

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO



Programa de doctorado en Biotecnología, Medicina
y Ciencias Biosanitarias

TESIS DOCTORAL

**REPROGRAMACIÓN DE GLÍA ENVOLVENTE OLFATIVA
HUMANA ADULTA A NEURONAS**

Autora:

María Portela Lomba

Directores:

Javier Sierra Istúriz

M^a Teresa Moreno Flores

Pozuelo de Alarcón (Madrid), 2022

“Las preguntas que no podemos contestar son las que más nos enseñan”

Patrick Rothfuss

ABREVIATURAS

AMPC	Adenosín Monofosfato Cíclico	
AnkG	Ankirina G	
ASCL	-	<i>Achaete-Scute Complex-Like</i>
BAM	BRN2, ASCL1 y MYT1L	
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
bHLH	Hélice-Bucle-Hélice Básica	<i>Basic Helix-Loop-Helix</i>
BMP	Proteína Morfogénica Ósea	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BO	Bulbo Olfativo	
CBG	Células Basales Globosas	
CHAT	Colinacetiltransferasa	<i>Choline Acetyltransferase</i>
CBH	Células Basales Horizontales	
CSPG	Proteoglicanos de Condroitín Sulfato	<i>Chondroitin Sulfate Proteoglycans</i>
CTCF	Fluorescencia Total Corregida por Célula	<i>Corrected Total Cell Fluorescence</i>
DAPI	4'6-Diamidino-2-Phenylindole	
DIC	Contraste de Interferencia Diferencial	
DPI	Día Post-infección	
DM	Dorsomorfina	
ESCs	Células Pluripotentes Embrionarias	<i>Embryonic Stem Cells</i>
FSK	Forskolina	
FT	Factores de Transcripción	
GAD67	Glutamato Descarboxilasa 67	<i>Glutamate Decarboxylase 67</i>
GDNF	Factor Neurotrófico Derivado de la Glía	<i>Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor</i>
GEO	Glía Envoltante Olfativa	
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>

GFP	Proteína Verde Fluorescente	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HLA	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
iNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintasa Inducible	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
iNs	Neuronas Inducidas	<i>Induced Neurons</i>
IntDen	Intensidad de Densidad	
iPSCs	Células Madre Pluripotentes Inducidas	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
LCA	Líquido Cefalorraquídeo Artificial	
Lip-OX	Peroxidación de Lípidos	
LM	Lesión Medular	
MAG	Glicoproteína Asociada a la Mielina	<i>Myelin-associated Glycoprotein</i>
MD	Medio de Diferenciación	
MATH/ATOH -		<i>Atonal Homolog</i>
miRNA	MicroRNA	
MC	Monoclonal	
MMP	Metaloproteasas de Matriz	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MO	Mucosa Olfativa	
NB	Neurobasal	
NEUROG	Neurogenina	
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso	<i>Nerve Growth Factor</i>
NGRs	Neuronas Ganglionares de Retina	
NSO	Neuronas Sensoriales Olfativas	
NT	Neurotrofina	
NuRD	Complejo Remodelador del Nucleosoma y con Actividad Deacetilasa	
P75-NGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Nervioso	<i>Nerve Growth Factor Receptor</i>

O/N	-	<i>Overnight</i>
OMgp o MOG	Glicoproteína de Mielina Asociada a Oligodendrocitos	
P/S/A	Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina	
PBS	Tampón Fosfato Salino	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PAI-1	Inhibidor del Activador del Plasminógeno	
PC	Policlonal	
PFA	Paraformaldehído	
PFU	Partículas Virales Infecciosas	
PLL	Poli-L-Lisina	
PO/L	Poli-L-Ornitina/Laminina	
REST	Factor de Transcripción Silenciador RE1	<i>RE1-Silencing Transcription Factor</i>
RNA-Seq	Secuenciación de RNA	
ROI	Región de Interés	<i>Region of Interest</i>
ROS	Radicales Libres de Oxígeno	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	Temperatura Ambiente	<i>Room Temperature</i>
SC	Célula de Schwann	<i>Schwann Cell</i>
SM	Fármacos sintéticos	<i>Small Molecules</i>
SNC	Sistema Nervioso Central	
SNP	Sistema Nervioso Periférico	
TH	Tirosina Hidroxilasa	<i>Tyrosine Hydroxylase</i>
TNCS	Transferencia Nuclear de Células Somáticas	
TNFR	Receptores del Factor de Necrosis Tumoral	<i>Tumour Necrosis Factor Receptors</i>
Tzv	Tiazovivina	
TTX	Tetrodoxina	

vGLUT1	Transportador De Glutamato Vesicular 1	<i>Vesicular Glutamate Transporters 1</i>
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
A2	"Astrocito reactivo"	
ddH2O	-	<i>double distilled H2O</i>

RESUMEN Y

ABSTRACT

La glía envolvente olfativa (GEO) es un tipo celular glial que rodea los axones de las neuronas sensoriales olfativas. Estudios previos han demostrado que estas células son capaces de promover *in vitro* la regeneración axonal de neuronas adultas lesionadas, procedentes del sistema nervioso central (SNC). *In vivo*, esta glía puede promover la mejora funcional a través de la reparación axonal en modelos animales de lesiones medulares. Asimismo, estudios clínicos han aportado evidencias de la factibilidad de su uso para el futuro tratamiento de pacientes lesionados medulares.

Si añadimos a la capacidad regenerativa de la GEO la posibilidad de convertir parte de estas células en neuronas, podríamos mejorar la capacidad de restaurar el área dañada: el trasplante de la GEO reprogramada en la zona de la lesión aportaría nuevas neuronas con capacidad para establecer relevos (“relay”) sinápticos que actuarían como puente para la reconexión de los axones lesionados.

La reprogramación celular consiste en generar cualquier tipo celular diferenciado, a partir de una célula somática, mediante la expresión de uno o varios factores de transcripción. La conversión directa es la reprogramación celular directa en la que la célula no pasa por un estadio pluripotente.

El objetivo de este trabajo es reprogramar GEO humana adulta (hGEO) a neuronas - neuronas inducidas- funcionales mediante la expresión de un único factor de transcripción, NEUROD1.

Tras la caracterización de la capacidad regenerativa de una línea de hGEO adulta, hemos determinado los factores neurogénicos y establecido las condiciones de cultivo para conseguir su reprogramación a neuronas. Tras analizar el proceso de reprogramación y evaluar el efecto de diversos fármacos moduladores de vías de señalización, podemos concluir que la reprogramación de la hGEO se realizó mediante la expresión de un único factor de transcripción, NEUROD1, y que se ha conseguido la maduración funcional de las neuronas inducidas.

La demostración de que hGEO adulta puede ser reprogramada a neuronas funcionales abre la puerta a su estudio en animales como un modelo de terapia celular para la reparación de lesiones del SNC.

Olfactory ensheathing glia (OEG) is a specific glial cell type that surrounds axons of the sensory olfactory neurons. Previous studies have shown that these cells are able to promote *in vitro* axonal regeneration of adult neurons from the central nervous system (CNS). *In vivo*, they can induce functional recovery through axonal repair in animal models of spinal cord injury. Moreover, clinical studies have demonstrated the feasibility of its use for the future treatment of injured spinal cord patients.

If we add to OEG regenerative capacity the possibility of converting some of these cells into neurons we could improve the recovery of the damaged area: engraftment of OEG induced neurons (OEG-iNs) would lead to synapse forming interneurons *in vivo*, acting as a relay in the damaged zone.

The goal of this work is to reprogram adult human OEG to functional neurons - induced neurons (iNs). Cellular reprogramming consists in generating any differentiated cellular type, from a somatic cell, through the expression of one or more transcription factors. Direct conversion is a direct cellular reprogramming in which the cell does not pass through a pluripotent state.

The goal of this work is to reprogram adult human OEG to functional neurons -induced neurons (iNs) - through the expression of a single transcription factor, NEUROD1.

We characterized the neurogenerative properties of a primary cell line from adult human olfactory glia and we determined which neurogenic factor, and which were the culture conditions needed to reprogram this cell line to neurons. After the analysis of the reprogramming process and after assessing the role of several small molecules, it can be concluded that hOEG reprogramming was achieved through the expression of a single transcription factor, NEUROD1, and that we obtained mature and functional induced neurons.

The achievement of adult hOEG reprogramming to neurons opens the door to test this procedure in animal models as a cellular therapy after central nervous system injury.

ÍNDICE



RESUMEN/ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. GLÍA ENVOLVENTE OLFATIVA	7
1.1 Estructura del sistema olfativo	7
1.1.1 Mucosa Olfativa.....	8
1.1.2 Bulbo olfativo.....	9
1.2 Características de la glía envolvente olfativa	10
1.3 Propiedades regenerativas de la glía envolvente olfativa.....	11
1.4 La glía envolvente olfativa en modelos de lesión del Sistema Nervioso Central.....	13
1.4.1 Factores intrínsecos y extrínsecos tras la lesión del Sistema Nervioso Central.....	13
1.4.2 La glía envolvente olfativa como terapia celular para lesiones del Sistema Nervioso Central.....	15
2. REPROGRAMACIÓN CELULAR.....	20
2.1 Características de la reprogramación celular	20
2.1.1 Reprogramación por transferencia nuclear	20
2.1.2 Reprogramación por fusión celular	22
2.1.3 Reprogramación por sobreexpresión de factores de transcripción.....	22
2.1.4 Reprogramación celular directa y a través de iPSCs	23
2.2 Aplicaciones de la reprogramación celular.....	27
2.2.1 Cribado de fármacos	27
2.2.2 Modelado de enfermedades	27
2.2.3 Medicina regenerativa	28
3. REPROGRAMACIÓN DIRECTA A NEURONAS	29
3.1 Factores de transcripción.....	29
3.1.1 Factores de transcripción bHLH	29
3.1.2 Otros factores	31
3.2 Fuente celular.....	31
3.2.1 Fibroblastos.....	32
3.2.2 Astrocitos.....	33
3.2.3 Otros tipos celulares	33
3.3 Factores facilitadores o inhibidores de la reprogramación	36
3.3.1 Remodelaciones epigenéticas	36
3.3.2 Cambio metabólico	37
3.4 Fármacos sintéticos.....	38

OBJETIVOS	42
MATERIALES Y MÉTODOS	46
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	47
2. CULTIVOS CELULARES.....	47
2.1. Cultivo de las líneas celulares	47
2.2. Cultivo primario de astrocitos postnatales de corteza de ratón	48
2.3. Cultivo primario de neuronas de corteza embrionaria de ratón	48
2.4. Cocultivos de hGEO con neuronas ganglionares de retina	49
3. GENERACIÓN DE LOS LENTIVIRUS	50
3.1. Empaquetado de los lentivirus	50
3.2. Concentración de los lentivirus	51
3.3. Titulación de las partículas infecciosas	51
4. REPROGRAMACIÓN DIRECTA DE GEO <i>IN VITRO</i>	52
4.1. Cocultivos de hGEO con astrocitos	54
5. FÁRMACOS INDUCTORES DE LA REPROGRAMACIÓN	54
6. TRANSPLANTE DE LA GEO EN LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL DE BARRILES.....	56
7. INMUNOFLUORESCENCIA	56
7.1. Inmunofluorescencia de los cultivos celulares	59
7.2. Inmunofluorescencia de los tejidos cerebrales.....	59
8. ELECTROFISIOLOGÍA.....	60
8.1. Registros patch-clamp en cultivos celulares	60
8.2. Registros patch-clamp en rodajas cerebrales	61
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
RESULTADOS	63
1. CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA C20 DE hGEO Y DE SUS PROPIEDADES REGENERATIVAS	65
1.1. Análisis de marcadores gliales.....	65
1.2. Análisis de marcadores neuronales	67
1.3. Análisis de marcadores de precursores neuronales.....	69
1.4. Análisis de la capacidad regenerativa.....	70
2. REPROGRAMACIÓN DE LA LÍNEA hGEO C20 A NEURONAS	72
2.1. Análisis de los factores de transcripción candidatos	73
2.2. Expresión de NEUROD1	75
2.3. Análisis del proceso de reprogramación	76
2.4. Estudio de la funcionalidad de las iNs.....	83

3. MADURACIÓN FUNCIONAL DE LAS NEURONAS INDUCIDAS	85
3.1. Cocultivos de C20-ND1-GFP sobre astrocitos humanos.....	85
3.2. Cocultivos de C20-ND1-GFP sobre astrocitos de ratón	87
3.3. Estudio de la funcionalidad de las iNs.....	89
3.4. Caracterización de la especificación neuronal	90
4. ESTUDIO DEL PROCESO DE REPROGRAMACIÓN	92
5. REPROGRAMACIÓN <i>IN VIVO</i>	94
6. EFECTO DE FÁRMACOS COMO INDUCTORES DE LA REPROGRAMACIÓN	96
DISCUSIÓN.....	101
CONCLUSIONES.....	114
BIBLIOGRAFÍA.....	118
ANEXOS	149

INTRODUCCIÓN



Desde los estudios clásicos de Ramón y Cajal, se conoce la escasa capacidad regenerativa de las neuronas adultas del Sistema Nervioso Central (SNC). Es por ello por lo que las lesiones cerebrales o en la médula espinal, o las enfermedades neurodegenerativas pueden ser causa de discapacidad permanente y de la dependencia del paciente.

Una de las estrategias para promover la regeneración del SNC en la zona lesionada es la terapia celular. Esta consiste en trasplantar células con capacidad para promover neuroregeneración en la región afectada. Así, las células trasplantadas sustituyen y/o crean un ambiente permisivo para regenerar las neuronas o los axones dañados y restaurar la función normal del área.

En lesiones del SNC se han trasplantado diversos tipos celulares, entre ellos la glía envolvente olfativa (GEO). La GEO es un tipo de glía específico del sistema olfativo, conocida por su capacidad intrínseca para promover la renovación de neuronas en el sistema olfativo de los mamíferos durante todas las etapas de la vida, incluida la etapa adulta. Es por ello por lo que se han utilizado con éxito para promover la regeneración axonal de neuronas lesionadas del SNC.

Si a esta capacidad regenerativa le añadimos la posibilidad de que algunas de estas células se conviertan en neuronas mediante técnicas de reprogramación celular, que es el principal objetivo de esta tesis doctoral, incrementaríamos considerablemente la posibilidad de reparación tras una lesión en el SNC.

1. GLÍA ENVOLVENTE OLFATIVA

1.1 Estructura del sistema olfativo

El sistema olfativo está compuesto por dos partes principales: la mucosa olfativa (MO), situada en el sistema nervioso periférico (SNP) y el bulbo olfativo (BO), localizado en el sistema nervioso central (SNC) (Smith and Bhatnagar, 2019) (**Figura 1**).

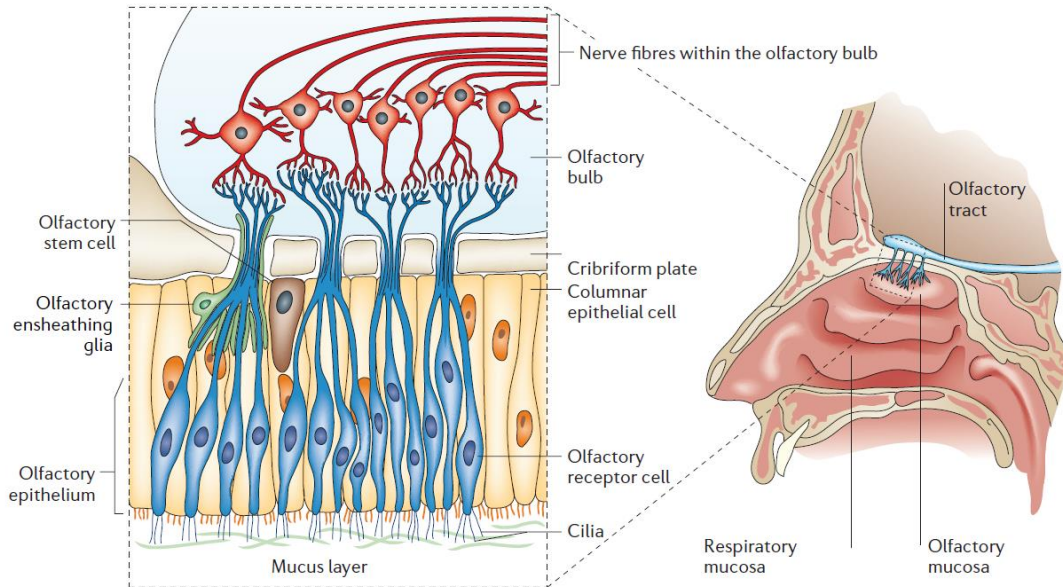


Figura 1. El sistema olfativo. Dibujo representativo del sistema olfativo humano. A la derecha se representa un corte sagital donde se muestra el sistema olfativo. A la izquierda se presenta con mayor detalle la partes del sistema olfativo (Thuret, Moon and Gage, 2006).

1.1.1 Mucosa Olfativa

La MO está formada principalmente por el neuroepitelio y la lámina propia (Salazar *et al.*, 2019).

El neuroepitelio contiene las neuronas sensoriales olfativas (NSO) bipolares, con dendritas apicales que extienden cilios olfativos en la superficie del neuroepitelio, y axones basales que lanzan proyecciones, atravesando la placa cribosa, hasta sus dianas en el BO. En este epitelio, también se encuentran las células sustentaculares, que ofrecen soporte y protección a las NSO, y las glándulas de Bowman, encargadas de la secreción de mucosa en la superficie del neuroepitelio (Doty, 2015; Smith and Bhatnagar, 2019). Además, en la zona más apical del neuroepitelio, se sitúan las células basales globosas (CBG), la fuente principal de la generación de nuevas NSO; y las células basales horizontales (CBH), células inactivas pero con capacidad proliferativa y de generación de todos los tipos celulares del neuroepitelio olfativo, incluidas las CBG, cuando se produce una lesión (Carter, MacDonald and Roskams, 2004; Leung, Coulombe and Reed, 2007; Mackay-Sim, 2010) (Figura 2).

La lámina propia está compuesta por tejido conectivo, por donde pasan los axones de las NSO formando fascículos para dirigirse al BO. Asimismo, en esta capa se encuentra la glía envolvente olfativa. La GEO envuelve estos fascículos, protegiéndolos, y modula la matriz extracelular guiando así a los nuevos axones a través de la placa cribosa hasta su llegada a su diana en el BO, las neuronas mitrales y en penacho, que se encuentran en los glomérulos (Au and Roskams, 2003; Fairless and Barnett, 2005) (**Figura 2**).

1.1.2 Bulbo olfativo

El BO está constituido por seis capas organizadas de la siguiente manera, desde la superficie hasta el interior: capa de las fibras del nervio olfativo, donde se encuentran los fascículos de los axones de las NSO acompañados por la GEO; capa glomerular, donde se produce la sinapsis en los glomérulos entre los axones de las NSO y las dendritas de las neuronas mitrales y/o en penacho, moduladas por las células periglomerulares; capa plexiforme externa, con dendritas secundarias de las neuronas mitrales y en penacho; capa de células mitrales, en la que se encuentran los somas de las neuronas mitrales; capa plexiforme interna, con axones dirigidos al tracto olfativo; y capa de células granulares, que modulan mediante inhibición la transmisión de señales olfativas (Figueres-Oñate, Gutiérrez and López-Mascaraque, 2014; Smith and Bhatnagar, 2019) (**Figura 2**).

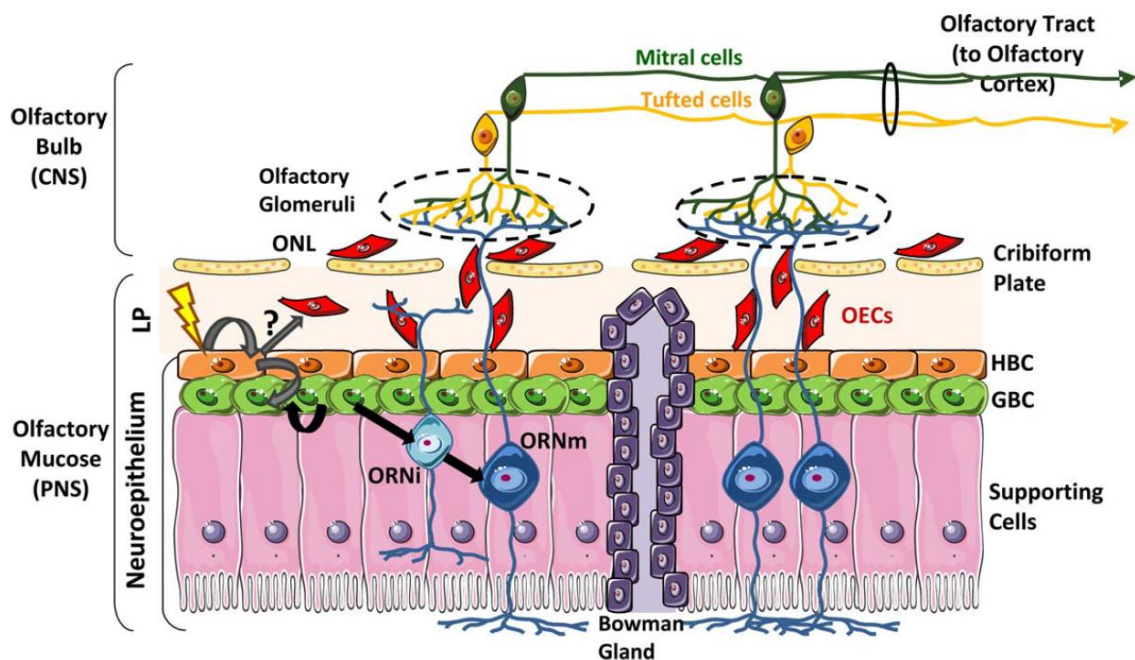


Figura 2. Imagen representativa del sistema olfativo adulto. Se representan las partes del sistema olfativo y se ilustran los tipos celulares que lo conforman (Gómez *et al.*, 2018).

1.2 Características de la glía envolvente olfativa

Debido a su capacidad intrínseca de promover regeneración axonal y a la de coexistir tanto en el SNC como en el SNP, la GEO ha sido difícil de clasificar. Inicialmente, fue identificada como célula de Schwann (SC, del inglés *Schwann cell*) no mielinizante debido a su parecida morfología a las SC y a su localización en el SNP envolviendo los axones (Pixley, 1992; Ramón-Cueto and Valverde, 1995). No obstante, en estudios posteriores, se observó que estas células también se encontraban en la barrera glial limitante de la capa de las fibras del nervio olfativo del BO rodeando a los axones (Doucette, 1991). Así, se han encontrado diferencias fenotípicas (Vincent, West and Chuah, 2005; Doty, 2015; Nazareth *et al.*, 2019) y de expresión génica (Guérout *et al.*, 2010; Lan *et al.*, 2022) entre la GEO procedente del BO y de la MO. Estas diferencias podrían deberse a su distinta naturaleza en el sistema olfativo: en la MO permiten la elongación de los axones de las neuronas olfatorias hasta la capa de las fibras del nervio olfativo, modulando la matriz extracelular; sin embargo, en el BO encauzan a los axones hasta su diana específica (Windus *et al.*, 2010; Paviot *et al.*, 2011).

A pesar de los múltiples estudios realizados con la GEO, todavía no existe un marcador completamente específico de este tipo de glía. No obstante, estas células expresan una combinación de antígenos que nos permiten identificarlas y diferenciarlas de otros tipos gliales (descritos a continuación en el texto) (Ramón-Cueto and Valverde, 1995). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la expresión de estos antígenos no es constante a lo largo del tiempo (Franceschini and Barnett, 1996). Estos marcadores varían dependiendo de su localización en el sistema olfativo (Oprych, Cotfas and Choi, 2017; Gómez *et al.*, 2018) y de la etapa de desarrollo en la que se encuentren (Franssen, de Bree and Verhaagen, 2007). También se ha planteado que la falta de marcadores universales de glía olfativa y la maleabilidad del fenotipo podrían representar diferentes estados funcionales de la misma población glial (Vincent, West and Chuah, 2005).

En la literatura, se describen dos tipos fenotípicos principales *in vitro*, una fusiforme bipolar “*Schwann-like*” que expresa p75-NGFR (el receptor del factor de crecimiento nervioso) y GFAP difuso (del inglés *glial fibrillary acidic protein*), y otra estrellada planar “*Astrocyte-like*” que expresa GFAP difuso y E-NCAM (del inglés *polysialylated neuronal cell adhesion molecules*) (Franceschini and Barnett, 1996; Moreno-Flores *et al.*, 2002).

Huang et al. realizaron ensayos de *time-lapse* en los que observaron que subpoblaciones distintas de GEO se transformaban entre ellas sin ningún estímulo extrínseco; es decir, células “*Schwann-like*” se transformaban espontáneamente a “*Astrocyte-like*” y viceversa (Huang et al., 2008). Adicionalmente estudios de líneas clonales apoyan la idea de esta flexibilidad entre los diferentes morfotipos (Franceschini and Barnett, 1996). Asimismo, hay que tener en cuenta que el método de cultivo puede alterar los niveles de expresión de los marcadores de la GEO (García-Escudero et al., 2012).

En un principio, se creía que la GEO provenía de las placodas olfativas (Doucette, 1990). Sin embargo, en los últimos años, gracias al uso de técnicas como los mapas de destino celular y el rastreo de linaje genético, se ha demostrado que esta no se origina en las placodas sino en la cresta neural (Barraud et al., 2010; Forni et al., 2011). Posteriormente, estas células migran y se incorporan a la placoda olfativa, donde a lo largo del desarrollo acompañan y guían a las neuronas olfativas desde la lámina propia en la MO hasta la capa de las fibras del nervio olfativo en el BO (Forni et al., 2011; Gómez et al., 2018). Estos estudios explican las similitudes que siempre se han visto entre las células Schwann y la GEO, ya que ambas provienen de la misma fuente, la cresta neural (Barraud et al., 2010; Forni et al., 2011).

1.3 Propiedades regenerativas de la glía envolvente olfativa

La GEO tiene la capacidad intrínseca de generar un ambiente proregenerativo alrededor de los axones neuronales. Durante el desarrollo de sistema olfativo son las células encargadas de proteger, guiar y acompañar a las neuronas olfativas desde el neuroepitelio hasta la capa de las fibras del nervio olfativo. Además, las NSO se renuevan constantemente y la GEO es la responsable de facilitar el crecimiento axonal de las nuevas neuronas (Bédard and Parent, 2004; Franssen, de Bree and Verhaagen, 2007). Por ello, resulta de interés averiguar el fundamento de estas propiedades regenerativas con el objetivo de aplicarlas en la regeneración de lesiones del sistema nervioso.

Aunque todavía no se conocen completamente los mecanismos moleculares por los que estas células son proregenerativas (Roet and Verhaagen, 2014), sí que se han identificado varias vías de señalización y moléculas que están implicadas (Pastrana et al., 2006; Simón et al., 2011; Wang et al., 2016). Se ha determinado que la GEO secreta

factores neurotróficos que promueven la supervivencia neuronal y la regeneración axonal, entre ellos el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*), el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nerve growth factor*) y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, del inglés *glial cell line-derived neurotrophic factor*) (Woodhall, West and Chuah, 2001; Pastrana *et al.*, 2007). Asimismo, esta glía presenta los receptores de estos factores, TrkB, p75 y GFR α -1. Esto podría indicar que estos factores tróficos tienen un efecto autocrino sobre la GEO (Woodhall, West and Chuah, 2001). Además de proporcionar soporte neurotrófico, la GEO expresa moléculas de adhesión que facilitan la extensión de los axones, como E-NCAM (Moreno-Flores *et al.*, 2003a) (**Figura 3**).

Otras moléculas secretadas por las GEO son las metaloproteasas de matriz (MMP, del inglés *matrix metalloproteinase*), que modulan la composición de la matriz extracelular (Pastrana *et al.*, 2006; Ould-Yahoui *et al.*, 2013). Las MMPs digieren redes perineuronales constituidas por los proteoglicanos de condroitín sulfato (CSPGs, del inglés *chondroitin sulfate proteoglycans*) y atenúan la formación de la cicatriz glial, que se forma tras una lesión del sistema nervioso. De esta manera se genera un entorno favorable para la regeneración y elongación de los axones (Gueye *et al.*, 2011) (**Figura 3**).

Sin embargo, estas células también expresan factores inhibitorios de la regeneración como Nogo o Sema 3A (Nocentini *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2018). Estas moléculas parecen tener una función de repulsión necesaria para la correcta guía de los axones de las neuronas olfativas (Schwartz *et al.*, 2000) (**Figura 3**).

La expresión de todas estas moléculas proporciona una constante comunicación glía-neurona que permite a las neuronas olfativas prolongar sus axones correctamente a lo largo de su camino al BO, pero además la GEO tiene otras propiedades que complementan los efectos proregenerativos de estos factores para favorecer el crecimiento axonal.

Como ya se ha comentado anteriormente, la formación de nuevas conexiones en el sistema olfativo está activa durante el desarrollo neonatal y durante toda la vida adulta. Como consecuencia, esto genera gran cantidad de restos celulares que no son favorables para el crecimiento de nuevos axones. Existen evidencias experimentales que han demostrado que es la GEO, y no los macrófagos, el principal responsable de fagocitar estos restos de las neuronas olfativas y, así, mejorar las condiciones para la supervivencia y la regeneración axonal (Nazareth *et al.*, 2015a; Nazareth *et al.*, 2015b).

En el sistema olfativo, la GEO no forma mielina. Sin embargo, en lesiones inducidas en las que se produce desmielinización por irradiación de rayos X y posterior aplicación de bromuro de etidio, se ha visto que estas pueden generar mielina con un patrón de tipo periférico, positivos para la proteína P0 (Barnett *et al.*, 2000; Kolatsi-Joannou *et al.*, 2001), tanto *in vitro* como *in vivo* (Lankford *et al.*, 2008). Otros estudios, en cambio, señalan que la GEO no mieliniza los axones (Plant *et al.*, 2002; Dombrowski *et al.*, 2006) pero atraería a células de Schwann a la zona de la lesión (Boyd *et al.*, 2004).

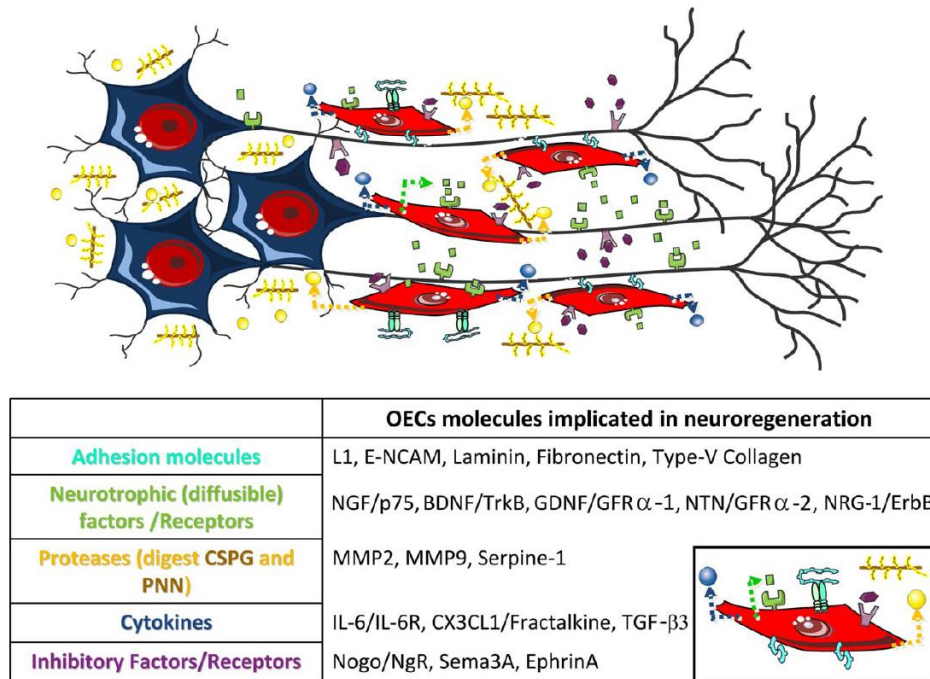


Figura 3. Esquema de moléculas expresadas por la GEO e implicadas en la neuroregeneración. Arriba, se muestra una imagen representativa del contacto GEO-neurona. Debajo, se recogen en una tabla las moléculas expresadas por la GEO (Gómez *et al.*, 2018).

1.4 La glía envoltora olfativa en modelos de lesión del Sistema Nervioso Central

1.4.1 **Factores intrínsecos y extrínsecos tras la lesión del Sistema Nervioso Central**

Cuando se produce una lesión en el SNC, los mecanismos moleculares y celulares que controlan el crecimiento axonal durante el desarrollo se reactivan (He and Jin, 2016). Tras la lesión, se producen una serie de cambios celulares para favorecer la regeneración axonal: se produce una entrada de calcio en la extremidad dañada de la

neurona que induce el reordenamiento del citoesqueleto para el resellado de la membrana y la formación de un nuevo cono de crecimiento (Chierzi *et al.*, 2005; Curcio and Bradke, 2018). También, se produce un aumento en el transporte mitocondrial, calcio dependiente (López-Doménech *et al.*, 2012), que aporta energía para poder remodelar el citoesqueleto. Además, en las neuronas dañadas se modifica el patrón de marcas epigenéticas, la regulación de la expresión génica y la activación de las cascadas de señalización implicadas en el crecimiento axonal (Shin and Cho, 2017). En estudios de lesiones del SNC, observaron que las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal se regeneran cuando se dañan primero las proyecciones sensoriales. Este fenómeno va acompañado por un aumento de los niveles del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) que permiten bloquear la inhibición de la regeneración mediada por la glicoproteína asociada a la mielina (MAG, del inglés *myelin-associated glycoprotein*) (Qiu *et al.*, 2002).

Sin embargo, aunque las neuronas dañadas fuesen capaces de regenerarse, debido a que el microambiente está afectado en el área lesionada, estos axones se elongarían sin ningún rumbo establecido y no podrían llegar a sus dianas y volver a establecer sinapsis. Por un lado, existe un impedimento fisiológico, un desequilibrio de factores extrínsecos que bloquean el correcto crecimiento axonal. Las neuronas, en condiciones fisiológicas, están rodeadas por una red perineuronal, una matriz compuesta por ácido hialurónico con, mayormente, proteoglicanos (CSPG) anclados. Esta matriz tiene la función de delinear y proteger las redes neuronales establecidas, mantener la homeostasis iónica y estabilizar las transmisiones sinápticas (Rhodes and Fawcett, 2004; Karetko and Skangiel-Kramska, 2009). Cuando se produce un daño en el tejido neuronal, esta matriz se degrada y los CSPGs se extienden por la zona de lesión inhibiendo el crecimiento axonal. Asimismo, debido a la lesión, las capas de mielina se rompen y son fuente de proteínas inhibitorias de la regeneración como las moléculas de la familia Nogo - Nogo A, B y C -, MAG y la glicoproteína de mielina asociada a oligodendrocitos (OMgp o MOG). Asimismo, existen otras moléculas inhibitorias en la zona de la lesión como los receptores y ligandos de la familia Eph/Ephrina, las semaforinas, etc. (Fawcett *et al.*, 2012).

Por otro lado, hay un impedimento físico, la generación de la cicatriz glial, que impide el paso de estos nuevos axones. La cicatriz glial es una barrera formada por un grupo heterogéneo de células gliales (principalmente astrocitos, microglía y oligodendrocitos) que rodea la zona dañada. La lesión produce una respuesta proinflamatoria aguda que activa el sistema inmunitario del SNC, la microglía, a un estadio activo (M1). Esta M1

impulsa el fenotipo “astrocito reactivo” (A1), que genera un ambiente tóxico para las neuronas y los oligodendrocitos. Además, estas células gliales bajo estas condiciones sobreexpresan CSPGs, lo que impide la regeneración axonal (Adams and Gallo, 2018). De esta manera, cuando el contexto inflamatorio es crónico se genera la cicatriz glial. A corto plazo esta barrera glial tiene una función beneficiosa, ya que preserva la integridad del tejido periférico no dañado; sin embargo, a largo plazo, impide la elongación de los axones a través de ella (Silver, Schwab and Popovich, 2014; Adams and Gallo, 2018).

1.4.2 La glía envolvente olfativa como terapia celular para lesiones del Sistema Nervioso Central

Cuando se genera un daño en el SNC, este es incapaz de regenerar sus neuronas o conexiones en la zona lesionada. Por ello, los investigadores han tenido que acudir al uso de diversas estrategias para conseguir la regeneración neuronal, como el trasplante de uno o varios tipos celulares (Ramón-Cueto and Valverde, 1995; Moreno-Flores *et al.*, 2002; Barnett and Chang, 2004). Las propiedades proregenerativas innatas de la GEO han hecho que estas células sean una de las candidatas utilizadas para promover la reparación del SNC dañado (Franklin and Barnett, 2000; Franssen, de Bree and Verhaagen, 2007; Watzlawick *et al.*, 2016; Gómez *et al.*, 2018).

Estudios *in vitro*

Los estudios *in vitro* demuestran los efectos neurotróficos que tiene la GEO no solo sobre las propias neuronas olfativas sino sobre otras neuronas del SNC (Pellitteri *et al.*, 2007; Pellitteri *et al.*, 2009). En ensayos de cocultivos de glía envolvente con neuronas ganglionares de la retina, postnatales y adultas axotomizadas (Moreno-Flores *et al.*, 2003a; Portela-Lomba *et al.*, 2020) se identificaron moléculas expresadas por GEO con diferentes capacidades de promover regeneración (Pastrana *et al.*, 2006). Así, en trabajos posteriores se validó el papel de moléculas relevantes para la regeneración axonal como la MMP2 (Pastrana *et al.*, 2006), el BDNF (Pastrana *et al.*, 2007) o el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (Simón *et al.*, 2011). Estos estudios también permiten replicar el microambiente inhibitorio generado en la lesión del SNC *in vivo* (Khankan, Wanner and Phelps, 2015): se mostró que el contacto directo entre la GEO y la célula dañada proporcionaba un sustrato permisivo que permitía la elongación de las neuritas frente al perfil inhibitorio de la cicatriz glial.

Estudios *in vivo*

El grupo de Nieto-Sampedro, fue uno de los primeros que llevaron a cabo trasplantes de GEO, en un modelo de rizotomía (corte de una de las raíces dorsales), en ratas adultas. En ellos, se demostró que la glía envolvente promueve la regeneración de los axones de las neuronas de las raíces dorsales, permitiendo su entrada en la médula espinal, y por tanto en el SNC (Ramón-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994).

A lo largo de los años, se fue profundizando el estudio del crecimiento axonal mediante el análisis con trazadores (retrógrados y/o anterógrados) y marcajes de crecimiento axonal, como GAP43. Asimismo, se estudió la recuperación funcional de diferentes grados de lesiones medulares (LM) con estudios electrofisiológicos y pruebas de comportamiento (motoras y sensitivas) (revisado en (Gómez *et al.*, 2018)).

Pese a que todavía no se conocen todos los mecanismos de acción de esta glía, en la bibliografía sí se han descrito varios mecanismos por los que estas células favorecen la regeneración neuronal en lesiones del SNC (revisado en (Franssen, de Bree and Verhaagen, 2007; Roet and Verhaagen, 2014; Gómez *et al.*, 2018)). A continuación, se describirán algunos de ellos.

Migración

Durante el desarrollo del sistema olfativo, la GEO migra desde el neuroepitelio a la capa las fibras del nervio olfativo acompañando a las NSO. Estudios *in vitro* demuestran que, aunque la capacidad migratoria de la GEO varía según la fuente anatómica de la que se obtenga la GEO, ambas tienen capacidad de migrar y promover el crecimiento de axones (Windus *et al.*, 2010; Ekberg *et al.*, 2012).

Diversos estudios *in vitro* demuestran que esta glía migra a través de contactos célula-célula estimuladas por ondas lamelipodiales dependientes de GDNF (Cao *et al.*, 2006; Windus *et al.*, 2007; Windus *et al.*, 2010). La GEO expresa el factor neurotrófico GDNF, el cual tiene un efecto autocrino que promueve la migración de la GEO y, subsiguientemente, promueve el crecimiento axonal. También, se ha descrito que los astrocitos reactivos de la cicatriz glial expresan la citoquina TNF- α , la cual actúa como un quimioatrayente a través de receptores TNFR de la GEO, y promueve la migración de la GEO hacia la zona de lesión (Su *et al.*, 2009; Lankford, Arroyo and Kocsis, 2017).

Asimismo, en modelos de LM *in vivo*, se ha confirmado que, cuando se produce una lesión, las células trasplantadas migran y promueven la regeneración axonal (Richter,

2005; Lankford *et al.*, 2008). En contradicción, también se describe que la GEO, en LM, tiene una capacidad migratoria muy limitada o incluso inexistente (Ramer *et al.*, 2004a; Pearse *et al.*, 2007). En la zona de lesión hay moléculas inhibitorias que podrían restringir la migración de esta glía (Reginensi *et al.*, 2015).

Respuesta astrocitaria e inmunitaria

Cuando se produce una LM, se genera un ambiente proinflamatorio que activa y atrae a astrocitos y microglía a la zona de lesión (Ren *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2021). López-Vales y colaboradores describen que, en lesiones de LM, la GEO neuroprotege modulando la respuesta inflamatoria. La GEO induce una respuesta astrocitaria y de microglía/macrófagos mayor, más temprana y de menor duración (López-Vales *et al.*, 2004b).

En estadios tempranos de la lesión, la GEO promueve la respuesta astrocitaria. Así, contribuye a la formación de la cicatriz glial para que se selle la zona dañada y, con ello, se restaure el microambiente extracelular. En estadios más tardíos, la GEO reduce la astrogliosis y la reactividad microglial, lo que disminuye los efectos inhibitorios y, consecuentemente, genera un entorno más permisivo para expansión de los axones (López-Vales *et al.*, 2004b).

Las citoquinas proinflamatorias, como IL1 β , inducen un incremento de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés *inducible nitric oxide synthase*) en microglía y macrófagos (Minghetti and Levi, 1998). La activación de iNOS está involucrado en la respuesta inmune y es neurotóxico en estadios tempranos; sin embargo, a largo plazo ejerce un papel neuroprotector (Sinz *et al.*, 1999). Lopez-Vales y colaboradores demostraron que, en LM, la GEO modula la actividad de iNOS, retrasando su expresión y, consecuentemente, promoviendo la supervivencia neuronal (López-Vales *et al.*, 2004b).

Angiogénesis

Diversos estudios *in vivo* han descrito que el trasplante de GEO en LMs favorece la angiogénesis (López-Vales *et al.*, 2004a; Richter, 2005; Wang *et al.*, 2022). Au y colaboradores demostraron que la GEO expresa el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*), un importante mediador de la angiogénesis (Au and Roskams, 2003). También, se ha descrito que cuando se implanta GEO en LM, los niveles de VEGF son mayores tanto en el área de la lesión como en las zonas proximales (López-Vales *et al.*, 2004a). Además, en trabajos

recientes, se ha expuesto que este factor podría promover la angiogénesis a través de la activación de la ruta PI3K/Akt en la GEO (Wang *et al.*, 2022). Por otro lado, Ramer y colaboradores proponen que la formación de nuevos vasos sanguíneos puede no solo tener una función de restablecimiento trófico, sino que también podrían funcionar como una guía física para la migración de la glía y la elongación axonal (Ramer *et al.*, 2004a). Asimismo, a partir de trabajos de metaanálisis de expresión génica, se han encontrado un grupo de genes relacionados con el desarrollo de vasos sanguíneos sobreexpresados en la GEO (Guérout *et al.*, 2010; Roet *et al.*, 2011).

Por el contrario, también existen estudios donde no encuentran efectos proregenerativos tras el trasplante de GEO en la zona de lesión (Ramer *et al.*, 2004b; Riddell *et al.*, 2004; Steward *et al.*, 2006; Pearse *et al.*, 2007).

Ensayos clínicos

A raíz de los buenos resultados obtenidos en animales, se han llevado a cabo varios ensayos clínicos con GEO (resumido en la siguiente tabla).

Origen celular	País	Otros parámetros	Referencias
GEO fetal	China	-	(Huang <i>et al.</i> , 2009); (Guest, Herrera and Qian, 2006)
MO-GEO	Australia China*	-	(Féron <i>et al.</i> , 2005); (Mackay-Sim <i>et al.</i> , 2008); (Rao <i>et al.</i> , 2013)*
Mucosa olfativa	Portugal	-	(Lima <i>et al.</i> , 2006); (Lima <i>et al.</i> , 2010)
GEO + SC	China	-	(Chen <i>et al.</i> , 2014)

MO-GEO + fibroblastos de los nervios olfativos	Polonia	-	(Tabakow <i>et al.</i> , 2013)
BO-GEO + puentes de nervios periféricos (matriz+ fibroblastos de los nervios olfativos + SC)	Polonia	Re-transección; rehabilitación	(Tabakow <i>et al.</i> , 2014)

Con estos ensayos clínicos se demuestra que el trasplante de GEO autólogo en LM es seguro y factible. En algunos, se ha conseguido mejora funcional; no obstante, es difícil determinar la contribución de la GEO en estas mezclas de células.

Actualmente, Tabakow y colaboradores están realizando un ensayo clínico con BO-GEO (clinicaltrials.gov: NCT03933072) “*Autologous Bulbar Olfactory Ensheathing Cells and Nerve Grafts for Treatment of Patients With Spinal Cord Transection*”.

En futuros ensayos habrá que establecer métodos de purificación de GEO para poder atribuir la regeneración a la GEO. Con ello, se podría potenciar y complementar estas propiedades con, por ejemplo, el cotrasplante con otros tipos celulares.

