

# Desarrollo de un modelo celular in vitro de esquizofrenia para ensayos de cribado de alto rendimiento.

Development of an in vitro cellular model of  
schizophrenia for high-throughput screening assays.

Jesús Carrete Bueno

Autor deseño da portada, *Solpor no laboratorio*: Samuel Rey Viña.

***A mi familia, por creer siempre en mí, apoyarme y ayudarme en todo momento***

*Mi más sincero agradecimiento tanto a mi tutor: José Manuel Brea Floriani, por su total disponibilidad y constante apoyo durante el desarrollo de este trabajo; como a Neila Cosme Boullosa, por su incesante ayuda desde el primer día, por estar siempre dispuesta a enseñarme, y por su infinita paciencia, que han hecho posible este Trabajo de Fin de Grado.*

# Índice

Resumen .....	1
1. Introducción.....	2
2. Hipótesis.....	10
3. Objetivos .....	10
4. Materiales y métodos .....	10
4.1 Línea celular.....	10
4.2 Cultivo celular .....	10
4.2.1 Descongelación y siembra.....	10
4.2.2 Mantenimiento rutinario .....	11
4.2.3 Congelación .....	12
4.3 Diferenciación celular .....	12
4.4 Ensayos de Inmunofluorescencia .....	13
4.5 Ensayos de Microelectrode Arrays (MEA).....	14
4.6 Análisis estadístico.....	14
5. Resultados .....	15
5.1 La diferenciación con PMA y con GLP-1 permitió obtener un fenotipo neuronal con diferentes poblaciones neuronales .....	15
5.2 La diferenciación con GLP-1 dota a las células de actividad eléctrica espontánea, no así la diferenciación con PMA .....	19
6. Discusión .....	20
7. Conclusiones .....	23
Bibliografía .....	24

## Resumen

La esquizofrenia es en la actualidad una de las enfermedades mentales que mayor grado de incapacidad genera. Se caracteriza por la presencia de tres tipos de síntomas: positivos, negativos y cognitivos. Hoy en día no existe cura para este trastorno, y los tratamientos farmacológicos se orientan a la mejora de la sintomatología de los pacientes. A pesar de que los tratamientos farmacológicos actuales mejoran los tratamientos clásicos, siguen sin constituir una terapia óptima para el tratamiento de todos los síntomas de esta enfermedad, en especial los síntomas cognitivos. Es por esto que es imprescindible desarrollar nuevos tratamientos que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes. Para poder evaluar nuevas moléculas con potencial terapéutico, los modelos de estudio se basan en ensayos con varias líneas celulares, sin embargo, no constituyen modelos de estudio idóneos por no reflejar un fenotipo similar al de la patología. Durante este TFG se ha trabajado en la diferenciación de la línea celular SH-SY5Y con el fin de desarrollar un modelo celular in vitro de esquizofrenia para ensayos de cribado de alto rendimiento.

## Abstract

Schizophrenia is currently one of the most disabling mental illnesses. It is characterized by the presence of three types of symptoms: positive, negative and cognitive. Nowadays there is no cure for this disorder, and pharmacological treatments are oriented to the improvement of patients' symptoms. Although current pharmacological treatments improve the classical treatments, they still do not constitute an optimal therapy for the treatment of all the symptoms of this disease, especially the cognitive symptoms. This is why it is essential to develop new treatments to improve the quality of life of patients. In order to evaluate new molecules with therapeutic potential, study models are based on assays with several cell lines, however, they are not suitable study models because they do not reflect a phenotype similar to that of the pathology. During this TFG we have worked on the differentiation of the SH-SY5Y cell line in order to develop an in vitro cell model of schizophrenia for high-throughput screening assays.

## Palabras clave

- Esquizofrenia - Cultivo celular - Modelo celular - Diferenciación celular  
- Cribado de alto rendimiento - Descubrimiento de fármacos

### 1. Introducción

La esquizofrenia es un desorden mental severo caracterizado por la aparición de tres tipos principales de síntomas: síntomas positivos, como delirios, agitación y alucinaciones; síntomas negativos, como anhedonia, alogia o apatía; y síntomas cognitivos, entre los que se encuentran alteraciones de la atención, el aprendizaje y la memoria (1). Se estima que esta enfermedad afecta aproximadamente a un 1% de la población mundial. La enfermedad suele aparecer entre los últimos años de la adolescencia y los primeros años de la edad adulta. Existe además una diferencia en la incidencia entre sexos, el sexo masculino presenta una mayor incidencia y gravedad de los síntomas, viéndose el sexo femenino menos afectado y siendo la aparición de los síntomas más tardía. Además, mientras estudios previos sugerían que la incidencia en países desarrollados y países en desarrollo era similar, nuevas revisiones parecen indicar que existe una mayor incidencia en los países desarrollados, a latitudes superiores y en áreas urbanas (2).

A pesar de los numerosos estudios realizados, la etiología de la enfermedad no está completamente dilucidada. Se sabe que en el desarrollo de la esquizofrenia participan tanto factores genéticos como ambientales, presentando ambos gran relevancia en la aparición de la misma (3).

Las estimaciones de heredabilidad de la esquizofrenia oscilan entre el 65-80%, presentando un complejo patrón de herencia no-Mendeliano. El gen DISC-1 (Disrupted in schizophrenia) que participa en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación, la migración, el crecimiento de los axones y dendritas neuronales, el transporte mitocondrial, la fisión y/o fusión, y la adhesión entre células, fue el primero en relacionarse con la esquizofrenia. Más

recientemente, gracias a estudios de asociación del genoma completo (GWAS), se han identificado nuevas variantes de genes de interés con influencia en la enfermedad, entre las que destacan variantes del gen C4 (gen del componente 4 del complemento), de SETD1A (codifica un componente de una histona metiltransferasa), RBM12 (RNA-binding motif 12, codifica una proteína que contiene varios motivos de unión al ARN) o NRXN1 (codifica la neurexina 1, proteína que media en la función sináptica) (4). Además, se sugiere que las alteraciones en otros genes relacionados con la señalización dopaminérgica como el DRD2 (que codifica para el receptor de dopamina D<sub>2</sub>), y glutamatérgica como (DAO, GRIA1, GRIN2A y GRM3), relacionados con la función del receptor NMDA de glutamato, presentan también especial relevancia (5).

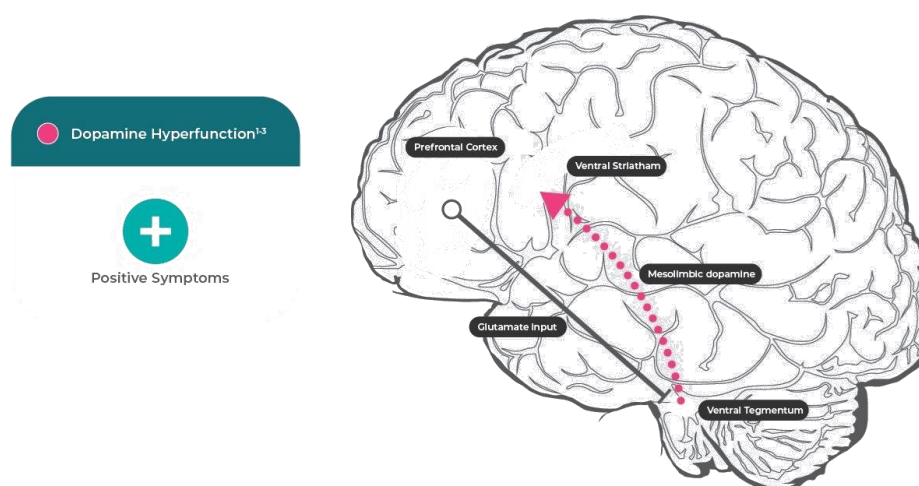
Sin embargo, la predisposición genética no es indispensable, ni suficiente por sí sola, para el desarrollo de la enfermedad, dependiendo también de: factores ambientales, como complicaciones durante el embarazo o el parto, traumas y adversidades sociales, emigración, uso de cannabis o vida en zonas urbanas (6); factores de neurodesarrollo, que comprenden procesos patológicos del sistema nervioso central que tienen lugar durante la vida fetal, el periodo perinatal y la primera infancia, como pueden ser hipoxia durante el parto o infecciones víricas durante el embarazo (se considera que la maduración de interneuronas GABA, la falta de sinapsis glutamatérgicas, la maduración de proyecciones dopaminérgicas, y la diferenciación/mielinización de oligodendrocitos pueden participar en la maduración cerebral postnatal asociada con la enfermedad) (7); así como factores epigenéticos (8).

