



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

Soportes celulares basados en sustratos de grafeno para terapia celular en la enfermedad del Parkinson

Autora: Noela Rodríguez-Losada

Programa de Doctorado en Biomedicina, Investigación Traslacional Y Nuevas Tecnologías en Salud, Facultad de Medicina. Real Decreto 99/2011

*Departamento Fisiología Humana, Histología, Anatomía Patológica y Educación Física Deportiva
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga*

DIRECCIÓN

*Tutor José Ángel Narvárez Bueno
Director José Ángel Narvárez Bueno
Director Miguel Ángel Arráez Sánchez*

2023



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Noela Rodríguez-Losada

 <https://orcid.org/0000-0003-3629-4883>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña NOELA RODRÍGUEZ LOSADA

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD FACULTAD DE MEDICINA REAL DECRETO 99/2011 de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: SOPORTES CELULARES BASADOS EN SUSTRATOS DE GRAFENO PARA TERAPIA CELULAR EN LA ENFERMEDAD DEL PARKINSON

Realizada bajo la tutorización de JOSÉ ÁNGEL NARVÁEZ BUENO y dirección de JOSÉ ÁNGEL NARVÁEZ BUENO Y MIGUEL ÁNGEL ARRAEZ SÁNCHEZ (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 9 de Enero de 2023

<p>RODRIGUEZ LOSADA NOELA -</p> <p>Firmado digitalmente por RODRIGUEZ LOSADA NOELA - Fecha: 2023.01.09 13:53:38 +01'00'</p> <p>Fdo.: NOELA RODRÍGUEZ LOSADA Doctorando/a</p>	<p>NARVAEZ BUENO JOSE ANGEL -</p> <p>Firmado digitalmente por NARVAEZ BUENO JOSE ANGEL - Fecha: 2023.01.09 11:07:38 +01'00'</p> <p>Fdo.: JOSÉ ÁNGEL NARVÁEZ BUENO Tutor/a</p>





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

Fdo.: JOSE ÁNGEL NARVAEZ BUENO

NARVAEZ BUENO
JOSE ANGEL -

Firmado digitalmente por NARVAEZ
BUENO JOSE ANGEL - Fecha:
2023.01.09 11:07:57 +01'00'

MIGUEL ÁNGEL ARRÁEZ SÁNCHEZ

ARRAEZ SANCHEZ
MIGUEL ANGEL -

Firmado digitalmente por ARRAEZ
SANCHEZ MIGUEL ANGEL -
Fecha: 2023.01.09 13:47:12 +01'00'

Director/es de tesis



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

D. José Ángel Narváez Bueno

Catedrático de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

D. Miguel Ángel Arráez Sánchez

Facultativo especialista de Área de Neurocirugía del hospital Regional Universitario de Málaga y Profesor Titular de Neurocirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

CERTIFICAN Que D^a. Noela Rodríguez Losada

ha obtenido y estudiado personalmente bajo mi dirección los datos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: “Soportes celulares basados en sustratos de grafeno para terapia celular en la enfermedad del Parkinson”, que considero tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en Málaga 9 de Enero 2023,

Director y Tutor

Director

Firmado

Firmado

D. José Ángel Narváez Bueno

D. Miguel Ángel Arráez Sánchez

NARVAEZ BUENO
JOSE ANGEL -  Firmado digitalmente por
NARVAEZ BUENO JOSE
ANGEL - Fecha:
2023.01.09 11:08:14
+01'00'

ARRAEZ SANCHEZ
MIGUEL ANGEL -  Firmado digitalmente por
ARRAEZ SANCHEZ MIGUEL
ANGEL -
Fecha: 2023.01.09 13:47:42
+01'00'



Edificio Pabellón de Gobierno.
Campus El Ejido.
29071

Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 /
952 13 71 10

ÍNDICE

Resumen	x
Agradecimientos	xi
Producción Científica de este estudio de tesis doctoral	xii
Abreviaturas	xiii
INTRODUCCIÓN	1
I.1. El Parkinson	2
I.1. Fisiopatología de la Enfermedad del Parkinson (PD)	3
I.2. Epidemiología de la PD	8
I.3. Etiología de la PD	8
I.3.1. La α -sinucleína	10
I.4. Proceso de diferenciación de las células DAérgicas del mesencéfalo	12
I.5. Enfoques terapéuticos para el abordaje de la enfermedad de PD	14
I.5.1. Enfoque tratamiento farmacológico	15
I.5.2. Enfoque tratamiento quirúrgico	17
I.5.3. Enfoque de tratamiento empleando factores neurotróficos	19
I.5.4 Enfoque de tratamiento mediante terapia génica	21
I.5.5. Enfoque de tratamiento mediante uso de la microbiota, el rol del microbioma en la PD	21
I.5.6. Enfoque de tratamiento mediante terapia celular	23
I.5.6.1. Uso de las células heterólogas como tejido de reemplazo en la PD	24
I.5.6.2. Uso de células autólogas en las terapias de reemplazo de la PD	24
I.5.7. Limitaciones técnicas en la remodelación de la función dopaminérgica empleando injerto	25
I.6. EL grafeno y el nanocrystal glass carbon como candidatos para soportes celulares: empleo como neuroprótesis	26
I.6.1. Qué es el Grafeno	27
I.6.2. Obtención del Grafeno	30
I.7. Qué es el nanocrystal glass carbon, NGLC	31



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
MATERIAL Y MÉTODOS	39
Resumen	40
M.I. Metodología empleada y descrita para el estudio de los efectos de los diferentes materiales grafénicos	42
M.1. Síntesis de materiales grafénicos	42
M.2. Cultivo de células dopaminérgicas embrionarias: SN4741	44
M.2.1. Análisis del tiempo que tarda una célula SN474 en duplicar su número en cultivo	45
M.2.2. Cultivo de células SN4741 sobre los diferentes materiales grafénicos en forma de polvo y película	46
M.3. Análisis de la viabilidad celular de células SN4741 en exposición los diferentes materiales grafénicos	47
M.3.1. Determinación mediante ensayo de MTT	47
M.3.2. Determinación mediante ensayo de necrosis	50
M.3.3. Determinación de la disfunción bioenergética	51
M.3.3.1. Parámetros valorados en el ensayo de Disfunción Bioenergética medidos en el en SeaHorse	52
M.4. Análisis de la influencia de los diferentes materiales grafénicos sobre los mecanismos proliferativos	55
M.4.1. Ensayo de Ioduro de Propidio	55
M.4.2. Ensayo de Bromodeoxiuridina (BrdU)	57
M.4.3. Ensayo de Western-blot para determinación de proteínas relacionadas directamente con el ciclo celular: proliferación, quiescencia y senescencia	58
M.5. Análisis de la influencia de los diferentes materiales grafénicos sobre los mecanismos de diferenciación y maduración DAérgica	63
M.5.1. Ensayo de Western-blot para la determinación de proteínas implicadas en la diferenciación y maduración DAérgica	63
M.5.2. Análisis de los efectos del GO y derivados sobre los mecanismos de diferenciación y maduración DAérgica	64
M.5.3. Ensayo de expresión génica de genes implicados en la diferenciación y maduración DAérgica	68

M.6. Disfunción Neuronal	73
M.6.1. Estudio de la capacidad/habilidad neuroprotectora de los diferentes materiales grafénicos: análisis por Western-blot de α -sinucleína y c-fos en tratamientos con rotenona	73
M.II. Metodología empleada y descrita para el estudio de los efectos de NGLC	74
M.7. Síntesis de NGLC,	74
M.8. Cultivo de células SN4741 expuestas a NGLC	78
M.9. Análisis de la Viabilidad Celular	79
M.9.1. Análisis de la Viabilidad Celular y del metabolismo de células SN4741 en exposición a NGLC mediante ensayo de MTT	
M.9.2. Análisis de la Viabilidad Celular de células SN4741 en exposición a NGLC mediante ensayo de viabilidad y citotoxicidad LIVE/DEAD® en película y en polvo	80
M.10. Western-blot para el estudio de proteínas implicadas en la proliferación y la diferenciación celular	80
M.11. Evaluación de la capacidad de las películas de NGLC para la diferenciación y maduración celular como andamio a largo plazo: técnica de inmunofluorescencia	81
M.III. Análisis Estadístico	83
RESULTADOS	84
Resumen	85
R.I. Resultados empleando materiales grafénicos	86
R.1. Resultados a cerca de la estructura y composición química de los diferentes materiales grafénicos	88
R.2. Resultados relativos al efecto de los diferentes materiales grafénicos producen sobre la morfología celular y arquitectura en SN4741	88
R.3. Resultados obtenidos del estudio de viabilidad celular	92
R.4. Proliferación celular	98
R.4.1. Ensayo de ciclo celular	98
R.4.2. Ensayo de 5'-Bromo 2- deoxiuridina (BrdU)	101
R.4.3. Análisis de proteínas relacionadas con el ciclo celular	103
R.5. Resultados relacionados con el metabolismo mitocondrial y bioenergético	106
R.6. Resultados relacionados con la diferenciación neuronal y DAérgica	112

R.7. Efectos neuroprotectores de los materiales grafénicos contra la neurotoxina dopaminérgica: Rotenona	125
R.II. Resultados relacionados con la capacidad diferenciadora y la citotoxicidad del nanocrystal glass like carbon (NGLC)	130
R.8. Resultados del estudio de la estructura y propiedades físico- químicas del NGLC	130
R.9. Efectos del NGLC sobre las células SN4741. Análisis de la morfología y distribución celular	133
R.10. Comparación de la viabilidad y la actividad metabólica celular	136
R.10.1. Resultados del ensayo de MTT	136
R.10.2. Resultados del ensayo de viabilidad y muerte celular empleando Calceína AM y Homodímero de Etidio-1 (EthD-1)	138
R.11. Ensayos de proteína para cuantificación de proteínas implicadas en la proliferación	142
R.12. Maduración celular	145
R.13. Películas de NGLC evaluadas como andamios celulares	146
R.13.1. Análisis de la morfología y la distribución celular en células cultivadas sobre películas NGLC	146
R14. Análisis de la diferenciación neuronal en relación con la comunicación celular y funcionalidad	150
DISCUSIÓN	155
CONCLUSIONES	182
BIBLIOGRAFÍA	185
ANEXO I. Esquema gráfico sobre la introducción	210
ANEXO II. Esquema gráfico sobre la diferenciación de células dopaminérgicas	212
ANEXO II. Esquema gráfico sobre la metodología	214



RESUMEN

Esta línea de estudio se ubica en la corriente regenerativa neuronal. La pretensión es generar unas condiciones microambientales óptimas, *in vitro*, con fines de reemplazo de tejido dañado dopaminérgico. Para lograr este fin, se pretende encontrar un material que favorezca la diferenciación y el crecimiento de neuronas DAérgicas. La principal hipótesis de estudio se basa en que el establecimiento de este microambiente idóneo lo debe proporcionar no solo las células de reemplazo, células madre neuronales o neuronas adultas de sustitución, sino también los factores inductores de la diferenciación dopaminérgica, y además un sistema de soporte o andamiaje celular que permita la funcionalidad y capacidad neuronal y donde se favorezcan los procesos de diferenciación neuronal para las células de sustitución.

Este trabajo de tesis analiza y evalúa dos materiales grafénicos que se distinguen principalmente por su estructura molecular, uno de ellos el óxido de grafeno y sus especies reducidas tanto en polvo como la película y el NGLC, “nanocrystal glass carbon nanotube”. Básicamente en este estudio se analizaron los procesos neuronales en ambos tipos de materiales relacionado con: (i) la supervivencia, (ii) la capacidad de estimular o reducir el proceso de proliferación, (iii) la estimulación de la maduración neuronal y la diferenciación hacia el fenotipo DA. En especial con NGLC se analizó si el grosor creciente de los materiales confería una mayor o menor capacidad diferenciadora a las células, además de analizar mediante proteínas relacionadas con la comunicación celular como la Sinaptofisina, la mejora de capacidad sináptica como respuesta al estímulo eléctrico, en función del grosor del material expuesto. Y de modo especial en los materiales de GO y sus subtipos se estudiaron los procesos de disfunción neuronal empleando: (iv) la disfunción bioenergética, (v) y si en un ambiente neurotóxico como PD, puede proteger las células, mediante la reducción de la acumulación de proteína α -sinucleína después de trata las células con estresores como la rotenona que emulan el

ambiente citotóxico de la enfermedad del Parkinson. Una de las conclusiones más notorias de este trabajo de tesis, es que los resultados aportados sugieren que la especie óxido de grafeno parcialmente reducido es el mejor candidato para ser empleado en el cultivo de células dopaminérgicas por poseer una mayor capacidad de neurodiferenciación, actividad biológica, neuroprotección y un menor estrés bioenergético, reduciendo los niveles de α -Syn de manera significativa en cultivos con inductor a neurotoxinas. En el caso del NGLC, la comparación con los diferentes grosores y rugosidades mostró que el film de 20 nm posee una mayor capacidad madurativa de las células SN4741. Además, este espesor exhibió una mejor conductividad eléctrica y mejores propiedades ópticas (como la transparencia).

Agradecimientos

I.- A mis Tutores y Directores de Tesis

A mi Tutor y Director, el Catedrático de Fisiología Humana, el Dr. José Ángel Narváez Bueno, gracias por aceptarme como tutorizada y como alumna en un momento tan delicado para mí, propio del proceso subyacente al duelo. Gracias por tener paciencia para que yo pudiera organizarme y terminar este estudio. ¡Estoy muy agradecida por la confianza!

A mi Director de Tesis el Profesor Titular de la UMA del Departamento de Cirugía y Director de la UCG Dr. Miguel Ángel Arráez Sánchez, gracias por aceptar la dirección y por toda la confianza y ayuda prestada para que esta tesis se hiciera real. ¡Gracias por aceptarme como alumna!

II.- A los Investigadores Principales y Colaboradores que han participado en este estudio y en las estancias que he desarrollado para poder elaborar este trabajo de manera directa o indirecta.

Al Dr. Ernest Arenas del *Karolinska Institute* (Professor), Estocolmo, Suecia, gracias por codirigir parte del estudio, por escribir el trabajo juntos, por la discusión científica enriquecedora y por permitir la estancia de investigación, ¡eternamente agradecida!

A la tutora del programa de Doctorado Biotecnología, Dra. Isabel Bellido, especialmente agradecerle toda la ayuda en la gestión del doctorado, en la ayuda inestimable prestada para que esta tesis pudiera ser defendida correctamente. ¡GRACIAS!

Al Doctor Roberto Guzmán de Villoria Lebieziejewski, profesor de la Universidad de Salamanca E. Politécnica Superior de Zamora, por la confianza puesta en mi para desarrollar una parte del proyecto de esta tesis y por la colaboración en sendos trabajos de tesis publicados. Igualmente agradecer al Doctor, tanto la revisión sistemática de la tesis especialmente en relación al NGLC como al grafeno.

Al Doctor Pedro Alegre (Professor) y su equipo, del centro UPeNN (Pensilvania) y del Instituto Ruth and Tristram Colket, Jr. Translational Research Building y Buerger Center for Advanced Pediatric Care CHOP, en la actualidad Director (Head) Gene Therapy Research, le estoy muy agradecida por su confianza y generosa ayuda al hacerme parte de sus estudios, corresponder también la dirección en la estancia en Filadelfia, gracias por la confianza y el aprecio por este estudio de tesis en colaboración de coautoría.

A la Doctora Beverly Davidson (Professor) UPeNN (Pensilvania) y Directora del Instituto Ruth and Tristram Colket, Jr. Translational Research Building y Buerger Center for Advanced Pediatric Care CHOP, gracias por aceptar mi estancia en el Filadelfia, por permitirme aprender de su equipo y por su gratitud y generosidad.

A la Doctora Michael Ehrlich (Professor, Pediatric Neurology, Mount Sinai Hospital, NY) por la generosidad en permitir que trabaje en su equipo con sus modelos celulares en el Instituto Colcket, Perelman Campus.

Al Doctor Javier Castresana (Catedrático) y equipo de la Universidad de Navarra, Departamento de Genética por su confianza puesta en mi para desarrollar parte del estudio de este trabajo y en los trabajos de futuro.

Al Doctor Santiago Ballaz (Profesor Titular) Universidad UTECH Ecuador, por su confianza y apoyo en este trabajo de investigación y por ser un ejemplo para mí de superación de adversidad.

A la Doctora Carmen Salto (Karolinska Institute, Estocolomo), gracias por apoyar la estancia en Suecia, por todo lo que aprendí de ti en mi estancia en Suecia. Eternamente agradecida por amadrinarme en Suecia, por mentorizarme en todo aquello que ha sido necesario y por el *up date*.

III.-A los científicos que siguen confiando en este trabajo y en mi labor profesional, además de ser mentores en el campo de los materiales, y por aportar su tiempo y calidad profesional en la mejora de este estudio

Al los Doctores, el Catedrático Carlos Diéguez y la Profesora titular Clara Villamarín de la Facultad de Medicina del Departamento de Fisiología Humana de la Universidad de Santiago de Compostela-(USC) CIMUS, agradecer muy especialmente su apoyo incondicional siempre mostrado, igualmente expresar mi gratitud por darme mi formación científica los primeros 3 años de mi carrera. Igualmente, el apoyo posterior en los proyectos de investigación, de todo corazón gracias. Igualmente expresar mi gratitud al Doctor José María Ordovás (Professor, Tufts USA) por la mentorización en mis primeros años de vida en el laboratorio de investigación FIMABIS.

IV.-A los equipos de científicos con los que he podido colaborar para desarrollar este trabajo

Al Doctor Pablo Romero por la generación de NGLC, a la Doctora Amelia Díaz Casares (Profesora Contratada Doctor Departamento de Fisiología Humana de la UMA) agradecer la colaboración con los estudios publicados a través del grupo PAIDI-CTS156. Especialmente a la Doctora María Ocaña (Mary, CIMES UMA) por el trabajo colaborativo de los estudios bioenergéticos, y por la discusión de los resultados, igualmente al Catedrático Doctor MA Medina (UMA, Departamento de Bioquímica).

Al equipo de los servicios centrales del SCAI (Fondos FEDER-EU), a los Servicios de Microscopía y sus coordinadores, especialmente agradecer a Goyo las imágenes de microscopía electrónica de barrido; igualmente agradecer al servicio de cultivo celular, al director del centro SCAI-UMA, así como al Vicerrector/a de Investigación por el apoyo en el servicio de infraestructura y gestión de este, pilar fundamental de este estudio. A los doctores José Pavía (titular de Farmacología, Facultad de Medicina UMA), catedráticos de bioquímica Eugenio y Mercedes (Facultad de Medicina, UMA) por permitirme trabajar en sus laboratorios y facilitarme toda su ayuda y todos los reactivos necesarios.

Muy especialmente agradecer al Dr. Cuestan Ayllón del Instituto de Nanociencia de Zaragoza por el estudio de X-Rayos por Espectroscopía Electrónica.

V.- A los revisores de la tesis

Quiero agradecer especialmente a mis directores y mi tutor.

Al doctor Javier Castresana de la Universidad de Pamplona Departamento de Genética, por la revisión estructural de la tesis.

Igualmente quiero agradecer a Dña. Mercedes Losada Díaz, la revisión fina de la tesis y la edición de esta, así como las correcciones de las diferentes versiones.

Al Dr.MD. Felipe Rodríguez-Medina por la revisión sistemática de la tesis, por las sugerencias y las correcciones.

A Mónica Paula y Alma Navarro, por todo lo andado en la vida juntas, por colaborar siempre tanto en lo personal como en lo profesional. Agradecer de todo corazón su ayuda para elaborar este documento y las revisiones realizadas del mismo documento, las ideas aportadas para la mejora de la misma.

Además, extendiendo mi agradecimiento a las correctoras externas del documento de tesis por su meticulosidad en la revisión para la mejora de la misma.

VI.- A título Personal

A las compañeras, los compañeros, las investigadoras, los investigadores, amigas y amigos. A mi familia, a mi madre y a mi padre a mis 4 hermanas y 3 sobrinos: Luca, Antía e Iago GRACIAS por los buenos momentos y por apoyarme en los momentos difíciles.

A Pepa y Pili, por su grandiosidad ejemplar.

A “Xosé y Rosiña”, por cuidarme tan bien, por animarme a finalizar este estudio de tesis, muy especialmente a “El Jefe”, que preguntaba: ¿cómo lleva la tesis?



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento Fisiología Humana,
Histología, Anatomía Patológica y
Educación Física Deportiva
Facultad de Medicina

Tesis Doctoral
Soportes celulares basados en sustratos de grafeno para terapia celular en
la enfermedad del Parkinson

Dedicado especialmente a



A mi Ángel de la Guarda,
Muy Querido Profesor Catedrático Dr. José Ángel Aguirre Gómez PhD. (D.E.P)
Quien siempre nos cuida, guía y
custodia en mi corazón un mensaje claro de **no DESISTIR**.

A mi Querida Hija Aldara,
"-Hija, llevas en cada célula de tu cuerpo las mitocondrias legadas por las mujeres de nuestra familia, valientes y fuertes y yo he tenido la fortuna de cedértelas a ti. Cada kilojulio de energía que necesites para conseguir todo aquello que te propongas procede de la mujer que suscribe estas palabras. He querido enseñarte con mi ejemplo vivo, que a pesar de que la vida nos pueda vapulear **es únicamente nuestra la decisión, de levantarnos una y otra vez tras cada caída.**
He escrito esta tesis mientras te concebía con una probabilidad ínfima de conocerte, no obstante, yo estaba convencida de que estarías a mi lado. Mientras cumplías cada fase embrionaria, juntas redactamos parte de los artículos de esta tesis, haciéndote presente con un pie apretando mi diafragma. Aldara, llevas un nombre originario de tierras Celtas, el nombre de una mujer con el corazón Noble, y espero que la nobleza de tu corazón sea como los protones que mueven la energía de nuestro cuerpo y posibilitan la propagación el estímulo eléctrico que nos permite pensar y soñar. Con tu llegada, cerramos el ciclo de la vida, y juntas cerraremos esta Tesis Doctoral, con la esperanza de que la ciencia que hay en ella, permita que la investigación en el campo del Párkinson florezca con nuestra semilla conjunta.
¡Fuerza Hija! -".

A mi prima Yolanda Díaz,
Ministra de Trabajo durante la Pandemia COVID19 2020 y actualmente Vicepresidenta Segunda del Gobierno de España: **-agradecerte el ejemplo de fortaleza e inteligencia en los momentos más difíciles vividos en los últimos tiempos, sin duda un ejemplo de inspiración-**.

A los/ las pacientes con Parkinson,
¡por vosotros y vosotras nos levantamos cada día!



Fotografía propia: Doctores Aguirre y Rodríguez-Losada con Sr.
Benjamín-Franklin, campus Universidad Pensilvania USA, 2017.

***Si consistant adversum me casta, non timebit cor meun.
Si exurgat adversum me proelium, in hoc ego esperabo.
Salmo 26.***

*(Aunque acampe contra mí un ejército, mi corazón no temerá.
Aunque estalle una guerra contra mí, no perderé la confianza)*

Producción científica de este estudio de tesis doctoral

I. Artículos pertenecientes a la tesis doctoral indexados

Rodríguez-Losada N*, Wendelbob R, Ocaña MC, Casares AD, Guzman de Villoría R, Aguirre Gomez JA, Arraez MA, Gonzalez-Alegre P, Medina MA, Arenas E, Narvaez JA. Graphene Oxide and Reduced Derivatives, as Powder or Film Scaffolds, Differentially Promote Dopaminergic Neuron Differentiation and Survival. *Front Neurosci.* 2020 Dec 21; 14:570409. doi: 10.3389/fnins.2020.570409. PMID: 33408604; PMCID: PMC7779605.

Rodríguez-Losada N*, Aguirre JA. The impact of graphene on neural regenerative medicine. *Neural Regen Res.* 2017 Jul;12(7):1071-1072. doi: 10.4103/1673-5374.211181. PMID: 28852385; PMCID: PMC5558482.

Rodríguez-Losada N*, Romero P, Estivill-Torrús G, Guzmán de Villoria R, Aguirre JA. Cell survival and differentiation with nanocrystalline glass-like carbon using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. *PLoS One.* 2017 Mar 23;12(3): e0173978. doi: 10.1371/journal.pone.0173978. PMID: 28334019; PMCID: PMC5363826

II. Artículos relacionados con la tesis doctoral desarrollados durante la realización de la misma indexados

Rodríguez-Losada N*, **de la Rosa J***, Larriva M, Wendelbo R, Aguirre JA, Castresana JS, Ballaz SJ. Overexpression of alpha-synuclein promotes both cell proliferation and cell toxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Adv Res.* 2020 Jan 22; 23:37-45. doi: 10.1016/j.jare.2020.01.009. PMID: 32071790; PMCID: PMC7016025.

Beauvais G*, **Rodríguez-Losada N***, Ying L, Zakirova Z, Watson JL, Readhead B, Gadue P, French DL, Ehrlich ME, Gonzalez-Alegre P. Exploring the Interaction Between eIF2 α Dysregulation, Acute Endoplasmic Reticulum Stress and DYT1 Dystonia in the Mammalian Brain. *Neuroscience.* 2018 Feb 10; 371:455-468. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.12.033. Epub 2017 Dec 28. PMID: 29289717.



Graphene Oxide and Reduced Derivatives, as Powder or Film Scaffolds, Differentially Promote Dopaminergic Neuron Differentiation and Survival

Noela Rodriguez-Losada^{1,2*}, Rune Wendelbob³, M. Carmen Ocaña^{4,5}, Amelia Diaz Casares¹, Roberto Guzman de Villoria⁶, Jose A. Aguirre Gomez^{1†}, Miguel A. Arraez⁷, Pedro Gonzalez-Alegre^{8,9}, Miguel A. Medina^{4,5}, Ernest Arenas¹⁰ and Jose A. Narvaez¹

OPEN ACCESS

Edited by:

Kaneyasu Nishimura,
Kyoto Pharmaceutical
University, Japan

Reviewed by:

Pankaj Seth,
National Brain Research Centre
(NBRC), India
Masanori Hijjoka,
Ritsumeikan University, Japan

*Correspondence:

Noela Rodriguez-Losada
noela@uma.es

†Deceased

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 07 June 2020

Accepted: 16 November 2020

Published: 21 December 2020

Citation:

Rodriguez-Losada N, Wendelbob R,
Ocaña MC, Casares AD,
Guzman de Villoria R,
Aguirre Gomez JA, Arraez MA,
Gonzalez-Alegre P, Medina MA,
Arenas E and Narvaez JA (2020)
Graphene Oxide and Reduced
Derivatives, as Powder or Film
Scaffolds, Differentially Promote
Dopaminergic Neuron Differentiation
and Survival.
Front. Neurosci. 14:570409.
doi: 10.3389/fnins.2020.570409

¹ Department Human Physiology, Faculty of Medicine, Biomedicine Research Institute of Malaga (IBIMA C07), University of Malaga, Malaga, Spain, ² Department of Didactic Science Education, Faculty of Science Education, University of Malaga, Malaga, Spain, ³ ABALONYX AS., Oslo, Norway, ⁴ Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Sciences, and IBIMA (Biomedical Research Institute of Málaga), Andalucía Tech, University of Málaga, Málaga, Spain, ⁵ CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Málaga, Spain, ⁶ Laboratory of Mechanical Engineering Applied to Design, Manufacturing and Applications of Composite Materials (LAMCOM), Department of Mechanical Engineering, University of Salamanca, Escuela Politécnica Superior de Zamora, Zamora, Spain, ⁷ Neurosurgery Unit, Department Neurosurgery, Biomedicine Research Institute of Malaga (IBIMA), Hospital Regional de Malaga, Andalusian Health System (SAS), Malaga, Spain, ⁸ Raymond G. Perelman Center for Cellular & Molecular Therapeutics, The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, United States, ⁹ Department of Neurology, Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, United States, ¹⁰ Laboratory of Molecular Neurobiology, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Emerging scaffold structures made of carbon nanomaterials, such as graphene oxide (GO) have shown efficient bioconjugation with common biomolecules. Previous studies described that GO promotes the differentiation of neural stem cells and may be useful for neural regeneration. In this study, we examined the capacity of GO, full reduced (FRGO), and partially reduced (PRGO) powder and film to support survival, proliferation, differentiation, maturation, and bioenergetic function of a dopaminergic (DA) cell line derived from the mouse substantia nigra (SN4741). Our results show that the morphology of the film and the species of graphene (GO, PRGO, or FRGO) influences the behavior and function of these neurons. In general, we found better biocompatibility of the film species than that of the powder. Analysis of cell viability and cytotoxicity showed good cell survival, a lack of cell death in all GO forms and its derivatives, a decreased proliferation, and increased differentiation over time. Neuronal maturation of SN4741 in all GO forms, and its derivatives were assessed by increased protein levels of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine transporter (DAT), the glutamate inward rectifying potassium channel 2 (GIRK2), and of synaptic proteins, such as synaptobrevin and synaptophysin. Notably, PRGO-film increased the levels of Tuj1 and the expression of transcription factors specific for midbrain DA neurons, such as Pitx3, Lmx1a, and Lmx1b. Bioenergetics and mitochondrial dysfunction were evaluated by measuring oxygen consumption modified by distinct GO species and were different between powder and film for the same GO species. Our results indicate that PRGO-film was the best GO species at maintaining

RESEARCH ARTICLE

Cell survival and differentiation with nanocrystalline glass-like carbon using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos

Noela Rodríguez-Losada¹*, Pablo Romero²‡, Guillermo Estivill-Torrús³, Roberto Guzmán de Villoria^{2,4}‡, Jose A. Aguirre¹*,

1 Department of Human Physiology, Faculty of Medicine, University of Malaga and Biomedicine Biomedical Research Institute of Malaga (IBIMA), Campus de Teatinos, Boulevard Louis Pasteur, Malaga, Spain, **2** IMDEA Material Institute, C/Eric Kandel 2, Getafe, Madrid, Spain, **3** Unidad de Clínica de Neurociencia, Biomedical Research Institute of Malaga (IBIMA), Regional University Hospital Malaga, Av. de Carlos Haya, s/n, Málaga, Spain, **4** FIDAMC. Foundation for the Research, Development and Application of Composite Materials Avda. Rita Levi-Montalcini 29, Getafe, Madrid, Spain

* These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* noela@uma.es (NR); Jose.Aguirre@uma.es (JA)



OPEN ACCESS

Citation: Rodríguez-Losada N, Romero P, Estivill-Torrús G, Guzmán de Villoria R, Aguirre JA (2017) Cell survival and differentiation with nanocrystalline glass-like carbon using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. PLoS ONE 12(3): e0173978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173978>

Editor: Masaya Yamamoto, Kyoto Daigaku, JAPAN

Received: August 12, 2016

Accepted: March 1, 2017

Published: March 23, 2017

Copyright: © 2017 Rodríguez-Losada et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data are available in the public repository of the university of Malaga at: <http://hdl.handle.net/10630/13226>.

Funding: This work was supported by 1) Funds from the University of Malaga and Campus de Excelencia Internacional Andalucía Tech (UMA); 2) Junta de Andalucía Government, Spain (PAIDI-CTS156); 3) Spanish Ministry of Science and Innovation through the Ramon y Cajal Fellowship (RG).

Abstract

Regenerative medicine requires, in many cases, physical supports to facilitate appropriate cellular architecture, cell polarization and the improvement of the correct differentiation processes of embryonic stem cells, induced pluripotent cells or adult cells. Because the interest in carbon nanomaterials has grown within the last decade in light of a wide variety of applications, the aim of this study was to test and evaluate the suitability and cytocompatibility of a particular nanometer-thin nanocrystalline glass-like carbon film (NGLC) composed of curved graphene flakes joined by an amorphous carbon matrix. This material is a disordered structure with high transparency and electrical conductivity. For this purpose, we used a cell line (SN4741) from substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. Cells were cultured either in a powder of increasing concentrations of NGLC microflakes (82±37µm) in the medium or on top of nanometer-thin films bathed in the same culture medium. The metabolism activity of SN4741 cells in presence of NGLC was assessed using methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium (MTT) and apoptosis/necrosis flow cytometry assay respectively. Growth and proliferation as well as senescence were demonstrated by western blot (WB) of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), monoclonal phosphorylate Histone 3 (serine 10) (PH3) and SMP30 marker. Specific dopaminergic differentiation was confirmed by the WB analysis of tyrosine hydroxylase (TH). Cell maturation and neural capability were characterized using specific markers (SYP: synaptophysin and GIRK2: G-protein-regulated inward-rectifier potassium channel 2 protein) via immunofluorescence and coexistence measurements. The results demonstrated cell positive biocompatibility with different concentrations of NGLC. The cells underwent a process of adaptation of SN4741 cells to NGLC where their metabolism decreases. This process is related to a decrease of PH3 expression and significant increase SMP30 related to senescence

III. Premios

1. Premio de la Sociedad Española de Fisiología a la mejor comunicación ePóster 2014.
2. Premio del Simposio Internacional Nanotec20 a la mejor comunicación 2020.

IV. Comunicaciones Publicadas en Congresos Internacionales relacionados con la Tesis Doctoral

Rodríguez-Losada, Noela; Wendelbo, Rune; Garcia-Fernandez, María; Pavia, José; Martin-Montanez, Elisa; Lara, Pablo; Arenas, Ernest; Aguirre, José Ángel. Graphene derivatives as scaffold for ex vivo survival and maturation of dopaminergic SN4741 cells. 2014. Acta Physiologica. 212, pp. 69-69.01/09/2014. ISSN 1748-1708. ISSN 1748-1716.

V. Divulgación científica en medios digitales e impresión en periódicos nacionales

(a) Divulgación Científica e impacto en los medios de comunicación del trabajo sobre soportes celulares con grafeno: Trabajo publicado: “*Cell survival and differentiation with nanocrystalline glass-like carbon using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos*”. PLOS ONE, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0173978>”

(1) Agencia SINC

<http://www.agenciasinc.es/Noticias/A-la-busqueda-de-soportes-fisicos-para-su-uso-en-medicina-regenerativa>

(2) Agencia EUROPA PRESS:

<http://www.europapress.es/andalucia/malaga-00356/noticia-investigadores-uma-avanzan-busqueda-soportes-fisicos-uso-medicina-regenerativa-20170327161353.html>

(3) WEB UMA:

<https://www.uma.es/sala-de-prensa/noticias/avanzan-en-la-busqueda-de-soportes-fisicos-para-su-uso-en-medicina-regenerativa/>

(4) Agencia AtresMedia

http://www.tecnoplora.com/sinc/busqueda-soportes-fisicos-uso-medicina-regenerativa_2017032858da29120cf2f510fd857aab.html

(5) La Vanguardia:

<http://www.lavanguardia.com/vida/20170327/421237749167/investigadores-de-la-upv-presentan-un-nuevo-sistema-inteligente-para-reducir-los-atascos-en-las-rotondas.html>

(6) Nova Ciencia:

<http://novaciencia.es/grafeno-tejidos-humanos/>

(7) Diario Costa:

<http://www.diariocosta.com/investigadores-de-la-uma-aportan-nuevos-resultados-sobre-la-biocompatibilidad-del-grafeno/>

(8) Málaga Hoy:

http://www.malagahoy.es/malaga/Investigadores-avanzan-uso-medicina-regenerativa_0_1121588411.html

(b) Divulgación científica e impacto del trabajo publicado: *Graphene Oxide and Reduced Derivatives as powder of film scaffolds differentially promote dopaminergic neuron differentiation and survival*. *Frontiers Neuroscience* , 2020

<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.570409>

(1) Uniciencia: <http://uciencia.uma.es/Noticias/Salud/El-grafeno-clave-en-medicina-regenerativa>

(2) UMA: <https://www.uma.es/sala-de-prensa/noticias/identifican-el-grafeno-oxidado-y-sus-derivados-como-el-material-idoneo-para-generar-soportes-celulares-en-medicina-regenerativa---/>

(3) Noticias de Ciencia y tecnología: <https://noticiasdelaciencia.com/art/41106/grafeno-oxidado-y-soportes-celulares-en-medicina-regenerativa>

(4) Europa press: <https://www.europapress.es/andalucia/malaga-00356/noticia-identifican-grafeno-oxidado-derivados-idoneos-generar-soportes-celulares-medicina-regenerativa-20210211150938.html>

(5) Cinco proyectos que pueden revolucionar el mundo:

<https://www.tuexperto.com/2021/03/05/grafeno-proyectos-revolucion-material/>

(6) La Vanguardia: https://www.lavanguardia.com/local/sevilla/20210211/6240680/identifican-grafeno-oxidado-derivados-idoneos-generar-soportes-celulares-medicina-regenerativa.html?fbclid=IwAR2_iB3A0gfNzXJmokrO7gVZM4nMI35tuOoYH-jwom6Aaixs-FmBwLgeoA

(7) Biotech: <http://biotech-spain.com/es/articulos/investigadores-de-la-uma-descubren-que-el-aumento-de-una-prote-na-presente-en-el-parkinson-provoca-tumores-/>

(8) Novaciencia: <https://novaciencia.es/el-grafeno-tambien-vale-como-soporte-celular-en-medicina-regenerativa/>

(9) 20 minutos: <https://www.msn.com/es-es/salud/vida-saludable/identifican-el-grafeno-oxidado-y-derivados-como-id%C3%B3neos-para-generar-soportes-celulares-en-medicina-regenerativa/ar-BB1dBuVf>



(10) Newsbezzzer y Varietyinfo: Perú y Venezuela : <https://newsbeezer.com/peru/grafeno-oxidado-y-portadores-celulares-en-medicina-regenerativa/>;

(12) Archide: <https://www.archyde.com/oxidized-graphene-and-cell-supports-in-regenerative-medicine>

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	ácido ribonucleico
a-syn	alfa-sinucleína
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i> : factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	<i>bovine serum albumin</i> : albúmina de suero bovino
CVD	<i>chemical vapor deposition</i> : deposición de vapor químico
CNTs	<i>carbon nanotube</i> : nanotubos de carbono
DA	dopamina
DAérgicas	neuronas dopaminérgicas
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAT	<i>dopamine active transporter</i> : transportador activo de dopamina
ECL	<i>enhanced chemiluminescent substrate</i> : sustrato quimioluminiscente mejorado
En1/2	engrailed homeobox genes: genes homeobox grabados/adornados
EPC	endothelial progenitor cells: células progenitoras endoteliales
F	fluorocromo
FBS	<i>fetal bovine serum</i> : suero bovino fetal
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i> : isotiocianato de fluoresceína
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i> : factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales
GFP	<i>green fluorescent protein</i> : proteína verde fluorescente
GO	<i>graphene oxide</i> : óxido de grafeno
GABA	Neurotransmisor GABA "ácido gamma-aminobutírico" pertenece a neuronas gabaérgicas
GLUT	Neurotransmisor Glutamato, pertenece a neuronas glutamatérgicas
Gpi	globo pálido interno
Gpe	globo pálido externo
iPS	<i>induction pluripotent cells</i> : células pluripotentes de inducción
Limx1a1b	<i>homeodominio limx factor transportador 1</i> : homeodominio limx factor transportador
Mash1	<i>mammalian achaete-scute homolog 1</i>
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i> : células madre mesenquimales
MSC-NP	<i>mesenchymal stem cell-derived neural progenitors</i> : progenitores neurales derivados de células madre mesenquimales
MTPT	1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina
NGF	<i>nerve growth factor</i> : factor de crecimiento nervioso
NGLC	<i>nanocrystalline glass-like carbon</i>
NGLC-p	<i>nanocrystalline glass-like carbon powder (polvo)</i>
NGLC-f	<i>nanocrystalline glass-like carbon film (película)</i>
Ngn2	neurogenina 2
HUCB-NSC-NP	<i>neural commitment of cord blood stem cells</i> : células madre del cordón umbilical comprometidas con neuronas
NT3	neurotrofina 3

NT4	neurotrofina 4
Nurr1	repet nuclear 1: receptor nuclear asociado 1
Otx2	<i>orthodenticle homeobox 2</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> : suero fosfato salino
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> : antígeno nuclear de células en proliferación
PD	<i>Parkinson's disease</i> : enfermedad del parkinson
PRGO	<i>partial reduced graphene oxide</i> : óxido de grafeno parcialmente reducido
FRGO	<i>full reduced graphene oxide</i> : óxido de grafeno totalmente reducido
Radh1	retinaldehído-deshidrogenasa 1
SEM	<i>scanning electron microscope</i> : microscopio electrónico de barrido
XPS	<i>X-ray photoelectron spectrometry</i> : espectroscopía fotoelectrónica de rayos X
SHH	sonic hedgehog
SN	sustancia negra
SNc	sustancia negra compacta
SNpc	sustancia negra perteneciente a la pars compacta
SNpr	sustancia negra perteneciente a la pars reticulata
SOX-2	<i>sex determining region y-box 2</i> :factor de transcripción SOX2
TH	tirosina hidroxilasa , limitante de la síntesis de dopamina
TMF	neurotrofina F
Trk	tyrosin receptor kinase family: receptor de tirosina quinasa
TUJ-1	<i>neuron-specific class iii beta-tubulin</i> : beta-tubulina de clase iii específica para neuronas
WNT-1	<i>WNT family member 1</i> : wnt miembro de la familia 1



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento Fisiología Humana,
Histología, Anatomía Patológica y
Educación Física Deportiva
Facultad de Medicina

Tesis Doctoral
*Soportes celulares basados en sustratos de grafeno para terapia celular en
la enfermedad del Parkinson*

INTRODUCCIÓN

I.1. El Parkinson

La **enfermedad de Parkinson** (PD, del inglés “*Parkinson’s disease*”) fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson miembro del Real Colegio de Cirujanos (1), quien acuñó su nombre a este trastorno motor como “*parálisis agitante*”, (Figura 1). La Organización Mundial de la Salud, establece el 11 de abril como el día Mundial del Parkinson en reconocimiento al autor que describió esta enfermedad, siendo actualmente descrita como un trastorno motor cuya etiología es probablemente idiopática y multifactorial (2). La enfermedad neurodegenerativa de la PD se caracteriza por presentar un trastorno clásico motor con síntomas característicos como la bradiquinesia (lentitud en los movimientos), la rigidez muscular; el temblor en reposo; alteración en la marcha con afectación de reflejos posturales y alteración del equilibrio, por tanto, aumento de la inestabilidad (3).

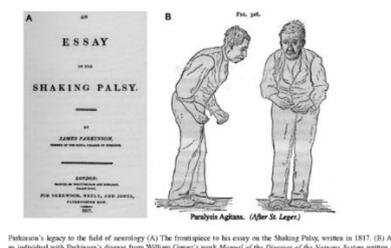


Figura 1. Primer tratado sobre el Parkinson. Obtenido de Lewis, P. A. (1).

*Nota: en este trabajo de tesis se empleará la nomenclatura anglosajona para el acrónimo PD.

* En Anexo I, véase un resumen sobre el enfoque de la introducción.

I.1. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (PD)

La PD constituye el principal trastorno extrapiramidal, siendo entendida como la red que participa de la regulación de la motilidad involuntaria. De este sistema extrapiramidal forman parte los ganglios basales (GB), un conjunto de núcleos profundos subcorticales cerebrales que conforman una red conectada a diferentes partes del córtex cerebral (véase esquema Figura 2 y 3). Los GB participan en el control de la actividad motora de manera prioritaria, por tanto, un deterioro del sistema extrapiramidal desencadena la manifestación sintomatológica de la enfermedad de Parkinson, así como de otros trastornos extrapiramidales denominados parkinsonismos (4).

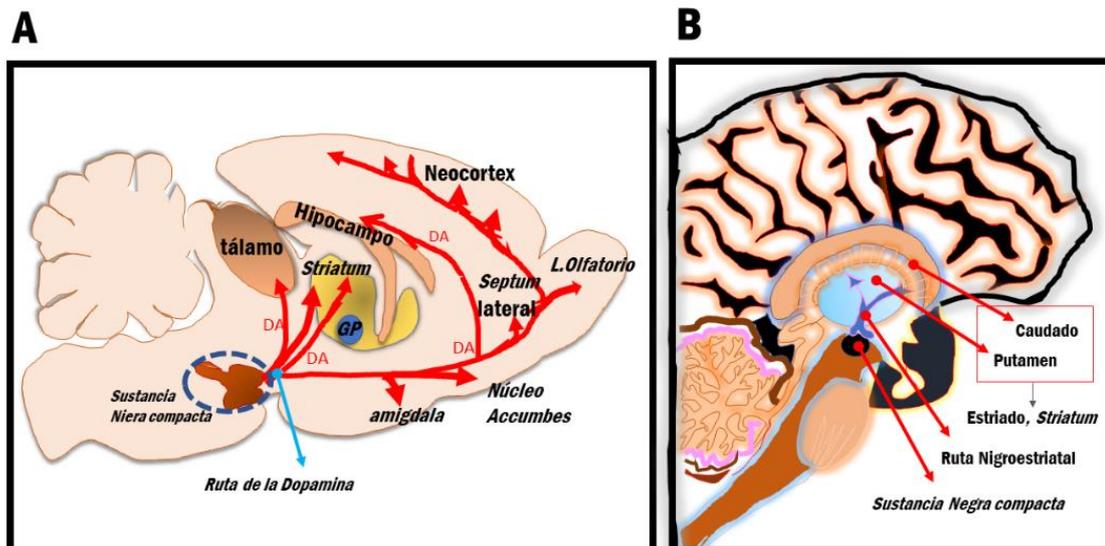


Figura 2. Esquema modelo del cerebro rata vs cerebro humano. Producción propia, editada por autora de la tesis N. Rodríguez Losada.

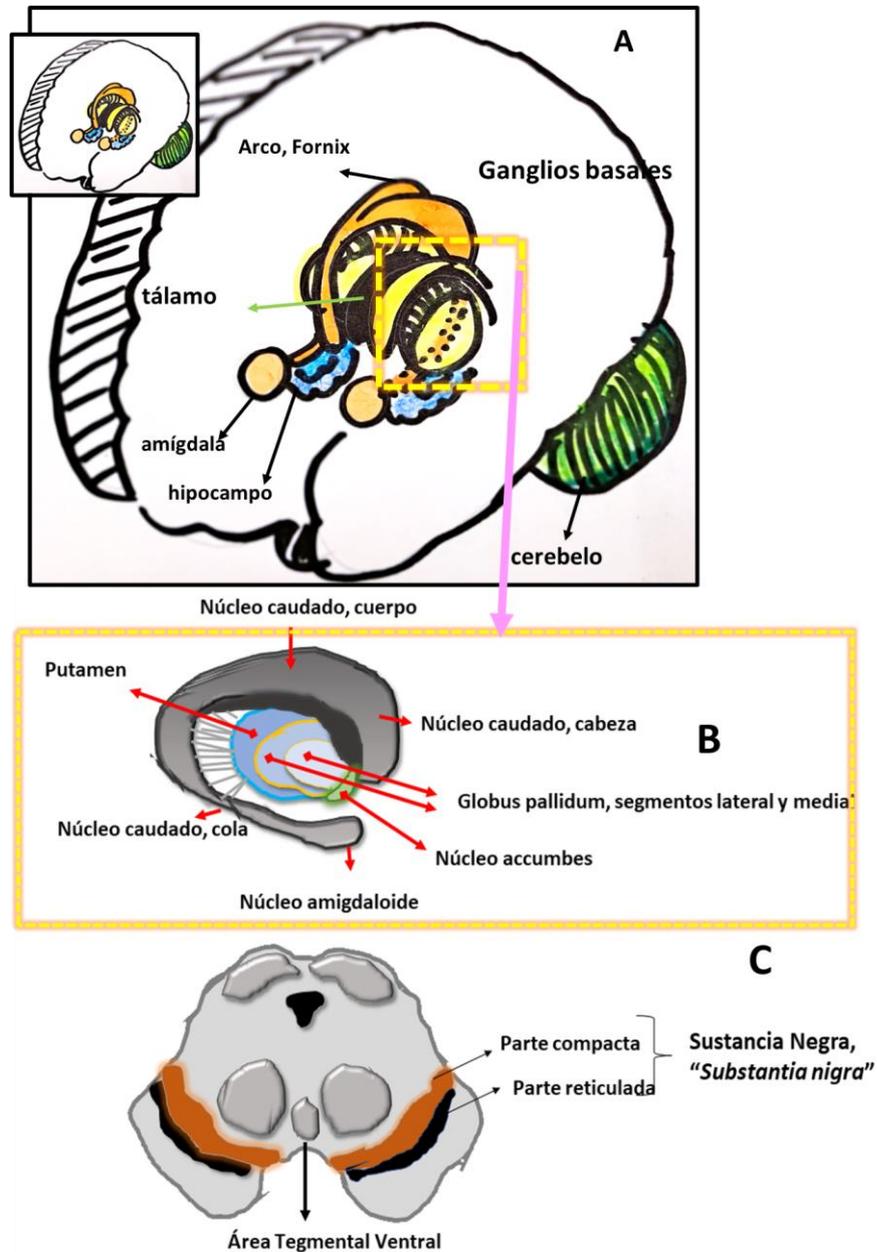


Figura 3. Visión de la disposición del cerebro medio y los ganglios basales (A). Detalle de la distribución del núcleo pálido (B) y área tegmental en visión ventral (C). Modelos reproducidos y adaptados por N. Rodríguez-Losada , figura A inspirada en A. Hasudungan (elaboración propia).



El proceso neurodegenerativo de la PD tiene una base fisiopatológica caracterizada por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (neuronas DAérgicas) productoras de dopamina (DA) y por la deficiencia en la enzima tirosina hidrolasa (TH) enzima limitante para la síntesis de DA además de mostrar déficit de otros neurotransmisores catecolaminérgicos (5). Por este motivo la DA no puede unirse al receptor D1 excitatorio, o D2 inhibitorio de la DA, para ejercer su acción moduladora. Las neuronas DAérgicas, están situadas en la Sustancia Negra (SN) de la *Pars Compacta* (SNc) del cerebro, donde sus cuerpos neuronales (somatas) proyectan los axones a modo de fibras a través de un circuito nigroestriatal hasta el estriado (del latín, *Striatum*) (véase Figura 2 y 3). En esta región, las terminaciones axónicas liberan los neurotransmisores como la DA, y otras catecolaminas, para realizar la acción fisiológica de control motor (6). La región SNc se encuentra en el llamado cerebro medio (Figura 3 y 4), por tanto, su acceso es restringido, y para su estudio se requiere de técnicas que permitan acceder a la región sin alterar el resto del tejido por lo que es requerido el uso de técnicas estereológicas. La estereología, por definición es una técnica que permite mediante coordenadas estereotáxicas preestablecidas a través del mapeo de tejido cerebral, conocer con exactitud y precisión cualquier localización del cerebro (7). Como se ha comentado anteriormente, en la PD la pérdida de función neuronal de las neuronas DAérgicas debido a componentes intrínsecos, así como a componentes exógenos, llevan en último término a la muerte o disfunción de neuronas DAérgicas, conduciendo drásticamente a una deficiencia de la

producción del neurotransmisor DA y por consiguiente una pérdida de su función propia. El resultado de esta pérdida es el aumento de la inhibición celular generada tanto en los núcleos del Globo Pálido interno (GPi), como de la SN reticulada perteneciente a la SNpc (véase esquema explicativo de la Figura 4 A y B). Y a modo general, el proceso fisiopatológico de la PD está directamente relacionado con el deterioro de la acción del circuito dopaminérgico (Figura 4C). El exceso de inhibición a nivel talámico viene condicionado por la pérdida de acción excitatoria del receptor D1 en el putamen (Figura 4C) con lo que se pierde la acción inhibitoria sobre interneuronas gabaérgicas (GABA) en el GPi, provocando una sobreinhibición de las neuronas talámicas que proyectan axones hacia corteza cerebral. Por otro lado, existe una vía indirecta donde el receptor D2 inhibitorio pierde su acción por falta de ligando (DA) dando como resultado la pérdida de la inhibición sobre neuronas GABA del globo pálido externo (GPe) y como consecuencia las neuronas glutamatérgicas (GLUT) del núcleo subtalámico sufren un aumento de activación que repercute en un aumento de inhibición de neuronas GABA del GPi generando un exceso inhibitorio talámico, como resultado hay una pérdida de la modulación del control motor condicionando la aparición de los típicos síntomas de la PD (véase figura 4 C).

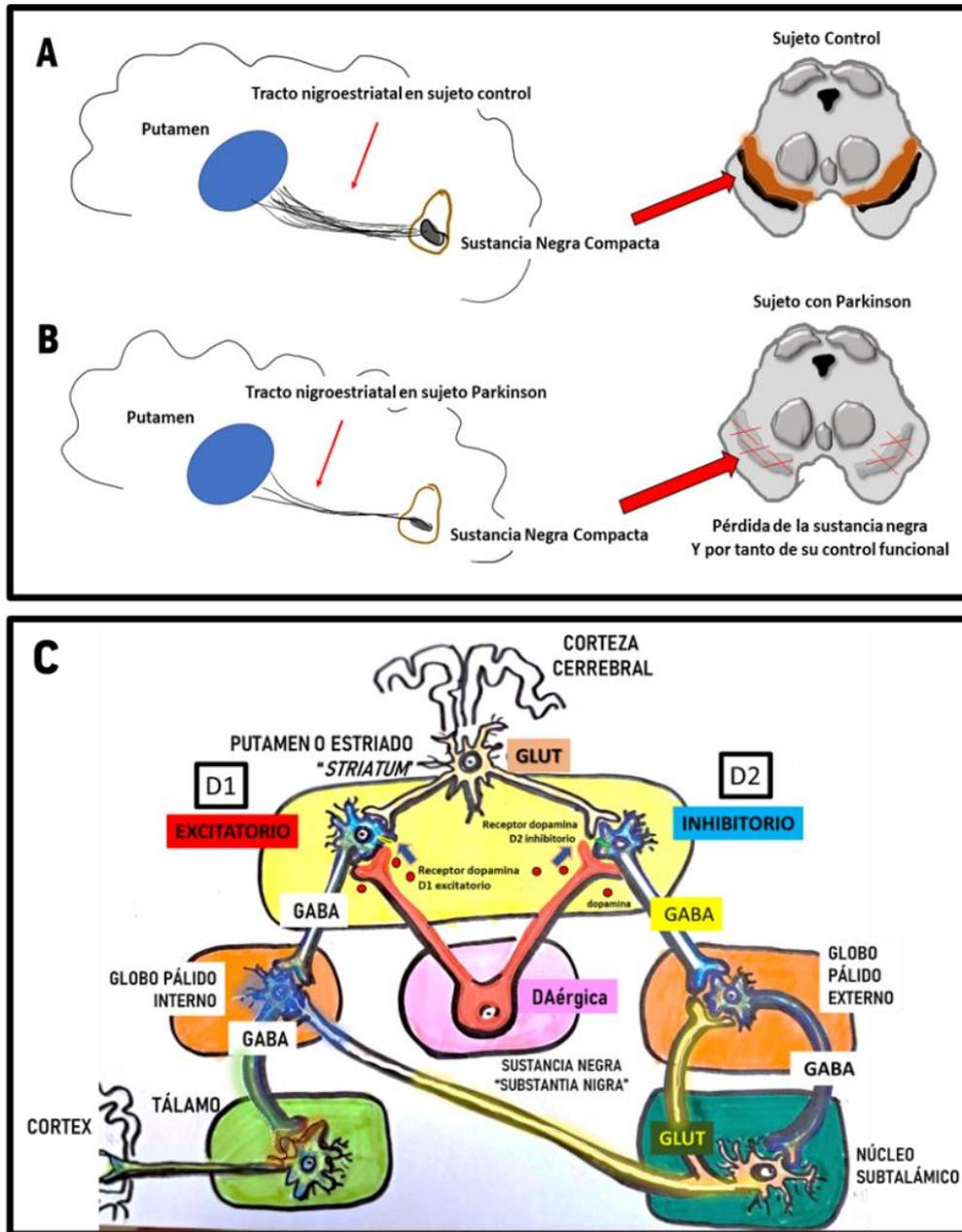


Figura 4. Esquema de la SNpc en sujeto control vs sujeto con PD en visión lateral (A), donde se ha reproducido la denervación del tracto nigroestriatal así como la pérdida de la sustancia negra. (B) Modelo de corte sagital de un modelo esquematizado de cerebro de rata. (C) Representa el circuito de acción neuronal afectada por la PD. D1 y D2 representa los receptores dopaminérgicos de excitación e inhibición. GLUT: neuronas glutamatérgicas, GABA: neuronas Gabaérgicas. La sustancia negra corresponde SNpc donde se proyectan neuronas DAérgicas. El circuito deteriorado por la ausencia de DA, y por consiguiente una inactividad de los receptores D1 y D2 inducen un exceso de actividad inhibitoria en la región talámica por lo que se pierde la modulación motora (reproducido y adaptado por N. Rodriguez-Losada, figura C, inspirada en A. Hasudungan).



