



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D.^a Uxía Rodríguez Rodríguez

**Uso de células neuronales humanas para el estudio
de compuestos naturales**

**Uso de células neuronais humanas para o estudo de
compostos naturais**

**Use of human neuronal cells for the study of natural
compounds**

Traballo Fin de Grao

Junio 2024

Licencia

Esta obra pertenece a Uxía Rodríguez Rodríguez, y está sujeta a la licencia Reconocimiento Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.



Índice

Índice	3
Índice de figuras	5
Índice de tablas	6
Abreviaturas	7
Resumen, resumo, abstract	9
Resumen	9
Resumo	9
Abstract.....	10
1. Introducción	11
1.1 Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y	14
1.2 Células madre neuronales (hNSC) y células progenitoras neuronales humanas (hNPC)..	15
1.2.1 Línea celular CTX0E16	16
1.3 Neurogénesis	17
1.4 Inducción de la diferenciación celular	18
1.4.1 Forskolina	18
1.4.2 CHIR99021	19
1.4.3 Ácido retinoico.....	21
2. Objetivos	22
3. Material y métodos	23
3.1 Reactivos utilizados	23
3.2 Cultivo celular de la línea CTX0E16.....	23
3.3 Determinación de la viabilidad celular	25
3.3.1 MTT	25
3.3.2 Tratamiento de las células con forskolina, CHIR99021 y ácido retinoico y determinación de la viabilidad celular	26
3.4 Inmunocitoquímica y análisis microscópico	27
3.5 Análisis estadístico	29
4. Resultados	30

4.1 Evaluación del efecto de la forskolina, CHIR99021 y del ácido retinoico sobre la viabilidad celular empleando el ensayo MTT	30
4.2 Controles de los marcadores de diferenciación neuronal en la línea celular CTX0E16 mediante inmunocitoquímica.....	33
4.3 Estudio del efecto de moduladores enzimáticos en la diferenciación neuronal mediante inmunocitoquímica	35
4.3.1 Estudio del efecto de la forskolina.....	35
4.3.2 Estudio del efecto de CHIR99021	38
4.3.3 Estudio del efecto del ácido retinoico	42
5. Discusión	45
6. Conclusiones	47
7. Bibliografía	48

Índice de figuras

Figura 1. Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.	14
Figura 2. Línea celular CTX0E16 cultivada en medio de proliferación celular (RMM).	16
Figura 3. Estructura química de la molécula de forskolina	18
Figura 4. Activación de la vía de señalización de la AC y la PKA inducida por la forskolina..	19
Figura 5. Estructura química de la molécula CHIR99021	20
Figura 6. Vía de señalización Wnt.....	20
Figura 7. Estructura química de la molécula del ácido retinoico.	21
Figura 8. Resumen de la vía de señalización del ácido retinoico.	21
Figura 9. Células CTX0E16	24
Figura 10. Esquema que muestra la estructura química del MTT	25
Figura 11. Espectro que muestra las longitudes de onda de excitación (línea punteada) y de emisión (línea continua)	28
Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de forskolina sobre la función mitocondrial en la línea celular CTX0E16.....	31
Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones de CHIR99021 sobre la función mitocondrial en la línea celular CTX0E16.....	32
Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de ácido retinoico sobre la función mitocondrial en la línea celular CTX0E16.....	32
Figura 15. Imágenes de microscopia confocal que muestran el control de Dylight 488 y de Dylight 594 y la expresión de DCX.....	33
Figura 16. Imágenes de microscopia confocal que muestran la expresión de GFAP y β -tubulina. A: expresión de GFAP marcada en verde con el anticuerpo secundario Dylight 488	34
Figura 17. Imágenes de microscopia confocal que muestra la expresión de MAP2, nestina y NeuN.....	35
Figura 18. Imagen de microscopia confocal donde la expresión de GFAP está marcada en color verde.	36
Figura 19. Imagen de microscopia confocal donde la expresión de MAP2 está marcada en color rojo. MAP2 se utilizó a una dilución	37
Figura 20. Imagen de microscopia confocal donde la expresión de NeuN está marcada en color verde.	37

Figura 21. <i>Imagen de microscopia confocal mostrando la expresión de nestina superpuesta con las imágenes de campo claro</i>	38
Figura 22. <i>Imagen de microscopia confocal donde la expresión de GFAP está marcada en color verde con el anticuerpo secundario Dylight 488.</i>	39
Figura 23. <i>Imagen de microscopia confocal donde la expresión de MAP2 está marcada en color rojo con el anticuerpo secundario Dylight 594.</i>	40
Figura 24. <i>Imagen de microscopia confocal donde la expresión de NeuN está marcada en color verde con el anticuerpo secundario Dylight 488.</i>	41
Figura 25. <i>Imagen de microscopia confocal donde la expresión de nestina está marcada en color rojo con el anticuerpo secundario Dylight 594.</i>	42
Figura 26. <i>Imagen de microscopia confocal donde la expresión GFAP está marcada en color verde con el anticuerpo secundario Dylight 488.</i>	43
Figura 27. <i>Imagen de microscopia confocal donde la expresión MAP2 está marcada en color rojo con el anticuerpo secundario Dylight 594.</i>	44

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Métodos in vivo para el estudio del efecto de compuestos químicos según las directrices de la OECD (https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm). ...</i>	12
Tabla 2. <i>Directrices de la OECD para la realización de estudios in vitro (https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm). ...</i>	13
Tabla 3. <i>Anticuerpos primarios utilizados en la inmucitoquímica, con sus respectivas diluciones y funciones. En el caso de MAP2 y de la nestina se especificará en qué momento se usó cada dilución.</i>	28
Tabla 4. <i>Anticuerpos secundarios utilizados en la inmucitoquímica, con sus respectivas diluciones y longitudes de onda de excitación y emisión.</i>	28

Abreviaturas

4-OHT	4-hidroxi-tamoxifeno
AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
AR	Ácido retinoico
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino (bovine serum albumin)
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DCX	Doblecortina (doublecortin)
DMEM:F12	Medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagles medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Factor de crecimiento epitelial humano (epidermal growth factor)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos humano (fibroblast growth factor)
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (glial fibrillary acidic protein)
GSK3 β	Glucógeno sintasa quinasa beta-3
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
hNPC	Células progenitoras neuronales humanas
hNSC	Células madre neuronales humanas
λ	Longitud de onda
LN	laminina

MAP2	Proteína asociada a microtúbulo 2 (microtubule-associated protein 2)
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5- difeniltetrazol
NADH	Nicotinamida deshidrogenasa dinucleótido
NDM	Medio de diferenciación neuronal (neuronal differentiation médium)
NeuN	Proteína nuclear específica de neurona (neuron specific nuclear protein)
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate buffered saline)
PDL	poli-D-lisina
PKA	Proteína kinasa A
RAR	Receptor del ácido retinoico
RMM	Medio de proliferación celular (reduced modified medium)
Rpm	Revoluciones por minuto
RXR	Receptor de retinoide X
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
v/v	Relación volumen volumen

Resumen, resumo, abstract

Resumen

Los modelos experimentales para evaluar el efecto de compuestos sobre el sistema nervioso se han ido modificando gradualmente con los años. Actualmente, los modelos *in vitro* son buenos aliados para el cribado de neurotoxicidad. En el año 2015, se desarrollaron células neuronales humanas progenitoras humanas, denominadas CTX0E16, como modelo *in vitro* de células neuronales nativas para investigar mecanismos fisiológicos. Las células madre neuronales humanas constituyen un modelo *in vitro* ideal para el estudio del desarrollo de mecanismos neuronales y sus desordenes, entre ellas se encuentra la línea CTX0E16. Esta línea, además de presentar todos los receptores de glutamato y GABA, canales dependientes de Na⁺ y canales dependientes de K⁺ que otras líneas celulares neuronales no tienen, tiene la capacidad diferenciarse a diferentes tipos celulares. Sin embargo, su uso en el laboratorio para estudios de toxicología no es habitual, debido a que su periodo de diferenciación es muy largo, pudiendo llegar a tardar 60 días.

En el presente trabajo fin de grado se han estudiado tres métodos de aceleración de la diferenciación celular utilizando moduladores enzimáticos, la forskolina, CHIR99021 y el ácido retinoico. Los resultados obtenidos a las 48 horas de tratamiento surgieron que la forskolina disminuye el número de células gliales y que el ácido retinoico promueve la diferenciación celular. No obstante, se necesitan estudios adicionales que evalúen los efectos de dichas moléculas para corroborar su uso en la aceleración de la diferenciación celular.

PALABRAS CLAVE: células madre neuronales humanas, forskolina, CHIR99021, ácido retinoico, diferenciación neuronal, neurotoxicidad.

Resumo

Os modelos experimentais para avaliar o efecto de compostos sobre o sistema nervioso foron modificándose gradualmente cos anos. Actualmente, os modelos *in vitro* son bos aliados para o cribado de neurotoxicidade. No ano 2015, desenvóléronse células neuronais humanas nativas para investigar mecanismos fisiolóxicos. As células nai neuronais humanas constitúen un modelo *in vitro* ideal para o estudo do desenvolvemento de mecanismos neuronais e os seus desordes, entre elas atópase a liña celular CTX0E16. Esta liña, ademáis de presentar todos os receptores de glutamato e GABA, canais dependentes de Na⁺ e canais dependentes de K⁺ que outras liñas celulares neuronais non teñen, teñen a capacidade de diferenciarse a diferentes tipos celulares. Porén, o seu uso no laboratorio para estudos de toxicoloxía non é habitual, debido a que o periodo de diferenciación é moi longo, podendo chegar a tardar 60 días.

No presente traballo fin de grao estudáronse tres métodos de aceleración da diferenciación celular empregando moduladores enzimáticos, a forskolina, CHIR99021 e o ácido retinoico. Os resultados obtidos as 48 horas de tratamento suxiren que a forskolina diminúe o número de células gliais e que o ácido retinoico promove a diferenciación celular. Non obstante, necesítanse estudos adicionais que evalúen o efecto de ditas molécula para corroborar o seu uso na aceleración da diferenciación celular.

PALABRAS CHAVE: células madre neuronais humanas, forskolina, CHIR99021, ácido retinoico, diferenciación neuronal, neurotoxicidade.

Abstract

Experimental models for evaluating the effects of compounds on the nervous system have gradually evolved over the years. Currently, *in vitro* models are valuable allies for neurotoxicity screening. In 2015, human neural progenitor cells, termed CTX0E16, were developed as an *in vitro* model of native neural cells to investigate physiological mechanisms. Human neural stem cells represent an ideal *in vitro* model for studying the development of neural mechanisms and their disorders, among them is the CTX0E16 cell line. This cell line, in addition to expressing all glutamate and GABA receptors, Na⁺ dependent channels, and K⁺ dependent channels that other neural cell lines lack, has the ability to differentiate into various cell types. However, its use in laboratory toxicological studies is not common due to its long differentiation period, which can take up to 60 days.

In this work, three methods for accelerating cell differentiation using enzymatic modulators, forskolin, CHIR99021, and retinoic acid were studied. The results obtained after 48 hours of treatment suggest that forskolin decreases the number of glial cells and that retinoic acid promotes cell differentiation. However, additional studies are needed to evaluate the effects of these molecules to confirm their use in accelerating cell differentiation.

KEY WORDS: human neuronal stem cells, forskolin, CHIR99021, retinoic acid, neuronal differentiation, neurotoxicity.

1. Introducción

Los cultivos celulares constituyen un sistema modelo que proporciona acceso directo y la posterior evaluación de compuestos químicos, asimismo, son una herramienta valiosa para obtener información sobre los mecanismos de toxicidad o de proliferación celular. En general, los modelos *in vitro* se han usado para analizar el mecanismo de acción y la comprensión de las bases celulares de compuestos naturales y sintéticos, además de permitir técnicas rápidas que pueden ser adaptadas a métodos de alto rendimiento y, que pueden complementar o incluso dar lugar a posteriores estudios *in vivo*, los cuales normalmente requieren cantidades más grandes de compuesto y diferentes tiempos de exposición a los mismos (Almeida et al., 2017; Braakhuis et al., 2016).

Los modelos experimentales para evaluar el efecto de compuestos sobre el sistema nervioso se han ido modificando gradualmente con los años. Actualmente, los modelos *in vitro* son buenos aliados para el cribado de neurotoxicidad. A pesar de que estos modelos no tienen en cuenta toda la fisiología y la complejidad del estado *in vivo*, sobre todo en lo que respecta a las alteraciones sensoriales, cognitivas o conductuales, son una herramienta muy útil para identificar los mecanismos de toxicidad de diferentes compuestos. Por ello, y dada la limitación en la disponibilidad de determinados compuestos puros para su uso *in vivo*, los modelos *in vitro* constituyen la primera línea para detectar compuestos que actúen en el sistema nervioso, tanto generando posibles efectos neurotóxicos como clasificando compuestos en función del potencial de daño al sistema nervioso (M. R. Li et al., 2024; Lopez-Suarez et al., 2022).

Tradicionalmente se han utilizado modelos de roedores para estudiar el efecto de compuestos sobre el sistema nervioso cuyo mecanismo de acción se desconoce, no obstante, la experimentación animal requiere una gran cantidad de compuestos y precisa cumplir con normas éticas y legales cada vez más estrictas (del Estado, 2013). Con el objetivo de probar una gran cantidad de compuestos, los modelos experimentales han cambiado gradualmente a modelos de células animales *in vitro*, que, no imitan completamente los entornos fisiológicos y bioquímicos *in vivo*, pero proporcionan la posibilidad de identificar la diana celular *in vitro* con el mínimo uso de compuesto. Además, el modelo *in vitro* de células de origen humano es una opción más deseable que el modelo de células animales (Lopez-Suarez et al., 2022; Vale C., 2024).

En el año 2015, se desarrollaron células neuronales humanas progenitoras humanas, denominadas CTX0E16, como modelo *in vitro* de células neuronales nativas para investigar mecanismos fisiológicos (Anderson et al., 2015). Sin embargo, a pesar de que este modelo celular está completamente caracterizado y validado para estudiar los efectos neurotóxicos o beneficiosos *in vitro*, el problema principal consiste en el largo periodo de diferenciación requerido por estas

células (Anderson et al., 2015; Boente-Juncal, Mendez, et al., 2018; Boente-Juncal, Vale, et al., 2018).

En las siguientes tablas se describen algunas de las directrices adoptadas internacionalmente por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) indicando diferentes métodos para el estudio del efecto de compuestos químicos. En la tabla 1 se recogen diferentes métodos *in vivo*.

Tabla 1. *Métodos in vivo para el estudio del efecto de compuestos químicos según las directrices de la OECD* (<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>).

401	Toxicidad oral aguda
402	Toxicidad dérmica aguda
403	Toxicidad aguda por inhalación
404	Irritación/corrosión dérmica aguda
405	Irritación/corrosión ocular aguda
406	Sensibilización de la piel
407	Estudio de toxicidad oral de 28 días de dosis repetidas en roedores
408	Estudio de toxicidad oral de 90 días de dosis repetidas en roedores
409	Estudio de toxicidad oral de dosis repetidas durante 90 días en no roedores
410	Toxicidad dérmica por dosis repetidas: estudio de 21/28 días
411	Toxicidad dérmica subcrónica: estudio de 90 días
412	Toxicidad subaguda por inhalación: estudio de 28 días
413	Toxicidad subcrónica por inhalación: estudio de 90 días
414	Estudio de toxicidad para el desarrollo prenatal
415	Estudio de toxicidad en la reproducción de una generación
416	Toxicidad reproductiva de dos generaciones
417	Toxicocinética
418	Neurotoxicidad retardada de sustancias organofosforadas después de una exposición aguda
419	Neurotoxicidad retardada de sustancias organofosforadas: estudio de dosis repetidas de 28 días
420	Toxicidad oral aguda: procedimiento de dosis fija
421	Prueba de detección de toxicidad para la reproducción/desarrollo
422	Estudio combinado de toxicidad de dosis repetidas con la prueba de detección de toxicidad para la reproducción y el desarrollo
423	Toxicidad oral - Método de clase tóxica aguda
424	Estudio de neurotoxicidad en roedores

No obstante, los experimentos con animales siguen principios éticos y legales, además de que se necesita un gran número de animales, son caros, se requiere haber realizado cursos de experimentación animal acreditados por las autoridades competentes y llevan mucho tiempo. La necesidad de probar un amplio número de compuestos, junto por las preocupaciones del bienestar animal, propició la búsqueda de alternativas en los análisis iniciales de efectos tóxicos, empleando métodos *in vitro*, hecho que aparece recogido en las directrices de la OECD que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Directrices de la OECD para la realización de estudios *in vitro* (<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>).