2. REPROGRAMACIÓN CELULAR

2.1 Características de la reprogramación celular

La reprogramación celular consiste en diferenciar una célula somática a otro tipo celular distinto (revisados en (Jaenisch and Young, 2008; Yamanaka and Blau, 2010; Graf, 2011; Halley-Stott, Pasque and Gurdon, 2013; Kanherkar *et al.*, 2014). Las células adultas diferenciadas son genéticamente similares a las células embrionarias y a otros tipos celulares, pero es el patrón de expresión génica lo que varía en cada tipo celular a lo largo del desarrollo. Esto es lo que confiere a los diferentes tipos de células su capacidad de dar lugar a diferentes linajes celulares: totipotencia, pluripotencia, multipotencia o unipotencia (ver **Figura 4**, en **Cuadro 1**).

Los principales tipos de reprogramación celular para retornar a la pluripotencia son los siguientes:

2.1.1 Reprogramación por transferencia nuclear

La transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) es la implantación física del núcleo de una célula somática en un óvulo enucleado (Briggs and King, 1952) (**Figura 5A**). Así, conseguimos una célula (reprogramada) con la misma información genética que la célula somática que, además, tiene propiedad totipotente (ver **Cuadro 1**). Sin embargo, la eficiencia de esta metodología disminuye drásticamente cuando se utiliza un núcleo somático adulto (Yang *et al.*, 2007). Además, los clones que sobreviven exhiben diversas alteraciones respecto a la célula inicial (Yang *et al.*, 2007; Czernik *et al.*, 2019). No obstante, podemos realizar TNCS, obtener células pluripotentes embrionarias (ESCs, del inglés embryonic stem cells) de la masa interna del blastocisto y generar líneas clonales pluripotentes (ver **Cuadro 1**). Esta incapacidad de reprogramar completamente el genoma refleja la “memoria epigenética” de la célula donante (Ng and Gurdon, 2008; Pasque *et al.*, 2011).

Cuadro 1: Potencias celulares

La **potencia celular** es la capacidad de una célula para diferenciarse en otros tipos celulares. Esta está regulada por procesos epigenéticos que determinan la conformación de la cromatina, y consecuentemente, la activación o represión de genes pluripotentes o específicos de linaje.

- **Totipotencia:** capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares de un organismo, incluidos los tejidos extraembrionarios.
- **Pluripotencia:** capacidad de diferenciarse a todos los tipos celulares de las tres capas germinales del embrión (endodermo, mesodermo, ectodermo), pero no los tejidos extraembrionarios.
- **Multipotencia:** capacidad de diferenciarse a los diferentes tipos celulares de una de las capas germinales del embrión.

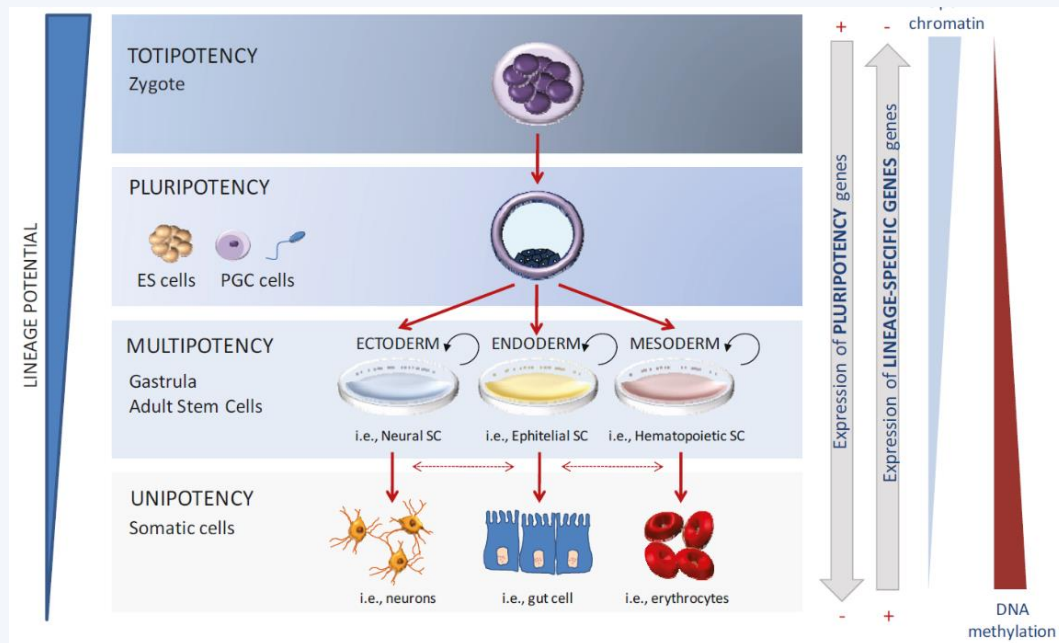


Figura 4. Esquema representativo de los grados de potencias celulares. Partiendo del cigoto, una célula totipotente, a lo largo de la diferenciación celular se pierde gradualmente la potencia celular: pluripotencia, multipotencia y unipotencia. A la derecha del esquema se ilustran los cambios epigenéticos involucrados en este proceso. (Berdasco and Esteller, 2011)

2.1.2 Reprogramación por fusión celular

La fusión celular es la hibridación de, al menos, dos células para formar una sola identidad con múltiples núcleos (heterocarión) no proliferativa (**Figura 5B**) (Ying *et al.*, 2002; Soza-Ried and Fisher, 2012). Tras 2-3 días, el núcleo se fusiona y se genera un híbrido con núcleo poliploide o aneuploide capaz de dividirse. Cuando se fusionan células somáticas con ESCs, estas adquieren pluripotencia (Tada *et al.*, 2001). Tada y colaboradores concluyen que las ESCs tienen la capacidad de modificar el patrón de marcas epigenéticas de las células somáticas.

La reprogramación por fusión celular es un procedimiento que se utiliza, principalmente, para estudiar la pluripotencia y los mecanismos trans-activadores implicados en la reprogramación (Piccolo *et al.*, 2011).

2.1.3 Reprogramación por sobreexpresión de factores de transcripción

Yamanaka y colaboradores consiguieron reprogramar células diferenciadas a células pluripotentes, equivalentes a las ESCs, mediante la sobreexpresión de cuatro factores de transcripción (FT): Oct4, Sox2, Klf4 y Myc (Takahashi and Yamanaka, 2006) (**Figura 5C**). Estas células pluripotentes fueron denominadas células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced pluripotent stem cells*).

La eficiencia de reprogramación es baja, entre 0,01%-0,1%, y a veces incompleta (Takahashi and Yamanaka, 2006). Por ello, muchos grupos de investigación han centrado su trabajo en aumentar la eficiencia de reprogramación mediante, por ejemplo, microRNAs (Judson *et al.*, 2009) o fármacos sintéticos (SM, del inglés *small molecules*) (Federation, Bradner and Meissner, 2014). Mediante la disminución de la actividad del complejo remodelador del nucleosoma y con actividad deacetilasa (NuRD), Rais y colaboradores, consiguieron una eficiencia de casi el 100% (Rais *et al.*, 2013).

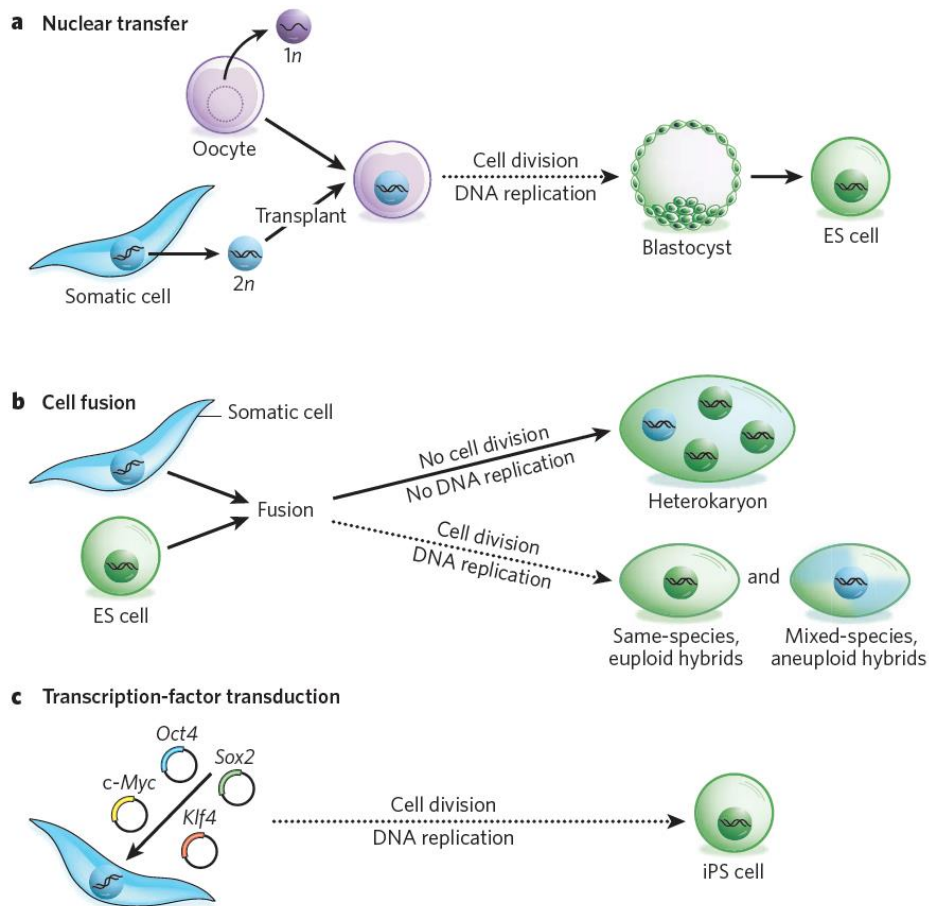


Figura 5. Tipos de reprogramación celular hacia la pluripotencia. Dibujos representativos de los procesos de reprogramación por TNCS (A), fusión celular (B) y sobreexpresión de factores de transcripción (C) (Yamanaka and Blau, 2010).

2.1.4 Reprogramación celular directa y a través de iPSCs

La reprogramación de una célula somática a otro tipo celular diferenciado se puede realizar de dos formas distintas: de una manera directa (reprogramación directa) o pasando a través de un estadio pluripotente intermedio de iPSC (reprogramación indirecta) (Figura 6).

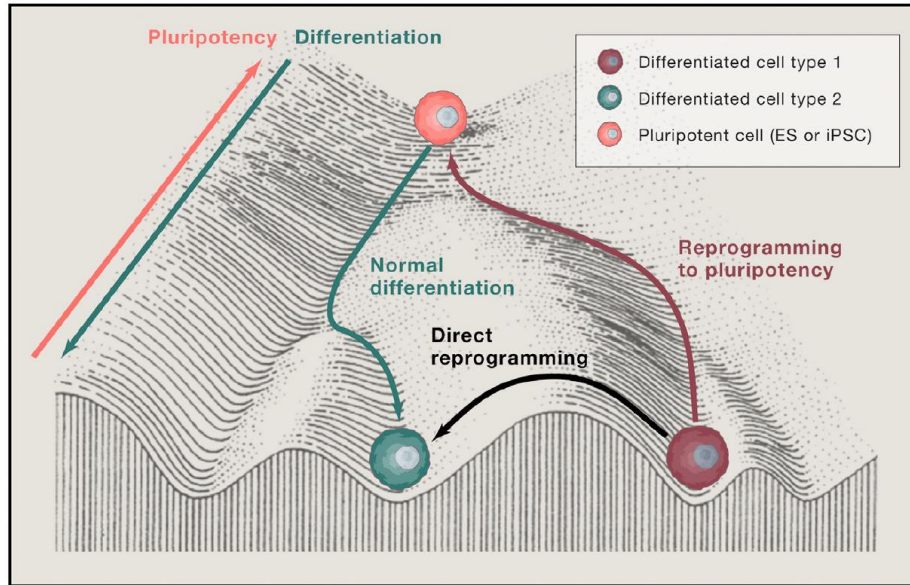


Figura 6. Esquema de la diferenciación y reprogramación celular. Durante el proceso de diferenciación, las células, como canicas, ruedan colina abajo por los valles de la montaña (flechas verdes) hacia su destino celular. La reprogramación celular demuestra que las canicas también pueden rodar colina arriba (flecha roja) para rodar por otro valle (reprogramación indirecta) o rodar entre valles (flecha negra; reprogramación directa) hacia otro destino celular ((Srivastava and DeWitt, 2016) modificado de Conrad Waddington (Waddington, 1957)).

A continuación, se resumen algunas de las características de ambos procesos.

En el caso de la reprogramación indirecta, mediada por iPSCs, la pluripotencia se puede alcanzar mediante la sobreexpresión de FTs (Takahashi and Yamanaka, 2006) (ver apartado 2.1.3) o mediante el uso de fármacos sintéticos (SM, del inglés *small molecules*) (Hou *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2022). Igualmente, la reprogramación directa se puede realizar con uno o varios FTs, dependiendo del tipo celular al que se quiera llegar (Aydin and Mazzoni, 2019) o mediante la activación o inhibición de diferentes rutas de señalización con SM (Ma, Kong and Zhu, 2017).

In vitro, la conversión directa se realiza en un medio de diferenciación específico del tipo celular que se quiera conseguir; mientras que, en la indirecta, se necesitan unas condiciones de cultivo para la generación de la iPSC y otras diferentes para su posterior diferenciación. Por ello, el tiempo requerido para el mismo objetivo sería mayor. No obstante, la ventaja de la reprogramación indirecta es que una vez se generan las células pluripotentes, estas pueden proliferar indefinidamente, y se pueden almacenar para futuros usos (Huang *et al.*, 2019). Además, una vez generadas las iPSCs, estas

pueden diferenciarse a distintos tipos celulares y, así, estudiar las interacciones entre diferentes tipos celulares procedentes del mismo sujeto (modelos 2D y 3D) (Centeno, Cimarosti and Bithell, 2018).

La reprogramación por TNCS o fusión nuclear requiere del uso de ESCs para la obtención del tipo celular deseado (ver apartado 2.1.). Sin embargo, la reprogramación celular directa y la indirecta permiten generar el tipo celular deseado sin la utilización de ninguna célula embrionaria, lo que elimina implicaciones éticas que tienen las técnicas anteriores.

Las iPSCs *in vivo* forman teratomas, tumores que contienen tejido de las tres capas germinales (Abad *et al.*, 2013). Si tras la diferenciación de estas células quedase alguna iPSC residual, podría desarrollar un tumor. Asimismo, la inducción de la pluripotencia favorece la generación de alteraciones genéticas como aberraciones cromosómicas o mutaciones puntuales (Mayshar *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2012), lo que puede promover la formación de tumores. Además, los FTs utilizados para generar las iPSCs son oncogenes relacionados con la carcinogénesis, especialmente c-Myc (Okita, Ichisaka and Yamanaka, 2007).

Por el contrario, la reprogramación directa, al no pasar por una fase pluripotente, no tiene capacidad de generar teratomas y la mayoría de los genes utilizados para reprogramar de una manera directa están relacionados con el tipo celular que se quiere obtener (Wang *et al.*, 2021a).

La inmunogenicidad de las células reprogramadas es mínima, ya que las células pueden ser autólogas. Sin embargo, Zhao y colaboradores encontraron que células parcialmente reprogramadas, generadoras de teratomas, pueden inducir respuesta inmune dependiente de células T; no obstante, esto estaba asociado a una expresión génica anormal (Zhao *et al.*, 2011). Respecto a la reprogramación directa, hasta el momento no se ha encontrado ningún caso de inmunogenicidad.

Varios estudios han observado que las células derivadas de iPSCs, al pasar por la fase pluripotente, pierden características asociadas al envejecimiento, es decir, sufren un “rejuvenecimiento” (Lapasset *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2017). Lapasset y colaboradores llevaron a cabo un estudio comparativo de diversas marcas de envejecimiento donde comparan las células de partida (“envejecidas”) frente a las iPSCs y ESCs. En estos estudios observaron que las iPSCs perdían marcas de senescencia (como la expresión de p21 o p16), que presentaban un alargamiento de los telómeros y que el patrón de

expresión de genes asociados con la actividad mitocondrial y el estrés oxidativo era similar al de las ESCs (Lapasset *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando se produce una conversión directa, parece que se preservan las marcas genéticas asociadas a la edad (Mertens *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2017).

Una característica de especial relevancia es que la conversión directa puede realizarse directamente *in vivo* utilizando células endógenas del tejido (Srivastava and DeWitt, 2016; Leaman, Marichal and Berninger, 2022). Así, se reducen los problemas asociados a la terapia celular convencional, como la anterior producción celular o la posterior integración en un sistema exógeno. Asimismo, reduce todavía más la probabilidad de generar una respuesta inmune.

Sin embargo, a pesar de las ventajosas aplicaciones que tiene la reprogramación celular, existen todavía algunas dificultades que tienen que ser abordadas (Huang *et al.*, 2019). Uno de los principales inconvenientes es el coste de producción: la generación y validación de líneas de iPSCs tiene un coste económico (10.000-25.000 dólares) y temporal (3-6 meses) bastante alto (Huang *et al.*, 2019). Además, producir a gran escala el tipo celular diferenciado que se necesita incrementa considerablemente los costes. Por este motivo, se han establecido diversos bancos de iPSCs a lo largo de todo el mundo (Huang *et al.*, 2019). En ellos, se han almacenado líneas alogénicas con distintos haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA, del inglés *human leukocyte antigen*) para su futuro uso. Respecto a la reprogramación directa, los costes de producción son ligeramente menores que en la reprogramación indirecta, ya que la producción de células directamente inducidas requiere menos pasos y, por ello, menor tiempo. Sin embargo, no se pueden generar bancos para aliviar la carga económica.

Otro inconveniente es que, a lo largo del proceso de reprogramación, se pueden producir mutaciones que pueden generar inestabilidades genéticas, como por ejemplo aberraciones cromosómicas. Así, la población celular final sería heterogénea (Hayashi, Ohnuma and Furue, 2019). Asimismo, el vehículo para la sobreexpresión de los factores de transcripción suelen ser partículas virales integrativas, lo que provoca alteraciones aleatorias en el genoma de las células.

También, existe una heterogeneidad innata entre fuentes celulares de distintos individuos. Cada individuo presenta fondos genéticos y epigenéticos distintos que pueden afectar a la reprogramación (Cahan and Daley, 2013; Hayashi, Ohnuma and Furue, 2019). Estas distinciones, pueden verse reflejadas en diferentes sesgos a lo largo del proceso de reprogramación y, consecuentemente, generar distintos fenotipos.

2.2 Aplicaciones de la reprogramación celular

La posibilidad de utilizar células procedentes de un paciente y convertirlas en el tipo celular deseado, da lugar a un estudio personalizado de la patología que se concreta en las siguientes aplicaciones (revisadas en (Shi *et al.*, 2017)).

2.2.1 Cribado de fármacos

Al poder producir el tipo celular deseado, se puede hacer un estudio más amplio de los posibles fármacos para el tratamiento de la patología del paciente. Así, se pueden tener en cuenta variables adicionales de cada paciente hacia el tratamiento, como el fondo genético o la influencia epigenética de cada individuo (Mall and Wernig, 2017). Además, esta técnica permite realizar cribados de alto rendimiento de una forma sencilla, ofreciendo información sobre la efectividad y posibles efectos secundarios antes de su uso en los ensayos clínicos (Karagiannis *et al.*, 2019).

2.2.2 Modelado de enfermedades

Los modelos más utilizados para el estudio de enfermedades son los animales; no obstante, estos no siempre reflejan las características de las patologías humanas. Por ello, la generación de modelos celulares derivados del propio paciente permite el estudio fisiopatológico y genético de su enfermedad. Muchos estudios ya han demostrado la efectividad de la reprogramación a la hora de mimetizar patologías (recogidos en (Shi *et al.*, 2017)), puesto que las células inducidas tienen un fenotipo molecular análogo al de las células afectadas por la enfermedad.

Ahora bien, existen limitaciones: el estudio de un tipo celular de manera aislada no proporciona información sobre el comportamiento de esa célula en el contexto del organismo (Mall and Wernig, 2017). No obstante, existen modelos de cocultivos de tres dimensiones y organoides (Lancaster *et al.*, 2013) que permiten una aproximación más rigurosa. También se describe en la bibliografía, el uso de “órganos en chips” que simulan las condiciones fisiológicas y ambientales (Esch, Bahinski and Huh, 2015) .

2.2.3 Medicina regenerativa

La medicina regenerativa busca el reemplazo de tejidos dañados o degenerados mediante terapias celulares. La reprogramación celular proporciona una fuente autóloga de múltiples tipos celulares que, además, pueden ser modificadas por técnicas de edición génica (McTague *et al.*, 2021).

De igual forma, generar órganos a partir de células del propio individuo eliminaría la inmunosupresión necesitada en los post-trasplantes actuales. *In vitro*, todavía no se han conseguido generar órganos funcionales a partir de células reprogramadas. Existen factores, como la correcta señalización espaciotemporal o microambiente, que son difíciles de emular. Por ello, también se ha estudiado la organogénesis *in vivo* para generar órganos en quimeras; no obstante, existen incompatibilidades inter-especie e implicaciones éticas (expuestas en (Suchy, Yamaguchi and Nakauchi, 2018).

Asimismo, la capacidad de poder regular el destino celular mediante la reprogramación celular ha sido de interés en el área del cáncer. Muchos grupos han estudiado distintas estrategias terapéuticas: redireccionar las células cancerosas hacia un fenotipo benigno, regular las respuestas inmunes hacia estas células malignas o directamente eliminar las células madre cancerosas (Park *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021b).

3. REPROGRAMACIÓN DIRECTA A NEURONAS

El progreso en la biología y genética del desarrollo ha permitido la reprogramación directa a neuronas al identificar aquellos elementos necesarios que inducen la neurogénesis y que especifican los distintos subtipos neuronales (Masserdotti, Gascón and Götz, 2016). A continuación, analizaremos los principales factores determinantes de la reprogramación directa de distintas células a neuronas inducidas (iNs, del inglés *induced neurons*).

3.1 Factores de transcripción

En el desarrollo, los FTs se encargan de dirigir la expresión de genes involucrados en el destino neuronal y por tanto, de regular las cascadas de señalización correspondientes. Así, la reprogramación celular hace uso de estas propiedades para llevar a cabo la conversión directa a neuronas (Dennis, Han and Schuurmans, 2018).

3.1.1 Factores de transcripción bHLH

La capacidad de los factores bHLH (del inglés *basic helix-loop-helix*) para modular el destino neuronal ha hecho que su uso sea la estrategia predominante para generar iNs (Masserdotti, Gascón and Götz, 2016; Dennis, Han and Schuurmans, 2018).

Estos factores están formados por dos alfa hélices que median la dimerización y un dominio básico que se une a las regiones E-box del ADN para activar la transcripción de genes (Dennis, Han and Schuurmans, 2018). Las bHLH en vertebrados comprenden 4 subfamilias principales: neurogeninas (NEUROG), MATH/ATOH (del inglés, *Atonal homolog*), NEUROD y ASCL (del inglés, *Achaete-scute complex-like*) (Baker and Brown, 2018). Esta familia de factores regula la expresión de genes involucrados en fases tempranas y tardías para conseguir la identidad neuronal durante el desarrollo (Guillemot, 2005; Guillemot, 2007).

Estos factores, se pueden agrupar por su función (Dennis, Han and Schuurmans, 2018). Por un lado, hay un grupo de bHLH proneurales que se expresan promoviendo la diferenciación neuronal y la especificación a un subtipo neuronal. En estas, se incluyen miembros de la familia de neurogeninas (NEUROG1, NEUROG2), ASCL1, NEUROD

(NEUROD4) y ATOH (ATOH1/MATH1, ATOH7/MATH5). Por otro lado, las bHLH neurales se expresan más tarde en células neuronales postmitóticas para llevar a cabo la diferenciación y maduración. Estas implican miembros de la familia NEUROD (NEUROD1, NEUROD2, NEUROD6), NSCL (NSCL1, NSCL2) y OLIG (OLIG1, OLIG2, OLIG3, BHLHE22).

Schuurmans y colaboradores describieron que, durante el desarrollo, la inducción de la diferenciación a través de neurogeninas se desarrolla de manera secuencial a través de la expresión de otros factores de transcripción, factores de la subfamilia NEUROD y proteínas T-BOX (TBR1 y TBR2). Además, existe un interruptor genético entre la expresión de *Neurog2* y *Ascl1* que regula la especificación a un fenotipo glutamatérgico o gabaérgico, respectivamente (Schuurmans *et al.*, 2004).

El laboratorio de Magdalena Götz, fue el primero en conseguir la conversión de células gliales postnatales a neuronas mediante la sobreexpresión del factor de transcripción PAX6 (Heins *et al.*, 2002). Esta fue la primera evidencia que demostró que un solo FT puede reprogramar células no neuronales a neuronas de una forma directa. En trabajos posteriores, mediante la inducción de la expresión del factor NEUROG2, un gen diana de PAX6, o ASCL1 obtuvieron iNs funcionales *in vitro* (Berninger *et al.*, 2007). Además, consiguieron caracterizar los distintos tipos neuronales que generan estos FTs. Así, mediante la expresión de NEUROG2, consiguieron generar iNs funcionales con características glutamatérgicas; en cambio, cuando expresaron el factor ASCL1 junto con su gen diana *DLX2*, obtuvieron iNs funcionales gabaérgicas (Heinrich *et al.*, 2010).

Con estos trabajos, se demostró que factores bHLH pueden inducir la reprogramación directa de astrogliá postnatal a neuronas funcionales y, además, dirigirlas a un tipo neuronal específico distinto. Asimismo, estos patrones de especificación neuronal coinciden con los encontrados en el desarrollo de la corteza cerebral (Schuurmans *et al.*, 2004; Dennis, Han and Schuurmans, 2018).

A partir de estos estudios, otros grupos han utilizado diversos factores bHLH: NEUROG2 (Liu *et al.*, 2013), ASCL1 (Liu *et al.*, 2015), NEUROD1 (Guo *et al.*, 2014) o NEUROD4 (Masserdotti *et al.*, 2015) para llevar a cabo la generación de iNs a partir de diversos tipos celulares.

3.1.2 Otros factores

Existen otros FTs utilizados, en combinación con factores bHLH, con el fin de potenciar la maduración, la eficiencia o la especificación celular.

El laboratorio de Marius Wernig precisó que la combinación de 3 factores (BAM: BRN2, ASCL1 y MYT1L) aumenta la maduración y eficiencia de la generación de iNs a partir de fibroblastos respecto al uso de ASCL1 individualmente (Vierbuchen *et al.*, 2010). Estudios posteriores describieron el mecanismo de acción de los factores BAM: durante las primeras horas de la reprogramación, ASCL1 produce una remodelación de la cromatina mediante el reclutamiento de otros factores, incluido el factor BRN2, (Wapinski *et al.*, 2013; Wapinski *et al.*, 2017); así, se induce un destino neuronal frente a un destino hacia miocito (Treutlein *et al.*, 2016). Después, BRN2 y MYT1L promueven la identidad neuronal permanente inhibiendo la expresión de genes no neuronales (Mall *et al.*, 2017).

Con el fin de conseguir iNs dopaminérgicas, el grupo de Malin Parmar, añadió a la combinación de factores BAM dos factores expresados en neuronas dopaminérgicas, LMX1A y FOXA2 (Pfisterer *et al.*, 2011). LMX1A promueve la diferenciación neuronal durante el desarrollo a un tipo dopaminérgico (Andersson *et al.*, 2006); FOXA2 impulsa la especificación a neuronas dopaminérgicas (Kittappa *et al.*, 2007).

En la bibliografía, se muestran múltiples combinaciones de factores bHLH con distintos factores para conseguir el fenotipo específico deseado: neuronas glutamatérgicas (Guo *et al.*, 2014), gabaérgicas (Colasante *et al.*, 2015), colinérgicas (Liu *et al.*, 2013), etc.

3.2 Fuente celular

La reprogramación permite la conversión de cualquier tipo celular a otro. En este apartado se expondrán algunos trabajos en los que lleva a cabo reprogramación directa a iNs a partir de distintas fuentes celulares.

3.2.1 Fibroblastos

Los fibroblastos son una de las fuentes celulares más accesibles para obtener a partir propio individuo. Por ello, son muchos los autores que han centrado su trabajo en reprogramar estas células a diversos tipos de neuronas.

En el apartado anterior ya se ha comentado uno de los primeros trabajos de reprogramación directa de fibroblastos a neuronas por el grupo de Marius Wernig (Vierbuchen *et al.*, 2010). Mediante la expresión de los factores BAM generaron iNs principalmente glutamatérgicas. En trabajos posteriores, demostraron que ASCL1 era suficiente para reprogramar fibroblastos a neuronas glutamatérgicas maduras (Chanda *et al.*, 2014). En este estudio, Chanda y colaboradores vieron que ASCL1 activa la expresión endógena de MYT1L y BRN2, lo que explica la madurez de las iNs generadas en ausencia de su expresión exógena.

También se ha mencionado que la incorporación adicional a los factores BAM de LMX1A y FOXA favorecía la especificación de la conversión de fibroblastos a neuronas dopaminérgicas (Pfisterer *et al.*, 2011). Seguidamente, Malin Parmar mostró que añadiendo otros dos factores (LMX1B y OTX2), involucrados en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas (Sherf *et al.*, 2015), aumentaba significativamente la eficiencia de conversión (Torper *et al.*, 2013).

El laboratorio de Vania Broccoli también ha llevado a cabo la diferenciación de fibroblastos a neuronas dopaminérgicas, pero mediante la combinación de los factores ASCL1, LMX1A y NURR1 (Caiazzo *et al.*, 2011; Dell'Anno *et al.*, 2014). NURR1 está involucrado en la supervivencia y diferenciación a neuronas dopaminérgica (Saucedo-Cardenas *et al.*, 1998). Asimismo, se ha reprogramado fibroblastos a neuronas gabaérgicas mediante el uso de los factores ASCL1, FOXG1, SOX2, DLX5 y LHX6 (Colasante *et al.*, 2015). En este estudio, exponen que FOXG1 podría actuar descondensando la cromatina para que así, ASCL1 y SOX2 puedan activar rutas moleculares para la reprogramación a neuronas gabaérgicas. Los factores DLX5 y LHX6 son considerados inductores de neuronas gabaérgicas (Liodis *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010).

También se ha llevado a cabo la reprogramación a neuronas específicas de región. Wang y colaboradores reprogramaron fibroblastos a células ganglionares de retina mediante la combinación de ASCL1, BRN3B y ISL1 (Wang *et al.*, 2020). BRN3B es un

FT diana del factor bHLH MATH5 (Mu *et al.*, 2005) que, durante el desarrollo, actúa junto a ISL1 para la diferenciación a neuronas ganglionares de retina (Li *et al.*, 2014).

3.2.2 **Astroцитos**

Los astroцитos son una de las fuentes más utilizadas para la reprogramación a neuronas debido, principalmente, a su origen neural común con las neuronas y a su distribución ubicua por todo el SNC (Gage, 2000).

Como se ha hecho referencia anteriormente, el laboratorio de Magdalena Götz fue el primero en reprogramar astroцитos a neuronas (Heins *et al.*, 2002; Berninger *et al.*, 2007; Heinrich *et al.*, 2010). Posteriormente, Masserdotti y colaboradores analizaron los mecanismos transcripcionales que median la reprogramación a través de los factores proneurales NEUROG2 y ASCL1 (Masserdotti *et al.*, 2015), comprobando que estos factores determinan el destino neuronal a través de distintas vías, pero con algunos genes diana comunes, entre ellos NEUROD4. Además, observaron que la expresión única de NEUROD4 es suficiente para generar neuronas funcionales, pero no para conseguir una especificación neuronal. El papel de NEUROD4 en la reprogramación de astroцитos a neuronas queda corroborado en un reciente trabajo (Rao *et al.*, 2021b) en el que se describen los mecanismos moleculares que subyacen a la conversión de astroцитos a neuronas mediada por ASCL1.

El grupo de Gong Chen reprogramó astroцитos a neuronas glutamatérgicas con una alta eficiencia utilizando el factor NEUROD1 (Guo *et al.*, 2014). Más adelante, ha demostrado en distintos trabajos que NEUROD1 puede generar iNs a partir de astroцитos del SNC lesionado de ratones (Chen *et al.*, 2020; Puls *et al.*, 2020) y de primates no humanos (Ge *et al.*, 2020). Además, han llevado a cabo la reprogramación de astroцитos del estriado a neuronas espinosas medianas en modelos murinos de la enfermedad de Huntington mediante la combinación de NEUROD1 con DLX2 (Wu *et al.*, 2020).

3.2.3 **Otros tipos celulares**

Los fibroblastos y astroцитos son las células más utilizadas para la conversión directa a neuronas. Además, se han reprogramado otros tipos celulares que pasamos a describir.

Pericitos

Mediante la sobreexpresión de ASCL1 y SOX2, Karow y colaboradores reprogramaron pericitos humanos a neuronas (Karow *et al.*, 2012). Sin embargo, describieron que la reprogramación no era completamente directa, sino que las células pasaban por un estadio desdiferenciado pero sin división celular. Asimismo, observaron que, tras este estadio intermedio, la reprogramación se bifurcaba dando lugar a dos destinos neuronales distintos, una glutamatérgica mediada por factores NEUROG y otra gabaérgica a través de factores DLX (Karow *et al.*, 2018).

Glía NG2

El laboratorio de Malin Parmar ha llevado a cabo la reprogramación de células gliales NG2 a neuronas *in vivo* (Torper *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2017). Mediante la combinación de tres factores (ASCL1, LMX1, NURR1), consiguieron generar iNs, principalmente gabaérgicas, funcionales que, además, se integraban en el circuito neuronal local (Torper *et al.*, 2015). En estudios posteriores, comprobaron que la mayoría de las iNs que generaban eran interneuronas, independientemente de la combinación de factores y de la región del cerebro donde se indujese la reprogramación (Pereira *et al.*, 2017).

Asimismo, Tai y colaboradores consiguen generar neuroblastos a partir de NG2 *in vivo* (Tai *et al.*, 2021). Mediante la sobreexpresión del factor SOX2 en LM, reprograman la glía NG2 a neuroblastos. Estos neuroblastos inducidos, tras su diferenciación, generan neuronas propioespinales excitatorias e inhibitorias que forman conexiones con vías ascendentes y descendentes de la médula. Así, estas iNs reducen la cicatriz glial y promueven la mejora funcional tras la LM.

Microglía

La microglía ha sido reprogramada con el uso del factor NEUROD1 *in vitro* e *in vivo* (Matsuda *et al.*, 2019). En este estudio, se describe que NEUROD1 produce una remodelación epigenética y transcripcional que, secuencialmente, induce la expresión de genes neuronales e inhibe la identidad microglial mediante la inducción de represores transcripcionales.

No obstante, estudios recientes indican que la sobreexpresión del factor NEUROD1 no induce reprogramación neuronal, sino que genera apoptosis microglial (Rao *et al.*, 2021a). Rao y colaboradores señalan que la observación de iNs a partir de microglía

descrita por Matsuda y colaboradores (Matsuda et al., 2019) está asociada a una población microglial no pura en cultivo y a la inespecificidad de la infección lentiviral *in vivo* (Rao et al., 2021a).

GEO

Tras probar distintos factores de transcripción, Sun y colaboradores llevaron a cabo la reprogramación directa de GEO de ratón a iNs mediante el factor NEUROG2 (Sun et al., 2019). Con ello, obtuvieron una población mixta de neuronas gabaérgicas y glutamatérgicas. Además, demostraron que tras la inoculación de las iNs *in vivo*, en médula espinal intacta y lesionada, estas sobreviven y maduran. Sin embargo, está todavía por determinar su utilidad funcional, ya que no se ha estudiado si median una mejoría motora o sensorial tras el trasplante.

Gliomas

Por último, se ha utilizado la reprogramación a neuronas como terapia inhibitoria de gliomas. Mediante la sobreexpresión de ASCL1, estas células no solo presentan una morfología y marcadores neuronales, sino que además reducen significativamente la división celular tanto *in vitro* como *in vivo* (Park et al., 2017; Cheng et al., 2019).

También, el grupo de Gong Chen demostró que los tres factores (ASCL1, NEUROG2, NEUROD1) pueden reprogramar glioblastomas, el tipo de glioma más agresivo, a neuronas funcionales con una alta eficiencia (Wang et al., 2021b). Asimismo, esta reprogramación inhibe significativamente la proliferación celular.

Como se describe en este apartado, la reprogramación directa a neuronas se puede llevar a cabo a partir de múltiples tipos celulares, independientemente de la capa germinal de la que provengan. Sin embargo, hay estudios que indican que cuanto más relacionada esté la fuente celular con el destino celular deseado, menos restrictivo será el estado epigenético y, consecuentemente, más factible será conseguir la reprogramación a ese destino celular (Sieweke, 2015; Masserdotti, Gascón and Götz, 2016).

3.3 **Factores facilitadores o inhibidores de la reprogramación**

3.3.1 ***Remodelaciones epigenéticas***

En células diferenciadas la cromatina está altamente estructurada para definir una identidad celular determinada. En la reprogramación celular, los FTs utilizados, junto con otros factores endógenos, establecen el destino celular, principalmente, mediante la apertura de regiones de la cromatina previamente inaccesibles (Ninkovic and Götz, 2018).

Cada vez son más los estudios que se centran en conocer el mecanismo epigenético que se produce en la reprogramación celular con el fin de entender mejor esta conversión y, consecuentemente, conseguir mejores eficiencias de reprogramación (Wapinski *et al.*, 2013; Cates *et al.*, 2021; Stricker and Götz, 2021).

La conversión directa de microglía a iNs con el factor NEUROD1 produce una desmetilación parcial de la histona H3K27, lo que permite la expresión de genes neuronales (Matsuda *et al.*, 2019). En fibroblastos, se ha descrito un estado de cromatina trivalente (compuesto por dos marcas activadoras H3K27ac y H3K4me1 y una represora H3K9me3) necesarias para la unión de ASCL1 y, por consiguiente, la reprogramación (Wapinski *et al.*, 2013).

Aunque los FTs promueven una reprogramación epigenética que favorece tanto la expresión de genes neuronales como la inhibición de genes de la fuente celular (Mall and Wernig, 2017), se han descrito distintos mecanismos para facilitar estas modificaciones epigenéticas. Una manera de favorecer la reprogramación es bloqueando represores de genes neuronales. El factor de transcripción silenciador RE1 (REST, del inglés *RE1-silencing transcription factor*) se expresa en células no neuronales reprimiendo la expresión de genes neuronales (Schoenherr and Anderson, 1995). La delección temprana de REST en astrocitos mejora drásticamente la eficiencia de reprogramación con NEUROG2 (Masserdotti *et al.*, 2015). Estudios de CHIP-qPCR revelaron que REST impide la accesibilidad de NEUROG2 al promotor de NEUROD4 impidiendo así su expresión y, consecuentemente, disminuyendo la eficiencia de reprogramación (Masserdotti *et al.*, 2015).

En fibroblastos, la inhibición de REST activa la expresión de genes neuronales a través de la expresión de los microRNAs (miRNA) miR-124 y miR-9/9* en la conversión a iNs (Drouin-Ouellet *et al.*, 2017). Asimismo, la sobreexpresión de estos miRNA es suficiente

para reprogramar fibroblastos a neuronas funcionales (Yoo *et al.*, 2011; Drouin-Ouellet *et al.*, 2017). El laboratorio de Andrew S. Yoo ha descrito que estos miRNA producen reconfiguraciones de la cromatina que permiten la expresión de genes neuronales mediante la represión de REST (Lee *et al.*, 2018). Existe una regulación recíproca entre REST y los miRNA que permite o bloquea la identidad neuronal (Conaco *et al.*, 2006).

Trabajos posteriores, han descrito el mecanismo molecular de miR-124 y miR-9/9* en la reprogramación de fibroblastos. Estos miRNAs primero inhiben la expresión de genes de fibroblastos y luego inducen la expresión de genes que definen la identidad neuronal (Cates *et al.*, 2021). Además, esta remodelación de cromatina no es suficiente para definir el subtipo neuronal, pero permite el acceso de otros factores a los genes que determinan el subtipo neuronal (Abernathy *et al.*, 2017).

Otra forma para facilitar la conversión directa es inhibir genes no neuronales. MYT1L se expresa constitutivamente en las neuronas e interviene en el mantenimiento de la identidad neuronal (Matsushita *et al.*, 2014). MYT1L ha demostrado ser un potente represor de identidades no neuronales en el desarrollo y en la reprogramación de fibroblastos (Mall *et al.*, 2017). En estudios de reprogramación, la expresión del factor ASCL1 en fibroblastos induce la expresión endógena de MYT1L (Chanda *et al.*, 2014); asimismo, la expresión exógena de MYT1L aumenta la eficiencia de conversión y maduración de las iNs (Vierbuchen *et al.*, 2010). En astrocitos, la reprogramación con ASCL1 también induce la expresión endógena de MYT1L y tiene un papel crítico en la maduración de las iNs (Rao *et al.*, 2021b).

3.3.2 Cambio metabólico

En el desarrollo, cuando se produce la diferenciación neuronal, se genera una reprogramación metabólica de un metabolismo glucolítico a un metabolismo oxidativo (Zheng *et al.*, 2016). En la reprogramación directa a neuronas, también se ha visto este cambio metabólico (Gascón *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018).

En la conversión de astrocitos a neuronas, se ha visto que el rápido cambio de metabolismo producido durante la conversión induce estrés oxidativo. Así, el aumento de radicales libres de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y, consecuentemente, la peroxidación de lípidos (Lip-Ox), producen muerte celular por ferroptosis (Gascón *et al.*, 2016). Gascón y colaboradores demostraron que la inhibición

de ferroptosis y la adición de antioxidantes favorecen la reprogramación directa. Además, los antioxidantes aumentan la maduración de las iNs *in vitro* e *in vivo*.

Mediante la transducción con *Bcl-2* se mejora la eficiencia de reprogramación. Esta proteína reduce la Lip-Ox y el tiempo de transición de los estados metabólicos y, de este modo, disminuye la muerte celular producida por la reprogramación metabólica (Gascón *et al.*, 2016). Además, cuando se añade al medio oligomicina A, un inhibidor de la cadena respiratoria que favorece la glucólisis anaerobia, la conversión de astrocitos a neuronas con FTs queda completamente bloqueada (Gascón *et al.*, 2016). Esto indica que el cambio metabólico es necesario para que los FTs pueden llevar a cabo la reprogramación.

Como hemos visto, es importante el cambio metabólico para la neurogénesis. Por ello, los FTs involucrados en la diferenciación neuronal tienen como dianas no solo genes neurogénicos, sino también genes relacionados con el metabolismo celular (Zheng *et al.*, 2016). El factor bHLH NEUROD6 promueve la diferenciación neuronal (Bartholomä and Nave, 1994). Se ha descrito que la expresión de este factor durante la diferenciación confiere tolerancia al estrés oxidativo mediante la inducción de una respuesta antioxidante y el incremento de la masa mitocondrial (Uittenbogaard, Baxter and Chiaramello, 2010). También, el factor FOXG1 regula el metabolismo mediante la fusión mitocondrial durante la fase temprana de la diferenciación neuronal (Pancrazi *et al.*, 2015) y, además promueve la reprogramación neuronal a partir de fibroblastos (Colasante *et al.*, 2015).

3.4 Fármacos sintéticos

Las rutas de señalización tienen un papel muy importante en el desarrollo neuronal (Guillemot, 2005). Por ello, también se ha recurrido a la modulación de estas vías mediante fármacos sintéticos (SM, del inglés *small molecules*) para potenciar la reprogramación celular (Qin, Zhao and Fu, 2017; Ma, Kong and Zhu, 2017) (**Figura 7**).

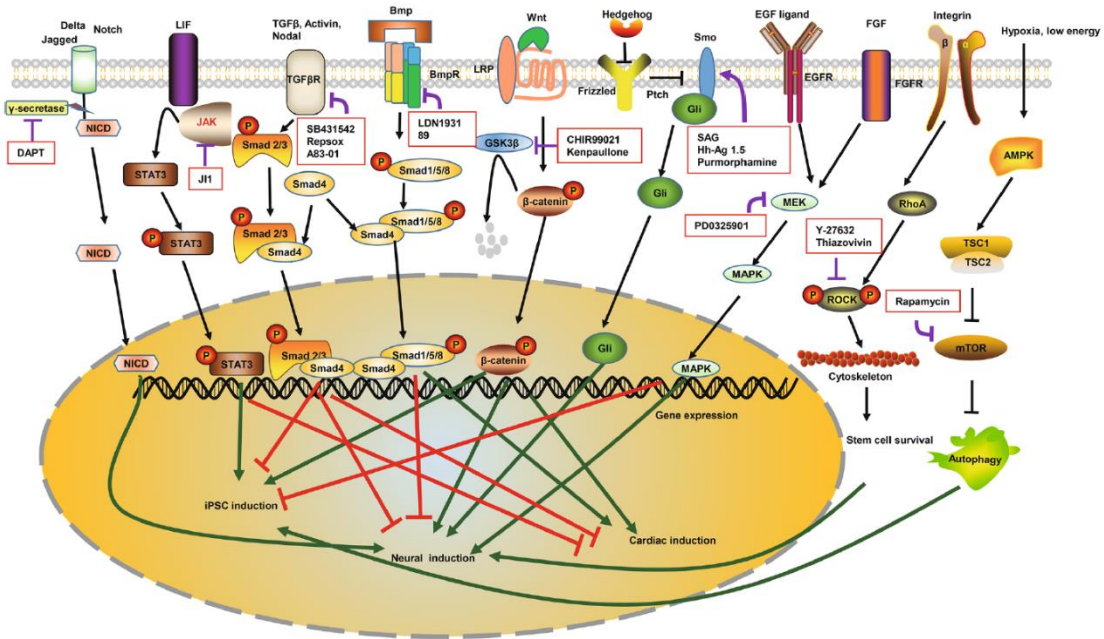


Figura 7. Esquema de vías de señalización implicadas en la reprogramación. Se detalla el mecanismo de acción de SM utilizadas en reprogramación celular para modular estas rutas de señalización (Qin, Zhao and Fu, 2017).

