

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

MEDICIÓN EN CÉLULAS DE CORRIENTES IÓNICAS EVOCADAS POR FOTOLIBERACIÓN DE COMPUESTOS ENJAULADOS

Sirvan, Ana Laura – LU: 1045409

Licenciatura en biotecnología

Tutor:

Filevich, Oscar, Biomed UCA-CONICET

Co-Tutor:

Prada, Federico, Universidad Argentina de la empresa

Febrero 16, 2017



UADE

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

RESUMEN

El receptor nicotínico de acetilcolina, es un canal iónico expresado tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Su ligando endógeno es la acetilcolina, pero también puede ser activado por nicotina y otros fármacos. Pertenece a la superfamilia de receptores ionotrópicos, es decir actúan muy rápidamente dejando pasar iones. Los iones que principalmente pasan por este canal son sodio y calcio los cuales, entre otras funciones, cambian el voltaje transmembrana. La forma clásica para la medición de estos movimientos iónicos es hacer electrofisiología: colocar una pipeta de vidrio sobre un receptor, aplicar su ligando y medir la corriente eléctrica producida por el paso de iones a través del canal.

Una nueva solución a este problema consiste en expresar una proteína cuya fluorescencia cambie al unirse al ion de interés, y luego medir estos cambios de fluorescencia por métodos ópticos. Este nuevo método, en el campo de la optogenética, es mucho más rápido que la electrofisiología, permite medir múltiples células a la vez tomando imágenes con una cámara y no requiere tanta habilidad manual ni entrenamiento. Sin embargo, ambas técnicas sufren de un problema común: la perturbación mecánica al aplicar ligando mueve las células en estudio, dificultando el análisis o terminando el experimento.

Los compuestos enjaulados son moléculas que pueden liberar un fragmento al absorber un fotón. La molécula “enjaulada” se encuentra inactiva. La “jaula” no tiene por sí misma actividad en el sistema en el que será usada, y la molécula enjaulada recupera su identidad original al ser liberada con luz. Esto permite aplicar fármacos en volúmenes extremadamente pequeños, con excelente precisión temporal y espacial, de un modo no invasivo, porque ya no dependen de la mecánica de la mezcla sino de la física de la luz.

En el presente trabajo amplificamos, purificamos, transfectamos y expresamos un plásmido reportero de calcio en células que expresan el receptor nicotínico de acetilcolina. Con él, obtuvimos registros ópticos del ingreso de calcio por apertura de los canales nicotínicos aplicando nicotina. Finalmente, registramos mediante imágenes la entrada de calcio ante la nicotina aplicada por ruptura de un compuesto enjaulado de nicotina.

ABSTRACT

The nicotinic acetylcholine receptor is an ion channel which is expressed both in central and peripheral nervous system. It is normally activated by acetylcholine, but can also bind nicotine and other drugs. It is classified as ionotropic, which means it acts by quickly letting ions through the membrane. Ions which mainly permeate this channel are sodium and calcium which among other things change the cell's membrane potential. The classical experimental tool for measuring these ion movements involves making electrophysiological recordings: applying a small glass pipette over a receptor, releasing ligand and measuring the electric current generated by this ion flow through the channel.

A new solution to this problem involves expressing a protein which will change its fluorescence upon binding the ion under study, and recording these changes in fluorescence by optical means, simultaneously in a whole cell population. This new method, a product of the emerging optogenetics field, yields much faster results, allows for measuring multiple cells at once by imaging with a camera, and does not require difficult manual skills or hard training. Nevertheless, both the classic and the optogenetics approach suffer from the same drawback: mechanical perturbation during drug application moves the cells under study, terminating the experiment or making resulting data very hard to analyse.

Caged compounds are molecules that can release a fragment upon light absorption. The “caged” molecule remains inactive. The “cage” has no activity by itself and upon absorption of a photon the caged molecule is released, recovering its original identity. This allows for drug application in extremely small volumes and with very high spatial and temporal precision, and in a non-invasive way, as the drug application does not rely on fluid mixing but on the physics of light.

In the present work, we amplify, purify, transfect and express a calcium reporter-encoding plasmid in cells which express the nicotinic acetylcholine receptor. With it, we obtain optical recordings of calcium flow into the cells when activating the nicotinic receptors with nicotine. Also, we record calcium flow upon nicotine release from a caged-nicotine compound.

Contenidos

Introducción.....	6
Antecedentes	8
Hipótesis.....	18
Metodología.....	19
• PASO 1: OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS REPORTEROS.....	19
• PASO 2: OBTENCIÓN DE CÉLULAS FLUORESCENTES.....	20
• PASO 3: APERTURA DE LOS CANALES NICOTÍNICOS CON NICOTÍNA. ...	22
• PASO 4: BÚSQUEDA DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA DE NICOTINA SUFICIENTE PARA CAUSAR UN AUMENTO EN LA FLUORESCENCIA. ...	23
• PASO 5: APERTURA DE LOS CANALES NICOTÍNICOS CON NICOTINA ENJAULADA.	24
Resultados	26
• PASO 1: OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS REPORTEROS.....	26
• PASO 2: OBTENCIÓN DE CÉLULAS FLUORESCENTES.....	29
• PASO 3: APERTURA DE LOS CANALES NICOTÍNICOS CON NICOTINA. ...	32
• PASO 4: BÚSQUEDA DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA DE NICOTINA SUFICIENTE PARA CAUSAR UN AUMENTO EN LA FLUORESCENCIA. ...	34
• PASO 5: APERTURA DE LOS CANALES NICOTÍNICOS CON NICOTINA ENJAULADA.	38
Discusión de resultados	42
Conclusión.....	43
ANEXOS.....	44
• ANEXO I – Composición medios de cultivo y soluciones.	44
• ANEXO II – Mapa plásmidos RGECO y GCaMP 6.	45

MEDICIÓN EN CÉLULAS DE CORRIENTES IÓNICAS EVOCADAS POR
FOTOLIBERACIÓN DE COMPUESTOS ENJAULADOS Sirvan, Ana Laura

- ANEXO III – Preparación células electrocompetentes 47
- ANEXO IV – Protocolo de electroporación..... 47
- ANEXO V – Protocolo de sembrado 47
- ANEXO VI – Protocolo lipofectamina 2000 48
- Bibliografía..... 49

Introducción

En el presente trabajo amplificamos, purificamos y transfectamos un plásmido que codifica para una proteína reportera de calcio en células que expresan el receptor nicotínico de acetilcolina. Para poder medir variaciones de calcio intracelular aplicamos un ligando del receptor y cuantificamos el cambio de fluorescencia. En este trabajo se aplicará nicotina o fotoliberando nicotina enjaulada.