I.2. Epidemiología de la PD

El PD es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común según los datos aportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y su prevalencia continuará creciendo a medida que la población envejezca (8). Se ha descrito una incidencia de la PD en 1-2 casos por 1000 habitantes, afectando mayoritariamente más a hombres que a mujeres. En concreto en España, se conoce que la prevalencia afecta al 1% de las personas por encima de 65 años (9). Igualmente, se estima que la población envejecida relacionada directamente con las enfermedades neurodegenerativas será del 77% en el año 2050, motivo por el cual es crucial seguir desarrollando estudios sobre los mecanismos de acción, los diagnósticos preventivos o los tratamientos efectivos que puedan reducir la aparición de la PD o ralentizar su aparición.

I.3. Etiología de la PD

A pesar de la gran cantidad de estudios en ciencia básica y estudios clínicos, los mecanismos moleculares implicados en el desencadenamiento de la PD siguen siendo inciertos (10). No obstante, la búsqueda del posible detonante de la enfermedad, es de gran complejidad debido a que las causas, que convergen en la neurodegeneración característica de la PD, son multifactoriales. Existe un gran número de publicaciones que respaldan que la muerte celular programada es la causante de la muerte de neuronas DAérgicas del cerebro en pacientes con PD, observándose una correlación con el estrés

oxidativo relacionado con la disfunción mitocondrial o bioenergética y la neuroinflamación, como factores clave de esta enfermedad (11). Por otra parte, se ha descrito que el proceso neuroinflamatorio participa como un agente potenciador de la PD (12), sugiriendo que el efecto de ciertos factores inflamatorios no esteroideos (NSAIDs) pudiera actuar como acelerantes de la enfermedad de PD, sin embargo, aunque que podría tener un efecto protector, la literatura científica sigue siendo controvertida ante este respecto (13).

Por el contrario, trabajos publicados como los de Aguirre et al. (14) describe a nivel molecular, como los inhibidores de la ciclo-oxigenasa inducida de la isoforma 2 (Cox-2) tienen un efecto positivo rescatando a las células DA del daño celular. Entre otras causas probables, también se han descrito causas genéticas tanto de genes que contribuyen a la enfermedad a través de un patrón de herencia dominante (*SNCA*, *VPS35*), recesivo (*PARK2*, *PINK1*, *DJ-1*), que incrementan el riesgo de desarrollar la enfermedad con una penetrancia incompleta (*GBA*, *LRRK2*). Entre otras causas probables, autores como Bandres-Ciga et al., (15), Klein et al., (16) o Nalls et al., (17) describen causas genéticas vinculadas a la PD y asociadas a homocigosis del gen *PARK*.

I.3.1 La alfa sinucleína

La alfa sinucleína (α -Syn) es una proteína de bajo peso molecular (véase Figura 5). Tiende a agregarse de manera aleatoria en el citosol, pudiendo encontrarse con estructura de α -hélice tetramérica cuando se asocia a fosfolípidos (18). La proteína α -Syn, se expresa de manera predominante en las terminales presinápticas y en los núcleos de las neuronas (19). En condiciones fisiológicas, la α -Syn, desempeña un papel en la liberación de vesículas sinápticas, en el tráfico de membranas, por tanto, participa en el proceso de neurotransmisión y plasticidad sináptica (20). La α -Syn es una proteína de conformación pequeña, cuyo número de acceso al banco genético es, GenBank: AAA98493.1 registrado en el *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Su secuencia proteica contempla en el locus AAA98493 (número de acceso al locus L36674), unos 126 aminoácidos. Existe una variante de 112 aminoácidos (acceso AAA98487.1), aunque se han descrito hasta 4 variantes alélicas del gen *SNCA* en la especie humana denominadas: variante 5, 8, 11, 14 (fuente extraída de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ipg/AAA98493.1>). Se han detallado al menos 4 isoformas de esta proteína, isoforma CRA_a (EAX06035.1, que carece del componente precursor amiloide, procedente de la especie humana, *Homo sapiens s.*), isoforma 3 (PNI56471.1, descrito en especie *Pan troglodytes*), isoforma 4 (PNI56472.1, *Pan troglodytes*), isoforma 10 (PNI56478.1, *Pan troglodytes*).

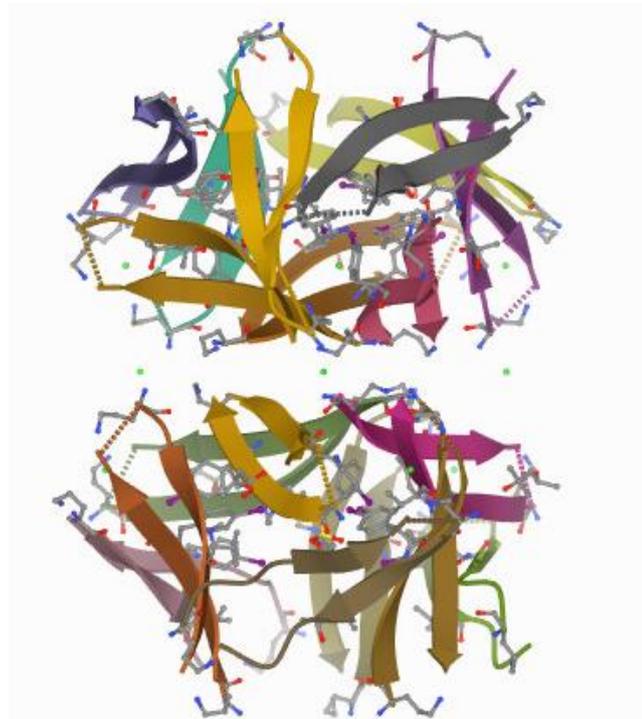


Figura 5. Imagen de la cristalización de un oligómero de α -Syn (figura tomada de Salveson, Spencer y Nowick (26)).

Se ha atribuido como detonante de la apoptosis de neuronas DAérgicas, a la presencia de la acumulación de la proteína alfa sinucleína (α -Syn) en vesículas intracelulares agregadas, denominadas cuerpos de Lewy (LB) tanto en modelos y pacientes con PD (5). También se ha descrito la acumulación en neuronas y células gliales en un grupo de enfermedades neurodegenerativas denominadas α -sinucleinopatías (21). De manera tradicional, se ha asociado a una acumulación anormal de α -Syn a la PD debido en parte a que el gen que codifica para la α -Syn (*SNCA*) causa una forma juvenil de PD asociada a la dosis genética que presenta por duplicidad o multiplicidad de este

gen (22, 23). No obstante, sigue siendo controvertida la asociación entre la acumulación de α -Syn y la apoptosis celular, ya el trabajo publicado por Rodríguez-Losada et al., (24) describe cómo un aumento de expresión de α -Syn no se relaciona con un aumento de la apoptosis, sino con un aumento de oncogenicidad, observado en células de neuroblastomas SH-SY5Y. El trabajo de Caro-Astorga et al., (25) refiere el mecanismo que podría explicar el fenómeno anteriormente descrito, estos autores demostraron como la histidina decarboxilasa puede secuestrar el ciclo celular generando una perpetuación de la célula, siendo este proceso regulado por α -Syn.

I.4. Proceso de diferenciación de las neuronas DAérgicas del mesencéfalo

El desarrollo y progresión de las neuronas DAérgicas en los cerebros fetales requiere de la actuación de factores de transcripción regulados por gradientes morfogénos (véase esquema Anexo II) que estabilizan los patrones de expresión del gen en el tejido embrionario (27,28). El mesencéfalo es la región cerebral, donde existe el 75% de neuronas adultas DA (29,30). Tal como describe Arenas et al., (31) las neuronas se disponen en los dos núcleos principales, anteriormente comentados, la SNc y el área ventral tegmental (véase Figura 3 y 4). Los estudios en tejido mesencefálico de embriones de modelos animales han permitido la caracterización del desarrollo de células DAérgicas. Este proceso de desarrollo lo pivota principalmente el morfógeno Sonic

Hedgehog (SHH) y WNT1 (del inglés, “*wingless type mmtv integration site family, member 1*”). La acción de SHH y WNT1 modulan la activación de factores de transcripción como Foxa1/2 (del inglés. “*Forkhead box protein A1/A2*”) (32).

Los trabajos desarrollados en tejido embrionario muestran tres regiones en el suelo de la placa ventral del mesencéfalo, como son la zona ventricular, la zona intermedia y la zona marginal (31). Las neuronas progenitoras DAérgicas se localizan en la zona ventricular, y expresan los factores de transcripción Sox2 (del inglés: “*sex determining region Y*”), Ng2 (Neurogenina 2), Lmx1a/b (“*Homeodominio Lmx Factor de transcripción 1*”), Foxa 1/2, Mash 1 (del inglés: “*mammalian achaete-scute homolog-1*”), Otx2 (del inglés: *Orthodenticle Homeobox 2*). Posteriormente, las células progenitoras migran hacia la zona intermedia y sufren un proceso de diferenciación post-mitótico dando lugar a las neuronas precursoras de DA, o también considerados neuroblastos. Estos neuroblastos post-mitóticos expresan los factores de transcripción Nurr1 (receptor nuclear asociado 1), Lmx1a/b y Foxa 1/2, En1/2 (del inglés: “*Engrailed Homeobox 1*”), Raldh1 (retinaldehído deshidrogenasa 1) y Tuj-1 (β -III-Tubulina). Los neuroblastos migran hacia la zona marginal para diferenciarse en neuronas DA maduras (28) expresando los factores de transcripción Nurr1, TH y Pitx-3 (Homeobox 3 de la hipófisis).



I.5. Enfoques terapéuticos para el abordaje de la enfermedad de PD

Enfoques terapéuticos abordados en este apartado:

- I.5.1. Enfoque terapéutico mediante tratamiento farmacológico
- I.5.2. Enfoque terapéutico mediante tratamiento quirúrgico
- I.5.3. Enfoque terapéutico mediante tratamiento con factores neurotróficos:
GDNF
- I.5.4. Enfoque terapéutico mediante terapia génica
- I.5.5. Enfoque terapéutico mediante uso de la microbiota
- I.5.6. Enfoque terapéutico mediante tratamiento de terapia celular
 - I.5.6.1. Uso de las células heterólogas como tejido de reemplazo en la PD
 - I.5.6.2. Uso de células autólogas en las terapias de reemplazo de la PD
- I.5.7. Limitaciones técnicas en la remodelación.

El abordaje clásico de la enfermedad del PD se ha centrado en el tratamiento farmacológico y quirúrgico que resumiremos en el siguiente apartado. No obstante, se encuentra en creciente aumento el desarrollo de terapias que emplean factores que mejoren la viabilidad celular y reducen el estrés oxidativo, que muestran resultados esperanzadores tanto en modelos animales como en ensayos clínicos en pacientes con PD. Así mismo, los nuevos enfoques en el estudio microbiota intestinal, dan luz a nuevas perspectivas para el abordaje de la enfermedad del PD.

I.5.1. Enfoque terapéutico mediante tratamiento farmacológico

Los tratamientos actuales, están destinados a paliar los síntomas motores de la PD mediante el uso de fármacos que estimulen la producción de DA (33,34), como son el fármaco oral L-Dopa (L-3,4'dihidroxifenilalanina) conocido como Levodopa (Parkinson Study Group) (35). Este fármaco es el que presenta mayor efectividad sobre todo a la hora de controlar la bradiquinesia, no obstante, los pacientes a largo plazo muestran efectos secundarios asociados al tratamiento como fluctuaciones motoras y disquinesias. En la actualidad, la teoría de la neurotoxicidad de la L-DOPA (36,37) es controvertida, de hecho, la estrategia antigua de retrasar el inicio de la L-DOPA en favor de agonistas dopaminérgicos no está vigente hoy en día (38, 39,40). La asociación de dos fármacos; carbidopa (comercialmente conocida como Sinemet®) y la benseracina (comercialmente conocida como Madopar®) ambos inhibidores de la dopa carboxilasa, se han convertido en un importante avance en el tratamiento terapéutico de estos pacientes, por los resultados positivos en su administración. Estas sustancias actúan inhibiendo la metabolización de la L-Dopa por el organismo para favorecer la mayor asimilación por parte del al sistema nervioso central (41).

En un estadio inicial de tratamiento con la L-Dopa, todos los pacientes responden muy bien a la administración de este fármaco. Sin embargo, la administración durante un largo periodo de tiempo de L-Dopa, se relaciona con efectos no deseados que afectan al sistema nervioso central, como son disquinesias, alteraciones psiquiátricas, o procesos de fluctuación clínica donde se observa una disminución del tiempo de beneficio del



tratamiento terapéutico (42). Estas fluctuaciones pasan por periodos de “on” caracterizados por una función motora normalizada y con desaparición de los síntomas, y periodos de “off” cuya función motora se ve comprometida, y reaparecen los síntomas característicos del Parkinson (43).

Existen otros tratamientos en los cuales se administran agonistas del receptor DA, es decir, moléculas análogas que suplen las funciones de la DA: agonistas dopaminérgicos (44). A este grupo pertenecen la Pergolida (comercialmente conocido como: Pharken®), el Lisuride (comercialmente conocido como: Dopergin®); la bromocriptina (comercialmente conocida como: Parlodel®) y el Popirinol (comercialmente conocido como: Requip®) (34,45). El mecanismo de acción de estos agonistas es directamente sobre los receptores dopaminérgicos postsinápticos, es decir, no actúa directamente en el almacenamiento del neurotransmisor DA (46).

Tratamientos con *apomorfina*, son empleados en fases avanzadas y en casos severos de fluctuaciones (47). Este fármaco se utiliza mediante la administración subcutánea, y tiene como inconveniente el corto periodo de vida media, por lo que debe ser administrado en forma de infusión continua (48). Existen también los parches de *rotigotina*, otro agonista que emula el mismo efecto de la DA en el cerebro. Este tratamiento permanece estable durante 24 horas, sin oscilaciones. No obstante, como sucede con el resto de los análogos, presenta efectos secundarios como las náuseas, vómitos, discinesias, somnolencia, entre otros (49).



Caben destacar aquellos tratamientos cuya estrategia se basa en inhibir el metabolismo de la DA, potenciando la acción dopaminérgica por bloqueo de su degradación metabólica (50) como la Selegilina (comercializados como *Plurimen*®). Finalmente, existen tratamientos basados en la administración de anticolinérgicos (51), comercialmente conocidos como: Biperideno (*Akineton*®) y Trihexifenidilo (*Artane*®). Estos tratamientos se emplean principalmente en pacientes jóvenes con enfermedad incipiente, sin embargo, posee efectos secundarios como visión borrosa, estreñimiento, náuseas y mareos efectos que limitan su empleo en un espectro mayor de pacientes (52). El último tratamiento comercializado es la Opicapona, un inhibidor periférico, selectivo y reversible de la catecol-O-metiltransferasa (COMT), que actúa aumentando los niveles plasmáticos de la L-DOPA cuando se utiliza en combinación con levopa/inhibidores de la dopa decarboxilasa (53).

I.5.2. Enfoque terapéutico mediante tratamiento quirúrgico

Con respecto a los tratamientos para la PD, la gran mayoría de los pacientes presentan una buena respuesta al tratamiento durante 5 a 10 años. A partir de ese momento, debido a la progresión de la enfermedad y a los efectos secundarios de la medicación, existe un alto número de pacientes muy limitados por las fluctuaciones motoras y disquinesias. Todo ello hace que en fases avanzadas de la enfermedad los fármacos no actúan de manera efectiva, requiriendo una intervención quirúrgica.



Clásicamente, las intervenciones consistían en procedimientos ablativos, es decir generar una lesión en un núcleo concreto, siendo este un tratamiento irreversible (54). Los tratamientos ablativos principales son: la palidotomía estereotáctica guiada por microelectrodos y la talamotomía (núcleo ventrolateral) y, más recientemente, la lesión mediante ultrasonidos de alta frecuencia (55). Los procedimientos ablativos han sido sustituidos, en la mayoría de los casos por la estimulación cerebral profunda (56). Esta técnica se realiza empleando un marco estereotáctico (Marco Lexell o CRW, véase Figura 6) o con técnicas de neuronavegación donde no se requiere el empleo de marcos estereotácticos. Básicamente en la intervención quirúrgica lo que pretenden es, revertir el efecto en estadios avanzados donde las fluctuaciones y discinesias son severas (57).

En los años 60, se observó que un tratamiento de cirugía con talatomía del núcleo ventral medio, mejoraba los síntomas de temblores y la rigidez. El caso de la estimulación cerebral profunda, el procedimiento consiste en realizar un implante mediante electrodos en el núcleo subtalámico y el globo pálido, estos electrodos se encuentran conectados a un estimulador a nivel subcutáneo que puede ser controlados para mejorar el tratamiento y los síntomas (58). Estos tratamientos consiguen controlar síntomas de la enfermedad, así como permitir disminuir dosis de medicación, ofreciendo al paciente una mejor calidad de vida durante bastantes años. Sin embargo, tal como describe Nombela et al., (59) la enfermedad sigue progresando, y a la larga los pacientes volverán a presentar síntomas y complicaciones derivados de los tratamientos.



Figura 6. Marco Lexell o CRW empleado para la Neurocirugía de PD,
Imagen procedente de: “Marco de estereotaxia Leksell® Vantage™
Elekta” (<https://www.medicaexpo.es>)

I.5.3- Enfoque de tratamiento empleando factores neurotróficos

Las neurotrofinas o factores neurotróficos, son una familia de proteínas muy estrechamente relacionadas, cuyo efecto biológico está enmarcado en la estimulación de la proliferación de progenitores neuronales, por lo tanto, tienen una implicación clara en el desarrollo, así como en la supervivencia celular. A nivel funcional están implicadas en la plasticidad neuronal sináptica, en la capacidad inmune o la muerte celular tras daño del tejido neuronal, donde ejercen su acción tanto en el sistema nervioso periférico como en

el sistema nervioso central (60). Las neurotrofinas cumplen su función neurotrófica mediante la acción de los receptores de la familia tirosina quinasa (del inglés “*tyrosine receptor kinase family*”, familia TRK) cuya activación promueve una cascada de señales intracelulares que activan los diferentes mecanismos de acción celular de las neurotrofinas (61). Se ha podido determinar en sujetos con PD, como el desarrollo de actividad física incrementa la producción de factores neurotróficos mejorando la neuroprotección celular (62).

Los tipos de neurotrofinas más estudiadas son: el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, “*Brain derived neurotrophic factor*”), factor de crecimiento nervioso (NGF, “*Nerve growth factor*”) y factor neurotrófico derivado de glia (GDNF, “*glial derived neurotrophic factor*”), la neurotrofina 4 (NT4), la neurotrofina 3 (NT3), factores neurotróficos derivados de astrocitos mesencefálicos (MANF), y los factores neurotróficos dopaminérgicos cerebrales (CDNF, “*cerebral dopamine neurotrophic factors*”) (63).

Hoy en día, el mayor ensayo clínico desarrollado en pacientes con PD se ha realizado empleando un factor neurotrófico denominado factor neurotrófico derivado de la glia, (*glial derived neuro factor* GDNF) (64,65). Los primeros resultados del ensayo clínico empleando GDNF como factor neurotrófico mostraron una buena tolerancia al tratamiento. En la actualidad se continúa con el seguimiento de estos pacientes para conocer el verdadero alcance de la restauración celular (66).

I.5.4. Enfoque de tratamiento mediante terapia génica

Otras estrategias moleculares emplean terapia génica con la finalidad de intentar vehicular vectores genéticos insertos en virus, como los lentivirus o adenovirus (AAVs) cuya función es infectar a las células DA. Los vectores virales portan un promotor para expresarse e infectar exclusivamente en ese tipo celular, y una vez infectada la célula diana, ésta libera su contenido génico (ARN preferiblemente) para incrementar la producción de DA en el tejido SN o bien, para proteger a las células DA del daño, así como el aclaramiento de la α -Syn, tal como describe el trabajo dirigido por el investigador Laciengo (67) empleando vectores rAAV9 para el gen GBA1. Las estrategias que se proponen en este estudio versan sobre la estimulación o incremento de actividad glucocerebrosidasa (GCase), una enzima relacionada con la digestión lisosomal, cuya acción se relaciona con la reducción de la acumulación de la α -Syn. Estos autores describen una mayor supervivencia de neuronas DAérgicas tras el uso terapéutico del vector.

I.5.5. Enfoque de tratamiento mediante uso de la microbiota, el rol del microbioma en la PD.

El intestino humano es capaz de albergar decenas de billones de microorganismos, incluidas más de 1000 especies de bacterias (68). Se denomina microbioma a los genomas colectivos de los microorganismos que pueblan el intestino. Este genoma es cien veces

más grande que el cómputo total de genoma del ser humano. Diversos estudios como el de Zhernakova et al., (69) o como el de Treangen et al., (70) han avalado el importante papel de la microbiota en las funciones fisiológicas del ser humano, incluido en los procesos de reparación celular. En el marco de Pandemia de la COVID19, se los asoció a un papel relevante como biomarcadores de evolución de la enfermedad (71). Además, se han realizado estudios donde demuestran que existe una evidencia entre el fenotipo microbiano y la PD (72). Los estudios realizados sobre la microbiota intestinal mostraron una asociación entre los síntomas gastrointestinales como es el estreñimiento, y el anticipo de los signos motores de la PD, así como la inflamación del colon asociada a la PD (73). Los cuerpos de Lewy y la α -Syn se han encontrado en el intestino antes de aparecer en el cerebro. Por ello, se ha hipotetizado que la PD podría empezar en el intestino antes que en el cerebro y que, desde el intestino podría propagarse hasta el cerebro (74). El hecho de que exista un aumento de la permeabilidad de las membranas del intestino junto con la presencia de α -Syn en los estadios iniciales de la enfermedad, induce a sospechar que a través del sistema nervioso entérico se podría propagar la enfermedad hasta el sistema nervioso central (75). En trabajos publicados sobre el trasplante de microbiota fecal (TMF), donde se administran las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, los resultados han demostrado una atenuación de los síntomas de la PD, sobre todo en el caso de estreñimiento severo, (síntoma recurrente en la PD) (76). Los resultados preliminares publicados recientemente por Van Laar et al., (77), sugieren una mejoría de los síntomas motores y no motores de la PD estudiando el efecto de la



TMF en 15 pacientes. Los autores describen que la administración colónica presenta mejor respuesta que la administración nasofaríngea, apuntando a este tipo de administración como una nueva opción al tratamiento de la PD.

I.5.6. Enfoque terapéutico mediante terapia celular

Otra de las líneas de trabajo para abordar la PD es la terapia celular que emplea modelos de PD *in vivo* e *in vitro*. Para poder realizar los estudios de implante *in vivo*, se emplean modelos animales en los cuales se les induce una lesión similar a la que padecen los pacientes con PD. Las lesiones de vías nigroestriatales (Figura 3, véase región nigroestriatal) se provocan utilizando fármacos neurotóxicos específicos lo cual genera un modelo de PD ampliamente utilizado en este campo de investigación. En la actualidad, los modelos animales más utilizados son el modelo de 6-hidroxidopamina (6-OH DA) en la rata (78) y el MPTP en el ratón negro C57bl/6 y en primates (79,80). Para intentar restaurar células DA funcionales, se han empleado diferentes tipos de células madre de origen heterólogo, es decir procedentes de otro individuo distinto al hospedador.

I.5.6.1 Uso de las células heterólogas como tejido de reemplazo en la PD

En el área de la medicina regenerativa, dentro del tipo de células heterólogas que se han empleado se encuentran las células fetales/embrionarias humanas, incluyendo células embrionarias DAérgicas (81). El uso de células fetales embrionarias ha tenido un



éxito discreto en los ensayos clínicos en fase 1, donde se ha encontrado una elevada morbilidad y mortalidad en pacientes de edad avanzada (82). Este fenómeno se asocia en parte a los efectos secundarios, que supone un implante de tejido pluripotencial, definido como todo aquel tejido con capacidad de originar cualquier línea germinal del organismo y puede originar por sí mismo todas las estructuras celulares necesarias (83), como son los tumores asociados o las disquinesias producidas por el injerto (84).

Además, el empleo de células embrionarias humanas posee una serie de limitaciones ético-legales para el uso, lo cual lo hace inviable en muchos países. Otro de los tipos celulares utilizados son las células madre neuronales y células adultas neuronales multipotentes a partir de las cuales se ha conseguido originar células DAérgicas con éxito (81,82). Además de los mencionados, otro tipo celular que ha mostrado resultados prometedores como describe Wolf et al., son las células madre endometriales como alternativa para la restauración de células DAérgicas (85).

I.5.6.2. Uso de células autólogas en las terapias de reemplazo de la PD

Las células madre de origen autólogo empleadas pueden ser células madre mesenquimales procedentes de médula ósea (BMSC) (revisado por Rodriguez -losada N et al., (86), células circulantes endoteliales (EPC) cuyo origen puede ser tanto médula ósea roja o el hemangioblasto (83) y las células inducidas pluripotenciales (iPS) que se pueden obtener tanto de fibroblasto como de células endodérmicas (87). En este caso, el

empleo de iPS (88,89) evidenció que el uso de un cóctel de genes inductores de la diferenciación DAérgica establece con éxito una población de células DA funcionales. Estos estudios preliminares anteceden a los ensayos preclínicos para conocer la capacidad funcional de estas células iPS transformadas en neuronas DAérgicas para restaurar tejido afectado por la PD. Recientemente han demostrado (90) el rol regenerativo que poseen las células EPC empleadas como una herramienta eficiente para el implante dada su capacidad neuroprotectora.

El empleo de EPC en otras áreas biomédicas, como en el área cardiovascular, ha sido extenso (revisado por Rodríguez-Losada (86) obteniendo resultados positivos en base a la supervivencia del paciente, pero también negativos por ausencia o disfunción de la conductividad eléctrica en el corazón injertado (91). No obstante, en líneas generales, los resultados, aunque prometedores en modelos animales, siguen sin resolver el problema de la eficacia a largo plazo del implante y los efectos secundarios del propio implante (92).

I.5.7. Limitaciones técnicas en la remodelación de la función DAérgica empleando injerto

Los ensayos clínicos previos en terapias de reemplazo celular mostraron que ciertos injertos pueden restaurar la función dopaminérgica estriatal (93). Freed et al., (94) describieron la supervivencia de los trasplantes realizados y la generación de un alivio

sintomático adecuado en algunos pacientes durante más de una década después de la operación. Así mismo, Doi et al., (95) publicaron que las células iPS eran beneficiosas como tratamiento para la PD. Sin embargo, las iPS poseen una alta capacidad mutacional, un hecho que pone en cuestionamiento la viabilidad del uso en humanos (96). Por otra parte, las iPS estarían relacionadas con problemas relacionados con la capacidad para corregir la excitabilidad celular en tejidos como el corazón, el envejecimiento celular rápido y la desdiferenciación celular; de hecho, todavía no es segura la implantación de iPS en ciertos tejidos (97).

I.6. Materiales grafénicos y NGLC “*Nanocrystal glass carbon nanotube*” como candidatos para soportes celulares: empleo como neuroprótesis

El grafeno fue aislado y caracterizado en profundidad por primera vez por Novoselov y Giem, laureados con el premio Nobel de Física en el año 2010. A raíz de este descubrimiento (98), han sido muchos los estudios sobre la biocompatibilidad de éste en modelos in vitro y en modelos animales in vivo (99). Algunas formas alotrópicas, como grafeno, nanotubos, nanofibras (100), fullerenos, carbono amorfo, se consideran potenciales andamios para la regeneración celular (101-104), revisado por Rodríguez-Losada y Aguirre (105,106).

I.6.1. ¿Qué es el grafeno?

El grafeno es una forma alotrópica del carbono, al igual que son el diamante o el grafito (107). El aspecto más revolucionario del grafeno está en su estructura, siendo un material nanométrico bidimensional, consistente en una sola capa de átomos de carbono fuertemente cohesionados mediante enlaces que presentan hibridación sp^2 y dispuestos en una superficie uniforme, ligeramente ondulada, con una estructura semejante a un panal de abejas por su configuración atómica hexagonal. (véase Figura 7, reproducida por Liu et al., (108)). En 1986, Boehm y colaboradores emplearon el uso de la palabra grafeno para nombrar a las láminas individuales de grafito, revisado por Dreyer et al., (109).

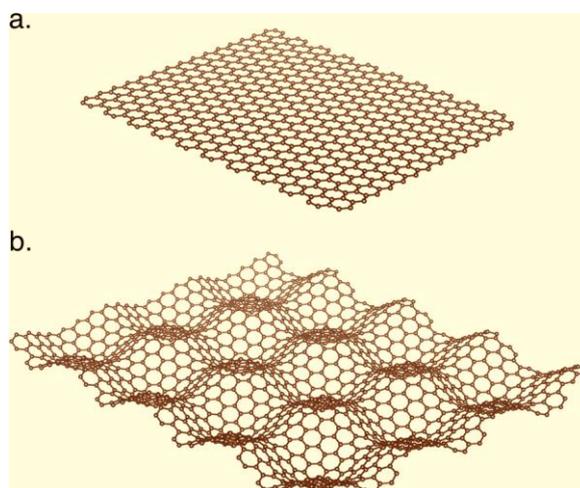


Figura 7. Estructura de Grafeno, Figura recuperada de Liu et al., (108).

Tal como describen Menéndez y Blanco (110), aunque el término grafeno hace referencia a un “hidrocarburo aromático policíclico infinitamente alternante de anillos de solo seis átomos de carbono”, actualmente en la literatura dicho término se aplica a agrupaciones de varias láminas de grafeno, refiriéndose a grafeno monocapa, bicapa o multicapa (menos de 10 capas), con propiedades diferentes y de gran interés para el desarrollo de nuevos materiales. La estructura del grafeno es precursora de otras formas de carbono como son, los fullerenos, los nanotubos y el grafito (véase Figura 8).

Los materiales grafénicos poseen una combinación de propiedades únicas, lo que los hace susceptibles de ser aplicados en el campo de la biomedicina. En primer lugar, hay que destacar su biocompatibilidad, ya que pueden ser empleado para el cultivo de modelos animales, como de líneas humanas (111), así como la biocompatibilidad demostrada en inyecciones directas de óxido de grafeno en modelos animales en cantidades bajas y medias de concentración (112). Una de las características más importantes a nivel biológico es su capacidad bactericida sin afectar al DNA humano (113).

El grafeno propiamente dicho, al ser una capa de un átomo de carbono de espesor es un material transparente (114), lo que lo convierte en un material muy atractivo para su uso como injerto ocular o de tejido (115).

El grafeno es un material muy duro (116) y tiene una resistencia mecánica cien veces superior al acero (42N/m grafeno vs 0.40 N/m acero) por lo que puede soportar

deformaciones del 10%, gracias a esta capacidad de deformarse podría acoplarse a tejidos no regulares.

Igualmente, es un excelente conductor eléctrico y térmico, propiedades muy interesantes para la generación de andamiajes de tejido nervioso o cardiaco (117). Además, tiene una gran capacidad de absorción de moléculas (118) por lo que es un material adecuado para la generación de chips de proteínas o DNA, o sondas de DNA /RNA etc. (119).

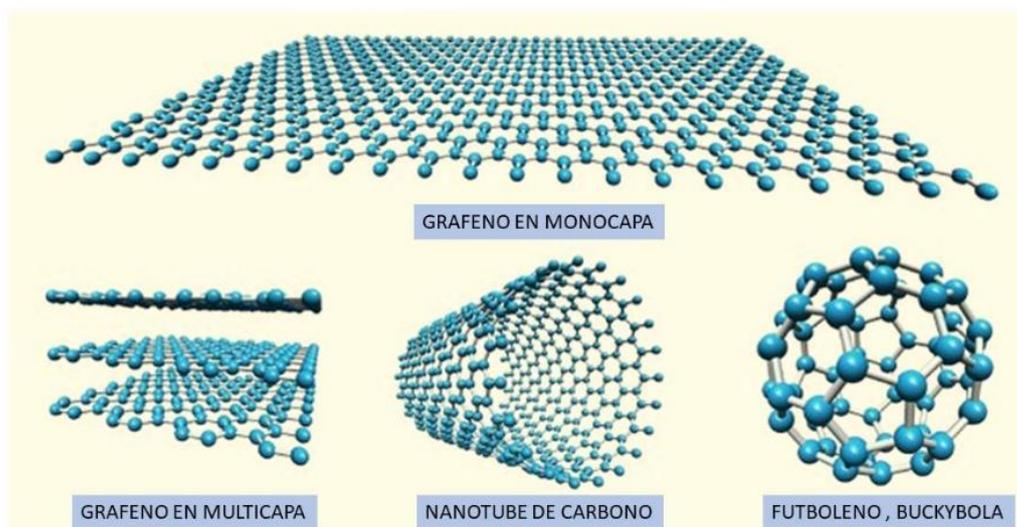


Figura 8 Estructuras derivadas de grafeno.
Recuperado de Lloyd-Hughes y Jeon, DOI: [10.1007/s10762-012-9905-y](https://doi.org/10.1007/s10762-012-9905-y)

I.6.2. Obtención del grafeno

Existen dos tipos de metodologías existentes para obtener grafeno:

- i) Las metodologías top-down que implican la “separación” de las capas de grafeno de estructuras tipo grafito ya existentes (el grafito está compuesto de muchas capas de grafeno).

En este grupo se engloban: exfoliación micromecánica, exfoliación química a través de la oxidación del grafito, exfoliación electroquímica y exfoliación/reducción térmica (120, 121).

- ii) Las metodologías bottom-up, que depositan capas de grafeno sobre determinados sustratos empleando hidrocarburos como fuentes de carbono. En este grupo se engloban: CVD (*chemical vapor deposition*), conversión química de CO₂, apertura de CNTs (*carbon nanotube*), descarga de arco, autoensamblado de surfactantes, crecimiento epitaxial sobre SiC y métodos solvotermales.

En la actualidad son numerosos los trabajos en los que se emplea la ruta química a partir del grafito para obtener numerosos materiales grafénicos (desde óxido de grafito a óxido de grafeno y materiales parcial o totalmente reducidos, lo que ofrece una amplia variedad de materiales con estructuras y propiedades químico-físicas diversas, haciendo susceptibles de aplicación en diversos campos de investigación (122, 123).



I.7. Qué es el “*Nanocrystal glass carbon nanotube*”, *NGLC*

El NGLC es una forma de carbono amorfo formado por nano-cristales de carbono. Estos nano-cristales tienen hibridación sp^2 y pueden formar fragmentos de diversos tamaños tipo fullereno, orientados aleatoriamente en función de la temperatura del procedimiento de síntesis empleado (véase Figura 8) (124-126). Sin embargo, visualizadas en conjunto estas estructuras muestran una apariencia vítrea que combina propiedades tan interesantes como la estabilidad a altas temperaturas, la extrema resistencia a la corrosión química, alta dureza, baja densidad, así como alta impermeabilidad a gases y a líquidos (125,126). Asimismo, estas películas delgadas de carbono amorfo son capaces de poseer la propiedad de transparencia, igual que las películas de grafeno y con un espesor similar a los grafenos de pocas capas mediante el procedimiento de pirolización (acción del calor) de una resina fotorresistente (127). Este material, por sus cualidades, ha sido empleado para realización de implantes neuronales flexibles de sensores de dopamina (128). Del mismo modo que el grafeno, los NGLC se caracterizan por disponer de una superficie específica excepcional debido a su alta densidad (129). Es característico que los nanocristales embebidos dentro de las matrices

de carbono amorfo, pueden ser inductores de un fuerte paramagnetismo atribuida a la presencia de un momento magnético en los bordes de la capa de grafeno (130). Una de las ventajas por las cuales empleamos el NGLC para este estudio es el hecho de que es más fácil de manipular y visualizar, además su proceso de producción favorece su capacidad de reproducción. Igualmente, el NGLC permite la delaminación parcial de las películas de carbono similares al vidrio (131).



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Esta memoria de tesis se enmarca en la corriente regenerativa neuronal. EL objetivo fundamental es generar unas condiciones microambientales óptimas, *in vitro*, con fines de reemplazo de tejido dañado dopaminérgico. Para lograr este fin, se pretende encontrar un material que favorezca la diferenciación y el crecimiento de neuronas DAérgicas.

La principal hipótesis de estudio se basa en que el establecimiento de este microambiente idóneo debe proporcionar no solo las células de reemplazo, células madre neuronales o neuronas adultas de sustitución, sino también los factores inductores de la diferenciación dopaminérgica, y además un sistema de soporte o andamiaje celular que permita la funcionalidad y capacidad neuronal y donde se favorezcan los procesos de neurodiferenciación para las células de sustitución a neuronas DAérgicas.

Así pues, esta hipótesis parte del hecho que ese soporte físico debe ser además biocompatible a largo plazo, en definitiva, un facilitador de la función neuronal, reproducible o escalable a nivel industrial para la aplicación biomédica. Es por ello, que se han elegido materiales idóneos, que contengan carbono en su estructura, como son los materiales grafénicos y el nanocrystalline glass-like carbon (NGLC) cuyas características fisicoquímicas les confieren la capacidad de facilitar el desarrollo y la neuroprotección de neuronas DAérgicas para ser empleadas en modelos de Parkinson. Esta hipótesis, se ampara en estudios previos con el uso del óxido de grafeno mostrados en la introducción, donde observa un aumento de neurogénesis en células progenitoras neuronales entre otros trabajos (132-139).

Se plantean las siguientes cuestiones:

- (i) Si estos materiales estudiados podrían ser adecuados para ser empleados a modo de prótesis neuronales, por tanto, si pudieran ser biocompatibles en cultivo celular durante un largo periodo de tiempo sin provocar procesos aberrantes como procesos neoplásicos.
- (ii) Si estos materiales pudieran favorecer el desarrollo de neuronas DA maduras, así como la funcionalidad neuronal entendida como un proceso de comunicación sináptica.
- (iii) Y, por otro lado, se cuestiona si estos materiales pudieran proteger a las células DAérgicas del ambiente citotóxico de la PD.

Para abordar estas cuestiones científicas y estudiar el efecto real que producen los diferentes materiales gráfenicos evaluados, así como el NGLC, se empleará una línea celular embrionaria estable (SN4741) que podría proporcionar información real tanto en la biocompatibilidad, como en la diferenciación y funcionalidad. Esta línea celular, por sus características propias comparte características embrionarias y dopaminérgicas, es decir, posee la concomitancia para alcanzar el fenotipo dopaminérgico. Además, al tratarse de un tipo clonal, SN4741, podría permitir conocer si los materiales estudiados facilitan o no la diferenciación neuronal.

A partir de la hipótesis formulada, los objetivos planteados son los siguientes:

Objetivo General: estudiar la biocompatibilidad de los materiales grafénicos (GO, PRGO, FRGO) así como NGLC. Y analizar el posible efecto biológico que pudieran tener sobre la línea celular embrionaria SN4741 en relación con los procesos de proliferación, diferenciación y función o disfunción neuronal, así como la posible capacidad neuroprotectora de los materiales cuando se reproduce in vitro las condiciones oxidativas del Parkinson.

Para poder alcanzar este objetivo general, se desarrollarán los siguientes objetivos específicos:



Objetivo específico relativo a los diferentes materiales grafénicos: GO, PRGO y FRGO:

1. Estudiar la biocompatibilidad de dichos materiales en las células SN4741, mediante ensayo de MTT y marcadores de citometría de flujo de vitalidad y mortalidad:
 - 1.1. Efecto biocompatible de los materiales en polvo (GO-p; PRGO-p y FRGO-p) a partir de los cuales se conformarán láminas(films) que se emplearán como soporte.
 - 1.2. Efecto biocompatible de las películas de los diferentes materiales (GO-f; PRGO-f y FRGO-f).
2. Estudiar la citoarquitectura celular y cambios morfológicos ocasionados por el cultivo con estos materiales.
3. Estudiar la disfunción celular bioenergética que pueda provocar cualquiera de los compuestos analizados como sustrato de andamiaje.
4. Estudiar la funcionalidad neuronal de los diferentes materiales grafénicos tanto en polvo como en forma de película.
5. Estudiar el efecto sobre la diferenciación dopaminérgica de los diferentes materiales grafénicos tanto en polvo como en forma de película.
6. Averiguar el efecto sobre la maduración neuronal DAérgica de los diferentes materiales grafénicos tanto en polvo como en forma de película.
7. Estudiar la capacidad neuroprotectora de los diferentes materiales grafénicos tanto en polvo como en forma de película mediante análisis de acumulación de α -Syn empleando rotenona como estresor y análisis del marcador de actividad neuronal cFos como marcador de funcionalidad neuronal cuando las células son cultivadas con el estresor y los materiales.

Objetivo específico para el material de carbono amorfo NGLC:

1. Estudiar efecto biocompatible del NGLC en polvo mediante MTT en las células SN4741, mediante ensayo de MTT y marcadores de citometría de flujo de vitalidad y mortalidad.
2. Estudiar la capacidad de adherencia celular, la citoarquitectura celular y cambios morfológicos ocasionados por el cultivo con NGLC.
3. Estudiar funcionalidad mediante análisis de proteínas relacionadas con el ciclo celular, proliferación y senescencia.
4. Estudiar capacidad neurodiferenciadora y de maduración mediante el análisis de los marcadores para célula DA madura y funcional.
5. Estudiar si la rugosidad o el espesor de las láminas de NGLC que se relaciona con características eléctricas, tienen algún efecto o cambio potencial en el comportamiento, maduración, funcionalidad o crecimiento de las células SN4741.



MATERIALES Y MÉTODOS

Resumen (ver Anexo III)

M. I. Metodología empleada y descrita para el estudio de los efectos de los diferentes materiales grafénicos

M.1. Síntesis de materiales grafénicos

M.2. Cultivo de células dopaminérgicas embrionarias: SN4741

M.2.1. Análisis del tiempo que tarda una célula SN4741 en duplicar su número en cultivo

M.2.2. Cultivo de células SN4741 sobre los diferentes materiales grafénicos en forma polvo y película

M.3. Análisis de la Viabilidad Celular de células SN4741 en exposición a los diferentes materiales grafénicos

M.3.1. Determinación mediante ensayo de MTT

M.3.2. Determinación mediante ensayo de Necrosis

M.3.3. Determinación de la disfunción bioenergética

M.3.3.1 Parámetros valorados en el ensayo de disfunción bioenergética

M.4. Análisis de la influencia de los diferentes materiales grafénicos sobre los mecanismos proliferativos

M.4.1. Ensayo de Ioduro de Propidio

M.4.2. Ensayo de Bromodeoxiuridina (BrdU)

M.4.3. Ensayo de Western-blot para determinación de proteínas relacionadas directamente con el ciclo celular: proliferación, quiescencia y senescencia

M.5. Análisis de la influencia de los diferentes materiales grafénicos sobre los mecanismos de diferenciación y maduración DAérgica

M.5.1. Ensayo de Western-blot para la determinación de proteínas implicadas en la diferenciación y maduración DAérgica

M.5.2. Ensayo de Inmunofluorescencia

M.5.3. Ensayo de expresión génica de genes implicados en la diferenciación y maduración DAérgica

M.6. Disfunción Neuronal

M.6.1. Estudio de la capacidad/habilidad neuroprotectora de los diferentes materiales grafénicos: análisis por Western-blot de α -Syn y c-fos en tratamientos con Rotenona

M.II. Metodología empleada y descrita para el estudio de los efectos de NGLC

M.7. Síntesis de NGLC

M.8. Cultivo de células SN4741 expuestas a NGLC

M.9. Ensayo de la viabilidad celular

M.9.1. Ensayo de la viabilidad celular y metabolismo de células SN4741 en exposición a NGLC mediante ensayo de MTT

M.9.2. Ensayo de la Viabilidad Celular de células SN4741 en exposición a NGLC (en forma de polvo y película) mediante ensayo de viabilidad y citotoxicidad LIVE/DEAD®

M.10. Ensayo de Western-blot para el estudio de proteínas implicadas en la proliferación y la diferenciación celular

M.11. Evaluación de la capacidad de las películas de NGLC para la diferenciación y maduración celular como andamio a largo plazo en cultivo: técnica de inmunofluorescencia

M.III. Análisis Estadístico

M.I. Metodología empleada y descrita para el estudio de los efectos de los diferentes materiales grafénicos

M.1. Síntesis de materiales grafénicos

El óxido de grafeno (GO) fue sintetizado por la empresa Abalonyx AS (Oslo, Norway), siguiendo protocolos estandarizados y recogidos en la literatura (140).

El GO se obtuvo a partir de grafito natural, siguiendo una modificación del método de Hummers y Offeman (141), empleado el permanganato de potasio como agente de oxidación.

Procedimiento

El GO se lavó con HCl para evitar la precipitación de manganeso como MnO_2 y a continuación fue centrifugado para formar una pasta acuosa.

La pasta fue mezclada con NaCl, y se secó de tal forma que al disolver el NaCl se obtuvo un andamio de GO en forma de película.

Las películas fueron usadas sin tratamiento térmico adicional para obtener una película GO, o bien se calentaron a $300^\circ C$ en aire (en atmósfera de N_2) para reducir parcialmente el GO (PRGO), o se trataron a una temperatura de $1100^\circ C$ en aire (en atmósfera de N_2) para obtener GO completamente reducido (FRGO) en forma de polvo o película o microescamas (producto de las películas trituradas).

Para la determinación de la química superficial de las películas se empleó la espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) a alto vacío además del empleo de la

microscopía electrónica de barrido convencional y ambiental (SEM) para el estudio de la morfología de los materiales, realizado en el Centro INA (Zaragoza, España).

Tabla 1. Materiales grafénicos empleados en la presente memoria de tesis

Acrónimo	Compuesto	Acrónimo	Compuesto
GO p	Óxido de Grafeno en polvo	GO f	Óxido de Grafeno en forma de película/film
PRGO p	Óxido de Grafeno Parcialmente Reducido en polvo	PRGO f	Óxido de Grafeno Parcialmente Reducido en forma de película/film
FRGO p	Óxido de grafeno totalmente reducido en polvo	FRGO f	Óxido de grafeno totalmente reducido en forma de película/film

**Nota aclaratoria:*

En este documento de Tesis se empleará el término anglosajón film para designar las películas o láminas de material empleado. El término de microescamas, define a las películas trituradas cuya microestructura difiere del polvo empleado para su fabricación.

M.2. Cultivo de células dopaminérgicas embrionarias denominadas SN4741

Las células dopaminérgicas SN4741 fueron aisladas de ratones transgénicos embrionarios por el grupo de Son et al.,1993 (142). Siendo su enclave para la obtención la SN, estos autores describen el modo de mantenimiento general de las células. Para los desarrollos experimentales se emplearon estas condiciones normales de cultivo como referencia estándar para el desarrollo experimental.

Procedimiento

Las células SN4741 se mantuvieron a 5% de CO₂ en atmósfera húmeda en medio de cultivo, que consistió en DMEM (Gibco) a 4,5g/L de D-Glucosa al 10% FBS ó FCS, y suero fetal de vaca o cabra (*Fetal bovine serum; Fetal calf serum*, Gibco) previamente inactivado a 37°C toda la noche o empleado 1 hora a 56°C.

El medio de cultivo se suplementó con los antibióticos penicilina y estreptomina (50 U/ml) y L-glutamina (2mM) y 1M piruvato sódico. Las placas de cultivo (Corning, Fisher) que se emplearon no requirieron de tratamiento adicional.

Previamente al uso a nivel experimental, las células cultivadas fueron analizadas para detectar la presencia de micoplasmas en contacto con las células empleando kit para la detección (Cell Culture Contamination Detection Kit C7028, Thermo Fisher Scientific, USA).

M.2.1. Análisis del tiempo que tarda una célula SN4741 en duplicar su número en cultivo

Para conocer el tiempo que tarda una célula SN4741 en doblar su número y emplear este dato para poder establecer el número inicial de células que son sembradas en función de la superficie de los soportes empleados, se estimó el tiempo de doblaje de las células SN4741. Este paso fue fundamental para evitar la confluencia celular en corto periodo de tiempo por exceso de número de células sembradas, así como para conocer los efectos de un cultivo de bajo número de células sembradas para comprobar si se ralentizaban los procesos metabólicos. Para poder observar el efecto celular que provocaban los materiales empleados, fue necesario obtener células activas metabólicamente, pero sin disparar la confluencia celular. Se sembraron 20000 células en placas de cultivo de 12 pocillos, y se realizó una cuantificación a tiempo 0 ($t=0$); a las 24 horas se cuantificaron las células de manera sucesiva durante 1 semana ($t=1$ hasta $t=7$). Las células se cuantificaron en un contador electrónico modelo Coulter Z2 (*Coulter Electronics*). Los datos fueron analizados empleando el programa *Doubling time* (<http://www.doubling-time.com/>), donde se obtuvo el tiempo medio de doblaje celular tras realizarlo en tres experimentos independientes, según la ecuación formulada a continuación (143).

$$\text{Tiempo duplicado} = \frac{\text{Duración} * \log(2)}{\log(\text{concentración final}) - \log(\text{concentración inicial})}$$



M.2.2. Cultivo de células SN4741 sobre los diferentes materiales grafénicos en forma de polvo y película

Las células control y células tratadas, con los diferentes materiales grafénicos tanto en polvo (GO-p, PRGO-p, FRGO-p) como en películas (GO-f, PRGO-f, FRGO-f), fueron cultivadas en medio de cultivo estándar (normal).

Se realizó un seguimiento y registro para analizar los efectos que a nivel morfológico y celular generó el tratamiento con los materiales estudiados.

En este primer paso experimental, se pone de manifiesto si el material empleado genera algún cambio morfológico visible a microscopía que pudiera indicar un proceso de diferenciación o, por lo contrario, un proceso de aberración celular o muerte por toxicidad.

Procedimiento

Los materiales grafénicos en forma de polvo fueron pesados y disueltos en medio de cultivo a la concentración de 1mg/ml y posteriormente se emplearon para los diferentes experimentos en un rango de concentración conocido.

Para poder emplear correctamente los materiales grafénicos en forma de película se trituraron a tamaño de microescamas por encima de un rango de 5-10 μm^2 , con el fin de evitar el proceso de genotoxicidad asociada a nanopartículas de materiales grafénicos de pequeño tamaño por debajo de las 5 μm^2 (144,145).



Se trataron con radiación ultravioleta a una longitud de onda de 185 nm durante 15 minutos con el fin de confirmar la ausencia de cualquier contaminación biológica en la muestra derivada de su manipulación (146). Después de dos semanas de tratamiento se tomaron fotografías y se analizaron los cambios morfológicos comparándolos con células SN4741 cultivadas en las mismas condiciones, pero sin material grafénico, en un tiempo respuesta entre el día 1 y el día 30 de cultivo. El análisis de los efectos morfológicos que pudieran derivarse de la exposición de las células a los materiales grafénicos evaluados, a una concentración conocida de 50 µg/ml en contacto con las células SN4741 fueron registradas mediante microscopio invertido, modelo TE2000-U unido a una cámara Nikon DS5MC empleando el microscopio Zeiss LSM700.

M.3. Análisis de la viabilidad celular de células SN4741 en exposición a los diferentes materiales grafénicos

M.3.1. Determinación mediante ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)

a) Fundamento, breve descripción metodológica

El ensayo de MTT (Roche, catálogo 11 465 007 001) se basa en la capacidad que tiene la mitocondria de reducir la sal MTT (tetrazolium) en un compuesto reducido de formazano, mediante la acción de la succinato deshidrogenasa y otras reductasas citosólicas (véase Figura 9, donde se representa de manera esquematizada el proceso).

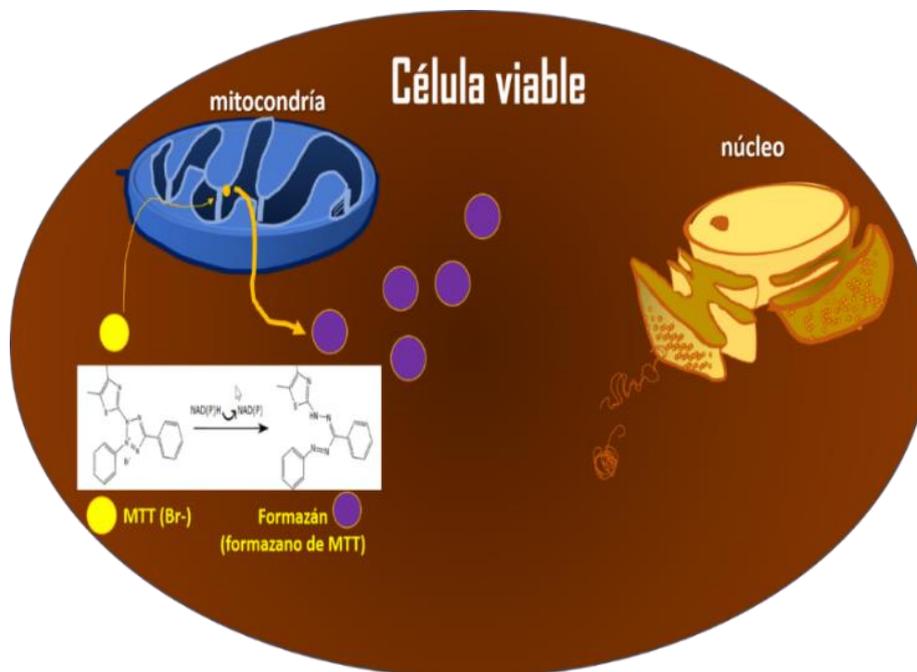


Figura 9. Esquema de funcionamiento de MTT. La figura muestra esquemáticamente como actúa el MTT, transformándose en formazán por actuación mitocondrial, dando lugar a un cambio colorimétrico de amarillo a violeta. (Imagen de elaboración propia).

Este proceso tiene como consecuencia, la liberación de formazano de MTT, visualizado en las células como pequeñas acumulaciones de sal de color violeta. Cuando se disuelven estas sales producidas por las células mediante un disolvente orgánico (isopropanol: HCl o SDS) el cambio colorimétrico muestra la actividad celular. Con lo que es posible medir el cambio de colorimetría mediante un espectrofotómetro a lectura de densidad óptica de 540 nm.

b) Procedimiento experimental



Se sembraron células SN4741 a una densidad conocida (Tabla 2) para cada tiempo respuesta de 24 horas, 3, 7 y 15 días en medio de cultivo normal en una placa de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific).

Tabla 2. Densidad de siembra celular analizada tras el estudio de doblaje celular

Densidad Celular	Días de cultivo	Placa de Cultivo
$1.75 \cdot 10^5$ células /cm ²	24	96
$6.7 \cdot 10^4$ células/cm ²	3	96
$6.7 \cdot 10^4$ células/cm ²	7	96
$3.3 \cdot 10^3$ células /cm ²	15	96

Las células fueron tratadas con los materiales grafénicos (GO-p, PRGO-p; FRGO-p; GOf, PRGO-f, FRGO-f) a una concentración de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 500 y 1000 µg/ml en medio de cultivo esencial DMEM sin fenolftaleína en condiciones normales. Para desarrollar la curva de concentración se utilizaron soluciones stock de los materiales grafénicos tanto en polvo como en película, de 2 mg/ml en medio DMEM sin fenolftaleína. Se emplearon triplicados por cada experimento (intraensayo) y al menos se realizaron tres experimentos de manera independiente (interensayo).



En cada experimento se contempló usar un control negativo, el cual consistió en células SN4741 sin tratamiento con GO y un control positivo, como control de células no viables que se fundamentó en células SN4741 cultivadas y tratadas con Tritón x-100 al 10%. Para el análisis se realizó una normalización de los datos en función de los resultados obtenidos del control negativo.

M.3.2. Determinación mediante ensayo de necrosis

Se dispuso del kit *LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay* (ThermoFisher Scientific, referencia L3224), para determinar el número de células vivas que habían captado la Calceína AM a 488 nm de longitud de onda, siendo detectadas por el detector en verde que es donde emite la Calceína AM. Además de manera simultánea se pueden visualizar las células no viables tanto necróticas como apoptóticas, mediante el marcador Etidium homodímero-1, que muestra la integridad de la membrana plasmática. Posteriormente, empleando la citometría de flujo, se pudieron discriminar las dos poblaciones celulares cuantificando el total de células vivas y muertas o no viables.

