figura 38. Sincronización CMPhs Las CMPhs, crecidas y cultivadas en medios definidos (geltrex y medio E8), fueron sincronizadas en la transición G1/S arrestándolas con Afidicolina (AFI) (10µg/ml por 20 h) y liberadas para ingresar en el ciclo celular, luego: las células fueron recolectadas luego de la liberación y fijadas con etanol 70% frío a las 0, 4, 8, 12, 14, 16, 20, 24, 28 y 32 horas. El contenido de ADN fue medido con ioduro de propidio (PI) y su fluorescencia se midió con un citómetro para determinar el contenido de ADN. Control (Ctrl): células asincrónicas. h: horas.

También confirmamos los resultados del perfil de expresión periódico del ARNm de las *CICLINAS A2*, *B1*, *D1*, *D2* y *D3* con este nuevo enfoque experimental. En este caso, los transcriptos fueron medidos luego del experimento de arresto y liberación con Afidicolina en las poblaciones celulares sincronizadas (Figura 39).

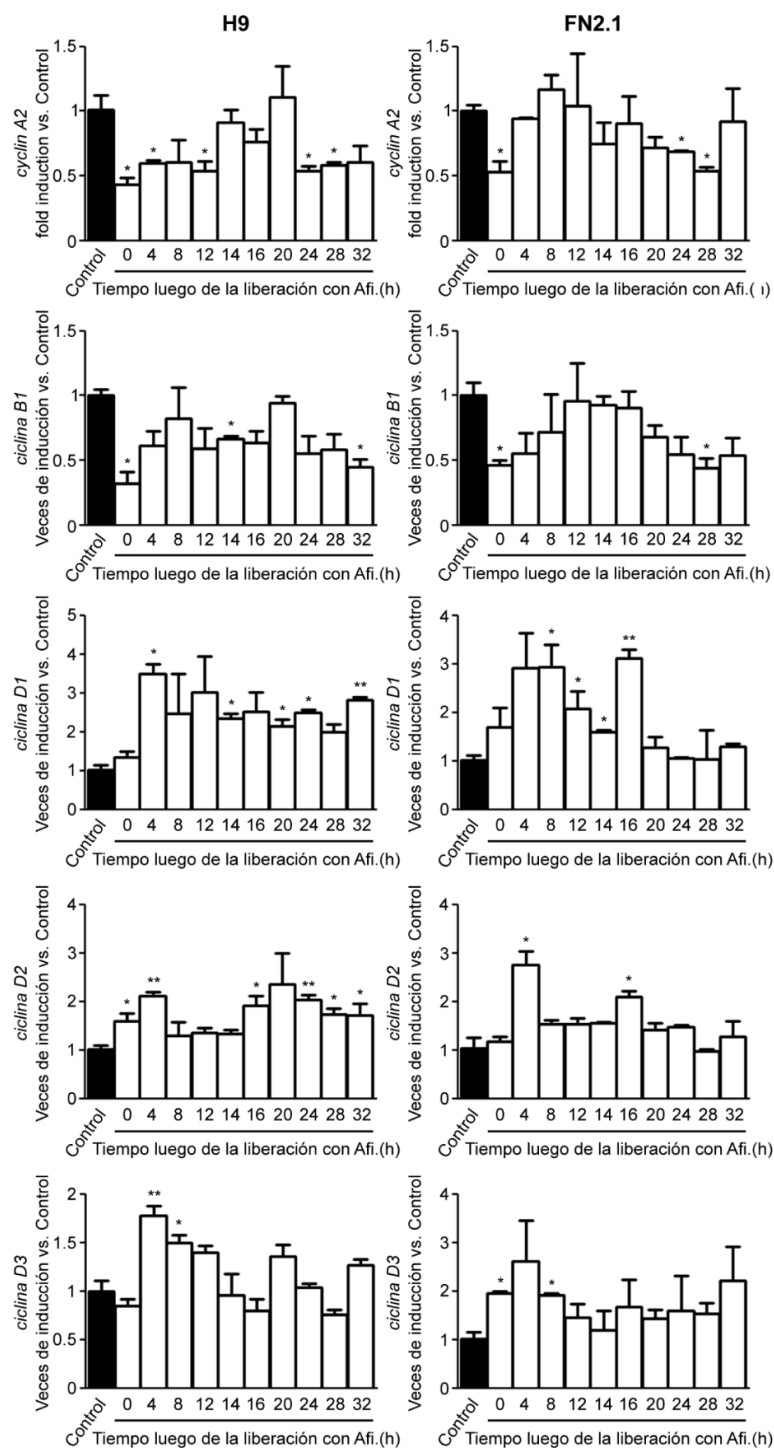


Figura 39. Niveles de expresión de ARNm de las ciclinas en la progresión del ciclo celular en CMPhs Las CMPhs (H9 y FN2.1), crecidas en condiciones de cultivo definidas, fueron sincronizadas en la transición G1/S arresándolas con Afidicolina (Afi.) (10 μ g/ml por 20 h) y liberadas para ingresar en el ciclo celular. Se cuantificaron por RT-qPCR los niveles de expresión del ARNm de las *CICLINAS A2*, *B1*, *D1*, *D2* y *D3* en células asincrónicas o en distintos tiempos luego de la remoción de Afi. La expresión de RPL7 fue utilizada como normalizador. Los gráficos muestra promedio + error estándar de las veces de inducción del ARNm relativo a las células control asincrónicas (establecidas arbitrariamente como 1) de al menos tres experimentos independientes: horas. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ vs. Control (células asincrónicas).

Con este enfoque, buscamos poder analizar la expresión del transcripto y la proteína de la *CICLINA E1* a lo largo del ciclo celular en las células con el ciclo celular sincronizado de modo de poder determinar de una manera más clara su perfil de expresión temporal. Para ello, las CMEhs H9 y CMPihs FN2.1, crecidas en condiciones de cultivo definidas (vitronectina y medio E8) fueron sincronizadas en la transición G1/S con Afidicolina y luego liberadas de modo que reingresen en el ciclo celular.

Luego, medimos los niveles de expresión del ARNm y la proteína de la *CICLINA E1* por RT-qPCR y Western Blot respectivamente, en células asincrónicas o cada en diferentes tiempos luego de remover la Afidicolina. En los resultados obtenidos, observamos que los niveles de ARNm presentaban un pico de expresión en la transición G1/S y se mantenían altos hasta 16hs luego de la liberación, esto acompañado de un aumento de la población de células con un contenido de ADN de 4N (fase G2/M). A las 32 horas luego de la liberación, se observa que los niveles de expresión de la *CICLINA E1* tienen un pico de expresión nuevamente (Figura 40 a). A partir de estos resultados, pudimos confirmar que los niveles de expresión del transcripto de esta ciclina son regulados periódicamente a través de la progresión del ciclo celular de las CMPhs.

En cuanto a la abundancia de la proteína de la *CICLINA E1*, observamos un comportamiento similar, aunque demorado, observando una alta expresión de la proteína hasta 20 horas después de la liberación (Figura 40 b). En conclusión, y a partir de estos resultados, determinamos que los niveles de la proteína de la *CICLINA E1* se regulan periódicamente a través de la progresión del ciclo celular de las CMPhs.

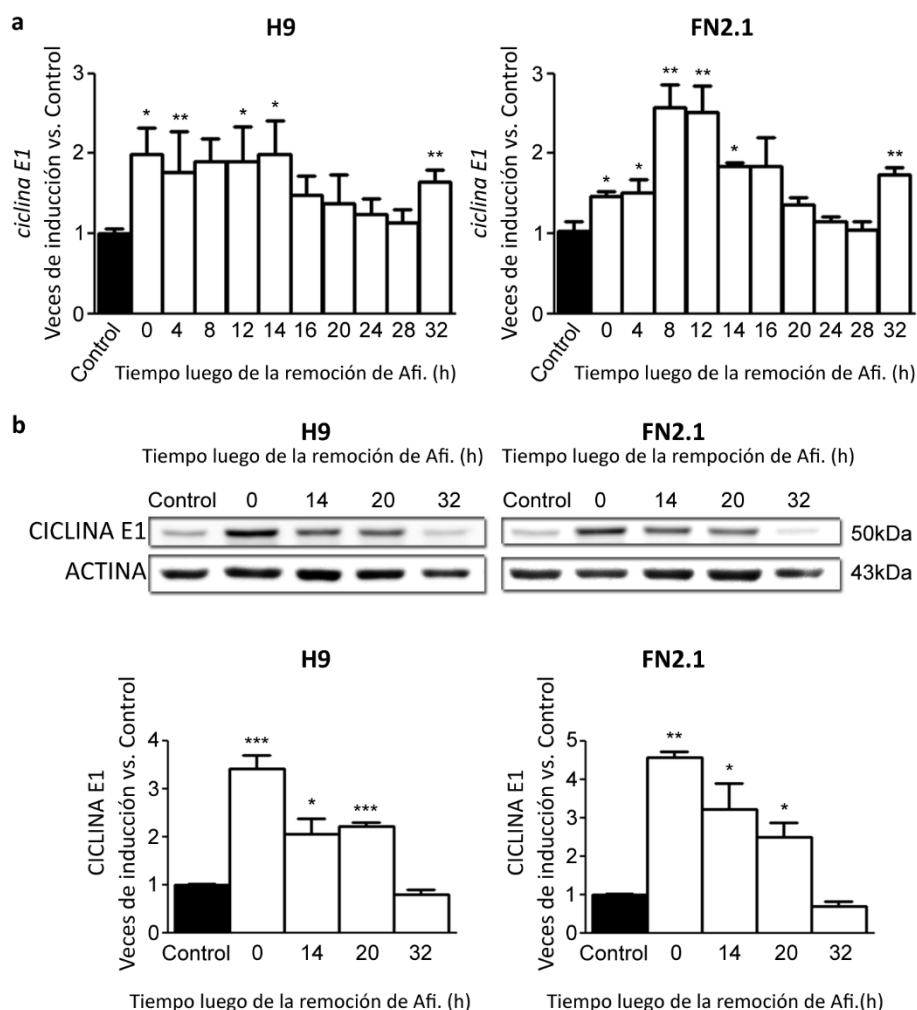


Figura 40. Expresión de la CICKINA E1 a lo largo del ciclo celular de CMPhs (a) Los niveles de expresión del ARNm de la *CICKINA E1* fueron cuantificados por RT-qPCR en células asincrónicas o en distintos puntos luego de la remoción de la Afidicolina (Afi.) La expresión de *RPL7* fue utilizada como normalizador. Los gráficos muestran promedio + error estándar de las veces de inducción del ARNm relativo a las células control asincrónicas (establecido arbitrariamente como 1) de al menos tres experimentos independientes. h: horas. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$ and (**) $p < 0.01$ vs. Control (células asincrónicas). (b) Los niveles de expresión de la proteína de la *CICKINA E1* fueron cuantificados por Western Blot en células asincrónicas o a diferentes tiempos luego de la remoción de APH. Como control de carga se utilizó ACTINA. Promedio + error estándar de las veces de inducción relativas al Control (células asincrónicas, fijadas arbitrariamente como 1) y se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes. h: horas. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. Control.

Luego, y teniendo en cuenta la disminución que observamos en los niveles de expresión de la proteína de la *CICKINA E1* en la transición G2/M, quisimos profundizar el estudio de su regulación. Está muy descripto que la *CICKINA E1* dirige la transición de la fase G1 a la fase S mediante el reclutamiento de los complejos de pre-replicación y la activación de CDK2, proteína quinasa, lo que lleva a la iniciación de la síntesis de ADN. En células somáticas, el pico de expresión de la *CICKINA E1* se da en la transición G1/S del ciclo celular. Esta periodicidad en la expresión es resultado tanto de la regulación de la

abundancia del ARNm como de la degradación de la proteína. En el inicio de la fase S, la CDK2 fosforila a la CICLINA E1. Este evento de fosforilación crea regiones cortas en la CICLINA E1 lo que permite su degradación proteasomal dependiente de ubiquitinación durante la fase S y G2/M [117].

Para analizar si el mecanismo mencionado ocurre en CMPhs y NP derivados de las CMEhs H9, utilizamos el inhibidor del proteasoma MG-132, y así determinar si la proteína de la *CICLINA E1* es ubiquitinada y degradada por el proteasoma en éstas células. El tiempo y concentración utilizados en las CMPhs (62.5 nM por 24 horas) fue puesto a punto por el grupo de Vilchez et al. [118], quienes determinaron que estas bajas concentraciones eran suficientes para reducir la actividad del proteasoma e inducir la actividad de las proteínas poli-ubiquitinadas en CMEhs sin producir un efecto citotóxico en las células (observado con concentraciones de uso cotidiano en la literatura).

Cuantificamos, entonces, los niveles proteicos de la CICLINA E1 por Western Blot en CMPhs asincrónicas y arrestadas en G2/M (tratamiento con NOCO) y NP, momento en el que observamos la disminución de los niveles de expresión, en presencia/ausencia del inhibidor del proteasoma MG-132. Al analizar el Western Blot, observamos que la inhibición del proteasoma revierte la disminución de la expresión de la CICLINA E1 observada en la fase G2/M de las células arrestadas (Figura 41).

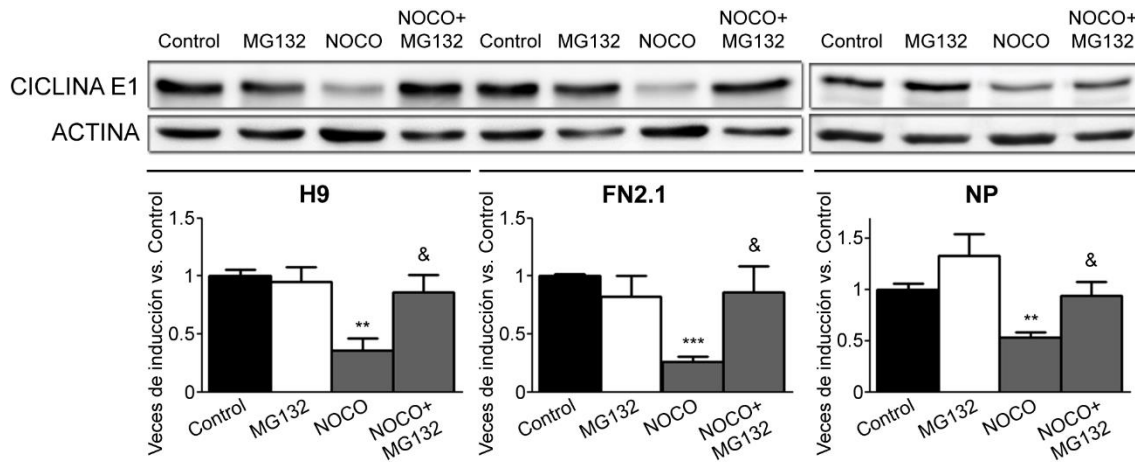


Figura 41. Regulación de la degradación de la CICLINA E1 en CMPhs y PN | Análisis de los niveles de expresión de la proteína de la CICLINA E1 cuantificada por Western Blot en células asincrónicas (Control) o sincronizadas en G2/M (arrestadas con NOCO, 100ng/ml por 24 h para CMPhs y 200ng/ml por 54 h para NP) y, tratadas o no, con el inhibidor del proteasoma MG-132 (MG132, 62.5nM por 24 h para CMPhs y 62.5nM por 54h para NP). Como control de carga se utilizó ACTINA. Promedio + Error Estándar de las veces de inducción relativas al control (células asincrónicas, fijadas arbitrariamente como 1) y se muestran blots representativos de al menos tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. Control. (&) $p < 0.05$, (&&) $p < 0.01$ vs. NOCO.

Luego, quisimos determinar si la inhibición de la CDK2 era capaz de prevenir la degradación de la *CICLINA E1* en la fase G2/M. Para ello, utilizamos un inhibidor específico de CDK2 en las mismas condiciones experimentales descritas para el inhibidor MG-132. Al analizar los resultados del Western Blot, observamos que la inhibición de CDK2 revierte también la disminución de los niveles de expresión de la *CICLINA E1* observada en la fase G2/M de las células arrestadas. De este modo, demostramos que la actividad de CDK2 interviene en la regulación de la disminución del producto proteico de la *CICLINA E1* en las CMPhs y NP arrestadas en G2/M (Figura 42).

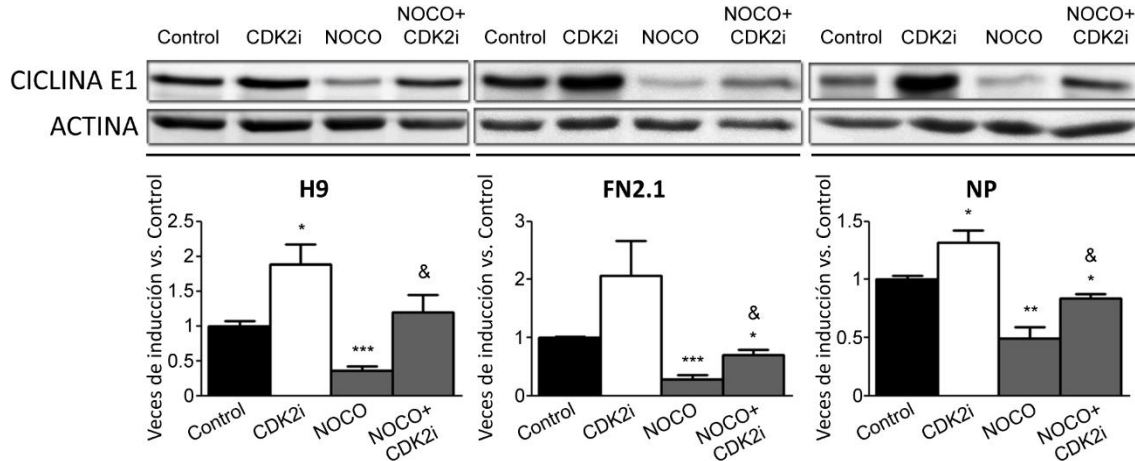


Figura 42. Regulación de la degradación de la CICLINA E1 en CMPhs y PN | Análisis de los niveles de expresión de la proteína de la CICLINA E1 cuantificada por Western Blot en células asincrónicas (Control) o sincronizadas en G2/M (arrestadas con NOCO, 100ng/ml por 24 h para CMPhs y 200ng/ml por 54 h para NP) y, tratadas o no, con el inhibidor II de CDK2 (CDK2i, 5μM por 24h para CMPhs y 5μM por 54h para NP). Como control de carga se utilizó ACTINA. Promedio + Error Estándar de las veces de inducción relativas al control (células asincrónicas, fijadas arbitrariamente como 1) y se muestran blots representativos de al menos tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. Control. (&) $p < 0.05$, (&&) $p < 0.01$ vs. NOCO.

Finalmente, y dado que se ha reportado que la enzima quinasas GSK3β puede también fosforilar la CICLINA E1 y regular su degradación, quisimos determinar si esto ocurría en nuestro modelo de estudio. Para ello, utilizamos un inhibidor específico de GSK3β (CHIR99021), y analizamos los niveles de expresión de la proteína de la *CICLINA E1* por Western Blot en las CMPhs (H9 y FN2.1) y NP asincrónicas, arrestadas en G1 (tratamiento con PD) y arrestadas en G2/M (tratamiento con NOCO) en presencia o no de CHIR99021.

Este mismo inhibidor fue utilizado previamente en las CMPhs en nuestro laboratorio, en un trabajo donde se determinó que la inhibición de GSK3β por medio del mismo reduce las tasas de apoptosis basales y aumenta la proliferación de las CMPhs (H9 y FN2.1) [114].

En el contexto celular del presente trabajo, encontramos que la inhibición de GSK3β no previno la disminución de los niveles de expresión de la proteína de la *CICLINA E1* en G2/M e, incluso, los niveles

proteicos disminuyeron aún más en esta transición en presencia del inhibidor (Figura 43). En conjunto, estos resultados sugieren que GSK3 β no está involucrada en la regulación de la degradación de la proteína de la *CICLINA E1* en G2/M, en CMPhs y NP, y que la misma depende de una degradación proteasomal dependiente de la ubiquitinación mediada por la quinasa CDK2.

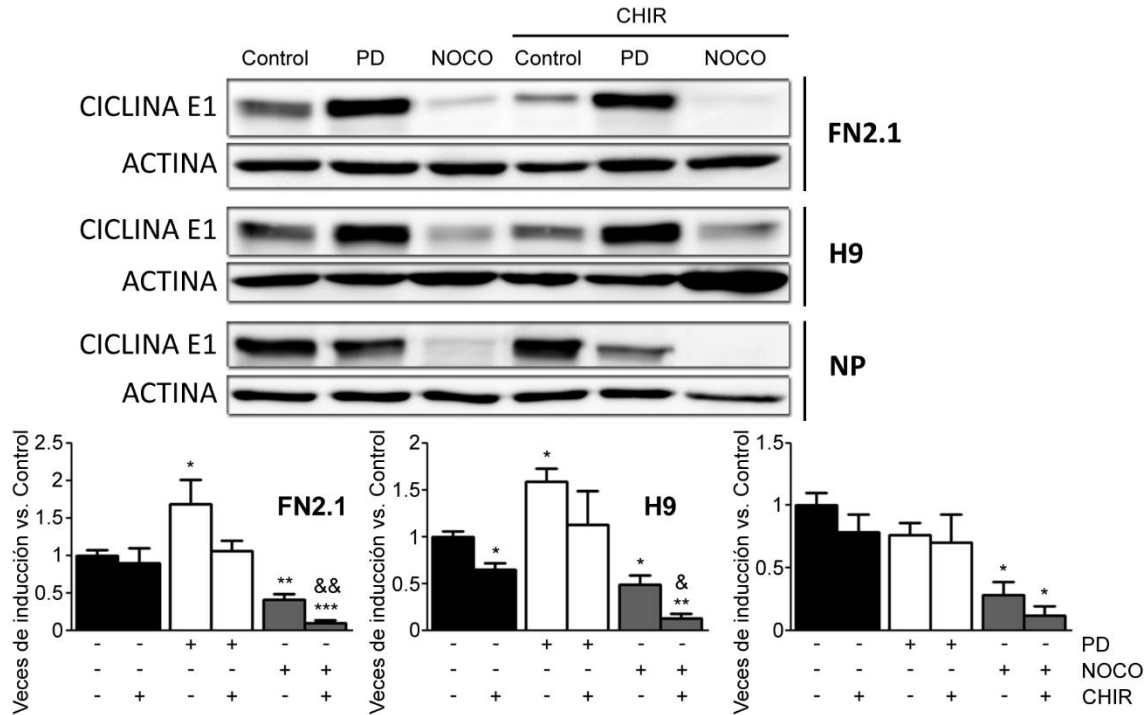


Figura 43. Regulación de la degradación de la CICLINA E1 en CMPhs y PN | Análisis de los niveles de expresión de la proteína de la CICLINA E1 cuantificada por Western Blot en células asincrónicas (Control) o sincronizadas en G1 (arrestadas con PD, 5 μ M por 30 h para CMPhs y 1 μ M por 24 h para NP) o G2/M (arrestadas con NOCO, 100ng/ml por 24 h para CMPhs y 200ng/ml por 54 h para NP) y, tratadas o no, con el inhibidor del de GSK3 β CHIR99021 (CHIR, 10 μ M por 24h). Como control de carga se utilizó ACTINA. Promedio + Error Estándar de las veces de inducción relativas al control (células asincrónicas, fijadas arbitrariamente como 1) y se muestran blots representativos de al menos tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. Control. (&) $p < 0.05$, (&&) $p < 0.01$ vs. NOCO.

Como dijimos previamente, muchos estudios demuestran que las CMPhs responden a señales de diferenciación en la fase G1, y que su destino celular hacia un linaje en particular depende del tiempo transcurrido en esta fase. Teniendo en cuenta esto, y dado que en el presente estudio utilizamos dos inhibidores que arrestan las células en G1 (PD) y en la transición G1/S (Afi.), quisimos asegurarnos que dichos tratamientos no afectaran la pluripotencia de las CMEhs H9 y CMPihs FN2.1. Para ello, medimos los niveles de expresión de los ARNm de los marcadores de pluripotencia (*OCT-4* y *NANOG*), y marcadores de diferenciación temprana a los distintos linajes: endodermo, mesodermo y ectodermo (*BRACHYURY*, *ALPHA-FETOPROTEINA* y *NESTINA* respectivamente) por medio de una RT-qPCR en las CMPhs tratadas con cada inhibidor. Como control de diferenciación se utilizaron CMPhs

diferenciadas utilizando un protocolo basado en cuerpos embrioides con 4 o 7 días de diferenciación, y los PN.

En el tratamiento de las CMPhs con cualquiera de los dos inhibidores puede observarse que la expresión de los marcadores de pluripotencia no se ve afectada, y los marcadores de diferenciación temprana no se inducen. De este modo pudimos concluir que la diferenciación no se induce en las CMPhs arrestadas con PD ni en aquellas arrestadas con Afi. (Figura 44 a y b).

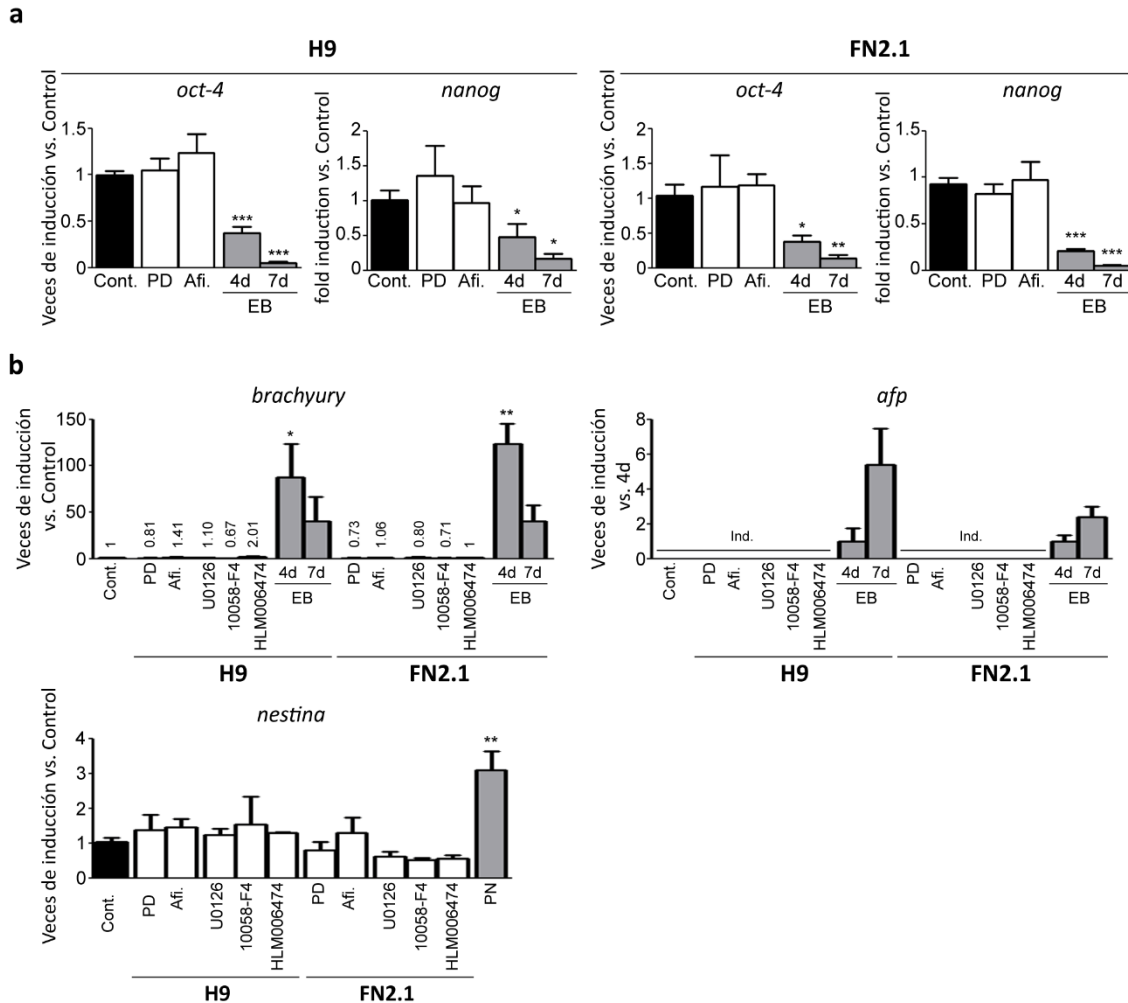


Figura 44. Control de diferenciación en CMPhs arrestadas en G1 o en la transición G1/S| CMPhs (H9 y FN2.1) fueron arrestadas en G1 con PD0332991 (PD) (5 μ M por 30 h) o Afidicolina (Afi.) (10 μ g/ml por 20 h) y luego se realizó un análisis por RT-qPCR de los transcritos asociados a (a) pluripotencia (NANOG y OCT-4) y (b) diferenciación temprana (*BRACHYURY*, *ALFA-FETOPROTEINA* o *AFP* y *NESTINA* para mesodermo, endodermo y ectodermo respectivamente). Como control de diferenciación se utilizaron CMPhs diferenciadas utilizando un protocolo basado en cuerpos embrioides [del inglés, embryoid body (EB)] a día 4 (4d) y 7 (7d) de diferenciación y NP. La expresión de RPL7 se utilizó como normalizador. Los gráficos muestran los niveles de inducción del ARNm relativo al control (Cont.) (Células creciendo de manera asincrónica) o día 4 (4d) del protocolo de diferenciación de los EB. Se muestra el Promedio + Error Estándar de tres experimentos

independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. Control.

Finalmente, y dado que en el estudio de la regulación de la *CICLINA E1* utilizamos diversos inhibidores, quisimos comprobar que los mismos no afectarán la pluripotencia de las CMEhs H9 y CMPihs FN2.1 en las condiciones experimentales ya descritas. Para ello, medimos los niveles de expresión de los ARNm de los marcadores de pluripotencia (*OCT-4* y *NANOG*) por medio de una RT-qPCR en ambas líneas de CMPs tratadas con los distintos inhibidores (NOCO, GSK690693, U0126, 10,058-F4, HLM006474, MG-132, inhibidor de CDK2 y CHIR99021). No se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia *OCT-4* y *NANOG* en las CMPs tratadas con los distintos inhibidores, por lo que la pluripotencia no fue afectada debido a dichos tratamientos (Figura 45)

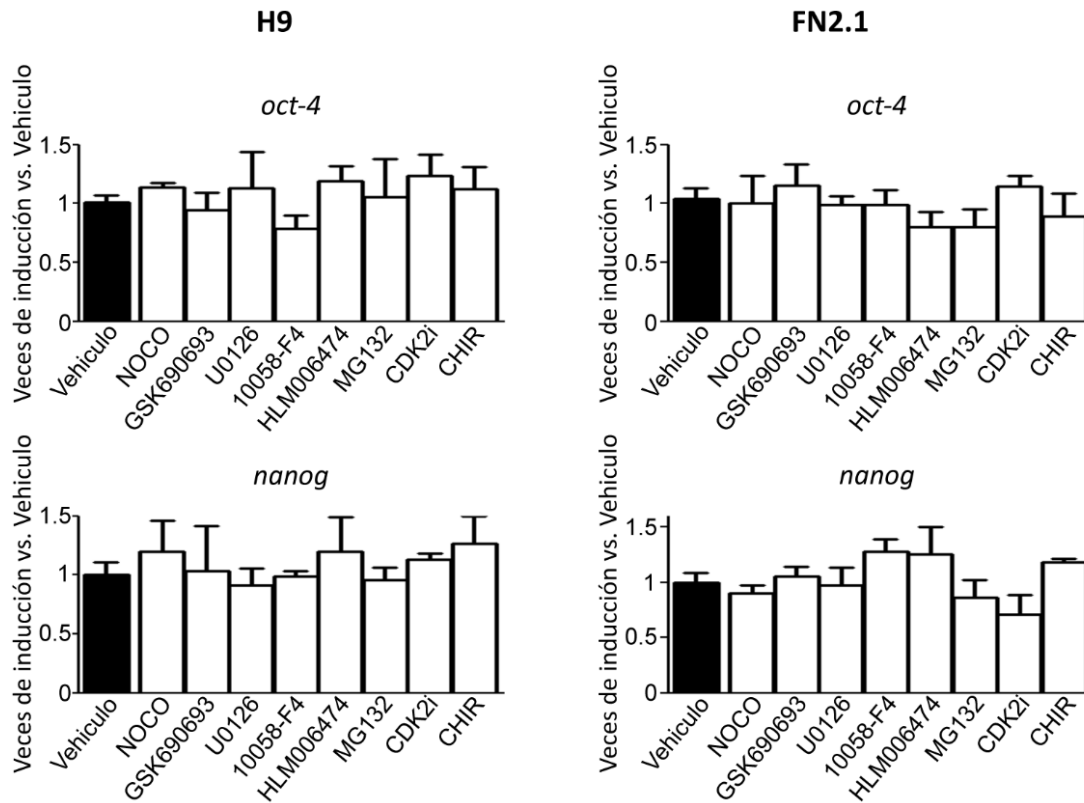


Figura 45. Control de diferenciación en CMPs tratadas con distintos inhibidores | CMPs (H9 y FN2.1) fueron tratadas con Nocodazol (NOCO, 100ng/ml por 24 h), GSK690693 (10μM por 24 h), U0126 (20μM por 24 h), 10058-F4 (100μM por 24 h), HLM006474 (40μM por 7 días), MG-132 (MG132, 62.5nM por 24 h), inhibidor II de CDK2 (CKD2i, 5μM por 24 h) y CHIR99021 (CHIR, 10μM por 24h) y luego se realizó un análisis por RT-qPCR de los marcadores asociados a pluripotencia (*NANOG* y *OCT-4*). La expresión de *RPL7* fue utilizada como normalizador. Los gráficos muestran Promedio + Error Estándar de los niveles de inducción relativos a las células control vehículo (tratamiento con DMSO, fijadas arbitrariamente como 1) de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. Control.

1.2.4 Análisis de la regulación de la *CICLINA E1* por miRNAs

A partir de todos los resultados obtenidos, y para profundizar el estudio y comprensión de la expresión y regulación de la *CICLINA E1* en las CMPhs, buscamos en bibliografía que microARNs (miRNAs) estaban descriptos como reguladores de la misma.

Entre los mismos encontramos a los miRNAs: miR-874-3p, miR-132-3p, miR-144-5p, miR-16-1-3p, miR-16-5p, miR-27a-5p, miR-27a-3p.

Luego, diseñamos stem loop primers (SLO) específicos para cada microARN para poder realizar la Retrotranscripción de los mismos y luego analizar su expresión mediante RT-qPCR. Utilizamos esta metodología debido a que el pequeño tamaño de los microARNs (22nt) no permite el uso de random primers, y tampoco pueden utilizarse oligoDTs dado que los mismos carecen de cola de poli-A. Dicho primer consiste en una región universal de 50nt aproximadamente, que forma un loop gracias a la complementariedad de secuencia y una región que es específica para cada microARN (6nt). Luego, para la PCR cuantitativa se diseñaron primers forward específicos para cada microARN. Como primer reverse se utiliza uno que es “universal” para todas las reacciones de q-PCR de los microARNs, ya que reconoce una región del SLO (Figura 46).

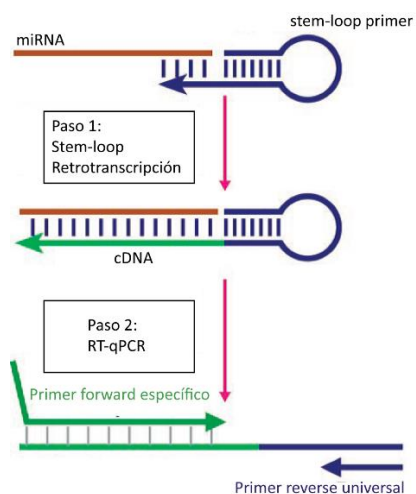


Figura 46. Esquema de la estrategia para medir los microARNs maduros por RT-qPCR | En azul se representa el stem loop primer, en marrón la molécula del microARN y en verde el primer Forward específico utilizado para la RT-qPCR.

Para corroborar que los primers diseñados fueran efectivamente específicos para cada secuencia, corrimos un gel de agarosa al 4% y corroboramos que los productos de PCR observados coincidieran con el tamaño de producto esperado (~50 Kb). A partir del análisis de los geles, pudimos determinar que los primers de los miR-27a-3p y miR-16-5p únicamente fueron específicos. En el caso de los primers de los miRNAs: miR-874-3p, miR-132-3p, miR-144-5p, miR-16-1-3p y miR-27a-5p, levantan productos inespecíficos.

En particular, se ha descrito que la sobre-expresión del miR-27a-3p aumentaba la expresión de la *CICLINA E1* en células cancerígenas [119]; y su inhibición ha sido relacionada con el arresto del ciclo celular en la fase G1 [120]. El grupo de Lerner et al., estudió la relación entre la expresión del miR-27a y la *CICLINA E1* en distintas líneas celulares cancerígenas y en células embrionarias de riñón. En estos modelos describieron que el miR-27a inhibe a la proteína FBW7 (del inglés, F-box and WD repeat domain containing 7). Esta proteína actúa como sustrato para ser reconocido por una ubiquitina ligasa, y, a su vez, tiene como sustrato la *CICLINA E1*. Por ende, el miR-27a inhibe a FBW7 y, de este modo, evita la ubiquitinación de la *CICLINA E1* y su degradación [121].

En cuanto al miR-16-5p, diversos estudios han publicado que este miRNA tiene como target a la *CICLINA E1* y, mediante su unión a la región 3' UTR de su transcripto, disminuye su expresión tanto a nivel de ARNm como de su proteína [122-126].

Decidimos entonces cuantificar los niveles de estos dos miRNAs en las CMPhs control y arrestadas con Afi. De este modo, queríamos determinar si en las células arrestadas con Afi, donde determinamos que los niveles de expresión del ARNm y proteína de esta están elevados, había una expresión diferencial de estos miRNAs en relación al control. En los gráficos del análisis de expresión por RT-qPCR, pudimos observar que el miR-16-5p disminuye de manera significativa en las CMPihs arrestadas con Afi., mientras que en las CMEhs H9 se observa la misma tendencia, pero las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. En el caso del miR-27a-3p, no observamos diferencias significativas entre el control y las células arrestadas con Afi. en ninguna de las dos líneas de CMPhs, si bien en las CMEhs H9 parecería haber una tendencia a un aumento en su expresión en las células arrestadas con Afi. en relación a las control, lo cual tendría sentido si hubiera una regulación de la *CICLINA E1* mediada por este miRNA tal y como fue descripta por Lerner et al. (Figura 47).

Si bien algunos de los resultados parecerían ir por el camino de lo publicado (aumento del miR-27a-3p contribuiría a un aumento de la expresión de la *CICLINA E1* mientras que el miR-16-5p contribuiría a su disminución); deberíamos realizar un estudio más profundo para poder determinar que hay una regulación directa o indirecta entre la expresión de estos miRNAs y la expresión de la ciclina.

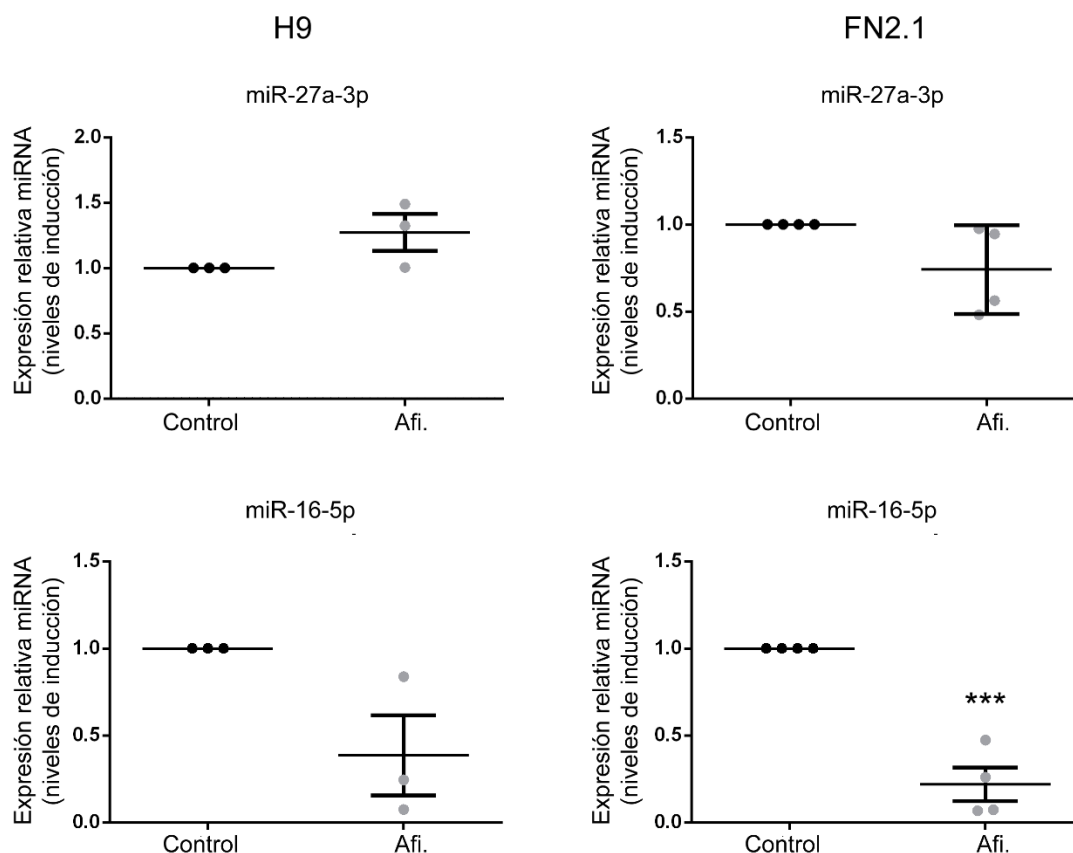


Figura 47. Análisis de los niveles de expresión del miR-27a-3p y miR-16-5p en CMPhs arrestadas en la transición G1/S | Análisis de los niveles de expresión del miR-27a-3p y miR-16-5p cuantificados por RT-qPCR, con stem loops primers específicos, en CMEhs H9 y CMPihs FN2.1 asincrónicas o sincronizadas en la transición G1/S (Afi.). La expresión de RNU6B fue utilizada como normalizador. Los gráficos muestran el promedio + error estándar de las veces de inducción del ARNm relativo a las células asincrónicas control (seteadas arbitrariamente como 1) de al menos tres experimentos independientes. El software GraphPad Prism 6.00 fue utilizado para el análisis de datos. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; vs. (***) $p < 0.001$; (****) $p < 0.0001$ vs. Control (células asincrónicas). Afi: afidicolina.

1.3 Análisis del perfil de expresión temporal de la familia del miR-302, el miR-145 y el miR-296 en el ciclo celular de CMPhs

Como mencionamos en la introducción del presente trabajo, el proceso de división celular es vital para el crecimiento y desarrollo del organismo. El control de los eventos moleculares durante el ciclo celular permite preservar la información genética. La progresión del ciclo celular implica un control transcripcional y epigenético adecuado. Además de las ciclinas, cuyo estudio presentamos en la sección 1.2, tenemos a los microARNs como agentes reguladores no sólo de la progresión del ciclo celular sino también de la proliferación y diferenciación.

Existen varios estudios que describen qué microARNs se expresan en las CMPhs en comparación con su progenie diferenciada. Entre ellos encontramos la familia del miR-302, clúster compuesto por los miR-302-a/b/c/d, involucrada en la promoción de la pluripotencia y proliferación de las CMPhs [127]. Además, dentro de los microARNs asociados a la diferenciación, están el miR-145, que facilita la diferenciación de células madre embrionarias mediante la represión de los factores de pluripotencia *OCT-4*, *SOX2* y *KLF4*, silenciando de ese modo el programa de auto renovación; y el miR-296 cuya expresión reprime la expresión de *SOX2*, *OCT-4* y *NANOG* en varias combinaciones [128].

Si bien está claro que existen microARNs que pueden regular componentes de la maquinaria del ciclo celular, cómo es el perfil de expresión de los mismos a lo largo del ciclo celular de CMPhs está, aún, poco investigado.

Por ello, además del análisis del perfil de expresión de las ciclinas, buscamos analizar la expresión de algunos microARNs candidatos, e involucrados en la regulación de la pluripotencia/diferenciación de las CMPhs, para poder determinar su perfil de expresión (periódico o constitutivo) a lo largo de su ciclo celular.

1.3.1 Análisis del perfil de expresión temporal de la familia del miR-302, el miR-145 y el miR-296 en el ciclo celular de CMPhs arrestadas farmacológicamente

En primer lugar, arrestamos las CMEhs H9 y CMPihs FN2.1 en las distintas fases del ciclo celular con los inhibidores farmacológicos previamente mencionados: en G1 (tratamiento con PD), en la transición G1/S (tratamiento con afidicolina) y en G2/M (tratamiento con Nocodazol). Para corroborar que las células se arrestaron correctamente, medimos el contenido de ADN total por medio de la técnica de BrdU y determinamos el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (Figura 47).

Éste análisis permite cuantificar de manera más precisa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular dado que ésta técnica separa a las células de acuerdo al contenido de ADN, como ocurre con la tinción de yoduro de propidio, pero también por la incorporación de un análogo del nucleótido timidina: bromo-deoxyuridina, nucleótido marcado que se incorpora cuando el ADN es sintetizado y permite definir de manera más precisa la fase S.

En todas las líneas celulares testeadas, el tratamiento con PD llevó a un aumento marcado en el número de células en la fase G1, y una disminución en el número de células en la fase G2. Por otro lado, luego del tratamiento con NOCO, la mayoría de las células en las distintas líneas celulares se encontraban en la fase G2/M. Finalmente, y en el caso de las células arrestadas con Afidicolina, se observó un aumento en el porcentaje de células en la fase G1 y una disminución en el porcentaje de células en la fase S (Figura 48).

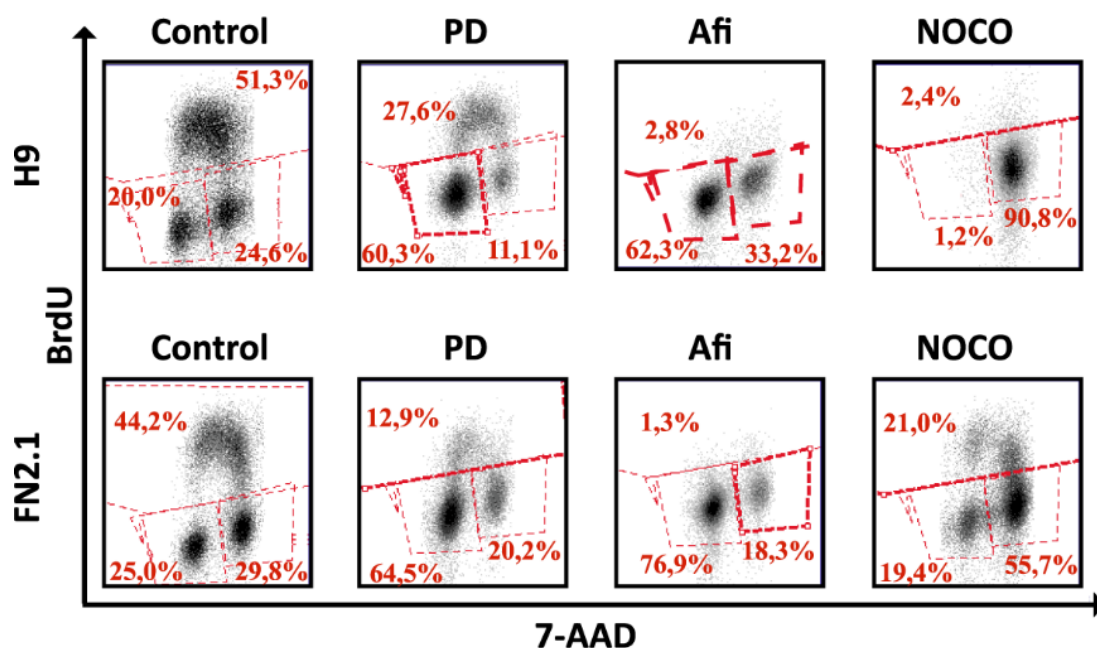


Figura 48. Arresto farmacológico CMPhs | CMEhs H9 y CMPihs FN2.1, crecidas y cultivadas en medios definidos (geltrex y medio E8), arrestadas en: G1 con PD0332991 (arresto con PD, 30h 5 μ M); la transición G1/S con Afidicolina (arresto con Afi, 20h 10 μ g/ml) o la transición G2/M con Nocodazol (arresto con NOCO, 24h 100ng/ml). El perfil del ciclo celular de las células asincrónicas (Control) o arrestadas farmacológicamente fue analizado luego de incubar a las mismas con un pulso de 30 minutos de BrdU y una tinción del ADN total con una solución de 7-AAD. La intensidad de fluorescencia fue determinada con un citómetro de flujo y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular fue calculado por el software Accuri C6.

Luego, diseñamos stem loop primers (SLO) específicos para cada miRNA y analizamos la expresión de los mismos por RT-qPCR en ambas líneas de CMPhs asincrónicas y arrestadas farmacológicamente (Figura 49). En todos los casos observamos un perfil de expresión periódico (y con la misma tendencia entre ambas líneas), con excepción del miR-296 el cual presentó un perfil de expresión constitutivo en las CMEhs H9, y periódico en las CMPihs FN2.1.

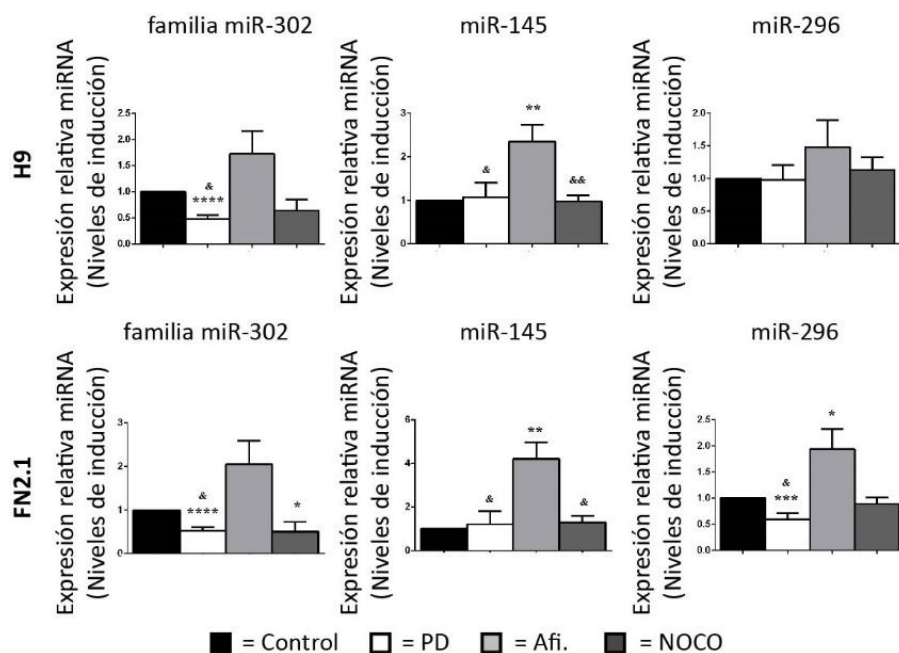


Figura 49. Análisis de los niveles de expresión de la familia del miR-302, el miR-145 y miR-296 a lo largo del ciclo celular de CMPhs en células arrestadas | Análisis de los niveles de expresión del miR-145, miR-296 y la familia del miR-302 cuantificados por RT-qPCR, con stem loops primers específicos, en CMEhs H9 y CMPihs FN2.1 asincrónicas o sincronizadas [G1 (PD), transición G1/S (Afi.) o transición G2/M (Nocodazol)]. La expresión de *RPL7* fue utilizada como normalizador. Los gráficos muestran el promedio + error estándar de las veces de inducción del ARNm relativo a las células asincrónicas control (seteadas arbitrariamente como 1) de al menos tres experimentos independientes. El software GraphPad Prism 6.00 fue utilizado para el análisis de datos. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; vs. (***) $p < 0.001$; (****) $p < 0.0001$ vs. Control (células asincrónicas).h: horas.

1.3.2 Análisis del perfil de expresión temporal de la familia del miR-302, el miR-145 y el miR-296 en el ciclo celular de CMPhs sincronizadas

Para asegurarnos de no estar perdiendo la ventana temporal en la cual los microARNs estudiados podrían tener su pico de expresión, como fue el caso de la *CICLINA E1*, decidimos realizar nuevamente un experimento de arresto y liberación para sincronizar las células y medir en distintos tiempos a lo largo del ciclo celular, post liberación, los miRNAs candidatos (Figura 50). Las células fueron arrestadas con Afidicolina y los niveles de expresión de cada microARN fueron medidos a las 0, 4, 8, 12, 14, 16, 20 y 24 horas post liberación por RT-q-PCR, con stem loop primers específicos.

Para ello, las CMPhs crecidas en condiciones de cultivo definidas fueron sincronizadas en la transición G1/S con Afidicolina (10 $\mu\text{g/ml}$ por 20 h) y luego liberadas de modo que reingresen en el ciclo celular. Para demostrar que las células fueran liberadas del procedimiento de bloqueo de manera correcta, la progresión del ciclo celular fue analizada cada 4 horas luego de la liberación hasta un total de 24 horas.

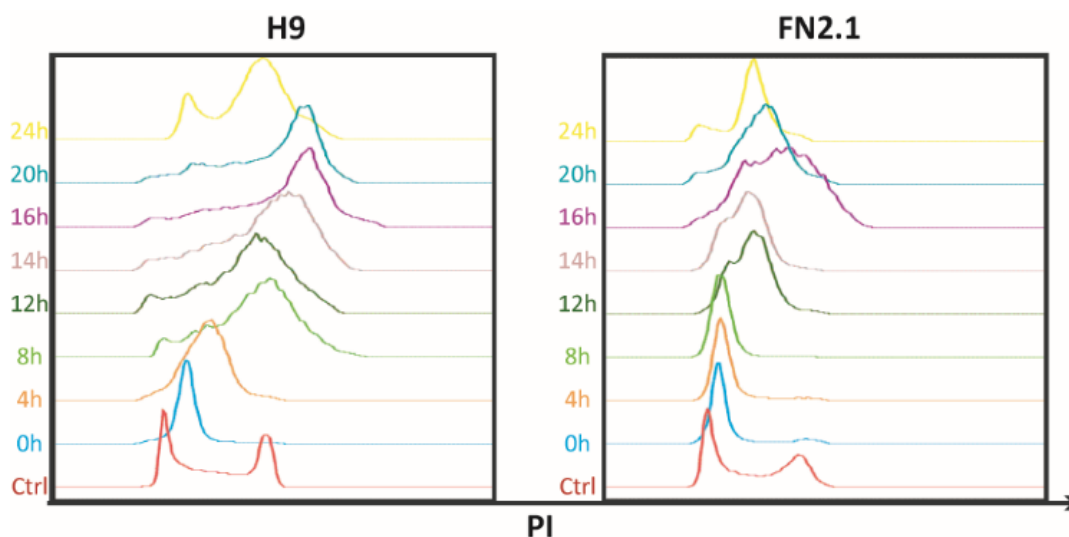


Figura 50. Sincronización CMPhs Las CMPhs, crecidas y cultivadas en medios definidos (geltrex y medio E8), fueron sincronizadas en la transición G1/S arretándolas con Afidicolina (Afi.) (10 μ g/ml por 20 h) y liberadas para ingresar en el ciclo celular, luego: las células fueron recolectadas luego de la liberación y fijadas con etanol 70% frío a las 0, 4, 8, 12, 14, 16, 20 y 24 horas. El contenido de ADN fue medido con ioduro de propidio (PI) y su fluorescencia se midió con un citómetro para determinar el contenido de ADN. Control: células asincrónicas. h: horas.

A partir de los resultados obtenidos pudimos confirmar que todos los microARNs estudiados presentan una expresión periódica a lo largo del ciclo celular de ambas CMPhs. En el caso de los miR-145 y miR-296, en CMPihs FN2.1 observamos que los niveles de expresión más altos fueron en la fase S; mientras que en las CMEhs los mismos se observaron en la transición G2/M en comparación con las células que proliferan asincrónicamente. En particular, observamos que los niveles de expresión de la familia del miR-302, en ambas CMPhs, se inducen a las 14-16 horas post liberación lo cual coincide con la fase S y se mantiene alto hasta 24 horas luego de la liberación de la afidicolina (Figura 51).

