



Universidad
Nacional
de Córdoba



Facultad de
Ciencias Exactas
Físicas y Naturales



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Tesina de Grado para optar por el título de Biólogo

**“CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS
REPRESORES REST, COREST Y G9A EN NEURONAS
HUMANAS OBTENIDAS DE iPSC Y NEURONAS
HIPOCAMPALES DE RATA EN CULTIVO”**

Tesista: José Facundo Drube

Firma: *Jose Drube*

Director: Dr. Carlos Wilson

Firma: *Carlos Wilson*

Tesina de Grado para optar por el título de Biólogo

**“CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS REPRESORES REST,
COREST Y G9A EN NEURONAS HUMANAS OBTENIDAS DE iPSC Y
NEURONAS DE HIPOCAMPALES DE RATA EN CULTIVO”**

Alumno: José Facundo Drube

Director: Dr. Carlos Wilson

Tribunal Examinador

- Nombre y Apellido: Dra. Anahí Franchi
- Nombre y Apellido: Dra. Carla Cisternas
- Nombre y Apellido: Dr. Nicolás Unsain
- Calificación: 10 (Aprobado)
- Fecha: 22 de Marzo de 2024

Firma:



Firma:



Firma:



Agradecimientos

Agradezco a mis padres por haberme dado la oportunidad de estudiar una carrera universitaria, con el apoyo incondicional de siempre, el amor y compañía. A mis hermanos y hermanas por haberme enseñado tanto, por inspirarme y motivarme cada día, y estar presentes siempre que los necesito.

A mis amigos y amigas, por hacer de estos años no sólo una cuestión de aprendizaje y crecimiento, sino también de diversión, son únicos e irremplazables, sin ellos mis días no serían tan hermosos como lo son.

A mi director Carlos por acompañarme en este último trayecto de la carrera, por estar siempre presente y confiar en mí, por enseñarme tanto e impulsarme a dar lo mejor, y demostrar que, además de buen investigador, hay que ser buena persona.

A mis compañeros de laboratorio e investigadores por hacerme sentir uno más del grupo, por hacerme disfrutar cada día en el laboratorio con su calidez, cariño y las charlas divertidas, sin duda fueron el mejor grupo que podría haber tenido. Dentro de ellos, a Mónica Remedi y Laura Gastaldi por cultivar las iPSCs (CIMETSA, IUCBC) y a Victoria Rozés (CIBICI, UNC) por facilitarnos las neuronas de rata.

Gracias al apoyo y compañía de todos ellos superé momentos difíciles y pude disfrutar de todos estos años, les estoy eternamente agradecido.

Por último, pero no menos importante, gracias a la Universidad Nacional de Córdoba y Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales por permitirme realizar una carrera universitaria de manera gratuita. Gracias a los profesores que me brindaron el conocimiento de manera tan dedicada. Gracias también al Instituto Universitario de Ciencias Biomédicas por brindarme un lugar y herramientas para poder realizar mi tesina para concluir mi carrera.

ÍNDICE

Resumen.....	5
Abstract.....	6
1. Introducción	
1.1. La neurona como unidad funcional del Sistema Nervioso	7
1.2. Neuronas del SNC: neurogénesis, polarización y maduración funcional	7
1.3. Fundamentos moleculares de la formación axonal y dendrítica de neuronas centrales	8
1.4. Introducción a la epigenética	9
1.5. Fundamentos moleculares de la epigenética	11
1.6. Contribución del represor transcripcional REST al desarrollo neuronal	12
1.7. Rol de los represores CoREST y G9a en el desarrollo y crecimiento neuronal	13
1.8. Definición del problema	14
2. Hipótesis y objetivos	15
3. Materiales y métodos	
3.1. Cultivo de neuronas humanas a partir de la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas	15
3.1.1. Reproducción y cultivo de hiPSC	15
3.1.2. Inducción neural de hiPSC en cultivo.....	16
3.1.3. Diferenciación de NSC en neuronas	16
3.2. Cultivo de neuronas de hipocampo aisladas de cerebros embrionarios de rata	16
3.2.1. Fijación de neuronas en cultivo derivadas de hiPSC e hipocampos embrionarios de rata (E18)	17
3.3. Detección mediante inmunofluorescencia indirecta de epítomos de interés	17
3.4. Adquisición de imágenes	18
3.5. Análisis de imágenes y cuantificación de la señal fluorescente.....	18
3.6. Procesamiento de datos, estimación de la señal nuclear, citoplasmática y razón núcleo/citoplasma	19
3.7. Análisis estadístico	19
4. Resultados.....	20
5. Discusión	40
6. Conclusión	44
7. Bibliografía	46

RESUMEN

La regulación epigenética es fundamental para muchos aspectos de la vida neuronal, desde el desarrollo hasta la enfermedad. La opinión predominante en el campo establece que el represor transcripcional REST debe ser silenciado durante la neurogénesis, siendo indetectable en neuronas post-mitóticas. En consecuencia, se considera un regulador maestro de la diferenciación neuronal. Sin embargo, informes recientes han matizado estas interpretaciones, ya que se ha detectado a REST en cerebros postnatales de ratón, así como en cerebros humanos envejecidos. Curiosamente, REST está reprimido en cerebros de individuos afectados con la enfermedad de Alzheimer en su forma esporádica (no genética), donde se le ha atribuido un rol neuroprotector. Por lo tanto, su expresión, localización y contribución parecen depender estrechamente del contexto fisiopatológico.

Utilizando células madre pluripotentes inducidas obtenidas mediante la reprogramación de fibroblastos humanos sanos (hiPSC) y microscopía confocal, detectamos que REST se acumula en el núcleo de neuronas derivadas de hiPSC dentro de los primeros 21 días de diferenciación *in vitro* (DIV). También realizamos este ensayo en neuronas de hipocampo en cultivo, aisladas de cerebros embrionario de rata (E18,5), obteniendo un resultado similar dentro de los primeros 14 DIV. Esta observación apoya la noción de que REST no solo se expresa en neuronas humanas envejecidas sino también durante el desarrollo post-mitótico y en neuronas murinas. Además, detectamos la expresión de los represores transcripcionales G9a y CoREST en ambos modelos, probablemente reclutados por REST en la cromatina. Sin embargo, su patrón de expresión y distribución nuclear difiere entre ambos modelos neuronales *in vitro*.

Colectivamente, nuestros datos revelan que REST se expresa y enriquece nuclearmente en neuronas hiPSC y de rata, matizando la evidencia que interpreta una re-expresión exclusiva durante el envejecimiento. Además, los comportamientos de la expresión de G9a, CoREST y REST destacan la noción de mecanismos epigenéticos específicos humanos. Nuestros próximos pasos apuntan a precisar su contribución a la fisiología y disfunción de las neuronas, identificando mecanismos reguladores y objetivos génicos.

Palabras Clave: neurona, neurogénesis, epigenética, REST/NRSF, CoREST, G9a, iPSC.

ABSTRACT

Epigenetic regulation is critical for many aspects of the neuronal life, ranging from development to disease. The prevailing view in the field states that the transcriptional repressor REST must be silenced during neurogenesis, being undetectable in post-mitotic neurons. Consequently, it is considered a master regulator of neuronal differentiation. However, recent reports have tempered these interpretations, since REST has been detected in post-mitotic mouse brains as well as in aging human brains. Intriguingly, REST is repressed in sporadic Alzheimer's Disease brains, suggesting neuroprotective roles. Therefore, its expression, localization and contribution tightly depend on the physiological context.

Using induced pluripotent stem cells obtained by reprogramming healthy human fibroblasts (hiPSC) and confocal microscopy, we detected that REST accumulates in the nucleus of hiPSC-derived neurons within the first 21 days of differentiation in vitro (DIV). We also performed this assay on hippocampal neurons from embryonic rat brains (E18.5), obtaining a similar result within the first 14 DIV. This observation supports the notion that REST is not only expressed in aging human neurons but also during post-mitotic development of both human and murine cultured neurons.

In addition, we detected the expression of the transcriptional repressors G9a and CoREST in both models, most likely recruited by REST to the chromatin. However, their expression pattern differs between human and rat cultured neurons. Accordingly, our data confirms their expression, but nuclear enrichment seems to be restricted only to rat neurons, at least within the timeframe considered for this study.

Collectively, our data unveils the enrichment of REST in growing hiPSC-derived neurons and rat cultured neurons. Moreover, the behaviors of G9a, CoREST and REST expression stress the notion of human-specific epigenetic mechanisms. Our next steps aim to precise their contribution to the physiology and dysfunction of neurons, identifying regulatory mechanisms and gene targets.

Keywords: neuron, neurogenesis, epigenetic, REST/NRSF, CoREST, G9a, iPSC.

1) INTRODUCCIÓN

1.1) La neurona como unidad funcional del Sistema Nervioso

Las neuronas son las unidades funcionales del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), encargadas de la transmisión y propagación del impulso eléctrico, mediante la formación de redes de comunicación entre neuronas y glías. Su desarrollo es un proceso continuo que comienza durante la vida embrionaria y, en algunos contextos, trasciende la vida postnatal y adulta hasta lograr la madurez funcional (Wilson *et al.*, 2018).

El desarrollo neuronal sucede a través de tres hitos principales. En primer lugar, comienza con la diferenciación de precursores neuronales (células madre neuronales o *neural stem cells*, NSC) en neuronas post-mitóticas, proceso conocido como neurogénesis. Durante el desarrollo embrionario, las NSC surgen del ectodermo, una de las 3 capas germinales del embrión. A partir de ella, emergen todas las células (neuronas y glías) que componen el SNC y el SNP, con sus distintas funciones y morfologías.

En el SNP encontramos diversos fenotipos neuronales, como las neuronas espinales sensitivas y motoras, cuyos somas se ubican en los ganglios de la raíz dorsal (*dorsal root ganglion neurons*, DRG) y en el cuerno anterior de la médula espinal, respectivamente. Además de las neuronas, también están presentes las células de Schwann, las que además de promover la mielinización de los axones de estas neuronas, también tienen un papel importante en la nutrición de axones mielinizados y no mielinizados (Catala & Kubis, 2013).

En forma análoga al SNP, el SNC posee diversos fenotipos neuronales y gliales, como astrocitos y oligodendrocitos; estos últimos encargados de la mielinización. Mientras que la neurogénesis en el SNC ocurre principalmente durante el desarrollo embrionario, la maduración de astrocitos y oligodendrocitos sucede post-natalmente (Giedd, 1999). A diferencia de las neuronas espinales del SNP, las neuronas piramidales glutamatérgicas, presentes en el hipocampo y la corteza cerebral, tienen una morfología “polar”, caracterizadas por la formación de múltiples dendritas y un único axón (Jiang *et al.*, 2015). En este trabajo de tesina, nos enfocaremos en este tipo particular de neurona.

1.2) Neuronas del SNC: neurogénesis, polarización y maduración funcional.

Las neuronas piramidales glutamatérgicas del SNC se caracterizan por la presencia de un cuerpo celular o soma, donde yace el núcleo y el ADN, a partir del cual surge el axón y las dendritas, dos compartimentos especializados en la propagación del impulso nervioso y la recepción de señales electroquímicas, respectivamente. Inmediatamente posterior a la neurogénesis, las neuronas lucen como células redondas, sin axón ni dendritas. En este

estadio de diferenciación, las neuronas son células “simétricas”. Sin embargo, señales intrínsecas y extrínsecas activan mecanismos celulares que involucran la dinámica del citoesqueleto de actina y microtúbulos, el tráfico vesicular y la destinación y retención selectiva de componentes, para inducir la pérdida de la simetría y la formación del axón y las dendritas (Cáceres *et al.*, 2012). Este proceso es conocido como “establecimiento de la polaridad neuronal” y es clave para diferenciar morfológica, funcional y bioquímicamente el axón de las dendritas (Dotti *et al.*, 1988). Finalmente, el desarrollo neuronal culmina con la adquisición de la madurez funcional, específicamente con la formación de contactos sinápticos neurona-neurona y neurona-glia (Wilson *et al.*, 2018; Conde & Cáceres, 2009; Craig & Banker 1994; Cáceres *et al.*, 2012). La Figura 1 ilustra estos tres hitos biológicos del neurodesarrollo, que no solo establecen la base morfológica esencial para la fisiología neuronal, sino que sustentan la complejidad de la conectividad en el sistema nervioso.

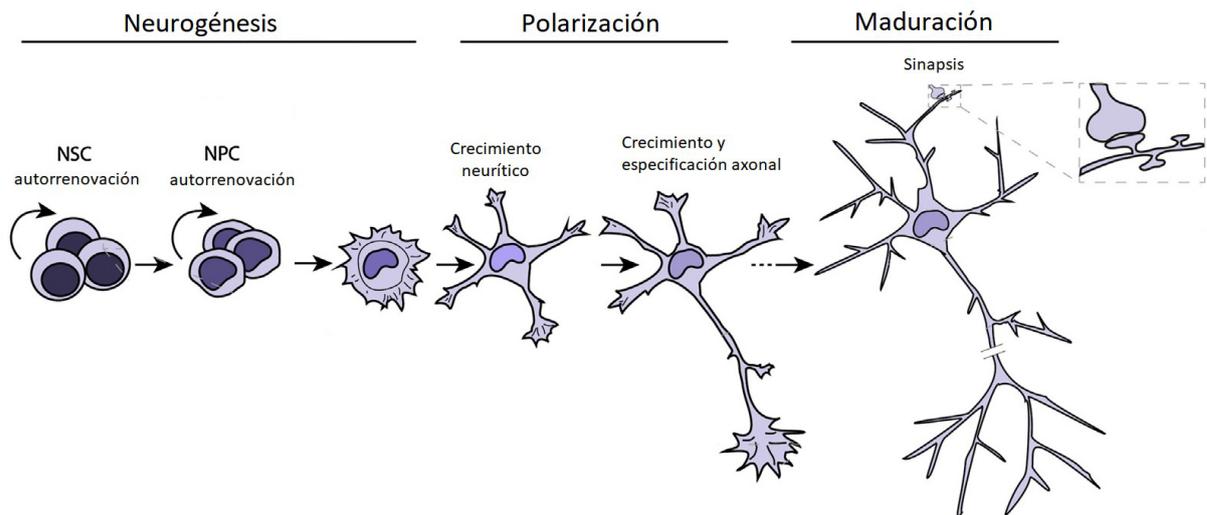


Figura 1. Representación gráfica de las sucesivas etapas en la adquisición de la polaridad neuronal y el desarrollo axonal. La figura ilustra el proceso de neurogénesis, polarización y maduración funcional. Las NSC (*neural stem cells*) poseen capacidad de autorrenovación debido a sus propiedades proliferativas. Señales extrínsecas e intrínsecas favorecen la diferenciación de NSC en neuronas post-mitóticas, para comenzar con el proceso de adquisición de polaridad. En esta etapa, se pierda la simetría celular, caracterizado por la especificación y crecimiento del axón. Posteriormente, se desarrollan las dendritas, las cuales experimentan procesos de ramificación, al igual que el axón en desarrollo. Finalmente, los compartimentos dendríticos y axonales alcanzan la madurez, formando las sinapsis. (Extraído y modificado de Wilson *et al.* 2018)

1.3) Fundamentos moleculares de la formación axonal y dendrítica de neuronas centrales

Los mecanismos que controlan el desarrollo axonal y dendrítico han sido estudiados

con detalle en las últimas décadas. La regulación de este proceso depende tanto de señales extrínsecas como intrínsecas, capaces de modular redes de señalización dependientes principalmente de TrkR (*tyrosine-kinase receptors*) y GPCR (*G protein-coupled receptors*). Estos receptores transducen señales que modifican la dinámica del citoesqueleto de actina y tubulina, y el tráfico vesicular, entre otros componentes. También desempeñan un papel fundamental en la destinación y retención selectiva de componentes tanto en el axón como en las dendritas en desarrollo, influyendo así sobre la morfología y funcionalidad de estos dominios (Takano *et al.*, 2019, Arimura & Kaibuchi, 2005, 2007; Wilson *et al.*, 2022).

No obstante, el estudio de los mecanismos que regulan la formación axo-dendrítica se ha enfocado principalmente en redes de regulación dependientes de proteínas. En cambio, los fundamentos genéticos y epigenéticos han sido relativamente poco estudiados, generando una desconexión entre los mecanismos celulares y la regulación del genoma durante las fases iniciales del neurodesarrollo (Wilson & Cáceres, 2021). Por lo tanto, integrar los aspectos genéticos y epigenéticos con las bases celulares del neurodesarrollo es fundamental para poder entender cabalmente el desarrollo, crecimiento y fisiología neuronal en contextos fisiológicos y patológicos.