Procedimiento experimental

Se cultivaron una densidad de 2.4×10^4 células/cm² de SN4741 en placa de cultivo de 24 pocillos (Corning) empleando medio de cultivo normal con DMEM sin fenolftaleína. Posteriormente tras 12 horas de cultivo se renovó el medio de cultivo y a

continuación se añadieron los tratamientos: GO-p, PRGO-p; FRGO-p; GO-f, PRGO-f, FRGO-f, controles positivos (Tritón x-100 al 10%) y control negativo (sin tratamiento). Se empleó una curva de calibración de 1, 5, 10, 20, y 50 $\mu\text{g/ml}$. Se utilizó el citómetro BD Accuri™ para la recogida de los datos y el análisis de las muestras. Para el análisis se realizó una normalización de los resultados en función del control negativo.

M.3.3 Determinación de la disfunción bioenergética

El análisis de disfunción bioenergética se realizó mediante el analizador *Seahorse* XF [®]24 que tiene la capacidad de medir de manera simultánea el flujo de protones que son derivados de la glucólisis y la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial denominada OCR (“*oxygen consumption rate*”), lo cual establece un balance que proporciona un perfil bioenergético de células vivas.

El analizador *Seahorse* tiene como ventaja la capacidad de detectar cambios en la función metabólica en tiempo real, proporcionando una ventana en los primeros eventos del cambio metabólico que permiten ser registrados.

En este análisis, se emplea Rotenona y Antimicina A, como inhibidores de la cadena transportadora de electrones dentro de la mitocondria, en concreto el complejo I y III de la cadena transportadora de electrones (Figura 10). Además, se emplea la oligomicina que inhibe el complejo V de la ATP sintetasa y el FCCP (carbonil cianida-

4- trifluorometoxi fenilhidrazona) que desacopla el consumo de oxígeno de la producción de ATP.

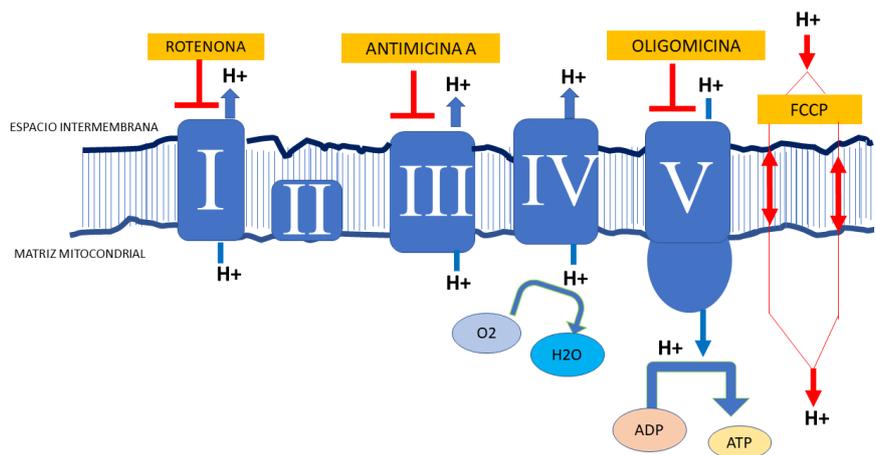


Figura 10. Cadena transportadora de electrones mitocondrial. Imagen inspirada en <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/seahorse-xf> (Imagen de elaboración propia, N. Rodríguez-Losada).

M.3.3.1. Parámetros valorados en el ensayo de Disfunción Bioenergética medidos en el en *SeaHorse*

I.- Consumo de Oxígeno (“*Non-mitochondrial Respiration Oxygen consumption*”) procedente de la respiración no mitocondrial, se emplea como parámetro para medir aquella respiración que persiste a pesar de estar bloqueado el complejo I y III debido al efecto de la Rotenona y Antimicina A.



II.- Respiración Basal por consumo de Oxígeno (“*Basal Respiration Oxygen consumption*”) muestra la demanda energética de la célula en condiciones basales. En concreto mide el oxígeno utilizado en satisfacer la demanda celular de ATP y resultante de la fuga de protones mitocondriales. Es decir, este parámetro fue empleado para comprobar la demanda celular de ATP que es resultante de la fuga de protones mitocondriales (H⁺, Figura 10).

III.- La Tasa de Respiración Máxima (“*Maximal Respiration*”), se define como la tasa máxima de consumo de oxígeno que la célula puede lograr cuando es agregado el desacoplador de electrones FCCP.

El FCCP, actúa imitando una demanda de energía que estimula la cadena respiratoria para que funcione a la máxima capacidad de demanda. Como consecuencia, se genera una rápida oxidación de los sustratos como azúcares, grasas o aminoácidos, los cuales cumplen con las necesidades metabólicas.

IV.- Capacidad de reserva respiratoria (“*Spare Respiratory Capacity*”), es una medida que indica la capacidad que posee la célula para responder de manera activa a la demanda energética, mostrando la capacidad o flexibilidad de la célula a dar esta respuesta.

V.- Ratio de producción de ATP (“*ATP Production rate*”), es un parámetro que mide el ATP producido por las mitocondrias para satisfacer las necesidades energéticas de la célula. Y para ello se empleó oligomicina, tratamiento que inhibe el ATP sintetasa, con la finalidad de medir la disminución en la tasa de consumo de oxígeno que experimentó



la célula. Se representó la porción de la respiración basal que se estaba utilizando para impulsar la producción de ATP.

VI.- Fuga de H⁺ (Protón) (“*H⁺ (Proton) Leak*”), midió la respiración basal no acoplada a la producción de ATP. La fuga de protones podría ser un signo de daño mitocondrial o podría usarse como un mecanismo para regular la producción mitocondrial de ATP.

Procedimiento

Se empleó la ratio del consumo de oxígeno (*Oxygen consumption rate (OCR)*) para medir la actividad metabólica de las células mediante el analizador *Seahorse XFe24 Extracellular Analyzer* (Agilent). Las células fueron sembradas en las placas de 24 pocillos, XFe24Cell Culture Microplates (Agilent), a una densidad de $1.8 \cdot 10^5$ células/cm². Transcurridas 12 horas de la siembra, las células fueron lavadas con XF Medio Basal (Agilent) que contenía 25 mM glucosa, 4 mM glutamina, y 1 mM piruvato sódico. Posteriormente las placas se incubaron durante una hora a 37°C en ausencia de CO₂ previo al inicio del desarrollo experimental. Se realizaron 4 medidas basales para desarrollar el experimento antes de la adición de 1 μM de oligomicina, 0.6 μM de FCCP y 1 μM actinomicina-A, y 1 μM de Rotenona (Rot). Se realizaron tres medidas entre las diferentes inyecciones de los fármacos. Dentro del protocolo diseñado para la toma de datos, en cada ciclo, se tomaron las mediciones tras un tiempo de mezcla de 3 minutos, y uno de espera de 2 minutos. Posteriormente, la adquisición de los datos se tomó tras 3 minutos. Los



datos se normalizaron con respecto al contenido de proteínas de las células obtenidas por el ensayo de Bradford (Bio-Rad).

M.4. Análisis de la influencia de los diferentes materiales grafénicos sobre los mecanismos proliferativos

M.4.1. Ensayo de Ioduro de Propidio

a) Fundamento del ensayo, breve descripción

El ioduro de propidio (IP), es un marcador que tiene afinidad por el material genético nuclear, porque se intercala entre la molécula de ADN, de manera inespecífica. Este marcador emite una señal a una longitud de onda de excitación/emisión máxima de $\lambda = 536/617$ cuando se une al ADN. Esta señal puede ser detectada por el citómetro de flujo, en el detector FL-2 (Forward-scattered Light 2 Area). El detector de FL-2 de ADN emite una señal recogida por el equipo que muestra la cantidad de ADN obtenida por cada célula que pasa de manera independiente por el citómetro de flujo. Como resultado, se genera un diagrama que representa la cantidad de ADN que hay en la fase G1/G0 cuando la célula no ha entrado todavía en fase de división celular, y por tanto su ADN no está amplificado; la fase S de síntesis de ADN y la fase G2/M de mitosis celular, donde se observa un incremento del ADN de doble cadena producto de la duplicidad de este. El citómetro permite hacer ventanas “gates” y seleccionar cada fase del ciclo celular dando



un porcentaje relativo de señal emitida por el detector. Para poder teñir adecuadamente el material genético, se emplea etanol al 70%, Tritón x-100 y RNAsas.

b) Procedimiento experimental

Las células SN4741 fueron crecidas en una densidad inicial de 1×10^4 células/cm², y permanecieron bajo el tratamiento con los diferentes materiales grafénicos, control positivo y negativo durante 3 y 7 días en cultivo respectivamente. Transcurrido este tiempo se subclonaron las células, empleando Tripsina/EDTA (0,25%) (Thermo Fisher Scientific) durante 2 minutos en incubador celular. A continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm y se resuspendieron en PBS (phosphate buffer saline, tampón de solución salina, Gibco), Posteriormente, se fijaron con etanol al 66% en hielo durante 2 horas, se lavaron y se incubaron con 0,25% de Tritón X-100 durante 30 minutos. Finalmente, se incubó la solución de IP 50 µg/ml en PBS y RNasa 100 µg/ml (Thermo Fisher Scientific) en PBS, durante 30 minutos en incubación a 37 °C en oscuridad. La reacción fue leída en un lector Becton Dickinson FACsort en el canal FL-2 (con una excitación del láser de 488 nm). El ciclo celular y las fases de distribución fueron determinadas mediante citometría de flujo (Dako cytometry) y empleando el programa Summit v4.3.02. Los datos mostrados fueron normalizados empleando la muestra control sin tratar.

M.4.2. Ensayo de Bromodeoxiuridina (BrdU)

a) Fundamento, breve descripción

El ensayo de BrdU, se basa en la incorporación de BrdU en vez de timidina en la cadena de DNA, de tal manera que durante la síntesis de DNA que se requiere para la mitosis celular, la célula incorpora nucleótidos para sintetizar nuevas cadenas de DNA para la amplificación del material genético. Una vez que la célula incorpora la molécula de BrdU, es posible reconocerla empleando un anticuerpo anti-BrdU. Para ello, es fundamental favorecer el acceso del anticuerpo al núcleo de la célula y la estrategia se basa en una fijación con Etanol que favorece la fijación nuclear y la permeabilización del núcleo, mediante el ácido clorhídrico y una solución tensoactiva como el Tritón X-100.

b) Procedimiento experimental

Las células SN4741 fueron cultivadas sobre cubreobjetos para cultivo celular, a una densidad de 1.3×10^4 células/cm² durante 3 días; a una densidad de 4×10^3 células/cm² para 5 y 7 días en placa de 13mm en ausencia y presencia de los materiales grafénicos (GO; PRGO; FRGO en polvo and película) a una concentración de 50 µg/ml.

Se trataron las células con 10 µM de BrdU durante 4 horas, y posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Se lavaron con 70% de etanol durante 20 minutos y con 4N HCl durante 2 minutos. Finalmente, las células fueron bloqueadas usando un 2% de suero de caballo.

El anticuerpo primario anti-ratón BrdU (Sigma-Aldrich) fue incubado a 1:75 durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas durante 3 veces con PBS con incubaciones intermedias de 10 minutos.

El anticuerpo secundario anti-ratón FITC (488 nm) fue usado a una concentración de 1:500. Los cubreobjetos fueron montados en gel de montaje (Flourescent Mountain gel, Agilent-Dako) y visualizados en microscopio de fluorescencia modelo Zeiss LSM700 con cámara TE200-UNikon DS5MC (Servicios Centrales, Universidad de Málaga).

M.4.3. Ensayo de Western-blot para determinación de proteínas relacionadas directamente con el ciclo celular: proliferación, quiescencia y senescencia

a) Fundamento del ensayo, breve descripción

De manera resumida, la técnica de western-blot o inmunoblot (inmunotransferencia), consisten en una separación electroforética de las proteínas en función de su tamaño eliminando el gradiente iónico de las proteínas (147). Para ello, se emplean soluciones como el agente tensoactivo, el dodecilsulfato sódico (SDS, $M_r=288,38$) y el agente reductor como ditiotretol (DTT, $M_r=154,25$) o β -mercaptoetanol (2-mercaptoetanol, $M_r=78,13$). Cuando las proteínas se disponen en un campo eléctrico

con diferencia de potencial eléctrico, todas ellas migran hacia el polo positivo permitiendo distinguir las mediante peso su molecular. A su vez, se emplea un “Ladder” una escalera de proteínas, que establece un peso molecular conocido con lo cual es posible extrapolar el peso molecular del Ladder de proteína al peso concreto de cada proteína. Para conseguir la separación adecuada de las proteínas desnaturalizadas y cargadas negativamente, se requiere de una matriz que permita su migración en función de su tamaño. Para ello, se emplea un agente de reticulación, la poliacrilamida, esta está compuesta del monómero acrilamida (C_3H_5NO ; $M_r = 71,08$) y del dímero de la bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida ($C_7H_{10}N_2O_2$; $M_r = 154,17$)). El gel se constituye de la combinación de ambas, acrilamida:bisacrilamida mediante su polimerización (Malke, Maniatis y Sambrook, 1989,147). La polimerización, se genera principalmente por a la adicción de amoniopersulfato (APS, $N_2H_8S_2O_8$; $M_r = 228,2$) como iniciador, así mismo el TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina ($C_6H_{16}N_2$; $M_r = 116,21$)) como propagador de la polimerización del gel.

El porcentaje de acrilamida:bisacrilamida varía en función de las necesidades experimentales, en el desarrollo experimental de esta tesis se ha empleado un porcentaje de 1:29. Igualmente, porcentaje de concentración del gel fabricado está relacionado con el tamaño del poro por el cual migrarán las proteínas estará en función del tamaño de proteínas que el desarrollo experimental requiera separar, en este caso particular, el gel de resolución empleado para las proteínas analizadas en esta tesis requirió ser de un porcentaje de acrilamida:bisacrilamida del 10% (147). El medio acuoso que favorece la

migración proteica se compone de soluciones tampón como TrisHCL/Glicina (Tris (hidroximetil) aminometano ($C_4H_{11}NO_3$; $M_r = 121,14$); ácido aminoacético ($C_2H_5NO_2$; $M_r = 75,07$)) y a la presencia de SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$; $M_r = 288,38$).

Una vez separadas las proteínas por migración, las proteínas se transfieren, a una membrana (PVDF o nitrocelulosa) que permite la hibridación con anticuerpos específicos. Este proceso se realiza mediante un “sándwich” que permite la migración proteica, donde a través de una diferencia de potencial eléctrica se consigue una migración de las proteínas desde el polo negativo (gel) hacia el polo positivo (membrana). Esta transferencia se consigue mediante el empleo de una solución que contiene un componente tampón (Tris-HCL/Glicina) que contiene sales y metanol, como agente transferente.

Tras el bloqueo de la membrana, se procede a la hibridación con los anticuerpos primarios específicos y los secundarios que se encuentran unidos a un enzima quimioluminiscente como la peroxidasa de rábano picante (HPR, horseradish peroxidase) o la fosfatasa alcalina (AP) que cuando son excitados mediante un sustrato que desprende una señal luminosa, la cual puede ser recogida en una película fotográfica, o bien, por un equipo fotográfico específico para su captación (Thermo Fisher), estos sustratos son capaces de excitar desde femtogramos a picogramos (ELC sustrate-West Pico Plus, Thermo Fisher).

b) Procedimiento experimental



Tanto las células control como las células SN4741 tratadas con GO y los diferentes subtipos (a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$) fueron cultivadas en placas de pocillos de 90 mm durante 3 y 7 días a una densidad de $5,3 \times 10^3$ células/ cm^2 y $2,4 \times 10^3$ células/ cm^2 respectivamente.

Las células se lavaron dos veces con PBS (1X) y se lisaron usando 100 μL de tampón RIPA (Thermo Fisher) con inhibidores de proteasas (1% NP - 40, 0,5% de desoxicolato de sodio, 0,1% de SDS, 100 mU/ g / ml de PMSF, 30 mU l / ml de aprotinina y ortovanadato de sodio 1 mM). Los lisados celulares, se recogieron mediante raspado, se transfirieron a tubos de microcentrífuga, se pasaron a través de una aguja de calibre 21 y se centrifugaron a 16000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Los lisados, (un total de 40 μg), se calentaron a 95°C durante 5 minutos en tampón Laemmli 1x (Sigma-Aldrich) y luego se analizaron por electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida (147) (SDS-PAGE, TGX™ Staining -Free Fast Cast™, Biorad) 10% a un voltaje de 15V/cm por 1 hora.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF para inmunotransferencia y se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente en el tampón de bloqueo, que contenía leche en polvo desnatada al 5% en tampón TBS (Tween-20 al 0,1% en TBS al 0,1%). La incubación con los anticuerpos específicos para detección se realizó de la siguiente manera. Primero, el anticuerpo primario contra P27-Kip (27 kDa, Abcam) se incubó a 1:5000 a temperatura ambiente durante 2 horas.



Los anticuerpos primarios siguientes fueron incubados toda la noche a 1:1000 y una temperatura de 4°C: el anticuerpo ciclina E (50 kDa, Abcam) que se corresponde con una proteína que inicia el proceso de división celular en el ciclo celular. Además, se utilizó la PH3-Ser10 (20 kDa, Abcam), una proteína de unión a la cromatina que marca la transición de la fase de síntesis a la fase G2 del ciclo celular. Igualmente se empleó el anticuerpo qKI67 (Millipore, 360kDa), una proteína que marca de manera específica la mitosis, es decir la fase G2 del ciclo celular, el anticuerpo PCNA (36 kDa, Abcam) aparece expresada en la fase del ciclo celular G2 / M y la proteína SP30 (30 kDa, Santa Cruz) que está involucrada en procesos senescentes.

Para todos los casos se empleó β -actina (42 kDa, Sigma) que permite la normalización de la cantidad de proteína total. La detección de proteínas se realizó con los anticuerpos secundarios correspondientes (1:10000) diluidos en el tampón de bloqueo.

Las señales, de emisión de los anticuerpos acoplados, fueron detectadas con sistemas ECL (Thermo-Fisher, Rockford, EE. UU). Las imágenes y la cuantificación de las bandas se analizaron utilizando Image Lab 4.0.1 y el programa Fiji / ImageJ en tres experimentos diferentes.

M.5. Análisis de la influencia de los diferentes materiales grafénicos sobre los mecanismos de diferenciación y maduración DAérgica

M.5.1. Ensayo de Western-blot para la determinación de proteínas implicadas en la diferenciación y maduración DAérgica

Procedimiento experimental

Las células SN4741 a una densidad de $2,4 \times 10^3$ células / cm^2 se trataron con los diferentes materiales en estudio (GO-p; PRGO-p; FRGO-p; GO-f; PRGO-f; FRGO-f) a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ durante un período de 21 días. Las células sin tratar se cultivaron durante 7 días. Se realizaron los experimentos en placas de cultivo de 60 mm. La detección de proteínas se realizó con anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo: anti-TH (60 kDa; Nobus biológicos), anti-DAT (80 kDa; clon DAT-Nt, Millipore), anti-sinaptobrevina (13 kDa; clon 69.1, Synaptic Systems Gotinga, Alemania), anti-sinaptofisina (38 kDa; Sinaptofisina, clon SY38, Chemicon) y anti-GIRK2 (48 kDa; Nobus biológicos). Todos los anticuerpos primarios (1:5000) se incubaron a 4°C durante la noche en un agitador y luego se agregó el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano (1:10000) diluido en tampón de bloqueo. Se detectaron señales con sistemas ECL (Thermo-Fisher, Rockford, EE. UU.). Las imágenes y la cuantificación de las bandas se analizaron con el programa NIH Fiji-ImageJ (148).

M.5.2. Ensayo de Inmunofluorescencia

a) Fundamento del ensayo, breve descripción

En resumen, el ensayo de inmunofluorescencia es una técnica que se basa en la detección de antígenos mediante anticuerpos específicos. Para poder detectarlos se emplea un anticuerpo que lleva conjugado un fluorocromo (F), por lo que donde exista unión específica antígeno-anticuerpo se encontrará la detección de una señal específica, que puede ser recogida por un detector (véase Figura 11 explicativa del ensayo). El método para detectar la señal varía según el ensayo, pero el fundamento es el mismo. Los métodos que emplean microscopía de fluorescencia se realizan mediante la excitación del F unido a un anticuerpo. La excitación del F genera una absorción de energía a una determinada longitud de onda específica (espectro de excitación), y cuando las moléculas del F regresan a su estado de relajación emiten una señal de menor energía y de mayor longitud de onda (espectro de emisión). Esta señal es visible según el espectro de emisión del F, que será observada por el experimentador en un microscopio convencional de fluorescencia de color rojo, verde, azul, violeta, amarilla (etc.), y esto dependerá del tipo de F que será elegido dependiendo del desarrollo experimental (FITC, Alexa-fluor 488: luz emisión verde; Rodamina, Alexa-fluor 555: roja, DAPI: azul; GFP: proteína verde fluorescente, etc.). La microscopía de fluorescencia confocal permite la lectura de una muestra en una dimensión de densidad y espesura determinada ya que el láser empleado para detectar la señal realiza un barrido en toda la densidad “Z” determinada por el

experimentador. El método que emplea la lectura de células individualizadas, fijadas o vivas, es el citómetro de flujo. La citometría de flujo emplea el mismo fundamento, pero en este caso las células deben de ser individualizadas antes de su lectura, dando información de la complejidad celular y del tamaño. Los métodos cromatográficos de fluorescencia permiten el empleo de esta tecnología a través de un soporte físico, y la detección se realiza en solución líquida (suero, plasmas, sobrenadantes). Comercialmente, hay anticuerpos primarios que directamente están unidos a un F, por lo que no se requiere de un anticuerpo secundario unido a éste (inmunofluorescencia directa). Estos anticuerpos están ampliamente empleados en citometría de flujo. O bien, se emplean anticuerpos primarios específicos de epítomos que se conjugan con anticuerpos secundarios con un F que reconoce a los primarios (inmunofluorescencia indirecta). Esta segunda opción permite jugar con los F y sus distintas longitudes de onda para detectar diferentes señales en una misma muestra.

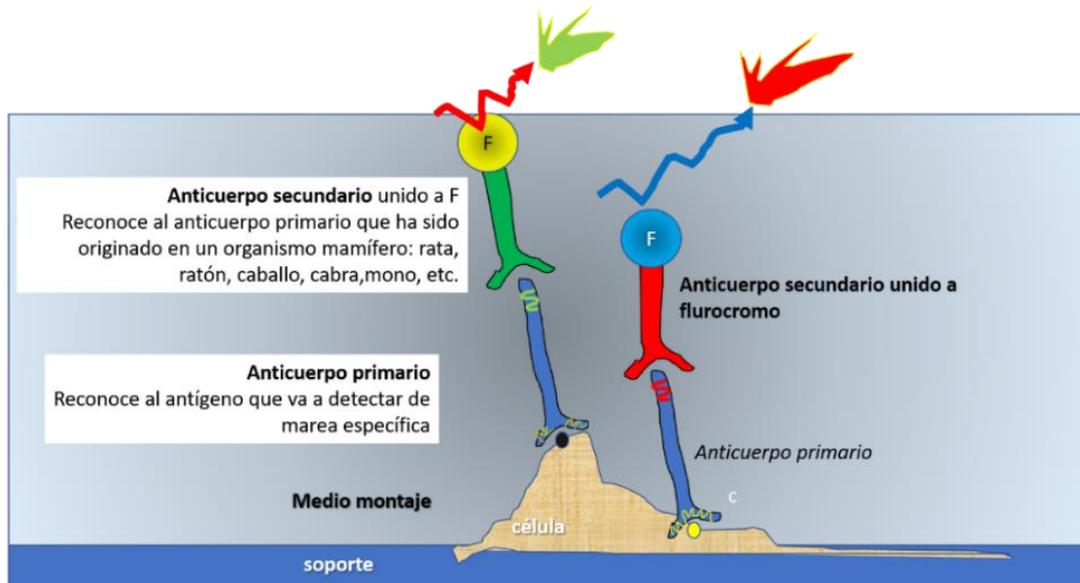


Figura 11. Esquema modelo de la reacción de inmunomarcado específica. Inmunofluorescencia indirecta (esquema de elaboración propia).

b) Procedimiento experimental

Las células SN4741 tratadas los diferentes materiales fueron incubadas y crecidas sobre cubreobjetos, a una densidad de $2,4 \times 10^3$ células / cm^2 durante 21 días.

Las células control no tratadas se fijaron en el día 7 in vitro, debido a que a partir de una semana de cultivo las células alcanzan su confluencia máxima y empiezan a morir.

La fijación celular se realizó con paraformaldehído al 4% (p/v) (Sigma-Aldrich) en PBS 0,1 M y pH 7,4 durante 20 minutos, y posteriormente se enjuagó tres veces con PBS y se permeabilizó con 0.1% Tritón X-100 en PBS. Seguidamente, las células se

bloquearon con suero de cabra normal al 5% (NGS, Invitrogen) en PBS con BSA al 3% (Invitrogen). Los anticuerpos primarios se usaron a una concentración de 1:100 en PBS con BSA al 3% durante la noche a 4°C.

Se usaron los siguientes anticuerpos: conejo anti-Tirosina Hidroxilasa (TH, Nobus biológicos), ratón anti-Tuj-1 (beta-III tubulina 1, Promega), cabra anti-GIRK2 (canal de potasio rectificador interno regulado por la proteína G 2 proteína, Abcam), rata anti-DAT (transportador transmembrana DA, Millipore).

Después de la incubación, las células fueron lavadas en PBS con Tween-20 al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 488 cabra anti-ratón o Alexa Fluor 555 cabra anti-conejo), fueron incubados durante 2 horas 1:500 a temperatura ambiente en PBS con 3% de BSA.

Las células fueron lavadas durante 1 hora en PBS con Tween-20 al 0,1% y después se tiñeron con DAPI (marcador de núcleo, Sigma-Aldrich) a 1:200 durante 15 minutos a temperatura ambiente. El análisis del coeficiente de colocalización para la microscopía de fluorescencia para cuantificar las interacciones de proteínas se realizó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (PCC) utilizando el programa Fiji-ImageJ plugin Col2 (149). La región de interés (ROI) para el análisis de colocalización se utilizó después de un proceso de desconvolución para reducir el fondo (150) de todas las imágenes confocales (Zeiss Confocal). Con el fin de reducir el fondo aleatorizado, se evaluó el



coeficiente de costes en todos los análisis (complemento Colo2) confirmando que la correlación entre las proteínas no dependía de artefactos.

M.5.3. Ensayo de expresión génica de genes implicados en la diferenciación y maduración DAérgica

a) Fundamento del ensayo, breve descripción

El ensayo de expresión génica contempla el aislamiento de material genético (ARN mensajero, ó secuencias de ADN complementario, ADNc) y la amplificación de una secuencia específica empleando pequeñas secuencias complementarias a modo de cebadores. La reacción es desarrollada por una enzima polimerasa (Taq-polimerasa, Biorad) que trabaja sobre la secuencia de ADN a unas temperaturas concretas (la enzima empleada en este estudio trabajó a 42 °C). Por tanto, empleando ciclos de temperatura de desnaturalización y enfriamiento, se activa la enzima polimerasa y se amplifican secuencias específicas. Actualmente, los equipos a tiempo real permiten la detección in situ mediante el empleo de sondas unidas a señalizadores fluorescentes (sondas Taqman, Applied Biosystems) o mediante moléculas que emiten una señal fluorescente cuando se unen a doble cadena de ADN (SYRBgreen, Roche). Cuando se amplifica la secuencia de un transcripto que dará lugar a una proteína, ese ARN mensajero o transcripto debe de ser retrotranscripto a ADN nuevamente para que la Taq-polimerasa pueda desarrollar la



reacción PCR. Las enzimas que retrotranscriben denominadas retrotranscriptasas inversas (superscript Reverse Transcriptase, Invitrogen) amplifican a temperaturas próximas al cuerpo humano, por ejemplo, 40°C, y generan el ADNc.

b) Procedimiento experimental

Las células SN4741 fueron sembradas a una densidad de $2,4 \times 10^3$ células / cm² en pocillos de 60 mm por triplicado durante 2 semanas en condiciones normales y se trataron materiales grafénicos usando una concentración de 50 µg/ml a largo plazo en cultivo (21 días). Las células incubadas en condiciones normales sin grafeno durante 7 días fueron empleadas como control negativo.

La extracción de ARN y la RT-PCR para obtener el ADNc correspondiente a partir de 200 ng de ARN se llevaron a cabo utilizando el kit RNase (Qiagen) y la *Superscript Reverse Transcriptase* (Invitrogen) y Oligo (dT) 16 (Promega, Madison, EE. UU). Se establecieron las siguientes condiciones de incubación y ciclos, como muestra en la Tabla 3, este protocolo desarrollado en termociclador (Applied Biosystems):

Tabla 3. Ciclos empleados para RT-PCR

TEMPERATURA (°C)	Tiempos (minutos)	Ciclos
25	10	1
42	60	1
70	15	1
4	∞	

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) se realizó utilizando un sistema de PCR en tiempo real AB 7500 (Applied Biosystems). La amplificación se realizó según lo recomendado por los fabricantes (ver Tabla 4) utilizando 20 μ L de la mezcla de reacción con 10 μ L de SYBR Green I Universal Taq Mix (Roche Diagnostic, Suiza), 0.25 μ M de cebadores apropiados y 2 μ L de ADNc. Se utilizaron las siguientes secuencias de cebadores mostrados en la Tabla 5. Cada experimento de RT-qPCR fue realizado por triplicado para el análisis de cada gen. Los datos fueron analizados conforme lo descrito por Pfaffl et al., (151).



Tabla 4. Ciclos empleados para RT-qPCR (PCR cuantitativa, “*quantitative PCR*”)

TEMPERATURA (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
95	600	Activación Enzimática, (Holding Stage)
95	15	40 ciclos, amplificación (Cycling Stage)
55-60	60	
95	10	Curva de Fusión, (Melt Curve Stage)
60	60	
95	15	
60	15	

Tabla 5. Secuencias cebadoras

Gen	Secuencia FW (orientación 5'-3')	Secuencia RW (orientación 5'-3')
<i>Pitx3</i>	5'-TTCCCGTTTCGCCTTCAACTCG-3'	5'-GAGCTGGGCGGTGAGAATACAGG-3'
<i>Limx1b</i>	5'-GGCACGAGGAGTGTTTGCAGT-3'	5'-GTTTGCAGTACAGTTTCCGATCC-3'
<i>Limx1a</i>	5-TTGCACTCTCGCAC-3'	5'-GCCTGCTTGCCGAAT-3'
<i>Tuj1 b-II- Tubulina</i>	5'- CCATTCAGAGTAAGAACAGTAGTTA CT-3'	5'- GGATGTCACACACCGCTACCTT-3'
<i>Th</i>	5'- GCTGGAGGATGTGTCTCACTTCTT-3	5'- CAGAAAATCACGGGCAGACAGTA-3
<i>Dat/Slc6a3</i>	5'-GCCATGTACCCCAGGAAGGA-3'	5'- CTACCGTCTTCGTGAGGCAT-3'
<i>Nr4a2/Nurr</i>	5'- CAGCTCCGATTTCTTAACTCCAG- 3'	5'- GGTGAGGTCCATGCTAAACTTGA-3
<i>Gadph</i>	5'- GAGAAACCTGCCAAGTATGATGA- 3'	5'- AGACAACCTGGTCCTCAGTGTA-3'

M.6. Disfunción neuronal

El entorno micromolecular donde las neuronas DA están afectadas por la enfermedad del PD, es un microambiente seriamente dañado donde el potencial de estrés oxidativo está incrementado, y por tanto, en este entorno fisiopatológico, los materiales grafénicos deben de responder a la pregunta de si ellos potencian este ambiente neurotóxico disfuncional, que incrementa, por ejemplo, los niveles de α -Syn, o por el contrario, si son capaces de conferir a las células cierta protección y, por lo tanto, disminuir dichos niveles. Para responder a estas preguntas se ha ideado la siguiente metodología experimental descrita a continuación.

M.6.1. Estudio de la capacidad/habilidad neuroprotectora de los diferentes materiales grafénicos: análisis por Western-blot de α -sinucleína y c-fos en tratamientos con rotenona

Se cultivaron las células SN4741 para todas las condiciones a una densidad de 2×10^3 células / cm^2 durante 7 días. Posteriormente, las células se trataron con rotenona $1,2 \mu\text{M}$ (Rot) en DMSO al 0,1% durante 24 horas como se describió previamente por Rodríguez-Losada et al., (25). La expresión de α -Syn se midió mediante Western-blot usando un anticuerpo monoclonal de α -Syn (clon Syn S211 peso molecular: 18 KDa; Thermo Fisher) y c-Fos (peso molecular de aproximadamente 62 kDa descrito pero

previsto alrededor de 46 kDa; Abcam) como marcador involucrado en la regulación de la actividad de genes con actividad y función neuronal y neuroplasticidad (152).

M.II. Metodología empleada y descrita para el estudio de los efectos de nanocrystalline glass-like carbon (NGLC)

M.7. Síntesis de NGLC

a) Fundamento del ensayo, breve descripción

El NGLC, es considerado un buen ejemplo de material de carbono desordenado con hibridación sp^2 . Su producción fue desarrollada por R. Guzmán de Villoría (Investigador Principal, Universidad de Salamanca) y P. Romero del IMDEA Materiales (Madrid, España). El NGLC se utilizó en forma de películas delgadas transparentes con diferente grado de espesor controlado para el cultivo de células embrionarias DAérgicas. En concreto, se estudió la influencia del espesor de las diferentes láminas producidas sobre las condiciones biológicas o funcionales de las células cultivadas. Este procedimiento, al contrario de la obtención de GO, PRGO y FRGO, es un procedimiento optimizado específicamente para esta tesis, por tanto, el protocolo para su obtención se detalla a continuación.



b) Procedimiento obtención de películas delgadas de NGLC

Las películas delgadas de NGLC fueron producidas siguiendo el protocolo publicado previamente por Romero et al 2016 (120). Las películas de NGLC fueron derivadas de la síntesis controlada por depósito químico en forma de vapor a presión atmosférica (CVD) en láminas de cobre a partir de las cuales también se obtuvo polvo de NGLC. El proceso de CVD consistió en la descomposición térmica de una fuente de carbono (C_2H_4) a $850^{\circ}C$ sobre una lámina de cobre ($22 \times 60 \text{ mm}^2$) en una atmósfera controlada de argón e hidrógeno. Se emplearon tres composiciones de gases diferentes para obtener diferentes películas de NGLC con diferentes espesores controlados (valores en sccm, $Ar / H^2 / C_2H_4 = 500/20/20, 300/120/120$ y $0/70/70$ correspondientes a $\sim 5 \text{ nm}$, 20 nm y películas de 80 nm de espesor).

Posteriormente, se transfirieron las películas de carbono sintetizado a polímero de polimetacrilato de metilo (PMMA) diluido en anisol (495 PMMA Resists, Microchem). Para ello, se realizó previamente una distribución homogénea de 0.5 ml de PMMA en la parte superior de la película de “carbono/ lámina de cobre” usando una pipeta desechable de plástico. Se dejó secar al aire (12 horas) para evaporar el disolvente y se repitió el proceso 2 veces más.

Este proceso dio como resultado un espesor de película de PMMA de $20\text{-}40 \mu\text{m}$. Luego, el sistema de “PMMA/ película de NGLC/ cobre” se colocó en un baño de ácido (disolución estándar de cobre, Alpha Aesar) para disolver la lámina de cobre. El PMMA se colocó en el fondo y se sumergió totalmente en el baño ácido. Se reemplazó todo el



ácido disolvente de cobre por uno nuevo, y después de 2 horas se dejó sumergido durante 24 horas. La película de “material de carbono o NGLC/ PMMA” resultante se limpió eliminando el ácido disolvente de cobre con agua desionizada, reemplazando el agua 5 veces. A continuación, se limpió en el baño de agua desionizada durante 24 horas. Posteriormente se tomó la muestra (con la película de carbono mirando hacia arriba y la película de PMMA hacia abajo) y se atrapó con una película transparente limpia (PVC A4 180 μm CE011880E) dejando secar durante 24 horas. Finalmente, se cortó la muestra en una superficie de $\sim 8 \times 8 \text{mm}^2$, empleando una cuchilla.

Para poder llevar a cabo la evaluación del efecto del PMMA y la rugosidad del cobre, se prepararon dos muestras de referencia. El primer paso fue la preparación de la muestra de “PMMA/cobre” siguiendo el proceso de transferencia descrito anteriormente, usando una muestra de cobre en bruto que no se había introducido en el reactor CVD (proceso de película sin carbono).

También fue preparada una muestra de cobre siguiendo el mismo proceso de síntesis de CVD para hacer crecer una película de NGLC pero con una composición de gas diferente ($\text{Ar}/\text{H}_2/\text{C}_2\text{H}_4 = 1000/20/0 \text{sccm}$) (película de carbono tratada térmicamente). Al no eliminarse ningún hidrocarburo durante el proceso de CVD, esta muestra de “película de carbono tratada térmicamente” no tenía un NGLC encima, pero imitaba la aspereza del cobre producida durante el proceso de CVD, y correspondería a la muestra control. Por otro lado, se obtuvo polvo de NGLC como material para testar la citotoxicidad y potencial genotoxicidad de las células en contacto con este material.

c) Producción de polvo de NGLC

La producción de polvo de NGLC fue realizada mediante un CVD sobre una lámina de cobre enrollada (10x30 cm²) empleando una concentración de gas de Ar / H₂ / C₂H₄ = 100/20/20 durante 60 minutos.

El CVD resultante fue consecuencia de la deposición de una película de carbono de ~ 300 nm de espesor. Para producir la dispersión de polvo de NGLC, se introdujo una película de NGLC de 300 nm de espesor depositada sobre cobre en un baño de etanol. Mediante la acción de ultrasonidos de alta energía (1 minuto, 40% de amplitud y 1 pulso por segundo, Vibra-Cell 500 W) la película fue separada y rompiéndose en forma de escamas o copos. Posteriormente se analizaron las películas de NGLC por microscopía electrónica de transmisión (JEOL JEM 3000F), tanto las películas como el polvo por microscopía electrónica de barrido (EVO MA15, Zeiss) y la espectroscopía Raman con láser verde Nd: YAG (532 nm, Jasco, NRS-5100).

Los materiales fueron comparados con una lámina comercial de grafeno de alta pureza depositada en una oblea de silicio (Graphenea, España). La topografía de la superficie del compuesto de película "NGLC/ PMMA" se caracterizó por microscopía de fuerza atómica (AFM) en condiciones ambientales (Park XE150). Las imágenes se adquirieron en modo "sin contacto" (PPP-NCHR, Park System) con un punto de ajuste de la punta de aproximadamente ~ 30-40 nm y amplitudes entre ~ 25-45 nm con una velocidad de exploración de 0.50 Hz. Las imágenes obtenidas (512x512 píxeles y áreas de 10 μm²) se procesaron y analizaron utilizando el programa XEI (versión 1.7.1).

M.8. Cultivo de células SN4741 expuestas a NGLC

El cultivo de SN4741 sobre las películas de NGLC o en contacto con el polvo, se realizó en un rango de concentraciones de 1, 5, 10, 20 and 50 $\mu\text{g/ml}$ con el fin de conocer el efecto citotóxico y neurodiferenciador del polvo en disolución. Previamente a su empleo en cultivo, las películas y los polvos de NGLC se irradiaron con radiación ultravioleta a una longitud de onda de 185 nm y se confirmaron la ausencia de micoplasma en el cultivo empleando un kit comercial para ello.

Las células se cultivaron en las películas con tres diferentes espesores de 5nm, 20nm y 80nm. Se desarrolló un seguimiento de la evolución morfológica de las células mediante microscopía invertida empleando TE2000-U unida a una cámara Nikon DS5MC y un microscopio Zeiss LSM700. Se empleó un tiempo respuesta de 24 horas posteriores hasta los 30 días de cultivo para la determinación de los efectos de NGLC. Para ello, se emplearon células control sin tratar y para las películas se emplearon unas películas sin el carbono amorfo pero que reproducían el tratamiento termal y la rugosidad de la película.



M.9. Análisis de la viabilidad celular

M.9.1. Ensayo de la viabilidad celular y metabolismo de células SN4741 en exposición a NGLC mediante ensayo de MTT

Para medir la activación del metabolismo celular en la viabilidad, las células SN4741 se expusieron a diferentes concentraciones de nanoflakes de NGLC. Los controles consistieron en células cultivadas sin NGLC. Los tratamientos se aplicaron por triplicado a las 24 horas, 3 y 7 días a concentraciones de 0 $\mu\text{g/ml}$ (control), 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$. En todos los casos, se usó una solución madre (2mg/ml) en medio esencial sin fenolftaleína. Las microescamas se suspendieron en DMEM a la concentración de stock (2 g / l). Los experimentos se realizaron en placas de 96 pocillos (Corning) utilizando 2500 células por pocillo cultivado en DMEM suplementado con 10% de penicilina estreptomicina FCS (1000 U / ml) y se incubaron a 37°C en CO₂ humidificado al 5%. El análisis de MTT se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche, ensayo del kit MTT) utilizando un control positivo con 10% de tratamiento con Tritón X-100 (15 minutos) y un control negativo sin Tritón X-100 ni NGLC. La reacción se leyó usando un lector de luminiscencia BioTek a una longitud de onda de prueba de 570 nm con una longitud de onda de referencia de 630nm. El análisis de viabilidad se consideró como una tasa de viabilidad: 100 - (control positivo de muestra con Tritón X-100 (10%) x 100% como se describió previamente en el protocolo de Roche para el ensayo de viabilidad MTT.

M.9.2. Ensayo de la viabilidad celular de células SN4741 expuestas a NGLC mediante ensayo de viabilidad y citotoxicidad LIVE/DEAD® en película y en polvo

Para este análisis, se emplearon las células SN4741 cultivadas en multipocillos (6 pocillos, Corning) (150000 células por pocillo) con microflakes de NGLC a la misma concentración (1-50 $\mu\text{g/ml}$) en el ensayo MTT, realizándose el experimento por triplicado. Después de 24 horas, 3 y 7 días de cultivo, las células se procesaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células teñidas se contaron por citometría de flujo utilizando el programa BD Accuri TM para el análisis. Además, se realizaron estudios de microscopia de inmunofluorescencia *in vivo* de células cultivadas en microflakes de NGLC, para validar la técnica. Las imágenes se obtuvieron utilizando una microscopía invertida TE2000-U unida a una cámara Nikon DS5MC y un microscopio Zeiss LSM700.

M.10. Ensayo de Western-blot para el estudio de proteínas implicadas en la proliferación y la diferenciación celular

La detección de proteínas fue realizada empleando los anticuerpos primarios contra el antígeno nuclear de células proliferativas anti-conejo policlonales (PCNA) (1:5000) y la anti-tirosina hidroxilasa policlonal de conejo (TH, Sigma-Aldrich) (1:1000). Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C durante la noche en un agitador con anticuerpo



conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:10000) diluido en tampón de bloqueo. Se detectaron señales con sistemas ECL (Thermo Fisher, Rockford, EE. UU.). Las imágenes y la cuantificación de las bandas se analizaron utilizando el programa Fiji-ImageJ.

M.11. Evaluación de la capacidad de las películas de NGLC para la diferenciación y maduración celular como andamio a largo plazo: técnica de inmunofluorescencia

Las células SN4741 fueron cultivadas en la parte superior de las películas de NGLC (espesor de 5, 20 y 80 nm) durante 15 días, y los controles se fijaron con paraformaldehído al 4% (p / v) en PBS 0,1 M, pH 7,4 durante 20 minutos, enjuagados tres veces con PBS y permeabilizados con 0.1% Tritón X-100 en PBS. Las células se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (NGS, Invitrogen) en PBS en BSA al 3% (Invitrogen). Se emplearon los siguientes anticuerpos: anti-Sinaptofisina (Sinaptofisina, clon SY38, Chemicon) y anti-GIRK2 de cabra (proteína del canal 2 de potasio del rectificador interno regulado por proteína G) (Abcam). Los anticuerpos marcadores primarios se usaron a 1:100 en PBS con BSA al 3% durante la noche a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron en PBS Tween-20 al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 488 cabra anti-ratón; Alexa Fluor 555 cabra anti-conejo) se incubaron con células durante 2 horas a una

concentración 1:500, RT, en PBS con BSA al 3%. Las células se lavaron durante 1 hora en PBS en Tween-20 al 0,1%, y finalmente, se tiñeron con DAPI (marcador nuclear, Sigma) a 1:200 durante 15 minutos a temperatura ambiente. El análisis del coeficiente de colocalización para microscopía de fluorescencia para cuantificar las interacciones entre proteínas específicas se realizó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, mediante el programa de procesamiento de imágenes Fiji-ImageJ. El contador de células totales (por número de marcaje nuclear, DAPI) en cada película se realizó usando el contador de partículas, *Plugging Counter Particles*; (Fiji-ImageJ, Schindelin et al., 2012, 148).



M. III. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como media \pm SD (desviación estándar, del inglés “*standard derivation*”). El mismo experimento fue repetido al menos 3 veces, excepto el ensayo del ciclo celular que se repitió 2 veces. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa de análisis de datos GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Para la comparación de la significación estadística entre dos grupos, se emplearon las pruebas t de Student (después de la validación de la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Levene) para datos paramétricos. Se usó la prueba de ANOVA de una vía o dos vías, con la prueba post hoc de Fisher para datos no paramétricos. El análisis del coeficiente de colocación empleado en microscopía de fluorescencia para cuantificar las interacciones de proteínas se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson, como describieron anteriormente Dunn et al., (149), utilizando el programa Fiji-ImageJ. Se consideró estadísticamente significativo a partir de un valor de $p < 0,05$. Los datos se analizaron utilizando el programa de análisis de datos GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM).



RESULTADOS

Resumen

R.I. Resultados empleando materiales grafénicos

R.1. Resultados acerca de la estructura y composición química de los diferentes materiales grafénicos

R.2. Resultados relativos al efecto que los diferentes materiales grafénicos ejercen sobre la morfología celular y arquitectura en SN4741

R.3. Resultados obtenidos del estudio de viabilidad celular

R.4. Proliferación celular

R.4.1. Ensayo de ciclo celular

R.4.2. Ensayo de 5´-Bromo 2- deoxiuridina (BrdU)

R.4.3. Análisis de proteínas relacionadas con el ciclo celular

R.5. Resultados relacionados con el metabolismo mitocondrial y bioenergético

R.6. Resultados relacionados con la diferenciación neuronal y DAérgica

R.7. Efectos neuroprotectores de los materiales grafénicos contra la neurotoxina dopaminérgica: Rotenona

R.II. Resultados relacionados con la capacidad diferenciadora y la citotoxicidad del nanocrystal glass like carbon (NGLC)

R.8. Resultados del estudio de la estructura y propiedades físico-químicas del NGLC

R.9. Efectos del NGLC sobre en las células SN4741. Análisis de la morfología y distribución celular

R.10. Comparación de la viabilidad y la actividad metabólica celular

R.10.1. Resultados del ensayo de MTT

R.10.2. Resultados del ensayo de viabilidad y muerte celular empleando Calceína AM y Homodímero de Etidio-1 (EthD-1)

R.11. Ensayos de proteína para cuantificación de proteínas implicadas en la proliferación

R.12. Maduración celular

R.13. Películas de NGLC evaluadas como andamios celulares

R.13.1. Análisis de la morfología y la distribución celular en células cultivadas sobre películas NGLC

R.I. Resultados empelando materiales grafénicos

R.1. Resultados acerca de la estructura y composición química de los diferentes materiales grafénicos

Los cambios en la morfología de la película de GO-f, de PRGO-f y FRGO-f se muestran en la Figura 12A. Se observa se observan las corrugaciones típicas de este tipo de materiales, como consecuencia de su propio proceso de obtención. En el estudio morfológico de las láminas, no se observaron cambios evidentes con respecto a la morfología de las películas de PRGO-f y de FRGO-f. Sin embargo, se evidenció como FRGO-f mostró pequeños puntos claros (menores de 10 nm de diámetro) en la superficie. Este fenómeno, pudiera ser producto de la temperatura de reducción de la película FRGO-f, que es significativamente más alta que la de la película de PRGO-f (1100 °C y 300 °C, respectivamente). Por consiguiente, se pudieron haber formado partículas de carbono u otras impurezas durante el proceso de reducción.

Para evaluar la efectividad del proceso de reducción y composición de las películas (Figura 12B), se analizó la relación O 1s /C 1s obtenida mediante XPS (Pei y Cheng, 2012). El O/C de la película GO-f disminuyó de 0.37 a 0.19 cuando se redujo a 300°C en argón (PRGO-f). Los datos mostraron que cuando la temperatura de reducción aumentaba a 1100 °C, la presencia de oxígeno disminuyó significativamente a solo 0.04 O/C para FRGO-f (Figura 12B), que muestra la efectividad de este proceso de reducción. Para FRGO-f, se comprobó igualmente como la presencia de nitrógeno y azufre se había reducido. Sin embargo, para todas las películas, tanto el nitrógeno como el azufre estaban por debajo de la concentración atómica del 1%.

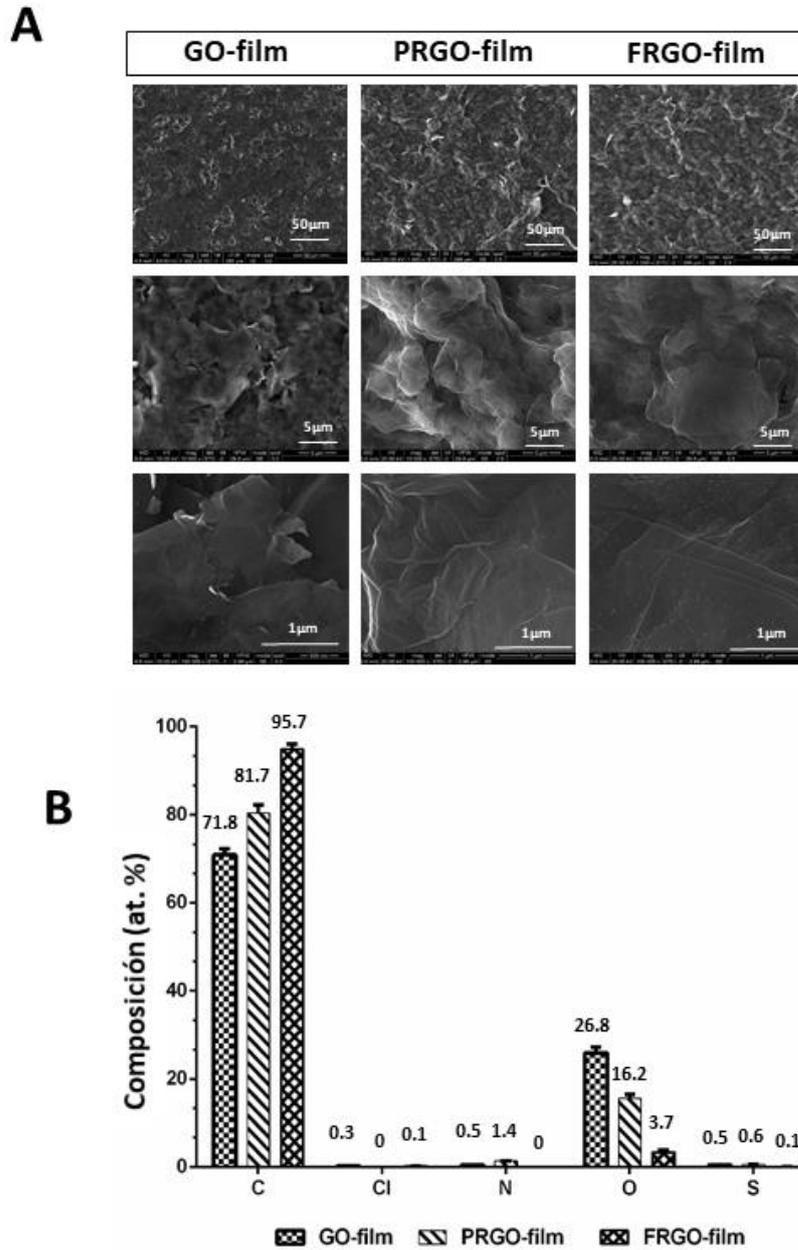


Figura 12. Estructura y composición de diferentes materiales grafénicos. (A) Micrografías de microscopía electrónica convencional de barrido de las películas GO (GO-f), GO parcialmente reducido (PRGO-f) y GO totalmente reducida (FRGO-f) a diferentes aumentos (1000x, 10000x y 100000x). (B) Composición química (átomo: at.%).

R.2. Resultados relativos al efecto que los materiales grafénicos ejercen sobre la morfología celular y arquitectura en SN4741

Estos resultados muestran el efecto de los materiales evaluados sobre las células SN4741 cuando son tratadas durante largo tiempo en cultivo (30 días) empleando una concentración de 50µg/ml con los distintos sustratos (Figura 13). Cabe señalar que en el análisis morfológico de las células control, no fue posible registrar el seguimiento a largo tiempo en cultivo. Y esto fue debido a que su comportamiento clonal inducía a las células a un proceso de proliferación ilimitado, hasta adquirir la confluencia celular. Este proceso disparó los procesos apoptóticos y necróticos detonando la muerte celular y evidenciando un aumento progresivo de cuerpos celulares en flotabilidad. Y, por tanto, el análogo comparativo del cultivo control vs cultivos con grafeno de células SN4741, en el mismo tiempo respuesta de registro, sería con células deterioradas. Motivo por el cual, se tuvieron que emplear registros de células control con 7 días de cultivo para muestras control. Este hallazgo, que evidenciaba los cambios morfológicos de las células mantenidas en placa, mostrando procesos neuronales propios de neuronas adultas, fue el paso previo para investigar y demostrar si realmente se favorecía o se inducían los procesos de diferenciación y de maduración celular, por lo que las células dejarían de comportarse como células tumorales (control) y madurarían a linaje neuronal DA cuando se tratan con GO y subtipos. En los ensayos por microscopía óptica se pudo observar un cambio en la morfología y citoarquitectura en los cultivos con materiales grafénicos

(Figura 13). Estos cambios estructurales se aproximaban a una morfología cercana a la de una neurona madura con producciones neuronales como son los botones axonales al final de las terminaciones celulares, o un alargamiento del cuerpo neuronal similar a las estructuras axonales. Además, se observaron procesos de arborescencia similares a las estructuras presinápticas, para permitir incrementar los contactos entre las células. En especial estos procesos fueron evidenciados en cultivos donde se había empleado PRGO y FRGO.

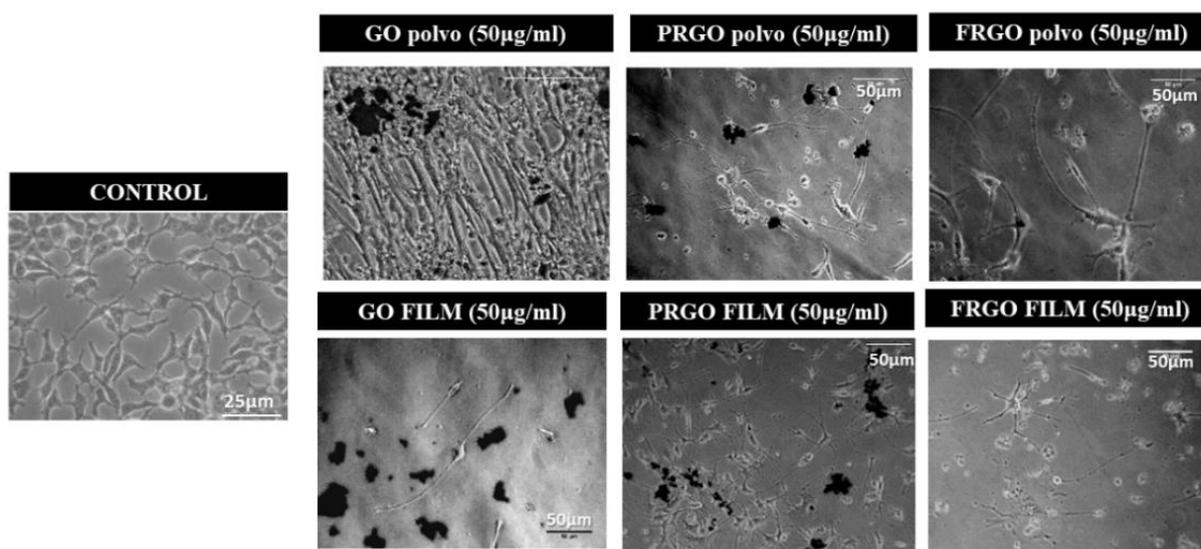
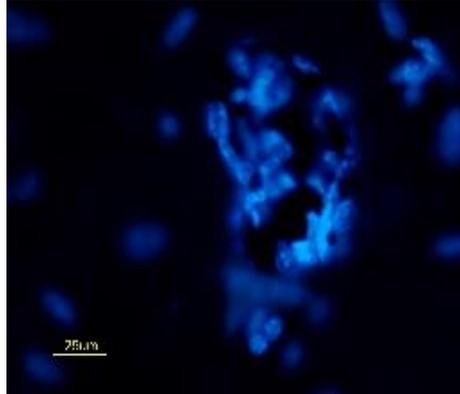


Figura 13. Cambios observados empleando microscopía de campo claro y contraste, se muestra los cambios morfológicos de las células SN4741 cuando han sido expuestas durante largo tiempo (30 días) a los materiales grafénicos (polvo y película) y células control (7 días, máximo tiempo mantenidas en cultivo sin producir confluencia celular).

