

Título del Trabajo:

Establecimiento de un método de diferenciación neuronal a partir de fibroblastos humanos como modelo de estudio de Ataxia Espinocerebelosa tipo 7

Título del Trabajo en Inglés:

Establishment of a neuronal differentiation method from human fibroblasts as a model for Spinocerebellar Ataxia type 7

Nombre: ANA VICTORIA

Apellidos: ARREDONDO ROBLES

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4059-1656>

País de Residencia: MEXICO

Área de Investigación: BÁSICA

Institución a la que Pertenece: CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Área de Adscripción: Departamento de Genética y Biología Molecular

Correo Electrónico: ana.arredondo@cinvestav.mx

Datos de los(as) coautores(as) del Trabajo

José Manuel Hernández Hernández, Oscar Hernández Hernández

Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, MEXICO, jose.hernandezh@cinvestav.mx, <https://orcid.org/0000-0001-7624-9986>

Laboratorio de Medicina Genómica, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, MEXICO, ohernandez@inr.gob.mx, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6388-2459>

Palabras en Español:

SCA7, Reprogramación celular, RNA-seq

Palabras en Inglés:

SCA7, Cellular reprogramming, RNA-seq

Titulo del Trabajo:

Establecimiento de un método de diferenciación neuronal a partir de fibroblastos humanos como modelo de estudio de Ataxia Espinocerebelosa tipo 7

Titulo del Trabajo en Inglés:

Establishment of a neuronal differentiation method from human fibroblasts as a model for Spinocerebellar Ataxia type 7

Área de Investigación:

Departamento de Genética y Biología Molecular

Introducción:

La Ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) es una enfermedad autosómica dominante, caracterizada por la pérdida de las habilidades motrices finas, y degeneración retinal. Existen diversos modelos experimentales para el estudio de SCA7, como modelos animales, o la reprogramación de células utilizando transgenes. Estas modificaciones genéticas pueden alterar el perfil epigenético de la enfermedad, por lo que se requiere de un método que preserve el contexto fisiológico de SCA7. Para ello, en este trabajo se propuso el uso del cóctel de moléculas pequeñas para la reprogramación de fibroblastos humanos sanos y con la patología de SCA7 hacia un fenotipo neural.

Objetivo:

Evaluar la diferenciación neuronal de fibroblastos derivados de pacientes con SCA7 a través de la utilización de las moléculas pequeñas ISX9, I-BET151, CHIR99021 y Forskolina.

Metodología:

Se proliferaron fibroblastos controles sanos (GM03440) y fibroblastos con la patología de SCA7 (GM03561) en medio DMEM a confluencia del 90%. Después, el medio fue sustituido por un medio de inducción, compuesto por neurobasal, N2 1%, B27 2%, GlutaMAX 1%, Penicilina- Estreptomicina 1%, bFGF (100-250 ng/mL), Forskolina 100 µM, CHIR99021 20 µM, ISX9 20 µM, e I- BET151 0.5 µM (Cóctel FICB). Los tratamientos se mantuvieron por 16 días. Una vez terminados los tratamientos, se realizó una extracción de RNA por el método Trizol-cloroformo. Posteriormente se realizó una secuenciación de RNA mediante un sistema de nanoesferas. Mediante PCR punto final y tiempo real se evaluó la expresión de marcadores de la diferenciación neuronal (Ngn2, NeuroD1, MAP2, TUBB3), el marcador de fibroblastos Col1a1, y hTBP como control endógeno. Mediante inmunofluorescencia se analizó la expresión del marcador neuronal B-III tubulina. Los datos se contrastaron en cultivos de fibroblastos GM03440 y GM03561 inducidos y no inducidos a diferenciación.

Resultados:

Se observaron cambios morfológicos en las células inducidas con el cóctel FICB, caracterizados por la presencia de somas y prolongaciones citoplasmáticas que asemejan a neuritas. De igual modo, los cultivos inducidos mostraron señal positiva para TUBB3 y una tendencia al incremento en la expresión de los marcadores relacionados con el linaje neural NeuroD1, Ngn2 TUBB3 y MAP2 en comparación a los fibroblastos no diferenciados. Asimismo, se detectó una tendencia a la baja en la expresión del marcador de fibroblastos Col1a1. El perfil transcripcional confirmó la sobreexpresión de marcadores

neuronales en las células tratadas. A la baja, destacaron genes relacionados con el ciclo celular y remodelación de matriz extracelular. De igual modo, el análisis del transcriptoma destaca expresiones reducidas en los fibroblastos de SCA7 de factores de transcripción que regulan procesos de neurogénesis, tales como CREB5 y PRRX1.

Conclusiones:

El uso del cóctel FICB tiene la capacidad de convertir fibroblastos humanos sanos y de pacientes con SCA7, en células de tipo neural, de modo que constituye un modelo viable para indagar los mecanismos patogénicos de la ataxia espinocerebelosa de tipo 7.