

Trabajo Fin de Máster



Desarrollo de un modelo *in-vitro* de neuronas humanas: aplicaciones biomédicas y biotecnológicas.

Ana Belén Carriquí Suárez

Máster Biotecnología y Bioingeniería

Curso académico 2020/2021

Tutor: Antonio Vicente Ferrer Montiel

Cotutora: Laura Butron García

Área de conocimiento: Nuevos Compuestos Bioactivos

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche

Declaración del tutor

El presente trabajo, titulado Desarrollo de un modelo in-vitro de neuronas humanas: aplicaciones biomédicas y biotecnológicas, realizado por Dña. **Ana Belén Carriquí Suárez** ha sido realizado bajo nuestra supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche.

En Elche,

Fdo. Antonio Ferrer Montiel

Fdo. Laura Butrón García

Índice

| | |
|---|----|
| Declaración del tutor | i |
| 1 Resumen y palabras clave | 1 |
| 2 Abstract and keywords..... | 2 |
| 3 Introducción y antecedentes..... | 3 |
| 3.1 Problemática del uso de animales en cosmética | 3 |
| 3.2 Problemática del uso de animales en investigación | 3 |
| 3.3 Métodos alternativos al uso de animales | 4 |
| 3.3.1 Cultivos primarios de células humanas..... | 5 |
| 3.3.2 Líneas celulares estables..... | 5 |
| 3.4 SH-SY5Y | 6 |
| 3.5 Morfología y funcionalidad de la neurona..... | 6 |
| 3.6 Canales TRP..... | 8 |
| 3.6.1 <i>TRPV1</i> | 10 |
| 3.6.2 <i>TRPA1</i> | 11 |
| 3.6.3 <i>TRPM8</i> | 11 |
| 4 Objetivos | 12 |
| 4.1 Objetivo general | 12 |
| 4.2 Objetivos específicos | 12 |
| 5 Materiales y Métodos | 13 |
| 5.1 Cultivo línea celular SH-SY5Y-VR1 | 13 |
| 5.1.1 Reactivos..... | 13 |
| 5.1.2 Medios de cultivo | 13 |
| 5.1.3 Método | 14 |
| 5.2 Diferenciación SH-SY5Y-VR1 | 15 |
| 5.2.1 Reactivos:..... | 16 |
| 5.2.2 Método de diferenciación | 17 |
| 5.3 Imagen de Calcio..... | 18 |
| 5.3.1 Reactivos..... | 19 |
| 5.3.2 Método | 20 |
| 5.4 Análisis estadístico..... | 21 |

| | | |
|-----|--|----|
| 6 | Resultados..... | 23 |
| 6.1 | Morfología | 23 |
| 6.2 | Funcionalidad..... | 26 |
| 7 | Discusión | 31 |
| 7.1 | Diferencias morfológicas | 31 |
| 7.2 | Diferencias funcionales o fisiológicas | 32 |
| 8 | Conclusiones y proyección futura | 35 |
| 9 | Bibliografía | 36 |

1 Resumen y palabras clave

En los últimos años ha surgido la necesidad de desarrollar alternativas al uso de animales de experimentación, tanto para el testado de productos dermatológicos como para la investigación básica y aplicada. En este contexto, se plantea desarrollar un modelo *in-vitro* de piel humana inervada para el cual primero hay que desarrollar un modelo *in-vitro* de neurona humana. El presente trabajo se centrará en el desarrollo de este modelo de neurona mediante la diferenciación a partir de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y-VR1 con diferentes compuestos (ácido retinoico, forskolina y dB-cAMP). El éxito funcional alcanzado en esta diferenciación se comprobará estudiando la respuesta de tres canales dependientes de calcio (*TRPV1*, *TRPM8* y *TRPA1*) ante la activación de estos por su agonista (capsaicina, mentol y AITC, respectivamente), así como la respuesta a KCl, todo ello mediante la técnica de imagen de calcio.

Se obtuvieron mejores resultados en aquellas células que habían sido tratadas con los tres compuestos (ácido retinoico, forskolina y dB-cAMP) frente a aquellas células que no habían recibido tratamiento con ácido retinoico.

Por lo tanto, el tratamiento con estos compuestos sería el más indicado para lograr una diferenciación neuronal exitosa.

Palabras clave: SH-SY5Y-VR1, diferenciación neuronal, ácido retinoico e imagen de calcio.

2 Abstract and keywords

In recent years, there has been a raising need to developed alternatives to animal testing, for both, testing dermatological products and basic and applied investigation. It is proposed to develop an innervated *in-vitro* skin model, for which a human neuron *in-vitro* model must be developed first. This project will be focus on the development of this neuron model performing a neuronal differentiation using the cell line SH-SY5Y-VR1 in combination of different compounds (retinoic acid, forskolin and dB-cAMP). The functional success of this differentiation will be tested studying the response of three calcium-dependent channels (*TRPV1*, *TRPM8* and *TRPA1*) by their agonist (capsaicin, menthol and AITC, respectively), as well as the response to KCl, by applying the calcium imaging technique.

Better results were acquired in cells that received treatment with retinoic acid, forskolin and dB-cAMP in comparison with those cells that did not received treatment with retinoic acid.

Therefore, the treatment with these compounds would be the most suitable treatment to achieve a successful neuronal differentiation.

Keywords: SH-SY5Y-VR1, neuronal differentiation, retinoic acid and calcium imaging.

3 Introducción y antecedentes

Durante muchos años se han utilizado animales en la investigación debido a su similitud fisiológica con los seres humanos (1). Sin embargo, en los últimos años se ha cuestionado su uso tanto por razones éticas como por otras relacionadas con las diferencias entre especies.

3.1 Problemática del uso de animales en cosmética

Los cosméticos contienen muchas sustancias químicas, de las que debe determinarse su toxicidad, dosis y eficacia. Por lo que, el testado de los ingredientes de los cosméticos en animales se lleva a cabo principalmente para comprobar la seguridad del producto y sus propiedades hipoalergénicas (1–3). Pero en los últimos años, ha aumentado la concienciación por el bienestar de los animales, esto ha llevado a muchos países a aprobar leyes para prohibir su uso en cosmética (1).

En marzo de 2013, Europa fue pionera en prohibir la venta de productos cosméticos probados en animales en los estados miembros de la Unión Europea, independientemente de dónde se produzcan dichos productos (1,4).

En este contexto, surge la necesidad a nivel europeo de desarrollar alternativas al uso de animales para el testado de productos cosméticos.

3.2 Problemática del uso de animales en investigación

Para estudios de la piel o del sistema nociceptivo, nos encontramos con el inconveniente de que la piel humana y la de los roedores sólo comparten alrededor de un 30% de los genes asociados a ésta, y aquellos que difieren son precisamente los asociados con la morfogénesis, crecimiento e inmunología (5). Además, existen diferencias anatómicas y fisiológicas entre la piel de los roedores y la de los humanos (*Figura 1*) (5). Todo ello conduce a que alrededor del 80% de las terapias fracasen en los ensayos clínicos, a pesar de la clara eficacia y seguridad mostrada en los estudios preclínicos con animales (5).

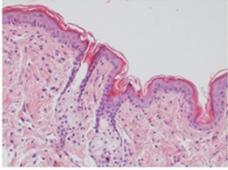
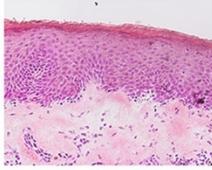
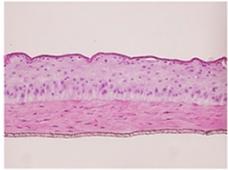
| |  Mouse |  Human |  Skin model |
|--------------------------------------|---|--|--|
| Histology |  |  |  |
| Epidermal layers | 2 - 5 | 16 - 18 | 10 - 15 |
| Skin renewal | 8 - 10 d | 28 d | No |
| Hair follicle | High number & wider diversity | Significantly less than rodents | No |
| Cutaneous muscle layer | Panniculus carnosus | No | No |
| sweat glands | Eccrine sweat glands (exclusively in the pads) | Apocrine & eccrine | No |
| Melanocytes | Follicular location | Interfollicular location | Requires implementation |
| T-cell population in the skin | Dendritic epidermal T-cells (DETC) | α/β T-cells | Requires implementation |
| Antimicrobial peptides | Tissue specific different from humans | Yes | Similar to humans |

Figura 1: Diferencias y similitudes entre la piel de los ratones, la piel humana y los modelos *in-vitro* basados en piel humana (5).

Asimismo, los modelos de piel actuales (*Figura 1*) no comparten muchas de las características fisiológicas de la piel humana *in-vivo*. Estos carecen de vascularización, inervación y su cultivo es principalmente estático (5).

Simultáneamente, los estudios del sistema nervioso se ven limitados por la falta de un modelo *in-vitro* de neuronas humanas (6). Los basados en animales no siempre imitan la fisiología humana y los resultados obtenidos podrían diferir entre especies, especialmente los efectos más peligrosos (7).

Por tanto, existe una necesidad de desarrollar nuevos modelos de piel humana *in-vitro* para el estudio básico y la fase preclínica del desarrollo de fármacos. A la vez, se requiere desarrollar un modelo de neuronas humanas que permita la inervación de estos modelos de piel *in-vitro*.

3.3 Métodos alternativos al uso de animales

Los modelos actuales empleados en estudios del sistema nervioso se basan en el cultivo primario de células humanas, o en el cultivo continuo de líneas celulares inmortalizadas estables que son de origen oncogénico.

3.3.1 Cultivos primarios de células humanas

En el cultivo primario, las células se aíslan directamente de los tejidos, tienen una vida útil finita y una capacidad de expansión limitada. Por otro lado, presentan una morfología celular original y mantienen muchos de los marcadores y funciones de las células *in-vivo* (8–10).

Varios estudios han demostrado la capacidad de generar células madre neurales a partir de diferentes fuentes como hESCs, iPSCs o fibroblastos (11). El principal inconveniente es la incapacidad para generar una población homogénea (ya que se pueden diferenciar en cualquier tipo de célula), inmortal y fácil de cultivar (12–14).

3.3.2 Líneas celulares estables

Este tipo de líneas se han utilizado ampliamente en experimentación y son homogéneas en todo el cultivo, lo cual proporciona alta reproducibilidad (10,15). Además, presentan alta capacidad de proliferación, permiten una fácil manipulación genética y muchas, al ser de origen humano, presentan similitudes con la genética humana (15).

Sin embargo, estos modelos requieren procesos de diferenciación para tener las características morfológicas y/o fisiológicas de las neuronas (16). Así mismo, su origen oncogénico les confiere una alta capacidad de proliferación y mutagénesis, por lo que sus características fisiológicas pueden diferir en gran medida de las características neuronales (16,17).

Las líneas celulares más empleadas para diferenciación son: SH-SY5Y y PC12 (16,18–21). De estas, sólo SH-SY5Y es de origen humano. Al ser tan ampliamente empleada, está bien caracterizada, *in-vitro* es estable e inmortal durante largos periodos de tiempo y no requiere factores de crecimiento (14,22–24). Además, es eléctricamente excitable y se ha empleado previamente en estudios farmacológicos de patch-clamp y de imagen de calcio (18). Debido a esta capacidad, se puede suponer que estas células presentan características más cercanas a las neuronales (25).

Por todas las ventajas ya explicadas, SH-SY5Y-VR1 será la línea utilizada en este estudio.

3.4 SH-SY5Y

Como se ha expuesto anteriormente, muchas áreas en el campo de la neurociencia se ven obstaculizadas por la falta de modelos *in-vitro* que se asemejen a las neuronas funcionalmente maduras (26).

La línea de células de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, se ha utilizado ampliamente en la investigación neurocientífica (27). Su origen es un tumor infantil que surge de las células neuroectodérmicas de la cresta neural. Como ya se ha comentado, tiene como ventajas que está bien caracterizada, bajo costo de mantenimiento, facilidad de manejo, reproducibilidad y posibilidad de diferenciación neuronal (28).

La diferenciación se caracteriza por la detención de la proliferación celular, así como por cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales (27). Los compuestos más utilizados para diferenciación son los ésteres de forbol y el ácido retinoico (AR), factores de crecimiento como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), y las neuregulinas. Otros menos utilizados son el metabolito de la vitamina D 1,25-dihidroxicolecalciferol (VitD3) y el colesterol (26).

De estos, el más utilizado es el ácido retinoico. Es la forma biológicamente activa de la vitamina A. Interviene en el desarrollo embrionario temprano y en la formación de varios órganos y sistemas, como el sistema nervioso (29). *In-vitro* participa en la diferenciación de distintos tipos celulares (29). Pero, al igual que todos los retinoides, disuelto en soluciones acuosas puede causar daños oxidativos cuando se expone a la luz, al aire y a temperaturas relativamente altas, condiciones habituales en cultivo celular (30).

3.5 Morfología y funcionalidad de la neurona

La neurona es la célula principal del sistema nervioso. Su función principal es recibir, procesar y transmitir información a través de señales químicas y eléctricas mediante potenciales de acción.

La estructura neuronal presenta ramificaciones alargadas llamadas neuritas, de las cuales, existen dos tipos: los axones y las dendritas (a menudo ramificadas), ambas transportan señales eléctricas y químicas (31). Las formas de las neuritas determinan las vías de transmisión de

señales en el sistema nervioso y el modo en que las señales eléctricas se procesan y transmiten (31).