El primer concepto de esquizofrenia fue propuesto en 1919 por Emil Kraepelin, acuñado bajo el nombre de “dementia praecox” (9). Emil Kraepelin afirmaba que la neuropatología, la fisiología y la química biológica del cerebro estaban asociados a los trastornos mentales. Sería en 1950 cuando Eugen Bleuler introdujese el nombre de esquizofrenia. Se especuló durante esta época que la disfunción cerebral es responsable de los síntomas de la esquizofrenia, en particular que las disfunciones del lóbulo frontal y/o temporal estarían relacionadas con las anomalías cognitivas (10). Fue en 1969, cuando a partir de exámenes cognitivos, neurológicos y electroencefálicos, Mirsky determinó la existencia de disfunción cerebral en la esquizofrenia

(11). Esta idea fue confirmada posteriormente por Seidman gracias a estudios de tomografía computarizada y tomografía por emisión de positrones (PET) (3).

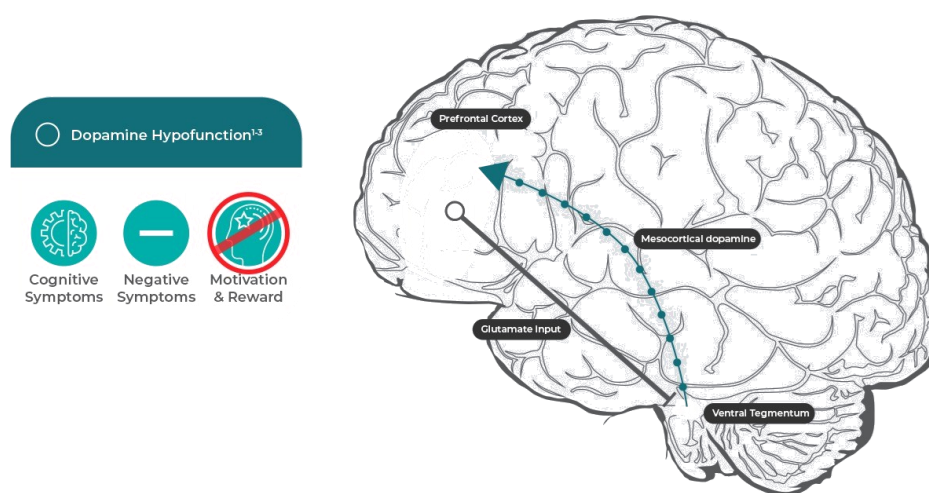
En cuanto a lo que a la fisiopatología respecta, históricamente se consideró la hipótesis dopaminérgica como dogma central del trastorno esquizofrénico, que asociaba la enfermedad a una hiperactividad dopaminérgica en la región mesolímbica (12). La disrupción dopaminérgica consecuencia de la hiperfunción de las neuronas dopaminérgicas que se proyectan desde los ganglios basales hacia áreas mesolímbicas, permite explicar correctamente la existencia de los síntomas positivos de la enfermedad (Figura 1). Esta hipótesis se ve respaldada por:

- Estudios con modelos animales (roedores) a los que se le administraron dosis repetidas de dopamina o se modificaron genéticamente para sobreexpresar receptores D<sub>2</sub> de dopamina en la región mesolímbica. Se obtuvieron en ambos casos comportamientos análogos a los que presentan individuos con esquizofrenia (13).
- Estudios de PET en humanos que revelaron un aumento en la síntesis de dopamina en regiones mesolímbicas (13).
- Estudios farmacológicos con antagonistas de receptores D<sub>2</sub> que se mostraron eficaces para reducir en especial los síntomas positivos de la esquizofrenia (13).



**Figura 1:** Representación gráfica de la **hiperfunción dopaminérgica** y su **influencia** sobre lo **síntomas positivos** (<http://schizophrenialife.se>)

Además, la señalización dopaminérgica cortical juega un papel clave en los procesos cognitivos, proponiéndose que la hipodopaminergia cortical estaba relacionada con los síntomas cognitivos de la enfermedad (Figura 2) (12).



**Figura 2:** Representación gráfica de la **hipofunción dopaminérgica** y su **influencia sobre los síntomas negativos y cognitivos** (<http://schizophrenialife.se>).

Sin embargo, la hipótesis dopaminérgica no es lo suficientemente consistente a la hora de explicar estos síntomas cognitivos y negativos. Es entonces cuando surge la hipótesis glutamatérgica. Esta hipótesis sugiere una hipofunción del receptor NMDAR de glutamato, presente en interneuronas inhibitorias productoras de GABA que proyectan hacia neuronas glutamatérgicas distribuidas por todo el cerebro, generándose un estado hiperglutamatérgico generalizado que juega un papel fundamental en el desarrollo de síntomas negativos y cognitivos. La implicación de este receptor surge como consecuencia del descubrimiento de los efectos psicotomiméticos que generan los antagonistas del NMDAR (13). Al igual que en el caso de la teoría dopaminérgica, esta hipótesis se ve respaldada por:

- Estudios con modelos animales (roedores y primates), donde la administración de antagonistas de NMDAR propició la aparición de comportamientos similares a los observados en la esquizofrenia, presentando síntomas positivos y también cognitivos y negativos (13).

- Estudios post mortem, que muestran alteraciones estructurales en neuronas glutamatérgicas, como reducción en la arborización dendrítica, densidad espinal o expresión de sinaptofisina en regiones frontales y temporales (13).
- Estudios farmacológicos con antagonistas de NMDAR como ketamina o PCP en pacientes sanos, que inducen síntomas similares a los síntomas positivos, negativos y cognitivos que manifiestan pacientes con esquizofrenia. Se ha demostrado que el bloqueo del receptor NMDAR tras la administración de este tipo de compuestos es suficiente y necesaria para inducir síntomas positivos, negativos y cognitivos, presentando además la capacidad de reproducir síntomas negativos y cognitivos de manera más fiable que la administración de anfetaminas (13).
- Estudios de resonancia magnética nuclear de protones (H-MRS) preliminares parecen indicar un aumento los niveles de glutamato en los ganglios basales, aumento de la concentración de glutamina en el tálamo y que los niveles de ambos aumentan en el lóbulo temporal medio en pacientes con esquizofrenia (13).

Además, estas neuronas glutamatérgicas, que no son inhibidas con eficacia por las interneuronas inhibitorias con receptores NMDAR hipofuncionales, proyectan también hacia las neuronas dopaminérgicas de los ganglios basales, por lo que se promueve el aumento de la síntesis y liberación de dopamina, permitiendo relacionar ambas hipótesis y explicando también el exceso de dopamina a nivel mesolímbico (14).

La intervención farmacológica es un componente clave para el tratamiento de la esquizofrenia. Sin embargo, con las terapias actuales no es posible aliviar todos los síntomas de la enfermedad. Es su complejidad la que imposibilita el desarrollo del antipsicótico ideal, siendo muy difícil aún en la actualidad luchar contra los síntomas negativos y especialmente los cognitivos.