1.4) Introducción al concepto de epigenética

En la década de 1960, Conrad Hal Waddington (Reino Unido), introdujo el concepto "epigenética", derivado de la palabra aristotélica "epigénesis", con el propósito de describir la rama biológica que explora las interacciones causales entre los genes y sus productos de expresión fenotípica (Waddington, 2017). El término "epigenética" reflejaba la necesidad de estudiar eventos "más allá" del gen, en un contexto histórico donde el rol que cumplían los genes en el desarrollo animal era aún incierto. Sin embargo, Waddington supuso que el

desarrollo embrionario implicaba necesariamente redes de interacciones génicas.

Waddington concebía el proceso de desarrollo en términos de lo que hoy en día se identificaría como “expresión génica diferencial” y “regulación”. Para ilustrar esta perspectiva, empleó la evocadora metáfora de "paisajes epigenéticos". En sus representaciones visuales (Figura 2 y 3), el sistema en desarrollo se asemeja a un paisaje con valles que se ramifican y profundizan a partir de un *plateau*, donde se encuentra simbolizado el huevo fertilizado (cigoto) (Waddington, 1940, 1957). El trayecto que conduce al final de cada valle simboliza el proceso de desarrollo que el cigoto experimenta hasta la formación de un tejido u órgano específico, regulado por la actividad e interacción de genes. En función de estas interpretaciones, Waddington propone que la relación entre un gen y su fenotipo no es necesariamente lineal, ya que las interacciones entre los genes y sus productos de expresión son fundamentales. En sus representaciones se ilustra que, si un gen muta y altera la tensión en un conjunto de cuerdas, el resultado no depende solo de ese gen, sino de la totalidad de las interacciones con los demás genes implicados (Figura 3). Este enfoque conceptual contribuyó a sentar las bases para la comprensión moderna de la expresión génica y la regulación diferencial en el desarrollo (Iyer & Baudet, 2014).

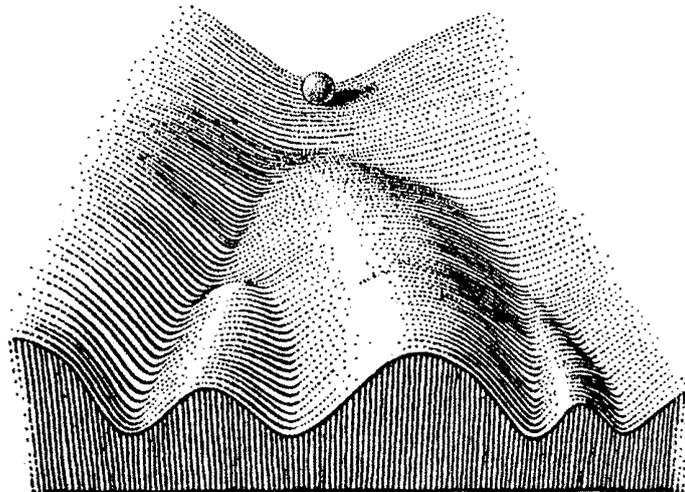


Figura 2. Paisaje epigenético de Waddington representando la ruta de desarrollo desde el huevo hasta el tejido u órgano que formará. (Extraído de Jablonka, & Lamb, 2002).

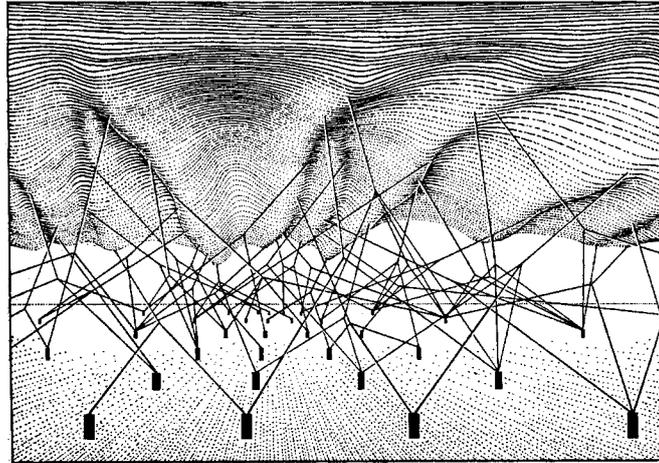


Figura 3. Paisaje epigenético con sus cursos y pendientes moldeados por genes e interacciones génicas representados por clavijas (genes) y cuerdas (‘tendencias químicas’ del gen). (Extraído de Jablonka & Lamb, 2002).

Para Waddington, la diferencia entre epigenética y genética del desarrollo reside en un cambio de enfoque. En este sentido, la epigenética resalta complejas redes de desarrollo, esto hace referencia a la interacción de proteínas y otras moléculas con los genes que éstas regulan y sus mecanismos compensatorios, mientras que la genética del desarrollo se centra en la jerarquía de un gen y su efecto en el fenotipo. En la actualidad, ambas disciplinas se entrelazan y la biología del desarrollo suele abordar esta problemática considerando las redes e interacciones génicas. Actualmente, la perspectiva de la epigenética ha sustituido en gran medida a la genética del desarrollo clásica. No obstante, no debemos asumir a la epigenética y la biología del desarrollo como sinónimos ya que ésta última es una disciplina mucho más amplia, abarcando todos los aspectos de la embriología, crecimiento, envejecimiento y regeneración (Jablonka & Lamb, 2002).

Actualmente, el concepto de “epigenética” difiere al concepto original de Waddington. Sin embargo, se debe valorar que este término siempre estuvo vinculado a las interacciones entre genes, sus productos y tanto el entorno interno como externo. El problema reside cuando se opaca el concepto de la epigenética haciendo referencia solo a la herencia de variaciones no relacionadas a cambios en el ADN (Jablonka & Lamb, 2002).

1.5) Fundamentos moleculares de la epigenética

A nivel molecular, entendemos a la epigenética como todas aquellas modificaciones químicas que, sin alterar la secuencia de un gen, influyen en su expresión (Wilson *et al.*, 2022). Dentro de estas modificaciones, destaca la metilación de los islotes CpG; regiones del ADN enriquecidas en citosinas (C) y guaninas (G) (CpG), generalmente ubicadas cerca

de regiones promotoras de un gen (Suzuki *et al.*, 2001). Además, podemos mencionar diversas modificaciones post-traduccionales (MPT) de histonas, como metilaciones y acetilaciones, principalmente detectadas en residuos de lisina de las isoformas 3 (H3) y 4 (H4). Mientras que el ciclo de metilación/demetilación de histonas está mediado por metiltransferasas (HMT) y demetilinasas (HDMT), la acetilación es catalizada por acetiltransferasas (HAT) y deacetilasas (HDAT). El conjunto de las MPT de histonas actualmente reportadas se resume en el código de histonas (Cheung *et al.*, 2000; Strahl & Allis, 2000; Gardner *et al.*, 2011; Wilson & Cáceres, 2021). En conjunto, estas modificaciones remodelan la topología de la cromatina, favoreciendo o reprimiendo la transcripción. Además, en otro nivel de regulación epigenética, es importante mencionar la contribución de los ARNs no codificantes de cadena larga y corta, microARNs, ARN circulares, entre otros, con efecto transcripcional y traduccional (Iyer & Baudet, 2014; Corradi *et al.*, 2020; Bellon *et al.*, 2017; Meister, 2013).

Durante el desarrollo y vida de todo organismo, el código de histonas no se mantiene constante. En el caso particular de las neuronas, metilaciones y acetilaciones en las histonas 3 y 4, principalmente, se han relacionado con la regulación de la extensión y guía axonal; el proceso mediante el cual un axón crece orientado por moléculas atractivas o repulsivas (Abay-Nørgaard *et al.*, 2020; Mariani, 2016; Riveiro *et al.*, 2017; Kleine-Kohlbrecher *et al.*, 2010). El cono de crecimiento axonal, una estructura rica en actina de la porción terminal de este compartimento, confiere propiedades de navegación durante la axogénesis, gracias a la presencia de receptores de moléculas que orientan el crecimiento. Para llevar a cabo esta tarea, el cono de crecimiento también desencadena procesos de remodelación a nivel local. Esto influye en la reorganización del citoesqueleto, especialmente de los microfilamentos de actina (F-actina) y microtúbulos (MT) (Bradke & Dotti, 2000; Witte *et al.*, 2008; Stiess & Bradke, 2011). No obstante, aún es incierto el nexo entre el remodelado de histonas con blancos genéticos específicos durante el desarrollo axón-dendrita.

Nuestro laboratorio ha descrito que la histona metil-transferasa G9a, que cataliza la bi-metilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me2) – un código represor de la expresión genética – es fundamental para el crecimiento del axón (Wilson *et al.*, 2020). Su delección genética, así como la inhibición farmacológica, impide la especificación axonal de neuronas de rata en cultivo, así como la migración cortical de neuronas en cerebros de ratón *in situ*. En este estudio se reporta que G9a reprime la expresión de inhibidores del desarrollo neuronal temprano, como el eje de señalización Lfc-RhoA-ROCK.

Sin embargo, G9a carece de sitios de unión al ADN. Por lo tanto, su acción depende de

la mediación de intermediarios, como REST y CoREST (Ballas *et al.*, 2005; Roopra *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2003).

1.6) Contribución del represor transcripcional REST al desarrollo neuronal

El desarrollo neuronal es el resultado de un balance de fuerzas, promotoras y represivas, que marcan el pulso de la diferenciación, crecimiento y maduración. (Anderson & Jan, 1997; Edlund & Jessell, 1999). Dentro de las fuerzas represivas, el factor transcripcional REST/NRSF (*repressant element-1 silencing transcription factor / neuron-restrictive silencer factor*), cumple funciones importantes. REST es una proteína de aprox. 100 kDa que se une a sitios consenso en el ADN llamados *regulatory elements 1* (RE-1). Consta de una secuencia de 1092 aa en *Homo sapiens*, 1082 aa en *Mus musculus* y 1069 aa en *Rattus norvegicus*, todos genes ortólogos entre sí. En humanos, el gen que la codifica está localizado en el cromosoma 4q12 y presenta 5 exones, de acuerdo con datos extraídos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). La evidencia señala que REST, al unirse a sitios RE-1, reprime la expresión de diversos genes neuronales. Entre ellos, podemos mencionar al gen SCG10, codificante de statmina 2, el gen codificante del canal de sodio tipo II, el *factor neurotrófico cerebral* (BDNF), la proteína asociada a microtúbulos *doublecortin* (DCX) y la proteína sináptica sinapsina I, entre otros. De esta forma, REST previene la adopción del fenotipo neuronal en células no neuronales, además de mantener la multipotencia de las células madre neuronales (NSC) (Ballas *et al.*, 2005; Schoenherr *et al.*, 1996; Ballas *et al.*, 2001). Durante la neurogénesis, REST es silenciado transcripcional y traduccionalmente, desencadenando la diferenciación de NSC en neuronas post-mitóticas a través de la expresión de genes neuronales antes reprimidos. Por estos motivos, se considera a REST un regulador maestro de la pluripotencialidad o progenitores neuronales.

Sin embargo, estudios posteriores cuestionan la ausencia de REST en neuronas post-mitóticas, sugiriendo que su actividad depende del modelo de estudio y el contexto fisiopatológico. Alineado con esta hipótesis, estudios recientes señalan que REST aumenta su expresión en cerebros humanos durante el envejecimiento, donde reprimiría la expresión de genes pro-apoptóticos (Lu *et al.*, 2014). En función de estos resultados, REST podría ser un factor protector ante el envejecimiento del cerebro. Siguiendo esta línea argumentativa, estudios recientes han identificado niveles indetectables de REST en cerebros de individuos con la enfermedad de Alzheimer (AD) en su forma esporádica, donde además se observa una hiperactivación de mecanismos apoptóticos (Meyer *et al.*, 2019).

En roedores también se ha detectado la expresión de REST en estadios avanzados del

desarrollo cerebral. Mediante la técnica de *western blot*, se detectó un pico de expresión de REST en el hipocampo de cerebros de ratón entre los 14 y 15 días post natales, decayendo su expresión posteriormente. Esta expresión post-natal de REST se asocia con la maduración de la sinapsis glutamatérgica, favoreciendo la expresión y ensamblado de la subunidad N2A al receptor de NMDA (Rodenas-Ruano *et al.*, 2012).

Colectivamente, estas evidencias indican que REST reaparece en estadios avanzados del desarrollo y la vida humana. Sin embargo, la diversidad de modelos de estudio y especies animales, así como diferencias entre los tiempos del desarrollo, dificultan entender la expresión y función de REST en neuronas post-mitóticas. Por ello, la contribución de REST en las neuronas del sistema nervioso central aún es controversial.

1.7) Rol de los represores CoREST y G9a en el desarrollo y crecimiento neuronal

CoREST, un correpresor descubierto por su asociación con REST (Andrés *et al.*, 1999), se expresa post-mitóticamente en neuronas de rata y ratón, donde favorece la migración cortical de neurona en cerebros embrionarios de ratón (Fuentes *et al.*, 2012). Además de la función que cumple CoREST en asociación a REST en la especificación de células neurales (Johnson *et al.*, 2008; Abrajano *et al.*, 2010; Qureshi *et al.*, 2010), estudios indican que también genera cambios en la cromatina, regulando así la expresión génica, de manera independiente (Abrajano *et al.*, 2009). Sin embargo, resulta desconocida su interacción con G9a en neuronas durante su desarrollo temprano y su consecuente contribución al homeostasis de la marca H3K9me2.

Por otra parte, la histona metiltransferasa G9a se ha visto implicada en aspectos como la neurogénesis (Kim *et al.*, 2016; Olsen *et al.*, 2016), el crecimiento neurítico (Fiszbein *et al.*, 2016; Fiszbein & Kornblihtt, 2016), la plasticidad sináptica (Sharma *et al.*, 2017a, 2017b; Sharma & Sajikumar, 2019) y la neurodegeneración (Liang *et al.*, 2016a, 2016b). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha identificado que en ausencia de G9a se inhibe la polarización de neuronas hipocampales de rata y el crecimiento axonal (Wilson *et al.*, 2020). De forma similar, la supresión de CoREST en cerebros embrionarios de ratón reduce la migración neuronal durante el desarrollo de la corteza cerebral (Fuentes *et al.*, 2012). Además, algunos reportes actuales sugieren que la ausencia de REST en el cerebro adulto conduce a la activación de mecanismos proapoptóticos (Lu *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2019). En base a estos antecedentes, sostenemos que, de existir un complejo represor formado por REST, CoREST y G9a, este podría regular el crecimiento, la supervivencia y/o muerte de las neuronas en etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, la expresión

temporal de estos represores no ha sido caracterizada a lo largo del desarrollo de neuronas post-mitóticas de origen humano o murino.

1.8) Definición del problema

Considerando el rol represor de los factores REST, CoREST y G9a, resulta de interés estudiar su contribución al desarrollo, crecimiento y supervivencia de neuronas post-mitóticas. Sin embargo, la ausencia de una caracterización detallada de la expresión y distribución de estos factores durante el desarrollo neuronal dificulta comprender sus funciones durante este proceso. Este trabajo de tesis aborda este problema, utilizando como modelo de estudio neuronas en cultivo de origen humano, obtenidas por diferenciación de iPSC (*induced pluripotent stem cells*), y neuronas de hipocampo aisladas de cerebros embrionarios de rata, técnicas de inmuno-detección y microscopía confocal.

2) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los represores transcripcionales REST, CoREST y G9a se expresan durante el desarrollo post-mitótico de neuronas humanas y neuronas de hipocampo de cerebro embrionario de rata para promover su desarrollo y crecimiento.

Objetivo general

Caracterizar la expresión de los represores transcripcionales REST, CoREST y G9a en neuronas hiPSC y neuronas hipocámpales de rata durante su desarrollo post-mitótico.

Objetivos específicos (OE)

OE1. Caracterizar la expresión de REST, CoREST y G9a en neuronas hiPSC en cultivo.

OE2. Caracterizar la expresión de REST, CoREST y G9a en neuronas de hipocampo de cerebro embrionario de rata en cultivo.

3) MATERIALES Y MÉTODOS

3.1) Cultivo de neuronas humanas a partir de la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas

Se cultivaron neuronas de origen humano obtenidas por diferenciación de células madre pluripotentes inducidas (human induced pluripotent stem cells, hiPSC). Las hiPSC se obtuvieron mediante reprogramación genética de fibroblastos de piel humana utilizando los factores de Yamanaka (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007), en la Plataforma de Células Madre de la Fundación Instituto Leloir (PLACEMA-FIL-CONICET, Buenos Aires, Argentina). Las hiPSC fueron descongeladas y amplificadas en el Laboratorio de Investigación en Células Madre (LINCEMA) del Centro de Investigación en Medicina Traslacional Severo R. Amuchástegui (CIMETSA) por profesionales especializadas. En síntesis, el cultivo y diferenciación neuronal se resume en 3 etapas principales.