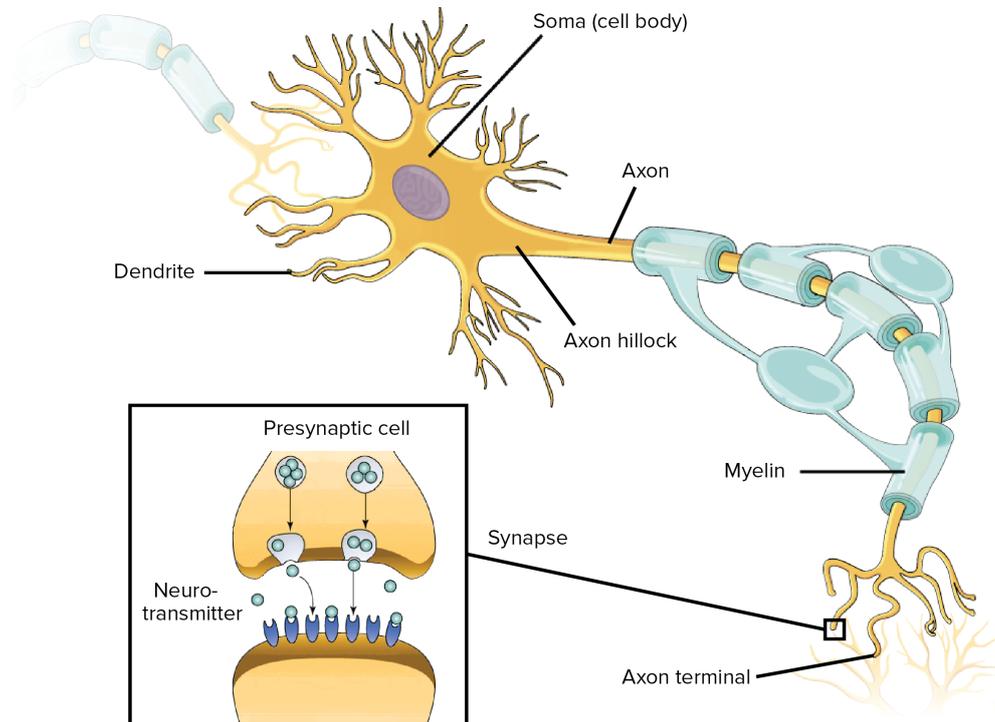


Figura 2: Morfología de una neurona y sinapsis. Imagen modificada de "Neurons and glial cells" (32) y "Synapse" (33).

Las neuronas se comunican entre sí y con otras células mediante sinapsis (Figura 2). En esta, los canales de calcio se abren, lo que permite el paso de iones de calcio hacia el interior de la célula, aumentando la concentración intracelular y desencadenando otros procesos como la transcripción de genes, la proliferación y la migración celular (34).

En las neuronas, la actividad eléctrica es fundamental para muchos procesos intracelulares, como la señalización de calcio, la homeostasis energética y la redistribución de proteínas (35). La actividad eléctrica depende de diferentes tipos de canales iónicos, activados por voltaje y ligando, permeables a iones como el sodio, potasio, cloro y calcio (36). Los tres primeros iones tienen un papel predominantemente en los cambios del potencial de membrana. Sin embargo, los iones de calcio no sólo pueden alterar este potencial, sino que también intervienen en la señalización neuronal (37).

3.6 Canales TRP

La superfamilia de los receptores de potencial transitorio (TRP) codifica proteínas de membrana que actúan como canales iónicos (38). En lo que respecta a mamíferos, actualmente está compuesta por 28 receptores, distribuidos en 6 subfamilias (*Figura 3*): *TRPC1-7* (canónico), *TRPM1-8* (melastatina), *TRPV1-6* (vaniloide), *TRPA1* (anquirina), *TRPP1-3* (policistina) y *TRPML1-3* (mucolipina). Además, podemos encontrar isoformas pertenecientes a otras subfamilias, como *TRPN* (NOMPC-like, en invertebrados y peces) o *TRPY* (en levaduras) (39).

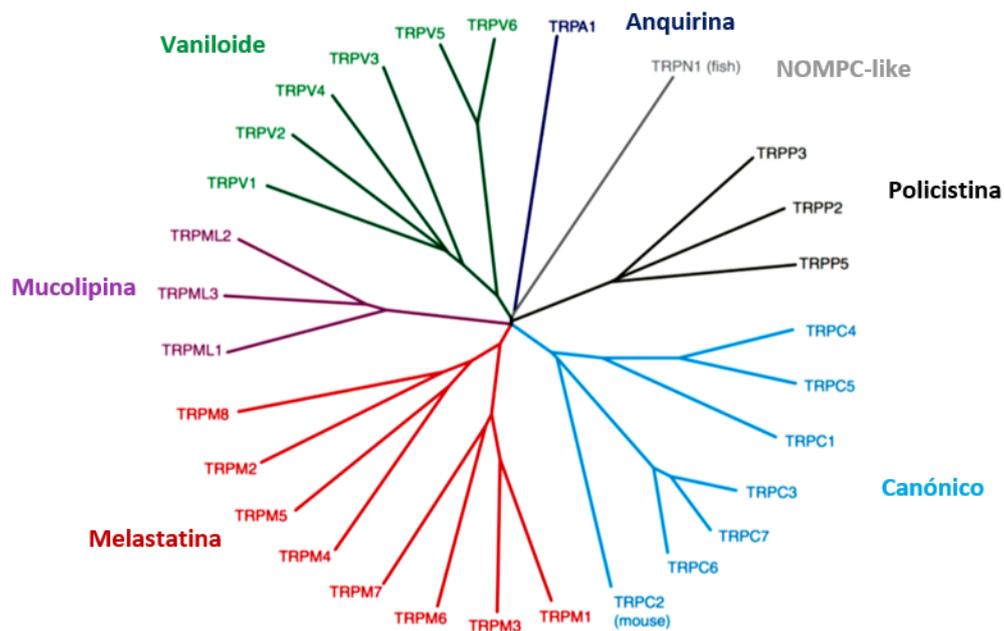


Figura 3: Árbol filogenético de los canales iónicos TRP expresados en humanos (39).

Dentro de la superfamilia de los TRP, existe un pequeño grupo denominado termoTRP (*Figura 4*), que reaccionan a un amplio rango de temperaturas (40–42). De estos, cuatro canales responden ante el calor (*TRPV1-TRPV4*) y dos frente al frío (*TRPA1* y *TRPM8*) (43).

Thermosensing nociceptive TRP channels in sensory neurons

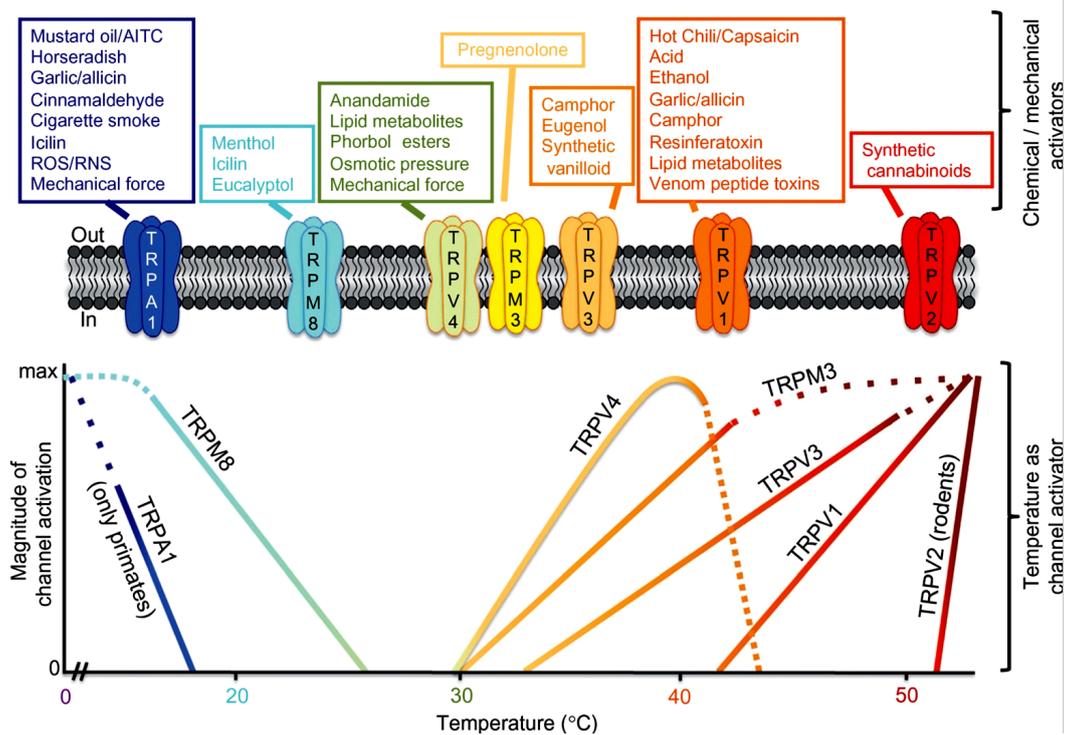


Figura 4: Clasificación de los canales TRP nociceptivos termosensibles en las neuronas sensoriales de los mamíferos. La fila superior de recuadros individuales denota los activadores químicos/mecánicos de los canales TRP marcados. El panel inferior representa la magnitud de la actividad del canal tras la activación por temperatura de los canales TRP mostrados (44).

La mayoría de los receptores TRP consisten en canales catiónicos no selectivos, los cuales permiten el flujo de iones Ca^{2+} , Na^+ e incluso Mg^{2+} , aunque su permeabilidad y selectividad dependerá de su isoforma. Presentan una gran variedad de mecanismos de activación, desde la unión de ligandos, voltaje y temperatura, hasta modificaciones covalentes en residuos nucleofílicos (39) (Figura 5). Estos receptores se expresan en diversos tejidos y tipos celulares, por lo que intervienen en la fisiología sensorial, ya que además de la nocicepción, se encuentran relacionados con el olfato, oído, visión, tacto u homeostasis iónica y térmica (45).

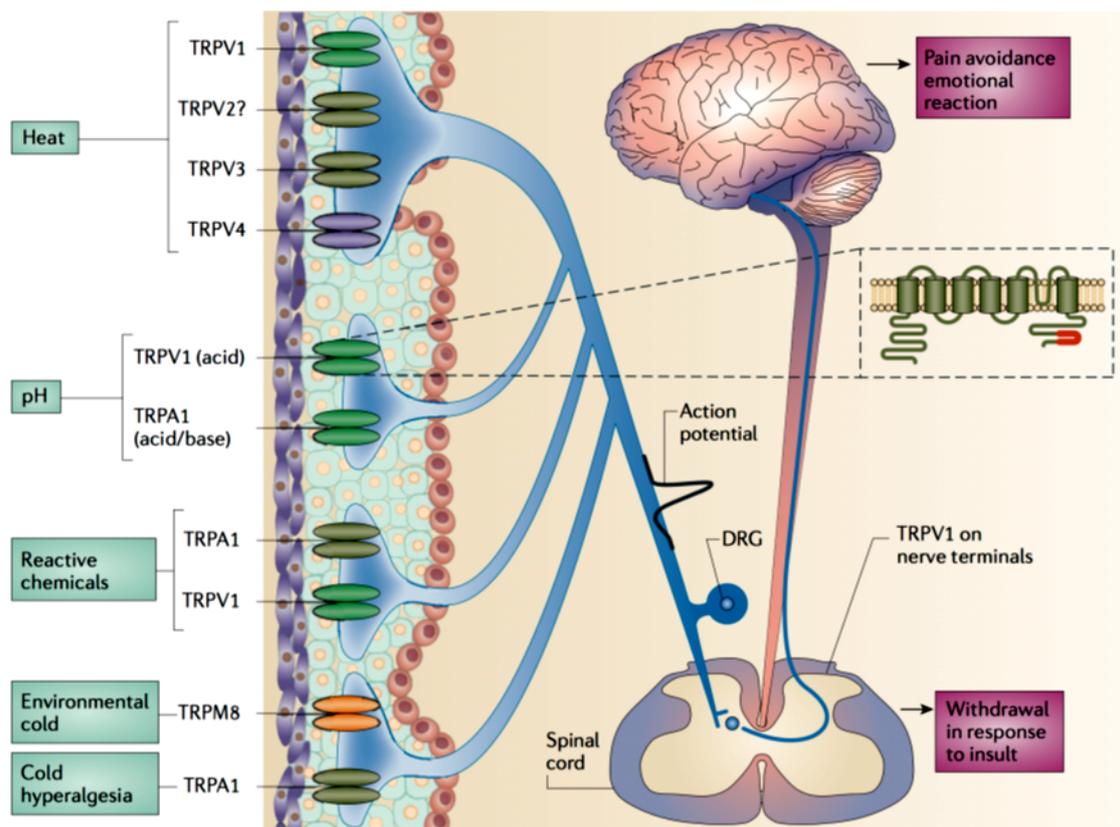


Figura 5: Canales iónicos TRP como nociceptores (46).

3.6.1 TRPV1

El receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (*TRPV1*) es un receptor de canal iónico polimodal que responde a estímulos nocivos, que pueden ser químicos, como la capsaicina (el agonista clásico) y el pH (<6); o físicos, como el calor (>45 °C) (47,48).

Este receptor, se expresa principalmente en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRGs) (49). Está implicado en la migración celular, la reorganización del citoesqueleto y la orientación neuronal (49).

En el artículo publicado por *EL Andaloussi-Lilja* en 2009 (49), utilizaron un clon estable de la línea celular del neuroblastoma humano SH-SY5Y con el canal *TRPV1* como modelo para el desarrollo del sistema nervioso y la diferenciación fue inducida por ácido retinoico (AR). Mostraron que la expresión de *TRPV1* aumentó durante la diferenciación. Más adelante, la activación de *TRPV1* y, como consecuencia, la concentración de Ca^{2+} basal y la inducida por la capsaicina también aumentaron en las células diferenciadas en comparación con las células de control.

3.6.2 *TRPA1*

El receptor de potencial transitorio de la anquirina 1 o *TRPA1* es la diana molecular de los irritantes ambientales y las sustancias químicas picantes (50).

El *TRPA1* se expresa en un subconjunto de neuronas sensoriales periféricas, lo que implica un papel especializado en la transducción sensorial (51). También se ha asociado a varios mecanismos fisiológicos como la motilidad intestinal, la inflamación o el dolor (52).

Su agonista de referencia para su estudio *in-vitro* es el isotiocianato de alilo (AITC), responsable del sabor picante de la mostaza, el rábano, y el wasabi (53,54).