Los objetivos de este trabajo son:

- Objetivo general de este trabajo es medir la respuesta celular ante la aplicación de fármacos mediante la técnica de fotoliberación de compuestos enjaulados.
- Objetivo específico es medir la respuesta celular ante la aplicación de nicotina enjaulada por la técnica de fotoliberación.

Para cumplir con estos objetivos, fuimos por pasos:

- Paso 1: obtención, amplificación y purificación del plásmido reportero.
- Paso 2: transfección de línea celular con el plásmido obtenido.
- Paso 3: aplicación de nicotina sobre el cultivo celular y realizar un registro del efecto para posterior análisis.
- Paso 4: Búsqueda de la concentración mínima de nicotina suficiente para causar un aumento en la fluorescencia.
- Paso 5: fotoliberación de nicotina enjaulada sobre el cultivo celular.

La relevancia de esta tesis consiste en permitirnos comprender el funcionamiento de las células en escala nanoscópica: cantidades de droga ínfimas en volúmenes menores al de una célula, sin intervención mecánica. Esto es especialmente importante en neuronas y el sistema nervioso en general, donde la misma droga aplicada en distintos lugares resulta en efectos totalmente no-relacionados. Una aplicación posible de esta tecnología es el tratamiento de disfunciones cerebrales, debidas a la deficiencia de un neurotransmisor. Uno puede imaginarse un sistema de fotoliberación “in vivo” en el cual la droga se administra

sistémicamente, pero, mediante una fibra óptica o un LED implantado, sólo es fotoliberada en el momento en que es necesaria, y sólo en un pequeño conjunto de neuronas deficientes en un neurotransmisor en particular.

Antecedentes

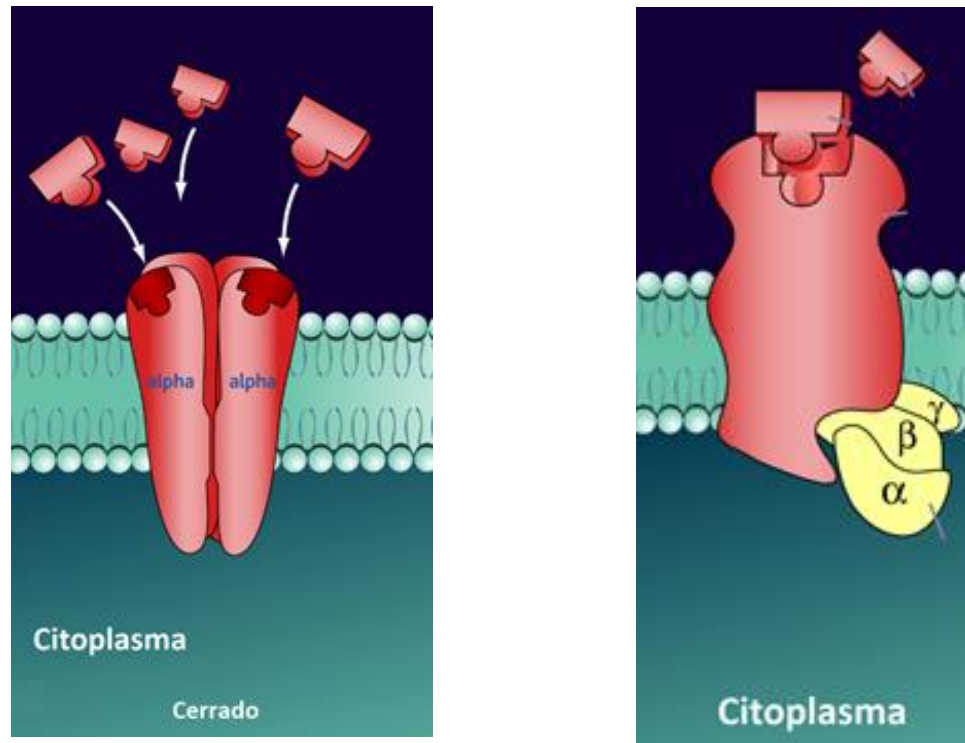


Figura 1: Izquierda: receptor nicotínico de acetilcolina. Derecha: receptor muscarínico de acetilcolina.

El **receptor de acetilcolina** es una proteína integral de membrana que responde a la unión del neurotransmisor acetilcolina. Existen dos tipos de receptores colinérgicos (Figura 1): el receptor nicotínico de acetilcolina y el receptor muscarínico de acetilcolina. Estos receptores poseen dos diferencias principales. La primera diferencia es que cada uno posee un ligando específico que lo activa y que le da el nombre al receptor. En el caso del receptor nicotínico, la nicotina, la cual no activa al receptor muscarínico. Y en el caso del muscarínico, la muscarina, que no activa al receptor nicotínico. La segunda diferencia es la familia a la cual pertenecen los receptores. El receptor nicotínico pertenece a la familia de receptores ionotrópicos, es decir receptores asociados a canales iónicos, los cuales poseen una activación rápida ya que al unirse el ligando se produce la apertura del canal y el paso de iones en un tiempo corto (milisegundos). En cambio, el receptor muscarínico pertenece a la

familia de los receptores metabotrópicos, estos poseen menor velocidad de transducción de señal ya que al unirse el ligando el receptor activa a una proteína, la cual fosforila y activa segundos mensajeros lo cual requiere tiempos más largos. En este trabajo nos centraremos en el receptor nicotínico de acetilcolina.

El **receptor nicotínico de acetilcolina** (nAChR), es expresado tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. El canal se encuentra en alta concentración en la sinapsis neuromuscular, transmitiendo rápidamente señales electroquímicas desde la terminal del nervio hasta la hendidura sináptica, en respuesta a la liberación de acetilcolina¹.

Participa en muchos procesos como la contracción muscular, generación de electricidad en por ejemplo *Torpedo marmorata* (Raya eléctrica jaspeada) y se encuentra relacionado al control de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α ¹. Es el canal iónico activado por ligando mejor caracterizado, por lo tanto, en el laboratorio se lo utiliza como modelo de otros receptores de similares características.