3.1.1) Reproducción y cultivo de hiPSC

Las hiPSC se descongelaron y cultivaron sobre una monocapa de fibroblastos embrionarios de ratón (inactivados por radiación) en medio DMEM/F12 suplementado con 20% de suero KSR (*knock-out serum substitute*), Glutamax, aminoácidos no esenciales, 20 ng/mL bFGF, β -mercaptoethanol, HEPES, Fungizone y Pen/Strep. Las hiPSCs crecieron formando colonias llamadas “Cuerpos Embrionarios” (CE).

3.1.2) Inducción neural de hiPSC en cultivo

Los CE, ricos en células madre pluripotentes, se indujeron a adoptar un fenotipo de célula madre neuronal multipotente mediante la acción de factores que promueven la adopción del linaje neuronal. Para ello, los CE fueron removidos mecánicamente y subcultivados en placas de cultivo pre-tratadas con Geltrex y Medio de Inducción Neural (NIM: DMEM/F12, N2, Glutamax, aminoácidos no esenciales, Heparina y bFGF 20 ng/mL). Luego de aprox. 10 días, se obtuvieron agrupaciones celulares conocidas como rosetas neurales, enriquecidas en célula madre neuronales multipotenciales, (*neural stem cells*, NSC).

3.1.3) Diferenciación de NSC en neuronas

Para inducir la diferenciación final a neuronas post-mitóticas, las rosetas neurales se disociaron enzimática y físicamente, con el objetivo de obtener células madre neuronales (NSC) aisladas. Luego, las NSC se cultivaron sobre cubre-objetivos de vidrio pre-tratados con Geltrex y medio de diferenciación neuronal NDM (*neural differentiation medium*): Neurobasal, B27, Glutamax, NEAA, BDNF, GDNF, Ac. Ascórbico, IGF-1 y AMPc). Los días *in vitro* (DIV) consignados en la metodología comienzan a contarse desde esta etapa.

3.2) Cultivo de neuronas de hipocampo aisladas de cerebros embrionarios de rata

Se cultivaron neuronas de hipocampo de cerebros embrionario de rata de 18 días de gestación, de acuerdo con protocolos previamente establecidos (Kaech & Banker, 2006; Wilson *et al.*, 2020). En síntesis, se sacrificó una rata preñada por cultivo en una cámara de CO₂ y se removieron los embriones del útero. Estos fueron decapitados y los cerebros aislados quirúrgicamente. Se extrajeron los hipocampos mediante disección bajo lupa (2 por cerebro; aprox. 16 por cultivo) y se digirieron con tripsina durante 20 min a 37°C. Luego, se disgregaron mecánicamente mediante resuspensión con una micropipeta p1000 y posteriormente una micropipeta p200. El rendimiento de cultivo se estimó mediante el conteo de células en una cámara de Neubauer. Se sembraron aprox. 50.000 neuronas sobre cubreobjetos de vidrio pre-tratados con poli-L-lisina (*overnight* (ON; 16-18 h), 37°C), dispuestos en una multiplaca de 24 pocillos. Las neuronas se cultivaron durante la primera hora en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), para promover su adhesión. Posteriormente, este medio se reemplazó por Neurobasal suplementado con B27, Glutamax y antibióticos (penicilina y estreptomicina). Cada 3 días se renovó el medio de cultivo, preservando al menos la mitad del medio condicionado por cada pocillo.

3.2.1) Fijación de neuronas en cultivo derivadas de hiPSC e hipocampos embrionarios de rata (E18).

Las neuronas se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA) y sacarosa al 4% p/v en buffer fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM NaH₂PO₄). El procedimiento de fijación se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, bajo campana de flujo tipo II previamente desinfectada con una solución de etanol al 70% v/v y esterilizada con luz UV por 10 min. Posteriormente, se encendió el flujo por 10 min hasta su estabilización. En el caso de la curva de diferenciación del objetivo específico 1, los cubre-objetos con neuronas se trasladaron de la multiplaca de cultivo a otra de fijado utilizando pinzas estériles, y se lavaron con 400 µL de PBS (neuronas hiPSC diferenciadas por 7, 14 y 21 DIV y neuronas hipocampales de rata E18 cultivadas por 1, 3, 7 y 14 DIV). Una vez depositados los cubre-objetos en la placa de fijado, se descartó el PBS de cada pocillo para continuar con el fijado de las neuronas. Cada pocillo de la multiplaca de fijado se incubó con 500 µL de solución de fijación durante 20 min a temperatura ambiente (TA), seguido de tres lavados de 10 min con PBS (400 µL por pocillo). Posteriormente, las muestras se mantuvieron en 500 µL de PBS almacenados a 4°C hasta el

momento de completar la curva de diferenciación para continuar con la inmunodetección.

3.3) Detección mediante inmunofluorescencia indirecta de epítomos de interés

Los cubreobjetos con neuronas fijadas se montaron sobre una tapa de una multiplaca de 24 pocillos, revestida por una capa de *Parafilm*. Luego, se realizaron 3 lavados rápidos con 50 μ L de PBS 1X por cubreobjeto. Luego, las neuronas se permeabilizaron con una solución al 0,2% v/v de Tritón-x100, diluida en PBS. Cada cubreobjeto se cubrió con 50 μ L de solución de permeabilización durante 10 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se incubaron los anticuerpos primarios para detectar cada proteína de interés: REST (1:500, ratón, AbCam, n° cat.: ab211537), CoREST (1:1.000, conejo, Sigma, n° cat.: HPA021638-25UL), G9a (1:1.000, conejo, Sigma, n° cat.: SAB2700645 SIGMA), H3K9me2 (1:2.000, conejo, AbCam, n° cat.: ab176882) y MAP2 (1:5000, pollo, BioLegend, n° cat.: 822501). Todos los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo se diluyeron una solución al 0,1% v/v de Tween-20 en PBS. Cada cubreobjeto se incubó con una gota de 50 μ L de solución de anticuerpo primario a 4°C durante ON en una cámara húmeda.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados con una solución de PBS-Tween 0,1% v/v a TA, cada uno de 5 min de duración. Posteriormente, se incubaron 50 μ L de los anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos contra las especies animales de interñes (AlexaFluor 488 nm, 568 nm, 633 nm; Thermo Scientific), diluidos 1:1000 en PBS Tween 0.1% v/v, durante 60 min a TA. Después de la incubación, se lavó con PBS-Tween 0,1% v/v durante 5 min a TA. Para delimitar el área nuclear, se llevó a cabo la tinción del ADN con la sonda DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), marcador fluorescente que se une a las bases nitrogenadas timina y adenina. Para ello, se incubó con una gota de 50 μ L de DAPI (1:5000, Sigma) en cada cubreobjeto durante 5 min. Finalmente, se lavó con 50 μ L de PBS durante 5 min finales y se montó en un portaobjetos de vidrio, utilizando el medio de montaje Mowiol (SIGMA). Los preparados se mantuvieron a 4° C hasta su observación en el microscopio confocal.

3.4) Adquisición de imágenes.

Las muestras se observaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 del Centro de Microscopía y Nanoscopía de Córdoba (CEMINCO). Dependiendo del tipo de preparación, las muestras se excitaron con diferentes longitudes de onda: 405 nm para DAPI y 488, 546, 633 nm para los fluoróforos AlexaFluor. La emisión recolectada fue de 465 nm, 517 nm, 603 nm y 647 nm. Se configuraron los parámetros de adquisición con un pinhole

de 1 Airy Unit (AU) y se empleó un objetivo de 63x, aplicando un zoom digital de 1,2. Las imágenes se obtuvieron mediante cortes ópticos en la modalidad z-stack, adquiriéndose en promedio 10 cortes ópticos (*slices*) por cada neurona.

3.5) Análisis de imágenes y cuantificación de la señal fluorescente

Posteriormente, las imágenes se procesaron utilizando el software Fiji-ImageJ, donde se sustrajo la señal de fondo (*background*), se aplicó un filtro de mediana y se optimizó el brillo y contraste de la imagen sin alterar el perfil RGB. Para la cuantificación de marcas, se seleccionaron las células MAP2+, marcador neuronal. Para obtener el total de la intensidad de fluorescencia correspondiente a cada inmunodetección, se proyectó la suma de los planos z mediante el plug-in de Fiji “Z-SUM”. Luego, cada imagen proyectada de la suma total de fluorescencia se utilizó para definir regiones de interés (ROI, *region of interest*); secciones poligonales para delimitar el área del núcleo (región DAPI+) y del soma. Una vez realizada la selección, se cuantificó la intensidad de la señal nuclear y citosólica (soma).

3.6) Procesamiento de datos, estimación de la señal nuclear, citoplasmática y razón núcleo/citoplasma

Los datos resultantes guardaron en una planilla de cálculo (Excel, Microsoft Office) para su posterior análisis. Los datos obtenidos fueron ordenados, separando cada factor en hojas propias, y organizándolos por día de tratamiento, y clasificando la señal del núcleo y citoplasma. Por lo tanto, el dato de las señales nucleares y citoplasmáticas de cada neurona quedaron emparejadas para posteriores análisis.

La normalización de los datos para el núcleo y citoplasma se realizó tomando como valor de referencia el promedio de la señal correspondiente a los 7 DIV para neuronas humanas iPSC y 1 DIV para neuronas hipocampales de rata E18.5, de manera independiente para cada compartimento. Luego se calculó el cociente de cada valor con respecto a este promedio ($x \text{ Núcleo} / \text{promedio Núcleo}$; $x \text{ Citoplasma} / \text{promedio Citoplasma}$), en todos los tiempos de ambos modelos.

Para calcular la razón entre el núcleo y citoplasma, se tomaron los datos previamente ordenados y se realizó un cociente entre los valores crudos del núcleo y el citoplasma de cada neurona en ambos modelos, en todos los tiempos. Esto se realizó con los factores REST, CoREST y G9a.

3.7) Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico, se utilizaron los datos normalizados mencionados en la sección previa. Se procedió a realizar la estadística utilizando la herramienta GraphPad Prism 9.0.2 (Software GraphPad Prism, Boston, Massachusetts USA). Para verificar si los datos tenían una distribución normal se llevó a cabo la prueba de normalidad “Shapiro-Wilk”. La identificación de los grupos significativamente diferentes entre 3 poblaciones para neuronas hiPSC (7, 14 y 21 DIV), y 4 poblaciones para neuronas hipocampales de rata E18,5 (1, 3, 7 y 14 DIV) fue realizada aplicando un ANOVA con el test Kruskal-Wallis con comparación múltiple entre los 7,14 y 21 DIV en neuronas humanas iPSC; y 1,3,7 y 14 DIV para las neuronas hipocampales de rata E18,5. En el caso de la comparación entre 2 poblaciones, se utilizó el test Mann-Whitney. Las diferencias entre poblaciones fueron consideradas significativas cuando el *p-value* fue inferior a 0,05 (*<0,05, **<0,01, ***<0,001, <****0,0001). Las estimaciones fueron realizadas en set de datos provenientes de diferentes cultivos (N). El número de cultivos (N) y de neuronas analizadas (n) se indica en cada leyenda de figura.

4) RESULTADOS

Caracterización del cultivo de neuronas hiPSC

Para caracterizar la expresión y distribución de los represores transcripcionales REST, CoREST y G9a, en este trabajo utilizamos como modelo de estudio neuronas en cultivo de origen humano y murino. Las neuronas humanas se obtuvieron por diferenciación de células madre pluripotentes inducidas (*induced pluripotent stem cells*, iPSC). La reprogramación de fibroblastos humanos en iPSC se realizó en el laboratorio PLACEMA de la Fundación Instituto Leloir (ver materiales y métodos). Una vez obtenidas las iPSC, estas fueron diferenciadas en neuronas centrales en el Laboratorio de Investigación en Células Madre (LINCEMA) del CIMETSA, IUCBC.

Estudios recientes señalan que el desarrollo de neuronas humanas en cultivo, obtenidas por diferenciación de iPSC (“neuronas hiPSC”), presenta algunas diferencias con respecto al cultivo de neuronas embrionarias de rata y ratón (Dotti *et al.*, 1988; Clowry *et al.*, 2010; Molnár & Clowry, 2012; Silbereis *et al.*, 2016; Marchetto *et al.*, 2019, Lindhout *et al.*, 2020). Particularmente, las neuronas hiPSC presentan 3 estadios principales de diferenciación y se desarrollan *in vitro* más lento que una neurona de rata en cultivo. Mientras que las neuronas de rata alcanzan el estadio 3 en aproximadamente 1,5 días de cultivo, las neuronas humanas lo hacen entre los 7-14 DIV (Lindhout *et al.* 2020). En el estadio 1 de neuronas hiPSC se encuentran células que expresan marcadores característicos

de precursores, como SOX2 y Nestina. Luego, en el estadio 2, las NSC se diferencian en neuronas que comienzan a desarrollar un compartimento axonal y dendrítico, exhibiendo la morfología neuronal característica de neuronas glutamatérgicas (Lindhout *et al.* 2020; Wilson *et al.* 2022). Finalmente, en el estadio 3 de neuronas hiPSC las neuronas ya se encuentran polarizadas, exhibiendo el ensamblado del segmento inicial del axón y actividad eléctrica (Lindhout *et al.* 2020).

En función de este curso temporal, nuestro laboratorio realizó previamente una caracterización del cultivo de neuronas hiPSC (Fig. 4, datos no publicados). Mediante un ensayo de inmunofluorescencia y microscopía confocal, se detectó la expresión de la proteína asociada a microtúbulos *Doublecortin* (DCX); un marcador molecular de neuronas post-mitóticas recientemente diferenciadas (Gleeson *et al.*, 1999). Las neuronas se cultivaron por 3, 7, 14 y 21 DIV. Además, las neuronas se tiñeron con el marcador DAPI para identificar el total de células en cultivo en cada tiempo de análisis. La Fig. 4A señala un aumento progresivo del número de neuronas DCX+, alcanzando un máximo de un 50% a los 21 DIV (Fig. 4B). Además, se observó que la longitud axonal aumenta progresivamente a medida que el cultivo se diferencia *in vitro*, alcanzado un máximo también a los 21 DIV (Fig. 4C).

Si bien el crecimiento neurítico es un criterio morfológico de maduración, decidimos evaluar también la excitabilidad de las neuronas hiPSC en el estadio 1 (7 DIV), 2 (14 DIV) y 3 (21 DIV), mediante ensayos de despolarización con KCl en neuronas vivas y microscopía de fluorescencia. Las neuronas se cargaron con la sonda fluorescente Fluo4-AM, cuya emisión fluorescente es proporcional a la cantidad de Ca²⁺ quelado en el citoplasma. Se tomaron imágenes confocales en la modalidad *time-lapse*, adquiriendo campos cada 2 segundos durante 3 min totales. En t=1 min las neuronas se trataron con 120 mM KCl y se registró la fluorescencia de la sonda Fluo4 hasta completar el registro (t=3 min) (Figura 4D-F). La Fig. 4D-F ilustra el aumento en la entrada de Ca²⁺ evocada por 120 mM KCl, aumentado su intensidad y consistencia a los 14 y 21 DIV (Fig. 4E, F). Estos resultados sugieren que las neuronas hiPSC de nuestro laboratorio se vuelven progresivamente excitables a partir de los 14 DIV (estadio 2), de acuerdo con reporte de otros grupos de investigación (Lindhout *et al.*, 2020).