Algunos trabajos utilizan las SM junto con la expresión de FTs para incrementar la eficiencia de reprogramación. Así, para reprogramar fibroblastos con NEUROG2, es necesaria la adición de dorsomorfina (DM, un inhibidor de la vía BMP (del inglés *bone morphogenetic protein*)) y forskolina (FSK, un activador de la PKA, en la vía del AMPc) para generar iNs funcionales con una alta eficiencia (Liu *et al.*, 2013). Ambas SM facilitan la accesibilidad de la cromatina en regiones antes inaccesibles para la NEUROG2 (Smith *et al.*, 2016) y se puede asociar con otros factores y promover una serie de activaciones génicas. Smith y colaboradores observaron que NEUROG2 actúa con CREB1 (vía del AMPc) y activa la expresión de SOX4; asimismo, este activa la expresión de otros factores proneurales como NEUROD1 y NEUROD4 (Smith *et al.*, 2016).

Factores proneurales, como ASCL1, han demostrado inducir la diferenciación neuronal inhibiendo la vía de NOTCH a través de factores de la familia MYT1 (Vasconcelos *et al.*, 2016; Mall *et al.*, 2017). En estudios de reprogramación, Karow y colaboradores aumentaron significativamente la eficiencia de reprogramación de pericitos con ASCL1 y SOX2 inhibiendo la ruta de NOTCH con la SM DAPT (Karow *et al.*, 2018). También, Hu y colaboradores aumentaron la eficiencia de reprogramación de astrocitos con ASCL1 añadiendo este inhibidor de la ruta de NOTCH (Hu *et al.*, 2019).

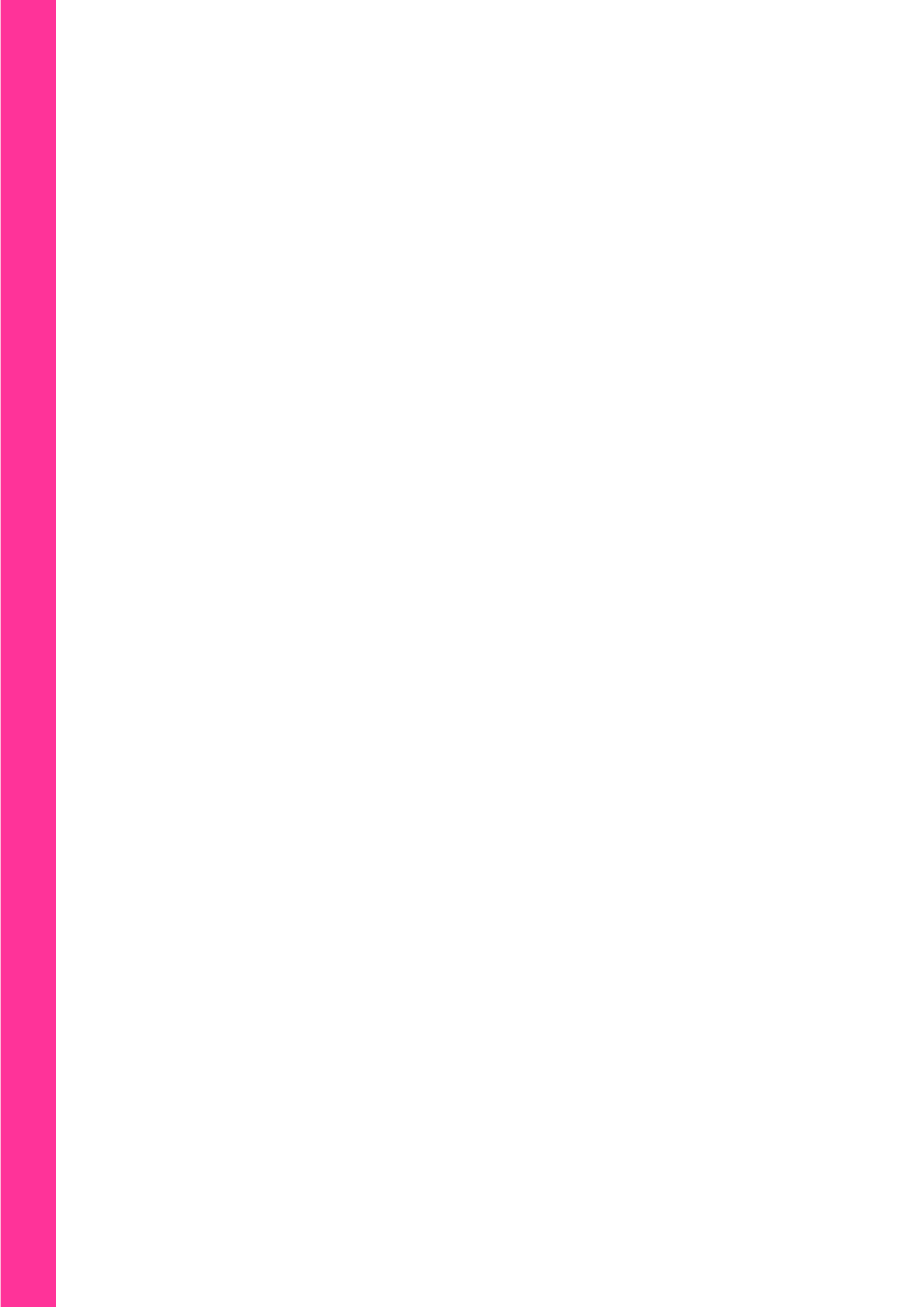
No obstante, otros trabajos muestran la obtención de iNs funcionales a partir de otro tipo celular mediante el uso exclusivo de SM, sin la expresión de ningún FT. Li y colaboradores reprogramaron fibroblastos a neuronas mediante la combinación de cuatro SM (FICB: FSK, ISX9, CHIR99021, I-BET151). Los autores describieron que ISX9 activa la expresión de genes neuronales e I-BET151 suprime la expresión de genes endógenos específicos de los fibroblastos (Li *et al.*, 2015). CHIR99021, un activador de la vía de WNT, y FSK han demostrado potenciar la conversión directa mediada por FTs (Ladewig *et al.*, 2012). El grupo de Gang Pei llevó a cabo la reprogramación directa mediante el uso de otro cóctel de SM (VCRFSGY: ácido valproico (VPA), CHIR99021, RepSox, FSK, SP600125, GO6983, Y27632). No obstante, aunque consiguieron generar iNs con una alta eficiencia, no era suficiente para promover la maduración y la supervivencia de estas neuronas. Por ello, utilizando subsiguientemente la combinación de CHIR99021, FSK y DM consiguieron generar iNs funcionales (Hu *et al.*, 2015). DM ha demostrado favorecer la supervivencia y maduración de las iNs generadas con la expresión de NEUROG2 (Liu *et al.*, 2013).

El laboratorio de Gong Chen identificó un cóctel de nueve SM (LDN193189, SB431542, TTNPB, tiazovivina (Tzv), CHIR99021, VPA, DAPT, *Smoothed agonist* (SAG), purmorfamina) capaz de reprogramar astrocitos a neuronas funcionales cuando eran administrados de manera secuencial (Zhang *et al.*, 2015). Estas SM inhiben rutas de señalización gliales y activan vías neuronales. En trabajos posteriores, establecieron que con el uso de solo cuatro SM (DAPT, CHIR99021, SB431542, LDN193189) podían llevar a cabo la reprogramación de astrocitos a neuronas de una forma más eficiente (Yin *et al.*, 2019). Mediante secuenciación de RNA (RNA-seq), observaron que la exposición de los astrocitos a estas SM desencadena una cascada molecular que desemboca en un cambio en el perfil genético (Ma, Yin and Chen, 2019). En este estudio observan características típicas de la reprogramación a neuronas, como la activación de factores neurogénicos, incluidos los de la familia bHLH, o el cambio metabólico de glucólisis a fosforilación oxidativa.

A partir de estos trabajos, varios autores han utilizado distintas combinaciones de SM para generar iNs a partir de fibroblastos (Wan *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019) y astrocitos (Gao *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2020). Además, modulando la combinación de SM, se puede favorecer reprogramación a distintos subtipos neuronales. Qin y colaboradores llevaron a cabo la conversión de fibroblastos a iNs motoras (Qin *et al.*, 2018) y, modificando la composición del cóctel de SM, generaron iNs dopaminérgicas (Qin *et al.*, 2020).

In vivo, se ha conseguido generar iNs a partir de astrocitos (Zhang *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2017) y fibroblastos (Yang *et al.*, 2019). Para ello, primero se trataron las células con las SM *in vitro*, y después se inyectaron *in vivo*. Cuando Yin y colaboradores inyectaron directamente las SM en ratones adultos de forma intracraneal o intraperitoneal, no consiguieron reprogramar los astrocitos *in vivo*. No obstante, observaron un aumento en la neurogénesis del hipocampo (Yin *et al.*, 2019). Sin embargo, en estudios recientes, se ha conseguido llevar a cabo con éxito la reprogramación de astrocitos endógenos de ratón adulto, de corteza y estriado, a neuronas (Ma *et al.*, 2021). Mediante la administración de SM a través de una cánula, generan iNs con características electrofisiológicas maduras. Además, mediante trazadores retrógrados trans-sinápticos, observan que las iNs generadas conectan con las neuronas circundantes.

OBJETIVOS



El objetivo general de este trabajo es la reprogramación directa de la glía envolvente olfativa humana (hGEO) adulta a neuronas funcionales. Para ello, abordamos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la población de hGEO C20, usando un panel de marcadores GEO-específicos y el estudio de su capacidad para promover regeneración axonal.
2. Determinar cuál es el factor neuro neurogénico (NEUROD1, NEUROGENINA 2 y/o ASCL1) con el que se consigue la reprogramación de la hGEO a neuronas, así como las condiciones de cultivo.
3. Caracterizar el proceso de la reprogramación de la hGEO a neuronas, estudiando la expresión de los marcadores neuronales en el tiempo tras su inducción.
4. Estudiar la maduración funcional de las neuronas inducidas en las diferentes condiciones de cultivo.
5. Inducir la reprogramación de la hGEO y trasplantarla en la corteza somatosensorial de barriles de ratón, para estudiar su reprogramación *in vivo*.
6. Estudiar el efecto de fármacos moduladores de vías de señalización celular en la reprogramación de hGEO a neurona.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales fueron estabulados siguiendo la normativa de la Directiva Europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Los ratones se criaron y mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas con acceso a una dieta estándar y agua *ad libitum*.

Los ratones C57BL6 (Charles River Laboratories) fueron obtenidos del Gabinete Veterinario de la Universidad Autónoma de Madrid o del Animalario de la Universidad Francisco de Vitoria.

Los ratones inmunosuprimidos NOD-SCID (Charles River Laboratories), fueron adquiridos y estabulados en el Animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (IIBM). Las jaulas estuvieron herméticamente cerradas con racks ventilados con presión positiva. Además, todo con lo que entraron en contacto (jaulas, viruta, pienso y agua) fue previamente esterilizado.

Las ratas Wistar macho adultas (RccHan[®]:WIST) de 2 meses de edad fueron obtenidas de Envigo (Envigo RMS Spain, SL) y sacrificadas tras su llegada.

2. CULTIVOS CELULARES

Todas las células se mantuvieron en un incubador (Thermo Scientific, Series II Water Jacketed) bajo las mismas condiciones: a 37 °C de temperatura y 5% de CO₂.

2.1. Cultivo de las líneas celulares

Las líneas humanas de glía envolvente olfativa (hGEO) (C20 (García-Escudero *et al.*, 2012)), TS14 (García-Escudero *et al.*, 2011), TS12 (Plaza *et al.*, 2016)) se mantuvieron en medio ME, compuesto por DMEM/F12 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino Hyclone al 10% (GE Healthcare Hyclone), glutamina 2mM (Lonza), extracto de pituitaria 20 µg/mL (Gibco), forskolina 2 µM (FSK; Sigma) y antibióticos (P/S/A, penicilina/estreptomicina/anfotericina; Lonza).

La línea HEK293T (Takara) fue criada en medio M10, compuesto por DMEM/F12 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco), glutamina 2 mM (Lonza) y P/S/A (Lonza).

La línea de astrocitos humanos HA1800 (ScienCell) se mantuvo en medio M10.

2.2. Cultivo primario de astrocitos postnatales de corteza de ratón

Los astrocitos fueron aislados de cortezas de ratones C57BL6 postnatales 0-2 días (P0-2). Brevemente, se separaron las cortezas cerebrales y, tras eliminar las meninges, se trocearon con una hoja de bisturí hasta obtener trozos <1 mm. A continuación, se pasaron 5 veces por una pipeta de 5 mL y se incubaron 30 minutos a 37 °C con agitación intermitente. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se disgregaron mecánicamente pipeteándolas con una Pasteur de vidrio 20-25 veces hasta que se llegó a una suspensión homogénea.

Después, se pasó la suspensión por una malla de 0,75 mm para eliminar los trozos sin disgregar y se centrifugó 5 minutos a 200 xg. Posteriormente, se aspiró el sobrenadante, se resuspendieron las células en el volumen de M10 correspondiente (1 mL por cada 4 hemisferios) y se plaqueó 1 mL del sobrenadante en un matraz de cultivo T75 (en adelante frasco T75; Falcon), pre-tratados con poli-L-lisina (PLL, 10 µg/mL; Sigma).

Tras 7-10 días, cuando las células llegaron al 90-95% de confluencia, se agitaron los frasco T75 toda la noche (O/N, del inglés *overnight*) a 37 °C para obtener un cultivo de astrocitos purificados.

2.3. Cultivo primario de neuronas de corteza embrionaria de ratón

Las neuronas fueron aisladas de cortezas de ratones C57BL6 embrionarias E17 y disociadas con el sistema de papaína de Worthington Biochemical Corporation. Primero, se separaron las cortezas cerebrales, se quitaron las meninges y se traspasaron a una placa con papaína, donde se trocearon con una hoja de bisturí hasta obtener trozos <1 mm. A continuación, se incubaron 30 minutos a 37 °C con agitación intermitente.

Una vez transcurrido el tiempo indicado, se disgregaron mecánicamente pipeteándolas con una Pasteur de vidrio 10-15 veces hasta que quedó una suspensión homogénea. Después, se centrifugó 5 minutos a 200 xg y se resuspendieron las células en medio NB-B27, compuesto por Neurobasal (NB, Gibco) suplementado con B27 (Gibco), glutamina 2 mM (Lonza) y P/S/A (Lonza).

Finalmente, las células se plaquearon en cubres (12mm, ThermoScientific) pre-tratados con PLL-Laminina (10 µg/mL-5 µg/mL).

2.4. Cocultivos de hGEO con neuronas ganglionares de retina

Se plaquearon las células de GEO sobre cubres de 12 mm en una placa de 24 pocillos (M24; Cultek), con el objetivo de que formasen una monocapa al día siguiente. Se extrajeron neuronas ganglionares de la retina (NGRs) de ratas adultas (ratas Wistar; Envigo) con el kit de papaína (Worthington Biochemical Corporation) y siguiendo el protocolo de (Portela-Lomba *et al.*, 2020) (**Figura 1**).

Brevemente, se extrajeron las retinas de ratas adultas y se colocaron sobre la papaína, donde se trocearon con una hoja de bisturí hasta obtener trozos <1 mm. A continuación, se incubaron 30 minutos a 37 °C con agitación intermitente y después el tejido se disgregó mecánicamente pipeteándolas con una Pasteur de vidrio 10-15 veces hasta conseguir una suspensión homogénea. Posteriormente, la reacción de digestión con papaína se paró y las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 200 xg. Al mismo tiempo, se cambió el medio de las GEOs a NB-B27.

Las neuronas se resuspendieron en medio NB-B27 y las neuronas aisladas se plaquearon sobre la monocapa de GEO correspondiente. Los cocultivos se incubaron durante 96 horas a 37 °C con un 5% CO₂.

Transcurrido ese tiempo, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% para llevar cabo las inmunofluorescencias (ver apartado **3**) con los siguientes marcadores neuronales: SMI31, marcador axonal y 514 (MAP2A, B), marcador del compartimento somato-dendrítico.

Para evaluar la capacidad regenerativa de las hGEO, las NGRs crecidas en el cocultivo se observaron con el objetivo 40X del microscopio fluorescente invertido (DMi8, Leica). Se fotografiaron al menos 30 campos de manera aleatoria y se cuantificaron como mínimo 200 neuronas en cada preparación. Los experimentos se repitieron independientemente al menos tres veces.

Las señales de inmunofluorescencia se cuantificaron con el software ImageJ (ImageJ; NIH) y la longitud de los axones fue medida utilizando el *plugin* NeuronJ. La cuantificación de la regeneración axonal fue determinada calculando: 1) el porcentaje de neuronas con axón, detectado con SMI31, frente al número total de neuronas, marcadas con 514; 2) la longitud media del axón por neurona, calculando la relación entre la media de las longitudes (µm) de todos los axones y el número total de neuronas contadas.

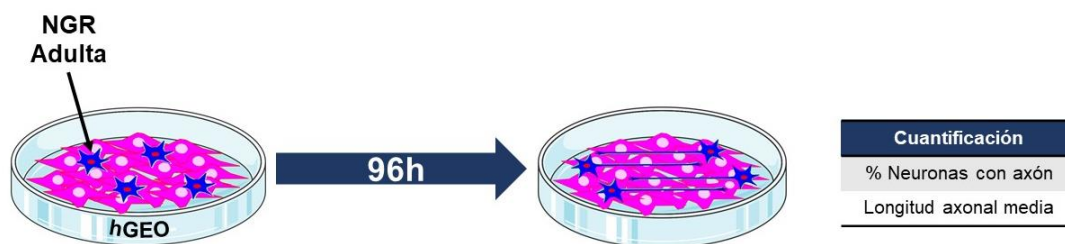


Figura 1. Esquema del cocultivo de hGEO con NGR. Ilustración representativa del ensayo de regeneración donde se plaquea NGR adulta axotomizada sobre una monocapa de hGEO. Tras 96h, se analiza el porcentaje de neuronas con axón y la longitud axonal media.

3. GENERACIÓN DE LOS LENTIVIRUS

Los plásmidos retrovirales pCAG-GFP-IRES-GFP (LV-GFP) y pCAG-NeuroD1-IRES-GFP (LV-ND1) fueron proporcionados por Dr. Gong Chen (Guo *et al.*, 2014) y clonados en lentivectores por la Dra. Vega García-Escudero. El lentivector pCAG-Neurogenin2-IRES-GFP (LV-NEUROG2) fue amablemente cedido por la Dra. Guillermina López-Bendito (Herrero-Navarro *et al.*, 2021); y el vector lentiviral pCMV-Ascl1-Neo (LV-ASCL1) por la Dra. Vega García-Escudero. Los mapas de los plásmidos lentivirales se encuentran en los **Anexos**.

3.1. Empaquetado de los lentivirus

Se sembraron 5×10^6 células HEK-293T en placas de 100 mm (p100). Al día siguiente, se llevó a cabo la transfección con Lipofectamina LTX Plus (Invitrogen) o fosfato cálcico (**Figura 2-1**).

Para la transfección con lipofectamina se llevó a cabo el siguiente protocolo: a 750 μ L de medio Optimem (Gibco) se le añadieron 6 μ g del plásmido de empaquetamiento PAX2 (Addgene), 5 μ g del plásmido del pseudotipado de la proteína G, pMD2G (Addgene), y 10 μ g de los vectores lentivirales a empaquetar. A esta mezcla se le añadieron 24 μ L del reactivo Plus. Por otro lado, a 750 μ L de Optimem se le añadieron 36 μ L de lipofectamina. Ambas soluciones se dejaron incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente (RT, del inglés *room temperature*). A continuación, se combinaron ambas soluciones, se mezclaron por inversión y se incubaron otros 20 minutos a RT.

Mientras hicimos las incubaciones, se aspiró el medio de las placas y se les añadió 3 mL de Optimem. A continuación, se invirtió la mezcla, se goteó a lo largo de toda la

placa, se agitó suavemente y se incubó a 37 °C. A las 6 horas, se cambió el Optimem por 7 mL de medio M10.

Para la transfección con fosfato cálcico realizamos los siguientes pasos. Por un lado, preparamos la solución A, que se compone de 300 µl de ddH₂O (del inglés *double distilled H₂O*), 30 µl de CaCl₂ (2,5 M), 6 µg de PAX2, 5 µg de PMD2G y 10 µg del plásmido a empaquetar. Por otro lado, preparamos la solución B, con 300 µl de HBS 2X, compuesto por 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ y lo ajustamos a pH 7. A continuación, se goteó la solución A sobre la solución B mientras se burbujeaba y se dejó incubar 30 minutos a RT.

Mientras hicimos las incubaciones, se aspiró el medio de las placas y se les añadió 3 mL de Optimem. A continuación, se invirtió la mezcla, se goteó a lo largo de toda la placa, se agitó suavemente y se incubó a 37 °C. A las 6 horas de incubación, se llevó a cabo un choque con glicerol al 10%. Previamente, se preparó la solución glicerol:HBS:ddH₂O (1:5:4). Se aspiró el Optimem y se añadieron 2 mL de la solución de glicerol a cada p100 durante 2 min. Después se aspiró, se hizo un lavado con PBS 1X y se añadió 7 mL de medio M10.

A las 72 horas se recogió el sobrenadante con las partículas infecciosas y se filtró con un filtro 0,45 µm PES *low-binding* (Fisherbrand).

3.2. Concentración de los lentivirus

La concentración de los lentivirus se realizó mediante ultracentrifugación (Ultracentrífuga OPTIMA XE-90) (**Figura 2-2**). El sobrenadante filtrado se depositó en tubos Beckman (31 mL 25x89mm Beckman Coulter) de manera que el peso de los tubos quedó equilibrado (diferencia máxima de 0,1 g), con un volumen máximo de 22 mL. Se centrifugó a 82.700 g durante 2 horas a 10 °C. A continuación, se decantó el sobrenadante y se dejó secar boca abajo durante un 2-3 minutos. Después, se añadió 200 µl de PBS 1X estéril frío y se dejó O/N a 4 °C. Al día siguiente las partículas virales se resuspendieron, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

3.3. Titulación de las partículas infecciosas

Para la titulación de las partículas virales, se plaquearon 300.000 células HEK-293T en placas de 6 pocillos (M6; Cultek). A las 24 horas, se añadieron volúmenes crecientes de los sobrenadantes virales (0, 2, 5, 7 µL) en los diferentes pocillos y se contaron las células en 2 pocillos para saber el número exacto de células que hay por pocillo en el

momento de la infección (**Figura 3-3**). Al día siguiente, se quitó el lentivirus y se añadieron 2 mL de medio M10 a las células. A las 72 horas post-infección, se recogieron las células y mediante citometría de flujo (FACSCANTO II) se determinó el porcentaje de células GFP positivas (GFP+), que es la proteína codificada por el gen reportero de los lentivectores.

A continuación, se calculó el título del sobrenadante viral con la siguiente fórmula:

$$\text{PFU/mL} = (N \times \% \text{GFP}+) / V.$$

Donde, PFU son partículas infectivas, N es el número de células el día de la infección, %GFP+ es el porcentaje de células positivas para GFP y V es el volumen de sobrenadante en mL. Los títulos obtenidos estuvieron entre 10^6 - 10^7 PFU/mL.

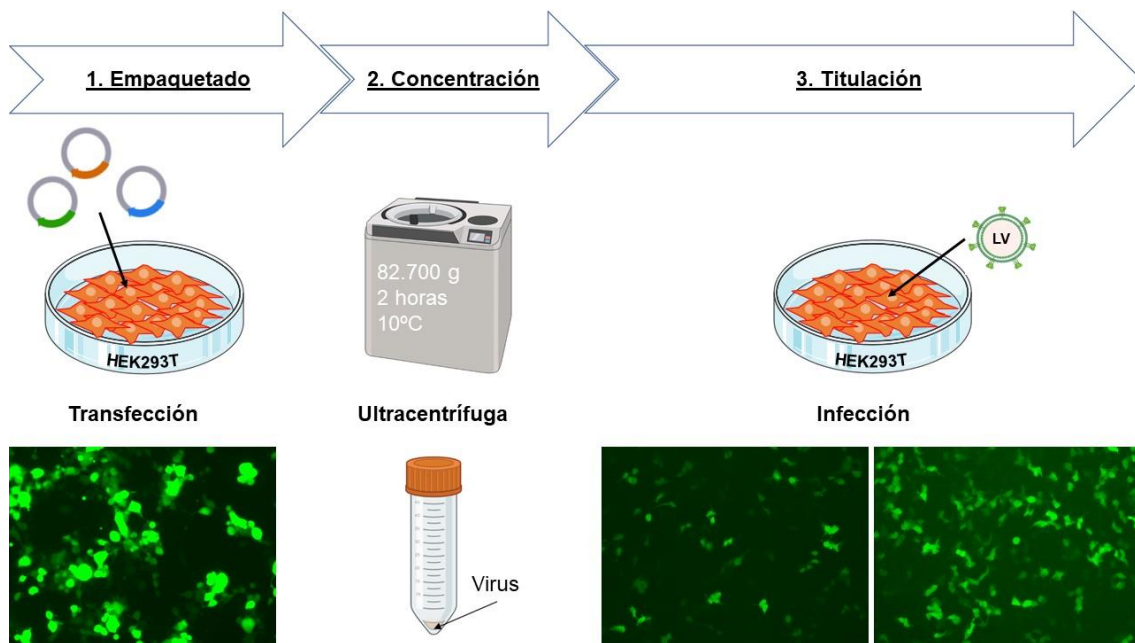


Figura 2. Esquema de la generación de los lentivirus. 1, el empaquetado de partículas lentivirales se lleva a cabo mediante la transfección de los plásmidos en células HEK293T (se muestran en verde las células transfectadas). 2, la concentración de los lentivirus se realiza mediante una ultracentrifugación bajo las condiciones indicadas. 3, la titulación de las partículas infectivas se realiza mediante la infección de células HEK293T con distintos volúmenes del lentivirus (se muestran en verde las células infectadas).

4. REPROGRAMACIÓN DIRECTA DE GEO IN VITRO

Se plaquearon 20.000 células C20 en placas de 24 pocillos (M24-I; Ibidi) pretratadas con poli-L-ornitina/laminina (PO/L: 20 µg/mL / 5 µg/mL, Sigma) para conseguir el 80-

90% de confluencia. Al día siguiente, se infectaron las células con los lentivirus correspondientes en medio M10 con polibreno (8 µg/mL, Sigma), con una MOI de 10. Tras 6-20 horas, se retiró el virus y se añadió medio M10. A las 24h, se cambió el medio por medio de diferenciación neuronal 1 (MD1), compuesto por DMEM/F12 (Gibco), glutamax (Gibco), P/S/A (Lonza), glucosa 3,5 mM (Sigma), FBS 1% (Gibco), N2 (Gibco) y B27 (Gibco); con 10 µM FSK (**Figura 3**).

El medio fue parcialmente renovado cada 3-4 días con medio de diferenciación neuronal 2 (MD2), compuesto por 1:1 DMEM/F12:NB (Gibco), glutamax (Gibco), P/S/A (Lonza), glucosa 3,5 mM (Sigma), N2 (Gibco) y B27 (Gibco); con 10 µM FSK y los factores de maduración BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía) y NT3 (neurotrofina 3) a una concentración final de 20 ng/mL.

Para la cuantificación de la expresión de los distintos marcadores neuronales, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{CTCF} = \text{IntDen} - (\text{Area} \times \text{MF del fondo}) - [((\text{MF} + 3 \times \text{SD control}) \times \text{Area control}) - \text{MArea control} \times \text{MF del fondo control}]$$

Donde CTCF es la fluorescencia total corregida por célula (del inglés *Corrected total cell fluorescence*), InDen es la densidad de intensidad, MF la media de fluorescencia y MArea la media del área. Como control usamos células infectadas con el lentivector control GFP, que llevamos en paralelo.

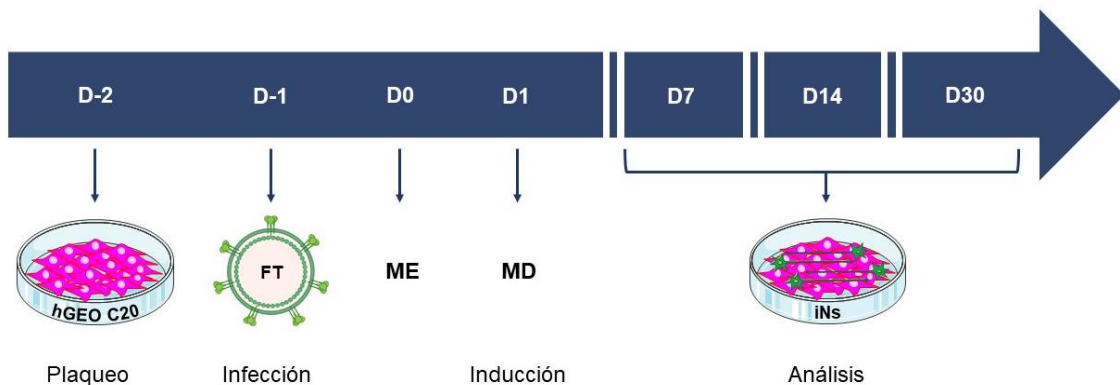


Figura 3. Cronograma de la reprogramación directa de hGEO a neuronas *in vitro*. Se plaquea la hGEO C20, se infectan con el lentivector que expresa el factor de transcripción (FT) y se lleva a cabo la inducción en medio de diferenciación (MD). Después, se lleva a cabo el análisis a distintos tiempos del proceso de reprogramación.

4.1. Cocultivos de hGEO con astrocitos

Para llevar a cabo ensayos de reprogramación a tiempos más largos (>30 días), las C20 infectadas fueron plaqueadas sobre una monocapa de astrocitos de ratón postnatales (apartado 2.2) o astrocitos humanos (apartado 2.1).

Para el cocultivo con los astrocitos de ratón, se plaquearon 75.000 astrocitos sobre placas M24-I (Ibidi) pretratadas con PO/L. Los astrocitos sobrantes, se plaquearon en una placa de 150mm (p150) pretratada con PO para llevar a cabo el condicionamiento del medio de diferenciación. Tras 48 horas, se plaquearon 20.000 células C20 infectadas (48h antes) sobre la monocapa de astrocitos en medio ME. Al día siguiente, se cambió el medio a MD1 condicionado y 10 μ M FSK. El medio fue renovado parcialmente cada 3-4 días con MD2 condicionado y 10 μ M FSK.

Para el cocultivo con los astrocitos humanos, se plaquearon 50.000 astrocitos sobre placas M24-I (Ibidi) pretratadas con PO/L. El resto del procedimiento se realizó igual que para el caso del cocultivo con astrocitos de ratón.

5. FÁRMACOS INDUCTORES DE LA REPROGRAMACIÓN

Para favorecer la inducción de la reprogramación, se añadieron fármacos al medio de diferenciación desde el primer día de la inducción. Según el ensayo, se mantuvieron los fármacos hasta el final o se quitaron en algún punto del proceso de reprogramación (detallado en el apartado 6 de **Resultados**). A continuación, se presenta una tabla con la información de todos los fármacos testados.

FÁRMACO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	MECANISMO DE ACCIÓN	CONCENTRACIÓN
CHIR99021 (CHIR)	Sigma	SML1046	Activador de la vía de Wnt	3 μ M
SB431542 (SB)	Sigma	S4317	Inhibidor de TGF β	5 μ M
DAPT	Sigma	D5942	Inhibidor de la vía de Notch	5 μ M
LDN193189 (LDN)	Sigma	SML0559	Inhibidor de BMP	0,25 μ M
ISX-9	Tocris	4439	Activa la expresión de factores pro-neurales (NeuroD1)	10 μ M
Forskolina (FSK)	Sigma	F6886	Activa el adenilato ciclasa	10 μ M
SAG (S)	Sigma	SML1314	Activador de la vía de Hedgehog	0,1 μ M
Purmirphamine (P)	Sigma	SML0868	Activador de la vía de Hedgehog	0,1 μ M
IBET-151 (IBET)	Sigma	SML0666	Inhibidor de BET, modula la expresión génica	2 μ M
Ácido valproico (VPA)	Sigma	PHR1061	-	500 μ M
Y27632 (Y27)	Sigma	Y0503	Inhibidor de Rho Kinasa (ROCK)	1 μ M
Ácido ascórbico (AA)	Sigma	PHR1008	-	5 μ g/mL

6. TRANSPLANTE DE LA GEO EN LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL DE BARRILES

La cirugía se realizó en una cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad. Ratones NOD/SCID de 30 días fueron anestesiados con isoflurano por vía inhalatoria y tratados con Buprex vía subcutánea. Se administró lidocaína en los oídos, se colocó al animal en el estereotáxico y se le puso vaselina en los ojos. A continuación, se inyectaron con agujas Hamilton las células control (C20-GFP) en el hemisferio izquierdo y las C20-ND1 (iNs) en el hemisferio derecho. Para ello, se utilizaron las siguientes coordenadas anteroposterior -1, mediolateral 1,4/-1,4 y dorsoventral -0,5 (tomando como referencia Bregma), correspondientes a la corteza somatosensorial de barriles. Se inyectaron 2 μ L de suspensión celular con 200.000 células a una velocidad de 0,5 μ l/min (**Figura 4**).

Los animales fueron analizados a los dos meses para hacer registros electrofisiológicos (n=3 animales) (ver apartado **6.2**) o para realizar inmunofluorescencias (n= 3 animales) (ver apartado **4.2**).

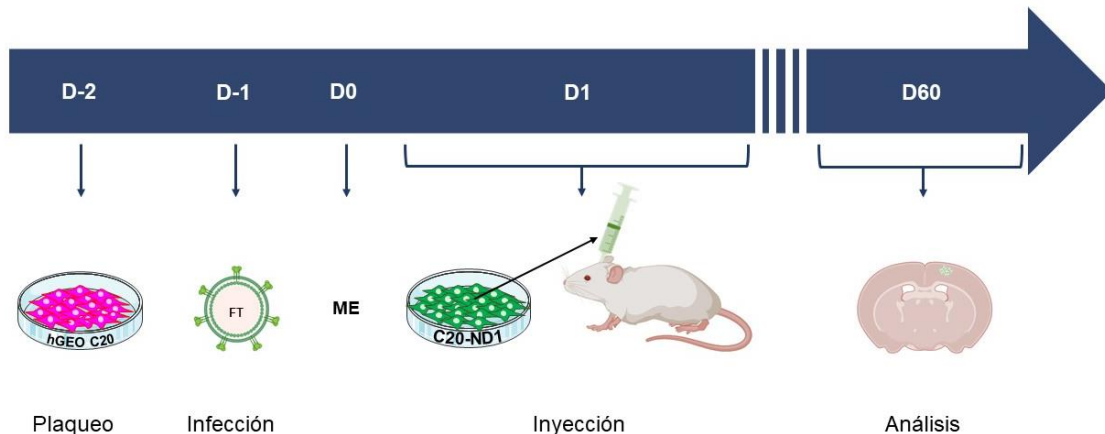


Figura 4. Esquema del ensayo de reprogramación directa de hGEO a neuronas *in vivo*. Se plaquea la hGEO C20, se infectan con el lentivirus que expresa el factor de transcripción (FT) y se inyectan las células en la corteza de ratones NOD/SCID. Tras 60 dpi, se analizan las cortezas.

7. INMUNOFLUORESCENCIA

Se proporcionan dos tablas donde se recoge toda la información de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

ANTICUERPO	REACTIVIDAD	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN	
				IN VITRO	IN VIVO
514	PC-Rabbit	Laboratorio del Dr. Ávila	-	1:500	-
Ankirina G	MC-Mouse	Thermo Fisher	33-8800	1:250	-
ASCL1	PC-Rabbit	Abcam	ab211327	1:300	-
ChAT	PC-Goat	Merck	AB144P	1:1000	-
Gad67	MC-Mouse	Millipore	MAB5406	1:1000	-
GAP43	MC-Mouse	Santa Cruz	sc-33705	1:300	-
GFAP	PC-Guinea Pig	Synaptic Systems	173002	1:1000	-
GFP	PC-Rabbit	Life Technologies	A11122	1:1000	1:500
GFP	MC-Mouse	Abcam	ab1218	1:500	1:300
GFP	PC-Chicken	Abcam	ab13970	1:1000	1:300
Ki67	MC-Mouse	Agilent	M7240	1:200	-
NeuN	MC-Rabbit	Abcam	ab177487	1:500	1:500
NeuroD1	MC-Mouse	Abcam	ab60704	1:1000	-
S100β	MC-Mouse	Sigma	SAB4200671	1:500	-
Smi31	MC-Mouse	BioLegend	801601	1:500	-
Sox2	PC-Rabbit	Abcam	ab97959	1:500	-
Sinapsina I	PC-Rabbit	Abcam	ab8	1:1000	-
TH	PC-Rabbit	Merck	AB152	1:500	-

Tuj1	<i>MC-Mouse</i>	Covance	MMS-435P	1:500	1:500
vGlut1	<i>PC-Guinea Pig</i>	Synaptic Systems	135 304	1:2000	-
Vimentina	<i>PC-Chicken</i>	Abcam	ab24525	1:1000	-

* REACTIVIDAD: PC, policlonal; MC: monoclonal

ANTICUERPO	REACTIVIDAD	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN	
				<i>IN VITRO</i>	<i>IN VIVO</i>
488	<i>Chicken</i>	Thermo Fisher	A-11039	1:500	1:500
488	<i>Mouse</i>	Thermo Fisher	A-21202	1:500	1:500
488	<i>Rabbit</i>	Thermo Fisher	A-21206	1:500	1:500
555	<i>Chicken</i>	Thermo Fisher	A-21437	1:500	1:500
555	<i>Goat</i>	Thermo Fisher	A-21432	1:500	1:500
555	<i>Guinea Pig</i>	Thermo Fisher	A-21435	1:500	1:500
555	<i>Mouse</i>	Thermo Fisher	A-31570	1:500	1:500
555	<i>Rabbit</i>	Thermo Fisher	A-31572	1:500	1:500
594	<i>Rabbit</i>	Thermo Fisher	A-21207	1:500	1:500
647	<i>Chicken</i>	Thermo Fisher	A-21449	1:500	1:500
647	<i>Goat</i>	Thermo Fisher	A-21447	1:500	1:500
647	<i>Guinea Pig</i>	Thermo Fisher	A-21450	1:500	1:500
647	<i>Mouse</i>	Thermo Fisher	A-31571	1:500	1:500
647	<i>Rabbit</i>	Thermo Fisher	A-31573	1:500	1:500

7.1. Inmunofluorescencia de los cultivos celulares

Las células fueron fijadas con PFA al 4%. Para la realización de las inmunofluorescencias las muestras fueron permeabilizadas y bloqueadas con PBS-TS (PBS, 0,1% Tritón, 5% FBS) durante 30 minutos a RT y, a continuación, fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo primario diluido en PBS-TS a 4 °C O/N.

Al día siguiente, se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente (Alexa) correspondiente, diluido en PBS-TS, durante 1 hora a RT en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X y se montaron con Fluoromount (Southern Biotech). Algunas muestras se incubaron adicionalmente durante 5 minutos con DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole; 1 µg/mL, MERCK) tras los lavados del anticuerpo secundario.

La observación de las muestras se realizó en un microscopio fluorescente invertido (DMi8, Leica). Por cada condición, se fotografiaron entre 20-25 campos de forma aleatoria. Después, se cuantificó la intensidad de densidad (IntDen) de los somas de forma automatizada y completamente ciega, tomando como región de interés (ROI) el marcaje de DAPI (se detallan los pasos seguidos para el procesamiento de las imágenes en **Anexos**). Las señales de inmunofluorescencia se cuantificaron con el software ImageJ (ImageJ; NIH).

7.2. Inmunofluorescencia de los tejidos cerebrales

Los animales fueron anestesiados con 0,2 mL pentobarbital (33 mg/mL) y perfundidos con PFA al 4%. Los cerebros fueron extraídos, incluidos en *Tissue-Tek OCT Compound* y cortados en secciones de 25 µm en un criostato.

Para la realización de las inmunofluorescencias, las muestras fueron bloqueadas con PBS-TS (0,1 M PBS, 0,5% Tritón, 2% Suero) durante 1 hora a RT y, a continuación, se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario diluido en PBS-TS a 4 °C O/N. Al día siguiente, los cortes fueron lavados 3 veces con PBS durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente (Alexa) correspondiente, diluido en PBS-TS, durante 2 horas a RT en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y se incubaron durante 10 minutos con DAPI (SIGMA). Después, se colocó el cubreobjetos con el medio de montaje Fluoromount (Southern Biotech).

La observación de las muestras se realizó en un microscopio fluorescente invertido (DMi8, Leica) o en un microscopio confocal invertido (LSM800, Zeiss).

8. ELECTROFISIOLOGÍA

Las células fueron visualizadas mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50WI (Olympus Optical, Japón) equipado con contraste de interferencia diferencial (DIC). Los objetivos usados fueron de 10x y 40x de inmersión en agua y una cámara CCD ORCA R² (Hamamatsu photonics, Japón). Las pipetas fueron situadas con un micromanipulador mecánico (Narishige, Tokyo, Japan) y los registros se hicieron usando un amplificador Cornerstone PC-ONE (DAGAN, Minneapolis, MN).

8.1. Registros patch-clamp en cultivos celulares

Células transducidas, GFP positivas, fueron registradas utilizando la técnica de fijación en parche de membrana (del inglés *patch-clamp*) en su configuración de célula completa (del inglés *whole-cell*) en los modos de fijación de voltaje y de corriente (del inglés *voltage-clamp* y *current-clamp*). Los registros fueron hechos con pipetas de borosilicato (OD-ID: 1.5-0.86; Sutter Instrument CO., Novato, CA), con una resistencia de 4-8 MΩ y se llenaron con una solución intracelular (compuesta por 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0,6 mM EGTA, 130 mM K-gluconato, 2 mM ATP, 0,2 mM GTP, 20 mM fosfocreatina y 50 U/mL creatina-fosfoquinasa; pH 7,3 y osmolaridad 286 mOsm). Los registros se llevaron a cabo a una temperatura de 30 °C con un flujo constante de solución extracelular (compuesta por 150 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM HEPES, 30 mM glucosa, 1 mM MgCl₂ y 2 mM CaCl₂; pH 7,3).

Los potenciales de acción y las corrientes de sodio fueron evocadas por pulsos crecientes despolarizantes de corriente y voltaje en *current* y *voltage clamp*, respectivamente. Para la generación de los estímulos y la adquisición de las respuestas se empleó el programa pCLAMP 10.2 (Molecular Devices). El potencial de membrana se ajustó a -60 mV y la resistencia en serie fue compensada aproximadamente al 50 % y monitorizada durante todo el experimento aplicando un pulso intracelular de 3 mV durante 5ms. Las células fueron aceptadas solo cuando la resistencia del sello fue superior a 1 GΩ y la resistencia en serie no cambió en un 20 % durante el experimento. Las señales fueron filtradas a 3 KHz y muestreadas a 10 KHz con una tarjeta de conversión analógico-digital Digidata 1500A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Tras obtener un registro estable de los potenciales de acción y las corrientes de sodio, se bloquearon los registros mediante la adición a la solución extracelular de tetrodoxina (TTX; 0,5 μ M, abcam), un bloqueante de los canales de sodio voltaje dependientes.

Neuronas embrionarias de corteza de ratón cultivadas *in vitro* entre 7-14 días (ver apartado 2.3.) fueron registradas como control positivo.

8.2. Registros patch-clamp en rodajas cerebrales

Tras sacrificar al ratón por decapitación, los cerebros fueron extraídos e inmediatamente colocados en líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) 1 (compuesto por 85 mM NaCl, 73 mM sacarosa, 2,5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0,5 mM CaCl₂, 7 mM MgCl₂, 1,25 mM NaH₂PO₄ y 10 mM glucosa; pH 7,4) y burbujeado constantemente con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Las rodajas fueron realizadas con un grosor de 300-250 μ m con un vibrátomo (Leica VT 1200S). Posteriormente, las rodajas fueron colocadas en una cámara de mantenimiento con LCA 2 (compuesto por 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1,25 mM NaH₂PO₄ y 12 mM glucosa; pH 7.4) e incubadas durante 1 hora a 32-34 °C burbujeado constantemente con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Tras la incubación, las rodajas fueron transferidas a la cámara de registro, la cual contenía 2 mL de LCA a 30 °C burbujeado constantemente con carbógeno y con una perfusión de flujo constante de 2 mL/min.

Los potenciales de acción y las corrientes de sodio se llevaron a cabo siguiendo los mismos protocolos de pulsos de corriente y voltaje que en el apartado 8.1.

Las neuronas endógenas de las rodajas fueron registradas como control positivo.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism (version 9.0; San Diego, CA, USA).

Las comparaciones estadísticas utilizadas en las cuantificaciones de los marcadores de la caracterización de la hGEO se realizaron utilizando el test t-Student.

Para las comparaciones estadísticas del estudio de la capacidad regenerativa, se realizaron análisis de varianza de dos factores (*One-way ANOVA*), seguido de la prueba

post-hoc de Tuckey, para la comparación múltiple entre las medias. La significación estadística se estableció a partir de un valor de $p < 0.05$.