Para comprender su funcionamiento, podemos dividir al receptor en tres zonas, una zona extracelular en donde interactúa con el ligando, una zona intracelular pequeña y un poro central definido por cinco subunidades. Las cinco subunidades conocidas para el receptor nicotínico son α , β , γ , δ y ϵ . El receptor nicotínico se divide en dos subtipos. El subtipo muscular, expresado en la unión neuromuscular, puede estar conformado: como la forma embrionaria, compuesto por las proteínas $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , y γ o como la forma adulta compuesto por las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , y ϵ , en ambos casos en relación 2:1:1:1. El subtipo neuronal puede ser homopentámero o heteropentámero, algunos ejemplos de conformación son el $(\alpha 7)_5$ (cinco subunidades de $\alpha 7$), $(\alpha 10)_5$ o $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$.² (Figura 2)

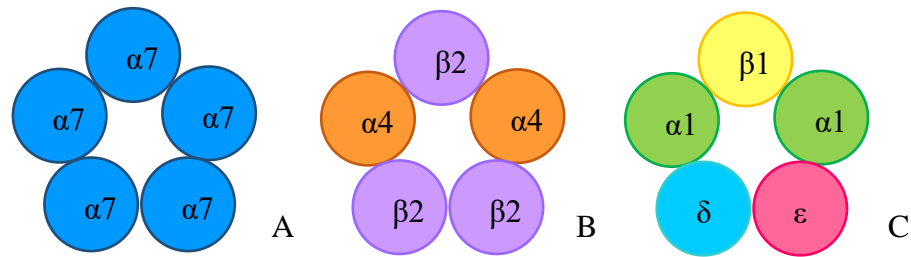


Figura 2: Receptores nicotínicos de acetilcolina. A) Receptor de subtipo neuronal homopentamérico $\alpha 7$. B) Receptor de subtipo neuronal heteropentamérico $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$. C) Receptor de subtipo muscular de adulto $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , y ϵ .

El receptor nicotínico es activado por:

- Ligandos agonistas, los cuales favorecen la actividad del receptor; por ejemplo, acetilcolina, nicotina y colina.

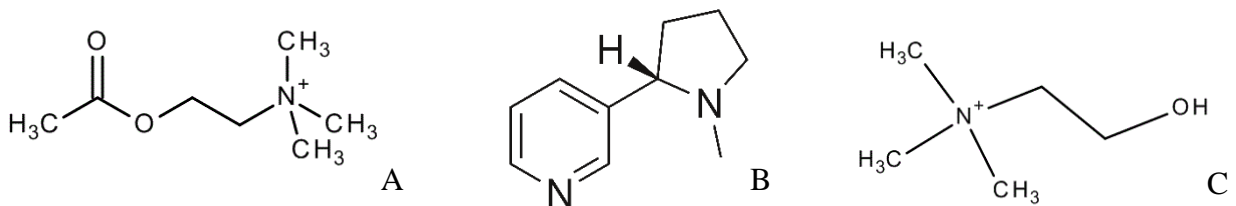


Figura 3: A) Acetilcolina. B) Nicotina. C) Colina.

- Ligandos antagonistas, los cuales desfavorecen la actividad del receptor, el más usado es la α -bungarotoxina.

Al unirse la acetilcolina, u otro ligando agonista, se genera un cambio conformacional en la proteína que permite el flujo de cationes, principalmente sodio y calcio. Tanto el ingreso de sodio como el de calcio produce la depolarización de la membrana

provocando un potencial postsináptico excitatorio. Además, el ingreso de calcio, entre otras cosas, puede actuar liberando neurotransmisores, recuperando al receptor nicotínico de la desensibilización vía cascada de señalización y puede activar un mecanismo de neuroprotección vía modulación de la expresión de genes³.

Los receptores poseen tres estados fundamentales abierto, inactivado (desensibilizado) o cerrado (Figura 4). El estado abierto ocurre cuando un ligando agonista, como la acetilcolina o la nicotina, se une; esto provoca la apertura del canal. Luego de unos 20 milisegundos de presencia continuada del ligando, el receptor puede pasar al estado inactivado (se desensibiliza). Este estado es resultado de un cambio conformacional que impide el flujo de iones, a pesar de poseer el ligando unido. En el caso del receptor nicotínico, por ejemplo, a pesar de encontrarse unida la nicotina el receptor no permite pasar iones. Por lo general la acetilcolina, o el ligando activador que se encuentre en ese momento, se suele hidrolizar con rapidez cerrándose el canal en aproximadamente 1 milisegundo, antes de que ocurra una desensibilización importante⁴.

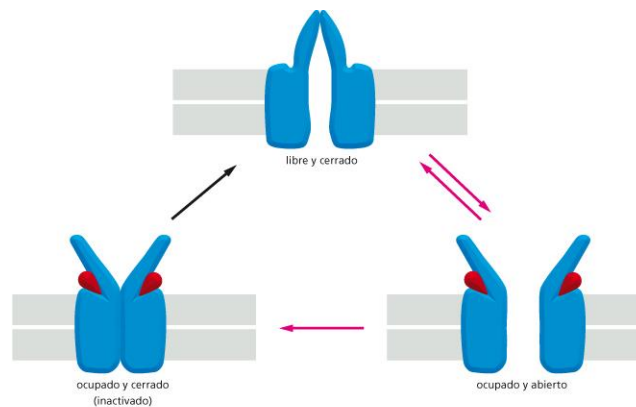


Figura 11-37 Biología molecular de la célula, quinta edición
(© Garland Science 2008 y Ediciones Omega 2010)

Figura 4: Posibles estados conformacionales del receptor acetilcolínico.

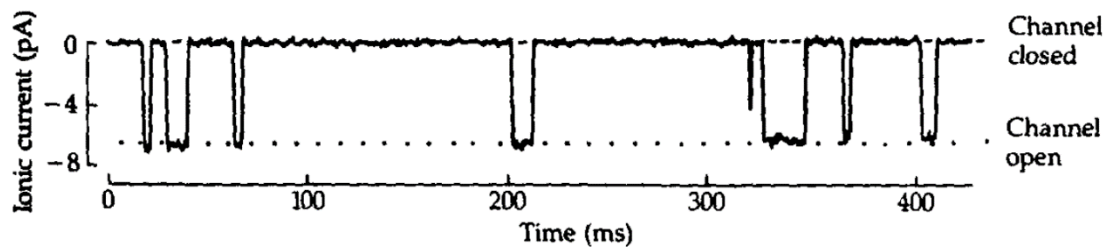


Figura 5: Registro de canal único.

En esta figura se puede observar la aparición de corrientes iónicas al abrirse el canal iónico. La membrana a la cual se le realizó la medición eléctrica se bañó de ambos lados con una solución salina. Se agregó 300 nM de acetilcolina en la cara extracelular de la membrana provocando la apertura ocasional del canal. Luego, se le aplicó un potencial de membrana de -140 mV. Pequeñas corrientes iónicas pasan cada vez que se abre el canal. En cada apertura del canal pasan aproximadamente $4,1 \times 10^7$ iones por segundo a una temperatura de 23°C. Y el canal se encuentra abierto solo por unos milisegundos. Estos iones generan corrientes eléctricas en la membrana causando las corrientes medidas en este gráfico⁵.