442D	Sensibilización cutánea <i>in vitro</i>
443	Estudio ampliado de toxicidad reproductiva de una generación
451	Estudios de carcinogenicidad
452	Estudios de toxicidad crónica
453	Estudios combinados de toxicidad crónica/carcinogenicidad
455	Borrador de directrices de prueba basadas en el rendimiento para ensayos de transactivación <i>in vitro</i> transfectados de forma estable para detectar agonistas y antagonistas de los receptores de estrógeno
456	Ensayo de esteroidogénesis H295R
457	Método de prueba de transactivación del receptor de estrógeno BG1Luc para identificar agonistas y antagonistas del receptor de estrógeno
460	Método de prueba de fuga de fluoresceína para identificar corrosivos oculares e irritantes graves
471	Prueba de mutación inversa bacteriana
473	Prueba de aberración cromosómica <i>in vitro</i> en mamíferos
474	Prueba de micronúcleos de eritrocitos de mamíferos
475	Prueba de aberración cromosómica de la médula ósea de mamíferos
476	Pruebas <i>in vitro</i> de mutación genética de células de mamíferos utilizando los genes Hprt y xprt
479	Toxicología genética: ensayo de intercambio de cromátidas hermanas <i>in vitro</i> en células de mamíferos
482	Toxicología genética: daño y reparación del ADN, síntesis no programada de ADN en células de mamíferos <i>in vitro</i>
490	Pruebas <i>in vitro</i> de mutación genética de células de mamíferos utilizando el gen de la timidina quinasa
491	Método de prueba <i>in vitro</i> de exposición de corta duración para identificar i) sustancias químicas que provocan daños oculares graves y ii) sustancias químicas que no requieren clasificación para irritación o daños oculares graves
493	Directrices de prueba basadas en el rendimiento para ensayos <i>in vitro</i> del receptor de estrógeno humano recombinante (hrER) para detectar sustancias químicas con afinidad de unión a ER

Dentro de los sistemas de cultivo celular se encuentran los cultivos celulares primarios, las líneas celulares inmortalizadas, las líneas celulares cancerosas y las células madre (Vale C., 2024). Los cultivos celulares primarios en humana no se emplean ya que implican cuestiones éticas. En comparación, las células humanas inmortalizadas permiten llevar a cabo experimentos a gran escala puesto que se pueden cultivar indefinidamente, lo que las hace un modelo *in vitro* más ideal (M. R. Li et al., 2024). Las líneas celulares cancerosas cuentan con una acumulación de daños en el ADN (ácido desoxirribonucleico), con aberraciones cromosómicas graves y con deriva genética, lo que puede hacer que los resultados obtenidos no sean precisos ni significativos. Por otro lado, las células madre al poder diferenciarse a linajes neuronales, permiten comprender mejor los eventos moleculares de la toxicidad y estudiar sus efectos en el desarrollo neuronal (S. Li et al., 2024).

1.1 Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y

Las líneas celulares comerciales humanas son mayoritariamente líneas celulares inmortalizadas derivadas de células tumorigénicas (Lopez-Suarez et al., 2022). Una de las líneas más utilizadas en la investigación de neurotoxicidad es la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, la cual se puede observar en la Figura 1.

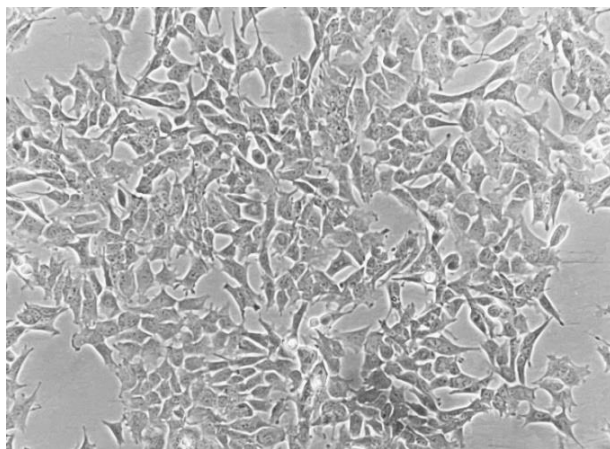


Figura 1. Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Se trata de una línea celular neuroblástica establecida en 1970 a partir de una biopsia de médula ósea metastásica de una niña que padecía neuroblastoma (Biedler et al., 1973). Estas células pueden diferenciarse en células similares a neuronas primarias, con cuerpos celulares más pequeños y neuritas más largas, pero, los niveles de neurotransmisores se ven influenciados por el agente de diferenciación utilizado (Presgraves et al., 2004). Uno de los agentes diferenciadores más utilizados en esta línea celular es el ácido retinoico, que estimula el desarrollo en neuronas colinérgicas (Adem et al., 1987; Raposo-Garcia et al., 2023).

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, a pesar de ser una de las líneas celulares más utilizadas, no deja de ser una línea que deriva de células cancerosas, por lo que tiene un número limitado de tipos de células a los que pueden parecerse y, por lo general, presentan anomalías cromosómicas importantes (Bray et al., 2012). Este modelo ha demostrado una gran utilidad para avanzar en el conocimiento del sistema nervioso, pero sus limitaciones lo hacen un modelo poco ideal en estudios de neurotoxicidad (Belluardo et al., 2021).

1.2 Células madre neuronales (hNSC) y células progenitoras neuronales humanas (hNPC)

Debido a las desventajas que pueden presentar las líneas celulares inmortalizadas derivadas de células tumorigénicas, en las últimas décadas se ha incrementado el uso de las células madre neuronales humanas (hNSC) y de las células progenitoras neuronales humanas (hNPC) (Carpenter et al., 1999; Gaspard & Vanderhaeghen, 2011). Este interés viene dado por tratarse de un modelo renovable y accesible en el que se pueden investigar los mecanismos básicos del neurodesarrollo humano y los complejos trastornos asociados al desarrollo del sistema nervioso (Jayaprakash et al., 2024). Además, las hNPC tienen la ventaja de que pueden ser fácilmente sometidas a manipulaciones bioquímicas, farmacológicas y genéticas, pudiendo ser adaptadas a la investigación pertinente (Anderson et al., 2015).

Las hNSC y hNPC derivan de numerosos tipos de células madre, incluidas las células madre embrionarias, fetales y adultas. Se ha demostrado que las hNPC cerebrales pueden ser expandidas y diferenciadas en cultivo, dando lugar a múltiples tipos de células neuronales, entre los que se encuentran los astrocitos, oligodendrocitos y diferentes tipos de neuronas (Carpenter et al., 1999; Gaspard & Vanderhaeghen, 2011). A pesar de los esfuerzos y métodos para desarrollar células neuronales, incluyendo glía y neuronas para el estudio de compuestos neuroactivos, uno de los principales obstáculos para su empleo en el estudio de alteraciones de la función cerebral empleando estos modelos *in vitro* es el tiempo que necesitan para diferenciarse en cultivo, que según los autores oscila entre 30 y 60 días (Anderson et al., 2015; Boente-Juncal, Mendez, et al., 2018; Boente-Juncal, Vale, et al., 2018; Hu et al., 2010).

Es importante resaltar que las células progenitoras, a pesar de ser capaces de renovarse y diferenciarse en un tipo celular específico (unipotentes) o en varios tipos celulares (multipotentes), carecen de capacidad para formar tumores, ya que tienen una proliferación elevada pero limitada. En contraste, las células madre embrionarias multipotentes tienen una capacidad de proliferación ilimitada siendo propicia la formación de tumores (Wiese et al., 2004).

Por otra parte, las consideraciones éticas asociadas al uso de blastocitos humanos, de los cuales derivan las células madre embrionarias, conllevaron a la creación de hNPC condicionalmente

inmortalizadas mediante la integración retroviral de una única copia de c-mycER^{TAM} (Anderson et al., 2015).

1.2.1 Línea celular CTX0E16

La línea celular CTX0E16 proviene del córtex de un embrión humano de 12 semanas de gestación, que posteriormente fue inmortalizada mediante la integración de un retrovirus c-mycER^{TAM} (Anderson et al., 2015). En la Figura 2 se observa una imagen de microscopía mostrando las células CTX0E16.

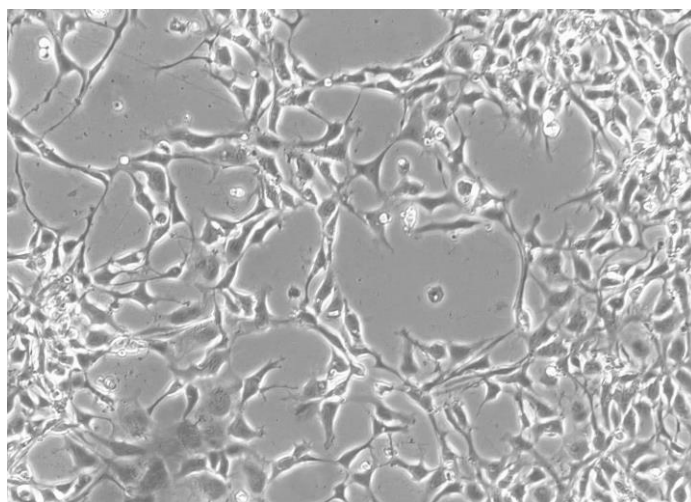


Figura 2. Línea celular CTX0E16 cultivada en medio de proliferación celular (RMM) a una densidad celular de 44.000 células/mL. Imagen tomada a los seis días de proliferación.

Trabajos anteriores han caracterizado dicha línea celular, con el fin de determinar si conservaban las características de su tejido de origen y si generaban los tipos de células neuronales apropiados tras su diferenciación. Esta caracterización fue propiciada por tratarse de una fuente robusta de células neuronales nativas que permiten investigar mecanismos fisiológicos tanto en la salud como en la enfermedad (Anderson et al., 2015).

Los resultados concluyeron que se tratan de células multipotentes capaces de diferenciarse a diferentes tipos celulares, entre ellos, varios tipos de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Además, esta línea tiene todos los receptores de glutamato y GABA (ácido gamma-aminobutírico), canales dependientes de Na⁺ y canales dependientes de K⁺ que otras líneas celulares neuronales no tienen. Por ello, se pueden emplear como modelo para el estudio del desarrollo de los mecanismos neuronales y sus desórdenes, siendo una herramienta muy útil para estudios de toxicidad (Anderson et al., 2015).

Sin embargo, su uso en el laboratorio para estudios de toxicología no es habitual, debido a que, como se ha mencionado anteriormente, su periodo de diferenciación es muy largo, pudiendo llegar

a tardar 60 días (Anderson et al., 2015; Boente-Juncal, Mendez, et al., 2018; Boente-Juncal, Vale, et al., 2018). Por lo tanto, la necesidad de probar un amplio número de compuestos en un periodo corto de tiempo para obtener resultados rápidos impide su uso para estos objetivos. No obstante, en la actualidad se ha puesto en manifiesto que las células madre neuronales humanas constituyen buenos modelos *in vitro* para la evaluación de compuestos (Boente-Juncal, Mendez, et al., 2018; Coronel et al., 2019; He et al., 2024; Kanemura et al., 2024; Lee et al., 2020; Mosley et al., 2017; Wang et al., 2023; Yamada-Goto et al., 2017), por ello, en este trabajo fin de grado se planteó desarrollar métodos de aceleración de la diferenciación de las células progenitoras humanas CTX0E16 para su uso en evaluación de compuestos.

Con el fin de contextualizar el objetivo del trabajo en las siguientes secciones se abordan los procesos de neurogénesis y de diferenciación celular.

1.3 Neurogénesis

La neurogénesis es el proceso de generación de nuevas neuronas de diferente fenotipo y función a partir de células madre y progenitoras indiferenciadas. Históricamente se creía que este proceso se limitaba a etapas tempranas del desarrollo, pero se ha demostrado que continúa en algunas regiones del sistema nervioso durante toda la vida, no obstante, durante las últimas décadas se ha avanzado mucho en el estudio de la neurogénesis *in vitro* empleando diferentes líneas celulares (Azari & Reynolds, 2016; Compagnucci et al., 2014; Donato et al., 2007; M. R. Li et al., 2024; Schulz et al., 2003; Zhang et al., 2001; Zhang & Zhang, 2010).

La neurogénesis se subdivide en varias etapas, que abarcan desde el momento en el que los precursores neuronales se dividen, hasta que se forman neuronas maduras y establecen contactos sinápticos entre ellas. Durante estos periodos de tiempo se expresan varios marcadores que se correlacionan con los pasos de diferenciación, por lo que para poder llevar a cabo su estudio se pueden usar anticuerpos de marcadores celulares que se observan mediante microscopia confocal (Gault & Szele, 2021; von Bohlen Und Halbach, 2007, 2011).

Para el estudio de la diferenciación de las células progenitoras humanas CTX0E16 se usó una técnica de inmunotinción conocida como inmunocitoquímica. A continuación, se detallan brevemente los marcadores neurogénicos empleados:

- **GFAP** (*glial fibrillary acidic protein*): se trata de una proteína del filamento intermedio III que se encuentra exclusivamente en los astrocitos del sistema nervioso central, las células Schwann no mielinizantes en el sistema nervioso periférico y en las células gliales entéricas. Por lo tanto, la GFAP es un marcador de astrocitos maduros de cerebro adulto y de células precursoras de nuevas neuronas (Yang & Wang, 2015).

- **DCX** (*doublecortin*): es una proteína asociada a microtúbulos específicos del cerebro que se cree que actúa como estabilizador de estos. Se encuentra presente tanto en el soma como en procesos de neuronas recién generadas, por lo que se puede utilizar como marcador para estudiar la morfología de estas (von Bohlen und Halbach, 2011).
- **β -tubulina** (*beta-tubulin*): la proteína β -tubulina pertenece a la familia de las tubulinas que se encuentran en los microtúbulos de las células, en concreto la de clase tres se encuentra en los microtúbulos de las neuronas. Por lo tanto, se usa como marcador de microtúbulos (von Bohlen und Halbach, 2011).
- **MAP2** (*microtubule-associated protein 2*): la proteína 2 asociada a microtúbulos pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), que son componentes principales de las proteínas del citoesqueleto asociadas con el ensamblaje de microtúbulos. Se usa como marcador de células neuronales diferenciadas (Liu et al., 2003).
- **Nestina** (*nestin*): proteína filamentososa del citoesqueleto que se expresa en diferentes tipos celulares en los estadios temprano del desarrollo. Se encuentra en células de la glía radial, en células neuroepiteliales y en precursores neuronales (Kalman & Ajtai, 2001).
- **NeuN** (*neuron-specific nuclear protein*): es una proteína nuclear soluble que se observa en la mayoría de los tipos de células neuronales. Se puede usar como marcador de células postmitóticas, incluso de las recién generadas (Mullen et al., 1992).

1.4 Inducción de la diferenciación celular

Puesto que el presente trabajo fin de grado estuvo encaminado a acelerar la diferenciación neuronal de la línea celular CTX0E16, a continuación, se describen los compuestos utilizados para conseguir este objetivo.

1.4.1 Forskolina

La forskolina ($C_{22}H_{34}O_7$) es una molécula orgánica que pertenece al grupo de los diterpenos y es producida por la planta *Coleus forskohlii* (Wagh et al., 2012). En la Figura 3 se muestra su estructura química.

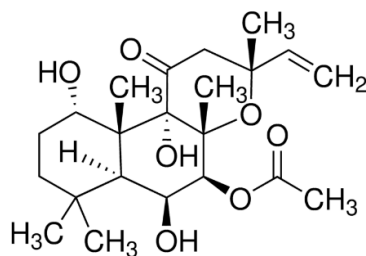


Figura 3. Estructura química de la molécula de forskolina

Se trata de un compuesto liposoluble, por lo que penetra con facilidad en las membranas celulares, estimulando la enzima adenilato ciclasa. La adenilato ciclasa (AC) cataliza la conversión de la adenosina trifosfato (ATP) en adenosín monofosfato cíclico (AMPc) produciendo una elevación de los niveles intracelulares de AMPc (Wagh et al., 2012).

Además, la forskolina activa a la proteína quinasa A (PKA), ya que esta es dependiente de AMPc, haciendo que aumente el tráfico intracelular de varias proteínas unidas a la membrana. Entre estas proteínas se encuentra el transportador de glucosa GLUT4, el canal de cloruro CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) y canales de potasio y de sodio dependientes de voltaje (Holman & Kasuga, 1997; Levin et al., 1995; Tartakoff, 1983; Zhou et al., 2000). En la Figura 4 se muestra un esquema de la activación de la vía de señalización de la AC y la PKA inducida por la forskolina.

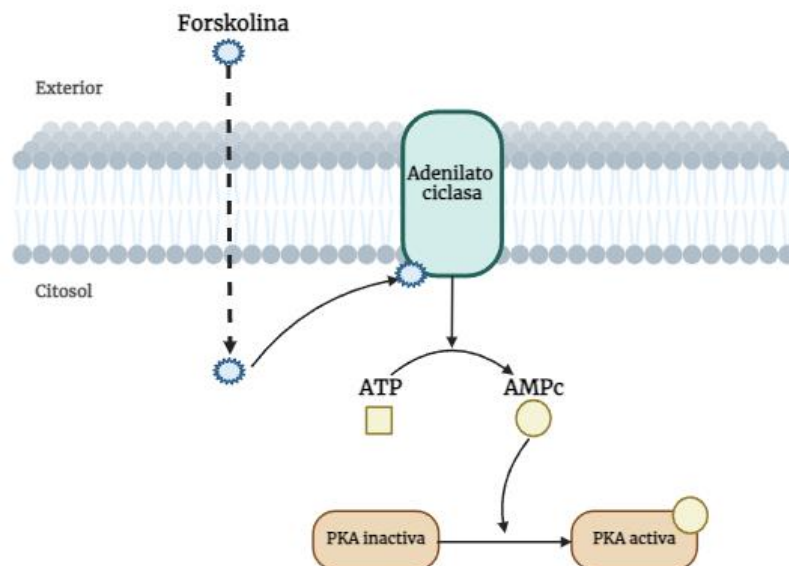


Figura 4. Activación de la vía de señalización de la AC y la PKA inducida por la forskolina. Figura realizada con el programa Biorender (<https://app.biorender.com/>).