El primer paso en la lucha contra la esquizofrenia surgió gracias al descubrimiento de los conocidos como antipsicóticos típicos entre las décadas de 1950 y 1970, con fármacos como el haloperidol, la clorpromazina, la flufenazina, la loxapina o la tioridazina (15). Estos fármacos basaban su mecanismo de acción en el bloqueo de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>,

disminuyendo la respuesta neuronal al estado hiperdopaminérgico propio de la esquizofrenia. Sin embargo, los efectos secundarios extrapiramidales (trastornos del movimiento como distonía, acatisia, parkinsonismo o discinesia tardía, consecuencia de la unión antagonista de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> dentro de las vías mesolímbica y mesocortical del cerebro que afectan al sistema extrapiramidal) y la carencia de respuesta al tratamiento en numerosos pacientes hicieron necesaria la búsqueda de nuevos fármacos. La no respuesta o resistencia al efecto del tratamiento con antagonistas dopaminérgicos del receptor D<sub>2</sub>, permitió ahondar en la comprensión del mecanismo fisiopatológico de la enfermedad, que no se explicaba solamente por un estado hiperdopaminérgico. Es en 1974 cuando se desarrolla la clozapina, apareciendo los conocidos como antipsicóticos atípicos, los cuales, a diferencia de los antipsicóticos típicos actúan sobre un mayor número de receptores, mejorando el tratamiento sintomatológico y disminuyendo los efectos extrapiramidales (15). En este grupo se incluyen algunos como la olanzapina, clozapina, risperidona y amisulpirida. A pesar de esto, existía persistencia de síntomas negativos y cognitivos en numerosos pacientes y efectos secundarios principalmente metabólicos.

La última incorporación para el tratamiento de la esquizofrenia la constituyen moléculas como el aripiprazol, la cariprazina y el brexipirazol. Actúan como agonistas parciales del receptor D<sub>2</sub> de dopamina, lo que se traduciría en una reducción de la actividad en este receptor en las regiones hiperdopaminérgicas del cerebro de los pacientes (es decir, la vía mesolímbica), al tiempo que tendría un efecto leve en la vía nigroestriatal, que contribuiría a la menor incidencia de efectos extrapiramidales. Además, las propiedades más amplias de agonista parcial 5-HT<sub>1A</sub> y antagonista 5-HT<sub>2A</sub> del aripiprazol pueden contribuir a su capacidad para tratar los síntomas negativos de la esquizofrenia en algunos pacientes (15). Se ha descrito que estos receptores serotoninérgicos podrían jugar un papel importante, pudiendo modular tanto la transmisión dopaminérgica como glutamatérgica y estar relacionados con procesos cognitivos (16).

Sin embargo, los avances en el tratamiento farmacológico aún tienen mucho recorrido por delante, debido principalmente a la resistencia al tratamiento, los efectos secundarios y la falta de efecto sobre los síntomas negativos y especialmente los síntomas cognitivos,

pudiéndose ver aumentados estos últimos como consecuencia del uso de los propios antipsicóticos, especialmente de los de primera generación, como sugieren varios estudios (17,18). Es por esto que es indispensable desarrollar nuevas moléculas con un mejor perfil farmacodinámico y que consigan aportar una mejora para los síntomas negativos y en especial los cognitivos, permitiendo mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados por esta enfermedad.

Para el descubrimiento de nuevas moléculas con efectos sobre los síntomas cognitivos de la enfermedad, los modelos clásicos de estudio se basan en modelos animales y en diferentes líneas celulares.

Los modelos animales basan sus estudios principalmente en roedores, pudiendo distinguirse además tres tipos principales de modelos; modelos farmacológicos, modelos genéticos y modelos de neurodesarrollo (3). Los primeros estudian cómo afectan al comportamiento a corto y largo plazo administraciones agudas, crónicas o subcrónicas de compuestos que inducen síntomas propios de la esquizofrenia, como pueden ser anfetaminas o antagonistas del receptor NMDAR. Los modelos genéticos centran su estudio en los efectos que se observan en ratones que sufren modificaciones en genes que se sabe están relacionados con la esquizofrenia (como DISC 1 o NRXN1). Los modelos del neurodesarrollo se basan en la hipótesis de que estresores durante el embarazo o la infancia temprana, como puede ser estrés o infecciones en la madre, problemas en el parto, o infecciones durante los primeros meses de vida, pueden afectar al correcto desarrollo neuronal y cerebral del individuo, propiciando la aparición de esquizofrenia en la etapa juvenil tardía o adulta temprana. Estos modelos animales utilizan principalmente hembras de roedores embarazadas, a las que se les infecta con un virus para estimular su respuesta inmune, afectando por lo tanto también al feto en desarrollo, que mostrará síntomas de la enfermedad una vez adulto (3).

En cuanto a los modelos in vitro se refiere (3), algunos de los modelos más relevantes son:

- Líneas celulares pluripotentes que permiten la diferenciación en todo tipo de células y líneas celulares multipotentes, que permiten la diferenciación a ciertas líneas

celulares, poseen ilimitada capacidad de renovación individual o baja inmunogenicidad entre otras ventajas. Sin embargo, en ambos casos los protocolos y condiciones de diferenciación aún están bajo desarrollo.

- Sistemas de cultivo tridimensionales: entre sus ventajas se encuentran la elevada respuesta a sustancias bioactivas y una mejor interacción entre células y entre estas y la matriz extracelular. A pesar de esto, una de sus principales desventajas es la falta o dificultad para su oxigenación y nutrición. Uno de los últimos avances en este campo lo constituye la línea neuronal hipocampal de ratón HT22, que constituye un modelo adecuado para estudios de citotoxicidad del glutamato, presenta facilidad para llevar a cabo procedimientos experimentales y preserva propiedades arquitectónicas sin desventajas aparentes.
- La línea celular SH-SY5Y: procede de tumor óseo metastásico de un paciente oncológico de 4 años de edad y constituye uno de los modelos in vitro más utilizados para el estudio de varias enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Huntington y la propia esquizofrenia. Esto se debe a que exhibe características funcionales y bioquímicas propias de neuronas, incluyendo el crecimiento de neuritas, síntesis de neurotransmisores y marcadores de actividad enzimática neuronal. Además, esta línea celular puede diferenciarse hacia nuevos fenotipos gracias a la adición de determinados compuestos, siendo la adición de ácido retinoico (RA) el método más utilizado para llevar a cabo esta diferenciación (19).

La búsqueda de la disminución del sufrimiento animal (20), así como las diferencias presentes entre los distintos sistemas de roedores y humanos, y los diferentes problemas que presentan los modelos in vitro (3), hace necesaria la optimización de un modelo celular de neurona humana dopaminérgica y/o glutamatérgica sobre la que induciendo un daño, se consiga reproducir el fenotipo neuronal de un paciente con esquizofrenia en el que se pueda realizar un screening farmacológico de moléculas con potencial terapéutico en el tratamiento de los síntomas cognitivos asociados a la enfermedad.

## 2. Hipótesis

En el presente TFG se planteó la hipótesis de que la diferenciación de la línea celular humana SH-SY5Y le proporcionase características morfológicas y funcionales de neurona madura, pudiendo ser usada para modular los déficits cognitivos asociados a la esquizofrenia y usarse en high throughput screening (cribado de alto rendimiento) para identificar compuestos con actividad sobre la misma.

## 3. Objetivos

El objetivo general de este TFG fue identificar una metodología de diferenciación de la línea celular SH-SY5Y para la obtención de un fenotipo de neurona madura que se pueda aplicar como modelo celular in vitro de esquizofrenia.