En 1999 es creada la línea celular CHO-K1/A5 por el doctor Francisco Barrantes y equipo. Esta línea celular expresa las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, δ y ϵ en relación 2:1:1:1 del receptor nicotínico muscular de adulto. La línea fue desarrollada como control en un trabajo que demostró que la deficiencia en esfingomiélin, un lípido de membrana, provoca una disminución en la cantidad de AChR expresado en membrana⁶.

En este trabajo estudiaremos el comportamiento del receptor nicotínico muscular expresado por la línea CHO-K1/A5 frente a la nicotina libre y a la nicotina enjaulada.

El patch clamp es la forma clásica de medir cambios en la corriente iónica de una célula. Actualmente se desarrollaron otras herramientas para observar estos cambios.

Los indicadores de calcio genéticamente codificados o GECIs por sus siglas en inglés, son herramientas optogenéticas muy utilizadas actualmente dentro de la neurobiología ya que permiten observar cambios en las concentraciones de calcio intracelular, un mensajero relacionado a múltiples funciones,⁷ utilizando métodos ópticos de detección de fluorescencia. Son simples de usar ya que no requieren una gran habilidad técnica y permiten observar poblaciones enteras de células a la misma vez. Estos indicadores sólo requieren la transfección de un plásmido que codifique para la proteína reportera y la luz pertinente para excitarla.

Existen dos tipos de GECIs:

- El tipo Cameleon, que se basan en FRET, está construídos mediante una fusión de una mutante de GFP que emite en azul, calmodulina (una proteína que une calcio), un péptido M13 el cual une calmodulina y una GFP mejorada que emite en verde o amarillo. Al unirse calcio la calmodulina se envuelve en el péptido M13 aumentando la eficiencia de transferencia de energía de tipo Förster (FRET) entre las GFPs, y cambiando la señal fluorescente⁸.

- El tipo GCaMP está construido con una única proteína fluorescente fusionada al extremo N- terminal del péptido M13; en el extremo C-terminal del mismo péptido se encuentra unida calmodulina. Al unirse calcio la calmodulina interacciona con el péptido M13 modificando el entorno del cromóforo de la proteína fluorescente provocando una variación de la fluorescencia⁹ (Figura 6).¹⁰

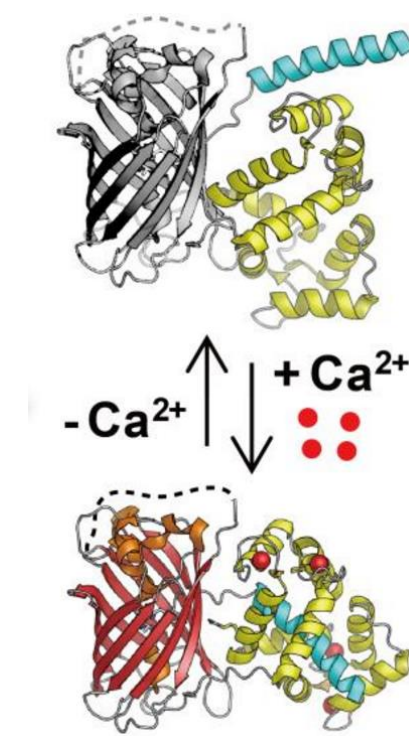


Figura 6: Modelo de una proteína de tipo GCaMP. En amarillo dominio de la calmodulina; en gris/rojo dominio de la proteína fluorescente; en celeste péptido M13.¹¹

En 2011 en el laboratorio de Robert Campbell es creada una serie de indicadores de calcio genéticamente codificados para imágenes ópticas o GECOs, según su sigla en inglés, a partir de mutaciones generadas aleatoriamente en GCaMP3¹², una versión mejorada del sensor GCaMP original¹³. Uno de los GECOs obtenidos es RGECO, una proteína de tipo GCaMP que al unir calcio aumenta su fluorescencia. La principal diferencia entre RGECO y GCaMP3 es que en vez de emitir con un máximo en aproximadamente 520 nm (verde) emite con un máximo en aproximadamente 600 nm (rojo, Figura 7). La ventaja de obtener una paleta extendida de indicadores de calcio

genéticamente codificados es que permite, usando dos GECIs con propiedades espectrales diferentes, sensor calcio en dos compartimientos distintos, por ejemplo, calcio mitocondrial y calcio somático o, por ejemplo, sensor calcio en dos poblaciones de células como neuronas y astrocitos, al mismo tiempo¹⁴.

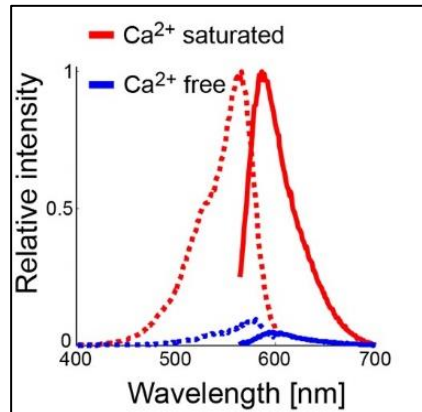


Figura 7: Espectro de absorción y emisión de RGECO, en azul sin calcio unido, en rojo con calcio unido.

En este trabajo se utilizará RGECO para la medición de las variaciones de calcio intracelular producto de la aplicación de los tratamientos.

La fotólisis o fotoliberación es la ruptura de un enlace químico como resultado de la absorción de un fotón de la luz.

Compuestos de coordinación o "compuestos complejos", consisten esencialmente en un ion complejo y un contraion¹⁵. Existen múltiples y diversas aplicaciones para estos complejos, por ejemplo, para ver temperaturas en ensayos biológicos y bioquímicos¹⁶ o como parte de celdas solares¹⁷.

Los **compuestos enjaulados** son complejos que pueden liberar una molécula o fragmento, al absorber un fotón. La molécula al encontrarse unida se encuentra inactiva. El grupo protector no tiene por sí mismo actividad en el sistema en el que será usado, y la molécula inactivada/enjaulado recupera su identidad original al ser fotoliberada. Esto permite liberar moléculas en volúmenes extremadamente pequeños, con excelente precisión temporal y espacial, de un modo no invasivo, porque ya no dependen de la mecánica de la mezcla sino de la física de la luz.

A finales de los 70s con la creación del ATP enjaulado¹⁸, se comienzan a utilizar los compuestos enjaulados como una nueva herramienta dentro de los laboratorios. Se enjaularon múltiples biomoléculas incluyendo neurotransmisores, pero estos compuestos requerían equipos de óptica costosos y la fotoliberación se realizaba con luz UV por lo tanto provocaba daño a las células en estudio.