Con respecto al cultivo de las células SN4741 directamente sobre GO-f, PRGO-f y FRGO-f, se realizaron experimentos con marcaje fluorescente, ya que las películas son opacas a la transmisión luminosa. Se empleó la microscopía de fluorescencia para observar si las células eran capaces de crecer adheridas o integradas en las láminas de materiales grafénicos. Se utilizó el marcador nuclear DAPI, para visualizar la presencia de los núcleos celulares (Figura 14). Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia demostraron que tanto el GO-f (14A), PRGO-f (14B) como FRGO-f (14C) permitieron el crecimiento de las células. No obstante, esta técnica permitió observar la citoarquitectura celular en las células cuando se cultivaron con PRGO (14B) y FRGO (14C). El tratamiento con los grafenos evidenció los procesos de orientación celular (lámina de PRGO-f, 14B) y organización arquitectónica en forma de matriz (lámina FRGO-f, 14C) que no parecen responder a una organización randomizada sino por el contrario estructurada.

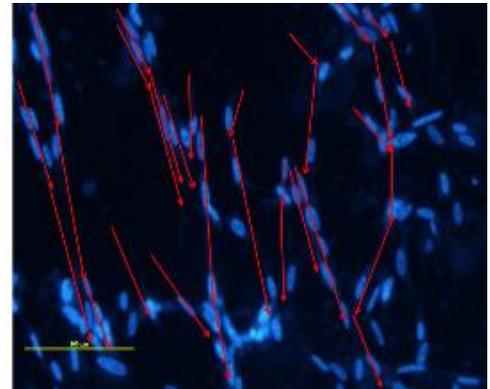
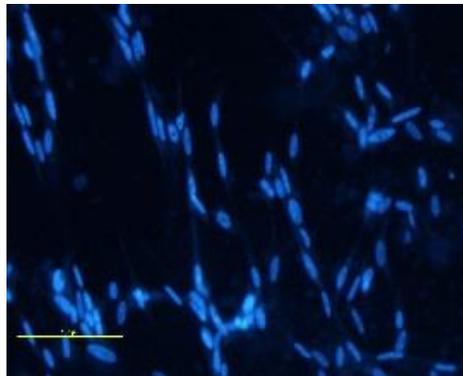
A

**células SN4741
sembradas sobre
lámina de GO-f**



B

**Cultivo de células
SN4741 sobre
láminas de PRGO-f**



C

**Cultivo de células SN4741
sobre láminas de FRGO-f**

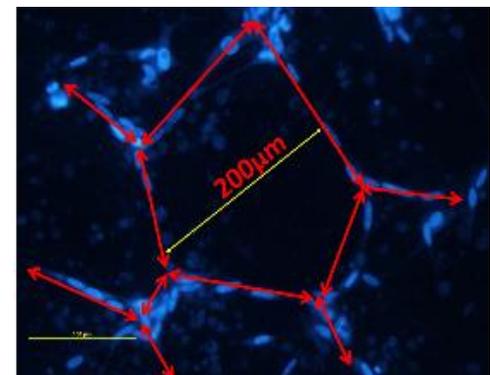
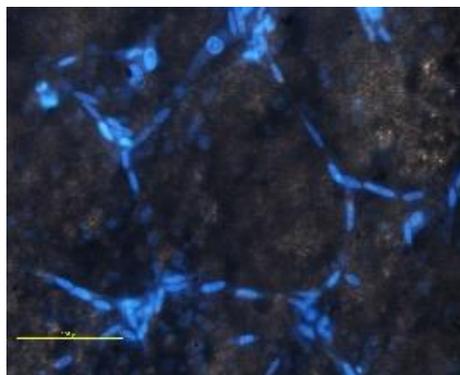


Figura 14. Cambios observados en la orientación y en la arquitectura sobre materiales grafénicos. Se muestra la disposición de las células, cuando las células son cultivadas sobre GO-f (A), PRGO-f (B) y FRGO-f (C) a modo de soporte celular (15 días de cultivo).

R.3. Resultados obtenidos del estudio de viabilidad celular

La Figura 15, muestra los resultados obtenidos de los ensayos de MTT, donde se muestra la capacidad de las células SN4741 de metabolizar MTT y transformarlo en formazán. Los experimentos mostrados en las gráficas describen la viabilidad medida por espectrofotometría, en un rango de dosis-respuesta de 1 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ y con una temporalidad de respuesta para los días 3, 7 y 15. Los datos normalizados muestran el incremento o descenso de la viabilidad en función del control SN4741 que no se mantuvo con los materiales grafénicos.

Los resultados reflejaron como tras 3 días con tratamiento los materiales grafénicos, los cultivos mantenidos con una alta concentración (500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$) de los mismos, redujeron la viabilidad celular en un 40-60% (* $p < 0.05$). Sin embargo, a los 3 días, la muestra con GO en polvo, mantuvo la viabilidad relativa mayor que el control (150 % viabilidad frente al 100% del control) a 100 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 15A). Sin embargo, en términos generales a concentraciones más bajas (rango entre 100 y 1 $\mu\text{g/ml}$), la mayoría de las condiciones reflejaron buena viabilidad (entorno al 80 y 100%).

A los 7 días de cultivo celular con los tratamientos de materiales grafénicos analizados, se observó un aumento general en la viabilidad celular en comparación con los cultivos de control sin material de grafeno. La viabilidad fue particularmente buena con respecto al control del 90-150% (* $p < 0.05$) para el GO-p y PRGO-p a 100 a 5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 15B).

A los 15 días, se halló que la mayoría de los sustratos aumentaron la viabilidad, pero a diferentes concentraciones (Figura 15C). Se detectó un aumento significativo en rango de 1 a 100 $\mu\text{g/ml}$ para los tratamientos con GO-p, PRGO-f y FRGO-f (* $p < 0.05$). De manera extraordinaria se observó como el PRGO-p aumentó la viabilidad relativa solo a las concentraciones más altas (1000 $\mu\text{g/ml}$) y más bajas (1 y 5 $\mu\text{g/ml}$).

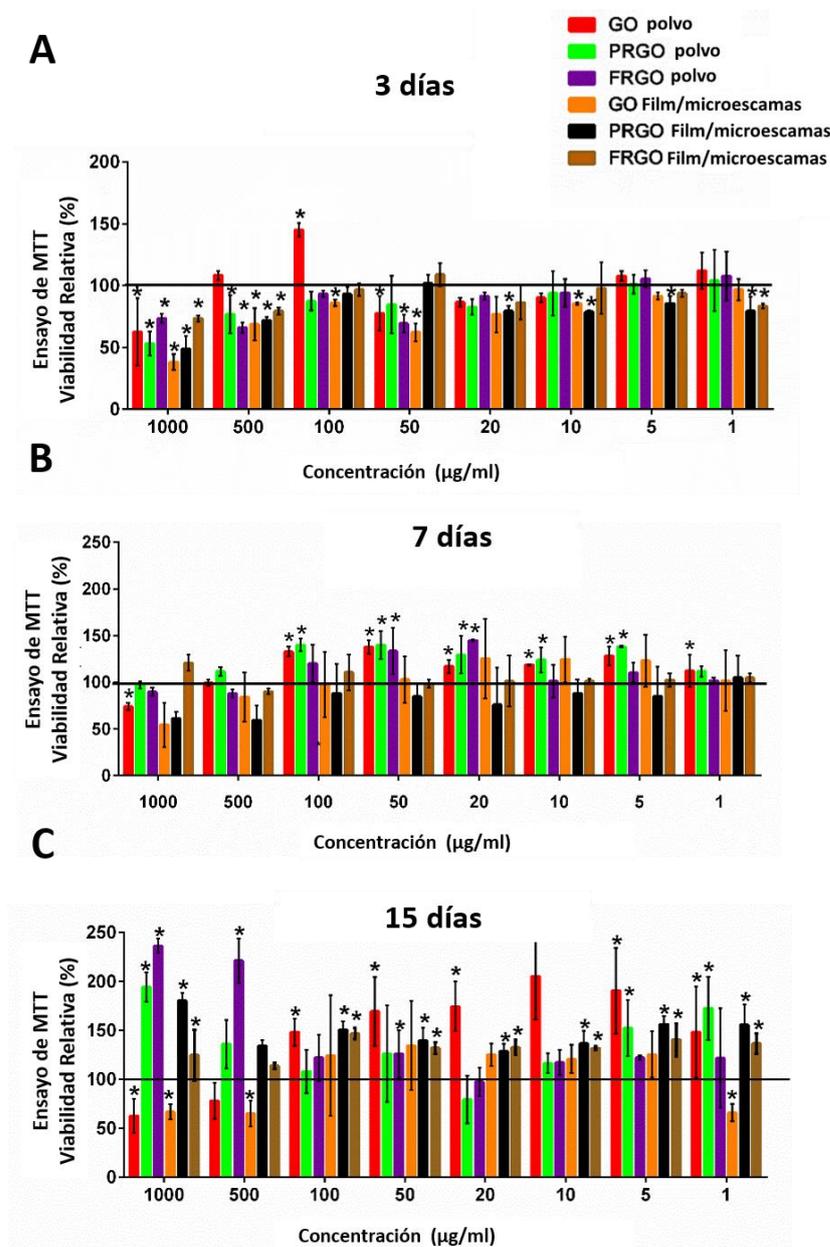


Figura 15. Efectos del tratamiento con materiales grafénicos sobre la viabilidad celular de las células SN4741. (A) Ensayo MTT que muestra la viabilidad celular relativa (%) después de 4 h (A), 7 días (B) y 15 días (C). Los resultados se normalizan a las células sin tratamiento, representadas como una línea horizontal negra. Los datos se expresan como media \pm DE, $n = 3$ experimentos (cada uno en determinaciones por triplicado). * $p < 0,05$ en comparación con el control mediante ANOVA bidireccional.

Para confirmar estos resultados, se realizaron medidas de viabilidad adicionales con el marcador de Calceína-AM y se examinó la muerte celular usando el marcador de Homodímero de Etidio 1, que se une al ADN solo en las células que han perdido la integridad de la membrana plasmática. Como control positivo, se emplearon las células tratadas con Tritón X-100 al 10%.

Los resultados derivados de este ensayo mostraron un mantenimiento preciso de la viabilidad celular y la ausencia casi completa de muerte celular en el día 7 en polvo o película GO (Figura 16), polvo o película PRGO (Figura 17) y polvo o película FRGO (Figura 18) en un rango de concentraciones de 50 a 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$, lo que subraya la excelente biocompatibilidad de materiales grafénicos ensayados.

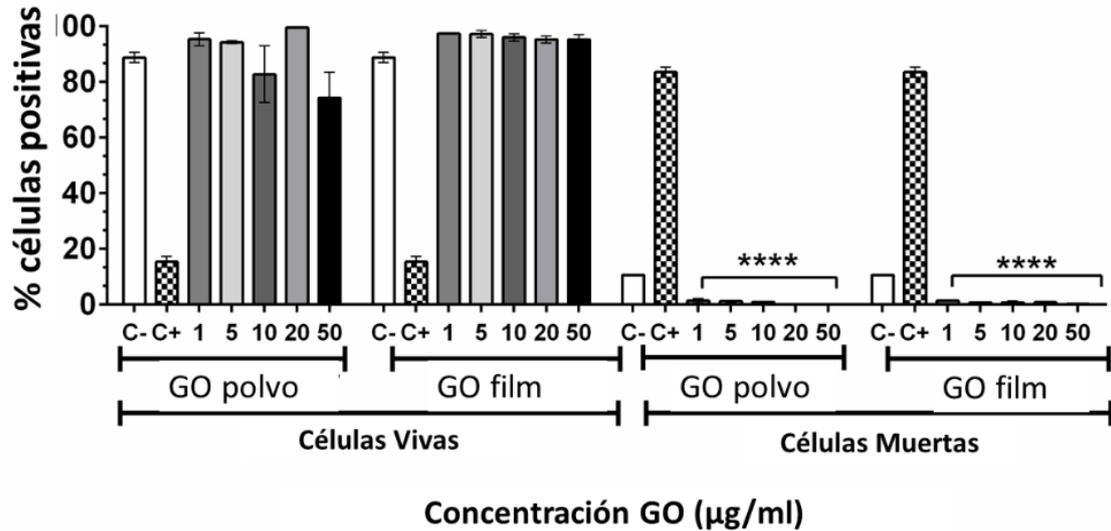


Figura 16. Ensayo de vida / muerte celular, utilizando Calceína-AM (células vivas) y Homodímero de Etidio-1 (células muertas), expresado como el porcentaje del número total de células marcadas y cuantificadas por citometría de flujo en el día 7. Las células se cultivaron con GO y control para la normalización del experimento. Los controles positivos C+ muestran los resultados tras tratamientos con Tritón x-100 y los controles negativos C- muestran las células sin tratamiento y cultivadas de manera convencional. Los datos se expresan como medias \pm SD, n = 3. *** p <0,001; **** p <0,0001, en comparación con el control que usa ANOVA bidireccional.

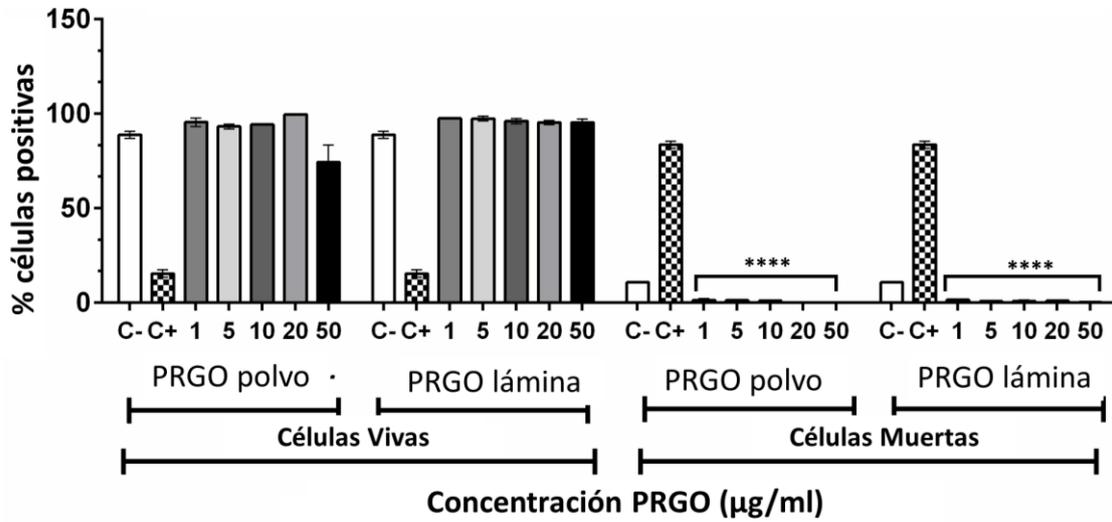


Figura 17. Ensayo de vida / muerte utilizando Calceína-AM (células vivas) y Homodímero de Etidio-1 (células muertas) en PRGO tanto en su forma en polvo como en las películas. Los datos se expresan como medias \pm SD, n = 3. *** p < 0,001; **** p < 0,0001, en comparación con el control que usa ANOVA bidireccional.

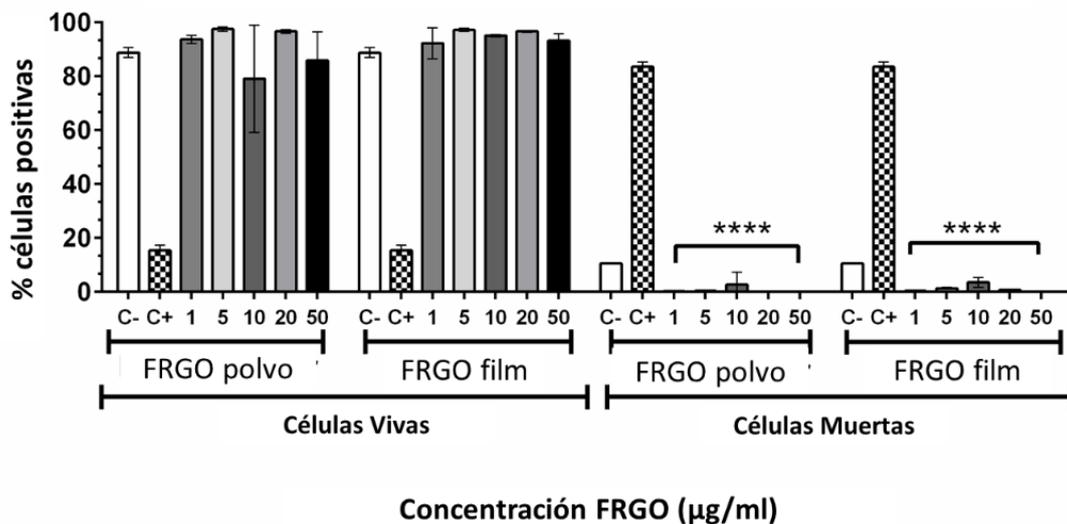


Figura 18. Ensayo de vida / muerte utilizando Calceína-AM (células vivas) y Homodímero de etidio-1 (células muertas) en FRGO tanto en su forma en polvo como en las películas. Los datos se expresan como medias \pm SD, n = 3. *** p < 0,001; **** p < 0,0001, en comparación con el control que usa ANOVA bidireccional.

R.4. Proliferación celular

R.4.1. Ensayo de ciclo celular

El análisis de ciclo celular se realizó empleando el ensayo de yoduro de propidio (PI, del inglés “*propidium iodide*”) mediante citometría de flujo a los 3 y 7 días de tratamiento con material de grafeno o en la muestra control sin tratar. Los resultados evidenciaron que existía un patrón diferente en las células tratadas con óxido de grafeno y los subtipos en comparación con las células control, que se relacionaba con la capacidad proliferativa (cantidad de ADN duplicado) y con el proceso de división celular (síntesis de ADN para iniciar la mitosis). Es decir, se observó cómo el GO y los diferentes subtipos afectaban al desarrollo del ciclo celular de estas células tratadas con respecto al ciclo celular de células sin tratar tanto a los 3 días como a los 7 días de tratamiento.

El análisis en el día 3 del ciclo celular (Figura 19) reveló que la mayoría de las células SN4741 sembradas sobre los diferentes soportes/sustratos a una concentración de 50 µg / ml se encontraban en la fase del ciclo en G2 /M (aumento de 2,5 veces, * p <0,05) en comparación con el control. Esto es, las células sembradas con los grafenos se hallaban en pleno proceso ya de escisión celular o de inicio, ya que el material genético había sido duplicado y la célula poseía el doble de cantidad de ADN como refleja la fase G2/M. Sin embargo, las células control se encontraban en otra fase del ciclo celular, probablemente en la fase de quiescencia G0/G1 o síntesis de ADN (fase S), por lo que se refleja en el gráfico (Figura 19). Las células tratadas con óxido de grafeno mostraron una disminución

significativa de 0.5 veces de la cantidad de ADN en la fase S, con respecto a las células control, en los grafenos PRGO y FRGO (tanto en polvo como en película, $*p < 0.05$). No obstante, se observó que GO en polvo, no originó un cambio significativo en la cantidad de ADN detectada en ninguna de las fases del ciclo celular, por lo que su comportamiento celular en relación con la capacidad proliferativa no se vio afectada y se mantuvo igual que las células control.

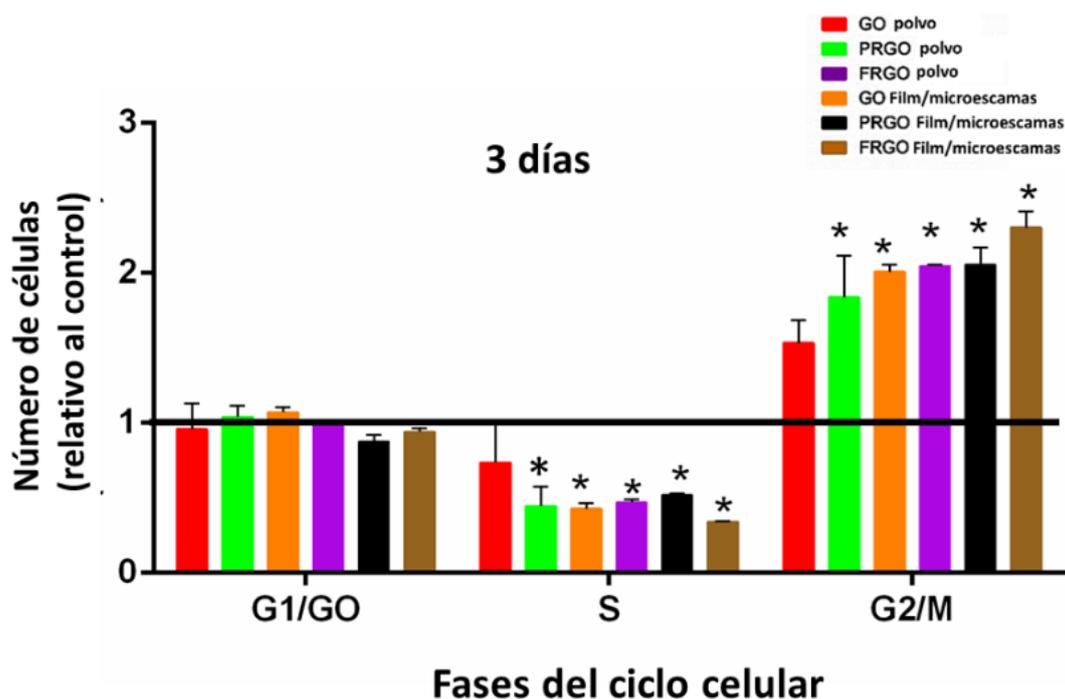


Figura 19. Efecto del tratamiento con materiales grafénicos ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$) sobre la distribución del ciclo celular y la proliferación de células SN4741. Porcentaje de células en G0 / G1, S y G2 / M. Los datos se expresan como media \pm SD, $n = 2$ experimentos (por triplicado). Análisis estadístico: t-Student, muestra la significación estadística $* p < 0,05$ en comparación con el control.

En contraste, en el día 7 la mayoría de las células se observaron en fase G0 /G1 (aumento significativo de 2.5 veces en comparación con el control, * $p < 0.05$), y se detectó una reducción en el número de células en G2 / M (0.5 veces en comparación con la condición de control, * $p < 0.05$), lo que sugiere que las células se detienen en G0 / G1. No obstante, GO-p no mostró diferencias significativas en comparación con el control en ninguna fase a los 7 días. Además, GO-f y PRGO-f registraron un número reducido de células en fase S (Figura 20), lo que sugiere un papel adicional en la detención del ciclo celular en G0/G1.

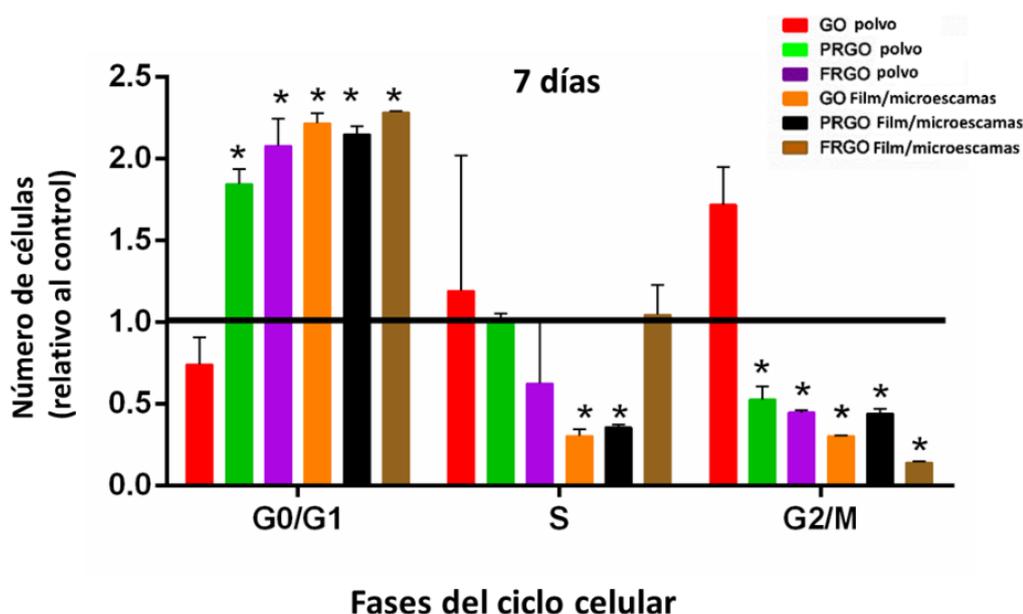


Figura 20. Efecto del tratamiento con materiales grafénicos (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$) sobre la distribución del ciclo celular y la proliferación de células SN4741. Porcentaje de células en G0 / G1, S y G2 / M. Los datos se expresan como media \pm SD, $n = 2$ experimentos (por triplicado). Análisis estadístico: t-Student, muestra la significación estadística * $p < 0,05$ en comparación con el control.

R.4.2. Ensayo de 5'-Bromo 2- deoxiuridina (BrdU)

La proliferación celular también se examinó mediante la incorporación de BrdU tratando a las células durante 4 horas, en un tiempo respuesta de 3, 5 y 7 días de tratamiento con los diferentes materiales gráficicos. Los resultados mostraron que en el día 3, la incorporación de BrdU disminuyó significativamente (* $p < 0.05$; ** $p < 0,01$) en comparación con el control (Figura 21.A). Esto fue particularmente pronunciado en PRGO y FRGO tanto en polvo como en película, ya que se evidenció un aumento significativo en el día 5 (Figura 21.B) y una disminución posterior en la incorporación de BrdU en el día 7 (Figura 21.C), lo que sugiere un fuerte efecto de PRGO y FRGO en relación con la disminución de la proliferación.

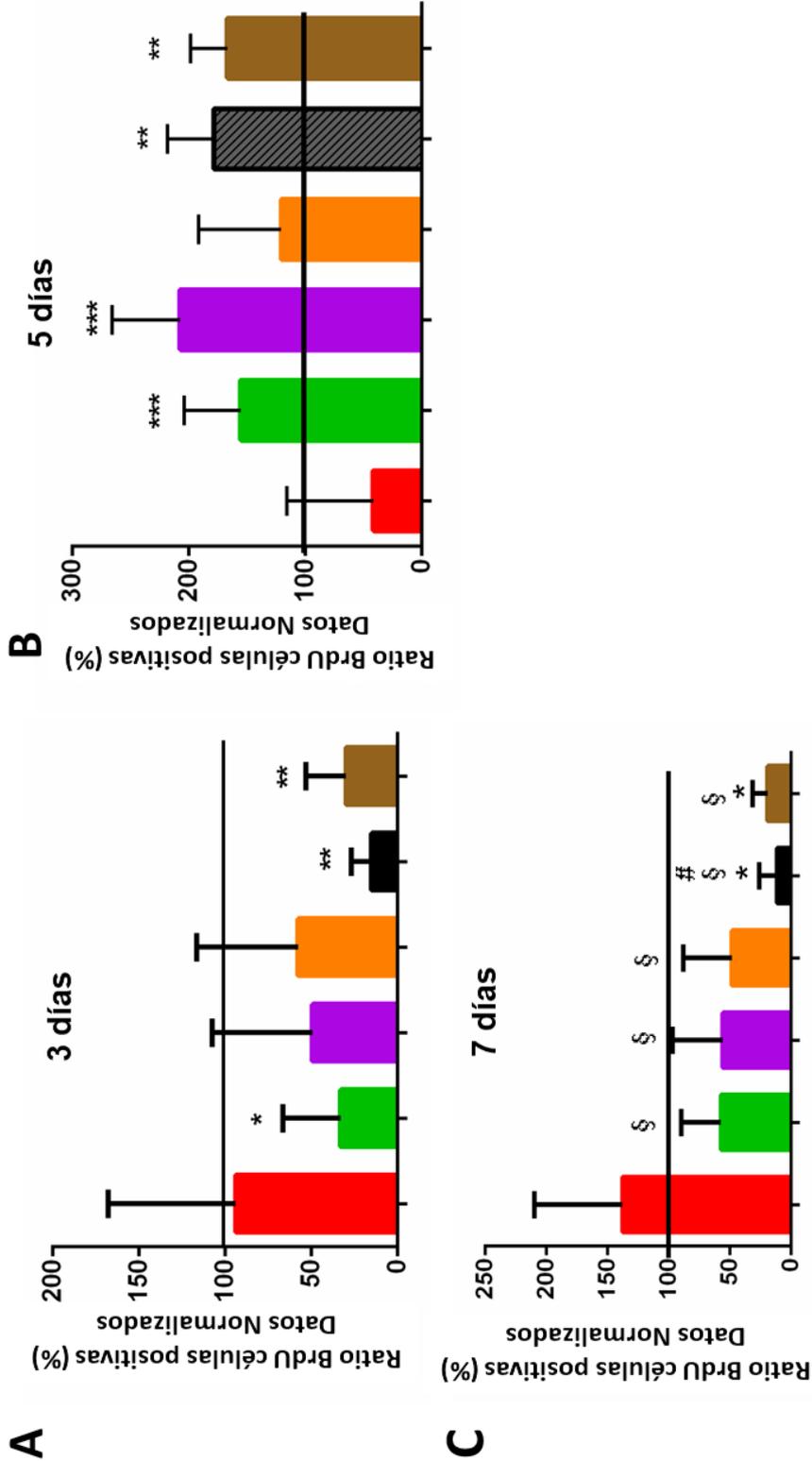


Figura 21. Efecto del tratamiento con materiales grafénicos (50 µg / ml) sobre la distribución del ciclo celular y la proliferación de células SN4741. Porcentaje de células positivas para BrdU en el día 3 (A), 5 (B) y 7 (C). Los datos se expresan como media ± SD, n = 3 en comparación con muestras de control. Se utilizó ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Fisher para la comparación entre grupos vs control; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. δ p <0,001 vs GO-p; # p <0,001 grupos vs PRGO-p

R.4.3. Análisis de proteínas relacionadas con el ciclo celular

Para confirmar los resultados anteriormente visualizados y entender mejor el proceso de mitosis alterada por los materiales grafénicos, se examinaron los niveles de proteínas involucradas en el ciclo celular por el ensayo de inmunotransferencia por Western blot, (Figura 22A) y se cuantificaron las expresiones de intensidad de banda de cada proteína Ki67, Ph3, Ciclina E, SP30 y P27 (Figura 22B).

Los resultados mostraron que el análisis de la proteína Ki67, un marcador de proliferación degradado en G0/G1 y que aparece de manera específica en G2/M, no reveló cambios después del tratamiento con los diferentes materiales ensayados en los 3 días de tratamiento. No obstante, se evidenció una disminución después de 7 días, especialmente significativa con las formas GO-f, PRGO-f y FRGO-f.

El estudio de PH3 (Ser10), un marcador específico de mitosis que participa de la fosforilación de histonas para empaquetar el ADN, mostró un aumento significativo después de 3 días de tratamiento (hasta 10-30 veces, ** $p < 0.01$), pero una diferencia no significativa en comparación con las muestras de control en día 7.

El análisis de ciclina E, una proteína requerida para la progresión a través de G1 y el inicio de la replicación del ADN (fase S), no mostró ningún cambio significativo en las muestras tratadas con materiales de grafeno con respecto al control. Sin embargo, en

el marcador de replicación, PCNA, se encontró una regulación negativa en el día 7 de tratamiento con todos los sustratos analizados, excepto GO-p.

Finalmente, el análisis de marcadores involucrados en senescencia (SP30) o quiescencia / diferenciación (P27/cKip) reveló un aumento significativo (* $p < 0.05$) en las células tratadas con PRGO-f y FRGO-f en el día 7.

En general, los resultados de proliferación indicaron que PRGO-f y FRGO-f induce un efecto antiproliferativo en las células SN4741 en el día 7 sugiriendo un posible efecto pro-diferenciador.

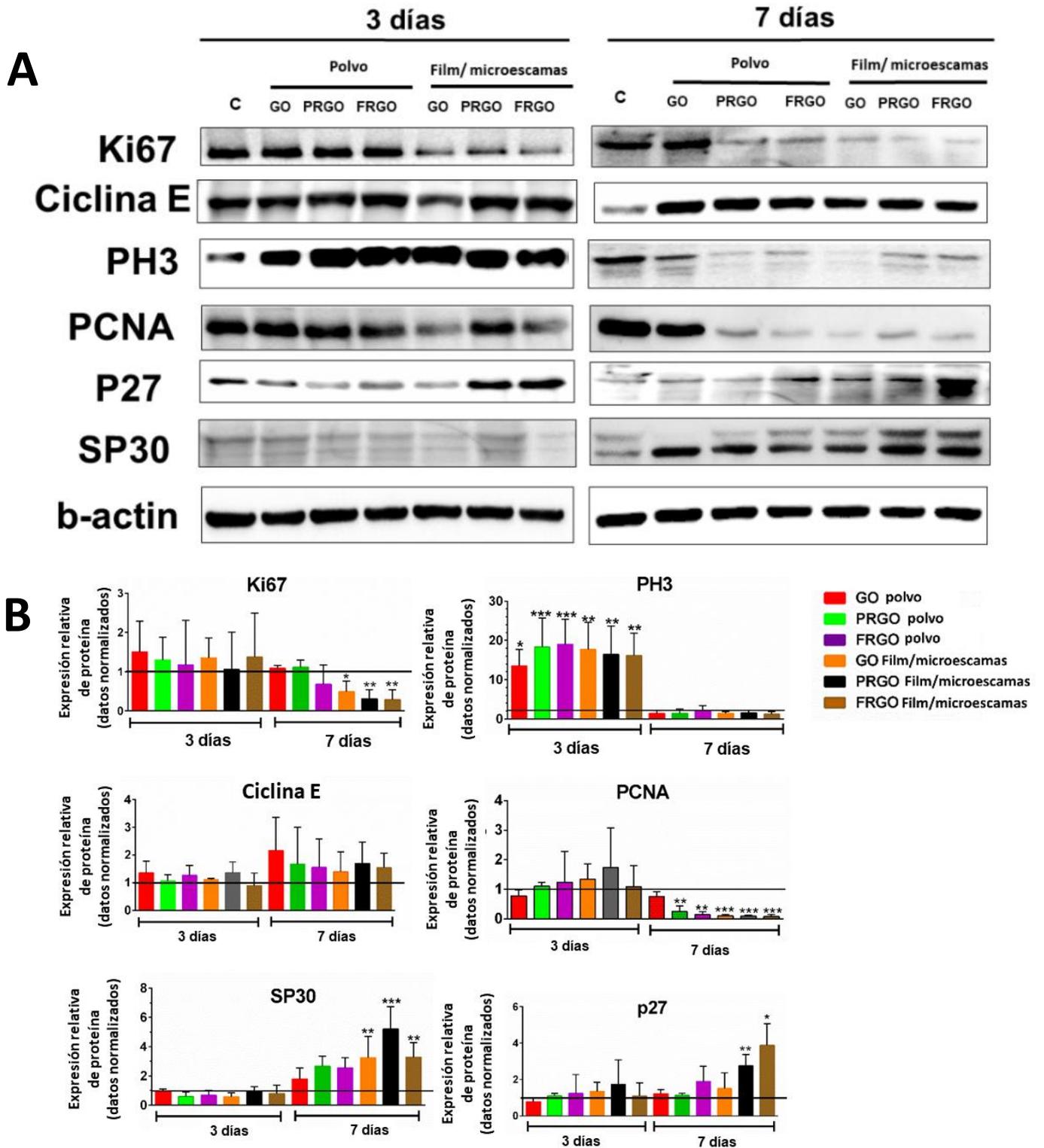


Figura 22. Proteínas implicadas en el ciclo celular. (A) muestra el panel de expresión de proteínas analizadas en el ciclo celular a los 3 y 7 días. (B) Muestra la cuantificación proteica, $n=3 \pm SD$, $n = 3$ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ en comparación con muestras de control usando ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Fisher para la comparación entre grupos vs control.

R.5. Resultados relacionados con el metabolismo mitocondrial y bioenergético

En el siguiente experimento, se analizó el metabolismo mitocondrial analizado en el Seahorse, empleando inhibidores de diferentes pasos de la cadena de transporte de electrones mitocondriales (ETC) y midiendo la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en tiempo real (Figura 23). Los resultados mostraron el efecto de los inhibidores analizados secuencialmente en este experimento empleando oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa (complejo V), que provoca una disminución en el OCR; el FCCP, un agente de desacoplamiento que colapsa el gradiente de protones e interrumpe el potencial de membrana mitocondrial, estimulando la actividad de ETC y aumentando así la OCR. La combinación de antimicina A, un inhibidor del complejo III, y Rotenona, que inhibe el complejo I, cierra la respiración mitocondrial y deja caer el OCR al nivel mínimo vinculado a la respiración mitocondrial. Esta estrategia permitió calcular diferentes parámetros metabólicos como el consumo de oxígeno no mitocondrial, la respiración basal y máxima, la capacidad respiratoria de reserva y la producción de ATP (véase Figura 23). Los resultados analizados con Seahorse mostraron una diferencia significativa en el mayor consumo de oxígeno no mitocondrial después de los tratamientos con los materiales grafénicos con la condición de control (* $p < 0.05$) (Figura 24).

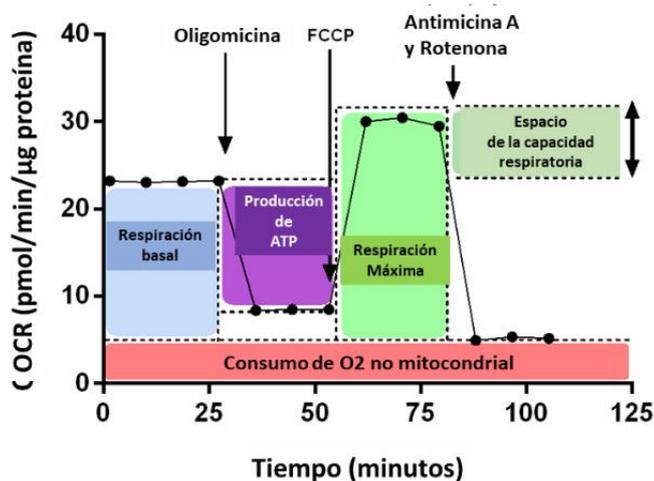


Figura 23. Efecto del tratamiento con materiales grafénicos sobre la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de las células SN4741. Esquema representativo de parámetros metabólicos calculados a partir de los resultados de OCR (modificado por MA Ocaña).

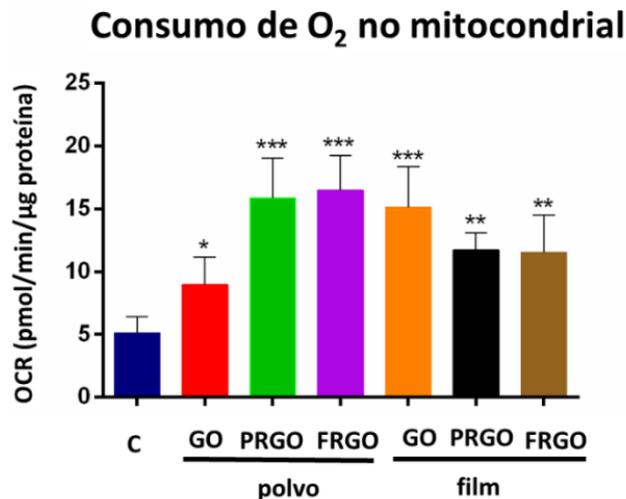


Figura 24. Efecto del tratamiento con materiales grafénicos sobre la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de las células SN4741. Producción de consumo de oxígeno no mitocondrial de células SN4741 tratadas durante 7 días con 50 μg/ml de dichos materiales. Los datos se normalizan a la cantidad de proteína y se expresan como medias ± SD, n ≥ 3. * p < 0.05, ** p < 0.01, p < 0.001 comparado con el control usando ANOVA.

Los resultados mostraron como el FRGO-f fue el único que disminuyó la respiración basal, entendida como la tasa de respiración en condiciones basales, con una alta significancia (** $p < 0.01$) (Figura 25).

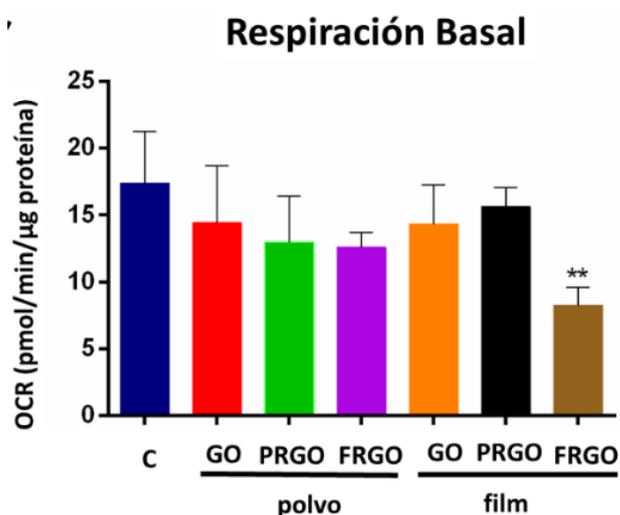


Figura 25. Efecto del tratamiento materiales grafénicos sobre la respiración basal, producción de células SN4741 tratadas durante 7 días con 50 $\mu\text{g/ml}$ en cada tratamiento. Los datos se normalizan a la cantidad de proteína y se expresan como medias \pm SD, $n \geq 3$. ** $p < 0.01$, comparado con el control usando ANOVA.

Con respecto a los resultados sobre el efecto en respiración máxima celular, el GO-p y GO-f, se observó una disminución de la respiración máxima, es decir, la capacidad respiratoria más alta de la célula (* $p < 0.05$). Sin embargo, en PRGO-p y

PRGO-f no se observó un efecto significativo en la respiración basal o máxima (Figuras 26).

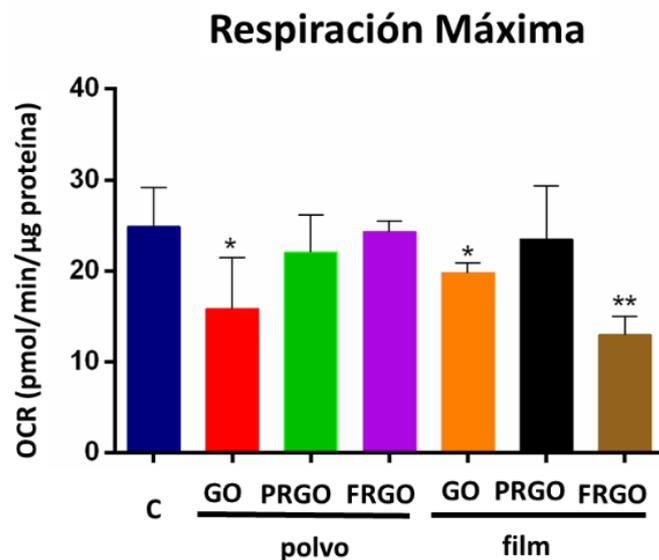


Figura 26. Efecto del tratamiento con materiales gráfenicos sobre la respiración máxima, producción de células SN4741 tratadas durante 7 días con 50 $\mu\text{g/ml}$ de los materiales. Los datos se normalizan a la cantidad de proteína y se expresan como medias \pm SD, $n \geq 3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, comparado con el control usando ANOVA.

Los resultados sobre el espacio de la capacidad respiratoria, parámetro que indica la capacidad de una célula para responder a la demanda energética, mostraron de manera notable como el GO-p y FRGO-f disminuían significativamente la capacidad respiratoria de reserva de estas células (* $p < 0.05$) (Figura 27). Por lo general, la respiración máxima baja se correlaciona con una capacidad respiratoria de reserva baja, como se observó con GO-p y FRGO-f. Curiosamente, FRGO-p no afectó la respiración máxima pero aumentó

la capacidad respiratoria de reserva de estas células (** $p < 0.01$). Sin embargo, PRGO-f no alteró la capacidad respiratoria máxima manteniéndose a niveles semejantes a la célula control. Los resultados sobre la respiración mitocondrial, vinculada a la producción de ATP mediada por el complejo V del ETC mostraron como el PRGO-p, GO-f y FRGO-f disminuyeron significativamente la respiración ligada al ATP (* $p < 0.05$) (Figura 28). Esta respiración vinculada al ATP puede interpretarse como la producción de ATP debido a la actividad del ETC.

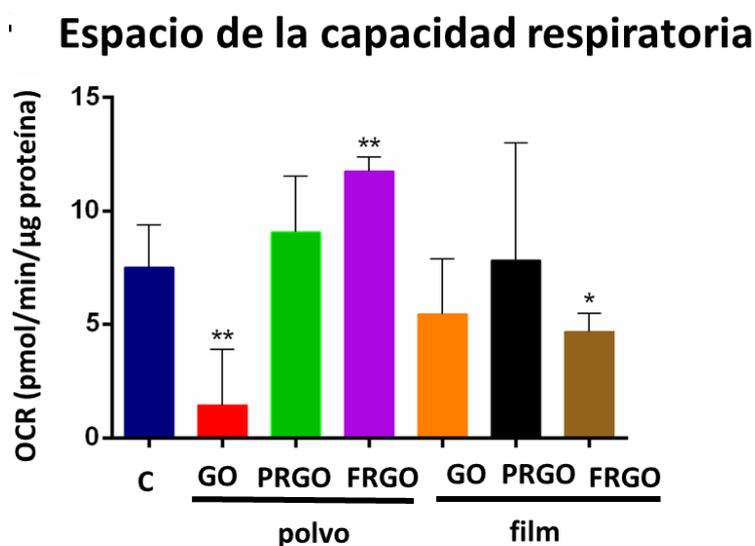


Figura 27. Efecto del tratamiento con materiales grafénicos sobre la producción de capacidad respiratoria de reserva de células SN4741 tratadas durante 7 días con 50 $\mu\text{g/ml}$. Los datos se normalizan a la cantidad de proteína y se expresan como medias \pm SD, $n \geq 3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control usando ANOVA.

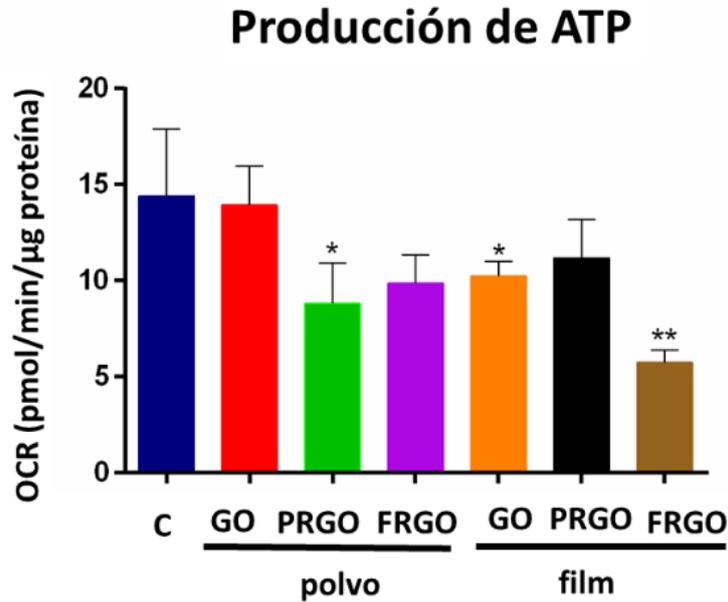


Figura 28. Efecto del tratamiento de materiales grafénicos la producción de ATP en células SN4741 tratadas durante 7 días con 50 µg/ml. Los datos se normalizan a la cantidad de proteína y se expresan como medias \pm SD, $n \geq 3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control usando ANOVA

R.6. Resultados relacionados con la diferenciación neuronal y

DAérgica

Como mostramos en el apartado 1.2, se examinó la influencia de diferentes materiales (concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$) sobre los cambios morfológicos en la arquitectura celular y el desarrollo de morfologías similares a las neuronas en el día 7. La diferenciación neural más notable se detectó en células tratadas con PRGO-f, donde se detectaron morfologías similares a neuronas DA y colocalización significativa de TH y Tuj1 (Figura 29).

Los resultados de inmunotinción específica para células dopaminérgicas empleando el coeficiente de Pearson y analizando el doble marcaje neuronal Tuj-1 (b-III-tubulina) y TH, revelaron un aumento de 2.5 a 4.5 veces mayor en colocalización de las muestras tratadas con polvo y película (PRGO-p, PRGO-f y FRGO-p, FRGO-f ,** p <0.01; * ** p <0.0001), y por GO-f (* p <0.05) (Figura 30).

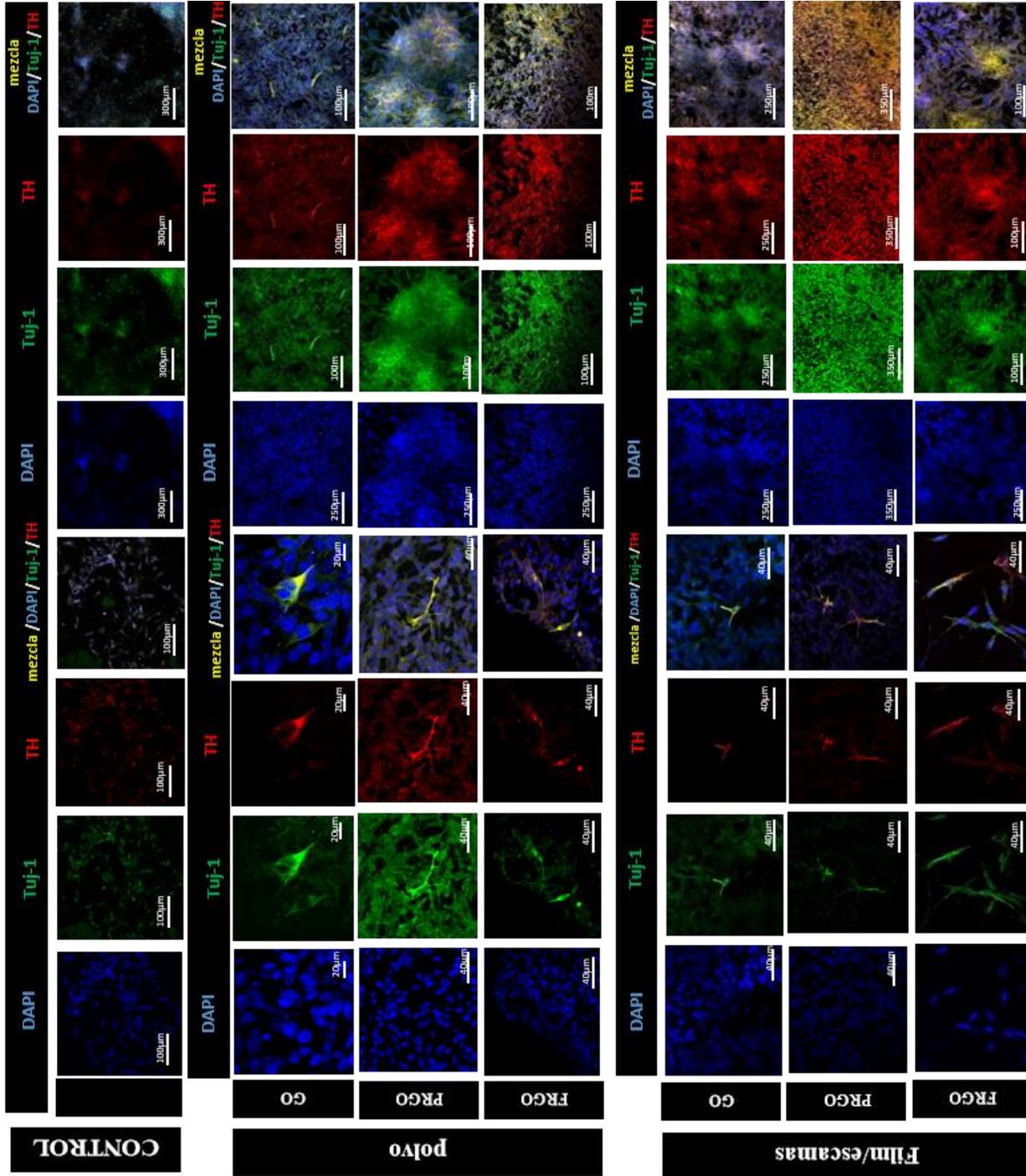


Figura 29. Fotografías de microscopía de inmunofluorescencia de células SN4741 tratadas con materiales grafénicos (50 µg / ml). Las células se identifican mediante tinción con DAPI nuclear (azul) y se examinan para determinar la tinción conjunta (amarillo) de Tuj-1 (verde) y TH (rojo)

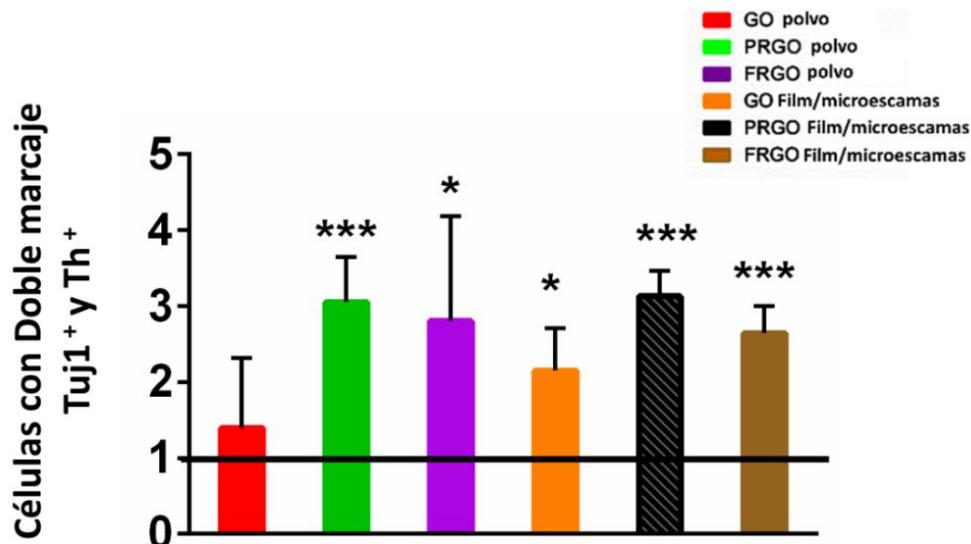


Figura 30. Efecto del tratamiento de materiales grafénicos sobre la morfología y los marcadores neuronales de las células SN4741. (B) Análisis cuantitativo de colocalización de TH y Tuj1, adquirido con un umbral automático (Fiji-ImageJ, NIH) y expresado como coeficiente de colocalización de Pearson (PCC). Los datos se normalizan para controlar la condición y se expresan como media \pm DE, $n = 6$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ en comparación con el control mediante la prueba t de Student.

Igualmente, se comprobó que mientras las células SN4741 de control conservó una morfología similar a las células fibroblásticas, la citoarquitectura de las células tratadas con las películas empleadas como soportes o andamios, cambiaron drásticamente, induciendo la formación de procesos similares a las neuritas (Figura 31 A PRGO-f y Figura 32 FRGO-f). En especial, también exhibieron procesos de contactos sinápticos o terminaciones de conexión neuronal que sugieren un mecanismo de comunicación entre células especializado, las células doblemente positivas para Tuj-1 y TH tratadas con los andamios para PRGO-f y FRGO-f (Figura 31A PRGO y Figura 31B FRGO).