Los objetivos específicos fueron:

1. Estudiar los cambios morfológicos inducidos por dos protocolos de diferenciación distintos: uno con ácido retinoico y PMA; y otro con ácido retinoico y GLP-1.
2. Estudiar la funcionalidad de los modelos celulares inducidos por ambos protocolos de diferenciación mediante estudios de microelectrodos.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Línea celular

La línea celular utilizada fue la SH-SY5Y (ATCC: CRL-2266), una sublínea celular inmortalizada triplemente clonada de la línea celular SK-N-SH, establecida en 1970 de la biopsia un tumor óseo metastásico de un paciente oncológico de 4 años de edad.

### 4.2 Cultivo celular

#### 4.2.1 Descongelación y siembra

Para llevar a cabo la descongelación, se preparó un tubo Falcon de 15 mL (*Corning*) en el que se introdujeron 10mL de medio de cultivo (*RPMI 1640 + Glutamax®*) previamente atemperado y suplementado con 10% suero bovino fetal inactivado (FBS) (*Sigma-Aldrich*), 1% de penicilina (*Sigma-Aldrich*) y

estreptomycin (*Sigma-Aldrich*), y 1 µg/mL de gentamicina (*Sigma-Aldrich*). El vial de congelación (*Thermo-Fisher*), almacenado a -80°C, se introdujo en un baño termostático a 37 °C durante 1-2 minutos hasta que se observó la descongelación completa del contenido. Las células se resuspendieron en el Falcon de 15 mL con los 10 mL de medio de cultivo, centrifugándose durante 10 min a 1000 rpm. El sobrenadante resultante de este proceso de centrifugación fue aspirado y el pellet resuspendido en 5 mL de medio de cultivo, que fueron sembrados en una placa P150 (*Corning*) (placas de cultivo estériles de 15 cm de diámetro) con 20 mL de medio. La transferencia se realizó gota a gota y con distancia entre ellas para evitar la aglomeración de las células. El medio se refrescó cada 2 o 3 días y para realizarlo, tan solo fue necesario aspirar el medio degradado y suplirlo por 25 mL de medio fresco.

#### **4.2.2 Mantenimiento rutinario**

Los pases celulares se hicieron al alcanzar una confluencia aproximada del 80% de las células en la placa (esto es, cuando las células en cultivo cubren el 80% del espacio libre de la placa). Se procedió aspirando el medio deteriorado y lavando con 25 mL de tampón fosfato salino (PBS) [(pH=7.4) preparado en el laboratorio usando NaCl (140 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM) y KCl (2.7 mM). NaCl y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> proporcionados por *Sigma-Aldrich*, el KCl (2.7 mM) y el KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 mM) proporcionados por *Panreac*] atemperado, que se retira aspirando. Se añadieron 2 mL de tripsina (*Sigma-Aldrich*) (un enzima proteolítico que digiere las proteínas de unión entre células, y entre células y la placa de cultivo) durante 3 minutos. Pasado este tiempo la tripsina se neutralizó con 8 mL de medio. Una vez fueron despegadas, la suspensión de células se introdujo en un Falcon de 15 mL, realizándose una dilución 1:5 y dispensando 5 mL de la dilución en una nueva placa P150 con 20 ml de medio de cultivo, que se introdujo en el incubador a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad constante.

### 4.2.3 Congelación

Para la congelación de las células utilizamos como medio de congelación FBS (*Sigma-Aldrich*) con 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich*), que evita la formación de cristales de agua que puedan afectar a las células durante la congelación.

Para llevar a cabo la misma, aspiramos el medio de la placa P150 y se lavó con 25 mL de PBS que fueron aspirados; tras esto, fueron añadidos 2 mL de tripsina que se dejaron durante 3 min en la placa. Pasado este tiempo, la tripsina se neutralizó con 8 mL de medio de cultivo, la propia mezcla de medio y tripsina se pipetea sobre la placa para conseguir despegar de manera óptima todas las células de la misma. Una vez que las células se despegaron, fueron transferidas a un Falcon de 15 mL, que se introdujo en una centrifuga durante 10 minutos a 1.000 rpm. Se aspiró el sobrenadante, y el pellet celular se resuspendió en 1 mL de medio de congelación en un criovial que se introdujo en un Frosty® (*Nalgene*) (permite la congelación gradual del criovial) en un congelador a -80°C.

### 4.3 Diferenciación celular

El proceso de diferenciación comienza con un tratamiento de Ácido Retinoico (10  $\mu$ M, *Bachem*) durante 5 días. Tras los 5 días, las células se trataron con PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato) (80 nM, *Sigma-Aldrich*) o GLP-1 (Glucagon-like peptide 1, o péptido 1 similar al glucagon) (1000 nM, *Bachem*).

La diferenciación celular se llevó a cabo en placas negras de fondo transparente de 96 pocillos (*Perkin*) o placas negras de fondo transparente pretratadas con poli-d-lys de 384 pocillos (*Greiner*). En las placas de 96 pocillos se sembraron en cada pocillo aproximadamente 5.000 células y un volumen de 100  $\mu$ L. En las placas de 384 pocillos, se sembraron 2.500 células y un volumen de unos 50  $\mu$ L, los pocillos de estas placas fueron previamente tratados con 15  $\mu$ L de laminina (*Sigma*). Para contar las células se utilizó un citómetro y se realizó una dilución 1:5 de la suspensión celular que se introduce en los pocillos.

El primer día de la diferenciación se decantó el medio con el que se prepararon las placas y se añadió medio completo con ácido retinoico a una concentración 10  $\mu$ M. Pasados 6 días se añadió al medio de diferenciación PMA, alcanzando una concentración final de 80 nM, y suplementos B27 (*Gibco*) y N2 (*Gibco*); o GLP-1 con B27 como suplementación. Tras 7 días, las células tratadas con PMA estuvieron completamente diferenciadas. En el caso de las células tratadas con GLP-1, la diferenciación se completó 10 días después de añadir el GLP-1.

#### 4.4 Ensayos de Inmunofluorescencia

Para el ensayo de inmunofluorescencia se emplearon las placas de 96 pocillos. Se fijaron las neuronas con 100  $\mu$ L/pocillo de Paraformaldehído 4% (*Santa Cruz Biotechnologies*) durante 20 minutos a 4°C. Pasado este tiempo, se decantó el Paraformaldehído y se lavaron los pocillos en 2 ocasiones con 100  $\mu$ L de HBSS (*Roche*) (solución salina equilibrada de Hanks). Se añadieron 100  $\mu$ L de buffer de bloqueo a cada pocillo (compuesto por 50 ml de HBSS + 1 g de serum de albúmina bovina (BSA) (*Roche*) + 50  $\mu$ litros de Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*), un detergente que permeabiliza las membranas celulares) durante 30 minutos. Posteriormente se procedió decantando la solución de bloqueo.

Para el marcaje de la  $\beta$ -tubulina III (una subunidad de los microtúbulos), se preparó en solución de bloqueo Anti-beta-tubulina-Alexa 488 (*BD Biosciences*) a dilución 1:500, y DRAQ-5 (*Abcam*), un marcador nuclear, hasta alcanzar una concentración 2,5  $\mu$ M. Se añadieron 100  $\mu$ L a cada pocillo, en oscuridad total y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se decantó y se lavó 2 veces con 100  $\mu$ L por pocillo de HBSS. Por último, se rellenaron los pocillos con 100  $\mu$ L de buffer de bloqueo y se procedió a visualizar las preparaciones en el microscopio de imágenes de alto contenido Operetta (*Perkin-Elmer*), analizando 9 campos por pocillo, y un total de 5 pocillos con un objetivo de 20X.