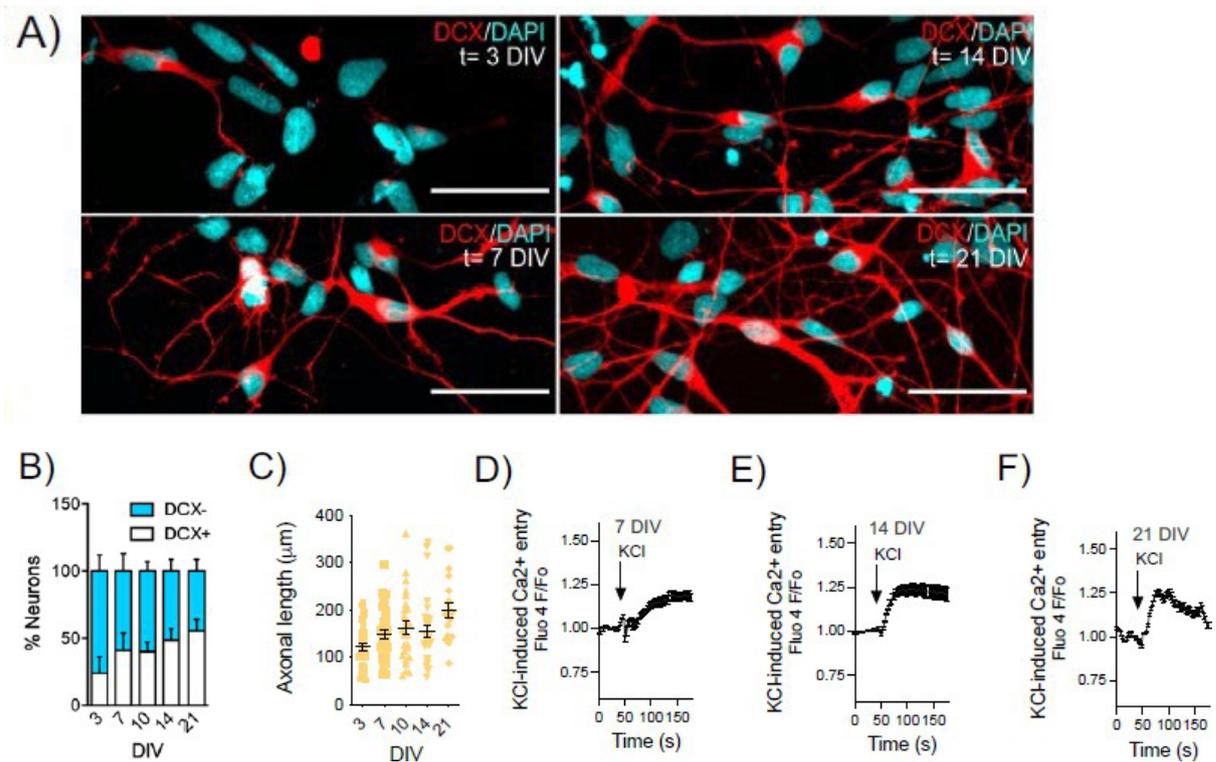


Figura 4. Diferenciación neuronal de iPSC humanas. A) Imágenes confocales representativas del cultivo de neuronas hiPSC de 3-21 días *in vitro* (DIV). Inmunofluorescencia: Doblecortina (DCX, marcador neuronal), DAPI (núcleo). Escala 200 μm. B) Estimación del porcentaje de diferenciación neuronal (% Neurons) de hiPSC de 3-21 DIV. C) Longitud axonal (*axonal length*) de neuronas hiPSC de 3-21 DIV. D-F) Despolarización inducida por entrada de Ca²⁺ (*KCl-induced Ca²⁺ entry Fluo 4 F/Fo*) en neuronas hiPSC a 7-21 DIV. Las neuronas se cargaron con Fluo4-AM seguido de microscopía confocal por lapsos de tiempo (*time*). 120 mM KCl se añadió a t=60 s. Datos no publicados de la Unidad de Genética del Crecimiento y Sobrevida Neuronal.

Caracterización de la expresión y distribución de los factores REST, CoREST, G9a en neuronas hiPSC y de rata en cultivo.

Se estudió la expresión y distribución de los represores transcripcionales REST, CoREST y G9a simultáneamente en dos modelos neuronales: neuronas hiPSC y neuronas de hipocampo de rata, aisladas de cerebros embrionarios de 18,5 días de gestación (E18,5). En el caso de las neuronas hiPSC, se cultivaron por 7, 14 y 21 DIV, mientras que las neuronas de rata por 1, 3, 7 y 14 DIV. Luego de completar cada tiempo de cultivo, las neuronas se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA) y sacarosa (SAC) al 4% p/v, disueltas en buffer fosfato salino (PBS, *phosphate buffer saline*). Luego de completar la fijación de todos los tiempos que conforman cada curva de desarrollo, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia (IF) utilizando anticuerpos comerciales para detectar la expresión de cada represor transcripcional. Es importante destacar que la IF se realizó solo después de haber recolectado todos los tiempos que conforman la curva de desarrollo para cada especie,

evitando así artefactos atribuibles a errores en las diluciones de anticuerpos utilizados durante la IF o la adquisición de imágenes. Posteriormente, las muestras fueron observadas en microscopio confocal Zeiss LSM 800 (CEMINCO, Córdoba), utilizando la modalidad *z-stack* en todos los casos (ver materiales y métodos). Las imágenes fueron luego analizadas, cuantificadas y procesadas con el software Fiji-ImageJ.

Expresión y distribución sub-celular del represor transcripcional REST/NRSF en neuronas hiPSC en cultivo

La Fig. 5 ilustra la expresión y distribución citoplasmática y nuclear de REST en neuronas hiPSC en cultivo a los 7, 14 y 21 DIV. En la Fig. 5A se muestran imágenes representativas que proyectan la máxima intensidad de fluorescencia de la proteína asociada a microtúbulos MAP2 (verde), marcador neuronal y somato-dendrítico, y el represor REST (rojo). Se muestra además el pseudocolor *Fire LUT* como un mapa térmico de la intensidad de fluorescencia (colores fríos: baja detección; colores cálidos: alta detección). Se desprende cualitativamente de la Fig. 5A que REST se enriquece progresivamente en neuronas hiPSC en cultivo, alcanzando niveles máximos de detección a los 21 DIV.

Con el objetivo de asignar un valor cuantitativo a la descripción anterior, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de la detección de REST en el núcleo y citoplasma de la neurona. En ambos casos, se proyectó la suma de la intensidad de fluorescencia de cada rebanada óptica del *z-stack* (*z-sum*). Se delimitó una región de interés (ROI, *region of interest*) en el núcleo, definida por el marcador de timinas DAPI (ver materiales y métodos). Por otra parte, el citoplasma se delimitó con un ROI poligonal que abarcó el soma de la neurona, excluyendo el citoplasma neurítico. Las Fig. 5B y 5C señalan que REST se enriquece progresivamente en el núcleo y citoplasma de neuronas hiPSC entre los primeros 7 y 21 DIV, respectivamente, alcanzando diferencias estadísticas a la 21 DIV con respecto a los 7 DIV. Se evaluó también el enriquecimiento nuclear mediante la estimación de la razón núcleo/citoplasma. La Fig. 5D indica que REST se enriquece nuclearmente a los 21 DIV en neuronas hiPSC. En síntesis, la Fig. 5 señala que REST se expresa progresivamente en neuronas hiPSC en cultivo, logrando un enriquecimiento nuclear a los 21 DIV (estadio 3 de neuronas hiPSC).

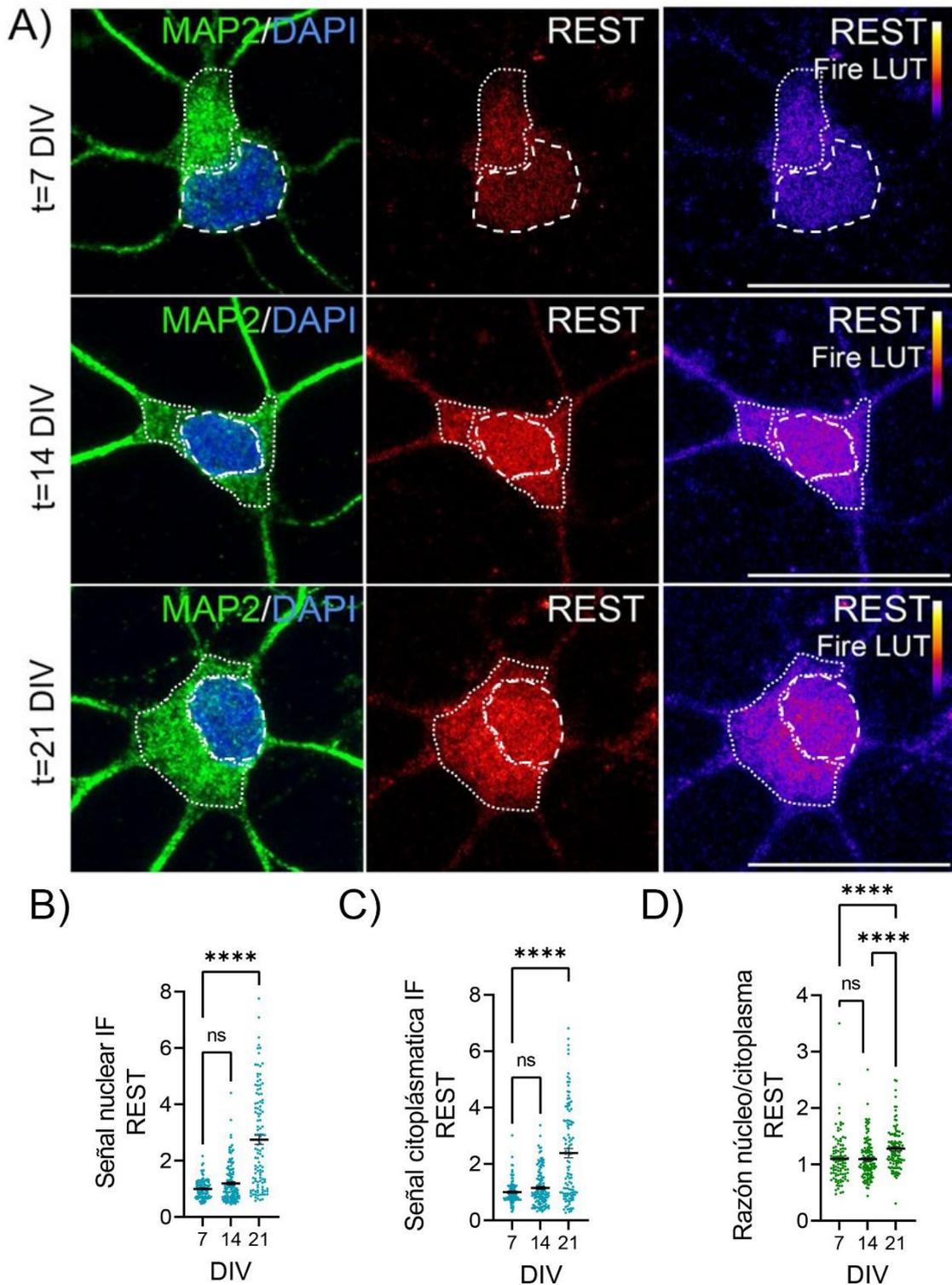


Figura 5. Expresión y distribución del factor REST en neuronas hiPSCs. A) Las neuronas humanas iPSC (N= 4) se cultivaron a 3 tiempos (t)= 7 (n= 98), 14 (n= 124) y 21 (n= 113) DIV y se fijaron con PFA/sacarosa al 4%. MAP2 (verde, marcador neuronal) y REST (rojo) se detectaron por inmunofluorescencia (IF) y se realizó un *z-stack* de imagen confocal. Se analizó el *z-stack* obtenido utilizando la herramienta informática FIJI. El núcleo se identificó mediante la tinción DAPI (azul). Escala 20 μ m. B, C) Cuantificación de la señal de IF en núcleo y citoplasma respectivamente (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple). D) Razón núcleo/citoplasma (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple).

Expresión y distribución sub-celular del represor transcripcional REST/NRSF en neuronas embrionarias de rata en cultivo.

En forma análoga a los estudios realizados en neuronas hiPSC, se estudió la expresión y distribución de REST en neuronas embrionarias de rata (E18,5) (Fig. 6). Se analizó la expresión de REST en neuronas de 1, 3, 7 y 14 DIV, tiempos de cultivo que reflejan neuronas no polarizadas (1 DIV), polarizadas (3 DIV), post-polarizadas (7 DIV) y en fase de maduración funcional (14 DIV) (Wilson *et al.*, 2020). De esta forma, se abarcó temporalmente la maduración morfológica y funcional de neuronas de rata en cultivo.

La Fig. 6A muestra imágenes representativas de la máxima intensidad de fluorescencia (*z-max*) de la proteína MAP2 y REST en neuronas de rata cultivadas por 1, 3, 7 y 14 DIV. Cualitativamente, se observa un incremento en la detección de REST durante el desarrollo en cultivo, reflejado también mediante el pseudocolor *Fire LUT*. Las Fig. 6B-D ilustran la cuantificación de la señal nuclear y citoplasmática de REST (Fig. 6B, C), así como su enriquecimiento nuclear (Fig. 6D). La Fig. 6B señala que REST es detectable en el núcleo desde $t=1$ DIV, alcanzando aumentos estadísticamente significativos a los 3, 7 DIV y 14 DIV, cuando alcanza un *plateau* (Fig. 6B).

Por otra parte, la señal citoplasmática de REST solo logra un aumento estadísticamente significativo a los 7 DIV (Fig. 6C). Luego, a los 14 DIV se restituye su expresión a un nivel comparable con 1 DIV. Finalmente, la razón núcleo/citoplasma de REST ratifica un aumento estadísticamente significativo en $t=7$ DIV y $t=14$ DIV (Fig. 6D), sugiriendo el enriquecimiento nuclear de este factor luego de la primera semana de cultivo, cuando las neuronas de rata están completamente polarizadas y electroquímicamente funcionales.

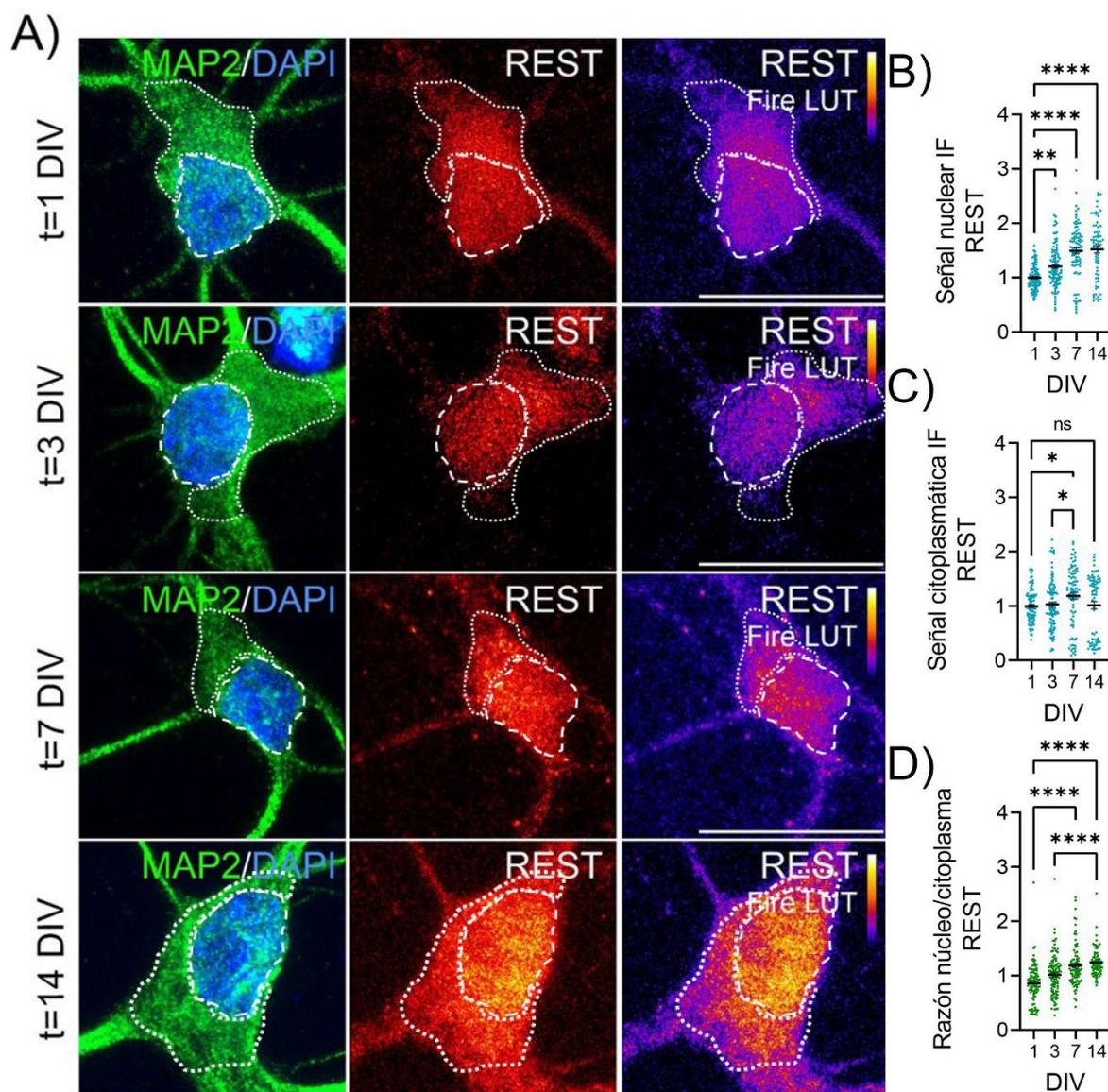


Figura 6. Expresión y distribución del factor REST en neuronas embrionarias de rata (E18,5). A) Las neuronas embrionarias de rata (N= 3) se cultivaron a 4 tiempos (t)= 1 DIV (n= 91), 3 DIV (n= 103), 7 DIV (n= 85) y 14 DIV (n= 70) y se fijaron con PFA/sacarosa al 4%. MAP2 (verde, marcador neuronal) y REST (rojo) se detectaron por inmunofluorescencia (IF) y se realizó un *z-stack* de imagen confocal. Se analizó el *z-stack* obtenido utilizando la herramienta informática FIJI. El núcleo se identificó mediante la tinción DAPI (azul). Escala 20 μ m. B, C) Cuantificación de la señal de IF en núcleo y citoplasma respectivamente (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple). D) Razón núcleo/citoplasma (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple).