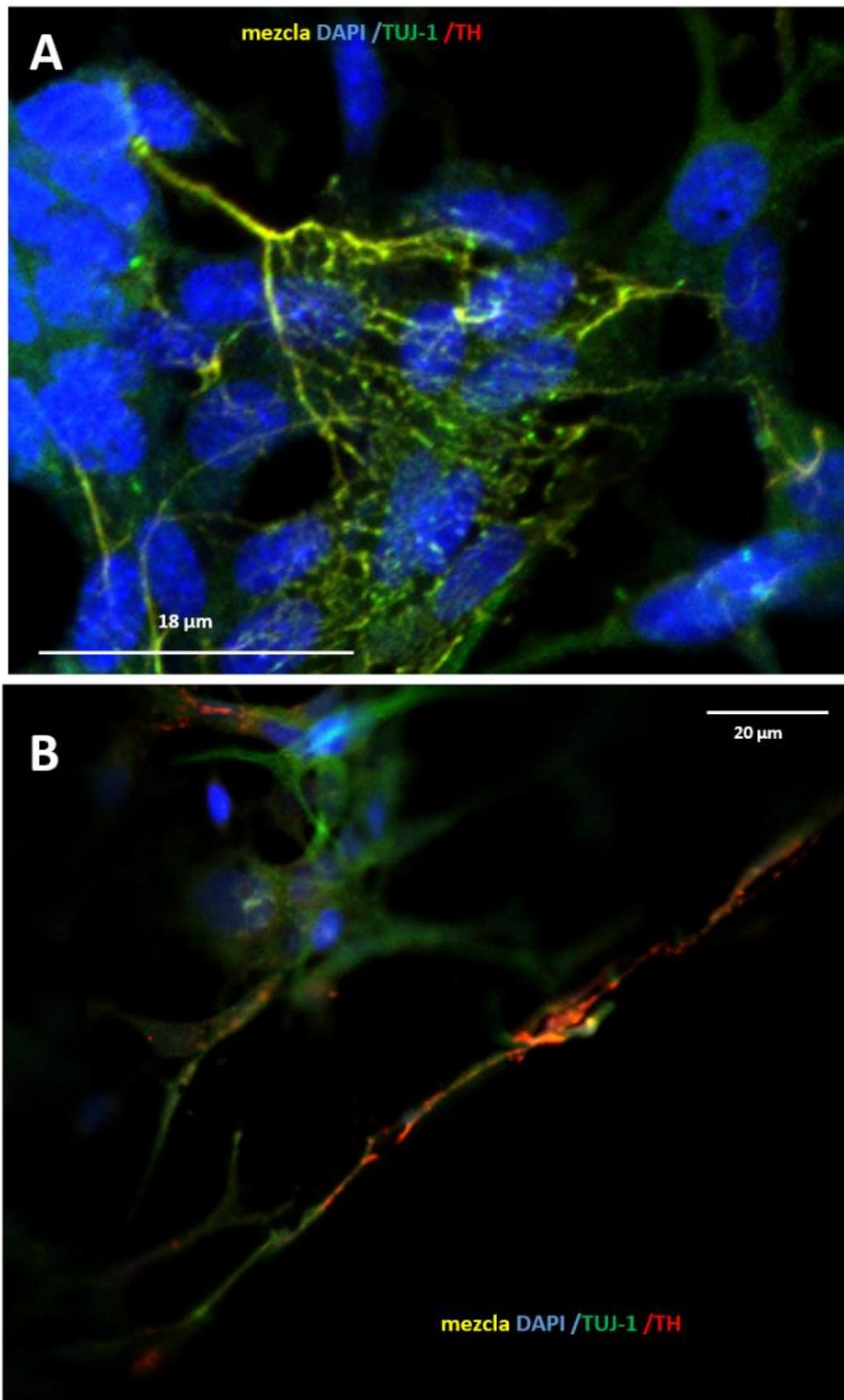


Figura 31. Muestra los cambios morfológicos de las células SN4741 cuando se cultivan en andamios de PRGO-f. Las fotografías muestran inmunotinción de células teñidas con DAPI (marcador de núcleos en azul) Tuj-1 / beta-III tubulina 1 (verde) y TH (rojo), mostrando el proceso neuronal. (A) Estructuras arborescentes similares a neuritas en células cultivadas en PRGO-f. (B) Contacto entre neuritas TH-positivas de células cultivadas en película PRGO

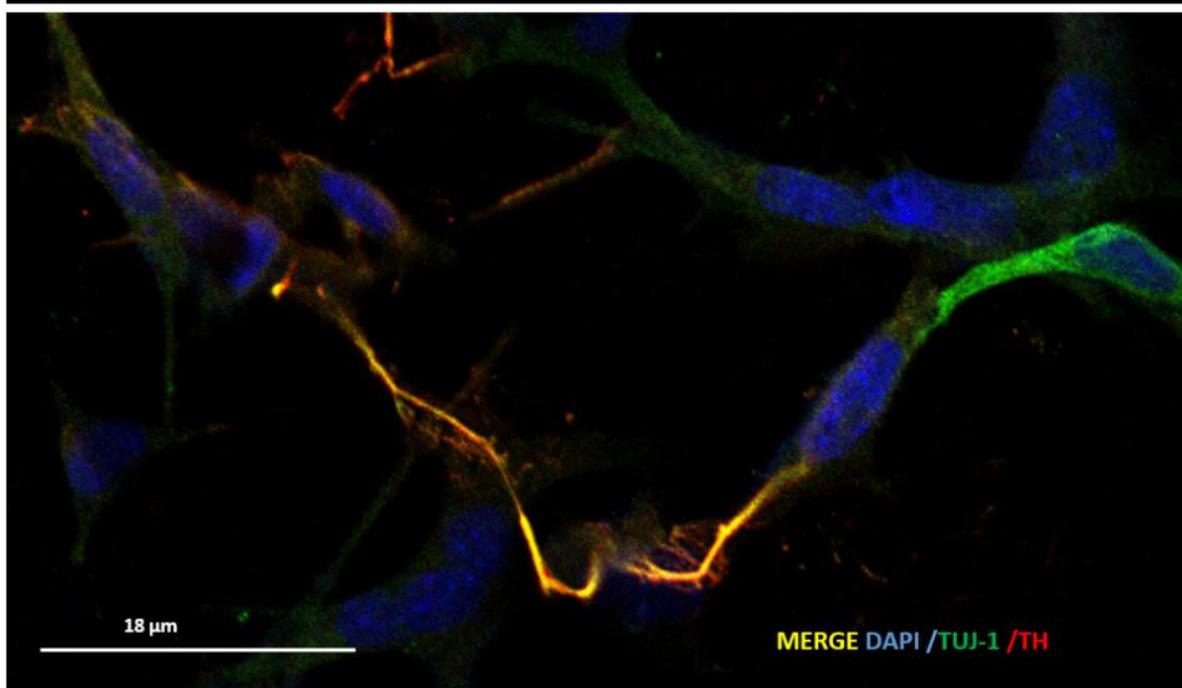


Figura 32. Detalle de los cambios morfológicos y contactos celulares de las células SN4741 cuando se cultivan en andamios de FRGO-f. Las fotografías muestran inmunotinción de células teñidas con DAPI (marcador de núcleos en azul) Tuj-1 / beta-III tubulina 1 (verde) y TH (rojo), mostrando el proceso neuronal. Células cultivadas en la película FRGO que muestran los procesos de las células Tuj-1 (verde) y TH (rojo).

Para determinar si las células TH positivas adquirieron un fenotipo propio de neuronas DA del mesencéfalo se examinaron los genes que están implicados en la expresión de marcadores que caracterizan este tipo de células. Se analizaron los cambios que podrían sufrir la expresión de los genes: Nr4a2/Nurr1; Dat/Slc6a3, y Th, evaluando si sufrían un cambio en su expresión por la exposición a los materiales grafénicos, a una concentración de 50 µg/ml. En particular, los resultados mostraron que los niveles de expresión génica de Nr4a2/Nurr1, un factor de transcripción requerido para el desarrollo de la neurona DA del mesencéfalo, aumentó hasta 10 veces en los tratamientos de polvo y película de PRGO y en FRGO. Para el transportador de dopamina Dat /Slc6a3 expresado en neuronas DA maduras, se observó hasta un aumento de 60 veces (**** p <0.0001), mayor en las muestras con PRGO -f y 20 veces (**p<0.01) con FRGO-p, en comparación con las células de control (Figura 33).

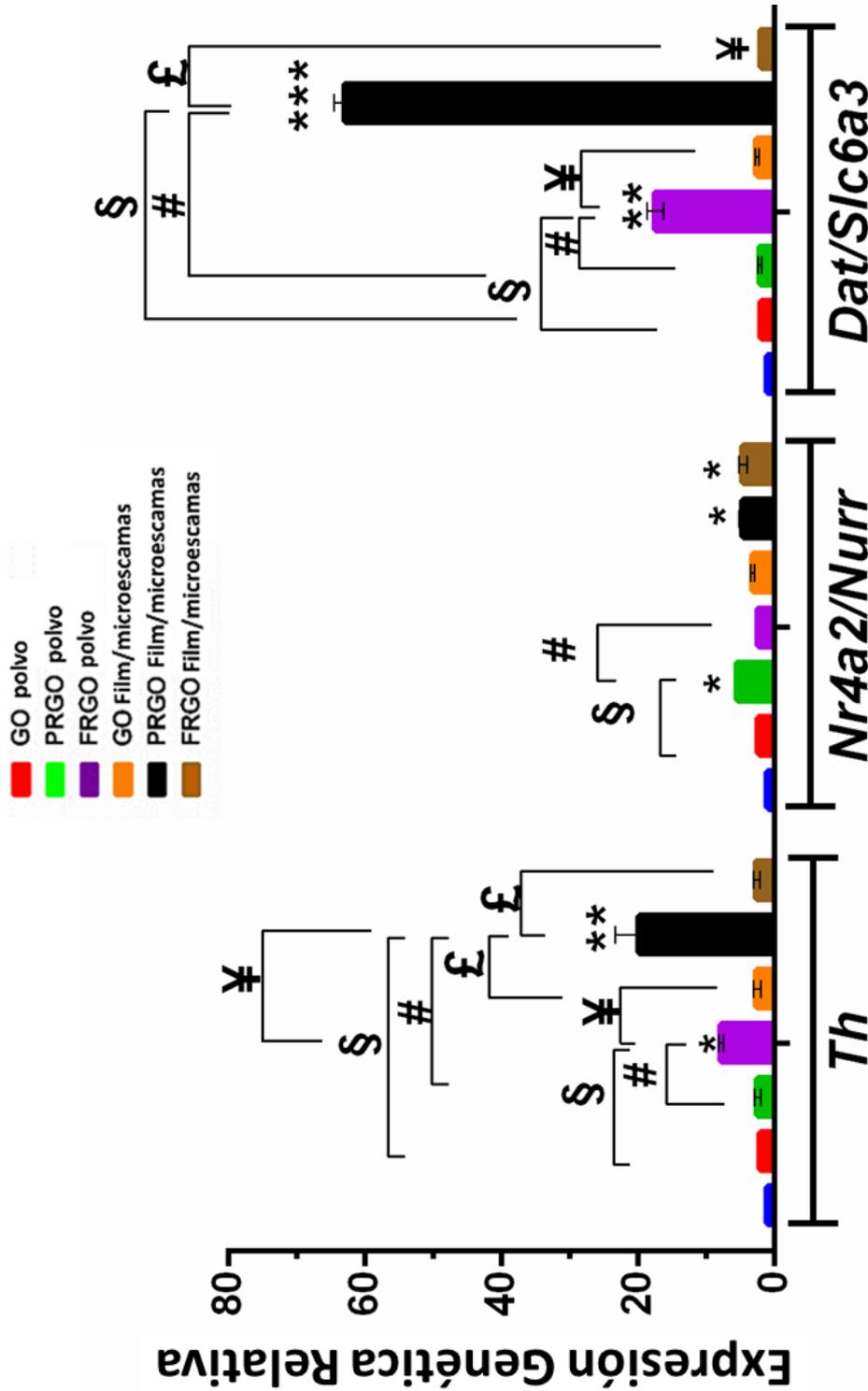


Figura 33. Efecto sobre la expresión de genes y proteínas implicados en la diferenciación y maduración de DA empleando materiales grafénicos. Expresión génica relativa de Th, Nr4a2 / Nurr1 y Dat / Slc6a3 analizada por RT-PCR en tiempo real en SN4741 tratado o no con materiales grafénicos (50 µg / ml) durante 21 días. N=6 experimentos, * P <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 para materiales grafénicos versus control; §p <0.001 para GO- polvo versus otro óxido de grafeno o sus derivados; #p <0.001 para PRGO-polvo versus otro óxido de grafeno o sus derivados; ¥ p <0.001 para FRGO-polvo versus otro óxido de grafeno o sus derivados; £ p <0.001 para PRGO-película versus FRGO-película. ANOVA.

Igualmente, el estudio de los factores de transcripción que determinan el fenotipo dopaminérgico *Limx1a/1b* y *Pitx3*, corroboraron el fenotipo dopaminérgico en las muestras tratadas con los materiales grafénicos. Los resultados de expresión génica a tiempo real demostraron que todas las condiciones con el tratamiento de óxido de grafeno y sus derivados aumentaron significativamente de 2.5 a 3 veces (* $p < 0,05$) la expresión de factores críticos de transcripción del mesencéfalo, como *Lmx1a* (153) y *Lmx1b* (154) y de la expresión específica de neurona DA del cerebro medio como el factor de transcripción *Pitx3* (155) (Figura 34).

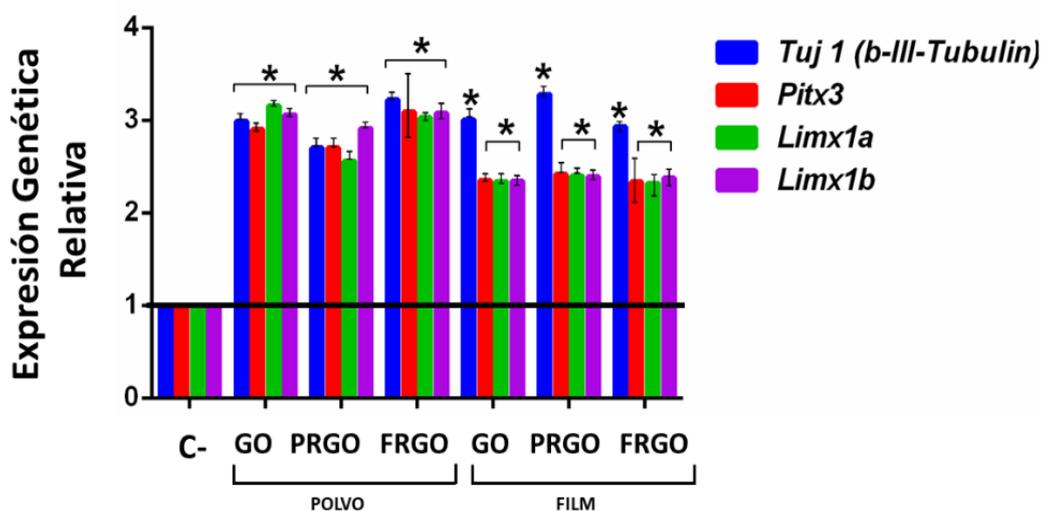


Figura 34. Expresión génica relativa de *Tubb3*, *Pitx3*, *Lmx1a* y *Lmx1b* analizados por RT-PCR en tiempo real en células SN4741 tratadas o no con materiales grafénicos (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$) durante 15 días. Se realizó el test de ANOVA bidireccional.

No obstante, las posibles modificaciones post-traduccionales de la expresión de ARN mensajero citoplasmático puede modificar su expresión proteica, por lo que pudiera no determinar necesariamente la presencia de proteínas. Por este motivo se ha confirmado mediante Western-blot, la expresión proteica de proteínas de madurez neuronal. Los resultados de inmunotransferencia corroboran y están correlacionados con los cambios morfológicos descritos anteriormente y con incrementos notables en los niveles de proteína TH. En este caso mostró un aumento de 35 veces por PRGO_f en microescamas ** $p < 0.01$, y 20 veces superior a PRGO_p, con respecto a la muestra control (Figura 35).

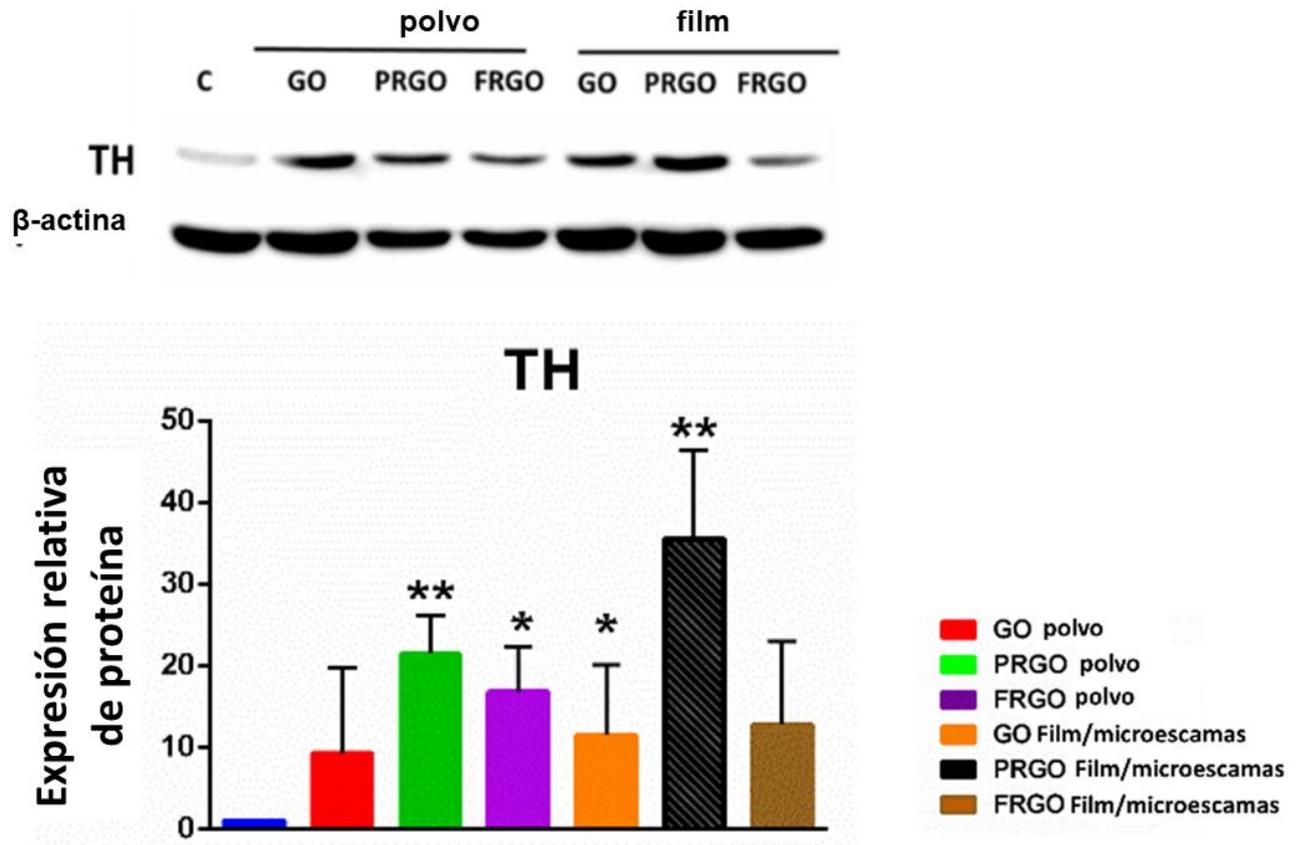


Figura 35. Western-blot de la proteína TH y β - actina como marcador de control de carga proteica. La gráfica muestra los niveles de proteína TH en células SN4741 tratadas o no con materiales grafénicos (50 μ g / ml) durante 21 días. Los datos se normalizan a β -actina y se expresan como medias \pm SD, n = 3, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 para grafenos frente al control. La prueba estadística en todos los casos fue ANOVA bidireccional.

Igualmente, para confirmar el grado de maduración se estudió la expresión del transportador transmembrana (DAT) cuya expresión aparece únicamente en neuronas DAérgicas adultas. Nuestros resultados reflejaron como la proteína DAT incrementa unas

20 veces cuando las células son crecidas en presencia de PRGO-f $**p < 0.01$, Figura 36. Igualmente, para el canal 2 de potasio rectificador interno regulado por proteína G (GIRK2), que es un canal que solo se expresa en células DAérgicas adultas, se observó un aumento de 35 veces mayor en las células cultivadas con PRGO-f con respecto al control, siendo estadísticamente significativo ($*p < 0,05$).

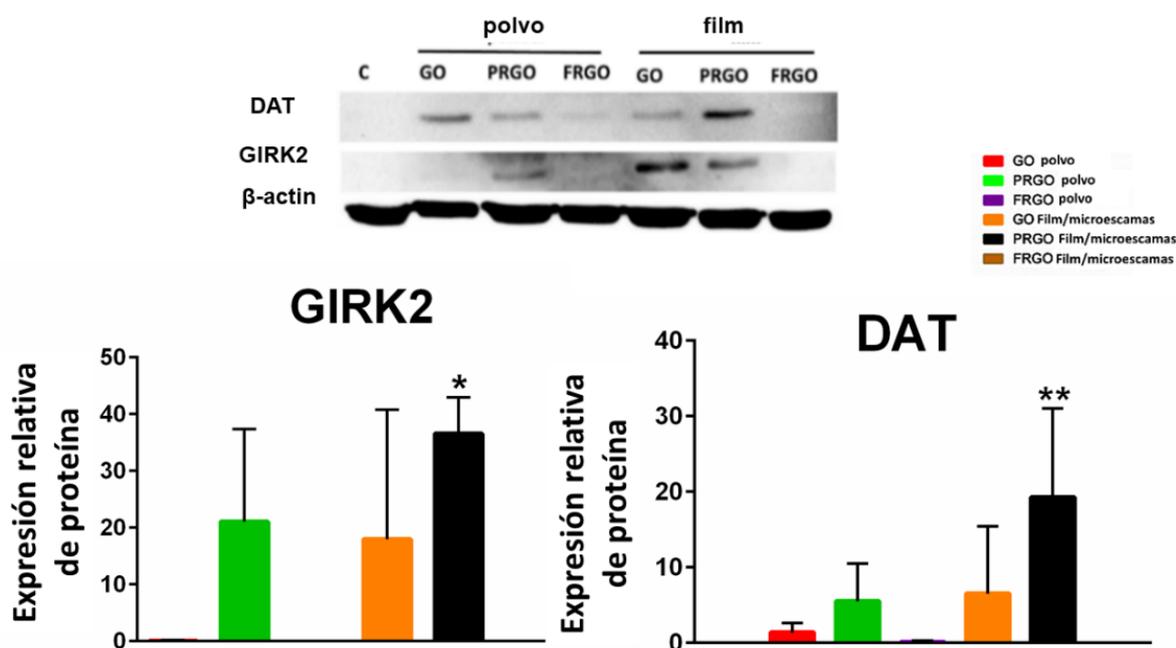


Figura 36. Muestra los geles de Western-blot de las proteínas DAT y GIRK2 y β -actina como marcador de control de carga proteica. Además de la cuantificación de los niveles de proteína en células SN4741 DAT y GIRK2 tratadas sin y con materiales grafénicos (50 μ g/ml) durante 21 días en cultivo. Los datos se normalizan a β -actina y se expresan como medias \pm SD, n = 3, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 para los materiales grafénicos frente al control. La prueba estadística en todos los casos fue ANOVA bidireccional.

Del mismo modo, el estudio de las proteínas implicadas en la comunicación neuronal, como son las proteínas presinápticas y postsinápticas, ratifican que las neuronas DAérgicas son maduras y poseen la maquinaria molecular necesaria para establecer una comunicación neuronal entre neuronas. Para ello, se determinó la expresión de proteínas: sinaptofisina y sinaptobrevina. En concreto, en la Figura 37, se muestran los resultados de expresión proteica obtenidos de las inmunotransferencias empleando el ensayo de Western-blot, donde se detectó un aumento significativo de sinaptobrevina 60 veces mayor con respecto al control, $*p < 0,05$, empleando el PRGO-f triturada en forma de microescamas sobre el cultivo celular. Así mismo, la expresión de sinaptofisina reflejó un aumento significativo, $*p < 0,05$, de 6 veces mayor en cultivos que contenían tanto PRGO-p como película en microescamas, en comparación con las muestras control. Estos resultados apoyan a los anteriormente descritos, donde se observa un mayor efecto madurativo y diferenciador del PRGO-f, para promover la diferenciación de DAérgicas en células SN4741.

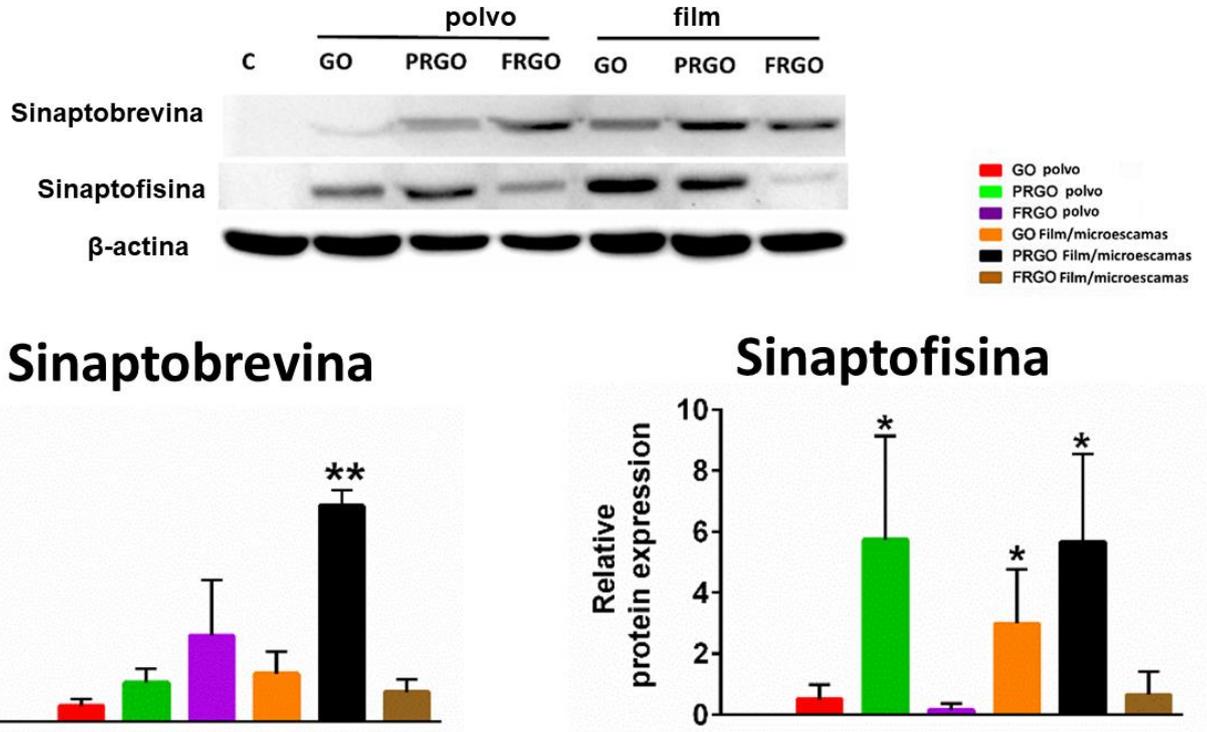


Figura 37. Muestra los geles de Western-blot de las proteínas sinaptobrevina y sinaptofisina y β - actina como marcador de control de carga proteica, en células SN4741 tratadas o no con materiales grafénicos ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$) durante 21 días. Los datos se normalizan a β -actina y se expresan como medias \pm SD, $n = 3$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ para óxido de grafeno y subtipos frente al control, utilizando el test estadístico ANOVA.



R.7. Efectos neuroprotectores de los materiales grafénicos contra la neurotoxina dopaminérgica: Rotenona

Dado el papel destacado de α -sinucleína en α -sinucleinopatías y PD, fue importante examinar los niveles de esta proteína en cultivos tratados con óxido de grafeno y sus derivados, sin la presencia o en presencia de la neurotoxina Rotenona. Los resultados, producto del análisis de los niveles de expresión de la proteína α -Syn en cocultivo con los diferentes materiales grafénicos, mostraron que en los cultivos con PRGO-f y FRGO-f a una concentración de 50 μ g/ml disminuían significativamente los niveles de proteína α -Syn en los cultivos (* $p < 0.05$) tras cultivar las células con los sustratos de dichos materiales durante 7 días (Figura 38). Finalmente, el análisis de los tratamientos con Rotenona (1,2 μ M), evidenció una reducción del 50% de la expresión de α -Syn en las muestras de FRGO-p, así como en las muestras con GO-f y PRGO-f con respecto al control positivo con Rotenona (** $p < 0.01$; Figura 39).

No obstante, la actividad neuronal de estos materiales con Rotenona, no se vio afectada con respecto a las muestras control tanto al control positivo como al control negativo.

Por otro lado, el análisis del marcador cFos como marcador de la actividad neuronal (Figura 40) mostró un incremento de expresión 3 veces mayor en los cultivos de células con tratamiento con GO-f, PRGO polvo y película, en comparación con los cultivos

control (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$) en células tratadas durante 7 días en cultivo con los materiales grafénicos, pero en ausencia de exposición neurotóxica. Cuando por el contrario se exponen las células a la neurotoxina, no se observa variación significativa de la expresión de cFos tanto en las células como como sin materiales grafénicos (Figura 41).

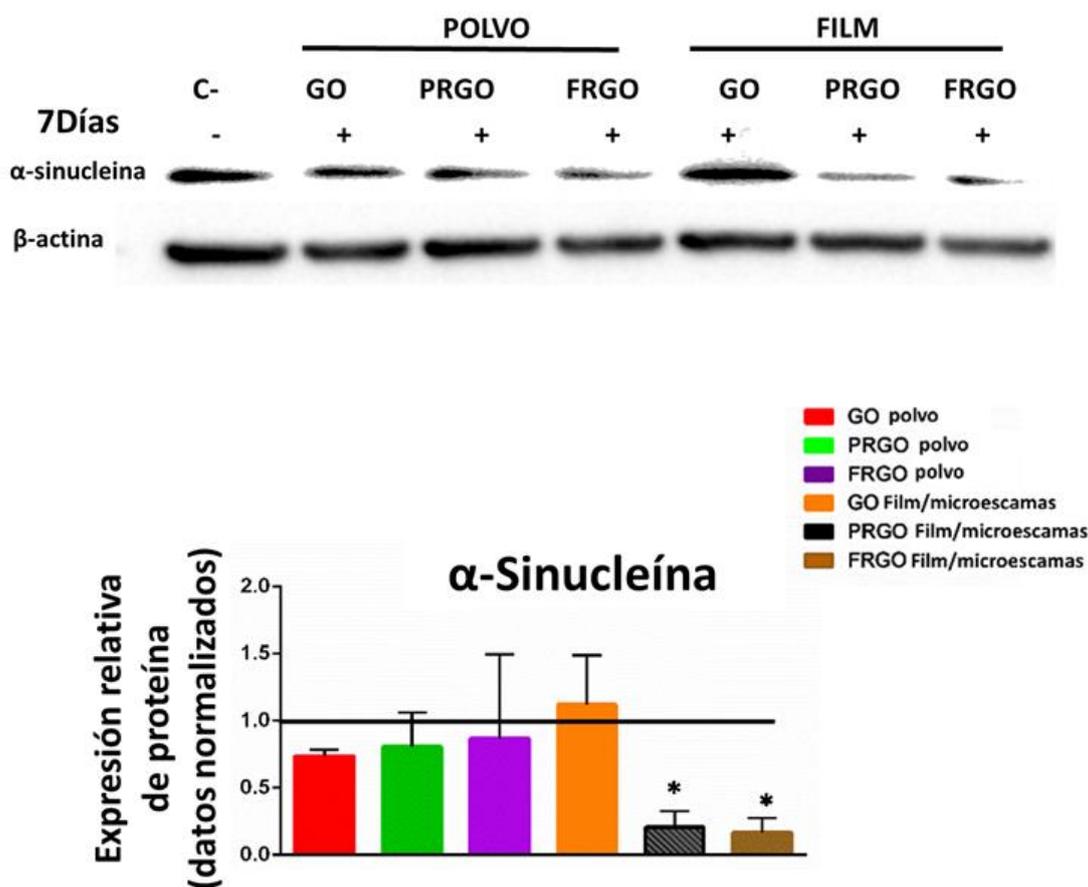


Figura 38. La cuantificación de la expresión de α -Syn se realizó en datos normalizados con β -actina. Los datos se expresan como medias \pm SD, $n = 3$, * $p < 0,05$, materiales grafénicos frente al control, utilizando el test estadístico ANOVA

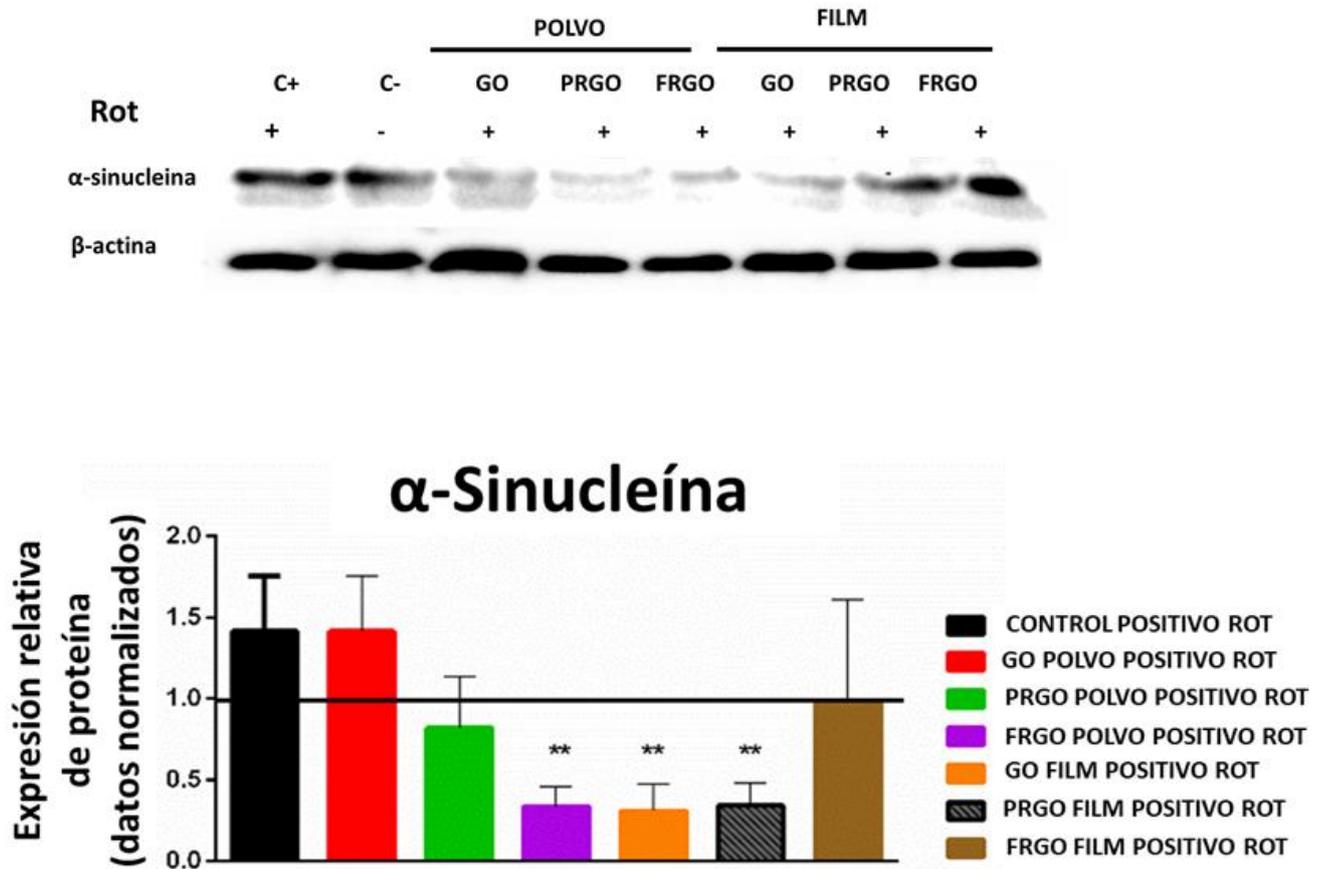


Figura 39. Muestra el Western-blot de α -sinucleína y β - actina como marcador de control de carga proteica, en células con 7 días en cultivo y con tratamiento con Rotenona. La cuantificación de la expresión de α -Syn se realizó en datos normalizados con β -actina, los datos se expresan como medias \pm SD, n = 3, * p <0,05, ** p <0,01, para materiales gráficnicos frente al control, utilizando el test estadístico ANOVA

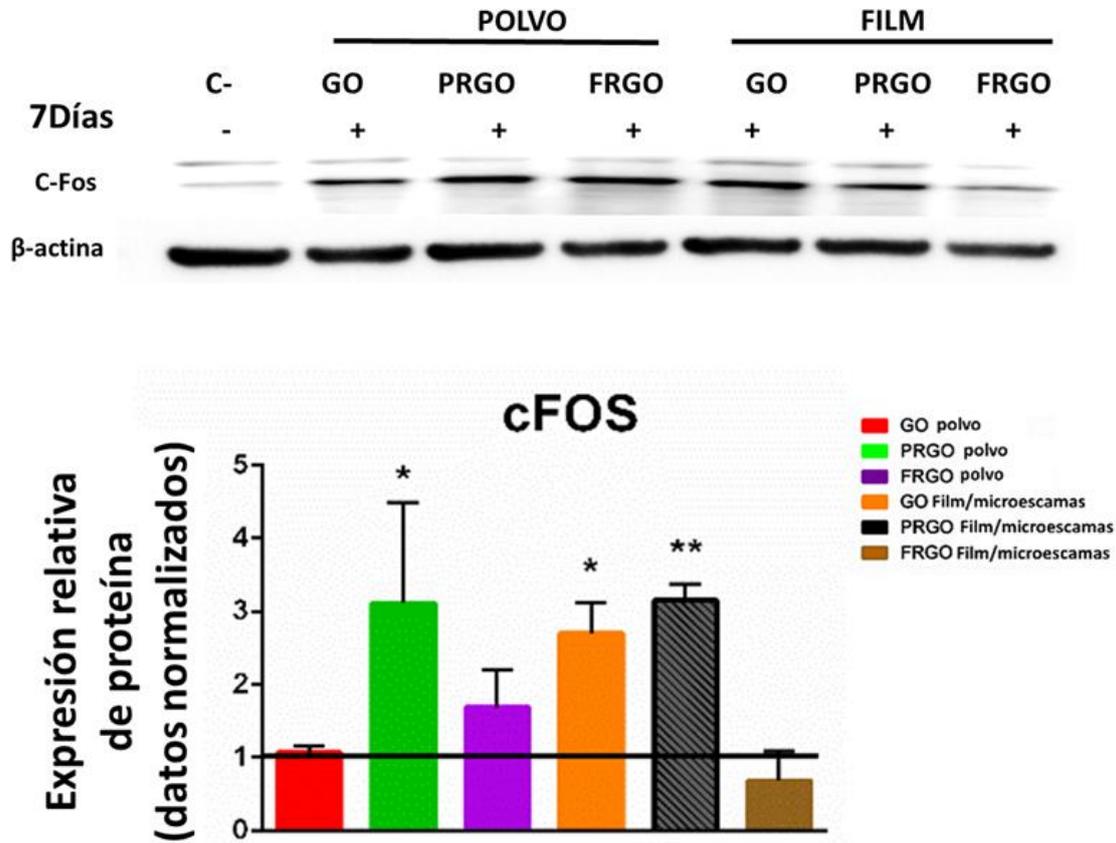


Figura 40. Muestra el Western-blot de cFos y β - actina como marcador de control de carga proteica, en células con 7 días en cultivo. La cuantificación de la expresión de α -Syn se realizó en datos normalizados con β -actina, los datos se expresan como medias \pm SD, n = 3, * p <0,05, ** p <0,01, materiales grafénicos frente al control, utilizando el test estadístico ANOVA.

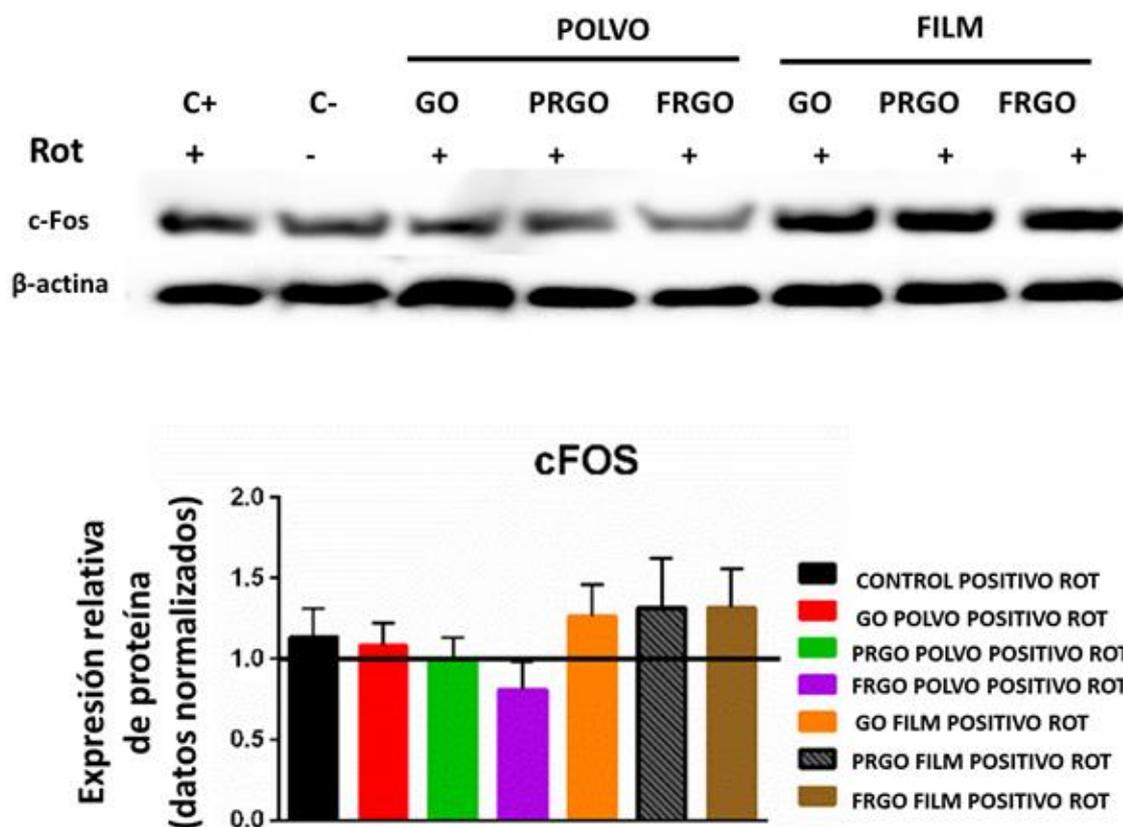


Figura 41. Muestra el Western-blot de cFos y β - actina como marcador de control de carga proteica, en células con 7 días en cultivo. La cuantificación de la expresión de α -Syn se realizó en datos normalizados con β -actina, los datos se expresan como medias \pm SD, $n = 3$, * $p < 0,05$ para materiales grafénicos frente al control, utilizando el test estadístico ANOVA. No se observan cambios significativos en la expresión de cFos con ROT con respecto al control.



R.II. Resultados relacionados con la capacidad diferenciadora y la citotoxicidad del nanocrystal glass like carbon (NGLC)

R.8. Resultados de la estructura y propiedades físicoquímicas del NGLC

Los resultados muestran el análisis de los dos tipos de NGLC empleados en la presente memoria de tesis: en forma de películas de diferentes espesores (NGLC-f, 5, 20 y 80 nm) sobre soportes de PMMA (Figura 42A) y en forma de polvo (NGLC-p, Figura 42E). En concreto, se comprobaron los efectos de cinco concentraciones diferentes de microescamas NGLC (NGLC-f) (1, 5, 10, 20 y 50 $\mu\text{g/ml}$) para la obtención de los datos para el análisis estructural y morfológico de las correspondientes películas. Los resultados fueron obtenidos empleando concentraciones crecientes de NGLC-p en el medio de cultivo o NGLC-f bañadas en el mismo medio de cultivo sobre el cual se cultivaron las células, pudiendo definir el grosor de estas películas y, por tanto, sus propiedades ópticas y eléctricas, controlando cuidadosamente las relaciones de flujo de gas utilizadas en el procedimiento CVD, (Figura 42 A y B). De este análisis se obtuvieron datos sobre las muestras de menor espesor (~ 5 nm) que mostraron una alta transparencia (86%) (Figura 42A) y una resistencia eléctrica moderadamente alta ($7.8 \Omega / \text{sq}$). Estas películas delgadas estaban compuestas por fragmentos de grafeno curvos y de pocas capas de ~ 3 nm de tamaño medio unidos por una matriz de carbono amorfo (Figura 42C), que replica la

estructura de los carbonos ampliamente utilizados similares al vidrio. Con respecto a la producción de NGLC-p (Figura 42D), se observó que estaban compuestos de microescamas con tamaños de $82\pm 37\ \mu\text{m}$ y aproximadamente 300 nm de espesor (Figura 42E y F). La estructura interna o microestructura de nuestros materiales de carbono también se analizó mediante espectroscopía Raman (Fig. 42G). El desorden en la microestructura de nuestras películas y escamas de NGLC en comparación con los materiales de grafeno se manifestó por la aparición de la banda D ($1350\ \text{cm}^{-1}$), el ensanchamiento de la banda G y las apariciones de las bandas D' y D'' (1620 y $1200\ \text{cm}^{-1}$, respectivamente).

Las bandas $2450\ \text{cm}^{-1}$ aproximadamente y $2950\ \text{cm}^{-1}$ fueron producto de la combinación de las bandas D, D' y D''. Las bandas a $2700\ \text{cm}^{-1}$ y $3250\ \text{cm}^{-1}$ aproximadamente son los armónicos D y D' respectivamente, y desaparecen en los carbonos amorfos.

Los resultados derivados del análisis topográfico de la superficie de las muestras de NGLC-f transferidas en PMMA mostraron a través del AFM, que la rugosidad aumentaba al aumentar los espesores correspondientes (Figura 42H). Estas arrugas fueron visualizadas en NGLC-f durante el enfriamiento inmediatamente después del proceso de CVD debido al desajuste entre el coeficiente térmico de las películas de carbón y el catalizador de cobre, y permanecen una vez que se transfieren al PMMA.

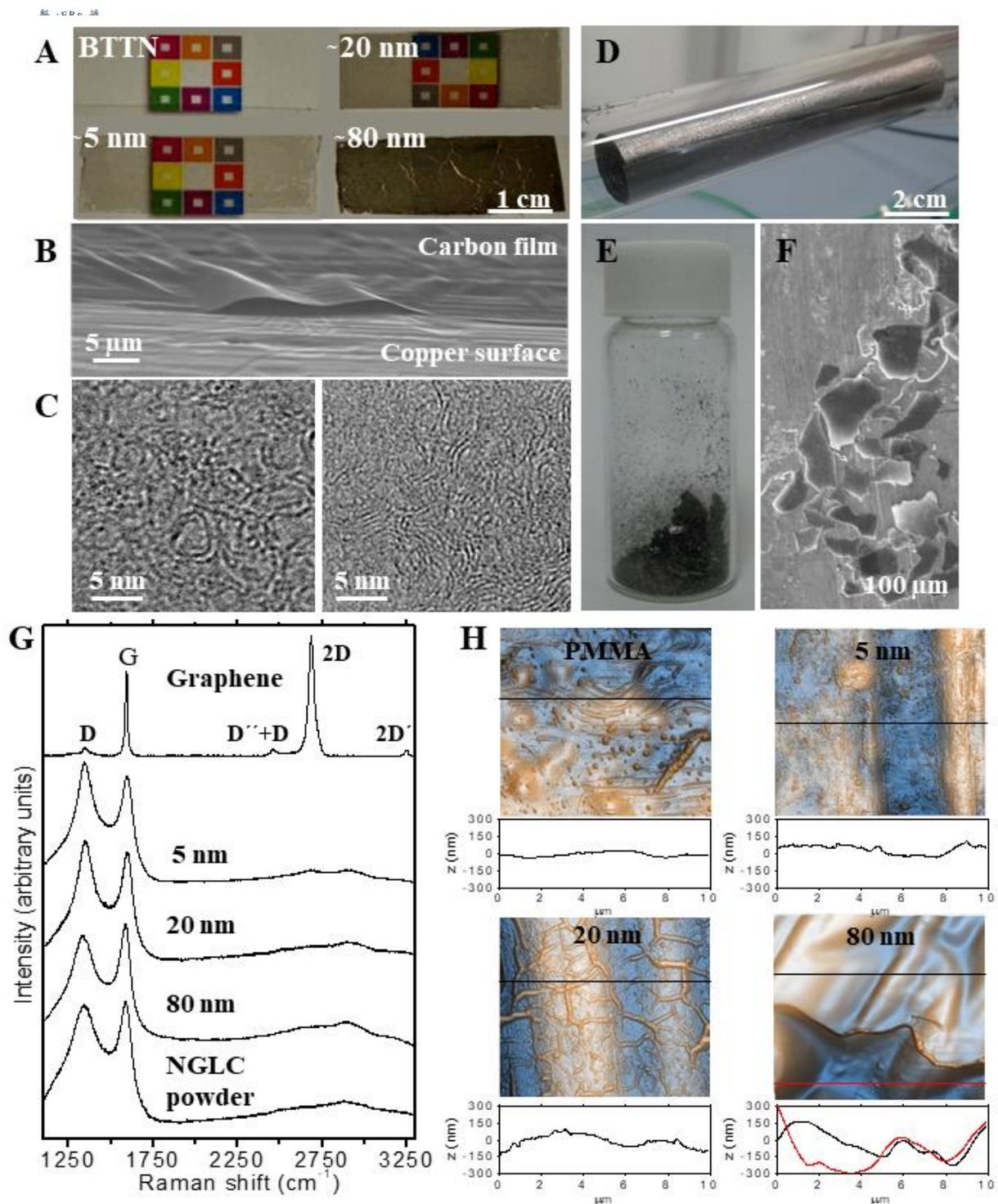


Figura 42. Caracterización de películas de NGLC utilizando diferentes técnicas de caracterización microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión (TEM), y microscopía de fuerza atómica, AFM (A). NGLC-f con diferentes espesores (~ 5 , ~ 20 y ~ 80 nm) y película sin carbono de tratamiento térmico de referencia (BTTN) utilizada en los experimentos que muestran diferentes grados de transparencia. (B) Se obtuvieron sobre una superficie de cobre controlando cuidadosamente las relaciones de flujo de gas utilizadas en el procedimiento CVD. Estas películas están compuestas por fragmentos de grafeno curvos y de pocas capas de ~ 3 nm de tamaño medio unidos por una matriz de carbono amorfo (C), que replica la estructura de los carbonos vítreos ampliamente utilizados. (D) Cobre recubierto de carbono después de CVD y (E, F) escamas de tamaños de $82 \pm 37 \mu\text{m}$ y espesores de aproximadamente 300 nm. (G) Espectroscopía Raman de películas NGLC con diferentes espesores (~ 5 , ~ 20 y ~ 80 nm), microescamas y grafeno, que muestra los amplios espectros de los carbonos amorfos en comparación con el grafeno altamente cristalino. (H) Rugosidad de la superficie de los compuestos de película de PMMA / Carbono medida por AFM, mostrando una rugosidad creciente en aquellos con películas de carbón de 20 y 80 nm de espesor.

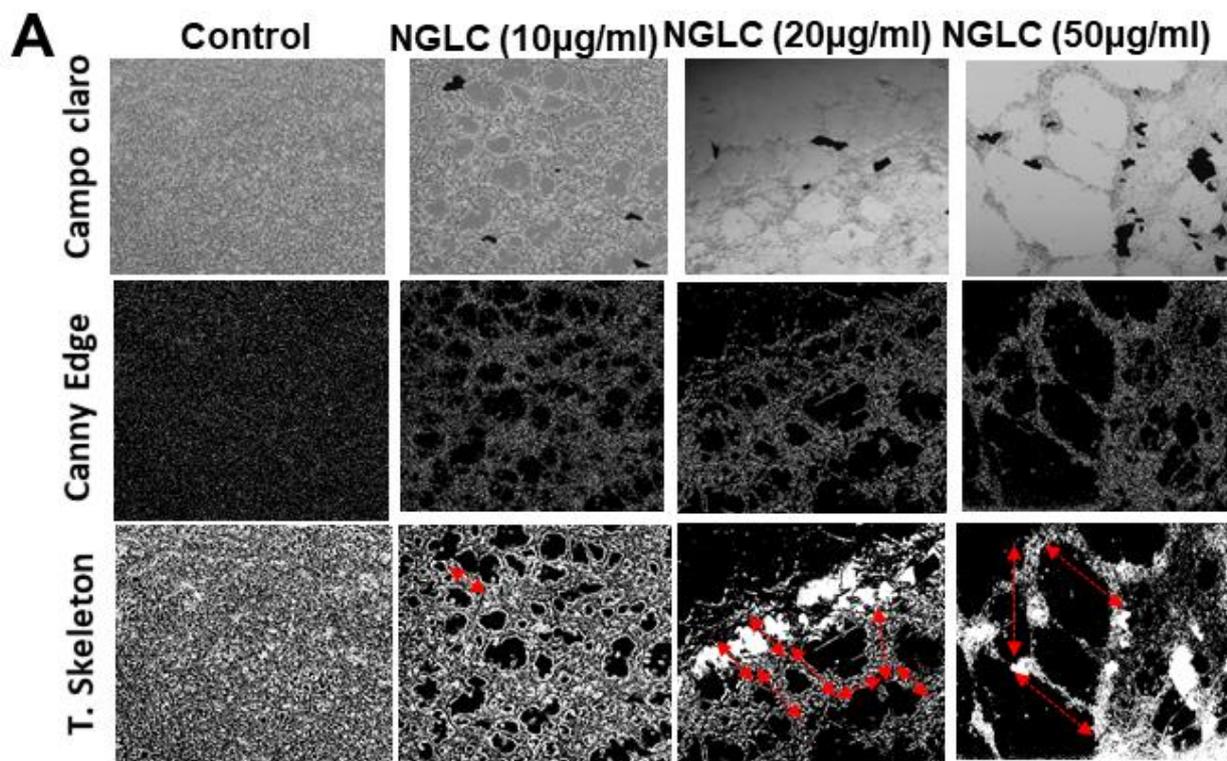
R.9. Efectos del NGLC en las células SN4741. Análisis de la morfología y distribución celular

Los resultados, producto del análisis morfológico y citoarquitectónico de los cultivos de la línea celular SN4741 crecidos durante 7 días en exposición a microescamas NGLC, mostraron cambios evidentes en la distribución celular y en su estructura. Las imágenes de los cultivos, tras 7 días de tratamiento con NGLC en escamas mostraron alrededor de las mismas (visualizadas como estructuras negras/opacas en la Figura 30) un crecimiento en forma en red, aparentemente organizadas en el cultivo, de una manera dependiente al tiempo de permanencia en contacto con estas microescamas. Por el contrario, las células cultivadas sin NGLC al cabo de 7 días, mostraron una disposición en monocapa celular, cuyos espacios intercelulares apenas están presentes después de 7 días de cultivo en una alta densidad de células.

Los resultados de la Figura 43 muestra el análisis en el programa ImageJ/Fiji del NIH donde, empleando la aplicación de *Canny Edge*, se pudo observar el contorno de las estructuras que forman las células a modo de red o entramado. Igualmente, empleando el complemento *Skeleton 2D / 3D*, se mostró la esqueletización estructurada de la arquitectura celular, donde se apreciaron procesos de ramificación que pudieron ser cuantificables. Ambos programas permitieron evidenciar la existencia de una citoarquitectura, no parecía evidenciar un fenómeno estocástico, por el contrario, se

constató que era un efecto real del NGLC en términos de diferenciación de las muestras tratadas, ya que en las muestras control no se han observado dichos fenómenos.