La forskolina es una molécula de uso común en cultivos celulares, ya que el AMPc desempeña un papel crucial en la diferenciación celular. Se trata de una diferenciación reversible, caracterizada por la conversión a un fenotipo similar a una neurona, que incluye una forma celular más redondeada y la inducción de un crecimiento extenso de neuritas (Ammer & Schulz, 1997; Bergsbaken et al., 1993; Wang et al., 2024).

1.4.2 CHIR99021

CHIR 99021 ($C_{22}H_{18}Cl_2N_8$) es una molécula de pequeño peso molecular que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa quinasa beta-3 ($GSK3\beta$) y mantiene la vía Wnt en un estado activo

(Castro-Torres et al., 2024; Govarthanan et al., 2020). En la figura 5 se muestra su estructura química.

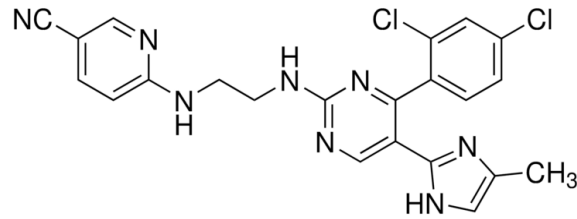


Figura 5. Estructura química de la molécula CHIR99021.

La vía de señalización Wnt se mantiene desactivada en ausencia de ligando, tal y como se muestra en la figura 6 A). La GSK3 β fosforila a la β -catenina provocando su ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma. La activación de la vía Wnt se produce cuando se une el ligando Wnt al receptor de membrana, como se puede ver en la figura 6 B). Se inhibe a la GSK3 β y cesa la fosforilación y degradación de la β -catenina, produciéndose una acumulación de β -catenina en el citoplasma y su translocación al núcleo. De esta manera se activan genes diana Wnt que regulan la progresión mitótica y la diferenciación celular (Nusse & Clevers, 2017; Rim et al., 2022).

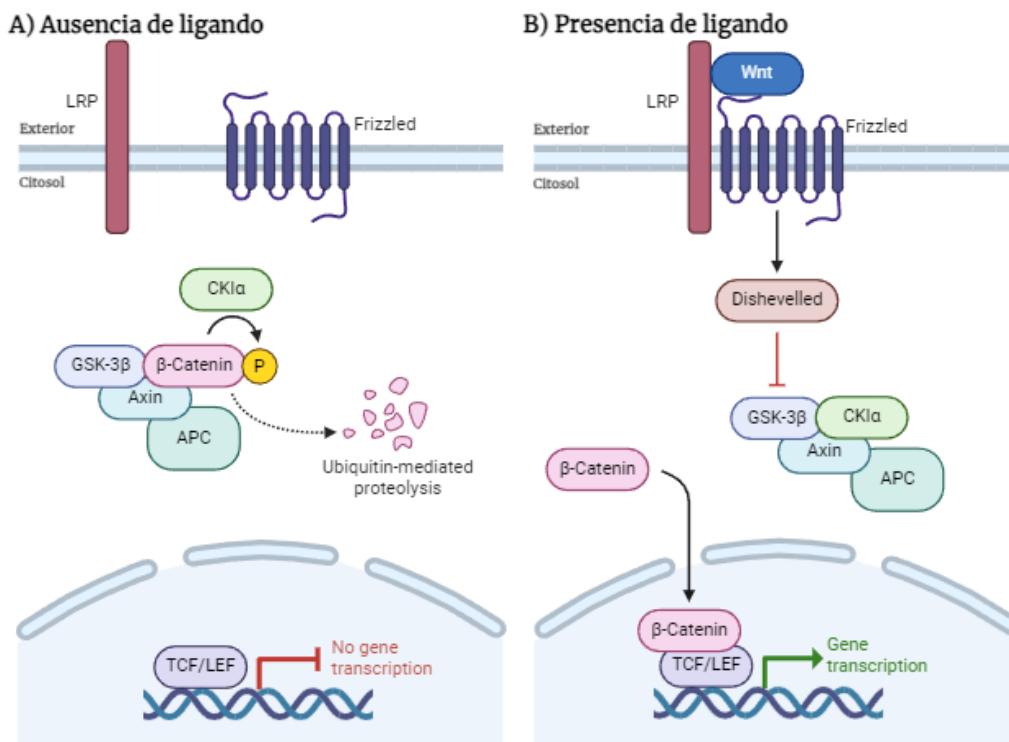


Figura 6. Vía de señalización Wnt. En la imagen A) la vía está desactivada debido a la ausencia de ligando, en cambio, en la imagen B) hay una activación de la vía provocada por la acción del ligando WNT. Figura modificada del programa Biorender (<https://app.biorender.com/>).

Diversos estudios han demostrado que el tratamiento de líneas celulares con CHIR99021 induce a la diferenciación celular hacia un linaje neuronal, gracias a su función como agonista de la vía de señalización Wnt (Chambers et al., 2012; Govarthanan et al., 2020; Kemp et al., 2016).

1.4.3 Ácido retinoico

El ácido retinoico (AR) es la forma activa de la vitamina A, se trata de una molécula lipófila que actúa en vías de señalización uniéndose a receptores nucleares y regulando la actividad transcripcional de varios genes diana, su estructura molecular se muestra en la figura 7. Participa en diversas funciones biológicas, entre ellas, en la embriogénesis, la diferenciación celular y la apoptosis (Kanungo, 2017; Niederreither & Dolle, 2008).

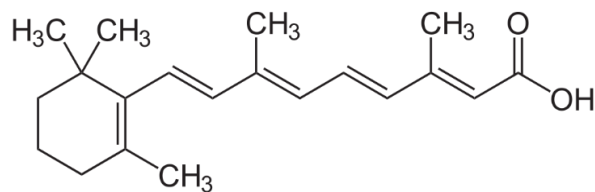


Figura 7. Estructura química de la molécula del ácido retinoico.

El AR es una molécula que desempeña un papel importante en la diferenciación celular *in vitro* a través de mecanismos complejos, entre los que se incluye la modulación de la transcripción génica y la inhibición de la proliferación celular. El ácido retinoico penetra por difusión pasiva en la célula y se une a sus receptores específicos en el núcleo celular, que son los receptores de ácido retinoico (RAR) y los receptores de retinoides X (RXR). Una vez se ha unido el AR, se forman complejos heterodiméricos entre RAR y RXR los cuales se unen a secuencias específicas del ADN. Los cambios en la expresión génica inducidos por el ácido retinoico promueven la diferenciación celular, en la figura 8 se muestra un resumen la vía de señalización del AR (Cunningham & Duester, 2015; Das et al., 2014; Maden, 2007; Niederreither & Dolle, 2008).

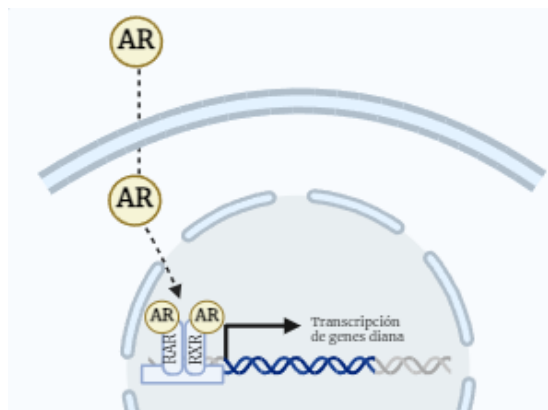


Figura 8. Resumen de la vía de señalización del ácido retinoico. Figura realizada con el programa Biorender (<https://app.biorender.com/>).

2. Objetivos

Las células neuronales humanas inmortalizadas son un buen modelo de neuronas humanas para la investigación de mecanismos fisiológicos del sistema nervioso central y para estudios de neurotoxicidad.

Entre estas, la línea celular CTX0E16 constituye una fuente sólida de células neuronales para investigar los mecanismos fisiológicos y la toxicidad de compuestos. Esta línea celular expresa canales iónicos dependientes de voltaje, receptores de GABA y glutamato y receptores colinérgicos, con propiedades funcionales y un fenotipo glutamatérgico (Anderson et al., 2015; Boente-Juncal, Mendez, et al., 2018; Boente-Juncal, Vale, et al., 2018), por lo cual podría ser un modelo *in vitro* para investigar compuestos tóxicos o compuestos con un efecto terapéutico. Sin embargo, el largo tiempo de diferenciación de estas células, que oscila entre los 30 y 60 días, a varios tipos de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos dificulta su uso habitual para estos objetivos.

Por ello, en este trabajo fin de grado se ha planteado el objetivo de desarrollar métodos de aceleración de la maduración de las células corticales humanas CTX0E16 para su uso en la evaluación de compuestos. Para ello, el trabajo se centra en dos objetivos:

- Establecer la viabilidad de las células madre neuronales humanas CTX0E16 tras su tratamiento con diferentes concentraciones de forskolina, CHIR99021 y ácido retinoico en medio de proliferación.
- Estudiar los métodos de aceleración de la diferenciación neuronal.

3. Material y métodos

3.1 Reactivos utilizados

El tampón fisiológico Locke's contiene en mM: 154 NaCl, 5,6 KCl, 1,3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico) y 5,6 glucosa (pH 7,4). Los flask de cultivo y las placas de cultivo de 96 pocillos empleados fueron de la marca Nunc. Las placas de cultivo de 12 pocillos empleadas fueron de la marca Avantor. El anticuerpo primario nestina y los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 647, Dylight 488, Dylight 594 y la poli-D-lisina han sido obtenidos de ThermoFisher. Los anticuerpos primarios GFAP, MAP2, NeuN y DCX se obtuvieron de Merck Millipore. El anticuerpo primario β -tubulina se obtuvo de BD-Pharmingen. El resto de los reactivos de laboratorio empleados han sido obtenidos de Sigma, salvo que se especifique expresamente otra procedencia.

3.2 Cultivo celular de la línea CTX0E16

Para este trabajo de fin de grado se empleó una línea neuronal humana denominada CTX0E16 que fue cedida por la compañía biofarmacéutica ReNeuron Group plc (Guildford, UK) e investigadores del Department of Basic and Clinical Neuroscience, Institute of Psychiatry Psychology & Neuroscience, King's College, London, mediante un acuerdo de transferencia de material con los investigadores del Departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de Lugo.

Estas células provienen de la corteza cerebral de un feto de 12 semanas de gestación y se immortalizan empleando un transgén c-MycER^{TAM} que permite la replicación de las células cuando se cultivan en presencia de 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT) (Pollock et al., 2006). Recientemente se ha caracterizado esta línea celular mediante la investigación del fenotipo molecular y celular de neuronas diferenciadas (Anderson et al., 2015).

El cultivo celular de células progenitoras neuronales humanas CTX0E16 se llevó a cabo en medio modificado reducido (RMM: DMEM : F12 que contiene HEPES 15 mM y bicarbonato sódico (Sigma) suplementado con albúmina sérica humana al 0,03 % (Sigma), 100 μ g/mL de apotransferrina (Scipac Ltd, Kent, UK), 16,2 μ g/mL de putrescina (Sigma), 5 μ g/mL de insulina humana (Sigma), 60 ng/mL de progesterona (Sigma), L-glutamina 2 mM (Sigma) y 40 ng/mL de selenito sódico (Sigma). Para la proliferación celular se añaden 10 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos humano (FGF: PeproTech, Rocky Hill, NJ), 20 ng/mL de factor de crecimiento epitelial humano (EGF, PeproTech, Rocky Hill, NJ) y 4 hidroxitamoxifeno 100 nM (Sigma)).

Es necesario un pretratamiento de los flask y de las placas de cultivo antes de su siembra con poli-D-lisina (PDL, 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; ThermoFisher) y laminina (LN, 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; Sigma), para la adherencia de la línea celular al plástico y su crecimiento en monocapa.

Una vez alcanzando el 70-80 % de confluencia las células deben de pasarse, en la Figura 9 muestra parte de dicho proceso. Para el pase celular se aspira el medio de cultivo y se lavan las células con HBSS (Hank's balanced salt solution) estéril para retirar los restos de medio. A continuación, se añade Acutasa (Sigma) estéril y se deja actuar 2-3 minutos en el incubador a 37 °C, se trata de una solución enzimática que despega las células del flask. Posteriormente se golpean con cuidado las paredes del flask de cultivo para que las células se desprendan del todo de la superficie del plástico y se comprueba en el microscopio invertido. La actividad de la Acutasa es inactivada añadiendo medio de cultivo al flask y la suspensión celular obtenida se centrifuga durante 5 minutos a 800 revoluciones por minuto (rpm). Se recoge un pequeño volumen de dicha suspensión, que se emplea para el conteo de la densidad celular en una cámara de Thoma. Una vez centrifugada la suspensión celular, se elimina el sobrenadante y las células, las cuales han precipitado al fondo, se resuspenden en 10 ml de medio. Según los resultados obtenidos en el conteo de la densidad celular en la cámara de Thoma se siembra un determinado volumen en cada flask o pocillo de la placa de cultivo. Una vez sembradas las células, deben de mantenerse en el incubador a 37 °C. Esta línea celular se puede mantener en cultivo hasta unos 30 o 35 pases.

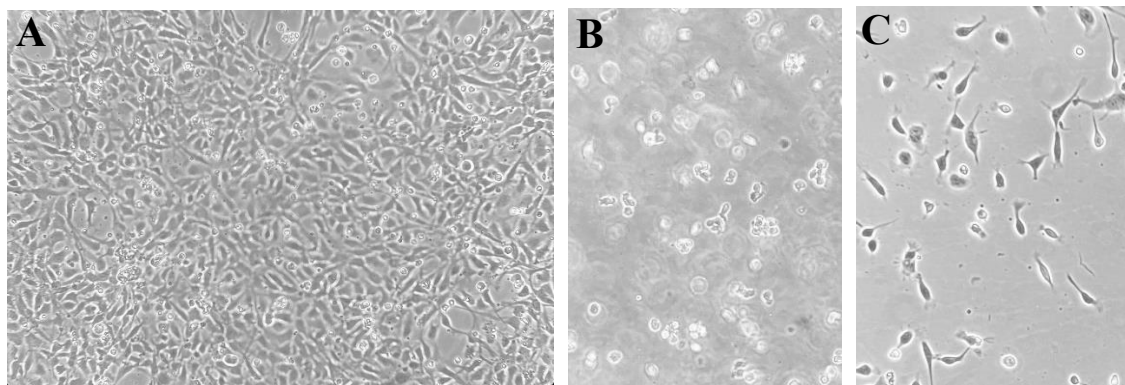


Figura 9. Células CTX0E16 con más de un 80 % de confluencia (A). Células tratadas con Acutasa (B), se encuentran despegadas del flask de cultivo. Células recién sembradas en un flask T25 (C).

Durante el tiempo en el que las células se encuentran en proliferación, el crecimiento celular provoca agotamiento del medio. Los nutrientes de este se consumen y se acumulan los productos metabólicos, lo cual puede llegar a ser tóxico para las células. Por este motivo, cada 2 o 3 días se debe cambiar el medio en el que se mantienen las células, aspirándolo y sustituyéndolo por el mismo volumen de medio fresco que el volumen retirado. Debe hacerse tanto en los pocillos de las placas de cultivo como en los flask de cultivo.

3.3 Determinación de la viabilidad celular

3.3.1 MTT

El ensayo de viabilidad celular utilizado para la evaluación de la toxicidad de la forskolina, de CHIR99021 y del ácido retinoico en la línea celular CTX0E16 fue el MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol). La línea celular se trató con diferentes concentraciones de los compuestos y se determinó la viabilidad del cultivo a través de una reacción colorimétrica.

El ensayo MTT se basa en la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales celulares para reducir el colorante MTT y producir un producto denominado formazán. El producto se acumula dentro de la célula, debido a su incapacidad de atravesar la membrana celular y, cuando se produce la solubilización celular, se libera, permitiendo su detección y cuantificación mediante un método colorimétrico (Vale C., 2024).

En la Figura 10 se muestra el fundamento del ensayo. Se observa cómo la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial depende de la concentración intracelular de NADH (nicotinamida deshidrogenasa dinucleótido). El NADH se reduce a NAD^+ permitiendo que ocurra la reacción en la que el MTT se convierte en el formazán. El MTT es un colorante de color amarillo y soluble en agua, en cambio, el formazán es de color violeta e insoluble en agua.

El formazán, al ser insoluble en agua, debe solubilizarse antes de llevar a cabo su lectura. Para ello, se pueden usar diferentes compuestos, como el dimetilsulfóxido (DMSO), dodecilsulfato sódico (SDS) y algunas combinaciones de detergentes y proteínas orgánicas (Heah et al., 2017; Kumar et al., 2018).