Comparación del enriquecimiento nuclear de REST entre neuronas hiPSC y neuronas de rata.

Considerando estos hallazgos, resultó interesante comparar la relación de la expresión de REST entre el núcleo y citoplasma de ambos modelos neuronales. Para ello, analizamos los datos de los 14 DIV para las neuronas murinas, y los 21 DIV para las neuronas hiPSC, ya que corresponden al tiempo de cultivo donde se observaron los máximos

enriquecimientos nucleares en ambos modelos (Fig. 7). Este análisis no muestra diferencias significativas en la razón núcleo/citoplasma, sugiriendo que REST se enriquece nuclearmente en forma similar en neuronas de hiPSC y de rata. No obstante, este enriquecimiento nuclear se logra una semana antes en neuronas de rata en comparación con neuronas hiPSC.

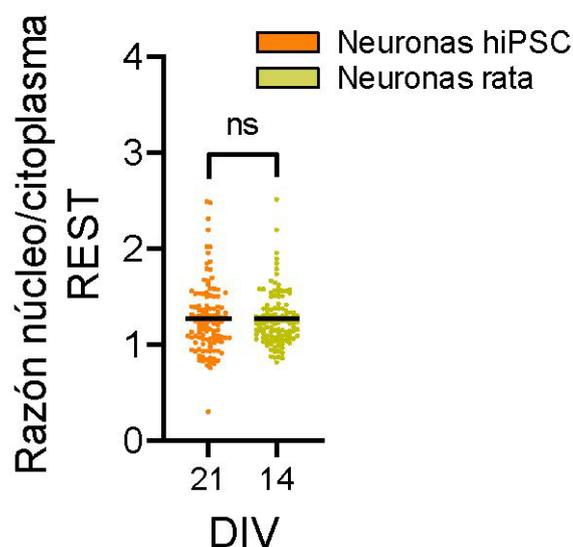


Figura 7. Expresión del factor REST en el núcleo. Comparación de la razón núcleo/citoplasma entre neuronas embrionarias de rata (E18,5) de 14 DIV (N=3, n= 70) y neuronas hiPSC de 21 DIV (N=4, n= 113) (test Mann-Whitney).

Expresión y distribución sub-celular del represor transcripcional CoREST en neuronas hiPSC en cultivo

La Fig. 8 ilustra la expresión y distribución nuclear y citoplasmática de CoREST en neuronas hiPSC en cultivo a los 7, 14 y 21 DIV. En la Fig. 8A se encuentran imágenes representativas que proyectan la máxima intensidad de fluorescencia de la proteína asociada a microtúbulos MAP2 (verde), marcador neuronal y somato-dendrítico, y el represor CoREST (rojo). En la última columna, se presenta el pseudocolor *Fire LUT* como un mapa térmico de la intensidad de fluorescencia. Se desprende cualitativamente de la Fig. 8A que CoREST aumenta su expresión a nivel citoplasmático en hiPSC en cultivo a los 21 DIV, mientras que 7 y 14 DIV no se observa una diferencia en su expresión. En cambio, a nivel nuclear, no se puede apreciar una variación en la señal proyectada de CoREST en ningún tiempo.

Para asignar un valor cuantitativo a la descripción anterior, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de CoREST en el núcleo y citoplasma de la neurona. Se proyectó la suma de la intensidad de fluorescencia de cada rebanada óptica del *z-stack* (*z-sum*). Se delimitó una ROI en el núcleo, definida por el marcador DAPI, y el citoplasma se delimitó con un ROI poligonal que abarcó el soma de la neurona, excluyendo el citoplasma neurítico. Las Fig. 8B señala que, a nivel nuclear, no hay un cambio significativo en la expresión del correpressor a lo largo del desarrollo del cultivo. En cambio, en la Fig. 8C, se observa en el citoplasma un aumento significativo en la expresión del factor a los 21 DIV. Mediante la estimación de la razón núcleo/citoplasma en la Fig. 8D, se puede resaltar la distribución principalmente citoplasmática a $t= 21\text{DIV}$, ya que la media toma un valor <1 , indicando mayores niveles de detección citoplasmática. Además, la Fig. 8E-F señala una particular distribución de CoREST en dendritas de neuronas en desarrollo a los 7 DIV. En los recortes 1-3 de la Fig. 8E-F se pueden diferenciar regiones de mayor concentración de este factor que suelen coincidir con puntos de ramificación de las dendritas. En resumen, la Fig. 8 indica que, en neuronas hiPSC, CoREST se enriquece únicamente a nivel citoplasmático a los 21 DIV (estadio 3) y se distribuye también en dendritas a los 7 DIV.

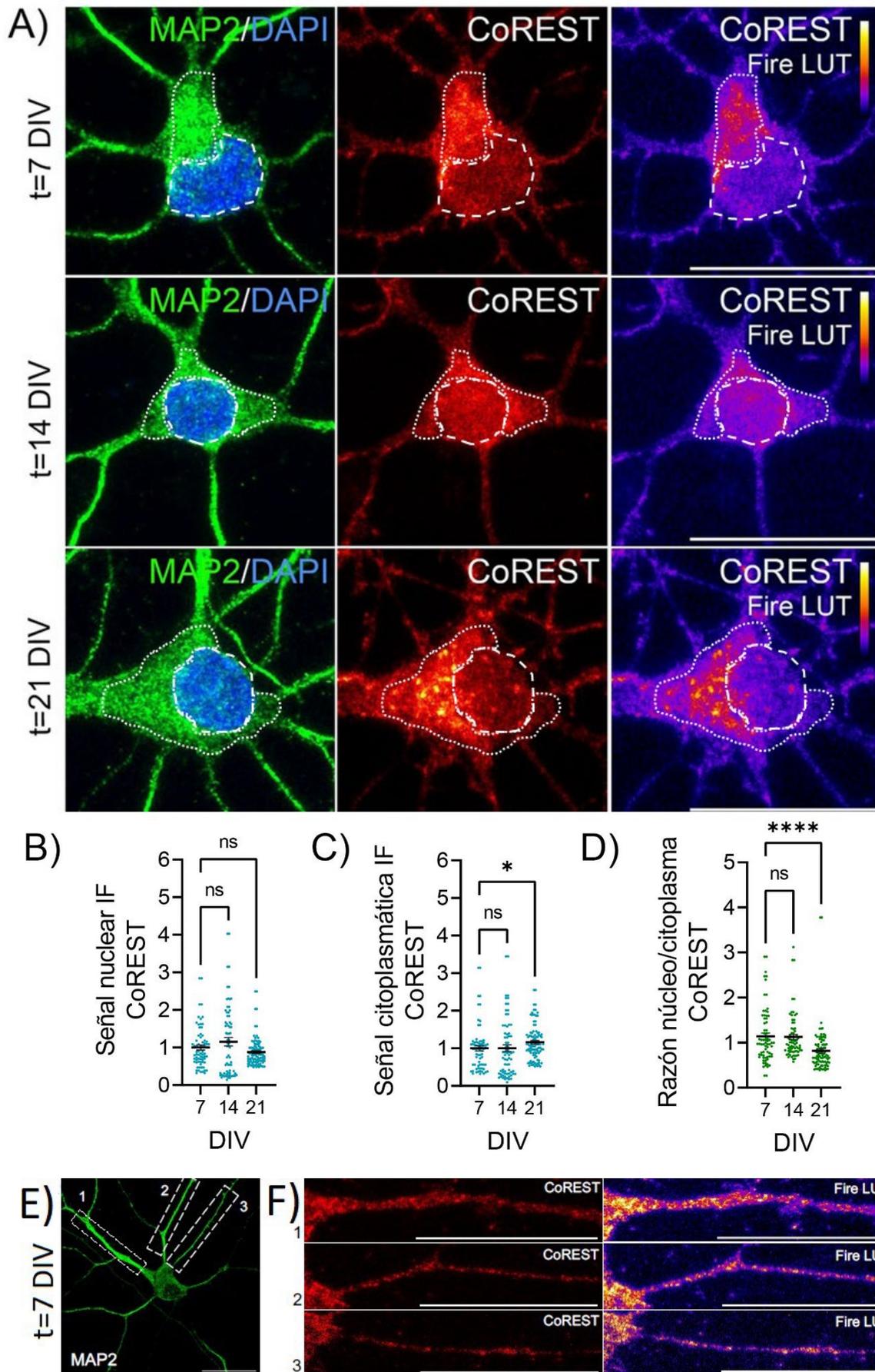


Figura 8. Expresión y distribución del factor CoREST en neuronas hiPSCs. A) Las neuronas humanas

iPSC (N= 3) se cultivaron a 3 tiempos (t)= 7 DIV (n= 70), 14 DIV (n= 72) y 21 DIV (n= 99) DIV y se fijaron con PFA/sacarosa al 4%. MAP2 (verde, marcador neuronal) y CoREST (rojo) se detectaron por inmunofluorescencia (IF) y se realizó un *z-stack* de imagen confocal. Se analizó el *z-stack* obtenido utilizando la herramienta informática FIJI. El núcleo se identificó mediante la tinción DAPI (azul). Escala 20 μ m. B, C) Cuantificación de la señal de IF en núcleo y citoplasma respectivamente (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple). D) Razón núcleo/citoplasma (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple). E) IF hacia MAP2 en neurona a t=7 DIV. F) Recortes 1-3 mostrando la presencia de CoREST en dendritas a t=7 DIV. La inmunofluorescencia muestra la distribución de CoREST en las dendritas MAP2+.

Expresión y distribución sub-celular del represor transcripcional CoREST en neuronas de rata en cultivo

De manera semejante a los estudios realizados en las neuronas hiPSC, se estudió la expresión y distribución de CoREST en neuronas embrionarias de rata a los t= 1, 3, 7 y 14 DIV (Fig. 9).

En la Fig. 9A podemos observar imágenes representativas de los *z-max* obtenidos de MAP2 y CoREST en los tiempos de cultivo mencionados anteriormente. De manera cualitativa se observa a t= 1 DIV, una distribución que, teniendo en cuenta el canal *Fire LUT*, tiende a ser más nuclear que citoplasmática. Luego, a los 3 DIV, se aprecia un aumento en la expresión en ambos compartimentos que cambia notablemente a t= 7 DIV, donde se observa claramente un enriquecimiento nuclear. Finalmente, a los 14 DIV, la distribución tiende a ser más citoplasmática que nuclear, con determinadas regiones en el núcleo que lo expresan.

En la Fig. 9B y 9C se señala la cuantificación de la expresión y distribución de este factor, en el núcleo y citoplasma respectivamente. En el núcleo (Fig. 9B), se observa una tendencia a enriquecerse de manera progresiva hacia los 7 DIV, donde alcanza su máximo, para luego decaer de manera significativa en t= 14 DIV. En cambio, en el citoplasma, no se percibe variación en la expresión de CoREST en neuronas de 1, 3 y 7 DIV (Fig. 9C). Sin embargo, a los 14 DIV se aprecia un aumento significativo en su expresión. La Fig. 9D indica que el patrón de la razón núcleo/citoplasma aumenta en t=7 DIV. Este enriquecimiento nuclear, sin embargo, disminuye de manera significativa a los 14 DIV, tomando un valor de 1,08, indicando una distribución casi equitativa entre estos compartimentos.

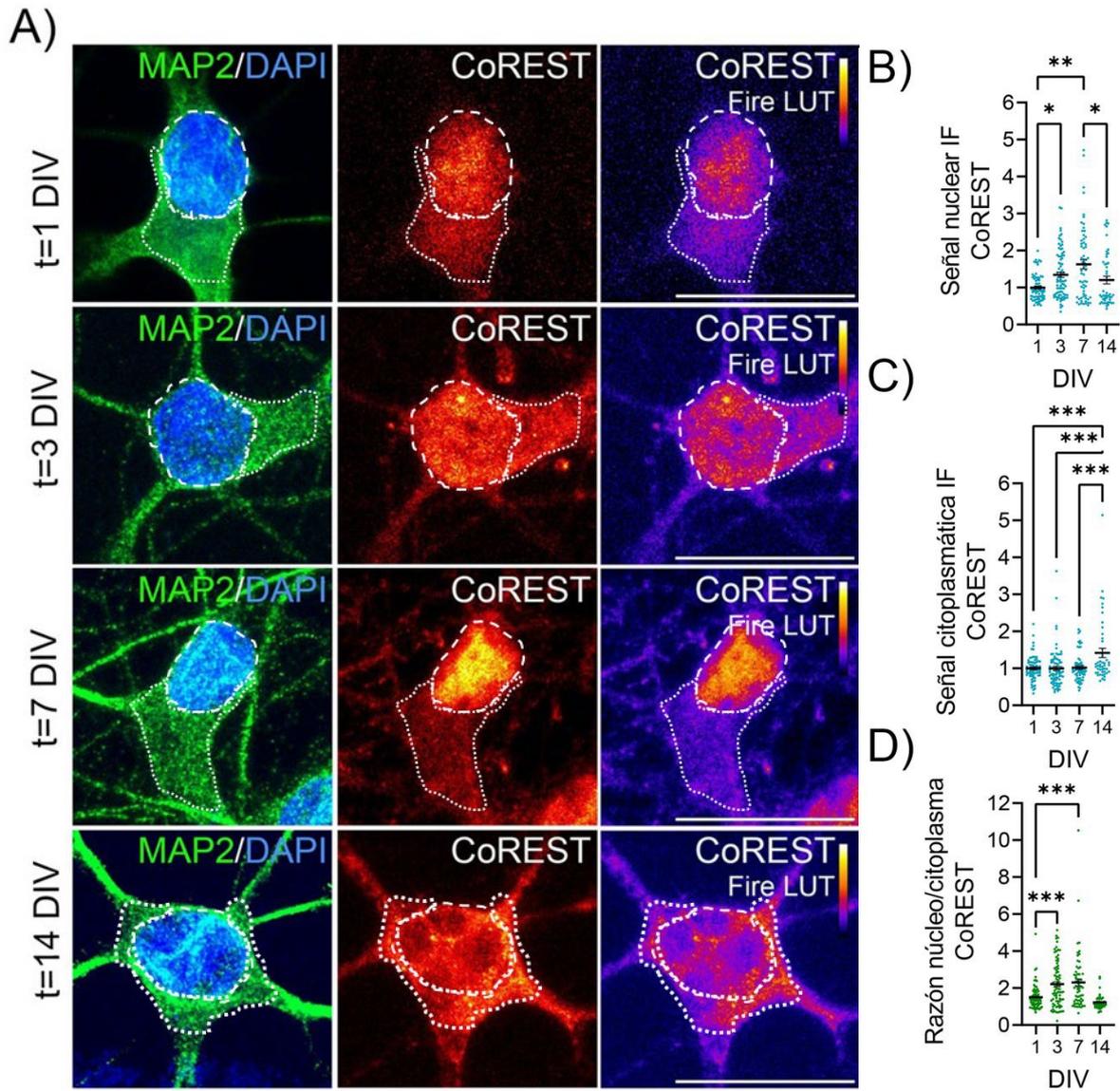


Figura 9. Expresión y distribución del factor CoREST en neuronas embrionarias de rata (E18.5). A) Las neuronas embrionarias de rata (N= 2) se cultivaron a 4 tiempos (t)= 1 DIV (n= 70), 3 DIV (n= 82), 7 DIV (n= 62) y 14 DIV (n= 48) DIV y se fijaron con PFA/sacarosa al 4%. MAP2 (verde, marcador neuronal) y CoREST (rojo) se detectaron por inmunofluorescencia (IF) y se realizó un *z-stack* de imagen confocal. Se analizó el *z-stack* obtenido utilizando la herramienta informática FIJI. El núcleo se identificó mediante la tinción DAPI (azul). Escala 20 μm. B, C) Cuantificación de la señal de IF en núcleo y citoplasma respectivamente (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple). D) Razón núcleo/citoplasma (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple).

Comparación del enriquecimiento nuclear de CoREST entre neuronas hiPSC y neuronas de rata.

La Fig. 10 señala la comparación entre la razón núcleo/citoplasma de ambos modelos neuronales. Para ello, se seleccionaron los datos correspondientes a los 7 DIV, ya que a este

tiempo de cultivo la razón núcleo/citoplasma alcanzó valores máximos, tanto en neuronas hiPSC como de rata. El análisis entre estas especies señala que el enriquecimiento nuclear de CoREST es significativamente mayor en neuronas de rata que en neuronas hiPSC, indicando diferencias en la expresión de CoREST entre ambos modelos neuronales.