Para las cuantificaciones de las IntDen de las inmunofluorescencias se realizaron análisis de varianza de dos factores (*Two-way ANOVA*), seguido de la prueba post-hoc de Sidak, para la comparación múltiple entre las medias. La significación estadística se estableció con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS



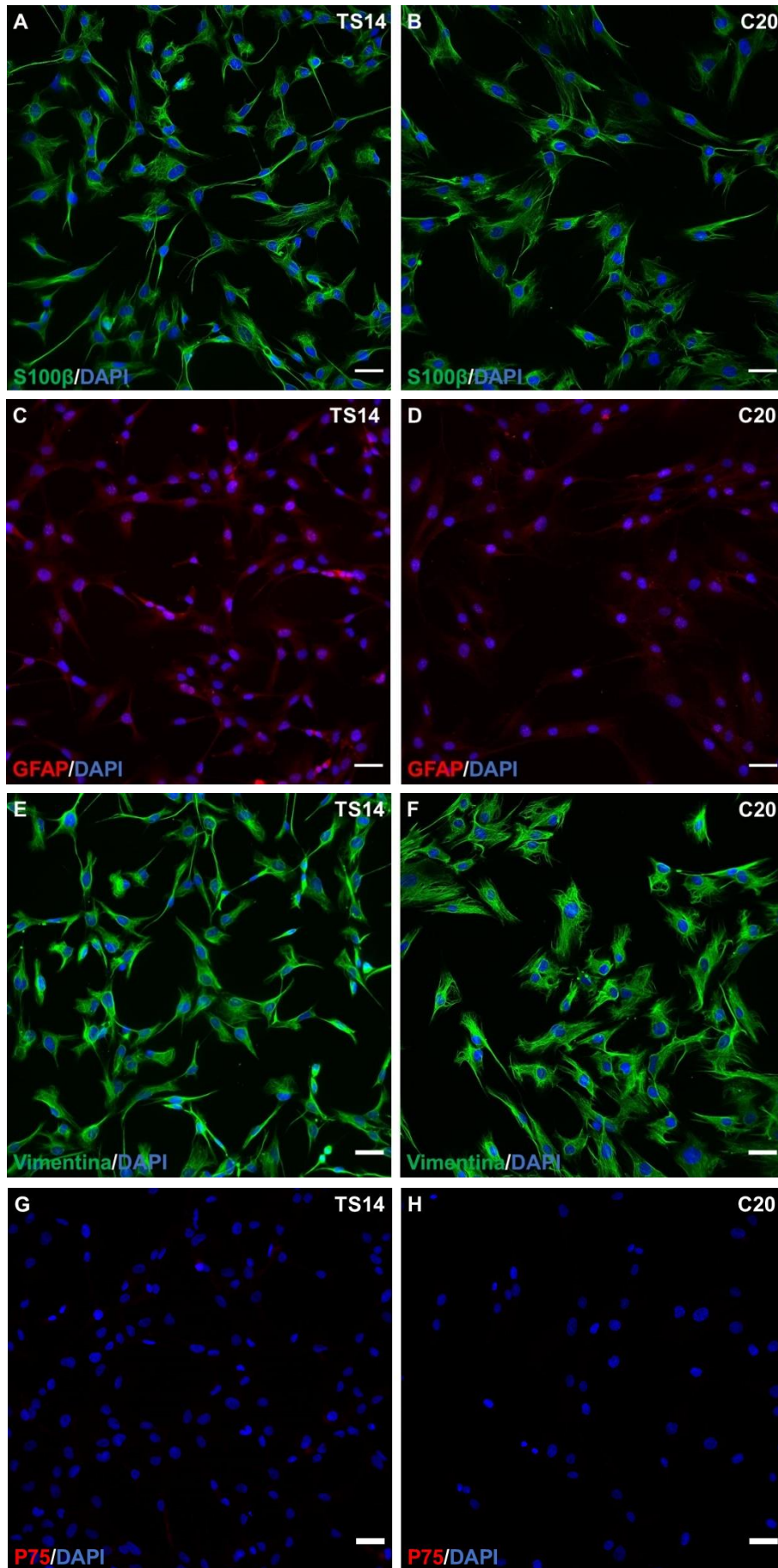
1. CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA C20 DE hGEO Y DE SUS PROPIEDADES REGENERATIVAS

La línea de GEO humana (hGEO) utilizada en esta tesis doctoral, denominada C20, fue obtenida de mucosa olfativa de una mujer adulta de treinta años de edad (García-Escudero *et al.*, 2015). Para verificar la identidad de esta línea celular realizamos un análisis de expresión de diversos antígenos y, posteriormente, hicimos un estudio de sus propiedades proregenerativas.

1.1. Análisis de marcadores gliales

Primero, llevamos a cabo un análisis de expresión de un panel específico de marcadores de GEO en la línea C20. Para ello, hicimos uso de técnicas de inmunofluorescencia para la detección de las proteínas S100 β , (proteína glial de unión a Ca²⁺), GFAP (del inglés *glial fibrillary acidic protein*), vimentina y el receptor de neurotrofina P75 de baja afinidad (en adelante P75) (**Figura 1A-H**). También, realizamos una tinción con DAPI para identificar los núcleos y poder cuantificar el número de células positivas para estos marcadores gliales respecto al número total de células. Como control de GEO humana utilizamos la línea de hGEO inmortalizada TS14 (García-Escudero *et al.*, 2011; Plaza *et al.*, 2016).

Tras el análisis de las imágenes, se obtuvieron los porcentajes de células positivas para los distintos marcadores gliales (**Figura 1I**). Las inmunofluorescencias y sus respectivas cuantificaciones muestran que casi el 100% de las células expresan los marcadores citoplasmáticos S100 β (**Figura 1A,B,I**) y vimentina (**Figuras 1E,F,I**). Además, alrededor del 70% de las células son GFAP positivas (**Figura 1C,D,I**) aunque la inmunoreactividad frente a GFAP es bastante difusa en ambos tipos celulares (**Figura 1C,D**). También, observamos que ni C20 ni el control TS14 expresan P75 (**Figura 1G,H,I**).



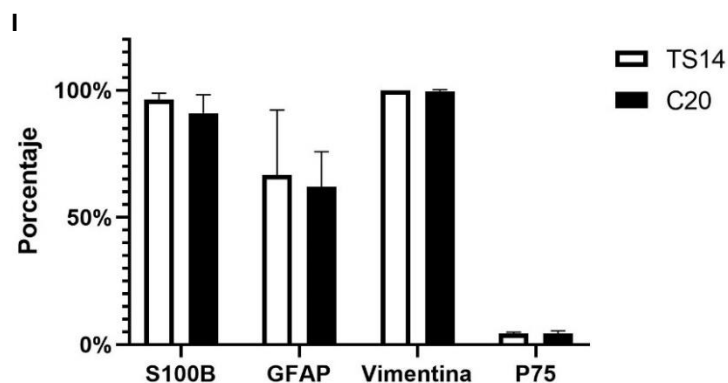
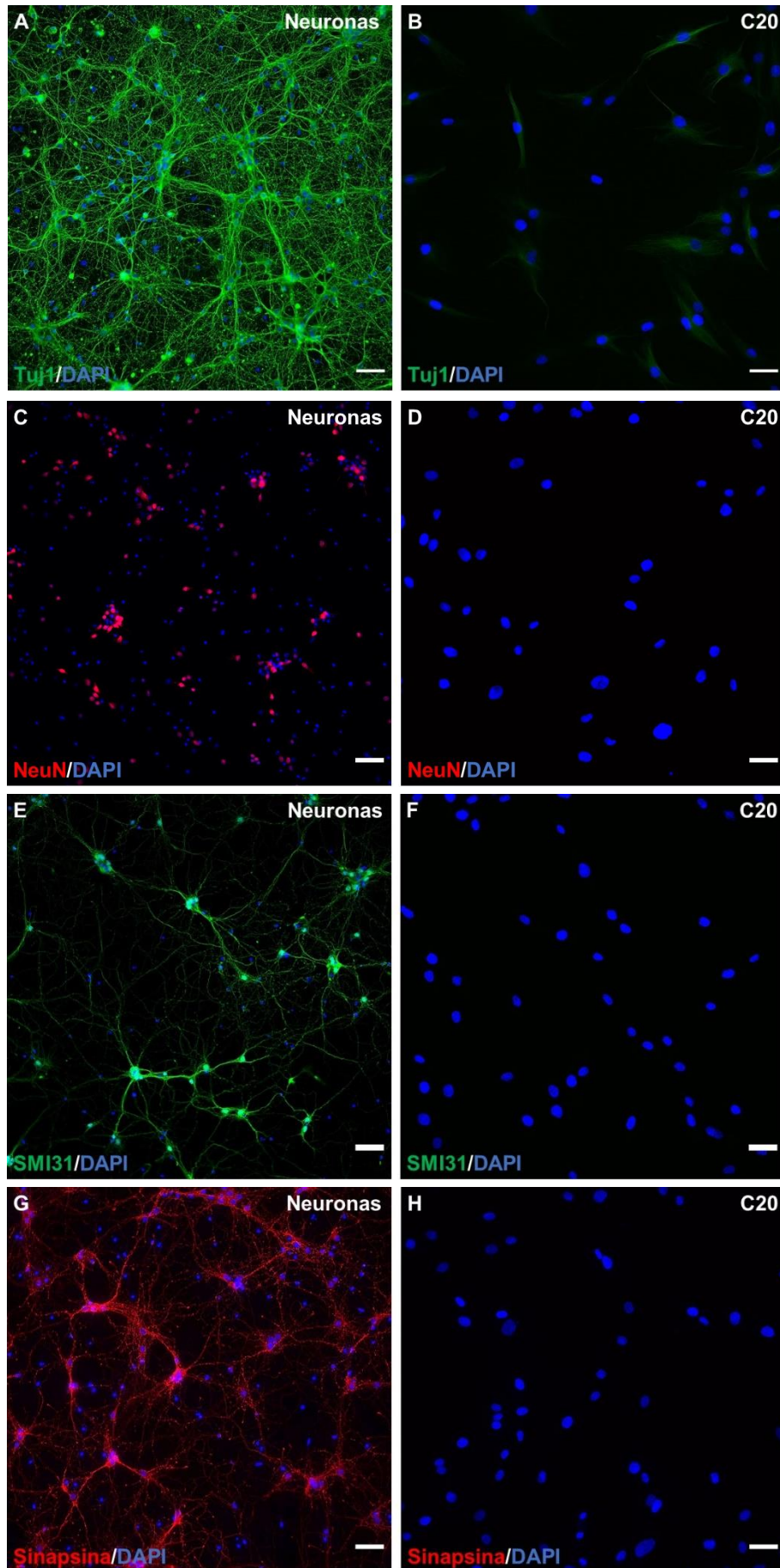


Figura 1. Análisis de expresión de los marcadores de hGEO por inmunofluorescencia. Se muestran imágenes representativas de los marcadores de GEO S100 β (A,B), GFAP (C,D), vimentina (E,F) y P75 (G,H) expresados en las líneas hGEO TS14 y C20. Los histogramas representan las medias \pm SD de las cuantificaciones de triplicados (I). El test estadístico aplicado fue la *t-Student*. (n=3, por experimento se analizaron 25 campos). La barra de escala equivale a 50 μ m.

1.2. Análisis de marcadores neuronales

A continuación, verificamos que las células C20 no expresaban marcadores neuronales. Mediante inmunofluorescencia analizamos la expresión de los marcadores neuronales generales β 3-tubulina (Tuj1) y el antígeno nuclear neuronal NeuN/Fox3 (NeuN) y de los marcadores neuronales maduros como el fosfoepítipo del neurofilamento H y de MAP 1B (SMI31), que es un marcador axonal, y Sinapsina-1 (a partir de ahora Sinapsina), que es un marcador sináptico. Los núcleos fueron teñidos con DAPI para poder identificar el número total de células y obtener el porcentaje de células positivas para los distintos marcajes. Como control positivo, se utilizaron neuronas embrionarias de corteza de ratón.

Los resultados obtenidos confirman que esta línea de hGEO no expresa marcadores neuronales (**Figura 2**). La inmunoreactividad de Tuj1 es mayor del esperado en las células C20, alrededor del 25%, pero se puede observar en la imagen representativa que el marcaje es mucho más difuso (comparar **Figuras 2A y B**). La expresión de NeuN, SMI31 y Sinapsina es inexistente en la línea C20 (**Figuras 2D,F,H**).



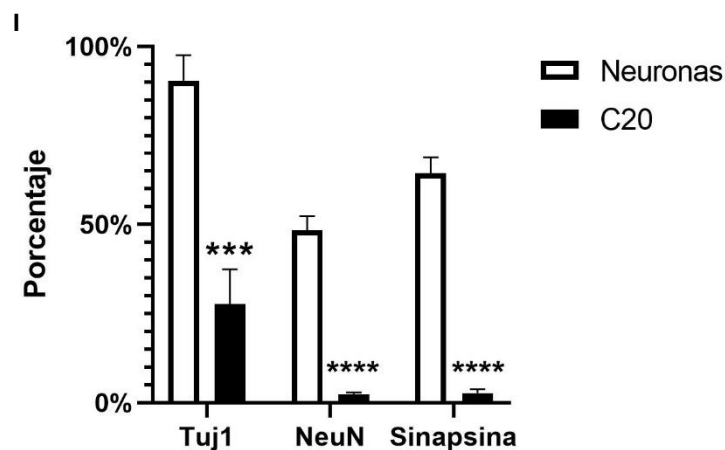


Figura 2. Análisis de expresión de los marcadores neuronales por inmunofluorescencia. Se muestran imágenes representativas de los marcadores neuronales Tuj1 (A,B), NeuN (C,D), SMI31 (E,F) y Sinapsina (G,H) expresados en neuronas y en la línea hGEO C20. Los histogramas representan las medias \pm SD de las cuantificaciones de triplicados (I). El test estadístico aplicado fue la *t-Student* (**** $p\leq 0.0001$; *** $p\leq 0.001$). (n=3, por experimento se analizaron 25 campos). La barra de escala equivale a 50 μ m.

1.3. Análisis de marcadores de precursores neuronales

Con el fin de descartar la presencia de precursores neuronales en la línea hGEO, realizamos una inmunofluorescencia para detectar SOX2, un marcador típico de precursores neuronales. DAPI detecta los núcleos celulares para poder determinar el número total de células y obtener los porcentajes. Como control positivo utilizamos los cultivos de neuronas de corteza embrionaria de ratón (E17) que por su estado embrionario es un nicho de precursores neuronales.

Las cuantificaciones descartan la existencia de precursores neuronales en la línea C20. En las imágenes se puede ver cómo el cultivo de corteza de ratón embrionaria contiene precursores neuronales SOX2 positivos (Figura 3A), alrededor del 20% (Figura 3C). Sin embargo, las células C20 no expresan el marcador SOX2 (Figura 3B).

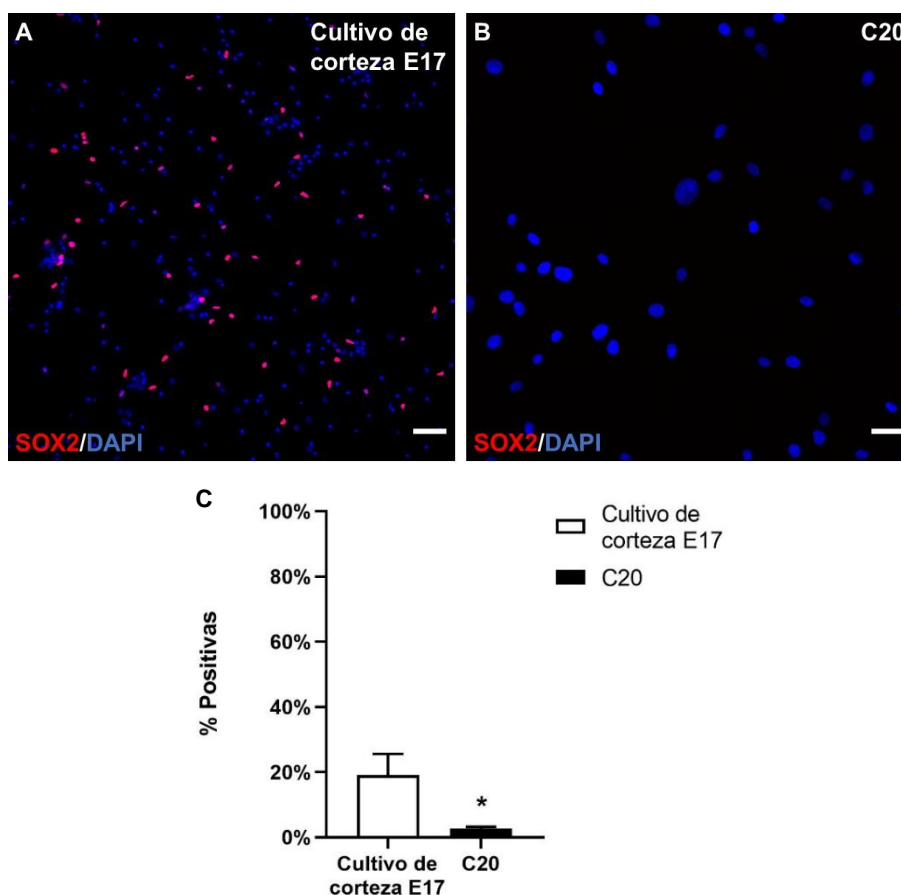


Figura 3. Análisis de expresión del marcador de precursor neuronal SOX2 por inmunofluorescencia. Se muestran imágenes representativas del marcador de precursor neuronal SOX2 en el cultivo primario de corteza 10 *in vitro* (A) y de la línea hGEO C20 (B). Los histogramas representan las medias \pm SD de las cuantificaciones de triplicados (C). El test estadístico aplicado fue la *t-Student* (* $p\leq 0.05$). ($n=3$, por experimento se analizaron 25 campos). La barra de escala equivale a 50 μm .

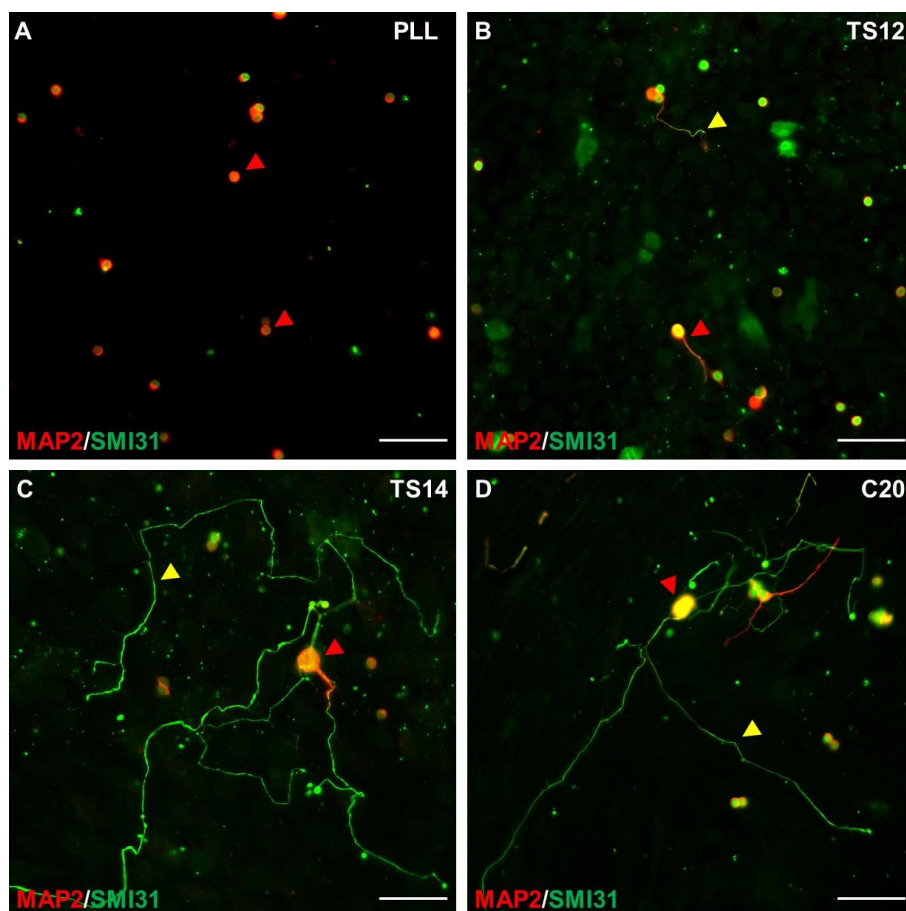
1.4. Análisis de la capacidad regenerativa

Con el fin de profundizar en la caracterización, llevamos a cabo la evaluación de las propiedades regenerativas de la hGEO C20. Para ello, realizamos un ensayo de regeneración *in vitro* mediante el cocultivo de la GEO con neuronas ganglionares de retina (NGRs) de rata adulta axotomizadas (ver **Materiales y métodos**). Como controles se usaron la línea TS14, con capacidad regenerativa; y TS12 una línea de hGEO inmortalizada con baja capacidad regenerativa (Plaza *et al.*, 2016). El sustrato Poli-L-Lisina (PLL) se empleó como control negativo de regeneración axonal.

Se cuantificó la regeneración axonal usando inmunotinciones frente a SMI31 como marcador axonal y MAP2 para identificar el compartimento somatodendrítico. Se

analizaron dos parámetros - el porcentaje de neuronas con axón y la longitud axonal media por neurona (ver **Materiales y Métodos**) - y se observó que la capacidad regenerativa de la hGEO C20 es similar al de las células TS14, nuestro control positivo. El porcentaje de neuronas con axón ronda el 15% y la longitud axonal media es de 40 micrómetros/neurona (**Figuras 4C,E,F**). Además, se apreció una capacidad regenerativa mayor, y estadísticamente significativa, de ambos parámetros respecto a los dos controles, la línea TS12 de baja regeneración (**Figuras 4B,E,F**) y la PLL, control negativo (**Figuras 4A,E,F**).

Asimismo, en las imágenes representativas, se puede observar que en los cocultivos de la NGR con las células TS14 y la línea C20, las neuronas extienden largos axones (**Figura 4C,D**). Sin embargo, cuando las NGRs axotomizadas crecen sobre las células TS12, estas solo extienden algún pequeño axón o dendrita (**Figura 4B**). De esta manera, se confirmó que las células C20 tienen capacidad neuroregenerativa característica de la GEO.



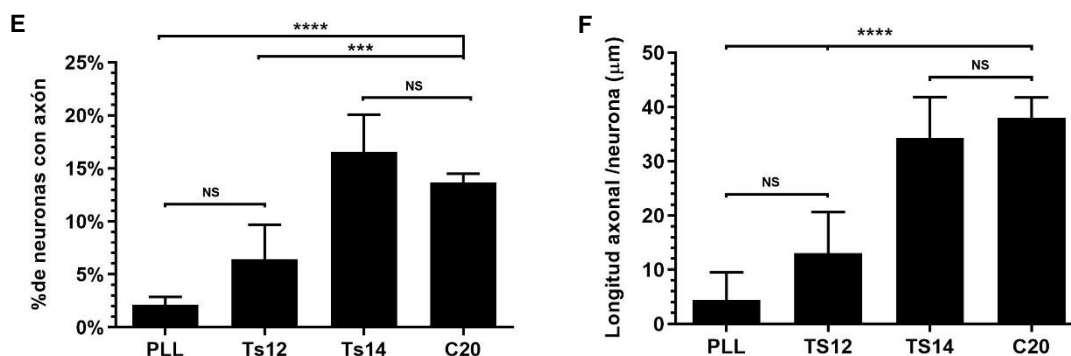


Figura 4. Análisis de la capacidad regenerativa de la hGEO C20 mediante cocultivos con NGRs. A-D, muestran imágenes representativas de las NGRs axotomizadas tras 96h en cocultivo con la hGEO. La línea TS14 fue utilizada como control positivo de la neuroregeneración (C), TS12 (B) y PLL (A) corresponden con controles de baja regeneración y negativo, respectivamente. Las flechas amarillas indican los axones y las flechas rojas, los somas y dendritas. En los histogramas se representan las medias \pm SD de las cuantificaciones: el porcentaje de neuronas de retina que extendían un axón (E) y el tamaño medio de axón expresado como $\mu\text{m}/\text{neurona}$ (F). Los test estadísticos aplicados fueron *One-way ANOVA* y post-hoc Tukey test (**** $p\leq 0.0001$; *** $p\leq 0.001$; NS, no significativo) para comparaciones múltiples entre medias ($n=4$, por experimento se analizaron ≥ 30 campos). La barra de escala equivale a $50\ \mu\text{m}$.

En conjunto, la línea hGEO C20 expresa marcadores característicos de GEO, pero no expresa marcajes neuronales ni de precursores neuronales. Asimismo, estas células muestran sus propiedades proregenerativas en un modelo *in vitro* de regeneración axonal adulta.

2. REPROGRAMACIÓN DE LA LÍNEA hGEO C20 A NEURONAS

La reprogramación celular directa a neuronas se lleva a cabo mediante la sobreexpresión de uno o varios factores de transcripción que tienen un papel decisivo en el destino celular durante el desarrollo (Masserdotti, Gascón and Götze, 2016).

Para la reprogramación directa de la línea hGEO C20 a neuronas, seleccionamos factores de transcripción de la familia bHLH involucrados en la especificación y diferenciación a neuronas y los sobreexpresamos en esta línea (ver **Materiales y Métodos**). A lo largo del proceso de reprogramación analizamos los patrones de expresión de diversos marcadores específicos de neurona y comprobamos la funcionalidad de estas neuronas inducidas (iNs).

2.1. Análisis de los factores de transcripción candidatos

Con el fin de identificar el factor o los factores de transcripción que indujesen la reprogramación de las células C20 a neuronas, sobreexpresamos en la glía los factores de transcripción más empleados en la bibliografía (NEUROG2, NEUROD1 y ASCL1), de manera individual o combinados entre sí. Los factores de transcripción se sobreexpresaron mediante el uso de partículas lentivirales y se identificaron por su coexpresión con la proteína fluorescente verde, GFP (del inglés *green fluorescent protein*). Asimismo, como control negativo, infectamos las células con el mismo lentivector pero sustituyendo el gen del factor de transcripción por una segunda copia del gen de la GFP.

Para determinar la eficiencia de reprogramación con estos factores, hicimos un estudio cualitativo mediante inmunofluorescencia de la expresión del marcador neuronal general Tuj1 por las células infectadas, GFP-positivas, 30 días post-infección (dpi).

Basándonos en el análisis de la expresión de Tuj1, primero observamos que las células infectadas con el lentivirus control (LV-GFP a partir de ahora) no expresaban Tuj1 y mantenían una morfología planar tipo glía (**Figura 5A**). Cuando se sobreexpresaba el factor NEUROD1, no solo se vio un aumento de expresión de Tuj1, sino que las células que lo expresaban presentaban un fenotipo con prolongaciones de tipo neuronal (**Figura 5B**, ver fechas amarillas). Sin embargo, cuando sobreexpresamos el factor NEUROG2, no se observó un aumento en la expresión de este marcador ni una morfología de tipo neuronal (**Figura 5C**).

En el caso de la coexpresión de NEUROD1 con NEUROG2, también se observó un aumento de Tuj1 asociado a un cambio de fenotipo, pero con unas extensiones mucho menores que con solo NEUROD1 (**Figura 5D**). Por último, cuando sobreexpresamos el factor ASCL1 solo o en combinación con los otros factores, se produjo mucha muerte celular en las células infectadas (datos no mostrados).

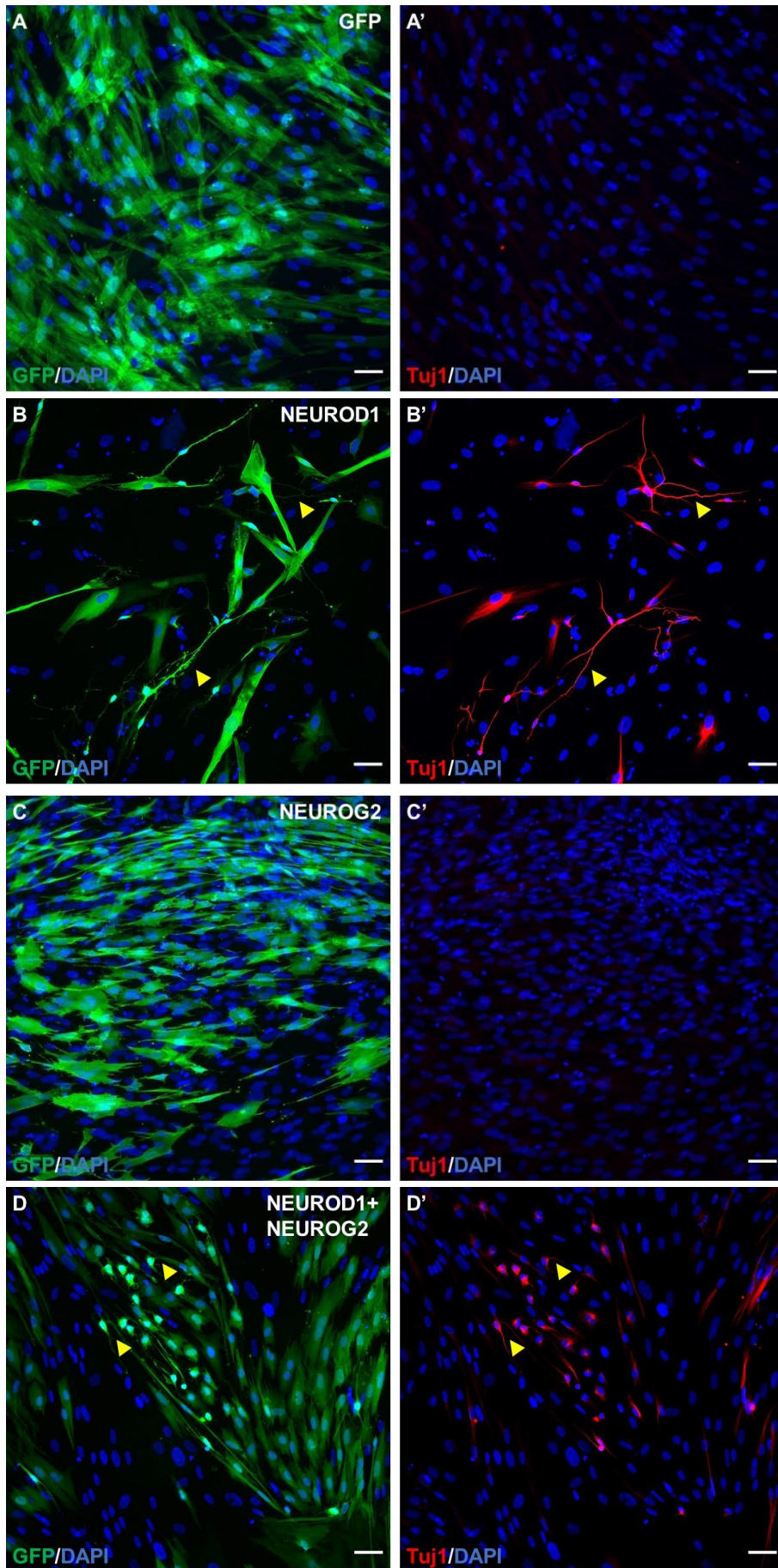
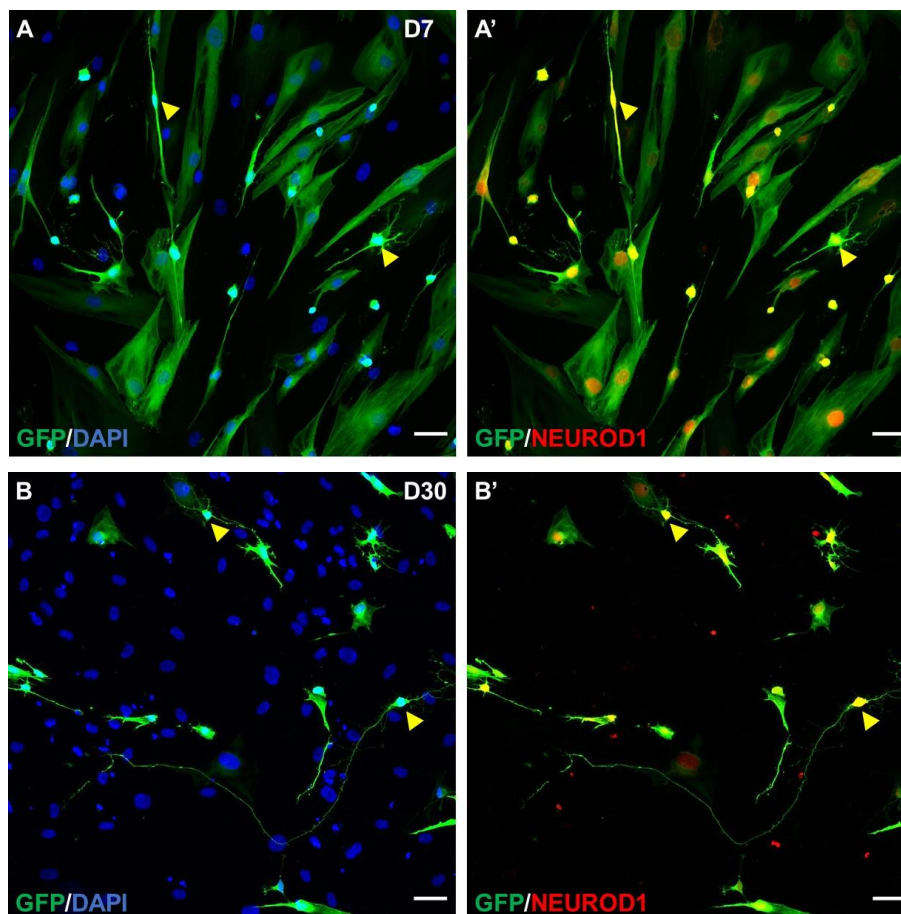


Figura 5. Estudio de factores de transcripción candidatos para la inducción de la reprogramación de C20 a neuronas. Imágenes representativas de la expresión del marcador neuronal Tuj1 30 dpi en C20 infectadas solo con GFP (**A**), e infectadas con los factores NEUROD1 (**B**), NEUROG2 (**C**) o en combinación (**D**). Las flechas amarillas indican las células que expresan Tuj1. La barra de escala equivale a 50 μ m.

2.2. Expresión de NEUROD1

A continuación, quisimos comprobar que los fenotipos observados se debían a la sobreexpresión de NEUROD1 en la hGEO. Para determinar la implicación de NEUROD1 en la inducción de la reprogramación, realizamos una inmunofluorescencia frente al factor NEUROD1 a distintos tiempos del proceso de reprogramación.

Así, tras la cuantificación, demostramos que a los 7 dpi el 80% de las células infectadas ya expresaban NEUROD1 y a los 30 dpi casi el 100% (**Figura 6C**). En las imágenes representativas se puede observar que solo las células infectadas, GFP positivas, expresan NEUROD1 (**Figura 6A,B**). Esto pone de manifiesto que la expresión de NEUROD1 se debe exclusivamente al lentivector y no a la influencia del medio neuronal sobre la expresión del gen.



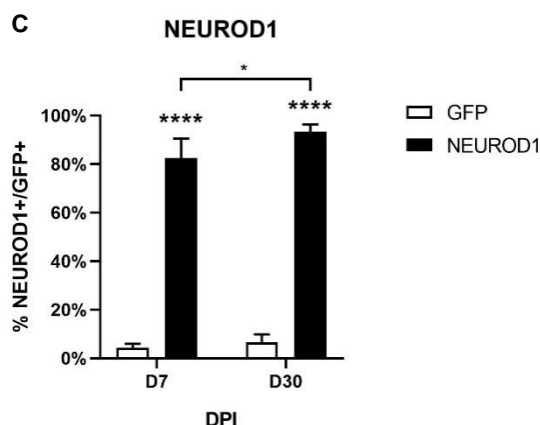


Figura 6. Análisis de expresión de NEUROD1. Imágenes representativas de la sobreexpresión del factor NEUROD1 a distintos tiempos de la inducción, 7 dpi (A) y 30 dpi (B). Las flechas amarillas señalan células infectadas que expresan NEUROD1. Los histogramas presentan las medias \pm SD de las cuantificaciones de la expresión de NEUROD1 a 7 dpi y 30 dpi, expresada en porcentaje de células que sobreexpresan NEUROD1 respecto al número total de células infectadas, GFP positivas (C). (n=3 experimentos independientes, por experimento se analizaron 25 campos). Los test estadísticos aplicados fueron *Two-way ANOVA* y post-hoc Sidak test (****p \leq 0.0001; *p \leq 0.05) para comparaciones múltiples entre medias. La barra de escala equivale a 50 μ m.

2.3. Análisis del proceso de reprogramación

Tras seleccionar el factor de transcripción NEUROD1, nos centramos en el estudio del proceso de reprogramación. Primero, determinamos la eficiencia de reprogramación calculando el porcentaje de células positivas para el marcaje neuronal Tuj1 respecto al total de células infectadas, GFP positivas.

Las cuantificaciones revelan la eficiencia de reprogramación de las células C20 con el factor NEUROD1 medida como porcentaje de células Tuj1 positivas/GFP positivas (Tuj1+/GFP+). A 7 dpi ya observamos un aumento significativo del número de células que sobreexpresan Tuj1 constituyendo alrededor del 30% de las células infectadas, respecto al control LV-GFP (Figuras 7A,A',C). Tras 30 dpi la eficiencia de reprogramación fue del 60% (Figuras 7B,B',C). Además, las imágenes representativas muestran un aumento en el número de células que expresan Tuj1 acompañado de un cambio de morfología con extensiones tipo neuronal (Figura 7B).

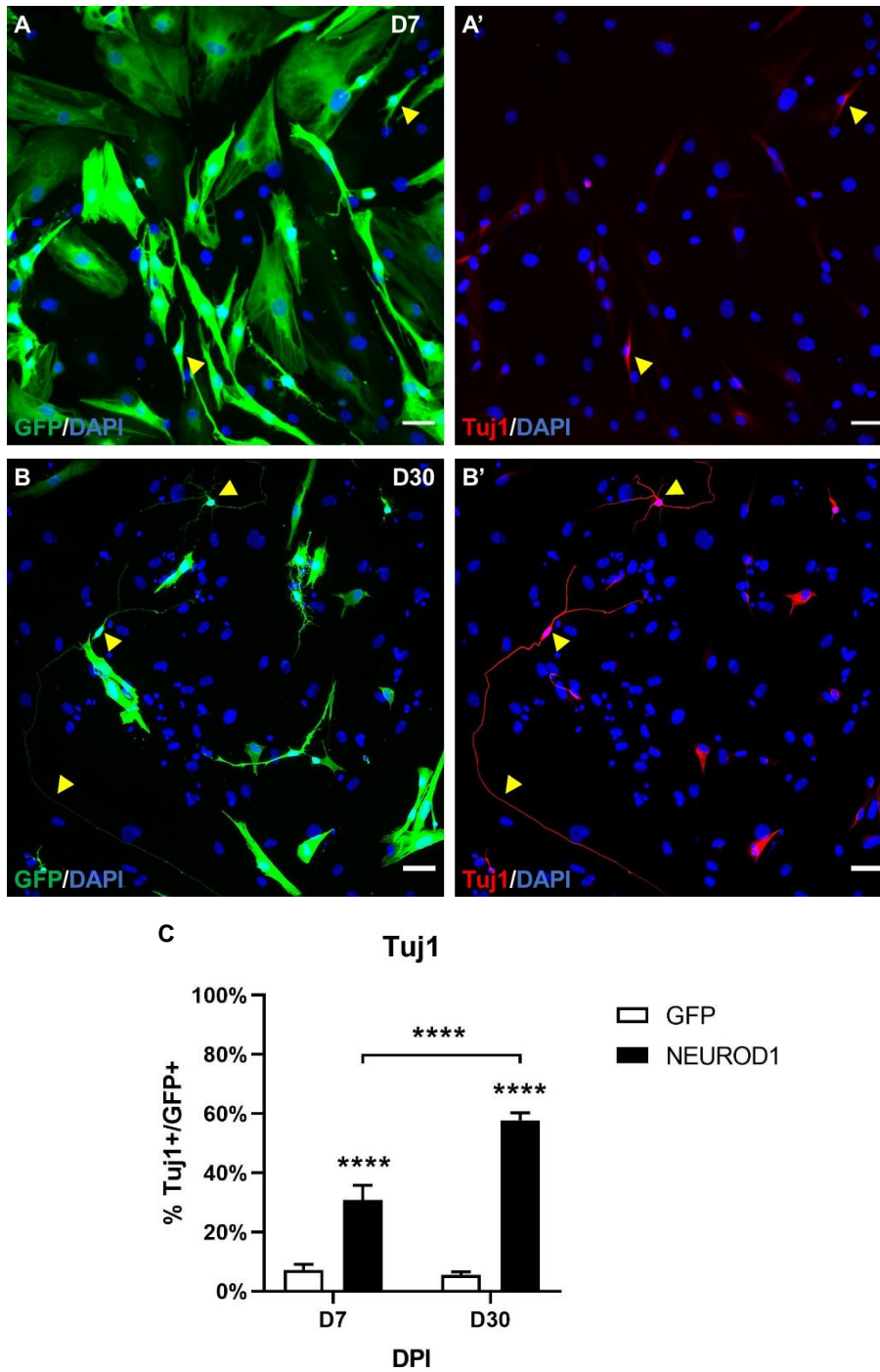


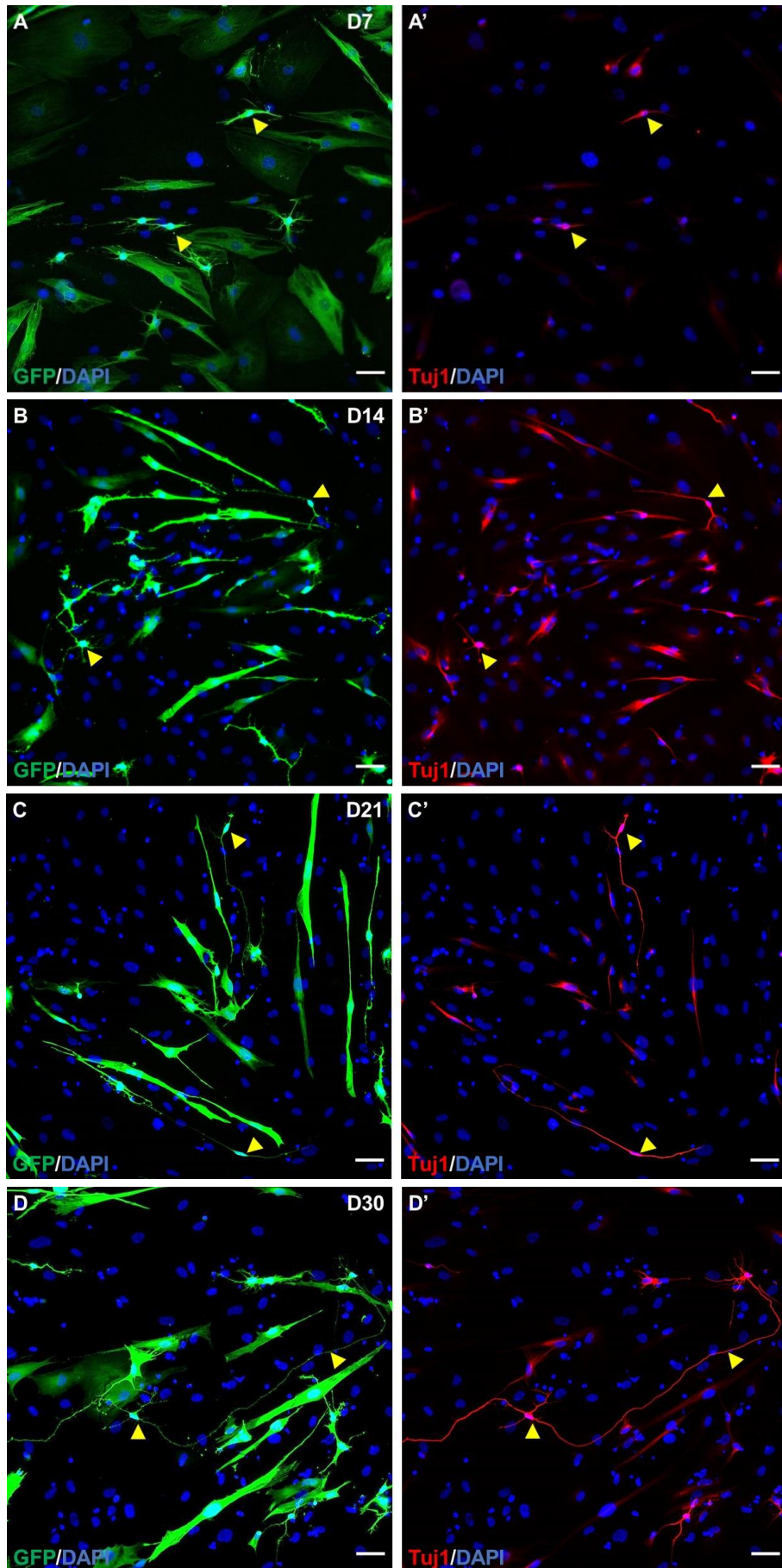
Figura 7. Estudio de la eficiencia de reprogramación. Imágenes representativas de la expresión de Tuj1 a distintos tiempos de la reprogramación, 7 dpi (A) y 30 dpi (B). Las flechas amarillas indican células Tuj1 positivas. Los histogramas presentan las medias \pm SD de las cuantificaciones de eficiencia de reprogramación a 7 dpi y 30 dpi, expresada en porcentaje de células que expresan Tuj1 respecto al número total de células infectadas, GFP positivas. (n=4 experimentos independientes, por experimento se analizaron 25 campos). Los test estadísticos aplicados fueron *Two-way ANOVA* y post-hoc Sidak test (**** $p\leq 0.0001$) para comparaciones múltiples entre medias. La barra de escala equivale a 50 μ m.