3.6.3 *TRPM8*

El receptor de potencial transitorio de la melastatina 8 (*TRPM8*) es el principal transductor molecular de la somatosensación por frío y en el mantenimiento de la temperatura corporal central en los seres humanos (55–57).

Se expresa en los ganglios de la raíz dorsal y en los ganglios del trigémino (58). Se ha visto que presenta efectos antinociceptivos o bloqueadores del dolor en ratas (59).

Su agonista de referencia es el mentol, que pueden desensibilizar el canal por aplicación repetida (60).

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

El objetivo último de este trabajo es crear un modelo *in-vitro* de neuronas humanas, siendo esta la primera parte de un proyecto que tiene como propósito crear un modelo *in-vitro* de piel humana inervada.

4.2 Objetivos específicos

Para lograr este objetivo general, se plantean otros objetivos más concretos, que son consecutivos en el tiempo:

- Establecer un protocolo de diferenciación neuronal utilizando la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y-VR1.
- Caracterización funcional de la línea celular SH-SY5Y-VR1 mediante imagen de calcio.
- Comprobar que el efecto observado se debe al tratamiento y no al vehículo (DMSO).

5 Materiales y Métodos

En este apartado se describe la metodología seguida en el trabajo y los materiales utilizados.

5.1 Cultivo línea celular SH-SY5Y-VR1

5.1.1 Reactivos

| REACTIVO | REFERENCIA | CASA COMERCIAL |
|---|------------|----------------|
| MEM, no glutamine | 21090-022 | GIBCO |
| Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) | 15140-122 | GIBCO |
| MEM NEAA (Non-essentials Amino Acids Solution (100X)) | 11140-035 | GIBCO |
| L-Glutamine (200 mM) | 25030-024 | GIBCO |
| FBS (Heat inactivated Fetal Bovine Serum) | 10500-064 | GIBCO |
| PUROMICYN READY | P9620 | SIGMA |
| Trypsin-EDTA (0.05%) | 25300-054 | GIBCO |
| Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sterile filtered) | D2650 | SIGMA |
| POLY-L-LYSINE | P4707 | SIGMA |
| Laminin Mouse Protein | L2020 | SIGMA |
| DULBECCO'S PBS (10X) | H15-011 | PAA |

Tabla 1: Referencias de los reactivos a utilizar para el cultivo.

La solución de PBS 1X se llevó a cabo diluyendo 100 mL de PBS 10X en 1 litro de agua destilada y se esterilizó mediante autoclave.

5.1.2 Medios de cultivo

5.1.2.1 Medio de mantenimiento

Se llevo a cabo con los siguientes componentes:

| REACTIVO | VOLUMEN | VOLUMEN | CONCENTRACIÓN FINAL |
|-------------|---------|---------|---------------------|
| MEM | 500 mL | 200 mL | |
| P/S | 5,7 mL | 2,28 mL | 1% |
| FBS | 57,5 mL | 23 mL | 10% |
| MEM NEAA | 5,7 mL | 2,28 mL | 0,1 mM |
| L-Glutamina | 5,7 mL | 2,28 mL | 2 mM |
| Puromicina | 23 µL | 9,2 µL | 0,4µg/mL |

Tabla 2: Reactivos, volúmenes y concentraciones para realizar el medio de mantenimiento.

5.1.3 Método

5.1.3.1 *Mantenimiento*

Cuando el frasco de 25 cm² presente una confluencia entre el 80-90% se tripsiniza para continuar su cultivo (nunca exceder de un 90% de confluencia).

- 1) Retirar el medio del frasco con ayuda de una pipeta.
- 2) Añadir 1 mL de tripsina-EDTA (0.05%) y dejar actuar durante 40 segundos. Dar unos golpecitos en la base del frasco con la mano hasta que se despeguen las células.
- 3) Inactivar la Tripsina añadiendo 5 mL de medio de mantenimiento y disgregar las células soltando la mezcla por las paredes del frasco, retirando las que puedan haber quedado pegadas en la superficie.
- 4) Trasvasar a un tubo de 15 mL.
- 5) Subcultivar en frasco de 25 cm².
- 6) Introducir en el incubador a 37°C, 5% CO₂ y 95% aire humidificado.
- 7) Tras 48 -72 horas, renovar el medio de mantenimiento por medio fresco.

5.1.3.2 *Siembra*

- 1) Introducir los cristales estériles en las placas de 24 pocillos, utilizando unas pinzas estériles.
- 2) Añadir 120 µL de Poly-L-Lysina con 12 mL de PBS con cuidado de no levantar el cristal a cada pocillo.
- 3) Dejar actuar 30 min en incubador a 37°C, 5% CO₂.
- 4) Retirar la Poly-L-Lysina con ayuda de una pipeta.
- 5) Hacer 3 lavados de los cristales añadiendo 500 µL de PBS a cada pocillo. (La placa se puede dejar hasta 15 días en el incubador).
- 6) Encender la lámpara de UV de la campana y dejar actuar 30 min con la tapa de la placa abierta (Este paso es opcional, se hace si algo no está estéril)
- 7) Añadir laminina 5 µg/mL (60 µL Laminina + 12 mL PBS) 500 µL/pocillo y dejar actuar 2 horas a 37°C, 5% CO₂. (Se puede dejar hasta 48 h).

- 8) Tripsinizar el frasco siguiendo los pasos descritos anteriormente.
- 9) Una vez resuspendidas las células en 6 mL de medio de mantenimiento, se determina la concentración celular mediante la cámara Neubauer, en la que se introducen 10 μ L del medio con las células.
- 10) Calcular el volumen que se necesita coger de la suspensión celular para obtener la cantidad de células que se requiere por pocillo. Multiplicar ese volumen por el número de pocillos necesarios (+1 ya que si se genera espuma se pierde volumen) y trasvasarlos a un nuevo tubo.
- 11) Calcular el volumen de medio de mantenimiento que se necesita para completar un pocillo según el resultado obtenido en el apartado anterior. Multiplicar ese volumen por el número de pocillos requeridos (+1) y añadir al tubo que contiene las células.
- 12) Mezclar bien la suspensión celular con ayuda de una pipeta y dispensar el volumen necesario en cada pocillo de la placa.
- 13) Colocar la placa en el incubador y mantener a 37°C, 5% CO₂ y 95% aire humidificado hasta el día de uso.

5.2 Diferenciación SH-SY5Y-VR1

El objetivo es transformar las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y-VR1 a un estado similar al neuronal, mediante la adición de diferentes compuestos. El protocolo de diferenciación completo se realiza en una semana (*Figura 6*).



Figura 6: Esquema del proceso de diferenciación.

5.2.1 Reactivos:

| REACTIVO | REFERENCIA | CASA COMERCIAL |
|--|------------|----------------|
| MEM no glutamine | 21090-022 | GIBCO |
| PENICILINA-STREPTOMICINA (20x100 mL) | 15140-122 | GIBCO |
| MEM NEAA (Non-essentials Amino Acids) | 11140-035 | GIBCO |
| L-GLUTAMINA | 25030-024 | GIBCO |
| FBS (Heat inactivated Fetal Bovine Serum) | 10500-064 | GIBCO |
| PUROMICYN READY | P9620 | SIGMA |
| Forskolin | 1099 | TOCRIS |
| N6,2'-O-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (dB-cAMP) | D0627 | SIGMA |
| Retinoic acid | R2625 | SIGMA |

Tabla 3: Referencias de los reactivos a utilizar para la diferenciación.

– **Retinoic acid (Ácido Retinoico):**

El ácido retinoico es un metabolito directo de la vitamina A. Los retinoides regulan fisiológicamente muchos procesos biológicos, tales como diferenciación, visión, apoptosis, proliferación y reproducción, entre otros. Es decir, son esenciales para el desarrollo embrionario y a su vez desempeñan un importante papel en la homeostasis del organismo ya adulto (61).

– **Forskolin (Forskolina):**

A nivel molecular este reactivo se encarga de permeabilizar a las células frente a la adenilil ciclasa (AC), esto se debe a que es un agente hipotensor y vasodilatador. Se utiliza para la reprogramación de fibroblastos embrionarios por su facilidad de inducir la diferenciación neuronal que poseen las células madres y varios neuroblastomas (62).

– **N6, 2'-O-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (dB-cAMP), (N6, 2'-O-dibutiriladenosina 3',5'-sal sódica de monofosfato cíclico):**

El dB-cAMP actúa directamente induciendo la diferenciación morfológica de las células de Schwann y a su vez, se encarga de la modulación celular de las mismas, es por esto que se usa en gran variedad de estudios de diferenciación de cultivos (35).

5.2.2 Método de diferenciación

Se utilizaron dos tratamientos de diferenciación, uno sin ácido retinoico (Tratamiento A) y otro con AR (Tratamiento B). Cada uno tiene su control asociado, el cual, contiene la misma concentración de DMSO que cada tratamiento, puesto que este actúa como vehículo y se requería comprobar que no tuviera ningún efecto sobre el cultivo.

- 1) Preparar medio basal 0,5% FBS.

| Medio basal 0,5% FBS | |
|----------------------|----------|
| Medio MEM | 25 mL |
| P/S | 285 µL |
| FBS 0.5% | 143,5 µL |
| MEM NEAA | 285 µL |
| L-Glutamina | 285 µL |
| Puromicina | 1,15 µL |

Tabla 4: Volúmenes de los compuestos que contiene el medio basal.

- 2) **Tratamiento A:** Añadir al medio basal 30 µM Forskolina disuelta en DMSO + 1 mM DB-cAMP disuelto en agua MilliQ + 0,5% FBS.

| Reactivos para 12 cristales | Tratamiento A | Concentraciones |
|-----------------------------|---------------|-----------------|
| FBS | 6,5 mL | 0,5 % |
| Forskolina | 19,5 µL | 30 µM |
| DB-cAMP | 65 µL | 1 mM |

Tabla 5: Volúmenes de los compuestos utilizados para realizar el tratamiento A.

- 3) **Tratamiento B:** Añadir al medio basal 30µM Forskolina + 1mM DB-cAMP + 5 µM AR disuelto en DMSO.

| Reactivos para 12 cristales | Tratamiento B | Concentraciones |
|-----------------------------|---------------|-----------------|
| 3 mL del tratamiento A | | |
| Ácido Retinoico | 1,5 µL | 5 µM |

Tabla 6: Volúmenes de los compuestos utilizados para realizar el tratamiento B.

- 4) **Tratamiento Control A:** medio basal 0,5% FBS + 0,30% DMSO.

| Reactivos para 6 cristales | Control A |
|----------------------------|-----------|
| FBS 0,5% | 3 mL |
| DMSO | 19,5 µL |

Tabla 7: Volúmenes de los compuestos utilizados para realizar el control A.

5) **Tratamiento Control B:** medio basal 0,5% FBS + 0,35% DMSO.

| Reactivos para 6 cristales | Control A |
|----------------------------|-------------|
| FBS 0,5% | 3 mL |
| DMSO | 1,5 μ L |

Tabla 8: Volúmenes de los compuestos utilizados para realizar el control B.

Se siembra en una placa de 24 pocillos a una densidad celular de 40.000 células/mL como se muestra en la *Figura 7*:

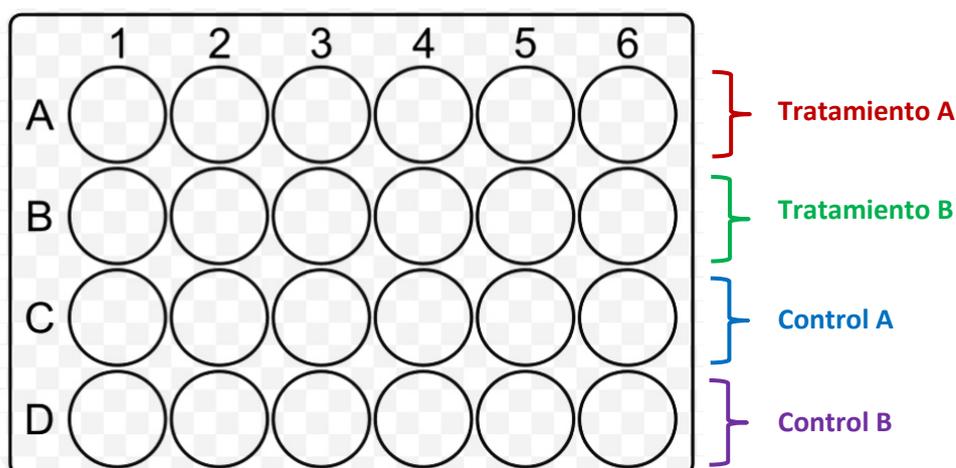


Figura 7: Simulación placa de 24 pocillos en la que se indica el tratamiento aplicado. **Tratamiento A:** tratamiento de diferenciación sin AR. **Tratamiento B:** tratamiento de diferenciación con AR. **Control A:** células sin diferenciar al 0,30% DMSO. **Control B:** células sin diferenciar al 0,35% DMSO.

5.3 Imagen de Calcio

Para estudiar la funcionalidad de las células diferenciadas a neurona, se empleó una técnica fluorométrica basada en una sonda sensible a calcio (63).

En el sistema nervioso, los iones de calcio juegan un papel principal en la comunicación celular como mensajeros. En los terminales presinápticos, la afluencia de calcio desencadena la exocitosis de vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores. Por otro lado, en el núcleo, las señales de calcio pueden regular la transcripción de genes (64).

Tras la despolarización, los iones de calcio entran en la célula a través de los canales de calcio activados por voltaje, aumentando la concentración de calcio intracelular ($[Ca]_i$). Las sondas sensibles al calcio se unen al calcio intracelular, aumentando la fluorescencia. Estos cambios se

correlacionan con la actividad neuronal y se miden mediante la combinación de un microscopio y una cámara (65).