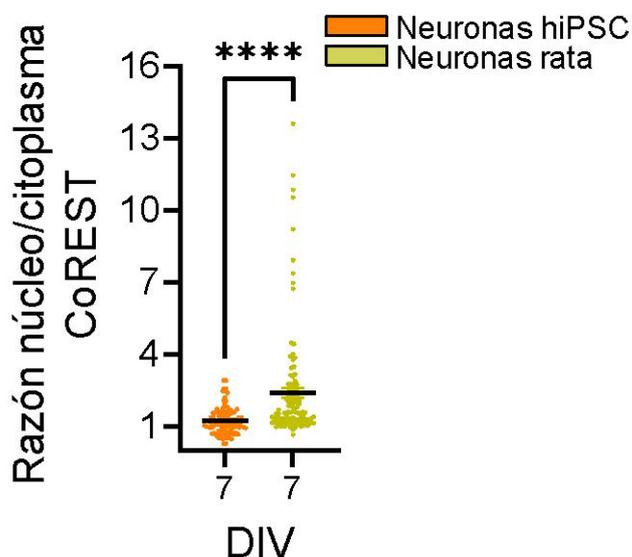


Figura 10. Expresión de CoREST en el núcleo. Comparación de la razón núcleo/citoplasma entre neuronas embrionarias de rata (E18,5) de 7 DIV (N=2, n= 82) y neuronas hiPSC de 7 DIV (N=3, n= 70) (test Mann-Whitney).

Expresión y distribución sub-celular de la histona metiltransferasa G9a en neuronas hiPSC en cultivo.

De la misma forma que en los anteriores ensayos, en la Fig. 11 podemos ver la expresión de G9a a t= 3, 7 y 14 DIV en neuronas hiPSC. En la Fig. 11A se observa cualitativamente una alta expresión de G9a, evidente a través de la columna que muestra el canal *Fire LUT*. Sin embargo, su expresión y distribución, aparentemente similar tanto en el núcleo como en el citoplasma, no parece diferir entre los días en cultivo (7-21 DIV).

A través de las Fig. 11B-D podemos deducir de manera cuantitativa que la expresión nuclear (Fig. 11B) y citoplasmática (Fig. 11C) no presenta variaciones a lo largo del desarrollo del cultivo. No obstante, analizando la razón núcleo/citoplasma en la Fig. 11C, se observa a los 21 DIV una disminución significativa en la expresión nuclear de G9 con respecto a los 14 DIV. La razón núcleo/citoplasma a los 21 DIV toma como valor 1,01, indicando que G9a se encuentra igualmente distribuido en ambos compartimentos. Con

respecto al $t=7$ DIV, no se observan diferencias significativas con los otros dos tiempos de cultivo.

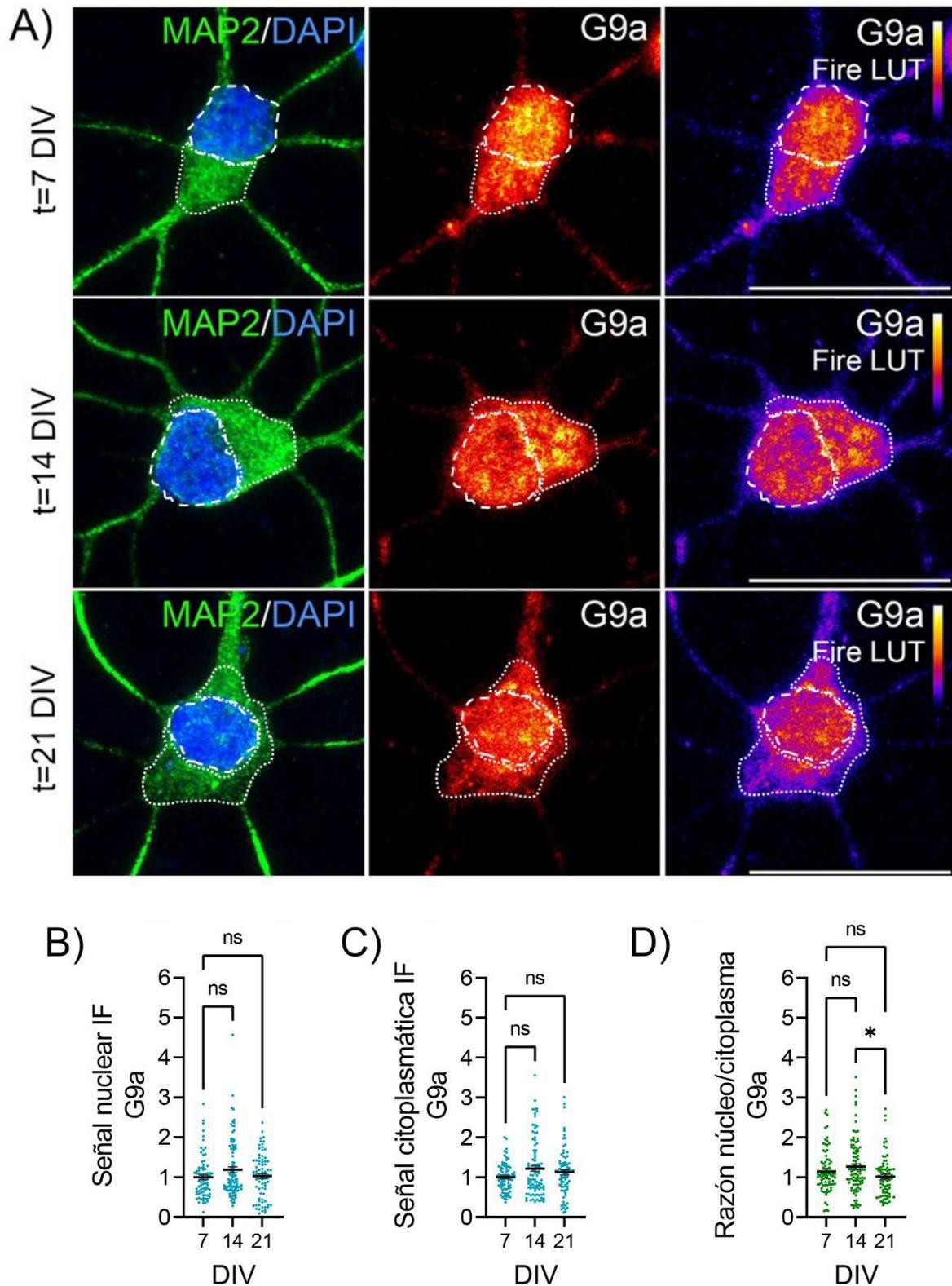


Figura 11. Expresión y distribución de G9a en neuronas humanas iPSCs. A) Las neuronas humanas iPSC ($N=4$) se cultivaron a 3 tiempos ($t=7$ ($n=78$), 14 ($n=95$) y 21 ($n=78$) DIV y se fijaron con PFA/sacarosa al 4%. MAP2 (verde, marcador neuronal) y G9a (rojo) se detectaron por inmunofluorescencia (IF) y se realizó

un *z-stack* de imagen confocal. Se analizó el *z-stack* obtenido utilizando la herramienta informática FIJI. El núcleo se identificó mediante la tinción DAPI (azul). Escala 20 μm . B, C) Cuantificación de la señal de IF en núcleo y citoplasma respectivamente (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple). D) Razón núcleo/citoplasma (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple).

Expresión y distribución sub-celular de la histona metiltransferasa G9a en neuronas de rata en cultivo.

En neuronas de rata se puede ver una gran presencia de G9a a nivel nuclear desde $t=1$ DIV, así como también señal en el citoplasma (Fig. 12A). Sin embargo, a los 3 DIV se puede observar una expresión exclusivamente nuclear, que aumenta hacia los 7 DIV y pareciera mantenerse hacia los 14 DIV (Fig. 12A).

En la Fig. 12B se denota un rápido y significativo incremento en la detección nuclear de G9a entre 1 DIV y 3 DIV, teniendo otro aumento estadísticamente importante hacia los 7 DIV, donde alcanza un *plateau*. En el citoplasma (Fig. 12C), la expresión es casi indetectable y no varía en ningún tiempo de cultivo. Como es de esperarse, la razón núcleo/citoplasma de G9a (Fig. 12D) aumenta significativamente entre 1 DIV y 7 DIV, manteniéndose elevado en $t=14$ DIV, indicando un gran enriquecimiento nuclear debido a sus altos valores.

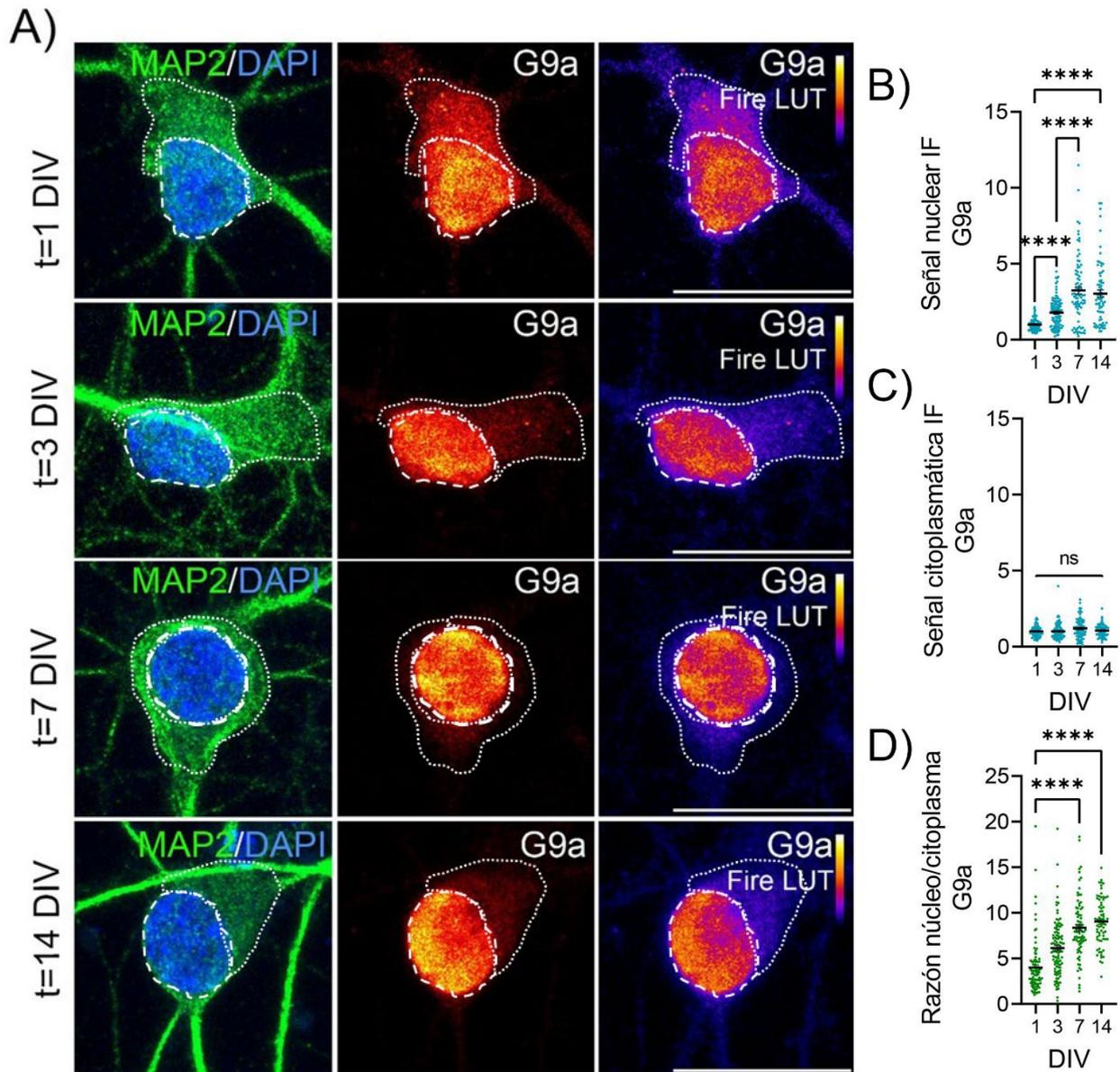


Figura 12. Expresión y distribución de G9a en neuronas embrionarias de rata (E18.5). A) Las neuronas embrionarias de rata (N= 3) se cultivaron a 4 tiempos (t= 1 (n= 91), 3 (n= 103), 7 (n= 85) y 14 (n= 70) DIV y se fijaron con PFA/sacarosa al 4%. MAP2 (verde, marcador neuronal) y G9a (rojo) se detectaron por inmunofluorescencia (IF) y se realizó un *z-stack* de imagen confocal. Se analizó el *z-stack* obtenido utilizando la herramienta informática FIJI. El núcleo se identificó mediante la tinción DAPI (azul). Escala 20 μm B, C) Cuantificación de la señal de IF en núcleo y citoplasma respectivamente (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple). D) Razón núcleo/citoplasma (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple).

Comparación del enriquecimiento nuclear de G9a entre neuronas hiPSC y neuronas de rata.

Para comparar las razones del núcleo/citoplasma entre las neuronas hiPSC y las murinas, seleccionamos los datos correspondientes al tiempo t= 14 DIV, ya que estos

representan la máxima razón núcleo/citoplasma detectada en ambos modelos. En la Figura

13 se observa que el enriquecimiento nuclear de G9a es casi 6 veces mayor que en las neuronas hiPSC. Esta diferencia significativa sugiere una disimilitud en los modelos estudiados con respecto al enriquecimiento nuclear de esta enzima.

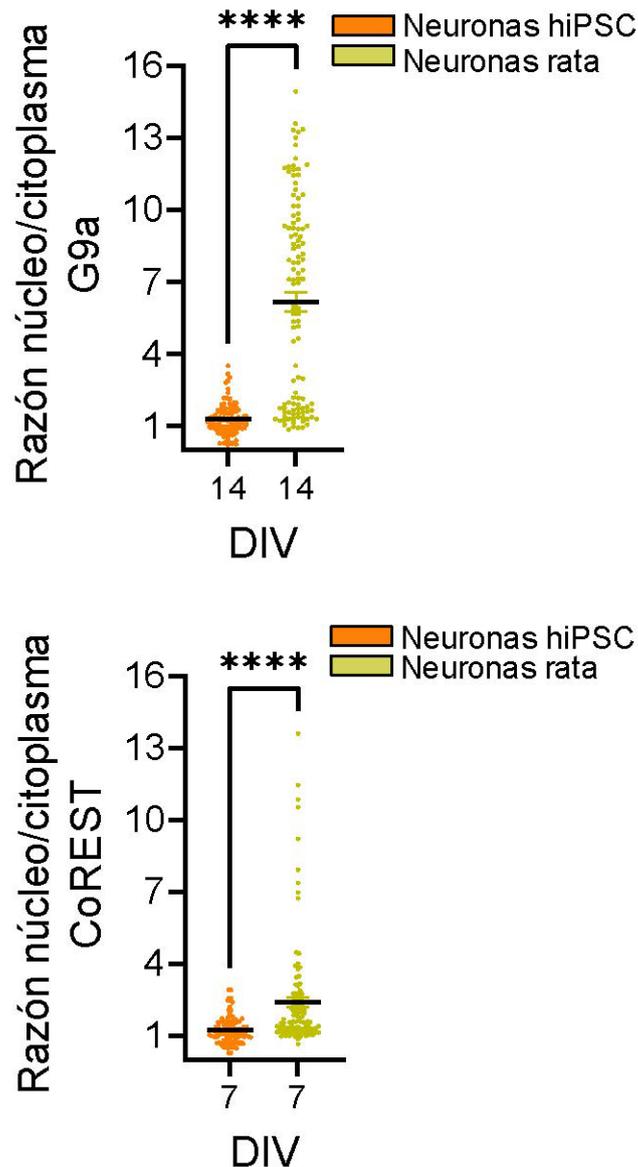


Figura 13. Expresión de G9a en el núcleo. Comparación de la razón núcleo/citoplasma entre neuronas embrionarias de rata (E18,5) de 14 DIV (N=3, n= 70) y neuronas hiPSC de 21 DIV (N=4, n= 78) (test Mann-Whitney).

Caracterización de la marca H3K9me2 en neuronas hiPSC y de rata en cultivo.