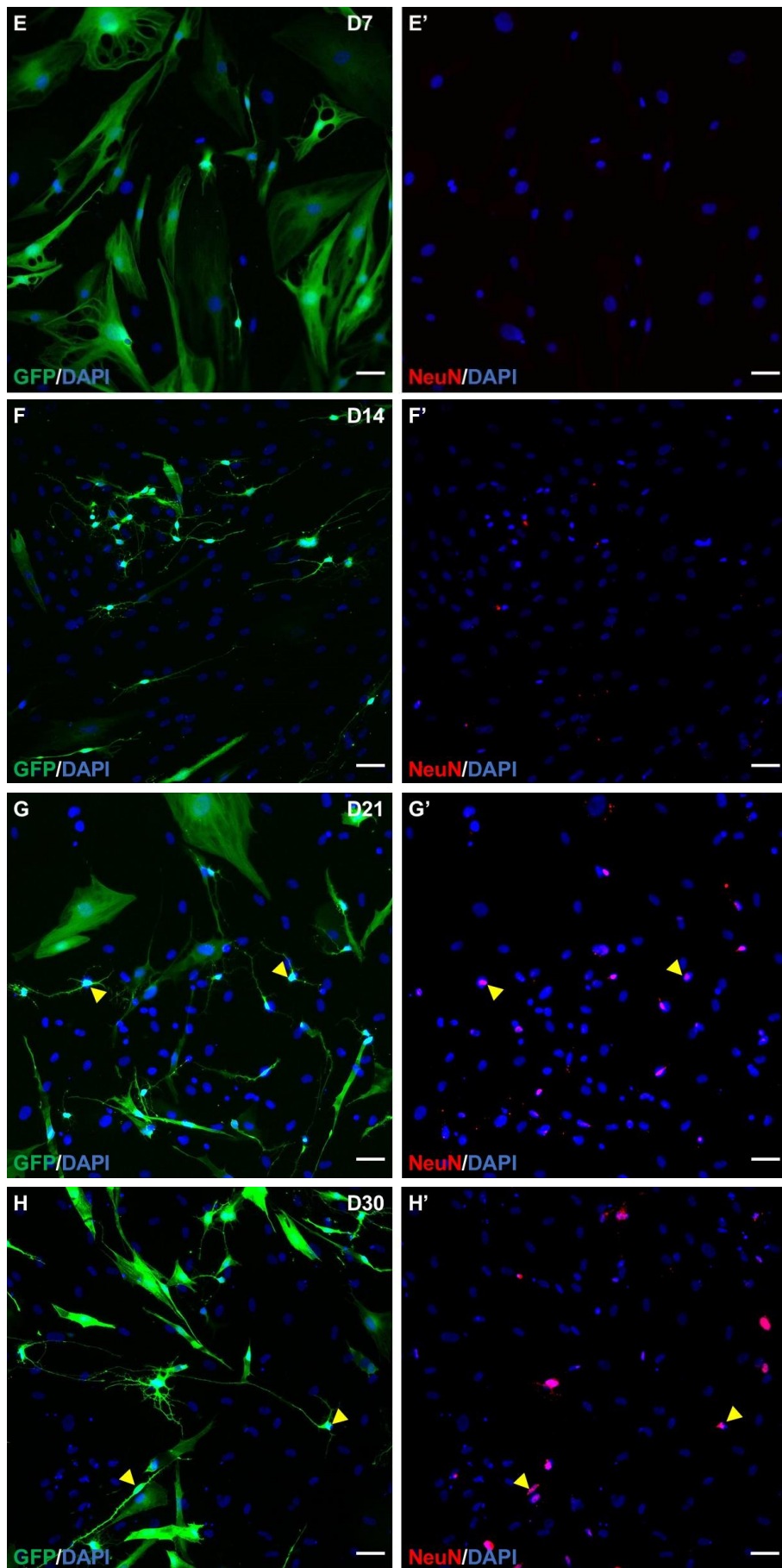
A continuación, estudiamos la expresión de varios marcadores neuronales a diferentes momentos de la reprogramación mediante inmunofluorescencia: Tuj1 y NeuN como marcadores neuronales generales (**Figura 8**), y SMI31 y Sinapsina como marcadores de neuronas maduras (**Figura 9**).

Tuj1 comenzó a detectarse a partir del día 7 (**Figura 8A,A'**). A 14 dpi alrededor del 40% de las células infectadas expresan Tuj1; además, las células empiezan cambiar su morfología y a presentar pequeñas prolongaciones (**Figura 8B,B'**). Tras 21 dpi, se detectan iNs Tuj1 positivas con extensiones más largas (**Figura 8C,C'**). Finalmente, a 30 dpi, el 60% de las células expresan Tuj1 y tienen una morfología tipo neuronal con largas prolongaciones que se asemejan a axones (**Figura 8D,D'**).

Respecto a la expresión de NeuN, este no se empieza a expresar hasta el día 21 (**Figura 8G,G'** comparar con **Figuras 8E,E' y F,F'**). A 30 dpi, es cuando se produce un cambio significativo, donde alrededor del 40% de las células que expresan GFP expresan NeuN (**Figura 8H.H'**).

La expresión del marcador axonal SMI31 comienza 14 dpi y se mantiene a lo largo del tiempo (**Figura 9B-D**). A día 30 dpi, es de destacar que las iNs más desarrolladas lo expresan en gradiente positivo del soma hacia los extremos del axón (**Figura 9D,D'**), patrón de expresión característico de neuronas maduras. Asimismo, la Sinapsina comienza a expresarse a partir de 21 dpi, con un patrón de expresión axonal característico a 30 dpi (**Figura 9G,G',H,H'**).





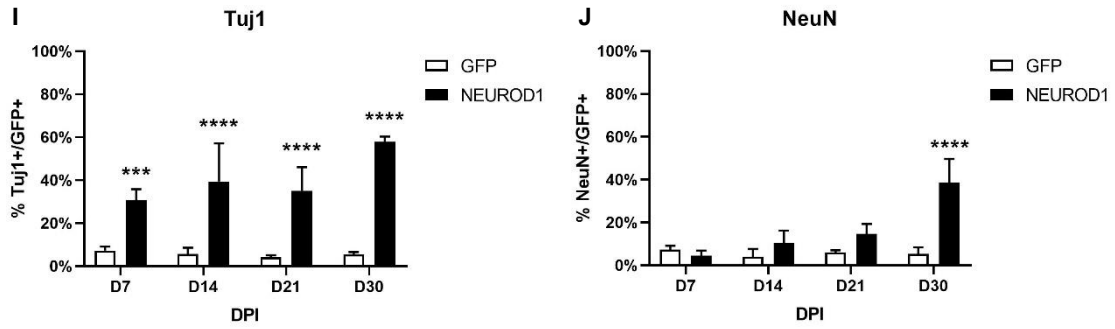
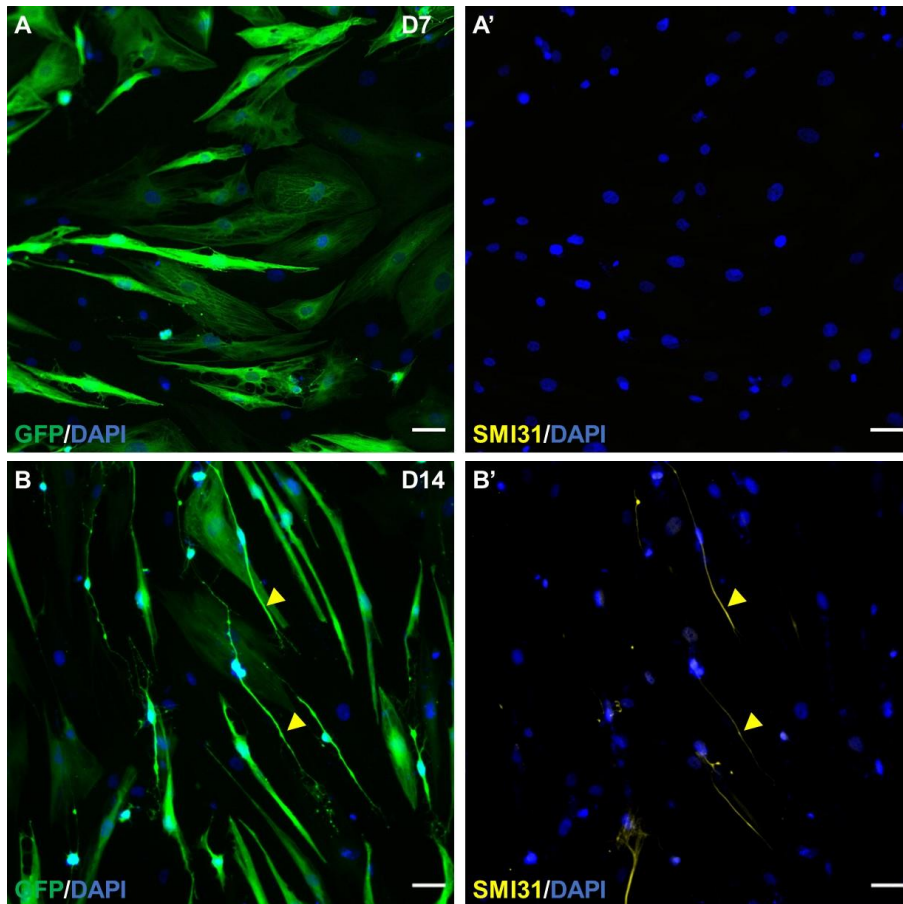
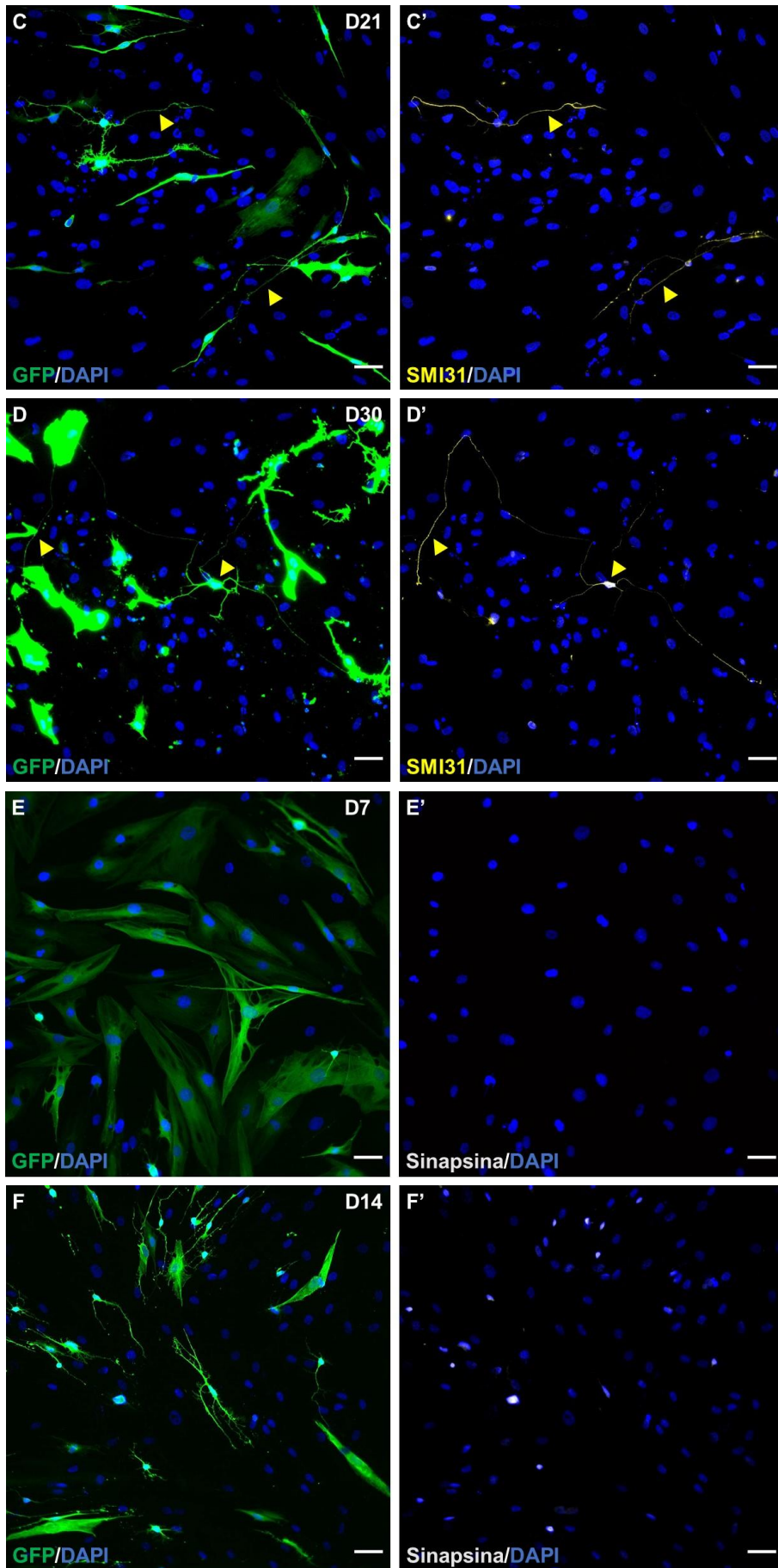


Figura 8. Análisis de expresión de marcadores neuronales generales en el proceso de reprogramación. Se muestran imágenes representativas de los marcadores neuronales Tuj1 (A-D) y NeuN (E-H), expresados 7, 14, 21 y 30 dpi. Las flechas amarillas señalan células que expresan el marcador. Los histogramas representan las medias \pm SD de las cuantificaciones de los marcadores Tuj1 (I) y NeuN (J). Los test estadísticos aplicados fueron *Two-way ANOVA* y post-hoc Sidak test (**** $p \leq 0.0001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$) para comparaciones múltiples entre medias ($n=3$ experimentos independientes se analizaron 25 campos). La barra de escala equivale a 50 μm .





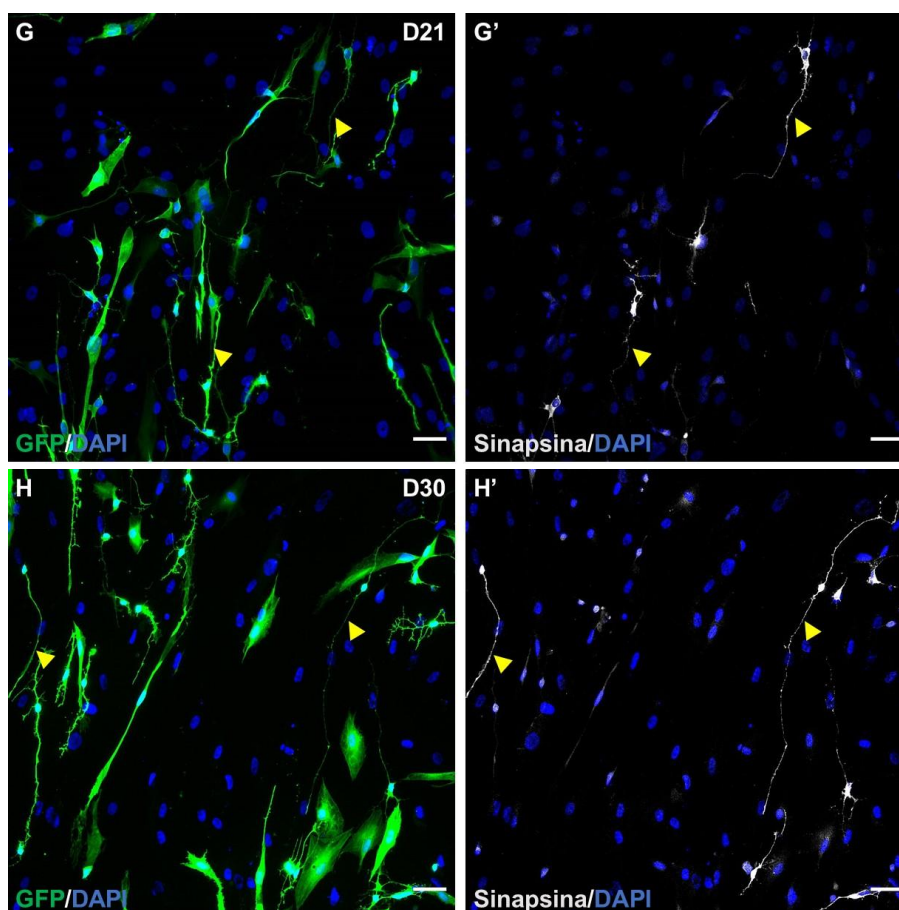


Figura 9. Análisis de expresión de marcadores neuronales maduros en el proceso de reprogramación. Se muestran imágenes representativas de los marcadores neuronales SMI31 (A-D) y Sinapsina (E-H), expresados 7, 14, 21 y 30 dpi. Las flechas amarillas señalan células que expresan el marcador. Es de destacar el patrón de expresión de SMI31 en gradiente positivo del soma hacia los extremos del axón (D') característico patrón axonal. Asimismo, se distingue el marcaje de la Sinapsina a lo largo del axón (G',H'). La barra de escala equivale a 50 μ m.

2.4. Estudio de la funcionalidad de las iNs

Finalmente, para determinar la funcionalidad de las iNs generadas, realizamos ensayos electrofisiológicos mediante la técnica de *patch-clamp*. Los registros se llevaron a cabo en iNs, identificadas con el reportero GFP, mantenidas en cultivo durante 2 meses post-infección. Como control positivo utilizamos neuronas embrionarias de corteza de ratón.

Primero, registramos en el modo *voltage clamp*, es decir, fijamos una serie de pulsos de voltaje incrementados gradualmente y registramos las entradas de corrientes de sodio, dependientes de voltaje, que atraviesan la membrana en cada pulso. A continuación, registramos en el modo *current clamp*, es decir, registramos el potencial de la membrana estimulando a la célula mediante la inyección de corriente a través del electrodo.

Además, al final del registro tratamos los cultivos con tetrodotoxina (TTX), una neurotoxina bloqueante de los receptores de sodio dependientes de voltaje. Así, se suprime la corriente de sodio dependiente de voltaje y, consecuentemente, los potenciales de acción. Con este tratamiento se demuestra que la corriente de sodio es específica de los canales de sodio dependientes de voltaje, característicos de una neurona.

En primer lugar, registramos las neuronas embrionarias de corteza de ratón como un control positivo de nuestro experimento (**Figura 10A-C**). Cuando aplicamos los pulsos de voltaje, registramos una entrada de sodio de aproximadamente 500 picoamperios (pA) (**Figura 10A**). Además, esta corriente de sodio fue bloqueada por la exposición a TTX (**Figura 10B**). Después, cuando estimulamos a la neurona en modo *current clamp*, se registraron trenes de potenciales de acción (PA) (**Figura 10C**).

Seguidamente, registramos las iNs a 60 dpi (**Figura 10D-F**). Los registros en *voltage clamp*, revelaron la existencia de una pequeña entrada de sodio, alrededor de 20 pA (**Figura 10D**). Asimismo, cuando aplicamos TTX al medio extracelular, la curva de entrada de sodio se elimina (**Figura 10E**). Esto mostraba que las iNs a partir de GEO C20 expresaban canales de Na⁺ dependientes de voltaje. Sin embargo, al registrar el potencial de membrana observamos que las iNs no disparaban ningún potencial de acción (**Figura 10F**). Esto se interpreta como que no hay suficientes canales de Na⁺ que induzcan una despolarización de la membrana tal que se pueda disparar un potencial de acción.

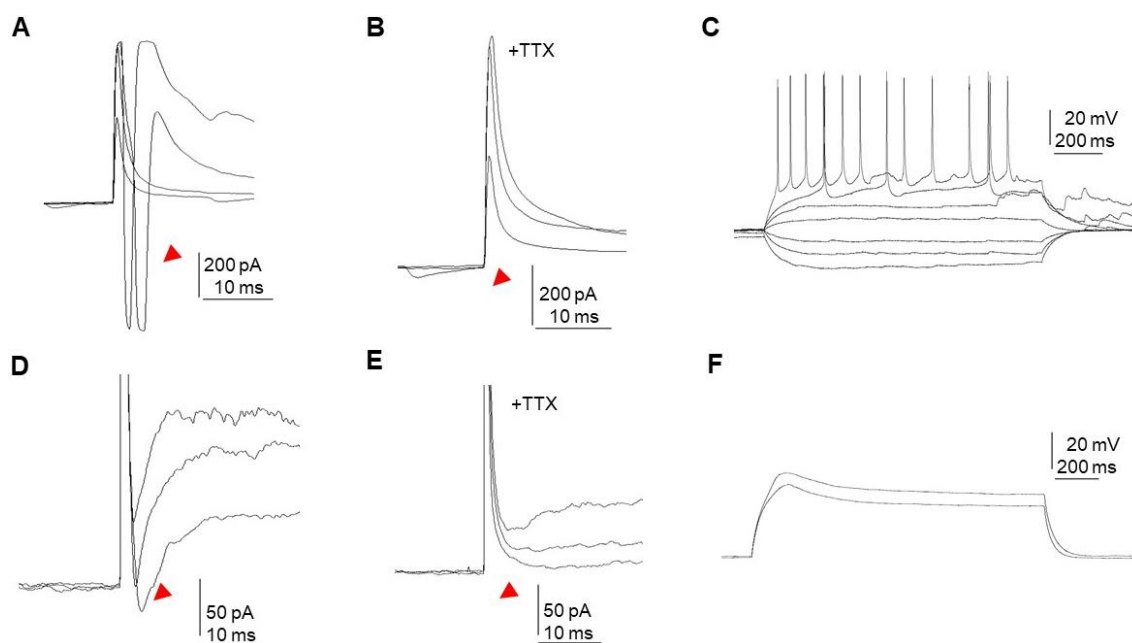


Figura 10. Estudio de las propiedades electrofisiológicas de las iNs. Registros de las corrientes de entrada de sodio voltaje dependientes (indicadas con flechas rojas) de neuronas embrionarias de corteza de ratón (A) y de las iNs 60 dpi (D). Bloqueo de las corrientes de sodio en presencia de TTX (B,E). Registros de los potenciales de acción de las neuronas (C) y de las iNs 60dpi (F). Las iNs presentan una pequeña entrada de Na⁺ pero que no es suficiente para disparar un potencial de acción.

Estos resultados en su conjunto demuestran que la línea de hGEO C20 puede ser reprogramada a neuronas con el factor de transcripción NEUROD1 ya que estas iNs expresan marcadores neuronales generales, axonales y sinápticos. Sin embargo, no son lo suficientemente maduras para generar potenciales de acción.

3. MADURACIÓN FUNCIONAL DE LAS NEURONAS INDUCIDAS

En el sistema nervioso central los astrocitos son los encargados de proporcionar soporte a las neuronas y promover tanto la supervivencia como la maduración neuronal (Pyka *et al.*, 2011). En reprogramación celular, varios estudios han descrito que los astrocitos promueven la diferenciación y la maduración de las iNs (Tang *et al.*, 2013; Klapper *et al.*, 2019). Por ello, con el fin de conseguir una mayor maduración y, por consiguiente, la funcionalidad de las iNs, llevamos a cabo un cocultivo de las iNs sobre una monocapa de astrocitos humanos y de ratón.

3.1. Cocultivos de C20-ND1-GFP sobre astrocitos humanos

Inicialmente, realizamos cocultivos sobre una línea de astrocitos humanos. Para ello, las células C20, previamente infectadas con un lentivirus portador de la secuencia de *NEUROD1* (48 horas antes), fueron plaqueadas sobre una monocapa de astrocitos humanos. Tras 60 dpi, las iNs fueron analizadas mediante técnicas de inmunofluorescencia. Como control, llevamos en paralelo la reprogramación sobre PO/L 60 dpi, sin la monocapa de astrocitos.

Primero, se muestra un cultivo de iNs sin cocultivo de astrocitos 60 dpi (Figura 11A). En el cultivo se observaba mucha muerte celular; sin embargo, se muestra una imagen de las células remanentes en la que se puede ver que alguna célula infectada, GFP

positiva, expresa el marcador neuronal Tuj1 (**Figura 11A'**), pero ninguna expresa Sinapsina (**Figura 11A''**). A continuación, se muestran las iNs reprogramadas sobre una monocapa de astrocitos humanos (**Figura 11B**). Bajo estas condiciones, se puede observar alguna célula reprogramada que expresa tanto el marcador Tuj1 (**Figura 11B'**) como Sinapsina (**Figura 11B''**).

Los datos indican que el cocultivo con astrocitos humanos mejora la supervivencia de las iNs maduras a largo plazo respecto a los cultivos en PO/L. Sin embargo, no obtenemos el aumento de madurez esperado, puesto que no vemos una mejora en el fenotipo de las iNs respecto a las que obteníamos tras 30 dpi en PO/L.

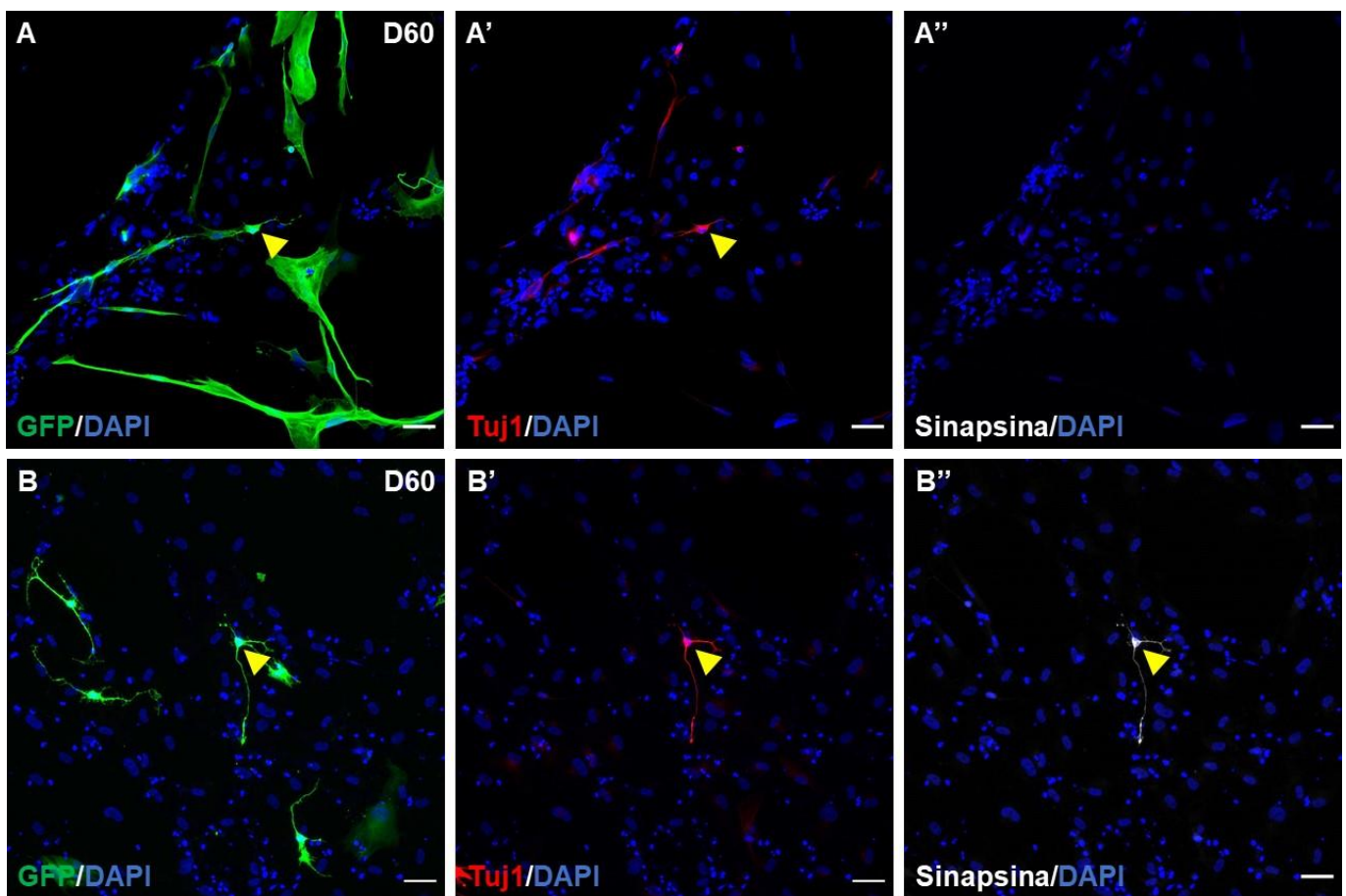


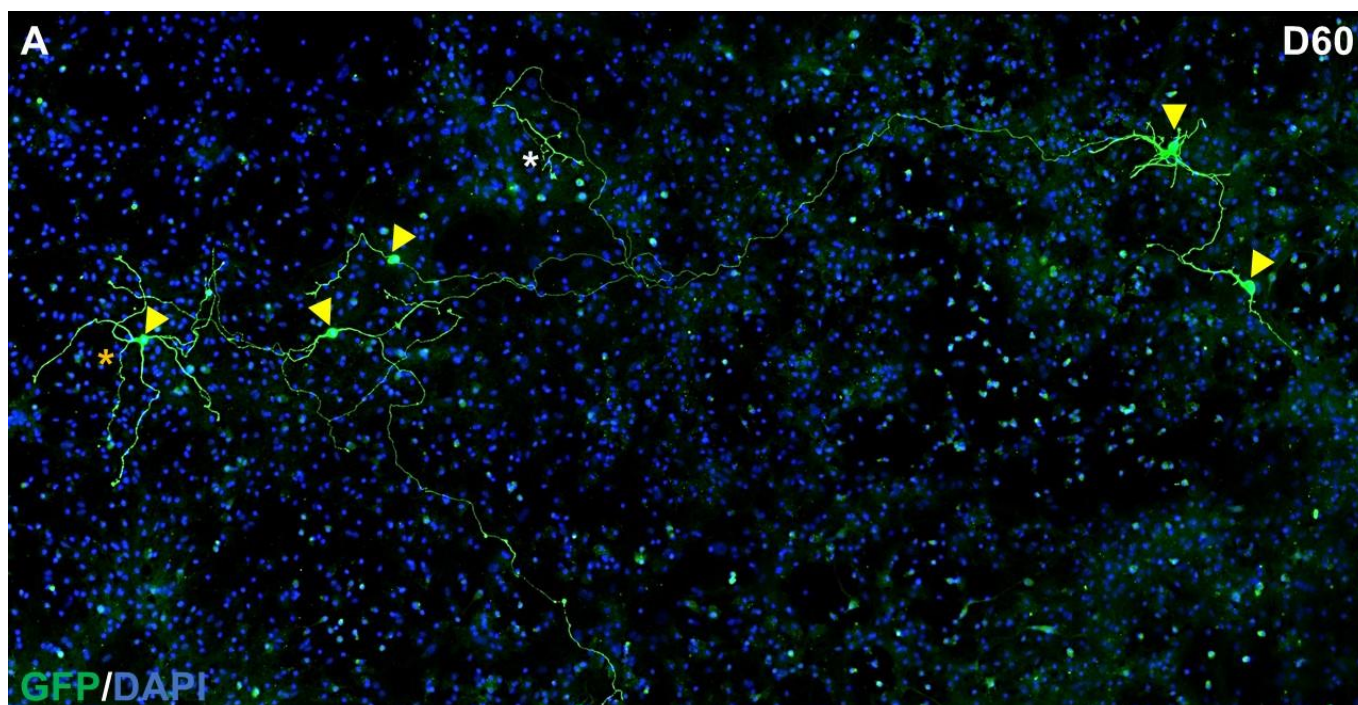
Figura 11. Cocultivo de las iNs sobre astrocitos humanos. Imágenes representativas de la expresión de los marcadores neuronales Tuj1 y Sinapsina en las iNs sobre PO/L (**A**) y sobre una monocapa de astrocitos humanos (**B**) 60 dpi. Se puede observar alguna célula reprogramada que expresa tanto el marcador Tuj1 como Sinapsina. Las flechas amarillas señalan células que expresan los marcadores. La barra de escala equivale a 50 μ m.

3.2. Cocultivos de C20-ND1-GFP sobre astrocitos de ratón

Posteriormente, llevamos a cabo cocultivos sobre astrocitos de ratón postnatales. Así, realizamos el mismo procedimiento que en el apartado anterior. Tras 60 dpi, realizamos inmunotinciones para la caracterización de las células reprogramadas.

La primera imagen representa un mosaico de varios campos (**Figura 12A**). En ella, se pueden detectar varias células GFP positivas con largas extensiones, de tipo axonal, y otras más cortas, de tipo dendríticas (**Figura 12A'**). Asimismo, al final de algunas de las prolongaciones, se pueden observar lo que parecen conos de crecimiento (**Figura 12A''**). Cuando analizamos la expresión de marcadores neuronales bajo estas condiciones, observamos que las iNs expresan los marcadores neuronales Tuj1 (**Figura 12B'**) y Sinapsina (**Figura 12B''**). Además, observamos que células GFP positivas expresan al inicio del axón Ankirina G (AnkG; **Figura 12C''**), un marcador específico del segmento inicial, y al final del axón GAP43 (**Figura 12D''**), un marcador de crecimiento axonal y de conos de crecimiento.

Estos resultados demuestran que los astrocitos de ratón aportan el microambiente necesario para que las iNs puedan sobrevivir largos tiempos *in vitro* y madurar.



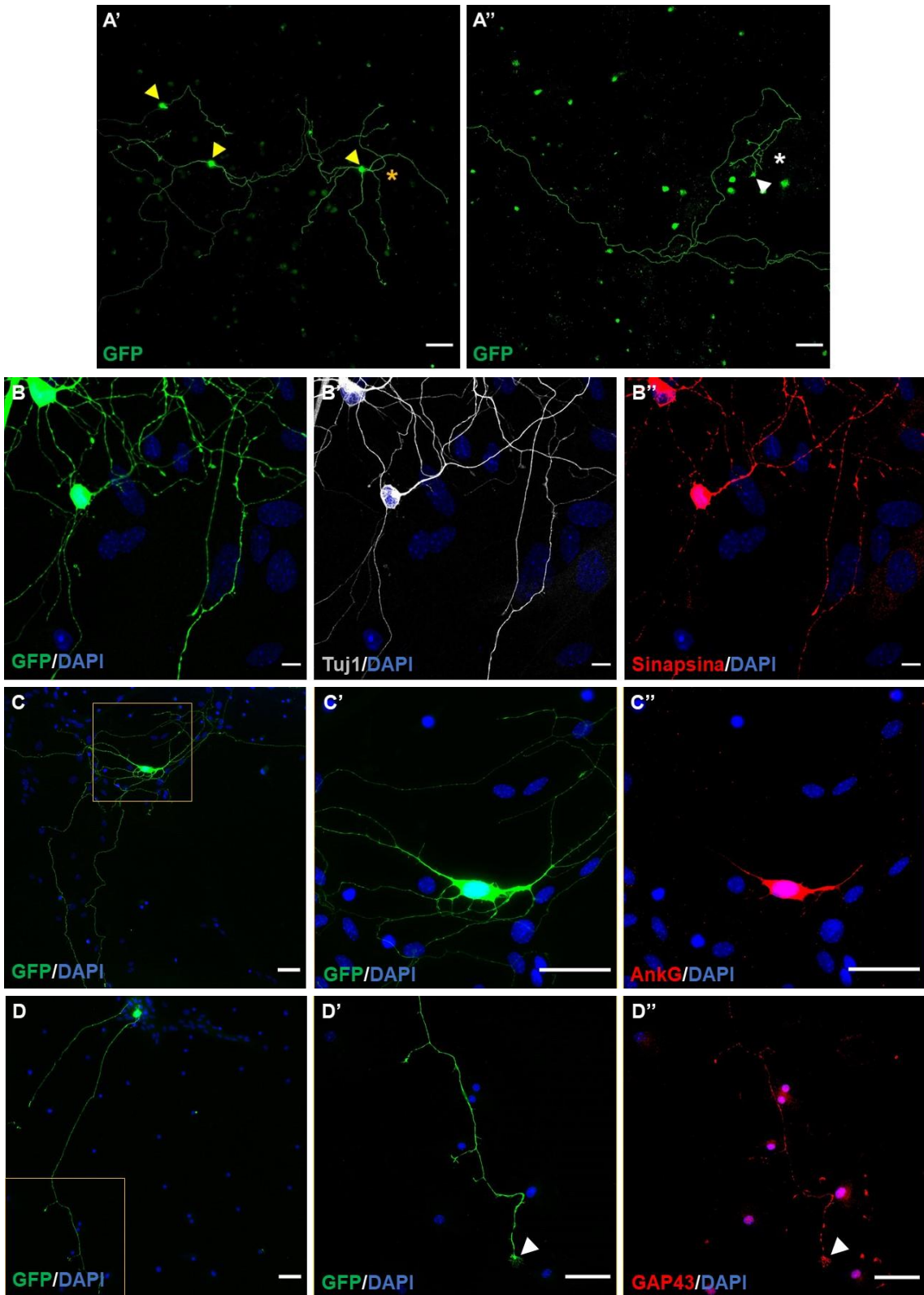


Figura 12. Cocultivo de las iNs sobre astrocitos de ratón. Mosaico de varios campos de un cultivo de iNs sobre una monocapa de astrocitos de ratón 60 dpi (**A**). Con un asterisco amarillo se marca una célula GFP positivas con largas extensiones, de tipo axonal, y otras más cortas, de tipo dendríticas (imagen ampliada en **A'**), además se marca con un asterisco naranja engrosamientos al final de las prolongaciones similares a conos de crecimiento (imagen ampliada en **A''**). **B**, muestra imágenes representativas de células infectadas GFP positivas que expresan los marcadores neuronales Tuj1 (**B'**) y Sinapsina (**B''**); y **C,D** muestran células GFP positivas con ampliaciones del cuadro amarillo (**C',D'**) que expresan los marcadores del segmento inicial del axón, Ankirina G (**C''**), y de los conos de crecimiento, GAP43 (**D''**). Las flechas amarillas señalan las iNs y las flechas blancas los conos de crecimiento. Las barras de escala equivalen a 100 μm (**A**), 50 μm (**A',A'', C,C',C'',D,D',D''**) y 10 μm (**B,B',B''**).

3.3. Estudio de la funcionalidad de las iNs

A continuación, realizamos estudios electrofisiológicos para comprobar la funcionalidad de las iNs reprogramadas sobre una monocapa de astrocitos de ratón. Para ello, realizamos tanto registros en *current clamp* como en *voltage clamp* en iNs mantenidas *in vitro* durante 60 y 90 días. De nuevo, utilizamos como control positivo neuronas embrionarias de corteza de ratón.

Primero, registramos las neuronas embrionarias de corteza de ratón (**Figura 13A,D**). Los registros en *current clamp* mostraron una corriente de entrada de sodio de aproximadamente 1000 pA (**Figura 13A**). Cuando registramos el potencial de membrana, detectamos que las neuronas generaban un pequeño tren de potenciales de acción (**Figura 13D**).

A continuación, llevamos a cabo los registros de las iNs en las condiciones de cocultivo sobre astrocitos de ratón, tras 60 dpi (**Figura 13B,E**) y 90 dpi (**Figura 13C,F**). Primero, registramos las corrientes de sodio de cultivos 60 dpi y observamos una entrada de sodio de 200 pA (**Figura 13B**). Asimismo, cuando realizamos los registros en modo *voltage clamp*, detectamos un potencial de acción que, además, se disparaba de manera repetitiva (**Figura 13E**). Después, registramos las iNs 90 dpi y observamos una entrada de sodio en torno a 1000 pA cuando registramos en modo *current clamp* (**Figura 13C**). Asimismo, cuando realizamos el registro del potencial de membrana, observamos que la iN disparó un tren de potenciales de acción (**Figura 13F**).

Estos resultados indican que las iNs, bajo estas condiciones, son suficientemente maduras como para expresar suficientes canales de sodio en la localización adecuada e inducir una despolarización de la membrana y disparar un tren de potenciales de

acción. Asimismo, observamos un aumento gradual de maduración respecto al tiempo en cocultivo.

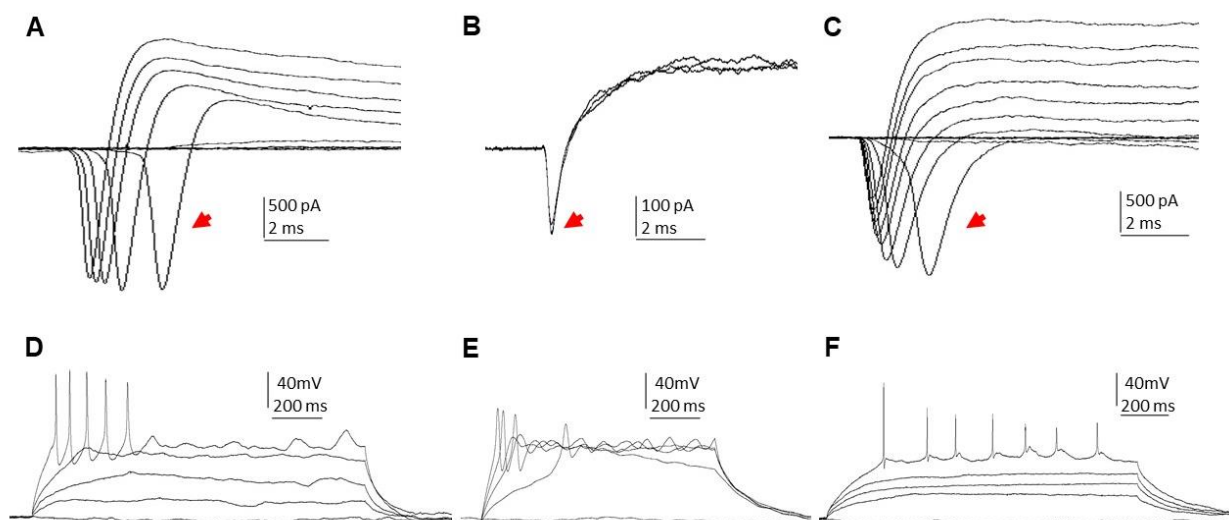


Figura 13. Estudio de las propiedades electrofisiológicas de las iNs en cocultivo con astrocitos de ratón. Registros de las corrientes de entrada de sodio dependientes de voltaje (indicadas con flechas rojas) de neuronas embrionarias de corteza de ratón (A), de iNs 60 dpi (B) y de iNs 90 dpi (C). Registros de los potenciales de acción de las neuronas (D), de iNs 60 dpi (E) y de iNs 90dpi (F). Las iNs presentan una entrada de sodio tal que induce un potencial de acción 60 dpi y un tren de potenciales de acción 90 dpi.

3.4. Caracterización de la especificación neuronal

Finalmente, con el fin de determinar el subtipo neuronal obtenido tras la reprogramación celular con el factor NEUROD1, analizamos el patrón de expresión de marcadores de distintos tipos neuronales expresados por las iNs maduras bajo estas condiciones de cultivo.

Tras 60 días en cultivo, detectamos iNs que expresaban el marcador de neuronas glutamatérgicas vGLUT1 (del inglés *vesicular glutamate transporters 1*; **Figura 14A'**) y GAD67 (del inglés *glutamate decarboxylase 67*; **Figura 14B'**), marcador de neuronas gabaérgicas. Sin embargo, no se encontraron células positivas para los marcadores CHAT (del inglés *choline acetyltransferase*; **Figura 14C'**), marcador específico de neuronas colinérgicas, ni TH (tirosina hidroxilasa; **Figura 14D'**), marcador de neuronas dopaminérgicas.

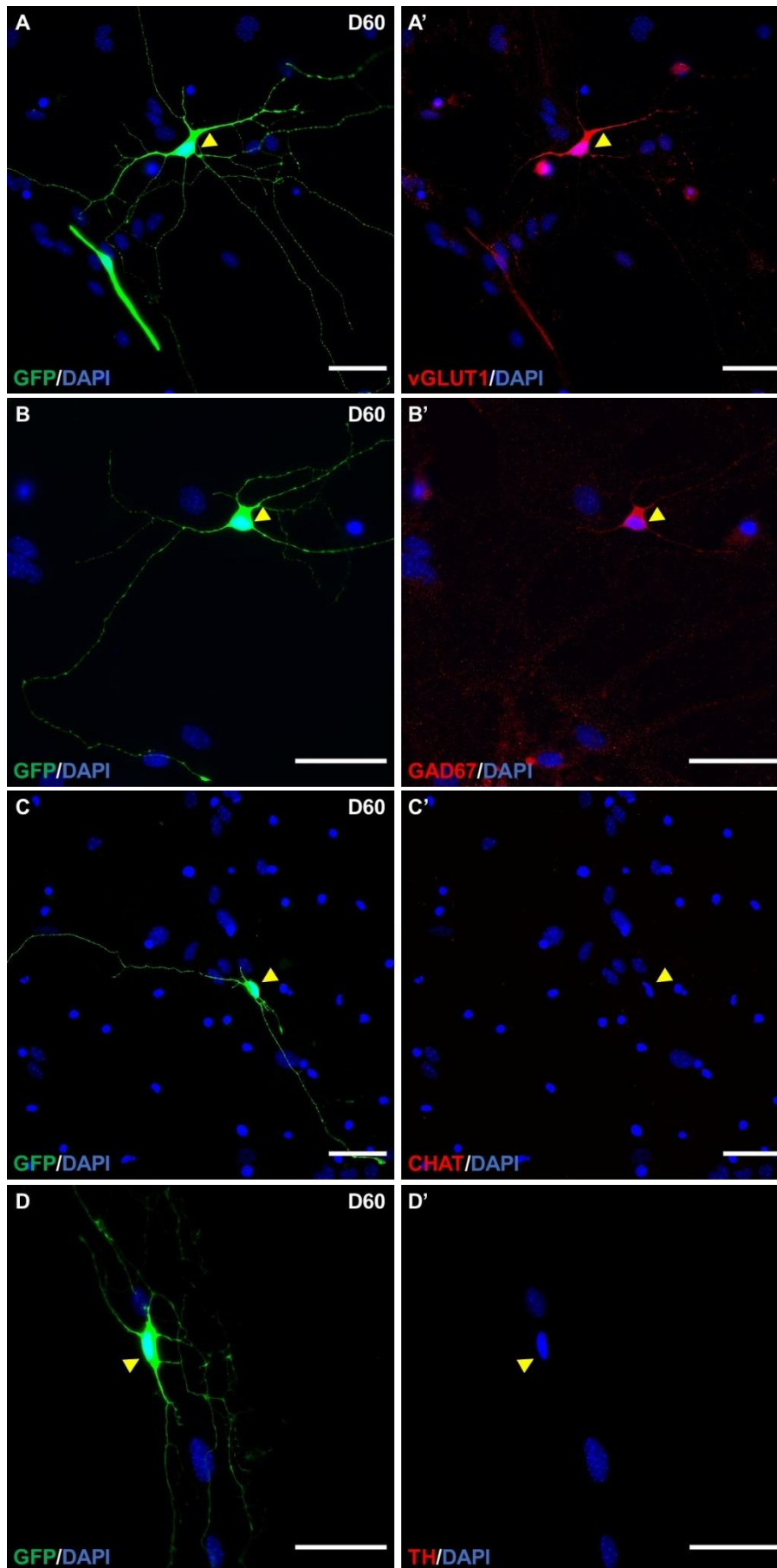


Figura 14. Estudio del subtipo neuronal obtenido en la reprogramación. Imágenes representativas de iNs GFP positivas (**A,B,C**) y de los marcadores neuronales vGLUT1 (**A'**), GAD67 (**B'**), CHAT (**C'**) y TH (**D'**) expresados 60 dpi bajo las condiciones de cultivo sobre una monocapa de astrocitos de ratón. Las flechas amarillas indican células positivas. La barra de escala equivale a 50 μ m.