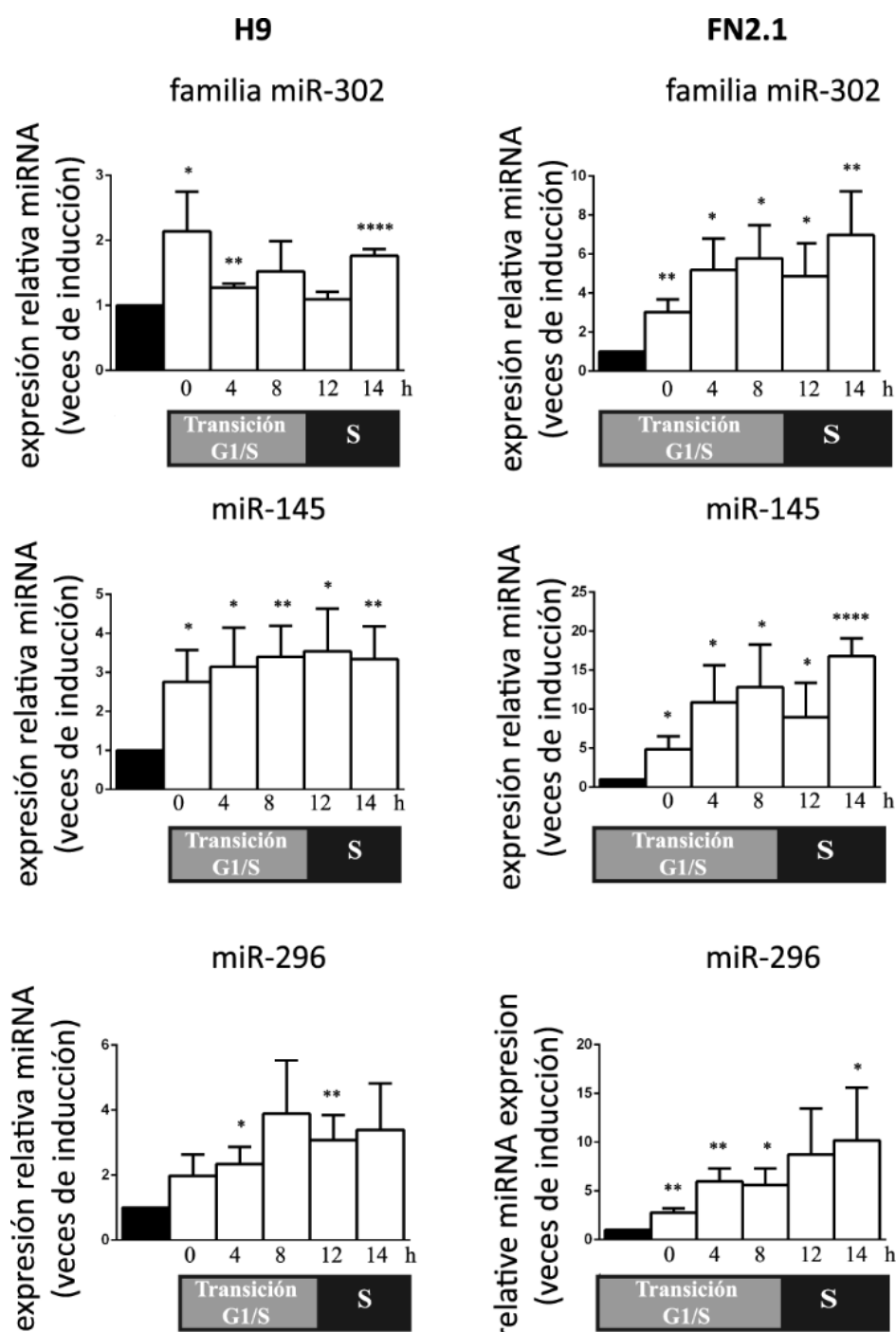


Figura 51. Análisis de los niveles de expresión de la familia del miR-302, el miR-145 y miR-296 a lo largo del ciclo celular de CMPhs en células sincronizadas | Análisis de los niveles de expresión del miR-145, miR-296 y la familia del miR-302 cuantificados por RT-qPCR, con stem loops primers específicos, en CMEhs H9 y CMPihs FN2.1 asincrónicas o en distintos puntos luego de la remoción de la Afi. La expresión de *RPL7* fue utilizada como normalizador. Los gráficos muestran el promedio + error estándar de las veces de inducción del ARNm relativo a las células asincrónicas control (seteadas arbitrariamente como 1) de al menos tres experimentos independientes. El software GraphPad Prism 6.00 fue utilizado para el análisis de datos. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; vs. (***) $p < 0.001$; (****) $p < 0.0001$ vs. Control (células asincrónicas).h: horas.

1.3.3 Análisis de los genes target y Gene ontology de la familia del miR-302, el miR-145 y el miR-296

Finalmente quisimos explorar qué procesos biológicos son potencialmente regulados por los microARNs candidatos en las CMPhs estudiadas. Para ello, buscamos genes target de cada microARN para poder analizar la ontología génica asociada a los mismos. El análisis de ontología génica (GO, del inglés gene ontology) lo realizamos utilizando el lenguaje de programación R, utilizando la función `enrichGO` del paquete `ClusterProfiler`.

En primer lugar, y en el caso de la familia del miR-302, utilizamos 146 genes target específicos validados por Lipchina et al. (2011). Al realizar el análisis de GO, obtuvimos un enriquecimiento en procesos relacionados con la regulación del ciclo celular, entre los que encontramos: la transición G1/S del ciclo celular mitótico, la transición de la fase G1/S del ciclo celular, la regulación de la transición G1/S del ciclo celular mitótico y la regulación de la transición de la fase G1/S del ciclo celular (Figura 52). Estos resultados sugieren que la expresión de esta familia de miRNAs en la transición G1/S tiene una significancia biológica.

A su vez, adquirimos una lista de genes target del miR-145-5p y del miR-296-5p de la base de datos miRWalk 3.0. Para ello, seleccionamos los primeros 100 genes target con un $p\text{-unión} \geq 0.8$. Este $p\text{-valor}$ corresponde a la probabilidad de que un gen target candidato sea un target real. Además, seleccionamos del listado obtenido aquellos genes presentes en las tres, o la mayoría, de las bases de datos que el programa miRWalk 3.0 considera (Targetscan, Mirdb, MiRTarBase); y nos quedamos con aquellos genes target cuyos respectivos microARNs se unieran a la región 3' UTR de los mismos. Para ambos microARNs, los términos de GO obtenidos muestran un enriquecimiento en procesos relacionados con procesos de diferenciación (Figura 53y Figura 54).

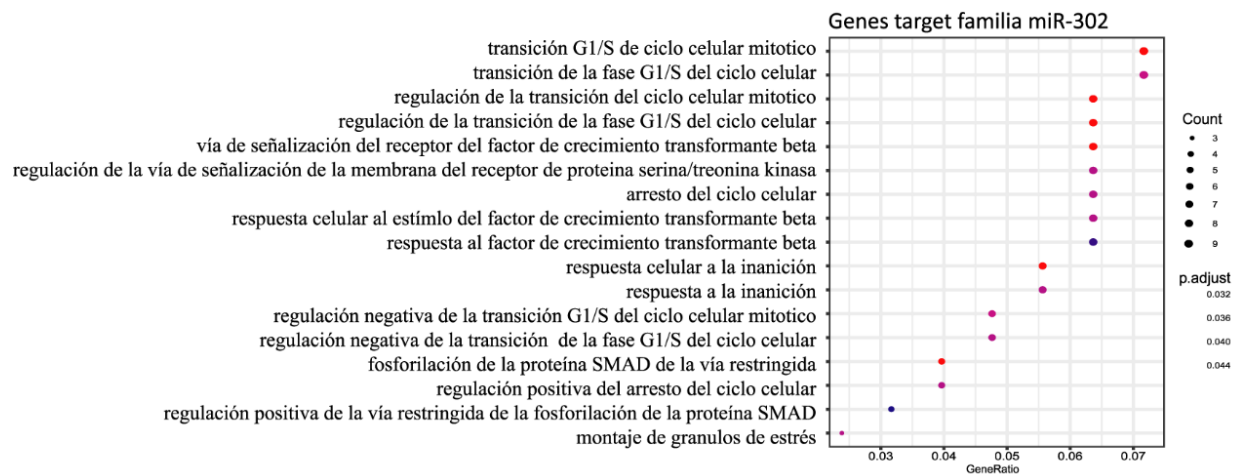


Figura 52. Análisis de los genes target de la familia del miR-302 | Análisis de la ontología génica (GO) de una lista de 146 genes targets en CMEhs H9. Dicha lista fue obtenida de Lipchina et al. (2011). En el gráfico de dot plot los puntos representan la proporción de genes y la escala de colores indican el p-valor.

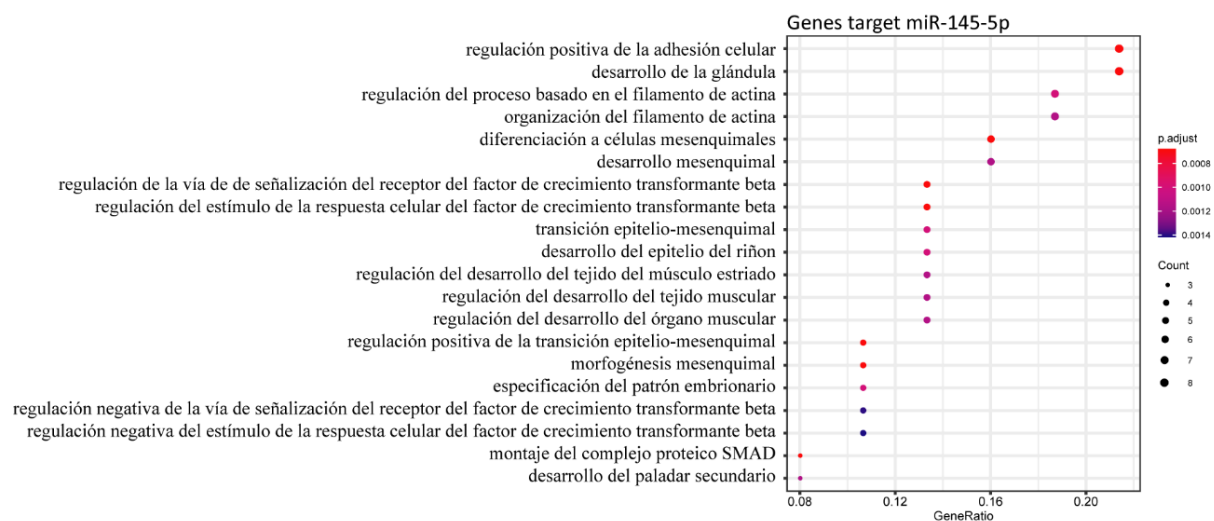


Figura 53. Análisis de los genes target del miR-145-5p | Análisis de la ontología génica (GO) de una lista de genes targets del miR-145-5p. La lista de genes targets la obtuvimos de la base de datos miRWalk 3.0. En el gráfico de dot plot los puntos representan la proporción de genes y la escala de colores indican el p-valor.

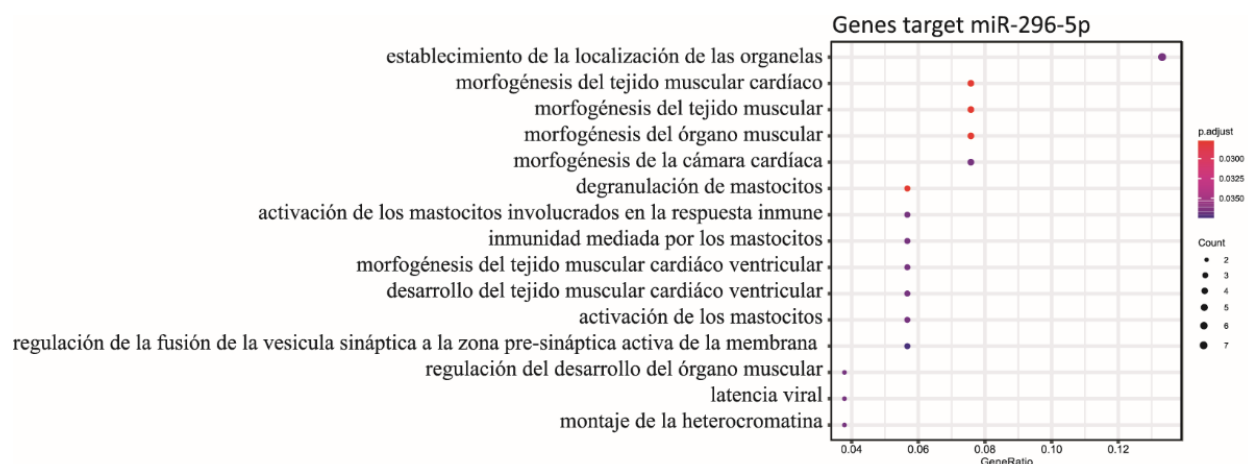


Figura 54. Análisis de los genes target del miR-296-5p | Análisis de la ontología génica (GO) de una lista de genes targets del miR-296-5p. La lista de genes targets la obtuvimos de la base de datos miRWalk 3.0. En el gráfico de dot plot los puntos representan la proporción de genes y la escala de colores indican el p-valor.

Conclusiones parciales del capítulo

En este primer capítulo, describimos en primer lugar la obtención y validación de las distintas poblaciones celulares utilizadas en los distintos análisis planteados en el mismo.

En primer lugar, describimos las poblaciones de células pluripotentes humanas: embrionarias (H9) e inducidas (FN2.1). Caracterizamos estas dos poblaciones en condiciones de cultivo indefinidas (geltrex y medio condicionado) y definidas (geltrex y medio E8). Ambas poblaciones, y en ambas condiciones, presentaron un aspecto morfológico típico de células indiferenciadas, así como también altos niveles de expresión (ARNm y proteína) de los marcadores de pluripotencia *OCT-4* y *NANOG*.

Caracterizamos, también, los PN (generados previamente en el laboratorio) a partir de las CMEhs H9 siguiendo un protocolo con neuro-rosetas. Determinamos mediante el análisis de la expresión proteica, que esta población celular expresar el marcador característico de progenitor neuronal: NESTINA. A su vez, a partir de estas células realizamos un protocolo de diferenciación hacia neuronas, validando así su potencial de diferenciación. Estos resultados nos permitieron, en su conjunto, confirmar que las células generadas eran efectivamente PN.

Una vez establecidos y validados los modelos celulares de trabajo, nos centramos en profundizar el estudio de la expresión de las principales ciclinas (*A2*, *B1*, *D1*, *D2*, *D3* y *E1*) en las CMPihs FN2.1, CMEhs y PN derivados de estas últimas. En particular, buscamos confirmar los resultados obtenidos en mi tesina de licenciatura en cuanto el perfil de expresión temporal de las mismas a lo largo del ciclo celular de las líneas celulares mencionadas.

Además, determinamos que los resultados obtenidos no dependen de las condiciones de cultivo dado que obtuvimos los mismos resultados en células con medio condicionado y en células con condiciones de cultivo bien definidas (placas tratadas con vitronectina y medio E8).

Luego nos enfocamos en el estudio de la expresión de la *CICLINA E1* en particular. En primer lugar, y con un nuevo enfoque experimental, determinamos que el ARNm de la misma presentaba un perfil periódico de expresión a lo largo del ciclo celular de las CMPhs y de los PN. Obtuvimos el mismo resultado para la proteína, y encontramos una disminución en los niveles de expresión de la misma en las CMPhs arrestadas en G2/M.

A partir de este resultado buscamos analizar la regulación de la degradación de la misma. Utilizando distintos inhibidores pudimos concluir que la degradación de la proteína de la *CICLINA E1* en CMPhs y en los PN es medida por el proteasoma mediante un mecanismo que depende de la actividad de la quinasa dependiente de ciclina 2, CDK2. También, concluimos que en nuestras condiciones experimentales la actividad de la quinasa GSK3 β no tendría un rol dominante en la degradación de la *CICLINA E1* mediada por CDK2.

Nos pareció de gran importancia poder comprobar que los distintos tratamientos realizados (inhibidores farmacológicos) no afectaron la pluripotencia de las CMPhs estudiadas.

Existen, además de las ciclinas, numerosos factores implicados en la regulación y progresión del ciclo celular de las CMPhs entre los que se encuentran los microARNs (miRNAs) Siguiendo esta línea, quisimos determinar la expresión de miRNAs que habían sido descriptos en bibliografía que regulaban la expresión de la *CICLINA E1*. Del listado seleccionado, pudimos medir de manera específica los miR-16-5p y miR-27a-3p. En particular, encontramos una disminución significativa del miR-16-5p en las CMPihs FN2.1 tratadas con Afidicolina. Si bien debemos profundizar dichos estudios, consideramos que el miR-16-5p podría ser un buen miRNA candidato involucrado en regular los niveles de expresión de esta ciclina en este tipo celular.

Además, siguiendo esta línea de estudiar el ciclo celular y los miRNAs como reguladores del mismo, encontramos a la familia del miR-302, una de las familias con mayor abundancia en estas células. Se describió que la misma se encuentra involucrada en la pluripotencia y proliferación de las CMPhs. En cuanto a los microARNs descriptos e involucrados en el proceso de diferenciación de estas células, se encuentran los miR-145 y miR-296. Dado su importancia en la regulación de estos procesos, determinamos el perfil de expresión temporal de estos microARNs candidatos mediante dos enfoques distintos (arrestos con inhibidores y ensayo de arresto y liberación). A partir de los experimentos realizados concluimos que todos los microARNs estudiados presentan un perfil de expresión temporal periódico a lo largo del ciclo celular de las CMEhs H9 y CMPihs FN21. En particular, observamos un aumento de expresión de los niveles de expresión de la familia del miR-302 en la transición G1/S la cual

se mantiene elevada en la fase S, lo cual podría sugerir cierta relación entre este perfil de expresión y el mantenimiento de la pluripotencia de estas células.

Por último, estudiamos la ontología génica de los genes target de los microARNs mencionados utilizando genes target validados (en el caso de la familia del miR-302) u obtenidos a partir de la base de datos miRWalk 3.0. Como resultado de este análisis, pudimos confirmar que los genes target de la familia del miR-302 están estrechamente relacionados con la regulación del ciclo celular; mientras que aquellos de los miR-145 y miR-296 lo están con los procesos de diferenciación.

Capítulo 2.

En este segundo capítulo buscamos identificar, por un lado, los miRNAs regulados por los factores de transcripción E2Fs en las CMPhs (objetivo 4); y por el otro, aquellos que orquestan las complejas redes de regulación durante el proceso de neurogénesis a partir de CMPhs (objetivo 5).

Para cumplir con estos objetivos, primero establecimos y validamos los modelos de estudio. En primer lugar, generamos CMN a partir de las líneas H9 y FN2.1 de CMPhs; y luego diferenciamos neuronas a partir de las CMN generadas. En segundo lugar, pusimos a punto el uso de un inhibidor general de los factores de transcripción E2Fs (iE2Fs, inhibidor pan-E2Fs) HLM006474.

Una vez que generamos dichos modelos, buscamos determinar el miRNoma que caracteriza a los procesos mencionados mediante el análisis de una secuenciación masiva de pequeños ARNs.

1.1 Modelo de CMN y Neuronas a partir de CMPhs

1.1.1 Generación y validación de CMN

Para la segunda parte de este trabajo, buscamos obtener progenitores neurales no solo a partir de las CMEhs H9 sino también a partir de las CMPihs FN2.1.

En el caso de las líneas de células pluripotentes, trabajamos con ambas en condiciones de cultivo definidas (placas pre-tratadas con vitronectina y medio E8; o placas pre-tratadas con geltrex y medio mTeSR1). La validación del estado indiferenciado de estas células se describió en el primer capítulo de esta tesis.

En un primer momento, entonces, nos centramos en la generación de células madre neurales (CMN). Uno de los métodos convencionales para generarlas es a partir de la formación, primero, de cuerpos embrioides (EB) y, luego, de neurorosetas. A partir de éstas últimas se aíslan las CMN para su preservación, expansión y diferenciación. Sin embargo, este protocolo es laborioso, extenso y presenta variabilidad.

A raíz de esto, buscamos utilizar una metodología más simple y reproducible. Además, quisimos asegurarnos de obtener células multipotentes, es decir con un potencial de diferenciación hacia los tres linajes neurales. Así fue como decidimos utilizar un protocolo de inducción neural reportado por la empresa Invitrogen [129]. El mismo permite generar CMN en monocapa en solo 7 días, utilizando un medio de inducción neural sin suero, y evitando el paso intermedio de formación de EB y neuro-rosetas para aislar las CMN a partir de éstas últimas (Figura 55).

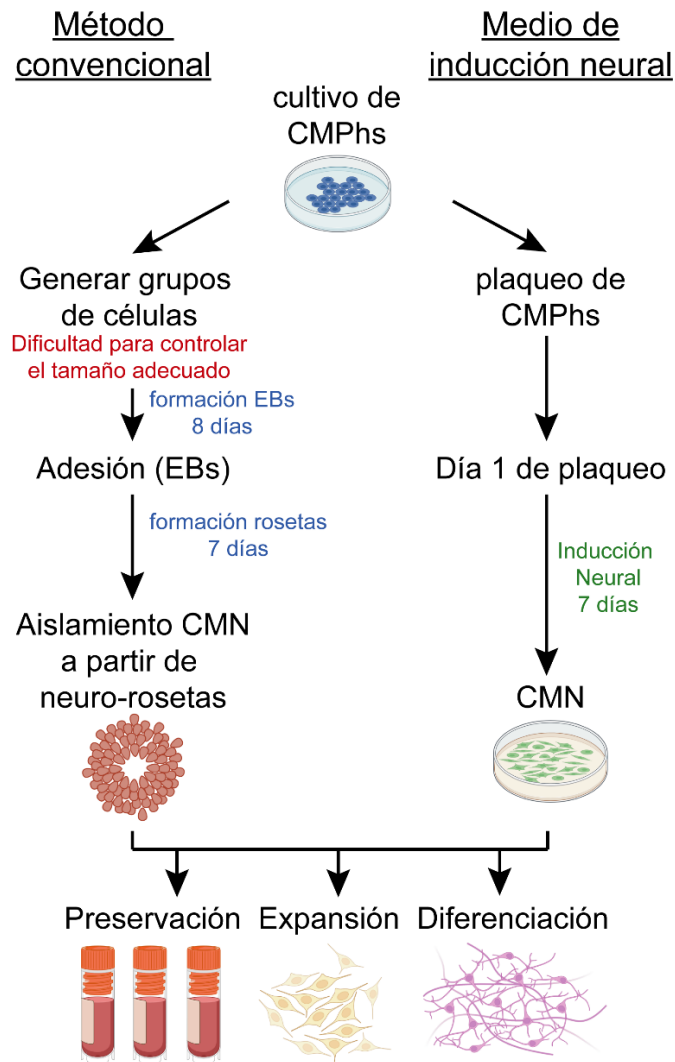


Figura 55. Esquema de métodos de generación de CMN | El esquema muestra el método convencional de generación de CMN mediante la formación de EB, neuro-rosetas, y aislamiento de las CMN a partir de las mismas; y la generación de CMN utilizando el medio de inducción neural y protocolo reportado por Invitrogen.

En dicho protocolo se partió de una población de CMPhs con una confluencia del 15-25%. La calidad del cultivo de CMPhs inicial es crítico para obtener una alta eficiencia de inducción neural. Para ello se buscó, entonces, partir de células con una morfología adecuada y sin la presencia de colonias diferenciadas. Además, y como mencionamos anteriormente, cultivamos a las células en condiciones de cultivo definidas con los medios de cultivo recomendados por la empresa que desarrolló este protocolo.

La Figura 56 muestra el cambio morfológico que se observa a medida que se genera la inducción neural a partir de células madre pluripotentes humanas. El panel de imágenes muestra, en primer lugar, colonias

de CMPhs (a), CMN en su primer día de expansión (b) y CMN en un segundo pasaje, donde ya se puede apreciar la morfología típica de células progenitoras neurales (c).

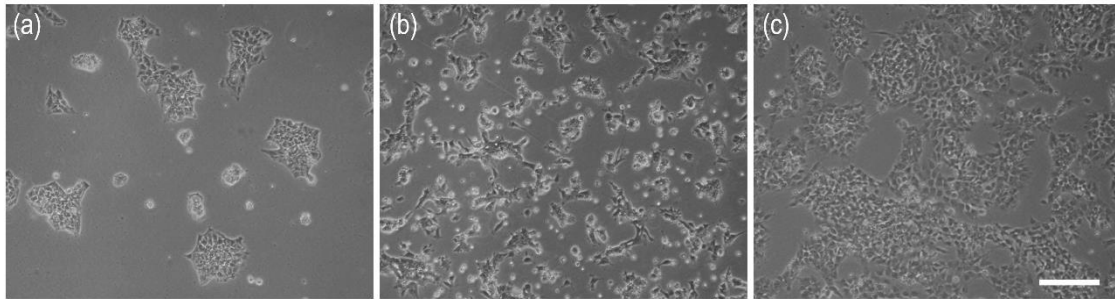


Figura 56. Esquema temporal del protocolo para la generación de las CMN | Las imágenes muestran los campos claros de (a) CMPhs en el día 1 de inducción neural, (b) CMN generadas a partir de éstas CMPhs en el día 1 de expansión (al finalizar los 7 días de inducción), (c) CMN en el segundo pasaje de expansión. La escala representa 100 μm .

Una vez obtenidas las CMN realizamos la validación de las mismas para corroborar su identidad celular. Para ello, en primer lugar, medimos los niveles proteicos (por inmunofluorescencia) del marcador de pluripotencia *OCT-4*, el cual describimos previamente, y luego la expresión de los marcadores de progenitores neurales *SOX-1*, *SOX-2*, *NESTINA* y *PAX-6*; y, en segundo lugar, las sometimos a protocolos específicos de diferenciación a los tres linajes neurales: neuronal (sección 1.1.2.1), oligodendrocítico (sección 1.1.2.2) y astrocitario (sección 1.1.2.3) para evaluar su capacidad multipotente.

SOX-2 (del inglés, *Sex-determining region Y-box 2*), si bien es uno de los factores de transcripción claves que cumplen un rol esencial en el mantenimiento de la pluripotencia, el mismo se expresa en los estadios tempranos del desarrollo del sistema nervioso y es utilizado como un marcador proteico para el desarrollo neural. Este factor resulta importante, también, en el mantenimiento de ciertas propiedades de las células madre neurales como lo son la proliferación/supervivencia, auto-renovación y neurogénesis.

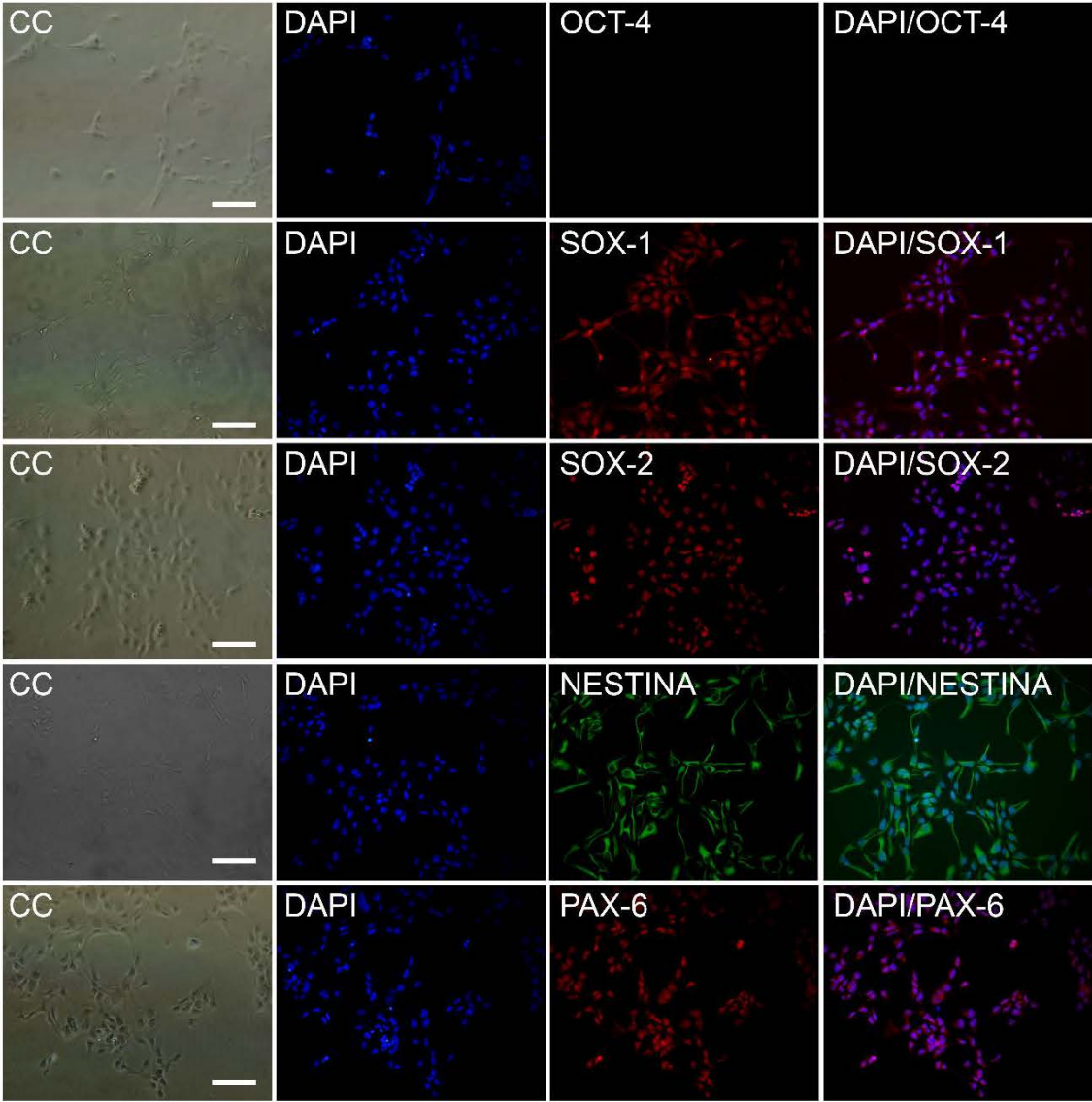
Además, en el proceso de embriogénesis resulta esencial el factor de transcripción *SOX-1* (del inglés, *SRY-box transcription factor 1*). El mismo se considera el marcador de células madre neurales más temprano dado que es el marcador específico del linaje neuroectodérmico que se activa primero durante la gastrulación [130].

Por último, el factor de transcripción *PAX-6* (del inglés, *paired type homeobox 6*) regula múltiples aspectos de las células madre neurales y el desarrollo neuronal en el Sistema nervioso central embrionario.

Tal como esperábamos, tanto en las inmunofluorescencias de las CMN generadas a partir de CMEhs H9 (Figura 57 a) como en aquellas de las CMN generadas a partir de CMPihs FN2.1 (Figura 57 b), no

detectamos expresión del marcador de pluripotencia OCT-4, y sí pudimos medir expresión de los marcadores de progenitores neurales mencionados.

(a)



(b)

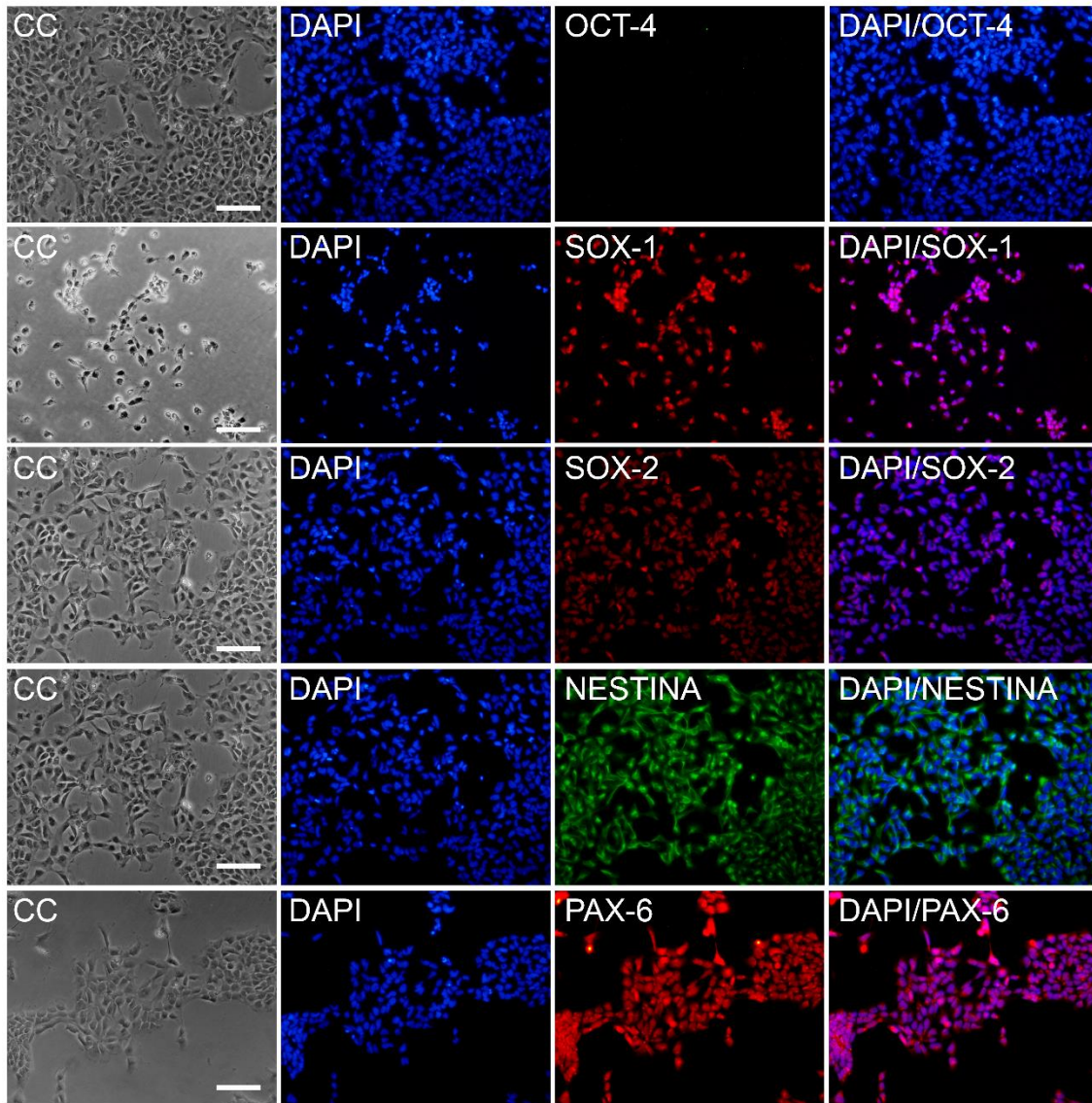


Figura 57. Validación del fenotipo de CMN | Detección por inmunofluorescencia del marcador de pluripotencia OCT-4 y de los marcadores de progenitores neurales SOX-1, SOX-2, NESTINA, PAX-6; en CMN derivadas a partir de la líneas de (a) CMEhs H9 y (b) CMPihs FN2.1. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 100 μm .

1.1.2 .1 Diferenciación neuronal

Luego, para continuar con la validación de las CMN, evaluamos su potencial de diferenciación hacia el linaje neuronal.

La diferenciación neuronal se realizó siguiendo un protocolo detallado por Yan et al. [129]. En el mismo partimos de CMN de un número de pasaje bajo, crecidas en monocapa sobre placas pre-tratadas con geltrex. Para iniciar el protocolo las células se cultivaron en un medio de diferenciación neuronal. El mismo está compuesto por medio Neurobasal, suplementado con aminoácidos no esenciales, B27 y distintos factores específicos para lograr la diferenciación neuronal: ácido ascórbico, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) y el factor neurotrófico derivado de células de la glía (GDNF, del inglés *glial cell-derived neurotrophic factor*). El tiempo de duración del mismo fue de 14 días, con un cambio de medio cada 2-3 días (Figura 58).

Se ha demostrado que el ácido ascórbico promueve la diferenciación de las CMEs hacia neuronas. Si bien la función que este componente ejerce no se encuentra aún del todo esclarecida, diversos estudios han demostrado que este compuesto aumenta la expresión de genes involucrados en la neurogénesis, maduración y neurotransmisión [131]. Se ha revelado que este rol beneficioso en la diferenciación neuronal de CMN humanas sería resultado, también, de la estimulación de la expresión de genes involucrados en vías de señalización que determinan el destino celular [132]. En particular la vía de WNT, la cual se ha demostrado que estimula la auto-renovación de las CMPhs [133].

Por otra parte, GDNF y BDNF son dos factores neurotróficos importantes para la supervivencia, crecimiento de las neuritas y diferenciación de distintas poblaciones de neuronas durante el desarrollo [134, 135].

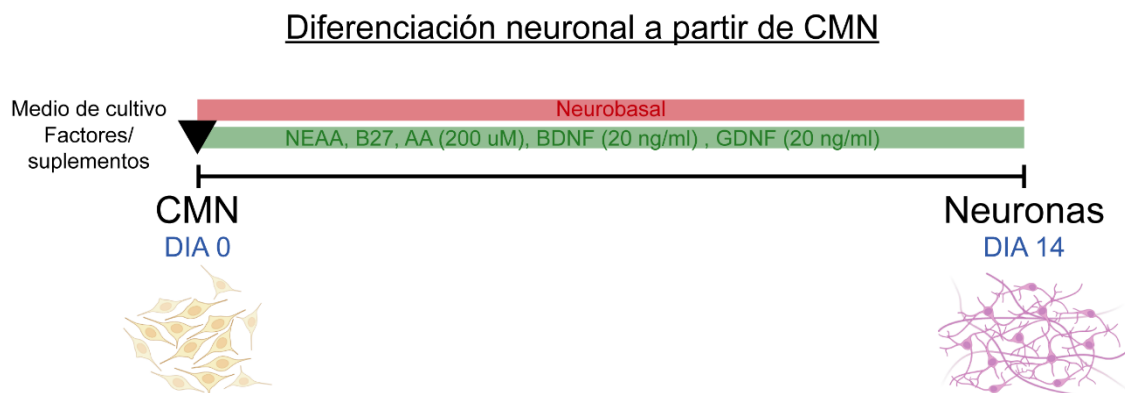


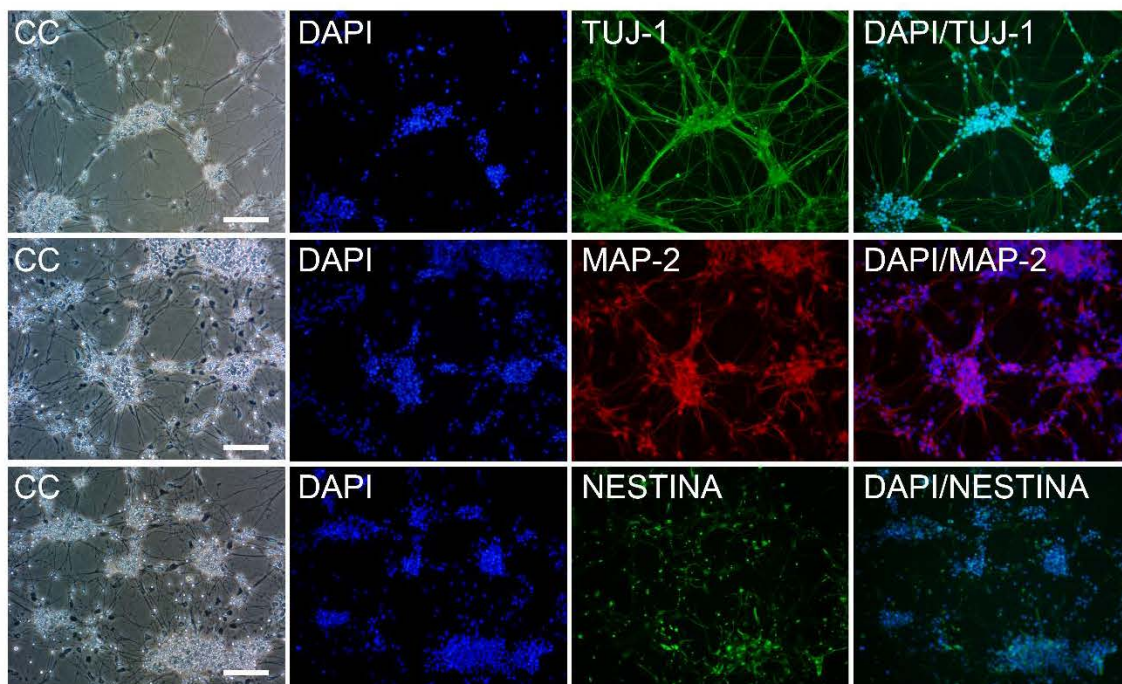
Figura 58. Esquema temporal del protocolo de diferenciación de neuronas a partir de CMN | El esquema muestra el protocolo de diferenciación neuronal utilizado. Se indujo la diferenciación neuronal de CMN generadas a partir de CMPhs (H9 y FN2.1), por 14 días, con un medio de diferenciación compuesto por Neurobasal suplementado con: aminoácidos no esenciales (NEAA, del inglés no essential aminoacids), B27, ácido ascórbico (AA), BDNF y GDNF.

Una vez obtenidas las neuronas, realizamos la validación de las mismas midiendo por inmunofluorescencia la expresión proteica de los marcadores *βIII-TUBULINA* (*TUJ-1*), *MAP-2* y

NESTINA en neuronas obtenidas a partir de CMN de CMEhs H9 (Figura 59 a) y de CMPihs FN2.1 (Figura 59 b).

En ambos casos pudimos observar la expresión TUJ-1, MAP-2 y también de *NESTINA*. Consideramos que esto se debe a que, como mencionamos anteriormente, este último marcador puede expresarse en ciertas neuronas inmaduras o que se encuentran en una fase temprana de su diferenciación.

(a)



(b)

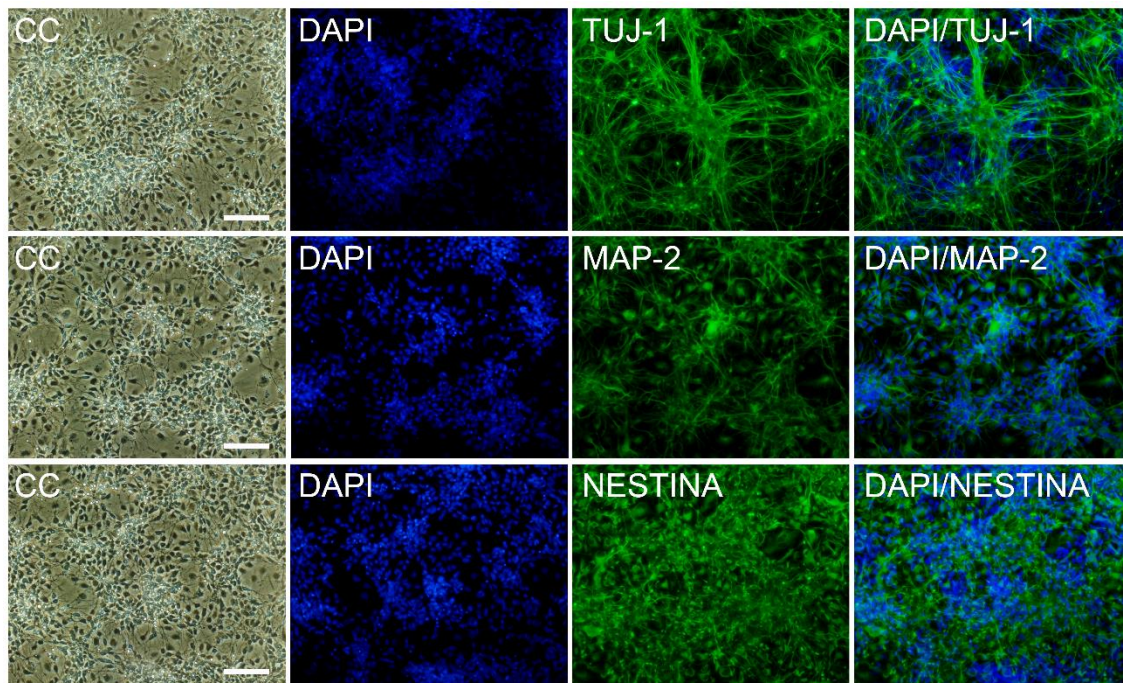
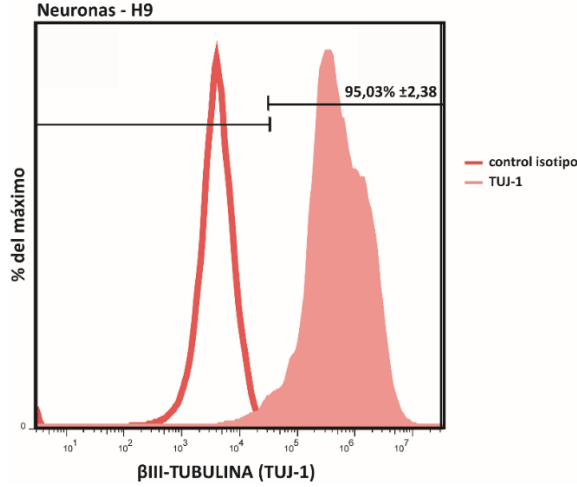


Figura 59. Validación del fenotipo neuronal|Detección por inmunofluorescencia de los marcadores neuronales TUJ-1 y MAP-2 y el marcador de CMN NESTINA en neuronas derivadas a partir de CMN generadas a partir de las líneas de (a) CMEhs H9 y (b) CMPihs FN2.1. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La escala representa 100 μm .

Además, para conocer el porcentaje de neuronas obtenidas a partir de este protocolo de diferenciación, y así determinar su eficiencia de una manera cuantitativa, realizamos una citometría de flujo indirecta utilizando un anticuerpo primario que reconoce a TUJ-1 en neuronas diferenciadas a partir de ambas líneas de CMPhs. De este modo, determinamos un porcentaje de eficiencia del $95,03\% \pm 2,38\%$ para las neuronas obtenidas a partir de las CMEhs H9, y del $96,45\% \pm 0,05\%$ en el caso de las neuronas obtenidas a partir de las CMPihs FN2.1 (Figura 60).

(a)



(b)

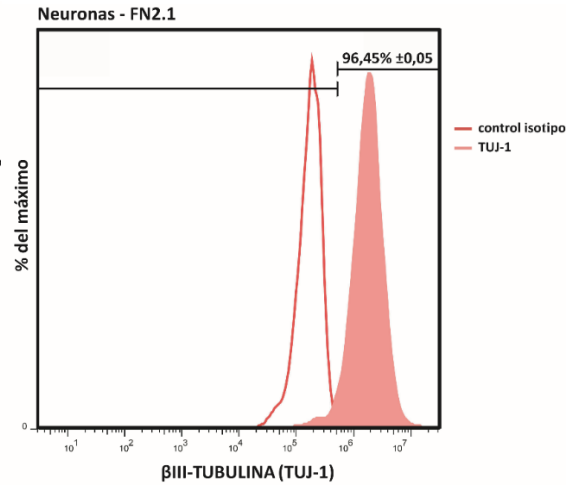
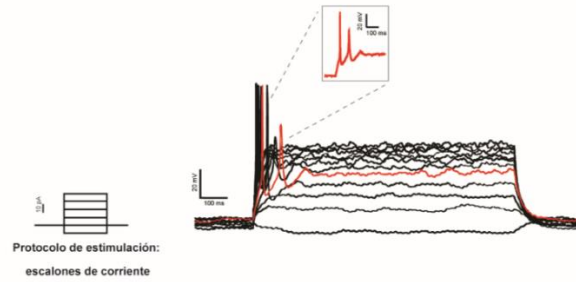


Figura 60. Cuantificación porcentaje de neuronas | Análisis indirecto intracelular por citometría de flujo del marcador neuronal TUJ-1 en neuronas derivadas a partir de CMN generadas a partir de las líneas de (a) CMEhs H9 y (b) CMPihs FN2.1. El histograma rosa representa las células marcadas con el anticuerpo de TUJ-1, la línea roja representa el control de isotipo. El % corresponde al promedio de tres réplicas biológicas \pm Error estándar.

Luego, quisimos determinar si las neuronas obtenidas presentaban actividad eléctrica. Para ello, enviamos muestras de neuronas diferenciadas a partir de las CMN de CMEhs H9 y CMPihs FN2.1, para que se les realizara mediciones electrofisiológicas en el IBioBA-MPSP; en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Antonia Marin Burgin. Generamos, entonces, neuronas con distintos tiempos de maduración (0 días post diferenciación, 7 días post diferenciación y 14 días post diferenciación) y, en las mismas, se midieron potenciales de acción evocados con una configuración current clamp (se fija la corriente y se mide el voltaje) y corrientes de sodio (Na^+) y potasio (K^+) con una configuración voltaje clamp (se fija el voltaje y se miden las corrientes de sodio que ingresan y de potasio que salen). Únicamente en las neuronas de 14 días de maduración pudieron registrarse potenciales de acción y corrientes de Na^+ característicos de neuronas inmaduras (Figura 61 y Figura 62). Estos resultados son consistentes con los reportados en literatura de diferenciaciones similares [31]. Cabe aclarar que existen actualmente protocolos largos de maduración neuronal [136, 137], pero su realización excede los objetivos de nuestro trabajo.

Electrofisiología

(A) Potenciales de acción evocados



(B) Corrientes evocadas de sodio y potasio

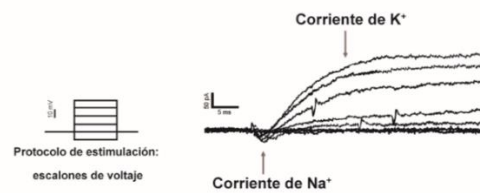
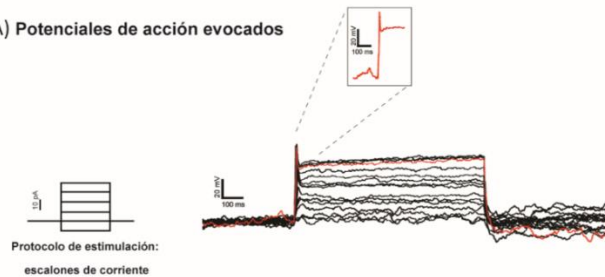


Figura 61. Validación de la actividad eléctrica neuronal | Gráficos de (a) potenciales de acción evocados con una configuración current clamp y de (b) corrientes de sodio y potasio con una configuración voltaje clamp en neuronas con dos semanas de maduración post diferenciación a partir de CMN de CMEhs H9.

Electrofisiología

(A) Potenciales de acción evocados



(B) Corrientes evocadas de sodio y potasio

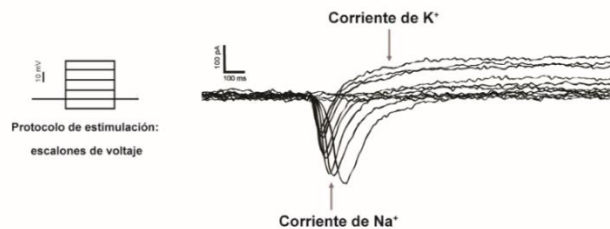


Figura 62. Validación de la actividad eléctrica neuronal | Gráficos de (a) potenciales de acción evocados con una configuración current clamp y de (b) corrientes de sodio y potasio con una configuración voltaje clamp en neuronas con dos semanas de maduración post diferenciación a partir de CMN de CMPihs FN21.

1.1.2.2 Diferenciación a astrocitos

En el caso de la diferenciación a astrocitos, realizamos el protocolo detallado por Yan et al.[129]; siendo el mismo un protocolo de 21 días en el que las CMN, crecidas en monocapa, se cultivan con medio DMEM suplementado con N2 y suero fetal bovino ambos al 1%.

Al finalizar la diferenciación de las CMN de CMEhs H9, medimos la expresión del marcador astrocitario GFAP (proteína ácida fibrilar glial, del inglés glial fibrillary acidic protein) en las células diferenciadas, células sin diferenciar (control negativo) y en una línea derivada de pacientes con glioblastoma multiforme, cultivada en condiciones que favorecen el fenotipo de célula madre de glioma (control positivo).

En el caso de las CMN de CMPihs FN2.1, medimos la expresión de GFAP en las células diferenciadas junto con la expresión de ACTINA como marcador de citoesqueleto.

El marcador GFAP es la principal proteína de filamentos intermedios (tipo III) en los astrocitos.

En el caso de la diferenciación astrocitaria en las CMN de CMEhs H9, pudimos observar marcación de GFAP en las células control positivo junto con la expresión de dicho marcador en algunas células obtenidas a partir de la diferenciación mencionada, y no encontramos dicha expresión en las células sin diferenciar, de modo que pudimos comprobar que dicha marcación es específica (Figura 63).

En el caso de la diferenciación a astrocitos obtenida a partir de las CMN de CMPihs, pudimos observar expresión del marcador GFAP junto con la expresión de ACTINA en un gran número de las células diferenciadas (Figura 64).

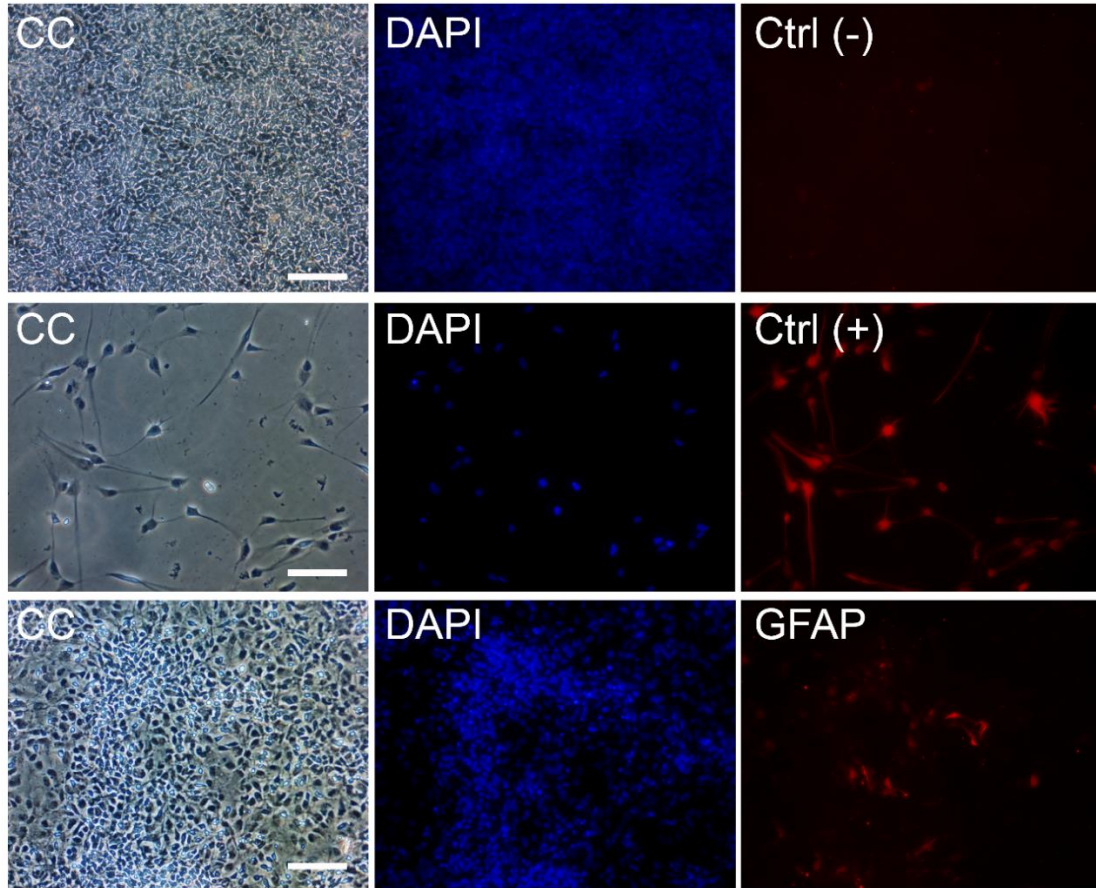


Figura 63. Validación del fenotipo astrocitario| Detección por inmunofluorescencia del marcador astrocitario GFAP en astrocitos derivados de CMN generados a partir de la línea de CMEhs H9. El control negativo corresponde a CMEhs H9 sin diferenciar, y el control positivo a una línea derivada de pacientes con glioblastoma multiforme, cultivada en condiciones que favorecen el fenotipo de célula madre de glioma. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 100 μm .

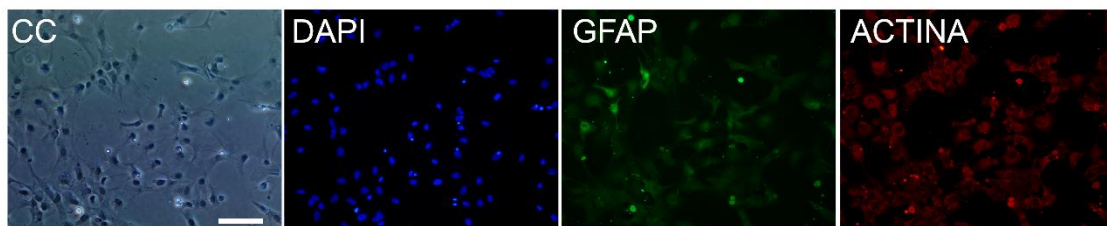


Figura 64. Validación del fenotipo astrocitario| Detección por inmunofluorescencia del marcador astrocitario GFAP y del componente del citoesqueleto ACTINA en astrocitos derivado de CMN generados a partir la línea de CMPihs FN2.1. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 100 μm .

1.1.2.3 Diferenciación a oligodendrocitos

Para la diferenciación oligodendrocítica, realizamos también el protocolo detallado por Yan et al. [129]; siendo el mismo un protocolo de 14 días en el que las CMN, crecidas en monocapa, se cultivan con medio DMEM/F12 y adición y remoción de distintos suplementos y factores de crecimiento (N2, bFGF, EGF, platelet-derived growth factor-AA, T3, NT3, ácido ascórbico y B27).

Al finalizar la diferenciación, realizamos la validación de este tipo celular midiendo en primer lugar los transcriptos de algunos marcadores oligodendrocíticos por RT-qPCR en los oligodendrocitos, las CMN a partir de las que fueron obtenidos, la línea de CMPhs a partir de la que fueron generadas (H9 o FN21) y neuronas diferenciadas a partir de las CMN. Los marcadores medidos por medio de ésta técnica fueron: el factor de transcripción *OLIGODENDROCÍTICO-2* (*OLIG2*), *SOX-10*, el antígeno *NEURAL/GLIAL-2* (*NG2*) y la enzima *GALACTOCEREBROSIDASA* (*GALC*) (Figura 64).

OLIG2 es un factor de transcripción básico de hélice-loop-hélice (bHLH) codificado por el gen *OLIG2*. Está involucrado en la determinación de las neuronas motoras y la diferenciación de oligodendrocitos.

SOX-10 es un factor de transcripción esencial para la generación de oligodendrocitos maduros.

NG2 es un epítopo de membrana que se expresa típicamente en los progenitores de oligodendrocitos.

GALC es una enzima que remueve la galactosa de derivados de ceramida, es codificada por el gen *GALC* en humanos y se expresa en oligodendrocitos inmaduros.

Los valores, analizados por la RT-qPCR, se expresaron como relativos, en cada caso, al valor obtenido en las CMPhs (H9 o FN21) para compararlos con la expresión de dichos marcadores en una célula indiferenciada. En los casos de *OLIG2*, *SOX-10* y *NG2*, no se observaron diferencias significativas en su expresión entre las distintas líneas celulares en ningún caso (tanto en las diferenciaciones a partir de H9 o FN21). En el caso de *GALC*, se pudo ver de manera cuantitativa que el valor de expresión de este marcadores en ambas diferenciaciones de oligodendrocitos es significativamente mayor que el valor de este marcador en las células indiferenciadas o en las CMN generadas a partir de las mismas (Figura 65).