El análisis de la distancia entre ramas mostró que el control (sin tratamiento) tenía una longitud media de ramificación de $5,3 \pm 1,3 \mu\text{m}$ (media \pm SEM) tras la medición de 25 ramificaciones. En concreto fueron observados en el experimento 1: $5,3 \pm 2,4 \mu\text{m}$ (n=10); experimento 2: $5,3 \pm 2,4 \mu\text{m}$ (n=6); experimento 3: $8,0 \pm 3,2 \mu\text{m}$ (n=6). Además, se encontró que en el experimento con NGLC $10 \mu\text{g} / \text{ml}$, la rama promedio poseía una longitud de $36,6 \pm 3,2 \mu\text{m}$. Se analizaron 36 ramificaciones: experimento 1: media $32,1 \pm 2,9 \mu\text{m}$ (n = 13); experimento 2: $50,5 \pm 6,1 \mu\text{m}$ (n = 10); experimento 3: $30,6 \pm 5,8 \mu\text{m}$ (n = 10). La muestra con NGLC $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ tuvo una longitud media de ramificación de $72,2 \pm 5,2 \mu\text{m}$. Se analizaron 33 ramificaciones: experimento 1: $69,4 \pm 9,5 \mu\text{m}$ (n = 3); experimento 2: media $75,4 \pm 8,0 \mu\text{m}$ (n=13); experimento 3: $71,6 \pm 10,5 \mu\text{m}$ (n = 7). En este caso, se observó una diferencia significativa con respecto al control ($p < 0,05$). En la muestra con NGLC $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ la longitud media de la ramificación fue de $73,5 \pm 6,7 \mu\text{m}$. Se analizaron 39 ramificaciones: experimento 1: $52,3 \pm 6,5 \mu\text{m}$ (n = 13); experimento 2: $59,7 \pm 9,5 \mu\text{m}$ (n = 13); $59,7 \pm 9,5 \mu\text{m}$ (n = 13). Y se observó también una diferencia significativa del tamaño de las ramas ($p < 0,05$) con respecto al control. En términos generales, el análisis de la distancia media que se registró en las ramificaciones demostró una mayor distancia de ramificación en los cultivos con concentración de 20 y $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ significativamente ($*p < 0,05$) mayor que las muestras control.



B

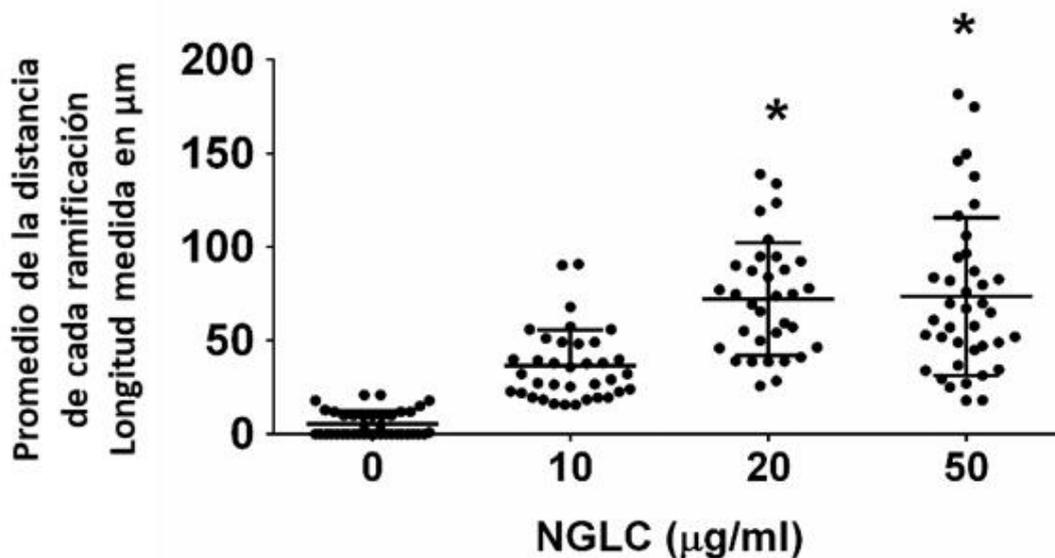


Figura 43. Influencia de la concentración de NGLC sobre el crecimiento celular. (A) Cambios en la arquitectura celular en un cultivo de células monocapa SN4741 después de 7 días de cultivo con o sin microescamas de NGLC (control) a tres concentraciones diferentes (10, 20 y 50 µg/ml). El control se muestra en un cultivo monocapa con alta confluencia después de 7 días. Se realizó un análisis de imagen utilizando el software Image J / Fiji y el plugin Canny Edge, que informa sobre la estructura del contorno. El análisis de la arquitectura celular se realizó empleando el complemento Skeletonized 2D / 3D (B) Cuantificación de la longitud de las ramas se obtuvo mediante el análisis de herramientas de medición de microscopio y 2D / 3D esqueletizadas, programa ImageJ / Fiji. Ampliación = 5X. Se utilizó ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Fisher para la comparación entre diferentes grupos: * $p < 0,05$ grupos vs control.

R.10. Comparación de la viabilidad y la actividad metabólica celular

R.10.1. Resultados del ensayo de MTT

Los resultados de la viabilidad y metabolismo celular empleando el ensayo colorimétrico de actividad metabólica MTT, con un tiempo respuesta de 24 horas, 3 días y 7 días de cultivo celular con cinco concentraciones de microescamas NGLC reveló diferentes patrones de comportamiento (Figura 44). Los resultados desvelaron que después de 24 horas de cultivo, existió un aumento alto y significativo de la viabilidad o metabolismo relativo ($200 \pm 24\%$; $p < 0,001$) con cantidades bajas de NGLC ($1 \mu\text{g/ml}$), mientras que el metabolismo disminuyó a medida que aumentaba la concentración. La viabilidad o metabolismo relativo más baja se registró a las 24 horas con NGLC $50 \mu\text{g/ml}$. Después de 3 días de cultivo, el metabolismo permaneció estable con respecto al control, pero después de 7 días, el metabolismo y por tanto la viabilidad relativa mejoró significativamente ($225 \pm 69\%$; $p < 0,001$) para NGLC a una concentración de $20 \mu\text{g/ml}$ (Figura 44). Después de 24 horas de cultivo, se observó un aumento alto y significativo de la capacidad relativa de viabilidad o metabolismo ($200 \pm 24\%$; $p < 0,001$) con cantidades bajas de NGLC ($1 \mu\text{g/ml}$), mientras que la viabilidad relativa o metabolismo disminuyó a medida que aumentaba la concentración.

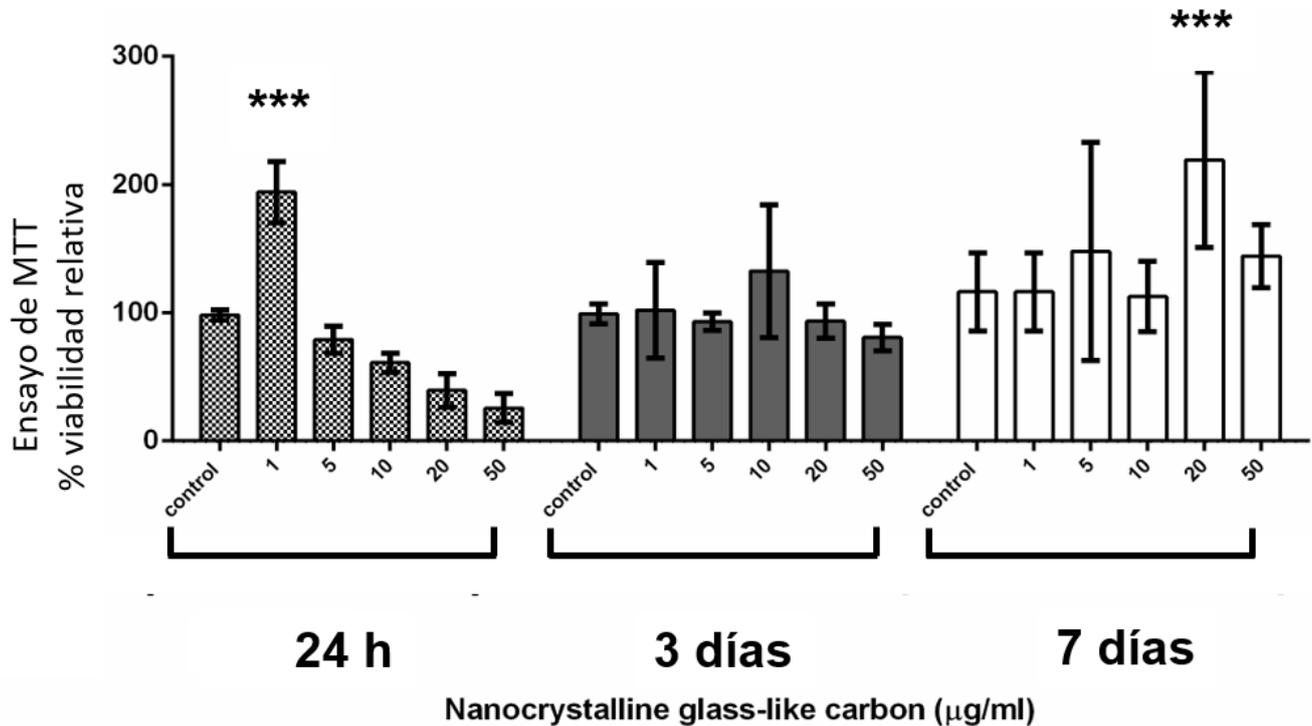


Figura 44. Ensayo MTT para metabolismo y proliferación celular. Para comparar la viabilidad celular, se cultivaron SN4741 en medios que contenían cinco concentraciones de microescamas diferentes (0 como control, 1, 5, 10, 20 y 50 µg/ml) de NGLC durante 24 horas, 3 días y 7 días. La viabilidad mostrada en las muestras control, han sido las analizadas en diferentes muestras de diferentes ensayos. Se utilizó ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Fisher para la comparación entre grupos vs control; *** $p < 0.0001$.

R.10.2. Resultados del ensayo de viabilidad y muerte celular empleando Calceína AM y Homodímero de Etidio-1 (EthD-1)

Para confirmar el ensayo de MTT en términos de viabilidad, se realizó el ensayo de vida/muerte celular utilizando Calceína AM como marcador de viabilidad y Homodímero de Etidio-1 (EthD-1) como marcador de muerte celular (Figura 45). En general, este ensayo no reveló diferencias significativas entre el número de células apoptóticas (3-7%) con tratamiento con NGLC y controles negativos (C- = muestras sin Tritón X-100 al 10% o carbono vítreo). Sin embargo, se encontró una diferencia significativa ($p < 0,001$) de las muestras con NGLC con respecto a los controles positivos (C + = muestras con Tritón X-100 al 10% como inductor apoptótico), que alcanzó el $90 \pm 4\%$ de células apoptóticas en las tres condiciones de cultivo (24 horas, 3 días y 7 días). En el mismo análisis, el número de células vivas a las 24 horas no mostró diferencias entre los grupos y el control negativo, pero sí que mostró una disminución significativa ($p < 0,001$) en comparación con el control positivo ($13 \pm 2\%$). A los 3 días de cultivo, solo se encontró un cambio significativo ($p < 0,01$; $99 \pm 5\%$ de células vivas) en un grupo ($10 \mu\text{g/ml}$) de células tratadas con NGLC. Después de 7 días, los grupos de células vivas cultivadas con 1, 10, 20 y $50 \mu\text{g/ml}$ mostraron ($100 \pm 10\%$) una diferencia significativa ($p < 0,01$) en comparación con las células de control positivo ($13 \pm 2\%$).

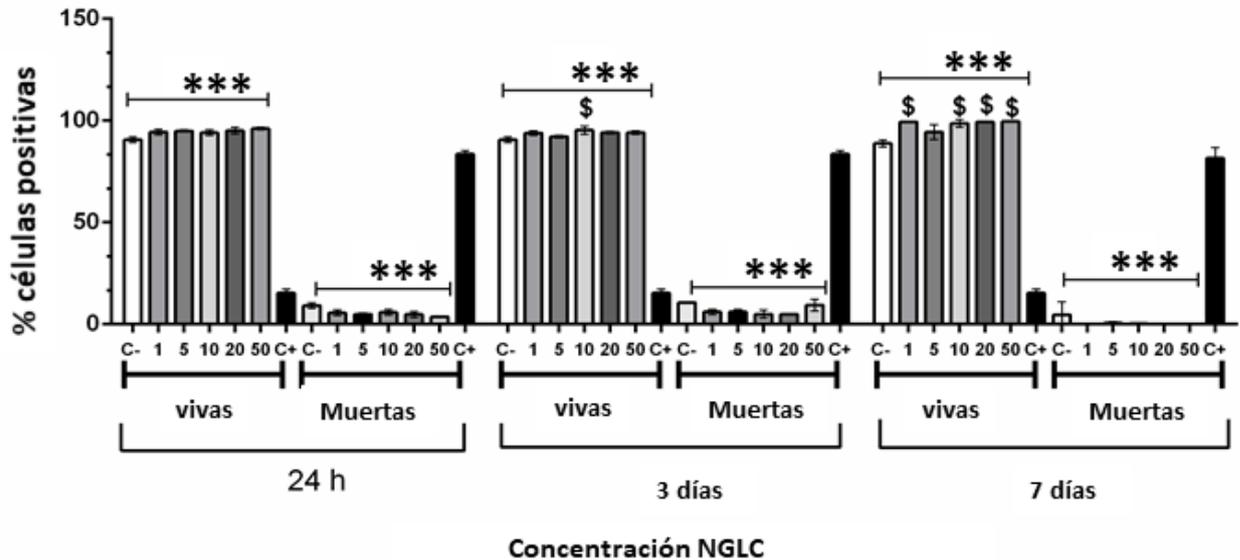


Figura 45. Medición de citotoxicidad mediante un ensayo de apoptosis / necrosis. Los valores indican células apoptóticas / necróticas expresadas como % de células teñidas positivamente contadas por citometría de flujo después de 24 horas, 3 días y 7 días de cultivo con microescamas de NGLC en cinco concentraciones diferentes (1, 5, 10, 20 y 50 µg/ml). Se utilizó ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Fisher para la comparación entre grupos vs control, *** $p < 0.0001$.

Los resultados descritos anteriormente corroboran el estudio de microscopía a los 7 días de cultivo, mediante el empleo del campo claro e inmunofluorescencia, donde se observaron los marcadores de Calceína AM (como marcador vital) y EthD-1, como marcador de apoptosis (Figura 45 y 46).

Estos datos evidenciaron que NGLC no promueve los procesos de apoptosis o necróticos, como lo demuestra el análisis de inmunofluorescencia de EthD-1 (Figura 43), ya que no se observaron diferencias significativas a las 24 horas de tratamiento a ninguna concentración de NGLC, ni siquiera a 50 µg/ml. En el día 7 se describió un aumento



significativo de la viabilidad medida por Calceína AM de las células tratadas con NGLC (incluidas las células tratadas con una dosis alta de 50 $\mu\text{g/ml}$). Estos datos también se complementan con los descritos previamente para el análisis MTT (ver Figura 44).

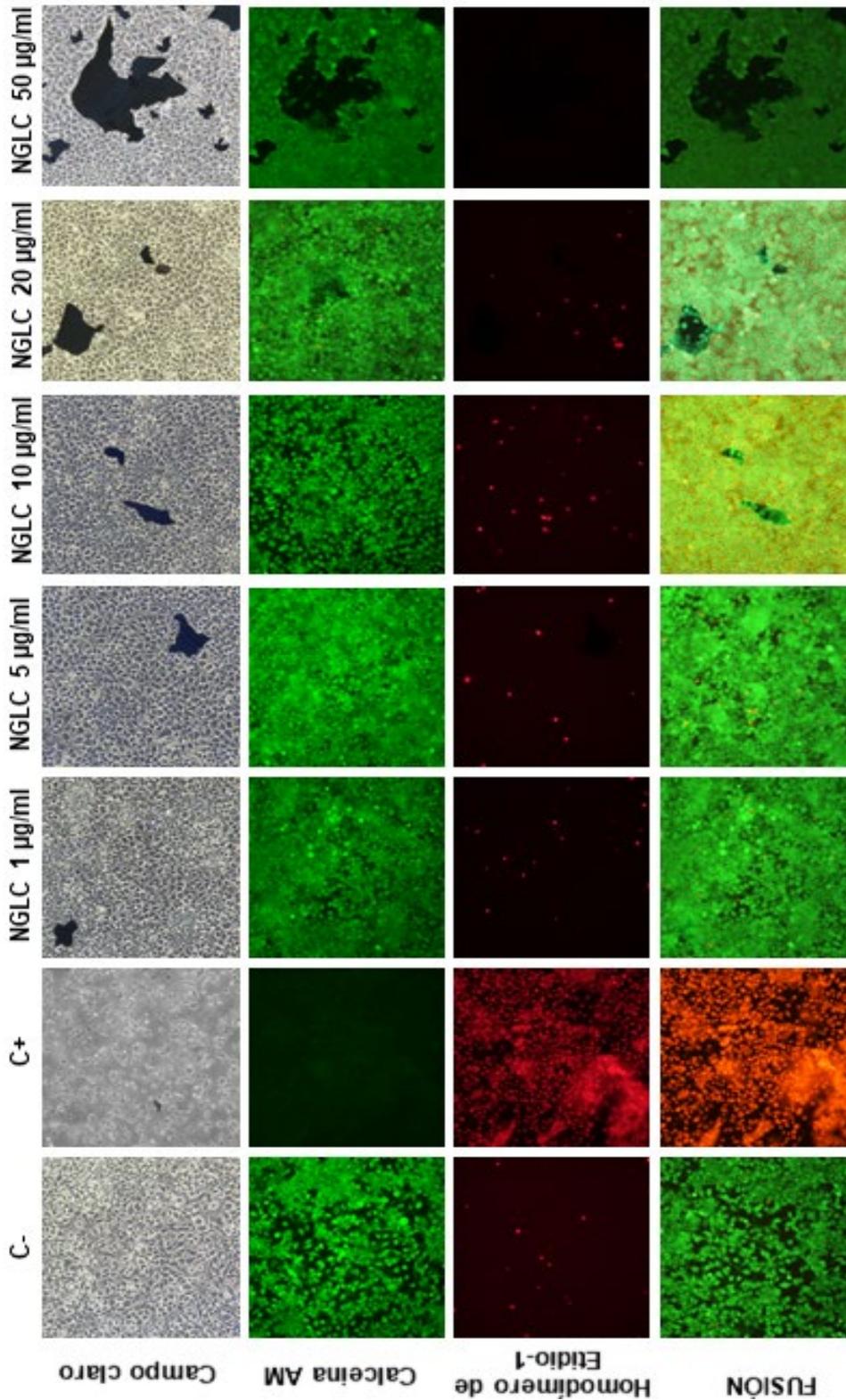


Figura 46. Imágenes de campo brillante (fila superior) e inmunofluorescencia (filas inferiores) que muestran el ensayo de apoptosis / necrosis con células SN4741 cultivadas en medio que contiene cinco concentraciones diferentes (1, 5, 10, 20 y 50 µg / ml) de microscamas NGLC. Se utilizó calceína AM (verde) como marcador de inmunofluorescencia vital y EthD-1 (rojo) como marcador de apoptosis, después de 7 días de cultivo, estudiado también por imágenes de fusión. Para ambos experimentos se utilizó un control positivo (C+) que representa el uso de Triton X-100 al 10% en el cultivo para inducir procesos apoptóticos, y el control negativo (C-) representa el cultivo sin Triton X-100 al 10% ni NGLC.

R.11. Ensayos de cuantificación de expresión de proteínas implicadas en la proliferación celular

Con el fin de interpretar la disminución de la proliferación o metabolismo celulares observada en el MTT, se realizaron experimentos de cuantificación de expresión de proteínas a las 24 horas y 7 días de cultivo. Las proteínas se analizaron mediante la detección y cuantificación de la expresión de PH3 y SMP30 implicadas tanto en los procesos de proliferación como de quiescencia respectivamente (Figura 47). El análisis de PH3 mostró en células de control frente a células tratadas con 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de NGLC después de 24 horas y 7 días de cultivo, una disminución significativa ($p < 0.05$) de la expresión de PH3, es decir, a las 24 horas las células no permanecían activas para la división celular, por el contrario, SMP30 se mostraba aumentado, favoreciendo que el ciclo celular se mantuviera en estadio inactivo, en fase G0. Posteriormente, el análisis después del día 7 mostró una capacidad metabólica mucho mayor con respecto a las células de control, lo que está relacionado con el aumento en la expresión relativa de PH3, mientras que SPM30 permaneció indetectable (Figura 47).

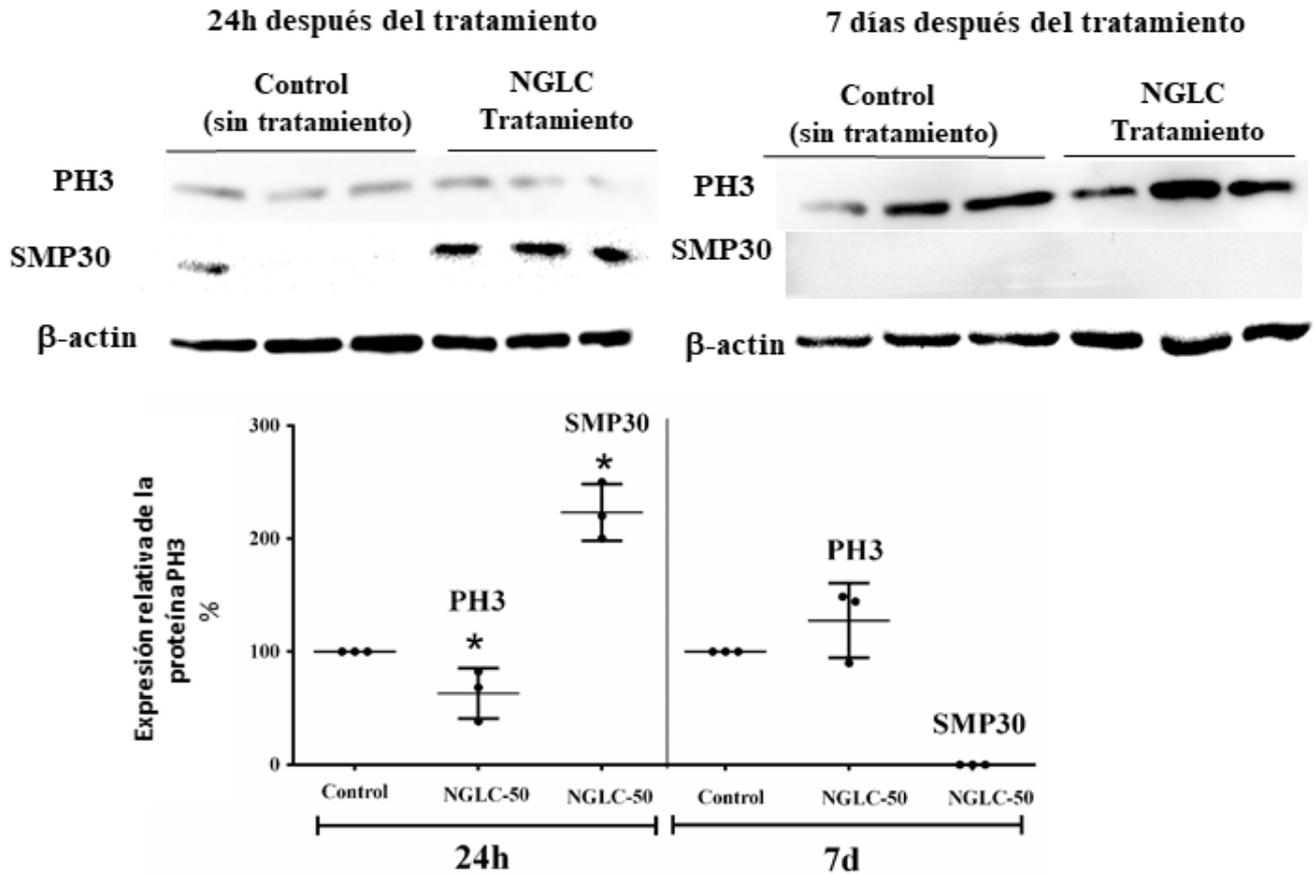


Figura 47. El análisis de histona 3 fosforilada (PH3); SMP30 y β - actina como marcador de control de carga proteica por transferencia Western-blot muestra el estudio a las 24 horas y 7 días usando NGLC a 50 μ g/ml frente al control (sin NGLC). Se cuantificó la expresión relativa de proteínas PH3 y SMP30 (%) y se muestran los datos normalizados con muestra de control a las 24 horas y 7 días de cultivo. Los datos se expresan como media \pm error estándar de las medias (media \pm SEM, n = 6). Se utilizó ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Fisher para la comparación entre diferentes grupos; * p <0,05 grupos vs control.

Igualmente, las determinaciones del marcador de proliferación PCNA, implicado en la replicación de ADN (Figura 48), mostraron después de 7 días de cultivo con la concentración más alta de NGLC (50 $\mu\text{g/ml}$) un aumento significativo ($p < 0,001$) (200 \pm 48%) en la proteína con respecto al control sin tratar. Se confirmó que a los 7 días las células permanecen activas metabólicamente y preparando su maquinaria celular para iniciar los procesos de mitosis.

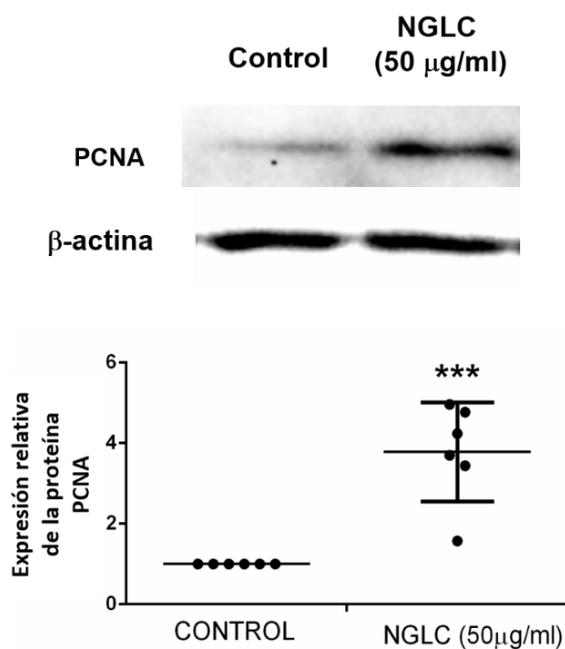


Figura 48. Análisis de Western-blot de PCNA y β -actina como marcador de control de carga proteico. Las células SN4741 se cultivaron durante 7 días con una alta concentración (50 $\mu\text{g/ml}$, NGLC). La cuantificación de PCNA para expresiones proteicas relativas se expresa como porcentaje. Los datos se muestran como media \pm SEM, y se utilizaron las pruebas t de Student para la significación estadística entre dos grupos, $n = 3$, *** $p < 0,001$.

R.12. Maduración celular

Se examinó la capacidad madurativa del NGLC en células SN4741 cultivadas después de 7 días de permanencia en cultivo con una alta concentración de dicho material (50µg/ml). La mayoría de las células SN4741 se volvieron positivas para TH (se evidenció un aumento significativo de TH (4 veces) con respecto al control, Figura 49), lo que indica la adquisición de un fenotipo dopaminérgico maduro, como lo demostraron los análisis de proteínas mediante transferencia de Western-blot.

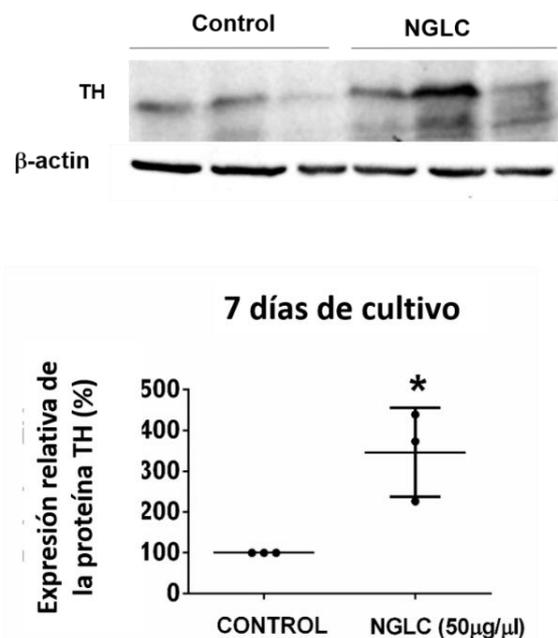


Figura 49. Imagen del gel de inmunotransferencia, por Western-blot de la TH y β -actina como marcador de control de carga proteico. Las células SN4741 se cultivaron durante 7 días con una alta concentración (50 µg/ml, NGLC). La cuantificación de TH para expresiones proteicas relativas se expresa como porcentaje. Los datos se muestran como media \pm SEM, y se utilizaron las pruebas t de Student para la significación estadística entre dos grupos, n = 3, * p <0,05.

R.13 Películas de NGLC evaluadas como andamios celulares

La capacidad de NGLC-f como andamio para el crecimiento o adhesión celular se determinó en diferentes cultivos celulares (Figura 50). Las imágenes de inmunofluorescencia DAPI (marcaje azul) a bajo aumento (5X), mostraron diferentes patrones de crecimiento en el día 7 de cultivo después de una siembra de alrededor de 10.000 células por NGLC y películas o portaobjetos de vidrio sin película tratada térmicamente (BTTN) de línea de base (como control).

R.13.1. Análisis de la morfología y la distribución celular en células cultivadas sobre NGLC-f

Se comprobó la adhesión celular a las películas *in vivo* usando tinción Hoechst 33342 como marcador nuclear. Además, se observó que los cultivos en una película de 20 nm de espesor mostraron una distribución direccional y lineal espontánea (Figura 50, D1-D2 –flechas- y Figura 50, E1-E2). Esta distribución particular no pareció deberse a un artefacto estructural de la película, sino a otros factores no determinados en este trabajo. De la misma manera, en zonas internas de la película con alta densidad celular se verificó el hecho de tal distribución especial de celdas (Figura 50, E1-E2). La direccionalidad no se apreció en ningún caso en los controles negativos (Figura 50, A1-A2) ni en los controles cultivados sobre soportes plásticos (Figura 50, A3-A4) ni en NNT

(Figura 50, B1-B5). La película de 80 nm (Figura 50, E1-E5) parece ser la que tiene el menor número de células, quizás debido a su mayor contenido de carbono. Sin embargo, las células cultivadas a largo plazo (2 semanas) y fijadas mostraron un número bajo. Además, la película NGLC de 20 nm de espesor mostró un mayor número de células adheridas en comparación con las películas de 5 y 80 nm.

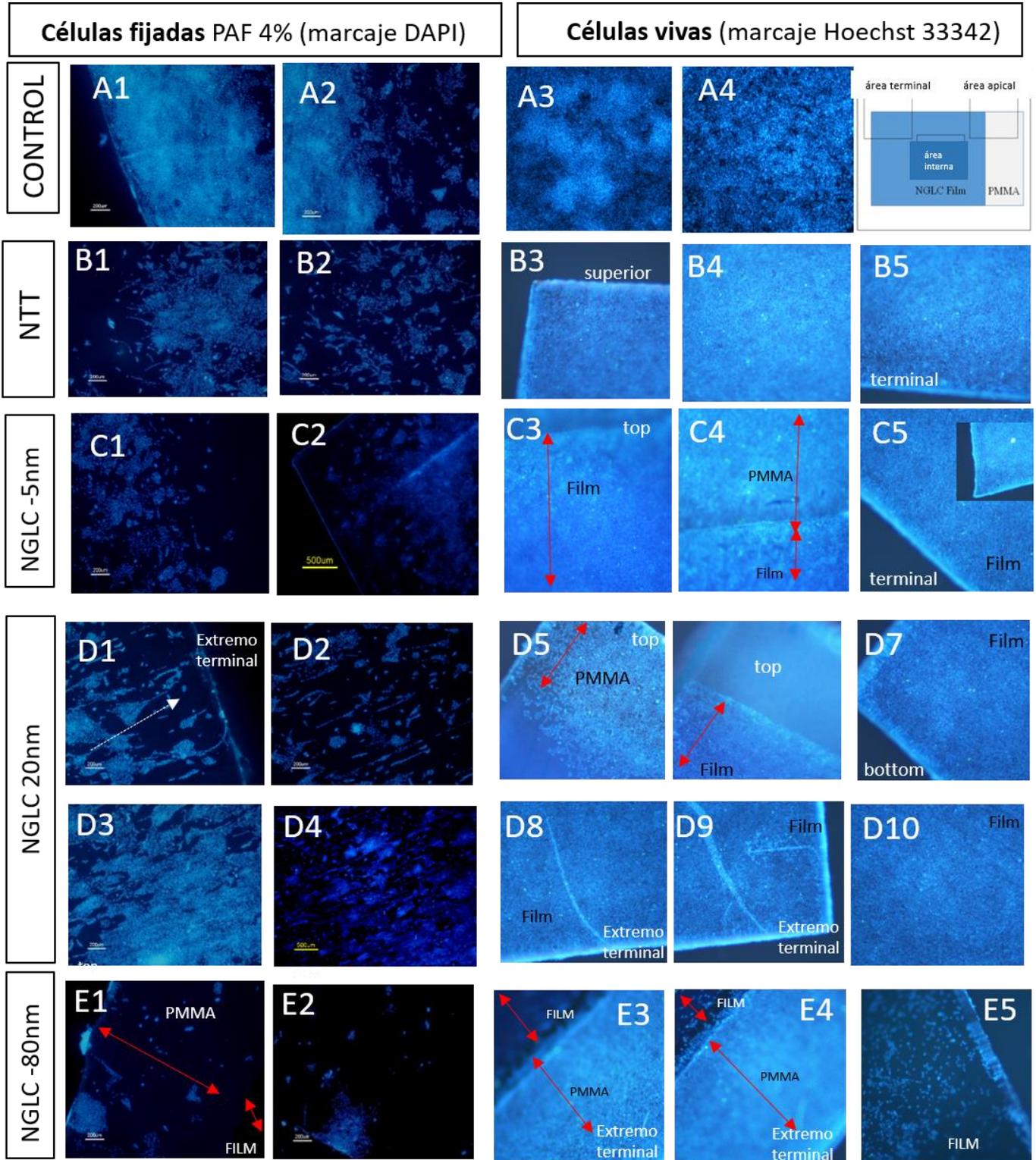


Figura 50. Influencia del espesor de la película NGLC sobre el cultivo celular SN4741. Las dos columnas de imágenes de la izquierda del panel (células fijadas con PAF) muestran la microscopía para inmunofluorescencia DAPI (fabricante de núcleos: etiqueta azul) a bajo aumento (5X) con diferentes patrones de crecimiento después de 2 semanas. Las tres columnas de la derecha (células vivas) muestran imágenes obtenidas *in vivo* con un aumento reducido (5X) después de marcar los núcleos con Hoechst 33342 (marcador azul). Se muestran células fijas cultivadas en monocapa sobre un portaobjetos de vidrio (A1-A2), en la superficie de plástico del pocillo (A3-A4) o en una película sin carbono tratada térmicamente de referencia (BTTN) (B1-B5; Figura B3: zona apical, B4: zona interna, B5: zona inferior) como controles experimentales. Se utilizaron películas NGLC de 5 nm de espesor (C1-C5), NGLC de 20 nm de espesor (D1-D5 y E1-E5) y NGLC de 80 nm de espesor (F1-F5) para el cultivo celular sobre ellos. Las áreas correspondientes a las películas de PMMA y NGLC se diferencian en las imágenes (C3, C4, C5). También, la disposición lineal celular espontánea junto con la direccionalidad del crecimiento celular y la orientación de las células (D1; flechas) se muestra en el área inferior de la película, mientras que el crecimiento en la zona de la película interna tiene el mismo efecto de disposición celular (D2, E1, E2). Se muestra la separación entre PMMA y la película (D4) y la zona interna de la película (D5). Se muestran células fijas cultivadas en la parte superior de la película NGLC de 80 nm de espesor (E1, E2) con los límites de la región de PMMA (E3, E4, flecha) y la película, así como una parte inferior de la película detallada (E5).

R14. Análisis de la diferenciación neuronal en relación con la comunicación celular y funcionalidad

Cuando las células SN4741 se cultivaron durante 4 semanas en la parte superior de los portaobjetos como control (Figura 51A, a1-a4), o en soporte NNT (Figura 51A, b1-b4) en este caso como un control de la película de NGLC-f, o en la parte superior del espesor de 5 nm (Figura 51A, c1-c4), 20 nm de espesor (Figura 51A, d1-d4) y películas NGLC de 80 nm de espesor (Figura 51A, e1-e4), observamos un patrón de comportamiento diferencial dependiente del grosor, como lo demuestra la inmunofluorescencia de la diferenciación celular y los marcadores de comunicación celular Sinaptofisina y GIRK2. Los resultados de inmunofluorescencia se cuantificaron (Figura 51B) para establecer el grado de colocalización de los marcadores Sinaptofisina/GIRK2 en células cultivadas en películas NGLC con diferentes espesores, mediante el uso del coeficiente de correlación de Pearson como se describió anteriormente (149). En este análisis, el máximo denota 1 y representa el 100% de las células que colocalizan ambos anticuerpos, mientras que el 0 representa la ausencia de colocalización. Los datos reflejaron, en general, que los 3 tipos de películas NGLC con diferentes espesores evidenciaron diferencias significativas de alta correlación (** $p < 0,001$) frente al control (células cultivadas sin NGLC) para películas NGLC de 5nm de espesor (coeficiente de Pearson = $0,7428 \pm 0,1843$; $n = 9$) y 20 nm película de espesor (coeficiente de Pearson = $0,8578 \pm 0,1260$; $n = 9$) y diferencias significativas más bajas

($p < 0,01$) para película de 80 nm de espesor (coeficiente de Pearson = $0,7928 \pm 0,1030$; $n=9$) en comparación con el control (coeficiente de Pearson = 0 ± 0 ; $n= 9$) o NNT (coeficiente de Pearson = $0,269 \pm 0,2472$; $n= 6$).

Cuando se analizaron los procesos axonales hallados en los cultivos, se encontró que GIRK2 estaba presente en las imágenes que mostraban unas estructuras prominentes similares a axones (Figura 51A, e4 y Figura 52 B5 y D4). Cuando las células estaban encima de la película de mayor espesor (80 nm), este era el espesor que poseía la tasa de coexistencia de Sinaptofisina más baja (70%). Los cultivos en películas NGLC de 5 nm mostraron procesos crecientes de tipo neural con colocación Sinaptofisina / GIRK2 (Figura 51A, c1-c4) donde se mide un proceso neuronal de tipo axónico (1843 μm , Figura 52 B5), es significativo señalar que estos procesos nunca se observaron en cultivos de control ni en cultivos NNT. Se pudo comprobar empleando el medidor de axones del programa Image J / Fiji con el complemento "*Microscope Measurement Tools*", que con películas NGLC de 20 nm (Figura 52C1-C5) existía una mayor capacidad sináptica (señal sinaptofisina / GIRK2) además de una polarización y orientación celular (Figura 52, C4).

Entre los hallazgos revelados, es el hecho de que las películas NGLC presentasen características arquitectónicas que demostraron la capacidad de generar redes celulares (Figura 52 B1-B4) después de 4 semanas en cultivo. En el cultivo celular en película NGLC de 80 nm (Figura 52, D1-D5) se detectaron procesos axónicos (Figura 52, D3) de arborización (Figura 52, d4) y de formación dendrítica (Figura 52, D5).

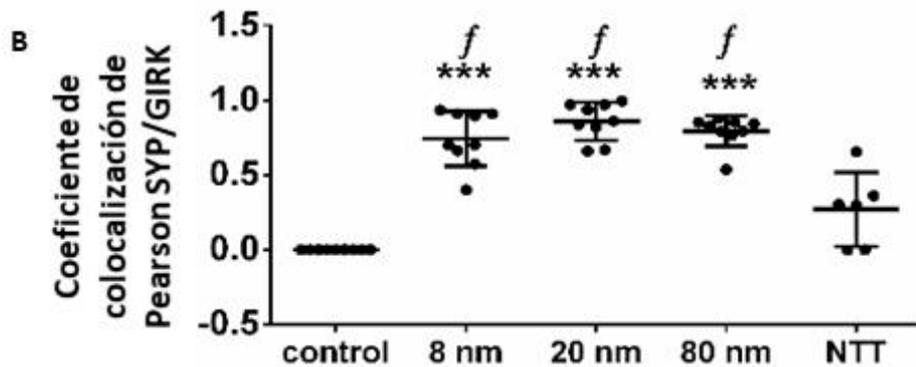
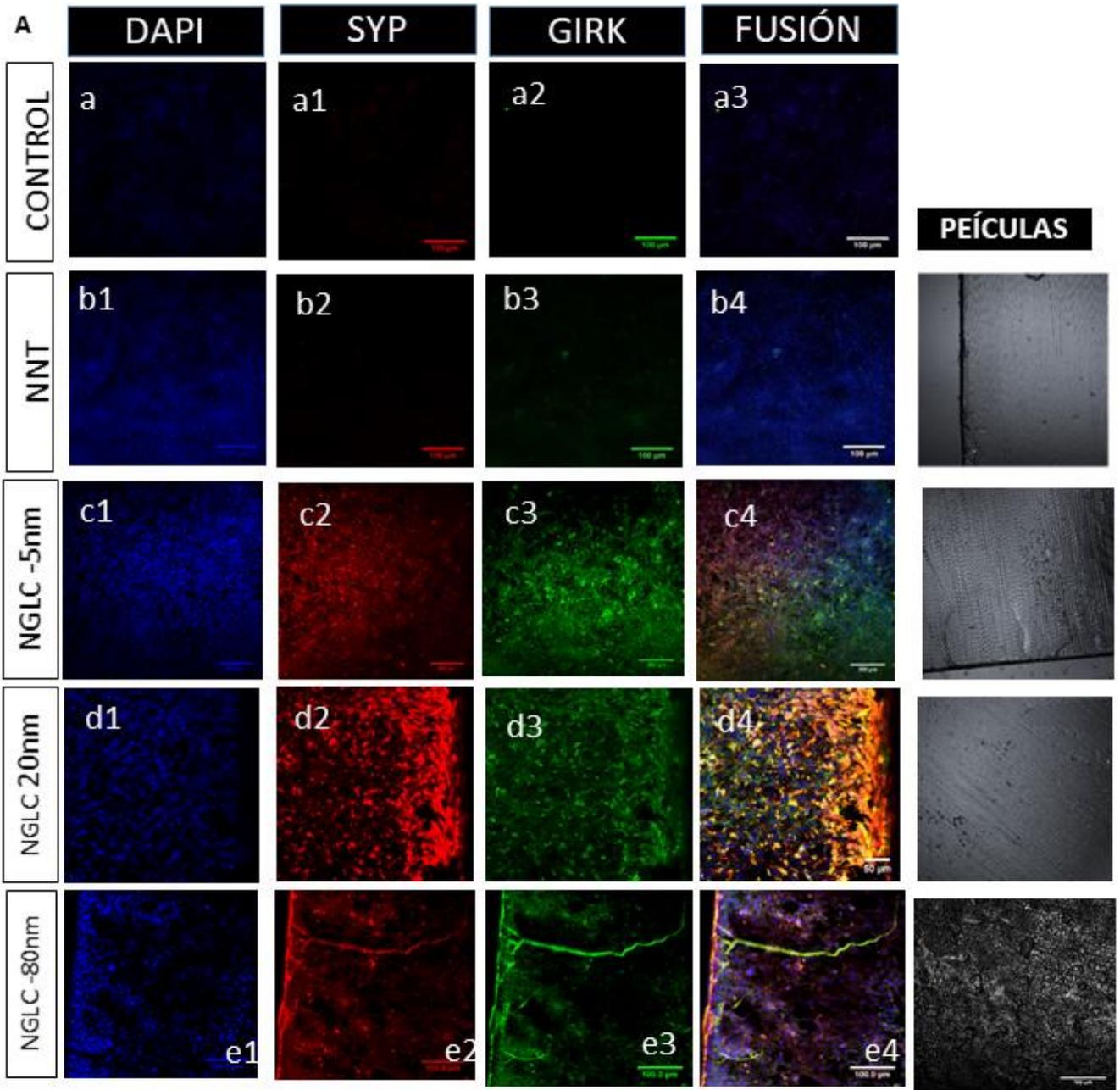


Figura 51. Inmunofluorescencia confocal de marcadores funcionales y de maduración celular en las células SN4741 a largo plazo en cultivo. El marcador nuclear DAPI (etiqueta azul), Sinaptofisina (SYP= Sinaptofisina: marcaje rojo) y el canal 2 de potasio rectificador interno regulado por proteína G (GIRK2: marcaje verde) se localizaron en células SN4741 cultivadas en pocillos de plástico (a1- a4), película sin carbón tratada térmicamente de referencia (NNT) (b1-b4), película NGLC de 5 nm de espesor (c1-c4), NGLC de 20 nm de espesor (d1-d4) y NGLC 80- película de nm de espesor (e1-e4). Las imágenes de campo claro de NNT y 5 nm, 20 nm, 80 nm NGLC se encuentran en la columna derecha del panel. (B). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (DE), $n = 6$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ frente al control (células cultivadas en pocillos de plástico); "f" = $p < 0,001$ marca las diferencias entre las muestras de NGLC y la película sin carbono tratada térmicamente de referencia (NNT).

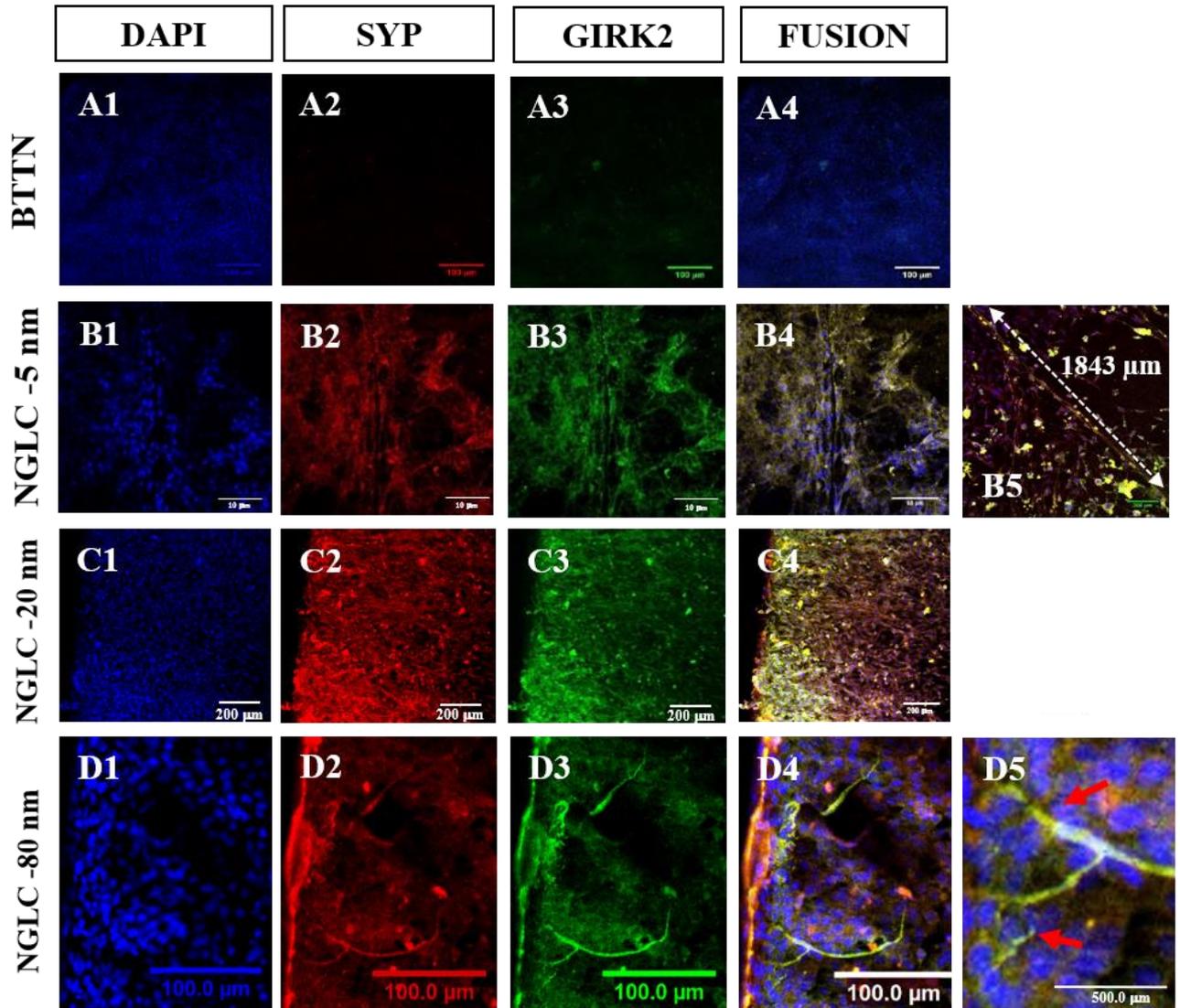


Figura 52. Procesos de tipo neuronal inducidos por películas NGLC. Imágenes de microscopía de inmunofluorescencia confocal que muestran los efectos morfológicos y estructurales de las películas de NGLC en las células SN4741 cultivadas encima de ellas. Se muestran las proteínas del marcador nuclear DAPI (etiqueta azul), Sinaptofisina (Sinaptofisina: etiqueta roja) y del canal 2 de potasio rectificador interno regulado por proteína G (GIRK2: etiqueta verde), así como su colocalización (combinación: etiqueta amarilla). La tinción DAPI positiva (A1, B1, C1, D1) mostró una imagen de cultivo en monocapa sin signo visible de diferenciación. La película NNT no muestra señal del marcador de SINAPTOFISINA (A2) y GIRK2 (A3).



DISCUSIÓN



Principal limitación (o factor limitante) en la regeneración tisular, el crecimiento y la implantación de las células madre: el "soporte celular"

La búsqueda de células con capacidad pluripotente que puedan diferenciarse hacia tejido neuronal (156) (células embrionarias: hESC, células inductoras de pluripotencia: iP) y multipotente (CSC, BMSC, etc.) (157) es ineficaz, si se pierde un importante punto de vista: “la capacidad de anidamiento funcional”, tanto en los procesos de reparación o regeneración celular (106). Es decir, no sólo se requiere que las células se implanten en los tejidos, mostrando capacidad de anidamiento, conseguida en ciertos casos no sin evidente dificultad (158, 159), sino que sea realmente un implante funcional tal como describen Rodríguez-Losada y Aguirre (106). Para ello, es necesario un correcto andamiaje celular que favorezca ambos procesos, y este es un aspecto fundamental para este tipo de terapias de reemplazo todavía sin esclarecer (160). Lo que prima actualmente es la necesidad de aumentar la investigación que permita la búsqueda de materiales óptimos que faciliten la función celular pero que no provoquen un daño mayor a largo plazo (105,106,161,162). En los últimos años, se han empleado los "esqueletos celulares" como andamio para la reparación y estimulación tisular para la correcta diferenciación. Esta técnica denominada "decelularización" consiste en confeccionar el tejido utilizando residuos esqueléticos que promueven la diferenciación de las células madre a líneas celulares funcionales (163). Existen en el mercado múltiples estructuras y matrices a base de glicanos y poli-glicólidos¹⁵ (poli-L-lactide (PGA); PGA-chitosan; PLA), que, si bien proporcionan una estructura 3D, no favorecen la estimulación o propagación eléctrica, ya

que no son materiales conductores (164). Tanto en el tejido cardíaco como en el nervioso, la propagación de actividad eléctrica transmitida en forma de potenciales de acción es una necesidad *sine qua non* para la correcta fisiología y funcionalidad del tejido excitable.

Por todo ello, existe un evidente aumento del interés en la investigación sobre materiales de carbono con propósitos regenerativos para aplicación biomédica. Algunas estructuras cristalinas del carbono pueden ser consideradas como materiales prometedores para su uso como andamios. Tal es el caso del grafeno, los nanotubos de carbono y las nanofibras de carbono, así como los fullerenos y las estructuras desorganizadas como el carbono amorfo y el carbono vítreo (*glass-like carbon*). Los trabajos recientemente publicados sobre estos materiales sostienen que el grafeno posee un gran potencial para la aplicación biomédica debido a sus extraordinarias propiedades fisicoquímicas (165), siendo un aspecto crucial su capacidad para conducir la corriente eléctrica, propiedad que favorece la propagación del impulso nervioso, lo cual ha quedado evidenciado en modelos en rata (166,167) .

El objetivo principal de esta memoria de tesis fue analizar y estudiar dos tipos básicos de materiales de carbono, que como se ha descrito anteriormente, podrían ser candidatos ideales para desarrollar soportes celulares a modo de prótesis permanentes. Centrándonos en las terapias de reemplazo celular relacionadas con las células DAérgicas dañadas de manera irreparables en PD (168), se requiere de materiales que permitan generar andamios neuronales que favorezcan el crecimiento neuronal seguro. Sobre este aspecto, se han publicado estudios previos relacionados con la influencia del GO en la

neurogénesis como facilitadores del crecimiento axonal (169). Sin embargo, al contrario de los experimentos realizados en neurogénesis *in vitro* (166,170), la PD confiere un entorno molecular citotóxico que debe ser tenido en cuenta a la hora de elegir ciertos materiales para la regeneración neuronal, con la finalidad última de conocer si los materiales empleados potencian el estrés oxidativo o la disfunción metabólica de las neuronas, o por el contrario tienen una capacidad neuroprotectora y mejoran la supervivencia celular. Otro de los aspectos importantes a tener en cuenta en el desarrollo de los soportes celulares o andamios es su capacidad para potenciar la diferenciación neuronal, evitando procesos aberrantes que pudieran llegar a desarrollar procesos oncogénicos como neoplasias celulares. Por este motivo, uno de los procesos biológicos analizados con detalle ha sido el proceso proliferativo en una línea celular clorogénica SN4741, con el fin de averiguar si los materiales potencian los procesos neoplásicos o por el contrario estimulan los procesos de diferenciación que provocan una reducción de la capacidad proliferativa como sucede en las neuronas adultas. En una gran parte de los trabajos publicados sobre el grafeno y sus derivados (171-174), se realizan estudios de tiempo de respuesta corto como 24 horas o 3 días. Sin embargo, la inducción de aberraciones dentro de las células requiere de un mantenimiento a largo tiempo en cultivo, y por este motivo en este estudio se realizan cultivos celulares con tiempo respuesta de largo tiempo de permanencia con el tratamiento (162).

Elección para el uso en biomedicina de materiales grafénicos, y su idoneidad para el empleo en la PD

Hasta ahora, en concreto muchos de los estudios sobre el uso de materiales grafénicos en biomedicina, se han realizado utilizando grafeno prístino (169-180), GO (180-183); GO reducido, pero sin determinar el grado de reducción, (130,184).