Para el marcaje de la tirosina hidroxilasa (TH), se preparó en solución de bloqueo el anticuerpo Alexa 488 anti-Tirosina Hidroxilasa (*Biosystems*) a dilución 1:500, y para el marcaje de VGLUT2, se empleó el anticuerpo Alexa 350 anti-VGLUT2 (*Biosystems*) a

dilución 1:500. En ambos casos se utilizó DRAQ-5 a 2.5  $\mu\text{M}$  como marcador nuclear. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de cada dilución a cada pocillo, en oscuridad total y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se decantó y se lavó 2 veces con 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de HBSS. Por último, se rellenaron los pocillos con 100  $\mu\text{L}$  de buffer de bloqueo y se visualizaron las preparaciones en el microscopio de imágenes de alto contenido Operetta, analizando también 9 campos por pocillo, y un total de 5 pocillos con un objetivo de 20X.

#### **4.5 Ensayos de Microelectrode Arrays (MEA)**

Los ensayos de microelectrodos son una técnica que permite monitorizar la actividad eléctrica espontánea de las células, gracias a la presencia de 8 microelectrodos en placas de fondo transparente de 96 pocillos Cytoview MEA (*Axion Biosystems*), que registran la actividad de forma constante. Las placas contienen 100  $\mu\text{L}$  de medio y aproximadamente 20.000 células por pocillo. Para la medición de la actividad eléctrica espontánea, el registro se realizó con el software Axis Navigator en el medidor Maestro Pro (*Axion Biosystems*).

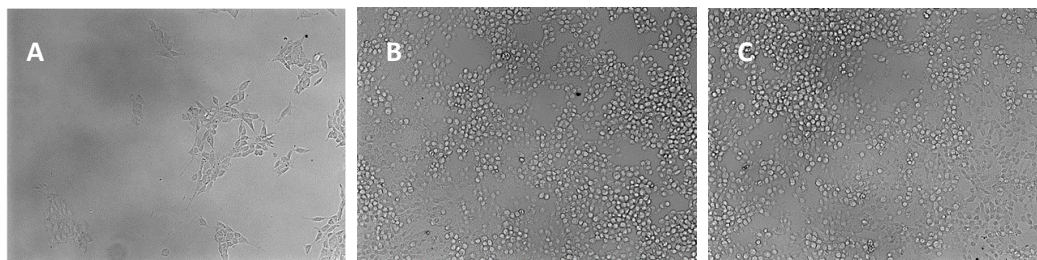
#### **4.6 Análisis estadístico**

Para poder realizar el análisis de neuritas se dispone del software Harmony® 4.1 (*Perkin-Elmer*) propio del Operetta. Para el ensayo de los diferentes parámetros estudiados de las neuritas, se compararon los grupos utilizando el test t de Student con un nivel de significación ( $\alpha > 0.05$ ) gracias al software GraphPad Prism® versión 8.0 para Windows® (*GraphPad Software*).

## 5. Resultados

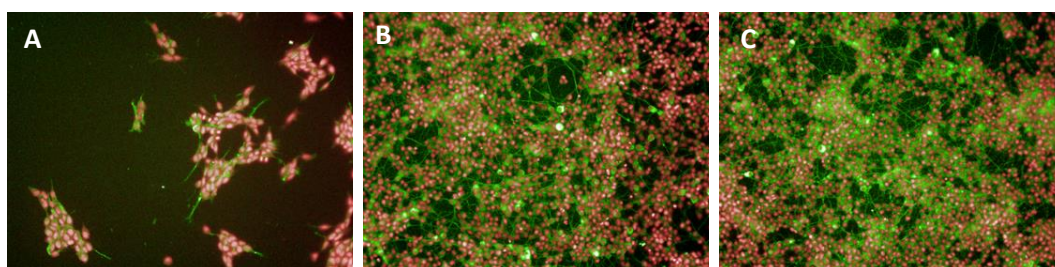
### 5.1 La diferenciación con PMA y con GLP-1 permitió obtener un fenotipo neuronal con diferentes poblaciones neuronales

En la Figura 3, se observa en el microscopio de campo claro a 20X aumentos la existencia de diferencias notables en la morfología de la población de células sin diferenciar, la población diferenciada con PMA y aquella diferenciada con GLP-1. Las células no diferenciadas presentan mayoritariamente un fenotipo de célula epitelial, existiendo una pequeña fracción de células con fenotipo neuronal que extienden neuritas de forma espontánea.



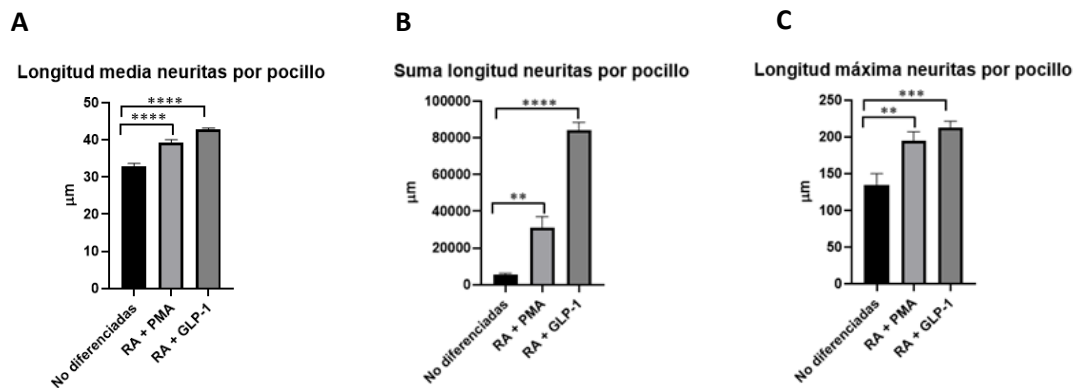
**Figura 3: Morfología de células SH-SY5Y: A)** Sin diferenciar **B)** Diferenciadas siguiendo protocolo RA+PMA. **C)** Diferenciadas siguiendo protocolo RA+GLP-1

Por otra parte, las células que han estado sujetas a ambos protocolos de diferenciación expresan un fenotipo neuronal, con un elevado número de dendritas y ramificaciones que establecen contacto unas con otras (Figura 4).



**Figura 4: Morfología de células SH-SY5Y: A)** Sin diferenciar **B)** Diferenciadas siguiendo protocolo RA+PMA. **C)** Diferenciadas siguiendo protocolo RA+GLP-1. Con los núcleos teñidos en rojo (DRAQ-5) y las neuritas en verde (anticuerpo anti-tubulina  $\beta$ -III).

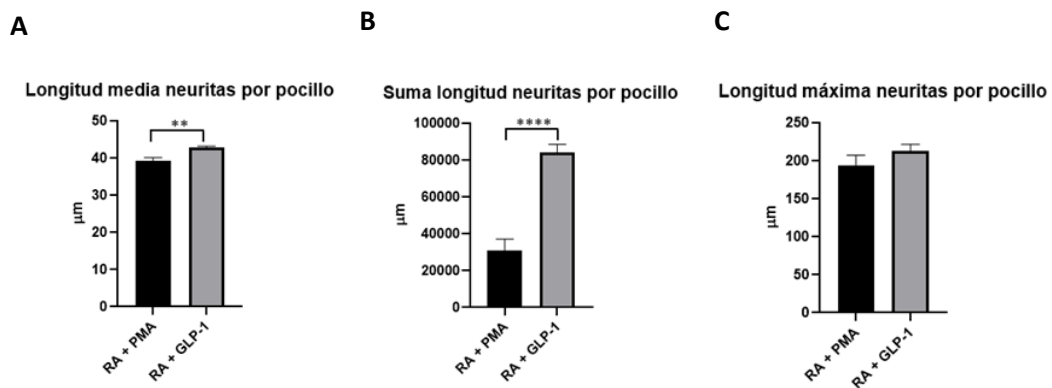
La cuantificación de la longitud de las neuritas evidenció diferencias existentes en varios parámetros (longitud media de neuritas por pocillo, longitud máxima de neuritas por pocillo, y suma de longitud de todas las neuritas de un pocillo) entre las tres poblaciones (Figura 5).