Los complejos de rutenio son utilizados como un componente en celdas solares, convirtiendo la energía de la luz solar en energía potencial, provocando la excitación de electrones, que pasan a través de un material conductor generando una corriente eléctrica. El problema es que, en los primeros complejos de rutenio utilizados para estas celdas, se encontró que a veces el rutenio captaba fotones y en vez de convertirlos en energía potencial, liberaba su ligando (fotoliberación), destruyendo la especie química fotoconversora y provocando que la celda dejara de funcionar. Esto actualmente se está mejorando^{19 20 21}. Sin embargo, en 2002 en el laboratorio del doctor Roberto Etchenique (INQUIMAE, FCEN, UBA), se aprovecha esta propiedad no deseada de los complejos de rutenio y se desarrolla unos nuevos complejos enjaulados. Estos son fotoliberados con luz visible. El primer compuesto que se enjaula con esta nueva técnica es la 4 aminopiridina (4AP), un bloqueante de canales de potasio²². A partir de este momento se comienzan a sintetizar enjaulados de

MEDICIÓN EN CÉLULAS DE CORRIENTES IÓNICAS EVOCADAS POR FOTOLIBERACIÓN DE COMPUESTOS ENJAULADOS Sirvan, Ana Laura

diversos neurotransmisores, como, por ejemplo, en 2005, GABA, triptamina, serotonina entre otros²³.

En 2010 se sintetizó, por el doctor Oscar Filevich y equipo, también en el laboratorio del doctor Roberto Etchenique, por primera vez el enjaulado de nicotina y se lo caracterizó²⁴.

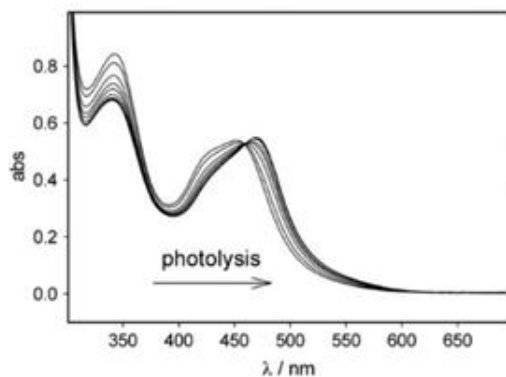


Figura 8: Fotólisis de RubiNico.

En la figura se 8 observa el espectro de absorción de RuBiNico, encontrándose el pico de mayor fotólisis alrededor de 470 nm (azul).

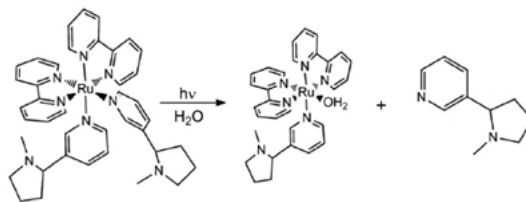


Figura 9: Estructura de RubiNico y sus productos de fotólisis.

En el presente trabajo, se combinará el uso de la línea celular que expresa el receptor nicotínico muscular, con el enjaulado de nicotina y técnicas ópticas de medición de calcio intracelular para acercarnos al estudio del efecto de moléculas efectoras (de ligandos como nicotina) sobre células únicas, o sobre partes de las mismas.

Hipótesis

Al aplicar luz azul, se fotoliberará nicotina del compuesto enjaulado, provocando la unión al receptor nicotínico de acetilcolina y apertura del canal; observándose un aumento en la fluorescencia de la proteína reportera RGECO en las células CHO-K1/A5 provocada por el ingreso de calcio al interior de la célula.

Metodología

El ensayo último de este trabajo consiste, por lo previamente expuesto, en cultivar células CHO-K1/A5 a partir del stock en -80°C , transfectarlas con un plásmido que codifica para una proteína reportera, indicadora de Ca^{2+} . Luego, verificar la expresión del plásmido y la emisión de fluorescencia. Comprobar aumentos en esta fluorescencia con tratamientos que provocan el incremento de Ca^{2+} intracelular. Después, fotoliberar nicotina y medir el cambio en la fluorescencia de la proteína reportera.

PASO 1: OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS REPORTEROS.

- Obtención de los plásmidos reporteros

Los plásmidos reporteros RGECO y GCaMP6 fueron enviados por correo en un papel desde el laboratorio del doctor Rafael Yuste (HHMI, Columbia University, NY). Cada papel contenía 3 μg de DNA. Para su recuperación se recortó una pequeña sección del papel y se la lavó con 20 μL de agua miliQ.

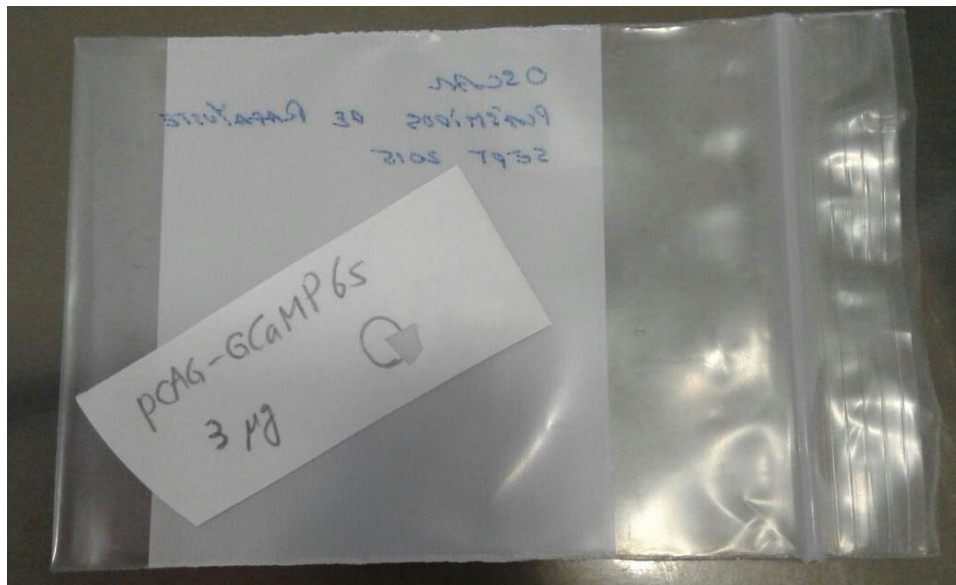


Figura 10: Papel con DNA plasmídico.