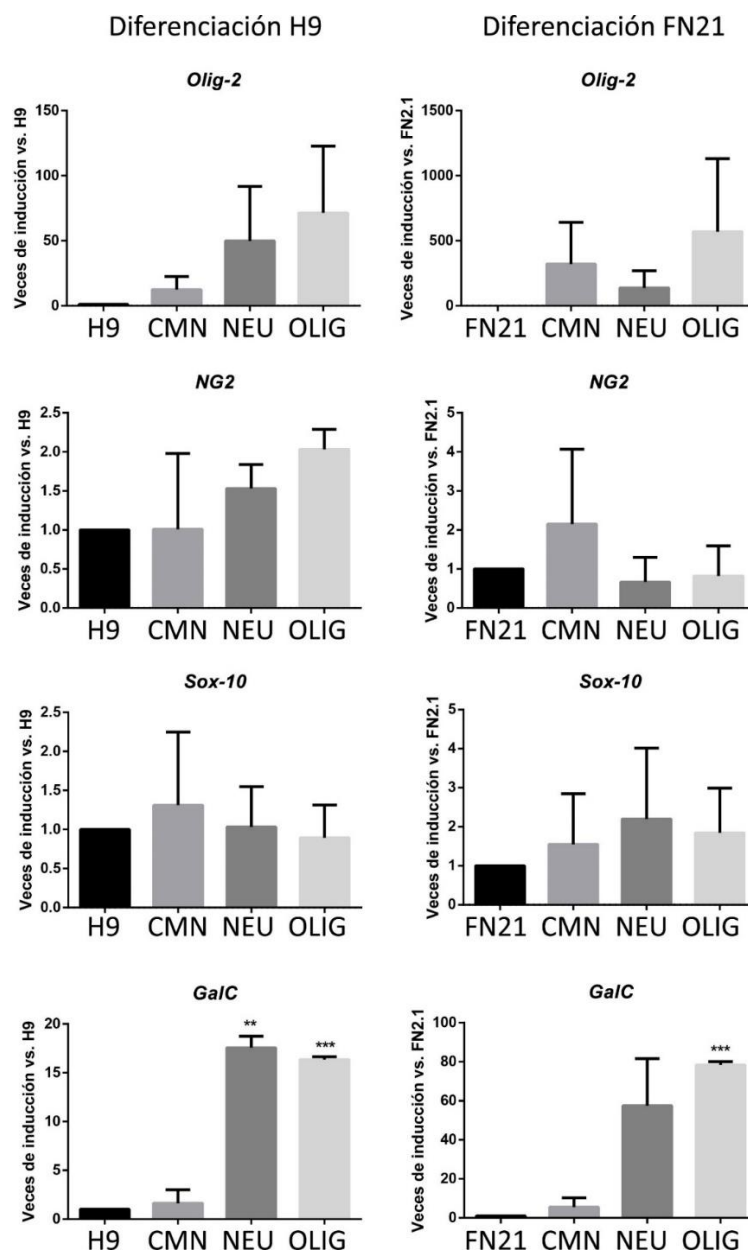
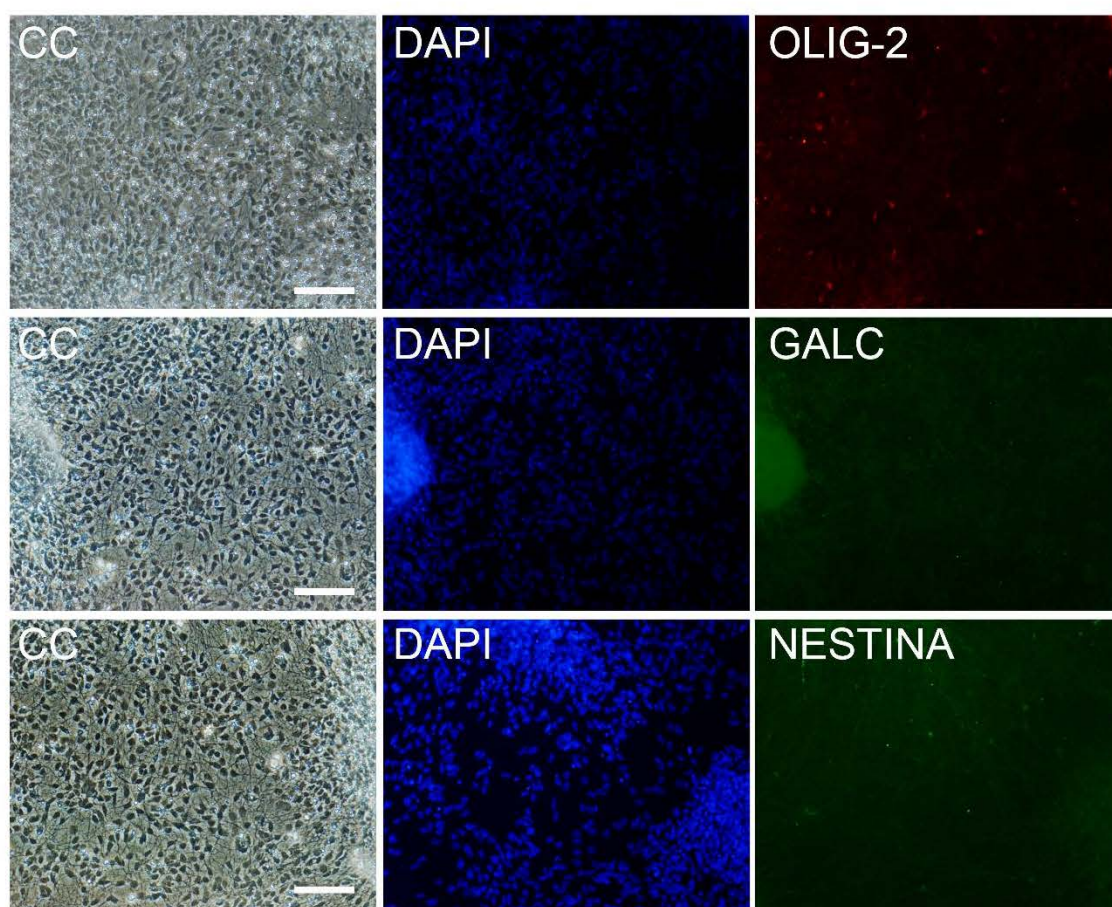


Figura 65. Validación del fenotipo de oligodendrocitos | Análisis por RT-q-PCR de los transcritos de los marcadores de OPs u oligodendrocitos *OLIG2*, *NG2*, *SOX-10* y *GALC* en CMEhs H9 y CMPihs FN2.1 cultivadas en condiciones de cultivo completamente definidas, CMN generadas a partir de éstas CMPihs, y neuronas u oligodendrocitos diferenciadas a partir de éstas CMN. La expresión de *RPL7* fue utilizada como normalizador. Los gráficos muestran los niveles de inducción relativos a las CMEhs H9 o CMPihs FN2.1. Se muestran el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. H9 o FN2.1.

Por inmunofluorescencia medimos la expresión proteica de los marcadores de oligodendrocitos *GALC* y *OLIG2*, y también *NESTINA* como marcador de CMN en diferenciaciones a oligodendrocitos obtenidas a partir de CMN de CMEhs H9 (Figura 66 a) y CMN de CMPihs FN2.1 (Figura 66 b).

En las diferenciaciones de ambas líneas celulares observamos algunas células con una expresión fuerte de OLIG2. Sin embargo, ni la expresión de GALC ni NESTINA resultaron ser específicas en ningún caso (Figura 66).

(a)



(b)

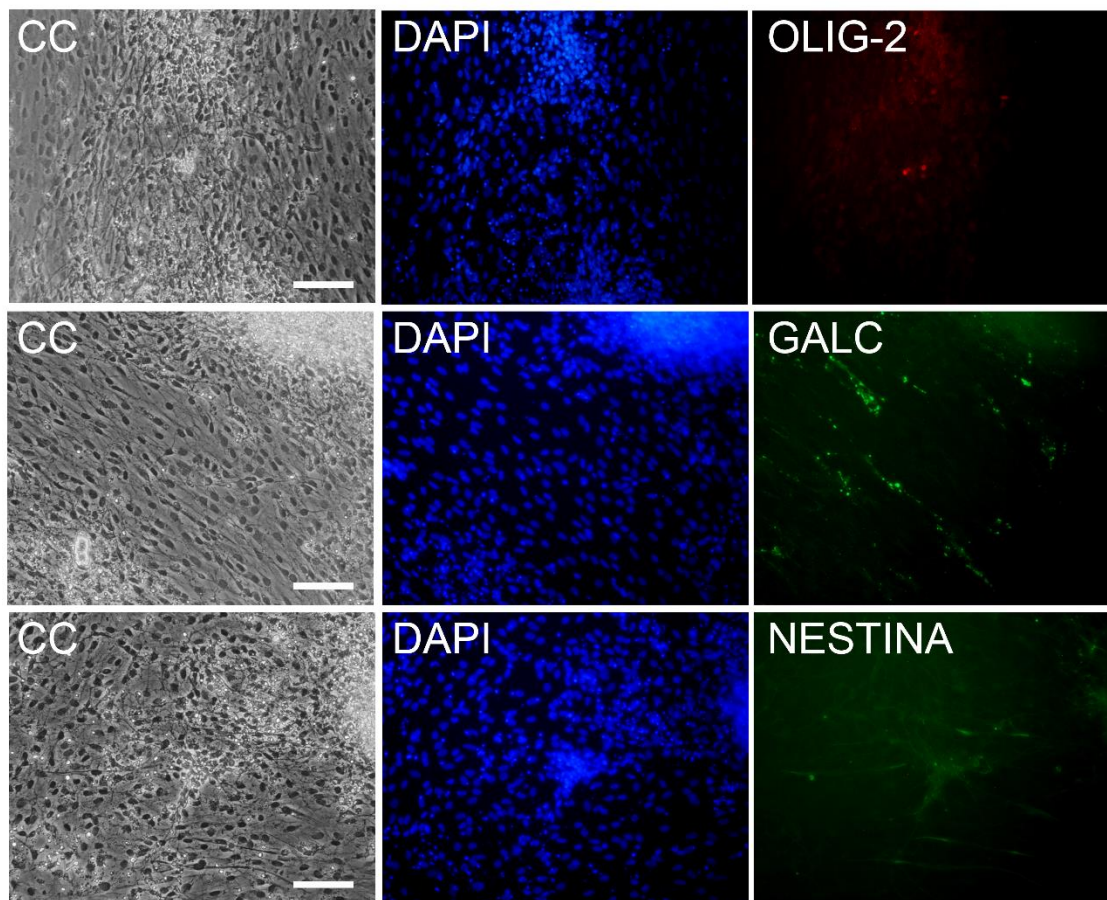


Figura 66. Validación del fenotipo oligodendrocítico | Detección por inmunofluorescencia de los marcadores de oligodendrocitos OLIG2, GALC y NESTINA en oligodendrocitos derivados de CMN generadas a partir las líneas de (a) CMEhs H9 y (b) CMPih FN2.1. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 100 μm .

En la publicación de Pouya et al. [138], describen distintos estadios en la diferenciación a partir de CMPhs hacia oligodendrocitos. El estadio I se refiere al de las células pluripotentes, el estadio II corresponde a las células como EBs durante la diferenciación, el estadio III son células similares a progenitores oligodendrocíticos (OPs, del inglés oligodendrocyte progenitor) y, por último, el estadio IV donde las células adoptan una morfología oligodendroglial caracterizada por múltiples ramas.

En este estudio miden la expresión de los transcritos y proteínas de algunos marcadores oligodendrocíticos en los distintos estadios de la diferenciación. A partir de sus resultados determinaron que las células en un estadio III (células tipo OPs), tenían una alta expresión de los transcritos de *OLIG2*, y la misma bajaba en el estadio IV a este nivel. En cuanto a los niveles proteicos de este marcador, los mismos también se expresaban en las células en este estadio.

Al medir los niveles proteicos de *GALC*, observaron un aumento de la expresión de esta enzima en el estadio IV, y no en el estadio III.

Dado los resultados que obtuvimos, y teniendo en cuenta la clasificación de Pouya et al., consideramos que con la diferenciación específica a oligodendrocitos realizada estamos obteniendo lo que podrían ser progenitores de oligodendrocitos (estadio III, según la publicación) [138], dado que los mismos expresan la proteína OLIG2 (Figura 65), y obtuvimos una alta expresión del ARNm de *GALC* pero no una clara expresión de su proteína la cual se considera un marcador de oligodendrocitos de un estadio más maduro. Podemos concluir, entonces, que nuestras condiciones de diferenciación no fueron suficientes para alcanzar una maduración completa *in vitro*, y sí obtuvimos algunas células con características de OPs.

1.2 Secuenciación masiva de ARNs pequeños en CMPhs tratadas con un pan-iE2F y en su diferenciación neuronal

Como mencionamos al inicio del presente capítulo, realizamos un análisis de secuenciación masiva de pequeños ARNs de dos experimentos distintos:

- 1) De las CMEhs (H9) tratadas con el inhibidor pan-E2Fs (iE2Fs) para analizar el perfil de expresión de los miRNAs regulados por los factores de transcripción E2Fs.
- 2) De las CMEhs (H9), CMN generados a partir de estas células pluripotentes y neuronas diferenciadas a partir de las CMN, para analizar el perfil de expresión de los miRNAs a lo largo de la diferenciación neuronal.

La extracción del ARN total de cada una de las muestras se realizó con el kit de aislamiento de miRNAs: mirVana. A partir de este kit, uno realiza una extracción orgánica seguido de una inmovilización del ARN en filtros de fibra de vidrio para purificar tanto el ARN total como ARN enriquecido en especies de ARN pequeños. Decidimos utilizar esta metodología de extracción debido a la pureza de las preparaciones que se obtienen con el mismo.

La secuenciación y el análisis bioinformático inicial se realizó en las instalaciones de secuenciación de High Throughput Sequencing de la empresa Macrogen, Corea del Sur (<http://foreign.macrogen.co.kr>). La librería utilizada fue la Illumina Small RNA Library de muestras de ARN total de cada una de las poblaciones celulares mencionadas en los experimentos 1 y 2 (Figura 67). Cada tipo celular se analizó por triplicado, con un número de lecturas por muestra de 21666667.

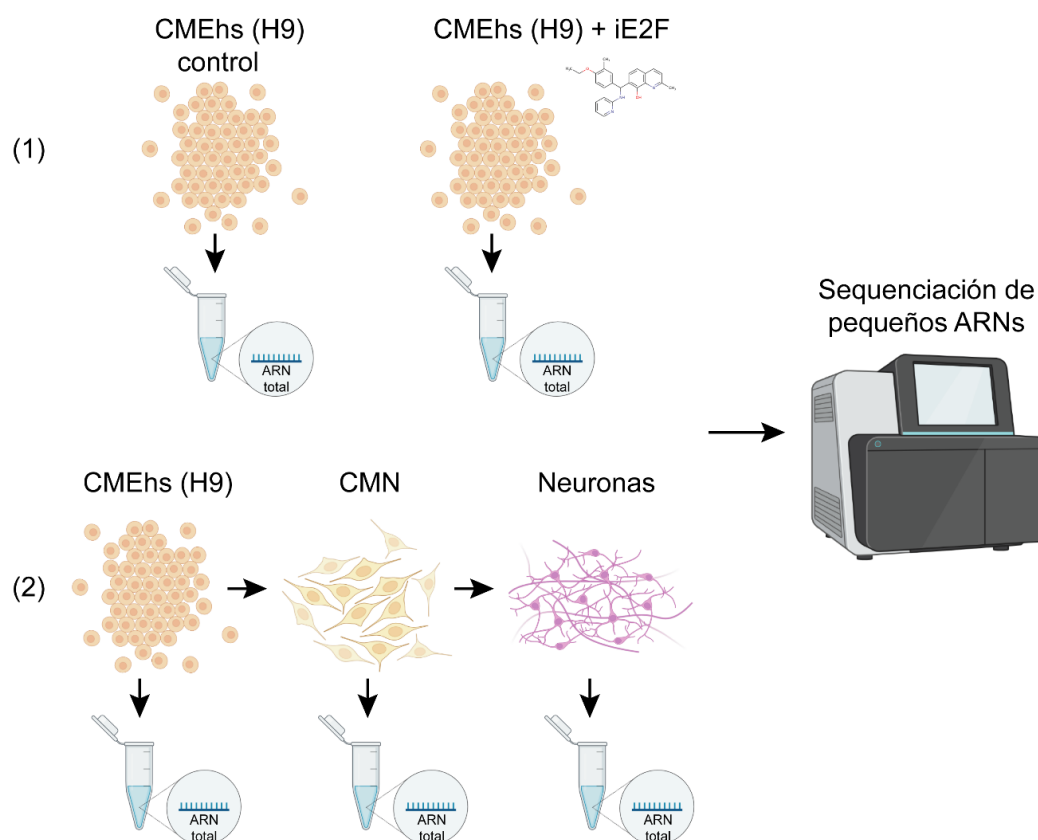


Figura 67. Esquema de las poblaciones celulares secuenciadas El esquema muestra las poblaciones celulares secuenciadas pertenecientes a cada experimento. En el experimento (1) se secuenciaron CMEhs (H9), CMN generadas a partir de estas CMEhs (H9) y neuronas diferenciadas a partir de estas CMN. En el experimento (2) se secuenciaron CMEhs (H9) Control y CMEhs (H9) tratadas con el pan-inhibidor de E2Fs (iE2Fs) (el tiempo y concentración del mismo junto con su puesta a punto se especificarán más adelante).

1.2.1 Secuenciación masiva de ARN pequeños en CMPhs tratadas con un pan-iE2F

1.2.1.1 Validación de las CMPhs tratadas con un pan-iE2F

El rol de los factores de transcripción E2F fue ampliamente descrito en la introducción de la presente tesis. En la misma expusimos la amplia diversidad de funciones que los mismos presentan y que no pueden explicarse de manera completa aún con los modelos descriptos hasta el momento.

En el presente trabajo, nos interesamos en identificar y estudiar que miRNAs son regulados por estos factores de transcripción en las CMPhs.

La estrategia que utilizamos fue realizar un RNA-Seq de pequeños ARNs de CMPhs tratadas con un inhibidor general de los factores de transcripción E2F (pan-E2Fs) y de CMPhs sin tratar como control. A partir de la secuenciación de pequeños ARNs buscamos comparar la expresión de miRNAs entre ambas condiciones para poder determinar que miRNAs podrían ser regulados, directa o indirectamente, por estos factores de transcripción (Figura 67, experimento (1)).

Para llevar a cabo este experimento, el compuesto que utilizamos fue el HLM006474, el cual inhibe la unión de todos los complejos de factores de transcripción E2Fs al ADN y al cual abreviaremos como iE2Fs [139].

Las células que decidimos utilizar para la secuenciación fueron las CMEhs H9 y, buscamos después, trasladar el análisis y los resultados obtenidos a las CMPihs FN2.1. Trabajamos con ambas líneas de CMPhs en condiciones de cultivo definidas (geltrex y medio mTeSR1).

En primer lugar pusimos a punto la concentración y tiempo de incubación del iE2Fs.

Para ello, probamos distintas concentraciones del mismo (10 μ M; 20 μ M y 40 μ M) a 24 y 48 horas, y buscamos determinar el efecto del inhibidor en la viabilidad celular. Para ello, realizamos dos técnicas distintas: XTT y azul de Tripán.

La técnica de XTT para viabilidad celular es un ensayo colorimétrico que detecta la actividad metabólica celular. Durante el mismo, la sal amarilla de tetrazolio es reducida, por las enzimas deshidrogenasas, en aquellas células metabólicamente activas a un compuesto formazan que presenta un fuerte color. Esta conversión ocurre solo en las células vivas y, por ende, la acumulación de formazan producido es proporcional a las células viables en la muestra.

En el ensayo de exclusión por azul de Tripán permite una identificación y enumeración directa de las células vivas y muertas de una dada población. El mismo se basa en que las células vivas (sin teñir) presentan una membrana celular intacta por lo que no permiten (excluyen) el ingreso de este colorante, mientras que las células muertas (teñidas), presentan una membrana celular permeable a dicho colorante. Al ingresar a las células muertas, este colorante se une a proteínas intracelulares otorgándole a las mismas un color azulado.

A partir del análisis del ensayo de XTT, pudimos determinar una disminución significativa de la viabilidad de las CMEhs H9 tratadas con el iE2Fs por 24 horas en una concentración 40 μ M. En el caso de las CMPihs FN2.1, se observa la misma tendencia de disminución pero la misma no resultó significativa (Figura 68). Al analizar ambas líneas de CMPhs tratadas con el iE2Fs por 48 horas y las distintas concentraciones mencionadas, pudimos observar esta misma tendencia de disminución de la viabilidad sobre todo en la concentración 40 μ M, si bien la misma no fue significativa en las H9 (Figura 68).

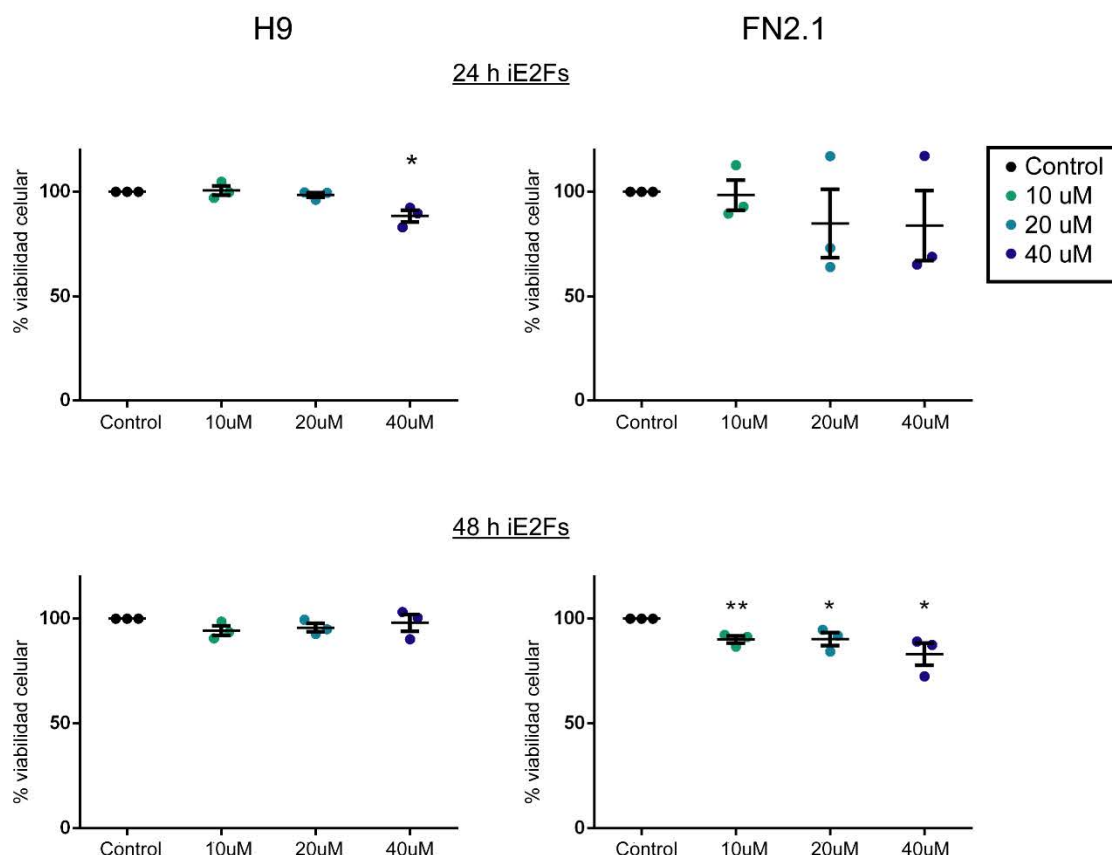


Figura 68. Análisis de la viabilidad celular en células tratadas con el iE2Fs por medio de un ensayo de XTT | Se analizó el porcentaje de viabilidad celular mediante un ensayo de XTT en CMPhs (H9 y FN21) tratadas con 10, 20 y 40 μ M del iE2Fs por 24 horas y 48 horas. Los gráficos muestran los porcentajes relativos a las CMPhs control. Se muestran el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. CMPhs control.

Al realizar el ensayo de azul de Tripán, no observamos diferencias significativas en ambas líneas de CMPhs H9 tratadas con las distintas concentraciones del iE2Fs por 24 horas, si bien se observa una tendencia de menor viabilidad celular en las células tratadas con una concentración del iE2Fs 40 μ M en este tiempo (Figura 69). Al observar las CMPhs tratadas con estas mismas concentraciones del iE2Fs por 48 horas, pudimos observar, en el caso de las CMEhs H9, una reducción significativa de la viabilidad celular en aquellas células tratadas con la concentración 40 μ M. Si bien en las CMPihs FN2.1 las diferencias no fueron significativas, puede observarse una tendencia de disminución de la viabilidad de las mismas en las concentraciones 20 y 40 μ M (Figura 69).

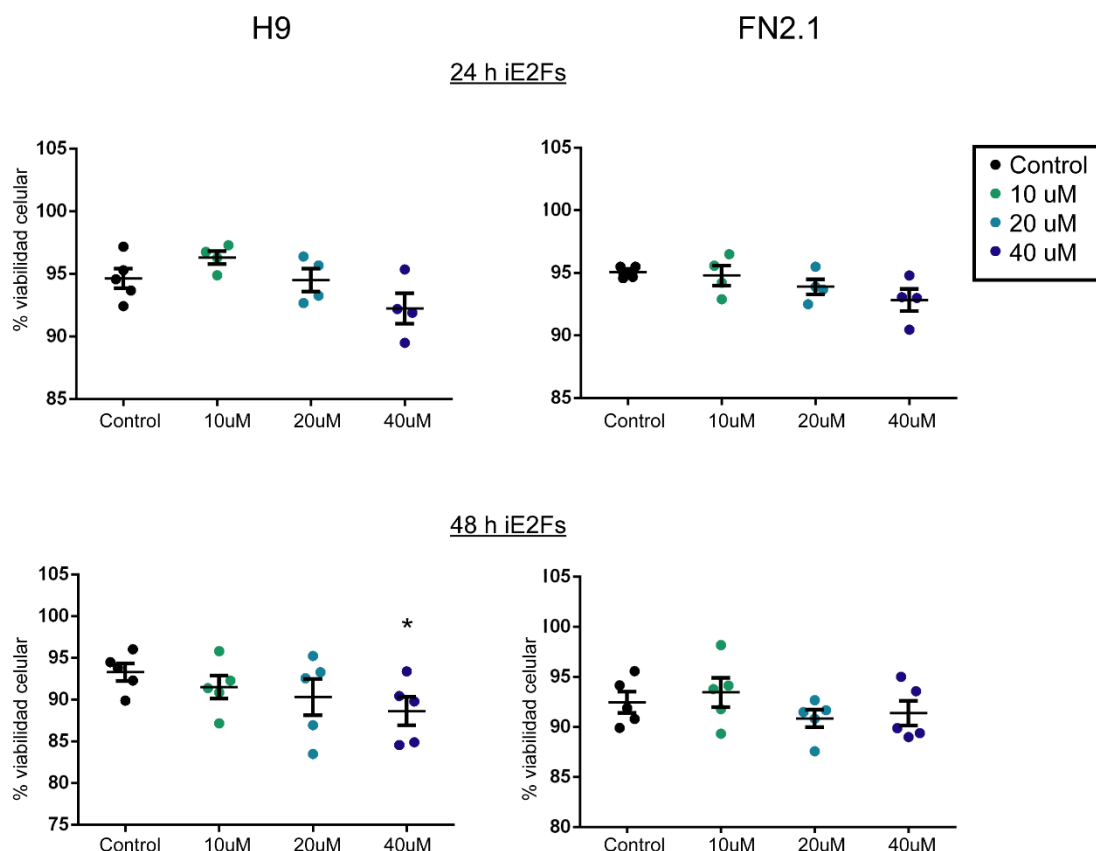


Figura 69. Análisis de la viabilidad celular en células tratadas con el iE2Fs por medio de un ensayo con azul de Tripán | Se analizó el porcentaje de viabilidad celular mediante un ensayo con azul de tripán en CMPhs (H9 y FN21) tratadas con 10, 20 y 40 μ M del iE2Fs por 24 horas y 48 horas. Los gráficos muestran los porcentajes relativos a las CMPhs control. Se muestran el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. CMPhs control.

A partir de estos ensayos, consideramos que el mejor tiempo de incubación era 24 horas y dentro de las concentraciones utilizadas del iE2Fs la mejor sería 20 μ M dado que es la mayor concentración en la que no se afecta la viabilidad. Sin embargo, para terminar de definir esto, quisimos, además, determinar el perfil del ciclo celular de las células arrestadas con el inhibidor de E2Fs. Este análisis lo realizamos en las CMPhs tratadas por 24 horas con iE2Fs 20 y 40 μ M y en comparación de las células indiferenciadas control. Se comprobó que las células control tuvieran un perfil de ciclo celular correspondiente a una célula madre pluripotente (alto porcentaje de células en fase S y bajo porcentaje en la fase G1).

Esto se realizó por medio de una marcación con Ioduro de Propidio, agente fluorescente que se intercala en el ADN, y posterior medición por citometría de flujo. El análisis del porcentaje de células en cada fase del ciclo se realizó por medio de la plataforma un variada del software FlowJo v10.0.7's que permite, mediante un modelo matemático, determinar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

Observamos un aumento del porcentaje de células en la fase G1 en aquellas tratadas con 20 μM del iE2Fs en comparación con las células control. Como mencionamos, varios de los factores de transcripción E2Fs están involucrados en la progresión del ciclo celular, por lo que consideramos que este resultado puede ser un efecto esperado al inhibir su actividad. En el caso de las células tratadas con 40 μM del iE2Fs, se observa el mismo aumento del porcentaje de células en la fase G1, pero el mismo no es mayor que el determinado en las células con la concentración de 20 μM . Además, en el análisis por citometría de flujo se observó un mayor porcentaje de muerte celular con iE2Fs 40 μM (Figura 70).

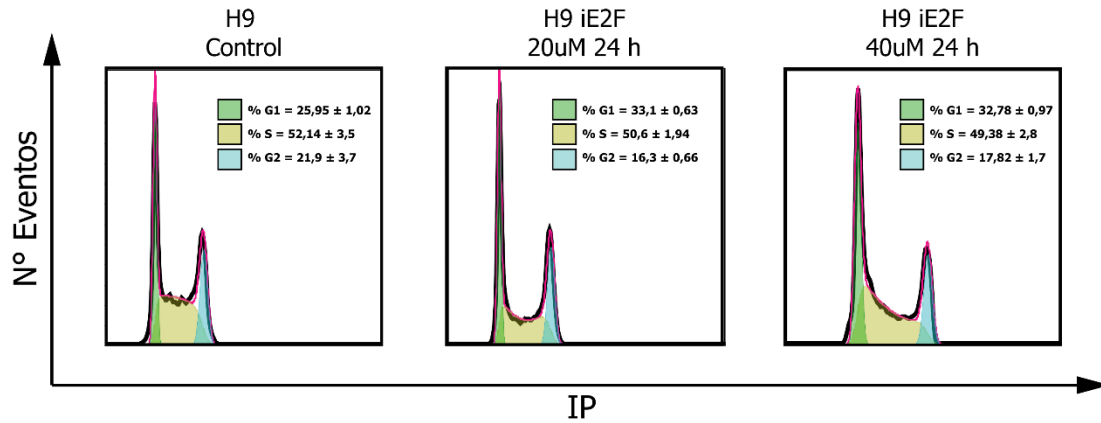


Figura 70. Perfil del ciclo celular de CMEh H9: Control y tratadas con el iE2Fs | El perfil del ciclo celular de las CMEhs H9 control y tratadas con el iE2Fs (20 μM y 40 μM por 24h) fue analizado luego de fijar las células con etanol 70% frío. El contenido de ADN fue medido por medio de una marcación con yoduro de propidio (IP) y su fluorescencia se determinó a través de una citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo con el promedio y error estándar de la frecuencia del contenido de ADN de cuatro réplicas biológicas para cada línea. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se calculó con la plataforma un variada del software FlowJo v10.0.7's. N=4.

A partir de estos análisis, determinamos que una concentración de 20 μM por 24 horas sería la mejor condición de incubación del iE2Fs, dado que consideramos que sería el mayor tiempo y concentración que podríamos utilizar en donde la viabilidad celular de las CMPhs no se vería comprometido y donde, además, se observa un cambio en el perfil del ciclo celular (aumento en el porcentaje de células en la fase G1).

Está establecido que el complejo de CICLINA E/CDK2, que es activado transcripcionalmente por los factores de transcripción E2Fs, fosforila y estabiliza el núcleo principal de factores de pluripotencia: NANOG, SOX-2 y OCT-4 [20]. Estos experimentos ponen en evidencia la conexión entre la maquinaria del ciclo celular que regula la transición de la fase G1/S y la red de pluripotencia [140].

Una vez establecidas las condiciones de trabajo, entonces, procedimos a medir los niveles de expresión, por medio de una RT-qPCR, de los marcadores de indiferenciación *OCT-4* y *NANOG* para determinar si había algún cambio en la expresión de los mismos debido al tratamiento con el inhibidor.

Pueden observarse una disminución significativa en los niveles de expresión del ARNm del marcador de pluripotencia *OCT-4* en las células tratadas con el inhibidor en relación a las células control (Figura 71). Consideramos que este resultado puede deberse a la falta de estabilización del mismo por la desregulación del complejo CICLINA E/CDK2 debido al efecto del inhibidor de los factores de transcripción E2Fs.

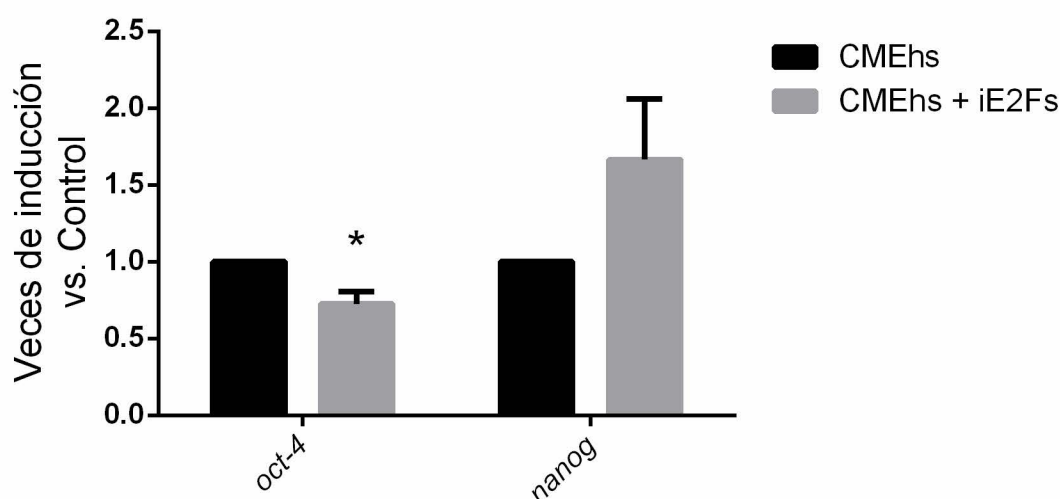


Figura 71. Análisis de la expresión de marcadores de indiferenciación en las CMEhs H9 tratadas con el iE2Fs | Análisis de los niveles de expresión del ARNm de marcadores de indiferenciación (*OCT-4* y *NANOG*); en CMEh H9 control y tratadas con el iE2Fs (20μM 24h). La expresión de *RPL7* fue utilizada como normalizador en todos los casos y los niveles de inducción son relativos a las CMEhs H9 control. Se muestran el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$ vs. CMEhs control.

1.2.1.2 Análisis bioinformático

Una vez recibidos los resultados de la secuenciación masiva de pequeños ARNs procedimos a realizar el análisis bioinformático de los mismos. La empresa Macrogen realizó en análisis inicial en el que obtienen un número de miRNAs normalizados al número total de miRNAs mapeados, y nos enviaron una tabla con la abundancia de cada uno de ellos en cada una de las muestras. A partir de la misma iniciamos nuestro análisis.

En primer lugar, analizamos la distribución de la expresión de los miRNAs en cada una de las muestras (CMEhs H9 control y tratadas con el iE2Fs) y observamos, que la misma es similar entre las distintas

réplicas de cada condición. A su vez, observamos que la distribución de la expresión de los miRNAs es similar también entre las células tratadas y no tratadas. Consideramos que esto se debe a que al inhibir la actividad de los factores de transcripción E2Fs, se estaría alterando la expresión de un número pequeño de miRNAs en relación a la expresión total, por lo que la distribución en términos generales aparenta ser muy similar (Figura 72).

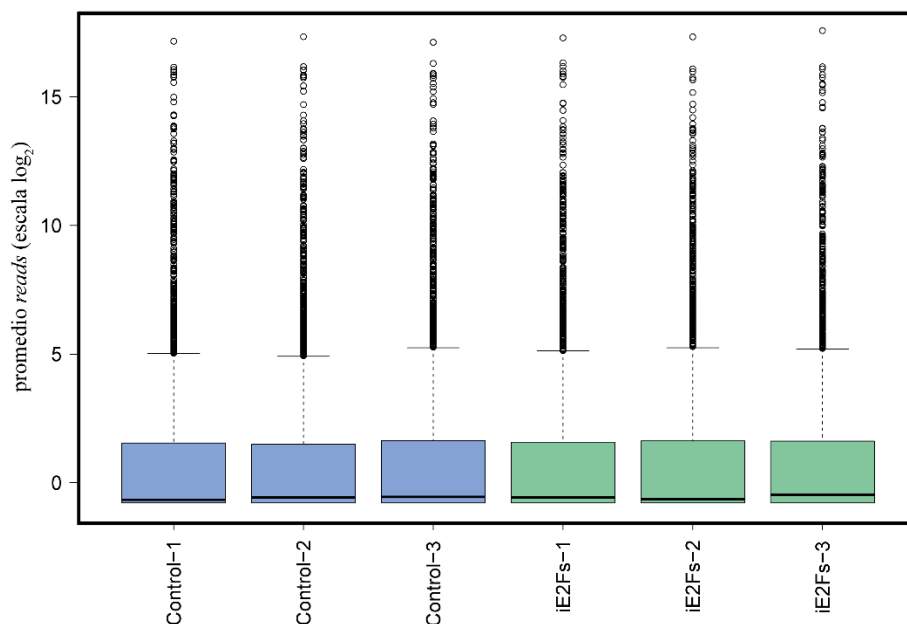


Figura 72. Distribución de la expresión de los miRNAs en las CMEhs control y tratadas con el iE2Fs | El gráfico muestra Box-plots que representan la distribución de la expresión de los miRNAs en las tres réplicas (1, 2 y 3) de las poblaciones celulares: Control (CMEhs H9 control) y células tratadas con el inhibidor de los factores de transcripción E2Fs (iE2Fs).

Luego determinamos qué miRNAs se expresan en cada población en particular, y en ambas poblaciones a la vez. Esto lo representamos en un Diagrama de Venn. Observamos que 723 miRNAs se expresan en ambas condiciones, mientras que 31 se expresan diferencialmente en las células control y 60 en las células tratadas con el iE2Fs (Figura 73).

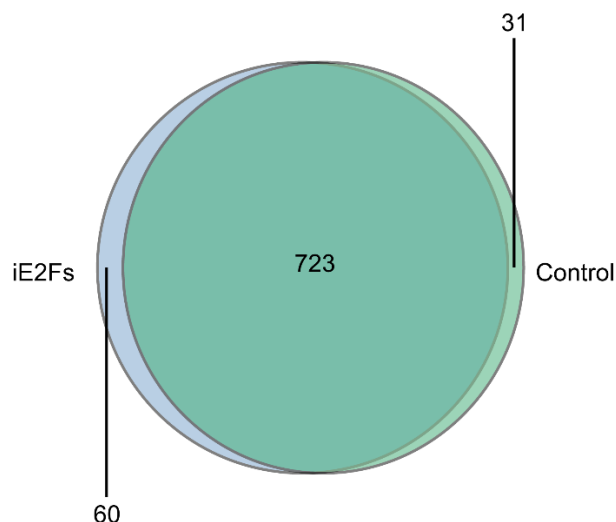


Figura 73. Número de miRNAs expresados en cada población celular | El gráfico se corresponde a un Diagrama de Venn indicando el número de miRNAs que se expresan en las CMEhs H9 control (Control) y/o en las CMEh H9 tratadas con el iE2Fs (iE2Fs).

Luego, para determinar el perfil de expresión de los miRNAs en ambas poblaciones celulares y sus réplicas, realizamos un gráfico de mapa de calor (*heatmap*). Para ello, filtramos y descartamos aquellos miRNAs con lecturas menores a diez debido a que las mismas resultan de un artefacto propio de la medición. Con los niveles de expresión de los miRNAs restantes, transformamos los datos para que los mismos entren en una escala de color entre 2 y -2. Luego con el paquete pheatmap del “R Studio” (lenguaje de programación y software gratis para análisis de datos), y los datos escalados, se generó el mapa de calor (*heatmap*).

En el mismo observamos que la distribución de la expresión de los miRNAs es similar tanto entre réplicas como entre las células tratadas y no tratadas. Consideramos que esto también, y como explicamos previamente, se debe a que con la inhibición de los factores de transcripción E2Fs, se estaría alterando la expresión de un número pequeño de miRNAs, por lo que la distribución en términos generales aparenta ser muy similar (Figura 74).

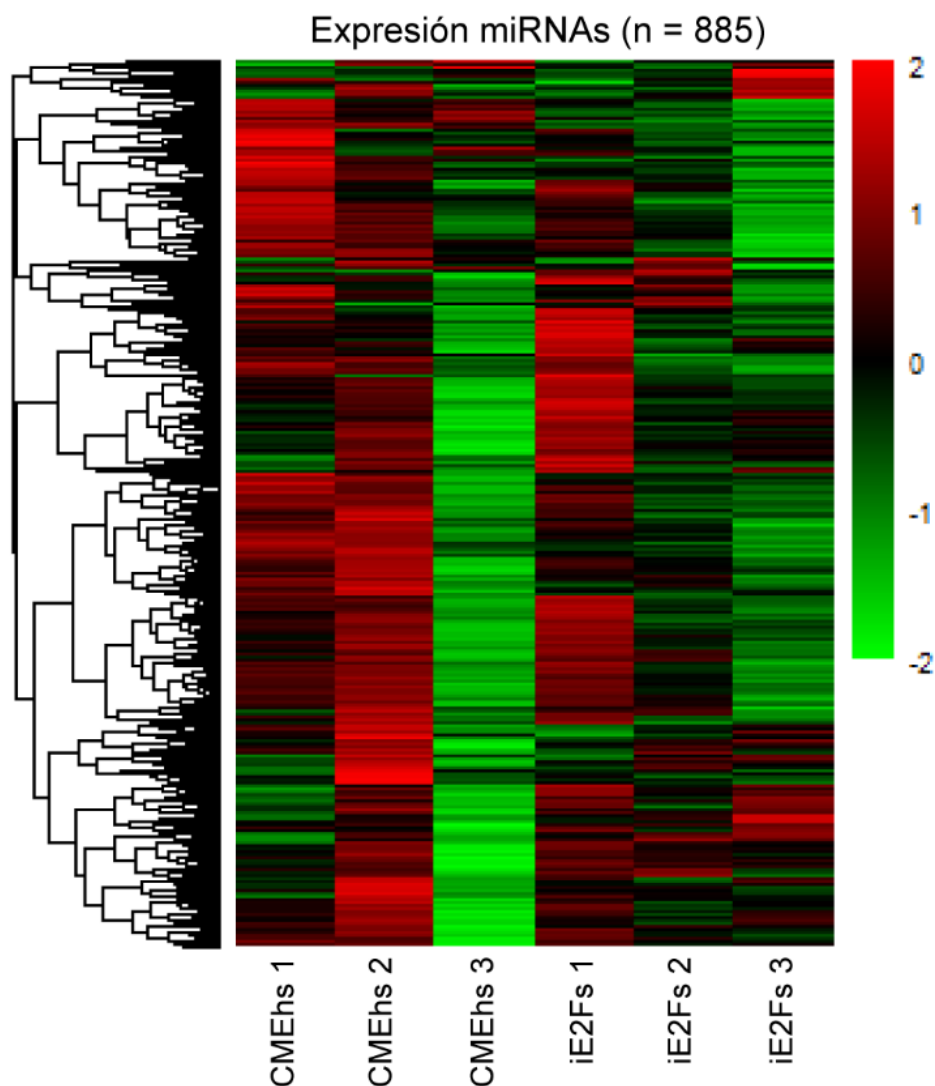


Figura 74. Niveles de expresión de los miRNAs en las CMEhs H9 control y tratadas con el iE2Fs | En el mapa de calor (*heatmap*) se pueden observar los niveles de expresión de los miRNAs en ambas poblaciones celulares: control (indicadas como CMEhs 1, 2 y 3) y tratadas con el iE2Fs (indicadas como iE2Fs 1, 2 y 3). En rojo se representan los niveles de expresión alto y en verde los bajos. Cada columna del *heatmap* corresponde a una réplica biológica de las células CMEhs H9 control y tratadas con el iE2Fs.

Con el fin de identificar cuáles son los miRNAs que aumentan/disminuyen sus niveles de expresión de manera significativa entre las CMEhs H9 control y las tratadas con el inhibidor, realizamos un análisis estadístico de expresión diferencial utilizando el paquete DESeq2 para R.

El diseño experimental se especifica al inicio del análisis, ya que es lo que va a indicarle a las funciones del DESeq2 como tratar a las muestras en el análisis. En este caso, el diseño experimental fue el de un tratamiento (el inhibidor de E2Fs) en contraste al control (CMEhs sin tratar). Así, buscamos analizar el efecto del inhibidor (tratamiento) en la expresión de los miRNAs en las CMEhs H9.

Existen diversos gráficos diagnósticos para corroborar que el análisis de expresión diferencial con el DESeq2 se realizó de manera correcta.

Uno de ellos es realizar un box plot de los datos normalizados por el DESeq2, para corroborar que la normalización realizada por el paquete haya sido correcta. Pudimos determinar mediante este gráfico diagnóstico, que la normalización realizada por el DESeq2 fue la adecuada (Figura 75).

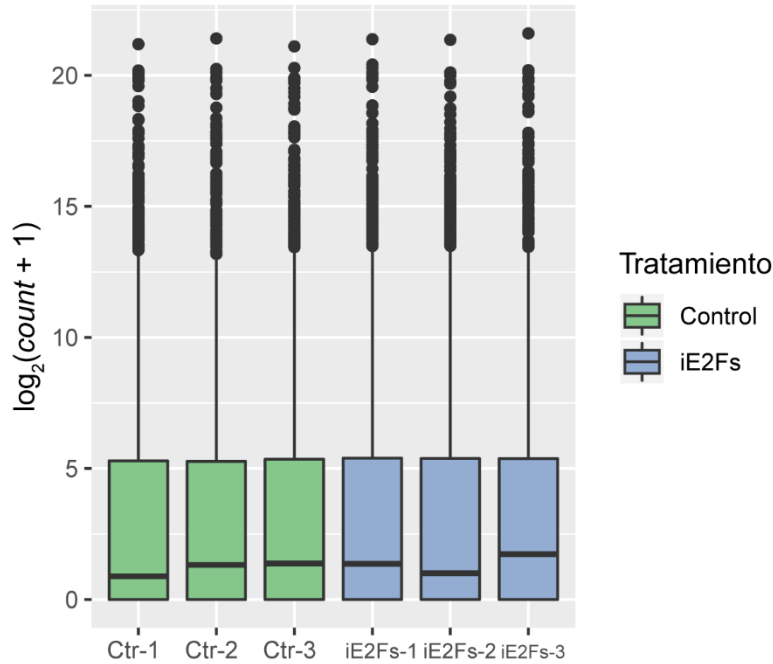


Figura 75. Análisis de la abundancia de la expresión normalizada de miRNAs por el paquete DESeq2 El gráfico muestra Box plots que representan la abundancia de la expresión normalizada de los miRNAs llevada a cabo por el paquete DESeq2 en las CMEhs control (Control) y las CMEhs tratadas con el iE2Fs (iE2Fs).

Para continuar con el diagnóstico del análisis de expresión diferencial, realizamos un análisis de componentes principales (PCA, del inglés *principal components analysis*) (Figura 76).

Este gráfico permite visualizar cómo se agrupan las poblaciones y sus respectivas réplicas según la similitud que existe entre ellas.

En el caso de este experimento, la distancia entre muestras no muestra una distribución ordenada. Esto podría deberse a que las diferencias entre las células tratadas y las células control probablemente sean muy pequeñas como para que puedan diferenciarse por medio de este análisis.

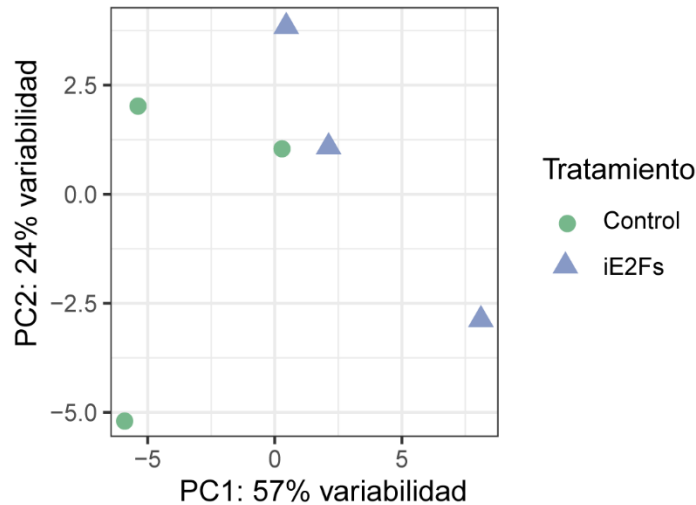


Figura 76. Análisis de componente principales | En el gráfico de PCA se muestra cómo se agrupan las poblaciones de CMEhs H9 control (Control) y las CMEhs H9 tratadas con el inhibidor (iE2Fs) y sus respectivas réplicas, según la similitud de los datos obtenidos del DESeq2.

Por último, como último gráfico diagnóstico, realizamos lo que se denomina un MA-plot (Figura 77). El mismo es un scatter plot 2D para visualizar la expresión génica de grupos de datos.

El gráfico diagnóstico de los MA-plots es útil para la comparación de dos grupos. En el gráfico, y en este caso, cada miRNA es representado por un punto. En el eje x está el promedio de expresión normalizado de todas las muestras, y el eje y es logaritmo del cambio de expresión (el log2 fold change) entre las CMEhs control y CMEhs tratadas con el inhibidor de E2Fs. Mediante una escala de colores se muestra el valor del p-ajustado, y se observan aquellos genes regulados positiva o negativamente, en la comparación CMEhs control vs iE2Fs, de acuerdo a si están por encima o por debajo del eje $y=0$.

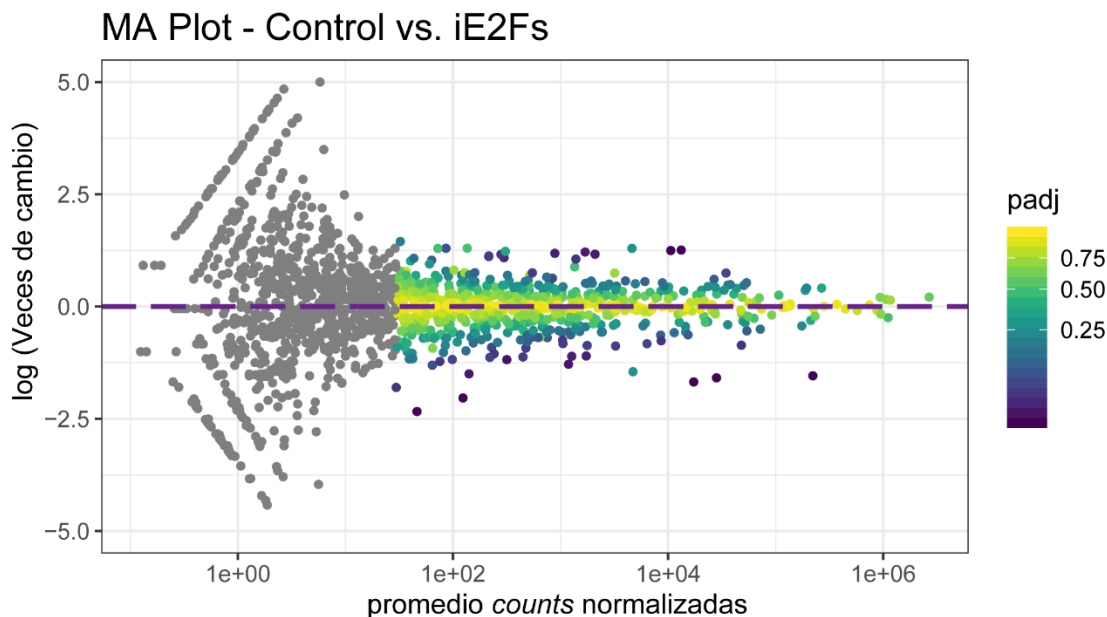


Figura 77. MA-plot de los cambios inducidos por el tratamiento por el inhibidor de iE2Fs | El MA-plot muestra la comparación del log2 de las veces de cambio entre las CMEhs H9 control vs iE2Fs en el eje y; y el promedio de los conteos normalizados por el factor tamaño en el eje x. Cada miRNA es representado por un punto. La escala de colores muestra los miRNAs de acuerdo a su valor de p ajustado.

Una vez finalizado este diagnóstico, analizamos los resultados obtenidos a partir del análisis de expresión diferencial.

Además el DESeq2 realiza el test para la hipótesis en que no hay efecto sobre el miRNA debido al tratamiento y que la diferencia observada entre el tratamiento y el control es causada simplemente por variabilidad experimental. El resultado de esta prueba es reportado como un p-valor.

Un modo de ser más estricto con el grupo de genes que va a ser considerado significativo, es disminuir el umbral del rango de descubrimiento falso (FDR, del inglés False Discovery Rate) que corresponde al padj (es un p-valor modificado).

En nuestro análisis, determinamos el número de miRNAs expresados diferencialmente con dos FDRs distintos: 0,1 y 0,05 (Tabla 8). En la misma puede observarse que 52 miRNAs son expresados diferencialmente con un FDR de 0.1 y 33 con un FDR de 0.05.

Análisis	FDR 0.1	FDR 0.05
CMEhs vs. iE2Fs	52	33

Tabla 7. Número de miRNAs expresados diferencialmente entre las distintas condiciones | La tabla muestra los miRNAs expresados diferencialmente entre las CMEhs H9 control (Control) y tratadas con el iE2Fs (iE2Fs) con un FDR de 0.1 y 0.05.

En la Figura 78 representamos, mediante un volcano plot, los miRNAs expresados diferencialmente entre las CMEhs H9 control y las tratadas con el iE2Fs con un FDR de 0.1. Cada punto representa un miRNA y en verde pueden observarse los miRNAs que están sobre-expresados en la condición testeada; mientras que en rojo se observan aquellos que están down-regulados en la condición testeada en relación al control. Estos últimos incluyen los microARNs miR-19a y miR-19b, miRNAs que se encuentran en el cluster miR-17~92, codificados en un intrón del locus del gen *MIR17HG/C13orf25*. Se demostró que los factores de transcripción E2F1, E2F2 y E2F3 se unen al promotor de este gen activando su transcripción en células Hela. Además, se vio que estos miRNAs en particular contribuyen a la reprogramación de fibroblastos hacia CMPIhs [141]. Consideramos que estos datos bibliográficos aportan robustez a los resultados obtenidos.

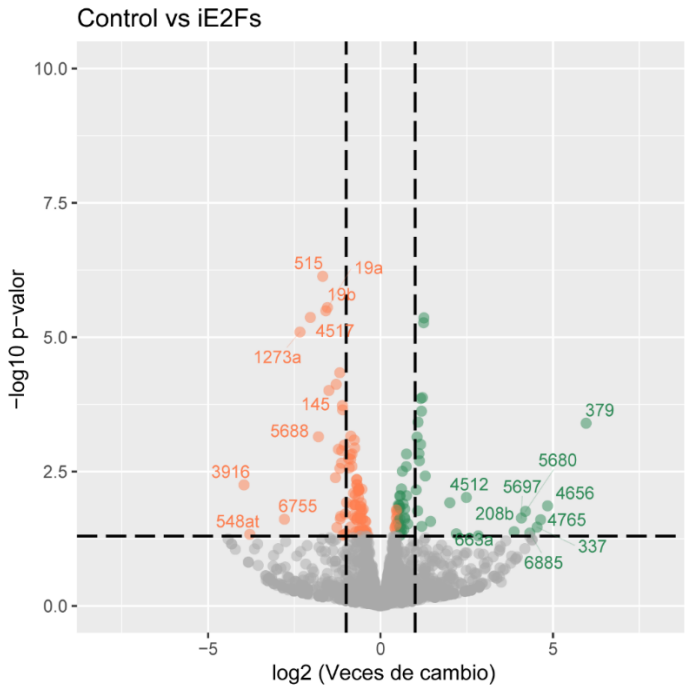


Figura 78. Análisis de la expresión diferencial de los miRNAs en las CMEhs H9 tratadas con el inhibidor en relación a las CMEhs control | En el volcano-plot se observan los miRNAs expresados diferencialmente entre las CMEhs

H9 tratadas con el inhibidor (iE2Fs). En rojo se observan los miRNAs que están menos expresados y en verde aquellos más expresados en las CMEhs iE2Fs en relación al control. Se indican los nombres de los 10 miRNAs más up regulados y de los 10 más down regulados en cada contraste. Las líneas negras corresponden a un log2 fold change de 1/-1 Y un $-\log_{10}$ p-valor de 1.3/-1.3, que corresponde a un p valor de 0.05.

Luego, buscamos validar estos resultados bioinformáticos de manera experimental, midiendo la expresión de los miRNAs seleccionados mediante una RT-qPCR con stem-loop primers específicos para cada miRNA.