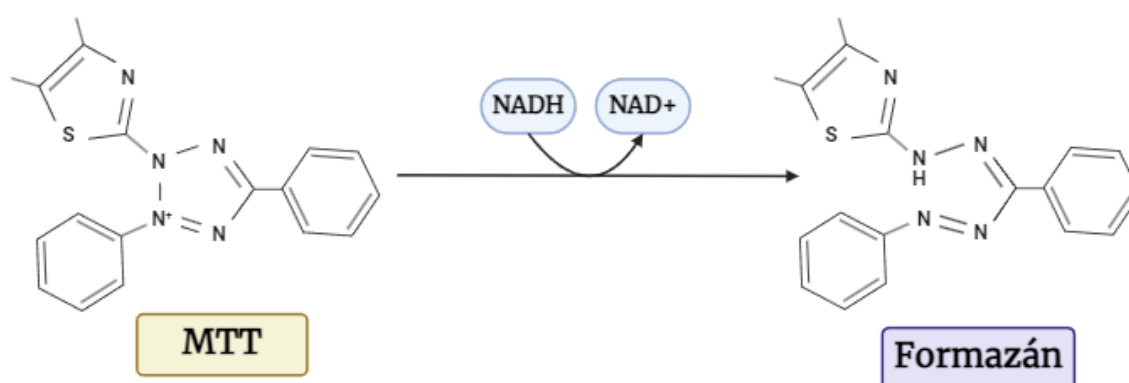


Figura 10. Esquema que muestra la estructura química del MTT (amarillo), del formazán (violeta) y el proceso de reducción del MTT por las deshidrogenasas mitocondriales. Figura realizada con el programa Biorender (<https://app.biorender.com/>).

La cantidad de formazán formado es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo, por lo que, las células metabólicamente inactivas, no van a tener la capacidad de formar el formazán.

La cuantificación colorimétrica se llevó a cabo mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector multimodal de microplacas (Synergy, Biotek). Los valores numéricos obtenidos se analizaron empleando el programa GraphPad Prism 8.

3.3.2 Tratamiento de las células con forskolina, CHIR99021 y ácido retinoico y determinación de la viabilidad celular

Para la realización del ensayo MTT se cultivaron las células CTX0E16 en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 40.000 células/mL, las placas fueron previamente tratadas con PDL y LN. Se dejaron en cultivo hasta alcanzar aproximadamente un 70 % de confluencia y se trataron con diferentes concentraciones de forskolina (0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M y 10 μ M), de CHIR99021 (0,3 μ M, 3 μ M y 30 μ M) y de ácido retinoico (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M y 30 μ M) durante 24 horas. Como control de muerte se empleó saponina a una concentración de 20 mg/mL.

Antes de realizar los tratamientos se observó la placa de cultivo en el microscopio invertido para comprobar que el crecimiento celular en los pocillos es homogéneo y que las células están vivas en todos ellos. En caso de que en algún pocillo esto no sea así, se descarta del experimento ya que podría llevar a resultados erróneos.

A las 24 horas de tratamiento se realizó el ensayo de viabilidad celular. En los primeros ensayos se realizó una aspiración del medio que contenía cada pocillo y posteriormente se lavó cada uno de los mismos con Locke's, con el objetivo de eliminar las células muertas. Se añadió en cada uno de los pocillos una disolución de 500 μ g/ml de MTT disuelto en Locke's y se incubó durante 60 minutos. La incubación tuvo lugar en un incubador de placas a 37 °C, en agitación constante (a 300 rpm) y en oscuridad, para evitar la degradación del MTT. A continuación, se aspiró el MTT y se añadió a cada uno de los pocillos DMSO (\geq 99,5 % de pureza, Sigma) para disgregar las células. La placa se mantuvo en DMSO toda la noche sellada con parafilm y envuelta en papel de aluminio para protegerla de la luz. Finalmente, la absorbancia emitida se leyó a 595 nm en un lector multimodal de placas Synergy 4 de Biotek. En la realización de este procedimiento se observó que las células se desprendían de la placa al lavarlas con el Locke's, por lo que los datos obtenidos no eran precisos. Como solución al problema se realizó el mismo ensayo, pero añadiendo el MTT directamente al medio de cultivo, lo que evitaba el desprendimiento celular. Los valores numéricos obtenidos se analizaron empleando el programa GraphPad Prism 8.

3.4 Inmunocitoquímica y análisis microscópico

La inmunocitoquímica es una técnica de inmunotinción que permite visualizar antígenos presentes en las células usando anticuerpos marcados. Se basa en añadir en la muestra que se va a estudiar el anticuerpo contra el antígeno que se desea detectar. En este caso se marcaron los anticuerpos primarios con anticuerpos secundarios fluorescentes (Ramos-Vara, 2005).

Para realizar la inmunocitoquímica, se cultivaron las células en cubreobjetos en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad celular de 70.000 células/mL y se dejaron en cultivo hasta alcanzar aproximadamente un 70 % de confluencia. Se trataron las células con forskolina (0,1 μ M, 1 μ M y 10 μ M), CHIR99021 (0,3 μ M y 3 μ M) y ácido retinoico (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M y 30 μ M) y se dejaron 48 horas. A continuación, se lavaron las células con tampón fosfato (PBS) a pH 7,2-7,4 y se fijaron durante 10 minutos con una disolución de paraformaldehído al 4 % y sacarosa al 4 % disueltos en PBS. Después, se incubaron con metanol preenfriado (-20 °C) durante 10 minutos a 4 °C, para desenmascarar proteínas con estructuras ricas en lípidos, como las espinas de las dendritas (Anderson et al., 2015; Srivastava et al., 2011). A continuación, se lavaron las células dos veces con PBS y se realizó un bloqueo de la reactividad inespecífica con PBS, 5 % de albúmina de suero bovino (BSA, del inglés bovine serum albumin) y 0,1 % (v/v) de tritón X-100 durante 50 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron los anticuerpos primarios seleccionados a sus respectivas diluciones (disueltos en PBS, 2 % de BSA y 0,1 % de tritón X-100), y se dejan en agitación a 4 °C toda la noche. Al día siguiente se hacen tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS y se añaden los anticuerpos secundarios seleccionados (disueltos en PBS, 2 % de BSA y 0,1 % de tritón X-100), dejando incubar 1 hora a temperatura ambiente y tapada la placa con papel de aluminio. En las tablas 3 y 4 se describen los anticuerpos utilizados. Una vez finalizada la incubación las células se lavaron tres veces con PBS durante 10 minutos. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos empleando líquido de montaje (4,5 mL de glicerol y 0,5 mL de PBS), se sellaron con esmalte de uñas y se dejaron secar para su observación al microscopio con el objetivo 40 x añadiendo aceite de inmersión. Las imágenes se adquirieron empleando un microscopio laser confocal Nikon TE2000E (Nikon, Mellville, NY) excitando los fluoróforos con los láseres 488 y 561.

Tabla 3. *Anticuerpos primarios utilizados en la inmucitoquímica, con sus respectivas diluciones y funciones. En el caso de MAP2 y de la nestina se especificará en qué momento se usó cada dilución.*

Anticuerpos primarios			
	Nombre	Dilución	Función
Ratón	DCX	1:1000	Marcador de microtúbulos
	β -tubulina	1:1000	Marcador de microtúbulos
	MAP2	1:1000 1:500	Marcador de células neuronales diferenciadas
	Nestina	1:1000 1:200	Marcador del citoesqueleto
Conejo	GFAP	1:1000	Marcador de astrocitos maduros de cerebro adulto y de células precursoras de nuevas neuronas
	NeuN	1:1000	Marcador de núcleo neuronal

Tabla 4. *Anticuerpos secundarios utilizados en la inmucitoquímica, con sus respectivas diluciones y longitudes de onda de excitación y emisión.*

Anticuerpos secundarios					
	Nombre	Dilución	Tipo	λ excitación (nm)	λ emisión (nm)
Ratón	Dylight 594	1:500	Policlonal	587	614
	Alexa Fluor 647	1:500	Policlonal recombinante	650	671
Conejo	Dylight 488	1:500	Policlonal	492	519

Los espectros de excitación y emisión de los anticuerpos secundarios se muestran en la Figura 11. Los controles negativos para la especificidad de los anticuerpos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario.

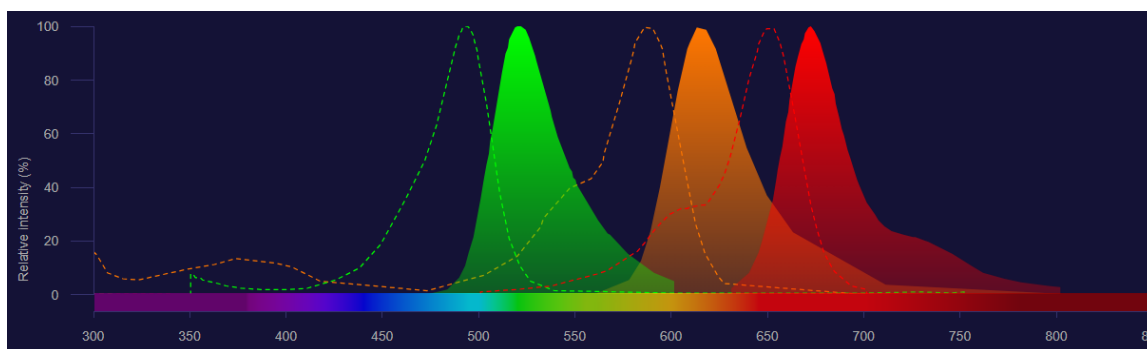


Figura 11. *Espectro que muestra las longitudes de onda de excitación (línea punteada) y de emisión (línea continua) para Dylight 488 (verde), Dylight 594 (naranja) y Alexa Fluor 647 (rojo). Imagen realizada en (<https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer/?SID=fr-probe-4#!/>).*

3.5 Análisis estadístico

Para el análisis del efecto de la forskolina, CHIR99021 y del ácido retinoico sobre la viabilidad celular los datos se expresaron como la media \pm SEM (error estándar de la media) de 3 repeticiones, cada una en triplicado. Para la comparación de las diferencias de medias entre más de dos grupos se empleó el análisis de la varianza de una variable (ANOVA). Los valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Las gráficas se obtuvieron mediante el software GraphPad Prism 8.

4. Resultados

4.1 Evaluación del efecto de la forskolina, CHIR99021 y del ácido retinoico sobre la viabilidad celular empleando el ensayo MTT

En primer lugar, se evaluó el efecto de las moléculas inductoras de la diferenciación neuronal, que en este trabajo fin de grado fueron la forskolina, CHIR99021 y el ácido retinoico, añadiéndolos al medio de proliferación celular (RMM) cuando las células estaban al 70% de confluencia, 2 días después de la siembra. Posteriormente, se mantuvieron en presencia de los inductores de diferenciación neuronal durante 24 horas en cultivo, para evaluar su efecto sobre la viabilidad celular empleando el ensayo MTT.

Primeramente, para el ensayo de MTT se lavaron las células con Locke's y se añadió después el MTT. En la Figura 12 A) se muestra que la forskolina a concentraciones entre 0,001 μM y 10 μM , usadas habitualmente para inducir la diferenciación neuronal (Ammer & Schulz, 1997; Bergsbaken et al., 1993; Bonvallet et al., 1990; Raposo-Garcia et al., 2023; Wang et al., 2024), no disminuía la viabilidad celular. La viabilidad en las células control fue $100 \pm 16,5 \%$, en células tratadas con 0,001 μM fue de $101,2 \pm 15,3 \%$, en células tratadas con 0,01 μM fue de $99,7 \pm 18,3 \%$, en células tratadas con 0,1 μM fue de $112,8 \pm 29,7 \%$, en células tratadas con 1 μM fue de $118,3 \pm 25,7 \%$ y en células tratadas con 10 μM fue de $154,5 \pm 3,1 \%$. Sin embargo, los resultados presentaban un error elevado, que, durante el curso del experimento, se atribuyó a que durante el proceso de lavado las células se despegaban de la placa de cultivo, un hecho previamente descrito en células de neuroblastoma (Raposo-Garcia et al., 2023), por lo que los resultados pudieran estar sesgados por la disminución del número de células en el pocillo.

Tras este primer ensayo de MTT se decidió reevaluar el efecto de la forskolina sobre la viabilidad de las células añadiendo directamente el MTT al medio de cultivo, es decir, sin lavar las células con Locke's. Los resultados se muestran en la Figura 12 B). En estas condiciones las células no se despegaron de las placas por lo que los resultados cambiaron y los errores disminuyeron. La viabilidad en las células control fue $100 \pm 13,4 \%$, en células tratadas con 0,001 μM fue de $96,6 \pm 16 \%$, en células tratadas con 0,01 μM fue de $95,7 \pm 15,5 \%$, en células tratadas con 0,1 μM fue de $97,6 \pm 11,7 \%$, en células tratadas con 1 μM fue de $113,7 \pm 12,3 \%$ y en células tratadas con 10 μM fue de $131,4 \pm 4,3 \%$.

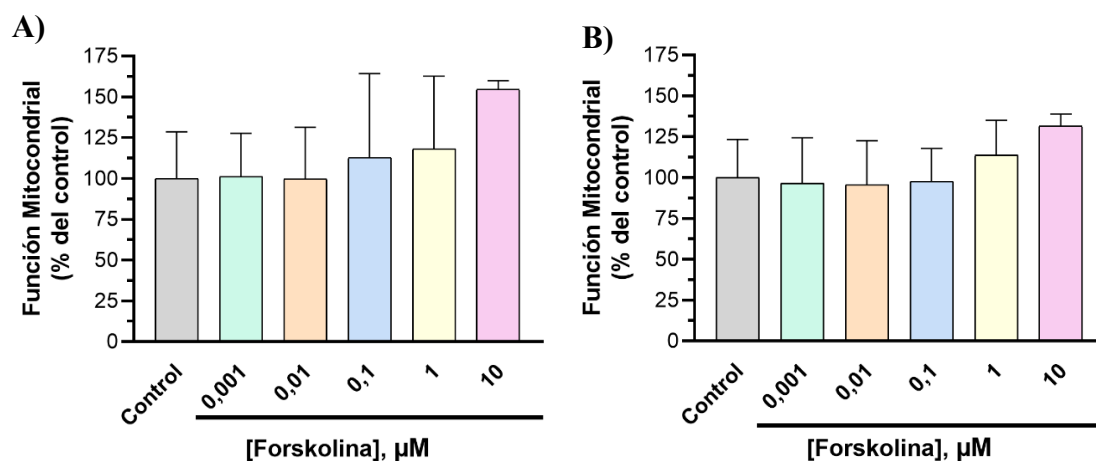


Figura 12. A) Efecto de diferentes concentraciones de forskolina sobre la función mitocondrial en la línea celular CTX0E16, cuando el ensayo del MTT se realiza en Locke's y se retira el medio celular antes de realizar el ensayo MTT. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados en triplicado. B) Efecto de diferentes concentraciones de forskolina sobre la función mitocondrial en la línea celular CTX0E16, cuando el ensayo del MTT se realizó directamente en el medio de cultivo. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados en triplicado.

Cómo segunda molécula inductora de la diferenciación celular se usó CHIR99021. Previamente se evaluó el efecto de CHIR99021 sobre la viabilidad de las células CTX0E16, con el objetivo de establecer que concentraciones son las más adecuadas para su posterior uso. No obstante, el ensayo de MTT se llevó a cabo añadiendo directamente el MTT en el medio de cultivo, para evitar que las células se despegasen de la placa de cultivo.

En la Figura 13 se observa el tratamiento con CHIR99021 a concentraciones entre 0,3 μ M y 30 μ M, concentraciones elegidas en base a estudios previos empleando el mismo compuesto para la diferenciación de organoides y células madre (Delepine et al., 2021; Govarthanan et al., 2020). CHIR99021 a una concentración 30 μ M disminuyó la viabilidad celular significativamente con respecto al control, mientras que a 0,3 μ M no modificó el parámetro, sin embargo, a 3 μ M aumentó la viabilidad celular de manera significativa con respecto al control. La viabilidad en células control fue de $100 \pm 2,0$ %, en células tratadas con 0,3 μ M fue de $92,57 \pm 0,8$ %, $121,5 \pm 6,14$ % en células tratadas con 3 μ M y de $4,6 \pm 0,6$ % en células tratadas durante 24 horas con CHIR99021 30 μ M.

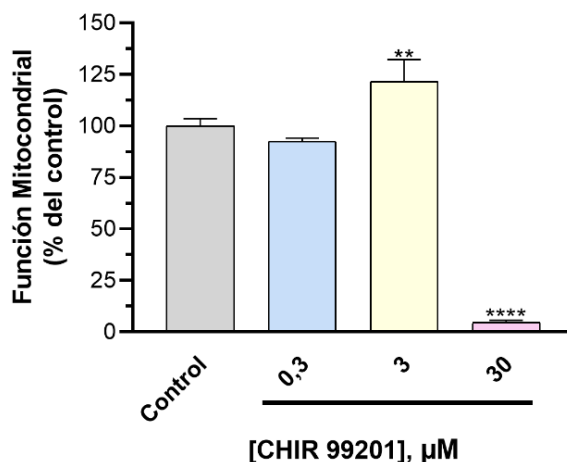


Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones de CHIR99021 sobre la función mitocondrial en la línea celular CTX0E16. Las células fueron expuestas a tres concentraciones diferentes de CHIR99021 durante 24 horas y se realizó el ensayo MTT añadiendo el MTT directamente en el medio de cultivo. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados en triplicado. *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$.