De igual manera, analizamos simultáneamente la bi-metilación de H3K9 (H3K9me2) en neuronas hiPSC y de rata. La MPT de histona H3K9me2 es catalizada principalmente por G9a en neuronas, y es considerada una marca represora de la expresión

genética (Mozzetta *et al.*, 2014; Roopra *et al.*, 2004; Shinkai & Tachibana, 2011; Tachibana *et al.*, 2002; Tachibana *et al.*, 2008), fundamental para el crecimiento del axón (Wilson *et al.*, 2020). En las neuronas hiPSC (Fig. 14A) se observa un incremento progresivo de la marca en los tiempos analizados (7-21 DIV), alcanzando un máximo significativo a los 21 DIV (Fig. 14B). Por otro lado, en las neuronas murinas (Fig. 15A), se observa un aumento significativo de H3K9me2 a los 7 y 14 DIV con respecto a 1 y 3 DIV (Fig. 15B).

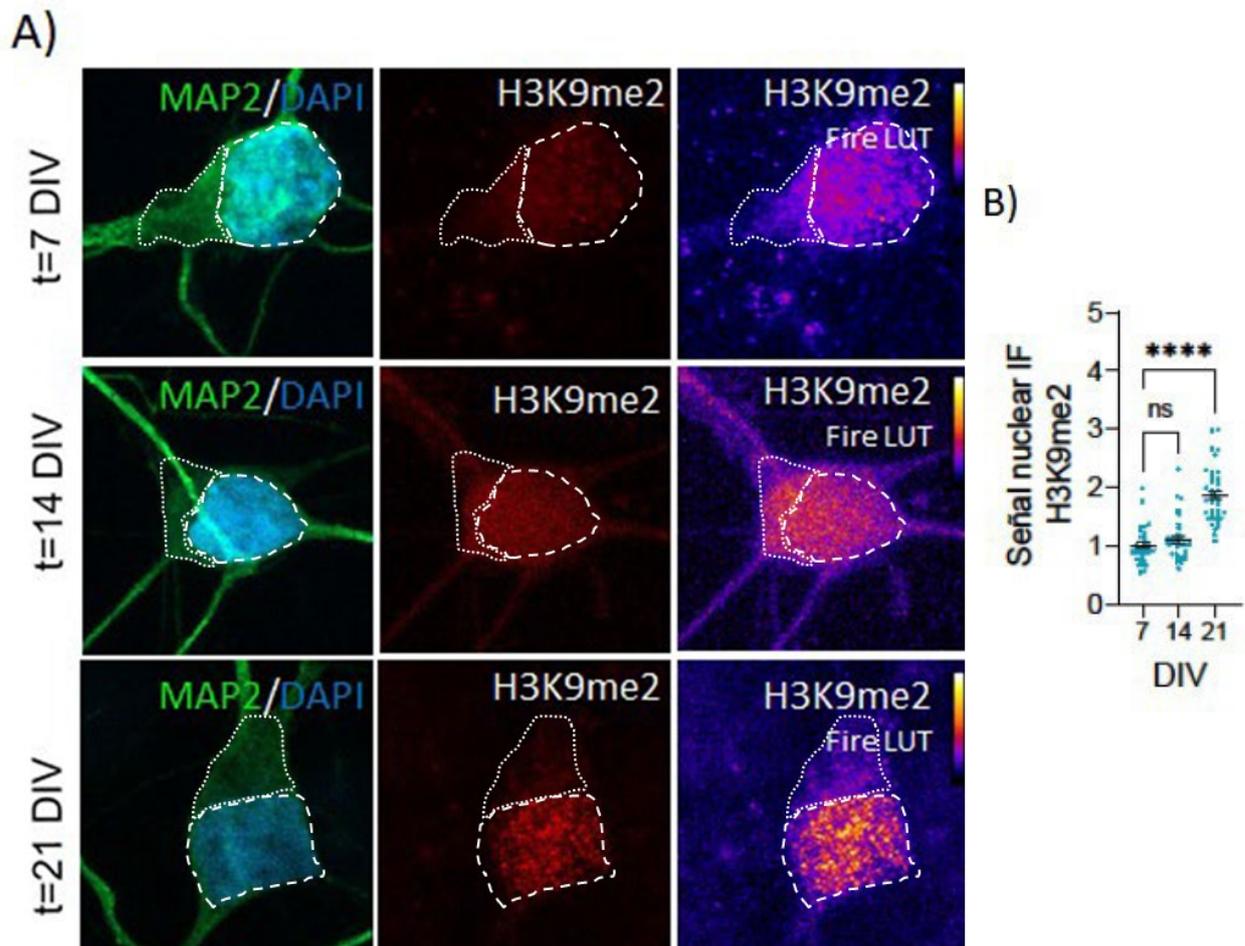


Figura 14. Expresión y distribución nuclear de H3K9me2 en neuronas humanas iPSCs. A) Las neuronas humanas iPSC (N= 1) se cultivaron a 3 tiempos (t)= 7 (n= 32), 14 (n= 31) y 21 (n= 37) DIV y se fijaron con PFA/sacarosa al 4%. MAP2 (verde, marcador neuronal) y G9a (rojo) se detectaron por inmunofluorescencia (IF) y se realizó un *z-stack* de imagen confocal. Se analizó el *z-stack* obtenido utilizando la herramienta informática FIJI. El núcleo se identificó mediante la tinción DAPI (azul). Escala 20 μ m. B) Cuantificación de la señal de IF en núcleo (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple).

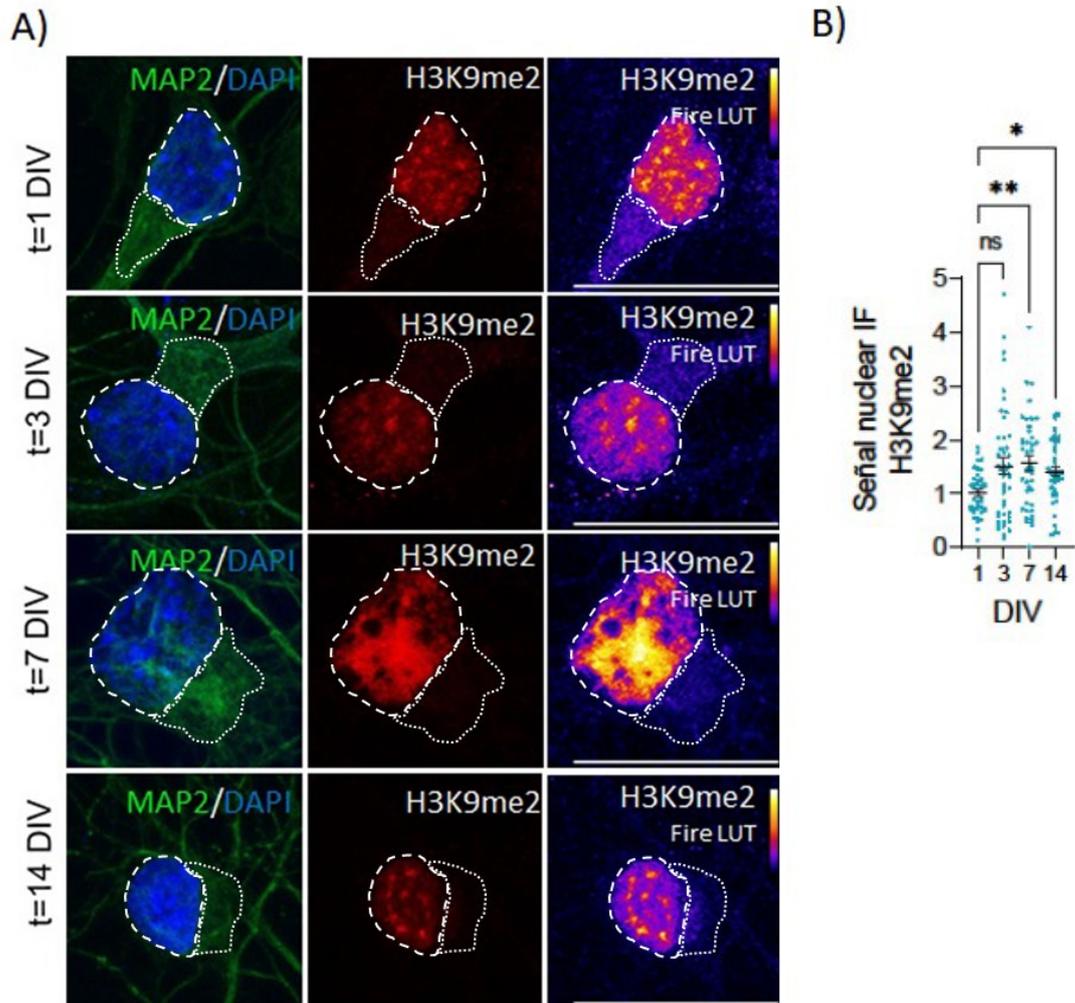


Figura 15. Expresión y distribución nuclear de H3K9me2 en neuronas embrionarias de rata (E18.5). A) Las neuronas embrionarias de rata (N= 1) se cultivaron a 4 tiempos (t)= 1 (n= 37), 3 (n= 46), 7 (n= 41) y 14 (n= 39) DIV y se fijaron con PFA/sucrosa al 4%. MAP2 (verde, marcador neuronal) y G9a (rojo) se detectaron por inmunofluorescencia (IF) y se realizó un *z-stack* de imagen confocal. Se analizó el *z-stack* obtenido utilizando la herramienta informática FIJI. El núcleo se identificó mediante la tinción DAPI (azul). Escala 20 μ m. B) Cuantificación de la señal de IF en núcleo (ANOVA, test Kruskal-Wallis con comparación múltiple)

5) DISCUSIÓN

En este trabajo, caracterizamos la expresión los represores transcripcionales REST, CoREST y G9a durante el desarrollo y crecimiento neuronal, empleando neuronas embrionarias de hipocampo, aisladas de cerebros de rata, y también humanas, obtenidas por diferenciación de iPSC.

De acuerdo con lo antecedentes presentados en este trabajo, sabemos que los cambios morfológicos y bioquímicos que suceden durante la neurogénesis, el crecimiento axonal, el desarrollo de dendritas y la formación de las sinapsis, se encuentran sumamente reguladas. No obstante, gran parte del conocimiento adquirido sobre estos procesos han sido

estudiado en una gran diversidad de modelos, incluyendo *D. melanogaster*, *C. elegans*, *M. musculus*, *R. norvegicus*, entre otros, y no está claro en qué medida podemos extrapolar a la especie humana los conocimientos adquiridos en estas especies animales (Zhao and Bhattacharyya, 2018).

Los resultados obtenidos en este trabajo establecen bases fundamentales para posteriores estudios ya que, por primera vez, se caracteriza la expresión y distribución de REST, CoREST y G9a en neuronas en desarrollo, y se realiza una comparación simultánea entre modelos neuronales de humano y de rata. Las similitudes y diferencias encontradas entre modelos definen un marco bioquímico y temporal para indagar sobre posibles mecanismos de regulación conservados o divergentes entre estas dos especies.

Expresión y distribución del factor REST en neuronas hiPSC y de rata

La visión tradicional sobre la expresión del represor transcripcional REST establece que éste se silencia durante la neurogénesis, alcanzando niveles bajos a indetectables en neuronas post-mitóticas (Ballas *et al.*, 2005). Sin embargo, una adecuada caracterización de su expresión en neuronas post-mitóticas no ha sido reportada. Nuestros resultados señalan que REST se expresa y enriquece nuclearmente tanto en neuronas humanas como en neuronas de rata. Los datos reportados en este trabajo confirman que la expresión de este factor en los primeros estadios de desarrollo es baja. Sin embargo, REST incrementa tanto su expresión como localización nuclear una vez que la neurona alcanza madurez morfológica y fisiológica (14 y 21 DIV, neuronas de rata e hiPSC, respectivamente) (Fig. 5B, D; Fig. 6B, D). Además, la comparación del enriquecimiento nuclear entre ambos modelos alcanza máximos equivalentes (Fig. 7). Es fundamental destacar que la relación en la que REST se encuentra enriquecido a nivel nuclear no presenta diferencias entre las especies estudiadas, sugiriendo un fenómeno conservado entre ambos modelos.

Estudios recientes señalan que REST es un marcador de envejecimiento del cerebro humano en condiciones fisiológicas (Lu *et al.*, 2014; Zullo *et al.*, 2014). Su ausencia, detectada en individuos afectados con la enfermedad de Alzheimer en forma esporádica, se asocia al aumento de muerte neuronal por apoptosis (Lu *et al.*, 2014). Por lo tanto, se considera a REST un factor neuroprotector ante el envejecimiento y la neurodegeneración humana. En contraparte, cerebros de ratón envejecidos no parecen re-expresar REST durante la senescencia, sugiriendo mecanismos especie-específicos (McGann *et al.*, 2021).

Los resultados presentados en este trabajo se suman a las evidencias sobre la re-expresión de REST en neuronas post-mitóticas, por fuera del proceso de neurogénesis. En

efecto, nuestros datos señalan que REST no sólo se expresa durante el envejecimiento, sino también durante la fase de crecimiento y maduración de la neurona en desarrollo. El enriquecimiento nuclear de REST fue detectable en neuronas de rata y derivadas de hiPSC al cabo de 14 y 21 DIV, respectivamente (Fig. 6D; Fig. 5D). Es decir, REST se acumula nuclearmente solo después de la definición del compartimento axonal y dendrítico en ambos modelos de estudio (Wilson *et al.*, 2020; Lindhout *et al.*, 2020), sugiriendo funciones nucleares por fuera de esta fase del desarrollo. Por lo tanto, resulta interesante cuestionarnos la dinámica temporal de la expresión de REST durante la larga vida de la neurona, y plantear interrogantes sobre cuáles son las funciones post-mitóticas de este represor, la dinámica temporal de expresión, aumentando y/o disminuyendo su presencia en ciertas etapas de la vida. Finalmente, será materia de futuras investigaciones indagar en la contribución de REST en el crecimiento neurítico y/o sobrevivencia de estas células.

Expresión y distribución del factor CoREST en neuronas hiPSC y de rata

CoREST, inicialmente descrito como un correpresor asociado a REST (Andrés *et al.*, 1999), es conocido por su rol en neuronas post-mitóticas de embriones de rata y ratón, favoreciendo la migración cortical de éstas, aunque también se sabe que puede trabajar en forma independiente (Quereshi *et al.*, 2010). Si bien se sabe que CoREST se expresa en neuronas de rata post-mitóticas, la dinámica de su expresión no ha sido caracterizada en neuronas en desarrollo humanas o murinas, así como tampoco su enriquecimiento nuclear. Nuestros resultados evidencian que la expresión de CoREST difiere entre neuronas hiPSC y de rata. Es fundamental destacar la relevancia de este dato, ya que nos permite sugerir diferencias interespecíficas con respecto a este factor y su función.

En el caso de las neuronas humanas, la expresión y distribución nuclear de CoREST entre $t=7$ y 21 DIV es relativamente baja (Fig. 8A, B). En contraste, su expresión y distribución citoplasmática tiende a aumentar a lo largo del tiempo del cultivo (Fig. 8C). Algo que captó nuestra atención, es que la distribución no se limita a la región somática. En este sentido, también detectamos la presencia de CoREST en dendritas MAP2+, abriendo un campo exploratorio con respecto a la función de éste fuera del núcleo (Fig. 8E, F).

La dinámica de expresión y distribución de CoREST en neuronas hiPSC contrasta con lo observado en el modelo de rata, donde su expresión aumenta progresivamente entre $t=1$ y 7 DIV, con una distribución principalmente nuclear (Fig. 9B). Sin embargo, a los 14 DIV este patrón de expresión y distribución se modifica, aumentando su presencia en el citoplasma y disminuyendo en el núcleo (Fig. 9C-D). Esto nos lleva a preguntarnos qué rol

puede tener CoREST fuera del núcleo en ambos modelos, si dicho rol citoplasmático es conservado entre las especies, expresándose quizás en distintos momentos (en neuronas murinas a partir de los 14 DIV), y si esta función extra nuclear (no genómica) puede estar vinculada o ser similar al que podría tener en las neuronas humanas.

Expresión y distribución de la HMT G9a en neuronas hiPSC y de rata

En este trabajo también caracterizamos la expresión y distribución de la histona metil transferasa (HMT) G9a en neuronas hiPSC y de rata. Al igual que CoREST, tanto la expresión como la distribución neuronal de G9a difiere entre los modelos estudiados. Como se había descrito previamente, la presencia de G9a en neuronas murinas se limita al núcleo (Fig. 12B, C), probablemente por su actividad HMT. Sin embargo, tanto las imágenes representativas y las cuantificaciones realizadas sugieren que G9a no se restringe al área nuclear en neuronas hiPSC dentro de la ventana temporal que abarca este estudio (7-21 DIV) (Fig. 11B, C), como sí sucede en las neuronas de rata, sugiriendo también una diferencia interespecífica.