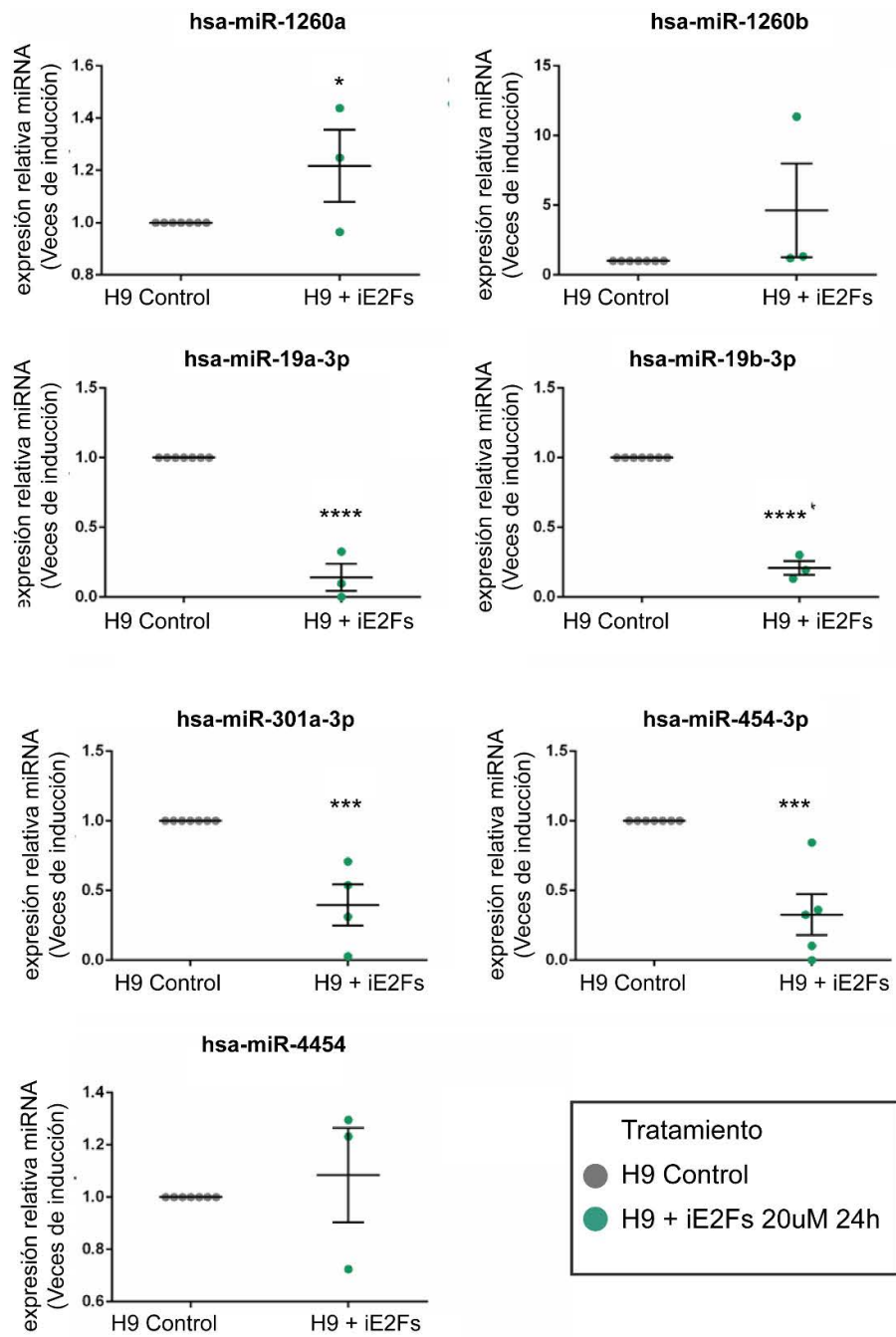
A partir del listado de miRNAs expresados diferencialmente obtenido, y de aquellos con cambios de expresión más significativos, seleccionamos 20 (Tabla 9). Los mismos corresponden a miRNAs ya reportados en cuanto a su relación con la familia de los factores de transcripción E2Fs (como los ya mencionados miR-19a-3p y 19b-5p), o miRNAs cuya relación con dichos factores o con el ciclo celular en CMEhs aún no ha sido reportada. Además, seleccionamos aquellos que no tuvieran niveles de expresión bajos para poder medirlos de manera experimental. Del listado de 20 miRNAs, pudimos cuantificar de manera específica con stem loop primers los siguientes 7: miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-4454, miR-1260a, miR-1260b, miR-454-3p y miR-301a-3p.

hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-589-3p	hsa-miR-186-5p	hsa-miR-1307-5p
hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-1260a	hsa-miR-301a-3p	hsa-miR-1323
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-1260b	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-4454
hsa-miR-21-3p	hsa-miR-1268a	hsa-miR-454-3p	hsa-miR-5701
hsa-miR-96-5p	hsa-miR-1268b	hsa-miR-500a-3p	hsa-miR-7974

Tabla 8. Listado de miRNAs candidatos | La tabla muestra los 20 miRNAs seleccionados como candidatos a partir del análisis de expresión diferencial para validar experimentalmente. Aquellos miRNAs cuyo primers fueron específicos se encuentran resaltados en negro.

Al analizar los niveles de expresión por RT-qPCR de estos miRNAs en las CMEhs H9, confirmamos que el patrón de expresión observado en los resultados del análisis de expresión diferencial en los casos de los miRNAs: miR-301a-3p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-454-3p coincide con nuestros datos de secuenciación, lo que le brinda una mayor robustez a los mismos. En el caso de los miRNAs: miR-4454, miR-1260a y miR-1260b, si bien las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas, parecerían seguir la misma tendencia de expresión. También medimos la expresión de los mismos en las CMPihs FN2.1, donde observamos el mismo comportamiento que en las CMEhs H9 en el caso de los miRNAs: miR-4454, miR-19b-3p, miR-301a-3p y miR-454-3p. Si bien a expresión de los miRNAs 1260a, miR-1260b y miR-19a-3p fue significativamente distintas en las células embrionarias tratadas en relación al control a diferencia de en las CMPihs; estos miRNAs parecerían tener, de todos modos, la misma tendencia de expresión (Figura 79).

a)



b)

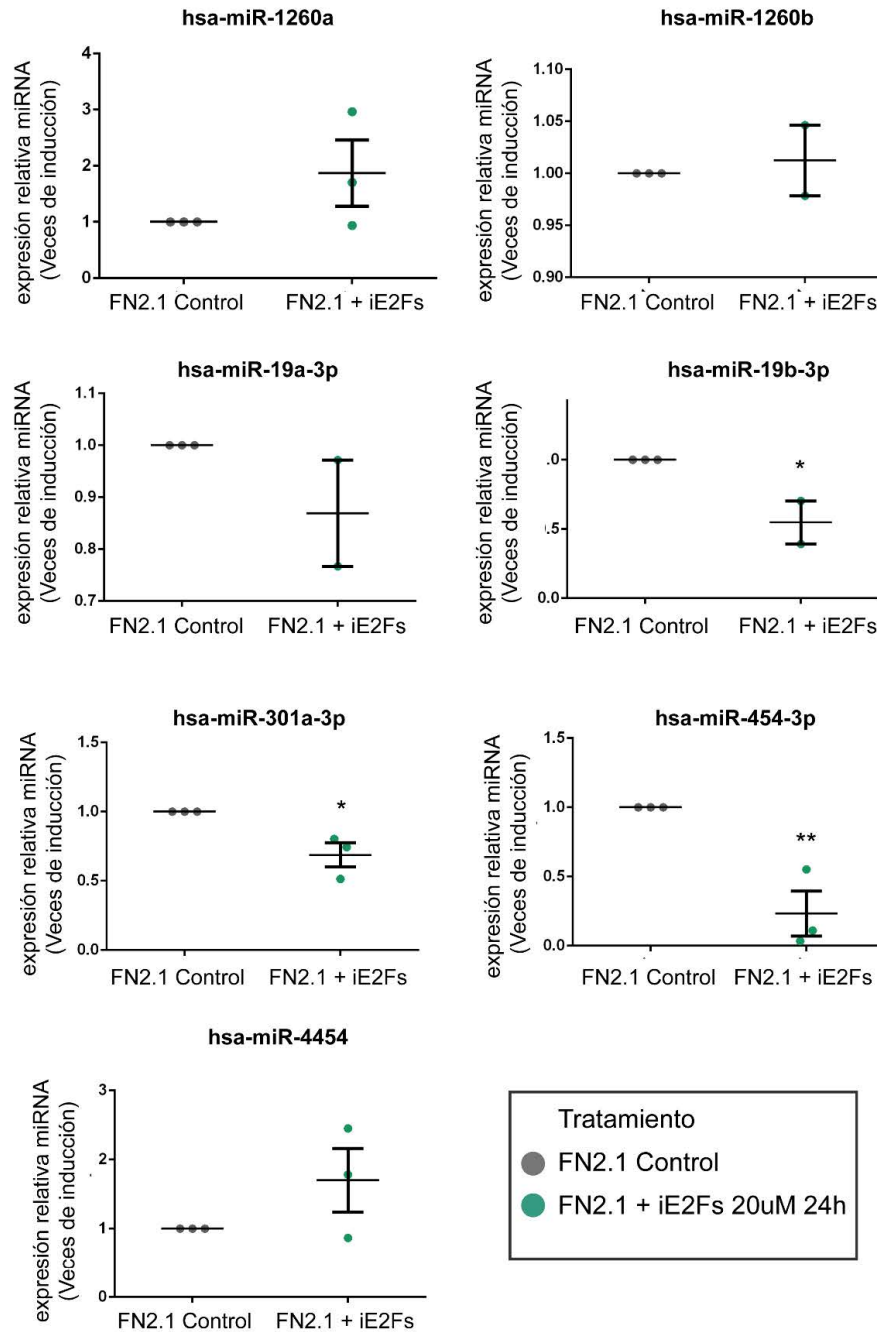


Figura 79. Validación de la expresión de los miRNAs expresados diferencialmente en las CMPihs iE2Fs | Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de los miRNAs: miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-4454, miR-1260a, miR-1260b, miR-454-3p y miR-301a-3p, en (a) CMEhs H9 y (b) CMPihs: control y tratadas con iE2Fs (20 μM, 24 h). La expresión de RNU6B fue utilizada como normalizador en todos los casos. Se muestran el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. H9 o FN2.1 control.

Del listado de miRNAs expresados diferencialmente quisimos analizar *in silico* los genes blanco (*target*) de los miRNAs candidatos expresados diferencialmente entre las CMPhs control y las CMPhs tratadas con el iE2F. Para dicha predicción utilizamos el software miRWalk, el cual utiliza un modelo (modelo random-forest) que calcula la probabilidad de que un sitio blanco candidato sea un sitio blanco real (*p-binding*). Lo que significa que un p-valor alto es mejor.

Es por ello que, para nuestro análisis, seleccionamos los genes blanco de los miRNAs mencionados con probable sitio de unión en la región 3'UTR, con un score de 0.8 o mayor. También, buscamos obtener aquellos genes presentes en las tres bases de datos disponibles (TargetScan, MirDBase y miRTarBase) para aumentar la certeza en la predicción.

Con estos parámetros, entonces, de cada miRNA seleccionamos los primeros 100 (o menos en el caso de no existir tantos) genes blanco con el mayor valor de *p-binding*.

A continuación, y a partir de este listado de genes, analizamos los procesos biológicos asociados a los mismos. De este modo buscamos comprender cuáles podrían ser los posibles procesos biológicos regulados por nuestros miRNAs candidatos.

Para llevar a cabo este estudio realizamos un test de enriquecimiento. Para este análisis, el programa utiliza un modelo matemático para determinar si el número de genes seleccionados es mayor al esperado (enriquecido). Para determinar si alguno de los términos anotados en una lista específica de genes tiene una frecuencia mayor a la esperada por chance, el programa calcula un p-valor. El resultado obtenido puede observarse en un *dot plot*. Este gráfico, además de la proporción de genes indicados en el tamaño del punto, indica el p valor con una escala de colores.

A partir del resultado de este análisis pudimos observar un listado de términos de ontología génica asociados a los genes blanco predichos. Los genes regulados por los miRNAs mencionados estarían relacionados con diversos procesos de desarrollo entre otros, así como también procesos de diferenciación (Figura 80).

Si bien este análisis es exploratorio, consideramos que estos resultados tienen coherencia en el sentido de que el ciclo celular, su regulación y los procesos de diferenciación están intrínsecamente relacionados. Por lo que podría ser que estos miRNAs que podrían estar regulados de manera directa o indirecta por los factores de transcripción E2F, podrían estar participando en este equilibrio mediante la regulación de genes involucrados en las distintas vías de diferenciación y desarrollo.

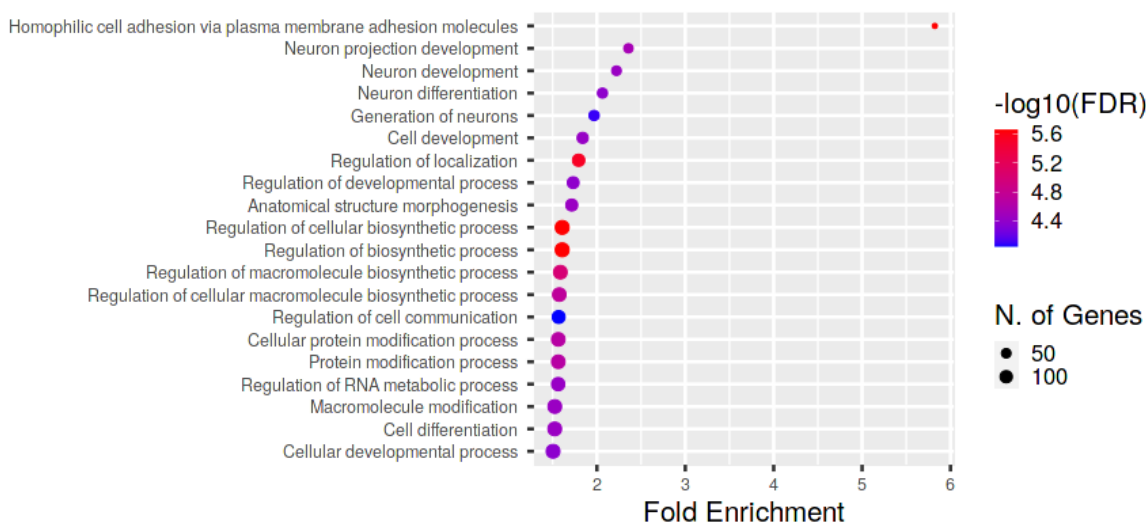


Figura 80. Análisis de Ontología génica | Gráfico de puntos donde se muestran los términos de ontología génica relacionados con el listado de genes blanco predichos para los miRNAs candidatos del análisis de expresión diferencial en las CMEhs H9 control versus iE2Fs, basándose en el nivel de procesos biológicos. El gráfico es en función del número de genes relacionados con cada término y los respectivos p-valores (en escala $-\log_{10}$). El análisis de enriquecimiento de GO se realizó mediante el programa Shinygo, con un FDR de 0.1.

1.2.2 Secuenciación masiva de ARN pequeños en CMPhs, CMN generadas a partir de las mismas y neuronas diferenciadas a partir de estas CMN

1.2.2.1 Validación de las muestras de CMPhs, CMN y neuronas generadas para secuenciar

Si bien diversos miRNAs fueron descriptos como agentes regulatorios importantes en el proceso de diferenciación neuronal a partir de las CMPhs, entre los que se encuentran los ya mencionados miR-124 y miR-9, aún existen muchas preguntas para responder en este campo de investigación. Con el acceso a la tecnología de secuenciación masiva buscaremos, en esta sección, identificar nuevos miRNAs involucrados en la regulación del proceso de neurogénesis.

Para ello, en este caso, las muestras que enviamos a secuenciar fueron las CMEhs H9, CMN generadas a partir de estas CMEhs H9 y neuronas, cuya generación y validación fue descripta al inicio de este capítulo. Buscaremos, en este caso también, trasladar el análisis y los resultados obtenidos a las CMPihs y CMN y neuronas generadas a partir de las mismas.

Con esta estrategia, buscaremos determinar el miRNoma de cada población, compararlos, y seleccionar miRNAs candidatos para estudiar su rol en la diferenciación neuronal a partir de las CMPs (Figura 67, experimento (2)).

Antes de ser enviadas a secuenciar, las muestras de cada población fueron validadas midiendo los niveles de expresión, cuantificados mediante RT-qPCR, de los marcadores de indiferenciación: *OCT-4* y *NANOG*; marcadores propios de CMN: *NESTINA* y *PAX-6*, y de neuronas: *β-TUBULINA III (TUBJ-1)*, *DOBLECORTINA (DCX)* y *Neurofilamento de cadena liviana (NEFL)*. En el mismo, observamos la expresión de los marcadores de indiferenciación en las CMEhs H9, y ausencia de los mismos tanto en las CMN como en las neuronas. Los niveles de expresión de los marcadores de CMN fueron altos en esta población, como era de esperar; y lo mismo ocurrió con las neuronas y aquellos marcadores propios de dicha población. Se observa una expresión significativamente mayor de los marcadores neuronales *DCX* y *NEFL* en las CMN en relación a las CMEhs, si bien la misma es menor que la expresión observada en las neuronas. Existe bibliografía donde reportan que el marcador *DCX* se expresa en progenitores neuronales y en neuronas inmaduras, por lo que este patrón de expresión tendría sentido[142]. En cuanto a *NEFL*, se ha reportado también que las CMN expresan este marcador, así como otros filamentos intermedios, los cuales se expresan durante el desarrollo neural y la diferenciación [143]. Finalmente, no se observó expresión de ninguno de los marcadores de diferenciación en las CMEhs H9, corroborando así su estado indiferenciado (Figura 81).

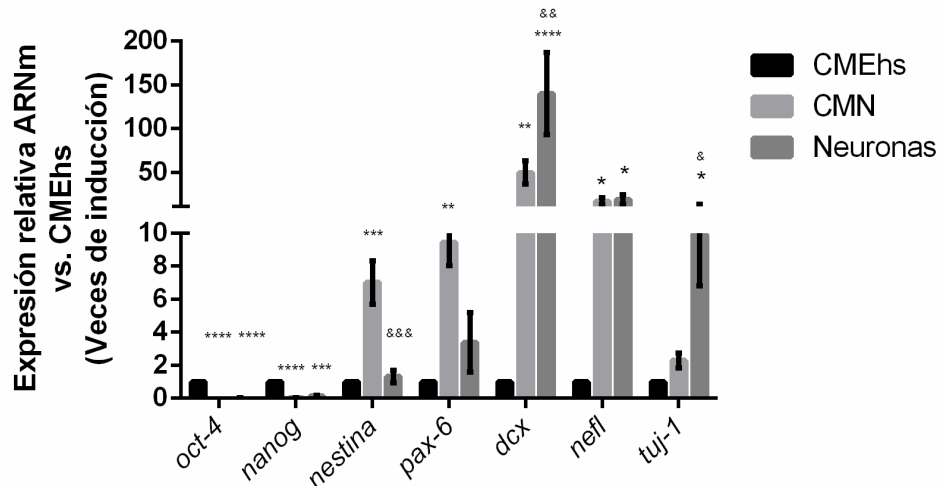


Figura 81. Análisis de la expresión de marcadores de indiferenciación y diferenciación en las CMEhs H9, CMN y Neuronas | Análisis de los niveles de expresión del ARNm de marcadores de indiferenciación (*OCT-4* y *NANOG*); CMN (*NESTINA* y *PAX6*) y Neuronas (*TUJ-1*; *DCX* y *NEFL*) en CMEhs H9, células madre neurales generadas a partir de las mismas (CMN) y neuronas (NEU) diferenciadas a partir de estas CMN. La expresión de *RPL7* fue utilizada como normalizador en todos los casos y los niveles de inducción son relativos a las CMEhs H9. Se muestran el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$, (****) $p < 0.0001$ vs. CMEhs o (&) $p < 0.05$, (&&) $p < 0.01$, (&&&) $p < 0.001$, (&&&&) $p < 0.0001$ vs. CMN.

1.2.2.2 Análisis bioinformático

A partir del listado de miRNAs expresados en cada población junto con su abundancia, analizamos la distribución de la expresión de los mismos en las tres poblaciones celulares. Pudimos determinar que la misma es similar entre las distintas réplicas de cada población y existen diferencias entre las distintas poblaciones celulares. Esto coincide con lo esperábamos, dado que consideramos que cada población celular tendrá un miRNoma característico y que contribuye a su identidad (Figura 82).

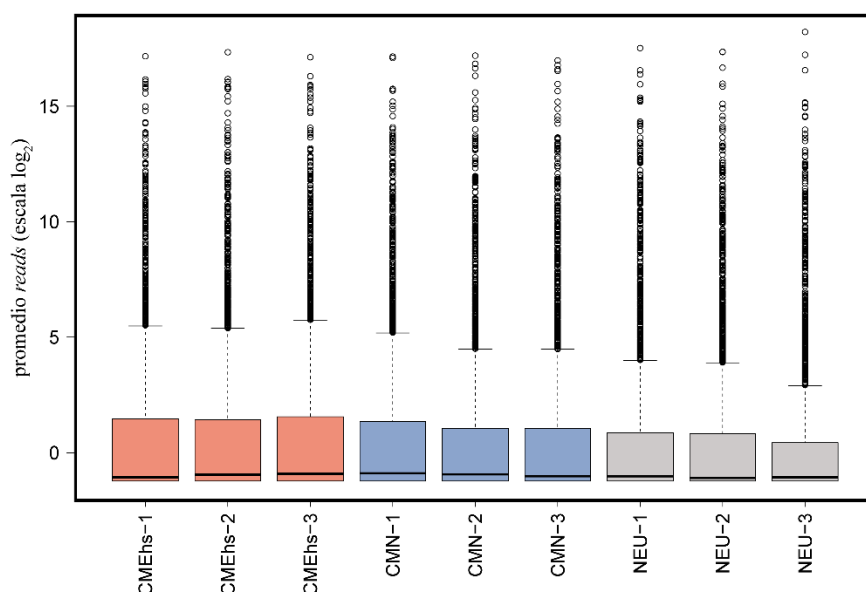


Figura 82. Distribución de la expresión de los miRNAs en las CMEhs H9 (CMEhs), CMN y Neuronas | El gráfico muestra Box-plots que representan la distribución de la expresión de los miRNAs en las tres réplicas (1, 2 y 3) de las poblaciones celulares: CMEhs H9 (CMEhs), CMN y Neuronas.

Luego determinamos qué microARNs se expresan en cada población en particular, y en varias poblaciones a la vez. En el diagrama de Venn puede observarse que 557 miRNAs se expresan tanto en las CMEhs H9, como en las CMN y Neuronas; 50 miRNAs se expresan en las CMEhs H9 y CMN; 131 miRNAs se expresan en las CMN y Neuronas; 9 miRNAs se expresan tanto en Neuronas como en CMEhs H9; y, por último, 138, 134 y 9 miRNAs se expresan sólo en CMEhs H9, CMN y en Neuronas respectivamente (Figura 83).

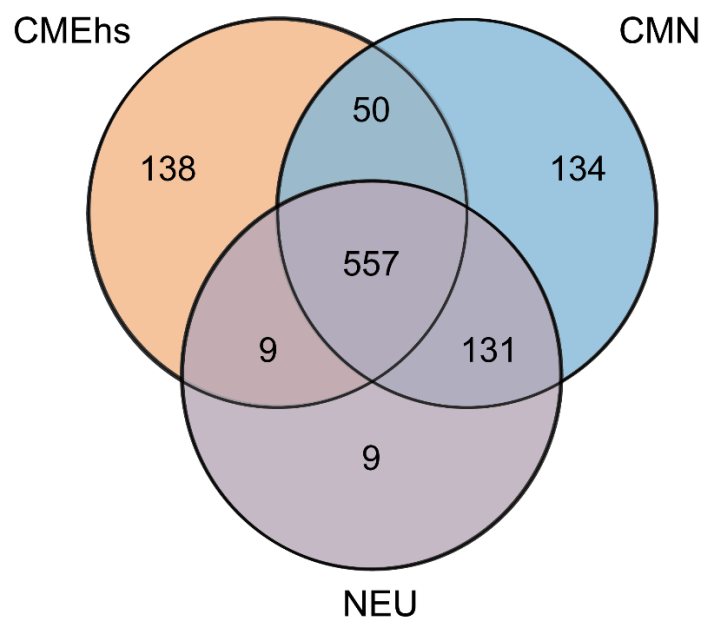


Figura 83. Número de miRNAs expresados en cada población celular | El gráfico se corresponde a un Diagrama de Venn indicando el número de miRNAs que se expresan en cada población celular únicamente, o solapados en dos o tres poblaciones celulares: CMEhs H9 (CMEhs), CMN y Neuronas (NEU).

Luego, con los niveles de expresión de los miRNAs en el experimento de diferenciación, realizamos un mapa de calor (*heatmap*) para observar el perfil de expresión de los miRNAs entre las distintas poblaciones. Identificamos 885 miRNAs expresados en al menos una de las poblaciones, teniendo en cuenta que filtramos aquellos miRNAs con lecturas mayores a diez en cada una de las réplicas y en al menos una de las poblaciones celulares estudiadas. Con los miRNAs resultantes se transformaron los datos para que los mismos entren en una escala de color entre 2 y -2. Luego con el paquete *pheatmap* de R, y los datos escalados, se generó el *heatmap* para poder observar el perfil de expresión de miRNAs característico de cada población (Figura 83).

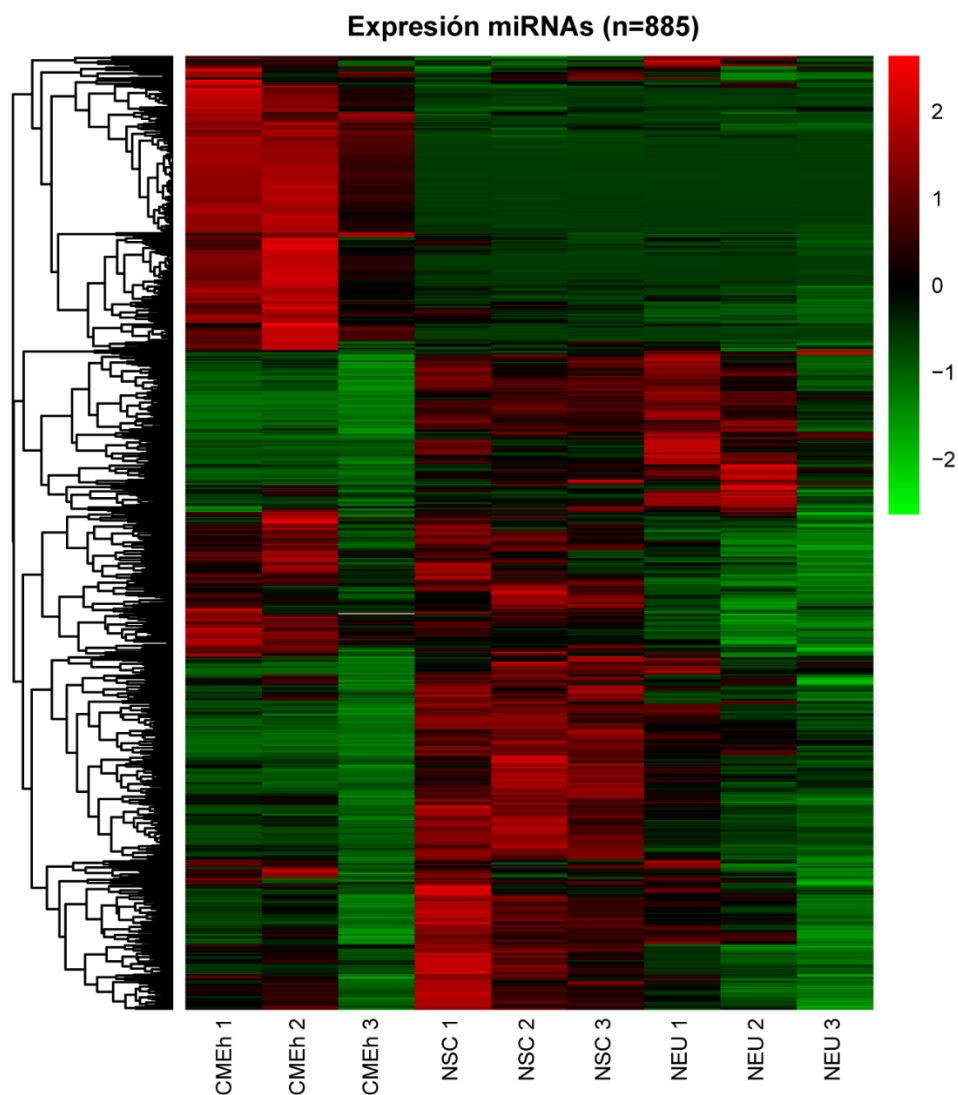


Figura 84. Niveles de expresión de los miRNAs en las CMEhs H9, CMN y Neuronas | En el mapa de calor (*heatmap*) se pueden observar los niveles de expresión de los miRNAs en las tres poblaciones celulares: CMEhs H9 (indicadas como CMEhs 1, 2 y 3), CMN (indicadas como CMN 1, 2 y 3) y Neuronas (indicadas como NEU 1, 2 y 3). En rojo se representan los niveles de expresión alto y en verde los bajos. Cada columna del *heatmap* corresponde a una réplica biológica de cada una de las poblaciones celulares estudiadas.

Luego realizamos un análisis estadístico de expresión diferencial, en este caso, entre las distintas poblaciones celulares. Para este experimento, la fórmula de diseño planteada fue de acuerdo al tipo celular (CMEhs, CMN y Neuronas). De este modo, buscamos determinar qué miRNAs aumentan o disminuyen su expresión al comparar dichas poblaciones celulares de a pares.

Realizamos también en este caso, como fue con el experimento (1), los diversos gráficos diagnóstico para corroborar que el análisis de expresión diferencial con el DESeq2 fuera el adecuado.

En primer lugar, corroboramos que la normalización realizada por el paquete haya sido correcta. Para ello, analizamos mediante un gráfico con Box-plots, que la distribución de la abundancia normalizada de los miRNAs sea similar entre las distintas réplicas biológicas de cada población celular (Figura 85). Se puede ver una distribución más bien homogénea en las abundancias de las *counts* (lecturas) entre las réplicas de cada una de las muestras permitiendo concluir que todas las muestras se comportan de manera similar y que el análisis realizado por el paquete DeSeq2 fue el correcto.

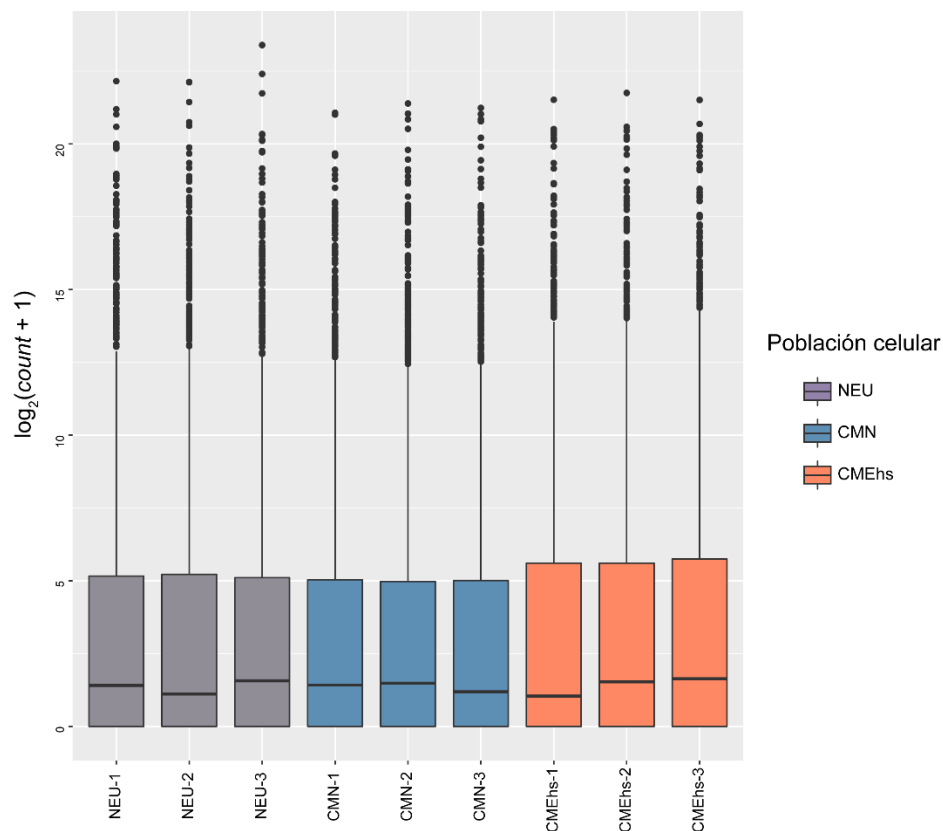


Figura 85. Análisis de la abundancia de la expresión normalizada de miRNAs por el paquete DESeq2 | El gráfico muestra Box plots que representan la abundancia de la expresión normalizada de los miRNAs llevada a cabo por el paquete DESeq2 en las CMEhs H9 (CMEhs), CMN y Neuronas (NEU), con sus respectivas réplicas (1,2 y 3).

Continuamos con el diagnóstico del DESeq2, visualizando la distancia entre las distintas muestras mediante un análisis de componentes principales (Figura 86). A partir del mismo, pudimos determinar que las réplicas de cada población son similares entre sí; y que todas las muestras se agrupan de acuerdo al tipo celular. Además, cabe destacar que las CMN y Neuronas presentan una mayor similitud entre ellas en relación a las CMEhs H9.

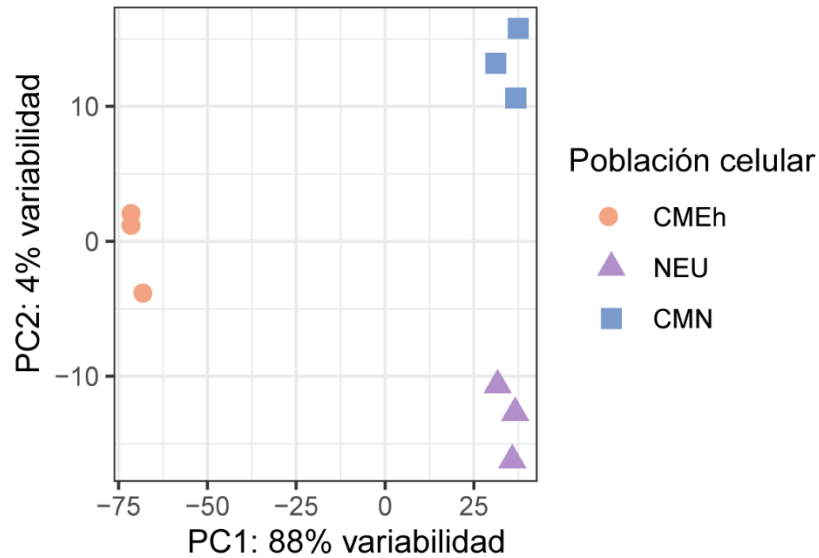
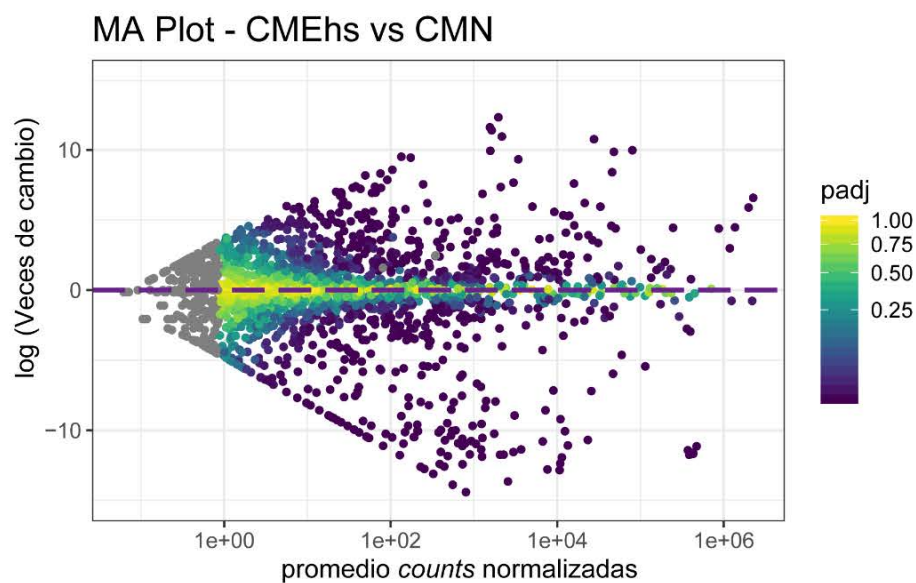


Figura 86. Análisis de componentes principales | En el gráfico de PCA se muestra cómo se agrupan las poblaciones de CMEhs H9, CMN y Neuronas (NEU) y sus respectivas réplicas, según la similitud de los datos obtenidos del DESeq2.

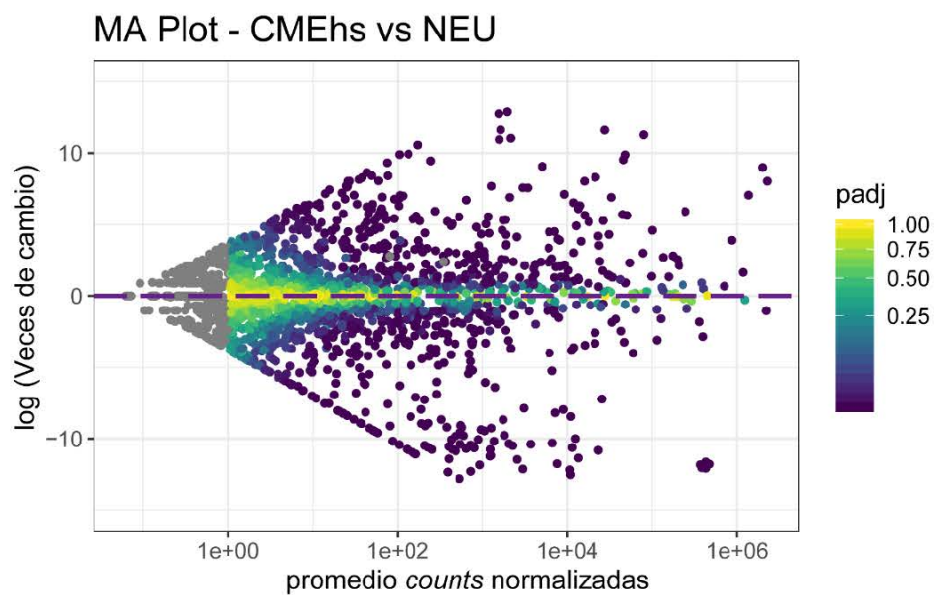
Del contraste entre las distintas poblaciones celulares de a pares (Figura 87 a) CMEhs vs. CMN; b) CMEhs vs. Neuronas y c) CMN vs. Neuronas) realizamos MA-plots.

Como mencionamos anteriormente, en el MA-plot se puede ver, en base al p-ajustado la cantidad de miRNAs de acuerdo a sus veces de cambio en relación a la expresión normalizada de los mismos. Cada miRNA es representado por un punto. En la comparación de los distintos gráficos puede observarse un número mayor de miRNAs con una expresión estadísticamente significativa en las comparaciones de CMEhs vs. CMN y CMEhs vs. NEU en relación a la de CMN vs. NEU.

a)



b)



c)

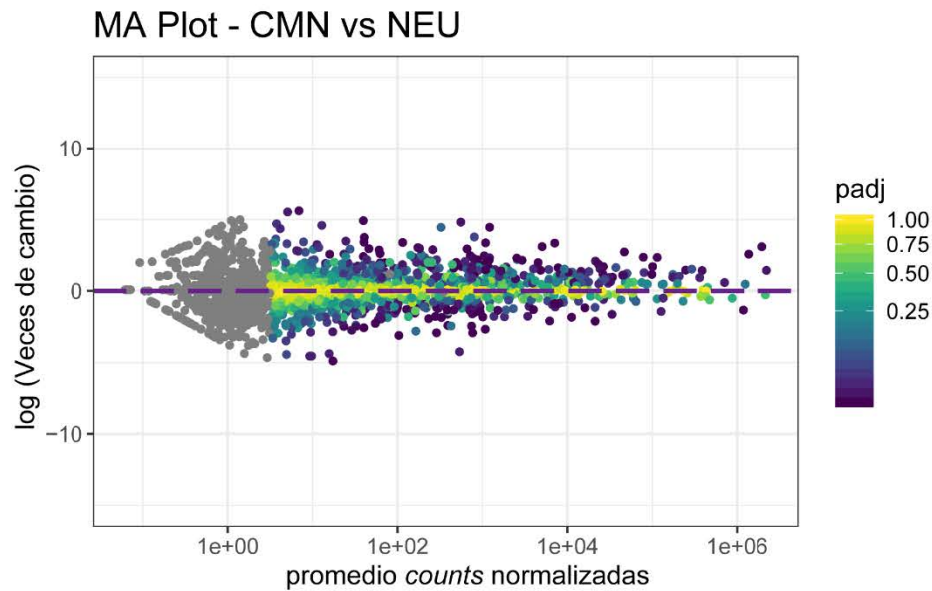


Figura 87. MA-plot de los cambios de expresión en el contraste de las poblaciones CMEh, CMN y Neuronas
 | El MA-plot muestra la comparación, en el eje y, del log2 de las veces de cambio entre las a) CMEhs H9 vs. CMN; b) CMEhs H9 vs. Neuronas (NEU) y c) CMN vs. Neuronas (NEU); y el promedio de los conteos normalizados por el factor tamaño en el eje x. Cada miRNA es representado por un punto. La escala de colores muestra los miRNAs de acuerdo a su valor de p ajustado.

Luego de obtener un diagnóstico adecuado del análisis de expresión diferencial, analizamos los resultados obtenidos a partir del mismo.

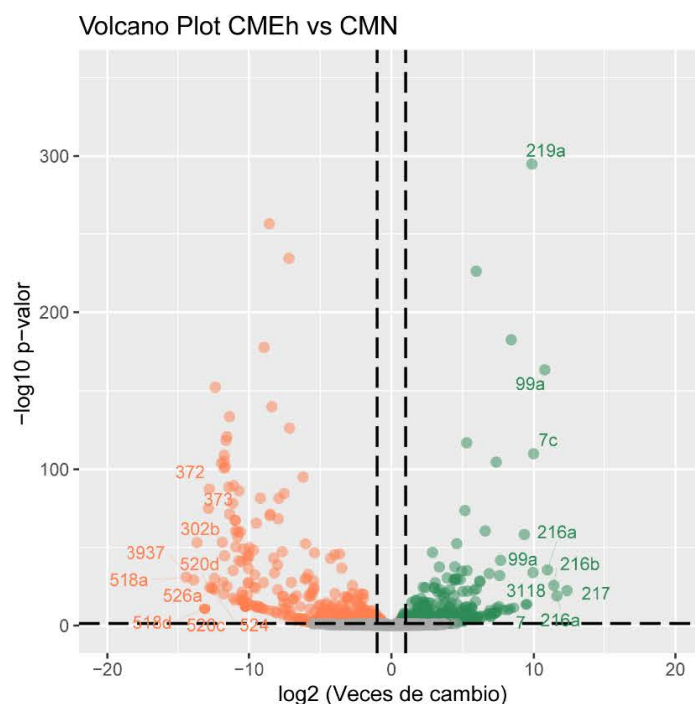
En este caso también analizamos los miRNAs expresados diferencialmente teniendo en cuenta dos FDR distintos: 0.1 o 0.05. En la Tabla 10 se resumen el número de miRNAs expresados diferencialmente entre cada par de poblaciones celulares comparadas según el FDR utilizado.

Análisis	FDR 0.1	FDR 0.05
CMEhs vs. CMN	806	728
CMN vs. NEU	335	270
CMEhs vs. NEU	883	798

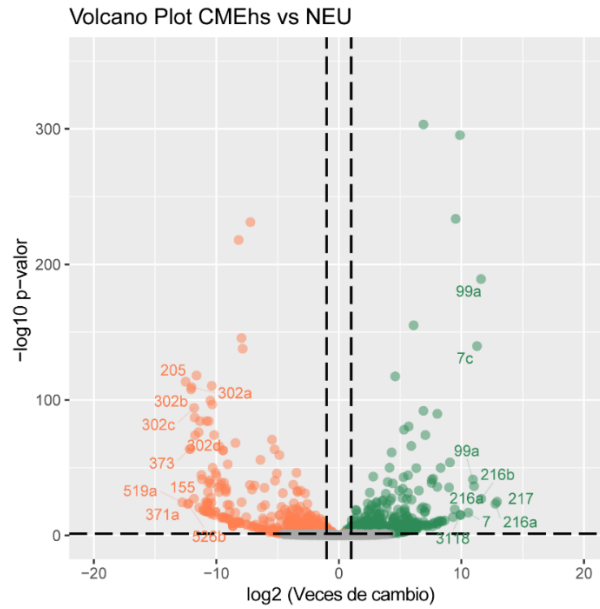
Tabla 9. Número de miRNAs expresados diferencialmente entre las distintas condiciones/poblaciones según el FDR (del inglés, False Discovery Rate) utilizado.

En la Figura 88 representamos, mediante un volcano plot, los miRNAs expresados diferencialmente entre a) las CMEhs H9 y las CMN; b) CMEhs y las Neuronas y c) CMN y Neuronas. En verde pueden observarse los miRNAs que están sobre-expresados en a) CMN, b) y c) Neuronas respectivamente. En dichos gráficos se observa que hay un número mayor de miRNAs expresados diferencialmente entre las CMEhs y las CMN o las Neuronas, en comparación con aquellos entre las CMN y las Neuronas. Estos resultados coinciden con el gráfico de PCA, confirmando que el perfil de expresión entre CMN y Neuronas presenta una similitud mayor, y, a su vez, se diferencian más de las CMEhs.

a)



b)



c)

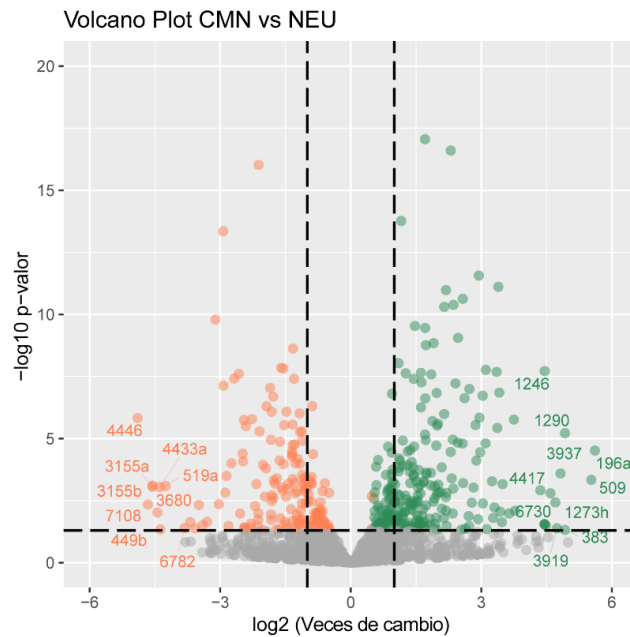


Figura 88. Análisis de la expresión diferencial de los miRNAs en CMEhs H9, CMN y Neuronas | En el volcano-plot se observan los miRNAs expresados diferencialmente en el contraste de las poblaciones (a) CMEhs vs CMN, (b) CMEhs vs Neuronas (NEU) y (c) CMN vs Neuronas (NEU). En rojo se observan los miRNAs que están down-regulados y en verde aquellos up-regulados en (A) CMN en relación a las CMEhs, (B) Neuronas en relación a las CMEhs y (C) Neuronas en relación a las CMN. Se indican los nombres de los 10 miRNAs más up regulados y de los 10 más down regulados en cada contraste. Las líneas negras corresponden a un \log_2 fold change de 1/-1 Y un $-\log_{10}$ p-valor de 1.3/-1.3, que corresponde a un p valor de 0.05.

Dado el gran número de miRNAs expresados diferencialmente entre las distintas poblaciones, y como cada una de ellas presentó un perfil de expresión específico, realizamos un “soft clustering” para poder agrupar toda esta información en “clústeres” con un perfil de expresión determinado. A partir de dicho análisis, determinamos la presencia de 5 clústeres. En los mismos identificamos los siguientes 5 perfiles de expresión: alta expresión en las Neuronas (NEU) (clúster 1), alta expresión en las CMN y Neuronas (NEU) (clúster 2), alta expresión en las CMEhs (clúster 3), alta expresión en CMN (clúster 4) y alta expresión en CMEhs que decrece a lo largo de la diferenciación (intermedia en CMN y baja en neuronas) (clúster 5) (Figura 89).

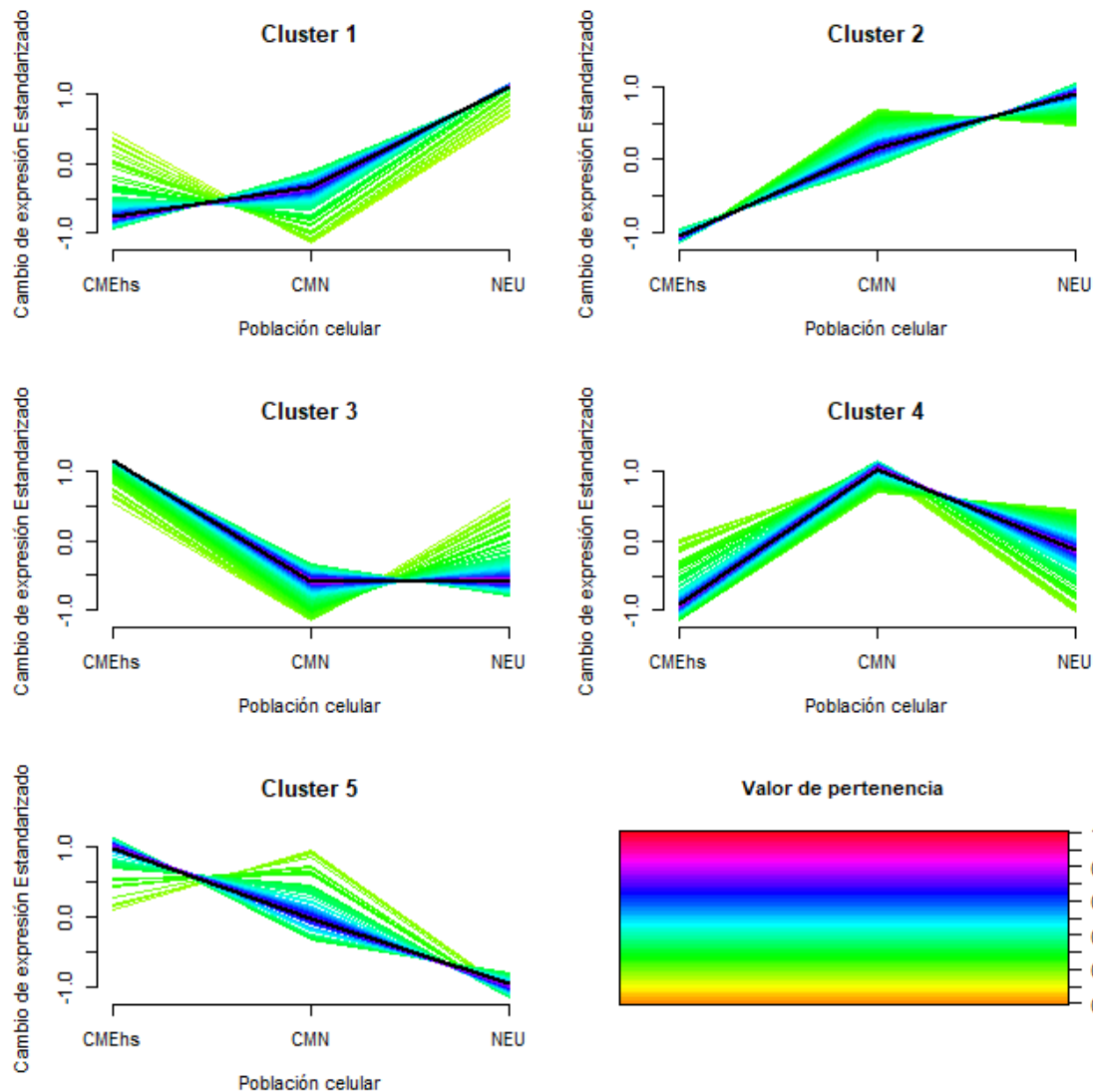


Figura 89. Clústeres de los miRNAs expresados diferencialmente entre los CMEhs H9, CMN y Neuronas| En negro se observa la tendencia de expresión de los miRNAs pertenecientes a cada cluster. La escala de valores asigna un color de acuerdo al valor de pertenencia de cada miRNA a dicho clúster.

Finalmente, identificamos las familias de miRNAs presentes en la lista de miRNAs expresados diferencialmente (recordamos que dos o más miRNAs pertenecen a una misma familia cuando comparten su secuencia semilla). A partir del listado de miRNAs expresados diferencialmente en cada par de comparaciones de las poblaciones celulares, y mediante la identificación de su nombre y secuencia con un paquete de R, obtuvimos a que familia pertenece, información que el programa obtiene desde la base de datos miRBase.

Con esta herramienta, entonces, le pedimos al paquete que nos dijeran las familias presentes en cada lista de miRNAs diferencialmente expresados con un FDR de 0.1. Obtuvimos un listado en cada caso con el nombre del miRNA y el “Family Acession” de la familia asociada a ese miRNA, siempre que contara con una.

Luego quisimos ver que familias se compartían en la lista de los miRNAs diferencialmente expresados entre los contrastes de las distintas poblaciones, lo cual graficamos mediante un diagrama de Venn (Figura 90). En el mismo puede observarse que hay 120 familias asociadas a los miRNAs presentes en los tres contrastes de poblaciones; 122 asociadas a los miRNAs expresados diferencialmente en CMEhs vs CMN y CMEhs vs NEU; 17 asociadas a los miRNAs expresados diferencialmente en CMN vs CMEhs y CMN vs NEU; y 26 familias asociadas a los miRNAs expresados diferencialmente tanto en NEU vs CMEhs y CMN vs NEU.

La Tabla 11 muestra un listado de los nombres de las familias a las que pertenecen los miRNAs diferencialmente expresados en cada contraste de poblaciones celulares.

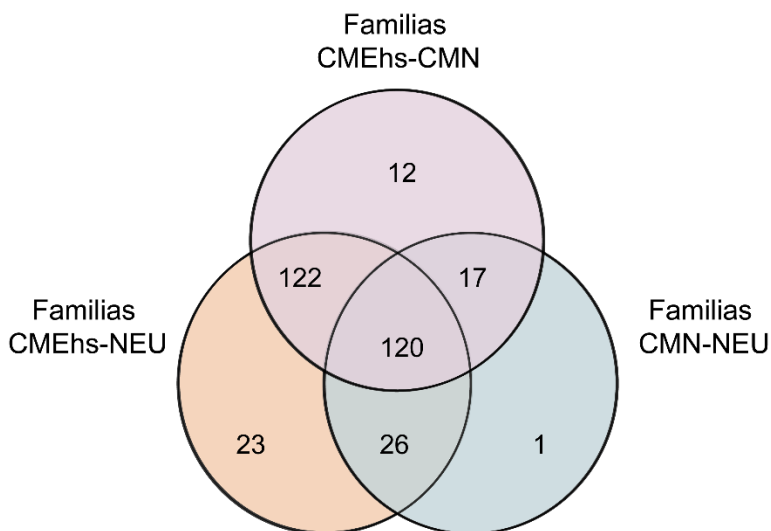


Figura 90. Número de familias a las que pertenecen los miRNAs expresados diferencialmente en cada contraste de poblaciones celulares | En las intersecciones de los Diagramas de Venn pueden observarse el número de familias de miRNAs que se comparten entre los distintos contrastes y cuantas no lo hacen.

	CMEhs vs. CMN CMEhs vs. NEU CMN vs. NEU	CMEhs vs. CMN CMEhs vs. NEU	CMEhs vs. CMN CMN vs. NEU	CMEhs vs. NEU CMN vs. NEU
	let-7 mir-15 mir-154 mir-17 mir-181 mir-25 mir-29 mir-500 mir-506 mir-515 mir-548 mir-19 mir-95 mir-138 mir-10 mir-26	mir-130 mir-132 mir-290 mir-216 mir-221 mir-30 mir-302 mir-329 mir-34 mir-368 mir-378 mir-379 mir-7 mir-8 mir-365 mir-449 mir-216	mir-135	mir-129 mir-148 mir-374 mir-664 mir-654
familia miRNA ("Family accession")				

Tabla 10. Listados con las familias de miRNAs presentes en cada análisis de expresión diferencial entre los contrastes de las distintas poblaciones celulares.

Para validar experimentalmente los datos obtenidos como resultado de la secuenciación masiva seleccionamos algunos microARNs candidatos que, sabemos por bibliografía, se inducen en la diferenciación neural.

Entre ellos, seleccionamos a los siguientes miRNAs: los miR-9-3p, miR-9-5p; miR-124-3p, miR-125a-5p, miR-125b-5p, miR-137 (todos ellos descritos en la introducción de la presente tesis); y los miRNAs miR-96-5p (involucrado en la inducción del factor de transcripción *SOX-5* [144]) y miR-128 (otro miRNA descrito como regulador pro-neurogénico [145]).

A continuación presentamos los gráficos del análisis de niveles de expresión por RT-qPCR de los miRNAs que pudimos cuantificar de manera específica mediante el uso de stem loop primers (miR-124-3p, miR-9-5p, miR-9-3p, miR-128, miR-125b-5p y miR-125a-5) (Figura 91) donde medimos una expresión alta de estos miRNAs en las neuronas, y en algunos casos en las CMN, en relación a su expresión en las CMEhs H9.