Cómo tercera y última molécula inductora de la diferenciación celular se usó el ácido retinoico. El ensayo de MTT se llevó a cabo añadiendo directamente el MTT en el medio de cultivo, para evitar que las células se despegasen de la placa de cultivo. En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos, donde ninguna de las concentraciones utilizadas disminuyó la viabilidad celular. La viabilidad en las células control fue $100 \pm 3,1$ %, en células tratadas con $0,1 \mu\text{M}$ fue de $98,5 \pm 3,5$ %, en células tratadas con $1 \mu\text{M}$ fue de $114,3 \pm 4,3$ %, en células tratadas con $10 \mu\text{M}$ fue de $116,1 \pm 9,0$ %, en células tratadas con $20 \mu\text{M}$ fue de $107 \pm 5,9$ % y en células tratadas con $30 \mu\text{M}$ fue de $100,6 \pm 2,7$ %.

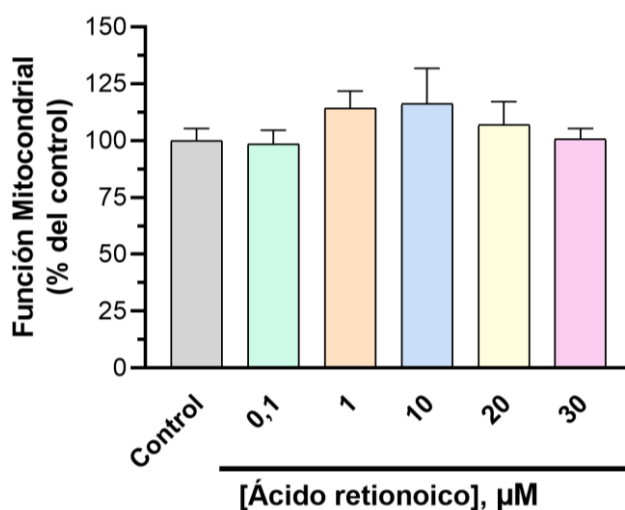


Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de ácido retinoico sobre la función mitocondrial en la línea celular CTX0E16. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de ácido

retinoico durante 24 horas y se realizó el ensayo MTT añadiendo el MTT directamente en el medio de cultivo. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados en triplicado.

4.2 Controles de los marcadores de diferenciación neuronal en la línea celular CTX0E16 mediante inmunocitoquímica

En esta parte del trabajo se cultivó la línea celular CTX0E16 en cubreobjetos en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad celular de 70.000 células/mL. El objetivo fue realizar estudios inmunocitoquímicos de las células creciendo en el medio de proliferación y establecer las diluciones de los marcadores neuronales. Las células se mantuvieron en el medio de proliferación durante seis días. Se probaron varios marcadores de manera individual (DCX, MAP2, nestina, GFAP, β -tubulina y NeuN) y la mezcla de dos de ellos (β -tubulina con GFAP) y se realizaron controles sin anticuerpo primario. Todos los anticuerpos primarios se usaron a una dilución 1:1000 y los secundarios a 1:500 (Dylight 488 y Dylight 594). Ninguno de los cubres incubados sin anticuerpo primario mostró una señal comparable a la obtenida en presencia de los anticuerpos primarios y, en el caso de los cubres incubados con anticuerpos primarios, todos mostraron expresión de este. En las Figuras 15, 16 y 17 se muestran los resultados obtenidos.

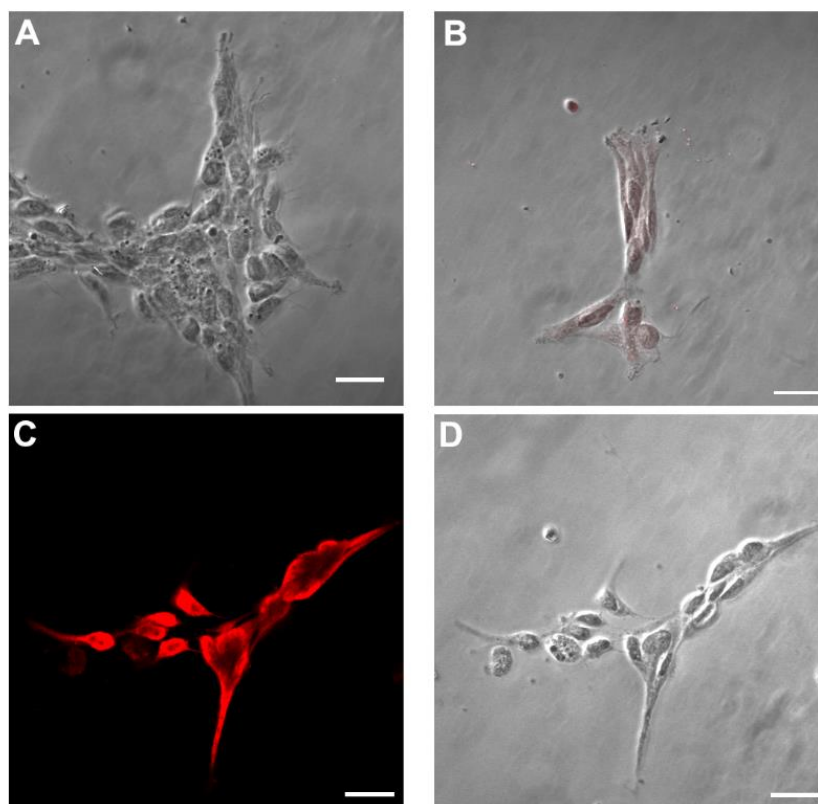


Figura 15. Imágenes de microscopía confocal que muestran el control de Dylight 488 y de Dylight 594 y la expresión de DCX. A: control sin anticuerpo primario y con el anticuerpo secundario

Dylight 488. B: control sin anticuerpo primario y con el anticuerpo secundario Dylight 594. C: expresión de DCX marcada en rojo con el anticuerpo secundario Dylight 594. D: imagen en campo claro de las células con anticuerpo primario anti-DCX y anticuerpo secundario Dylight 594. En todas las imágenes la barra de escala es de 20 μm .

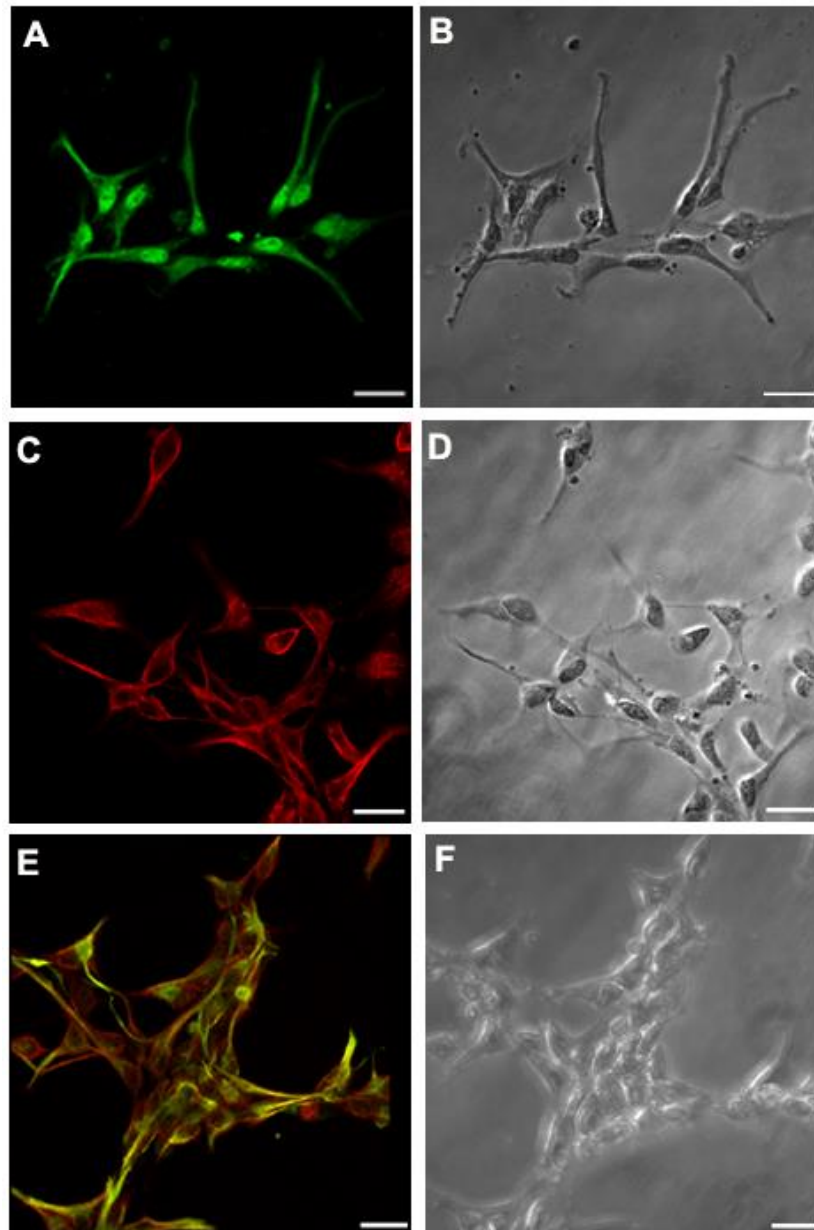


Figura 16. Imágenes de microscopia confocal que muestran la expresión de GFAP y β -tubulina. A: expresión de GFAP marcada en verde con el anticuerpo secundario Dylight 488. B: imagen en campo claro de la misma muestra. C: expresión de β -tubulina marcada en rojo con el anticuerpo secundario Dylight 595. D: imagen en campo claro de las mismas células. E: expresión de β -tubulina marcada en rojo con el anticuerpo secundario Dylight 595 y de GFAP marcada en verde con el anticuerpo secundario Dylight 488. F: imagen en campo claro de la expresión de β -tubulina y GFAP. En todas las imágenes la barra de escala es de 20 μm .

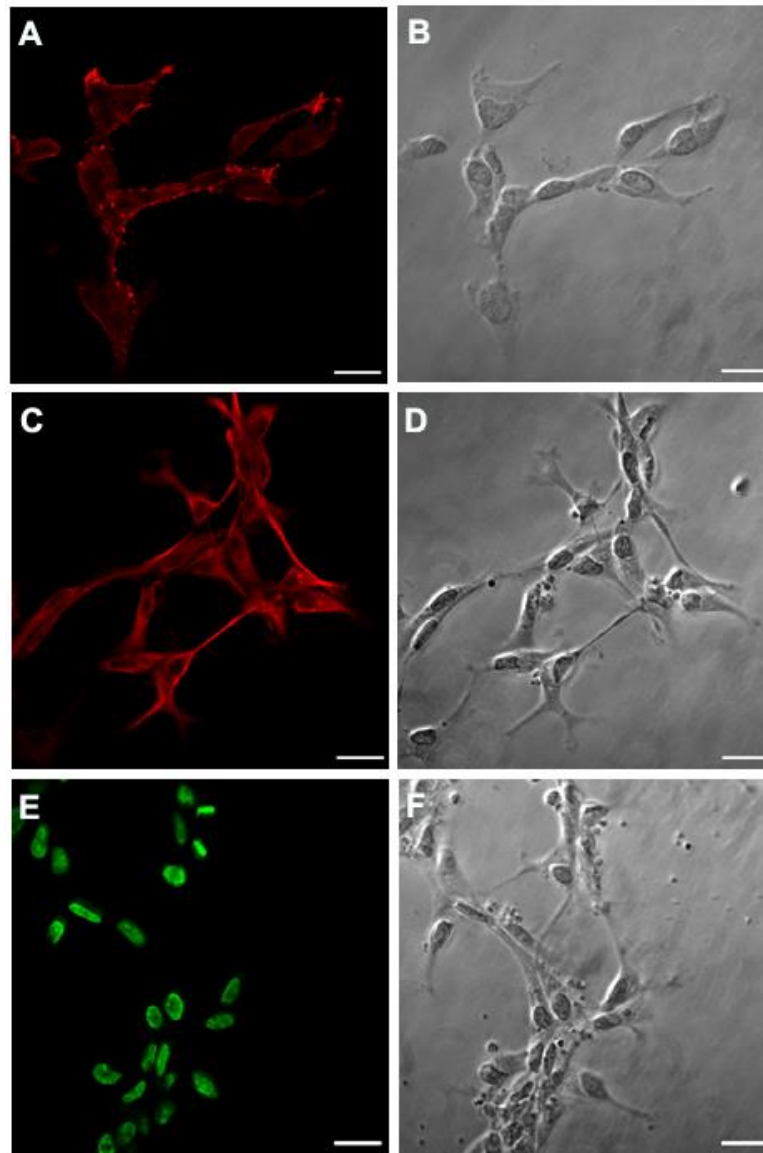


Figura 17. Imágenes de microscopía confocal que muestra la expresión de MAP2, nestina y NeuN. A: expresión de MAP2 marcada en rojo con el anticuerpo secundario Dylight 594. B: imagen en campo claro de las mismas células. C: expresión de la nestina marcada en rojo con el anticuerpo secundario Dylight 595. D: imagen en campo claro de la expresión de la misma muestra. E: expresión de NeuN marcada en verde con el anticuerpo secundario 488. F: imagen en campo claro de las mismas células. En todas las imágenes la barra de escala es de 20 μm .

4.3 Estudio del efecto de moduladores enzimáticos en la diferenciación neuronal mediante inmunocitoquímica

4.3.1 Estudio del efecto de la forskolina

En base a los resultados obtenidos en el ensayo MTT, se decidieron usar las concentraciones 0,1 μM , 1 μM y 10 μM de forskolina para evaluar su efecto en la diferenciación celular mediante la

técnica de inmunocitoquímica. Para ello, se cultivó la línea celular CTX0E16 en cubreobjetos en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad celular de 70.000 células por pocillo. Las células se trataron con las concentraciones mencionadas de forskolina y se dejaron 48 horas en cultivo. Pasado este tiempo se siguió el protocolo de inmunocitoquímica previamente descrito. Se usaron cuatro anticuerpos primarios diferentes (GFAP, MAP2, nestina y NeuN).

En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos tras incubar las células con GFAP como anticuerpo primario y Dylight 488 como anticuerpo secundario. Se observa como a medida que aumenta la concentración de forskolina disminuye la expresión del marcador GFAP, es decir, disminuyen las células gliales, hasta llegar a desaparecer cuando la concentración de forskolina es 10 μM .

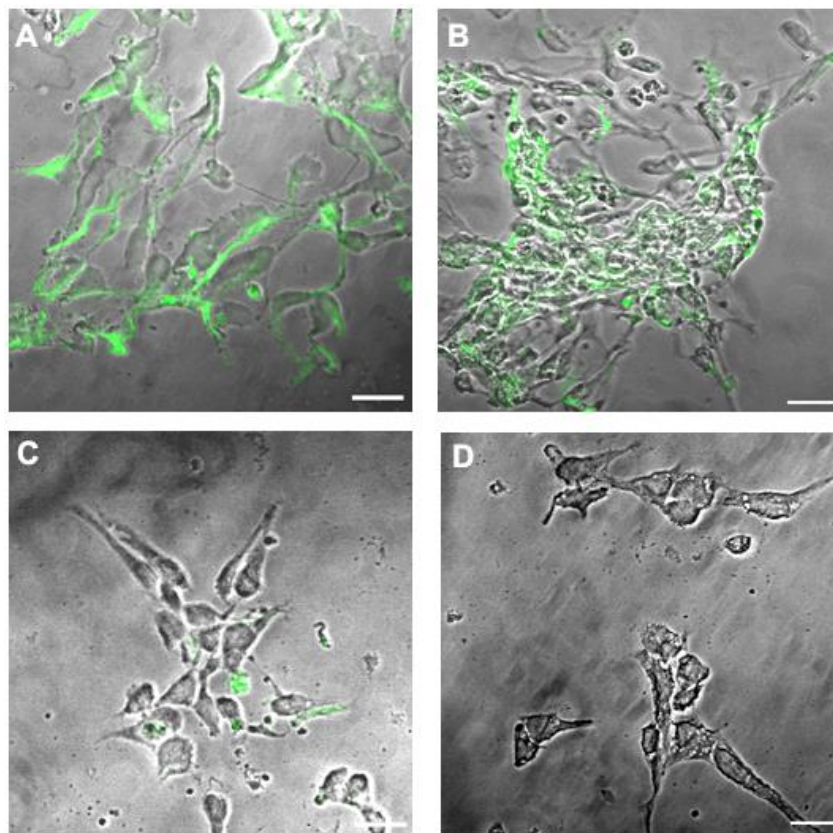


Figura 18. Imagen de microscopia confocal donde la expresión de GFAP está marcada en color verde. A: control, células no tratadas con forskolina. B: células tratadas con 0,1 μM de forskolina. C: células tratadas con 1 μM de forskolina. D: células tratadas con 10 μM de forskolina. La barra de escala es de 20 μm .