5.3.1 Reactivos

| REACTIVO | REFERENCIA | CASA COMERCIAL |
|--|------------|----------------|
| Fluo-4, AM | F14201 | invitrogen |
| Pluronic | F127 | ROCHE |
| Sodium Chloride | S0520.1000 | SIGMA |
| Potassium chloride | P4504-500 | SIGMA |
| Calcium chloride dihydrate | C3881-500 | SIGMA |
| HEPES | H3375-250 | SIGMA |
| D-Mannitol | M4125 | SIGMA |
| Magnesium chloride hexahydrate | M2670 | SIGMA |
| D-(+)-Glucose | G8270 | SIGMA |
| Capsaicin | M2023 | SIGMA |
| Menthol | M2772 | SIGMA |
| Allyl isothiocyanate | 377430 | SIGMA |
| Ionomycin from <i>Streptomyces conglobatus</i> | I9657 | SIGMA |

Tabla 9: Referencias de los reactivos a utilizar para el análisis.

– Sonda Fluo-4:

La sonda Fluo-4 AM se encuentra en su forma acetoximetil éster (no fluorescente), cuyo enlace será escindido en el interior celular dando lugar a su forma libre Fluo-4 (fluorescencia verde). Además, este compuesto es un inhibidor de transportadores de aniones orgánicos, permitiendo reducir la pérdida de fluorescencia debida a la salida de la sonda hacia el exterior celular a través de dichos transportadores (63).

Una vez la sonda se introduce en el interior celular, las esterasas allí presentes producen su activación, permitiendo la unión a iones calcio y finalmente dan lugar a un incremento en la fluorescencia. La sonda molecular Fluo-4 presenta una longitud de onda de excitación de 494 nm y de emisión de 516 nm, además de elevada sensibilidad (66). De este modo, la adición de un modulador con actividad agonista produce la apertura del canal receptor y en consecuencia un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, provocando un aumento en la fluorescencia emitida por la sonda. Los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular producen variaciones en la intensidad de fluorescencia, permitiendo el estudio del paso de iones calcio a través del receptor.

– **Ácido plurónico:**

Es un tensioactivo soluble en agua capaz de disminuir la tensión interfacial, emulsionar sustancias insolubles en agua y formar asociaciones supramoleculares (micelas o vesículas) en soluciones acuosas que pueden atrapar diversos compuestos (67). Se ha demostrado que los plurónicos aumentan la permeabilidad de la membrana, por lo que se usó como permeabilizante de las células a la sonda Fluo-4.

5.3.2 Método

- 1) Preparar 1 litro de solución externa 1X:

| Reactivo | Concentración | Gramos |
|-------------------|---------------|--------|
| NaCl | 140 mM | 8,18 |
| KCl | 4 mM | 0,29 |
| CaCl ₂ | 2 mM | 0,29 |
| HEPES | 10 mM | 2,383 |
| Manitol | 20 mM | 3,64 |
| MgCl ₂ | 2 mM | 0,4 |
| Glucosa | 5 mM | 0,9 |

Tabla 10: Concentraciones y gramos de los reactivos empleados para preparar la solución externa, estos se disuelven en agua bidestilada.

- 2) Ajustar el pH de la solución a 7,4 con NaOH.
- 3) Preparar los reactivos que actuarán como estímulos, disueltos en la solución externa:

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final |
|------------|-----------------------|---------------------|
| Capsaicina | 50 mM | 1 μ M |
| AITC | 1M | 100 μ M |
| Mentol | 300 mM | 100 μ M |
| KCl | | 40 mM |
| Ionomicina | 10 mM | 10 μ M |

Tabla 11: concentraciones de los reactivos de análisis pre-disueltos en DMSO.

- 4) Quitar el medio del pocillo.
- 5) Se añade 1mL de solución externa 1X + 3 μ L de ácido plurónico al 20% en DMSO + 3 μ L de Fluo-4 a 2 μ M. Se añade 500 μ L por pocillo.
- 6) Dejar actuar durante una hora en el incubador a 37°C, 5% CO₂ y 95% aire humidificado.
- 7) Lavamos con la solución externa y dejamos actuar durante 20 minutos en el incubador. La sonda se puede reutilizar una vez. Se retira del pocillo y se coloca en otro.

- 8) Colocar el cristal en una placa petri con solución externa. Cuidado con no rasgar el cristal o con que le dé la luz.
- 9) La medición se lleva a cabo mediante un microscopio de fluorescencia que lleva una cámara incorporada.
- 10) Abrir el programa *HCIImage* y seleccionar las áreas de interés (ROI), cada ROI representa a una célula.
- 11) Medir los estímulos con el programa *HCIImage* según los tiempos de la *Figura 11* dejando actuar al estímulo 30 segundos y lavando con la solución externa durante el tiempo indicado en la *Figura 8*:

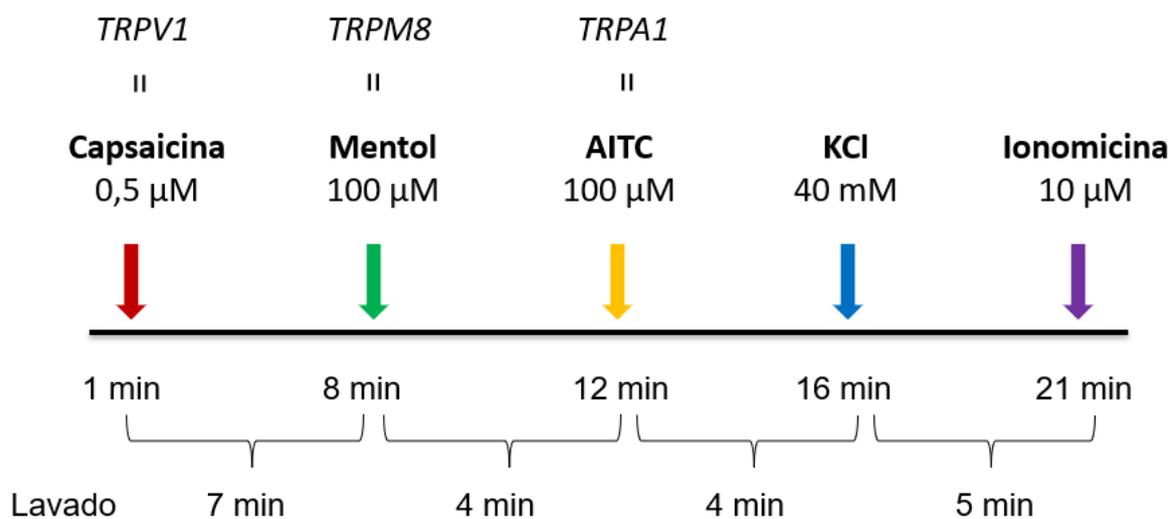


Figura 8: Estímulos aplicados durante el ensayo de calcio. Se indica el minuto en el que se da el estímulo, el estímulo aplicado, la concentración, el canal estimulado y el tiempo de lavado con la solución externa.

5.4 Análisis estadístico

Las imágenes morfológicas se editaron mediante el programa de edición ImageJ, con el que se aumentó el contraste y calidad de las fotografías.

Las mediciones de intensidad de fluorescencia cada 0,3 segundos se analizaron primeramente en Excel y posteriormente se transfirieron a GraphPad Prism para realizar el análisis estadístico y su representación gráfica.

La funcionalidad de cada neurona se evaluó de forma cuantitativa, determinando la apertura parcial o no apertura del canal tras la adición del agonista, en comparación con la línea de base antes de la inyección. Al final de cada experimento se aplicó ionicina para obtener niveles

de $[Ca^{2+}]_i$ saturados tomados como F_{max} , con la que normalizamos la fluorescencia como una relación F/F_{max} .

La significancia estadística entre los tratamientos y controles se determinó mediante la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, se trata de una prueba no paramétrica para comparar el rango medio de dos muestras relacionadas y determinar si existen diferencias entre ellas. Se utiliza como alternativa a la prueba *t de Student* cuando no se puede suponer la normalidad de dichas muestras (68).

Para aquellos resultados del mismo grupo en los que se quisiera comprobar la significancia estadística entre ellos, se empleó la prueba Kruskal-Wallis (versión no paramétrica de ANOVA), la cual compara tres o más grupos no emparejados, y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn, que compara la diferencia de la suma de rangos entre dos columnas con la diferencia media esperada (basada en el número de grupos y su tamaño) (69).

Todos los valores se reportan cómo *media ± SEM*. Los valores $P < 0,05$ se consideraron significativos.

6 Resultados

En este apartado se van a exponer los resultados obtenidos desde dos aproximaciones, una morfológica y otra funcional.

6.1 Morfología

A continuación, se muestran las diferencias morfológicas entre los grupos control sin diferenciar y los grupos diferenciados mediante dos tratamientos distintos.

Pasados dos días con el medio de diferenciación, se procedió a su renovación y se tomaron fotografías en el microscopio óptico para evaluar las diferencias morfológicas, estas se muestran en la *Figura 9*:

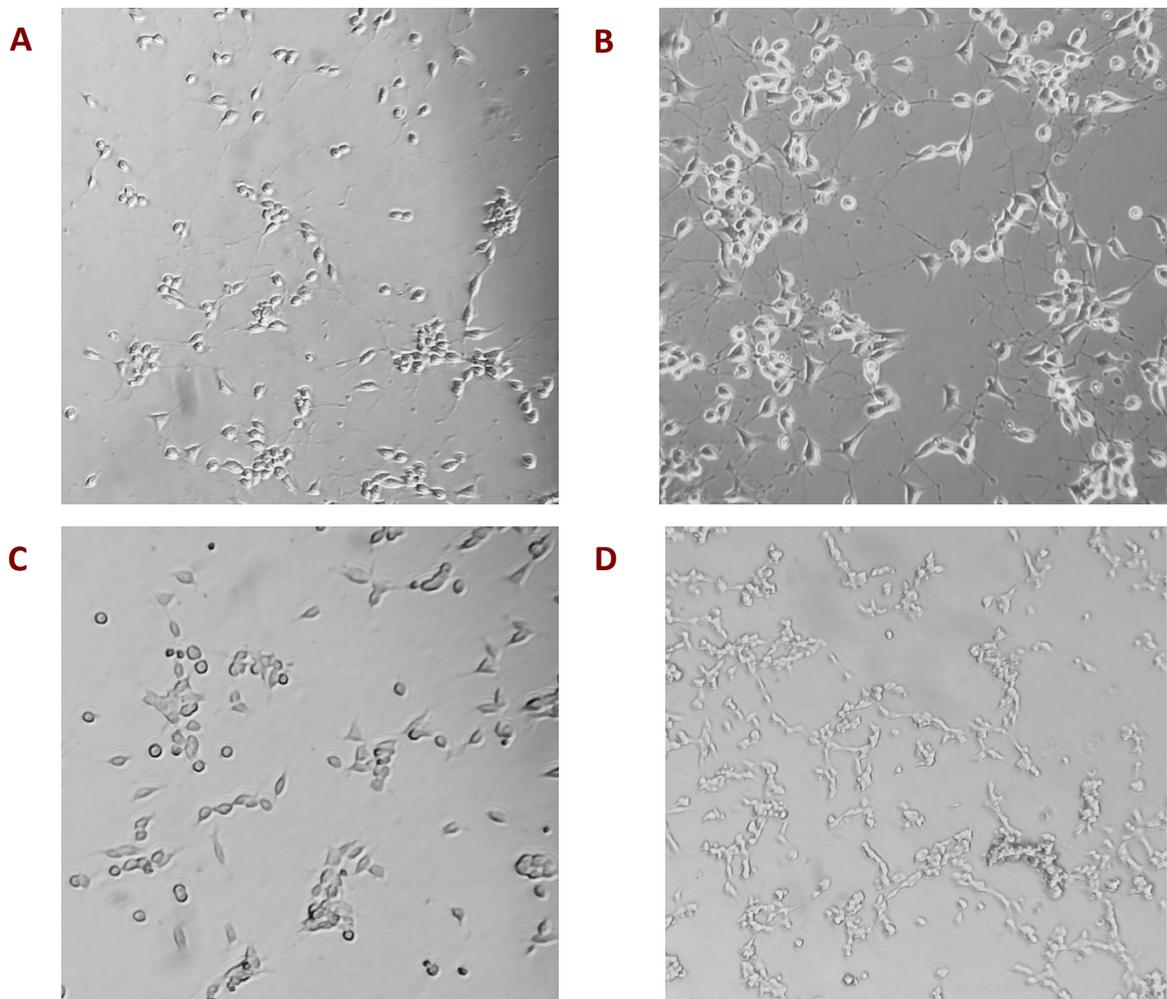


Figura 9: Morfología de la línea celular SH-SY5Y-VR1 vista a microscopio óptico 10X tras 2 días. **(A)** Tratamiento A, Forskolina y dB-cAMP. **(B)** Tratamiento B, Forskolina, dB-cAMP y Ácido Retinoico. **(C)** Control del tratamiento A, sin diferenciar al 0,30% DMSO. **(D)** Control del tratamiento B, sin diferenciar al 0,35% DMSO.

Tras dos días en medio de diferenciación, las células tratadas comienzan a desarrollar proyecciones y a establecer conexiones (*Figura 9*). Esto sobre todo se aprecia en las tratadas con AR (Tratamiento B).

A los cinco días, se tomaron imágenes de las células cargadas con sonda de calcio fluorescente, utilizando un microscopio de fluorescencia. En la *Figura 10* se muestran las diferencias morfológicas entre los tratamientos A y B, mientras que en la *Figura 11* se muestran las diferencias entre los controles A y B.