Los resultados obtenidos en este apartado reflejan la capacidad que tienen los astrocitos de ratón postnatales para inducir la maduración neuronal. Así, estos astrocitos facilitan que las iNs se desarrollen y maduren lo suficiente como para ser electrofisiológicamente funcionales. Adicionalmente, estas condiciones favorecen la especificación celular hacia un subtipo neuronal glutamatérgico o gabaérgico.

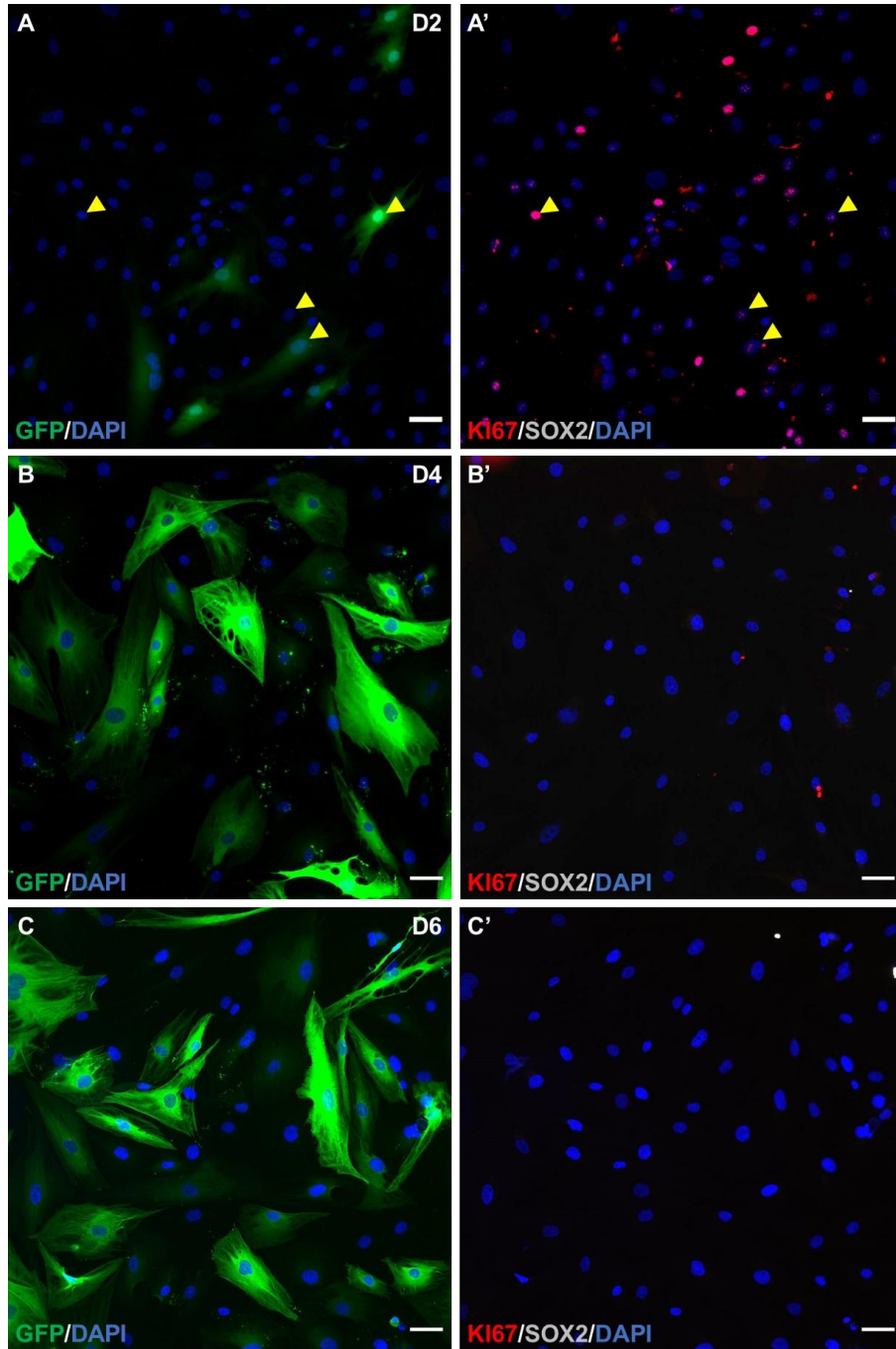
4. ESTUDIO DEL PROCESO DE REPROGRAMACIÓN

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la posibilidad de que la célula sujeta a reprogramación directa pudiera pasar por estadios intermedios transitorios tipo precursor, durante la conversión al destino celular (Morris, 2016). Así, algunos autores han descrito que las células pasan por un estadio desdiferenciado no proliferativo previo a la completa conversión (Treutlein *et al.*, 2016; Karow *et al.*, 2018).

Con el fin de estudiar si en el proceso de reprogramación de hGEO a neuronas estas pasan por un estadio desdiferenciado, analizamos la expresión de SOX2, un marcador característico de precursores neuronales, durante los primeros días de la inducción (2, 4 y 6 dpi). Asimismo, en paralelo, estudiamos los niveles de proliferación de estas células con el marcador de proliferación celular KI67.

Los resultados reflejan que un alto porcentaje de células infectadas con LV-GFP están en proceso de proliferación a los 2 dpi, alrededor del 85% (**Figura 15D**). También un alto número de células infectadas con el factor NEUROD1 están en división, alrededor del 70% (**Figura 15A'D**); sin embargo, el porcentaje es significativamente menor en este grupo en comparación con el grupo control (**Figura 15D**). Respecto a los días 4 y 6 dpi, no existen diferencias en el porcentaje de células KI67 positivas entre los grupos (**Figura 15D**), pero sí que hay una bajada muy significativa del porcentaje de células que expresan este marcador en ambos grupos respecto a 2 dpi (**Figura 15B',C',D**).

En referencia a la expresión del factor SOX2, no hay variaciones significativas del porcentaje de células que lo expresan, ni a lo largo de los días ni entre grupos (**Figura 15E**).



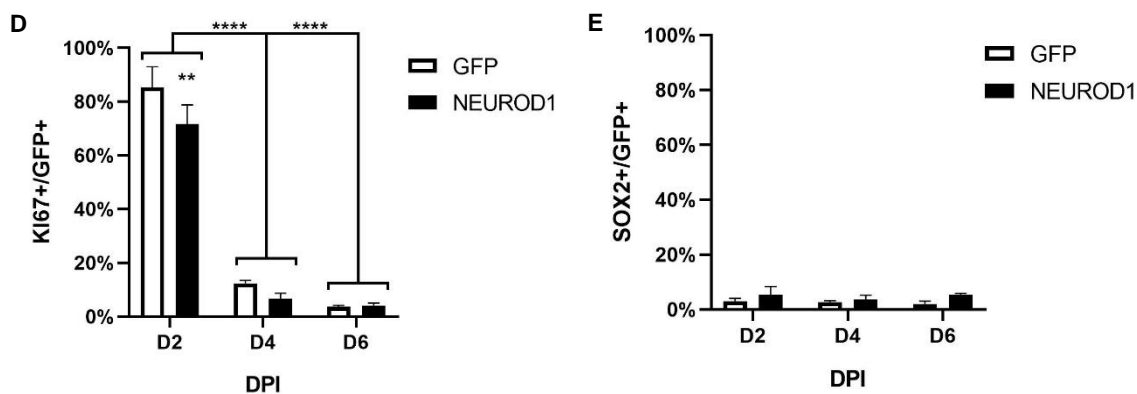


Figura 15. Análisis de expresión de marcadores indicadores de una desdiferenciación. Imágenes representativas de los marcadores SOX2 y KI67 a distintos tiempos del proceso de reprogramación del grupo NEUROD1: D2 (A,A'), D4 (B,B'), D6 (C,C'). Las flechas amarillas señalan células que expresan el marcador. Los histogramas representan las medias \pm SD de las cuantificaciones de triplicados de los marcadores KI67 (D) y SOX2 (E). Los test estadísticos aplicados fueron *Two-way ANOVA* y post-hoc Sidak test (** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.0001$) para comparaciones múltiples entre medias ($n=3$, por experimento se analizaron 10 campos). La barra de escala equivale a 50 μ m.

Estos estudios señalan que el proceso de reprogramación no pasa por un estadio proliferativo previo a la reprogramación celular. Asimismo, no encontramos un aumento de expresión del marcador de precursores neuronales SOX2, lo que indica que nuestras células no pasan por un estadio desdiferenciado proliferativo mediado por el factor SOX2, durante los primeros días de la inducción.

5. REPROGRAMACIÓN *IN VIVO*

Tras conseguir la reprogramación de hGEO a neuronas funcionales *in vitro*, quisimos saber si la reprogramación se podía producir *in vivo*. Para ello, infectamos las células con el factor NEUROD1 y al día siguiente las inyectamos en la corteza de ratones inmunosuprimidos NOD/SCID (detallado en **Materiales y Métodos**). Tras 2 meses, sacrificamos los ratones y analizamos las iNs trasplantadas mediante inmunofluorescencia y registros electrofisiológicos.

En estos resultados preliminares observamos que las células que sobreexpresan NEUROD1 sobreviven en la corteza de ratón (**Figura 16**). En las imágenes se pueden ver que células GFP positivas expresan los marcadores neuronales Tuj1 (**Figura 16A**)

y NeuN (**Figura 16B**). Las células con marcaje positivo para Tuj1 y NeuN, que no son GFP, corresponden con las neuronas del tejido receptor (flechas blancas).

Cuando realizamos los registros electrofisiológicos, observamos células verdes en la zona de la inyección. No obstante, estas células tenían una membrana muy lábil y no se podía formar el sello con la punta de la pipeta, por lo que no se pudieron registrar.

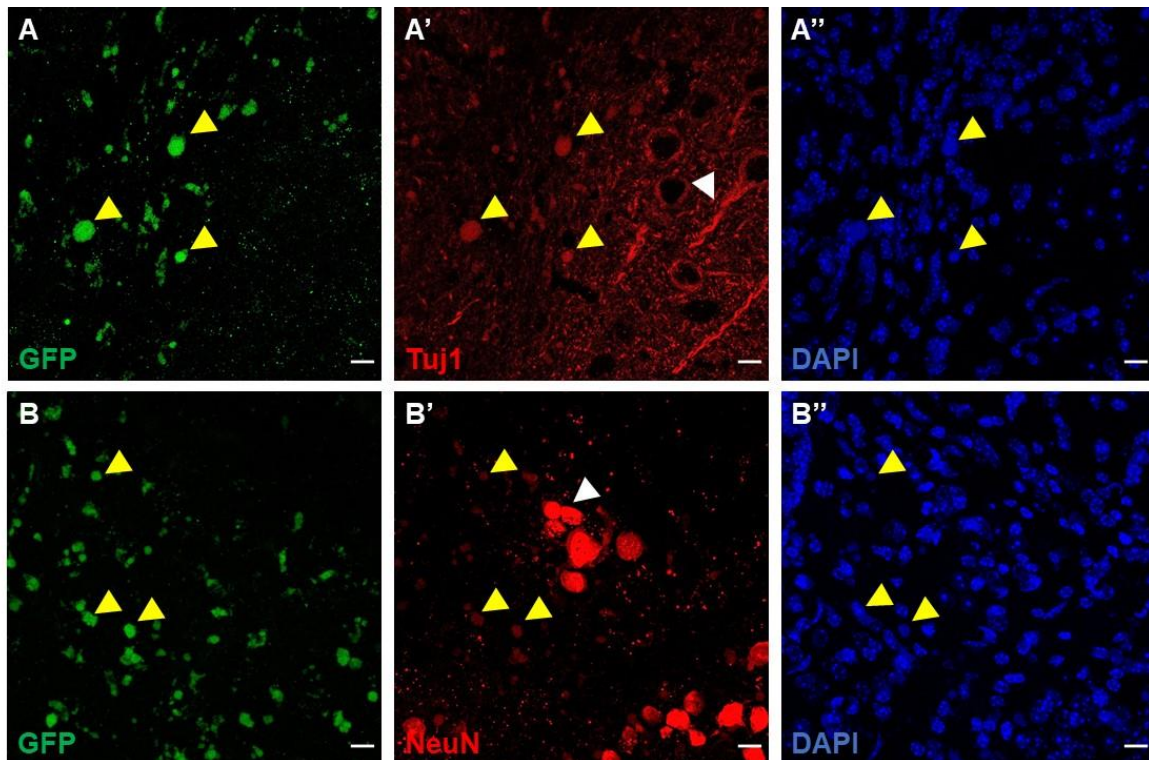


Figura 16. Reprogramación de hGEO *in vivo*. Imágenes representativas de los marcadores neuronales Tuj1 (**A**) y NeuN (**B**) tras 60 dpi. Las flechas amarillas señalan células GFP positivas para Tuj1 y NeuN; las flechas blancas señalan neuronas del tejido receptor con marcaje positivo para Tuj1 y NeuN. La barra de escala equivale a 10 μ m.

Estos resultados demuestran que las células C20-NEUROD1 pueden sobrevivir hasta 60 dpi y que además expresan marcadores neuronales. No obstante, en el control negativo, donde inyectamos células C20-GFP, no vemos células GFP positivas (datos no mostrados). Por ello, en la actualidad se están repitiendo estos experimentos.

6. EFECTO DE FÁRMACOS COMO INDUCTORES DE LA REPROGRAMACIÓN

La reprogramación celular es un proceso muy ineficiente. Por esta razón, muchos autores han acudido al uso de fármacos sintéticos (SM, del inglés *small molecule*) para potenciar y facilitar la reprogramación (revisados en (Qin, Zhao and Fu, 2017)). Asimismo, con el fin de evitar la inserción de genes exógenos, se han utilizado exclusivamente combinaciones de estas SM para inducir la reprogramación (revisados en (Ma, Kong and Zhu, 2017)).

Nosotros, con el fin de optimizar el proceso de reprogramación de las hGEO, añadimos distintas combinaciones de estos fármacos a las células transducidas con NEUROD1 (resumidos en la **Tabla 1**). También, intentamos reprogramar las células C20 solo con SM, sin la sobreexpresión de ningún factor de transcripción (ver **Tabla 2**). Además, intentamos aplicar los cócteles de SM utilizados por otros grupos (ver **Tabla 3**). De todas las combinaciones que probamos, ninguna consiguió mejorar nuestras condiciones de reprogramación únicamente con el factor de transcripción NEUROD1.

Asimismo, bajo las condiciones de maduración con el cocultivo con astrocitos, quisimos intentar optimizar el desarrollo de las iNs añadiendo la SM Y27 (Y27632; 5 μ M), un inhibidor de la vía de ROCK que ha demostrado favorecer la elongación axonal (Bito *et al.*, 2000). Sin embargo, observamos que este fármaco, solo o en combinación con la FSK, empeoraba el fenotipo respecto a nuestra condición estándar, solo FSK (**Figura 17**).

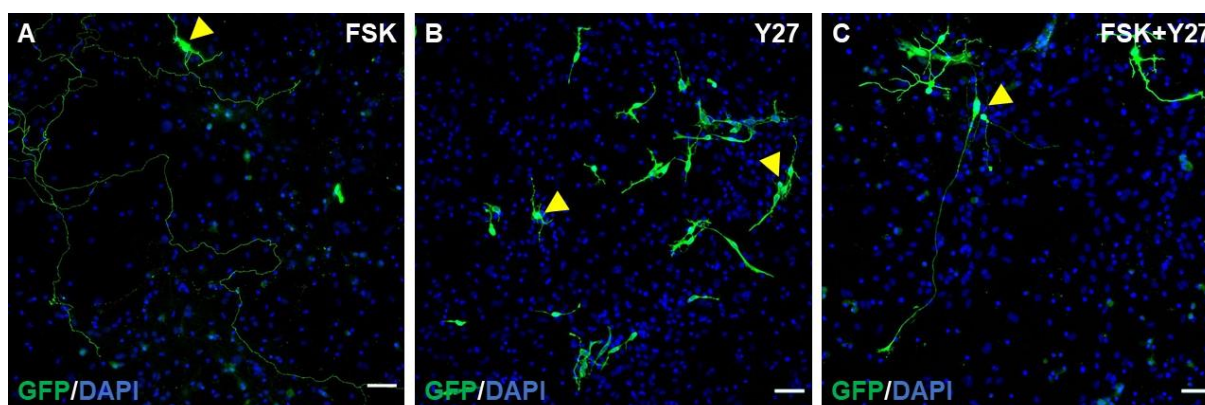


Figura 17. Reprogramación de la hGEO C20 con *small molecules*. Imágenes representativas de iNs sobre una capa de astrocitos de ratón 60 dpi con distintos fármacos: FSK (**A**), Y27 (**B**) y FSK+Y27 (**C**). Las flechas amarillas señalan las iNs. La adición de Y27 no mejora la eficiencia de reprogramación frente a la inducción sobreexpresando NEUROD1. La barra de escala equivale a 50 μ m.

Con estos resultados concluimos que, de todas las combinaciones de SM probadas, la FSK es la que mejor induce la reprogramación de nuestras células a través de la sobreexpresión de NEUROD1.

Tabla 1. Reprogramación de hGEO a neuronas mediante NEUROD1 + SM

SM (μ M)											MD sin SM (DPI)	DPI	Resultado
FSK	CHIR	SAG	P	ISX9	SB	DAPT	LDN	IBET	VPA	Y27			
20											14 / No	21	Muerte celular
10	1,5										14 / No	21	No reprogramación
10	3										14 / No	21	No reprogramación
10		0,1	0,1								14 / No	21	No reprogramación
10				10							14 / No	21	No reprogramación
10					5						14 / No	21	No reprogramación
10						5					14 / No	21	No reprogramación
10							0,25				14 / No	21	No reprogramación
10								2			14 / No	21	No reprogramación
10									500		14 / No	21	No reprogramación
10										1	No	21	No reprogramación
					5		0,25				14 / No	21	No reprogramación

Tabla 2. Reprogramación de hGEO a neuronas con solo SM

SM (μM)											MD sin SM (DPI)	DPI	Resultado
FSK	CHIR	SAG	P	ISX9	SB	DAPT	LDN	IBET	VPA	Y27			
10											No	21	No reprogramación
10	3										No	21	No reprogramación
10		0,1	0,1								No	21	No reprogramación
10				10							No	21	No reprogramación
10					5						No	21	No reprogramación
10						5					No	21	No reprogramación
10							0,25				No	21	No reprogramación
10								2			No	21	No reprogramación
10	3			10	5						No	21	No reprogramación
10	3			10		5					No	21	No reprogramación
10					5	5	0,25				No	21	No reprogramación
					5		0,25				No	21	No reprogramación

Tabla 3. Reprogramación de hGEO a neuronas con combinaciones de SM de la bibliografía

Referencia (* el protocolo fue modificado)	NEUROD1	SM (d = dpi con SM)											DPI	Resultado	
		FSK	CHIR	SAG, P	ISX9	SB	DAPT	LDN	IBET	VPA	Y27	AA			
(Gao <i>et al.</i> , 2017)	Con / Sin	d1-30	d1-20		d1-20	d1-20				d1-30	d1-20		d1-30	30	No reprogramación
(Gao <i>et al.</i> , 2017) *	Con / Sin	d1-30	d1-8		d1-8	d1-8				d1-30	d1-8		d1-30	30	No reprogramación
(Zhang <i>et al.</i> , 2015)	Con / Sin		d3-7	d7-9		d1-3	d3-7	d1-3			d3-5	d1-9		30	No reprogramación
(Yin <i>et al.</i> , 2019)	Con / Sin		d2-6			d1-2	d2-6	d1-2				d6-30	d6-30	30	No reprogramación
(Yin <i>et al.</i> , 2019) *	Con / Sin		d1-6			d1-6	d1-6	d1-6				d6-30	d6-30	30	No reprogramación

DISCUSIÓN



El propósito del presente trabajo es la reprogramación de la glía envolvente olfativa humana (hGEO) adulta a neuronas. La primera cuestión que se planteó fue el interés de reprogramar la GEO y las ventajas que ello representaría respecto a la reprogramación de otras fuentes celulares ya descritas. Como ya se ha detallado en la introducción, la GEO es un tipo celular con propiedades neuroregenerativas intrínsecas. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han puesto de manifiesto la capacidad regenerativa de esta glía en distintas lesiones del sistema nervioso central (SNC), especialmente en lesiones medulares (revisado en (Gómez *et al.*, 2018)). Así, la principal ventaja respecto a otros tipos celulares ya reprogramados a neuronas, como por ejemplo astrocitos (Heinrich *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015), es que además de la restauración neuronal, estas células generan un microambiente propicio para la formación de nuevas conexiones neuronales. Asimismo, con vistas a su posible uso en clínica, y como sucede con otras fuentes celulares como los fibroblastos (Vierbuchen *et al.*, 2010; Colasante *et al.*, 2015), estas células se pueden obtener fácilmente del paciente. De esta forma, se pueden realizar terapias autólogas y así evitar los rechazos post-trasplante.

La siguiente cuestión a considerar fue el origen anatómico de la hGEO de la que partir para llevar a cabo la reprogramación. Como se ha descrito en la introducción, la GEO se puede obtener de dos fuentes, la procedente del bulbo olfativo y la de la mucosa olfativa. Si bien se ha comprobado que pueden variar tanto sus perfiles genéticos (Guérout *et al.*, 2010) como sus mecanismos de regeneración (Windus *et al.*, 2010; Paviot *et al.*, 2011; Mayeur *et al.*, 2013; Ibrahim *et al.*, 2014), hasta la fecha no se han demostrado grandes diferencias en su capacidad neuroregenerativa. Estudios previos de nuestro grupo muestran que diversas líneas de hGEO y procedentes de ambas fuentes, tienen capacidad de promover regeneración axonal *in vitro* (García-Escudero *et al.*, 2012). Además, estos cultivos primarios mantienen estas propiedades a lo largo de los pases en cultivo (García-Escudero *et al.*, 2010; García-Escudero *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta estos factores y de cara a la posible aplicación en clínica, finalmente nos decantamos por el uso de hGEO procedente de la mucosa olfativa. Una de las principales razones es que la obtención de biopsias de la mucosa olfativa es menos invasiva que la del bulbo olfativo.

Una vez resueltas estas cuestiones, se eligió para llevar a cabo el proceso de reprogramación la línea celular de hGEO de mucosa denominada C20. Primero, se caracterizó dicha línea analizando el patrón de expresión de marcadores GEO y su capacidad neuroregenerativa.

Al comparar la expresión de marcadores característicos de la GEO - S100 β , vimentina y la proteína GFAP - con un control positivo, la línea de hGEO inmortalizada TS14 (Lim *et al.*, 2010; García-Escudero *et al.*, 2011; Plaza *et al.*, 2016), observamos que estos marcadores gliales se expresan de manera similar en ambas líneas celulares. Prácticamente el 100% de las células expresan los marcadores S100 β y vimentina mientras que para la proteína GFAP tanto la línea C20 como la TS14 presentan un marcaje difuso. Como se ha detallado en la introducción, en la literatura se describen dos tipos principales de inmunodetecciones de GEO en cultivo, una con un marcaje GFAP intenso y fibroso, y otra con GFAP débil y difuso (Franceschini and Barnett, 1996). En nuestras manos, tanto las líneas de GEO humanas (Lim *et al.*, 2010; García-Escudero *et al.*, 2012) como de rata (Moreno-Flores *et al.*, 2003a; Moreno-Flores *et al.*, 2003b), siempre han presentado una inmunotinción difusa de GFAP.

Otro marcador de la GEO es el receptor de neurotrofina P75 de baja afinidad (en adelante P75). En este caso, ni la línea TS14 ni las células C20 lo expresan. Esto podría explicarse porque ambas líneas de hGEO fueron obtenidas de pacientes adultos (García-Escudero *et al.*, 2011; García-Escudero *et al.*, 2015). Se ha descrito que P75 se expresa durante el desarrollo del sistema olfativo pero que en el adulto es apenas detectable (Gong *et al.*, 1994; Franceschini and Barnett, 1996). Asimismo, Barnett y colaboradores describieron que la expresión de este receptor se pierde rápidamente tras su cultivo *in vitro* en presencia del suero fetal bovino (Barnett *et al.*, 2000).

Hay que tener en cuenta que la expresión de estos antígenos no es constante en la GEO, sino que depende de su localización y de la etapa de desarrollo en la que se encuentren (Franssen, de Bree and Verhaagen, 2007). Además, existen evidencias que demuestran que las condiciones de cultivo pueden alterar el perfil de expresión de marcadores a lo largo de los pases de los cultivos primarios de la GEO (García-Escudero *et al.*, 2012).

Con el fin de descartar la expresión de marcadores neuronales en las células hGEO-C20, previos a su inducción a neuronas, hicimos un estudio comparativo con un cultivo primario de neuronas embrionarias de corteza de ratón. El análisis nos indica que las células hGEO C20 no expresan ni el marcador neuronal NeuN, ni los marcadores más maduros, Sinapsina y SMI31. Sorprendentemente, alrededor del 30% de las células expresaban el marcador neuronal general Tuj1. Sin embargo, en las inmunofluorescencias se puede observar que el patrón de expresión de este marcador es bastante más difuso y débil que el de las neuronas. Estudios previos han mostrado que diversas líneas de GEO tienen una expresión citoplasmática difusa de Tuj1 (García-

Escudero *et al.*, 2012; García-Escudero *et al.*, 2015). Asimismo, estudios en distintos cultivos de astrocitos humanos han descrito que estos presentan una expresión constitutiva de Tuj1 que, además, no está asociada al pase celular (Dráberová *et al.*, 2008; Knight and Serrano, 2017).

Por último, quisimos descartar la presencia de precursores neuronales en nuestra línea celular. Esto nos permitiría confirmar que todas las neuronas inducidas (iNs, del inglés *induced neurons*) fueron generadas por el proceso de reprogramación y no por la diferenciación de precursores residuales presentes en la línea de hGEO. Por consiguiente, realizamos inmunotinciones frente a SOX2, un marcador de precursores neuronales. Como control positivo utilizamos cultivos celulares de las neuronas embrionarias de corteza de ratón, ya que estos contienen precursores neuronales remanentes. Tras la cuantificación, hallamos que en el cultivo primario neuronal había aproximadamente un 20% de precursores SOX2 positivos, mientras que en los cultivos de las células C20 no se detectaron dichos precursores.

Una de las características de mayor interés de la GEO es su inherente capacidad proregenerativa, por lo que el siguiente paso fue evaluar esta propiedad en la línea de hGEO C20. Para ello, llevamos a cabo ensayos de cocultivo de las células C20 con neuronas ganglionares de retina (NGR) de rata adulta axotomizadas. En ellos, se evaluaron dos parámetros para determinar la capacidad regenerativa: el porcentaje de NGRs que extienden axones (SMI31 positivos) y la longitud media axonal/neurona de estos axones. Para precisar el nivel de regeneración, utilizamos las líneas de hGEO inmortalizadas TS14 y TS12 (Plaza *et al.*, 2016) como controles de alta y baja regeneración, respectivamente. También, verificamos que la NGR axotomizada no extendía axones de manera inherente. Así, en paralelo crecimos RGN sobre Poly-L-Lisina, un sustrato necesario para que las neuronas puedan adherirse en cultivo. Los resultados obtenidos confirman que las células C20 tienen una capacidad regenerativa significativamente igual al control positivo, TS14. Alrededor del 15% de las neuronas extienden un axón y, además, estos tienen una longitud media/neurona de aproximadamente 40 μm . Asimismo, los valores de estos parámetros estudiados de los controles de baja y nula regeneración, son acordes a lo esperado (Plaza *et al.*, 2016).

Una vez finalizada la caracterización de la línea de hGEO C20, se procedió a llevar a cabo su reprogramación a neuronas. Existen dos métodos para generar neuronas mediante la sobreexpresión de factores de transcripción: la reprogramación directa, reprogramando la célula deseada directamente a neurona, o indirecta, generando una célula madre pluripotente inducida, iPSC (del inglés *induced Pluripotent Stem Cell*

(Takahashi and Yamanaka, 2006)), y posteriormente diferenciándola a neuronas. En la introducción se ha presentado una comparativa de las ventajas y limitaciones que tienen cada técnica. Así, teniendo en cuenta estos datos nos decantamos por la reprogramación directa. La principal razón fue que el uso de iPSCs puede generar tumores (Abad *et al.*, 2013). También consideramos que la reprogramación a través de iPSC supone desdiferenciar una célula adulta para, luego, revertir ese estado; esto no es así en la reprogramación directa.

El método de sobreexpresión de los factores de transcripción es determinante en la reprogramación celular directa. Un método comúnmente utilizado es la infección de la célula a reprogramar con vectores virales que porten en su genoma modificado la secuencia del factor de interés, siendo γ -retrovirus (retrovirus), lentivirus o virus adeno asociados los vectores más frecuentes (Hu, 2014). Los retrovirus tienen una elevada eficiencia de transducción, aunque esa infectividad se limita a células en división, y se integran en el genoma del hospedador lo que permite una continua expresión del transgén (Miller, Adam and Miller, 1990). Los lentivirus son un tipo de retrovirus que pueden transducir tanto células en división como quiescentes y también se integran en el genoma del hospedador manteniendo en el tiempo la expresión del transgén (Naldini *et al.*, 1996). La diferencia en cuanto a capacidad infectiva se debe a que los retrovirus solo pueden entrar en el núcleo de la célula hospedadora durante la rotura de la envuelta nuclear en la mitosis, mientras que las partículas lentivirales tienen un tamaño que les permite entrar en el núcleo a través del complejo del poro nuclear (Bukrinsky *et al.*, 1993). Esto supone que los vectores lentivirales sean una alternativa más adecuada para la transducción de células diferenciadas, lo que es nuestro caso. Los virus adeno-asociados no son integrativos y pueden transducir tanto células en división como en G0, pero su uso está limitado por su capacidad de empaquetamiento (4Kb) (Muzyczka, 1992).

Basándonos en la bibliografía, analizamos tres factores de transcripción que están involucrados en el destino neuronal durante el desarrollo: NEUROG2, NEUROD1 y ASCL1 (Guillemot, 2005; Guillemot, 2007). Nuestro criterio para definir el éxito de la generación de iNs tras la infección, fue el nivel de expresión del marcador neuronal Tuj1. Así, tras 30 días post-infección (dpi), observamos que solo el factor NEUROD1 puede inducir la reprogramación. También la combinación de NEUROD1 y NEUROG2 aumentaba los niveles de expresión de Tuj1; no obstante, al observar el fenotipo de estos factores utilizados de forma individual, este marcaje lo asociamos a la expresión de NEUROD1. Además, se consideró que las morfologías obtenidas con la infección exclusiva con NEUROD1 eran más de tipo neuronal. Respecto al factor ASCL1,

observamos mucha muerte celular cuando era utilizado solo o en combinación con otros factores (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos con NEUROD1 no concuerdan con lo publicado previamente por Sun y colaboradores (Sun *et al.*, 2019). Estos autores reprogramaron GEO de ratón a neuronas mediante la expresión del factor NEUROG2. Primero probaron varios factores de transcripción, entre ellos NEUROD1, pero solo NEUROG2 inducía la expresión del marcador neuronal Tuj1. Esta discordancia podría deberse a que el mecanismo inductor de la reprogramación celular es diferente entre especies. Lin y colaboradores hacen un estudio comparativo transcripcional entre tejidos de ratón y humanos donde ponen de manifiesto las diferencias de expresión entre ambos (Lin *et al.*, 2014). Además, hay que tener en cuenta que, en el proceso de reprogramación, no solo actúa el factor de transcripción sobreexpresado, sino que también están involucradas las redes transcripcionales endógenas y el estado de la cromatina de la célula de partida (Lin *et al.*, 2014; Ninkovic and Götz, 2018). Por ejemplo, entre diferentes tipos celulares sí se ha observado que, aun utilizando el mismo factor de transcripción, existe una diferencia de fenotipo según la célula de la que se partía. Por ejemplo, el factor ASCL1 genera neuronas glutamatérgicas cuando se parte de fibroblastos (Chanda *et al.*, 2014); sin embargo, en astrocitos genera iNs gabaérgicas (Heinrich *et al.*, 2010). También, los factores de transcripción tienen un mecanismo de acción distinto según el tipo celular. Así, se ha identificado en la reprogramación de fibroblastos a neuronas, que *Zfp238* es un gen diana clave para la inducción neuronal con ASCL1 con un importante papel en la especificación neuronal (Wapinski *et al.*, 2013); sin embargo, en astrocitos ASCL1 no induce la reprogramación a través de *Zfp238*, sino a través de otras dianas como *NeuroD4* (Rao *et al.*, 2021b).

De acuerdo con nuestros resultados, el laboratorio de Gong Chen ha publicado diversos trabajos donde demuestra la efectividad de NEUROD1 para inducir la reprogramación de astrocitos a neuronas (Guo *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020). NEUROD1 es un factor de transcripción de la familia de los bHLH que tiene un importante papel en la diferenciación neuronal durante el desarrollo (Hevner *et al.*, 2006) y en la supervivencia y maduración neuronal en la neurogénesis adulta (Gao *et al.*, 2009). Asimismo, varias publicaciones ponen de manifiesto funciones de NEUROD1 en el sistema olfativo. Boutin y colaboradores describieron que NEUROD1 es necesario y suficiente para inducir la transición a neuronas de progenitores presentes en el bulbo olfativo (Boutin *et al.*, 2010). Asimismo, Packard y colaboradores demostraron que todas las neuronas sensitivas olfativas provenían de una población de las células basales globosas NEUROD1 positivas (Packard *et al.*, 2011).

Al analizar el patrón de expresión de los marcadores neuronales durante el proceso de reprogramación, este mostraba una dinámica similar a la observada durante el desarrollo neuronal. Pudimos ver cómo las células reprogramadas expresan el marcador neuronal Tuj1 desde el día 7 post-infección, acompañado de un cambio morfológico con extensiones progresivamente mayores a lo largo del tiempo, mientras que NeuN empieza a expresarse a partir del día 21. Este dato es consistente con que Tuj1 se expresa en neuronas inmaduras y se mantiene su expresión en la neurona madura mientras que NeuN solo se expresa en neuronas maduras (Sarnat, Nochlin and Born, 1998). En cuanto al marcador axonal SMI31, las iNs comienzan a expresarlo a los 14 dpi, pero no es hasta el día 30 cuando este marcaje se expresa en gradiente positivo del soma hacia las extremidades, un patrón de expresión característico de axones maduros (Fischer and Romano-Clarke, 1991; Bush *et al.*, 1996). La Sinapsina se empieza a expresar a partir de 21 dpi, con un marcaje axonal característico a 30 dpi.

Es importante resaltar que, a lo largo del proceso de reprogramación, se produce mucha muerte celular. En las imágenes representativas se puede observar que a lo largo del tiempo disminuye el número de células GFP positivas, especialmente entre la segunda y tercera semana. Como se ha explicado en la introducción, la reprogramación celular es un proceso que implica un cambio metabólico. Esto induce estrés oxidativo en las células y, consecuentemente, causa la muerte por ferroptosis de muchas de estas células (Gascón *et al.*, 2016). Asimismo, Babos y colaboradores exponen otro proceso que dificulta la reprogramación directa, el estrés genómico producido por la sobreexpresión de los factores de transcripción (Babos *et al.*, 2019). Estos autores describen que existen colisiones en el ADN entre los altos niveles de transcripción y de replicación, lo que desemboca en una baja eficiencia de reprogramación y una alta muerte celular. Concluyen que la reprogramación es un proceso determinista que se lleva a cabo solo en las pocas células que tienen altos índices de transcripción y mantienen la capacidad proliferativa.

También, en reprogramación indirecta, se ha descrito que la baja eficacia de la generación de células pluripotentes podría ser el resultado de procesos estocásticos, procesos dinámicos en los que hay cierta aleatoriedad, a lo largo de la inducción de la pluripotencia (Yamanaka, 2009; Hanna *et al.*, 2009). La inducción se produce en la mayor parte de las células, sin embargo, pocas llegan a reprogramarse completamente. Un estudio más amplio y profundo de los factores involucrados en la reprogramación directa, incluidos los mecanismos epigenéticos y metabólicos, permitirá entender mejor el proceso para incrementar considerablemente las eficiencias de conversión y disminuir la muerte celular.

En las inmunofluorescencias a 30 dpi observamos que las iNs que tienen largas prolongaciones y que expresan marcadores de neuronas maduras, tienen un nivel de expresión de GFP menor que las iNs a tiempos más cortos de reprogramación. Esta disminución podría estar asociada a una disminución de la expresión de NEUROD1 ya que la expresión de ambos genes está regulada por el mismo promotor. Si así fuera, la disminución de la expresión de NEUROD1 podría ser un mecanismo necesario para la maduración de las iNs, de tal manera que solo las células que lo consiguen son las que sobreviven y pueden llegar a madurar. Basamos nuestra hipótesis en trabajos como el de Pataskar y colaboradores en el que describen que, en la neurogénesis, NEUROD1 es inducido solo durante un breve periodo de tiempo; sin embargo, esta expresión transitoria es suficiente para desencadenar cambios epigenéticos necesarios para la activación de genes neuronales (Pataskar *et al.*, 2016). También, se ha descrito que la sobreexpresión de NEUROD1 en precursores neuronales de la zona subventricular induce la diferenciación neuronal; sin embargo, estas neuronas desaparecen a lo largo del tiempo (Boutin *et al.*, 2010). Estos autores sugieren que la falta de supervivencia es debido a la falta de expresión transitoria de NEUROD1, ya que este se expresaba de manera constitutiva. Para comprobar nuestra propuesta, en próximos experimentos estudiaremos los niveles de expresión de NEUROD1 a lo largo del proceso de reprogramación mediante técnicas de qPCR. También, nos planteamos utilizar lentivectores inducibles para activar la sobreexpresión de NEUROD1 solo al principio de la inducción neuronal. Adicionalmente, Vroemen y colaboradores describieron que precursores neuronales transducidos con un gen reportero GFP, disminuían la expresión de GFP a medida que se diferenciaban a neuronas o glía (Vroemen, Weidner and Blesch, 2005).

Finalmente, estudiamos la funcionalidad de las iNs a 60 dpi mediante ensayos de electrofisiología. En los registros de las corrientes de sodio, observamos una pequeña entrada de este ion de, aproximadamente, 20 picoamperios (pA). Asimismo, verificamos que las corrientes provenían de canales de sodio dependientes de voltaje añadiendo tetrodoxina a la solución extracelular, un bloqueante específico de este tipo de canales. Así, cuando aplicamos la tetrodoxina, desaparece la curva de entrada de sodio. Sin embargo, cuando aplicamos corrientes despolarizantes, no detectamos ningún potencial de acción. Para que una neurona pueda generar potenciales de acción, la densidad de los canales de sodio dependientes de voltaje debe ser alta y, además, deben ubicarse principalmente en el segmento inicial del axón (Kole *et al.*, 2008). Las iNs expresan canales de sodio voltaje dependientes que generan una pequeña corriente de sodio, sin embargo, es probable que no haya la suficiente densidad de canales para producir la

corriente necesaria para la generación de un potencial de acción. Asimismo, cabe resaltar que, tras 60 dpi, había mucha muerte celular y las iNs se encontraban muy aisladas, sin una monocapa de GEO remanente. Como ya hemos resaltado en párrafos anteriores de esta discusión, la reprogramación directa es un proceso con mucha mortandad y, además, requiere de largos tiempos en cultivo para la obtención de iNs maduras.

Por eso, con el fin de conseguir una mayor maduración de las neuronas reprogramadas a largos tiempos *in vitro* (>30 dpi), cultivamos las iNs sobre una monocapa de astrocitos. En el sistema nervioso central, los astrocitos son los encargados de proporcionar soporte a las neuronas y promover tanto la maduración como la supervivencia neuronal (Pyka *et al.*, 2011). Asimismo, diversos autores han descrito que el cocultivo de iNs con astrocitos es crucial para la completa diferenciación y maduración de las neuronas reprogramadas (Tang *et al.*, 2013; Odawara *et al.*, 2014; Klapper *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos demuestran que son los astrocitos de ratón los que aportan el microambiente necesario para que las iNs puedan sobrevivir largos tiempos en cultivo, desarrollarse y madurar. Lischka y colaboradores hicieron un estudio funcional comparativo de iNs crecidas sobre una monocapa de astrocitos humanos isogénicos y de ratón (Lischka *et al.*, 2018). En ellos demostraron que eran los astrocitos de ratón los que inducían una maduración funcional.

Bajo estas condiciones, las iNs generadas tras 60 dpi sobre la monocapa de astrocitos de ratón presentan un fenotipo más desarrollado donde se distinguen unas prolongaciones morfológicamente similares a dendritas y unas proyecciones más largas de tipo axonal. Asimismo, estas iNs expresan marcadores neuronales maduros como la Ankirina G, una proteína necesaria para mantener la polaridad neuronal y la organización del segmento inicial (Hedstrom, Ogawa and Rasband, 2008); y GAP43 en los conos de crecimiento, un marcador asociado al crecimiento axonal (Skene *et al.*, 1986). Así, cuando realizamos registros electrofisiológicos, observamos que no solo se generaba corriente de entrada de sodio de 200 pA, sino que además las iNs disparaban un potencial de acción de manera repetitiva. Cuando los registros los realizamos a 90 dpi, vimos que la entrada de sodio era de 1000 pA y que las iNs disparaban un tren de potenciales de acción, lo que indicaba un mayor grado de maduración respecto a 60 dpi. Cuando Sun y colaboradores registraron las iNs generadas a partir de GEO de ratón 34 dpi, registraron un tren de potenciales de acción con una entrada de sodio de 150 pA (Sun *et al.*, 2019). Esta diferencia de ventana temporal puede deberse a que las células humanas adultas necesiten mayor tiempo para llegar a un mismo grado de madurez.

Asimismo, estas condiciones permitieron la especificación neuronal hacia un subtipo neuronal determinado: las iNs expresaban los marcadores vGLUT1 o GAD67, marcadores de neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas. Anteriormente, y a pesar de la expresión de marcadores como SMI31 y Sinapsina, no teníamos resultados concluyentes del subtipo neuronal de las iNs (datos no mostrados). Esta falta de especificación lo asociamos a la falta de maduración de las iNs. El laboratorio de Gong Chen describió que la reprogramación de astrocitos a neuronas a través de NEUROD1 generaba neuronas glutamatérgicas; no obstante, la reprogramación de glía NG2 con este mismo factor daba lugar a neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas (Guo *et al.*, 2014). Asimismo, cuando Matsuda y colaboradores reprogramaron microglía a neuronas, también obtuvieron una población heterogénea de ambos tipos neuronales, aunque con una mayor proporción de neuronas glutamatérgicas (Matsuda *et al.*, 2019). Respecto a lo publicado anteriormente, Sun y colaboradores también obtienen una población mixta de neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas cuando inducen la reprogramación de GEO de ratón utilizando el factor NEUROG2 (Sun *et al.*, 2019).

Adicionalmente, cabe mencionar que la reprogramación celular se podría dirigir hacia un subtipo neuronal determinado añadiendo factores de transcripción involucrados en la especificación celular en el desarrollo neuronal. Wu y colaboradores indujeron la reprogramación de astrocitos del estriado a neuronas gabaérgicas mediante la combinación de los factores NEUROD1 y DLX2 (Wu *et al.*, 2020). También, Pfisterer y colaboradores añadieron los factores LMX1a y FOXA2 a la combinación de factores BAM utilizado por el laboratorio de Marius Wernig (Pang *et al.*, 2011) con el fin de obtener neuronas dopaminérgicas a partir de fibroblastos (Pfisterer *et al.*, 2011).