▪ Amplificación del plásmido reportero

Para la amplificación de los plásmidos reporteros, se realizó una transformación en bacterias competentes *Escherichia coli* DH5 α ya que los mismos poseen origen de replicación bacteriano. Se utilizaron los productos del lavado de los papeles del punto anterior y se realizó la transformación utilizando la técnica de electroporación debido a que es una forma rápida y económica de transfectar. La electroporación consiste en someter una suspensión de células y el plásmido de interés a un campo eléctrico intenso durante unos milisegundos. Esto permite el ingreso del DNA a la célula y su expresión transiente. (Ver Anexos II, III y IV)

Con las bacterias electroporadas, se procedió a la recuperación de las mismas en un Eppendorf con 1 ml de medio LB (Anexo I) durante media hora a 37°C. Luego se plaqueó el contenido del Eppendorf en placa de Petri de 9mm con LB Agar y Ampicilina a concentración 100 μ g/mL.

▪ Purificación de los plásmidos

Para la purificación de los plásmidos se utilizó el kit de midiprep para plásmidos de Qiagen. Se corrió un gel para ver que no hubiese contaminación con ADN genómico, para eso se eligieron dos enzimas de corte único, HpaI y ScaI. Estas enzimas se eligieron ya que están presentes en ambos plásmidos y liberaban fragmentos capaces de ser separados por un gel. Para RGECO se libera un fragmento de 3519 pb y otro de 3338 pb; para GCamp6 uno de 3535 pb y otro de 3401 pb.

En nanodrop se cuantificó y se midió la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm para ver que no hubiese contaminación con proteína.

PASO 2: OBTENCIÓN DE CÉLULAS FLUORESCENTES.

▪ Crecimiento y mantenimiento de la línea celular

Para el crecimiento y mantenimiento de la línea celular CHO-K1/A5, se utilizó medio HAM'S F12 con 10% de SFB. Primero se realizó crecimiento de la línea en botellas, durante 24 a 48 horas en estufa a 37°C con 5% de CO₂, y luego se sembraron (Anexo V) en vidrios de 12 mm en multiwell de 24 wells a una densidad celular de 1x10⁴, el crecimiento también fue realizado en estufa.

▪ Elección plásmido reportero

Antes de realizar la transfección se eligió a RGECO como plásmido reportero ya que como se puede observar en la figura 11, el espectro de absorción de GCaMP6 se superpone en gran medida con el espectro de RuBiNico. En cambio, la superposición de los espectros de RGECO y RuBiNico es menor, esto permite tener más fotones que exciten a RGECO sin fotoliberar a RuBiNico; por lo tanto, utilizar RGECO no afectaría significativamente el resultado y nos permitiría medir la variación de calcio.

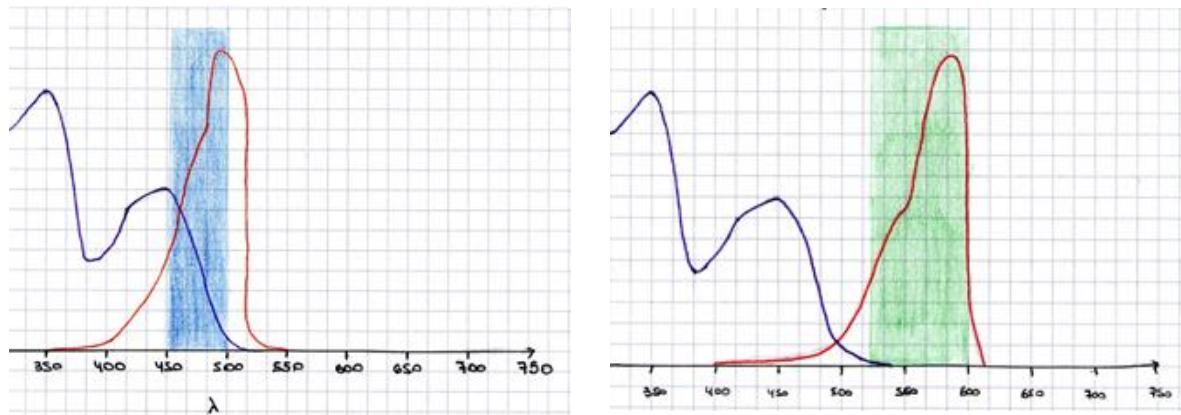


Figura 11: Izquierda en violeta espectro de absorción de RuBiNico y en Naranja el de GCaMP6; la columna azul corresponde a las longitudes de onda que deja pasar el cubo de filtros que se debería utilizar para excitar a GCaMP6.

Derecha en violeta espectro de absorción de RuBiNico y en rojo de RGECO; la columna verde corresponde a las longitudes de onda que deja pasar el cubo de filtros que se debería utilizar para excitar a RGECO.

▪ Visualización de fluorescencia.

El equipo de microscopía utilizado es un Nikon ECLIPSE TE300 invertido, equipado con una cámara Hamamatsu Orca ER de tipo CCD y una lámpara de mercurio.

El microscopio posee un sistema de lentes muy compacto que guía la luz desde la lámpara atravesando un riel de cubos de filtros, que excitan en verde o azul la muestra, hasta la torre de objetivos.

Para la visualización de la fluorescencia se utilizó un cubo de filtros equipado en el microscopio que permite pasar solamente longitudes de onda en verde desde la lámpara de

mercurio para la excitación de la muestra y solo permite pasar longitudes de onda en el espectro de los rojos, emitidas por la muestra, hacia el ocular.

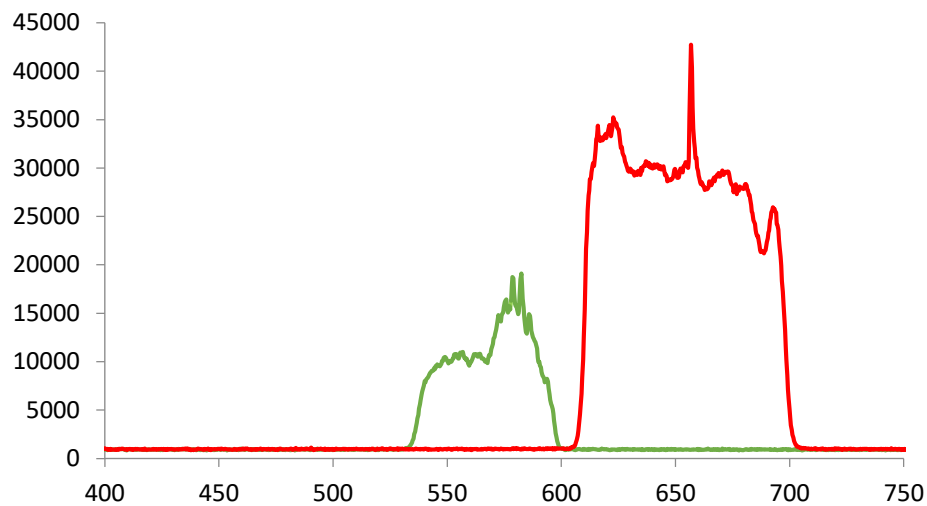


Figura 12: Transmitancia versus longitud de onda. En verde longitudes de onda que pasan por el cubo excitando la muestra y en rojo longitudes de onda que pasan por el cubo desde la muestra hacia el ocular (emisión de la muestra).