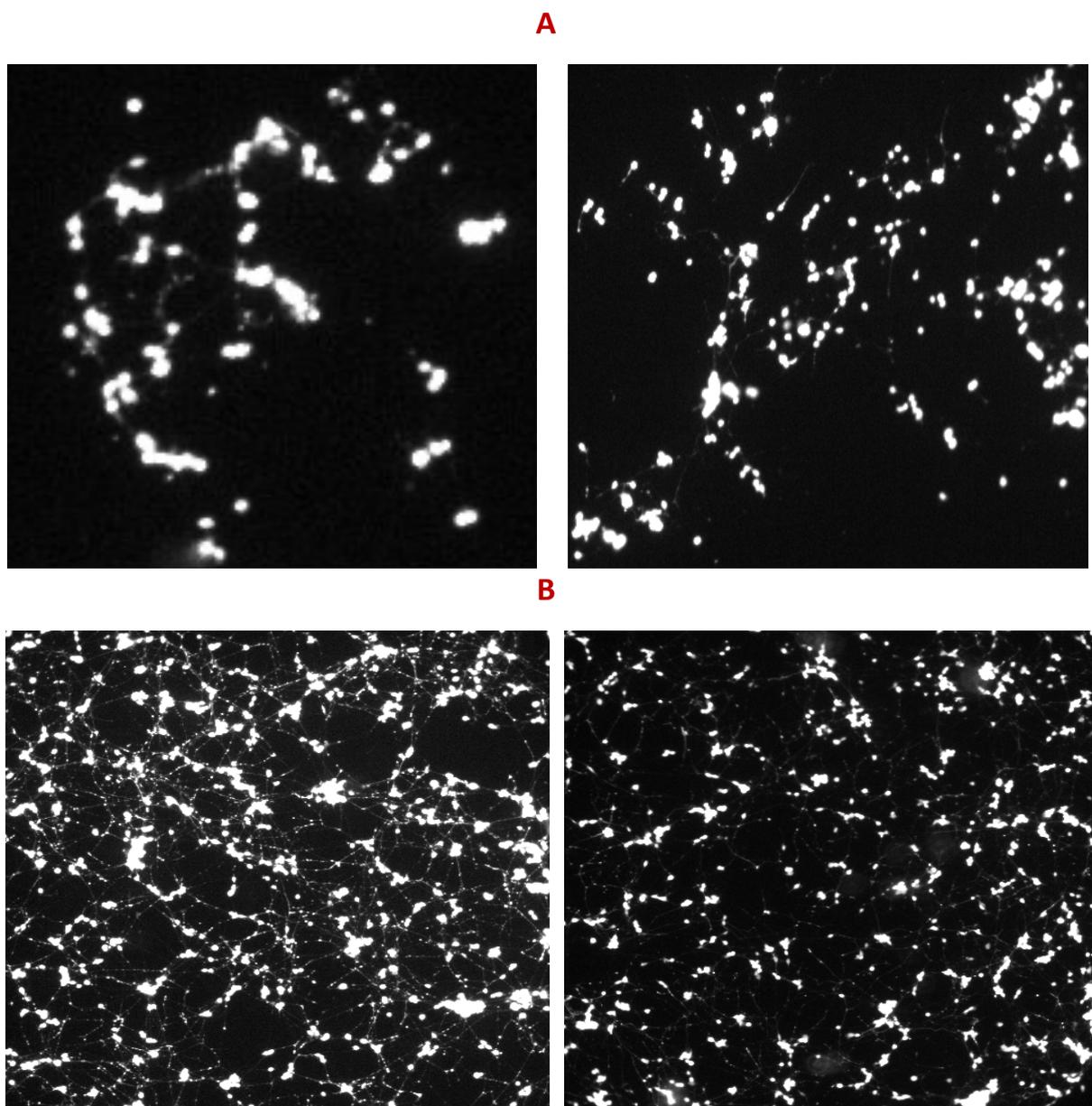


Figura 10: Morfología de la línea celular SH-SY5Y-VR1 vista a microscopio de fluorescencia 10X tras aplicar distintos tratamientos durante 5 días. **(A)** Tratamiento A, Forskolina y dB-cAMP. **(B)** Tratamiento B, Forskolina, dB-cAMP y Ácido retinoico.

Las células alcanzaron una gran diferenciación morfológica transcurridos cinco días en AR (Tratamiento B), y una moderada diferenciación en el caso de las tratadas solo con Forskolina y dB-cAMP (Tratamiento A) (*Figura 10*). También se aprecia una mayor confluencia en el Tratamiento B.

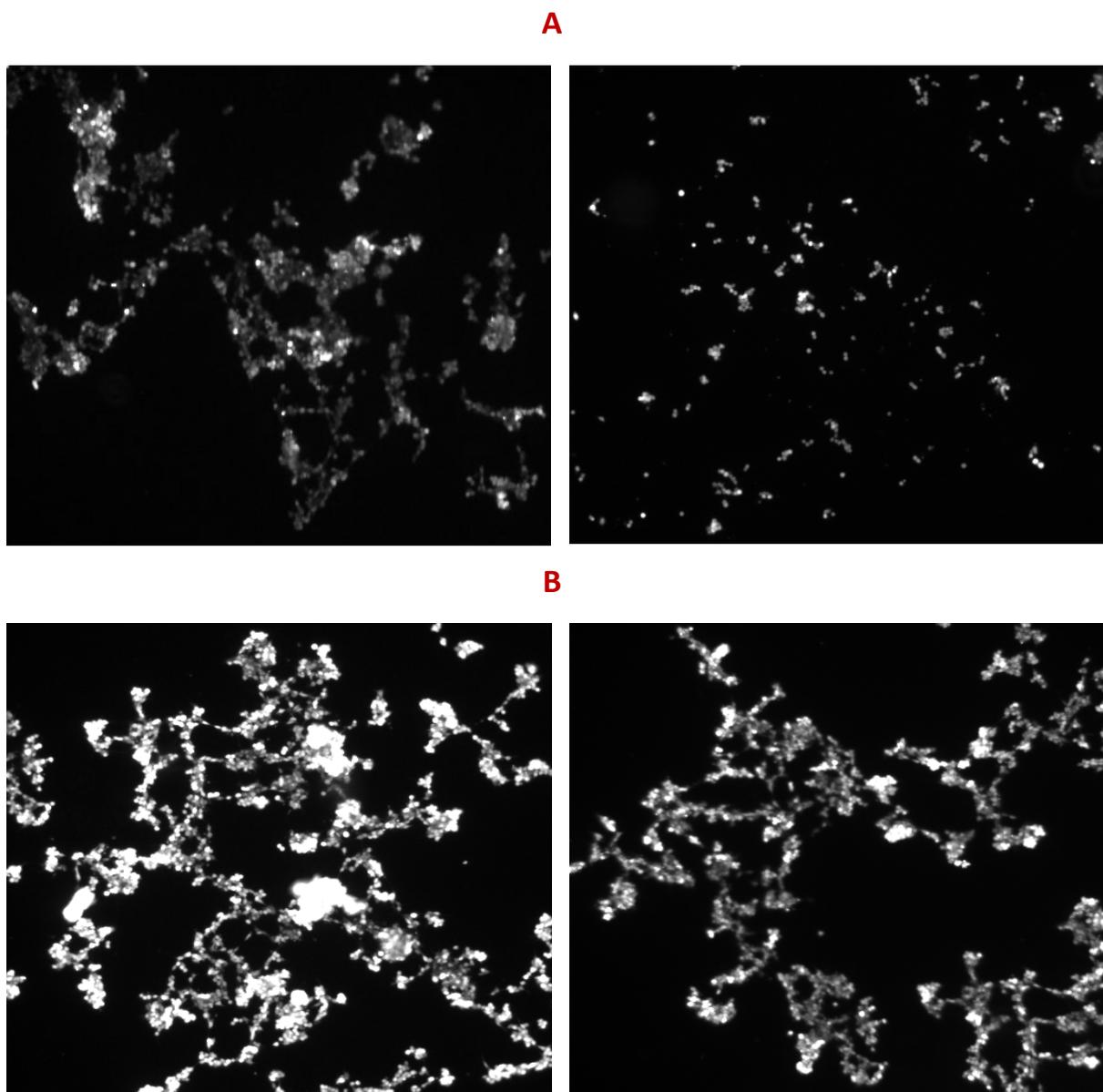


Figura 11: Morfología de la línea celular SH-SY5Y-VR1 vista a microscopio de fluorescencia 10X tras aplicar distintos tratamientos durante 5 días. **(A)** Control del tratamiento A, sin diferenciar al 0,30% DMSO. **(B)** Control del tratamiento B, sin diferenciar al 0,35% DMSO.

Pasados 5 días, las células control comenzaron a formar acumulaciones y no se aprecian prolongaciones (*Figura 11*). Al igual que en los tratamientos, el control A muestra una menor confluencia.

6.2 Funcionalidad

En este apartado se detallan los resultados obtenidos mediante imagen de calcio. Se exponen las intensidades de fluorescencia de cinco experimentos aislados, por condición experimental.

En la *Figura 12*, se representan registros representativos de las intensidades de la fluorescencia.

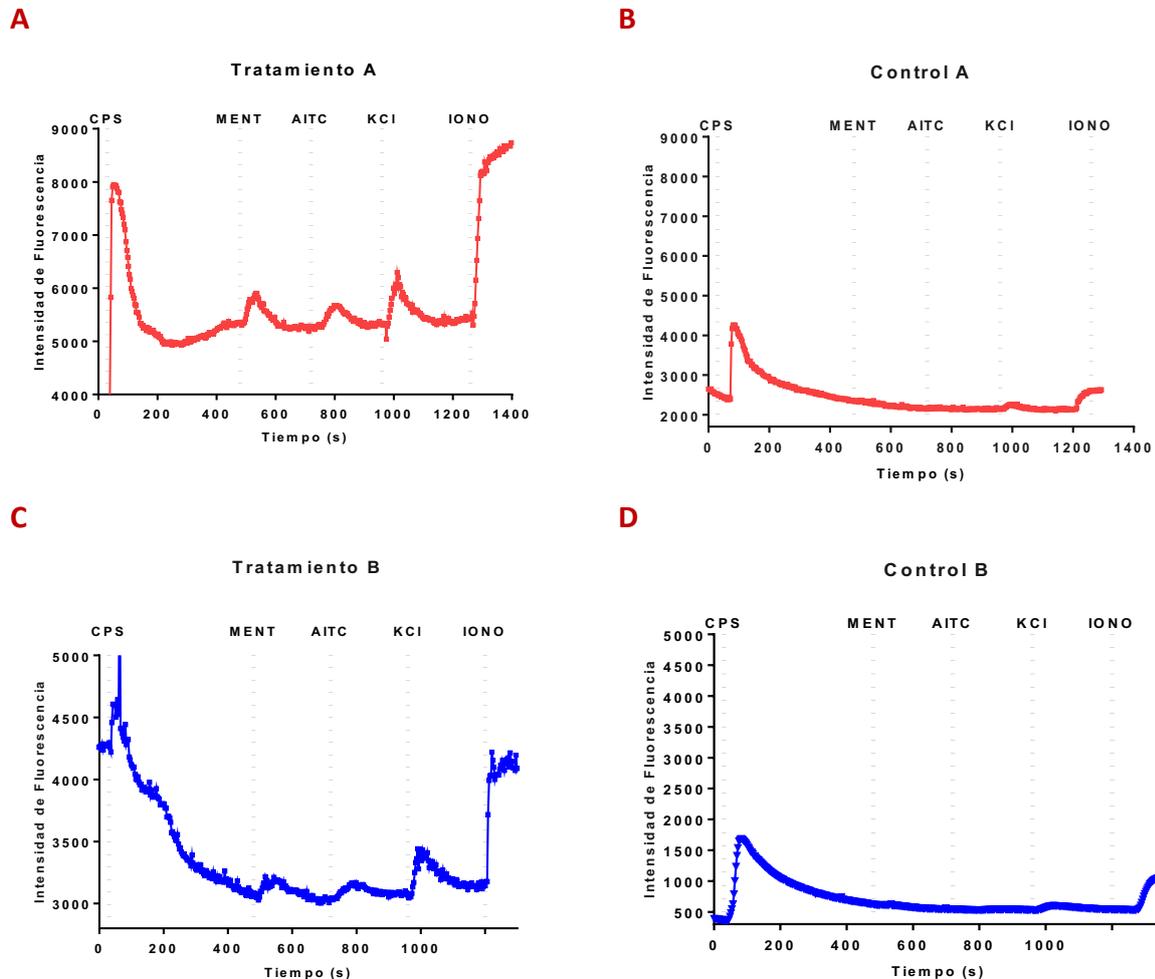


Figura 12: Registros representativos de los cambios en la intensidad de fluorescencia ante cada estímulo por condición experimental. **(A)** Tratamiento A. **(B)** Control del Tratamiento A. **(C)** Tratamiento B. **(D)** Control del Tratamiento B.

Se aprecia que en todos grupos las células respondieron ante capsaicina, ya que poseen el canal *TRPV1*, ante KCl, puesto que las células cancerosas suelen responder a estímulos de K^+ (70), y también ante ionomicina, que es el control positivo. Por otro lado, en el caso de las tratadas, se observan los picos de fluorescencia intermedios correspondientes a mentol y AITC.

Para establecer la significancia de los resultados, se analizaron los datos normalizados como F/F_{max} , siendo F_{max} la saturación máxima de $[Ca^{2+}]_i$ ante ionomicina. Se consideraron significativos aquellos datos con $P < 0,05$.

La *Figura 13*, muestra la respuesta ante cada estímulo de cada condición experimental, representado como intensidad de fluorescencia.