Todos nuestros resultados en conjunto demuestran que hemos conseguido generar iNs funcionales a partir de hGEO adulta mediante técnicas de reprogramación directa *in vitro*, pero ¿es esta inducción completamente directa o la célula pasa por un estadio intermedio desdiferenciado antes de dirigir su destino hacia neurona? Para dilucidar esta cuestión, estudiamos los niveles de expresión de SOX2, un marcador de precursor neuronal, y de KI67, un marcador de proliferación celular, a distintos tiempos durante la primera semana de la reprogramación. Nuestros datos muestran que en ninguno de los días analizados hay un aumento de expresión de SOX2 ni en las células infectadas con el lentivector NEUROD1, ni tampoco respecto al grupo control (LV-GFP). Asimismo, se detecta una disminución significativa en el número de células proliferativas 2 dpi respecto al grupo control, lo que indica que las células que sobreexpresan el factor NEUROD1 se dividen menos. A días más tardíos, tanto el grupo que sobreexpresa el

factor neurogénico como el grupo control, disminuyen muy significativamente la proliferación. En el primer caso, lo asociamos a la inducción de la reprogramación celular a neuronas, células no proliferativas, mediado por el factor NEUROD1; sin embargo, en el grupo control, esta disminución de división celular podría estar asociada a las condiciones de cultivo celular, en un medio neuronal con ausencia de suero, junto con una inhibición por contacto generada por el alto número de células por pocillo.

Estos datos en conjunto indican que el proceso de reprogramación de hGEO no pasa por un estadio transitorio proliferativo ni desdiferenciado, al menos modulado por el factor SOX2. Sun y colaboradores tampoco detectaron un aumento de expresión de marcadores de precursores neuronales (PAX6 Y KLF4) y, además, también observaron que las células que sobreexpresaban el factor neurogénico disminuían la capacidad de dividirse; no obstante, las células control (LV-GFP) mantenían la capacidad proliferativa, al menos hasta 8 dpi. (Sun *et al.*, 2019). Esta diferencia en el grupo control podría explicarse por la diferencia de confluencia celular al inicio de la inducción.

A pesar de que la mayoría de los autores afirman que la reprogramación directa no pasa por un estadio intermediario, en los últimos años distintos autores han sugerido que este proceso de reprogramación directa pueda consistir en una primera fase de desdiferenciación seguida de la inducción al estado diferenciado. Karow y colaboradores, que utilizaron la combinación de ASCL1 con SOX2 para reprogramar pericitos humanos a neuronas (Karow *et al.*, 2012), no solo describieron que durante el proceso de conversión los pericitos pasan por un estadio desdiferenciado, sino que el paso transitorio por este estadio es crucial para la reprogramación (Karow *et al.*, 2018). Asimismo, Treutlein y colaboradores identificaron la expresión transitoria de varios genes de precursores neuronales en estadios intermedios de la reprogramación de fibroblastos a neuronas (Treutlein *et al.*, 2016), aunque entre estos genes no se encontraron los genes canónicos de precursores neuronales SOX2 ni PAX6. Esta transición podría ser distinta en función del tipo celular del que se parta, pero necesaria para activar cascadas de genes reguladores del destino neuronal.

Además de la reprogramación de hGEO *in vitro*, realizamos ensayos de reprogramación *in vivo*. Para ello, inyectamos hGEO transducida en la corteza de ratones inmunosuprimidos. Tras 2 meses, observamos que las células transducidas con NEUROD1, GFP positivas, sobreviven y expresan marcadores neuronales. Cuando realizamos los registros electrofisiológicos, no pudimos registrar ninguna célula GFP positiva debido a la labilidad de la membrana celular. Es por ello que se requiere un

mayor conocimiento del proceso de reprogramación y de los tiempos de su inducción para su aplicación más efectiva en nuestros modelos *in vivo*.

Son muchos los autores que han acudido al uso de fármacos (SM, del inglés *small molecule*) para mejorar la eficiencia de reprogramación (Liu *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2016). Esto es debido a su capacidad para activar o inhibir vías de señalización implicadas en la diferenciación neuronal durante el desarrollo (Qin, Zhao and Fu, 2017). En nuestro caso, en primer lugar, añadimos varias SM, por separado o en combinación, a las hGEO C20 que sobreexpresaban NEUROD1 y no observamos ninguna mejora en la reprogramación respecto a nuestras condiciones de partida. Asimismo, intentamos reprogramar la hGEO C20 con el uso exclusivo de SM: probamos varias combinaciones, entre ellas las utilizadas por otros autores (Zhang *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2019), pero ninguna consiguió reprogramar la hGEO a neuronas. Esto indica que los mecanismos de reprogramación varían entre tipos celulares, lo que se ve reflejado en las combinaciones de SM utilizadas por diferentes autores para reprogramar distintos tipos celulares como fibroblastos (Li *et al.*, 2015) o astrocitos (Zhang *et al.*, 2015). Es más, partiendo de un mismo tipo celular, se puede llevar a cabo la reprogramación celular a neuronas modulando distintas vías de señalización a través de combinaciones de SM diferentes (Li *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015).

Los datos presentados en esta tesis doctoral demuestran que la hGEO adulta puede ser reprogramada *in vitro* a neuronas funcionales mediante la sobreexpresión del factor de transcripción NEUROD1. Además, estas neuronas inducidas expresan marcadores de tipo glutamatérgico o gabaérgico. Asimismo, se hace un estudio de este proceso de reprogramación donde se verifica que las iNs no pasan por un estadio desdiferenciado proliferativo, al menos mediado por SOX2. También se observa que es necesario el cocultivo de las iNs con astrocitos de ratón postnatales para conseguir la maduración, funcionalidad y especificación de estas neuronas. Futuros experimentos revelarán con mayor detalle este proceso de reprogramación a lo largo del tiempo, lo que permitirá abordar los estudios *in vivo* con mayor conocimiento del proceso.

CONCLUSIONES



A la vista de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. La línea de glía envolvente olfativa humana (hGEO) C20 presenta características propias de la GEO, en cuanto al patrón de expresión de marcadores del tipo celular y de sus propiedades neuroregenerativas.
2. La línea de glía envolvente olfativa humana (hGEO) C20 no presenta características propias neuronales ni células precursoras neuronales.
3. La expresión del factor de transcripción neurogénico NEUROD1 induce la reprogramación de C20 a neuronas. Las neuronas inducidas (iNs) expresan los marcadores neuronales generales β 3-tubulina (Tuj1) y el antígeno nuclear neuronal NeuN/Fox3. Las neuronas inducidas expresan el marcador axonal SMI31, del neurofilamento H y MAP1B, así como el marcador sináptico Sinapsina-1, siendo ambos marcadores de neuronas maduras.
4. La expresión de los factores de transcripción neurogénicos NEUROG2 y ASCL1 no induce la reprogramación de C20 a neuronas, ni solos ni en combinación.
5. Las iNs a 60 días post-infección (dpi) no son funcionalmente maduras: expresan canales de sodio dependientes de voltaje en su membrana, pero no con la densidad suficiente o en la localización adecuada como para disparar potenciales de acción.
6. El cocultivo de las iNs sobre astrocitos postnatales de ratón genera un microambiente permisivo para la supervivencia y maduración de estas. Así, las neuronas inducidas, además de los marcadores neuronales anteriormente citados, expresan el marcador Ankirina G, un marcador específico del segmento inicial, y GAP43, un marcador de crecimiento axonal.
7. Las iNs a 90 dpi sobre astrocitos postnatales de ratón son electrofisiológicamente funcionales siendo capaces de disparar un tren de potenciales de acción.
8. Las iNs sobre astrocitos postnatales de ratón son capaces de especificarse a neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas.
9. La reprogramación de hGEO a neuronas no pasa por un estadio transitorio proliferativo ni desdiferenciado, al menos mediado por SOX2.

10. Los fármacos moduladores de vías de señalización no mejoran la reprogramación inducida por NEUROD1.
11. Las células hGEO trasplantadas en la corteza somatosensorial de ratón, 24h después de la infección con NEUROD1, sobreviven al cabo de dos meses, pero no presentan una diferenciación a neurona madura.

BIBLIOGRAFÍA

Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., Graña, O., Megías, D., Domínguez, O., Martínez, D., Manzanares, M., Ortega, S. and Serrano, M. (2013) 'Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features', *Nature*, 502(7471), pp. 340-5.

Abernathy, D. G., Kim, W. K., McCoy, M. J., Lake, A. M., Ouwenga, R., Lee, S. W., Xing, X., Li, D., Lee, H. J., Heuckeroth, R. O., Dougherty, J. D., Wang, T. and Yoo, A. S. (2017) 'MicroRNAs Induce a Permissive Chromatin Environment that Enables Neuronal Subtype-Specific Reprogramming of Adult Human Fibroblasts', *Cell Stem Cell*, 21(3), pp. 332-348.e9.

Adams, K. L. and Gallo, V. (2018) 'The diversity and disparity of the glial scar', *Nat Neurosci*, 21(1), pp. 9-15.

Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T. and Ericson, J. (2006) 'Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons', *Cell*, 124(2), pp. 393-405.

Au, E. and Roskams, A. J. (2003) 'Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro', *Glia*, 41(3), pp. 224-36.

Aydin, B. and Mazzoni, E. O. (2019) 'Cell Reprogramming: The Many Roads to Success', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 35, pp. 433-452.

Babos, K. N., Galloway, K. E., Kisler, K., Zitting, M., Li, Y., Shi, Y., Quintino, B., Chow, R. H., Zlokovic, B. V. and Ichida, J. K. (2019) 'Mitigating Antagonism between Transcription and Proliferation Allows Near-Deterministic Cellular Reprogramming', *Cell Stem Cell*, 25(4), pp. 486-500.e9.

Baker, N. E. and Brown, N. L. (2018) 'All in the family: proneural bHLH genes and neuronal diversity', *Development*, 145(9).

Barnett, S. C., Alexander, C. L., Iwashita, Y., Gilson, J. M., Crowther, J., Clark, L., Dunn, L. T., Papanastassiou, V., Kennedy, P. G. and Franklin, R. J. (2000) 'Identification of a human olfactory ensheathing cell that can effect transplant-mediated remyelination of demyelinated CNS axons', *Brain : a journal of neurology*, 123 (Pt 8, pp. 1581-1588.

Barnett, S. C. and Chang, L. (2004) 'Olfactory ensheathing cells and CNS repair: Going solo or in need of a friend?', *Trends in Neurosciences*, 27(1), pp. 54-60.

Barraud, P., Seferiadis, A. a., Tyson, L. D., Zwart, M. F., Szabo-Rogers, H. L., Ruhrberg, C., Liu, K. J. and Baker, C. V. H. (2010) 'Neural crest origin of olfactory ensheathing glia', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), pp. 21040-21045.

Bartholomä, A. and Nave, K. A. (1994) 'NEX-1: a novel brain-specific helix-loop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons', *Mech Dev*, 48(3), pp. 217-28.

Berdasco, M. and Esteller, M. (2011) 'DNA methylation in stem cell renewal and multipotency', *Stem Cell Res Ther*, 2(5), pp. 42.

Berninger, B., Costa, M. R., Koch, U., Schroeder, T., Sutor, B., Grothe, B. and Götz, M. (2007) 'Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia', *J Neurosci*, 27(32), pp. 8654-64.

Bito, H., Furuyashiki, T., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., Maekawa, M., Ishizaki, T. and Narumiya, S. (2000) 'A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons', *Neuron*, 26(2), pp. 431-41.

Boutin, C., Hardt, O., de Chevigny, A., Coré, N., Goebbels, S., Seidenfaden, R., Bosio, A. and Cremer, H. (2010) 'NeuroD1 induces terminal neuronal differentiation in olfactory neurogenesis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(3), pp. 1201-6.

Boyd, J. G., Lee, J., Skihar, V., Doucette, R. and Kawaja, M. D. (2004) 'LacZ-expressing olfactory ensheathing cells do not associate with myelinated axons after implantation into the compressed spinal cord', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7), pp. 2162-6.

Briggs, R. and King, T. J. (1952) 'Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 38(5), pp. 455-63.

Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. and Stevenson, M. (1993) 'A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells', *Nature*, 365(6447), pp. 666-9.

Bush, M. S., Goold, R. G., Moya, F. and Gordon-Weeks, P. R. (1996) 'An analysis of an axonal gradient of phosphorylated MAP 1B in cultured rat sensory neurons', *Eur J Neurosci*, 8(2), pp. 235-48.

Bédard, A. and Parent, A. (2004) 'Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb', *Brain Res Dev Brain Res*, 151(1-2), pp. 159-68.

Cahan, P. and Daley, G. Q. (2013) 'Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(6), pp. 357-68.

Caiazzo, M., Dell'Anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T. D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., Russo, G., Carninci, P., Pezzoli, G., Gainetdinov, R. R., Gustincich, S., Dityatev, A. and Broccoli, V. (2011) 'Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts', *Nature*, 476(7359), pp. 224-7.

Cao, L., Su, Z., Zhou, Q., Lv, B., Liu, X., Jiao, L., Li, Z., Zhu, Y., Huang, Z., Huang, A. and He, C. (2006) 'Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes olfactory ensheathing cells migration', *Glia*, 54(6), pp. 536-44.

Carter, L. A., MacDonald, J. L. and Roskams, A. J. (2004) 'Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype', *J Neurosci*, 24(25), pp. 5670-83.

Cates, K., McCoy, M. J., Kwon, J. S., Liu, Y., Abernathy, D. G., Zhang, B., Liu, S., Gontarz, P., Kim, W. K., Chen, S., Kong, W., Ho, J. N., Burbach, K. F., Gabel, H. W., Morris, S. A. and Yoo, A. S. (2021) 'Deconstructing Stepwise Fate Conversion of Human Fibroblasts to Neurons by MicroRNAs', *Cell Stem Cell*, 28(1), pp. 127-140.e9.

Centeno, E. G. Z., Cimarosti, H. and Bithell, A. (2018) '2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling', *Mol Neurodegener*, 13(1), pp. 27.

Chanda, S., Ang, C. E., Davila, J., Pak, C., Mall, M., Lee, Q. Y., Ahlenius, H., Jung, S. W., Südhof, T. C. and Wernig, M. (2014) 'Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor ASCL1', *Stem Cell Reports*, 3(2), pp. 282-96.

Chen, L., Huang, H., Xi, H., Zhang, F., Liu, Y., Chen, D. and Xiao, J. (2014) 'A prospective randomized double-blind clinical trial using a combination of olfactory ensheathing cells and Schwann cells for the treatment of chronic complete spinal cord injuries', *Cell Transplant*, 23 Suppl 1, pp. S35-44.

Chen, Y. C., Ma, N. X., Pei, Z. F., Wu, Z., Do-Monte, F. H., Keefe, S., Yellin, E., Chen, M. S., Yin, J. C., Lee, G., Minier-Toribio, A., Hu, Y., Bai, Y. T., Lee, K., Quirk, G. J. and

Chen, G. (2020) 'A NeuroD1 AAV-Based Gene Therapy for Functional Brain Repair after Ischemic Injury through In Vivo Astrocyte-to-Neuron Conversion', *Mol Ther*, 28(1), pp. 217-234.

Cheng, X., Tan, Z., Huang, X., Yuan, Y., Qin, S., Gu, Y., Wang, D., He, C. and Su, Z. (2019) 'Inhibition of Glioma Development by ASCL1-Mediated Direct Neuronal Reprogramming', *Cells*, 8(6).

Chierzi, S., Ratto, G. M., Verma, P. and Fawcett, J. W. (2005) 'The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK', *Eur J Neurosci*, 21(8), pp. 2051-62.

Colasante, G., Lignani, G., Rubio, A., Medrihan, L., Yekhlief, L., Sessa, A., Massimino, L., Giannelli, S. G., Sacchetti, S., Caiazzo, M., Leo, D., Alexopoulou, D., Dell'Anno, M. T., Ciabatti, E., Orlando, M., Studer, M., Dahl, A., Gainetdinov, R. R., Taverna, S., Benfenati, F. and Broccoli, V. (2015) 'Rapid Conversion of Fibroblasts into Functional Forebrain GABAergic Interneurons by Direct Genetic Reprogramming', *Cell Stem Cell*, 17(6), pp. 719-734.

Conaco, C., Otto, S., Han, J. J. and Mandel, G. (2006) 'Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7), pp. 2422-7.

Curcio, M. and Bradke, F. (2018) 'Axon Regeneration in the Central Nervous System: Facing the Challenges from the Inside', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 34, pp. 495-521.

Czernik, M., Anzalone, D. A., Palazzese, L., Oikawa, M. and Loi, P. (2019) 'Somatic cell nuclear transfer: failures, successes and the challenges ahead', *Int J Dev Biol*, 63(3-4-5), pp. 123-130.

Dell'Anno, M. T., Caiazzo, M., Leo, D., Dvoretzkova, E., Medrihan, L., Colasante, G., Giannelli, S., Theka, I., Russo, G., Mus, L., Pezzoli, G., Gainetdinov, R. R., Benfenati, F., Taverna, S., Dityatev, A. and Broccoli, V. (2014) 'Remote control of induced dopaminergic neurons in parkinsonian rats', *J Clin Invest*, 124(7), pp. 3215-29.

Dennis, D. J., Han, S. and Schuurmans, C. (2018) 'bHLH transcription factors in neural development, disease, and reprogramming', *Brain Res*.

Dombrowski, M. A., Sasaki, M., Lankford, K. L., Kocsis, J. D. and Radtke, C. (2006) 'Myelination and nodal formation of regenerated peripheral nerve fibers following

transplantation of acutely prepared olfactory ensheathing cells', *Brain Res*, 1125(1), pp. 1-8.

Doty, R. L. (2015) *Handbook of olfaction and gustation*. Third edition. edn. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.

Doucette, R. (1990) 'Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system', *Glia*, 3(6), pp. 433-49.

Doucette, R. (1991) 'PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve', *J Comp Neurol*, 312(3), pp. 451-66.

Drouin-Ouellet, J., Piracs, K., Barker, R. A., Jakobsson, J. and Parmar, M. (2017) 'Direct Neuronal Reprogramming for Disease Modeling Studies Using Patient-Derived Neurons: What Have We Learned?', *Front Neurosci*, 11, pp. 530.

Dráberová, E., Del Valle, L., Gordon, J., Marková, V., Smejkalová, B., Bertrand, L., de Chadarevian, J. P., Agamanolis, D. P., Legido, A., Khalili, K., Dráber, P. and Katsetos, C. D. (2008) 'Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity', *J Neuropathol Exp Neurol*, 67(4), pp. 341-54.

Ekberg, J. A., Amaya, D., Mackay-Sim, A. and St John, J. A. (2012) 'The migration of olfactory ensheathing cells during development and regeneration', *Neurosignals*, 20(3), pp. 147-58.

Esch, E. W., Bahinski, A. and Huh, D. (2015) 'Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery', *Nat Rev Drug Discov*, 14(4), pp. 248-60.

Fairless, R. and Barnett, S. C. (2005) 'Olfactory ensheathing cells: their role in central nervous system repair', *Int J Biochem Cell Biol*, 37(4), pp. 693-9.

Fawcett, J. W., Schwab, M. E., Montani, L., Brazda, N. and Müller, H. W. (2012) 'Defeating inhibition of regeneration by scar and myelin components', *Handb Clin Neurol*, 109, pp. 503-22.

Federation, A. J., Bradner, J. E. and Meissner, A. (2014) 'The use of small molecules in somatic-cell reprogramming', *Trends Cell Biol*, 24(3), pp. 179-87.

Figueres-Oñate, M. a., Gutiérrez, Y. and López-Mascaraque, L. (2014) 'Unraveling Cajal's view of the olfactory system', *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(July), pp. 55-55.

Fischer, I. and Romano-Clarke, G. (1991) 'Association of microtubule-associated protein (MAP1B) with growing axons in cultured hippocampal neurons', *Mol Cell Neurosci*, 2(1), pp. 39-51.

Forni, P. E., Taylor-Burds, C., Melvin, V. S., Williams, T. and Wray, S. (2011) 'Neural crest and ectodermal cells intermix in the nasal placode to give rise to GnRH-1 neurons, sensory neurons, and olfactory ensheathing cells', *J Neurosci*, 31(18), pp. 6915-27.

Franceschini, I. a. and Barnett, S. C. (1996) 'Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage', *Dev Biol*, 173(1), pp. 327-43.

Franklin, R. J. and Barnett, S. C. (2000) 'Olfactory ensheathing cells and CNS regeneration: the sweet smell of success?', *Neuron*, 28(1), pp. 15-8.

Franssen, E. H. P., de Bree, F. M. and Verhaagen, J. (2007) 'Olfactory ensheathing glia: Their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord', *Brain Research Reviews*, 56(1), pp. 236-258.

Féron, F., Perry, C., Cochrane, J., Licina, P., Nowitzke, A., Urquhart, S., Geraghty, T. and Mackay-Sim, A. (2005) 'Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury', *Brain*, 128(12), pp. 2951-2960.

Gage, F. H. (2000) 'Mammalian neural stem cells', *Science*, 287(5457), pp. 1433-8.

Gao, L., Guan, W., Wang, M., Wang, H., Yu, J., Liu, Q., Qiu, B., Yu, Y., Ping, Y., Bian, X., Shen, L. and Pei, G. (2017) 'Direct Generation of Human Neuronal Cells from Adult Astrocytes by Small Molecules', *Stem Cell Reports*, 8(3), pp. 538-547.

Gao, L., Huang, S., Zhang, H., Hua, W., Xin, S., Cheng, L., Guan, W., Yu, Y., Mao, Y. and Pei, G. (2019) 'Suppression of glioblastoma by a drug cocktail reprogramming tumor cells into neuronal like cells', *Sci Rep*, 9(1), pp. 3462.

Gao, Z., Ure, K., Ables, J. L., Lagace, D. C., Nave, K. A., Goebbels, S., Eisch, A. J. and Hsieh, J. (2009) 'Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons', *Nat Neurosci*, 12(9), pp. 1090-2.

García-Escudero, V., García-Gómez, A., Langa, E., Martín-Bermejo, M. a. J. s., Ramírez-Camacho, R., García-Berrocal, J. R. n., Moreno-Flores, M. T., vila, J. s. and

Lim, F. (2012) 'Patient-derived olfactory mucosa cells but not lung or skin fibroblasts mediate axonal regeneration of retinal ganglion neurons', *Neuroscience Letters*, 509(1), pp. 27-32.

García-Escudero, V., García-Gómez, A., Gargini, R., Martín-Bermejo, M. J., Langa, E., de Yébenes, J. G., Delicado, A., Avila, J., Moreno-Flores, M. T. and Lim, F. (2010) 'Prevention of senescence progression in reversibly immortalized human ensheathing glia permits their survival after deimmortalization', *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(2), pp. 394-403.

García-Escudero, V., Gargini, R., Gallego-Hernández, M. T., García-Gómez, A., Martín-Bermejo, M. J., Simón, D., Delicado, A., Moreno-Flores, M. T., Ávila, J. and Lim, F. (2011) 'A neuroregenerative human ensheathing glia cell line with conditional rapid growth', *Cell Transplantation*, 20(2), pp. 153-166.

García-Escudero, V., Rosales, M., Muñoz, J. L., Scola, E., Medina, J., Khalique, H., Garaulet, G., Rodriguez, A. and Lim, F. (2015) 'Patient-derived olfactory mucosa for study of the non-neuronal contribution to amyotrophic lateral sclerosis pathology', *J Cell Mol Med*, 19(6), pp. 1284-95.

Gascón, S., Murenu, E., Masserdotti, G., Ortega, F., Russo, G. L., Petrik, D., Deshpande, A., Heinrich, C., Karow, M., Robertson, S. P., Schroeder, T., Beckers, J., Imler, M., Berndt, C., Angeli, J. P., Conrad, M., Berninger, B. and Götz, M. (2016) 'Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming', *Cell Stem Cell*, 18(3), pp. 396-409.

Ge, L. J., Yang, F. H., Li, W., Wang, T., Lin, Y., Feng, J., Chen, N. H., Jiang, M., Wang, J. H., Hu, X. T. and Chen, G. (2020) 'Neuroregeneration to Treat Ischemic Stroke Through NeuroD1 AAV-Based Gene Therapy in Adult Non-human Primates', *Front Cell Dev Biol*, 8, pp. 590008.

Gong, Q., Bailey, M. S., Pixley, S. K., Ennis, M., Liu, W. and Shipley, M. T. (1994) 'Localization and regulation of low affinity nerve growth factor receptor expression in the rat olfactory system during development and regeneration', *J Comp Neurol*, 344(3), pp. 336-48.

Graf, T. (2011) 'Historical origins of transdifferentiation and reprogramming', *Cell Stem Cell*, 9(6), pp. 504-16.

Guan, J., Wang, G., Wang, J., Zhang, Z., Fu, Y., Cheng, L., Meng, G., Lyu, Y., Zhu, J., Li, Y., Wang, Y., Liuyang, S., Liu, B., Yang, Z., He, H., Zhong, X., Chen, Q., Zhang, X., Sun, S., Lai, W., Shi, Y., Liu, L., Wang, L., Li, C., Lu, S. and Deng, H. (2022) 'Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells', *Nature*.

Guest, J., Herrera, L. P. and Qian, T. (2006) 'Rapid recovery of segmental neurological function in a tetraplegic patient following transplantation of fetal olfactory bulb-derived cells', *Spinal Cord*, 44(3), pp. 135-42.

Gueye, Y., Ferhat, L., Sbai, O., Bianco, J., Ould-Yahoui, A., Bernard, A., Charrat, E., Chauvin, J. P., Risso, J. J., Féron, F., Rivera, S. and Khrestchatisky, M. (2011) 'Trafficking and secretion of matrix metalloproteinase-2 in olfactory ensheathing glial cells: A role in cell migration?', *Glia*, 59(5), pp. 750-70.

Guillemot, F. (2005) 'Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon', *Curr Opin Cell Biol*, 17(6), pp. 639-47.

Guillemot, F. (2007) 'Cell fate specification in the mammalian telencephalon', *Prog Neurobiol*, 83(1), pp. 37-52.

Guo, Z., Zhang, L., Wu, Z., Chen, Y., Wang, F. and Chen, G. (2014) 'In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model', *Cell Stem Cell*, 14(2), pp. 188-202.

Guérout, N., Derambure, C., Drouot, L., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Boyer, O. and Marie, J. P. (2010) 'Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa', *Glia*, 58(13), pp. 1570-1580.

Gómez, R. M., Sánchez, M. Y., Portela-Lomba, M., Ghotme, K., Barreto, G. E., Sierra, J. and Moreno-Flores, M. T. (2018) 'Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs)', *Glia*, 66(7), pp. 1267-1301.

Halley-Stott, R. P., Pasque, V. and Gurdon, J. B. (2013) 'Nuclear reprogramming', *Development*, 140(12), pp. 2468-71.

Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C. J., Creighton, M. P., van Oudenaarden, A. and Jaenisch, R. (2009) 'Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration', *Nature*, 462(7273), pp. 595-601.

Hayashi, Y., Ohnuma, K. and Furue, M. K. (2019) 'Pluripotent Stem Cell Heterogeneity', *Adv Exp Med Biol*, 1123, pp. 71-94.

He, Z. and Jin, Y. (2016) 'Intrinsic Control of Axon Regeneration', *Neuron*, 90(3), pp. 437-51.

Hedstrom, K. L., Ogawa, Y. and Rasband, M. N. (2008) 'AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity', *J Cell Biol*, 183(4), pp. 635-40.

Heinrich, C., Blum, R., Gascón, S., Masserdotti, G., Tripathi, P., Sánchez, R., Tiedt, S., Schroeder, T., Götz, M. and Berninger, B. (2010) 'Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons', *PLoS Biol*, 8(5), pp. e1000373.

Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K. L., Hack, M. A., Chapouton, P., Barde, Y. A. and Götz, M. (2002) 'Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6', *Nat Neurosci*, 5(4), pp. 308-15.

Herrero-Navarro, Á., Puche-Aroca, L., Moreno-Juan, V., Sempere-Ferrández, A., Espinosa, A., Susín, R., Torres-Masjoan, L., Leyva-Díaz, E., Karow, M., Figueres-Oñate, M., López-Mascaraque, L., López-Atalaya, J. P., Berninger, B. and López-Bendito, G. (2021) 'Astrocytes and neurons share region-specific transcriptional signatures that confer regional identity to neuronal reprogramming', *Sci Adv*, 7(15).

Hevner, R. F., Hodge, R. D., Daza, R. A. and Englund, C. (2006) 'Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus', *Neurosci Res*, 55(3), pp. 223-33.

Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge, J., Xu, J., Zhang, Q., Zhao, Y. and Deng, H. (2013) 'Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds', *Science*, 341(6146), pp. 651-4.

Hu, K. (2014) 'Vectorology and factor delivery in induced pluripotent stem cell reprogramming', *Stem Cells Dev*, 23(12), pp. 1301-15.

Hu, W., Qiu, B., Guan, W., Wang, Q., Wang, M., Li, W., Gao, L., Shen, L., Huang, Y., Xie, G., Zhao, H., Jin, Y., Tang, B., Yu, Y., Zhao, J. and Pei, G. (2015) 'Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules', *Cell Stem Cell*, 17(2), pp. 204-12.

Hu, X., Qin, S., Huang, X., Yuan, Y., Tan, Z., Gu, Y., Cheng, X., Wang, D., Lian, X. F., He, C. and Su, Z. (2019) 'Region-Restrict Astrocytes Exhibit Heterogeneous Susceptibility to Neuronal Reprogramming', *Stem Cell Reports*, 12(2), pp. 290-304.

Huang, C. Y., Liu, C. L., Ting, C. Y., Chiu, Y. T., Cheng, Y. C., Nicholson, M. W. and Hsieh, P. C. H. (2019) 'Human iPSC banking: barriers and opportunities', *J Biomed Sci*, 26(1), pp. 87.

Huang, H., Chen, L., Xi, H., Wang, Q., Zhang, J., Liu, Y. and Zhang, F. (2009) '[Olfactory ensheathing cells transplantation for central nervous system diseases in 1,255 patients]', *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiufu chongjian waike zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*, 23(1), pp. 14-20.

Huang, Z. H., Wang, Y., Cao, L., Su, Z. D., Zhu, Y. L., Chen, Y. Z., Yuan, X. B. and He, C. (2008) 'Migratory properties of cultured olfactory ensheathing cells by single-cell migration assay', *Cell Res*, 18(4), pp. 479-90.

Ibrahim, A., Li, D., Collins, A., Tabakow, P., Raisman, G. and Li, Y. (2014) 'Comparison of olfactory bulbar and mucosal cultures in a rat rhizotomy model', *Cell Transplantation*, 23(11), pp. 1465-1470.

Jaenisch, R. and Young, R. (2008) 'Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming', *Cell*, 132(4), pp. 567-82.

Ji, J., Ng, S. H., Sharma, V., Neculai, D., Hussein, S., Sam, M., Trinh, Q., Church, G. M., McPherson, J. D., Nagy, A. and Batada, N. N. (2012) 'Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells', *Stem Cells*, 30(3), pp. 435-40.

Judson, R. L., Babiarz, J. E., Venere, M. and Bliloch, R. (2009) 'Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency', *Nat Biotechnol*, 27(5), pp. 459-61.

Kanherkar, R. R., Bhatia-Dey, N., Makarev, E. and Csoka, A. B. (2014) 'Cellular reprogramming for understanding and treating human disease', *Front Cell Dev Biol*, 2, pp. 67.

Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., Inoue, H., Yamashita, J. K., Todani, M., Nakagawa, M., Osawa, M., Yashiro, Y., Yamanaka, S. and Osafune, K. (2019) 'Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development', *Physiol Rev*, 99(1), pp. 79-114.

Karetko, M. and Skangiel-Kramska, J. (2009) 'Diverse functions of perineuronal nets', *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 69(4), pp. 564-77.

Karow, M., Camp, J. G., Falk, S., Gerber, T., Pataskar, A., Gac-Santel, M., Kageyama, J., Brazovskaja, A., Garding, A., Fan, W., Riedemann, T., Casamassa, A., Smiyakin, A., Schichor, C., Götz, M., Tiwari, V. K., Treutlein, B. and Berninger, B. (2018) 'Direct pericyte-to-neuron reprogramming via unfolding of a neural stem cell-like program', *Nat Neurosci*, 21(7), pp. 932-940.

Karow, M., Sánchez, R., Schichor, C., Masserdotti, G., Ortega, F., Heinrich, C., Gascón, S., Khan, M. A., Lie, D. C., Dellavalle, A., Cossu, G., Goldbrunner, R., Götz, M. and Berninger, B. (2012) 'Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells', *Cell Stem Cell*, 11(4), pp. 471-6.

Khankan, R. R., Wanner, I. B. and Phelps, P. E. (2015) 'Olfactory ensheathing cell-neurite alignment enhances neurite outgrowth in scar-like cultures', *Experimental Neurology*, 269, pp. 93-101.

Kim, Y., Zheng, X., Ansari, Z., Bunnell, M. C., Herdy, J. R., Traxler, L., Lee, H., Paquola, A. C. M., Blithikioti, C., Ku, M., Schlachetzki, J. C. M., Winkler, J., Edenhofer, F., Glass, C. K., Paucar, A. A., Jaeger, B. N., Pham, S., Boyer, L., Campbell, B. C., Hunter, T., Mertens, J. and Gage, F. H. (2018) 'Mitochondrial Aging Defects Emerge in Directly Reprogrammed Human Neurons due to Their Metabolic Profile', *Cell Rep*, 23(9), pp. 2550-2558.

Kittappa, R., Chang, W. W., Awatramani, R. B. and McKay, R. D. (2007) 'The *foxa2* gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age', *PLoS Biol*, 5(12), pp. e325.

Klapper, S. D., Garg, P., Dagar, S., Lenk, K., Gottmann, K. and Nieweg, K. (2019) 'Astrocyte lineage cells are essential for functional neuronal differentiation and synapse maturation in human iPSC-derived neural networks', *Glia*, 67(10), pp. 1893-1909.

Knight, V. B. and Serrano, E. E. (2017) 'Post-Translational Tubulin Modifications in Human Astrocyte Cultures', *Neurochem Res*, 42(9), pp. 2566-2576.

Kolatsi-Joannou, M., Li, X. Z., Suda, T., Yuan, H. T. and Woolf, A. S. (2001) 'In early development of the rat mRNA for the major myelin protein P0 is expressed in nonsensory areas of the embryonic inner ear, notochord, enteric nervous system, and olfactory ensheathing cells', *Developmental Dynamics*, 222(1), pp. 40-51.

Kole, M. H., IIschner, S. U., Kampa, B. M., Williams, S. R., Ruben, P. C. and Stuart, G. J. (2008) 'Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment', *Nat Neurosci*, 11(2), pp. 178-86.

Ladewig, J., Mertens, J., Kesavan, J., Doerr, J., Poppe, D., Glaue, F., Herms, S., Wernet, P., Kögler, G., Müller, F. J., Koch, P. and Brüstle, O. (2012) 'Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts', *Nat Methods*, 9(6), pp. 575-8.

Lan, Y. X., Yang, P., Zeng, Z., Yadav, N., Zhang, L. J., Wang, L. B. and Xia, H. C. (2022) 'Gene and protein expression profiles of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb', *Neural Regen Res*, 17(2), pp. 440-449.

Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P. and Knoblich, J. A. (2013) 'Cerebral organoids model human brain development and microcephaly', *Nature*, 501(7467), pp. 373-9.

Lankford, K. L., Arroyo, E. J. and Kocsis, J. D. (2017) 'Chronic TNF α Exposure Induces Robust Proliferation of Olfactory Ensheathing Cells, but not Schwann Cells', *Neurochem Res*, 42(9), pp. 2595-2609.

Lankford, K. L., Sasaki, M., Radtke, C. and Kocsis, J. D. (2008) 'Olfactory ensheathing cells exhibit unique migratory, phagocytic, and myelinating properties in the x-irradiated spinal cord not shared by schwann cells', *Glia*, 56(15), pp. 1664-1678.

Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Aït-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J. M., De Vos, J., Lehmann, S. and Lemaitre, J. M. (2011) 'Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state', *Genes Dev*, 25(21), pp. 2248-53.

Leaman, S., Marichal, N. and Berninger, B. (2022) 'Reprogramming cellular identity in vivo', *Development*, 149(4).

Lee, S. W., Oh, Y. M., Lu, Y. L., Kim, W. K. and Yoo, A. S. (2018) 'MicroRNAs Overcome Cell Fate Barrier by Reducing EZH2-Controlled REST Stability during Neuronal Conversion of Human Adult Fibroblasts', *Dev Cell*, 46(1), pp. 73-84.e7.

Leung, C. T., Coulombe, P. A. and Reed, R. R. (2007) 'Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration', *Nat Neurosci*, 10(6), pp. 720-6.

- Li, R., Wu, F., Ruonala, R., Sapkota, D., Hu, Z. and Mu, X. (2014) 'Isl1 and Pou4f2 form a complex to regulate target genes in developing retinal ganglion cells', *PLoS One*, 9(3), pp. e92105.
- Li, X., Zuo, X., Jing, J., Ma, Y., Wang, J., Liu, D., Zhu, J., Du, X., Xiong, L., Du, Y., Xu, J., Xiao, X., Chai, Z., Zhao, Y. and Deng, H. (2015) 'Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons', *Cell Stem Cell*, 17(2), pp. 195-203.
- Lim, F., Martín-Bermejo, M. J., García-Escudero, V., Gallego-Hernández, M. T., García-Gómez, A., Rábano, A., Díaz-Nido, J., Ávila, J. and Moreno-Flores, M. T. (2010) 'Reversibly immortalized human olfactory ensheathing glia from an elderly donor maintain neuroregenerative capacity', *Glia*, 58(5), pp. 546-558.
- Lima, C., Escada, P., Pratas-Vital, J., Branco, C., Arcangeli, C. A., Lazzeri, G., Maia, C. A., Capucho, C., Hasse-Ferreira, A. and Peduzzi, J. D. (2010) 'Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury', *Neurorehabil Neural Repair*, 24(1), pp. 10-22.
- Lima, C., Pratas-Vital, J., Escada, P., Hasse-Ferreira, A., Capucho, C. and Peduzzi, J. D. (2006) 'Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study', *The journal of spinal cord medicine*, 29(3), pp. 191-203; discussion 204-6.
- Lin, S., Lin, Y., Nery, J. R., Urich, M. A., Breschi, A., Davis, C. A., Dobin, A., Zaleski, C., Beer, M. A., Chapman, W. C., Gingeras, T. R., Ecker, J. R. and Snyder, M. P. (2014) 'Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(48), pp. 17224-9.
- Liodis, P., Denaxa, M., Grigoriou, M., Akufo-Addo, C., Yanagawa, Y. and Pachnis, V. (2007) 'Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes', *J Neurosci*, 27(12), pp. 3078-89.
- Lischka, F. W., Efthymiou, A., Zhou, Q., Nieves, M. D., McCormack, N. M., Wilkerson, M. D., Sukumar, G., Dalgard, C. L. and Doughty, M. L. (2018) 'Neonatal mouse cortical but not isogenic human astrocyte feeder layers enhance the functional maturation of induced pluripotent stem cell-derived neurons in culture', *Glia*, 66(4), pp. 725-748.
- Liu, M. L., Zang, T., Zou, Y., Chang, J. C., Gibson, J. R., Huber, K. M. and Zhang, C. L. (2013) 'Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons', *Nat Commun*, 4, pp. 2183.

Liu, Y., Miao, Q., Yuan, J., Han, S., Zhang, P., Li, S., Rao, Z., Zhao, W., Ye, Q., Geng, J., Zhang, X. and Cheng, L. (2015) 'Ascl1 Converts Dorsal Midbrain Astrocytes into Functional Neurons In Vivo', *J Neurosci*, 35(25), pp. 9336-55.

López-Doménech, G., Serrat, R., Mirra, S., D'Aniello, S., Somorjai, I., Abad, A., Vituriera, N., García-Arumí, E., Alonso, M. T., Rodríguez-Prados, M., Burgaya, F., Andreu, A. L., García-Sancho, J., Trullas, R., Garcia-Fernández, J. and Soriano, E. (2012) 'The Eutherian *Armcx* genes regulate mitochondrial trafficking in neurons and interact with Miro and Trak2', *Nat Commun*, 3, pp. 814.

López-Vales, R., García-Álías, G., Forés, J., Navarro, X. and Verdú, E. (2004a) 'Increased expression of cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor in lesioned spinal cord by transplanted olfactory ensheathing cells', *J Neurotrauma*, 21(8), pp. 1031-43.

López-Vales, R., García-Álías, G., Forés, J., Vela, J. M., Navarro, X. and Verdú, E. (2004b) 'Transplanted olfactory ensheathing cells modulate the inflammatory response in the injured spinal cord', *Neuron glia biology*, 1(3), pp. 201-209.

Ma, N. X., Yin, J. C. and Chen, G. (2019) 'Transcriptome Analysis of Small Molecule-Mediated Astrocyte-to-Neuron Reprogramming', *Front Cell Dev Biol*, 7, pp. 82.

Ma, X., Kong, L. and Zhu, S. (2017) 'Reprogramming cell fates by small molecules', *Protein Cell*, 8(5), pp. 328-348.

Ma, Y., Xie, H., Du, X., Wang, L., Jin, X., Zhang, Q., Han, Y., Sun, S., Li, X., Zhang, C., Wang, M., Li, C., Xu, J., Huang, Z., Wang, X., Chai, Z. and Deng, H. (2021) 'In vivo chemical reprogramming of astrocytes into neurons', *Cell Discov*, 7(1), pp. 12.

Mackay-Sim, A. (2010) 'Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa', *Arch Ital Biol*, 148(2), pp. 47-58.

Mackay-Sim, A., Féron, F., Cochrane, J., Bassingthwaite, L., Bayliss, C., Davies, W., Fronek, P., Gray, C., Kerr, G., Licina, P., Nowitzke, A., Perry, C., Silburn, P. A. S., Urquhart, S. and Geraghty, T. (2008) 'Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: A 3-year clinical trial', *Brain*, 131(9), pp. 2376-2386.

Mall, M., Karetka, M. S., Chanda, S., Ahlenius, H., Perotti, N., Zhou, B., Grieder, S. D., Ge, X., Drake, S., Euong Ang, C., Walker, B. M., Vierbuchen, T., Fuentes, D. R., Brennecke, P., Nitta, K. R., Jolma, A., Steinmetz, L. M., Taipale, J., Südhof, T. C. and

Wernig, M. (2017) 'Myt1l safeguards neuronal identity by actively repressing many non-neuronal fates', *Nature*, 544(7649), pp. 245-249.

Mall, M. and Wernig, M. (2017) 'The novel tool of cell reprogramming for applications in molecular medicine', *J Mol Med (Berl)*, 95(7), pp. 695-703.

Masserdotti, G., Gascón, S. and Götz, M. (2016) 'Direct neuronal reprogramming: learning from and for development', *Development*, 143(14), pp. 2494-510.

Masserdotti, G., Gillotin, S., Sutor, B., Drechsel, D., Irmeler, M., Jørgensen, H. F., Sass, S., Theis, F. J., Beckers, J., Berninger, B., Guillemot, F. and Götz, M. (2015) 'Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes', *Cell Stem Cell*, 17(1), pp. 74-88.

Matsuda, T., Irie, T., Katsurabayashi, S., Hayashi, Y., Nagai, T., Hamazaki, N., Adefuin, A. M. D., Miura, F., Ito, T., Kimura, H., Shirahige, K., Takeda, T., Iwasaki, K., Imamura, T. and Nakashima, K. (2019) 'Pioneer Factor NeuroD1 Rearranges Transcriptional and Epigenetic Profiles to Execute Microglia-Neuron Conversion', *Neuron*, 101(3), pp. 472-485.e7.

Matsushita, F., Kameyama, T., Kadokawa, Y. and Marunouchi, T. (2014) 'Spatiotemporal expression pattern of Myt/NZF family zinc finger transcription factors during mouse nervous system development', *Dev Dyn*, 243(4), pp. 588-600.

Mayeur, A., Duclos, C., Honoré, A., Gauberti, M., Drouot, L., do Rego, J. C., Bon-Mardion, N., Jean, L., Vérin, E., Emery, E., Lemarchant, S., Vivien, D., Boyer, O., Marie, J. P. and Guérout, N. (2013) 'Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair', *PLoS One*, 8(4), pp. e62860.

Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J. C., Yakir, B., Clark, A. T., Plath, K., Lowry, W. E. and Benvenisty, N. (2010) 'Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells', *Cell Stem Cell*, 7(4), pp. 521-31.

McTague, A., Rossignoli, G., Ferrini, A., Barral, S. and Kurian, M. A. (2021) 'Genome Editing in iPSC-Based Neural Systems: From Disease Models to Future Therapeutic Strategies', *Front Genome Ed*, 3, pp. 630600.

Mertens, J., Paquola, A. C. M., Ku, M., Hatch, E., Böhnke, L., Ladjevardi, S., McGrath, S., Campbell, B., Lee, H., Herdy, J. R., Gonçalves, J. T., Toda, T., Kim, Y., Winkler, J., Yao, J., Hetzer, M. W. and Gage, F. H. (2015) 'Directly Reprogrammed Human Neurons

Retain Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects', *Cell Stem Cell*, 17(6), pp. 705-718.

Miller, D. G., Adam, M. A. and Miller, A. D. (1990) 'Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection', *Mol Cell Biol*, 10(8), pp. 4239-42.

Minghetti, L. and Levi, G. (1998) 'Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide', *Prog Neurobiol*, 54(1), pp. 99-125.

Moreno-Flores, M. T., Díaz-Nido, J., Wandosell, F. and Avila, J. (2002) 'Olfactory ensheathing glia: Drivers of axonal regeneration in the central nervous system?', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2002(1), pp. 37-43.

Moreno-Flores, M. T., Lim, F., Jesús Martín-Bermejo, M., Díaz-Nido, J., Ávila, J. and Wandosell, F. (2003a) 'High level of amyloid precursor protein expression in neurite-promoting olfactory ensheathing glia (OEG) and OEG-derived cell lines', *Journal of Neuroscience Research*, 71(6), pp. 871-881.

Moreno-Flores, M. T., Lim, F., Martín-Bermejo, M. J., Díaz-Nido, J., Avila, J. and Wandosell, F. (2003b) 'Immortalized olfactory ensheathing glia promote axonal regeneration of rat retinal ganglion neurons', *Journal of neurochemistry*, 85(4), pp. 861-71.