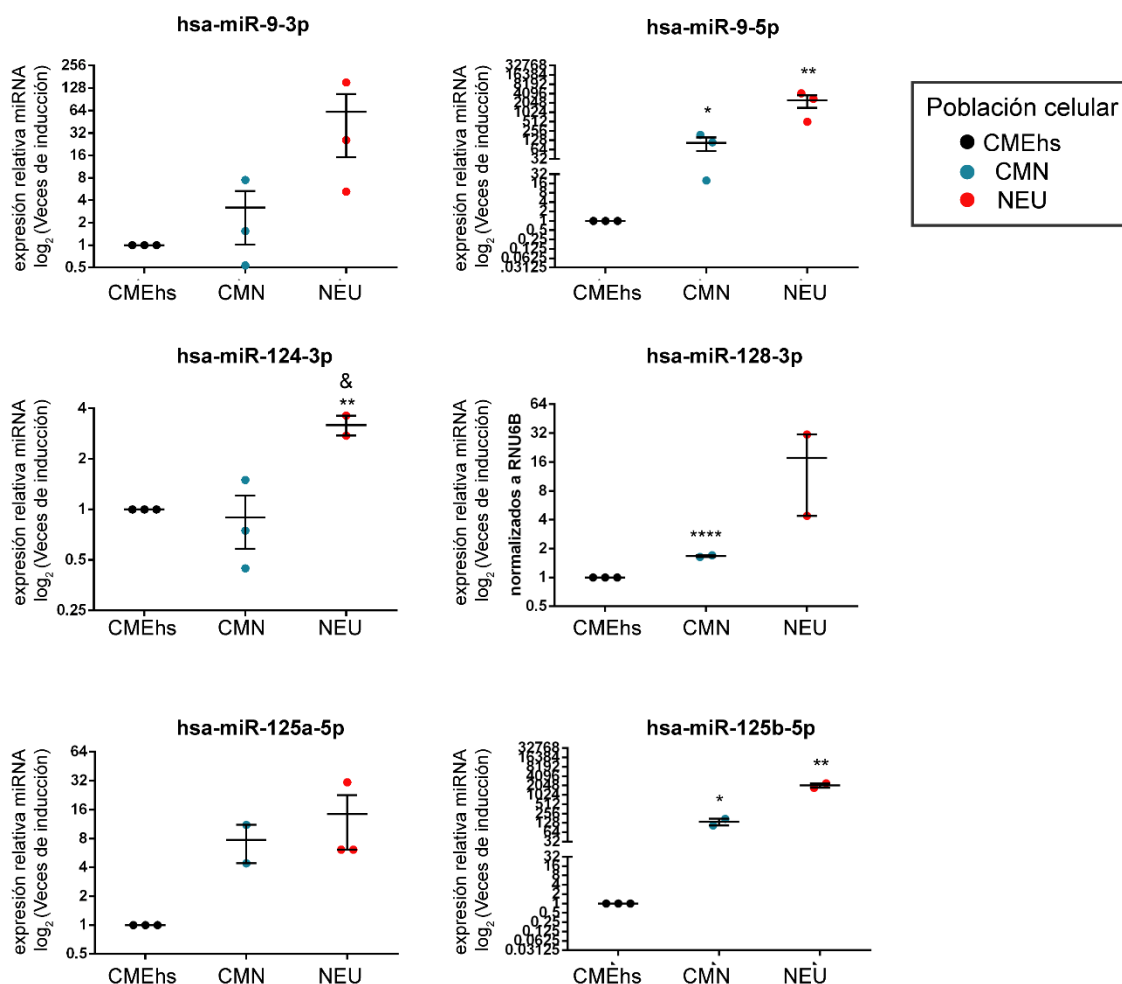


Figura 91. Validación de la expresión de los miRNAs de inducción neural | Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de los miRNAs miR-9-3p, miR-214-3p, miR-125b-5p, miR-9-5p, miR-125a y miR-128-3p-5p, en CMEhs H9, CMN y Neuronas (NEU). La expresión de RNU6B fue utilizada como normalizador en todos los casos. Se muestran el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. H9 o (&) $p < 0.05$, (&&) $p < 0.01$, (&&&) $p < 0.001$ vs. CMN.

Conclusiones Parciales del capítulo

En primer lugar, a partir de las líneas de células pluripotentes humanas: embrionarias (H9) e inducidas (FN2.1) en condiciones de cultivo definidas (descriptas y validadas en el primer capítulo), generamos CMN siguiendo un protocolo en monocapa. Determinamos mediante el análisis de la expresión proteica,

que estas poblaciones celulares expresan los marcadores característicos de CMN. A su vez, a partir de estas células realizamos protocolos de diferenciación hacia los tres linajes neurales (neuronal, astrocitario y oligodendrocítico), validando la identidad de las células obtenidas al medir marcadores típicos de cada linaje. Estos resultados nos permitieron confirmar la capacidad multipotente de las CMN generadas y, en su conjunto, determinar que las células generadas eran efectivamente CMN.

Nuestro mayor interés estaba centrado en la diferenciación neuronal. Por ello, además de medir la expresión de los marcadores típicos neuronales por medio de ensayos de inmunofluorescencia, determinamos el porcentaje de células positivas para TUJ-1 (siendo de prácticamente un 100% para las neuronas generadas a partir de las CMN de ambas CMPhs). Es importante destacar que las neuronas obtenidas a partir de ambas líneas de células pluripotentes, presentaban el patrón de expresión característico de genes marcadores del linaje neuronal. Además, y en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Marin Burgin, medimos la actividad eléctrica de las neuronas obtenidas, determinando que las mismas presentan una electrofisiología que corresponde a un perfil de neurona inmadura.

Luego, y para la segunda mitad de este capítulo, diseñamos dos experimentos de secuenciación masiva. En el primero de ellos, buscamos analizar los miRNAs regulados por los factores de transcripción E2Fs en las CMPhs, e involucrados en su proliferación, por lo que comparamos el miRNoma de las CMEhs H9 con éstas células tratadas con un inhibidor general de los factores de transcripción E2Fs (iE2Fs) mediante un análisis de secuenciación masiva de pequeños ARNs. Pudimos determinar que las células tratadas con este inhibidor presentaron un porcentaje de células en la fase G1 mayor al de las células control.

En base a los resultados del análisis de la secuenciación masiva, determinamos el perfil de expresión de los miRNAs en ambas poblaciones, observando que los cambios de expresión entre las mismas no eran muy marcados.

A su vez, a partir del análisis de expresión diferencial entre ambas poblaciones identificamos aquellos miRNAs que presentaron cambios significativos en sus niveles de expresión debido al tratamiento con el inhibidor. El número de miRNAs diferencialmente expresados fue de 52 o 33 con un FDR de 0.1 o 0.05 respectivamente. Por ende, el iE2Fs estaría alterando la expresión de un número bajo de miRNAs.

Luego, seleccionamos 7 candidatos entre el listado de miRNAs expresados diferencialmente, y los estudiamos de manera experimental. Validamos los niveles de expresión de los miRNAs: miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-4454, miR-1260a, miR-1260b, miR-454-3p y miR-301a-3p; confirmando los resultados obtenidos con la secuenciación masiva.

Determinamos, *in silico*, un listado de genes blanco predichos para nuestros miRNAs candidatos y, con el mismo, buscamos determinar los términos de ontología génica en el que estos genes estarían involucrados. El mismo sugiere que los miRNAs que seleccionamos estarían involucrados en la regulación de genes relacionados, sobre todo, con procesos de diferenciación y desarrollo.

En el segundo experimento analizamos el miRNoma de tres poblaciones celulares: CMEhs H9, CMN generadas a partir de las mismas y neuronas diferenciadas a partir de estas CMN.

En primer lugar determinamos el perfil de expresión de los miRNAs expresados en cada uno de ellas, observando que cada una de ellas presentaba un perfil de expresión característico y siendo más similares los perfiles presentados por las CMN y las neuronas.

Realizamos en este caso, también, una análisis de expresión diferencial comparando las poblaciones de a pares para poder determinar en cada una de ellas aquellos microARNs que presentaron cambios significativos en sus niveles de expresión en la diferenciación. El número de miRNAs diferencialmente expresados fue de 806, 335 y 883 en las comparaciones de CMEhs vs. CMN, CMN vs. Neuronas y CMEhs vs. Neuronas respectivamente y con un FDR de 0.1. Con un FDR de 0.05 el número de miRNAs expresado diferencialmente entre las CMEhs vs. CMN, CMN vs. Neuronas y CMEhs vs. Neuronas fueron de 728, 270 y 798 respectivamente. Podemos concluir que hay un gran número de miRNAs expresados diferencialmente a lo largo de la neurogénesis a partir de CMEhs lo cual es coherente con la amplia red de regulación que conlleva este proceso. Además, determinamos que el número de miRNAs expresados diferencialmente entre CMN y Neuronas fue menor en relación a las otras poblaciones lo que podría deberse a que las CMN y Neuronas son poblaciones celulares con un patrón génico más similar.

Pudimos, además, determinar a partir del listado de miRNAs expresados diferencialmente la presencia de 5 clústeres que reflejan 5 perfiles de expresión distintos a lo largo de las tres poblaciones celulares; y el listado de familias a las que pertenecen aquellos miRNAs expresados diferencialmente en cada comparación de poblaciones.

Por último, seleccionamos miRNAs que, por bibliografía, sabíamos que su expresión se induce en la neurogénesis, y los estudiamos de manera experimental. Validamos los niveles de expresión de los miRNAs: miR-124-3p, miR-9-5p, miR-9-3p, miR-128, miR-125b-5p y miR-125a-5 en las poblaciones celulares mencionadas; confirmando así los resultados obtenidos con la secuenciación masiva.

Capítulo 3.

Como hemos ido mencionando a lo largo de la presente tesis, es sabido que los miRNAs cumplen un importante rol en la regulación de la auto-renovación y diferenciación de las CMPhs.

A partir de los datos que obtuvimos en nuestra secuenciación de pequeños ARNs, y del análisis de expresión diferencial de los miRNAs a lo largo de la diferenciación neuronal, quisimos encontrar miRNAs candidatos de estudio cuyo rol no haya sido descrito en la neurogénesis. Fue así como, dentro de la lista que obtuvimos, en particular de las familias presentes en el análisis de expresión diferencial (Tabla 4), identificamos a la familia del miR-216. Esta familia de miRNAs está compuesta por 4 miembros (miR-216a-3p/5p y miR-216b-3p/5p) y, en conjunto con los miR-217-3p/5p, forma un clúster. Determinamos que este clúster presenta altos niveles de expresión en las CMN y Neuronas de nuestro modelo experimental, mientras que la misma no es detectable en las CMEhs H9.

El clúster del miR-216/217 se encuentra localizado en el cromosoma 2p16.1 en humanos y en el 11qA3.3 en ratón. Además, este clúster se ha descrito como un clúster específico de cordados [146]. En humanos, los genes de estos miRNAs están localizados a lo largo de una región de ~ 18 kpb y dentro del ARN no codificante MIR217HG (del inglés, *MIR217 host gene*), también conocido como MIR216AHG o MIR216BHG. En la Figura 92 se muestra un esquema del locus del clúster miR-216/217 en el genoma humano.

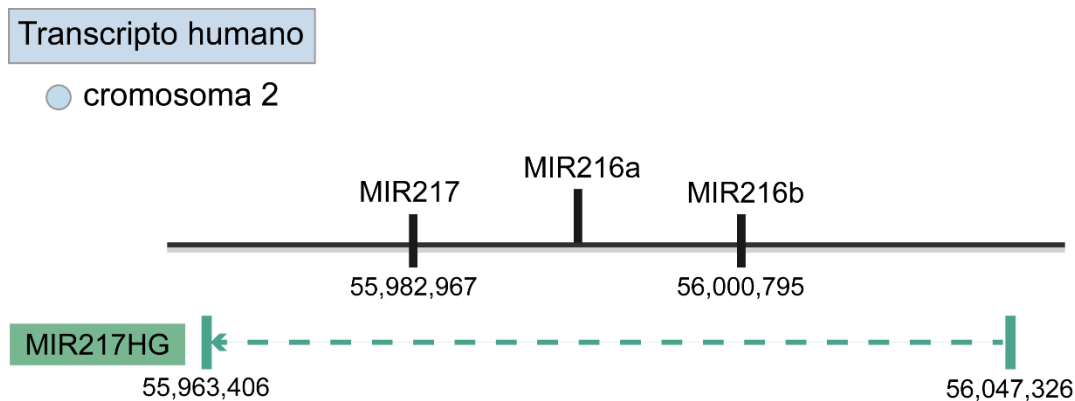


Figura 92. Locus del clúster miR-216/217 en humanos | El esquema muestra la región cromosómica donde se ubican los genes de los miRNAs del el clúster miR-216/217, y el ARN largo no codificante MIR217HG dentro el cual están codificados. Figura adaptada de [147].

En estudios previos se ha demostrado que este clúster (o alguno/s de los miRNAs que lo componen) se encuentra/n desregulado/s en distintos cánceres, como el cáncer colorrectal, pancreático, renal, de mama, de próstata, de hígado y glioblastoma [147-155]. Además, existen estudios que relacionan este clúster con desórdenes renales y pancreatitis crónica [156].

Sin embargo, no existe aún información acerca de su rol en la neurogénesis. Dado que un gran número de miRNAs que están involucrados en los procesos de auto-renovación y diferenciación son co-expresados como clústeres, funcionando como reguladores maestros de estas funciones, buscamos estudiar y modular la expresión del clúster miR-216/217 en CMPhs y en su diferenciación neuronal (objetivo 6).

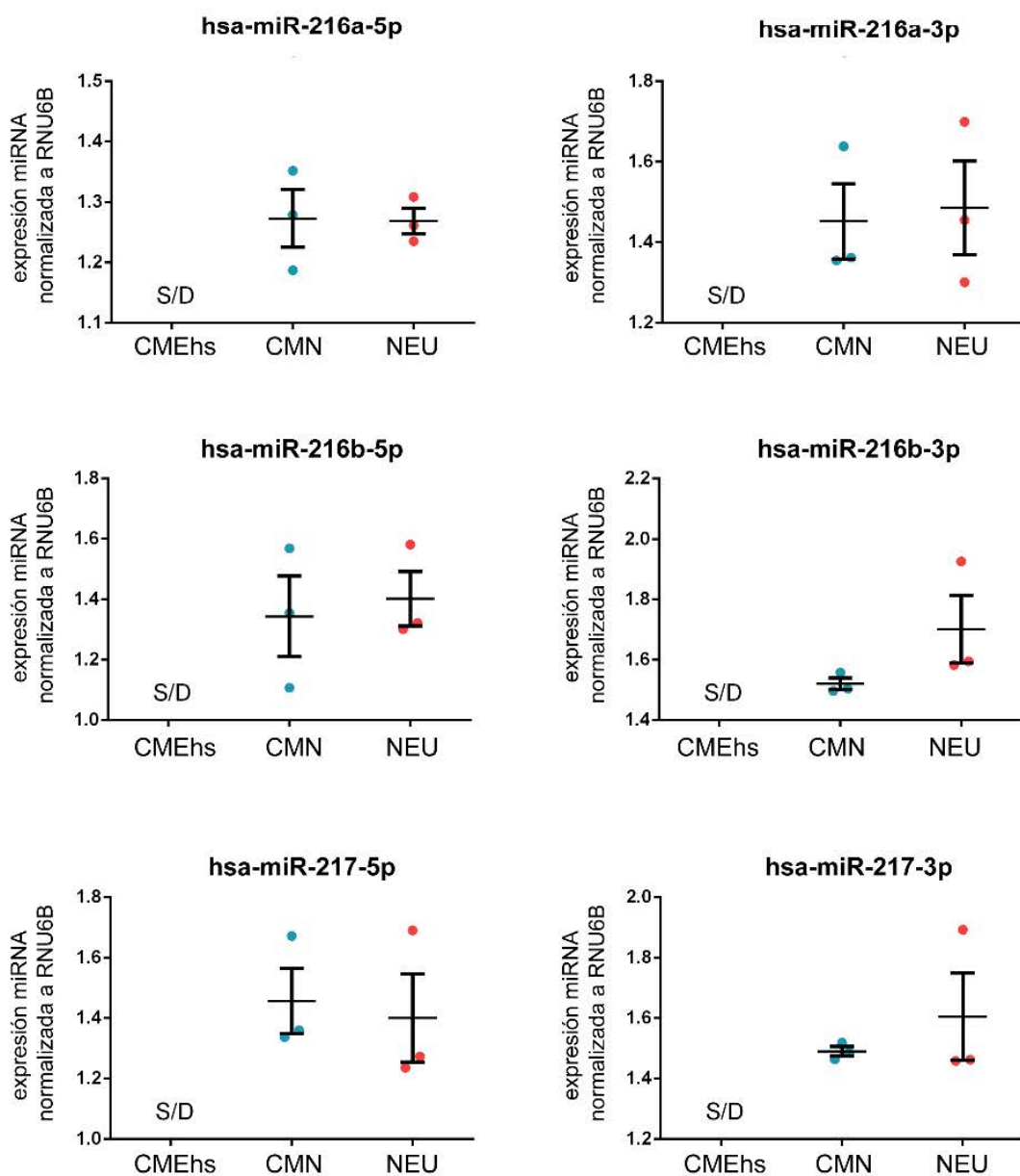
1.1 Validación experimental de la expresión del clúster miR-216/217 en la diferenciación neuronal

En primer lugar, y una vez establecido los miRNAs candidatos de estudio, buscamos validar los resultados bioinformáticos obtenidos en el análisis de la secuenciación masiva de manera experimental en las CMEhs H9. Además quisimos determinar si el perfil de expresión de este clúster miR-216/217 era el mismo en las CMPihs FN2.1. A continuación, entonces, medimos la expresión de los miRNAs pertenecientes al clúster por medio de una RT-qPCR con stem loop primers específicos para cada uno de ellos.

Al analizar los niveles de expresión de este clúster de miRNAs en las CMEhs H9, CMN y neuronas (NEU), confirmamos que el patrón de expresión observado coincide con nuestros datos de secuenciación. Pudimos determinar, también, que el perfil de expresión del clúster miR-216/217 en las CMPihs FN2.1 tiene el mismo comportamiento que el observado y determinado en las CMEhs H9: niveles de expresión no detectables en las CMPhs, y altos niveles de expresión de las CMN y NEU. A continuación presentamos los gráficos del análisis de expresión por RT-qPCR de los mismos tanto en las CMEhs H9 como en las CMPihs FN2.1 (Figura 93).

a)

H9



b)

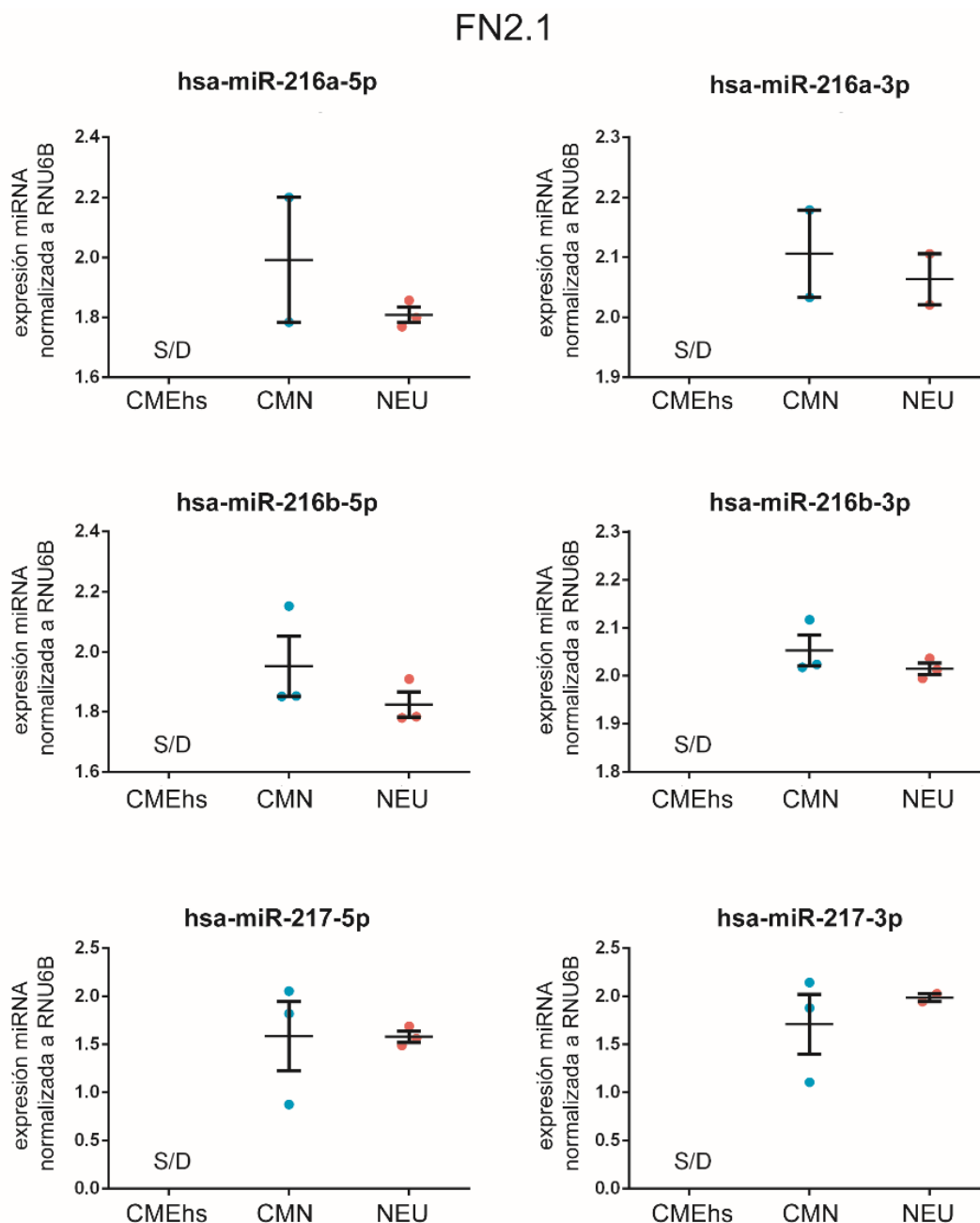


Figura 93. Validación experimental de la expresión del clúster miR-216/217 | Análisis de los niveles de expresión de los miRNAs del clúster miR-216/217: miR-216a-3p/5p; miR-216b-3p/5p y miR-217-3p/5p, en CMPhs a)CMEhs H9 y b) CMPihs FN2.1; y células madre neurales (CMN) y neuronas (NEU) generadas a partir de cada una de ellas. Los gráficos muestran promedio + Error estándar de la expresión de cada miRNA normalizada a la expresión de RNU6B.N=3.

1.2 Análisis *in silico* del clúster miR-216/217

1.2.1 Expresión del clúster miR-216/217 en otras especies, células pluripotentes y diferenciaciones a otros linajes

Quisimos investigar si la falta de expresión del clúster miR-216/217 en las CMPhs (H9 y FN2.1) y la inducción de expresión de este clúster en CMN generadas a partir de las mismas y neuronas diferenciadas a partir de estas últimas es propio de nuestro modelo, o se traslada a otros tipos de células madre (o de distinta especies) y a diferenciaciones hacia otros linajes.

Para ello, buscamos datos publicados de otras secuenciaciones de pequeños ARN de otros grupos de investigación, para observar la expresión de este clúster en particular.

Los datos de expresión de los miRNAs del clúster miR-216/217 provenientes de otros estudios los representamos en distintas tablas donde la expresión está representada por No, Baja, Muy baja, Alta y Muy alta. Así comparamos los datos provenientes de resultados de distintos grupos, colocando la referencia de donde fueron extraídos los mismos.

Al analizar la expresión de estos miRNAs en otras CMPhs, nos encontramos con que éstos tampoco se expresan en otras líneas de células madre pluripotentes humanas (Tabla 12). Es importante destacar que los resultados obtenidos en CMEhs H9 por diversos grupos de investigación coincidieron con los nuestros (expresión del clúster miR-216/217 no detectable en estas células). Este mismo comportamiento lo observamos en CMP de otras especies, en particular analizamos datos de dos líneas celulares de ratón y una de macacos (Tabla 13).

Observamos también, que en distintas líneas celulares diferenciadas a un tipo neural, estos miRNAs presentan, en general, niveles altos y muy altos de expresión (Tabla 14), mientras que en células de diferenciaciones a otros linajes (mesodermo y endodermo), estos miRNAs no se expresan o los niveles de expresión son muy bajos, con excepción de células pancreáticas donde se determinó una expresión alta (Tabla 15). Esto último no nos llamó la atención dado que el páncreas es uno de los órganos donde está reportado que estos miRNAs se expresan y existen varias publicaciones sobre el estudio del rol de los mismos en cánceres pancreáticos [147, 151-153].

Estos resultados nos refuerzan la idea de que el clúster miR-216/217 podría tener un rol en la neurogénesis, y que el mismo podría estar conservado en mamíferos.

Tipo celular CMPs	miR-216a		miR-216b		miR-217		Cita/ Acceso GEO
	-3p	-5p	-3p	-5p	-3p	-5p	
CMEh ELF (naive)	S/D	S/D	No	No	No	No	Sperber et al. 2015
CMEh H9	No	No	No	No	S/D	No	Serie GSE56152/ Hu et al 2012/ Serie GSE110719/ Serie GSE110719/ Serie GSE42446/ Garate et al. 2018
CMEh H1	S/D	No	S/D	No	S/D	No	Serie GSE42446
CMEh BG01	S/D	Muy baja	S/D	Muy baja	S/D	Muy baja	Hu et al. 2012
CMEh HUES6	S/D	No	S/D	No	S/D	No	Serie GSE110719
CMEh ES04	S/D	No	S/D	No	S/D	No	Serie GSE42446
CMEh SA02	S/D	No	S/D	No	S/D	No	Serie GSE42446
CMPih a partir de fibroblastos	No	S/D	No	S/D	S/D	No	Serie GSE42446/ Serie GSE110719

Tabla 11. Expresión del clúster miR-216/217 en diferentes CMPs | En cada columna se muestran los niveles de expresión de cada microARN (No, Muy baja, Baja, Alta, Muy alta). En la última columna se muestran la cita o acceso de GEO de donde se obtuvieron los valores de expresión.

Tipo celular y especie CMP	miR-216a		miR-216b		miR-217		Cita/ Acceso GEO
	-3p	-5p	-3p	-5p	-3p	-5p	
CME de Ratón E14	No	No	No	No	No	No	Series GSE77692/ Series GSE80415
CME de Ratón PGK	No	No	No	No	No	No	Series GSE77692
CME de Macaco Rhesus	S/D	Muy baja	S/D	Muy baja	S/D	S/D	Sun et al. 2011

Tabla 12. Expresión del clúster miR-216/217 en CMPs pertenecientes a distintas especies | En cada columna se muestran los niveles de expresión de cada microARN (No, Muy baja, Baja, Alta, Muy alta). En la última columna se muestran la cita o acceso de GEO de donde se obtuvieron los valores de expresión.

Tipo celular linaje neural	miR-216a		miR-216b		miR-217		Cita/ Acceso GEO
	-3p	-5p	-3p	-5p	-3p	-5p	
Células de la corteza prefrontal humana (semana gestacional 20)	S/D	Alta	S/D	Alta	S/D	Alta	Nowakowski et al. 2018
Neuronas diferenciadas de CMPih generadas a partir de fibroblastos	Muy Alta	Muy Alta	Alta	Muy Alta	S/D	Muy Alta	Zhao et al. 2015
Diferenciación a motoneurona día 35 desde CMEhs	S/D	Alta	S/D	Alta	S/D	Alta	Serie GSE56152
Diferenciación a cerebro anterior día 35 desde CMEhs	S/D	Alta	S/D	Alta	S/D	Alta	Serie GSE56152
Neuronas del mecenéfaló diferenciadas de CMPihs	Alta	S/D	Alta	S/D	S/D	Alta	Serie GSE110719
Células pigmentadas de la retina diferenciadas de CMPhs	S/D	Alta	S/D	Baja	S/D	Alta	Hu et al. 2012

Tabla 13. Expresión del clúster miR-216/217 en tipos celulares del linaje neural En cada columna se muestran los niveles de expresión de cada miRNA (No, Muy baja, Baja, Alta, Muy alta). En la última columna se muestran la cita o acceso de GEO de donde se obtuvieron los valores de expresión.

Tipo celular Diferenciación a otros linajes	miR-216a		miR-216b		miR-217		Cita/ Acceso GEO
	-3p	-5p	-3p	-5p	-3p	-5p	
Progenitor mesodérmico	No	No	No	No	S/D	No	Garate et al. 2018
Cardiomiocitos	Muy baja	Muy baja	Muy baja	Muy baja	S/D	Muy baja	Garate et al. 2018
Células madre mesenquimales derivadas de medulas ósea	S/D	Baja	S/D	Baja	S/D	Baja	Sepúlveda et al. 2014
Diferenciación a endodermo definitivo a partir de CMEhs	S/D	Muy baja	S/D	Muy baja	S/D	Muy baja	Serie GSE66078/ Wilson et al. 2015
Células tipo β diferenciadas de CMEhs	S/D	Alta	S/D	Alta	S/D	Alta	Zhou et al. 2020

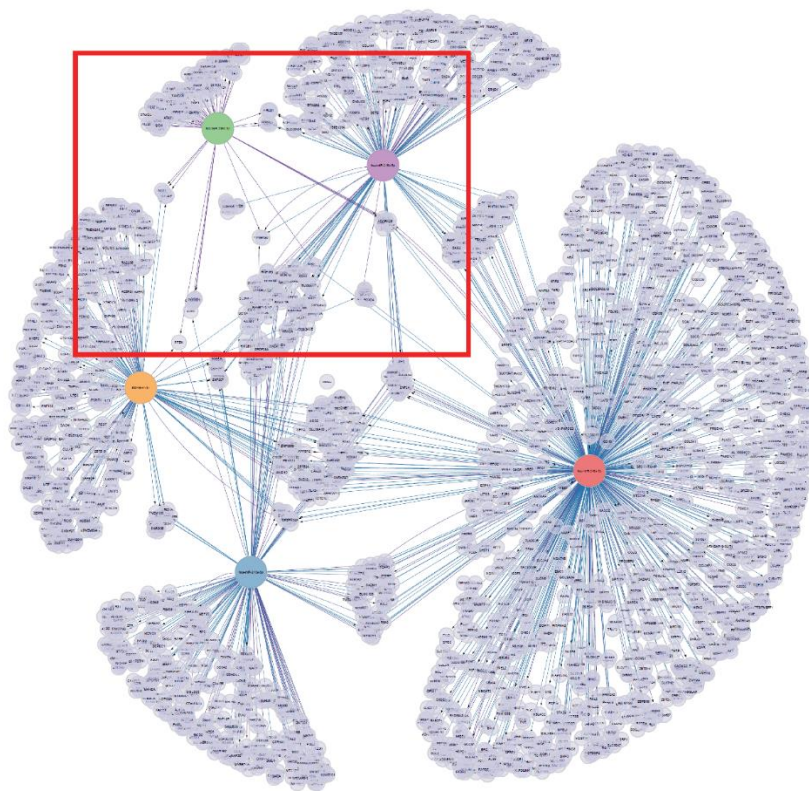
Tabla 14. Expresión del clúster miR-216/217 en tipos celulares de diferenciaciones a otros linajes distintos al linaje neural En cada columna se muestran los niveles de expresión de cada microARN (No, Muy baja, Baja, Alta, Muy alta). En la última columna se muestran la cita o acceso de GEO de donde se obtuvieron los valores de expresión.

1.2.2 Análisis *in silico* de los genes *target* del clúster miR-216/217

A continuación, quisimos analizar los genes blanco (*target*) del clúster miR-216/217. Hoy en día, para ello, existen numerosas bases de datos para investigarlos basándose, cada una, en distintos parámetros (validación de la interacción miRNA-ARNm, probabilidad de unión del miRNA al ARNm, presencia de secuencias complementarias a la secuencia semilla en alguna de las regiones del ARNm, entre otras).

En primer lugar, trabajamos con un *software* llamado *cytoscape* [157]. El mismo nos permitió visualizar las interacciones entre los miRNAs del clúster y sus genes blanco predichos. Para ello, descargamos lo que el programa denomina *linksets* que consisten en la información de estas interacciones provenientes de distintas bases de datos, en este caso miRBase, miRTarBase, TargetScan y transmiR.

Como resultado, se puede visualizar la compleja red de interacción entre los miRNAs del clúster miR-216/217 y sus genes blanco. En la Figura 94 los círculos de mayor tamaño y distinto color corresponden a los miRNAs y, los círculos más pequeños corresponden a los genes blanco. La interacción entre ellos está caracterizada por las líneas que unen ambos tipos de círculos. Puede verse, además, que muchos de los miRNAs comparten varios genes blanco lo cual está representado por la densidad de líneas que llegan a cada círculo pequeño. Si bien este análisis se basa en predicciones, refuerza la idea de que los miRNAs miembros del clúster podrían estar regulando de manera conjunta algunos de sus genes blanco.



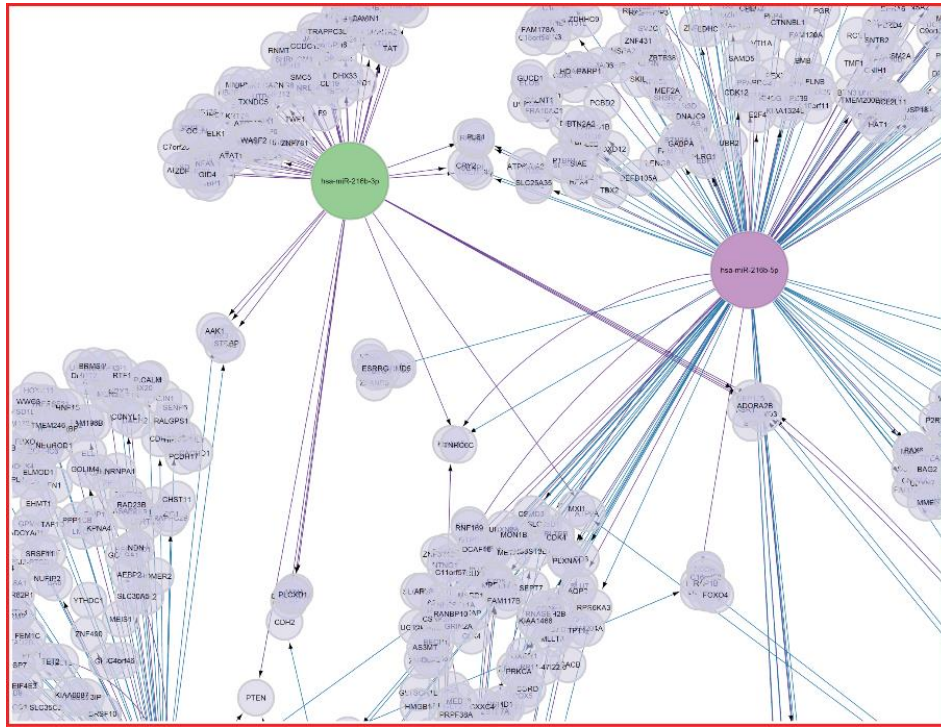


Figura 94. Red de interacción entre cada miRNA del clúster miR-216/217 y sus genes blanco | Cada círculo grande y de color representa un miRNA y, los círculos pequeños grises sus genes blanco. Las interacciones entre ellos están representadas por las líneas que los unen. En el recuadro en rojo se muestra un aumento de esta compleja red.

A continuación, para obtener un listado de las interacciones miRNA-ARNm para poder analizarlas posteriormente, utilizamos nuevamente el software miRWalk. Decidimos utilizar este programa dado que el mismo contiene información sobre interacciones predichas y validadas experimentalmente. Para las predicciones integra múltiples algoritmos lo que lo hace más fácil el obtener una lista de interacciones presentes en varias bases de datos a la vez. Además, y como explicamos en el capítulo 2, esta herramienta calcula la probabilidad de que un sitio blanco candidato sea un sitio real expresándola como un valor de *p-binding*.

Para nuestro análisis *in silico* de los genes blanco del clúster miR-216/217, seleccionamos aquellos con probable sitio de unión en la región 3' UTR, con un *p-binding* ≥ 0.8 . También, buscamos obtener aquellos genes presentes en las tres bases de datos disponibles (TargetScan, MirDBase y miRTarBase) para aumentar la certeza en la predicción.

Con estos parámetros, entonces, de cada miRNA seleccionamos los primeros 50 genes blanco predichos. A partir del listado obtenido analizamos los procesos biológicos asociados a los mismos para poder comprender cuáles podrían estar siendo regulados por este clúster.

Como resultado de este análisis obtuvimos la Figura 95, donde pueden observarse el listado de los 10 términos de ontología génica con menor *p*-valor y con el número de genes blanco predichos asociados a cada término. Los genes blanco predichos, regulados por los miRNAs del clúster miR-216/217, estarían relacionados con diversos procesos entre los que se destacaron la regulación del ciclo celular, incluyendo la regulación de distintas CDKs, como así también distintos procesos asociados con la fosforilación de proteínas.

Si bien este análisis es exploratorio, estos resultados sugieren que este clúster de miRNAs podría estar participando en la regulación de genes que estén involucrados en la proliferación de las CMN y neuronas inmaduras.

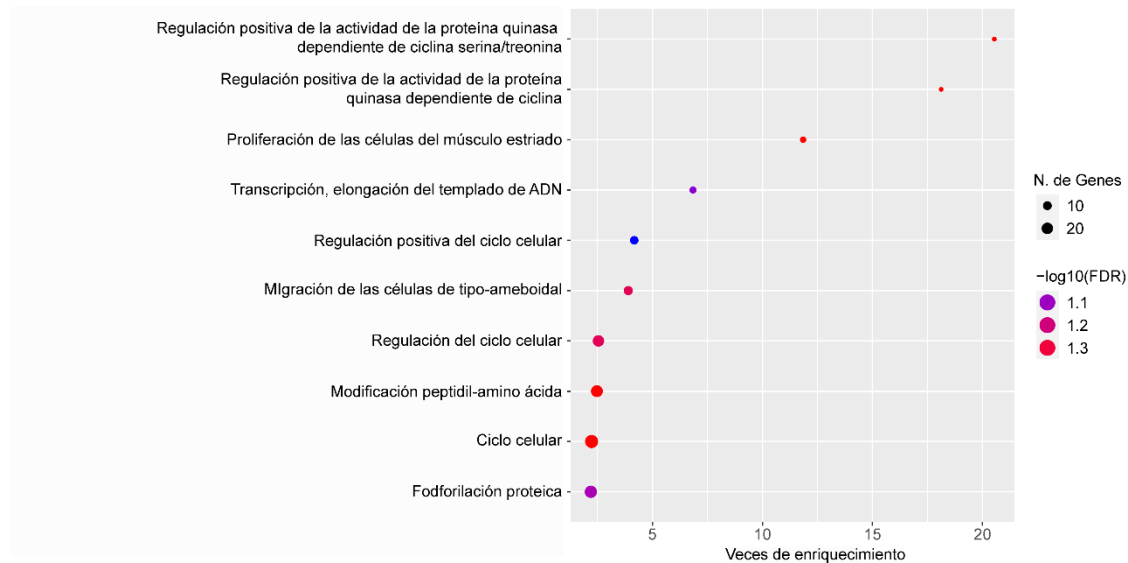


Figura 95. Análisis de Ontología génica de los genes blanco del clúster miR-216/217 | Gráfico de puntos donde se muestran los términos de ontología génica relacionados con el listado de genes blanco predichos del clúster del miR-216/217 en función del número de genes relacionados con cada término y los respectivos p-valores (en escala $-\log_{10}$). El análisis de enriquecimiento de GO se realizó mediante el programa Shinygo, con un FDR de 0.1.

1.2.3 Análisis *in silico* de genes expresados diferencialmente en diferenciaciones neuronales a partir de CMPs

Luego del análisis bioinformático de los genes blanco predichos para este clúster, quisimos comparar el listado de genes obtenidos con genes expresados en datos de secuenciaciones de células diferenciadas a algún tipo celular del linaje neural a partir de CMPs. A modo de exploración, quisimos determinar que genes se expresaban de manera diferencial entre estas células y las células pluripotentes progenitoras, y

filtrar aquellos con este comportamiento y, que a su vez, se encontraran dentro del listado de los genes blanco predichos para nuestro clúster de estudio.

Con este objetivo, a partir del listado de genes blanco obtenido en la base de datos miRWalk 3.0, obtuvimos un listado de genes blanco de cada miRNA. A partir de los mismos armamos dos listados distintos seleccionando distinta cantidad de genes blanco por miRNA para ser más o menos estrictos. Así fue que nos quedamos con un listado con 60 genes blanco en total (10 genes blanco por cada miRNA perteneciente al clúster) y 300 genes blanco en total (50 genes blanco por cada miRNA perteneciente al clúster).

En el repositorio de GEO (Pubmed), buscamos datos publicados de ARN-seq de experimentos con diferenciaciones neuronales, en lo posible, a partir de células madre pluripotentes humanas. A partir de esta búsqueda, obtuvimos datos de 7 ARN-seq distintos que presentamos en la siguiente tabla (Tabla 16).

Secuenciación	Tipo de CMPhs	Progenitor neuronal o tipo de neurona	Acceso GEO
Secuenciación 1	CMPihs y CMEhs	Progenitores del cerebro anterior	GSE131697
Secuenciación 2	CMEhs H9	Progenitores neuronales	GSE132965
Secuenciación 3	CMPihs	Progenitor neural	GSE129310
Secuenciación 4	CMEhs H9	Neuronas corticales	GSE141028
Secuenciación 5	CMPihs	Neuronas inducidas (iN)	GSE144151
Secuenciación 6	CMPihs	Neuronas inducidas (iN)	GSE144152
Secuenciación 7	S/D	Neuronas corticales	GSE157080

Tabla 15. Datos de las secuenciaciones de ARN utilizadas | En cada columna se muestra el nombre asignado a cada secuenciación, el tipo de CMPhs utilizado en el experimento y el progenitor neural o neurona diferenciado a partir de las mismas. En la última columna se muestran el acceso de GEO de donde se obtuvieron los datos.

Luego, del listado de genes expresados en las secuenciaciones y de los 60 o 300 genes blanco candidatos obtenidos del miRWalk, realizamos una intersección para determinar qué genes blanco predichos por el miRWalk están presentes en los datos de las 7 secuenciaciones. Obtuvimos un listado de 56 genes blanco candidatos presentes en todas las listas (Figura 96).

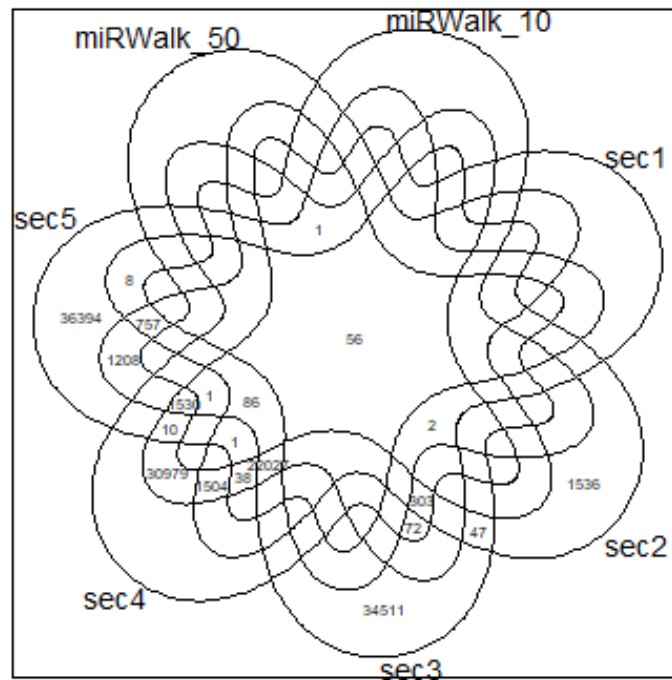


Figura 96. Intersección de los listados de genes obtenidos de las siete secuenciaciones y los 60/300 genes blanco del clúster miR-216/217 obtenidos a través de la base de datos miRWalk| En el centro de cada gráfico se muestra el número de genes presentes en todas las secuenciaciones y en la lista de los 60 (miRWalk_10) o 300 genes blanco del clúster (miRWalk_50).

Con este listado de los 56 genes blanco candidatos y sus niveles de expresión en cada secuenciación, realizamos un análisis de expresión diferencial, a partir de cada grupo de datos, para ver su comportamiento entre las poblaciones celulares en cada experimento. Debido a la gran cantidad de información, seleccionamos para este análisis a las secuenciaciones número 1, 5 y 6 dado que las mismas presentaban un diseño experimental que nos permitió ver una comparación entre CMPhs versus neuronas o un cambio de la expresión de los genes a lo largo de la diferenciación neuronal.

A continuación realizamos el análisis de expresión diferencial a partir de los datos de cada secuenciación, buscando tener del mismo aquellos genes blanco candidatos con una expresión diferencial significativa entre ambas poblaciones. Este enfoque nos permitirá, luego, trasladar los resultados obtenidos a nuestro modelo, para explorar si los mismos presentan el mismo comportamiento entre las CMEhs H9 y las CMN y Neuronas.

Análisis de expresión diferencial:

En el caso de la secuenciación 1, los datos de ARN-*seq* publicados fueron de los días 13, 14, 15 y 16 de una diferenciación de CMEhs a progenitores de cerebro anterior (PN). Realizamos entonces, sólo con los niveles de expresión del listado de genes blanco candidatos mencionado anteriormente, un análisis de expresión diferencial entre los distintos días de la diferenciación. Utilizamos dos FDR (del inglés, *False Discovery Rate*) distintos, para tener dos puntos de corte distintos. En la Tabla 17 (a) pueden verse aquellos genes de la lista expresados diferencialmente en cada par de comparación. En las comparaciones entre los días 13 vs. 14 y 13 vs. 15, ninguno de los genes candidatos se expresó diferencialmente. De los 56 genes target, 5 genes se expresaron de manera diferencial a lo largo de los días de la diferenciación a progenitores de cerebro anterior. Si bien esta diferencia fue significativa ($p < 0.05$), las diferencias de expresión (veces de cambio) observadas fueron pequeñas.

En el análisis de la secuenciación 5, se comparó la expresión del listado de los 56 genes en CMPihs y neuronas diferenciadas a partir de las mismas. Al realizar la expresión diferencial utilizando el valor del p-ajustado, no encontramos genes que se expresen diferencialmente. Debido a esto, probamos utilizar el p-valor como punto de corte. Determinamos que con un p-valor < 0.05 , 5 genes se expresaron de manera diferencial entre ambas poblaciones celulares (Tabla 17 b).

Para el análisis de la secuenciación 6, se comparó la expresión de genes nuevamente entre CMPihs y neuronas diferenciadas de las mismas. Realizamos el análisis de expresión diferencial con dos FDR distintos, también para tener dos puntos de corte distintos. En este caso, la mayoría de los genes blanco candidatos se expresaron de manera diferencial (Tabla 17 c).

a)

Expresión diferencial	FDR 0.1	FDR 0.05
Día 13 vs. Día 16	<i>ANLN, WEE1, CREB5, GRIA3</i>	<i>ANLN, CREB5, GRIA3</i>
Día 14 vs. Día 15	<i>WEE1</i>	<i>WEE1</i>
Día 14 vs. Día 16	<i>WEE1, CREB5, GRIA3, TFRC</i>	<i>WEE1, TFRC</i>
Día 15 vs. Día 16	<i>TFRC, CREB5</i>	<i>TFRC, CREB5</i>

b)

Expresión diferencial	p-valor < 0.05
CMPihs vs Neuronas	<i>COL4A4, LHFPL2, RREB1, WEE1, KAT7</i>

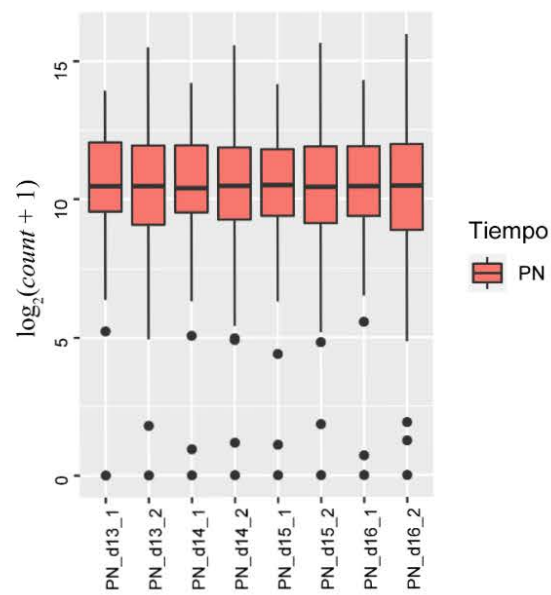
c)

Expresión diferencial	FDR 0.1	FDR 0.05
CMPihs vs Neuronas	50	49

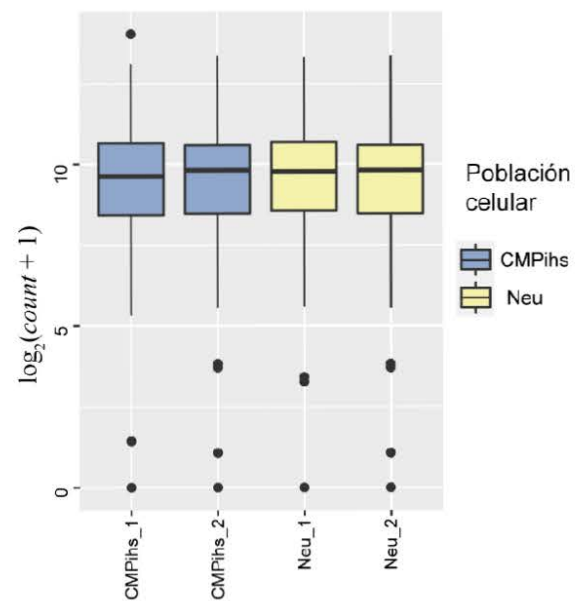
Tabla 16. Genes blanco candidatos expresados diferencialmente – secuenciación 1 | La tabla muestra los genes blanco candidatos expresados diferencialmente entre a) los distintos días de la diferenciación a progenitores de cerebro anterior a partir de CMEhs, con un FDR de 0.1 y 0.05; b) las CMPihs y las Neuronas inducidas con un p-valor <0.05 y c) las CMPihs y las Neuronas inducidas, con un FDR de 0.1 y 0.05.

Para corroborar que en el análisis del DESeq2 los datos hayan sido normalizados de manera correcta, realizamos un blox plot para ver la distribución de los mismos en cada uno de los análisis de expresión diferencial mencionados. En la Figura 97, puede observarse que la normalización realizada por el DESeq2 fue la adecuada en todos los casos.

a)



b)



c)

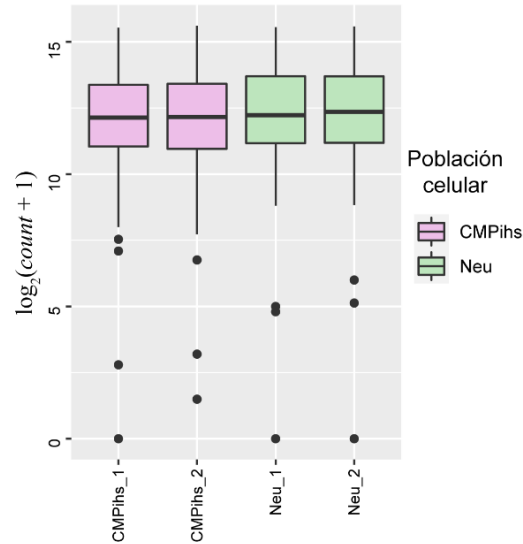
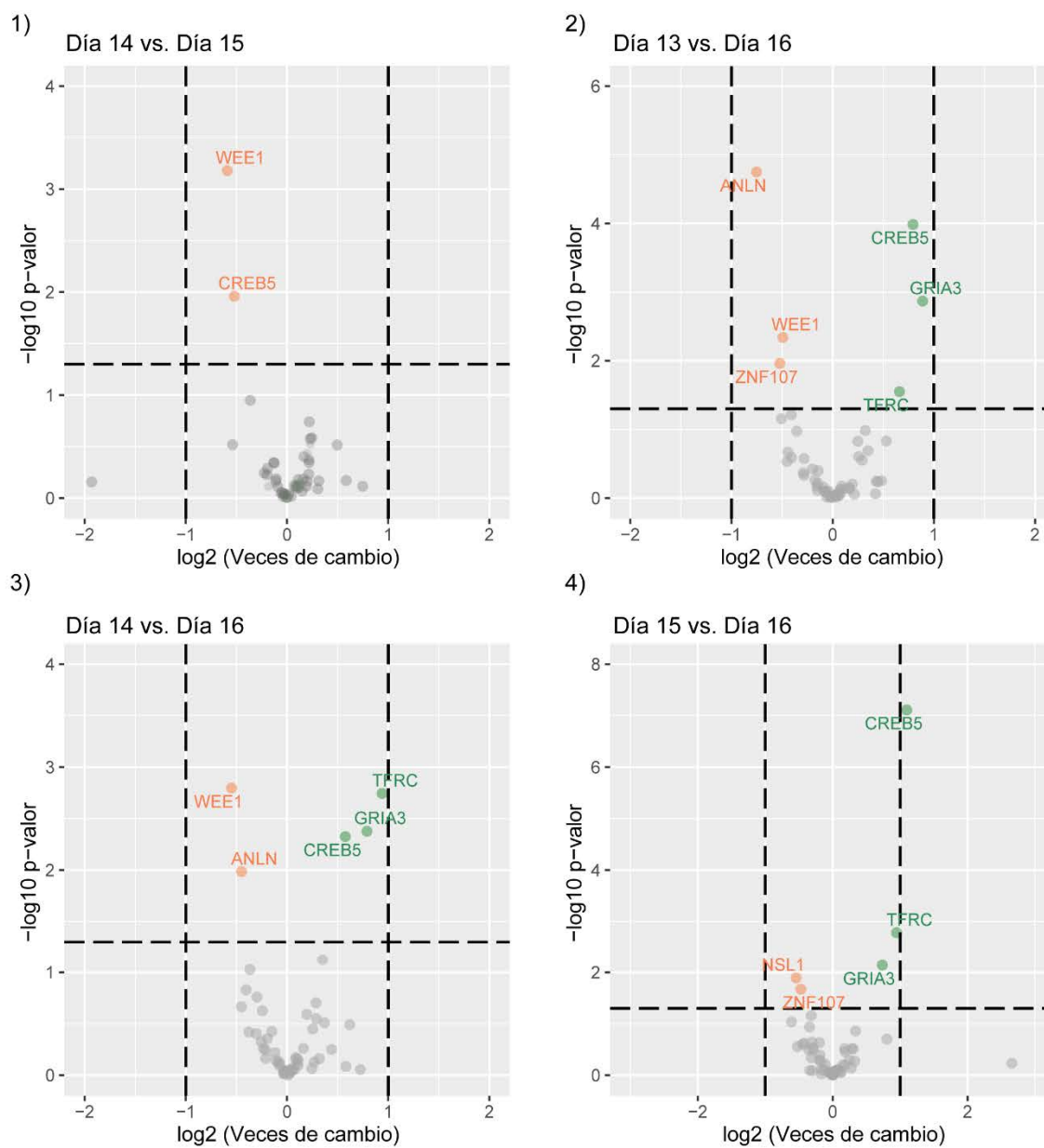


Figura 97. Análisis de la abundancia de la expresión normalizada de ARNm por el paquete DESeq2 | El gráfico muestra Box plots que representan la abundancia de la expresión normalizada de los ARNm llevada a cabo por el paquete DESeq2 en a) los distintos días de la diferenciación a progenitores de cerebro anterior (Secuenciación 1); b) en las CMPihs y las neuronas (Secuenciación 5); y c) en las CMPihs y las neuronas diferenciadas a partir de las mismas (Secuenciación 6).

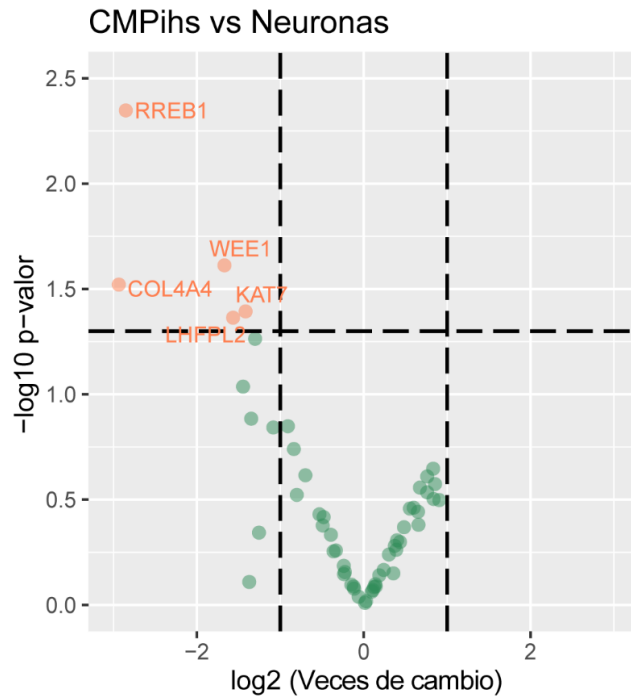
Luego, para graficar estos resultados, realizamos gráficos de *volcano-plot* en cada par de comparación y de cada análisis de expresión diferencial, de modo de visualizar los genes expresados diferencialmente, y cómo se comporta esta expresión.