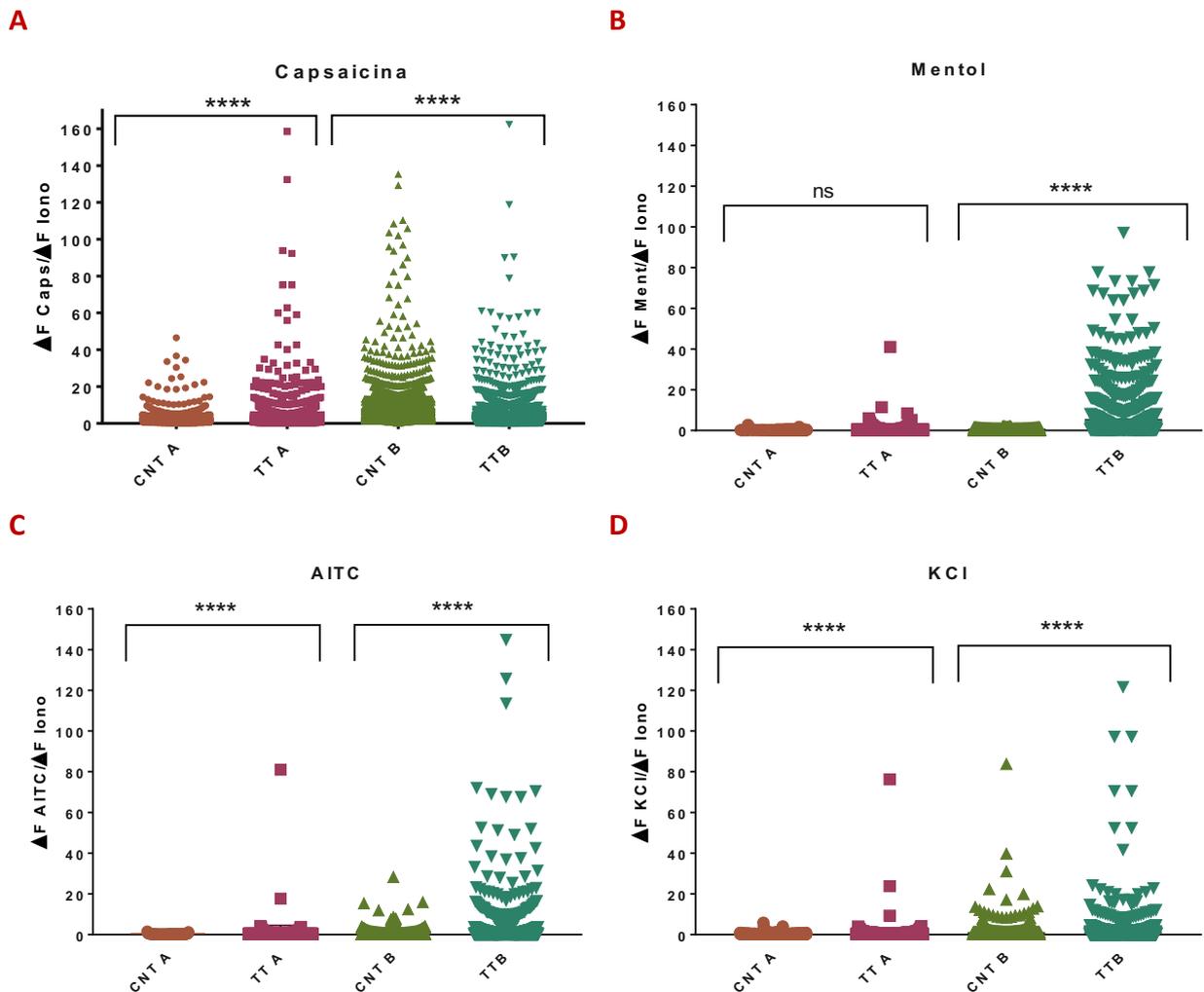


Figura 13: Comparación de la Intensidad de fluorescencia máxima, entre el control y el tratamiento, alcanzada ante cada estímulo. Los datos están normalizados mediante F/F_{max} y se muestran como media \pm SEM. **(A)** Capsaicina, $P > 0,0001$: $2,193 \pm 0,05847$ (CNT A), $3,949 \pm 0,2364$ (TT A), $9,878 \pm 0,4824$ (CNT B) y $4,254 \pm 0,2363$ (TT B). **(B)** Mentol, $P > 0,2490$ y $P > 0,0001$: $0,2793 \pm 0,006898$ (CNT A), $0,4558 \pm 0,0525$ (TT A), $0,4631 \pm 0,008734$ (CNT B) y $5,241 \pm 0,3196$ (TT B). **(C)** AITC, $P > 0,0001$: $0,2315 \pm 0,01883$ (CNT A), $0,6335 \pm 0,1759$ (TT A), $0,7106 \pm 0,06214$ (CNT B) y $2,831 \pm 0,2926$ (TT B). **(D)** KCl, $P > 0,0001$: $0,3183 \pm 0,01294$ (CNT A), $0,4422 \pm 0,06003$ (TT A), $0,7586 \pm 0,05244$ (CNT B) y $1,079 \pm 0,1397$ (TT B). Analizado mediante two-sided Wilcoxon rank-sum test, $n = 1300 - 2800$ células, en 5 experimentos aislados.

Las células que recibieron el Tratamiento B muestran una clara superioridad de intensidad de fluorescencia ante todos los estímulos. Siendo especialmente relevante la respuesta ante la apertura del canal *TRPM8* activado por mentol ($5,241 \pm 0,3196$ TT B; $0,4631 \pm 0,008734$ CNT B) y ante el canal *TRPA1* activado por AITC ($2,831 \pm 0,2926$ TT B; $0,7106 \pm 0,06214$ CNT B).

Además, se aprecia que el tratamiento disminuye el efecto del vehículo sobre la respuesta a capsaicina ($9,878 \pm 0,4824$ CNT B y $4,254 \pm 0,2363$ (TT B).

En la *Figura 14*, se muestra la comparativa de los cambios de intensidad, ante los estímulos, de cada tratamiento.

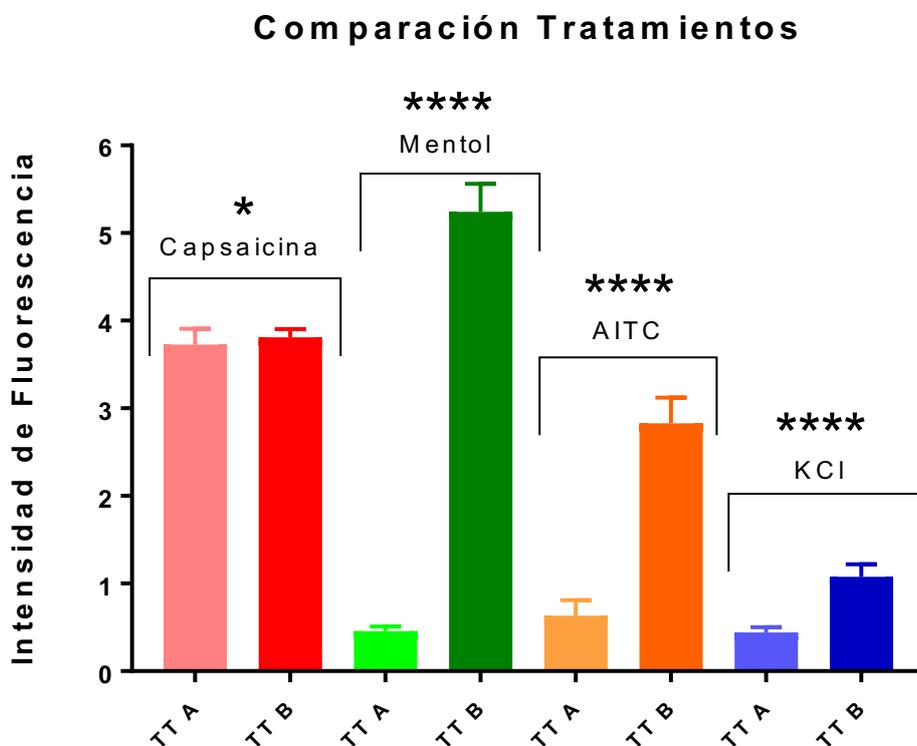


Figura 14: Comparación de la Intensidad de fluorescencia máxima, entre los tratamientos, alcanzada ante cada estímulo. Los datos están normalizados mediante F/F_{max} y se muestran como media \pm SEM. Tratamiento A (TT A) y Tratamiento B (TT B). Analizado mediante two-sided Wilcoxon rank-sum test.

Los resultados refuerzan lo mostrado en la *Figura 13*, verificando una mayor intensidad de fluorescencia y, por tanto, de respuesta en el Tratamiento B.

Para comprobar si existían diferencias en el número de células que respondían ante cada estímulo, entre los grupos tratados y los sin tratar, se calcularon los porcentajes de células que mostraban respuesta, considerando la respuesta a ionomicina como el 100% de células. Estos resultados se muestran en la *Figura 15*.

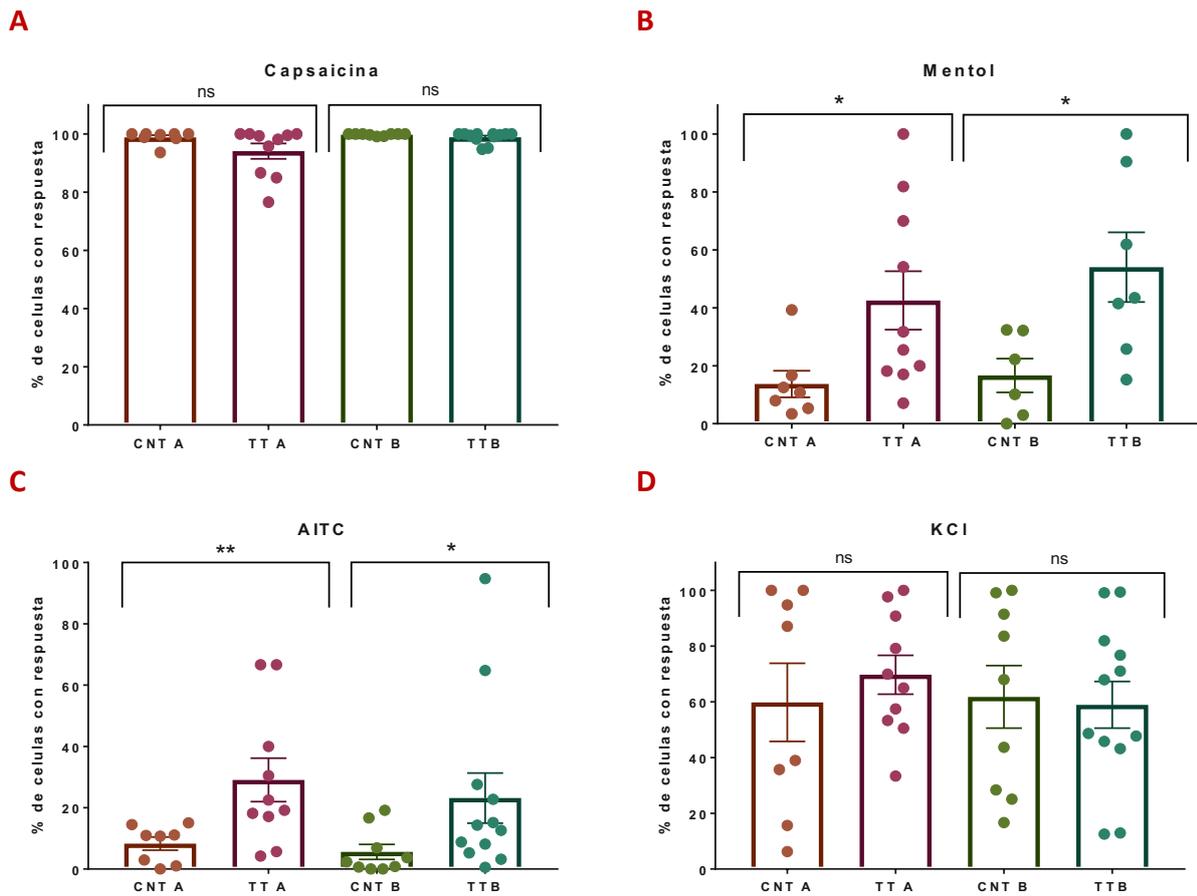


Figura 15: Porcentaje de células que responden ante cada estímulo. Se consideró como respuesta a toda célula que al ser normalizada diera un valor superior a 0,1 de fluorescencia frente al estímulo y que además respondiera a ionomicina. Todos los valores se muestran como porcentaje y como media \pm SEM. **(A)** Capsaicina, $P=0,2219$ y $P=0,3727$: $98,85 \pm 0,7708$ (CNT A), $94,11 \pm 2,637$ (TT A), $99,78 \pm 0,1209$ (CNT B) y $98,89 \pm 0,5472$ (TT B). **(B)** Mentol, $P= 0,0136$ y $P= 0,0221$: $13,7 \pm 4,585$ (CNT A), $42,56 \pm 10,09$ (TT A), $16,64 \pm 5,843$ (CNT B) y $54,04 \pm 12,03$ (TT B). **(C)** AITC, $P= 0,0062$ y $P= 0,0330$: $8,287 \pm 2,137$ (CNT A), $29,07 \pm 7,084$ (TT A), $5,583 \pm 2,452$ (CNT B) y $23,15 \pm 8,161$ (TT B). **(D)** KCl, $P= 0,7610$ y $P= 0,7544$: $59,81 \pm 14,04$ (CNT A), $69,73 \pm 6,964$ (TT A), $61,77 \pm 11,23$ (CNT B) y $58,92 \pm 8,368$ (TT B). Analizado mediante two-sided Wilcoxon rank-sum test, $n=10$ cristales aproximadamente, en 5 experimentos aislados.

La estimulación con capsaicina dio lugar a una elevación medible del calcio en el 100% de las células, y también el KCl resultó en un pico de calcio en más del 50% de las células. El número de células que respondieron también se incrementó ante mentol, obteniendo un $42,56 \pm 10,09\%$ en el caso del Tratamiento A y un $54,04 \pm 12,03\%$ en el caso del Tratamiento B. Atendiendo al AITC, respondieron un $29,07 \pm 7,084\%$ de las células en el caso del Tratamiento A y un $23,15 \pm 8,161\%$ en el caso del Tratamiento B. Estos valores concuerdan con los obtenidos en el incremento de la intensidad de fluorescencia.

En un primer planteamiento del procedimiento experimental, se determinaron los mismos tratamientos, pero sólo se planteó un control. Este consistía en las células sin diferenciar con el medio de mantenimiento. Posteriormente se modificó el protocolo, incluyendo como vehículo el porcentaje de DMSO de cada tratamiento para determinar si tenía algún efecto en el cultivo.

En la *Figura 16* se representan las intensidades de fluorescencia de los tres controles utilizados durante este trabajo, para comprobar si existen diferencias significativas producidas por el DMSO.