Morris, S. A. (2016) 'Direct lineage reprogramming via pioneer factors; a detour through developmental gene regulatory networks', *Development*, 143(15), pp. 2696-705.

Mu, X., Fu, X., Sun, H., Beremand, P. D., Thomas, T. L. and Klein, W. H. (2005) 'A gene network downstream of transcription factor Math5 regulates retinal progenitor cell competence and ganglion cell fate', *Dev Biol*, 280(2), pp. 467-81.

Muzyczka, N. (1992) 'Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells', *Curr Top Microbiol Immunol*, 158, pp. 97-129.

Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M. and Trono, D. (1996) 'In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector', *Science*, 272(5259), pp. 263-7.

Nazareth, L., Chen, M., Shelper, T., Shah, M., Tello Velasquez, J., Walkden, H., Beacham, I., Batzloff, M., Rayfield, A., Todorovic, M., Beagley, K. W., St John, J. A. and

Ekberg, J. A. K. (2019) 'Novel insights into the glia limitans of the olfactory nervous system', *J Comp Neurol*, 527(7), pp. 1228-1244.

Nazareth, L., Lineburg, K. E., Chuah, M. I., Tello Velasquez, J., Chehrehasa, F., St John, J. A. and Ekberg, J. A. K. (2015a) 'Olfactory ensheathing cells are the main phagocytic cells that remove axon debris during early development of the olfactory system', *Journal of Comparative Neurology*, 523(3), pp. 479-494.

Nazareth, L., Tello Velasquez, J., Lineburg, K. E., Chehrehasa, F., St John, J. A. and Ekberg, J. A. K. (2015b) 'Differing phagocytic capacities of accessory and main olfactory ensheathing cells and the implication for olfactory glia transplantation therapies', *Molecular and cellular neurosciences*, 65, pp. 92-101.

Ng, R. K. and Gurdon, J. B. (2008) 'Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription', *Nat Cell Biol*, 10(1), pp. 102-9.

Ninkovic, J. and Götz, M. (2018) 'Understanding direct neuronal reprogramming-from pioneer factors to 3D chromatin', *Curr Opin Genet Dev*, 52, pp. 65-69.

Nocentini, S., Reginensi, D., Garcia, S., Carulla, P., Moreno-Flores, M. T., Wandosell, F., Trepát, X., Bribian, A. and del Río, J. A. (2012) 'Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy', *Cell Mol Life Sci*, 69(10), pp. 1689-703.

Odawara, A., Saitoh, Y., Alhebshi, A. H., Gotoh, M. and Suzuki, I. (2014) 'Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture', *Biochem Biophys Res Commun*, 443(4), pp. 1176-81.

Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S. (2007) 'Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells', *Nature*, 448(7151), pp. 313-7.

Oprych, K., Cotfas, D. and Choi, D. (2017) 'Common olfactory ensheathing glial markers in the developing human olfactory system', *Brain Struct Funct*, 222(4), pp. 1877-1895.

Ould-Yahoui, A., Sbai, O., Baranger, K., Bernard, A., Gueye, Y., Charrat, E., Clément, B., Gignes, D., Dive, V., Girard, S. D., Féron, F., Khrestchatisky, M. and Rivera, S. (2013) 'Role of matrix metalloproteinases in migration and neurotrophic properties of nasal olfactory stem and ensheathing cells', *Cell Transplant*, 22(6), pp. 993-1010.

Packard, A., Giel-Moloney, M., Leiter, A. and Schwob, J. E. (2011) 'Progenitor cell capacity of NeuroD1-expressing globose basal cells in the mouse olfactory epithelium', *J Comp Neurol*, 519(17), pp. 3580-96.

Pancrazi, L., Di Benedetto, G., Colombaioni, L., Della Sala, G., Testa, G., Olimpico, F., Reyes, A., Zeviani, M., Pozzan, T. and Costa, M. (2015) 'Foxg1 localizes to mitochondria and coordinates cell differentiation and bioenergetics', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(45), pp. 13910-5.

Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Südhof, T. C. and Wernig, M. (2011) 'Induction of human neuronal cells by defined transcription factors', *Nature*, 476(7359), pp. 220-3.

Park, N. I., Guilhamon, P., Desai, K., McAdam, R. F., Langille, E., O'Connor, M., Lan, X., Whetstone, H., Coutinho, F. J., Vanner, R. J., Ling, E., Prinos, P., Lee, L., Selvadurai, H., Atwal, G., Kushida, M., Clarke, I. D., Voisin, V., Cusimano, M. D., Bernstein, M., Das, S., Bader, G., Arrowsmith, C. H., Angers, S., Huang, X., Lupien, M. and Dirks, P. B. (2017) 'ASCL1 Reorganizes Chromatin to Direct Neuronal Fate and Suppress Tumorigenicity of Glioblastoma Stem Cells', *Cell Stem Cell*, 21(3), pp. 411.

Pasque, V., Jullien, J., Miyamoto, K., Halley-Stott, R. P. and Gurdon, J. B. (2011) 'Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming', *Trends Genet*, 27(12), pp. 516-25.

Pastrana, E., Moreno-Flores, M. T., Avila, J., Wandosell, F., Minichiello, L. and Diaz-Nido, J. (2007) 'BDNF production by olfactory ensheathing cells contributes to axonal regeneration of cultured adult CNS neurons', *Neurochemistry international*, 50(3), pp. 491-8.

Pastrana, E., Moreno-Flores, M. T., Gurzov, E. N., Avila, J., Wandosell, F. and Diaz-Nido, J. (2006) 'Genes associated with adult axon regeneration promoted by olfactory ensheathing cells: a new role for matrix metalloproteinase 2', *J Neurosci*, 26(20), pp. 5347-59.

Pataskar, A., Jung, J., Smialowski, P., Noack, F., Calegari, F., Straub, T. and Tiwari, V. K. (2016) 'NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program', *EMBO J*, 35(1), pp. 24-45.

Paviot, A., Guérout, N., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Jean, L., Boyer, O. and Marie, J. P. (2011) 'Efficiency of laryngeal motor nerve repair is greater with bulbar than with mucosal olfactory ensheathing cells', *Neurobiology of Disease*, 41(3), pp. 688-694.

Pearse, D. D., Sanchez, A. R., Pereira, F. C., Andrade, C. M., Puzis, R., Pressman, Y., Golden, K., Kitay, B. M., Blits, B., Wood, P. M. and Bunge, M. B. (2007) 'Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery', *Glia*, 55(9), pp. 976-1000.

Pellitteri, R., Spatuzza, M., Russo, A. and Stanzani, S. (2007) 'Olfactory ensheathing cells exert a trophic effect on the hypothalamic neurons in vitro', *Neurosci Lett*, 417(1), pp. 24-9.

Pellitteri, R., Spatuzza, M., Russo, A., Zaccheo, D. and Stanzani, S. (2009) 'Olfactory ensheathing cells represent an optimal substrate for hippocampal neurons: an in vitro study', *Int J Dev Neurosci*, 27(5), pp. 453-8.

Pereira, M., Birtele, M., Shrigley, S., Benitez, J. A., Hedlund, E., Parmar, M. and Ottosson, D. R. (2017) 'Direct Reprogramming of Resident NG2 Glia into Neurons with Properties of Fast-Spiking Parvalbumin-Containing Interneurons', *Stem Cell Reports*, 9(3), pp. 742-751.

Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Björklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J. and Parmar, M. (2011) 'Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(25), pp. 10343-8.

Piccolo, F. M., Pereira, C. F., Cantone, I., Brown, K., Tsubouchi, T., Soza-Ried, J., Merckenschlager, M. and Fisher, A. G. (2011) 'Using heterokaryons to understand pluripotency and reprogramming', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 366(1575), pp. 2260-5.

Pixley, S. K. (1992) 'The olfactory nerve contains two populations of glia, identified both in vivo and in vitro', *Glia*, 5, pp. 269-284.

Plant, G. W., Currier, P. F., Cuervo, E. P., Bates, M. L., Pressman, Y., Bunge, M. B. and Wood, P. M. (2002) 'Purified Adult Ensheathing Glia Fail to Myelinate Axons under Culture Conditions that Enable Schwann Cells to Form Myelin', *The Journal of Neuroscience*, 22(14), pp. 6083-6091.

Plaza, N., Simón, D., Sierra, J. and Moreno-Flores, M. T. (2016) 'Transduction of an immortalized olfactory ensheathing glia cell line with the green fluorescent protein (GFP) gene: Evaluation of its neuroregenerative capacity as a proof of concept', *Neuroscience Letters*, 612, pp. 25-31.

Portela-Lomba, M., Simón, D., Russo, C., Sierra, J. and Moreno-Flores, M. T. (2020) 'Coculture of Axotomized Rat Retinal Ganglion Neurons with Olfactory Ensheathing Glia, as an In Vitro Model of Adult Axonal Regeneration', *J Vis Exp*, (165).

Puls, B., Ding, Y., Zhang, F., Pan, M., Lei, Z., Pei, Z., Jiang, M., Bai, Y., Forsyth, C., Metzger, M., Rana, T., Zhang, L., Ding, X., Keefe, M., Cai, A., Redilla, A., Lai, M., He, K., Li, H. and Chen, G. (2020) 'Regeneration of Functional Neurons After Spinal Cord Injury via', *Front Cell Dev Biol*, 8, pp. 591883.

Pyka, M., Busse, C., Seidenbecher, C., Gundelfinger, E. D. and Faissner, A. (2011) 'Astrocytes are crucial for survival and maturation of embryonic hippocampal neurons in a neuron-glia cell-insert coculture assay', *Synapse*, 65(1), pp. 41-53.

Qin, H., Zhao, A. and Fu, X. (2017) 'Small molecules for reprogramming and transdifferentiation', *Cell Mol Life Sci*, 74(19), pp. 3553-3575.

Qin, H., Zhao, A., Ma, K. and Fu, X. (2018) 'Chemical conversion of human and mouse fibroblasts into motor neurons', *Sci China Life Sci*, 61(10), pp. 1151-1167.

Qin, H., Zhao, A. D., Sun, M. L., Ma, K. and Fu, X. B. (2020) 'Direct conversion of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells using small molecules and protein factors', *Mil Med Res*, 7(1), pp. 52.

Qiu, J., Cai, D., Dai, H., McAtee, M., Hoffman, P. N., Bregman, B. S. and Filbin, M. T. (2002) 'Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP', *Neuron*, 34(6), pp. 895-903.

Rais, Y., Zviran, A., Geula, S., Gafni, O., Chomsky, E., Viukov, S., Mansour, A. A., Caspi, I., Krupalnik, V., Zerbib, M., Maza, I., Mor, N., Baran, D., Weinberger, L., Jaitin, D. A., Lara-Astiaso, D., Blecher-Gonen, R., Shipony, Z., Mukamel, Z., Hagai, T., Gilad, S., Amann-Zalcenstein, D., Tanay, A., Amit, I., Novershtern, N. and Hanna, J. H. (2013) 'Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency', *Nature*, 502(7469), pp. 65-70.

Ramer, L. M., Au, E., Richter, M. W., Liu, J., Tetzlaff, W. and Roskams, A. J. (2004a) 'Peripheral Olfactory Ensheathing Cells Reduce Scar and Cavity Formation and Promote Regeneration after Spinal Cord Injury', *Journal of Comparative Neurology*, 473(1), pp. 1-15.

Ramer, L. M., Richter, M. W., Roskams, A. J., Tetzlaff, W. and Ramer, M. S. (2004b) 'Peripherally-derived olfactory ensheathing cells do not promote primary afferent regeneration following dorsal root injury', *Glia*, 47(2), pp. 189-206.

Ramón-Cueto, A. and Nieto-Sampedro, M. (1994) 'Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants', *Exp Neurol*, 127(2), pp. 232-44.

Ramón-Cueto, A. and Valverde, F. (1995) 'Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties', *Glia*, 14(3), pp. 163-73.

Rao, Y., Du, S., Yang, B., Wang, Y., Li, Y., Li, R., Zhou, T., Du, X., He, Y., Zhou, X., Yuan, T. F., Mao, Y. and Peng, B. (2021a) 'NeuroD1 induces microglial apoptosis and cannot induce microglia-to-neuron cross-lineage reprogramming', *Neuron*, 109(24), pp. 4094-4108.e5.

Rao, Y., Zhu, W., Liu, H., Jia, C., Zhao, Q. and Wang, Y. (2013) 'Clinical application of olfactory ensheathing cells in the treatment of spinal cord injury', *J Int Med Res*, 41(2), pp. 473-81.

Rao, Z., Wang, R., Li, S., Shi, Y., Mo, L., Han, S., Yuan, J., Jing, N. and Cheng, L. (2021b) 'Molecular Mechanisms Underlying Ascl1-Mediated Astrocyte-to-Neuron Conversion', *Stem Cell Reports*, 16(3), pp. 534-547.

Reginensi, D., Carulla, P., Nocentini, S., Seira, O., Serra-Picamal, X., Torres-Espín, A., Matamoros-Angles, A., Gavín, R., Moreno-Flores, M. T., Wandosell, F., Samitier, J., Trepát, X., Navarro, X. and del Río, J. A. (2015) 'Increased migration of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord', *Cell Mol Life Sci*, 72(14), pp. 2719-37.

Ren, J., Mao, X., Chen, M., Zhang, W., Liu, Y., Duan, C., Zhang, H., Sun, C., Wu, W., Zhu, X., Ge, J., Tao, W., Wang, Y. and Lu, H. (2015) 'TCTP Expression After Rat Spinal Cord Injury: Implications for Astrocyte Proliferation and Migration', *J Mol Neurosci*, 57(3), pp. 366-75.

Rhodes, K. E. and Fawcett, J. W. (2004) 'Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS?', *J Anat*, 204(1), pp. 33-48.

Richter, M. W. (2005) 'Lamina Propria and Olfactory Bulb Ensheathing Cells Exhibit Differential Integration and Migration and Promote Differential Axon Sprouting in the Lesioned Spinal Cord', *Journal of Neuroscience*, 25(46), pp. 10700-10711.

Riddell, J. S., Enriquez-Denton, M., Toft, A., Fairless, R. and Barnett, S. C. (2004) 'Olfactory ensheathing cell grafts have minimal influence on regeneration at the dorsal root entry zone following rhizotomy', *Glia*, 47(2), pp. 150-67.

Roet, K. C. D., Bossers, K., Franssen, E. H. P., Ruitenber, M. J. and Verhaagen, J. (2011) 'A meta-analysis of microarray-based gene expression studies of olfactory bulb-derived olfactory ensheathing cells', *Experimental Neurology*, 229(1), pp. 10-45.

Roet, K. C. D. and Verhaagen, J. (2014) 'Understanding the neural repair-promoting properties of olfactory ensheathing cells', *Experimental Neurology*, 261, pp. 594-609.

Salazar, I., Sanchez-Quinteiro, P., Barrios, A. W., López Amado, M. and Vega, J. A. (2019) 'Anatomy of the olfactory mucosa', *Handb Clin Neurol*, 164, pp. 47-65.

Sarnat, H. B., Nochlin, D. and Born, D. E. (1998) 'Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system', *Brain Dev*, 20(2), pp. 88-94.

Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J. D., Le, W. D., Smidt, M. P., Cox, J. J., De Mayo, F., Burbach, J. P. and Conneely, O. M. (1998) 'Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7), pp. 4013-8.

Schoenherr, C. J. and Anderson, D. J. (1995) 'The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes', *Science*, 267(5202), pp. 1360-3.

Schuurmans, C., Armant, O., Nieto, M., Stenman, J. M., Britz, O., Klenin, N., Brown, C., Langevin, L. M., Seibt, J., Tang, H., Cunningham, J. M., Dyck, R., Walsh, C., Campbell, K., Polleux, F. and Guillemot, F. (2004) 'Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways', *EMBO J*, 23(14), pp. 2892-902.

- Schwarting, G. A., Kostek, C., Ahmad, N., Dibble, C., Pays, L. and Püschel, A. W. (2000) 'Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice', *J Neurosci*, 20(20), pp. 7691-7.
- Sherf, O., Nashelsky Zolotov, L., Liser, K., Tilleman, H., Jovanovic, V. M., Zega, K., Jukic, M. M. and Brodski, C. (2015) 'Otx2 Requires Lmx1b to Control the Development of Mesodiencephalic Dopaminergic Neurons', *PLoS One*, 10(10), pp. e0139697.
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C. and Yamanaka, S. (2017) 'Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress', *Nat Rev Drug Discov*, 16(2), pp. 115-130.
- Shin, J. E. and Cho, Y. (2017) 'Epigenetic Regulation of Axon Regeneration after Neural Injury', *Mol Cells*, 40(1), pp. 10-16.
- Sieweke, M. H. (2015) 'Waddington's valleys and Captain Cook's islands', *Cell Stem Cell*, 16(1), pp. 7-8.
- Silver, J., Schwab, M. E. and Popovich, P. G. (2014) 'Central nervous system regenerative failure: role of oligodendrocytes, astrocytes, and microglia', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(3), pp. a020602.
- Simón, D., Martín-Bermejo, M. J., Gallego-Hernández, M. T., Pastrana, É., García-Escudero, V., García-Gómez, A., Lim, F., Díaz-Nido, J., Ávila, J. and Moreno-Flores, M. T. (2011) 'Expression of plasminogen activator inhibitor-1 by olfactory ensheathing glia promotes axonal regeneration', *Glia*, 59(10), pp. 1458-1471.
- Sinz, E. H., Kochanek, P. M., Dixon, C. E., Clark, R. S., Carcillo, J. A., Schiding, J. K., Chen, M., Wisniewski, S. R., Carlos, T. M., Williams, D., DeKosky, S. T., Watkins, S. C., Marion, D. W. and Billiar, T. R. (1999) 'Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice', *J Clin Invest*, 104(5), pp. 647-56.
- Skene, J. H., Jacobson, R. D., Snipes, G. J., McGuire, C. B., Norden, J. J. and Freeman, J. A. (1986) 'A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes', *Science*, 233(4765), pp. 783-6.
- Smith, D. K., Yang, J., Liu, M. L. and Zhang, C. L. (2016) 'Small Molecules Modulate Chromatin Accessibility to Promote NEUROG2-Mediated Fibroblast-to-Neuron Reprogramming', *Stem Cell Reports*, 7(5), pp. 955-969.

Smith, T. D. and Bhatnagar, K. P. (2019) 'Anatomy of the olfactory system', *Handb Clin Neurol*, 164, pp. 17-28.

Soza-Ried, J. and Fisher, A. G. (2012) 'Reprogramming somatic cells towards pluripotency by cellular fusion', *Curr Opin Genet Dev*, 22(5), pp. 459-65.

Srivastava, D. and DeWitt, N. (2016) 'In Vivo Cellular Reprogramming: The Next Generation', *Cell*, 166(6), pp. 1386-1396.

Steward, O., Sharp, K., Selvan, G., Hadden, A., Hofstadter, M., Au, E. and Roskams, J. (2006) 'A re-assessment of the consequences of delayed transplantation of olfactory lamina propria following complete spinal cord transection in rats', *Exp Neurol*, 198(2), pp. 483-99.

Stricker, S. H. and Götz, M. (2021) 'Epigenetic regulation of neural lineage elaboration: Implications for therapeutic reprogramming', *Neurobiol Dis*, 148, pp. 105174.

Su, Z., Yuan, Y., Chen, J., Cao, L., Zhu, Y., Gao, L., Qiu, Y. and He, C. (2009) 'Reactive astrocytes in glial scar attract olfactory ensheathing cells migration by secreted TNF-alpha in spinal cord lesion of rat', *PLoS One*, 4(12), pp. e8141.

Suchy, F., Yamaguchi, T. and Nakauchi, H. (2018) 'iPSC-Derived Organs In Vivo: Challenges and Promise', *Cell Stem Cell*, 22(1), pp. 21-24.

Sun, X., Tan, Z., Huang, X., Cheng, X., Yuan, Y., Qin, S., Wang, D., Hu, X., Gu, Y., Qian, W. J., Wang, Z., He, C. and Su, Z. (2019) 'Direct neuronal reprogramming of olfactory ensheathing cells for CNS repair', *Cell Death Dis*, 10(9), pp. 646.

Tabakow, P., Jarmundowicz, W., Czapiga, B., Fortuna, W., Miedzybrodzki, R., Czyz, M., Huber, J., Szarek, D., Okurowski, S., Szewczyk, P., Gorski, A. and Raisman, G. (2013) 'Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury', *Cell Transplantation*, 22(9), pp. 1591-1612.

Tabakow, P., Raisman, G., Fortuna, W., Czyz, M., Huber, J., Li, D., Szewczyk, P., Okurowski, S., Miedzybrodzki, R., Czapiga, B., Salomon, B., Halon, A., Li, Y., Lipiec, J., Kulczyk, A. and Jarmundowicz, W. (2014) 'Functional regeneration of supraspinal connections in a patient with transected spinal cord following transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells with peripheral nerve bridging', *Cell transplantation*, 23(12), pp. 1631-55.

- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N. and Tada, T. (2001) 'Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells', *Curr Biol*, 11(19), pp. 1553-8.
- Tai, W., Wu, W., Wang, L. L., Ni, H., Chen, C., Yang, J., Zang, T., Zou, Y., Xu, X. M. and Zhang, C. L. (2021) 'In vivo reprogramming of NG2 glia enables adult neurogenesis and functional recovery following spinal cord injury', *Cell Stem Cell*, 28(5), pp. 923-937.e4.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) 'Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors', *Cell*, 126(4), pp. 663-76.
- Tang, X., Zhou, L., Wagner, A. M., Marchetto, M. C., Muotri, A. R., Gage, F. H. and Chen, G. (2013) 'Astroglial cells regulate the developmental timeline of human neurons differentiated from induced pluripotent stem cells', *Stem Cell Res*, 11(2), pp. 743-57.
- Tang, Y., Liu, M. L., Zang, T. and Zhang, C. L. (2017) 'Direct Reprogramming Rather than iPSC-Based Reprogramming Maintains Aging Hallmarks in Human Motor Neurons', *Front Mol Neurosci*, 10, pp. 359.
- Thuret, S., Moon, L. D. F. and Gage, F. H. (2006) 'Therapeutic interventions after spinal cord injury', *Nature reviews. Neuroscience*, 7(8), pp. 628-43.
- Torper, O., Ottosson, D. R., Pereira, M., Lau, S., Cardoso, T., Grealish, S. and Parmar, M. (2015) 'In Vivo Reprogramming of Striatal NG2 Glia into Functional Neurons that Integrate into Local Host Circuitry', *Cell Rep*, 12(3), pp. 474-81.
- Torper, O., Pfisterer, U., Wolf, D. A., Pereira, M., Lau, S., Jakobsson, J., Björklund, A., Grealish, S. and Parmar, M. (2013) 'Generation of induced neurons via direct conversion in vivo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(17), pp. 7038-43.
- Treutlein, B., Lee, Q. Y., Camp, J. G., Mall, M., Koh, W., Shariati, S. A., Sim, S., Neff, N. F., Skotheim, J. M., Wernig, M. and Quake, S. R. (2016) 'Dissecting direct reprogramming from fibroblast to neuron using single-cell RNA-seq', *Nature*, 534(7607), pp. 391-5.
- Uittenbogaard, M., Baxter, K. K. and Chiaramello, A. (2010) 'The neurogenic basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD6 confers tolerance to oxidative stress by triggering an antioxidant response and sustaining the mitochondrial biomass', *ASN Neuro*, 2(2), pp. e00034.

Vasconcelos, F. F., Sessa, A., Laranjeira, C., Raposo, A. A. S. F., Teixeira, V., Hagey, D. W., Tomaz, D. M., Muhr, J., Broccoli, V. and Castro, D. S. (2016) 'MyT1 Counteracts the Neural Progenitor Program to Promote Vertebrate Neurogenesis', *Cell Rep*, 17(2), pp. 469-483.

Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C. and Wernig, M. (2010) 'Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors', *Nature*, 463(7284), pp. 1035-41.

Vincent, A. J., West, A. K. and Chuah, M. I. (2005) 'Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells', *Journal of neurocytology*, 34(1-2), pp. 65-80.

Vroemen, M., Weidner, N. and Blesch, A. (2005) 'Loss of gene expression in lentivirus- and retrovirus-transduced neural progenitor cells is correlated to migration and differentiation in the adult spinal cord', *Exp Neurol*, 195(1), pp. 127-39.

Waddington, C. H. (1957) *The strategy of the genes; a discussion of some aspects of theoretical biology*. New York,: Macmillan.

Wan, X. Y., Xu, L. Y., Li, B., Sun, Q. H., Ji, Q. L., Huang, D. D., Zhao, L. and Xiao, Y. T. (2018) 'Chemical conversion of human lung fibroblasts into neuronal cells', *Int J Mol Med*, 41(3), pp. 1463-1468.

Wang, H., Yang, Y., Liu, J. and Qian, L. (2021a) 'Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms and progress', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22(6), pp. 410-424.

Wang, J., He, Q., Zhang, K., Sun, H., Zhang, G., Liang, H., Guo, J., Hao, L., Ke, J. and Chen, S. (2020) 'Quick Commitment and Efficient Reprogramming Route of Direct Induction of Retinal Ganglion Cell-like Neurons', *Stem Cell Reports*, 15(5), pp. 1095-1110.

Wang, X., Jiang, C., Zhang, Y., Chen, Z., Fan, H., Wang, Z., Tian, F., Li, J., Yang, H. and Hao, D. (2022) 'The promoting effects of activated olfactory ensheathing cells on angiogenesis after spinal cord injury through the PI3K/Akt pathway', *Cell Biosci*, 12(1), pp. 23.

Wang, X., Pei, Z., Hossain, A., Bai, Y. and Chen, G. (2021b) 'Transcription factor-based gene therapy to treat glioblastoma through direct neuronal conversion', *Cancer Biol Med*.

Wang, Y., Bao, X., Wu, S., Shen, X., Zhang, F., Lv, Z., Wu, Q., Xie, C., Liu, H., Lin, J., Teng, H. and Huang, Z. (2018) 'Semaphorin 3A as an inhibitive factor for migration of olfactory ensheathing cells through cofilin activation is involved in formation of olfactory nerve layer', *Mol Cell Neurosci*, 92, pp. 27-39.

Wang, Y., Dye, C. A., Sohal, V., Long, J. E., Estrada, R. C., Roztocil, T., Lufkin, T., Deisseroth, K., Baraban, S. C. and Rubenstein, J. L. (2010) 'Dlx5 and Dlx6 regulate the development of parvalbumin-expressing cortical interneurons', *J Neurosci*, 30(15), pp. 5334-45.

Wang, Y., Teng, H. L., Gao, Y., Zhang, F., Ding, Y. Q. and Huang, Z. H. (2016) 'Brain-derived Neurotrophic Factor Promotes the Migration of Olfactory Ensheathing Cells Through TRPC Channels', *Glia*, 64(12), pp. 2154-2165.

Wapinski, O. L., Lee, Q. Y., Chen, A. C., Li, R., Corces, M. R., Ang, C. E., Treutlein, B., Xiang, C., Baubet, V., Suchy, F. P., Sankar, V., Sim, S., Quake, S. R., Dahmane, N., Wernig, M. and Chang, H. Y. (2017) 'Rapid Chromatin Switch in the Direct Reprogramming of Fibroblasts to Neurons', *Cell Rep*, 20(13), pp. 3236-3247.

Wapinski, O. L., Vierbuchen, T., Qu, K., Lee, Q. Y., Chanda, S., Fuentes, D. R., Giresi, P. G., Ng, Y. H., Marro, S., Neff, N. F., Drechsel, D., Martynoga, B., Castro, D. S., Webb, A. E., Südhof, T. C., Brunet, A., Guillemot, F., Chang, H. Y. and Wernig, M. (2013) 'Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons', *Cell*, 155(3), pp. 621-35.

Watzlawick, R., Rind, J., Sena, E. S., Brommer, B., Zhang, T., Kopp, M. A., Dirnagl, U., Macleod, M. R., Howells, D. W. and Schwab, J. M. (2016) 'Olfactory Ensheathing Cell Transplantation in Experimental Spinal Cord Injury: Effect size and Reporting Bias of 62 Experimental Treatments: A Systematic Review and Meta-Analysis', *PLoS Biol*, 14(5), pp. e1002468.

Windus, L. C., Claxton, C., Allen, C. L., Key, B. and St John, J. A. (2007) 'Motile membrane protrusions regulate cell-cell adhesion and migration of olfactory ensheathing glia', *Glia*, 55(16), pp. 1708-19.

Windus, L. C. E., Lineburg, K. E., Scott, S. E., Claxton, C., MacKay-Sim, A., Key, B. and St John, J. A. (2010) 'Lamellipodia mediate the heterogeneity of central olfactory ensheathing cell interactions', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(10), pp. 1735-1750.

Woodhall, E., West, A. K. and Chuah, M. I. (2001) 'Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors', *Molecular Brain Research*, 88(1-2), pp. 203-213.

Wu, Z., Parry, M., Hou, X. Y., Liu, M. H., Wang, H., Cain, R., Pei, Z. F., Chen, Y. C., Guo, Z. Y., Abhijeet, S. and Chen, G. (2020) 'Gene therapy conversion of striatal astrocytes into GABAergic neurons in mouse models of Huntington's disease', *Nat Commun*, 11(1), pp. 1105.

Yamanaka, S. (2009) 'Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation', *Nature*, 460(7251), pp. 49-52.

Yamanaka, S. and Blau, H. M. (2010) 'Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches', *Nature*, 465(7299), pp. 704-12.

Yang, X., Smith, S. L., Tian, X. C., Lewin, H. A., Renard, J. P. and Wakayama, T. (2007) 'Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning', *Nat Genet*, 39(3), pp. 295-302.

Yang, Y., Chen, R., Wu, X., Zhao, Y., Fan, Y., Xiao, Z., Han, J., Sun, L., Wang, X. and Dai, J. (2019) 'Rapid and Efficient Conversion of Human Fibroblasts into Functional Neurons by Small Molecules', *Stem Cell Reports*, 13(5), pp. 862-876.

Yin, J. C., Zhang, L., Ma, N. X., Wang, Y., Lee, G., Hou, X. Y., Lei, Z. F., Zhang, F. Y., Dong, F. P., Wu, G. Y. and Chen, G. (2019) 'Chemical Conversion of Human Fetal Astrocytes into Neurons through Modulation of Multiple Signaling Pathways', *Stem Cell Reports*, 12(3), pp. 488-501.

Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P. and Smith, A. G. (2002) 'Changing potency by spontaneous fusion', *Nature*, 416(6880), pp. 545-8.

Yoo, A. S., Sun, A. X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R. E., Tsien, R. W. and Crabtree, G. R. (2011) 'MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons', *Nature*, 476(7359), pp. 228-31.

Yu, S., Cheng, L., Tian, D., Li, Z., Yao, F., Luo, Y., Liu, Y., Zhu, Z., Zheng, M. and Jing, J. (2021) 'Fascin-1 is Highly Expressed Specifically in Microglia After Spinal Cord Injury and Regulates Microglial Migration', *Front Pharmacol*, 12, pp. 729524.

Zhang, L., Lei, Z., Guo, Z., Pei, Z., Chen, Y., Zhang, F., Cai, A., Mok, G., Lee, G., Swaminathan, V., Wang, F., Bai, Y. and Chen, G. (2020) 'Development of Neuroregenerative Gene Therapy to Reverse Glial Scar Tissue Back to Neuron-Enriched Tissue', *Front Cell Neurosci*, 14, pp. 594170.

Zhang, L., Yin, J. C., Yeh, H., Ma, N. X., Lee, G., Chen, X. A., Wang, Y., Lin, L., Chen, L., Jin, P., Wu, G. Y. and Chen, G. (2015) 'Small Molecules Efficiently Reprogram Human Astroglial Cells into Functional Neurons', *Cell Stem Cell*, 17(6), pp. 735-747.

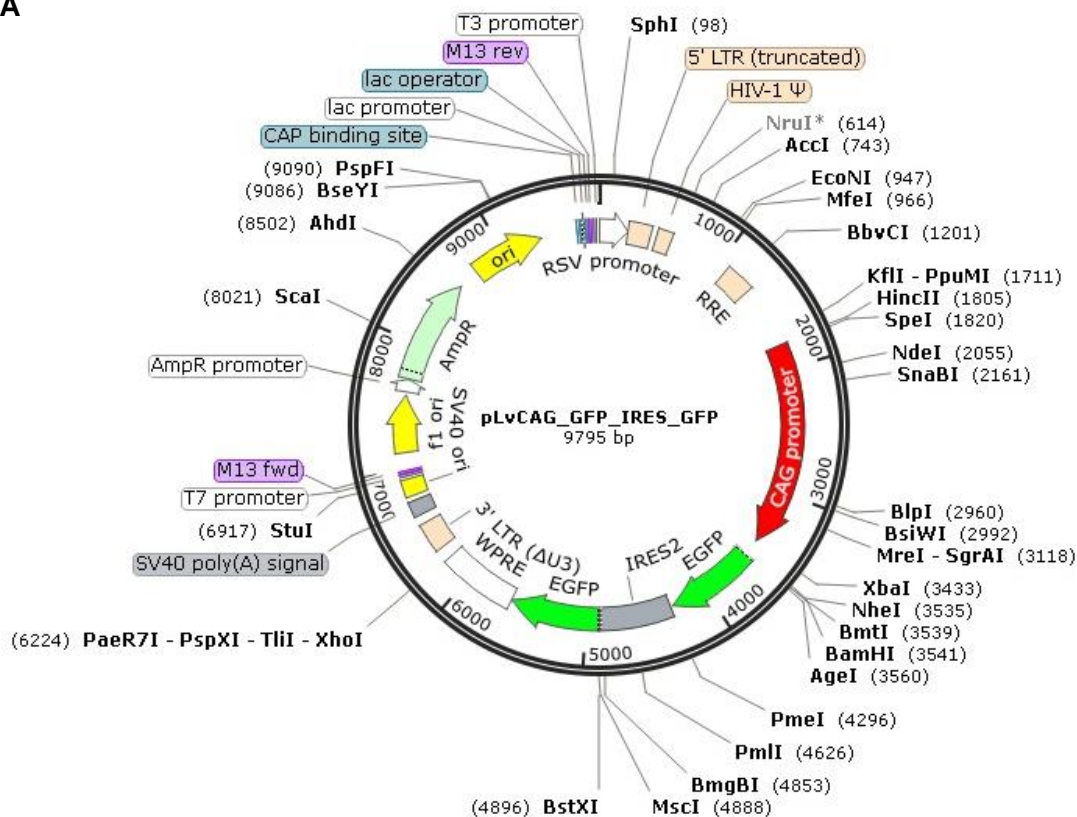
Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z. and Xu, Y. (2011) 'Immunogenicity of induced pluripotent stem cells', *Nature*, 474(7350), pp. 212-5.

Zheng, X., Boyer, L., Jin, M., Mertens, J., Kim, Y., Ma, L., Hamm, M., Gage, F. H. and Hunter, T. (2016) 'Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation', *Elife*, 5.

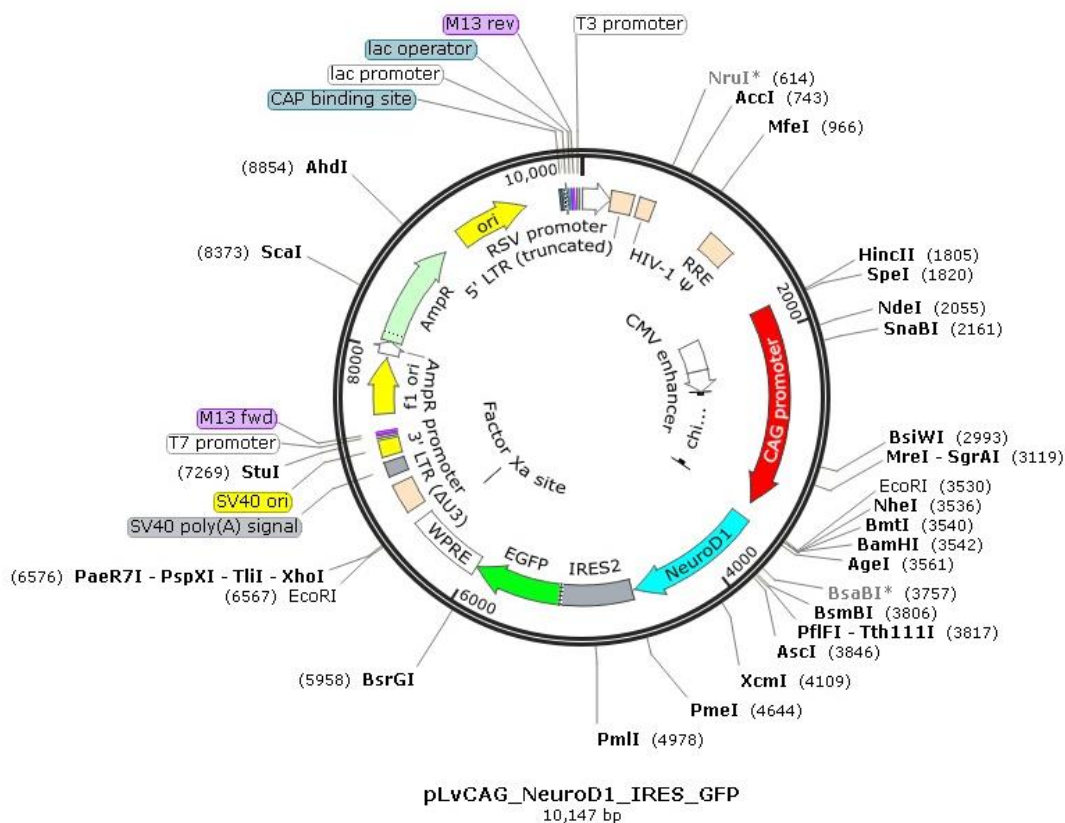
ANEXOS

Figura I. Mapas de los vectores lentivirales. Esquemas representativos de la estructura de los plásmidos utilizados: GFP (A), NEUROD1 (B), NEUROGENINA 2 (C) y ASCL1 (D).

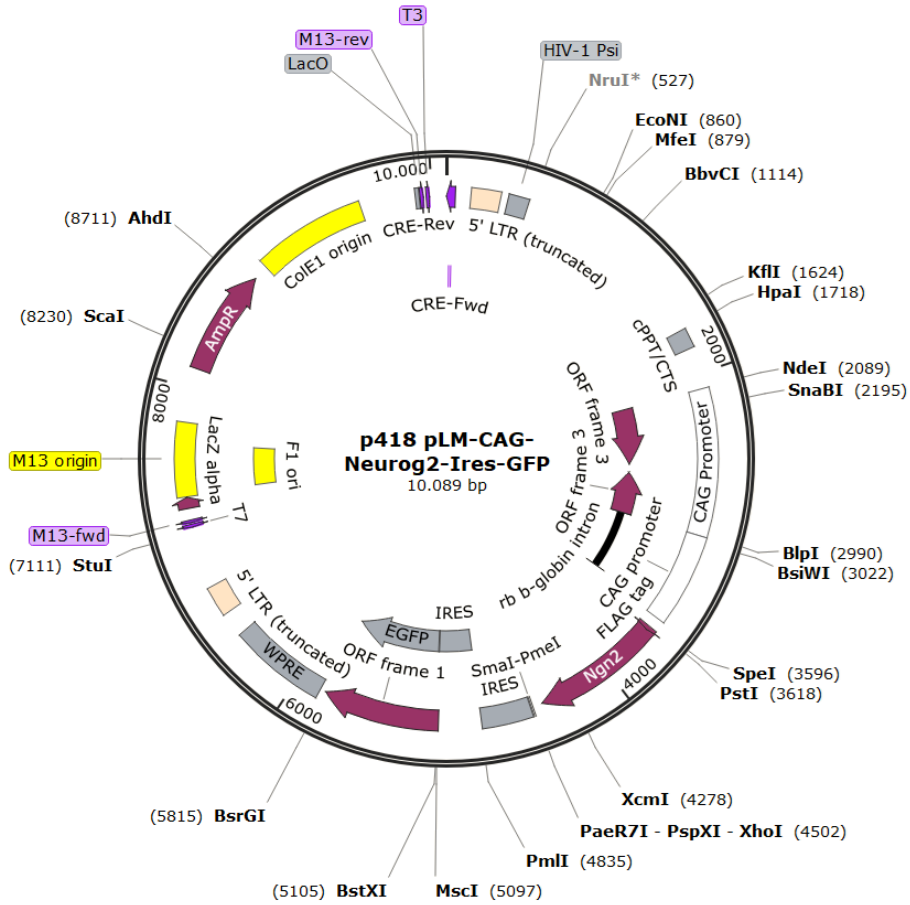
A



B



C



D

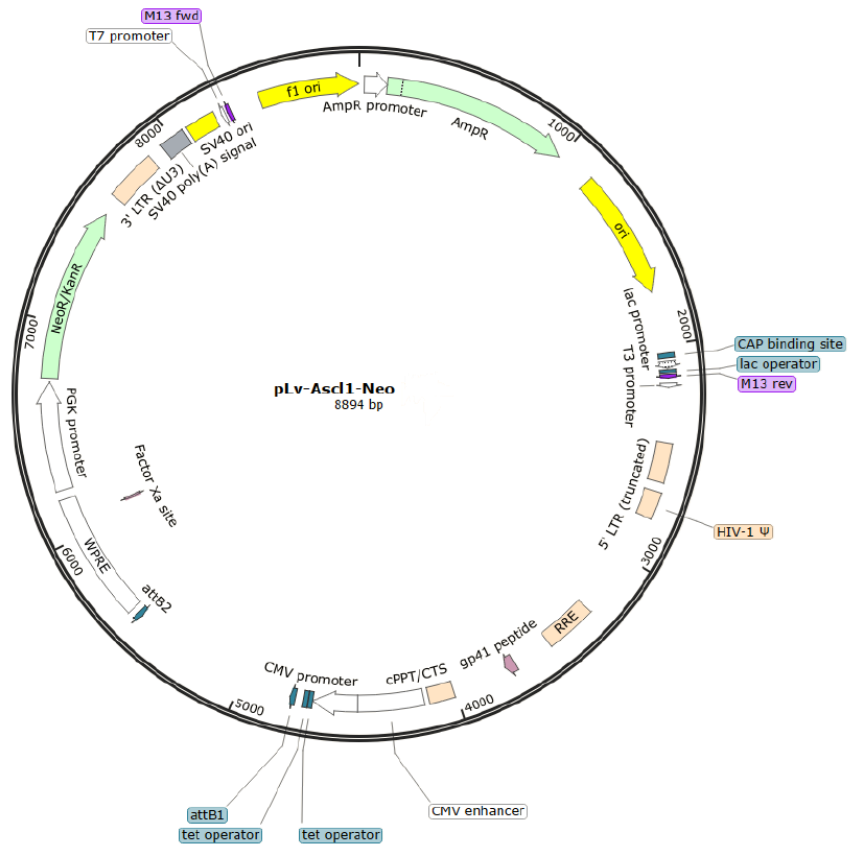


Figura II. Códigos de las macros. Códigos utilizados para el procesamiento de las imágenes de las inmunofluorescencias. **A**, Macro para contar el número total de células y determinar la ROI. **B**, Macro para seleccionar las ROI GFP positivas. **C**, Macro para el procesamiento en bucle.

A. Macro DAPI

```

1 rename("DAPI")
2 run("Subtract Background...", "rolling=30 disable");
3 run("Enhance Contrast...", "saturated=2");
4 run("Mean...", "radius=2");
5 setAutoThreshold("Default dark no-reset");
6 setOption("BlackBackground", true);
7 run("Convert to Mask");
8 run("Fill Holes");
9 run("Watershed");
10 run("Analyze Particles...", "size=110-Infinity circularity=0.40-1.00 show=Masks exclude clear summarize add");

```

B. Macro GFP

```

1 rename("GFP")
2 run("Mean...", "radius=2");
3 setAutoThreshold("Default dark no-reset");
4 setOption("BlackBackground", true);
5 run("Convert to Mask");
6 run("Fill Holes");
7 imageCalculator("AND create", "GFP","Mask of DAPI");
8 selectWindow("Result of GFP");
9 run("Analyze Particles...", "size=110-Infinity pixel circularity=0.40-1.00 show=Masks exclude clear summarize add");

```

C. Macro Bucle

```

2 macro "loop1" {
3   beg = "C:/Users/Usuario/Desktop/Nueva carpeta (2)/4. GFP, MAP2, NEUN, DAPI_3/4_R"; //
4
5   end00 = "_RAW_ch00.tif";
6   end01 = "_RAW_ch01.tif";
7   end02 = "_RAW_ch02.tif";
8   end03 = "_RAW_ch03.tif";
9
10  for (i = 1; i < 31; i +=1) { //
11    num = toString(i);
12    pic00 = beg+num+end00;
13    pic01 = beg+num+end01;
14    pic02 = beg+num+end02;
15    pic03 = beg+num+end03;
16    open(pic00);
17    open(pic01);
18    open(pic02);
19    open(pic03);
20
21    selectWindow("4_R"+num+"_RAW_ch03.tif");//
22    runMacro("C:/Users/Usuario/Desktop/Nueva carpeta (2)/Macro DAPI.ijm");
23
24    selectWindow("4_R"+num+"_RAW_ch00.tif");//
25    runMacro("C:/Users/Usuario/Desktop/Nueva carpeta (2)/Macro GFP.ijm");
26
27    selectWindow("4_R"+num+"_RAW_ch01.tif");//
28    run("From ROI Manager");
29    roiManager("Measure");
30
31    c=1;//
32    run("Read and Write Excel","sheet=Data_sheet_" + c);
33
34    run("Clear Results");
35
36    selectWindow("4_R"+num+"_RAW_ch02.tif");//
37    run("From ROI Manager");
38    roiManager("Measure");
39    String.copyResults();
40
41    c=2;//
42    run("Read and Write Excel","sheet=Data_sheet_" + c);
43    run("Close All");
44  }
45 }

```