**Figura 5: A)** Longitud media de neuritas por pocillo de las células sin diferenciar, células diferenciadas con Protocolo RA+PMA y células diferenciadas con Protocolo RA+GLP-1 **B)** Suma de la longitud de neuritas por pocillo de las células sin diferenciar, células diferenciadas con Protocolo RA+PMA y células diferenciadas con Protocolo RA+GLP-1 **C)** Longitud máxima por pocillo de neuritas de células sin diferenciar, células diferenciadas con Protocolo RA+PMA y células diferenciadas con Protocolo RA+GLP-1

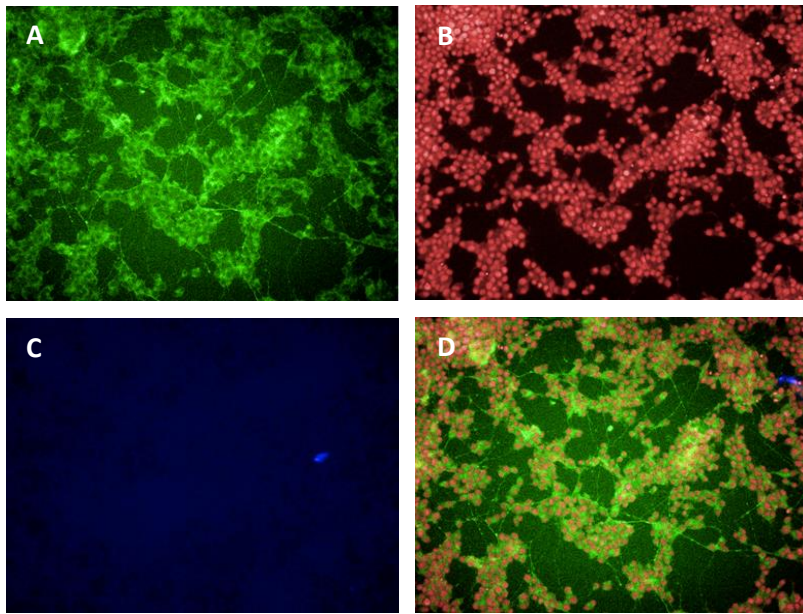
Observamos como tras la inducción de la diferenciación celular con ambos protocolos de diferenciación, las células diferenciadas presentan mayor longitud media de neuritas por pocillo, longitud máxima de neuritas por pocillo, y suma de longitud de todas las neuritas con respecto a las células sin tratar.

En la comparativa de ambos métodos de diferenciación entre sí, se observó que tanto la longitud media de las neuritas por pocillo, como la suma de la longitud de neuritas por pocillo, son significativamente mayores en la población diferenciada con GLP-1 (Figura 6).

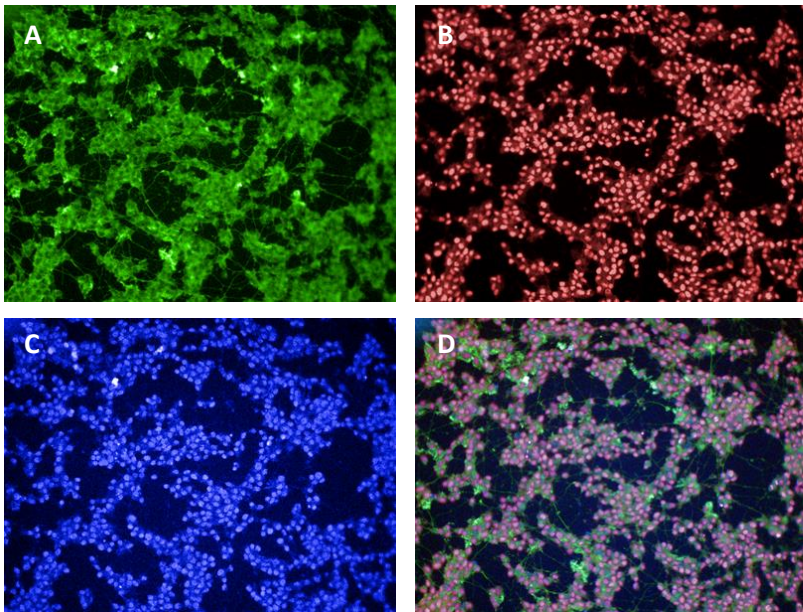


**Figura 6:** **A)** Longitud media de neuritas por pocillo células diferenciadas con Protocolo RA+PMA y células diferenciadas con Protocolo RA+GLP-1 **B)** Suma de la longitud de neuritas por pocillo de células diferenciadas con Protocolo RA+PMA y células diferenciadas con Protocolo RA+GLP-1 **C)** Longitud máxima por pocillo de neuritas de células diferenciadas con Protocolo RA+PMA y células diferenciadas con Protocolo RA+GLP-1

Por otro lado, se comprobó que la población diferenciada con PMA se marca únicamente con el anticuerpo específico nuclear DRAQ-5 y con el anticuerpo específico para la tirosina hidroxilasa, pero no con el anticuerpo para VGLUT2 (Figura 7); al contrario de lo que ocurre en la población diferenciada con GLP-1, donde se observan los núcleos teñidos con DRAQ-5 y la presencia tanto de tirosina hidroxilasa como de VGLUT-2, que además aparecen de forma simultánea en la mayoría de las neuronas (Figura 8), poniendo de manifiesto la coexpresión de ambos marcadores en una misma célula.



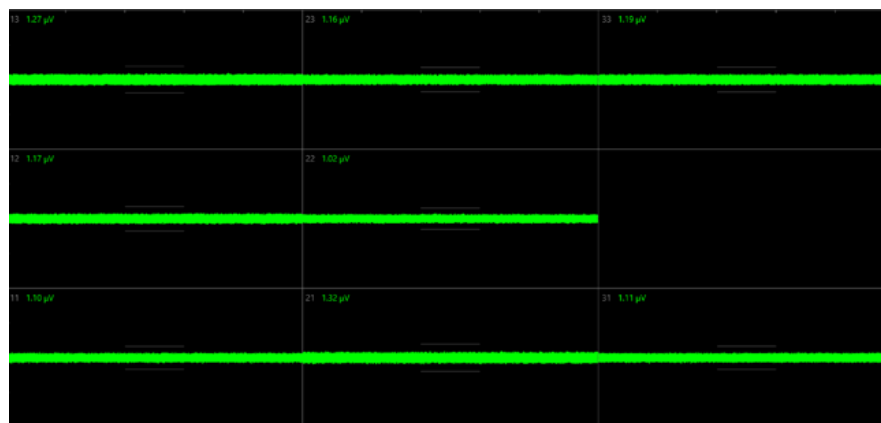
**Figura 7: Morfología de las células SH-Y5Y diferenciadas con protocolo RA+PMA** donde observamos en **A)** La tirosina hidroxilasa teñida en verde (anticuerpo Alexa 488 anti-Tirosina Hidroxilasa) **B)** Núcleos teñidos en rojo (DRAQ-5) **C)** Ausencia de tinción para VGLUT2 (Alexa 350 anti-VGLUT2) **D)** Superposición de las imágenes anteriores