Comparación Controles

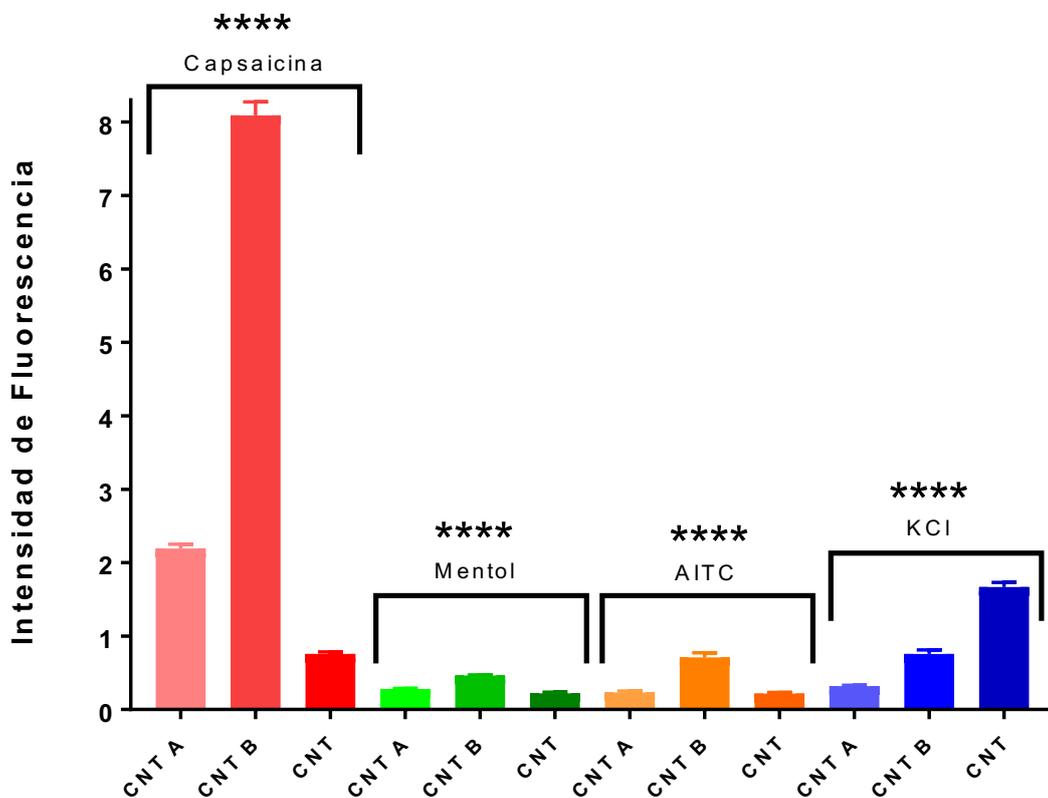


Figura 16: Comparación de la Intensidad de fluorescencia entre los controles alcanzada ante cada estímulo. Los datos están normalizados mediante F/F_{max} y se muestran como media \pm SEM. Analizado mediante Kruskal-Wallis test.

El análisis estadístico muestra que existe mayor respuesta en los controles del Tratamiento B, es decir, en aquellos que contenían mayor porcentaje de DMSO.

En el próximo apartado se procederá a la discusión de todos los resultados mostrados.

7 Discusión

En el presente trabajo, se ha pretendido conseguir una diferenciación neuronal desde dos aproximaciones, una morfológica, observando las diferencias mostradas a nivel visual en los cultivos, y otra funcional, mediante un ensayo de calcio.

A continuación, se van a discutir por separado los resultados obtenidos en cada uno de estos dos planteamientos.

7.1 Diferencias morfológicas

Las células de neuroblastoma SH-SY5Y-VR1 indiferenciadas (*Figuras 9. C, D y 11*) proliferan rápidamente, exhiben un fenotipo plano, crecen en grupos y no se ramifican (71,72), mientras que las células diferenciadas (*Figuras 9. A, B y 10*) tienen múltiples sinapsis que las conectan a las células circundantes (6,73), presentan axones largos y ramificados, disminuyen su proliferación y en algunos casos se polarizan (71,74).

Después de 2 días, las células SH-SY5Y-VR1 diferenciadas comienzan a formar proyecciones más largas (*Figura 9. A, B*). Esto se evidencia por la expansión de ramificaciones finas que generalmente están conectadas a las células vecinas (24). Tras 5 días, las células diferenciadas comienzan a desarrollar proyecciones más largas y muestran un fenotipo más neuronal (*Figura 10*). En el caso de la diferenciación inducida por AR (Tratamiento B) (*Figura 10. B*), se observa esta formación de neuritas cuya longitud aumenta con el tiempo de exposición (75).

Se emplearon tres compuestos para la diferenciación: Ácido retinoico, dB-cAMP y forskolina. Puesto que el Ácido retinoico es tóxico, unas se trataron tan solo con dB-cAMP y forskolina (Tratamiento A) y otras con los 3 compuestos (Tratamiento B), con el fin de observar diferencias y estudiar si el AR era prescindible.

El dB-cAMP es un análogo del AMPc permeable a la membrana celular. La forskolina es un diterpeno que activa la enzima adenilato ciclasa, induciendo una mayor generación de AMPc intracelular. El ácido retinoico activa el receptor β_2 , regulando la transcripción de los genes neuronales (76).

Se ha demostrado que un aumento del AMPc intracelular estabiliza diferentes factores de transcripción, aumenta la longitud de las neuritas e induce cambios morfológicos en las células, dando lugar a características neuronales (77).

Se ha demostrado también que la adición de AR induce la diferenciación celular a través de una serie de mecanismos, como la detención de la progresión del ciclo celular fuera de G0/G1, el aumento de la expresión de los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclinas (CDK) p21 y p27^{Kip1} y de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL, así como el aumento de la actividad PI3K/AKT, que desempeña un papel en el desarrollo y la diferenciación de las neuritas (78). Si comparamos la diferenciación con y sin AR (*Figura 10*), observamos que las tratadas con AR (Tratamiento B) muestran un mejor fenotipo neuronal.

La mayoría de los protocolos de diferenciación para la línea celular SH-SY5Y implican el uso de AR como factor de diferenciación, y esta se realiza durante unos días (21,79–81). Después las células se consideran diferenciadas basándose principalmente en su morfología (75). Sin embargo, atendiendo únicamente a la morfología, no está claro si estas células diferenciadas, exhiben características fisiológicas de neurona, sin un análisis molecular detallado. Por lo que, a pesar del claro éxito alcanzado en la diferenciación atendiendo a los cambios fenotípicos, quisimos comprobar la funcionalidad de estas neuronas.

7.2 Diferencias funcionales o fisiológicas

En muchos estudios, solo se comprueban los cambios a nivel del genotipo mediante estudios de inmunofluorescencia, comprobando la presencia de genes propios de las neuronas (21,27,75,80–82). En este proyecto se ha pretendido comprobar la capacidad de las células diferenciadas de responder ante distintos estímulos, responsables de la apertura de canales de calcio, de una manera similar a como lo harían las neuronas maduras.

En los registros de los cambios en la intensidad de fluorescencia (*Figura 12*) se observa que tanto las células tratadas como los controles responden a capsaicina (agonista del canal *TRPV1*). Esto era de esperar ya que la línea celular SH-SY5Y-VR1 lleva incorporado este canal. También se observa cómo principalmente las células tratadas (*Figura 12.A y C*) son las que responden tanto a mentol (agonista del canal *TRPM8*) como a AITC (agonista del canal *TRPA1*), lo cual es indicativo de una diferenciación exitosa. Cabe destacar que las posibles respuestas de los

controles ante estos dos últimos compuestos estaban contempladas, ya que trabajamos con una línea celular de neuroblastoma con mucha capacidad mutagénica, lo que influye en que las respuestas no sean homogéneas ante todos los estímulos. Además, el Ca^{2+} está implicado en la inducción de la apoptosis y en la regulación de las vías de señalización apoptótica (83), por lo que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ registrado en alguna célula podría no deberse a una respuesta, sino a la apoptosis de ésta.

Además, la mayoría de las células respondieron a la adición de KCl (*Figura 12*). Los canales de K^+ están más activos en las células cancerosas (84). Estudios anteriores con esta línea celular ya habían demostrado que la adición de altas concentraciones de KCl provoca un cambio en potencial de membrana, que a su vez conduce a la apertura de los canales y la afluencia de Ca^{2+} , con el aumento resultante de la fluorescencia intracelular (70,85,86). Por lo que las respuestas ante KCl no pueden ser consideradas como indicativo de diferenciación, sino más como un control interno de que las células siguen vivas antes de la adición de la ionomicina.

Son especialmente relevantes los resultados de la *Figura 13*, que muestran la intensidad de fluorescencia máxima normalizada. Se puede ver claramente como hay una mayor intensidad de fluorescencia ante los estímulos en las células que recibieron el Tratamiento B, seguidas por las que recibieron el Tratamiento A. Una mayor intensidad de fluorescencia corresponde a un mayor incremento en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (87), lo que supone una mayor apertura del canal dependiente de calcio, indicando una mayor respuesta ante el estímulo. En las células SH-SY5Y, el tratamiento con AR ha demostrado tener efectos más directos en la transducción de señales (*Figura 14*), activando la PI3K y fosforilando rápidamente la Akt, además del incremento de ciertas proteínas y mARNs (29,88).

Aunque las intensidades de fluorescencia para mentol y AITC (*Figura 13. B y C*) tanto en el tratamiento A (mentol $0,4558 \pm 0,0525$ y AITC $0,6335 \pm 0,1759$) como en el B (mentol $5,241 \pm 0,3196$ y AITC $2,831 \pm 0,2926$) no varían mucho, habría que considerar que las pequeñas diferencias pueden deberse a que el mentol se administró después de estimular con capsaicina. Se ha estudiado que estos agonistas parecen presentar interacciones mutuas para los canales *TRPV1* y *TRPM8*, siendo la capsaicina inhibidor del *TRPM8* y el mentol del *TRPV1* (89).

Este patrón en las intensidades de fluorescencia también lo podemos ver reflejado en el porcentaje de células que responden ante cada estímulo (*Figura 15*). Obteniendo siempre

porcentajes mayores del 50% en los casos de la capsaicina y KCl (*Figura 15. A y D*), y también, porcentajes mayores ante el metol y el AITC (*Figura 15. B y C*) en las células tratadas frente a los controles.

Analizando la implicación del vehículo utilizado en los compuestos de diferenciación (DMSO) (*Figura 16*), se observa que los controles del Tratamiento B que contenían un 0,35% de DMSO, muestran más respuesta que los controles del Tratamiento A que contenían un 0,30% de DMSO o los controles sin DMSO. Este incremento en la fluorescencia podría deberse, como se ha mencionado antes, a que el DMSO es tóxico y podría estar induciendo la apoptosis, por lo que este aumento de fluorescencia podría deberse al aumento $[Ca^{2+}]_i$ por apoptosis (83). Además, el número de experimentos que se realizó con el control sin DMSO fue menor, lo que también contribuye a disminuir la significancia estadística.

8 Conclusiones y proyección futura

Por todo lo anteriormente explicado, se concluye que se ha establecido un protocolo útil para conseguir una diferenciación neuronal a partir de una línea celular de neuroblastoma, concretamente la línea celular SH-SY5Y-VR1. Este protocolo duraría una semana y requeriría la adición de los compuestos de diferenciación forskolina, dB-cAMP y ácido retinoico.

Los resultados de la imagen de calcio muestran que las neuronas obtenidas serían además capaces de responder a diferentes estímulos de un modo similar a como lo haría una neurona humana sana.

El compuesto DMSO, utilizado como vehículo, parece tener efectos en el incremento de fluorescencia, por lo que sería interesante comprobar el posible uso de otro solvente, como el etanol, teniendo en cuenta la posible activación de *TRPM8* por este, o H₂O.

También habría que estudiar si estas neuronas diferenciadas son capaces de producir potenciales de acción de manera independiente al soma. Esto se comprobaría mediante cámaras microfluídicas (MFC) acopladas a un sistema de MEA (Microelectrode array) que separaran los axones del soma y permitiría ver si estos serían capaces de propagar el potencial de acción hasta el soma. También se requerirían ensayos de inmunohistoquímica para comprobar si las células diferenciadas expresan genes propios de neuronas sanas.

Como se mencionó al principio del trabajo, la proyección final de este es crear un modelo *in-vitro* de piel humana inervada, por ahora, se podría afirmar que se ha conseguido establecer el camino a seguir para lograr el modelo de neurona que permita llegar a este fin último.

9 Bibliografía

1. Sreedhar D, Manjula N, Pise A, Pise S, Ligade VS. Ban of cosmetic testing on animals: A brief overview. *Int J Curr Res Rev.* 2020;12(14):113–6.
2. Ciasullo R, Simone C, Conti ME. XXVII CONGRESSO NAZIONALE DI SCIENZE MERCEOLOGICHE. 2016. 95–97 p.
3. Wang Y, Zhao Y, Song F. The Ethical Issues of Animal Testing in Cosmetics Industry. *Humanit Soc Sci.* 2020;8(4):112.
4. Sinchilo EI. Animal law. *Natl Res Univ High Sch Econ* [Internet]. 2020;1:1–95. Available from: <https://pravo.hse.ru/legalst/lslaw/animallaw/>
5. Löwa A, Jevtić M, Gorreja F, Hedtrich S. Alternatives to animal testing in basic and preclinical research of atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2018;27(5):476–83.
6. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J Vis Exp.* 2016;2016(108):1–11.
7. Tukker AM, Wijnolts FMJ, de Groot A, Westerink RHS. Human iPSC-derived neuronal models for in vitro neurotoxicity assessment. *Neurotoxicology.* 2018 Jul 1;67:215–25.
8. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics.* 2009 Mar;8(3):443–50.
9. Alge CS, Hauck SM, Priglinger SG, Kampik A, Ueffing M. Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *J Proteome Res.* 2006 Apr;5(4):862–78.
10. Stansley B, Post J, Hensley K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer’s disease. *Am J Neuroinflammation* [Internet]. 2012;9(1):13–8. Available from: <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/115>
11. Verpelli C, Carlessi L, Bechi G, Fusar Poli E, Orellana D, Heise C, et al. Comparative Neuronal Differentiation of Self-Renewing Neural Progenitor Cell Lines Obtained from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2013;7:175. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00175>
12. Dhara SK, Stice SL. Neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Cell Biochem.* 2008;105(3):633–40.