La Figura 98 a) muestra los *volcano-plot* realizados para a la comparación de la expresión de los genes blanco candidatos entre los días 1) 14 vs. 15; 2) 13 vs. 16; 3) 14 vs. 16; y 4) 15 vs. 16. La Figura 98 b) corresponde al *volcano-plot* de la comparación de expresión de genes de la secuenciación 5, donde puede observarse que los genes que tienen una expresión diferencial significativa, se encuentran menos expresados en las neuronas en relación a las CMPihs de las que derivaron. Y, finalmente, la Figura 98 c) muestra los genes expresados diferencialmente entre las CMPihs y las neuronas diferenciadas a partir de las mismas de la secuenciación 6. En este caso, dado el gran número de genes expresados diferencialmente, buscamos filtrar aquellos 5 genes que más aumentarían su expresión y los 5 que más la disminuirían en las neuronas en relación a las CMPihs de las cuales se diferenciaron. En el gráfico se observan los nombres de dichos genes.

a)



b)



c)

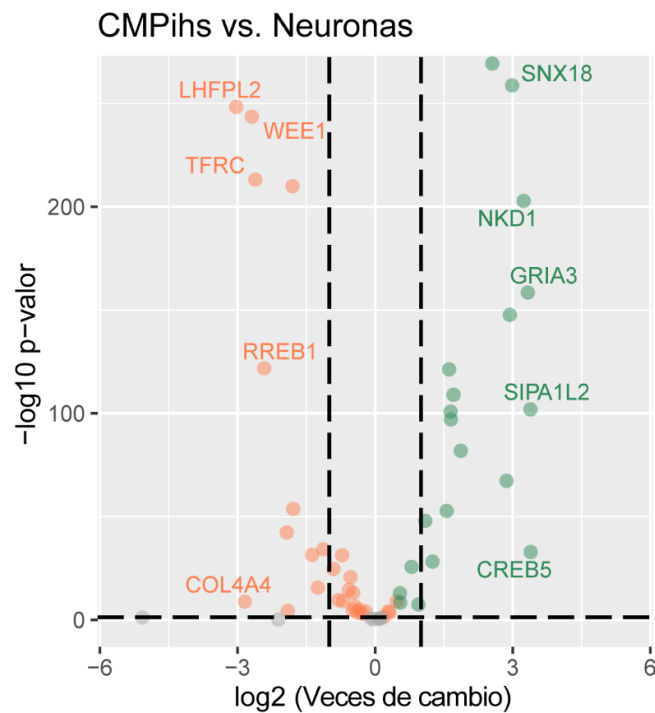


Figura 98. Análisis de la expresión diferencial | En el volcano-plot se observan los genes expresados diferencialmente entre a) los distintos días de la diferenciación a progenitores de cerebro anterior. En rojo se observan los genes que están menos expresados y en verde aquellos más expresados en 1) día 15 en relación al día 14; 2) día 16 en relación al día 13; 3) día 16 en

relación al día 14; y 4) día 16 en relación al día 15; b) las CMPihs y las neuronas diferenciadas de las mismas. En rojo se observan los genes que están menos expresados y en verde aquellos más expresados en las neuronas en relación a las CMPihs; y c) las CMPihs y las neuronas diferenciadas de las mismas. En rojo se observan los genes que están menos expresados y en verde aquellos más expresados en las neuronas en relación a las CMPihs. Se indican los nombres de los genes expresados diferencialmente en cada contraste. Las líneas negras corresponden a un log2 fold change de 1/-1 Y un $-\log_{10}$ p-valor de 1.3/-1.3, que corresponde a un p valor de 0.05.

A partir de los análisis de expresión diferencial de las tres secuenciaciones, obtuvimos en total 7 genes con una expresión significativamente distinta. Los mismos están enumerados en la Tabla 17, donde se muestra en qué experimentos de secuenciación se expresaron de manera diferencial. Estos siete genes aparecieron en el análisis de al menos dos de las secuenciaciones.

secuenciaciones 1, 5 y 6	secuenciaciones 1 y 5	secuenciaciones 5 y 6	secuenciaciones 1 y 6
<i>WEE1</i>			<i>WEE1</i>
	<i>CREB5</i> <i>GRIA3</i> <i>TFRC</i> <i>ANLN</i>		<i>CREB5</i> <i>GRIA3</i> <i>TFRC</i>
		<i>COL4A4</i> <i>LHFPL2</i> <i>RREB1</i>	

Tabla 17. Genes blanco candidatos expresados diferencialmente – secuenciación 1, 5 y 6 | La tabla muestra los genes blanco candidatos expresados diferencialmente en los análisis de expresión diferencial de las tres secuenciaciones.

1.3 Análisis experimental de la expresión de los genes *blanco* candidatos del clúster miR-216/217

Si bien para determinar que un gen es realmente blanco de un miRNA se necesitan realizar ensayos en donde la expresión del mismo a nivel de ARNm y/o proteína se afecte debido a la modulación del miRNA; quisimos validar la expresión de los 7 ARNm candidatos en nuestro modelo. Buscamos así, ver cómo es la expresión de cada uno de ellos en las distintas poblaciones celulares (CMEhs, CMN y Neuronas) para explorar su comportamiento y determinar si alguno podría resultar de interés para profundizar su estudio.

La medición de los transcritos la realizamos por medio de una RT-qPCR, donde pudimos medir los genes *WEE1* (del inglés, *Wee1-like protein kinase*), *ANLN* (del inglés, *Anillin*), *RREB1* (del inglés, *Ras-responsive element-binding protein 1*), *COL4A4* y *GRIA3* (del inglés, *glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3*) (Figura 99).

A partir de dicho análisis, pudimos determinar una inducción significativa de la expresión de *WEE1* en las CMN en relación a las CMEhs H9; y una disminución de su expresión en las neuronas en relación tanto a las CMN como a las CMEhs H9. Esta disminución coincide con lo observado en el análisis de expresión diferencial de las secuenciaciones 5 y 6, donde *WEE1* presenta una baja expresión en las neuronas en relación a las CMPihs. Además, en los resultados del análisis de la secuenciación 1, dicho gen también presenta una baja expresión en los primeros días de la diferenciación a progenitores de cerebro anterior en relación a los últimos días.

Este gen codifica para una quinasa que genera una fosforilación inhibitoria en CDK1, participando así de la regulación de la transición G2/M del ciclo celular.

A partir del análisis de expresión de los ARNm de *ANLN* y *RREB1*, observamos que no hubo un cambio significativo en su expresión en las CMN en relación a las CMEhs; pero si la misma disminuyó en las neuronas en relación a estas últimas. Este comportamiento coincide con lo observado en las secuenciaciones 5 y 6. Además, en la secuenciación 1 la expresión de *ANLN* es menor en el último día de la diferenciación a progenitor de cerebro anterior en relación a los primeros días de diferenciación.

El gen de *ANLN* codifica para una proteína de unión a actina que tiene un rol importante en el crecimiento celular, la migración y la citoquinesis [158].

En cuanto a *RREB1*, el mismo codifica para un factor de transcripción *zinc-finger* que actúa río debajo de la vía de señalización RAS. Se ha demostrado que el mismo es esencial en el desarrollo embrionario de ratón[159].

Al analizar la expresión de *COL4A4*, determinamos una disminución de la expresión del transcripto tanto en las CMN como en las neuronas en relación a las CMEhs H9. Esta disminución la observamos también en el análisis de las secuenciaciones 5 y 6, donde la expresión de este gen es menor en las neuronas en relación a las CMPihs de las que derivan.

Este gen provee instrucciones para formar uno de los componentes del colágeno de tipo IV.

Por último, analizamos la expresión de *GRIA3*, que codifica para GLUA3, una subunidad de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo AMPA. Estos receptores permiten la transmisión sináptica química rápida entre neuronas del sistema nervioso central.

Del análisis por RT-qPCR pudimos determinar que hay una disminución significativa del transcripto del mismo en las CMN en relación a las CMEhs, mientras que no hay diferencia significativa en la expresión del mismo en las neuronas en relación a las otras poblaciones celulares. En el análisis de las secuenciaciones, este gen presentó una alta expresión en el último día de la diferenciación a progenitor de cerebro anterior en relación a los primeros días de diferenciación; y una alta expresión, también, en las neuronas en relación a las CMPihs de las que se diferenciaron (secuenciaciones 5 y 6).

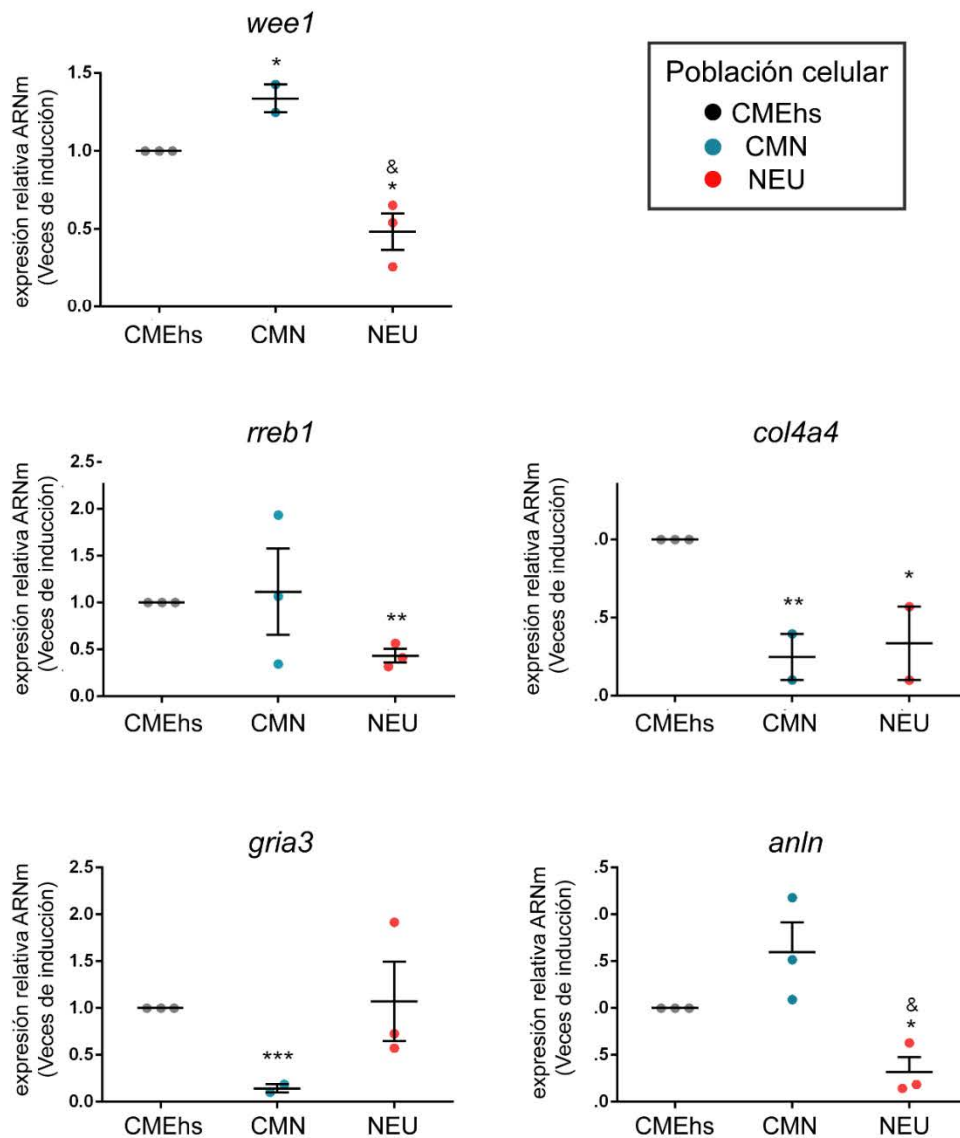


Figura 99. Validación experimental de la expresión de los genes blanco candidatos del clúster miR-216/217 | Análisis de los niveles de expresión de los transcritos *wee1*, *rreb1*, *col4a4*, *gri3* y *anln*, en CMEhs II9; células madre neurales (CMN) y neuronas (NEU). Los gráficos muestran promedio + Error estándar de las veces de inducción de cada transcripto relativo a las CMEhs H9 (fijadas arbitrariamente como 1). N=3. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$ vs. CMEhs; (&) $p < 0.05$, (&&) $p < 0.01$ y (&&&) $p < 0.001$ vs. CMN.

En el anterior análisis sólo medimos la regulación de los transcritos de los genes candidatos mencionados. Nos resulta de gran interés, como perspectiva futura, extender este análisis a las proteínas de los mismos para determinar su expresión en estas poblaciones.

1.4 Modulación de la expresión del miR-217-5p en CMPhs y en CMN

1.4.1 Análisis de la sobre-expresión/inhibición del miR-217-5p en CMN

A continuación, luego de los análisis de expresión de los miRNAs y de los genes candidatos blanco por RT-qPCR, quisimos estudiar el efecto de la modulación de la expresión de estos miRNAs en el proceso de diferenciación a neuronas a partir de las CMPhs.

Con este objetivo, optamos por el uso de moléculas sintéticas que mimetizan a un miRNA (denominadas en inglés *mimic*), o con una molécula que se une de manera complementaria al mismo inhibiendo así su función (denominada en inglés *inhibitor*).

En una primera etapa, iniciamos este tipo de análisis con los oligos sintéticos diseñados para el miR-217-5p. Seleccionamos este miRNA debido a que fue el miRNA del que más bibliografía encontramos en relación a su función (si bien la misma en su mayoría es en relación a diversos cánceres) y, sobre todo, que presenta genes blanco experimentalmente validados, algunos de los cuales coinciden con los genes blanco que nosotros postulamos como candidatos de estudio en nuestro modelo.

En primer lugar, entonces, pusimos a punto la concentración de estas moléculas sintéticas. Debido a que el oligo *inhibitor* bloquea la acción del miRNA pero no promueve su degradación, es decir, no disminuye su nivel de expresión, dicho análisis por RT-qPCR no fue posible. Debido a esto, decidimos utilizar la concentración de 30 nM, acorde a lo reportado en numerosas publicaciones [160-165] y a experimentos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio.

Comenzamos este análisis en las CMN de H9, debido a que en este tipo celular el clúster miR-216/217 se expresa, lo que nos permite modular la expresión del miR-217-5p tanto con el *mimic* (aumentándola aún más) como con el *inhibitor* (bloqueando su función). En las CMPhs, en cambio, dado que este clúster no se expresa solo utilizaremos el *mimic* para determinar el efecto al inducir su expresión.

Con este objetivo, en primer lugar, transfectamos las CMN de H9 de manera transitoria con las concentraciones 10 y 30nM tanto del *mimic* del miR-217-5p o el *mimic* scramble (control negativo) y analizamos los niveles de expresión del mir-217-5p por RT-qPCR a los 2 días post-transfección.

A partir de dicho análisis pudimos determinar que una concentración de 10nM era suficiente para inducir la expresión de este miRNA en esta población celular y en el tiempo seleccionado (Figura 100).

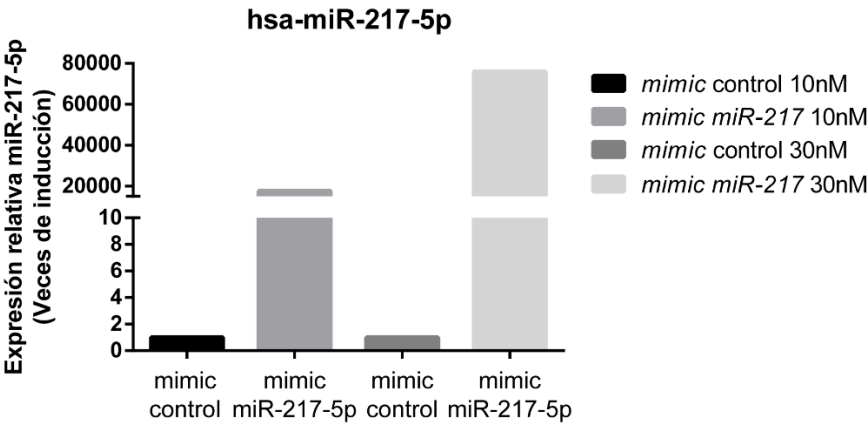


Figura 100. **Sobre-expresión del miR-217-5p en CMN de H9** | Análisis de la sobreexpresión del miR-217-5p, cuantificada por RT-qPCR, en CMN de H9 a las 48 horas (2 días) post-transfección de las mismas con un mimic miR-217-5p (10 y 30nM). Los gráficos muestran promedio + Error estándar de las veces de inducción del miR-217-5p relativo a las CMN de H9 control (transfección con mimic scramble control) correspondiente.

Luego de seleccionar esta concentración, quisimos ver si la expresión del miR-217-5p disminuía con el transcurso de los días. Para ello, medimos su expresión 2, 4 y 7 días post-transfección en las CMN de H9. Pudimos determinar que, si bien el nivel máximo de expresión corresponde a los dos días post-transfección, aún a los 4 y 7 días post-transfección los niveles de expresión del miRNA siguen siendo muy elevados en relación a las CMN de H9 transfectadas con el mimic scramble (control negativo) (Figura 101). Este análisis nos resultó importante para, en un futuro, poder realizar experimentos para modular la expresión de este miRNA a lo largo de la diferenciación neuronal de las CMN, por lo que sería necesario que su expresión se mantuviera elevada en el tiempo.

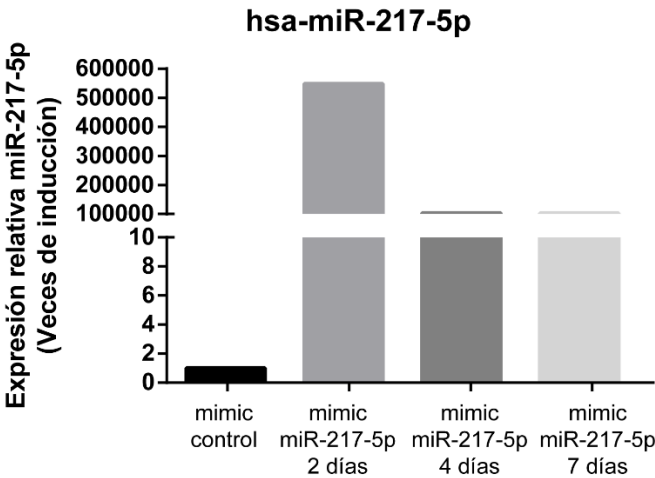


Figura 101. Sobre-expresión del miR-217-5p en CMN de H9 | Análisis de la sobreexpresión del miR-217-5p, cuantificada por RT-qPCR, en CMN de H9 a los 2, 4 y 7 días post-transfección de las mismas con un mimic miR-217-5p (10nM). Los gráficos muestran promedio + Error estándar de las veces de inducción del miR-217-5p relativo a las CMN de H9 control (transfección con mimic scramble control) correspondiente.

A continuación, quisimos determinar el efecto de la modulación de este miRNA (mediante el uso de su *mimic* o *inhibitor*) en el ciclo celular de las CMN. Para ello, medimos el perfil del ciclo celular por medio de una marcación con yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo, en células tratadas con el *mimic* (10nM) o con el *inhibitor* (30nM) del miR-217-5p por 48 horas. El perfil del ciclo celular de las células tratadas fue comparado con las células control correspondiente (*mimic scramble* o *inhibitor scramble*).

En dicho análisis pudimos determinar que ninguno de los tratamientos generó un cambio significativo en el perfil del ciclo celular de las CMN de H9 en relación a las células transfectadas con el mimic/inhibitor control (Figura 102).

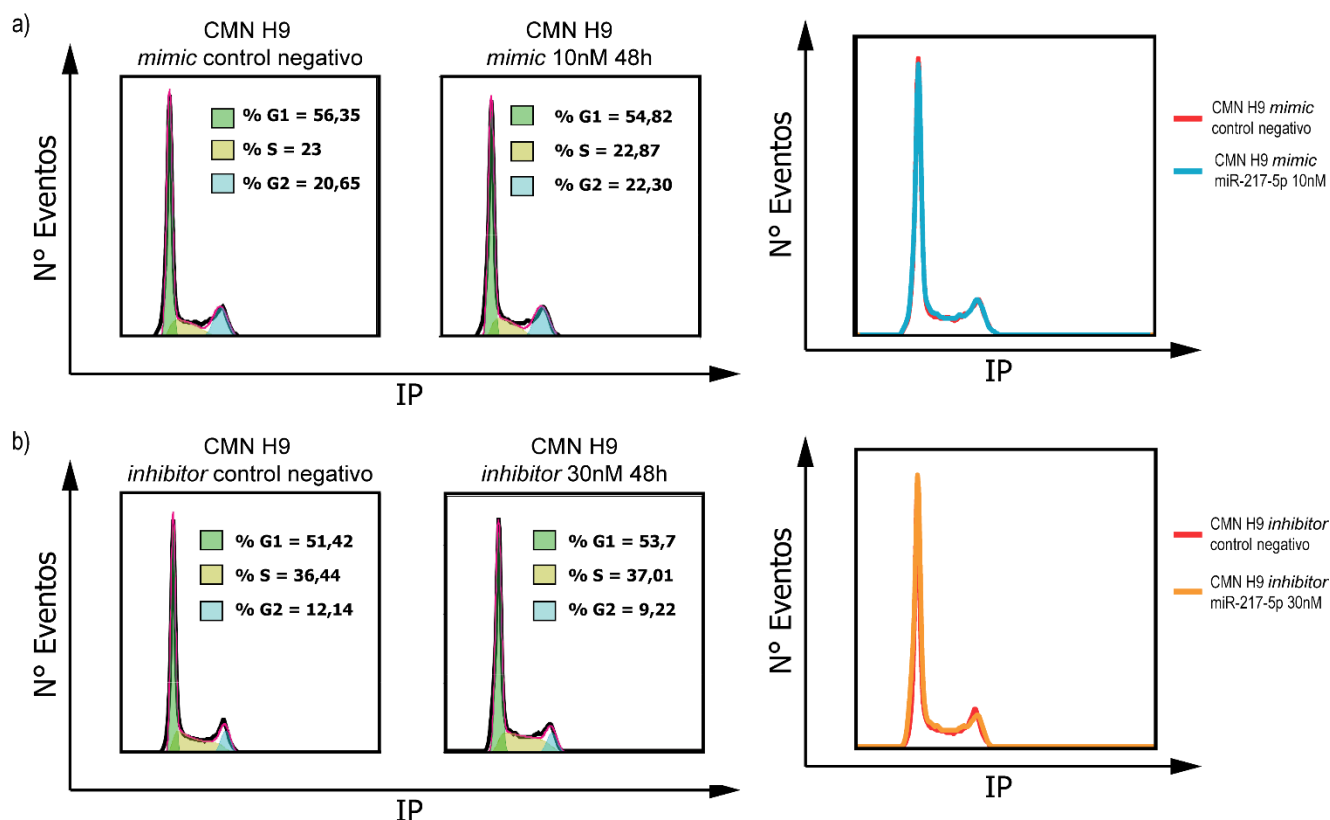


Figura 102. Análisis del perfil del ciclo celular en CMN de H9 con sobre-expresión/inhibición del miR-217-5p | Los histogramas representan el perfil del ciclo celular de las CMN de H9 a las 48 horas post-transfección con: (a) el mimic del miR-217-5p (10nM) y con el mimic scramble control (10nM) o (b) el inhibitor del miR-217-5p (30nM) y con el inhibitor scramble control (30nM). Dicho perfil fue analizado luego de que las células fueran fijadas con etanol 70% frío. El contenido de

ADN fue medido con ioduro de propidio (IP) y su fluorescencia determinada con un citómetro de flujo. Se muestra un gráfico representativo con un histograma con la frecuencia del contenido de ADN para cada condición (mimic/inhibitor control negativo y mimic/inhibitor miR-217-5p) y un gráfico de la superposición de los 3 histogramas (control, 10 y 30nM para cada tratamiento). El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular fue calculada con la plataforma Un-variada FlowJo v10.0.7's. N=3.

1.4.2 Análisis de la sobre-expresión del miR-217-5p en CMPhs

Luego, estudiamos el efecto de inducir la expresión de este miRNA en las CMPhs, tanto las H9 como las FN2.1. Como mencionamos anteriormente, en estos tipos celulares dado que este miRNA no se expresa, el uso del *inhibitor* del miR-217-5p no tiene sentido por lo que todos los análisis los realizamos solo con el *mimic* del miR-217-5p.

En primer lugar, transfectamos de manera transitoria las CMEhs H9 y las CMPihs FN2.1 con una concentración 10nM tanto del *mimic* del miR-217-5p como del *mimic* scramble control, y corroboramos la inducción de la expresión de este miRNA a los 4 días post-transfección.

A partir de dicho análisis pudimos determinar que una concentración de 10nM era suficiente para que la expresión de este miRNA se mantenga elevada a los 4 días post-transfección en ambas poblaciones celulares (Figura 103).

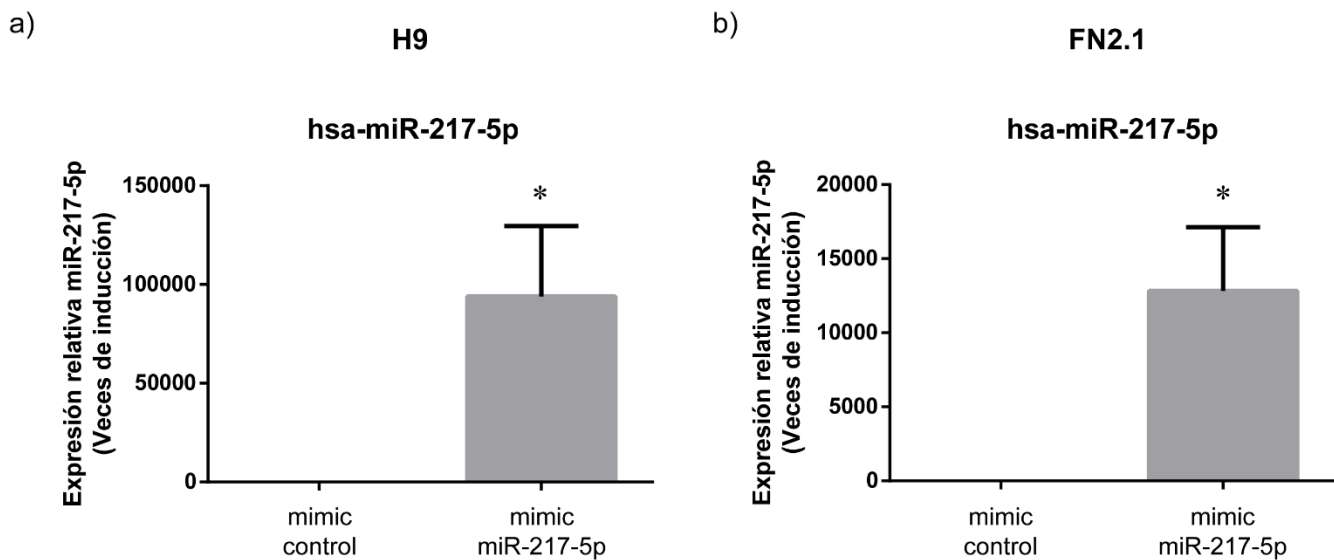


Figura 103. Sobre-expresión del miR-217-5p en CMPhs | Análisis de la sobreexpresión, cuantificada por RT-qPCR, del miR-217-5p en a) CMEhs H9 y b) CMPihs FN2.1, a los 4 días post-transfección con un mimic del miR-217-5p (10nM). Los gráficos muestran promedio + Error estándar de las veces de inducción del miR-217-5p relativo a la CMPhs control (transfección con mimic scramble control) correspondiente. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$ vs. CMEhs o CMPihs mimic control.

Luego, quisimos estudiar si la inducción de este miRNA generaba algún efecto biológico en las CMPhs. Para ello, en primer lugar, decidimos analizar el perfil del ciclo celular de las células transfectadas. Para ello, analizamos mediante un ensayo con ioduro de propidio el perfil del ciclo celular de células CMEhs H9 y CMPihs FN2.1 transfectadas con el *mimic* del miR-217-5p en comparación con ambas líneas de CMPhs transfectadas con el *mimic* scramble control.

Este ensayo nos permitió determinar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular mediante la cuantificación del contenido de ADN por citometría de flujo y el análisis de ciclo celular realizado con el programa FlowJo. A partir de éstos resultados, identificamos un aumento significativo en la fase G1 de las CMEhs H9 y CMPihs pasando de un 29,11% \pm 1,9 al 35,42% \pm 1,22 y de un 35,17% \pm 0,23 a un 41,76% \pm 0,75 respectivamente. Esto significaría un aumento del 21,67% (en CMEhs H9) y del 18,74% (en CMPihs FN2.1) sobre el porcentaje total de G1 en cada caso (Figura 104).

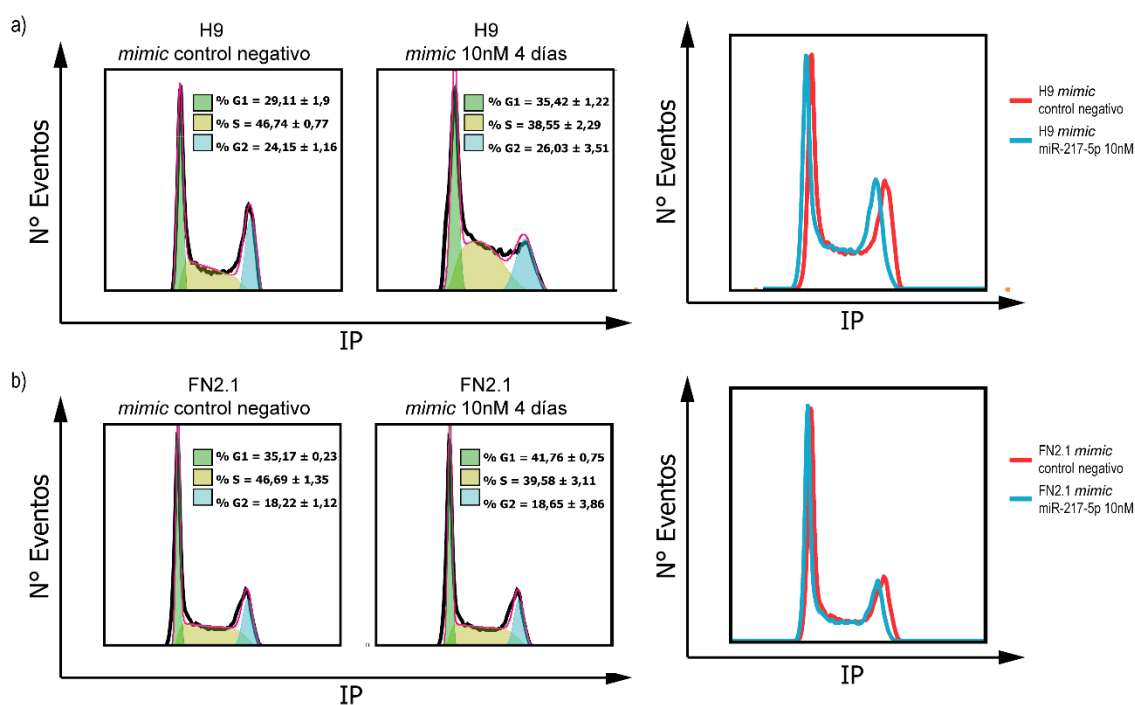


Figura 104. Análisis del perfil del ciclo celular en CMPhs con sobre-expresión del miR-217-5p | Los histogramas representan el perfil del ciclo celular de las CMPhs (a) CMEhs y (b) CMPihs a los 4 días post-transfección con el *mimic* del miR-217-5p (10nM) y con el *mimic* scramble control (10nM). Dicho perfil fue analizado luego de que las células fueran fijadas con etanol 70% frío. El contenido de ADN fue medido con ioduro de propidio (IP) y su fluorescencia determinada con un citómetro de flujo. Se muestra un gráfico representativo con un histograma con la frecuencia del contenido de ADN para cada condición (*mimic* control y *mimic* miR-217-5p). El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular fue calculada con la plataforma Un-variada FlowJo v10.0.7's. N=3.

En segundo lugar, quisimos determinar si la inducción de la expresión de este miRNA en las CMPhs tiene un efecto en la viabilidad celular. Para ello, realizamos una tinción con ioduro de propidio (IP) y

posterior análisis por citometría de flujo. El mismo se basa en la propiedad de que las células vivas presentan membranas plasmáticas intactas mientras que las células no-viables la tienen dañadas. En este sentido, cuando uno realiza una tinción con IP, las células vivas excluyen este colorante. El mismo, en cambio, penetra en las células no viables donde se intercala en la doble hebra de ADN y su fluorescencia puede ser medida por citometría de flujo.

Analizamos, entonces, el porcentaje de muerte celular en las CMEhs H9 y las CMPihs FN2.1 a los 4 días post-transfección con el *mimic* miR-217-5p en relación al *mimic* scramble control. A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que la inducción de este miRNA en ambas CMPhs no afecta de manera significativa su viabilidad celular (Figura 105).

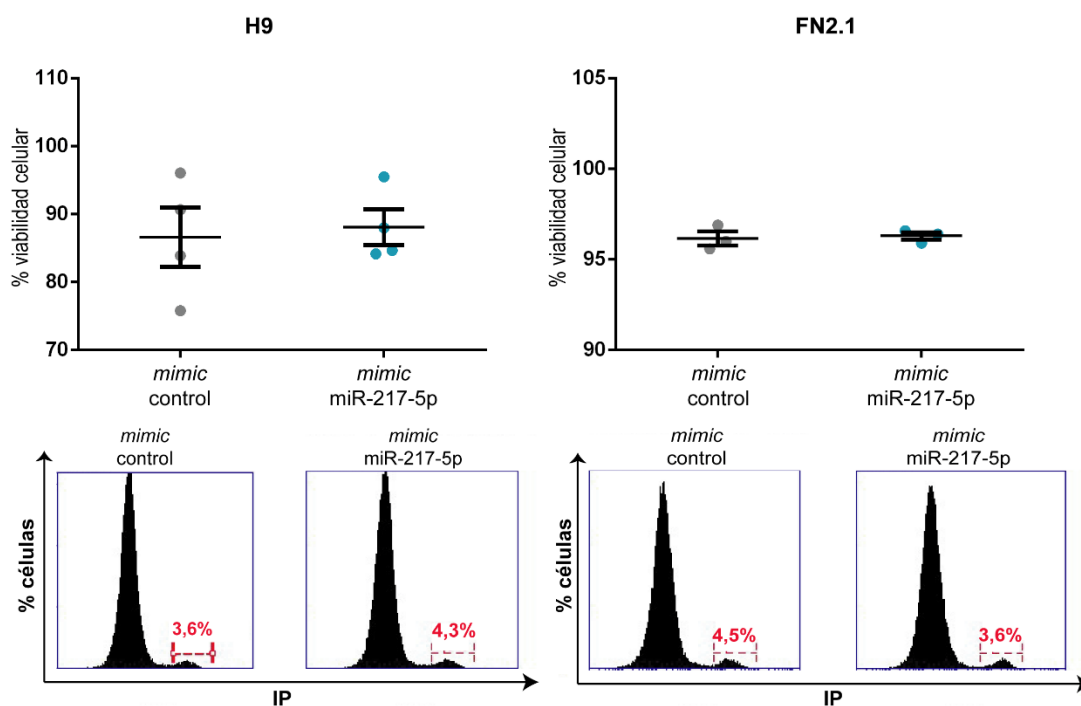


Figura 105. Análisis de la viabilidad celular en CMPhs con sobre-expresión del miR-217-5p | Se analizó el porcentaje de viabilidad celular (a los 4 días post-transfección) mediante una tinción con ioduro de propidio en CMPhs (H9 y FN21) tratadas con el *mimic* del miR-217-5p (10nM) y con el *mimic* scramble control (10nM). Los gráficos muestran los porcentajes relativos a las CMPhs control. Se muestran el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ vs. cada CMPhs control correspondiente en cada caso. Cada gráfico muestra, abajo, un histograma representativo del perfil de la tinción con IP analizado por citometría de flujo. El porcentaje corresponde al porcentaje de células no viables en cada caso.

Luego, decidimos analizar el efecto de sobre-expresar este miRNA en las CMPhs en los niveles de expresión de los principales genes de pluripotencia (*OCT-4* y *NANOG*) y los marcadores de CMN (*PAX-6* y *SOX-1*) para identificar si la modulación de este miRNA generaba algún cambio en la expresión de estos transcritos (Figura 106).

Tal como se puede observar en la Figura 106, no se obtuvieron cambios significativos en la expresión de los genes estudiados, con respecto al control negativo con excepción de la expresión del transcripto de *OCT-4* en las CMEhs. En dicho análisis puede observarse una disminución significativa de la expresión de este transcripto en las células CMEhs H9 tratadas con el mimic del miR-217 en relación a las células tratadas con el mimic control.

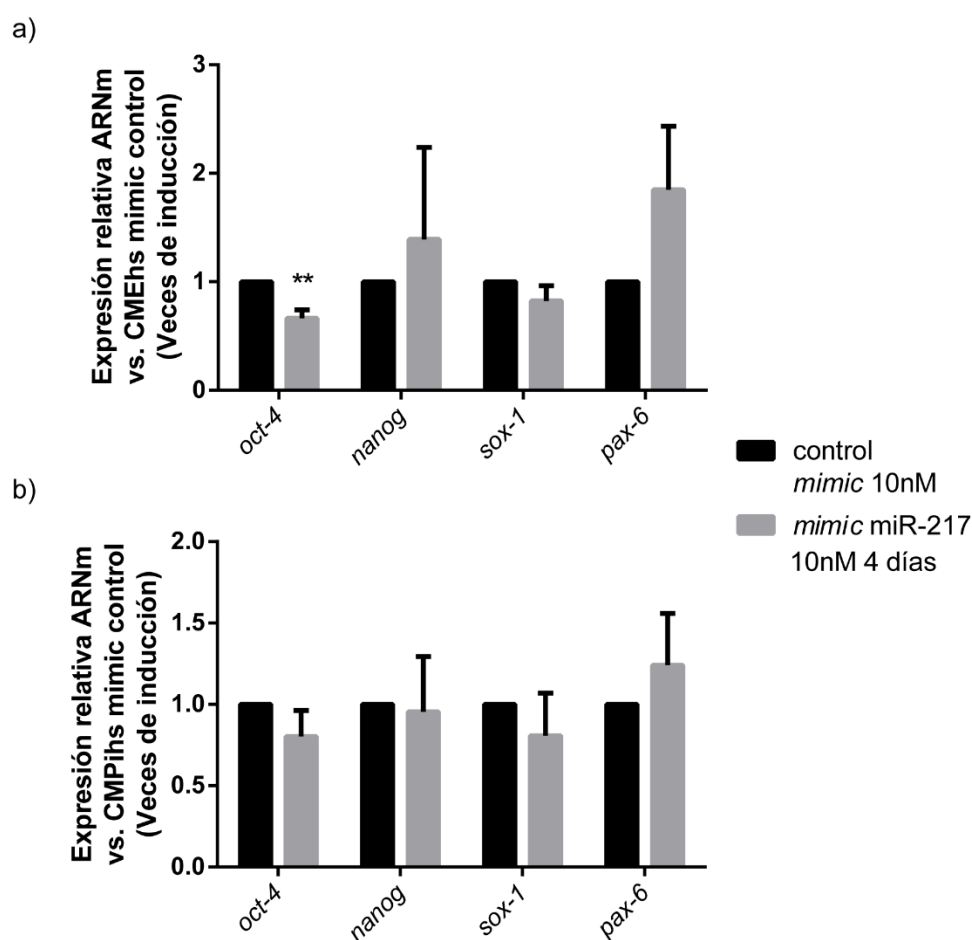


Figura 106. Análisis de la expresión de genes de pluripotencia y marcadores de CMN en CMPhs con sobre-expresión del miR-217-5p | Análisis de los niveles de expresión cuantificados por RT-qPCR de los transcritos de *OCT-4*, *NANOG*, *SOX-1* y *PAX-6*, en CMPhs (a) CMEhs H9 y (b) CMPihs FN2.1 a los 4 días post-transfección con el mimic del miR-217-5p (10nM) y con el mimic scramble control (10nM). Los gráficos muestran promedio + Error estándar de las veces de inducción de cada transcripto relativo a cada CMPhs control (fijadas arbitrariamente como 1). N=3. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$ vs. cada CMPhs control.

Por último, en estas mismas células quisimos determinar si la sobre-expresión de este miRNA modula los niveles de expresión de los genes blanco candidatos seleccionados. De este modo, buscamos determinar si hay regulación (directa o indirecta) de los transcritos de estos genes mediada por este miRNA en particular. Sumamos, además, el análisis de dos genes blanco: *SIRT1*, *FGFRL1*, y *CICLINA D1* que por bibliografía encontramos eran regulados por este miRNA [166-168].

A partir del análisis de los niveles de expresión de estos genes en las CMPhs a los 4 días post-transfección con el *mimic* del miR-217-5p, observamos resultados distintos en ambas líneas de CMPhs. En el caso de las CMEhs, no hubieron cambios significativos en la expresión de ninguno de los genes blanco candidatos con excepción del gen *GRIA3*, el cual se observó una disminución significativa en las CMEhs H9 transfectadas con el *mimic* del miR-217 en relación a las células control (Figura 107 a).

Por otra parte, en el caso de las CMPihs FN2.1, pudimos determinar una disminución significativa en la expresión de los genes blanco candidatos *WEE1*, *SIRT1* y *CICLINA D1* en las células sobre-expresando el miR-217 en relación a las células control (Figura 107 b).

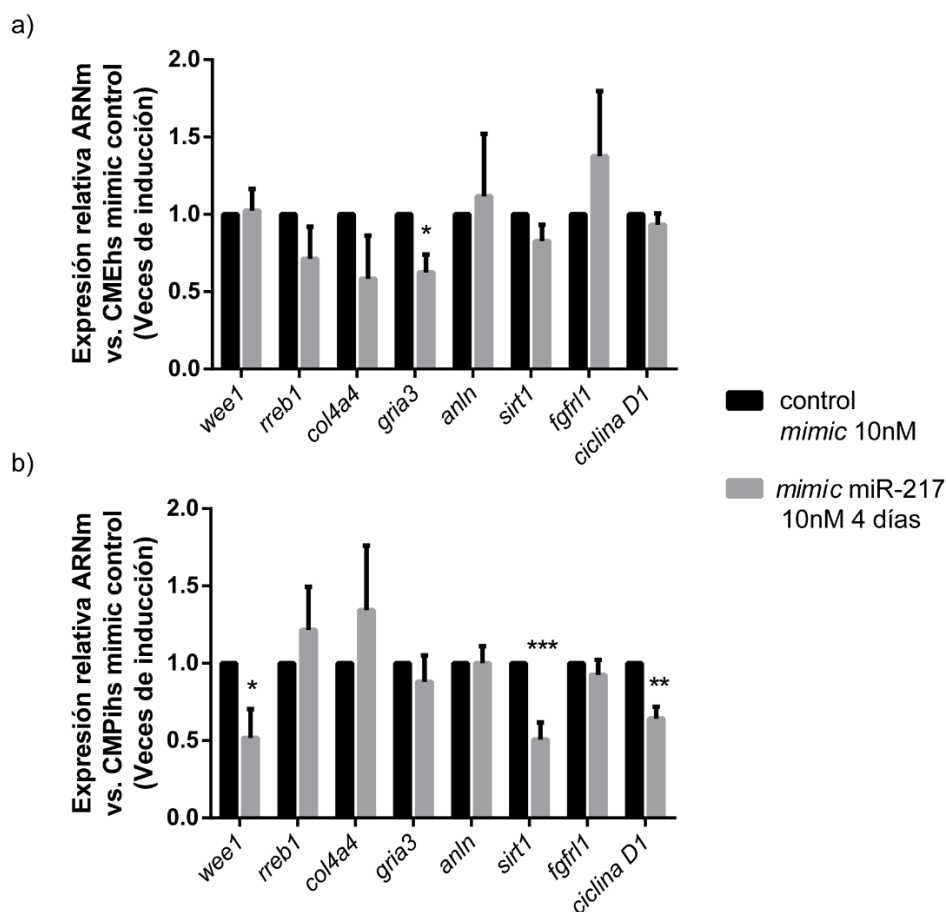


Figura 107. Análisis de la expresión de posibles genes target del clúster miR-216/217 en CMPhs con sobre-expresión del miR-217-5p | Análisis de los niveles de expresión por RT-qPCR de los transcritos *WEE1*, *RREB1*, *COL4A4*, *GRIA3*, *ANLN*, *SIRT1*, *FGFRL1* y *CICLINA D1* en CMPhs (a) CMEhs H9 y (b) CMPihs FN2.1 a los 4 días post-transfección

con el mimic del miR-217-5p (10nM) y con el mimic scramble control(10nM). Los gráficos muestran promedio + Error estándar de las veces de inducción de cada transcripto relativo a cada CMPhs control (fijadas arbitrariamente como 1). N=3. Se realizó la prueba estadística t de Student de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$ vs. cada CMPhs control.

Conclusiones Parciales del capítulo

A partir del análisis de expresión diferencial entre las CMEhs, CMN y neuronas determinamos que la expresión del clúster miR-216/217 se induce en las CMN y neuronas, y no es detectable en las CMEhs. Debido a esto, y a que no encontramos información del rol del mismo en la neurogénesis a partir de CMPhs, nos pareció un candidato de estudio interesante.

En el presente capítulo, entonces, nos centramos en profundizar el estudio de este clúster, formado por 6 miembros, y exclusivo de cordados.

En primer lugar, pudimos validar de manera experimental los niveles de expresión de los miembros del mismo en las CMPhs, CMN y neuronas diferenciadas a partir de las mismas.

A partir del análisis de datos bioinformáticos publicados por otros grupos de investigación, confirmamos que este clúster de miRNAs no se expresa en otros tipos de CMPhs y en CMP de otras especies. Además, el mismo se expresa en otras células del linaje neural. En datos de diferenciaciones a otros linajes, no encontramos expresión del mismo con excepción de la diferenciación hacia células tipo β , donde se observó una expresión elevada.

Luego, analizamos los genes blancos predichos para todos los miRNAs encontrando que los mismos regularían a un gran número de genes, muchos de los cuales estarían regulando de manera conjunta. Luego, estudiamos los procesos celulares asociados a estos genes y determinamos que los miRNAs de este clúster regularían genes relacionados, sobre todo con la regulación del ciclo celular.

Luego comparamos el listado de los genes blanco predichos para este clúster con genes expresados en datos publicados de 7 secuenciaciones de células diferenciadas a algún tipo celular del linaje neural a partir de CMPhs. Obtuvimos así un listado de 56 genes target presentes tanto en la predicción bioinformática como expresados diferencialmente entre la célula neural y su CMPhs progenitora.

Con este listado de los 56 genes blanco candidatos y sus niveles de expresión en cada secuenciación, realizamos un análisis de expresión diferencial para tres de las secuenciaciones, obteniendo de las mismas 5 genes con una expresión significativa distinta que pudimos medir por RT-qPCR (*WEE1*, *GRIA3*, *ANLN*, *COL4A4* Y *RREB1*) en nuestras poblaciones celulares. Pudimos determinar que la expresión de todos ellos coincide con los resultados observados en los datos de una o más de las secuenciaciones analizadas.

Luego, analizamos el rol de uno de los miembros del clúster (miR-217-5p) de manera experimental mediante el uso de moléculas sintéticas *mimics/inhibitors*. En primer lugar medimos el efecto de la modulación de este miRNA en las CMN de H9, determinando que ni su sobre-expresión ni su inhibición afectaron de manera significativa el perfil del ciclo celular de estas células.

Estudiamos, también, el efecto de la sobre-expresión de este miRNA en las CMPhs (H9 y FN2.1). Observamos que la expresión de este miRNA en estas células generó un aumento en el porcentaje de células en la fase G1 en ambos casos. Este resultado refuerza la información obtenida por el análisis de ontología génica donde se relaciona a estos miRNAs con la regulación de genes involucrados en el ciclo celular y la proliferación. Determinamos, además, que la viabilidad celular no se ve comprometida por la sobre-expresión de este miRNA en ninguna de las dos líneas de CMPhs.

Quisimos analizar también, si había un cambio en los niveles de expresión de genes: de pluripotencia (*OCT-4* y *NANOG*), marcadores de células neurales (*PAX-6* y *SOX-1*) o en los transcritos de los genes blanco candidatos seleccionados ciertos genes blanco de este miRNA reportados por bibliografía. A partir de este análisis determinamos una disminución significativa en la expresión del transcripto de *OCT-4* en las CMEhs tratadas con el *mimic* del miR-217 en relación a su control. En cuanto a los genes blanco, observamos una disminución significativa en la expresión del gen blanco candidato *GRIA3* en las CMEhs H9 transfectadas con el *mimic* del miR-217 en relación a las células control; y también, una disminución significativa en la expresión de los genes blanco candidatos *WEE1*, *SIRT1* y *CICLINA D1* en las CMPihs FN2.1 tratadas con el *mimic* del miR-217 en relación a las CMPihs control.

Discusión

Existen dos tipos de procesos fundamentales en el desarrollo de un organismo: la división celular y la diferenciación celular. Para que haya un crecimiento normal, estos dos procesos deben estar finamente regulados y coordinados.

En este sentido, las células madre (embrionarias humanas o adultas) tienen un rol crítico durante el desarrollo embrionario y en mantener la homeostasis en los individuos adultos. Un mejor entendimiento de la biología de las mismas permitirá a la comunidad científica comprender mejor determinadas patologías y posibilitará diseñar nuevos enfoques para su potencial uso en medicina regenerativa. La misma, se ha establecido como una alternativa futura para la reparación de tejidos y órganos afectados por distintas enfermedades.

El estudio de los procesos que regulan la auto-renovación y pluripotencia de las células madre pluripotentes humanas, así como los procesos de diferenciación de las mismas, es necesario para avanzar en la construcción de este conocimiento. Estas habilidades, que caracterizan a estas células, se encuentran intrínsecamente relacionadas con la regulación de su ciclo celular y de su diferenciación. Si bien históricamente estos procesos se estudiaban por separado, una gran cantidad de evidencia ha contribuido a indicar que los mismos están estrechamente relacionados, siendo incluso considerados las dos caras de una misma moneda [65].

Estos procesos están regulados por complejos mecanismos moleculares en los que participan distintos agentes reguladores, entre los que destacamos las ciclinas, los factores de transcripción E2Fs y los miRNAs. Un mayor conocimiento de la función que cumplen los mismos permitirá, por un lado, obtener poblaciones celulares dotadas de una alta capacidad proliferativa inicial, como así también aumentar la eficiencia de la diferenciación con un total compromiso hacia un linaje específico.

El objetivo principal de la presente tesis fue estudiar la expresión y regulación de los complejos que operan en la fase G1 del ciclo celular a lo largo de la diferenciación de las CMPhs a NP; como también dilucidar la participación de los miRNAs tanto en la regulación del ciclo celular, en particular aquellos regulados por los factores de transcripción E2F, como en el proceso de diferenciación celular a neuronas.

Perfil de expresión de los factores reguladores del ciclo celular en CMPhs y en su progenie neural

Como mencionamos anteriormente, las CMPhs se han convertido en una herramienta esencial para el estudio de los procesos de desarrollo *in vitro* como también en otras áreas de la biología básica. Sin

embargo, para su uso seguro en la clínica es necesario un entendimiento preciso de las vías moleculares que regulan el mantenimiento prolongado de la auto-renovación y pluripotencia *in vitro*.

Existen varias publicaciones que evidencian la conexión mecanicista entre el ciclo celular y la auto-renovación y las redes de pluripotencia. En este sentido, se ha reportado que los principales factores de transcripción reguladores de la pluripotencia, OCT-4, NANOG y SOX-2, cumplen roles en controlar la transición a través del ciclo celular mediante la regulación directa de genes necesarios para la transición de la fase G1 a la fase S como lo son *CDK6* y *CDC25A*, y en acelerar la progresión en la fase G1 [98, 169, 170]. Del mismo modo, la maquinaria del ciclo celular ha sido implicada en la regulación de las redes mencionadas, incluyendo targets como *OCT-4*, *NANOG* y *SOX-2* [171]. Por ejemplo, Brumbaugh et al. han reportado que ERK2 y CDK1/CICLINA A2 fosforilan diferencialmente a NANOG *in vitro*, elevando la posibilidad de que CDK1 funcione de forma análoga a ERK2, a lo mejor para mantener la expresión de NANOG durante las fases S/M; sin embargo, esto en ese momento era solo especulativo [172].

Hasta dónde llega nuestro conocimiento, se han propuesto hasta el momento varios escenarios que describen el ciclo celular de las CMPhs, pero las características precisas funcionales y moleculares del mismo aún se mantienen sin conocer. Debido a esto, durante mi tesina de licenciatura describimos la expresión de los transcritos de las principales ciclinas en dos tipos de CMPhs, las CMEhs H9 y CMPihs FN2.1, y en PN derivados de CMEhs, tema de estudio que, en su momento y hasta donde sabemos, no había sido estudiado aún.

En la primer parte de esta tesis, profundizamos aún más este estudio, buscando arrojar un poco de luz sobre el entendimiento de la regulación del ciclo celular en los dos tipos de CMPhs, poniendo especial énfasis en los tiempos y niveles de expresión de las principales ciclinas (a nivel de ARNm con un nuevo enfoque experimental mediante un ensayo de arresto y liberación; y también a nivel proteico), en particular en la *CICLINA E1*.

A partir de los resultados obtenidos, confirmamos que los ARNm de las ciclinas de tipo D se expresan de manera periódica en las CMEhs H9 y las CMPihs FN2.1. Además, determinamos que la *CICLINA D2* es la ciclina de tipo D que se expresa más predominantemente en ambos tipos de células pluripotentes, en particular, observamos que los niveles de expresión del ARNm y de la proteína de la *CICLINA D1* son significativamente menores que los observados en los FH. En línea con este descubrimiento, Card y colegas reportaron que los niveles de la *CICLINA D1* son atenuados por el miR-302a en las CMEhs [98]. Más aún, en 2010 este mismo grupo reportó que la *CICLINA D2* se expresa predominantemente en las CMEhs H9 y que, durante el compromiso a un linaje, durante las etapas tempranas de la diferenciación, ocurre un cambio en la relación de la expresión de las *CICLINAS D2* a *D1* [53].

Además, en el caso de las ciclinas de tipo A y B, estudios con CMEm han revelado que las proteínas de las *CICLINAS A2* y *B1* son expresadas constitutivamente y más abundantes en las CMEm que en las células somáticas MEFs [173]. En consistencia con estos descubrimientos, Becker et al. observaron

una expresión robusta similar de las ciclinas de tipo A y B en CMEhs, atribuyendo estos altos niveles de expresión a la alta proporción de CMEhs residiendo, en cualquier momento, en las fases S, G2 y M [52]. En apoyo a estos hallazgos, Neganova et al. demostraron que en las CMEhs los niveles de las *CICLINAS A2* y *B1* fluctúan durante el ciclo celular [57]. En línea con esta evidencia, determinamos que los ARNm de las *CICLINAS A2* y *B1* se expresan de manera periódica en ambas líneas de CMPhs y, determinamos también, que los niveles de expresión de su ARNm y proteína son mayores en las CMPhs que en los FH, independientemente de su distribución del ciclo celular atípica. Curiosamente, Liu et al, observaron que la actividad de AKT fluctúa a lo largo del ciclo celular, siendo reflejo de la expresión de la *CICLINA A*. Por otra parte, la delección de la *CICLINA A2* induce una elevada apoptosis en CMEhs, lo que apoya la idea de que la *CICLINA A2* estaría gobernando la supervivencia celular *in vivo* en gran parte al promover la activación de AKT [174]. Por lo tanto, queda por determinar si los altos niveles de expresión de la *CICLINA A2* que observamos contribuyen a gobernar la supervivencia celular de las CMPhs mediante la regulación de la actividad de AKT.

Por último, los reportes de cómo la *CICLINA E1* es regulada a través de la progresión del ciclo celular de las CMPhs son muy contradictorios. En este sentido, Filipczyk et al. por medio de un ensayo de inmunocitoquímica determinó que el 100% de las CMEhs que proliferan son positivas para la proteína *CICLINA E1*, concluyendo que la misma se expresa de manera constitutiva en las CMEhs indiferenciadas del mismo modo que ocurre en las CMEhs [55]. En esta misma dirección, el grupo de Singh et al. observó que la expresión de la *CICLINA E1* no era periódica, tanto a nivel de transcripto como proteico, en las CMEhs H9 [58]. Por el contrario, Abdelalim et al. Reportaron que los niveles proteicos de la *CICLINA E1* aumentan alrededor de la transición G1/S en las CMEhs [56].

En este sentido, en el presente estudio, determinamos que los niveles del ARNm y el producto proteico de la *CICLINA E1* oscilan a través del ciclo celular tanto de las CMEhs como en las CMPihs, presentando un pico de expresión en la transición G1/S. Además, determinamos que hay una disminución de los niveles proteicos de la *CICLINA E1* en la transición G2/M en estos tipos celulares. Este último resultado está respaldado por Neganova et al., quienes previamente observaron que las CMEhs presentan menores niveles de expresión de la proteína de la *CICLINA E1* en la transición G2/M [57]. En conjunto, nuestros resultados son consistentes con los descubrimientos previos en cuanto a los niveles de expresión (tanto en sentido de abundancia como periodicidad asociada al ciclo celular) del ARNm y proteína de las ciclinas de tipo *D*, *A1* y *B2* en CMEhs. Cabe destacar que, en este trabajo, encontramos un comportamiento similar en las CMPihs, otro tipo de células pluripotentes. Sin embargo, determinamos que las fluctuaciones de los niveles de expresión del ARNm de las ciclinas a lo largo del tiempo son distintas entre las CMEhs y las CMPihs. Estas diferencias observadas en la fluctuación temporal del ARNm de las ciclinas entre las líneas celulares H9 y FN2.1 podrían ser explicadas, al menos en parte, por una firma de expresión génica que define el estado de las CMPihs como único y distinto del de las CMEhs [175]. Luego de un estudio completo de la expresión del gen de la *CICLINA E1* utilizando distintos agentes químicos para la sincronización del ciclo celular y distintas condiciones de cultivo,

determinamos que los niveles de expresión de su ARNm y producto proteico fluctúan a lo largo del ciclo celular de los dos tipos de CMPhs estudiados.

Consideramos que la discrepancia entre los trabajos mencionados, especialmente en lo que respecta a la regulación de la *CICLINA E1* a través del ciclo celular de las CMPhs, podría deberse a la variabilidad existente entre las diferentes líneas de CMEhs/CMPihs utilizadas en los experimentos entre los distintos grupos, el tiempo en cultivo de las líneas celulares (número de pasajes) [54], el uso de distintos protocolos experimentales o medios de cultivo, la ventana temporal en la que las células sincronizadas fueron sorteadas/procesadas/analizadas, la contribución de algunas células diferenciadas o la sensibilidad del ensayo de Western Blot o la calidad de los anticuerpos [51]. Notablemente, en este trabajo utilizamos distintos inhibidores farmacológicos y realizamos, además, ensayos de arresto y liberación para no perder la ventana temporal en la que la *CICLINA E1* alcanza su máximo nivel de expresión, por un lado, y para confirmar que los cambios observados no se deben a un efecto secundario del inhibidor utilizado, por el otro.

Curiosamente, los experimentos de arresto y liberación demostraron que la fluctuación en los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* no eran los mismos que los reflejados por los niveles de su proteína, lo que puede deberse a diferencias en su estabilidad y/o en los mecanismos que regulan la transcripción y traducción.