Podemos hipotetizar que la presencia de G9a en citoplasma en las neuronas humanas se debe a su síntesis o probable retención antes de translocar al núcleo. Sin embargo, no se observa un enriquecimiento nuclear de este factor a medida que el cultivo evoluciona. Por el contrario, los resultados sugieren que a los 21 DIV ocurre una disminución en la relación núcleo/citoplasma de G9a, lo que nos lleva a plantearnos las siguientes incógnitas: ¿podría G9a estar siendo exportada desde el núcleo hacia el citoplasma?, ¿requiere de alguna modificación o señal química para translocar al núcleo?, ¿existe un mecanismo regulatorio que retenga a G9a en el citoplasma, impidiendo su ingreso al núcleo en estos estadios? ¿sucede el enriquecimiento nuclear de G9a en otro momento del desarrollo (por ejemplo, después de los 21 DIV)?

Análisis de los niveles de metilación de H3K9 en neuronas hiPSC y de rata

Nuestros resultados señalan que la marca represora H3K9me2 se enriquece en ambos modelos neuronales (humano y rata) (Fig. 14B; Fig. 15B) Sin embargo, las diferencias en cuanto al enriquecimiento nuclear de G9a entre especies abre preguntas respecto a los mecanismos que catalizan la bimetilación de H3K9. Considerando que el enriquecimiento nuclear de G9a en neuronas hiPSC es muy inferior al observado en neuronas de rata, cabe preguntarse si solo basta G9a en neuronas hiPSC para mantener la marca H3K9me2, o si además habrá otros factores implicados.

Es importante destacar que en ambos modelos se observa un aumento de H3K9me2 conforme avanza el desarrollo del cultivo neuronal. En el caso de las neuronas humanas, el máximo valor se alcanza a los 21 DIV (dentro de la ventana de tiempo estudiada en este trabajo). En los tiempos anteriores ($t= 7$ y 14 DIV), la señal de H3K9me2 es relativamente baja y no se observan cambios significativos. En las neuronas murinas, la bimetilación es evidente en el núcleo a 7 DIV manteniéndose así hasta los 14 DIV.

La dinámica de metilación H3K9me2 cobra sentido cuando la comparamos con la expresión de REST en ambos modelos. En las neuronas humanas, el enriquecimiento nuclear progresivo de REST a lo largo del cultivo podría contribuir a reclutar la maquinaria necesaria para la metilación de H3K9. Estos datos que concuerdan con resultados previos que explican la interacción de REST, CoREST y G9a y su función en la bimetilación de H3K9 en neuronas murinas.

No obstante, la homeostasis de H3K9me2 en neuronas hiPSC podría estar mediada también por otros factores como LSD1, un factor de transcripción que se une a CoREST y es necesario para la desmetilación (Shi *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2010), ya que CoREST y G9a no se enriquecen nuclearmente como sí sucede en neuronas de rata. Para comprobar si REST y G9a forman un complejo destinado a regular la homeostasis de H3K9me2, sería oportuno realizar estudios de interacción, ya sea a través de un ensayo de co-inmunoprecipitación o microscopía FRET (*fluorescence resonance energy transfer*). También se podría inhibir genética o farmacológicamente REST, por un lado, y G9a por otro, y luego analizar la homeostasis de la marca H3K9me2. Actualmente, nuestro laboratorio está explorando estas hipótesis.

6) CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que, contrariamente a la visión predominante del campo, REST sí se expresa en neuronas post-mitóticas tanto de origen humano como de rata. Sin embargo, su expresión es progresiva; desde niveles bajos a indetectables en tiempos tempranos (1 y 7 DIV, rata y humano respectivamente) hasta enriquecerse nuclearmente (14 y 21 DIV, rata y humano respectivamente). En este sentido, este trabajo llena un vacío en la biología del represor REST, señalando que las neuronas lo expresan intrínsecamente durante el crecimiento temprano, alcanzando máximos solo luego de que las neuronas se han polarizado. Además, destacamos la expresión de REST en neuronas post-mitóticas como un fenómeno conservado entre especies, y sustenta su posible implicancia en la neuroprotección.

En cuanto a CoREST y G9a, observamos diferencias interespecíficas en su expresión y distribución. Los hallazgos realizados en nuestro laboratorio sugieren una distribución y expresión diferencial para G9a entre los modelos, y una función extra-nuclear potencialmente distinta para CoREST en neuronas humanas y murinas, lo que abre un campo exploratorio sobre su función y regulación específicas. Estos resultados podrían sugerir diferencias interespecíficas en la regulación de la bimetilación de H3K9, aunque es necesario indagar en detalle esta hipótesis.

En conjunto, nuestros resultados proporcionan una caracterización extensiva sobre la expresión y distribución de REST, CoREST y G9a durante el neurodesarrollo humano y de rata. Este marco biológico será fundamental para llevar a cabo futuras investigaciones destinadas a comprender los mecanismos subyacentes de la regulación epigenética en el desarrollo neuronal y su implicación en la salud y la enfermedad.

7) BIBLIOGRAFÍA

- Abay-Nørgaard, S., Attianese, B., Boreggio, L., & Salcini, A. E. (2020). Regulators of H3K4 methylation mutated in neurodevelopmental disorders control axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 147(15), dev190637.
- Abrajano, J. J., Qureshi, I. A., Gokhan, S., Molero, A. E., Zheng, D., Bergman, A., & Mehler, M. F. (2010). Corepressor for element-1–silencing transcription factor preferentially mediates gene networks underlying neural stem cell fate decisions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16685-16690.
- Abrajano, J. J., Qureshi, I. A., Gokhan, S., Zheng, D., Bergman, A., & Mehler, M. F. (2009). REST and CoREST modulate neuronal subtype specification, maturation and maintenance. *PloS one*, 4(12), e7936.
- Anderson, D. J., & Jan, Y. N. (1997). The determination of the neuronal phenotype. *Molecular and cellular approaches to neural development*, 26-63.
- Andrés, M. E., Burger, C., Peral-Rubio, M. J., Battaglioli, E., Anderson, M. E., Grimes, J., ... & Mandel, G. (1999). CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17), 9873-9878.
- Arimura, N., & Kaibuchi, K. (2005). Key regulators in neuronal polarity. *Neuron*, 48(6), 881-884.
- Arimura, N., & Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(3), 194-205.
- Ballas, N., Battaglioli, E., Atouf, F., Andres, M. E., Chenoweth, J., Anderson, M. E., ... & Mandel, G. (2001). Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron*, 31(3), 353-365.
- Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D. D., Speh, J. C., & Mandel, G. (2005). REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell*, 121(4), 645-657.
- Bellon, A., Iyer, A., Bridi, S., Lee, F. C., Ovando-Vazquez, C., Corradi, E., ... & Baudet, M. L. (2017). miR-182 regulates Slit2-mediated axon guidance by modulating the local translation of a specific mRNA. *Cell reports*, 18(5), 1171-1186.
- Bradke, F., & Dotti, C. G. (2000). Changes in membrane trafficking and actin dynamics during axon formation in cultured hippocampal neurons. *Microscopy research and technique*, 48(1), 3-11.
- Cáceres, A., Ye, B., & Dotti, C. G. (2012). Neuronal polarity: demarcation, growth and

- commitment. *Current opinion in cell biology*, 24(4), 547-553.
- Cáceres, A., Ye, B., & Dotti, C. G. (2012). Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment. *Current opinion in cell biology*, 24(4), 547-553.
- Catala, M., & Kubis, N. (2013). Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handbook of clinical neurology*, 115, 29-41.
- Cheung, P., Allis, C. D., & Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, 103(2), 263-271.
- Clowry, G., Molnar, Z., & Rakic, P. (2010). Renewed focus on the developing human neocortex. *Journal of anatomy*, 217(4), 276-288.
- Conde, C., & Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(5), 319-332.
- Corradi, E., Dalla Costa, I., Gavoci, A., Iyer, A., Rocuzzo, M., Otto, T. A., ... & Baudet, M. L. (2020). Axonal precursor miRNAs hitchhike on endosomes and locally regulate the development of neural circuits. *The EMBO journal*, 39(6), e102513.
- Craig, A. M., & Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annual review of neuroscience*, 17(1), 267-310.
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A., & Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *Journal of Neuroscience*, 8(4), 1454-1468.
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A., & Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *Journal of Neuroscience*, 8(4), 1454-1468.
- Edlund, T., & Jessell, T. M. (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell*, 96(2), 211-224.
- Foster, C. T., Dovey, O. M., Lezina, L., Luo, J. L., Gant, T. W., Barlev, N., ... & Cowley, S. M. (2010). Lysine-specific demethylase 1 regulates the embryonic transcriptome and CoREST stability. *Molecular and cellular biology*, 30(20), 4851-4863.
- Fuentes, P., Canovas, J., Berndt, F. A., Noctor, S. C., & Kukuljan, M. (2012). CoREST/LSD1 control the development of pyramidal cortical neurons. *Cerebral cortex*, 22(6), 1431-1441.
- Gardner, K. E., Allis, C. D., & Strahl, B. D. (2011). Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *Journal of molecular biology*, 409(1), 36-46.
- Giedd, J. (1999). Brain development, IX: human brain growth. *American Journal of Psychiatry*, 156(1), 4-4.
- Gleeson, J. G., Lin, P. T., Flanagan, L. A., & Walsh, C. A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23(2), 257-271.

- Holtzman, D. M., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2011). Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Science translational medicine*, 3(77), 77sr1-77sr1.
- Iyer, A. N., Bellon, A., & Baudet, M. L. (2014). microRNAs in axon guidance. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 78..
- Jablonka, E., & Lamb, M. J. (2002). The changing concept of epigenetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 981(1), 82-96.
- Jiang, X., & Nardelli, J. (2016). Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiology of disease*, 92, 3-17.
- Johnson, R., Teh, C. H. L., Kunarso, G., Wong, K. Y., Srinivasan, G., Cooper, M. L., ... & Stanton, L. W. (2008). REST regulates distinct transcriptional networks in embryonic and neural stem cells. *PLoS biology*, 6(10), e256.
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature protocols*, 1(5), 2406-2415.
- Kleine-Kohlbrecher, D., Christensen, J., Vandamme, J., Abarrategui, I., Bak, M., Tommerup, N., ... & Helin, K. (2010). A functional link between the histone demethylase PHF8 and the transcription factor ZNF711 in X-linked mental retardation. *Molecular cell*, 38(2), 165-178.
- Lindhout, F. W., Kooistra, R., Portegies, S., Herstel, L. J., Stucchi, R., Snoek, B. L., ... & Hoogenraad, C. C. (2020). Quantitative mapping of transcriptome and proteome dynamics during polarization of human iPSC-derived neurons. *Elife*, 9, e58124.
- Lu, T., Aron, L., Zullo, J., Pan, Y., Kim, H., Chen, Y., ... & Yankner, B. A. (2014). REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 507(7493), 448-454.
- Lu, T., Aron, L., Zullo, J., Pan, Y., Kim, H., Chen, Y., ... & Yankner, B. A. (2014). REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 507(7493), 448-454.
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S. Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., & Yankner, B. A. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429(6994), 883-891.
- Marchetto, M. C., Hrvoj-Mihic, B., Kerman, B. E., Yu, D. X., Vadodaria, K. C., Linker, S. B., ... & Gage, F. H. (2019). Species-specific maturation profiles of human, chimpanzee and bonobo neural cells. *elife*, 8, e37527.
- Mariani, L., Lussi, Y. C., Vandamme, J., Riveiro, A., & Salcini, A. E. (2016). The H3K4me3/2 histone demethylase RBR-2 controls axon guidance by repressing the actin-remodeling gene *wsp-1*. *Development*, 143(5), 851-863.
- McGann, J. C., Spinner, M. A., Garg, S. K., Mullendorff, K. A., Woltjer, R. L., & Mandel, G.

- (2021). The genome-wide binding profile for human RE1 Silencing Transcription factor unveils a unique genetic circuitry in hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 41(31), 6582-6595.
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*, 14(7), 447-459.
- Meyer, K., Feldman, H. M., Lu, T., Drake, D., Lim, E. T., Ling, K. H., ... & Yankner, B. A. (2019). REST and neural gene network dysregulation in iPSC models of Alzheimer's disease. *Cell Rep.* 26, 1112–1127. e9.
- Molnár, Z., & Clowry, G. (2012). Cerebral cortical development in rodents and primates. *Progress in brain research*, 195, 45-70.
- Mozzetta, C., Pontis, J., Fritsch, L., Robin, P., Portoso, M., Proux, C., Margueron, R., and Ait-Si-Ali, S. (2014). The histone H3 lysine 9 methyltransferases G9a and GLP regulate polycomb repressive complex 2-mediated gene silencing. *Mol.Cell*53,277–289.
- Qureshi, I. A., Gokhan, S., & Mehler, M. F. (2010). REST and CoREST are transcriptional and epigenetic regulators of seminal neural fate decisions. *Cell cycle*, 9(22), 4477-4486.
- Riveiro, A. R., Mariani, L., Malmberg, E., Amendola, P. G., Peltonen, J., Wong, G., & Salcini, A. E. (2017). JMJD-1.2/PHF8 controls axon guidance by regulating Hedgehog-like signaling. *Development*, 144(5), 856-865.
- Rodenas-Ruano, A., Chávez, A. E., Cossio, M. J., Castillo, P. E., & Zukin, R. S. (2012). REST-dependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors. *Nature neuroscience*, 15(10), 1382-1390.
- Roopra, A., Qazi, R., Schoenike, B., Daley, T. J., & Morrison, J. F. (2004). Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Molecular cell*, 14(6), 727-738.
- Schoenherr, C. J., Paquette, A. J., & Anderson, D. J. (1996). Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9881-9886.
- Shi, Y. J., Matson, C., Lan, F., Iwase, S., Baba, T., & Shi, Y. (2005). Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Molecular cell*, 19(6), 857-864.
- Shi, Y., Sawada, J. I., Sui, G., Affar, E. B., Whetstine, J. R., Lan, F., ... & Shi, Y. (2003). Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*, 422(6933), 735-738.

- Shinkai, Y., & Tachibana, M. (2011). H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. *Genes Dev.* 25, 781–788.
- Silbereis, J. C., Pochareddy, S., Zhu, Y., Li, M., & Sestan, N. (2016). The cellular and molecular landscapes of the developing human central nervous system. *Neuron*, 89(2), 248-268.
- Stiess, M., & Bradke, F. (2011). Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way. *Developmental neurobiology*, 71(6), 430-444.
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41-45.
- Suzuki, Y., Tsunoda, T., Sese, J., Taira, H., Mizushima-Sugano, J., Hata, H., ... & Sugano, S. (2001). Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome research*, 11(5), 677-684.
- Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H., and Shinkai, Y. (2008). G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J.* 27, 2681–2690.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H., and Shinkai, Y. (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.* 16, 1779-1791.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4), 663-676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, 131(5), 861-872.
- Takano, T., Funahashi, Y., & Kaibuchi, K. (2019). Neuronal polarity: positive and negative feedback signals. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 69.
- Waddington, C. (1957). *The strategy of the genes* (London: Volume George Allen and Unwin).
- Waddington, C. H. (1940). *Organisers and genes*. Organisers and genes.
- Waddington, C. H. (2017). The basic idea of biology. In *The Origin of Life* (pp. 1-41). Routledge.
- Wilson Rodriguez, C., Moyano, A. L., & Cáceres, A. O. (2022). Perspectives on Mechanisms Supporting Neuronal Polarity From Small Animals to Humans.
- Wilson, C., & Cáceres, A. (2021). New insights on epigenetic mechanisms supporting axonal development: histone marks and miRNAs. *The FEBS Journal*, 288(22), 6353-6364.
- Wilson, C., Giono, L. E., Rozes-Salvador, V., Fiszbein, A., Kornblihtt, A. R., & Cáceres, A.

(2020). The histone methyltransferase G9a controls axon growth by targeting the RhoA signaling pathway. *Cell reports*, 31(6).

Wilson, C., Muñoz-Palma, E., & González-Billault, C. (2018, August). From birth to death: A role

for reactive oxygen species in neuronal development. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 80, pp. 43-49). Academic Press.

Wilson, C., Muñoz-Palma, E., & González-Billault, C. (2018, August). From birth to death: A role for reactive oxygen species in neuronal development. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 80, pp. 43-49). Academic Press.

Wilson, C., Rozés-Salvador, V., & Cáceres, A. (2020). Protocol for evaluating neuronal polarity in murine models. *STAR protocols*, 1(3), 100114.

Witte, H., Neukirchen, D., & Bradke, F. (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *The Journal of cell biology*, 180(3), 619-632.

Zhao, X., & Bhattacharyya, A. (2018). Human models are needed for studying human neurodevelopmental disorders. *The American Journal of Human Genetics*, 103(6), 829-857.

Zullo, J. M., Drake, D., Aron, L., O'Hern, P., Dhamne, S. C., Davidsohn, N., ... & Yankner, B. A. (2019). Regulation of lifespan by neural excitation and REST. *Nature*, 574(7778), 359-364.