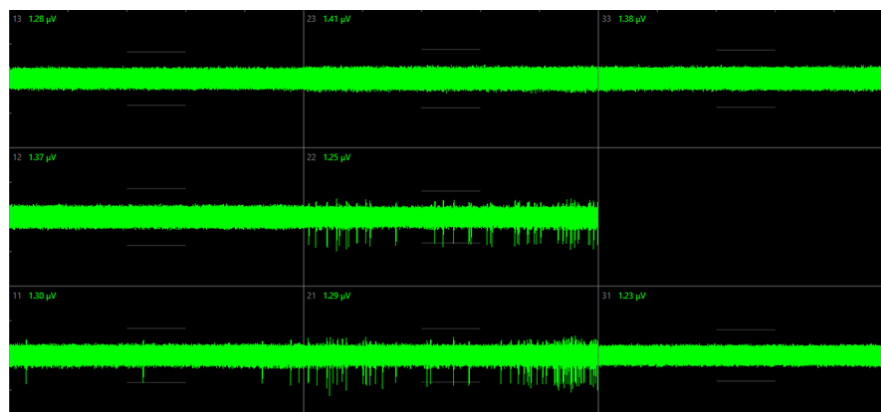
**Figura 8: Morfología de las células SH-Y5Y diferenciadas con protocolo RA+GLP-1** donde observamos en **A)** La tirosina hidroxilasa teñida en verde (anticuerpo Alexa 488 anti-Tirosina Hidroxilasa) **B)** Núcleos teñidos en rojo (DRAQ-5) **C)** El VGLUT2 teñido en azul (Alexa 350 anti-VGLUT2) **D)** Superposición de las imágenes anteriores.

## 5.2 La diferenciación con GLP-1 dota a las células de actividad eléctrica espontánea, no así la diferenciación con PMA

Se observó una clara diferencia en la actividad eléctrica espontánea (en forma de potenciales de acción) entre las dos poblaciones (Figuras 9 y 10). Así, las células diferenciadas con PMA no presentan actividad espontánea, mientras que en aquellas diferenciadas con GLP-1 observamos la existencia de actividad espontánea y, además, cierto grado de sincronización en los potenciales de acción, que suceden de manera simultánea en los diferentes microelectrodos de un mismo pocillo.



**Figura 9:** Potenciales de acción registrados por 8 microelectrodos de un pocillo de las placas Cytoview MEA conteniendo células diferenciadas bajo el protocolo RA+PMA



**Figura 10:** Potenciales de acción registrados por 8 microelectrodos de un pocillo de las placas Cytoview MEA conteniendo células diferenciadas bajo el protocolo RA+GLP-1

## 6. Discusión

Los principales hallazgos de este trabajo fueron que la diferenciación de la línea celular SH-SY5Y con PMA y GLP-1, indujo en las células la expresión de un fenotipo neuronal dopaminérgico y dopaminérgico-glutamatérgico respectivamente; y que, además, la diferenciación de dicha línea con GLP-1 fue capaz de dotar a las células de actividad eléctrica espontánea.

Actualmente, existe una gran dificultad para obtener y cultivar neuronas humanas en el laboratorio que sirvan como base para la experimentación sobre esquizofrenia y otras enfermedades mentales, por lo que se recurre a otras líneas celulares humanas con características ventajosas para su manipulación, como es el caso de la línea SH-SY5Y utilizada en este TFG.

Esta línea celular presenta la gran ventaja de que puede inducirse su diferenciación a células con diversos tipos de fenotipos neuronales, tan solo sometiéndolas a determinados cambios en la composición del medio de cultivo. La línea celular SH-SY5Y ya ha sido diferenciada con sustancias como RA (21), GLP-1 (22), PMA (23) entre otras, existiendo protocolos ya publicados para su diferenciación (24). Los principales problemas de estos protocolos son su baja eficiencia, consecuencia de la falta de homogeneidad de los cultivos obtenidos y de los largos tiempos de cultivo con exposición a compuestos que requieren. En este TFG hemos optimizado los protocolos existentes para intentar conseguir una población homogénea, con un fenotipo neuronal específico.

La línea SH-SY5Y presenta varias características adicionales que la hacen propicia para ser utilizada como modelo de neurona o célula con fenotipo neuronal, y es que como hemos mencionado anteriormente, exhibe características funcionales y bioquímicas propias de neuronas, incluyendo el crecimiento de neuritas, síntesis de neurotransmisores y marcadores de actividad enzimática neuronal. Asimismo, debido a su origen tumoral, estas células están inmortalizadas, pudiendo reproducirse en cultivo mientras se mantienen sus características (3).

La línea SH-SY5Y no es una línea celular homogénea, presentando dos fenotipos distintos en

el mismo cultivo: uno de célula epitelial (tipo S) y otro de célula neuronal (tipo N) (25). En primer lugar, para conseguir una población homogénea, se procede tratando las células durante 5 días con ácido retinoico, que inducirá la expresión del receptor TrkB en las células con fenotipo N exclusivamente (19). Las células seguirán proliferando hasta que en el día 6 de diferenciación se añade PMA o GLP-1, retirando el FBS del medio, y limitándose la supervivencia del fenotipo epitelial (que no habrá expresado el receptor TrkB) y obteniéndose una población compuesta únicamente por células con fenotipo N, que pueden ser inducidas a expresar un fenotipo neuronal.

Es una vez homogeneizado el cultivo cuando se procede con la diferenciación, que se realiza siguiendo dos esquemas distintos con el objetivo de determinar qué modelo representa mejor el fenotipo neuronal que se ve afectado en la esquizofrenia.

En el primer caso, la diferenciación se induce con PMA, pudiendo observarse una diferenciación completa, con un elevado número de neuritas y ramificaciones que tienden a establecer contacto unas con otras. Además, las células muestran reactividad con el anticuerpo específico para la tirosina hidroxilasa, poniendo de manifiesto la presencia de la enzima tirosina hidroxilasa, enzima encargada de catalizar la conversión del aminoácido L-tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA), precursor de la dopamina (26), permitiéndonos afirmar así que con este protocolo se obtiene un fenotipo neuronal dopaminérgico.

Con el segundo protocolo, la diferenciación se induce con GLP-1 y conduce también a una diferenciación completa con elevado número de neuritas y ramificaciones. Además, este protocolo permite obtener neuronas con neuritas de mayor longitud y más ramificadas que con la diferenciación que utiliza PMA. En cuanto al fenotipo neuronal que se obtiene en la diferenciación con GLP-1, observamos que en este caso las células son positivas tanto para el anticuerpo específico para la tirosina hidroxilasa, como ocurría en el caso de las diferenciadas con PMA, revelando un fenotipo neuronal dopaminérgico, como con el anticuerpo específico para VGLUT2, que demuestra la existencia del transportador vesicular 2 de glutamato en estas células. VGLUT2 es uno de los transportadores encargados de introducir el glutamato en las vesículas sinápticas para su posterior liberación en la hendidura sináptica (27), y su presencia

indica, por tanto, que estas neuronas exhiben también un fenotipo glutamatérgico. La coexistencia de TH y VGLUT2 en una misma célula permite afirmar que la diferenciación con GLP-1 induce un fenotipo de neurona dopaminérgica y glutamatérgica (22). La inducción del fenotipo de neurona dopaminérgica y glutamatérgica es especialmente útil, ya que en la esquizofrenia se ven afectados ambos sistemas de neurotransmisión (13), por lo que la posibilidad de poder estudiarlos en conjunto es especialmente relevante y simula más fielmente los procesos que ocurren in vivo, lo que podría reportar un beneficio en los ensayos de cribado de alto rendimiento. Esto se debe a que se podrían inducir daños que aparecen en la esquizofrenia y que afectan tanto a la transmisión dopaminérgica como a la glutamatérgica a la vez, sin tener que utilizar co-cultivos o tipos celulares diferentes, y mejorando los resultados obtenidos en el cribado de alto rendimiento, al seleccionar compuestos más completos que tengan efecto en un amplio abanico de síntomas de la esquizofrenia, desde los síntomas positivos (causados por problemas en la transmisión de dopamina), a los síntomas cognitivos (causados principalmente por problemas en la transmisión de glutamato).