- Transfección de células CHO

Para la transfección se utilizó lipofectamina 2000. La transfección con lipofectamina consiste en mezclar el material genético con la solución de lipofectamina 2000, la cual contiene subunidades de lípidos que pueden formar liposomas encapsulando el DNA. Debido a la carga que posee el liposoma se cree que puede fusionarse con la membrana de la célula introduciendo así el material genético deseado. (Anexo VI).

PASO 3: APERTURA DE LOS CANALES NICOTÍNICOS CON NICOTÍNA.

- Ensayo nicotina

Este ensayo se realizó sobre células transfectadas con el plásmido reportero, las cuales se lavaron con HBSS sin calcio y se sustituyó el medio por una solución alta en calcio, concentración 8 mM (Anexo I). Luego, mientras se realizaba una toma de imágenes bajo

microscopía de fluorescencia, se aplicaron 200 μ L de nicotina en HBSS con concentración 10 mM. Las fotos fueron tomadas con un tiempo de exposición 200 ms, 3 s lapso entre fotos durante 5 min; estos parámetros se mantendrán para todos los ensayos a menos que se diga lo contrario.

A pesar de que la concentración fisiológica de Ca^{2+} extracelular es de 1,5 mM, se optó por aumentar la concentración en nuestra solución de ensayo para acentuar el aumento de fluorescencia.

- Control negativo aumento de la fluorescencia

Este control se realizó para ver que efectivamente no se producía un aumento de la fluorescencia de la proteína reportera si no había iones Ca^{2+} ingresando a la célula. Para realizarlo se utilizaron CHO-K1/A5 transfectadas con el plásmido reportero, las cuales se lavaron con HBSS sin calcio y, mientras se realizaba la toma de imágenes, se aplicaron 200 μ L de nicotina en HBSS 10 mM.

PASO 4: BÚSQUEDA DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA DE NICOTINA SUFICIENTE PARA CAUSAR UN AUMENTO EN LA FLUORESCENCIA.

Este ensayo se realizó para saber cuál es la mínima concentración de nicotina que logra abrir al receptor nicotínico, causando un aumento en la fluorescencia. Debido a que en la síntesis de nicotina enjaulada a veces resulta un porcentaje de nicotina sin enjaular, al usar la mínima cantidad que dé efecto observable, la nicotina libre disminuiría a valores que no afectarían al resultado.

Para esta prueba se retiró el medio HAM'S F12 en el que crecían las células, se las lavó con HBSS sin Ca^{2+} y se las bañó en una solución alta en calcio. Luego, mientras se tomaba una sucesión de fotos bajo microscopía de fluorescencia, se retiró el buffer en el que se encontraban las células y se agregaron 200 μ L de una solución de nicotina diluida en una solución alta en calcio. Las concentraciones de nicotina ensayadas fueron 100 μ M; 20 μ M; 10 μ M; 4 μ M.

PASO 5: APERTURA DE LOS CANALES NICOTÍNICOS CON NICOTINA ENJAULADA.

▪ Preparación de la nicotina enjaulada

El compuesto enjaulado fue sintetizado por el tutor de esta tesis. Posee un peso molecular de 808,81 g/mol. El compuesto luego de la síntesis es liofilizado, en este estado no es fotosensible, pero es importante mantenerlo seco ya que con la humedad ambiente alcanza para hidratar al compuesto y liberar la nicotina enjaulada, por eso se lo mantiene en un frasco con parafilm.

Para los ensayos se generó una solución madre de nicotina enjaulada a concentración 100 mM, pesando y diluyendo el compuesto en agua miliQ. Las diluciones de la solución madre fueron realizadas con la solución alta en calcio. Todo este trabajo fue ejecutado en un cuarto oscuro para evitar la fotólisis, a modo de luz se utilizó un LED rojo el cual no fotolisa el compuesto.

▪ Ensayo apertura de los canales nicotínicos con nicotina enjaulada

Para este ensayo se utilizaron las células CHO-K1/A5 transfectadas con el plásmido reportero, las cuales se lavaron con HBSS sin calcio y se las mantuvo en la solución alta en calcio. Luego, mientras se tomaba una secuencia de fotos bajo microscopía de fluorescencia, se retiró la solución y se agregó la solución de nicotina enjaulada a 20 μ M; pasadas unas 20 fotos se aplicó luz con un LED de 450 nm durante 3 s. Se eligió este LED ya que es el más cercano a 470 nm (longitud de onda con la mayor eficiencia de fotólisis).

En este ensayo la secuencia de fotos duró 10 min.

▪ Control negativo de la jaula

Los productos de fotólisis del compuesto enjaulado son nicotina, por un lado, y $[\text{Ru}(\text{Bpy})_2\text{Nicotina-H}_2\text{O}]$ por el otro. Uno podría pensar que el efecto observado luego de la exposición del preparado a luz de fotólisis se debe, no a la nicotina fotoliberada, sino, a la “jaula fotoliberada”. Por ello, se utilizó $[\text{Ru}(\text{Bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, “jaula”, para ver que esta no provocara ningún efecto sobre la fluorescencia de las células.

Para este ensayo se utilizaron células transfectadas con el plásmido reportero, las cuales se lavaron con HBSS sin calcio, y se las colocó en la solución alta en calcio. Luego,

se procedió a la toma de imágenes bajo microscopía de fluorescencia mientras se les agregó una solución con la jaula y se les aplicó luz LED de 450 nm.

- Análisis de las imágenes

Todas las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ²⁵.

Primero se generó un stack con todas las imágenes obtenidas en el ensayo. Luego se delimitó una zona de interés y se midió la intensidad de luz de los píxeles. Se calculó el valor de la media de este conjunto de datos y se les restó el valor de media del fondo. Se graficó el cambio de fluorescencia ($\Delta F/F_0$).

Resultados

PASO 1: OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS REPORTEROS

- Amplificación de los plásmidos

La electroporación dio como resultado *E. coli* transformadas figura 13.