En el caso de la diferenciación neuronal, para la elección de los materiales idóneos como soportes o andamios celulares, sería recomendable considerar una serie de características especiales implicadas en la estimulación de los procesos biológicos neuronales para las células, tales como impulsos eléctricos y no simplemente a modo de sostén de células. Así mismo, sería importante controlar una serie de parámetros que pudieran influir en el anclaje celular o la propagación del impulso nervioso como es la superficie (106), la morfología, la flexibilidad (control del grosor), la naturaleza hidrofílica, la conductividad eléctrica, y en algunos casos también la transparencia del material (por ejemplo en regeneración de tejidos maculares oculares), entre otros factores, tal y como se describe en el estudio desarrollado por Rodríguez-Losada et al, (105) sobre el material de NGLC o sobre las láminas de grafeno (162). Y es conocido que, en la última década, diferentes materiales de carbono han promovido y estabilizado el anclaje celular e inducido la formación de redes neuronales (186,187). No obstante, no todas las estructuras y materiales grafénicos empleados como sustrato o como suspensión dentro de un medio de cultivo poseen la misma respuesta biológica o biocompatibilidad, como



se reporta en esta memoria (162,241). En ocasiones, en la aplicación del grafeno se han evidenciado procesos nanotóxicos en diferentes tipos celulares (132,133) que pudieran ser debidos a impurezas de los materiales o durante el proceso de preparación del material. En la actualidad existe una importante discusión sobre la idoneidad del uso del grafeno en su forma más pura, como grafeno prístino, o bien óxido de grafeno, o el uso de materiales híbridos con grafeno para recubrir otras superficies (165). No obstante, este trabajo aporta el primer estudio comparativo sobre los efectos celulares y moleculares del GO y de los materiales grafénicos por la reducción total o parcial del óxido de grafeno y del propio óxido de grafeno (en forma de polvo o película) caracterizado a corto (24 horas) y largo plazo (7 y 15 días) (162). Así mismo, es el primer estudio que desarrolla un material como el NGLC que está compuesto por una curva de microescamas de grafenos unidos por carbono amorfo (105) y lo aplica en el campo de la biomedicina. Este material presenta excepcionales propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas (120) lo que lo hace susceptible de actuar como material de soporte celular. Además, en este estudio se generó en condiciones controladas de grosor con lo cual se permitió conocer si existió una diferencia inherente entre el crecimiento de las células o en la actividad funcional de las mismas y con respecto al grosor de la película de NGLC.

Elección del tipo celular SN4741 para el desarrollo experimental

Este trabajo analiza y muestra el efecto observado de los nanomateriales empleados en relación con la citotoxicidad, proliferación, diferenciación, maduración y neuroprotección en un modelo *in vitro* de PD utilizando células indiferenciadas SN4741. Esta línea celular, derivada de las células DAérgicas de la SN procedente de ratones transgénicos (142,188) permitió por su grado de inmadurez conocer tanto los verdaderos cambios morfogénéticos y funcionales de las células tratadas con materiales grafénicos y con NGLC sin que existiera una interacción con otros reactivos neurodiferenciadores como en el caso de los medios de cultivos primarios celulares. Se sabe que las células SN4741 son células clonadas con velocidad proliferativa constante en condiciones estándar, y poseen una morfología bien caracterizada, con una buena capacidad de respuesta frente a agentes oxidantes como Rotenona o MPP+ (188). Por consiguiente, la homogeneidad del cultivo de SN474 permitió establecer una relación clara entre el efecto material de grafeno seleccionado y los resultados obtenidos. Por el contrario, en aquellos estudios donde se ha empleado grafeno o NGLC sobre cultivo primario con células de médula ósea humana, tejido adiposo (182,183,189) o con cualquier otro tipo de cultivos no estables capaces de responder a casi cualquier estímulo (117,139,173), los parámetros empleados para su cultivo o mantenimiento pudieron haber influido en la respuesta observada. Por lo que, esta heterogeneidad celular, podría suponer un error con respecto a la atribución de efectos generados de los materiales grafénicos en este

tipo de cultivos primarios, cuya composición celular por su complejidad presentan más de un fenotipo y por consiguiente la respuesta del grafeno ante cada tipo celular difiere. Asimismo, en un cultivo primario, se requiere de tratamientos que inhiban el crecimiento de células fibroblásticas para bloquear la proliferación expansiva de este tipo celular tan resistente (190). Como resultado, este tipo de tratamiento estaría modificando las condiciones ambientales para poder determinar si el óxido de grafeno alguno de los materiales de grafeno evaluados o el NGLC favorece o no, los procesos madurativos neuronales de quiescencia o senescencia.

Por otro lado, si los cultivos primarios son de procedencia humana, incluyen también de manera decisiva factores de riesgo (género, edad, obesidad, hipertensión o diabetes, etc.) que afectan directamente el comportamiento celular y podrían enmascarar el efecto real de los materiales grafénicos (189,191). Tomando en conjunto todos estos aspectos, se consideró utilizar la línea celular clonal SN4741 para realizar los estudios preliminares y conocer el efecto real biológico del material analizado.

Uso de materiales en forma de polvo, películas (films) o escamas.

Con respecto a los diferentes materiales grafénicos empleados en este trabajo, la principal diferencia que se encontró entre ellos fue en la morfología y la composición atómica. Del mismo modo, se observó que, aunque estos materiales compartían ciertas

similitudes en la composición química con otros tipos de grafeno empleados en otros estudios (191,192), el GO, PRGO y FRGO empleados no eran idénticos a los materiales utilizados en estudios anteriores. Hasta el momento, los estudios sobre el uso de grafeno en medicina regenerativa se habían realizado utilizando GO (193) y GO reducido (sin determinar el grado de reducción) (137). En general, los resultados mostrados en este trabajo de tesis evidencian cómo el polvo y los films pertenecientes al mismo tipo de GO, poseían un efecto biológico diferente en el mismo tipo de célula clonal y tratada con el mismo medio de cultivo y con las mismas condiciones de mantenimiento. Con respecto al uso de films, los experimentos fueron estandarizados utilizando sustratos de los diferentes materiales, que tuvieron que dividirse en pequeñas microescamas. Estos tamaños corresponden a los tamaños previamente escritos por Chang et al. (179) y Nair et al. (194), donde se pone de manifiesto una ausencia de genotoxicidad celular relacionada con un tamaño adecuado del grafenoide en suspensión, igualmente lo corroboran los trabajos publicados por Syama y Mohanan (195) y Lalwani et al. (196). De acuerdo con los resultados obtenidos, esta tesis viene a confirmar que usando una suspensión de microescamas, el proceso de diferenciación surge sin la necesidad de hacer crecer las células en verdaderos andamios, y sin la necesidad de emplear algún tipo de neurodiferenciador o estimulador de la neurogénesis como son los empleados en los cultivos primarios de células progenitoras mesenquimales o embrionarias para generar neuronas (87,166,197-199). Especialmente, los materiales de PRGO-f y FRGO-f mostraron una mayor capacidad neurodiferenciadora que GO-f. Con respecto al material

de NGLC, los resultados mostraron que el material en forma de películas favorecía el anclaje de las células en puntos determinados formando redes organizadas. Este comportamiento especial podría reflejar una relación entre la topografía del material y las propiedades fisicoquímicas (200,201).

Citotoxicidad, proliferación y diferenciación de los materiales estudiados

La bibliografía actual (104), describe un número limitado de autores que muestren en detalle la citotoxicidad y biocompatibilidad los materiales grafénicos, por lo que son necesarios estudios rigurosos que analicen en profundidad la biocompatibilidad de los sustratos para ser empleados en regeneración tisular. A pesar de que tanto los materiales grafénicos como el NGLC muestran una excelente respuesta biológica *in vitro*, en particular para poder ser aplicada en ingeniería tisular, es necesario realizar un mayor número de ensayos *in vivo*, que muestren el potencial real regenerativo de estos materiales y la toxicidad a largo plazo, ya que todavía es desconocido (106).

En relación con la viabilidad celular desarrollada en esta memoria de tesis, el uso mediante el ensayo MTT ha sido controvertido como también han descrito otros autores en la bibliografía (144,145) incluido el presente estudio en nanocristales de NGLC (105). La controversia viene dada porque a pesar de que se observó una reducción de MTT relacionada con una reducción de la proliferación por proceso de quiescencia o

senescencia, no por ello tendría que ser debida a un proceso apoptótico o necrótico que desarrolla el material ensayado. Como describen otros autores (202), las mediciones del reactivo MTT (expresado como viabilidad relativa) dependen de la transformación metabólica intracelular de las sales de tetrazolio en formazán, y cuando la capacidad metabólica de la célula para convertir MTT en formazán disminuye, esto significa que las células se están muriendo o reduciendo su tamaño poblacional, o bien que hay una reducción del propio metabolismo celular (203). Aunque el ensayo de MTT es el método más ampliamente utilizado por la literatura en relación con los materiales grafénicos, posee una clara limitación con respecto al proceso proliferativo, ya que no todas las células poseen la misma actividad metabólica que además no permite discriminar este proceso celular (204). Las células clonales donde se ha introducido un oncogén de manera artificial, tienen una ilimitada capacidad de multiplicación y generalmente están eternizadas empleando genes que las hacen inmortales, por definición una célula clonal tiene una alta capacidad proliferativa y una actividad metabólica elevada. Pero, por el contrario, las neuronas maduras difícilmente se pueden dividir y el metabolismo depende de su actividad vital funcional o de su mecanismo de comunicación celular (205). Por lo que, en conclusión, la ratio de actividad de MTT podría descender en caso de acontecer un proceso de diferenciación neuronal promovida por procesos de maduración que llevan consigo procesos de senescencia (206). Los resultados de MTT muestran que a corto plazo los materiales grafénicos son inofensivos e incluso beneficiosos a bajas concentraciones (polvo de GO; PRGO y FRGO: 10 µg/ml). Sin embargo, se observó un

efecto tóxico a altas concentraciones (1000 $\mu\text{g/ml}$) en las primeras horas de incubación. Estos resultados concuerdan con la mayoría de los estudios a corto plazo (tratamiento de 24 horas) que utilizan GO en polvo (117,134,179,207). Este hecho es difícilmente comparable con la literatura actual sobre células madre mesenquimales humanas, donde se muestra una mayor viabilidad y proliferación en 24 horas y 21 días de cultivo, así como una citotoxicidad disminuida después de incorporar microescamas de GO (194). Ciertos materiales grafénicos ensayados en el presente trabajo muestran una reducción de la capacidad metabólica del MTT después de los primeros 3 días de tratamiento, mostrando una reducción del metabolismo de MTT, sobre todo en los tratamientos con microescamas de PRGO y FRGO en todos los rangos de concentraciones. Los resultados sobre la proliferación celular mediante la medición del número de células en cada fase del ciclo celular y la incorporación de BrdU mostraron una disminución del número de células en la fase S y un aumento de G2 / M después de 3 días de tratamiento. Por consiguiente, es bastante probable que, a pesar de los procesos potenciales de apoptosis o necrosis debidos al tratamiento con los diferentes materiales grafénicos a los 3 días, las células supervivientes se encuentran en fase de división celular. Y sobre este aspecto se han publicado estudios (208) donde se describe la capacidad selectiva de GO para aumentar el proceso de apoptosis, reduciendo el número de células en cultivo. Además, se ha descrito como la apoptosis está presente en los procesos de diferenciación (209), donde se encuentra un proceso apoptótico en aquellas células capaces de adquirir maduración. Así mismo, los resultados obtenidos sobre los

experimentos realizados sugieren que ciertos materiales de grafeno pueden seleccionar algunas células para estimular su capacidad de maduración y diferenciación, ya que no todas las células del cultivo alcanzan la diferenciación. Este proceso es corroborado por los estudios publicados en células tumorales tratadas con materiales de grafeno, donde igualmente observan el proceso antimitótico del óxido de grafeno (210,211). Por otro lado, cabe recordar que la línea SN4741 procede de un embrión transgénico cuyas células se estabilizan mediante la adición de un oncogen, motivo por el cual se vuelven eternas y estables tal como describe Song et al., (142). En particular, se ha publicado un estudio sobre los efectos de la proliferación de células DAérgicas derivadas de feocromocitoma neural (PC-12) tratadas con GO y PRGO en polvo, mostrando como a las 24 horas hay un aumento de la detención del ciclo celular así como del proceso de apoptosis (208). Como consecuencia, estos tratamientos generaron una desregulación del tiempo de permanencia en las fases del ciclo celular. Este hecho también se confirma en este trabajo de tesis, donde a través de los experimentos del ciclo celular se confirma que los materiales grafénicos, como el NGLC, modifican la sincronización de las diferentes fases del ciclo celular en muestras tratadas, con excepción del GO en polvo donde no se observaron diferencias significativas a los 3 y 7 días de cultivo, con respecto a las muestras control. Sin embargo, los experimentos a los 7 días mostraron cómo en algunos materiales grafénicos existía un aumento en la actividad de MTT, sin observar diferencias significativas en la película de PRGO en comparación con las muestras de control. Tampoco se reportó un aumento en la cantidad de células muertas con los experimentos

realizados sobre muerte celular y viabilidad con Etidio y Calceína AM, en los subtipos GO o NGLC después de 7 días en cultivo. En concreto, los ensayos del ciclo celular y proliferación empleando el mismo tiempo respuesta realizados con GO y sus derivados (PRGO, FRGO etc.), mostraron cómo las células permanecían en la fase G0 / G1, de acuerdo con una tasa de proliferación disminuida. Y este fenómeno podría relacionarse con la ruta de las integrinas y los receptores tirosina quinasas (RTK) que producen un efecto sinérgico sobre el control de la fase G0 / G1 que regula el ciclo celular (212). Igualmente, se ha descrito cómo Sonic Hedgehog (SHH) y Wnt juegan un papel crucial en el control de la división celular y la morfogénesis neuronal (213-215). Se evidenció en trabajos previos (212), cómo SHH podía bloquear la activación de la β 1integrarina, permitiendo la adhesión celular e induciendo un cambio conformacional de la β 1integrarina hacia un estado inactivado en las células de la cresta neural (216). En particular, los resultados obtenidos empleando microescamas de PRGO muestran una detención del ciclo celular en la fase G0 / G1 a los 7 días de tratamiento, relacionada con los procesos de quiescencia celular. Este hallazgo está respaldado por la cantidad de ADN analizado mediante ciclo celular empleando marcaje con yoduro de propidio, que además lo confirman los ensayos de BrdU donde se contempla una reducción de la incorporación de este marcador. Igualmente, este hecho es constatado por el panel analizado de proteínas relacionadas con la proliferación, observando una reducción de Ki67 cuya proteína es exclusiva de la mitosis celular; y el aumento significativo de la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de quiescencia (P27) y la senescencia (SMP30) relacionada

con la maduración. De acuerdo con estos datos parece que, transcurridos 7 días de tratamiento con los materiales ensayados, se produce una transformación molecular que altera la identidad celular y la capacidad mitogénica de las células, permitiéndoles diferenciarse y desarrollarse de manera más efectiva en el cultivo con GO, por lo que transcurridos 15 días, las células ya transformadas permanecen metabólicamente activas, tal como lo muestra el ensayo MTT. Hecho que también es corroborado mediante los estudios de microscopía durante un periodo largo de tiempo, donde se observan procesos neuronales que requieren de actividad metabólica, como es la comunicación neuronal presináptica y postsináptica. Autores como Rodríguez-Lozano et al. (183), corroboran los resultados obtenidos, también reportan un aumento de la viabilidad celular con el tratamiento con GO después de 15 días en otro tipo de tejido como son los realizados en cultivos primarios de células madre del ligamento periodontal con fenotipo mesenquimatoso (217).

Con respecto a los análisis de MTT para el material NGLC, los resultados de dosis respuesta de las microescamas cultivadas en las células, mostraron patrones diferentes, dependiendo del tiempo en permanencia en cultivo. De manera similar, los tratamientos de NGLC como en GO son inofensivos para las células en tratamientos de respuesta corta (24 horas) a concentraciones elevadas, pero más aún a bajas concentraciones (1 µg/l), lo cual parece ser incluso beneficioso para la célula. En particular, el material NGLC estimula la producción de la proteína SMP30 relacionada con la senescencia celular en las primeras 24 horas de cultivo, al contrario de los materiales de materiales grafénicos

que lo realizan a los 3 días. El tratamiento con NGLC a corto plazo, no evidencia un incremento de la histona fosforilada, PH3, por lo cual parece que cuando las células están en contacto con el material durante las primeras 24 horas se adaptan, y posteriormente a los 7 días se observa un incremento proliferativo observado también en el aumento de expresión de PH3 y la ausencia de expresión de SMP30. Esto se contrapone a los estudios sobre GO en la forma polvo o película, donde se revela que existe una toxicidad a altas concentraciones a los 7 y 15 días, pero no a las 24 horas (218). En relación con el análisis de proliferación por PCNA, se observó un incremento de la expresión de este marcador de replicación del ADN a los 7 días de cultivo celular. Estos hallazgos son compatibles con otros estudios donde se emplean nanopartículas de carbono (117,217).

En resumen, la principal limitación de los ensayos de MTT para medir biocompatibilidad y proliferación, reside en que los procesos de quiescencia o senescencia, que se caracterizan por una disminución del metabolismo basal y de la actividad celular, y por consiguiente la metabolización de los compuestos empleados como indicadores de viabilidad, metabolismo o proliferación, podrían generar confusión en la interpretación de los datos. Por este motivo, se realizó un análisis de la disfunción bioenergética de las células empleando intercaladores de la cadena transportadora de la respiración mitocondrial, con el fin de conocer si los materiales grafénicos afectaban al metabolismo celular de manera positiva o negativa.

Con respecto al análisis bioenergético, se sabe que la respiración mitocondrial es esencial para la adecuada función y diferenciación neuronal (219). Se ha visto que el



grafeno interrumpe la actividad mitocondrial en las células tumorales (220,221). El estudio de Sun et al., (222), mostró una disfunción mitocondrial y alteración del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) en cerebros de pez cebra tratados con GO. Esta regulación del metabolismo mitocondrial se ha relacionado con anomalías del citoesqueleto tanto en células tumorales como en pez cebra. En modelos de PD, se ha descrito una relación entre la inhibición del complejo I de la ETC y la disfunción de los microtúbulos (176). En concreto, en este estudio de tesis se evaluó la respiración mitocondrial de diferentes subtipos de grafeno, y se halló un aumento del consumo de oxígeno no mitocondrial en algunos derivados de GO. Esta respiración no mitocondrial se corresponde con la oxidación del sustrato o la oxidación peroxisomal, lo cual se correlaciona frecuentemente con una alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (223). Algunos estudios han encontrado niveles más altos de ROS en células tumorales en presencia de grafeno (179,220). Sin embargo, los experimentos realizados con los diferentes materiales de grafeno no indujeron un aumento en la muerte celular con respecto a la condición de control y, por lo tanto, no es probable que los materiales ensayados provoquen un aumento significativo en los niveles de ROS. En cuanto al consumo de oxígeno vinculado a la respiración mitocondrial, tanto el polvo de GO como la película FRGO, disminuyeron la respiración mitocondrial y la capacidad respiratoria sobrante. Una baja capacidad respiratoria libre, entendida como la capacidad de una célula para responder a una demanda energética, suele encontrarse en algunas patologías, incluidas las neuronales (224). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que polvo GO y película de FRGO no son los

materiales más adecuados de GO para ser aplicadas en un modelo de PD. De los seis subtipos GO utilizados en este estudio, solo el PRGO, especialmente en forma de película, no alteró el metabolismo mitocondrial, y el FRGO en polvo fue el único que aumentó la capacidad respiratoria de reserva de estas células. Además, los resultados obtenidos en la película de PRGO muestran una ausencia de la disfunción bioenergética, lo que apuntaría a encontrar mejores resultados en la diferenciación de neuronas DAérgicas apoyados en estos estudios metabólicos.

Maduración neuronal

Acerca del proceso de diferenciación y maduración tras el tratamiento con los materiales grafénicos este estudio muestra cómo las películas de sustratos utilizados en forma de microescamas, tienen una mayor capacidad de diferenciación a nivel neuronal y especialmente hacia el linaje dopaminérgico, así como de la comunicación celular, en comparación con las muestras en polvo. Y en particular, nuestros resultados muestran cómo la película PRGO en comparación con la película GO, y la película FRGO, tiene una mayor capacidad de maduración DAérgica valorada a través del estudio de colocalización (Tuj-1 / TH); factores de transcripción y expresión génica (Th; Nurr1, Dat y Tubb3; Pitx3; Lim1xa; Limx1b); expresión específica de proteínas (TH, DAT, GIRK2) además de la maduración en la comunicación neuronal a nivel de transporte de vesículas sinápticas (Sinaptobrevina; Sinaptofisina). Este hecho es inusual en la línea celular



embrionaria indiferenciada SN4741 (142). Básicamente, en los experimentos desarrollados, el proceso de diferenciación neuronal y dopaminérgica promueve una reducción en el proceso de proliferación celular observado a partir del séptimo día de cultivo. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la película PRGO induce la diferenciación y evidencia la maduración de células SN4741 a neuronas DAérgicas maduras del mesencéfalo como muestra el estudio morfológico y genético. Probablemente la explicación de estas diferencias se deba en parte a diferencias en la morfología y composición química superficial. El estudio atómico (XPS) muestra cómo la película PRGO en comparación con GO y FRGO no tiene Cloro en su composición, y tiene los niveles atómicos más altos de nitrógeno y azufre. Este trabajo describe cómo la película de GO utilizada para trabajos de regeneración (24,135,137,185) o la película de FRGO, si bien tienen una capacidad diferenciadora y madurativa, estos subtipos albergan una mayor disfuncionalidad bioenergética, relacionada una reducción en la respiración basal (película de FRGO * $p < 0.05$), respiración máxima (película de GO y FRGO, * $p < 0.05$), capacidad respiratoria de reserva (película de FRGO) y una reducción significativa en la producción de ATP (película GO; película FRGO; * $p < 0,05$).

Especialmente en el tratamiento con la película de PRGO se observó un aumento del desarrollo de los procesos neuronales como las arborescencias o las proyecciones axonales, lo que corrobora otros hallazgos descritos por otros autores con tratamiento de polvo de GO en cultivos celulares primarios donde los medios de cultivos poseen inductores neuronales (131,169). Así mismo, el tratamiento de microescamas de PRGO

estimuló los procesos organizativos promoviendo la aparición de redes o entramados neuronales similares a los observados en los estudios con espuma de GO (Serrano et al., 2014), G y GO en polvo (180).

En el caso concreto de las películas de NGLC, la respuesta celular con respecto a la maduración fue observada tras la semana de cultivo celular confirmando una buena adhesión celular a superficies hidrofóbicas. Este estudio muestra la capacidad neurodiferenciadora del NGLC, y reporta cómo el control de la superficie e hidrofiliidad son factores considerados importantes en la diferenciación (225) y en uso biomédico, como en la creación de nano-biointerfaces para medicina molecular (193,226). Con respecto a la citoarquitectura observada con NGLC, se determinó que existía una organización no aleatoria celular en forma de red neuronal, del mismo modo que presentaba PRGO. En particular, se observaron unas proyecciones axónicas propias de las células DAérgicas en las películas de NGLC.

En relación con el estudio molecular de los marcadores de maduración y de especialización, en concreto, el marcador de diferenciación neuronal como el marcaje Tuj-1 para neuronas maduras adultas analizadas que colocalizaban con la enzima TH, sugiere un proceso de maduración de las neuronas hacia un linaje de neurona DAérgicas maduras. Nuevamente, este fenómeno de maduración es un hecho insólito en la línea celular embrionaria indiferenciada SN4741 (142), no descrito hasta la fecha. La correlación de los marcadores Tuj-1+/TH+ que existe en PRGO es más fuerte que la que



ocurre en otros materiales grafénicos analizados. Dado que todas las células han sido tratadas con el mismo medio de cultivo y la misma concentración de materiales grafénicos, nuestros resultados sugieren que el efecto sobre la TH se debe exclusivamente a materiales grafénicos, pero no a otras variables. Por este motivo, se le podría atribuir al PRGO una capacidad inductora de la diferenciación neuronal. Por el contrario, otros resultados obtenidos con GO en combinación con CNT como facilitadores de diferenciación DAérgica cultivados con células embrionarias, no mostraron claramente el efecto diferenciador de GO / CNT en sus resultados publicados (139,227). En especial, en el trabajo publicado por Yang y colaboradores (226), las imágenes que muestran la expresión de TH poseen un bajo número de células mostradas con un gran aumento, pero no muestran el área completa, por lo cual no se puede verificar correctamente el número real de células marcadas con TH. Además, estos autores no evidencian la correlación con la expresión de TH y Tuj1 en presencia de polvo de GO y por lo tanto no es posible evaluar si las neuronas DAérgicas son realmente adultas o no. Por el contrario, en la presente memoria se muestra una alta densidad celular de un marcaje de Tuj-1+/TH+ doble positivo. Sin embargo, es importante considerar que en los tratamientos con materiales grafénicos, se ha observado variación intraensayo a pesar de que se trata de células clonales sometidas a las mismas condiciones de cultivo. Este hecho contrasta con los resultados en células humanas embrionarias (hESC) donde apenas se observa la variación intraensayo experimental (157). Por este motivo, para conocer de manera rigurosa si los efectos observados eran producto de los materiales ensayados, se realizaron



experimentos con otros ensayos moleculares genéticos para RT-qPCR en expresión de Tuj-1 y Th y Western-blot para TH. Los datos ratifican un aumento de expresión, por lo que se pudo demostrar que el potencial de diferenciación dopaminérgico de materiales grafénicos es superior al grado de expresión del estudio de Yang et al., (139) mencionado anteriormente. La capacidad de maduración del GO en las especies de película (tratamiento de microescamas) de GO, PRGO y FRGO quedó demostrado en el análisis de expresión de los marcadores de maduración dopaminérgico Tuj-1 y los factores de transcripción, Pitx3 and Limx1a/1b, relacionados con el linaje dopaminérgico descritos por Arenas et al., (31,89,213). Curiosamente, los patrones de expresión de estos factores de transcripción y maduración DAérgica mostraron un fenómeno dicotómico, observándose dos patrones de expresión, dependiendo de si se trataba de la especie en polvo o de la película, cuya composición química no difiere. Más aún, los resultados de maduración de las células DAérgicas, expresando marcadores como Dat en células cultivadas con PRGO en microescamas (50µg/ml) confirman que el proceso de maduración es adecuado. La pregunta acerca de por qué el PRGO es capaz de estimular 60 veces la expresión de Dat en las células SN4741 es una cuestión por esclarecer, siendo un aspecto que está pendiente de estudio. Los mecanismos moleculares que estimulan este proceso son todavía desconocidos, no obstante, otros estudios en SN4741 (163,228,229) podrían explicar el proceso molecular ya que describen como el factor de transcripción Noto3 actúa como diana efectora de la ruta señalizadora para Shh que relaciona a las células SN4741 con la maduración de la línea celular DAérgica. Estos

autores describen como el factor de transcripción *Nato3* actúa sobre *Foxa2* y *Shh*, los cuales a su vez actúan sobre *Nurr1* (154, 213, 228). La activación de *Shh-Foxa2* activa la cascada que a su vez activa *TH* y *Nurr1*, siendo la activación de *Nurr1* independiente de *TH*. Estos resultados que corroboran los estudios sobre *Nurr1*, avalan la hipótesis de que *PRGO-f* en microescamas a baja concentración podría actuar como inductor de la diferenciación y maduración.

Otro de los aspectos relevantes tratados en este estudio ha sido la evaluación de la funcionalidad de las sinapsis a través de la relación entre producción, movilización y utilización de vesículas sinápticas, mediante el análisis de expresión proteica de *Sinaptobrevina* y *Sinaptofisina* (112,118,230). Los resultados aportados obtenidos tras tratamientos sobre materiales grafénicos de las células *SN4741* a largo tiempo en cultivo mostraron mayor comunicación celular en forma de películas y microescamas que las especies cultivadas en polvo. Además, la coexistencia de expresión de *GIRK2* y *DAT* que se consideran buenos marcadores para la funcionalidad de las sinapsis (153,168) muestran que *PRGO* en película posee la capacidad de aumentar significativamente su expresión, por lo que podría postularse claramente que *PRGO* en película favorece la comunicación neuronal en una red neuronal como se observa en neuronas *DAérgicas* maduras *SN4741* con la imagen de la tinción triple positiva para *Tuj-1 +/TH +/ GIRK2 +; TH +/ Sinaptofisina +/ GIRK2 + y TH + / Sinaptofisina + / DAT +*. No obstante, los procesos de arborescencia dendrítica o puntos de conexión sináptica fueron observados en las superficies de las películas del *PRGO* y *FRGO*, esto supone que estos materiales

favorecen los procesos neuronales afines a los mecanismos de comunicación celular no observados en las células control.

Con respecto al fenómeno de comunicación neuronal empleando soportes de NGLC se comprobó que un incremento de la rugosidad en las películas de NGLC que podría influir de manera relevante en los cultivos celulares, así como en los procesos neuronales observados en los cultivos. Se pudo comprobar cómo la parte posterior de las películas son principalmente de carbono y es la que ofrece mayor espesor (120). Curiosamente, la superficie expuesta de NGLC al cultivo celular es la misma en los tres tipos de películas de NGLC de 8, 20 u 80 nm de espesor empleadas. En el análisis de los marcadores de Sinaptofisina y GIRK2, se observó un significativo aumento de la colocalización Sinaptofisina +/GIRK2 + en las células SN4741 sembradas en películas con grosor de 20 nm. Lo que estos experimentos muestran es que la rigidez y el espesor de las películas, podría estar infiriendo en la propagación de proyecciones axónicas observadas o en comunicación celular. En concreto, se comprobó que el grosor de las películas puede influir no solo en la rigidez y transparencia de las películas, sino también en sus características eléctricas. Las películas de 20 nm de espesor son dos veces más conductoras de electricidad que las películas de 8 nm de espesor y dentro del mismo rango que las películas de 80 nm de espesor (120), por lo que se puede concluir que la capacidad eléctrica de las películas NGLC es un indicio del grado de maduración celular que está directamente relacionado con la acumulación específica del carbono molecular que compone la película. Además, NGLC no solo permite el crecimiento y la adhesión de las

células, sino a su vez la diferenciación y la creación de redes (105,131). Esta capacidad es un fenómeno deseable para la comunicación y supervivencia de las células adultas. De hecho, NGLC indujo la diferenciación o maduración neuronal en células DAérgicas sin utilizar ningún factor de crecimiento celular como GDNF, BDNF ni matriz de laminina (63,65), lo que permite el crecimiento celular espontáneo. Por tanto, este resultado en sí mismo es relevante para la regeneración neuronal; de ahí la relevancia de este estudio. NGLC presenta capacidad para promover la organización celular, reordenando las células de tal manera que su arquitectura cambie sin que aumente el número de células, modificando la disposición celular de una monocapa a la agrupación.

Sin embargo, la evidencia más concluyente que respalda el potencial uso beneficioso de PRGO en estrategias de reemplazo para la PD involucra el estudio sobre neuroprotección sobre cómo se comportan las células embrionarias SN4741 tratadas con materiales grafénicos investigados en un ambiente de estrés sin inductores de oxidación mitocondrial. Los mecanismos de proliferación activa de las células de control secretan factores de crecimiento en el entorno microcelular en espacios pequeños y aumentan su estrés celular. Los análisis de α -sinucleína muestran cómo las células de control la expresan de forma endógena y cómo PRGO-f y FRGO-f reducen significativamente su expresión.

Consideraciones finales

Centrando este trabajo en las terapias de reemplazo celular para las neuronas DAérgicas dañadas en la PD (168) o considerando cualquiera de las múltiples posibilidades de crecimiento de células neurales para el tratamiento de lesiones nerviosas, las películas de óxido de grafeno parcialmente reducido (PRGO-f) o nanocrystalline glass-like carbon (NGLC-f) podrían ser consideradas para la producción de parches regenerativos, por ejemplo, usados para desarrollar tractos axonales. Este tipo de película, a diferencia de otros nanomateriales de carbono utilizados en cultivos celulares, pueden proporcionar más ventajas principalmente en términos de mejora de la conductividad eléctrica y mayor capacidad de interacción celular entre la superficie exterior de la película y los axones celulares restantes y pueden ser de interés para la integración celular completa. El hecho de que materiales grafénicos como el PRGO, o el NGLC incidan en el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación, reduciendo la capacidad proliferativa y aumentando el proceso de diferenciación, es una señal favorable que podría atribuirse al hecho de que ambos sustratos se fundamentan en materiales de grafeno.

Y este equilibrio no solo es bueno sino deseable, ya que contribuye a un cambio de concepto sobre las características más propicias para desarrollar andamios celulares. Esto es debido a que un sustrato que permita la proliferación de células inmaduras o maduras (no terminales), está próximo a ser considerado peligroso ya que puede potenciar la malignidad involucrada en procesos oncogénicos en un tejido

tan peculiar como el neuronal. Esta idea invita a reconsiderar el modelo de andamio ideal para ser utilizado en la regeneración tisular, poniendo un mayor énfasis en el concepto de funcionalidad y diferenciación celular más que en la obtención de sustratos que permitan el crecimiento y colonización celular.



CONCLUSIONES

I.- Conclusiones sobre el estudio realizado empleando diferentes materiales

grafénicos

1. Los resultados sobre citotoxicidad mostraron biocompatibilidad a largo plazo en cultivo del óxido de grafeno (GO); parcialmente reducido (PRGO) y totalmente reducido (FRGO) en un determinado rango de concentración. A

2. En este estudio se evidencia que, aunque se traten las células cultivadas en condiciones estandarizadas con un mismo material grafénico, el hecho de emplear dicho material en película o polvo produce efectos biológicos distintos. Por lo cual, se pone de manifiesto cómo la estructura molecular, la organización atómica de los elementos en los diferentes materiales y su propia composición química, afectan de manera directa a las células.

3. El empleo de las películas a modo de andamiaje sin triturar permite un mayor desarrollo de los procesos neuronales tales como las arborescencias dendríticas, zonas de aproximación o botones sinápticos.

4. Los resultados sugieren que el material PRGO-f es el mejor candidato para ser empleado en el cultivo de células dopaminérgicas por poseer una mayor capacidad de neurodiferenciación, actividad biológica, neuroprotección y un menor estrés



bioenergético, reduciendo los niveles de α -Syn de manera significativa en cultivos con inductor a neurotoxinas.

5. Se concluye que, por todos los resultados obtenidos, el PRGO-f es el mejor candidato para formar parte de estructuras de sostén o prótesis para el cultivo de células en terapias de reemplazo en la PD.

II.- Conclusiones sobre el material nanocrystalline glass-like carbon (NGLC)

6. Los resultados mostraron una carencia de citotoxicidad con respecto al material NGLC, que parece ser inocuo para las células SN4741.
7. El NGLC es capaz de inducir diferenciación neuronal y favorecer las capacidades funcionales neuronales.
8. La comparación con los diferentes grosores y rugosidades de NGLC mostró que el film de 20 nm posee una mayor capacidad madurativa de las células SN4741. Además, este espesor exhibió una mejor conductividad eléctrica y mejores propiedades ópticas (como la transparencia).
9. El hecho de que este nanomaterial se sintetizase bajo parámetros muy controlados se favorece la reproducibilidad para su uso en aplicaciones biomédicas, ingeniería de tejidos y desarrollo de dispositivos biocompatibles.



BIBLIOGRAFÍA

1. Lewis PA. James Parkinson: The man behind the Shaking Palsy. *J Parkinsons Dis.* 2012;2(3):181–7.
2. Farret CA, Chouza MM, Benaiges IC. Neurorehabilitación en la enfermedad de Parkinson. *Neurología: Publicación oficial de la Sociedad Española de Neurología.* 2007;3:22–9.
3. Grandas F, Obeso JA, Sarró ET. Tratado sobre la enfermedad de Parkinson. Luzán. 2004;5.
4. Micheli FE. Enfermedad de Parkinson y Trastornos Relacionados. Editorial Medica Panamericana; 2006.
5. Lanciego JL, Gonzalo N, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Obeso JA. Terapia celular “neuro-restauradora” en la enfermedad de Parkinson: un debate pendiente. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra.* 2004 Dec;27(3).
6. Ferger B, Teismann P, Earl CD, Kuschinsky K, Oertel WH. Salicylate protects against MPTP-induced impairments in dopaminergic neurotransmission at the striatal and nigral level in mice. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology.* 1999 Aug 11;360(3):256–61.
7. Aguirre JA, Cintra A, Hillion J, Narvaez JA, Jansson A, Antonelli T, et al. A stereological study on the neuroprotective actions of acute modafinil treatment on 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced nigral lesions of the male black mouse. *Neuroscience letters.* 1999;275(3):215–8.
8. Neurological Disorders: Public Health Challenges. www.who.int. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241563369>
9. Benito-León J, Bermejo-Pareja F, Rodríguez J, Molina J, Gabriel R, Morales J. Prevalence of PD and other types of parkinsonism in three elderly populations of central Spain. *Movement Disorders.* 2002 Nov 26;18(3):267–74.
10. Shadrina MI, Slominsky PA, Limborska SA. Molecular Mechanisms of Pathogenesis of Parkinson’s Disease. *International Review of Cell and Molecular Biology.* 2010;229–66.
11. Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Mar;7(3):207-19. doi: 10.1038/nrn1868.
12. Urrutia P, Aguirre P, Esparza A, Tapia V, Mena NP, Arredondo M, et al. Inflammation alters the expression of DMT 1, FPN 1 and hepcidin, and it causes iron accumulation in central nervous system cells. *Journal of Neurochemistry.* 2013;126(4):541–9.
13. Samii, A., Etminan, M., Wiens, M. O., & Jafari, S. NSAID use and the risk of Parkinson’s disease: systematic review and meta-analysis of observational studies: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *Drugs &*

- Aging. 2009. 26(9), 769–779. <https://doi.org/10.2165/11316780-000000000-00000>
14. Aguirre JA, Leo G, Cueto R, Andbjør B, Naylor A, Medhurst AD, et al. The novel cyclooxygenase-2 inhibitor GW637185X protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *NeuroReport*. 2008 Apr 16;19(6):657–60.
 15. Bandres-Ciga S, Ahmed S, Sabir MS, Blauwendraat C, Adarmes-Gómez AD, Bernal-Bernal I, Bonilla-Toribio M, Buiza-Rueda D, Carrillo F, Carrión-Claro M, Gómez-Garre P, Jesús S, Labrador-Espinosa MA, Macias D, Méndez-Del-Barrio C, Perrián-Tocino T, Tejera-Parrado C, Vargas-González L, Díez-Fairen M, Alvarez I, Tartari JP, Buongiorno M, Aguilar M, Gorostidi A, Bergareche JA, Mondragon E, Vinagre-Aragon A, Croitoru I, Ruiz-Martínez J, Dols-Icardo O, Kulisevsky J, Marín-Lahoz J, Pagonabarraga J, Pascual-Sedano B, Ezquerro M, Cámara A, Compta Y, Fernández M, Fernández-Santiago R, Muñoz E, Tolosa E, Valdeoriola F, Gonzalez-Aramburu I, Sanchez Rodriguez A, Sierra M, Menéndez-González M, Blazquez M, Garcia C, Suarez-San Martin E, García-Ruiz P, Martínez-Castrillo JC, Vela-Desojo L, Ruz C, Barrero FJ, Escamilla-Sevilla F, Mínguez-Castellanos A, Cerdan D, Tabernero C, Gomez Heredia MJ, Perez Errazquin F, Romero-Acebal M, Feliz C, Lopez-Sendon JL, Mata M, Martínez Torres I, Kim JJ, Dalgard CL; American Genome Center, Brooks J, Saez-Atienzar S, Gibbs JR, Jorda R, Botia JA, Bonet-Ponce L, Morrison KE, Clarke C, Tan M, Morris H, Edsall C, Hernandez D, Simon-Sanchez J, Nalls MA, Scholz SW, Jimenez-Escrig A, Duarte J, Vives F, Duran R, Hoenicka J, Alvarez V, Infante J, Marti MJ, Clarimón J, López de Munain A, Pastor P, Mir P, Singleton A; International Parkinson Disease Genomics Consortium. The Genetic Architecture of Parkinson Disease in Spain: Characterizing Population-Specific Risk, Differential Haplotype Structures, and Providing Etiologic Insight. *Mov Disord*. 2019 Dec;34(12):1851-1863. doi: 10.1002/mds.27864. Epub 2019 Oct 29.
 16. Klein C, Westenberger A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Jan;2(1):a008888. doi: 10.1101/cshperspect.a008888.
 17. Nalls MA, Blauwendraat C, Vallerga CL, Heilbron K, Bandres-Ciga S, Chang D, Tan M, Kia DA, Noyce AJ, Xue A, Bras J, Young E, von Coelln R, Simón-Sánchez J, Schulte C, Sharma M, Krohn L, Pihlstrøm L, Siitonen A, Iwaki H, Leonard H, Faghri F, Gibbs JR, Hernandez DG, Scholz SW, Botia JA, Martinez M, Corvol JC, Lesage S, Jankovic J, Shulman LM, Sutherland M, Tienari P, Majamaa K, Toft M, Andreassen OA, Bangale T, Brice A, Yang J, Gan-Or Z, Gasser T, Heutink P, Shulman JM, Wood NW, Hinds DA, Hardy JA, Morris

- HR, Gratten J, Visscher PM, Graham RR, Singleton AB; 23andMe Research Team; System Genomics of Parkinson's Disease Consortium; International Parkinson's Disease Genomics Consortium. Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* 2019 Dec;18(12):1091-1102. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30320-5.
18. Fusco G, Chen SW, Williamson PTF, Cascella R, Perni M, Jarvis JA, Cecchi C, Vendruscolo M, Chiti F, Cremades N, Ying L, Dobson CM, De Simone A. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science.* 2017 Dec 15;358(6369):1440-1443. doi: 10.1126/science.aan6160.
 19. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci.* 1988 Aug;8(8):2804-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.08-08-02804.1988.
 20. Grandas F. Agonistas dopaminérgicos y neuroprotección en la enfermedad de Parkinson. Barcelona: Ars Medica, D.L; 2002.
 21. McCann H, Stevens CH, Cartwright H, Halliday GM. α -Synucleinopathy phenotypes. *Park Relat Disord.* 2014;20(SUPPL.1):S62-7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70017-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70017-8)
 22. Eriksen JL, Przedborski S, Petrucelli L. Gene dosage and pathogenesis of Parkinson's disease. *Trends Mol Med.* 2005 Mar;11(3):91-6. doi: 10.1016/j.molmed.2005.01.001.
 23. Konno T, Ross OA, Puschmann A, Dickson DW, Wszolek ZK. Autosomal dominant Parkinson's disease caused by SNCA duplications. *Parkinsonism Relat Disord.* 2016 Jan;22 Suppl 1(Suppl 1):S1-6. doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.09.007. Epub 2015 Sep 3.
 24. Rodríguez-Losada N, de la Rosa J, Larriva M, Wendelbo R, Aguirre JA, Castresana JS, Ballaz SJ. Overexpression of alpha-synuclein promotes both cell proliferation and cell toxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Adv Res.* 2020 Jan 22;23:37-45. doi: 10.1016/j.jare.2020.01.009.
 25. Caro-Astorga J, Fajardo I, Ruiz-Pérez MV, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Nascent histamine induces α -synuclein and caspase-3 on human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2014 Sep;451(4):580-6.
 26. Salveson PJ, Spencer RK, Nowick JS. X-ray Crystallographic Structure of Oligomers Formed by a Toxic β -Hairpin Derived from α -Synuclein: Trimers and Higher-Order Oligomers. *J Am Chem Soc.* 2016 Apr 6;138(13):4458-67. doi:

- 10.1021/jacs.5b13261. Epub 2016 Mar 23. PMID: 26926877; PMCID: PMC4825732.
27. Yan, C. H., Levesque, M., Claxton, S., Johnson, R. L., y Ang, S. L. (2011). *Lmx1a* and *lmx1b* function cooperatively to regulate proliferation, specification, and differentiation of midbrain dopaminergic progenitors. *Journal of Neuroscience*, 31(35), 12413-12425.
 28. Ang SL. Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development*. 2006 Sep;133(18):3499-506. doi: 10.1242/dev.02501. Epub 2006 Aug 9.
 29. Ang S-L, Perca-Gomez A, Lacroix E, Rhinn M. Genetic analysis of mouse brain patterning. *Biochemical Society Transactions*. 2000 Oct 1;28(5):A138–8.
 30. Camus A, Davidson BP, Billiards S, Khoo P, Rivera-Pérez JA, Wakamiya M, Behringer RR, Tam PP. The morphogenetic role of midline mesendoderm and ectoderm in the development of the forebrain and the midbrain of the mouse embryo. *Development*. 2000 May;127(9):1799-813. doi: 10.1242/dev.127.9.1799.
 31. Arenas E, Denham M, Villaescusa JC. How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development*. 2015 Jun 1;142(11):1918-36. doi: 10.1242/dev.097394.
 32. Ferri AL, Lin W, Mavromatakis YE, Wang JC, Sasaki H, Whitsett JA, Ang SL. *Foxa1* and *Foxa2* regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development*. 2007 Aug;134(15):2761-9. doi: 10.1242/dev.000141. Epub 2007 Jun 27.
 33. Aguila JC, Hedlund E, Sanchez-Pernaute R. Cellular programming and reprogramming: sculpting cell fate for the production of dopamine neurons for cell therapy. *Stem Cells Int*. 2012;2012:412040. doi: 10.1155/2012/412040. Epub 2012 Sep 4
 34. Rodríguez Pupo Jorge Michel, Díaz Rojas Yuna Viviana, Rojas Rodríguez Yesenia, Ricardo Rodríguez Yuniel, Aguilera Rodríguez Raúl. Actualización en enfermedad de Parkinson idiopática. *CCM* 2013 Jun ; 17(2): 163-177. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812013000200007&lng=es.
 35. Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K; Parkinson Study Group. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2004 Dec 9;351(24):2498-508. doi: 10.1056/NEJMoa033447.
 36. Zheng C, Zhang F. New insights into pathogenesis of l-DOPA-induced dyskinesia. *Neurotoxicology*. 2021 Sep;86:104-113. doi: 10.1016/j.neuro.2021.07.006. Epub 2021 Jul 28.

37. Marín Agustín C. Concepto de enfermedad de parkinson. Nuevos aspectos patogénicos en la enfermedad de Parkinson: autofagia y lípidos. ¿Son decisivos? *Revista de Neurología*. 2010;50(S04):4.
38. Zhao YT, Liu L, Zhao Y, Xie ZY. The effect and safety of levodopa alone versus levodopa sparing therapy for early Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. 2022 Apr;269(4):1834-1850. doi: 10.1007/s00415-021-10830-0. Epub 2021 Oct 15.
39. Xie CL, Zhang YY, Wang XD, Chen J, Chen YH, Pa JL, Lin SY, Lin HZ, Wang WW. Levodopa alone compared with levodopa-sparing therapy as initial treatment for Parkinson's disease: a meta-analysis. *Neurol Sci*. 2015 Aug;36(8):1319-29. doi: 10.1007/s10072-015-2253-7. Epub 2015 May 17.
40. Talati R, Baker WL, Patel AA, Reinhart K, Coleman CI. Adding a dopamine agonist to preexisting levodopa therapy vs. levodopa therapy alone in advanced Parkinson's disease: a meta analysis. *Int J Clin Pract*. 2009 Apr;63(4):613-23. doi: 10.1111/j.1742-1241.2009.02027.x. Epub 2009 Feb 16.
41. Block G, Liss C, Reines S, Irr J, Nibbelink D. Comparison of immediate-release and controlled release carbidopa/levodopa in Parkinson's disease. A multicenter 5-year study. The CR First Study Group. *Eur Neurol*. 1997;37(1):23-7. doi: 10.1159/000117399.
42. Hauser RA, Hsu A, Kell S, Espay AJ, Sethi K, Stacy M, Ondo W, O'Connell M, Gupta S; IPX066 ADVANCE-PD investigators. Extended-release carbidopa-levodopa (IPX066) compared with immediate-release carbidopa-levodopa in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations: a phase 3 randomised, double-blind trial. *Lancet Neurol*. 2013 Apr;12(4):346-56. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70025-5. Epub 2013 Feb 26.
43. Kurlan R, Rubin AJ, Miller C, Rivera-Calimlim L, Clarke A, Shoulson I. Duodenal delivery of levodopa for on-off fluctuations in parkinsonism: preliminary observations. *Ann Neurol*. 1986 Aug;20(2):262-5. doi: 10.1002/ana.410200213.
44. Alonso Cánovas A, Luquin Piudo R, García Ruiz-Espiga P, Burguera JA, Campos Arillo V, Castro A, et al. Agonistas dopaminérgicos en la enfermedad de Parkinson. *Neurología*. 2014 May;29(4):230-41. Focchi, G. R., Leite, M. D. C., y Scivoletto, S. (2001). Use of the dopaminergic agonist pergolide in the treatment of cocaine craving. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 23(4), 188-194.
45. A. Focchi GR, Leite MC, Andrade AG, Scivoletto S. Use of Dopamine Agonist Pergolide in Outpatient Treatment of Cocaine Dependence. *Substance Use & Misuse*. 2005 Jan;40(8):1169-77.

46. Joyce JN, Millan MJ. Dopamine D3 receptor antagonists as therapeutic agents. *Drug Discov Today*. 2005 Jul 1;10(13):917-25. doi: 10.1016/S1359-6446(05)03491-4.
47. Frankel JP, Lees AJ, Kempster PA, Stern GM. Subcutaneous apomorphine in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1990 Feb;53(2):96-101. doi: 10.1136/jnnp.53.2.96.
48. Hughes AJ, Bishop S, Kleedorfer B, Turjanski N, Fernandez W, Lees AJ, Stern GM. Subcutaneous apomorphine in Parkinson's disease: response to chronic administration for up to five years. *Mov Disord*. 1993 Apr;8(2):165-70. doi: 10.1002/mds.870080208.
49. Bermejo PE, Zea MA, Alba-Alcántara L, Ruiz-Huete C. Efectos locales del tratamiento transdérmico con rotigotina [Local effects of transdermal treatment with rotigotine]. *Rev Neurol*. 2013 Apr 1;56(7):359-62. Spanish.
50. Díaz F. Selegilina y enfermedad de Parkinson: inhibición de la MAO. *Revista de Neuro-Psiquiatria*. 21mar.2013 [citado 15jul.2022];61:S51-S57. Available from: <https://revistas.upch.edu.pe/index.php/RNP/article/view/1450>
51. Brailowsky, S., y García-Muñoz, M. Neurofarmacología de la enfermedad de Parkinson: aspectos básicos y avances recientes. *Salud Mental*. 2013 16(4), 37-53.
52. Villalba-Moreno ÁM, Alfaro-Lara ER, Sánchez-Fidalgo S. Fármacos con carga anticolinérgica: aspectos prácticos y precauciones. *FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria*. 2020 Aug;27(7):353-67.
53. Linazasoro-Cristóbal G, López Del Val LJ, García Ruiz-Espiga P, López-Manzanares L, Luquin-Piudo MR, Martínez-Castrillo JC, Mir P, Pagonabarraga-Mora J. Optimized clinical management of Parkinson's disease with opicapone. Recommendations from Spanish experts. *Rev Neurol*. 2020 Jun 12;70(s01):S1-S11. English, Spanish. doi: 10.33588/rn.70s01.2019340.
54. Sierra Benítez Enrique Marcos, León Pérez Mairianny Quianella, Solomon Cardona María Teresa. Cirugía ablativa del núcleo subtalámico en la Enfermedad de Parkinson. Consideraciones necesarias. *Rev. Med. Electrón*. 2020 Dic ; 42(6): 2644-2658. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242020000602644&lng=es. Epub 31-Dic-2020.
55. Arce, I. A. P., y López, C. L. M. Manejo quirúrgico de la enfermedad de Parkinson. *Decisiones en neurología*. 2016 Tomo II, 425.
56. Llumiguano C, Dóczy T, Baths I. Tratamiento de la enfermedad de Parkinson con palidotomía y palido-talamotomía estereotáctica guiada por microelectrodos [Microelectrode guided stereotactic pallidotomy and pallido-thalamotomy for

- treatment of Parkinson's disease]. *Neurocirugia (Astur)*. 2006 Oct;17(5):420-32. Spanish.
57. Linazasoro G. Fisiopatología del parkinsonismo y las discinesias: enseñanzas de las observaciones quirúrgicas [Physiopathology of parkinsonism and dyskinesias: lessons from surgical observations]. *Neurologia*. 2001 Jan;16(1):17-29. Spanish.
58. Kunstmann C, Valdivia F, De Marinis A, Ayach F, Montes JM, Chana-Cuevas P. Estimulación cerebral profunda en enfermedad de Parkinson [Deep brain stimulation in Parkinson's disease]. *Rev Med Chil*. 2018 May;146(5):562-569. Spanish. doi: 10.4067/s0034-98872018000500562.
59. Nombela C, Lozano A, Villanueva C, Barcia JA. Simultaneous Stimulation of the Globus Pallidus Interna and the Nucleus Basalis of Meynert in the Parkinson-Dementia Syndrome. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2019;47(1-2):19-28. doi: 10.1159/000493094. Epub 2019 Jan 10.
60. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2000;(60):277-90. doi: 10.1007/978-3-7091-6301-6_19.
61. Dawbarn D, Allen SJ. Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2003 Jun;29(3):211-30. doi: 10.1046/j.1365-2990.2003.00487.x.
62. da Silva PG, Domingues DD, de Carvalho LA, Allodi S, Correa CL. Neurotrophic factors in Parkinson's disease are regulated by exercise: Evidence-based practice. *J Neurol Sci*. 2016 Apr 15;363:5-15. doi: 10.1016/j.jns.2016.02.017. Epub 2016 Feb 10.
63. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther*. 2013 May;138(2):155-75. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.004. Epub 2013 Jan 21. PMID: 23348013.
64. Björklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ. Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res*. 2000 Dec 15;886(1-2):82-98. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02915-2.
65. Bäckman CM, Shan L, Zhang YJ, Hoffer BJ, Leonard S, Troncoso JC, Vonsattel P, Tomac AC. Gene expression patterns for GDNF and its receptors in the human putamen affected by Parkinson's disease: a real-time PCR study. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Jun 27;252(1-2):160-6. doi: 10.1016/j.mce.2006.03.013. Epub 2006 Apr 27.

66. Whone AL, Boca M, Luz M, Woolley M, Mooney L, Dharia S, Broadfoot J, Cronin D, Schroers C, Barua NU, Longpre L, Barclay CL, Boiko C, Johnson GA, Fibiger HC, Harrison R, Lewis O, Pritchard G, Howell M, Irving C, Johnson D, Kinch S, Marshall C, Lawrence AD, Blinder S, Sossi V, Stoessl AJ, Skinner P, Mohr E, Gill SS. Extended Treatment with Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2019;9(2):301-313. doi: 10.3233/JPD-191576.
67. Sucunza D, Rico AJ, Roda E, Collantes M, González-Aseguinolaza G, Rodríguez-Pérez AI, Peñuelas I, Vázquez A, Labandeira-García JL, Broccoli V, Lanciego JL. Glucocerebrosidase Gene Therapy Induces Alpha-Synuclein Clearance and Neuroprotection of Midbrain Dopaminergic Neurons in Mice and Macaques. *Int J Mol Sci.* 2021 May 1;22(9):4825. doi: 10.3390/ijms22094825.
68. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, Kurilshikov A, Bonder MJ, Valles-Colomer M, Vandeputte D, Tito RY, Chaffron S, Rymenans L, Verspecht C, De Sutter L, Lima-Mendez G, D'hoë K, Jonckheere K, Homola D, Garcia R, Tigchelaar EF, Eeckhaut L, Fu J, Henckaerts L, Zhernakova A, Wijmenga C, Raes J. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science.* 2016 Apr 29;352(6285):560-4. doi: 10.1126/science.aad3503. Epub 2016 Apr 28. PMID: 27126039.
69. Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, Tigchelaar EF, Schirmer M, Vatanen T, Mujagic Z, Vila AV, Falony G, Vieira-Silva S, Wang J, Imhann F, Brandsma E, Jankipersadsing SA, Joossens M, Cenit MC, Deelen P, Swertz MA; LifeLines cohort study, Weersma RK, Feskens EJ, Netea MG, Gevers D, Jonkers D, Franke L, Aulchenko YS, Huttenhower C, Raes J, Hofker MH, Xavier RJ, Wijmenga C, Fu J. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science.* 2016 Apr 29;352(6285):565-9. doi: 10.1126/science.aad3369. Epub 2016 Apr 28.
70. Treangen TJ, Wagner J, Burns MP, Villapol S. Traumatic Brain Injury in Mice Induces Acute Bacterial Dysbiosis Within the Fecal Microbiome. *Front Immunol.* 2018 Nov 27;9:2757. doi: 10.3389/fimmu.2018.02757.
71. Villapol S. Gastrointestinal symptoms associated with COVID-19: impact on the gut microbiome. *Transl Res.* 2020 Dec;226:57-69. doi: 10.1016/j.trsl.2020.08.004. Epub 2020 Aug 20.
72. Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord.* 2015 Mar;30(3):350-8. doi: 10.1002/mds.26069. Epub 2014 Dec 5.

73. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schretter CE, Rocha S, Gradinaru V, Chesselet MF, Keshavarzian A, Shannon KM, Krajmalnik-Brown R, Wittung-Stafshede P, Knight R, Mazmanian SK. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*. 2016 Dec 1;167(6):1469-1480.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.018.
74. Cersosimo MG, Raina GB, Pecci C, Pellene A, Calandra CR, Gutiérrez C, Micheli FE, Benarroch EE. Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. *J Neurol*. 2013 May;260(5):1332-8. doi: 10.1007/s00415-012-6801-2. Epub 2012 Dec 21.
75. Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, Voigt RM, Shaikh M, Jaglin JA, Estes JD, Dodiya HB, Keshavarzian A. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One*. 2011;6(12):e28032. doi: 10.1371/journal.pone.0028032. Epub 2011 Dec 1.
76. Ananthaswamy A. Faecal transplant eases symptoms of Parkinson's disease. *New Scientist*. 2011 Jan;209(2796):8-9. [https://doi.org/10.1016/S0262-4079\(11\)60124-3](https://doi.org/10.1016/S0262-4079(11)60124-3).
77. Van Laar T, Boertien JM, Herranz AH. Faecal Transplantation, Pro- and Prebiotics in Parkinson's Disease; Hope or Hype? *J Parkinsons Dis*. 2019;9(s2):S371-S379. doi: 10.3233/JPD-191802.
78. Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med*. 2011 May 10;9:52. doi: 10.1186/1741-7015-9-52.
79. Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med*. 1999 Dec;5(12):1403-9. doi: 10.1038/70978.
80. Di Monte DA, McCormack A, Petzinger G, Janson AM, Quik M, Langston WJ. Relationship among nigrostriatal denervation, parkinsonism, and dyskinesias in the MPTP primate model. *Mov Disord*. 2000 May;15(3):459-66. doi: 10.1002/1531-8257(200005)15:3<459::AID-MDS1006>3.0.CO;2-3.
81. Thompson LH, Parish CL. Transplantation of fetal midbrain dopamine progenitors into a rodent model of Parkinson's disease. *Methods Mol Biol*. 2013;1059:169-80. doi: 10.1007/978-1-62703-574-3_15.
82. Brundin P, Barker RA, Parmar M. Neural grafting in Parkinson's disease Problems and possibilities. *Prog Brain Res*. 2010;184:265-94. doi: 10.1016/S0079-6123(10)84014-2.

83. Rodríguez-Losada N, Garcia-Pinilla JM, Jimenez-Navarro MF, Gonzalez FJ. Endothelial progenitor cells in cell-based therapy for cardiovascular disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2008 Oct 26;54(1):11-23.
84. Freed CR, Zhou W, Breeze RE. Dopamine cell transplantation for Parkinson's disease: the importance of controlled clinical trials. *Neurotherapeutics*. 2011 Oct;8(4):549-61. doi: 10.1007/s13311-011-0082-9.
85. Wolff EF, Mutlu L, Massasa EE, Elsworth JD, Eugene Redmond D Jr, Taylor HS. Endometrial stem cell transplantation in MPTP- exposed primates: an alternative cell source for treatment of Parkinson's disease. *J Cell Mol Med*. 2015 Jan;19(1):249-56. doi: 10.1111/jcmm.12433. Epub 2014 Oct 6.
86. Rodríguez-Losada N, Jiménez-Navarro MF, Fernández B, Rueda-Martínez C, Aránega A, Marchal JA, de Teresa Galván E. Resident and non-resident stem cells in acute myocardial infarction. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2010 Sep 1;10(3):202-15. doi: 10.2174/1871529x11006030202.
87. Beauvais G, Rodríguez-Losada N, Ying L, Zakirova Z, Watson JL, Readhead B, Gadue P, French DL, Ehrlich ME, Gonzalez-Alegre P. Exploring the Interaction Between eIF2 α Dysregulation, Acute Endoplasmic Reticulum Stress and DYT1 Dystonia in the Mammalian Brain. *Neuroscience*. 2018 Feb 10;371:455-468. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.12.033. Epub 2017 Dec 28.
88. Hartfield EM, Yamasaki-Mann M, Ribeiro Fernandes HJ, Vowles J, James WS, Cowley SA, Wade-Martins R. Physiological characterisation of human iPSC-derived dopaminergic neurons. *PLoS One*. 2014 Feb 21;9(2):e87388. doi: 10.1371/journal.pone.0087388.
89. Arenas E. Parkinson's disease in the single-cell era. *Nat Neurosci*. 2022 May;25(5):536-538. doi: 10.1038/s41593-022-01069-7.
90. Sadanandan N, Di Santo S, Widmer HR. Another win for endothelial progenitor cells: Endothelial progenitor cell-derived conditioned medium promotes proliferation and exerts neuroprotection in cultured neuronal progenitor cells. *Brain Circ*. 2019 Sep 30;5(3):106-111. doi: 10.4103/bc.bc_41_19.
91. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki Ki, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2000 Jun;105(11):1527-36. doi: 10.1172/JCI8296.
92. Barker RA, Parmar M, Kirkeby A, Björklund A, Thompson L, Brundin P. Are Stem Cell-Based Therapies for Parkinson's Disease Ready for the Clinic in 2016? *J Parkinsons Dis*. 2016;6(1):57-63. doi: 10.3233/JPD-160798.
93. Zawada WM, Cibelli JB, Choi PK, Clarkson ED, Golueke PJ, Witt SE, Bell KP, Kane J, Ponce de Leon FA, Jerry DJ, Robl JM, Freed CR, Stice SL. Somatic

- cell cloned transgenic bovine neurons for transplantation in parkinsonian rats. *Nat Med.* 1998 May;4(5):569-74. doi: 10.1038/nm0598-569.
94. Freed CR, Leehey MA, Zawada M, Bjugstad K, Thompson L, Breeze RE. Do patients with Parkinson's disease benefit from embryonic dopamine cell transplantation? *J Neurol.* 2003 Oct;250 Suppl 3:III44-6. doi: 10.1007/s00415-003-1308-5.
95. Doi D, Samata B, Katsukawa M, Kikuchi T, Morizane A, Ono Y, Sekiguchi K, Nakagawa M, Parmar M, Takahashi J. Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports.* 2014 Mar 6;2(3):337-50. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.01.013.
96. Sridhar A, Ohlemacher SK, Langer KB, Meyer JS. Robust Differentiation of mRNA-Reprogrammed Human Induced Pluripotent Stem Cells Toward a Retinal Lineage. *Stem Cells Transl Med.* 2016 Apr;5(4):417-26. doi: 10.5966/sctm.2015-0093. Epub 2016 Mar 1.
97. Ou L, Wang X, Zou F. Is iPS cell the panacea? *IUBMB Life.* 2010 Mar;62(3):170-5. doi: 10.1002/iub.289.
98. Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, Grigorieva IV, Firsov AA. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science.* 2004 Oct 22;306(5696):666-9. doi: 10.1126/science.1102896.
99. Maleki M, Zarezadeh R, Nouri M, Sadigh AR, Pouremamali F, Asemi Z, Kafil HS, Alemi F, Yousefi B. Graphene Oxide: A Promising Material for Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Biomol Concepts.* 2020 Dec 31;11(1):182-200. doi: 10.1515/bmc-2020-0017.
100. Oprych KM, Whitby RL, Mikhalovsky SV, Tomlins P, Adu J. Repairing Peripheral Nerves: Is there a Role for Carbon Nanotubes? *Adv Healthc Mater.* 2016 Jun;5(11):1253-71. doi: 10.1002/adhm.201500864. Epub 2016 Mar 29.
101. Lalwani G, Gopalan A, D'Agati M, Sankaran JS, Judex S, Qin YX, Sitharaman B. Porous three-dimensional carbon nanotube scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2015 Oct;103(10):3212-25. doi: 10.1002/jbm.a.35449. Epub 2015 Mar 31.
102. Kabiri M, Oraee-Yazdani S, Dodel M, Hanaee-Ahvaz H, Soudi S, Seyedjafari E, Salehi M, Soleimani M. Cytocompatibility of a conductive nanofibrous carbon nanotube/poly (L-Lactic acid) composite scaffold intended for nerve tissue engineering. *EXCLI J.* 2015 Jul 27;14:851-60. doi: 10.17179/excli2015-282.
103. Kumar PV, Bardhan NM, Tongay S, Wu J, Belcher AM, Grossman JC. Scalable enhancement of graphene oxide properties by thermally driven phase

- transformation. *Nat Chem*. 2014 Feb;6(2):151-8. doi: 10.1038/nchem.1820. Epub 2013 Dec 15.
104. Kumar S, Chatterjee K. Comprehensive Review on the Use of Graphene-Based Substrates for Regenerative Medicine and Biomedical Devices. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Oct 12;8(40):26431-26457. doi: 10.1021/acsami.6b09801. Epub 2016 Oct 4.
105. Rodríguez-Losada N, Romero P, Estivill-Torrús G, Guzmán de Villoria R, Aguirre JA. Cell survival and differentiation with nanocrystalline glass-like carbon using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. *PLoS One*. 2017 Mar 23;12(3):e0173978. doi: 10.1371/journal.pone.0173978.
106. Rodríguez-Losada N, Aguirre JA. The impact of graphene on neural regenerative medicine. *Neural Regen Res*. 2017 Jul;12(7):1071-1072. doi: 10.4103/1673-5374.211181.
107. Menéndez López, R. M. Del grafito al grafeno. El renacimiento de un clásico. CSIC Editorial. 2016.
108. Liu W, Zhao L, Zurek E, Xia J, Zheng Y, Lin H, et al. Building egg-tray-shaped graphenes that have superior mechanical strength and band gap. *Computational Materials*. 2019 Jul 11;5(1).
109. Dreyer DR, Ruoff RS, Bielawski CW. From conception to realization: an historical account of graphene and some perspectives for its future. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010 Dec 3;49(49):9336-44. doi: 10.1002/anie.201003024.
110. Menéndez, R., y Blanco, C. ¿Qué sabemos del grafeno? Ed. CSIC. 2014.
111. Fabbro A, Scaini D, León V, Vázquez E, Cellot G, Privitera G, Lombardi L, Torrisi F, Tomarchio F, Bonaccorso F, Bosi S, Ferrari AC, Ballerini L, Prato M. Graphene-Based Interfaces Do Not Alter Target Nerve Cells. *ACS Nano*. 2016 Jan 26;10(1):615-23. doi: 10.1021/acs.nano.5b05647. Epub 2016 Jan 5.
112. Zhang X, Yin J, Peng C, Hu W, Zhu Z, Li W, et al. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon*. 2011 Mar;49(3):986-95.
113. Kong Z, Hu W, Jiao F, Zhang P, Shen J, Cui B, Wang H, Liang L. Theoretical Evaluation of DNA Genotoxicity of Graphene Quantum Dots: A Combination of Density Functional Theory and Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem B*. 2020 Oct 22;124(42):9335-9342. doi: 10.1021/acs.jpcc.0c05882. Epub 2020 Oct 13.
114. Yocham KM, Scott C, Fujimoto K, Brown R, Tanasse E, Oxford JT, Lujan TJ, Estrada D. Mechanical Properties of Graphene Foam and Graphene Foam -

- Tissue Composites. *Adv Eng Mater*. 2018 Sep;20(9):1800166. doi: 10.1002/adem.201800166. Epub 2018 Jun 25.
115. Bramini M, Alberini G, Colombo E, Chiacchiaretta M, DiFrancesco ML, Maya-Vetencourt JF, Maragliano L, Benfenati F, Cesca F. Interfacing Graphene-Based Materials With Neural Cells. *Front Syst Neurosci*. 2018 Apr 11;12:12. doi: 10.3389/fnsys.2018.00012.
116. Khan ZU, Kausar A, Ullah H, Badshah A, Khan WU. A review of graphene oxide, graphene buckypaper, and polymer/graphene composites: Properties and fabrication techniques. *Journal of Plastic Film & Sheeting*. 2016 Aug 3;32(4):336–79.
117. Gurunathan S, Kim JH. Synthesis, toxicity, biocompatibility, and biomedical applications of graphene and graphene-related materials. *Int J Nanomedicine*. 2016 May 5; 11:1927-45. doi: 10.2147/IJN.S105264.
118. Zhang Y, Wu C, Guo S, Zhang J. Interactions of graphene and graphene oxide with proteins and peptides. *Nanotechnology Reviews*. 2013 Feb 1;2(1):27–45.
119. Gao L, Lian C, Zhou Y, Yan L, Li Q, Zhang C, Chen L, Chen K. Graphene oxide-DNA based sensors. *Biosens Bioelectron*. 2014 Oct 15;60:22-9. doi: 10.1016/j.bios.2014.03.039. Epub 2014 Apr 13.
120. Romero P, Postigo PA, Baquedano E, Martínez J, Boscá A, Guzman de Villoria R. Controlled synthesis of nanocrystalline glass-like carbon thin films with tuneable electrical and optical properties. *Chemical Engineering Journal*. 2016 Sep;299:8–14.
121. Botas C, Álvarez P, Blanco P, Granda M, Blanco C, Santamaría R, et al. Graphene materials with different structures prepared from the same graphite by the Hummers and Brodie methods. *Carbon*. 2013 Dec;65:156–64.
122. Sierra U, Álvarez P, Blanco C, Granda M, Santamaría R, Menéndez R. Cokes of different origin as precursors of graphene oxide. *Fuel*. 2016 Feb;166:400–3.
123. Menéndez López RM, Álvarez Rodríguez P, Sierra Gómez UA, Blanco Rodríguez C, Granda Ferreira M, Santamaría Ramírez R. Método de obtención de óxido de material pregrafítico, óxido de grafeno o grafeno a partir de materiales pregrafíticos y productos obtenidos por dicho método. *digitalcsices* . 2014 Oct 10 ; Available from: <https://digital.csic.es/handle/10261/124491>
124. Harris † PJF. Fullerene-related structure of commercial glassy carbons. *Philosophical Magazine*. 2004 Oct 11;84(29):3159–67.
125. Zhao Z, Wang EF, Yan H, Kono Y, Wen B, Bai L, et al. Nanoarchitected materials composed of fullerene-like spheroids and disordered graphene layers with tunable mechanical properties. *Nature Communications*. 2015 Feb 4;6(1).

126. Pesin LA. Review Structure and properties of glass-like carbon Journal of Materials Science. 2002;37(1):1–28.
127. Shamsa M, Liu WL, Balandin AA, Casiraghi C, Milne WI, Ferrari AC. Thermal conductivity of diamond-like carbon films. Applied Physics Letters. 2006 Oct 16;89(16):161921.
128. VanDersarl JJ, Mercanzini A, Renaud P. Integration of 2D and 3D Thin Film Glassy Carbon Electrode Arrays for Electrochemical Dopamine Sensing in Flexible Neuroelectronic Implants. Advanced Functional Materials. 2014 Nov 6;25(1):78–84.
129. Kim P, Shi L, Majumdar A, McEuen PL. Thermal Transport Measurements of Individual Multiwalled Nanotubes. Physical Review Letters. 2001 Oct 31;87(21).
130. Kusakabe K, Maruyama M. Magnetic nanographite. Physical Review B. 2003 Mar 28;67(9).
131. Wang C, Diao D. Magnetic behavior of graphene sheets embedded carbon film originated from graphene nanocrystallite. Applied Physics Letters. 2013 Feb 4;102(5):052402.
132. Chen CH, Lin CT, Hsu WL, Chang YC, Yeh SR, Li LJ, Yao DJ. A flexible hydrophilic-modified graphene microprobe for neural and cardiac recording. Nanomedicine. 2013 Jul;9(5):600-4. doi: 10.1016/j.nano.2012.12.004. Epub 2013 Jan 22.
133. Chen GY, Pang DW, Hwang SM, Tuan HY, Hu YC. A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. Biomaterials. 2012 Jan;33(2):418-27. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.071. Epub 2011 Oct 19.
134. Domínguez-Bajo A, González-Mayorga A, López-Dolado E, Serrano MC. Graphene-Derived Materials Interfacing the Spinal Cord: Outstanding in Vitro and in Vivo Findings. Front Syst Neurosci. 2017 Sep 27; 11:71. doi: 10.3389/fnsys.2017.00071.
135. Fiorillo M, Verre AF, Iliut M, Peiris-Pagés M, Ozsvári B, Gandara R, Cappello AR, Sotgia F, Vijayaraghavan A, Lisanti MP. Graphene oxide selectively targets cancer stem cells, across multiple tumor types: implications for non-toxic cancer treatment, via "differentiation-based nano-therapy". Oncotarget. 2015 Feb 28;6(6):3553-62. doi: 10.18632/oncotarget.3348.
136. Hong SW, Lee JH, Kang SH, Hwang EY, Hwang YS, Lee MH, Han DW, Park JC. Enhanced neural cell adhesion and neurite outgrowth on graphene-based biomimetic substrates. Biomed Res Int. 2014; 2014:212149. doi: 10.1155/2014/212149. Epub 2014 Jan 30.

137. Menea F, Abdelghani A, Menea B. Graphene nanomaterials as biocompatible and conductive scaffolds for stem cells: impact for tissue engineering and regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015 Dec;9(12):1321-38. doi: 10.1002/term.1910. Epub 2014 Jun 11. PMID: 24917559.
138. Veliev F, Briançon-Marjollet A, Bouchiat V, Delacour C. Impact of crystalline quality on neuronal affinity of pristine graphene. *Biomaterials.* 2016 Apr;86:33-41. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.042. Epub 2016 Feb 2.
139. Yang, D., Li, T., Xu, M., Gao, F., Yang, J., Yang, Z., y Le, W. (2014). Graphene oxide promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons. *Nanomedicine (London, England),* 9, 2445–2455. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.197>
140. Motealleh A, Eqtesadi S, Perera FH, Ortiz AL, Miranda P, Pajares A, Wendelbo R. Reinforcing 13-93 bioglass scaffolds fabricated by robocasting and pressureless spark plasma sintering with graphene oxide. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019 Sep;97:108-116. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.05.016. Epub 2019 May 10.
141. Hummers WS, Offeman RE. Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society.* 1958 Mar;80(6):1339–9.
142. Son JH, Chun HS, Joh TH, Cho S, Conti B, Lee JW. Neuroprotection and neuronal differentiation studies using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. *J Neurosci.* 1999 Jan 1;19(1):10-20. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-01-00010.1999.
143. Weisstein E. Making MathWorld. *The Mathematica Journal.* 2007 Aug 7;10(3). Weisstein EW. Least Squares Fitting--Exponential. mathworld.wolfram.com. Available from: <https://mathworld.wolfram.com/LeastSquaresFittingExponential.html>
144. Mirzayans R, Andrais B, Murray D. Do Multiwell Plate High Throughput Assays Measure Loss of Cell Viability Following Exposure to Genotoxic Agents? *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 2;18(8):1679. doi: 10.3390/ijms18081679.
145. Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Wang YW, Kumar P, Murray D. Multinucleated Giant Cancer Cells Produced in Response to Ionizing Radiation Retain Viability and Replicate Their Genome. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 8;18(2):360. doi: 10.3390/ijms18020360.
146. Jalvo B, Santiago-Morales J, Romero P, Guzman de Villoria R, Rosal R, Aronov D, et al. Microbial colonisation of transparent glass-like carbon films triggered by a reversible radiation-induced hydrophobic to hydrophilic transition. *RSC Adv.* 2016;6(55):50278–87. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA04960E>

147. Malke H. T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, X + 545 S., 61 Abb., 28 Tab. Cold Spring Harbor, N. Y. 1982. Cold Spring Harbor Laboratory. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*. 2007 Jan 24;24(1):32–2.
148. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jun 28;9(7):676-82. doi: 10.1038/nmeth.2019.
149. Dunn KW, Kamocka MM, Mcdonald JH. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. 2011; 46202:723–42.
150. Landmann L. Deconvolution improves colocalization analysis of multiple fluorochromes in 3D confocal data sets more than filtering techniques. *J Microsc*. 2002 Dec 1;208:134–47.
151. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
152. Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. 1990;4(4):477–85.
153. Andersson E, Tryggvason U, Deng Q, Friling S, Alekseenko Z, Robert B, et al. Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell*. 2006;124(2):393–405.
154. Smidt MP, Asbreuk CH, Cox JJ, Chen H, Johnson RL, Burbach JP. A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b. *Nat Neurosci*. 2000 Apr;3(4):337-41. doi: 10.1038/73902.
155. Smidt MP, Smits SM, Bouwmeester H, Hamers FPT, van der Linden AJA, Hellemons AJCGM, et al. Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. *Development*. 2004;131(5):1145–55.
156. Yamashita T. Endogenous Neurogenesis, Oligodendrogenesis and Angiogenesis after Ischemic Brain Injury. *J Neurol Neurophysiol*. 2012;s8(01):8–11.
157. Zhang P, Xia N, Reijo Pera RA. Directed dopaminergic neuron differentiation from human pluripotent stem cells. *J Vis Exp*. 2014 Sep 15;(91):51737. doi: 10.3791/51737.
158. Ma K, Fox L, Shi G, Shen J, Liu Q, Pappas JD, Cheng J, Qu T. Generation of neural stem cell-like cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Neurol Res*. 2011 Dec;33(10):1083-93. doi: 10.1179/1743132811Y.0000000053.

159. Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson DL, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP, Paul SM. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 4;98(25):14669-74. doi: 10.1073/pnas.251341998. Epub 2001 Nov 27.
160. Moriarty N, Parish CL, Dowd E. Primary tissue for cellular brain repair in Parkinson's disease: Promise, problems and the potential of biomaterials. *Eur J Neurosci*. 2019 Feb;49(4):472-486. doi: 10.1111/ejn.14051. Epub 2018 Jul 10.
161. Rodríguez-Losada, N., Villoria, R. G. De, y Aguirre, J. A. Is it Trendy to do Research on Graphene Based Materials for use in Regenerative Medicine ?. *Novel Techniques in Arthritis & Bone Research*. 2017. 1(1), 1–4.
162. Rodríguez-Losada N, Wendelbob R, Ocaña MC, Casares AD, Guzman de Villoría R, Aguirre Gomez JA, Arraez MA, Gonzalez-Alegre P, Medina MA, Arenas E, Narvaez JA. Graphene Oxide and Reduced Derivatives, as Powder or Film Scaffolds, Differentially Promote Dopaminergic Neuron Differentiation and Survival. *Front Neurosci*. 2020 Dec 21;14:570409. doi: 10.3389/fnins.2020.570409.
163. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng*. 2011 Aug 15;13:27-53. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071910-124743.
164. Kazuno A, Maki D, Yamato I, Nakajima N, Seta H, Soeda S, Ozawa S, Uchiyama Y, Tamaki T. Regeneration of Transected Recurrent Laryngeal Nerve Using Hybrid-Transplantation of Skeletal Muscle-Derived Stem Cells and Bioabsorbable Scaffold. *J Clin Med*. 2018 Sep 12;7(9):276. doi: 10.3390/jcm7090276.
165. Kumar S, Chatterjee K. Comprehensive Review on the Use of Graphene-Based Substrates for Regenerative Medicine and Biomedical Devices. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Oct 12;8(40):26431-26457. doi: 10.1021/acsami.6b09801. Epub 2016 Oct 4.
166. Akhavan O, Ghaderi E, Abouei E, Hatamie S, Ghasemi E. Accelerated differentiation of neural stem cells into neurons on ginseng-reduced graphene oxide sheets. *Carbon N Y*. 2014;66:395–406. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2013.09.015>
167. Palejwala AH, Fridley JS, Mata JA, Samuel EL, Luerksen TG, Perlaky L, Kent TA, Tour JM, Jea A. Biocompatibility of reduced graphene oxide nanoscaffolds following acute spinal cord injury in rats. *Surg Neurol Int*. 2016 Aug 23;7:75. doi: 10.4103/2152-7806.188905.

168. Cragg SJ, Clarke DJ, Greenfield SA. Real-time dynamics of dopamine released from neuronal transplants in experimental Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2000 Jul;164(1):145-53. doi: 10.1006/exnr.2000.7420.
169. Li N, Zhang X, Song Q, Su R, Zhang Q, Kong T, Liu L, Jin G, Tang M, Cheng G. The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates. *Biomaterials*. 2011 Dec;32(35):9374-82. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.065. Epub 2011 Sep 8.
170. He Z, Zhang S, Song Q, Li W, Liu D, Li H, Tang M, Chai R. The structural development of primary cultured hippocampal neurons on a graphene substrate. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016 Oct 1;146:442-51. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.06.045. Epub 2016 Jun 26.
171. Wang C, Diao D. Magnetic behavior of graphene sheets embedded carbon film originated from graphene nanocrystallite. *Applied Physics Letters*. 2013 Feb 4;102(5):052402.
172. Bianco A. Graphene: safe or toxic? The two faces of the medal. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013 May 3;52(19):4986-97. doi: 10.1002/anie.201209099. Epub 2013 Apr 11.
173. Gurunathan S, Han JW, Eppakayala V, Kim JH. Biocompatibility of microbially reduced graphene oxide in primary mouse embryonic fibroblast cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013 May 1;105:58-66. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.12.036. Epub 2013 Jan 5.
174. Kabiri M, Oraee-Yazdani S, Dodel M, Hanaee-Ahvaz H, Soudi S, Seyedjafari E, Salehi M, Soleimani M. Cytocompatibility of a conductive nanofibrous carbon nanotube/poly (L-Lactic acid) composite scaffold intended for nerve tissue engineering. *EXCLI J*. 2015 Jul 27;14:851-60. doi: 10.17179/excli2015-282.
175. Pretti C, Oliva M, Pietro RD, Monni G, Cevasco G, Chiellini F, Pomelli C, Chiappe C. Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2014 Mar; 101:138-45. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.11.008. Epub 2014 Jan 15.
176. Choi YJ, Kim E, Han J, Kim JH, Gurunathan S. A Novel Biomolecule-Mediated Reduction of Graphene Oxide: A Multifunctional Anti-Cancer Agent. *Molecules*. 2016 Mar 18;21(3):375. doi: 10.3390/molecules21030375.
177. Tang M, Li J, He L, Guo R, Yan X, Li D, Zhang Y, Liao M, Shao B, Hu Y, Liu Y, Tang Q, Xia L, Guo X, Chai R. Transcriptomic profiling of neural stem cell differentiation on graphene substrates. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019 Oct 1;182:110324. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.06.054. Epub 2019 Jun 25.

178. Park SY, Park J, Sim SH, Sung MG, Kim KS, Hong BH, Hong S. Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. *Adv Mater.* 2011 Sep 22;23(36):H263-7. doi: 10.1002/adma.201101503. Epub 2011 Aug 8.
179. Chang Y, Yang ST, Liu JH, Dong E, Wang Y, Cao A, Liu Y, Wang H. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol Lett.* 2011 Feb 5;200(3):201-10. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.11.016. Epub 2010 Dec 2.
180. Serrano MC, Patiño J, García-Rama C, Ferrer ML, Fierro JLG, Tamayo A, et al. 3D free-standing porous scaffolds made of graphene oxide as substrates for neural cell growth. *J Mater Chem B* . 2014;5698–706. Available from: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2014/TB/c4tb00652f>
181. Strömberg I, Kehr J, Andbjør B, Fuxe K. Fetal ventral mesencephalic grafts functionally reduce the dopamine D2 receptor supersensitivity in partially dopamine reinnervated host striatum. *Exp Neurol.* 2000 Jul;164(1):154-65. doi: 10.1006/exnr.2000.7421.
182. Heo C, Yoo J, Lee S, Jo A, Jung S, Yoo H, et al. The control of neural cell-to-cell interactions through non-contact electrical field stimulation using graphene electrodes. *Biomaterials.* 2011;32(1):19–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.095>
183. Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Aznar-Cervantes S, Ros-Roca M a., Algueró MC, Atucha NM, et al. Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;2731–41.
184. Guo R, Zhang S, Xiao M, Qian F, He Z, Li D, Zhang X, Li H, Yang X, Wang M, Chai R, Tang M. Accelerating bioelectric functional development of neural stem cells by graphene coupling: Implications for neural interfacing with conductive materials. *Biomaterials.* 2016 Nov;106:193-204. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.019. Epub 2016 Aug 16.
185. Tang M, Li J, He L, Guo R, Yan X, Li D, Zhang Y, Liao M, Shao B, Hu Y, Liu Y, Tang Q, Xia L, Guo X, Chai R. Transcriptomic profiling of neural stem cell differentiation on graphene substrates. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019 Oct 1;182:110324. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.06.054. Epub 2019 Jun 25.
186. Bei HP, Yang Y, Zhang Q, Tian Y, Luo X, Yang M, Zhao X. Graphene-Based Nanocomposites for Neural Tissue Engineering. *Molecules.* 2019 Feb 13;24(4):658. doi: 10.3390/molecules24040658.
187. Moschetta M, Lee JY, Rodrigues J, Podestà A, Varvicchio O, Son J, Lee Y, Kim K, Lee GH, Benfenati F, Bramini M, Capasso A. Hydrogenated Graphene Improves Neuronal Network Maturation and Excitatory Transmission. *Adv Biol*

- (Weinh). 2021 Jan;5(1):e2000177. doi: 10.1002/adbi.202000177. Epub 2021 Jan 4.
188. Mudò G, Mäkelä J, Di Liberto V, Tselykh TV, Olivieri M, Piepponen P, Eriksson O, Mälkiä A, Bonomo A, Kairisalo M, Aguirre JA, Korhonen L, Belluardo N, Lindholm D. Transgenic expression and activation of PGC-1 α protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Apr;69(7):1153-65. doi: 10.1007/s00018-011-0850-z. Epub 2011 Oct 8.
189. Feng ZQ, Yan K, Shi C, Xu X, Wang T, Li R, Dong W, Zheng J. Neurogenic differentiation of adipose derived stem cells on graphene-based mat. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018 Sep 1;90:685-692. doi: 10.1016/j.msec.2018.05.019. Epub 2018 May 5.
190. Chu E, Chu MY, Darnowski JW, Chen ZH, Pan BC, Chu SH. Enhancement of 5-fluoro-2'-deoxyuridine antineoplastic activity by 5-benzyloxybenzyloxybenzylacetyluridine in a human colon carcinoma cell line. *Cancer Res.* 1992 Apr 1;52(7):1729-36.
191. Kalbacova M, Broz A, Kong J, Kalbac M. Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells. *Carbon.* 2010 Dec;48(15):4323-9.
192. Seo S, Yoon Y, Lee J, Park Y, Lee H. Nitrogen-Doped Partially Reduced Graphene Oxide Rewritable Nonvolatile Memory. *ACS Nano.* 2013 Apr;7(4):3607-15.
193. Sahni D, Jea A, Mata JA, Marcano DC, Sivaganesan A, Berlin JM, Tatsui CE, Sun Z, Luerssen TG, Meng S, Kent TA, Tour JM. Biocompatibility of pristine graphene for neuronal interface. *J Neurosurg Pediatr.* 2013 May;11(5):575-83. doi: 10.3171/2013.1.PEDS12374. Epub 2013 Mar 8.
194. Nair M, Nancy D, Krishnan AG, Anjusree GS, Vadukumpully S, Nair SV. Graphene oxide nanoflakes incorporated gelatin-hydroxyapatite scaffolds enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanotechnology.* 2015 Apr 24;26(16):161001. doi: 10.1088/0957-4484/26/16/161001. Epub 2015 Mar 31.
195. Syama S, Mohanan PV. Safety and biocompatibility of graphene: A new generation nanomaterial for biomedical application. *Int J Biol Macromol.* 2016 May;86:546-55. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.116. Epub 2016 Feb 2.
196. Lalwani G, Gopalan A, D'Agati M, Srinivas Sankaran J, Judex S, Qin Y-X, et al. Porous three-dimensional carbon nanotube scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2015 Mar 31;103(10):3212-25.

197. Traverso V, Kinkl N, Grimm L, Sahel J, Hicks D. Basic fibroblast and epidermal growth factors stimulate survival in adult porcine photoreceptor cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Oct;44(10):4550-8. doi: 10.1167/iovs.03-0460.
198. Miskinyte G, Devaraju K, Grønning Hansen M, Monni E, Tornero D, Woods NB, Bengzon J, Ahlenius H, Lindvall O, Kokaia Z. Direct conversion of human fibroblasts to functional excitatory cortical neurons integrating into human neural networks. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Sep 29;8(1):207. doi: 10.1186/s13287-017-0658-3.
199. Schwieger J, Warnecke A, Lenarz T, Esser KH, Scheper V. Neuronal Survival, Morphology and Outgrowth of Spiral Ganglion Neurons Using a Defined Growth Factor Combination. *PLoS One.* 2015 Aug 11;10(8):e0133680. doi: 10.1371/journal.pone.0133680.
200. Anselme K, Davidson P, Popa AM, Giazzon M, Liley M, Ploux L. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta Biomater.* 2010 Oct;6(10):3824-46. doi: 10.1016/j.actbio.2010.04.001. Epub 2010 Apr 4.
201. Aronov D, Rosen R, Ron EZ, Rosenman G. Tunable hydroxyapatite wettability: Effect on adhesion of biological molecules. *Process Biochemistry.* 2006 Dec;41(12):2367-72.
202. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. *Cell Viability Assays*. Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C, et al., editors. PubMed. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
203. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
204. Sliwka L, Wiktorska K, Suchocki P, Milczarek M, Mielczarek S, Lubelska K, et al. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PLoS One.* 2016;11(5):1-17.
205. Sviderskaya EV, Hill SP, Evans-Whipp TJ, Chin L, Orlow SJ, Easty DJ, Cheong SC, Beach D, DePinho RA, Bennett DC. p16(Ink4a) in melanocyte senescence and differentiation. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Mar 20;94(6):446-54. doi: 10.1093/jnci/94.6.446. Erratum in: *J Natl Cancer Inst* 2002 Jun 5;94(11):866.

206. Ding W, Gao S, Scott RE. Senescence represses the nuclear localization of the serum response factor and differentiation regulates its nuclear localization with lineage specificity. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 5):1011–8
207. Zakrzewska KE, Samluk A, Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Sawosz E, Chwalibog A, Pijanowska DG, Pluta KD. Analysis of the cytotoxicity of carbon-based nanoparticles, diamond and graphite, in human glioblastoma and hepatoma cell lines. *PLoS One.* 2015 Mar 27;10(3):e0122579. doi: 10.1371/journal.pone.0122579.
208. Kang Y, Liu J, Wu J, Yin Q, Liang H, Chen A, et al. Graphene oxide and reduced graphene oxide induced neural pheochromocytoma-derived PC12 cell lines apoptosis and cell cycle alterations via the ERK signaling pathways. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:5511–23.
209. Bournival J, Quessy P, Martinoli MG. Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP⁺-induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons. *Cell Mol Neurobiol.* 2009 Dec;29(8):1169-80. doi: 10.1007/s10571-009-9411-5.
210. Szmids M, Stankiewicz A, Urbańska K, Jaworski S, Kutwin M, Wierzbicki M, Grodzik M, Burzyńska B, Góra M, Chwalibog A, Sawosz E. Graphene oxide down-regulates genes of the oxidative phosphorylation complexes in a glioblastoma. *BMC Mol Biol.* 2019 Jan 3;20(1):2. doi: 10.1186/s12867-018-0119-2.
211. Zhou H, Zhang B, Zheng J, Yu M, Zhou T, Zhao K, Jia Y, Gao X, Chen C, Wei T. The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration. *Biomaterials.* 2014 Feb;35(5):1597-607. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.020. Epub 2013 Nov 28.
212. Schwartz MA, Assoian RK. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci.* 2001 Jul;114(Pt 14):2553-60. doi: 10.1242/jcs.114.14.2553.
213. Castelo-Branco G, Wagner J, Rodriguez FJ, Kele J, Sousa K, Rawal N, Pasolli HA, Fuchs E, Kitajewski J, Arenas E. Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 28;100(22):12747-52. doi: 10.1073/pnas.1534900100. Epub 2003 Oct 13. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 16;101(46):16390.
214. Schulte G, Bryja V, Rawal N, Castelo-Branco G, Sousa KM, Arenas E. Purified Wnt-5a increases differentiation of midbrain dopaminergic cells and

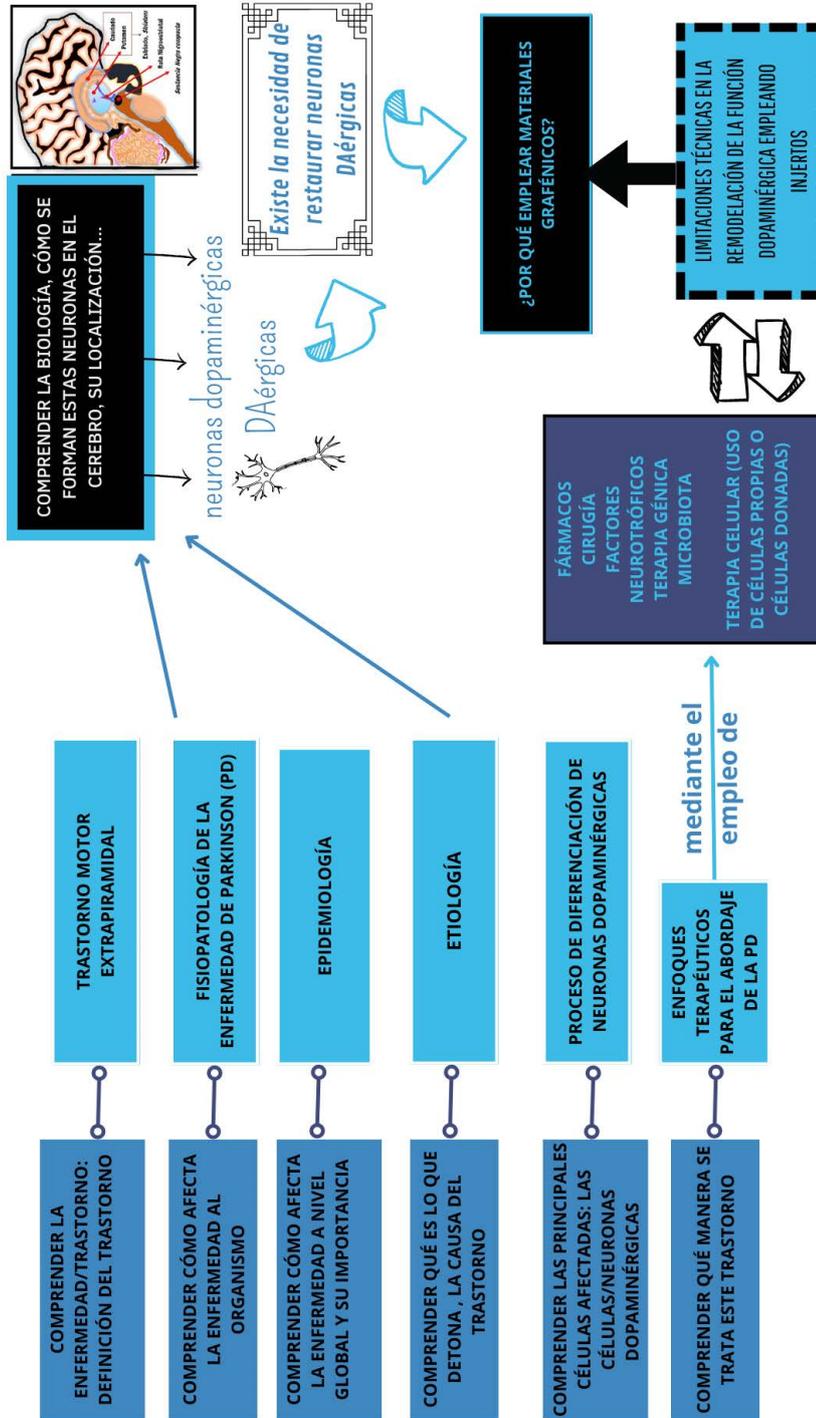


- dishevelled phosphorylation. *J Neurochem.* 2005;92(6):1550–3. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2004.03022.x>
215. Sousa KM, Villaescusa JC, Cajanek L, Ondr JK, Castelo-Branco G, Hofstra W, Bryja V, Palmberg C, Bergman T, Wainwright B, Lang RA, Arenas E. Wnt2 regulates progenitor proliferation in the developing ventral midbrain. *J Biol Chem.* 2010 Mar 5;285(10):7246-53. doi: 10.1074/jbc.M109.079822. Epub 2009 Dec 16.
216. Fournier-Thibault C, Blavet C, Jarov A, Bajanca F, Thorsteinsdóttir S, Duband JL. Sonic hedgehog regulates integrin activity, cadherin contacts, and cell polarity to orchestrate neural tube morphogenesis. *J Neurosci.* 2009 Oct 7;29(40):12506-20. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2003-09.2009.
217. Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Aznar-Cervantes S, Ros-Roca MA, Algueró MC, Atucha NM, Lozano-García AA, Moraleda JM, Cenis JL. Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2014 Dec;25(12):2731-41. doi: 10.1007/s10856-014-5293-2. Epub 2014 Aug 1.
218. Rodriguez-Losada ; Wendelbo, R ; Garcia-Fernandez, M ; Pavia, J ; Martin-Montanez, E ; Lara, JP ; Arenas, E ; Aguirre J. Graphene derivatives as scaffold for ex vivo survival and maturation of dopaminergic SN4741 cells.2014. *Acta Physiol.* 212: 69–69^a.
219. Agostini M, Romeo F, Inoue S, Niklison-Chirou M V., Elia AJ, Dinsdale D, et al. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Differ.* 2016;23(9):1502–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2016.36>.
220. Lammel T, Boisseaux P, Fernández-Cruz ML, Navas JM. Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Part Fibre Toxicol.* 2013 Jul 12;10:27. doi: 10.1186/1743-8977-10-27.
221. Szmidi M, Stankiewicz A, Urbańska K, Jaworski S, Kutwin M, Wierzbicki M, Grodzik M, Burzyńska B, Góra M, Chwalibog A, Sawosz E. Graphene oxide down-regulates genes of the oxidative phosphorylation complexes in a glioblastoma. *BMC Mol Biol.* 2019 Jan 3;20(1):2. doi: 10.1186/s12867-018-0119-2.
222. Sun J, Zhou Q, Hu X. Integrating multi-omics and regular analyses identifies the molecular responses of zebrafish brains to graphene oxide: Perspectives in environmental criteria. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019 Sep 30;180:269-279. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.05.011. Epub 2019 May 14.

223. Funes HA, Apostolova N, Alegre F, Blas-Garcia A, Alvarez A, Marti-Cabrera M, Esplugues JV. Neuronal bioenergetics and acute mitochondrial dysfunction: a clue to understanding the central nervous system side effects of efavirenz. *J Infect Dis*. 2014 Nov 1;210(9):1385-95. doi: 10.1093/infdis/jiu273. Epub 2014 May 9.
224. Desler C, Hansen TL, Frederiksen JB, Marcker ML, Singh KK, Juel Rasmussen L. Is There a Link between Mitochondrial Reserve Respiratory Capacity and Aging? *J Aging Res*. 2012;2012:192503. doi: 10.1155/2012/192503. Epub 2012 Jun 5.
225. Jahani H, Jalilian FA, Wu CY, Kaviani S, Soleimani M, Abbasi N, Ou KL, Hosseinkhani H. Controlled surface morphology and hydrophilicity of polycaprolactone toward selective differentiation of mesenchymal stem cells to neural like cells. *J Biomed Mater Res A*. 2015 May;103(5):1875-81. doi: 10.1002/jbm.a.35328. Epub 2014 Sep 24.
226. Lee YJ, Seo TH, Lee S, Jang W, Kim MJ, Sung JS. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells in response to the domain size of graphene substrates. *J Biomed Mater Res A*. 2018 Jan;106(1):43-51. doi: 10.1002/jbm.a.36215. Epub 2017 Sep 23.
227. Orecchioni M, Bedognetti D, Sgarrella F, Marincola FM, Bianco A, Delogu LG. Impact of carbon nanotubes and graphene on immune cells. *J Transl Med*. 2014 May 21;12:138. doi: 10.1186/1479-5876-12-138.
228. Nissim-Eliraz E, Zisman S, Schatz O, Ben-Arie N. Nato3 integrates with the Shh-Foxa2 transcriptional network regulating the differentiation of midbrain dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci*. 2013 Sep;51(1):13-27. doi: 10.1007/s12031-012-9939-6. Epub 2012 Dec 21.
229. Zetterström RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science*. 1997 Apr 11;276(5310):248-50. doi: 10.1126/science.276.5310.248.
230. Becher a, Drenckhahn a, Pahner I, Margittai M, Jahn R, Ahnert-Hilger G. The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J Neurosci*. 1999;19(6):1922–31.
231. Wang SX, Lu YB, Wang XX, Wang Y, Song YJ, Wang X, Nyamangerelt M. Graphene and graphene-based materials in axonal repair of spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2022 Oct;17(10):2117-2125. doi: 10.4103/1673-5374.335822.



ANEXO I

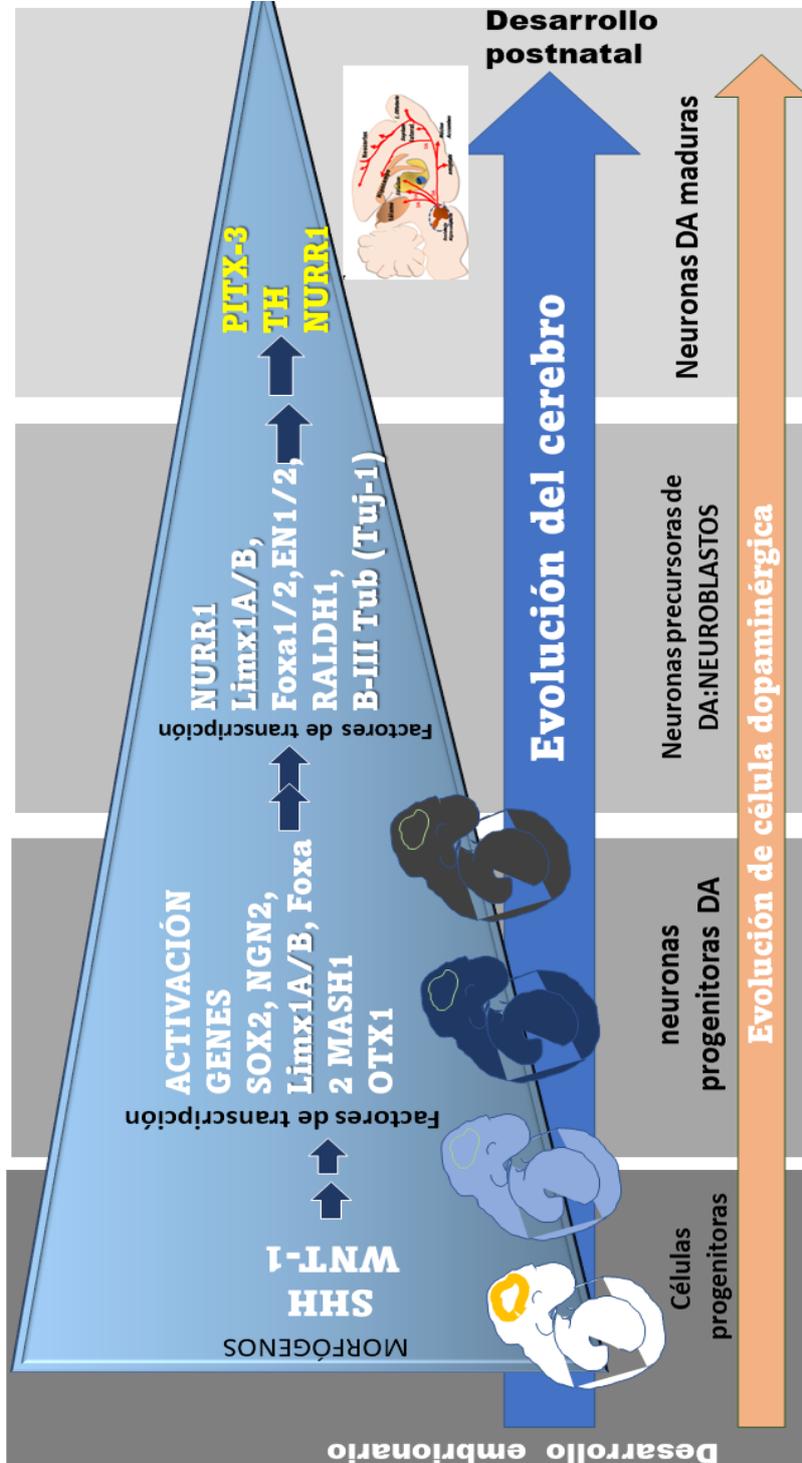


Resumen del capítulo de Introducción, enfoque didáctico. Elaboración propia.



ANEXO II

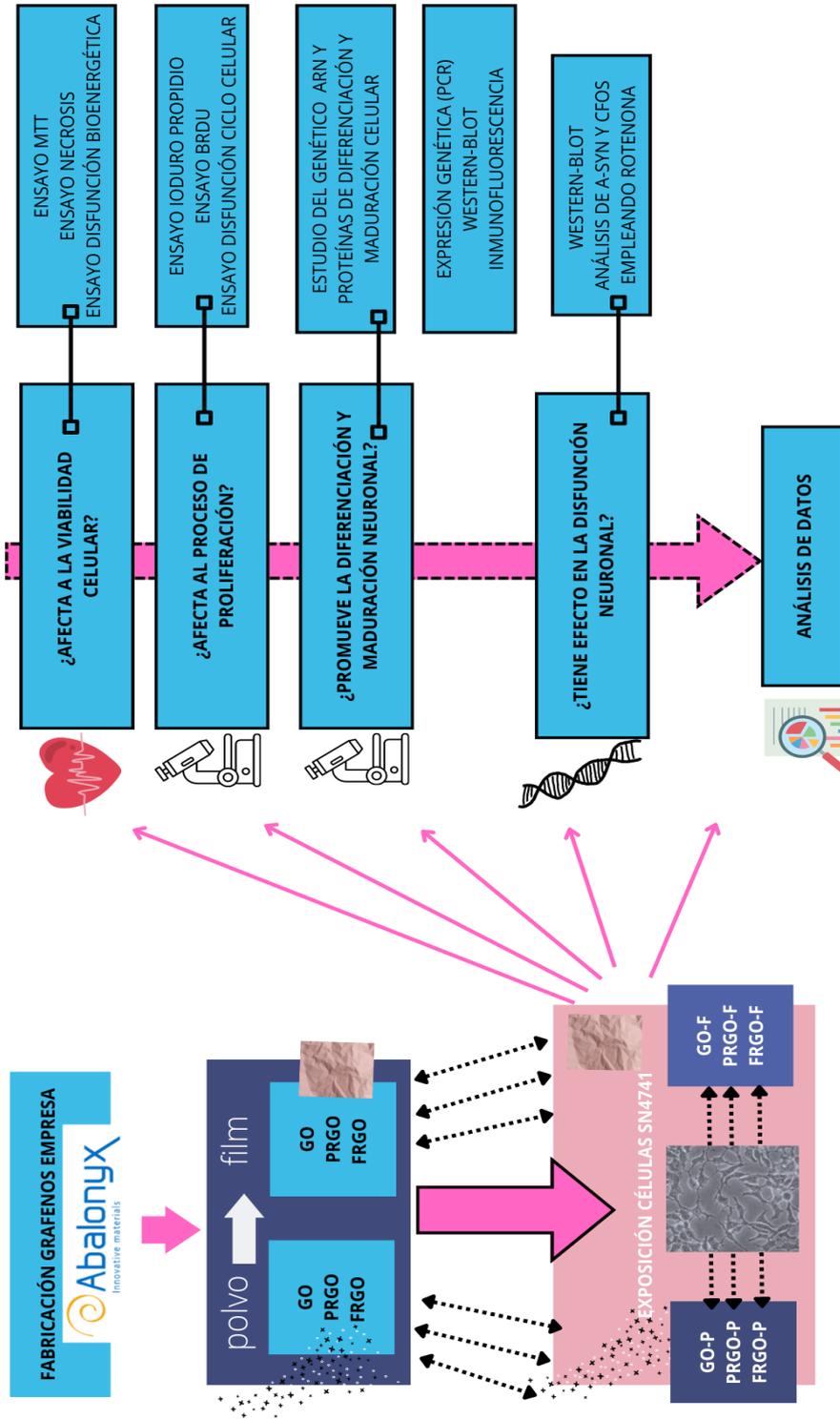
Proceso de diferenciación de las células dopaminérgicas del mesencéfalo



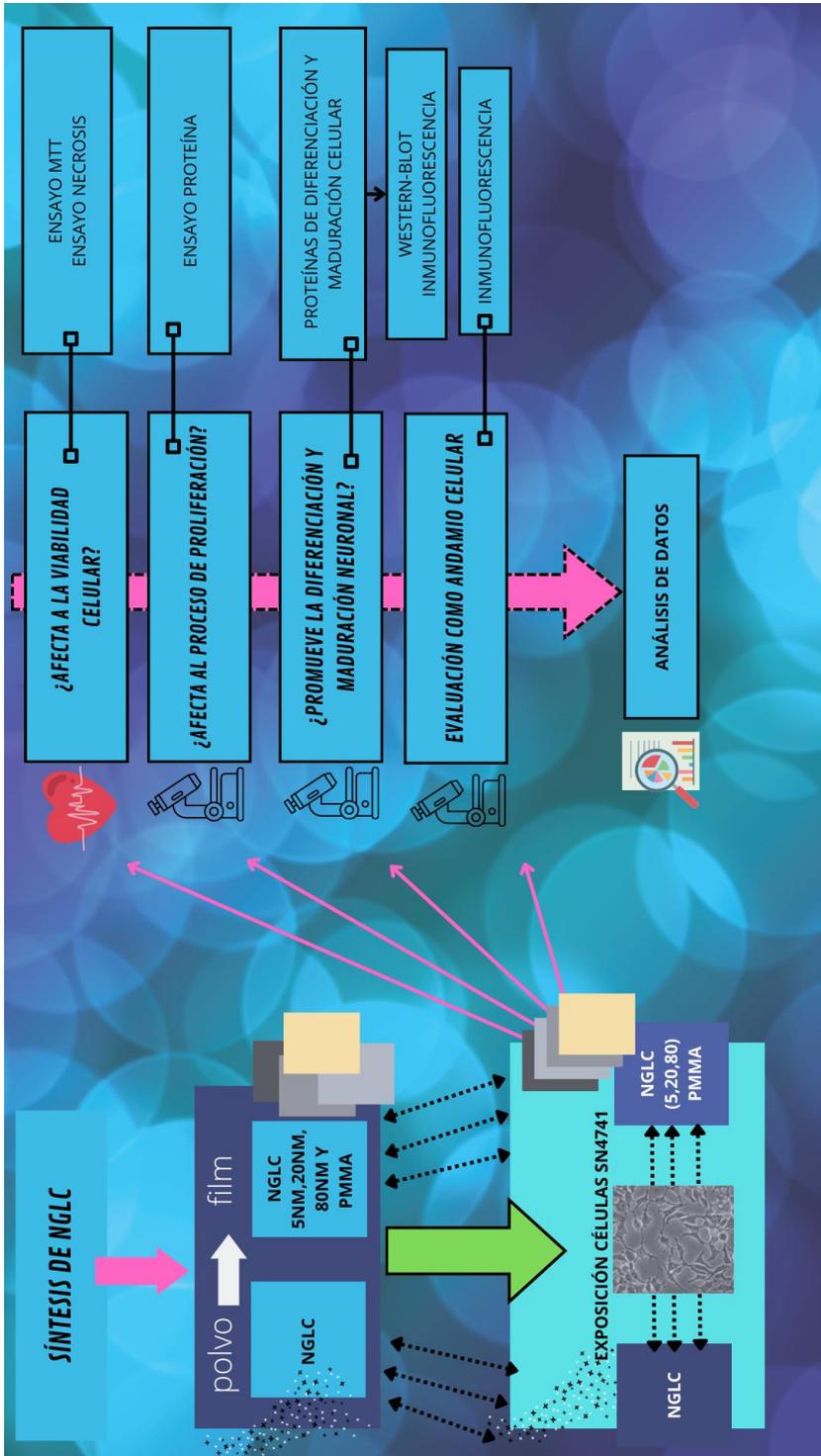
Esquema del proceso de diferenciación. Elaboración propia.



ANEXO III



Resumen del capítulo de Metodología, enfoque didáctico. Metodología empleada y descrita para el estudio de los efectos de materiales grafénicos. Elaboración propia.



Resumen del capítulo de Metodología, enfoque didáctico. Metodología empleada y descrita para el estudio de los efectos y síntesis de NGLC. Elaboración propia.



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

*Soportes celulares basados en sustratos de grafeno
para terapia celular en la enfermedad del Parkinson*

Autora: Noela Rodríguez-Losada

2023