En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos, en las mismas condiciones, tras la inmunocitoquímica para MAP2 como anticuerpo primario y Dylight 594 como anticuerpo secundario. Se observó que la expresión de la proteína no se alteraba en presencia de la forskolina, si bien la intensidad de la fluorescencia en cada caso no ha sido cuantificada.

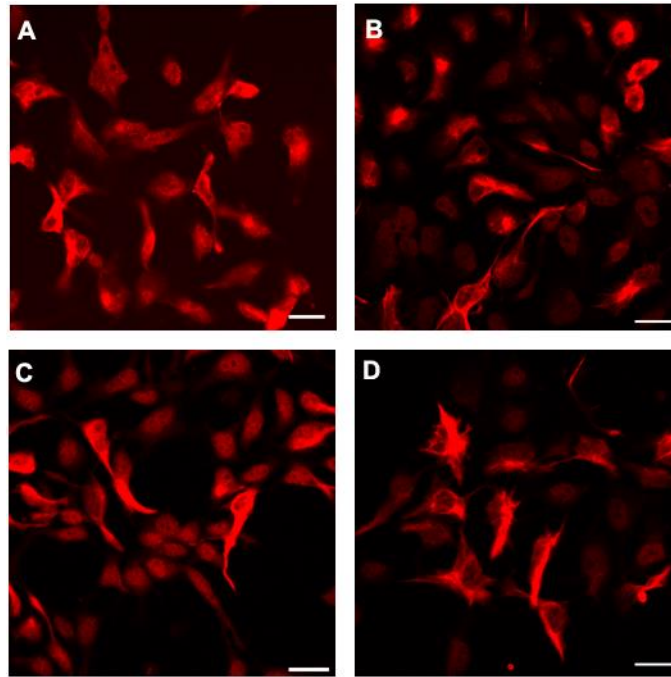


Figura 19. Imagen de microscopía confocal donde la expresión de MAP2 está marcada en color rojo. MAP2 se utilizó a una dilución 1:500. A: control, células no tratadas con forskolina. B: células tratadas con 0,1 μM de forskolina. C: células tratadas con 1 μM de forskolina. D: células tratadas con 10 μM de forskolina. La barra de escala es de 20 μm .

Cuando se examinó el efecto de la forskolina sobre la expresión de NeuN (Figura 20), los resultados obtenidos indicaron que la forskolina no afectaba a la expresión de NeuN.

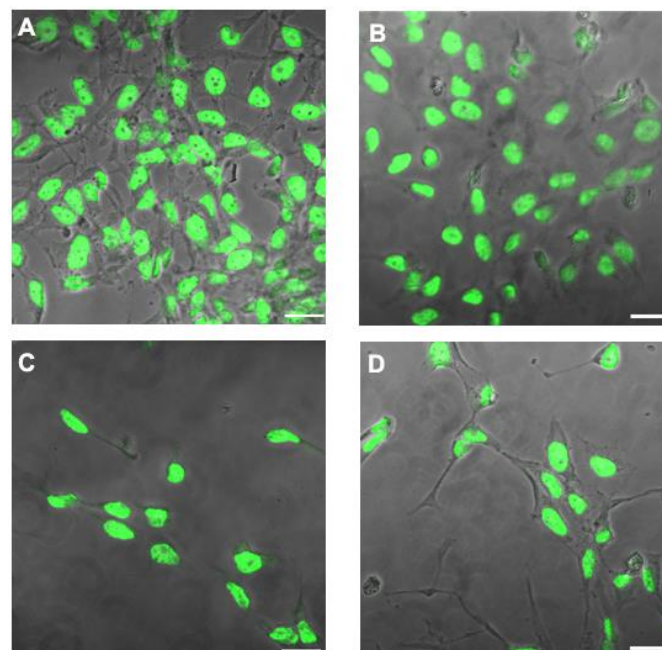


Figura 20. Imagen de microscopía confocal donde la expresión de NeuN está marcada en color verde. A: control, células no tratadas con forskolina. B: células tratadas con 0,1 μM de

forskolina. C: células tratadas con 1 μM de forskolina. D: células tratadas con 10 μM de forskolina. La barra de escala es de 20 μm .

El análisis del efecto de la forskolina sobre la expresión de nestina se muestra en la Figura 21, usando Alexa Fluor 647 como anticuerpo secundario. En presencia de diferentes concentraciones de forskolina la expresión de la nestina se mantuvo constante.

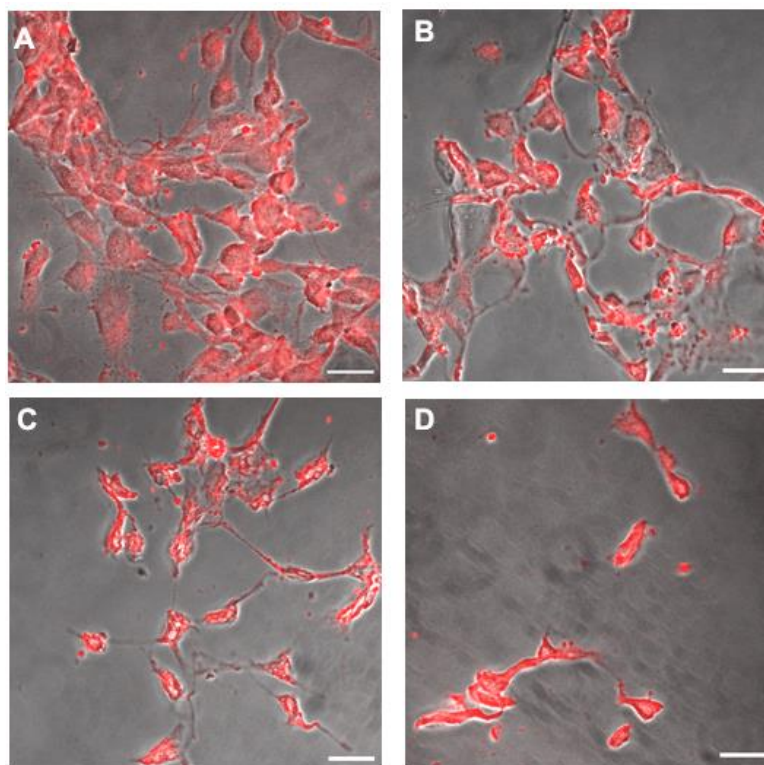


Figura 21. Imagen de microscopía confocal mostrando la expresión de nestina superpuesta con las imágenes de campo claro. La nestina se utilizó a una dilución 1:200. A: control, células no tratadas con forskolina. B: células tratadas con 0,1 μM de forskolina. C: células tratadas con 1 μM de forskolina. D: células tratadas con 10 μM de forskolina. La barra de escala es de 20 μm .

4.3.2 Estudio del efecto de CHIR99021

En base a los resultados obtenidos en el ensayo MTT, se usaron las concentraciones 0,3 μM y 3 μM de CHIR99021, en condiciones similares a las descritas para la forskolina durante 48 horas para analizar el efecto de la molécula sobre la expresión de GFAP, MAP2, nestina y NeuN.

En la Figura 22 se muestra el efecto de CHIR99021 sobre la expresión de la proteína marcadora de células gliales GFAP. Los resultados obtenidos indican que, aparentemente, este compuesto a concentraciones 0,3 μM y 3 μM no modifica la expresión de células gliales.

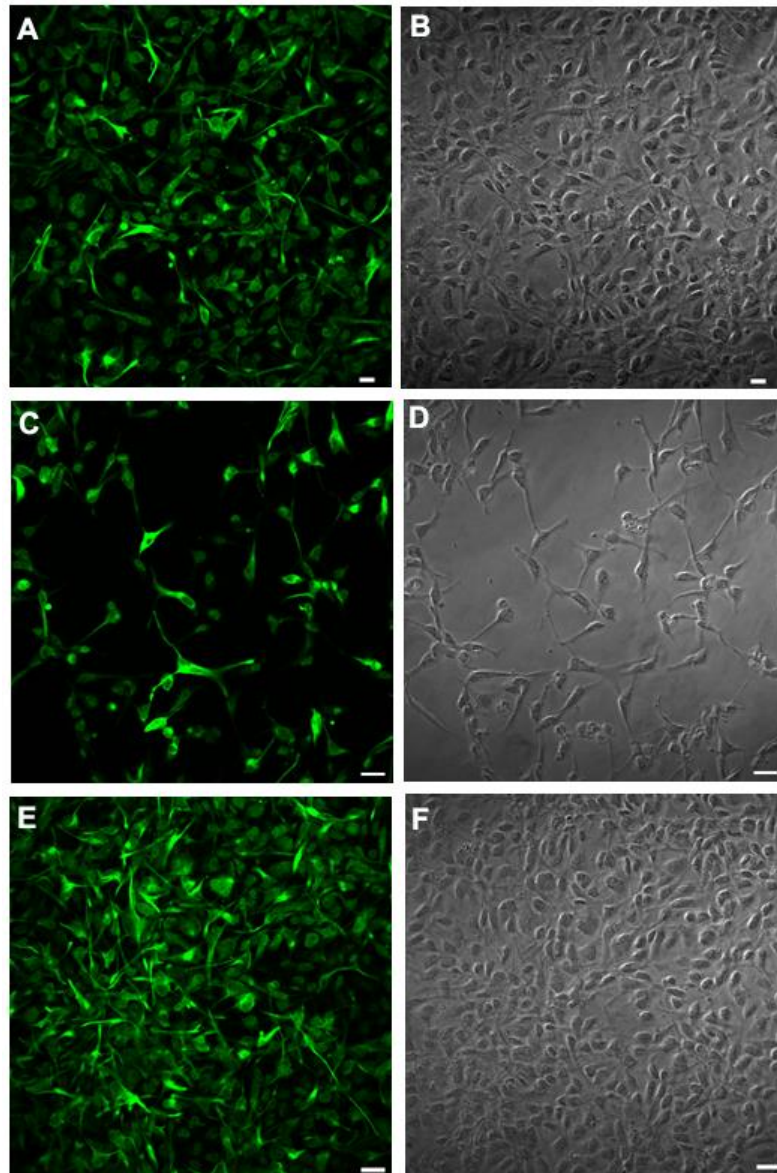


Figura 22. Imagen de microscopia confocal donde la expresión de GFAP está marcada en color verde con el anticuerpo secundario Dylight 488. *A:* control, células no tratadas con CHIR99021. *B:* imagen en campo claro del control *C:* células tratadas con 0,3 μM de CHIR99021. *D:* imagen en campo claro de las células tratadas con 0,3 μM de CHIR99021. *E:* células tratadas con 3 μM de CHIR99021. *F:* imagen en campo claro de las células tratadas con 3 μM de CHIR99021. La barra de escala es de 20 μm .

Posteriormente se evaluó el efecto de CHIR99021 sobre la expresión de la proteína asociada a los microtúbulos tras 48 horas de exposición de las células al compuesto a concentraciones de 0,3 μM y 3 μM (Figura 23). Aparentemente, la exposición de las células a CHIR99021 no modifica la expresión de MAP2, si bien es de resaltar el mayor número de las prolongaciones neuronales en las células tratadas que en las células control.

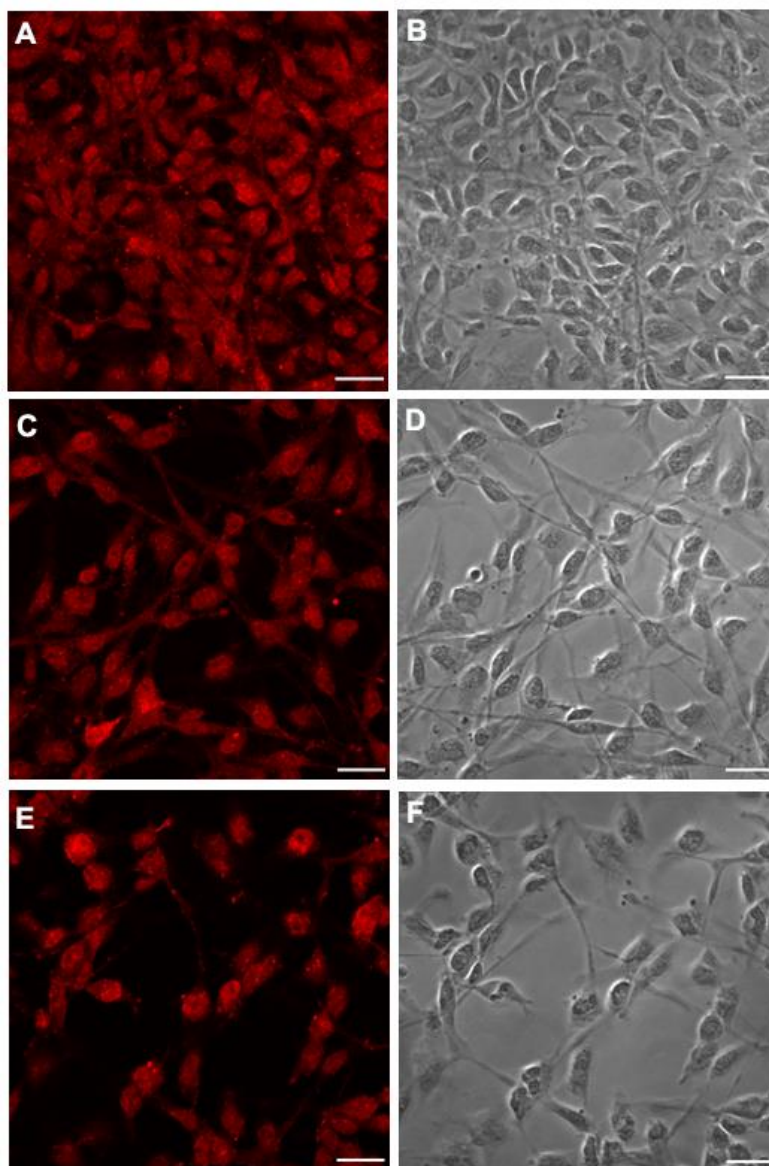


Figura 23. Imagen de microscopia confocal donde la expresión de MAP2 (1:1000) está marcada en color rojo con el anticuerpo secundario Dylight 594. A: control, células no tratadas con CHIR99021. B: imagen en campo claro del control C: células tratadas con 0,3 μM de CHIR99021. D: imagen en campo claro de las células tratadas con 0,3 μM de CHIR99021. E: células tratadas con 3 μM de CHIR99021. F: imagen en campo claro de las células tratadas con 3 μM de CHIR99021. La barra de escala es de 20 μm .

En la Figura 24 se muestra el efecto de CHIR99021 sobre la expresión de la proteína nuclear NeuN. Los resultados obtenidos indican que, aparentemente, este compuesto a concentración 3 μM no modifica la expresión de NeuN.

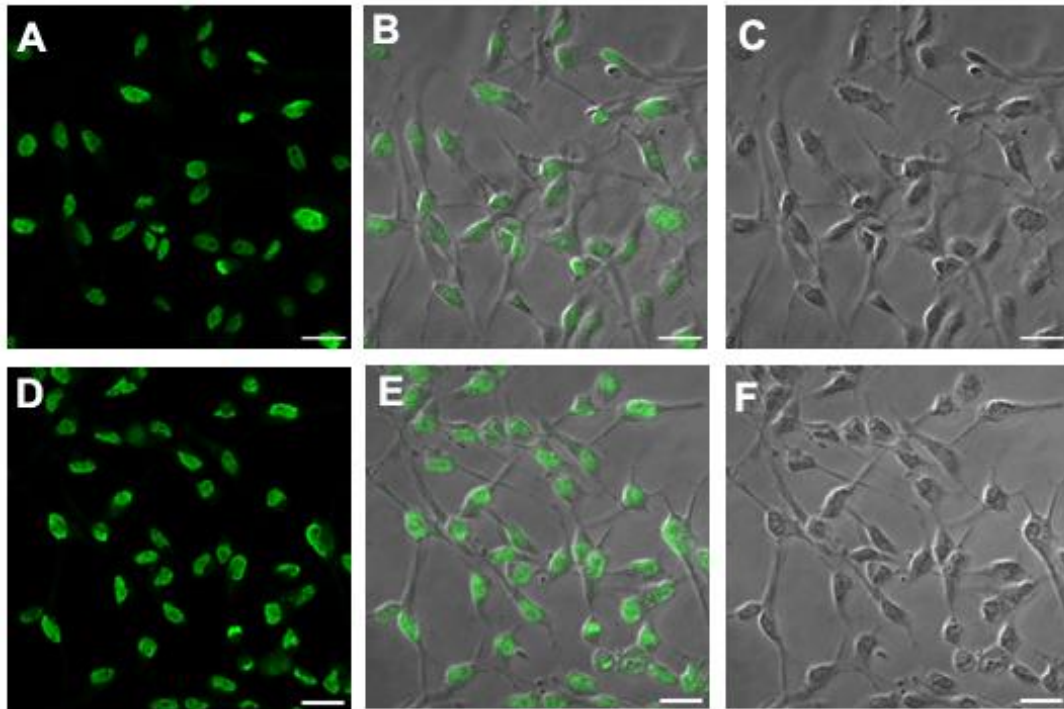


Figura 24. Imagen de microscopia confocal donde la expresión de NeuN está marcada en color verde con el anticuerpo secundario Dylight 488. A: control, células no tratadas con CHIR99021. B: control en campo claro con la señal del marcador superpuesta C: imagen en campo claro del control. D: células tratadas con 3 μM de CHIR99021. E: imagen en campo claro con la señal del marcador superpuesta de células tratadas con 3 μM de CHIR99021. F: imagen en campo claro de las células tratadas con 3 μM de CHIR99021. La barra de escala es de 20 μm .