13. Induced Pluripotent Stem Cell Differentiation Protocols [Internet]. [cited 2021 Jun 19]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/stem-cell-culture/ipsc-differentiation>
14. Tong Z Bin, Hogberg H, Kuo D, Sakamuru S, Xia M, Smirnova L, et al. Characterization of three human cell line models for high-throughput neuronal cytotoxicity screening. *J Appl Toxicol*. 2017;37(2):167–80.
15. Lopes FM, Bristot IJ, da Motta LL, Parsons RB, Klamt F. Mimicking Parkinson’s Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In Vitro Models. *NeuroMolecular Med* [Internet]. 2017;19(2):241–55. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12017-017-8454-x>
16. Ferrari E, Cardinale A, Picconi B, Gardoni F. From cell lines to pluripotent stem cells for modelling Parkinson’s Disease. *J Neurosci Methods* [Internet]. 2020;340(April):108741. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108741>
17. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson’s disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2017;12(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>
18. Hartung T, Hogberg HT, Leist M, Pamies D, Smirnova L. Advanced Cell Techniques to Study Developmental Neurobiology and Toxicology. *Neural Cell Biol*. 2017;(December):187–217.
19. Wiatrak B, Kubis-Kubiak A, Piwowar A, Barg E. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells*. 2020 Apr;9(4).
20. Hu R, Cao Q, Sun Z, Chen J, Zheng Q, Xiao F. A novel method of neural differentiation of PC12 cells by using Opti-MEM as a basic induction medium. *Int J Mol Med*. 2018 Jan;41(1):195–201.
21. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp*. 2016 Feb;(108):53193.
22. Ko KR, Tam NW, Teixeira AG, Frampton JP. SH-SY5Y and LUHMES cells display differential sensitivity to MPP+, tunicamycin, and epoxomicin in 2D and 3D cell culture. *Biotechnol Prog*. 2020;36(2).
23. Dacarro G, Pallavicini P, Bertani SM, Chirico G, D’Alfonso L, Falqui A, et al. Synthesis of reduced-size gold nanostars and internalization in SH-SY5Y cells. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2017;505:1055–64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979717307671>
24. Constantinescu R, Constantinescu AT, Reichmann H, Janetzky B. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm Suppl*. 2007;(72):17–28.
25. Spitzer NC. Electrical activity in early neuronal development. *Nature*. 2006;444(7120):707–12.

26. Agholme L, Lindström T, Kgedal K, Marcusson J, Hallbeck M. An in vitro model for neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimer's Dis.* 2010;20(4):1069–82.
27. Ducray AD, Wiedmer L, Herren F, Widmer HR, Mevissen M. Quantitative characterization of phenotypical markers after differentiation of SH-SY5Y cells. *CNS Neurol Disord - Drug Targets.* 2020;19:1–12.
28. Yoon SB, Lee G, Park SB, Cho H, Lee JO, Koh B. Properties of differentiated SH-SY5Y grown on carbon-based materials. *RSC Adv.* 2020;10(33):19382–9.
29. López-Carballo G, Moreno L, Masiá S, Pérez P, Baretino D. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 2002;277(28):25297–304.
30. Sharow KA, Temkin B, Asson-Batres MA. Retinoic acid stability in stem cell cultures. *Int J Dev Biol.* 2012;56(4):273–8.
31. Schierwagen A. Neuronal Morphology: Shape Characteristics and Models. *Neurophysiology.* 2008;40(4):310–5.
32. 35.1 Neurons and Glial Cells - Biology | OpenStax [Internet]. [cited 2021 Jun 16]. Available from: <https://openstax.org/books/biology/pages/35-1-neurons-and-glial-cells>
33. 9.1 Signaling Molecules and Cellular Receptors - Biology | OpenStax [Internet]. [cited 2021 Jun 16]. Available from: <https://openstax.org/books/biology/pages/9-1-signaling-molecules-and-cellular-receptors>
34. Lafer EM. Synaptic Vesicle Recycling. In: Lajtha A, Reith MEA, editors. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Membranes and Transport* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2007. p. 423–37. Available from: https://doi.org/10.1007/978-0-387-30380-2_21
35. Moutaux E, Charlot B, Genoux A, Saudou F, Cazorla M. An integrated microfluidic/microelectrode array for the study of activity-dependent intracellular dynamics in neuronal networks. *Lab Chip.* 2018;18(22):3425–35.
36. Simms BA, Zamponi GW. Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron* [Internet]. 2014;82(1):24–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>
37. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell.* 2007 Dec;131(6):1047–58.
38. Frolov R V., Weckström M. Harnessing the Flow of Excitation: TRP, Voltage-Gated Na⁺, and Voltage-Gated Ca²⁺ Channels in Contemporary Medicine. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2016;103:25–95.

39. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 2011;12(3).
40. McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature.* 2002;416(6876):52–8.
41. Mergler S, Garreis F, Sahlmüller M, Reinach PS, Paulsen F, Pleyer U. Thermosensitive transient receptor potential channels in human corneal epithelial cells. *J Cell Physiol.* 2011;226(7):1828–42.
42. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell.* 2002;108(5):705–15.
43. Fernández-Carvajal A, Fernández-Ballester G, Devesa I, González-Ros JM, Ferrer-Montiel A. New strategies to develop novel pain therapies: Addressing thermoreceptors from different points of view. *Pharmaceuticals.* 2011;5(1):16–48.
44. Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP. Sensory TRP Channels: The Key Transducers of Nociception and Pain. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;131(1):73–118.
45. Alexander. Transient receptor potential (TRP) cation channels. *Br J Pharmacol.* 2009;158:148–55.
46. Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov [Internet].* 2011;10(8):601–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3456>
47. Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ, Roufogalis BD. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV 1 ion channels. *Cell Calcium.* 2004;35(5):471–8.
48. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997;389(6653):816–24.
49. EL Andaloussi-Lilja J, Lundqvist J, Forsby A. TRPV1 expression and activity during retinoic acid-induced neuronal differentiation. *Neurochem Int.* 2009;55(8):768–74.
50. Hojland CR, Andersen HH, Poulsen JN, Arendt-Nielsen L, Gazerani P. A human surrogate model of itch utilizing the TRPA1 agonist trans-cinnamaldehyde. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(7):798–803.
51. Wolfgang B, Liedtke, MD PD. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. 2007.
52. Legrand C, Merlini JM, De Senarclens-Bezençon C, Michlig S. Ankyrin 1 (TRPA1) channel. 2020;10:11238. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68013-2>

53. Brône B, Peeters PJ, Marrannes R, Mercken M, Nuydens R, Meert T, et al. Tear gasses CN, CR, and CS are potent activators of the human TRPA1 receptor. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;231(2):150–6.
54. Ryckmans T, Aubdool AA, Bodkin J V, Cox P, Brain SD, Dupont T, et al. Design and pharmacological evaluation of PF-4840154, a non-electrophilic reference agonist of the TrpA1 channel. 2011;
55. Andersen HH, Olsen R V., Møller HG, Eskelund PW, Gazerani P, Arendt-Nielsen L. A review of topical high-concentration L-menthol as a translational model of cold allodynia and hyperalgesia. *Eur J Pain (United Kingdom).* 2014;18(3):315–25.
56. Olsen R V., Andersen HH, Møller HG, Eskelund PW, Arendt-Nielsen L. Somatosensory and vasomotor manifestations of individual and combined stimulation of TRPM8 and TRPA1 using topical L-menthol and trans-cinnamaldehyde in healthy volunteers. *Eur J Pain (United Kingdom).* 2014;18(9):1333–42.
57. Gava NR, Davis C, Lehto SG, Rao S, Wang W, Zhu DXD. Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels are involved in body temperature regulation. *Mol Pain.* 2012 May;8:36.
58. Philippaert K, Vennekens R. Chapter 19 - Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels in Diabetes. In: Szallasi ABT-TRPC as TT, editor. Boston: Academic Press; 2015. p. 343–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124200241000199>
59. Werkheiser JL, Rawls SM, Cowan A. Mu and kappa opioid receptor agonists antagonize icilin-induced wet-dog shaking in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;547(1–3):101–5.
60. Galeotti N, Di Cesare Mannelli L, Mazzanti G, Bartolini A, Ghelardini C. Menthol: A natural analgesic compound. *Neurosci Lett.* 2002;322(3):145–8.
61. Tsantoulas C, Farmer C, Machado P, Baba K, McMahon SB, Raouf R. Probing functional properties of nociceptive axons using a microfluidic culture system. *PLoS One.* 2013;8(11):1–17.
62. Agarwal S, Krishnamurthy K. Histology, Skin. In *Treasure Island (FL)*; 2020.
63. Fisher Scientific. Molecular Probes™ Fluo-4, AM, penetrable en células 10 x 50 µg Reactivos y kits de crecimiento y diferenciación celular [Internet]. [cited 2021 Apr 26]. Available from: <https://www.fishersci.es/shop/products/fluo-4-am-cell-permeant/11504786>
64. Grienberger C, Konnerth A. Imaging Calcium in Neurons. *Neuron* [Internet]. 2012;73(5):862–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011>
65. Fröhlich F. Optical Measurements and Perturbations. *Netw Neurosci.* 2016;145–59.
66. Fluo-4FF, AM, cell permeant - Special Packaging [Internet]. [cited 2021 Jun 25]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F23981#/F23981>

67. Zhirnov AE, Demina T V., Krylova OO, Grozdova ID, Melik-Nubarov NS. Lipid composition determines interaction of liposome membranes with Pluronic L61. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2005;1720(1–2):73–83.
68. Kotz S, Johnson NL. Breakthroughs in Statistics, Volume III. Vol. 40, *Technometrics.* 1998. 165–165 p.
69. GraphPad Prism 9 Statistics Guide - Interpreting results: Kruskal-Wallis test [Internet]. [cited 2021 Jun 9]. Available from: https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/how_the_kruskal-wallis_test_works.htm
70. Şahin M, Öncü G, Yılmaz MA, Özkan D, Saybaşılı H. Transformation of SH-SY5Y cell line into neuron-like cells: Investigation of electrophysiological and biomechanical changes. *Neurosci Lett* [Internet]. 2021;745:135628. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394021000069>
71. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the Use of SH - SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Neuronal Cell Cult Methods Protoc* [Internet]. 2013;1078:35–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-640-5>
72. Pålman S, Hoehner JC, Nånberg E, Hedborg F, Fagerström S, Gestblom C, et al. Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 1995;31(4):453–8.
73. Balasubramanian PS. Nuclear elongation correlates with neurite induced cellular elongation during differentiation of SH-SY5Y neural cells. *Int J Morphol.* 2021;39(2):548–53.
74. Barros VG, Duhalde-vega M, Caltana L, Brusco A, Antonelli MC. Differentiation of a Human Neuroblastoma Into Neuron-Like Cells Increases Their Susceptibility to Transduction by Herpesviral Vectors. *J Neurosci Res.* 2006;83(June):787–800.
75. Constantinescu R, Constantinescu AT, Reichmann H, Janetzky B. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *Neuropsychiatr Disord An Integr Approach.* 2007;17–28.
76. Martínez AL, Brea J, Monroy X, Merlos M, Burgueño J, Loza MI. A New Model of Sensorial Neuron-Like Cells for HTS of Novel Analgesics for Neuropathic Pain. *SLAS Discov.* 2019;24(2):158–68.
77. Ghil SH, Kim BJ, Lee YD, Suh-Kim H. Neurite outgrowth-induced by cyclic AMP can be modulated by the α subunit of go. *J Neurochem.* 2000;74(1):151–8.
78. Qiao J, Paul P, Lee S, Qiao L, Josifi E, Tiao JR, et al. PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2012;424(3):421–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.125>

79. Simões RF, Ferrão R, Silva MR, Pinho SLC, Ferreira L, Oliveira PJ, et al. Refinement of a differentiation protocol using neuroblastoma SH-SY5Y cells for use in neurotoxicology research. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2021;149:111967. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691521000016>
80. Constantinescu R, Constantinescu AT, Reichmann H, Janetzky B. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm Suppl*. 2007;(72):17–28.
81. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, et al. 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;75(3):991–1003.
82. Agholme L, Lindström T, Kågedal K, Marcusson J, Hallbeck M. An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. *J Alzheimer's Dis*. 2010;20:1069–82.
83. Wang XJ, Xu JX. Possible involvement of Ca²⁺ signaling in rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*. 2005;376(2):127–32.
84. Şahin M, Öncü G, Yılmaz MA, Özkan D, Saybaşılı H. Transformation of SH-SY5Y cell line into neuron-like cells: Investigation of electrophysiological and biomechanical changes. *Neurosci Lett*. 2021;745(January).
85. Sousa SR, Vetter I, Ragnarsson L, Lewis RJ. Expression and Pharmacology of Endogenous Cav Channels in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *PLoS One*. 2013;8(3).
86. Maqoud F, Curci A, Scala R, Pannunzio A, Campanella F, Coluccia M, et al. Cell cycle regulation by Ca²⁺ activated K⁺ (BK) channels modulators in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8):1–19.
87. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods*. 2008 Nov;46(3):143–51.
88. Zhang J, Gao Y, Yu M, Wu H, Ai Z, Wu Y, et al. Retinoic acid induces embryonic stem cell differentiation by altering both encoding RNA and microRNA expression. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(7):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0132566>
89. Takaishi M, Uchida K, Suzuki Y, Matsui H, Shimada T, Fujita F, et al. Reciprocal effects of capsaicin and menthol on thermosensation through regulated activities of TRPV1 and TRPM8. *J Physiol Sci*. 2016;66(2):143–55.