Por otro lado, consideramos que el poder describir en detalle los aspectos mecanísticos que conectan el cambio de la maquinaria del ciclo celular al destino celular resultará útil para el desarrollo de nuevos métodos para generar tipos celulares específicos de manera más eficiente. Con este propósito, en esta tesis también investigamos los cambios que ocurren en el ciclo celular y en el perfil de expresión de las ciclinas en la progenie de las CMEhs en los estadios tempranos de la diferenciación neural. En este estudio, encontramos que esta progenie diferenciada inmadura (NESTINA+/CD133+) tiene un perfil del ciclo celular que se asemeja al de las células somáticas con una población en la fase G1 alta. Es importante mencionar que los PN expresan niveles de expresión significativamente altos de las ciclinas de tipo D (*CICLINA D1* y *D2*) en comparación con los FH y las CMPhs. En este sentido, se ha reportado que la sobre expresión de las ciclinas D1 y E1 en ratones acorta la fase G1 del ciclo celular, lo que lleva a una disminución en la neurogénesis y a un aumento en las poblaciones de las células progenitoras apicales e intermediarias [176-180]. Además, se ha demostrado que la *CICLINA D2* es esencial para la expansión de las células progenitoras neurales tanto en el cerebro del mamífero embrionario como en el del adulto [179, 180].

Por lo tanto, es concebible que los niveles de expresión de la *CICLINA D2* y *E1* que presentan los PN derivados de las CMEhs podrían ser requeridos para mantener su proliferación en ese estadio de la diferenciación. Recientemente, el grupo de Pauklin et al. reportaron que en la fase G1 tardía, se induce la expresión de la *CICLINA D1* y forma un complejo con factores de transcripción locus-específicos para reclutar co-activadores transcripcionales en los genes de neuroectodermo y co-represores en los genes de

endodermo en células madre [181]. Cabe destacar, que se ha demostrado que la actividad de las ciclinas de tipo D también promueven la formación del neuroectodermo durante la generación de las CMPihs mediante el aumento de la expresión de *PAX-6* [182]. A partir de esto, podríamos especular que las ciclinas de tipo D podrían influenciar en el fenotipo asociado a la expresión de genes en los PN.

Regulación de la *CICLINA E1* en CMPhs y en su progenie neural

Luego, profundizamos el estudio de la regulación del ARNm de la *CICLINA E1* en las CMPhs asincrónicas.

Cabe mencionar que el complejo *CICLINA E1*/CDK2 es considerado el principal complejo ciclina/CDK en CMEmhs. También se encontró que la disminución en la actividad de CDK2 genera un aumento en la duración de la fase G1 lo que establece un perfil de ciclo celular canónico en las CMEmhs, seguido de su diferenciación [183]. Resultados similares se vieron en las CMEhs [55, 57]. Además, se ha determinado que la *CICLINA E1* cumple un rol clave durante la derivación pluripotente de las CMEhs y, potencialmente, también durante el desarrollo normal del embrión [184].

Dado que altos niveles de la actividad de la CDK2 puede ser resultado de los altos niveles de expresión de la *CICLINA E1*, quisimos estudiar las vías de señalización que regulan el ARNm de esta última en CMPhs. Si bien las cascadas de señalización PI3K/AKT y MEK/ERK1/2 cooperan para mantener la pluripotencia de las CMPhs [112, 113], sólo la inhibición de la vía de MEK/ERK1/2 causa la pérdida de la capacidad de auto-renovación y tasa de proliferación [113].

Por otra parte, la vía de señalización PI3K/AKT tiene una relevancia predominante en asegurar la supervivencia de las CMPhs [114]. En consistencia con estos descubrimientos, en el presente trabajo demostramos que solo la vía MEK/ERK1/2, pero no la vía de PI3K/AKT, regula los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* en células creciendo de manera asincrónica.

En cuanto a lo que respecta al estudio de los factores de transcripción que podrían estar regulando los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1*, enfocamos nuestra atención en el factor c-MYC y en la familia de factores de transcripción E2Fs. En el caso de c-MYC, ya ha sido reportado que este factor de transcripción podría tener un rol importante en regular promotores y miRNAs asociados a los genes principales de pluripotencia. Estos hallazgos implican que los genes blancos de la red de regulación de c-MYC juegan un rol esencial no solo en controlar la eficiencia de reprogramación, sino también en mantener la pluripotencia de las células madre [185-187]. Es más, se han identificado blancos directos de c-MYC como las ciclinas, incluyendo la *CICLINA E1*, y las CDKs en las CMEmhs, lo que sugiere un rol de c-MYC en la regulación del ciclo celular de las células madre pluripotentes [115].

Por lo tanto, la ocupación de c-MYC en los promotores de los genes reguladores del ciclo celular podría tener un rol en la rápida división celular tanto de las células madre pluripotentes murinas (CMPms) como las CMPhs. En efecto, encontramos que los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* en las CMPhs disminuían con la inhibición de c-MYC utilizando el inhibidor 10,058-F4. Es importante destacar que la activación de ERK1/2 mejora notablemente la estabilidad de la proteína c-MYC como resultado de una fosforilación directa en la serina 62 [188], lo que sugiere que podría haber un complejo regulatorio con un *loop* de retroalimentación positiva entre c-MYC y la *CICLINA E1*/CDK2 en CMPhs. Sin embargo, deberían hacerse más experimentos para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, es bien sabido que la regulación de la transcripción de la *CICLINA E1* es mediada por sitios de unión a E2F presentes en su promotor. Más aun, la *CICLINA E1* es capaz de estimular su propia transcripción a través de un mecanismo de retroalimentación positiva que involucra la activación de los E2Fs [189, 190]. Particularmente, se ha descrito que el E2F1 es el principal factor de transcripción E2F que involucra directamente la regulación de la *CICLINA E1* [191]. En efecto, utilizamos un inhibidor general de los factores de transcripción E2Fs (pan-E2Fs), y observamos que, en las CMPhs, los niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* parcialmente dependen de la actividad de los E2Fs. En conclusión, encontramos que en las CMPhs asincrónicas, la vía de señalización MEK/ERK1/2 sumado a c-MYC y los factores de transcripción E2Fs, serían responsables, al menos en parte, de los altos niveles de expresión del ARNm de la *CICLINA E1* observados tanto en las CMEhs H9 como en las CMPihs FN2.1.

Por último, decidimos analizar como los niveles proteicos de la *CICLINA E1* son regulados durante las fases S-G2/M, dado que observamos la disminución de la expresión proteica en G2/M tanto en CMPhs y NP. Se ha demostrado, en células somáticas, que frente a un estímulo mitogénico, los niveles de expresión de la *CICLINA E1* (ARNm y proteína) presentan un pico en la fase G1/S y luego la proteína es degradada en las fases S-G2/M del ciclo celular. A partir de nuestros resultados, determinamos este mismo comportamiento periódico en las CMPhs y PN.

Por bibliografía, sabemos que la degradación de la *CICLINA E1* es mediada por, al menos, dos vías distintas de ubiquitinación-proteosoma: una que involucra la ubiquitina ligasa BCR (BTB-Cul-3-Rbx1) cuyo blanco es la *CICLINA E1* monomérica [192] y otra la proteína FBW7 del complejo ubiquitina ligasa F-box Fbw7 (SCFFbw7, Skp1-Cul1-Rbx1-Fbw7) [117]. En células somáticas quiescentes, la *CICLINA E1* monomérica es degradada constitutivamente por medio de la vía mediada por BCR, que no requiere de la fosforilación de la *CICLINA E1* [193]. Por el contrario, en células somáticas proliferativas, en la entrada a la fase S, la fosforilación de la *CICLINA E1* por medio de la CDK2, la prepara para la fosforilación por medio de la GSK-3 β y otras quinasas [194]. Estos eventos de fosforilación crean pequeñas regiones en la *CICLINA E1* que son reconocidas por el complejo SCFFbw7 que media la ubiquitinación de la *CICLINA E1* y, como consecuencia, su rápida degradación proteosomal durante la fase S y G2/M [117, 190, 194, 195].

Dado que estos mecanismos aún no fueron estudiados en CMPhs y en su progenie diferenciada a PN, analizamos la disminución de la expresión de la proteína de la CICLINA E1 al inhibir el proteosoma y/o la CDK2. Con los resultados obtenidos demostramos que, en estos contextos celulares, la CICLINA E1 es degradada por el proteosoma mediante un mecanismo que requiere de la actividad de la CDK2. Por ende, y dado que la fosforilación de la CICLINA E1 por medio de la CDK2 es requerida, la disminución de la expresión de la proteína de la CICLINA E1 en CMPhs y PN parecería estar mediada por el complejo SCFFbw7. Curiosamente, en este sentido, fue reportado que las células progenitoras hepáticas de ratón indiferenciadas no requieren de BCR y, en cambio, utilizan la vía de SCFFbw7 para regular la CICLINA E1 [190, 196]. Las vías de ubiquitinación dependientes de BCR o SCFFbw7, parecen modular los niveles de expresión de la proteína de la *CICLINA E1* en un modo célula y estado de diferenciación dependiente, siendo la vía mediada por SCFFbw7 el mecanismo predominante en células pluripotentes altamente proliferativas o células progenitoras. Además, antes de ser degradada por la vía del proteosoma mediada por SCFFbw7, la CICLINA E1 debe ser fosforilada en motivos conservados llamados CPDs (del inglés, Cdc4 phosphodegrons) [197].

El complejo CICLINA E-CDK2 se autofosforila en los residuos T62, T380 y S384 presentes en los CPDs. GSK3 β , entre otros, fosforila también el residuo T380 [190]. Mientras que la fosforilación de T380 es mayoritariamente constitutiva, el residuo S384 solo puede ser auto-fosforilado por CDK2 y es el interruptor clave para que se inicie la degradación de la ciclina E1 [197].

Dado que la fosforilación del residuo T380 de la CICLINA E1 mediante GSK3 β fue reportada como clave para la degradación de la misma [194], estudiamos el efecto de la inhibición de GSK3 β con un inhibidor farmacológico específico (CHIR99021) y no observamos ni siquiera una reversión parcial de la degradación de la CICLINA E1. Creemos que es posible que, bajo nuestras condiciones experimentales, la actividad de GSK3 β no tendría un rol dominante sobre la estabilidad de la CICLINA E1 mediada por CDK2 dado a los altos niveles de actividad de PI3K/AKT presente en las CMPhs y los PN (estimulada y sostenida por bFGF y EGF respectivamente), que regulan negativamente a GSK3 β .

Siguiendo esta misma línea, y para profundizar aún más en la regulación de la *CICLINA E1* en nuestras condiciones experimentales, quisimos determinar qué miRNAs podrían estar involucrados en la misma. Como hemos ido mencionando lo largo de esta tesis, existen numerosos estudios que han resaltado roles importantes de los miRNAs como reguladores tanto del ciclo celular de las CMPhs, como de la diferenciación [198]. A partir de una búsqueda bibliográfica, encontramos dos miRNAs que fueron estudiados, en particular, en la regulación de la *CICLINA E1*: el miR-27a-3p y el miR-16-5p.

En estos estudios se ha determinado un comportamiento opuesto de estos dos miRNAs. Por un lado, el miR-27a-3p ha sido estudiado principalmente en células cancerígenas donde se ha observado que aumenta la expresión de la CICLINA E1 [119]; y su inhibición ha sido relacionada con el arresto del ciclo celular en la fase G1 [120]. En particular, nos llamó la atención un estudio realizado por Lerner y colegas, donde

estudiaron si la proteína FBW7 es regulada por miRNAs. En dicho trabajo identificaron al miR-27a-3p como uno de los principales supresores de esta proteína y, establecieron que mediante su acción, este miRNA evita la ubiquitinación y degradación de la CICLINA E1 (como mencionamos anteriormente, substrato clave de esta proteína) [121]. En este sentido, y en línea con nuestros estudios sobre la regulación de la degradación de la CICLINA E1, analizamos los niveles de expresión de este miRNA en las CMPhs arrestadas con Afidicolina donde los niveles de expresión de esta ciclina son elevados. Si bien no determinamos diferencias significativas en la expresión de este miRNA en las CMPhs arrestadas en relación al control; en las CMEhs se observa una tendencia a un aumento en la expresión de este miRNA en las células arrestadas.

Como mencionamos previamente, en el presente trabajo determinamos que la degradación de la CICLINA E1 estaría siendo por la vía del proteosoma mediada por la proteína SCFFbw7. En este sentido, consideramos que sería interesante profundizar este estudio, para determinar si este miRNA está involucrado en la regulación de la misma mediante la supresión de la proteína FBW7 tal y cómo describieron Lerner et al.

Por otro lado, estudiamos la expresión del miR-16-5p. El mismo, ha sido descripto como regulador directo de la *CICLINA E1* en diversos cánceres, disminuyendo la expresión de la misma, a nivel de ARNm y proteína, mediante su unión a la región 3'UTR de su transcripto [122-126]. A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, determinamos una posible regulación de la *CICLINA E1* por medio de este miRNA en las CMPihs FN2.1 dado que, la expresión del mismo disminuyó de manera significativa en las células arrestadas con Afidicolina donde los niveles de la *CICLINA E1* son elevados. Si bien la misma tendencia se observó en las CMEhs H9, la misma no fue estadísticamente significativa. Consideramos que sería interesante profundizar este estudio, para poder describir el rol de este miRNA y determinar si el mismo regula efectivamente a la *CICLINA E1*, y si esta regulación es directa, tal como se describió en ciertas publicaciones, o indirecta.

Perfil de expresión temporal de la familia del miR-302, el miR-145 y el miR-296 en el ciclo celular de CMPhs

El ciclo celular representa no solo un mecanismo de división celular finamente orquestado sino que también cumple un rol importante en la regulación de la decisión del destino celular [54]. Como reguladores importantes de esta transición surgen, nuevamente, los miRNAs [198]. Entre ellos encontramos el clúster del miR-302. El mismo, es el clúster de miRNAs más enriquecido en las CMPhs, no solo importante en el mantenimiento de la pluripotencia, sino también, con un rol central en acelerar la transición G1/S y promover la proliferación celular [199]. Por el contrario, los miR-145 y miR-296, son miRNAs que se inducen durante la diferenciación y silencian el programa de auto-renovación y pluripotencia [128, 200].

Si bien se ha logrado un gran progreso en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación del ciclo celular de las CMPhs llevada a cabo por los miRNAs, su expresión temporal a lo largo de las distintas fases del ciclo celular aún se mantienen desconocidas. Más aún, no hay trabajos publicados sobre este tema en CMPihs.

Debido a esto, en el presente trabajo nos propusimos estudiar la expresión temporal del conjunto de miRNAs mencionados en dos líneas de CMPhs, las CMEhs H9 y las CMPihs FN2.1. De nuestros experimentos de arresto (farmacológico) y liberación, podemos concluir que la familia del miR-302, el miR-145 y el miR-296 presentan una expresión periódica a lo largo del ciclo celular de las CMEhs H9 y las CMPihs FN2.1. A partir de estos resultados, proponemos que esta periodicidad permite un mejor control en la progresión del ciclo celular. Además, observamos que los niveles de expresión de la familia miR-302 se inducen en la transición G1/S, probablemente para impedir el inicio de la diferenciación, y los mismos se mantienen elevados en la fase S. Es interesante destacar que observamos un mayor nivel de inducción en la expresión de esta familia de miRNAs en las CMPihs y, considerando su potencial uso en la medicina regenerativa, creemos que sería importante profundizar este estudio.

En el caso de los miR-145 y miR-296, también observamos mayores niveles de expresión de los mismos en la transición G1/S y en la fase S del ciclo celular, al comparar los niveles de expresión en las células que proliferan de manera asincrónica. Algunos estudios concluyen que las células madre pluripotentes son menos susceptibles a las señales de diferenciación las fases S o G2 del ciclo celular en comparación con la fase G1 [201]. Sin un estímulo de diferenciación, probablemente el aumento en la expresión de estos miRNAs asociados a la diferenciación (miR-145 y miR-296) es contra-arrestado por los niveles de expresión mucho mayores de la familia del miR-302. Además, las CMPhs solo se diferencian una vez que disminuye en gran medida la expresión de la familia del miR-302 [202].

Mediante un enfoque basado en un experimento de *micro-array*, el grupo de Lako et al. identificaron miRNAs que presentaban cambios significativos en su expresión entre las distintas fases del ciclo celular de las CMEhs H9. En contraposición a lo que nosotros observamos, ellos no observaron mayores niveles de expresión de la familia del miR-302 en la fase S. Consideramos que esto se debe a que en dicho trabajo utilizaron un límite en las veces de cambio mayor a dos (>2.0 -fold change) para seleccionar aquellos miRNAs expresados de manera diferencial. Si bien las veces de inducción de la familia del miR-302 podría no ser elevada, este incremento podría ser funcionalmente significativo. Para reforzar esta idea, se ha reportado que el clúster del miR-302 representa más del 60% de todos los miRNAs expresados en las CMEhs [203].

Para obtener más información, realizamos un análisis de ontología génica (GO, del inglés *gene ontology*) utilizando un listado de confianza de genes blancos de la familia del miR-302 en las CMEhs obtenido del trabajo de Lipchina et al [203]. En el mismo, mediante un ensayo con la técnica PAR-CLIP (del inglés, *photo activatable ribonucleoside-enhanced cross-linking and immunoprecipitation method*) que permite la captura de aquellos ARNm blancos unidos a la proteína AGO2, seleccionaron un listado de 146 genes

blanco de la familia del miR-302/367 de alta confianza. Estos mismos genes fueron aquellos que, también, en experimentos de inhibición de la familia del miR-302/367 aumentaban de manera significativa su expresión.

Este análisis funcional reveló que hay una sobre representación significativa de genes regulando el ciclo celular, especialmente la transición G1/S del mismo y la proliferación. Esto sugiere que el aumento de la expresión de la familia del miR-302 en la transición G1/S que describimos tendría una relevancia biológica.

También, llevamos a cabo un análisis de ontología génica de un listado de genes blancos de los miR-145 y miR-296 obtenidos a partir de la base de datos *miRWalk* 3.0. Como esperábamos, confirmamos que los genes blanco estimados están involucrados en procesos biológicos relacionados con procesos de diferenciación.

Un entendimiento más global de los miRNAs y del impacto que los mismos tienen en distintos procesos biológicos requerirá de un conocimiento profundo, no solo de los genes blanco de miRNAs específicos, sino también de los factores que regulan su actividad y de las vías que controlan la regulación espacio-temporal de la expresión de estos miRNAs.

Generación de CMN y diferenciación neuronal a partir de las mismas

En el inicio del segundo capítulo, describimos la generación de CMN y su diferenciación a neuronas para establecer parte del modelo de estudio que se utilizó posteriormente.

La generación de CMN *in vitro* es un enfoque prometedor que permite investigar la neurogénesis, modelar enfermedades del Sistema nervioso central y diseñar sistemas de búsquedas de drogas. Dichas células, además, presentan un gran potencial de uso para la medicina regenerativa. En la ciencia básica, la generación de esta población celular *in vitro* es valiosa para estudiar el proceso de inducción neural y la diferenciación de progenitores hacia distintos tipos de neuronas.

Siguiendo esta línea, la fuente más conveniente y aceptable de CMN son las CMPhs. Existen, sin embargo, distintos protocolos para su inducción y posterior diferenciación [204]. En los últimos años, se ha buscado generar protocolos replicables, eficientes y de bajo costo que permitan generar una población de CMN uniformes.

Se han desarrollado distintas estrategias para derivar CMN a partir de CMPhs [18]. Entre ellas, la formación de EBs presenta ciertas desventajas entre las que se destaca una gran variabilidad debido a su tamaño inicial [205]. En este sentido, los protocolos en monocapa eliminan el paso de formación de EBs y, además, presentan la ventaja de que el cultivo está expuesto, de manera más homogénea a los morfógenos y factores de diferenciación y crecimiento [206].

Para la generación de CMN nos basamos, entonces, en un protocolo en monocapa, con un medio de inducción neural sin suero, donde se logra una inducción neural en 7 días. Las mismas no expresaban el marcador de pluripotencia *OCT-4*, y sí expresaban los marcadores propios de las CMN (*SOX-1*, *SOX-2*, *NESTINA* y *PAX-6*). Validamos, de este modo, la identidad de esta población celular.

Es importante destacar que a partir de este protocolo obtuvimos células con un potencial de diferenciación hacia los tres linajes neurales (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos), si bien en la diferenciación oligodendrocítica, obtuvimos células con características de progenitores oligodendrocíticos. Consideramos que, en nuestras condiciones experimentales, los mismos no alcanzaron una maduración completa, y sí demostraron características típicas de lo que el grupo de Pouya et al. caracterizaron como progenitores de oligodendrocitos (estadio III de la diferenciación, según la publicación [138]).

Al diferenciar las CMN (tanto las obtenidas de la línea de CMEhs H9 como de las CMPihs FN2.1) hacia el linaje neuronal, lo hicimos basándonos en un protocolo de diferenciación *in vitro* en el que estas células se cultivan en monocapa y se diferencian durante 14 días. El protocolo de diferenciación neuronal consistió en utilizar un medio Neurobasal suplementado con aminoácidos no esenciales, B27, ácido ascórbico, BDNF y GDNF (estos últimos dos son factores neurotróficos importantes para la diferenciación de distintas poblaciones de neuronas durante el desarrollo [134, 135]). Este protocolo se basó en el trabajos de Yang et al. [129], al igual que el utilizado para la generación de CMN. A partir del mismo, la empresa Invitrogen lanzó un kit comercial a la venta.

Además de confirmar por inmunofluorescencia que las neuronas obtenidas expresan los marcadores neuronales (Tuj-1 y MAP-2); confirmamos la eficiencia de diferenciación. Determinamos, mediante la cuantificación del porcentaje de células positivas para Tuj-1 por medio de una citometría de flujo indirecta, obteniendo un $95,03\% \pm 2,38\%$ de eficiencia para las neuronas obtenidas a partir de las CMEhs H9, y del $96,45\% \pm 0,05\%$ en el caso de las neuronas obtenidas a partir de las CMPihs FN2.1.

Por último, para terminar de validar el modelo celular a utilizar, se le hicieron mediciones electrofisiológicas a las neuronas obtenidas. Las mismas se realizaron en el IBioBA-MPSP; en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Antonia Marin Burgin. La excitabilidad eléctrica requiere de la actividad conjunta de varios tipos de canales iónicos. En especial, los canales iónicos activados por voltaje como lo son los canales de Sodio (Na^+) y potasio (K^+), son importantes en las neuronas porque desencadenan y dan forma a los potenciales de acción. Varios estudios han demostrado que la densidad de estas corrientes en neuronas diferenciadas a partir de CMN aumentan gradualmente durante la diferenciación [207].

Una neurona post-mitótica madura al insertar canales voltaje-dependientes en su membrana plasmática. Por lo tanto, la respuesta de picos (potenciales de acción) de una célula debido a una inyección de corriente puede utilizarse para determinar la etapa de maduración de una neurona en diferenciación. En este sentido, Burman et al. describieron los distintos estadios de potenciales de acción como: pasivo (más inmaduro), pico abortivo, pico único y picos recurrentes (más maduro) [208]. El grupo de Song et al., en

particular, demostró que la frecuencia de disparos de potenciales de acción aumenta progresivamente con la maduración neuronal. En sus resultados determinaron que estas características electrofisiológicas eran casi idénticas entre las neuronas derivadas de CMEhs y las derivadas de CMPihs, demostrando por primera vez, de manera sistemática, que ambos tipos de CMPhs presentan una actividad neuronal similar[209].

En nuestras neuronas, pudimos registrar potenciales de acción y corrientes de Na^+ a los 14 días de maduración. Los perfiles electrofisiológicos observados coinciden con los de neuronas inmaduras observando picos más recurrentes en el caso de las neuronas generadas a partir de CMEhs H9 y un pico único en el caso de las neuronas generadas a partir de las CMPihs, según lo establecido por Burman et al.

Además, nuestros resultados coinciden con lo observado por el grupo de Esposito et al., donde observaron una excitabilidad incipiente en neuronas inmaduras, revelada por la pequeña amplitud de sus potenciales de acción y sus corrientes de ingreso de Na^+ y egreso de K^+ [210]. Autar et al. observaron lo mismo, determinando que a medida que el cultivo progresaba, había un porcentaje de células con disparos de potencial de acción espontáneos y repetitivos, lo que indica un aumento en la excitabilidad neuronal y maduración funcional del cultivo a lo largo del tiempo [211]. Como mencionamos anteriormente, existen reportes de protocolos largos de maduración neuronal [136, 137], pero su realización excede los objetivos de nuestro trabajo.

Identificación del miRNoma en CMPhs tratadas con un inhibidor general de los factores de transcripción E2Fs

La división celular y la progresión del ciclo son controladas por mecanismos que aseguran la transmisión adecuada de la información genética de una generación a otra. Por ende, el control del ciclo celular es un proceso complejo que involucra distintas vías de señalización.

Por muchos años la regulación del ciclo celular ha sido estudiada principalmente debido a su relevancia en enfermedades hiper proliferativas como el cáncer. Actualmente, el interés de la regulación del ciclo celular se ha expandido a otras áreas emergentes en la investigación como es el de las células madre [54].

Los factores de transcripción E2Fs son críticos en la expresión temporal de los genes oscilantes del ciclo celular y en los ARNs no codificantes. La vía RB/E2Fs es importante en la progresión del ciclo celular, mediante la estimulación para que las ciclinas y CDKs de la fase G1 formen complejos. En las CMPhs, muchos de los roles de los distintos complejos RB/E2Fs y los factores que determinan a qué se une cada complejo aún son desconocidos. Existen pocos reportes sobre cómo es la expresión de los factores de transcripción E2Fs en las células pluripotentes y, hasta donde sabemos, no hay información sobre la interacción entre los factores E2Fs y los miRNAs en las CMPhs.

En el presente trabajo estudiamos qué miRNAs son regulados por los factores de transcripción E2Fs en las CMEhs H9 y en las CMPihs FN2.1. Para ello, tratamos a las CMPhs con un inhibidor general de los factores de transcripción E2Fs (pan-E2F) HLM006474 en una concentración de 20 μ M por un periodo de 24 horas. Determinamos que, con esta concentración y tiempo de incubación, se induce un aumento en el porcentaje de células en la fase G1 del ciclo celular y, además, la viabilidad de las CMPhs no se ve comprometida.

Los E2Fs también pueden ser inactivados al inactivar su compañero de dimerización (DP-1, del inglés *dimerization partner*). Un estudio utilizó un dominante negativo de un mutante de DP-1, el cual retiene su dominio de dimerización pero no tiene el del sitio de unión al ADN [212]. Estas mutantes, entonces, secuestran a los factores E2Fs que dependen de las proteínas DPs (del E2F1 al E2F6) de modo que no pueden unirse a los sitios de E2Fs en el ADN. En dicho trabajo, determinaron que esta mutante DP-1 induce un arresto de G1 en el ciclo celular. Del mismo modo, en otro estudio, la eliminación de DP-1 mediante el uso de shARN (del inglés, *small hairpin RNA*) también induce arresto del ciclo celular [213]. Esta información sugiere que los E2Fs deben unirse al ADN para poder estimular la proliferación, lo cual va en línea con lo que observamos en nuestros experimentos al utilizar el inhibidor HLM006474 dado que, el mismo, inhibe la unión al ADN de los complejos E2Fs.

Luego, a partir de las CMEhs H9 tratadas con el pan-E2F, realizamos un análisis de ARN-*seq* de pequeños ARNs, y determinamos aquellos expresados diferencialmente entre las células inhibidas en relación a las CMEhs control. Encontramos a partir de este análisis, 52 miRNAs expresados diferencialmente. De este listado, encontramos algunos miRNAs que fueron relacionados con la familia de los E2Fs en otras líneas celulares, y miRNAs cuya relación con estos factores de transcripción o con el ciclo celular de las CMPhs nunca fue descripta.

En particular, destacamos a los miR-19a y miR-19b. Los miR-19a y miR-19b-1 son codificados por el clúster miR-17-19 localizado en el gen MIR17HG/C13orf25 del cromosoma 13 humano, mientras que el miR-19b-2 es codificado por el clúster miR-106a-363 localizado en el cromosoma X humano. Si bien los miR-19b-1 y miR-19b-2 se transcriben a partir de distintos genes, presentan la misma secuencia madura a la cual se la refiere comúnmente como miR-19b. Se ha descripto que los E2F1, E2F2 y E2F3 se unen de manera directa al promotor del gen C13orf25 activando su transcripción en células HeLa. También que el factor E2F1 puede activar la transcripción del clúster miR-106a-303. A su vez, se ha descripto que el clúster miR-17~92 puede disminuir la expresión del factor de transcripción *E2F1* generando así una retroalimentación negativa en la red de regulación transcripcional [141]. Esta información va en línea con nuestros resultados donde vemos, en las células tratadas con el inhibidor de los E2Fs, una disminución en la expresión de estos miRNAs en relación al control. Esto sugiere que estos miRNAs estarían siendo regulados por alguno/s de los factores de transcripción E2Fs en estas líneas de CMPhs.

Posteriormente validamos estos cambios de expresión determinados en la secuenciación de manera experimental en algunos de estos miRNAs candidatos (miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-4454, miR-1260a, miR-1260b, miR-454-3p y miR-301a-3p) tanto en CMEhs H9 como en CMPihs FN2.1.

Además, estudiamos los genes blanco predichos de estos miRNAs mediante un análisis de ontología génica. A partir del mismo determinamos que los mismos estarían regulando genes, directa o indirectamente, involucrados en las distintas vías de diferenciación y desarrollo. Entre dichos términos se especifica, también, la diferenciación y desarrollo neuronal. Diversos estudios han demostrado que los miembros de la familia del miR-19, entre los que se destacan los miR-19a y miR-19b, tienen un rol importante en la regulación del desarrollo del sistema nervioso, cardiovascular, la formación de vasos sanguíneos, entre otros. Además, se ha descrito un rol clave en la diferenciación, supervivencia y migración de las neuronas [141]. También existen trabajos que describen que el miR-19a inhibe la diferenciación de las CMN a neuronas al regular de manera negativa al gen *NEUROGENINA 1* [214]; y que el miR-19b promueve la proliferación de progenitores neurales mediante la regulación de la expresión del gen *PTEN* [215, 216].

En cuanto a los otros miRNAs, no encontramos reportes sobre los mismos y su relación con los factores de transcripción E2F o las células madre pluripotentes. La mayoría de los mismos fueron estudiados en distintos cánceres. En particular esta descrito que el miR-1260b tiene como gen blanco a *SFRP1* (del inglés, *Secreted Frizzled-related protein 1*) y, mediante su silenciamiento, activa la vía de Wnt/ β -catenina en un modelo de adenocarcinoma [217]. Se ha descrito, también, que el miR-454-3p tiene como blanco este gen y es capaz de activar esta vía y promoviendo la metástasis en cáncer de mama [218]. Esta vía, como mencionamos anteriormente, determina la mayor parte de los procesos de desarrollo en el estado embrionario y regula el mantenimiento, auto-renovación y diferenciación de las células madre del tejido adulto de los mamíferos. Sería interesante profundizar el estudio de estos miRNAs y poder determinar si los mismos regulan esta vía en nuestro modelo experimental.

El miR-301a-3p, por otro lado, fue reportado como regulador de la proliferación mediante su gen blanco *PTEN*, en células escamosas esofágicas [219], y *RUNX3* (del inglés, *run related transcription factor 3*) en cáncer de próstata [220]. En nuestros experimentos observamos una disminución en la expresión de este miRNA en las CMPhs tratadas con el inhibidor donde, a su vez, vimos un aumento en el porcentaje de células en fase G1 del ciclo celular. Siguiendo esta línea de pensamiento, consideramos que podría estudiarse el aporte de estos miRNAs en la regulación de la proliferación de las CMPhs.

Identificación del miRNoma en la diferenciación neuronal y generación de CMN a partir de CMPhs

Las CMN, como describimos anteriormente, son un subgrupo de precursores indiferenciados que mantienen la habilidad de proliferar y auto-renovarse, y tienen la capacidad de dar origen a los linajes neuronal y de glía en el sistema nervioso. La neurogénesis, iniciada desde CMN y que da como resultado neuronas nuevas funcionales, es un proceso fundamental tanto para el neuro-desarrollo embrionario como para la plasticidad del cerebro adulto.

El proceso de generar una neurona funcional, incluyendo la auto-renovación de CMN, la especificación del destino celular, migración neuronal, maduración e integración, es regulado por el juego dinámico entre los factores de transcripción, el control epigenético, los miRNAs y las señales celulares extrínsecas del nicho en el que las células madre residen. En particular, se ha reportado que los miRNAs resultan relevantes durante la neurogénesis modulando la proliferación, diferenciación, maduración y migración celular [221].

Más aún, el estudio del rol de estos miRNAs durante la neurogénesis a partir de células pluripotentes (CMEhs y CMPihs) está en sus comienzos. Es muy probable que exista una red compleja en la cual determinados miRNAs, algunos quizás no conocidos o no descriptos en este contexto celular, orquesten el patrón de expresión neural durante la diferenciación. Hay miRNAs que pueden actuar en distintos estadios de los linajes de las células madre con diversas funciones en la promoción o represión de la diferenciación [222].

En un primer momento, la mayoría de los estudios donde se analizaba el rol de los miRNAs durante la neurogénesis se realizaron utilizando modelos animales [223]. Con el advenimiento de las CMPhs y la posibilidad de diferenciar estas células en CMN y, luego, en neuronas, surgió la oportunidad de estudiar el rol de estos miRNAs durante la determinación del destino neural en un contexto humano. En este sentido, se abrieron nuevos caminos para la generación de distintos tipos celulares neurales humanos que, previamente, eran difíciles de conseguir.

Dado que los miRNAs están emergiendo como factores importantes durante la especificación del subtipo neuronal *in vivo*, los mismos podrían ser utilizados como herramientas adicionales para modular las decisiones hacia el destino celular neuronal. Los primeros en observar esto fueron Kim et al. [224], quienes reportaron que la inhibición del miR-133b resultó en un aumento en la diferenciación dopaminérgica de las CMEm. A pesar de los grandes avances en el campo, aún existen muchas preguntas que hacer.

Actualmente, debido al desarrollo de la secuenciación masiva, no solo se asignarán nuevas funciones a los miRNAs existentes sino que también, nuevos miRNAs serán identificados y su rol en la neurogénesis

estudiado. Un ejemplo reciente es el descubrimiento del miR-3099 y su rol en la diferenciación neural [225].

En el presente trabajo, para encontrar posibles miRNAs candidatos involucrados en la diferenciación neuronal de CMPhs, determinamos, en primer lugar, el perfil de expresión de los mismos en CMEhs (H9), CMN generadas a partir de células H9 y neuronas diferenciadas a partir de estas CMN por medio de una secuenciación masiva de pequeños ARNs.

A partir de dicho análisis, pudimos establecer el miRNoma de cada población celular, determinando en primer lugar el número de miRNAs expresados en cada población.

Luego, y mediante un mapa de calor, pudimos visualizar el perfil de expresión en cada una de ellas (y en sus tres réplicas), observando un perfil bien definido en cada caso. Al comparar la expresión entre las tres poblaciones, se pudo observar una similitud mayor entre las CMN y las neuronas en comparación con las CMEhs. Esto sería un indicio de que estas poblaciones celulares presentan una identidad más similar lo cual se ve reflejado en la dinámica de expresión de los miRNAs.

En un estudio realizado por Kumar y colaboradores, diferenciaron CMN a partir de CMPihs para medir el miRNoma, y en particular, los ARNm expresados en cada una de estas dos poblaciones celulares. Si bien, en un análisis de correlación, estas poblaciones demostraron una alta superposición global en su transcriptoma, probablemente, por compartir características como la auto-renovación; los mapas de calor y análisis de componentes principales que llevaron a cabo entre las mismas demostraron un patrón discreto y uniforme, tanto el miRNoma como el transcriptoma, para cada estadio celular. Si bien en dicho estudio no estudiaron la diferenciación neuronal de estas células, este último resultado coincide con el patrón distintivo entre CMEhs y CMN que nosotros observamos, y cabe destacar, este grupo utilizó para la generación de las CMN el mismo kit de inducción que nosotros utilizamos [226].

Esta diferencia también la observamos en el análisis de expresión diferencial de los miRNAs entre las poblaciones celulares mencionadas. En el mismo, determinamos aquellos miRNAs expresados diferencialmente en cada para de comparación (CMEhs vs. CMN; CMEhs vs. NEU y CMN vs. NEU); y en esta última comparación fue en la que se observó el menor número de miRNAs expresados diferencialmente, volviendo a ponerse en evidencia una mayor similitud entre las CMN y Neuronas en relación a las CMEhs.

Nuevamente, en el análisis de expresión diferencial realizado por Kumar et al., describieron 51 y 4033 miRNAs y ARNm expresados diferencialmente entre las CMPihs y CMN que estudiaron [226]. Describen este repertorio de miRNAs como un número menor al obtenido en estudios previos y, atribuyen esta diferencia, posiblemente al tamaño de la muestra, tipo de diferenciación y metodología. Ha sido descripto que el tamaño de la muestra afecta los resultados dado que, pequeños tamaños de muestra resultan, muchas veces, en listas de genes con poca precisión de predicción [227].

Esto podría ser algo a tener en cuenta al comparar nuestros resultados de expresión diferencial entre estas dos poblaciones, donde el número de miRNAs expresados diferencialmente fue mayor (728) con el mismo FDR. El punto de corte de las veces de inducción utilizado es otro valor que debe tomarse en cuenta para comparar estos resultados.

A partir de este mismo análisis, también, pudimos determinar 5 clústeres distintos que reflejan 5 perfiles de expresión a lo largo de las tres poblaciones celulares. Consideramos que esto podría ser reflejo de las complejas redes de regulación que orquestan los miRNAs en el proceso de diferenciación neuronal. Diversos estudios han demostrado su rol crítico en la regulación de la expresión de genes a través de los distintos estadios de la neurogénesis, desde el mantenimiento de la pluripotencia en el estado de CMEhs hasta el establecimiento de los fenotipos neurales [85].

Consideramos que el entendimiento de estos procesos regulatorios involucrados en la diferenciación y el rol regulatorio de los miRNAs en estas transiciones celulares es crítico para mejorar la diferenciación neuronal *in vitro* a partir de CMPs.

Debido al aumento en el conocimiento de la biología de los miRNAs y el modo en el que ejercen su función, los mismos pueden clasificarse en dos tipos de grupos: familias (miRNAs que comparten la misma secuencia semilla) o clústeres (miRNAs que están ubicados muy cerca en el genoma). Así, miRNAs de un mismo clúster o familia podrían tener una relación funcional mediante la co-regulación o la regulación coordinada de procesos biológicos [228]. En este sentido, nos pareció interesante identificar las familias de miRNAs presentes en la lista de miRNAs expresados diferencialmente. Entre los nombres de las familias expresadas diferencialmente, encontramos algunas reportadas, por otros grupos, como familias up-reguladas en CMN como lo son la familia del miR-10, miR-30, miR-23 y miR-170 [226, 229]. El rol de las mismas ha sido relacionado con la promoción de la auto-renovación y estado indiferenciado de las CMN [226].

De este listado, y a partir de un análisis bibliográfico, nos encontramos con una familia, la del miR-216, que se expresa diferencialmente en los pares de comparación CMEhs vs. CMN y CMEhs vs. NEU. La misma resultó formar un clúster con el miR-217: el clúster miR-216/217. Profundizaremos su análisis en la siguiente sección dado que fue nuestro candidato de estudio.

Por último, validamos experimentalmente los resultados obtenidos en nuestro análisis de la secuenciación masiva de pequeños ARNs al medir la expresión de miRNAs ya descriptos como importantes en la diferenciación neuronal [229] por RT-qPCR, obteniendo el perfil de expresión esperado de los mismos.

Estudio del clúster miR-216/217 en la diferenciación neuronal a partir de CMPhs

Como mencionamos anteriormente, a partir del análisis de expresión diferencial de nuestros datos de secuenciación masiva de pequeños ARNs, encontramos a la familia del mir-216. La misma consiste en cuatro miembros (miR-216a-5p/3p y miR-216b-5p/3p) (MIPF0000054 *family accession*, *miRBase*). Esta familia de miRNAs se encuentra localizada en el cromosoma 2p16 y junto con el miR-217 (miR-217-5p/3p) forman el clúster miR-216/217.

En humanos, los genes de estos miRNAs están localizados a lo largo de una región de ~ 18 kpb y dentro del ARN no codificante MIR217HG (del inglés, MIR217 host gene). Este clúster se ha descrito como específico de cordados [146], y existen diversas publicaciones que asocian a algunos miembros de este clúster con distintos cánceres, en general como supresores de tumores.

En particular, han sido descritos como miRNAs anti-tumorales en células de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, del inglés *pancreatic ductal adenocarcinoma*) dado que la expresión ectópica de los mismos reducía la agresividad de estas células [153]. También se le atribuyó este rol en cáncer colorrectal al miR-216a, donde el grupo de Zhang y colaboradores demostraron que su sobre-expresión disminuía la migración e invasión de estas células *in vitro*, e inhibía la metástasis *in vivo* [154]. En tejido de células no-pequeñas de cáncer de pulmón se vio una baja expresión del miR-216b en comparación con la observada en tejido sano adyacente y, se demostró, que este miRNA inhibe la proliferación e invasión de estas células mediante la inhibición de su gen blanco SOX-9 [230].

Por el contrario, se demostró que el miR-216a actúa como un oncogén en células de carcinoma renal, promoviendo la proliferación celular, viabilidad y motilidad de las mismas, y suprimiendo la apoptosis [148]. Lo mismo se vio en relación a este miRNA en cáncer pancreático, donde determinaron que la inhibición del mismo aumentaba la apoptosis y disminuía la proliferación de estas células [152]. Siguiendo esta línea, también se determinó una alta expresión de este clúster en tejidos de glioblastoma, principalmente en el tipo pro neural [155]. Los datos del grupo de Zhang et al., por el contrario, demostró que la expresión de los mismos disminuía en tejidos de gliomas humanos en comparación con tejido sano, y que el miR-216b inhibía la migración e invasión celular de estas células mediante la supresión del gen FoxM1 [231]. Estos resultados ponen en evidencia las diferencias de expresión y función que pueden tener los miRNAs dependiendo del contexto celular, tejido, entre algunas de las variables posibles.

En nuestros resultados, en particular, determinamos que el clúster miR-216/217 estaba altamente expresado en CMN y neuronas, pero no encontramos niveles de expresión medibles en las CMEhs H9. En el mismo sentido, Kulcenty, K., et al estudiaron el perfil de expresión de los miRNAs durante la diferenciación neural a partir de CMPihs, y si bien no profundizan su estudio, mencionan al miR-217 como uno de los 20 miRNAs más *up-regulados* en CMN. Para la generación de estas CMN utilizaron el

mismo kit comercial que nosotros utilizamos, lo que le da robustez, al menos parcialmente, a nuestros resultados [229].

Estos resultados nos llevaron a pensar que el clúster miR-216/217 podría estar involucrado en la regulación de la diferenciación neuronal de CMEhs. Además, al analizar datos bioinformáticos publicados de diferenciaciones de CMEhs a mesodermo y endodermo, no encontramos una inducción de los niveles de expresión de este clúster de miRNAs en estas diferenciaciones hacia estos linajes específicos. Sí encontramos datos que muestran una alta expresión de este clúster en células tipo β diferenciadas de CMEhs, lo cual coincide con varios trabajos publicados donde describen a estos miRNAs como enriquecidos en el tejido pancreático [147, 152]. Tampoco encontramos datos bibliográficos de este clúster en relación a la diferenciación neuronal a partir de CMPhs o la regulación de la pluripotencia en estas células.

Debido a esto, uno de nuestros principales objetivos es elucidar el rol de este clúster de miRNAs a lo largo de la diferenciación neuronal de CMPhs, estudiando y modulando su expresión.

En primer lugar, validamos de manera experimental los resultados bioinformáticos obtenidos en el análisis de la secuenciación masiva de manera experimental en las CMEhs H9, y extendimos este análisis a las CMPihs FN2.1. Corroboramos así los resultados obtenidos en la secuenciación y determinamos, además, el mismo perfil de expresión que del clúster miR-216/217 en las CMPihs y las CMN y neuronas generadas a partir de las mismas.

A continuación, analizamos los genes blanco (target) del clúster miR-216/217, determinando que existe una compleja red de interacción entre los mismos y todos los miRNAs miembros del mismo, algunos de los cuales son blanco de un solo miRNA y otros genes blanco son regulados por más de uno de ellos.

A partir del análisis de la ontología génica del listado obtenido de los genes blanco de estos miRNAs, determinamos que los mismos estarían regulando procesos relacionados con el ciclo celular, incluyendo la regulación de distintas CDKs, como así también distintos procesos asociados con la fosforilación de proteínas.

Si bien este análisis es exploratorio y fue realizado con herramientas bioinformáticas, el resultado coincide con bibliografía publicada en relación al rol de estos miRNAs en algunos cánceres.

En este sentido, se ha demostrado, por ejemplo, que la expresión del miR-216b estaba reducida en cáncer de mama, y mediante la inhibición de su gen blanco histona deacetilasa 8 (*HDAC8*, del inglés *histone deacetylase 8*) inhibía la proliferación y la progresión del ciclo celular de estas células. En este trabajo mencionan que la vía de señalización Wnt/ β -catenina es un mecanismo molecular importante que inicia el proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT, del inglés *epithelial-mesenchymal transition*), y que *HDAC8* activa potencialmente esta vía. Proponen, entonces, que los efectos del miR-216b como supresor de tumores podría estar relacionado a su acción sobre genes que influyen el proceso de EMT como *HDAC8* [232].

Algo similar observó el grupo de He et al., estudiando el rol del miR-216b en células de cáncer cervical. Determinaron que este miRNA podía inhibir la proliferación de las mismas mediante la inhibición directa de su gen blanco *FOXM1*, el cual se ha demostrado ser un componente río debajo de la vía Wnt/ β -catenina. En particular, estudiaron el efecto de la expresión del miR-216b en la expresión de genes del ciclo celular relacionados con *FOXM1*, incluyendo a P21 (regulado negativamente por FOXM1), RB y p-RB (regulador indirecto río arriba de FOXM1), y la *CICLINA D1* (que puede ser regulada positivamente por FOXM1); y en los transcriptos de otros genes blanco río debajo de la vía de β -catenina/Wnt: *CICLINA D1*, *c-MYC* y *LEF1*. Determinaron que, con la sobre-expresión de este miRNA, la expresión de los genes blanco río-abajo de la vía de Wnt/ β -catenina disminuían mientras que la de P21 aumentaba, y los niveles de fosforilación de RB disminuían significativamente. Confirmaron así, que este miRNA podía afectar la proliferación de las célula de cáncer cervical mediante la regulación de factores de división relacionados con *FOXM1* [233].

En conjunto, estos resultados de ontología génica sugieren que este clúster podría estar regulando, mediante la acción sobre sus genes blanco, la proliferación de las CMN y neuronas inmaduras en nuestro modelo experimental.

Luego, a partir de datos bioinformáticos de *ARN-seq* de diferenciaciones neuronales a partir de CMPhs publicados por distintos grupos, obtuvimos un listado de genes que comparamos con el listado de genes blanco del clúster del miR-216/217 obtenido del miRWalk. De la intersección entre los mismos obtuvimos 56 genes blanco candidatos presentes en todas las listas. De este modo, buscamos investigar que genes predichos como genes blancos del clúster del miR-216/217 presentan, además, una expresión diferencial en diferenciaciones neuronales a partir de CMPhs publicadas. Al explorar estos resultados buscaríamos determinar si alguno podría ser un candidato de interés para profundizar su estudio de un modo más directo (medir si su expresión se modifica al modular la expresión del/los miRNA/s).

De este análisis de expresión diferencial, obtuvimos 5 genes candidatos: *WEE1*, *ANLN*, *RREB1*, *COL4A4* y *GRIA3*. Luego, determinamos la expresión de estos genes candidatos en nuestras poblaciones celulares (CMEhs H9, CMN y neuronas generadas a partir de estas).

En el caso del gen *WEE1*, observamos una inducción significativa del mismo en las CMN en relación a las CMEhs H9; y una disminución de su expresión en las neuronas en relación tanto a las CMN como a las CMEhs H9. Como mencionamos anteriormente, esta quinasa regula la transición G2/M del ciclo celular, mediante una fosforilación inhibitoria en CDK1. Existe evidencia sobre un mecanismo regulatorio único en la fase G2 que determina la competencia de la diferenciación de las CMEhs. El mismo fue descripto por el grupo de VanOudenhove et al.; donde observaron que ocurre una pausa en la fase G2 del ciclo celular durante la diferenciación a determinados linajes, y que la misma es regulada por *WEE1*. Determinaron que en las diferenciaciones a endodermo y mesodermo existe esta pausa en la fase G2 y un aumento en la expresión de *WEE1*, pero sólo la diferenciación a endodermo se ve comprometida como consecuencia de la inhibición de este gen [234]. A pesar de que en dicho trabajo no se especifica nada

sobre la diferenciación a ectodermo, este mecanismo de acción de *WEE1* podría tener sentido en nuestro modelo. Al investigar sobre miRNAs reportados cuyo target fuera este gen, encontramos a los miRNAs: miR-195, miR-516-3p y miR-128a [99, 235]. Buscamos, entonces, los niveles de expresión de estos miRNAs en nuestros datos de secuenciación, encontramos que los miRNAs miR-195 y miR-516-3p se encuentran poco expresados en las CMN y NEU, mientras que el miR-128-3p presenta una alta expresión en estas células. Teniendo en cuenta esto, consideramos que sería interesante investigar la regulación de *WEE1* en nuestro modelo, y determinar si el mismo es regulado por el clúster miR-216/217 o por alguno de sus miRNAs, o si el miR-128-3p podría ser el causante de su regulación.

Por otro lado, observamos que no hubo un cambio significativo en la expresión de los transcriptos de *ANLN* y *RREB1* en las CMN en relación a las CMEhs; pero si la misma disminuyó en las neuronas en relación a estas últimas. Al investigar en bibliografía, encontramos que se ha reportado en algunos trabajos sobre cáncer pancreático que este gen es un target directo del miR-217. Uno de estos grupos de investigación, además, observó que células de cáncer de mama que tenían delecionado el gen de *ANLN*, dejaban de presentar características de pluripotencia[236, 237]. A partir de esta información, consideramos sería interesante determinar si este gen es target directo también del miR-217 en nuestro modelo, y si su inhibición podría estar involucrada en la regulación de las propiedades de pluripotencia en las CMEhs.

En cuanto a *RREB1*, además de nuestra predicción bioinformática donde *RREB1* apareció en el listado de genes predichos para el clúster, no encontramos publicaciones en donde reporten esto de manera experimental. Nos llamó la atención una publicación que reportó que el miR-217 tiene como target directo a *K-RAS* y que, a su vez, K-RAS (del inglés, *Kirsten rat sarcoma virus*) induce la expresión de *RREB1*, por lo que una disminución de *K-RAS* tendría como consecuencia una falta de inducción de la expresión de *RREB1*. Esto nos genera la pregunta si en nuestro modelo la disminución de *RREB1* en las neuronas podría deberse a la acción directa o indirecta del miR-217 [238].

Al analizar la expresión de *COL4A4*, determinamos una disminución de la expresión del transcripto tanto en las CMN como en las neuronas en relación a las CMEhs H9. No encontramos información específica sobre este gen en la pluripotencia o en la neurogénesis; o sobre miRNAs que lo regulan.

Finalmente, analizamos la expresión de *GRIA3* y determinamos una disminución significativa del transcripto del mismo en las CMN en relación a las CMEhs, mientras que no hay diferencia significativa en la expresión del mismo en las neuronas en relación a las otras poblaciones celulares. En el análisis de las secuenciaciones, este gen presentó una alta expresión en el último día de la diferenciación a progenitor de cerebro anterior en relación a los primeros días de diferenciación; y una alta expresión, también, en las neuronas en relación a las CMPihs de las que se diferenciaron (secuenciaciones 5 y 6). Estos últimos resultados refuerzan el rol importante de este gen en la neurogénesis. Además, se ha reportado que una mutación puntual en este gen genera discapacidad intelectual y retraso en el desarrollo [239]. Habría que

determinar si la disminución de la expresión que observamos en las CMN podría depender de la función del clúster miR-216/217 o de alguno de sus miembros.

Consideramos que los resultados aquí expuestos, abren diversos caminos posibles a explorar. En particular consideramos que sería interesante, no solo determinar si hay una acción directa o indirecta del clúster miR-216/217 o de alguno de sus miembros en la regulación de los transcriptos mencionados, sino también extender este análisis a las proteínas de los mismos para determinar su expresión en estas poblaciones.

En línea con esta idea, decidimos modular la expresión de los miRNAs y proceder a realizar algunos ensayos funcionales. Para ello, trabajamos primero con las moléculas sintéticas *mimics/inhibitors* del miR-217-5p dado que fue uno de los miembros del que mayor bibliografía encontramos y, más importante, que presenta genes blanco experimentalmente validados, algunos de los cuales coinciden con los genes blanco que nosotros postulamos como candidatos de estudio en nuestro modelo.

Luego, medimos el efecto de la modulación de las mismas en el ciclo celular de las CMN. Determinamos que, tanto el tratamiento con el *mimic* o el *inhibitor* del miR-217-5p no generó cambios significativos en el perfil del ciclo celular de estas células en relación a las células transfectadas con el *mimic/inhibitor* control.

En el caso de las CMPhs, trabajamos solo con el *mimic* dado que en estas poblaciones celulares este miRNA no se expresa por lo que el uso del inhibidor no tiene sentido. Al analizar el perfil del ciclo celular en las células transfectadas con esta molécula, identificamos un aumento significativo en la fase G1, tanto de las CMEhs H9 como de las CMPihs FN2.1 en relación a las células control. Este resultado nos pareció muy interesante, y creemos que, debido a esto, vale la pena profundizar el estudio de los genes target predichos para este miRNA, sobre todo aquellos relacionados con la proliferación y el ciclo celular. En particular, el gen blanco candidato *WEE1*, el cual mencionamos regula un mecanismo regulatorio único en la fase G2 que determina la competencia de la diferenciación de las CMEhs [234]. En este sentido, y dado nuestros resultados, sería interesante determinar si este cambio en el perfil del ciclo celular podría ser causa del mecanismo de acción de este gen y si la regulación del mismo es modulada por el clúster del miR-216/217 o alguno de sus miembros.

Además, y teniendo en cuenta los trabajos mencionados previamente de Menbari et al [232] y He et al [233], donde observaron una disminución en la proliferación y progresión del ciclo en células cancerígenas de mama y cervical respectivamente, debido a la acción del miR-216b sobre distintos genes blanco (*HDAC8* y *FOXM1*). Ambos genes siendo componentes río abajo o arriba de la vía de β -catenina/Wnt, la cual es importante en la proliferación celular. Teniendo en cuenta esto, consideramos que sería interesante también, como perspectiva futura, explorar los componentes de esta vía en nuestro modelo experimental y bajo la modulación de los miRNAs del clúster en estudio.

A continuación, determinamos si la inducción de la expresión de este miRNA en las CMPhs tiene un efecto en la viabilidad celular. Se describió, en células de cáncer colorrectal, que el miR-217-5p induce apoptosis mediante la inhibición de sus genes blanco *PRKCI* (del inglés, *protein kinase c iota type I*), *BAG3* (del inglés, *BAG family molecular chaperone regulator 3*), *ITGAV* (del inglés, *integrin subunit alpha v*) y *MAPK1* (del inglés, *mitogen-activated protein kinase 1*), genes involucrados en la vía de señalización ERK-MAPK.

A partir de nuestros experimentos concluimos que la inducción de este miRNA en ambas CMPhs no afecta de manera significativa su viabilidad celular.

Luego, analizamos el efecto de la sobre-expresión del miR-217-5p en las CMPhs en los niveles de expresión de los principales genes de pluripotencia (*OCT-4* y *NANOG*) y los marcadores de CMN *PAX-6* y *SOX-1*. Hay algunos trabajos publicados que reportan a algunos de estos miRNAs como reguladores de la expresión de marcadores de pluripotencia. En particular, el trabajo de Roscigno et al., identificó al miR-216a-5p como un regulador negativo de las propiedades de pluripotencia. Determinaron que la expresión de este miRNA estaba disminuida en los cultivos de células madre en cáncer de mama. Para obtener poblaciones de células madre, pusieron a cultivar en suspensión distintas líneas de cáncer de mama, y en esta condición, las mismas se enriquecen en células madre y crecen como mamó-esferas. Determinaron, entonces, en estos cultivos que la sobre-expresión de este miRNA disminuía la expresión proteica de los marcadores de pluripotencia *NANOG* y *SLUG* y el marcador de la transición EMT *VIMENTINA*. También, al analizar la modulación de este miRNA en células de mama diferenciadas observaron que la *down*-regulación de este miRNA aumentaba la capacidad de las mismas de formar mamó-esferas; mientras que su sobre-expresión disminuía su capacidad de formar células madre, lo cual lo determinaron por estos ensayos de formación de mamó-esferas [149].

En línea con este reporte, otro grupo de investigación determinó también en cáncer de mama el miR-216a-5p era blanco del ARN largo no codificante DANCR (del inglés, *differentiation antagonizing non-protein coding RNA*), y mediante su inhibición, promueve la proliferación celular, invasión y migración. Demostraron también que la inhibición de este miRNA aumenta los niveles de las proteínas *NANOG*, *OCT-4* y *SOX-2* [240].

Consideramos que estos resultados tienen sentido con lo que observamos en nuestro modelo experimental donde la expresión de este clúster no es medible en las poblaciones de CMPhs que son las que presentan altos niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia. Sería interesante determinar si la inducción de la expresión de este clúster de miRNAs en las CMN y neuronas generadas a partir de estas CMPhs tiene que ver con una *down*-regulación de estos marcadores de pluripotencia en estas dos últimas poblaciones celulares mencionadas.

A partir de nuestros análisis de la expresión de estos genes por RT-qPCR pudimos determinar una disminución significativa de la expresión del transcripto de *OCT-4* en las CMEhs H9 tratadas con el

mimic del miR-217. Consideramos que sería interesante profundizar el estudio de este cambio y, en primer lugar, determinar si el mismo ocurre también a nivel proteico.

Finalmente, y dado la investigación que llevamos a cabo sobre los genes blancos candidatos seleccionados, determinamos si había un cambio en la expresión de los mismos al modular la expresión del miR-217-5p. De este modo buscamos determinar si los cambios de expresión de los mismos en las distintas poblaciones celulares podrían estar siendo regulados de manera directa o indirecta por este miRNA. Incluimos en dicho análisis tres genes: *SIRT1*, *FGFR1* y la *CICLINA D1*, que por bibliografía encontramos eran genes blancos directos reportados, o regulados de manera indirecta, reportados de este miRNA [166-168, 241].