En la Figura 25 se muestra la expresión de nestina en células control y en células tratadas durante 48 horas con CHIR99021 a concentraciones 0,3 μM y 3 μM , en este caso, la intensidad de la fluorescencia incrementó en las células tratadas con el compuesto a concentraciones de 3 μM .

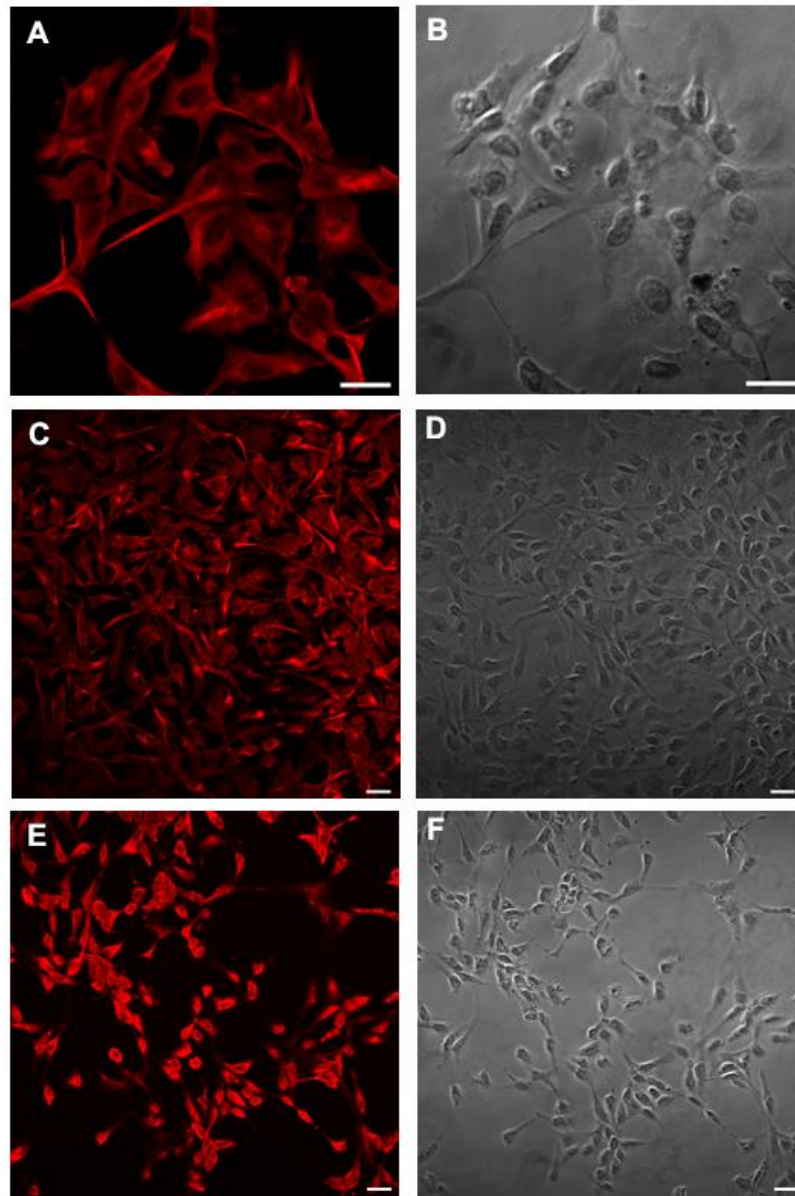


Figura 25. Imagen de microscopia confocal donde la expresión de nestina (1:1000) está marcada en color rojo con el anticuerpo secundario Dylight 594. A: control, células no tratadas con CHIR99021. B: imagen en campo claro del control C: células tratadas con 0,3 μM de CHIR99021. D: imagen en campo claro de las células tratadas con 0,3 μM de CHIR99021. E: células tratadas con 3 μM de CHIR99021. F: imagen en campo claro de las células tratadas con 3 μM de CHIR99021. La barra de escala es de 20 μm .

4.3.3 Estudio del efecto del ácido retinoico

En base a los resultados obtenidos en el ensayo MTT, se usaron las concentraciones 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 20 μM y 30 μM de ácido retinoico, en condiciones similares a las descritas para la forskolina y CHIR99021 durante 48 horas para analizar el efecto de la molécula sobre la expresión de GFAP y MAP2.

En la Figura 26 se muestra el efecto del ácido retinoico sobre la expresión de la proteína marcadora de células gliales GFAP. Diferentes concentraciones de ácido retinoico no modificaron la expresión de GFAP si bien aparece una evidente modificación en la localización de la expresión de GFAP. El ácido retinoico a las concentraciones empleadas en este trabajo modificó la expresión de GFAP aparente en el soma y en las prolongaciones en células control (Figura 26 A-B) a una localización citoplasmática y perinuclear (Figura 26C-L).

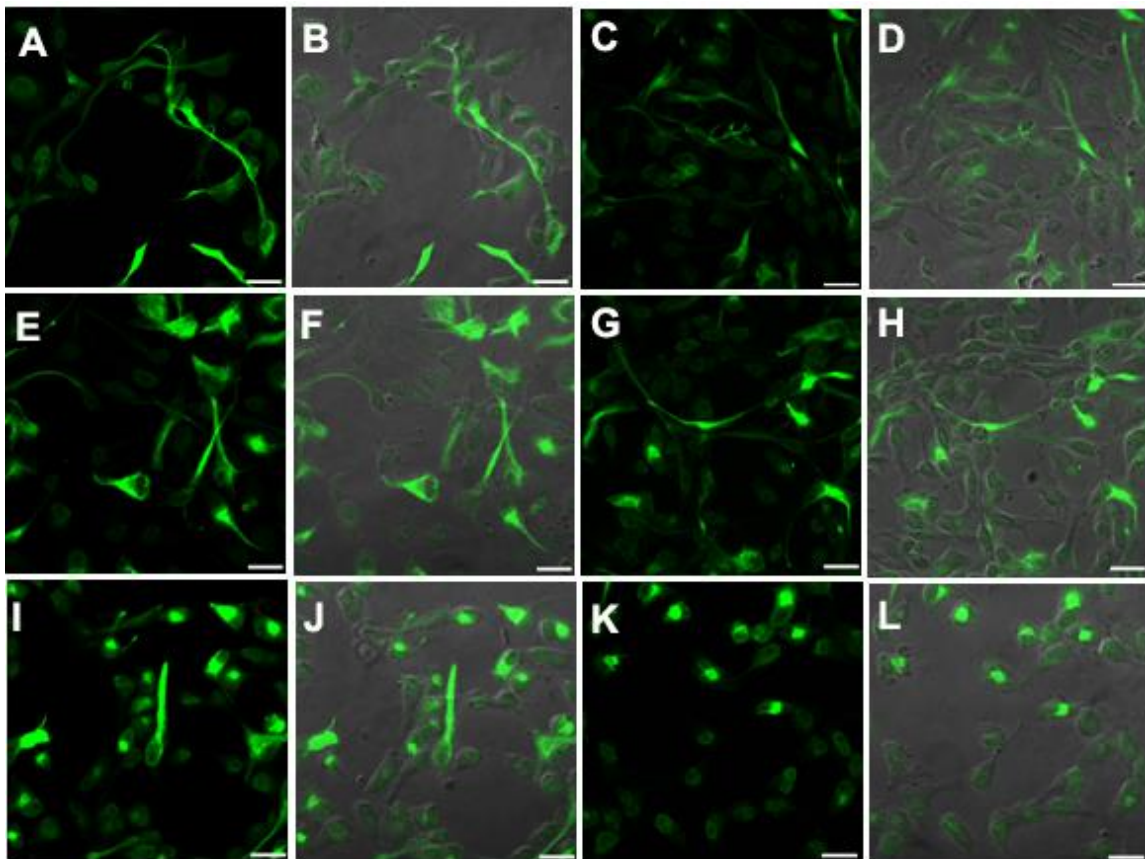


Figura 26. Imagen de microscopía confocal donde la expresión GFAP está marcada en color verde con el anticuerpo secundario Dylight 488. A: control, células no tratadas con AR. B: control en campo claro con la señal del marcador superpuesta. C: células tratadas con 0,1 μ M de AR. D: imagen en campo claro con la señal del marcador superpuesta de las células tratadas con 0,1 μ M de AR. E: células tratadas con 1 μ M de AR. F: imagen en campo claro con la señal del marcador superpuesta de las células tratadas con 1 μ M de AR. G: células tratadas con 10 μ M de AR. H: imagen en campo claro con la señal del marcador superpuesta de las células tratadas con 10 μ M de AR. I: células tratadas con 20 μ M de AR. J: imagen en campo claro con la señal del marcador superpuesta de las células tratadas con 20 μ M AR. K: células tratadas con 30 μ M de AR. L: imagen en campo claro con la señal del marcador superpuesta de las células tratadas con 30 μ M de AR. La barra de escala es de 20 μ m.

En la Figura 27 se muestra el efecto del ácido retinoico sobre la expresión de la proteína asociada a los microtúbulos (MAP2). En la figura se observa claramente como la expresión de MAP2 aumenta a medida que aumenta la concentración de AR, un aumento evidente a concentraciones de AR de 20 y 30 μM .

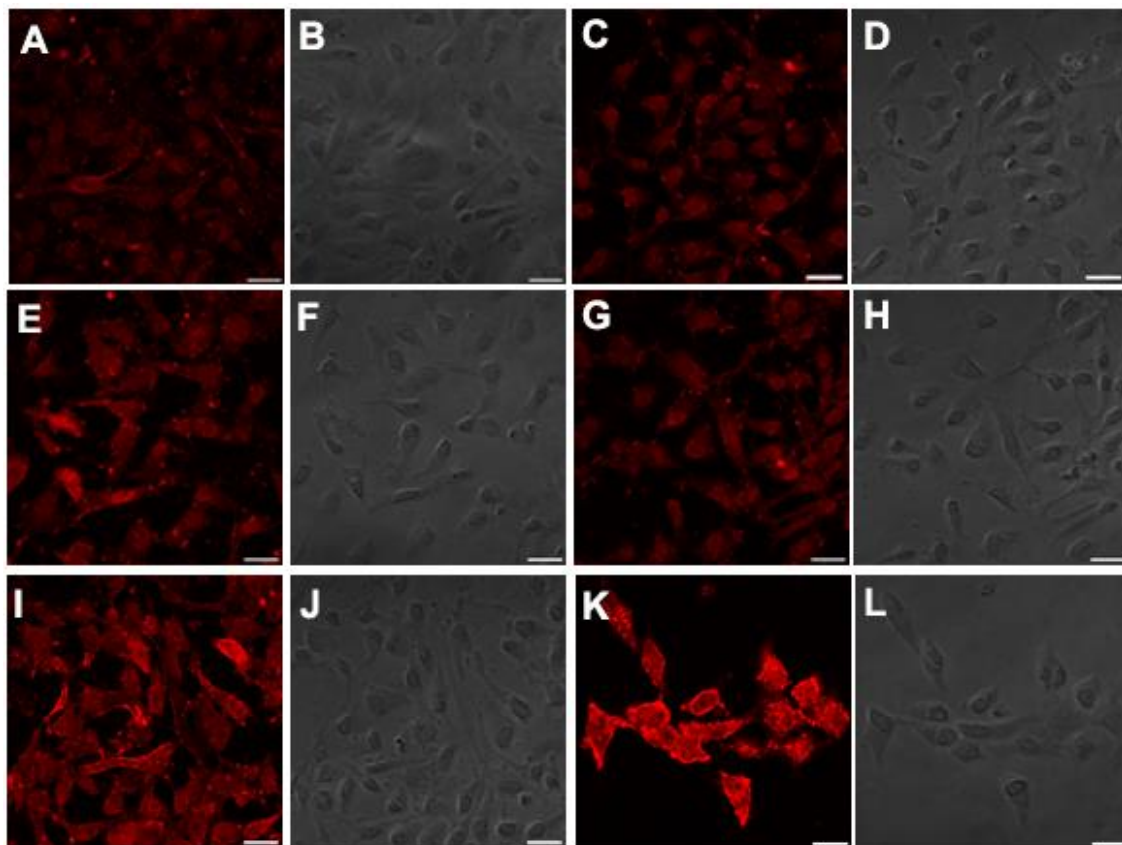


Figura 27. Imagen de microscopia confocal donde la expresión MAP2 (1:1000) está marcada en color rojo con el anticuerpo secundario Dylight 594. A: control, células no tratadas con AR. B: imagen del control en campo claro. C: células tratadas con 0,1 μM de AR. D: imagen en campo claro de las células tratadas con 0,1 μM de AR. E: células tratadas con 1 μM de AR. F: imagen en campo claro de las células tratadas con 1 μM de AR. G: células tratadas con 10 μM de AR. H: imagen en campo claro de las células tratadas con 10 μM de AR. I: células tratadas con 20 μM de AR. J: imagen en campo claro de las células tratadas con 20 μM de AR. K: células tratadas con 30 μM de AR. L: imagen en campo claro de las células tratadas con 30 μM de AR. La barra de escala es de 20 μm .

5. Discusión

Las células madre neuronales (hNSC) y células progenitoras neuronales humanas (hNPC) son un buen modelo *in vitro* (Carpenter et al., 1999; Gaspard & Vanderhaeghen, 2011; Halliwell, 2017; Jayaprakash et al., 2024). Dentro de estas se encuentra la línea celular CTX0E16, la cual proviene del córtex de un embrión humano de 12 semanas de gestación y fue inmortalizada mediante la integración de un retrovirus c-mycER^{TAM}. La línea celular CTX0E16 ha sido previamente caracterizada, demostrándose que, al pasarlas del medio de proliferación celular (RMM) al medio de diferenciación neuronal (NDM) y manteniéndolas en este entre 30 y 60 días, adoptaban una morfología neuronal (Anderson et al., 2015; Boente-Juncal, Mendez, et al., 2018; Boente-Juncal, Vale, et al., 2018). Además, en los estudios inmunocitoquímicos realizados se ha demostrado que se expresaba la proteína nestina, el marcador de precursores neuronales Sox2 y que incrementaba la expresión de los marcadores neuronales Tau y MAP2 según aumentaba el tiempo de las células en cultivo. Asimismo, esta línea tiene todos los receptores de glutamato y GABA, canales dependientes de Na⁺ y canales dependientes de K⁺ que otras líneas celulares neuronales no tienen (Anderson et al., 2015; Boente-Juncal, Mendez, et al., 2018; Boente-Juncal, Vale, et al., 2018). Teniendo en cuenta las características de la línea celular CTX0E16, se trata de un modelo *in vitro* ideal para realizar estudios de toxicidad de posibles sustancias nocivas o terapéuticas, sin embargo, presentan la desventaja de tener un largo periodo de diferenciación, lo cual limita su uso para estos objetivos. Por ello, en este trabajo fin de grado se decidió utilizar la línea celular CTX0E16 con el objetivo de acelerar su tiempo de diferenciación.

Los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular demostraron que la molécula de forskolina no disminuye la viabilidad de estas y que las concentraciones más adecuadas para su posterior uso en los estudios inmunocitoquímicos son 0,1 µM, 1 µM y 10 µM. En los estudios inmunocitoquímicos realizados con diferentes marcadores se observa que la expresión de MAP2, nestina y NeuN no se alteraba en presencia de la forskolina. No obstante, con el marcador GFAP se observa como a medida que aumenta la concentración de forskolina disminuye la expresión de este, hasta llegar a desaparecer cuando la concentración es 10 µM.

Los ensayos de viabilidad realizados con la molécula CHIR99021 mostraron que el tratamiento de las células con 0,3 µM no cambiaba la viabilidad con respecto al control, que el tratamiento con 3 µM aumenta la viabilidad de manera significativa y que con 30 µM disminuye la viabilidad. Los estudios inmunocitoquímicos se llevaron a cabo con a las concentraciones 0,3 µM y 3 µM, observándose que aparentemente los marcadores GFAP y NeuN no modifican su expresión. En el caso de MAP2 no se observa cambio en la intensidad de fluorescencia del marcador, pero cabe destacar el mayor número de las prolongaciones neuronales en las células tratadas que en las

células control. La expresión de nestina incrementó en las células tratadas con el compuesto a concentraciones de 3 μ M.