En cuanto a la funcionalidad de los dos fenotipos obtenidos, se observó que las células diferenciadas con GLP-1 presentan actividad eléctrica espontánea, corroborando que estas tienen actividad funcional similar a la que se observa in vivo en neuronas maduras (22), y que esto es una característica que adquieren tras la diferenciación, ya que las células sin diferenciar no son eléctricamente activas. Sin embargo, aunque también han sido diferenciadas a fenotipo neuronal, las células tratadas con PMA no tienen actividad eléctrica, lo que podría deberse a que se trata de neuronas exclusivamente dopaminérgicas o a la limitada de ramificación de sus neuritas, que le impide el establecimiento de conexiones. La obtención de un cultivo eléctricamente activo es especialmente importante, ya que corrobora que con la diferenciación no inducimos solo una morfología de neurona madura, sino que también se comportan funcionalmente como neuronas, sin tener que recurrir a cultivos primarios de células obtenidas de animales o de la reprogramación células humanas.

El modelo celular obtenido puede, por lo tanto, ser una herramienta muy útil en ensayos de cribado de alto rendimiento para identificar compuestos o moléculas con actividad protectora

ante daños o interrupciones que puedan desencadenar esquizofrenia, o para identificar compuestos que reviertan o mejoren los síntomas que se producen en la enfermedad, que se podrían modular induciendo daño a las células diferenciadas, obteniendo así un modelo celular humano in vitro de síntomas de la esquizofrenia.

## 7. Conclusiones

1. El tratamiento de la línea celular SH-SY5Y con RA + PMA indujo un fenotipo neuronal expresando neuritas largas y ramificadas.
2. El tratamiento de la línea celular SH-SY5Y con RA + GLP-1 indujo la expresión de neuritas largas y más ramificadas que las células no diferenciadas y que las células diferenciadas con RA + PMA.
3. El tratamiento con RA + PMA promovió la expresión de marcadores neuronales de fenotipo dopaminérgico (TH).
4. El tratamiento con RA + GLP-1 promovió la expresión de marcadores neuronales de fenotipo dopaminérgico (TH) y glutamatérgico simultáneamente (VGLUT2).
5. El tratamiento con RA + PMA no dotó de actividad eléctrica espontánea a las neuronas.
6. El tratamiento con RA + GLP-1 sí dotó de actividad eléctrica espontánea a las células obtenidas, presentando además un considerable grado de sincronidad en sus potenciales de acción.
7. Los resultados obtenidos mostraron que el protocolo de diferenciación con RA + GLP-1 indujo un fenotipo de neurona dopaminérgica y glutamatérgica funcional que es adecuado para su utilización futura como un modelo in vitro de esquizofrenia.

## Bibliografia

1. McCutcheon RA, Reis Marques T, Howes OD. Schizophrenia-An Overview. *JAMA Psychiatry*. 2020 Feb 1;77(2):201-210.
2. Andreasen NC. Schizophrenia: the fundamental questions. *Brain Res Rev*. 2000 Mar;31(2-3):106-12.
3. Koszła O, Targowska-Duda KM, Kędzierska E, Kaczor AA. In vitro and in vivo models for the investigation of potential drugs against schizophrenia. *Biomolecules*. 2020 Jan 19;10(1):160.
4. Coelewij L, Curtis D. Mini-review: update on the genetics of schizophrenia. *Ann Hum Genet*. 2018 Sep;82(5):239-43.
5. Harrison PJ. Recent genetic findings in schizophrenia and their therapeutic relevance. *J Psychopharmacol*. 2015 Feb;29(2):85-96.
6. Stilo SA, Murray RM. Non-genetic factors in schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep*. 2019 Sep 14;21(10):100.
7. Jaaro-Peled H, Hayashi-Takagi A, Seshadri S, Kamiya A, Brandon NJ, Sawa A. Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1. *Trends Neurosci*. 2009 Sep;32(9):485-95.
8. Föcking M, Doyle B, Munawar N, Dillon ET, Cotter D, Cagney G. Epigenetic factors in schizophrenia: mechanisms and experimental approaches. *Mol Neuropsychiatry*. 2019 Mar;5(1):6-12.
9. Berrios GE, Hauser R. The early development of Kraepelin's ideas on classification: a conceptual history. *Psychol Med*. 1988 Nov; 18(4):813-21.
10. Ashok AH, Baugh J, Yeragani VK. Paul Eugen Bleuler and the origin of the term

- schizophrenia (Schizopreniegruppe). *Indian J Psychiatry*. 2012 Jan;54(1):95-6.
11. Seidman LJ, Mirsky AF. Evolving notions of schizophrenia as a developmental neurocognitive disorder. *J Int Neuropsychol Soc*. 2017 Oct;23(9-10):881-892.
  12. McCutcheon RA, Abi-Dargham A, Howes OD. Schizophrenia, dopamine and the striatum: from biology to symptoms. *Trends Neurosci*. 2019 Mar;42(3):205-20.
  13. McCutcheon RA, Krystal JH, Howes OD. Dopamine and glutamate in schizophrenia: biology, symptoms and treatment. *World Psychiatry*. 2020 Feb;19(1):15-33.
  14. Arya A, Sindhwani G, Kadian R. Neurotransmitter and brain parts involved in schizophrenia. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018 June;11(6):4-11.
  15. Weston-Green K. Antipsychotic drug development: from historical evidence to fresh perspectives. *Front Psychiatry*. 2022 Jun 16;13:903156.
  16. Gray JA, Roth BL. Molecular targets for treating cognitive dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2007 Sep;33(5):1100-19.
  17. Kasper S, Resinger E. Cognitive effects and antipsychotic treatment. *Psychoneuroendocrinology*. 2003 Jan;28 Suppl 1:27-38.
  18. Woodward ND, Purdon SE, Meltzer HY, Zald DH. A meta-analysis of cognitive change with haloperidol in clinical trials of atypical antipsychotics: dose effects and comparison to practice effects. *Schizophr Res*. 2007 Jan; 89(1-3):211-24.
  19. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, Gallego C, Comella JX. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*. 2000 Sep;75(3):991-1003.
  20. Lewis DI. Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs.

Emerg Top Life Sci. 2019 Nov 27;3(6):675-679.

21. Korecka JA, van Kesteren RE, Blaas E, Spitzer SO, Kamstra JH, Smit AB, Swaab DF, Verhaagen J, Bossers K. Phenotypic characterization of retinoic acid differentiated SH-SY5Y cells by transcriptional profiling. PLoS ONE. 2013 May 28;8(5):e63862.
22. Yang JL, Lin YT, Chen WY, Yang YR, Sun SF, Chen SD. The neurotrophic function of glucagon-like peptide-1 promotes human neuroblastoma differentiation via the PI3K-AKT Axis. Biology (Basel). 2020 Oct 22;9(11):348.
23. Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S, Joyce JN. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. Neurotox Res. 2004;5(8):579-98.
24. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. J Vis Exp. 2016 Feb 17;(108):53193.
25. Kovalevich J, Santerre M, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. Methods Mol Biol. 2021;2311:9-23.
26. Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. Arch Biochem and Biophys. 2011 Apr;508(1):1-12.
27. Wallen-Mackenzie A, Wootz H, Englund H. Genetic inactivation of the vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2) in the mouse: What have we learnt about functional glutamatergic neurotransmission? Ups J Med Sci. 2010 Feb;115(1):11-20.