A partir de estos experimentos observamos una disminución significativa en la expresión del transcripto de *GRIA3* en las CMEhs H9 tratadas con el *mimic* del miR-217 en relación a las células control. Este comportamiento coincidiría con lo que observamos en las CMN, donde determinamos una disminución de la expresión de este gen y, donde sabemos, la expresión de este miRNA se induce.

En el caso de las CMPihs, determinamos una disminución significativa en la expresión de los transcriptos de *WEE1*, *SIRT1* y la *CICLINA D1* en las células con sobre-expresión del miR-217 en relación al control. Los resultados obtenidos en relación a los genes de *WEE1* y la *CICLINA D1* que, como mencionamos previamente, están involucrados en la regulación de la progresión del ciclo celular, podrían ir en línea con el aumento observado en el porcentaje de la fase G1 en las CMPhs tratadas con el *mimic* de este miRNA. En este sentido, sería interesante profundizar el análisis de la regulación de estos genes y su función en la regulación del ciclo celular.

Creemos que estas diferencias observadas entre las CMEhs y las CMPihs son un punto importante a tener en cuenta. Si bien las CMPihs se asemejan a las CMEhs tanto morfológica como funcionalmente, existen varias publicaciones que debaten las diferencias en la expresión génica entre estos tipos de líneas celulares y llevan a cuestionar la equivalencia de las mismas [242, 243].

A pesar de que el perfil global de expresión entre las CMEhs y las CMPihs es similar, se han reportado diferencias sutiles en la expresión de ARNm y miRNAs entre las mismas. Algunas de estas diferencias se han relacionado con la “memoria epigenética” de la célula somática de origen de las CMPihs. Este término se refiere a las marcas epigenéticas del tipo celular de origen en las CMPihs resultantes, lo que afectaría su expresión génica. Estas diferencias en la expresión génica, indicativas de una memoria epigenética, han sido demostradas en CMPihs derivadas de fibroblastos, tejido adiposo y queratinocitos así como en CMPims [243].

El grupo de Parrota et al., por ejemplo, realizó un análisis comparativo entre una línea de CMPihs reprogramada a partir de fibroblastos y la línea de CMEhs H9; para identificar patrones bioquímicos específicos de cada una de ellas. En dicho estudio determinaron que, si bien en términos generales ambas líneas presentan un comportamiento similar, existen ciertas diferencias. Hipotetizan, también, que el

background epigenético distinto entre ambos tipos de líneas celulares podría jugar, al menos en parte, un rol importante [242].

En otro estudio compararon el metiloma de ADN entre las CMPihs y las CMEhs con una resolución de base única. A partir del mismo determinaron que si bien los patrones de metilación entre ambas líneas eran similares, identificaron ciertas regiones con una metilación distinta [244].

Consideramos que las diferencias que pueden existir entre ambos tipos de CMPihs, debido a el perfil epigenético y de metilación propio de cada línea, podría influir en la modulación diferencial que observamos en la expresión de los genes que estudiamos.

Otra explicación posible, podría ir en línea con diferencias en los genes blancos de los miRNAs entre distintas líneas celulares. En este sentido, un estudio comparó grupos de genes reprimidos por los mismos miRNAs en distintas líneas celulares y tejidos, reportando que la mayoría de los genes blancos no presentaban diferencias en su expresión, y que las diferencias en la expresión detectadas podrían atribuirse a efectos secundarios debido a la introducción del miRNA. Mencionan, también, que existen isoformas de regiones 3'UTR alternativas, generadas por clivajes y poli-adenilación alternativos en distintos contextos celulares. Se ha determinado que estas isoformas alternativas influyen un ~10% de los genes blanco predichos al comparar cualquier par de líneas celulares.

Una manera de distinguir entre ambas posibilidades es el uso del ensayo de luciferasa para poder distinguir aquella represión en la expresión de los ARNm mediadas de manera directa por los miRNAs de posibles efectos secundarios no deseados.

Además, otra manera en que el contexto celular puede influir es en la expresión diferencial de proteínas de unión al ARNm, que pueden tanto aumentar como disminuir la eficacia de los sitios de unión de los miRNAs [245].

Teniendo en cuenta esto, consideramos que sería importante determinar si esta regulación de la expresión de estos genes es debido a una acción directa del miR-217, y si estos cambios ocurren, también, a nivel proteico. En el caso de Zhang et al. [168], Observaron también que el tratamiento con el *mimic* del miR-217, en células MCF-7, disminuía su proliferación, arrestaba a las células en G1 y disminuía la expresión de la *CICLINA D1*. En este estudio, determinaron que en esta regulación estaba involucrado el gen *DACH1* (factor determinante del destino celular), el cual identificaron como gen blanco de este miRNA y que, a su vez, regula a la *CICLINA D1*.

El grupo de Sutaria et al., determinó la expresión de este clúster en el páncreas. Sin embargo, menciona en su trabajo numerosos estudios que reportan la expresión del mismo en otros tejidos. En su trabajo, en particular, demostraron que el *knock out* del gen MIR217HG (que contiene a este clúster de miRNAs) en ratones era letal embrionario, no así el silenciamiento del gen de cada miRNA de manera individual[147] Esto lleva a la idea de que la falta de expresión de este clúster, o del MIR217HG, podría impedir el desarrollo de otros órganos además del páncreas. Mencionan como órgano de interés el cerebro,

dado que midieron la expresión de este clúster durante el desarrollo embrionario y, observaron, que el mismo se expresaba en este tejido durante los días embrionarios 13.5 al 17.5.

Además, si bien se centraron en el estudio del miR-217 en el desarrollo del cáncer pancreático, en el mismo determinaron al ARNm *REST/NRSF* (del inglés, *transcriptional repressor neuron restrictive response element*) como un blanco directo de este miRNA. Este gen es un represor transcripcional de genes neuronales en tejidos no-neuronales [249]. Además, recientemente, una investigación realizada por el grupo de Copeland et al., describió un grupo de miRNAs involucrados en la correcta regulación de la vía de los FGFs para obtener una correcta especificación de la cresta neural en los vertebrados. Entre los miRNAs enriquecidos en la cresta neural mencionan al miR-217. En dicho estudio determinaron que este miRNA, junto con el miR-20a y el miR-200a, promueven la identidad de la cresta neural mediante la atenuación de los niveles de señalización de FGF, en particular, los ARNm de *FGF4*, *FGF13* y *FGFR2*.

Consideramos que estos trabajos refuerzan la idea de un posible rol importante del clúster del miR-216/217 en el desarrollo neural. Si bien queda mucho por esclarecer en cuanto a la regulación de la diferenciación neuronal a partir de CMPs en la que estos miRNAs participan, consideramos que sería interesante tener en cuenta también, el gen que contiene a estos miRNAs: MIR217HG.

En este sentido, se sabe que no solo los miRNAs de un mismo clúster, por su cercanía, suelen estar bajo el control de los mismos elementos regulatorios (como lo son los promotores y *enhancers*), sino que también, se ha visto que los transcriptos que contienen miRNAs, usualmente presentan perfiles de expresión similares a estos últimos, lo que indica que estos miRNAs se transcriben como parte de este transcripto de ARN largo. Esta organización poli-cistónica en donde un transcripto primario contiene distintos pre-miRNAs, puede permitir la co-regulación de los mismos si necesitan ser expresados al mismo tiempo [246].

Actualmente, no encontramos mucha información sobre la expresión y regulación del ARN largo no codificante (lncRNA, del inglés *long non-coding RNA*) MIR217HG ni cómo se transcriben los miRNAs del clúster miR-216/217 a partir del mismo. Sin embargo, el estudiante David Wu del laboratorio del Dr. Dan Lim de la UCSF realizó un estudio para analizar que lncRNA eran necesarios durante la inducción neural a partir de CMPs. Si bien el MIR217HG no fue un gen blanco de su *screening*, sí nos dio información sobre el perfil de expresión del mismo durante la diferenciación neural a partir de CMPs. En la Figura 108, puede observarse un aumento en su expresión durante la inducción neural lo que refuerza la idea de que este lncRNA y el clúster de miRNAs que codifica presentan el mismo perfil de expresión.

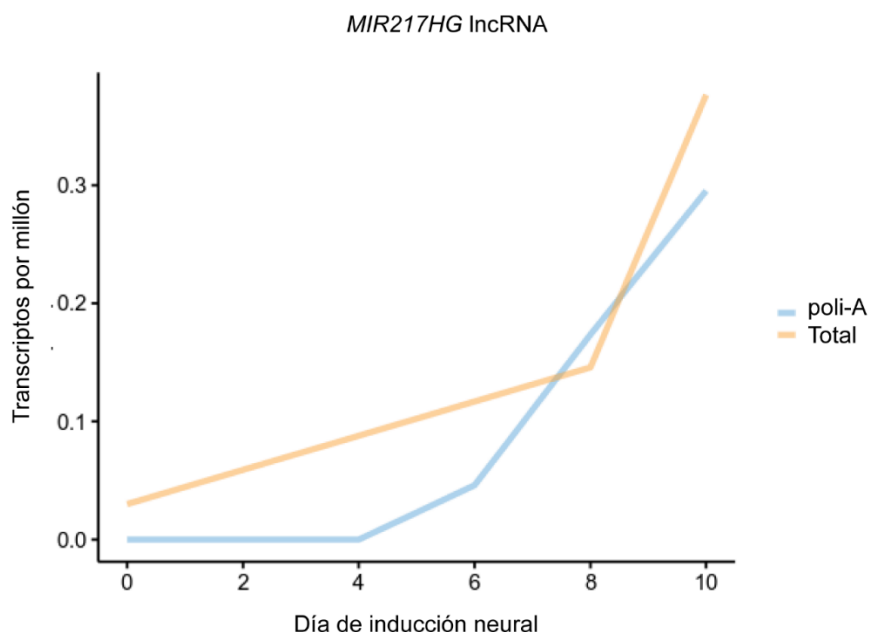


Figura 108. Niveles de expresión del MIR217HG a lo largo de la inducción neural a partir de CMPhs| El gráfico nos los proveyó el estudiante David Wu.

En conclusión, en este trabajo de tesis, abordamos el estudio de los factores reguladores de la fase G1 del ciclo celular de las CMPhs, poniendo principal énfasis en la expresión y regulación de la *CICLINA E1*, la cual se ha descrito como esencial en el mantenimiento de la pluripotencia. También, y en esta misma línea, estudiamos qué miRNAs podrían estar siendo regulados por los factores de transcripción E2Fs en estas líneas celulares, conocimiento que constituye un primer acercamiento a esta temática, en un contexto donde aún no hay muchas investigaciones en el área. Finalmente, contribuimos con el aporte de evidencia bioinformática y experimental sobre el miRNoma a través de la diferenciación neuronal de las CMPhs. En particular, identificamos el clúster miR-216/217 como un potencial agente importante en la regulación de este proceso.

En ese sentido, por un lado sería importante determinar fehacientemente los genes blancos del mismo y su rol en esta diferenciación, por otro lado, sería interesante estudiar la posible regulación conjunta de estos miRNAs y si contribuyen en lograr una correcta regulación para promover la identidad neural o neuronal de éstas células. Si bien la realización de estos estudios a veces presenta ciertas limitaciones dado que, a veces, la interacción entre un miRNA y su gen blanco produce una reducción sutil en la expresión (< 2 veces de cambio) proteica de este último, y muchas veces la inhibición o sobre-expresión de un miRNA no genera un fenotipo obvio. Esto contribuye a una idea emergente en el campo, la cual describe que los miRNAs estarían actuando para aportar robustez a los procesos biológicos, como por ejemplo, para reforzar los programas transcripcionales de modo de agudizar las transiciones en el desarrollo, afianzar las identidades celulares, o amortiguar las fluctuaciones en la expresión génica frente a la respuesta celular a señales de estrés o ciertas redes regulatorias [80].

Creemos, de todas formas que el desarrollo y aplicación de tecnologías, como el uso de proteómica, CRISPR/Cas9 y las técnicas derivadas de secuenciaciones masivas de ácidos nucleicos e inmunoprecipitación de la cromatina (como la técnica AGO-IP) van a ser fundamentales para poder abordar estas problemáticas.

Teniendo en cuenta esto, y en paralelo a la modulación de la expresión de los miRNAs del clúster utilizando los *mimic/inhibitor*, consideramos que sería interesante utilizar una estrategia que nos permita silenciar el clúster entero, y así determinar su rol en la diferenciación neuronal a partir de las CMPhs. Con este objetivo, buscamos llevar a cabo una estrategia de pérdida de función utilizando la tecnología de CRISPR/Cas9. De este modo, nos aseguraríamos de silenciar completamente la expresión de todos los miembros del clúster a la vez.

Brevemente, en esta técnica, una nucleasa (en nuestro caso la Cas9), puede ser dirigida hacia casi cualquier *target* de interés mediante el uso de un ARN guía (sgRNA) que la dirige hacia el sitio específico que se quiere modificar en el genoma, el cual debe estar próximo a una secuencia corta reconocida por esta enzima, denominada secuencia PAM (del inglés *protospacer adjacent sequence*). De este modo, la nucleasa reconoce, por complementariedad de bases con el sgRNA y el reconocimiento de la secuencia PAM, el sitio de interés y genera un corte doble cadena en el ADN. Esto estimula, entonces, la maquinaria de reparación propia de las células, mediante las vías de NEHJ (del inglés, *non-homologous DNA end joining*) o HDR (del inglés, *homology directed repair*), lográndose así la edición génica.

Se ha demostrado que al utilizar dos ARNs guías que dirigen la endonucleasa Cas9 a dos sitios del genoma distanciados entre sí, se puede generar una delección entre ambos sitios de corte doble cadena. En el trabajo de Canver et al. determinaron que esta metodología puede generar delecciones de gran tamaño (desde 1.3 kb hasta 1 Mb); y que la frecuencia de delección es inversamente proporcional al tamaño que se quiere deleccionar [247].

Aprovechando esta herramienta, diseñamos dos ARNs guías dirigidos al inicio (gRNA *Start1/2*) y final (gRNA *End1/2*) del clúster miR-216/217, buscando que la endonucleasa Cas9 genere cortes doble cadena en los extremos del mismo. De este modo, mediante la vía de reparación NEHJ, estaríamos delectando el clúster completo (~18kb) y logrando así su silenciamiento.

Actualmente nos encontramos realizando este experimento. Logramos clonar los gRNAs, co-transfectar los plásmidos en las CMPhs y generar cultivos unicelulares (clones) para iniciar la búsqueda de aquellas donde se haya generado el silenciamiento del clúster miR-216/217.

Para poder identificar las células donde ocurrieron los dos cortes y la delección del clúster completo (clones positivos), diseñamos pares de *primers* internos que reconocen secuencias dentro del clúster y no deberían levantar ningún producto en caso de que la delección fue efectiva. Y por el otro lado, pares de

primers externos que reconocen a cada lado del sitio de corte, que deberían levantar producto en caso de deleccionarse el clúster y los extremos lindantes al mismo se acercan, de lo contrario, se encuentran a 18kb aproximadamente uno de otro por lo que un producto de PCR en ese caso no sería posible.

Si bien, hasta el momento, de las muestras analizadas por PCR para determinar los productos obtenidos con cada par de *primers*, en ninguno obtuvimos la deleción buscada; sí observamos la aparición de un producto de PCR con los *primers* externos 1 en dos *pools* de células transfectadas con la combinación de gRNAs S2E1, lo que indicaría que en el mismo existe un clon con el clúster miR-216/217 deleccionado. Este producto de PCR fue aislado y secuenciado para confirmar la identidad de secuencia. El resultado de la secuenciación fue alineado con el genoma y coincidió con las regiones río arriba y río abajo del clúster del miR-216/217. Debido a esto, en el presente nos encontramos en la búsqueda de un clon positivo a partir de estos *pools* de células.

Por último, consideramos que el conocimiento de los mecanismos mencionados y el diseño de estrategias para controlar la proliferación y la diferenciación de CMN plausibles de ser empleados en terapias de reemplazo celular permitirá derivar suficiente número de células con capacidad para restaurar la estructura y función del tejido dañado, en un campo de estudio que está en gran crecimiento.

Conclusiones

A partir de la presente tesis se desprenden las siguientes conclusiones generales:

- Analizamos y determinamos los niveles de expresión proteicos de las principales CICLINAS: *A*, *B1*, *D1*, *D2* y *E1* en CMPhs (en condiciones de cultivo definidas), PN y FH asincrónicas y arrestadas con PD.
- Determinamos un mismo perfil de expresión que su ARNm en la proteína de la *CICLINA D1* en las CMPhs, PN y FH.
- Obtuvimos los mismos resultados en el perfil de expresión del ARNm de estas ciclinas en células con medio condicionado y en células con condiciones de cultivo bien definidas, comprobando así que los no dependen de las condiciones de cultivo.
- Determinamos que el ARNm y la proteína de la *CICLINA E1* presentaban un perfil periódico de expresión a lo largo del ciclo celular de las CMPhs y de los PN. Encontramos una disminución en los niveles de expresión de la proteína en las CMPhs arrestadas en G2/M e identificamos que esta degradación en CMPhs y en los PN es mediada por el proteasoma mediante un mecanismo que depende de la actividad de la quinasa CDK2, mientras que la quinasa GSK3 β no tendría un rol dominante en la misma.
- Postulamos al miR-16-5p como un posible candidato involucrado en regular los niveles de expresión de la *CICLINA E1* en las CMPihs.
- Analizamos el perfil de expresión temporal de la familia del miR-302 y los miR-145 y miR-296, importantes en los procesos de pluripotencia y diferenciación; estableciendo que un perfil de expresión temporal periódico de los mismos a lo largo del ciclo celular de las CMEhs H9 y CMPihs FN21.
- Observamos un aumento de expresión de los niveles de expresión de la familia del miR-302 en la transición G1/S la cual se mantiene elevada en la fase S. Confirmamos además, que los genes target de esta familia están estrechamente relacionados con la regulación del ciclo celular; mientras que aquellos de los miR-145 y miR-296 lo están con los procesos de diferenciación.
- Generamos CMN a partir de las líneas pluripotentes humanas: embrionarias (H9) e inducidas (FN2.1) confirmando su identidad celular y capacidad multipotente.

- Diferenciamos neuronas a partir de estas CMN, las cuales presentaron casi un 100% de marcación positiva para TUJ-1 y una electrofisiología que corresponde a un perfil de neurona inmadura.
- Tratamos las CMEhs H9 con un inhibidor general de los factores de transcripción E2Fs (iE2Fs) y determinamos un aumento en el porcentaje de células en la fase G1 debido a este tratamiento. Definimos el miRNoma de las CMEhs tratadas con el iE2Fs versus el control, observando que los cambios de expresión entre las mismas no eran muy marcados.
- Realizamos un análisis de expresión diferencial entre ambas poblaciones (iE2Fs vs. control) y seleccionamos 7 candidatos (miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-4454, miR-1260a, miR-1260b, miR-454-3p y miR-301a-3p) que validamos experimentalmente confirmando los resultados obtenidos con la secuenciación masiva.
- Determinamos, *in silico*, un listado de genes blanco predichos para estos miRNAs candidatos y, mediante un análisis de ontología génica, encontramos que los mismos estarían involucrados en la regulación de genes relacionados con procesos de diferenciación y desarrollo.
- Establecimos el miRNoma de tres poblaciones celulares: CMEhs H9, CMN generadas a partir de las mismas y neuronas diferenciadas a partir de estas CMN, observando que cada una de ellas presentaba un perfil de expresión característico y siendo más similares los perfiles presentados por las CMN y las neuronas.
- Exploramos el listado de miRNAs expresados diferencialmente entre estas poblaciones encontrando la presencia de 5 clústeres que reflejan 5 perfiles de expresión distintos a lo largo de las mismas.
- Validamos experimentalmente, en las poblaciones celulares mencionadas, los niveles de expresión de miRNAs, que por bibliografía, sabíamos su expresión se induce en la neurogénesis (miR-124-3p, miR-9-5p, miR-9-3p, miR-128, miR-125b-5p y miR-125a-5); confirmando así los resultados obtenidos con la secuenciación masiva.
- Identificamos, a partir de nuestros resultados de secuenciación al clúster miR-216/217 cuya expresión se induce en las CMN y neuronas, y no es detectable en las CMEhs y validamos experimentalmente sus niveles de expresión.
- Analizamos los genes blancos predichos para estos miRNAs y determinamos, por un análisis de ontología génica, que los miRNAs de este clúster regularían genes relacionados, principalmente, con la regulación del ciclo celular.

- Del listado de genes blanco predichos y otros expresados en datos publicados de 7 secuenciaciones de células diferenciadas a algún tipo celular del linaje neural a partir de CMPhs, obtuvimos así un listado de 56 genes target presentes en todos. De los mismos seleccionamos 5 genes candidatos (*WEE1*, *GRIA3*, *ANLN*, *COL4A4* Y *RREB1*). Medimos su expresión en nuestro modelo experimental y encontramos que su expresión coincide con los resultados observados en los datos de una o más de las secuenciaciones analizadas.
- Modulamos la expresión de uno de los miembros del clúster (miR-217-5p) determinando que ni su sobre-expresión ni su inhibición afectaron de manera significativa el perfil del ciclo celular de las CMN de H9.
- Determinamos que la sobre-expresión del miR-217-5p en las CMPhs indujo un aumento en el porcentaje de células en la fase G1 y que la viabilidad celular de ninguna de las dos líneas se vio comprometida.
- Estudiamos el efecto de la modulación del miR-217-5p en los niveles de expresión de genes: de pluripotencia (*OCT-4* y *NANOG*), marcadores de células neurales (*PAX-6* y *SOX-1*) o en los transcriptos de los genes blanco candidatos seleccionados, estableciendo una disminución significativa en la expresión de *OCT-4* en las CMEhs H9 que sobre-expresan este miRNA en relación a las células control.
- Analizamos la expresión de genes blanco candidatos del miR-217 en CMPhs tratadas con un *mimic* de este miRNA, determinando una disminución significativa en la expresión del transcripto *GRIA3* en las CMEhs H9 tratadas en relación al control; y de los transcriptos *WEE1*, *SIRT1* y *CICLINA D1* en las CMPihs tratadas con el *mimic* en relación al control.

Bibliografia

1. Shi, Y., et al., *Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress*. Nat Rev Drug Discov, 2017. **16**(2): p. 115-130.
2. Zipori, D., *The nature of stem cells: state rather than entity*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(11): p. 873-8.
3. Zernicka-Goetz, M., S.A. Morris, and A.W. Bruce, *Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(7): p. 467-77.
4. White, J., et al., *Developmental activation of the Rb-E2F pathway and establishment of cell cycle-regulated cyclin-dependent kinase activity during embryonic stem cell differentiation*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(4): p. 2018-27.
5. Amit, M., et al., *Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture*. Dev Biol, 2000. **227**(2): p. 271-8.
6. Zaveri, L. and J. Dhawan, *Cycling to Meet Fate: Connecting Pluripotency to the Cell Cycle*. Front Cell Dev Biol, 2018. **6**: p. 57.
7. Maherali, N. and K. Hochedlinger, *Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(6): p. 595-605.
8. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 101-6.
9. Okano, H. and S. Yamanaka, *iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease*. Mol Brain, 2014. **7**(1): p. 22.
10. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
11. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
12. Takahashi, M., *[Retinal Cell Therapy Using iPS Cells]*. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 2016. **120**(3): p. 210-24; discussion 225.
13. Xu, C., et al., *Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(10): p. 971-4.
14. Keller, G., *Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine*. Genes Dev, 2005. **19**(10): p. 1129-55.
15. Bacakova, L., et al., *Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review*. Biotechnol Adv, 2018. **36**(4): p. 1111-1126.
16. Hwang, N.S., S. Varghese, and J. Elisseeff, *Controlled differentiation of stem cells*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(2): p. 199-214.
17. Czyz, J. and A. Wobus, *Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors*. Differentiation, 2001. **68**(4-5): p. 167-74.
18. Dhara, S.K. and S.L. Stice, *Neural differentiation of human embryonic stem cells*. J Cell Biochem, 2008. **105**(3): p. 633-40.

19. Reubinoff, B.E., et al., *Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(4): p. 399-404.
20. Reubinoff, B.E., et al., *Neural progenitors from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(12): p. 1134-40.
21. Eze, U.C., et al., *Single-cell atlas of early human brain development highlights heterogeneity of human neuroepithelial cells and early radial glia*. Nat Neurosci, 2021. **24**(4): p. 584-594.
22. Stiles, J. and T.L. Jernigan, *The basics of brain development*. Neuropsychol Rev, 2010. **20**(4): p. 327-48.
23. Conti, L. and E. Cattaneo, *Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities?* Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(3): p. 176-87.
24. Grochowski, C., E. Radzikowska, and R. Maciejewski, *Neural stem cell therapy-Brief review*. Clin Neurol Neurosurg, 2018. **173**: p. 8-14.
25. Altman, J. and G.D. Das, *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. J Comp Neurol, 1965. **124**(3): p. 319-35.
26. Goldman, S.A. and F. Nottebohm, *Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(8): p. 2390-4.
27. Harrison, R.G., *The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement*. J Exp Zool, 1959. **142**: p. 5-73.
28. Mertens, J., et al., *Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience*. Nat Rev Neurosci, 2016. **17**(7): p. 424-37.
29. Svendsen, C.N., M.A. Caldwell, and T. Ostenfeld, *Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation*. Brain Pathol, 1999. **9**(3): p. 499-513.
30. Vazin, T. and W.J. Freed, *Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review*. Restor Neurol Neurosci, 2010. **28**(4): p. 589-603.
31. Hansen, S.K., et al., *Induced pluripotent stem cell - derived neurons for the study of spinocerebellar ataxia type 3*. Stem Cell Res, 2016. **17**(2): p. 306-317.
32. Hsu, Y.C., D.C. Lee, and I.M. Chiu, *Neural stem cells, neural progenitors, and neurotrophic factors*. Cell Transplant, 2007. **16**(2): p. 133-50.
33. Goparaju, S.K., et al., *Rapid differentiation of human pluripotent stem cells into functional neurons by mRNAs encoding transcription factors*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 42367.
34. Kelava, I. and M.A. Lancaster, *Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research*. Dev Biol, 2016. **420**(2): p. 199-209.
35. Lu, X., J. Yang, and Y. Xiang, *Modeling human neurodevelopmental diseases with brain organoids*. Cell Regen, 2022. **11**(1): p. 1.
36. Lancaster, M.A., et al., *Cerebral organoids model human brain development and microcephaly*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 373-9.
37. Lavazza, A., *'Consciousnessoids': clues and insights from human cerebral organoids for the study of consciousness*. Neurosci Conscious, 2021. **7**(2): p. niab029.
38. Sidhay, J. and J.A. Knoblich, *Brain organoids: an ensemble of bioassays to investigate human neurodevelopment and disease*. Cell Death Differ, 2021. **28**(1): p. 52-67.

39. Soufi, A. and S. Dalton, *Cycling through developmental decisions: how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming*. Development, 2016. **143**(23): p. 4301-4311.
40. Kapinas, K., et al., *The abbreviated pluripotent cell cycle*. J Cell Physiol, 2013. **228**(1): p. 9-20.
41. Satyanarayana, A. and P. Kaldis, *Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms*. Oncogene, 2009. **28**(33): p. 2925-39.
42. Liu, L., et al., *The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(9): p. 1060-1067.
43. Spencer, S.L., et al., *The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit*. Cell, 2013. **155**(2): p. 369-83.
44. Collins, I. and M.D. Garrett, *Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors*. Curr Opin Pharmacol, 2005. **5**(4): p. 366-73.
45. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell Prolif, 2003. **36**(3): p. 131-49.
46. Ter Huurne, M. and H.G. Stunnenberg, *G1-phase progression in pluripotent stem cells*. Cell Mol Life Sci, 2021. **78**(10): p. 4507-4519.
47. Burdon, T., A. Smith, and P. Savatier, *Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(9): p. 432-8.
48. Lange, C. and F. Calegari, *Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells*. Cell Cycle, 2010. **9**(10): p. 1893-900.
49. Pauklin, S. and L. Vallier, *The Cell-Cycle State of Stem Cells Determines Cell Fate Propensity*. Cell, 2014. **156**(6): p. 1338.
50. White, J. and S. Dalton, *Cell cycle control of embryonic stem cells*. Stem Cell Rev, 2005. **1**(2): p. 131-8.
51. Conklin, J.F. and J. Sage, *Keeping an eye on retinoblastoma control of human embryonic stem cells*. J Cell Biochem, 2009. **108**(5): p. 1023-30.
52. Becker, K.A., et al., *Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase*. J Cell Physiol, 2006. **209**(3): p. 883-93.
53. Becker, K.A., et al., *Human embryonic stem cells are pre-mitotically committed to self-renewal and acquire a lengthened G1 phase upon lineage programming*. J Cell Physiol, 2010. **222**(1): p. 103-10.
54. Barta, T., et al., *Cell cycle regulation in human embryonic stem cells: links to adaptation to cell culture*. Exp Biol Med (Maywood), 2013. **238**(3): p. 271-5.
55. Filipczyk, A.A., et al., *Differentiation is coupled to changes in the cell cycle regulatory apparatus of human embryonic stem cells*. Stem Cell Res, 2007. **1**(1): p. 45-60.
56. Abdelalim, E.M., *Molecular mechanisms controlling the cell cycle in embryonic stem cells*. Stem Cell Rev, 2013. **9**(6): p. 764-73.
57. Neganova, I., et al., *Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells*. Oncogene, 2009. **28**(1): p. 20-30.
58. Singh, A.M., et al., *Cell-cycle control of developmentally regulated transcription factors accounts for heterogeneity in human pluripotent cells*. Stem Cell Reports, 2013. **1**(6): p. 532-44.

59. Ghule, P.N., et al., *Reprogramming the pluripotent cell cycle: restoration of an abbreviated G1 phase in human induced pluripotent stem (iPS) cells*. J Cell Physiol, 2011. **226**(5): p. 1149-56.
60. Rodriguez Varela, M.S., et al., *Regulation of cyclin E1 expression in human pluripotent stem cells and derived neural progeny*. Cell Cycle, 2018. **17**(14): p. 1721-1744.
61. Coronado, D., et al., *A short G1 phase is an intrinsic determinant of naive embryonic stem cell pluripotency*. Stem Cell Res, 2013. **10**(1): p. 118-31.
62. Julian, L.M. and A. Blais, *Transcriptional control of stem cell fate by E2Fs and pocket proteins*. Front Genet, 2015. **6**: p. 161.
63. Rowland, B.D. and R. Bernards, *Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs*. Cell, 2006. **127**(5): p. 871-4.
64. Conklin, J.F., J. Baker, and J. Sage, *The RB family is required for the self-renewal and survival of human embryonic stem cells*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1244.
65. Borrell, V. and F. Calegari, *Mechanisms of brain evolution: regulation of neural progenitor cell diversity and cell cycle length*. Neurosci Res, 2014. **86**: p. 14-24.
66. Ali, F., et al., *Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis*. Development, 2011. **138**(19): p. 4267-77.
67. Ohnuma, S. and W.A. Harris, *Neurogenesis and the cell cycle*. Neuron, 2003. **40**(2): p. 199-208.
68. Galderisi, U., F.P. Jori, and A. Giordano, *Cell cycle regulation and neural differentiation*. Oncogene, 2003. **22**(33): p. 5208-19.
69. Zhang, P., et al., *Non-Coding RNAs and their Integrated Networks*. J Integr Bioinform, 2019. **16**(3).
70. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
71. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 126-39.
72. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
73. Gebert, L.F.R. and I.J. MacRae, *Regulation of microRNA function in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(1): p. 21-37.
74. Rupaimoole, R. and F.J. Slack, *MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2017. **16**(3): p. 203-222.
75. Treiber, T., N. Treiber, and G. Meister, *Publisher Correction: Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(5): p. 321.
76. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
77. Place, R.F., et al., *MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1608-13.
78. Riffo-Campos, A.L., I. Riquelme, and P. Brebi-Mieville, *Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose?* Int J Mol Sci, 2016. **17**(12).
79. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.

80. Martinez-Sanchez, A. and C.L. Murphy, *MicroRNA Target Identification-Experimental Approaches*. Biology (Basel), 2013. **2**(1): p. 189-205.
81. Ong, S.G., et al., *MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **88**: p. 3-15.
82. Vidigal, J.A. and A. Ventura, *Embryonic stem cell miRNAs and their roles in development and disease*. Semin Cancer Biol, 2012. **22**(5-6): p. 428-36.
83. Rodriguez-Varela, M.S., et al., *miR-302 family, miR-145 and miR-296 temporal expression profile along the cell cycle of human pluripotent stem cells*. Gene Expr Patterns, 2021. **40**: p. 119168.
84. Anokye-Danso, F., et al., *Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(4): p. 376-88.
85. Meza-Sosa, K.F., G. Pedraza-Alva, and L. Perez-Martinez, *microRNAs: key triggers of neuronal cell fate*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 175.
86. Huang, B., et al., *MicroRNA expression profiling during neural differentiation of mouse embryonic carcinoma P19 cells*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2009. **41**(3): p. 231-6.
87. Makeyev, E.V., et al., *The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing*. Mol Cell, 2007. **27**(3): p. 435-48.
88. Rago, L., et al., *miR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin*. EMBO J, 2014. **33**(8): p. 906-20.
89. Niu, C.S., Y. Yang, and C.D. Cheng, *MiR-134 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression*. Int J Oncol, 2013. **42**(5): p. 1533-40.
90. Sun, G., et al., *miR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 529.
91. Le, M.T., et al., *MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(19): p. 5290-305.
92. Cui, Y., et al., *MiR-125b orchestrates cell proliferation, differentiation and migration in neural stem/progenitor cells by targeting Nestin*. BMC Neurosci, 2012. **13**: p. 116.
93. Zhao, C., et al., *MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(5): p. 1876-81.
94. Conaco, C., et al., *Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2422-7.
95. Yoo, A.S., et al., *MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons*. Nature, 2011. **476**(7359): p. 228-31.
96. Wang, Y. and R. Blelloch, *Cell cycle regulation by microRNAs in stem cells*. Results Probl Cell Differ, 2011. **53**: p. 459-72.
97. Mens, M.M.J. and M. Ghanbari, *Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs*. Stem Cell Rev Rep, 2018. **14**(3): p. 309-322.
98. Card, D.A., et al., *Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(20): p. 6426-38.
99. Qi, J., et al., *microRNAs regulate human embryonic stem cell division*. Cell Cycle, 2009. **8**(22): p. 3729-41.

100. Questa, M., et al., *Generation of iPSC line iPSC-FH2.1 in hypoxic conditions from human foreskin fibroblasts*. Stem Cell Res, 2016. **16**(2): p. 300-3.
101. Gianotti-Sommer, A., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cells from peripheral blood using the STEMCCA lentiviral vector*, in *StemBook*. 2008: Cambridge (MA).
102. Morris-Hanon, O., et al., *The Cell Cycle Inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1) Control Proliferation but Enhance DNA Damage Resistance of Glioma Stem Cells*. Neoplasia, 2017. **19**(7): p. 519-529.
103. Videla Richardson, G.A., et al., *Specific Preferences in Lineage Choice and Phenotypic Plasticity of Glioma Stem Cells Under BMP4 and Noggin Influence*. Brain Pathol, 2016. **26**(1): p. 43-61.
104. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
105. Ruijter, J.M., et al., *Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(6): p. e45.
106. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
107. Bott, C.J., et al., *Nestin in immature embryonic neurons affects axon growth cone morphology and Semaphorin3a sensitivity*. Mol Biol Cell, 2019. **30**(10): p. 1214-1229.
108. Kwon, G.S., et al., *Tg(Afp-GFP) expression marks primitive and definitive endoderm lineages during mouse development*. Dev Dyn, 2006. **235**(9): p. 2549-58.
109. Antin, P.B., et al., *Precocious expression of cardiac troponin T in early chick embryos is independent of bone morphogenetic protein signaling*. Dev Dyn, 2002. **225**(2): p. 135-41.
110. Garcia, C.P., et al., *Human Pluripotent Stem Cells and Derived Neuroprogenitors Display Differential Degrees of Susceptibility to BH3 Mimetics ABT-263, WEHI-539 and ABT-199*. PLoS Onc, 2016. **11**(3): p. e0152607.
111. Mossahebi-Mohammadi, M., et al., *FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 79.
112. Paling, N.R., et al., *Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48063-70.
113. Li, J., et al., *MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal*. Differentiation, 2007. **75**(4): p. 299-307.
114. Romorini, L., et al., *AKT/GSK3beta signaling pathway is critically involved in human pluripotent stem cell survival*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 35660.
115. Kidder, B.L., J. Yang, and S. Palmer, *Stat3 and c-Myc genome-wide promoter occupancy in embryonic stem cells*. PLoS One, 2008. **3**(12): p. e3932.
116. Santoni-Rugiu, E., et al., *Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(10): p. 3497-509.
117. Caldon, C.E., et al., *Differences in degradation lead to asynchronous expression of cyclin E1 and cyclin E2 in cancer cells*. Cell Cycle, 2013. **12**(4): p. 596-605.
118. Vilchez, D., et al., *Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 304-8.

119. Su, C., et al., *miR-27a-3p regulates proliferation and apoptosis of colon cancer cells by potentially targeting BTG1*. *Oncol Lett*, 2019. **18**(3): p. 2825-2834.
120. Zhou, L., et al., *MiR-27a-3p functions as an oncogene in gastric cancer by targeting BTG2*. *Oncotarget*, 2016. **7**(32): p. 51943-51954.
121. Lerner, M., et al., *MiRNA-27a controls FBW7/hCDC4-dependent cyclin E degradation and cell cycle progression*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(13): p. 2172-83.
122. Wang, F., et al., *microRNA-16-5p enhances radiosensitivity through modulating Cyclin D1/E1-pRb-E2F1 pathway in prostate cancer cells*. *J Cell Physiol*, 2019. **234**(8): p. 13182-13190.
123. Zhang, H., et al., *miR-16-5p inhibits chordoma cell proliferation, invasion and metastasis by targeting Smad3*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(6): p. 680.
124. Toraih, E.A., et al., *MicroRNA-target cross-talks: Key players in glioblastoma multiforme*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(11): p. 1010428317726842.
125. Ghosh, T., et al., *MicroRNA-874-mediated inhibition of the major G1/S phase cyclin, CCNE1, is lost in osteosarcomas*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(52): p. 21264-21281.
126. Rodrigucz-Galan, A., L. Fernandez-Messina, and F. Sanchez-Madrid, *Control of Immunoregulatory Molecules by miRNAs in T Cell Activation*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2148.
127. Barroso-del Jesus, A., G. Lucena-Aguilar, and P. Menendez, *The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(3): p. 394-8.
128. Li, N., et al., *microRNAs: important regulators of stem cells*. *Stem Cell Res Ther*, 2017. **8**(1): p. 110.
129. Yan, Y., et al., *Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells*. *Stem Cells Transl Med*, 2013. **2**(11): p. 862-70.
130. Venere, M., et al., *Sox1 marks an activated neural stem/progenitor cell in the hippocampus*. *Development*, 2012. **139**(21): p. 3938-49.
131. Shin, D.M., et al., *Ascorbic acid responsive genes during neuronal differentiation of embryonic stem cells*. *Neuroreport*, 2004. **15**(12): p. 1959-63.
132. Rharass, T., et al., *Ascorbic acid alters cell fate commitment of human neural progenitors in a WNT/beta-catenin/ROS signaling dependent manner*. *J Biomed Sci*, 2017. **24**(1): p. 78.
133. Yi, F. and B.J. Merrill, *Stem cells and TCF proteins: a role for beta-catenin--independent functions*. *Stem Cell Rev*, 2007. **3**(1): p. 39-48.
134. Bonafina, A., et al., *GDNF and GFRalpha1 Are Required for Proper Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons*. *Cell Rep*, 2019. **29**(13): p. 4308-4319 e4.
135. Ferreira, F.F., et al., *Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Role in Cannabinoid-Mediated Neurogenesis*. *Front Cell Neurosci*, 2018. **12**: p. 441.
136. Paavilainen, T., et al., *Effect of prolonged differentiation on functional maturation of human pluripotent stem cell-derived neuronal cultures*. *Stem Cell Res*, 2018. **27**: p. 151-161.
137. Nicholas, C.R., et al., *Functional maturation of hPSC-derived forebrain interneurons requires an extended timeline and mimics human neural development*. *Cell Stem Cell*, 2013. **12**(5): p. 573-86.

138. Pouya, A., et al., *Human induced pluripotent stem cells differentiation into oligodendrocyte progenitors and transplantation in a rat model of optic chiasm demyelination*. PLoS Onc, 2011. **6**(11): p. e27925.
139. Ma, Y., et al., *A small-molecule E2F inhibitor blocks growth in a melanoma culture model*. Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6292-9.
140. Liu, L., et al., *G1 cyclins link proliferation, pluripotency and differentiation of embryonic stem cells*. Nat Cell Biol, 2017. **19**(3): p. 177-188.
141. Li, X., et al., *miR-19 family: A promising biomarker and therapeutic target in heart, vessels and neurons*. Life Sci, 2019. **232**: p. 116651.
142. Couillard-Despres, S., et al., *Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis*. Eur J Neurosci, 2005. **21**(1): p. 1-14.
143. Mohammad, M.H., et al., *Characterization of neural stemness status through the neurogenesis process for bone marrow mesenchymal stem cells*. Stem Cells Cloning, 2016. **9**: p. 1-15.
144. Stevanato, L. and J.D. Sinden, *The effects of microRNAs on human neural stem cell differentiation in two- and three-dimensional cultures*. Stem Cell Res Ther, 2014. **5**(2): p. 49.
145. Santos, M.C., et al., *miR-124, -128, and -137 Orchestrate Neural Differentiation by Acting on Overlapping Gene Sets Containing a Highly Connected Transcription Factor Network*. Stem Cells, 2016. **34**(1): p. 220-32.
146. Candiani, S., *Focus on miRNAs evolution: a perspective from amphioxus*. Brief Funct Genomics, 2012. **11**(2): p. 107-17.
147. Sutaria, D.S., et al., *Knockout of Acinar Enriched microRNAs in Mice Promote Duct Formation But Not Pancreatic Cancer*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 11147.
148. Chen, P., et al., *miR-216a-5p acts as an oncogene in renal cell carcinoma*. Exp Ther Med, 2018. **15**(4): p. 4039-4046.
149. Roscigno, G., et al., *miR-216a Acts as a Negative Regulator of Breast Cancer by Modulating Stemness Properties and Tumor Microenvironment*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(7).
150. Xia, H., L.L. Ooi, and K.M. Hui, *MicroRNA-216a/217-induced epithelial-mesenchymal transition targets PTEN and SMAD7 to promote drug resistance and recurrence of liver cancer*. Hepatology, 2013. **58**(2): p. 629-41.
151. Szafranska, A.E., et al., *MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncogene, 2007. **26**(30): p. 4442-52.
152. Erener, S., et al., *Deletion of pancreas-specific miR-216a reduces beta-cell mass and inhibits pancreatic cancer progression in mice*. Cell Rep Med, 2021. **2**(11): p. 100434.
153. Yonemori, K., et al., *The microRNA expression signature of pancreatic ductal adenocarcinoma by RNA sequencing: anti-tumour functions of the microRNA-216 cluster*. Oncotarget, 2017. **8**(41): p. 70097-70115.
154. Zhang, D., et al., *Down-regulation of KIAA1199/CEMIP by miR-216a suppresses tumor invasion and metastasis in colorectal cancer*. Int J Cancer, 2017. **140**(10): p. 2298-2309.
155. Cesarini, V., et al., *ADAR2/miR-589-3p axis controls glioblastoma cell migration/invasion*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(4): p. 2045-2059.

156. Kato, M., et al., *TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(7): p. 881-9.
157. Shannon, P., et al., *Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks*. Genome Res, 2003. **13**(11): p. 2498-504.
158. Zhou, W., et al., *Knockdown of ANLN by lentivirus inhibits cell growth and migration in human breast cancer*. Mol Cell Biochem, 2015. **398**(1-2): p. 11-9.
159. Morgani, S.M., et al., *The transcription factor Rreb1 regulates epithelial architecture, invasiveness, and vasculogenesis in early mouse embryos*. Elife, 2021. **10**.
160. Maraghechi, P., et al., *Discovery of pluripotency-associated microRNAs in rabbit preimplantation embryos and embryonic stem-like cells*. Reproduction, 2013. **145**(4): p. 421-37.
161. Collier, M.E.W., A.R. Ambrose, and A.H. Goodall, *Does hsa-miR-223-3p from platelet-derived extracellular vesicles regulate tissue factor expression in monocytic cells?* Platelets, 2022: p. 1-12.
162. Shah, M.S., et al., *Comparative effects of diet and carcinogen on microRNA expression in the stem cell niche of the mouse colonic crypt*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1862**(1): p. 121-34.
163. Liang, X., et al., *MicroRNA-34c enhances murine male germ cell apoptosis through targeting ATF1*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33861.
164. Feng, Z.M., et al., *Essential role of miR-200c in regulating self-renewal of breast cancer stem cells and their counterparts of mammary epithelium*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 645.
165. Comer, B.S., et al., *MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **307**(9): p. L727-34.
166. Liu, J., et al., *CircRNA_100367 regulated the radiation sensitivity of esophageal squamous cell carcinomas through miR-217/Wnt3 pathway*. Aging (Albany NY), 2019. **11**(24): p. 12412-12427.
167. Copeland, J. and M. Simoes-Costa, *Post-transcriptional tuning of FGF signaling mediates neural crest induction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(52): p. 33305-33316.
168. Zhang, Q., et al., *MiR-217 Promotes Tumor Proliferation in Breast Cancer via Targeting DACH1*. J Cancer, 2015. **6**(2): p. 184-91.
169. Lee, J., et al., *Oct-4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells*. Biochem J, 2010. **426**(2): p. 171-81.
170. Zhang, X., et al., *A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A*. J Cell Biol, 2009. **184**(1): p. 67-82.
171. Ouyang, J., et al., *Cyclin-dependent kinase-mediated Sox2 phosphorylation enhances the ability of Sox2 to establish the pluripotent state*. J Biol Chem, 2015. **290**(37): p. 22782-94.
172. Brumbaugh, J., et al., *NANOG is multiply phosphorylated and directly modified by ERK2 and CDK1 in vitro*. Stem Cell Reports, 2014. **2**(1): p. 18-25.
173. Fujii-Yamamoto, H., et al., *Cell cycle and developmental regulations of replication factors in mouse embryonic stem cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12976-87.
174. Liu, P., et al., *Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus*. Nature, 2014. **508**(7497): p. 541-5.

175. Chin, M.H., et al., *Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(1): p. 111-23.
176. Lange, C., W.B. Huttner, and F. Calegari, *Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(3): p. 320-31.
177. Pilaz, L.J., et al., *Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(51): p. 21924-9.
178. Lim, S. and P. Kaldis, *Loss of Cdk2 and Cdk4 induces a switch from proliferation to differentiation in neural stem cells*. Stem Cells, 2012. **30**(7): p. 1509-20.
179. Tsunekawa, Y. and N. Osumi, *How to keep proliferative neural stem/progenitor cells: a critical role of asymmetric inheritance of cyclin D2*. Cell Cycle, 2012. **11**(19): p. 3550-4.
180. Tsunekawa, Y., et al., *Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates*. EMBO J, 2012. **31**(8): p. 1879-92.
181. Pauklin, S., et al., *Initiation of stem cell differentiation involves cell cycle-dependent regulation of developmental genes by Cyclin D*. Genes Dev, 2016. **30**(4): p. 421-33.
182. Chen, C.L., et al., *Cyclin D1 acts as a barrier to pluripotent reprogramming by promoting neural progenitor fate commitment*. FEBS Lett, 2014. **588**(21): p. 4008-17.
183. Koledova, Z., et al., *Cdk2 inhibition prolongs G1 phase progression in mouse embryonic stem cells*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(2): p. 181-94.
184. Krivega, M.V., et al., *Cyclin E1 plays a key role in balancing between totipotency and differentiation in human embryonic cells*. Mol Hum Reprod, 2015. **21**(12): p. 942-56.
185. Nagaria, P.K., et al., *High-Fidelity Reprogrammed Human iPSCs Have a High Efficacy of DNA Repair and Resemble hESCs in Their MYC Transcriptional Signature*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 3826249.
186. Chen, X., et al., *Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells*. Cell, 2008. **133**(6): p. 1106-17.
187. Kim, J., et al., *An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells*. Cell, 2008. **132**(6): p. 1049-61.
188. Hydbring, P., et al., *Phosphorylation by Cdk2 is required for Myc to repress Ras-induced senescence in cotransformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 58-63.
189. Geng, Y., et al., *Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein*. Oncogene, 1996. **12**(6): p. 1173-80.
190. Siu, K.T., M.R. Rosner, and A.C. Minella, *An integrated view of cyclin E function and regulation*. Cell Cycle, 2012. **11**(1): p. 57-64.
191. Ohtani, K., J. DeGregori, and J.R. Nevins, *Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12146-50.
192. Singer, J.D., et al., *Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells*. Genes Dev, 1999. **13**(18): p. 2375-87.
193. McEvoy, J.D., et al., *Constitutive turnover of cyclin E by Cul3 maintains quiescence*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(10): p. 3651-66.

194. Welcker, M., et al., *Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation*. Mol Cell, 2003. **12**(2): p. 381-92.
195. Koepp, D.M., et al., *Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase*. Science, 2001. **294**(5540): p. 173-7.
196. Kossatz, U., et al., *The cyclin E regulator cullin 3 prevents mouse hepatic progenitor cells from becoming tumor-initiating cells*. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 3820-33.
197. Davis, R.J., et al., *The PP2A-B56 Phosphatase Opposes Cyclin E Autocatalytic Degradation via Site-Specific Dephosphorylation*. Mol Cell Biol, 2017. **37**(8).
198. Abdelalim, E.M., *Molecular mechanisms controlling the cell cycle in embryonic stem cells*. Stem Cell Rev Rep, 2013. **9**(6): p. 764-73.
199. Jin, S., et al., *A Novel Role for miR-1305 in Regulation of Pluripotency-Differentiation Balance, Cell Cycle, and Apoptosis in Human Pluripotent Stem Cells*. Stem Cells, 2016. **34**(9): p. 2306-17.
200. Mallanna, S.K. and A. Rizzino, *Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells*. Dev Biol, 2010. **344**(1): p. 16-25.
201. Pauklin, S. and L. Vallier, *The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity*. Cell, 2013. **155**(1): p. 135-47.
202. Li, H.L., et al., *miR-302 regulates pluripotency, teratoma formation and differentiation in stem cells via an AKT1/OCT4-dependent manner*. Cell Death Dis, 2016. **7**: p. e2078.
203. Lipchina, I., et al., *Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response*. Genes Dev, 2011. **25**(20): p. 2173-86.
204. Galiakberova, A.A. and E.B. Dashinimaev, *Neural Stem Cells and Methods for Their Generation From Induced Pluripotent Stem Cells in vitro*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 815.
205. Bauwens, C.L., et al., *Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories*. Stem Cells, 2008. **26**(9): p. 2300-10.
206. D'Aiuto, L., et al., *Large-scale generation of human iPSC-derived neural stem cells/early neural progenitor cells and their neuronal differentiation*. Organogenesis, 2014. **10**(4): p. 365-77.
207. Rakovic, A., et al., *Electrophysiological Properties of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Midbrain Dopaminergic Neurons Correlate With Expression of Tyrosine Hydroxylase*. Front Cell Neurosci, 2022. **16**: p. 817198.
208. Burman, R.J., et al., *Molecular and electrophysiological features of spinocerebellar ataxia type seven in induced pluripotent stem cells*. PLoS One, 2021. **16**(2): p. e0247434.
209. Song, M., et al., *Coordinated development of voltage-gated Na⁺ and K⁺ currents regulates functional maturation of forebrain neurons derived from human induced pluripotent stem cells*. Stem Cells Dev, 2013. **22**(10): p. 1551-63.
210. Esposito, M.S., et al., *Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development*. J Neurosci, 2005. **25**(44): p. 10074-86.
211. Autar, K., et al., *A functional hiPSC-cortical neuron differentiation and maturation model and its application to neurological disorders*. Stem Cell Reports, 2022. **17**(1): p. 96-109.
212. Wu, C.L., et al., *Expression of dominant-negative mutant DP-1 blocks cell cycle progression in G1*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(7): p. 3698-706.

213. Maehara, K., et al., *Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53*. J Cell Biol, 2005. **168**(4): p. 553-60.
214. Jovicic, A., et al., *Comprehensive expression analyses of neural cell-type-specific miRNAs identify new determinants of the specification and maintenance of neuronal phenotypes*. J Neurosci, 2013. **33**(12): p. 5127-37.
215. Dhiraj, D.K., et al., *miRNAs-19b, -29b-2* and -339-5p show an early and sustained up-regulation in ischemic models of stroke*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83717.
216. Liu, X.S., et al., *MicroRNA-17-92 cluster mediates the proliferation and survival of neural progenitor cells after stroke*. J Biol Chem, 2013. **288**(18): p. 12478-88.
217. Ren, J., et al., *miR-1260b Activates Wnt Signaling by Targeting Secreted Frizzled-Related Protein 1 to Regulate Taxane Resistance in Lung Adenocarcinoma*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 557327.
218. Ren, L., et al., *MiR-454-3p-Mediated Wnt/beta-catenin Signaling Antagonists Suppression Promotes Breast Cancer Metastasis*. Theranostics, 2019. **9**(2): p. 449-465.
219. Zhang, N. and J.F. Liu, *MicroRNA (MiR)-301a-3p regulates the proliferation of esophageal squamous cells via targeting PTEN*. Bioengineered, 2020. **11**(1): p. 972-983.
220. Fan, L., et al., *MicroRNA301a3p overexpression promotes cell invasion and proliferation by targeting runtrelated transcription factor 3 in prostate cancer*. Mol Med Rep, 2019. **20**(4): p. 3755-3763.
221. Zhang, H., B. Shykind, and T. Sun, *Approaches to manipulating microRNAs in neurogenesis*. Front Neurosci, 2012. **6**: p. 196.
222. Mahabadi, J.A., et al., *The role of microRNAs in embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell differentiation in male germ cells*. J Cell Physiol, 2019. **234**(8): p. 12278-12289.
223. Stappert, L., B. Roese-Koerner, and O. Brustle, *The role of microRNAs in human neural stem cells, neuronal differentiation and subtype specification*. Cell Tissue Res, 2015. **359**(1): p. 47-64.
224. Kim, J., et al., *A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons*. Science, 2007. **317**(5842): p. 1220-4.
225. Zainal Abidin, S., et al., *MiR-3099 is Overexpressed in Differentiating 46c Mouse Embryonic Stem Cells upon Neural Induction*. Malays J Med Sci, 2014. **21**(Spec Issue): p. 27-33.
226. Kumar, S., et al., *Role of miRNA-mRNA Interaction in Neural Stem Cell Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(19).
227. Stretch, C., et al., *Effects of sample size on differential gene expression, rank order and prediction accuracy of a gene signature*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65380.
228. Guo, L., et al., *Global analysis of miRNA gene clusters and gene families reveals dynamic and coordinated expression*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 782490.
229. Kulcenty, K., et al., *MicroRNA Profiling During Neural Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(15).
230. Liu, S., et al., *MicroRNA-216b regulated proliferation and invasion of non-small cell lung cancer by targeting SOX9*. Oncol Lett, 2018. **15**(6): p. 10077-10083.
231. Zhang, T., et al., *miR-216b inhibits glioma cell migration and invasion through suppression of FoxM1*. Oncol Rep, 2017. **38**(3): p. 1751-1759.

232. Menbari, M.N., et al., *MiR-216b-5p inhibits cell proliferation in human breast cancer by down-regulating HDAC8 expression*. Life Sci, 2019. **237**: p. 116945.
233. He, S., et al., *MiR-216b inhibits cell proliferation by targeting FOXM1 in cervical cancer cells and is associated with better prognosis*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 673.
234. VanOudenhove, J.J., et al., *Unique Regulatory Mechanisms for the Human Embryonic Stem Cell Cycle*. J Cell Physiol, 2017. **232**(6): p. 1254-1257.
235. Bueno, M.J. and M. Malumbres, *MicroRNAs and the cell cycle*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(5): p. 592-601.
236. Idichi, T., et al., *Regulation of actin-binding protein ANLN by antitumor miR-217 inhibits cancer cell aggressiveness in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncotarget, 2017. **8**(32): p. 53180-53193.
237. Wang, D., et al., *Anillin regulates breast cancer cell migration, growth, and metastasis by non-canonical mechanisms involving control of cell stemness and differentiation*. Breast Cancer Res, 2020. **22**(1): p. 3.
238. Drakaki, A. and D. Iliopoulos, *MicroRNA-gene signaling pathways in pancreatic cancer*. Biomed J, 2013. **36**(5): p. 200-8.
239. Davies, B., et al., *A point mutation in the ion conduction pore of AMPA receptor GRIA3 causes dramatically perturbed sleep patterns as well as intellectual disability*. Hum Mol Genet, 2017. **26**(20): p. 3869-3882.
240. Tao, W., et al., *LncRNA DANCR contributes to tumor progression via targetting miR-216a-5p in breast cancer: lncRNA DANCR contributes to tumor progression*. Biosci Rep, 2019. **39**(4).
241. Szafranska, A.E., et al., *Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues*. Clin Chem, 2008. **54**(10): p. 1716-24.
242. Parrotta, E., et al., *Two sides of the same coin? Unraveling subtle differences between human embryonic and induced pluripotent stem cells by Raman spectroscopy*. Stem Cell Res Ther, 2017. **8**(1): p. 271.
243. Narsinh, K.H., J. Plews, and J.C. Wu, *Comparison of human induced pluripotent and embryonic stem cells: fraternal or identical twins?* Mol Ther, 2011. **19**(4): p. 635-8.
244. Lister, R., et al., *Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 68-73.
245. Nam, J.W., et al., *Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting*. Mol Cell, 2014. **53**(6): p. 1031-1043.
246. Kim, V.N., *MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 376-85.
247. Canver, M.C., et al., *Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells*. J Biol Chem, 2014. **289**(31): p. 21312-24.
246. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. *An Overview of the Cell Cycle*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>.

247. Azevedo-Pouly, Ana Clara. "*Biological functions of microRNA-216 and microRNA-217 during the development of pancreatic cancer.*" Doctoral dissertation, Ohio State University, 2013. http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=osu1374244806.