Por último, los ensayos de viabilidad celular realizados con el ácido retinoico demostraron que no disminuía la viabilidad de las células. En los estudios inmunocitoquímicos se observó que a medida que aumenta la concentración de ácido retinoico aumenta la expresión del marcador MAP2, por lo tanto, al tratarse de un marcador de diferenciación neuronal, a medida que aumenta la concentración de ácido retinoico las células se diferencian. Por otro lado, la expresión del marcador GFAP se mantuvo constante.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo fin de grado no es posible concluir que en 48 horas se puedan obtener neuronas diferenciadas a partir de células madre neuronales. Sin embargo, los estudios realizados indican que la forskolina sola o en combinación con otros compuestos, podría disminuir el número de células gliales y que el ácido retinoico a medida que aumenta su concentración aumenta la expresión del marcador de diferenciación. Es de destacar que en dicho trabajo no se cuantificó la intensidad de fluorescencia obtenida, datos que podrían aportar información importante para elegir el compuesto que aporte mejores resultados en la diferenciación neuronal de las células CTX0E16.

Son necesarios estudios posteriores que evalúen los efectos de la forskolina, de CHIR99021 y del ácido retinoico en un medio de diferenciación propiamente dicho, ya que el medio de proliferación y el de diferenciación tienen una composición diferente, el medio de diferenciación (NDM) lleva un suplemento de B-27 y no lleva 4-OHT, FGF ni EGF. Además, también podría ser de interés probar a mezclar los moduladores enzimáticos a diferentes concentraciones y estudiar sus efectos en la diferenciación neuronal.

6. Conclusiones

En este trabajo fin de grado se ha cultivado la línea celular CTX0E16 con el objetivo de acelerar la diferenciación neuronal. Con los resultados se ha obtenido una primera aproximación sobre el efecto que tienen tres moduladores enzimáticos, la forskolina, el CHIR99021 y el ácido retinoico, sobre la diferenciación de las células, sin embargo, es necesario realizar estudios posteriores que confirmen sus efectos. No obstante, los datos obtenidos permiten concluir que:

1. La forskolina a concentraciones 0,001 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM y 10 μM , CHIR99021 a concentraciones 0,3 μM y 3 μM y el ácido retinoico a concentraciones 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 20 μM y 30 μM , durante 24 horas, no disminuyeron la viabilidad de la línea celular CTX0E16.
2. La forskolina disminuyó el número de células gliales a medida que se aumentó su concentración y tras 48 horas la forskolina a concentraciones de 10 μM eliminó la expresión de células gliales.
3. El tratamiento con CHIR99021 no modificó la expresión de los marcadores neuronales, pero cabe destacar un mayor número de las prolongaciones neuronales en las células tratadas que en las células control.
4. El tratamiento con ácido retinoico aumentó la expresión del marcador de diferenciación neuronal MAP2.

7. Bibliografía

- Adem, A., Mattsson, M. E., Nordberg, A., & Pahlman, S. (1987). Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. *Brain Res*, 430(2), 235-242. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(87\)90156-8](https://doi.org/10.1016/0165-3806(87)90156-8)
- Almeida, A., Sarmento, B., & Rodrigues, F. (2017). Insights on in vitro models for safety and toxicity assessment of cosmetic ingredients. *Int J Pharm*, 519(1-2), 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.024>
- Ammer, H., & Schulz, R. (1997). Regulation of stimulatory adenylyl cyclase signaling during forskolin-induced differentiation of mouse neuroblastoma x rat glioma (NG108-15) cells. *Neurosci Lett*, 230(3), 143-146. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00495-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00495-3)
- Anderson, G. W., Deans, P. J., Taylor, R. D., Raval, P., Chen, D., Lowder, H., . . . Srivastava, D. P. (2015). Characterisation of neurons derived from a cortical human neural stem cell line CTX0E16. *Stem Cell Res Ther*, 6(1), 149. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0136-8>
- Azari, H., & Reynolds, B. A. (2016). In Vitro Models for Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021279>
- Belluardo, N., Mudo, G., Di Liberto, V., Frinchi, M., Condorelli, D. F., Traversa, U., . . . Giuliani, P. (2021). Investigating the Role of Guanosine on Human Neuroblastoma Cell Differentiation and the Underlying Molecular Mechanisms. *Front Pharmacol*, 12, 658806. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.658806>
- Bergsbaken, C. L., Sommers, S. L., & Law, P. Y. (1993). Effect of forskolin and isobutylmethylxanthine on delta-opioid receptor activity in neuroblastoma x glioma NG108-15 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 264(3), 1474-1483. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7680718>
- Biedler, J. L., Helson, L., & Spengler, B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33(11), 2643-2652. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4748425>
- Boente-Juncal, A., Mendez, A. G., Vale, C., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2018). In Vitro Effects of Chronic Spirolide Treatment on Human Neuronal Stem Cell Differentiation and Cholinergic System Development. *ACS Chem Neurosci*, 9(6), 1441-1452. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00036>
- Boente-Juncal, A., Vale, C., Alfonso, A., & Botana, L. M. (2018). Synergistic Effect of Transient Receptor Potential Antagonist and Amiloride against Maitotoxin Induced Calcium

- Increase and Cytotoxicity in Human Neuronal Stem Cells. *ACS Chem Neurosci*, 9(11), 2667-2678. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00128>
- Bonvallet, R., Lemtiri-Chlieh, F., & Rougier, O. (1990). Forskolin but not isoprenaline increases sodium current from frog cardiac myocytes. *Exp Physiol*, 75(6), 843-846. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1990.sp003466>
- Braakhuis, H. M., Giannakou, C., Peijnenburg, W. J., Vermeulen, J., van Loveren, H., & Park, M. V. (2016). Simple in vitro models can predict pulmonary toxicity of silver nanoparticles. *Nanotoxicology*, 10(6), 770-779. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1127443>
- Bray, N. J., Kapur, S., & Price, J. (2012). Investigating schizophrenia in a "dish": possibilities, potential and limitations. *World Psychiatry*, 11(3), 153-155. <https://doi.org/10.1002/j.2051-5545.2012.tb00116.x>
- Carpenter, M. K., Cui, X., Hu, Z. Y., Jackson, J., Sherman, S., Seiger, A., & Wahlberg, L. U. (1999). In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol*, 158(2), 265-278. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7098>
- Castro-Torres, R. D., Olloquequi, J., Parcerisas, A., Urena, J., Etcheto, M., Beas-Zarate, C., . . . Auladell, C. (2024). JNK signaling and its impact on neural cell maturation and differentiation. *Life Sci*, 122750. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122750>
- Chambers, S. M., Qi, Y., Mica, Y., Lee, G., Zhang, X.-J., Niu, L., . . . Whiting, P. (2012). Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nature biotechnology*, 30(7), 715-720.
- Compagnucci, C., Nizzardo, M., Corti, S., Zanni, G., & Bertini, E. (2014). In vitro neurogenesis: development and functional implications of iPSC technology. *Cell Mol Life Sci*, 71(9), 1623-1639. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1511-1>
- Coronel, R., Lachgar, M., Bernabeu-Zornoza, A., Palmer, C., Dominguez-Alvaro, M., Revilla, A., . . . Liste, I. (2019). Neuronal and Glial Differentiation of Human Neural Stem Cells Is Regulated by Amyloid Precursor Protein (APP) Levels. *Mol Neurobiol*, 56(2), 1248-1261. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1167-9>
- Cunningham, T. J., & Duester, G. (2015). Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(2), 110-123. <https://doi.org/10.1038/nrm3932>
- Das, B. C., Thapa, P., Karki, R., Das, S., Mahapatra, S., Liu, T. C., . . . Evans, T. (2014). Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorg Med Chem*, 22(2), 673-683. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.11.025>

- del Estado, B. O. (2013). Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *BOE*, 34, 11370-11421.
- Delepine, C., Pham, V. A., Tsang, H. W. S., & Sur, M. (2021). GSK3ss inhibitor CHIR 99021 modulates cerebral organoid development through dose-dependent regulation of apoptosis, proliferation, differentiation and migration. *PLoS One*, 16(5), e0251173. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251173>
- Donato, R., Miljan, E. A., Hines, S. J., Aouabdi, S., Pollock, K., Patel, S., . . . Sinden, J. D. (2007). Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC Neurosci*, 8, 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-36>
- Gaspard, N., & Vanderhaeghen, P. (2011). From stem cells to neural networks: recent advances and perspectives for neurodevelopmental disorders. *Dev Med Child Neurol*, 53(1), 13-17. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2010.03827.x>
- Gault, N., & Szele, F. G. (2021). Immunohistochemical evidence for adult human neurogenesis in health and disease. *WIREs Mech Dis*, 13(6), e1526. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1526>
- Govarthanan, K., Vidyasekar, P., Gupta, P. K., Lenka, N., & Verma, R. S. (2020). Glycogen synthase kinase 3beta inhibitor- CHIR 99021 augments the differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 22(2), 91-105. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.12.007>
- Halliwell, R. F. (2017). Electrophysiological properties of neurons derived from human stem cells and iNeurons in vitro. *Neurochem Int*, 106, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.10.003>
- He, Y., Li, R., Yu, Y., Huang, C., Xu, Z., Wang, T., . . . Qi, Z. (2024). Human neural stem cells promote mitochondrial genesis to alleviate neuronal damage in MPTP-induced cynomolgus monkey models. *Neurochem Int*, 175, 105700. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105700>
- Heah, K. G., Shobri, N., Khoruddin, N., Suhaimi, S., Yusof, Y., & Hock, T. (2017). A review on dimethyl thiazodiphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) assay in cell viability. *Res J App Sci*, 12(7-9), 372-378.
- Holman, G. D., & Kasuga, M. (1997). From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia*, 40(9), 991-1003. <https://doi.org/10.1007/s001250050780>
- Hu, B. Y., Weick, J. P., Yu, J., Ma, L. X., Zhang, X. Q., Thomson, J. A., & Zhang, S. C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental

- principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(9), 4335-4340. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910012107>
- Jayaprakash, B., Savira, M., Mahmood, A. A. R., & Prasanna, M. (2024). The Role of Stem Cell Therapies in the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Curr Stem Cell Res Ther*. <https://doi.org/10.2174/011574888X313112240510160102>
- Kalman, M., & Ajtai, B. M. (2001). A comparison of intermediate filament markers for presumptive astroglia in the developing rat neocortex: immunostaining against nestin reveals more detail, than GFAP or vimentin. *Int J Dev Neurosci*, 19(1), 101-108. [https://doi.org/10.1016/s0736-5748\(00\)00058-7](https://doi.org/10.1016/s0736-5748(00)00058-7)
- Kanemura, Y., Yamamoto, A., Katsuma, A., Fukusumi, H., Shofuda, T., Kanematsu, D., . . . Okano, H. (2024). Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitor Cells Showed Neuronal Differentiation, Neurite Extension, and Formation of Synaptic Structures in Rodent Ischemic Stroke Brains. *Cells*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/cells13080671>
- Kanungo, J. (2017). Retinoic Acid Signaling in P19 Stem Cell Differentiation. *Anticancer Agents Med Chem*, 17(9), 1184-1198. <https://doi.org/10.2174/1871520616666160615065000>
- Kemp, P. J., Rushton, D. J., Yarova, P. L., Schnell, C., Geater, C., Hancock, J. M., . . . Telezhkin, V. (2016). Improving and accelerating the differentiation and functional maturation of human stem cell-derived neurons: role of extracellular calcium and GABA. *J Physiol*, 594(22), 6583-6594. <https://doi.org/10.1113/JP270655>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Lee, K. M., Hawi, Z. H., Parkington, H. C., Parish, C. L., Kumar, P. V., Polo, J. M., . . . Tong, J. (2020). The application of human pluripotent stem cells to model the neuronal and glial components of neurodevelopmental disorders. *Mol Psychiatry*, 25(2), 368-378. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0495-0>
- Levin, G., Keren, T., Peretz, T., Chikvashvili, D., Thornhill, W. B., & Lotan, I. (1995). Regulation of RCK1 currents with a cAMP analog via enhanced protein synthesis and direct channel phosphorylation. *J Biol Chem*, 270(24), 14611-14618. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.24.14611>
- Li, M. R., Men, S. H., Wang, Z. Y., Liu, C., Zhou, G. R., & Yan, Z. G. (2024). The application of human-derived cell lines in neurotoxicity studies of environmental pollutants. *Sci Total Environ*, 912, 168839. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168839>

- Li, S., Zhao, M., Zhang, S., Yang, R., Yin, N., Wang, H., & Faiola, F. (2024). Assessing developmental neurotoxicity of emerging environmental chemicals using multiple in vitro models: A comparative analysis. *Environ Pollut*, 347, 123743. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123743>
- Liu, Y., Saad, R. S., Shen, S. S., & Silverman, J. F. (2003). Diagnostic value of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) for neuroendocrine neoplasms. *Adv Anat Pathol*, 10(2), 101-106. <https://doi.org/10.1097/00125480-200303000-00005>
- Lopez-Suarez, L., Awabdh, S. A., Coumoul, X., & Chauvet, C. (2022). The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. *Neurotoxicology*, 92, 131-155. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.07.008>
- Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 8(10), 755-765. <https://doi.org/10.1038/nrn2212>
- Mosley, M. C., Lim, H. J., Chen, J., Yang, Y. H., Li, S., Liu, Y., & Smith Callahan, L. A. (2017). Neurite extension and neuronal differentiation of human induced pluripotent stem cell derived neural stem cells on polyethylene glycol hydrogels containing a continuous Young's Modulus gradient. *J Biomed Mater Res A*, 105(3), 824-833. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35955>
- Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1), 201-211. <https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201>
- Niederreither, K., & Dolle, P. (2008). Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet*, 9(7), 541-553. <https://doi.org/10.1038/nrg2340>
- Nusse, R., & Clevers, H. (2017). Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*, 169(6), 985-999. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>
- Pollock, K., Stroemer, P., Patel, S., Stevanato, L., Hope, A., Miljan, E., . . . Sinden, J. D. (2006). A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol*, 199(1), 143-155. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.12.011>
- Presgraves, S. P., Ahmed, T., Borwege, S., & Joyce, J. N. (2004). Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res*, 5(8), 579-598. <https://doi.org/10.1007/BF03033178>
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42(4), 405-426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>

- Raposo-Garcia, S., Cao, A., Costas, C., Louzao, M. C., Vilarino, N., Vale, C., & Botana, L. M. (2023). Mouse N2a Neuroblastoma Assay: Uncertainties and Comparison with Alternative Cell-Based Assays for Ciguatoxin Detection. *Mar Drugs*, 21(11). <https://doi.org/10.3390/md21110590>
- Rim, E. Y., Clevers, H., & Nusse, R. (2022). The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators. *Annu Rev Biochem*, 91, 571-598. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-040320-103615>
- Schulz, T. C., Palmarini, G. M., Noggle, S. A., Weiler, D. A., Mitalipova, M. M., & Condie, B. G. (2003). Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Neurosci*, 4, 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-4-27>
- Srivastava, D. P., Woolfrey, K. M., & Penzes, P. (2011). Analysis of dendritic spine morphology in cultured CNS neurons. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(53), e2794.
- Tartakoff, A. M. (1983). Perturbation of the structure and function of the Golgi complex by monovalent carboxylic ionophores. *Methods Enzymol*, 98, 47-59. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(83\)98138-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(83)98138-7)
- Vale C., R.-G. S. (2024). Toxicological studies with cells. In L. M. Botana (Ed.), *Environmental Toxicology: Non-Bacterial Toxins* (pp. 135-170). Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- von Bohlen Und Halbach, O. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res*, 329(3), 409-420. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0432-4>
- von Bohlen und Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*, 345(1), 1-19. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1196-4>
- Wagh, V. D., Patil, P. N., Surana, S. J., & Wagh, K. V. (2012). Forskolin: upcoming antiglaucoma molecule. *J Postgrad Med*, 58(3), 199-202. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.101396>
- Wang, G., Zhang, D., Qin, L., Liu, Q., Tang, W., Liu, M., . . . Huang, B. (2024). Forskolin-driven conversion of human somatic cells into induced neurons through regulation of the cAMP-CREB1-JNK signaling. *Theranostics*, 14(4), 1701-1719. <https://doi.org/10.7150/thno.92700>
- Wang, S., Hesén, R., Mossink, B., Nadif Kasri, N., & Schubert, D. (2023). Generation of glutamatergic/GABAergic neuronal co-cultures derived from human induced pluripotent stem cells for characterizing E/I balance in vitro. *STAR Protoc*, 4(1), 101967. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101967>

- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K. V., Tarasova, Y., . . . Wobus, A. M. (2004). Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci*, *61*(19-20), 2510-2522. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4144-6>
- Yamada-Goto, N., Ochi, Y., Katsuura, G., Yamashita, Y., Ebihara, K., Noguchi, M., . . . Nakao, K. (2017). Neuronal cells derived from human induced pluripotent stem cells as a functional tool of melanocortin system. *Neuropeptides*, *65*, 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.04.004>
- Yang, Z., & Wang, K. K. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci*, *38*(6), 364-374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>
- Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O., & Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, *19*(12), 1129-1133. <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1129>
- Zhang, X. Q., & Zhang, S. C. (2010). Differentiation of neural precursors and dopaminergic neurons from human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*, *584*, 355-366. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-369-5_19
- Zhou, J., Yi, J., Hu, N., George, A. L., Jr., & Murray, K. T. (2000). Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in *Xenopus* oocytes. *Circ Res*, *87*(1), 33-38. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.1.33>