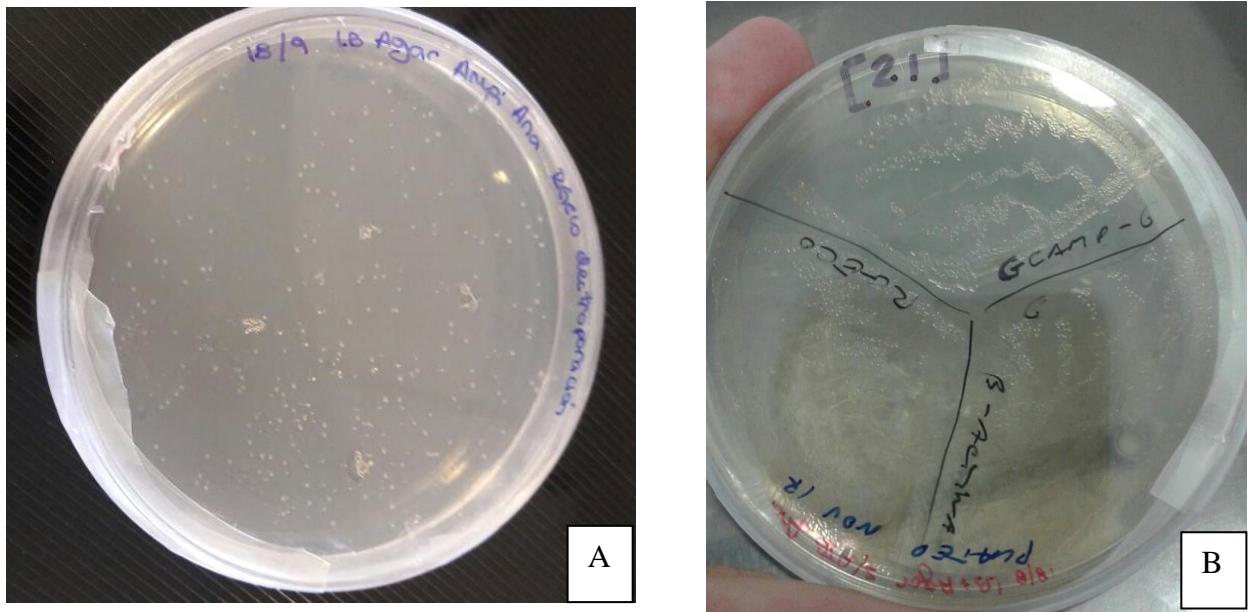


Figura 13: A) *E. coli* transformadas con plásmido RGECO. B) *E. coli* transformadas con plásmido GCaMP6.

Debido a que el plásmido posee un gen de resistencia a ampicilina y el agar posee ampicilina, al ver crecimiento deducimos que las bacterias efectivamente se encuentran transformadas.

- Purificación de los plásmidos

La primera purificación arrojó los valores de concentración de la tabla 1:

Id plásmido	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
RGECO	0,033 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
GCaMP6	0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tabla 1: Concentración plásmidos RGECO y GCaMP6, medidos con nanodrop.

Relación 260/280:

RGECO = 1,178

GCaMP6 = 1,636

Aproximadamente 1,8 es el valor aceptado para considerar el ADN puro.

Esta purificación posee concentraciones muy bajas y la posterior transfección no dio el resultado esperado. Además, tuvimos problemas a la hora de separar el DNA genómico ya que la centrifuga que posee el laboratorio llega a una velocidad muy inferior a la mencionada en el protocolo.

En la siguiente purificación, la cual arrojó los valores de concentración mencionados en la tabla 2, se aumentó el tiempo de centrifugación para compensar la falta de velocidad y se fue retirando el sobrenadante (donde se encuentra el ADN plasmídico) en etapas, centrifugando en cada una para disminuir la cantidad de DNA genómico.

Id plásmido	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
RGECO (1)	1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
RGECO (2)	0,75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
GCaMP 6 (1)	1,69 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
GCaMP 6 (2)	2,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tabla 2: Concentraciones del plásmido purificado medido con un equipo nanodrop. Los plásmidos (1) y (2) provienen de los mismos crecimientos overnight pero fueron purificados por separado. debido

Relación 260/280:

RGECO (1) = 1,94

RGECO (2) = 1,93

GCaMP6 (1) = 1,92

GCaMP6 (2) = 1,86

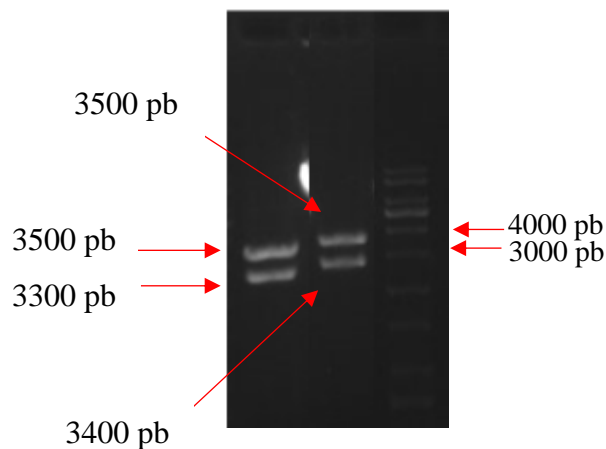


Figura 14: Corrida en gel de agarosa de la digestión de los plásmidos que codifican para GCaMP6 y RGECO. Calle 1 RGECO, calle 2 GCaMP6 y calle 3 marcador de peso molecular 1kb.

Esta imagen se encuentra editada para poder unir las calles correspondientes a los plásmidos de interés.

Observando la figura 14 se puede ver que en la calle 1, correspondiente a RGECO, hay un fragmento de aproximadamente 3500 pb y otro de 3300 pb. En la calle 2, correspondiente a GCaMP6 se puede ver un fragmento de aproximadamente 3500 pb y otro de 3400 pb. De acuerdo a lo calculado anteriormente, para RGECO debería haber un fragmento de 3519 pb y otro de 3338 pb y para GCaMP6 uno de 3535 pb y otro de 3401 pb. Comparando lo calculado con el resultado arrojado por el gel podemos decir que nos encontramos en presencia de los plásmidos buscados. Además, no se observan signos de ADN genómico.

PASO 2: OBTENCIÓN DE CÉLULAS FLUORESCENTES.

- **Transfección de células CHO**

Se realizaron siete transfecciones utilizando RGECO de la primera purificación, pero al observar las células bajo fluorescencia, ninguna fluorescía indicando que no ocurrió ningún evento de transfección.

Luego de la segunda purificación se comenzó a transfectar con el DNA RGECO (2), se eligió este ya que poseía los valores de concentración más cercanos a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (valor de referencia en todos los protocolos).

En ambos casos se adaptaron los volúmenes de reactivos para obtener masas de plásmido iguales a la del protocolo.

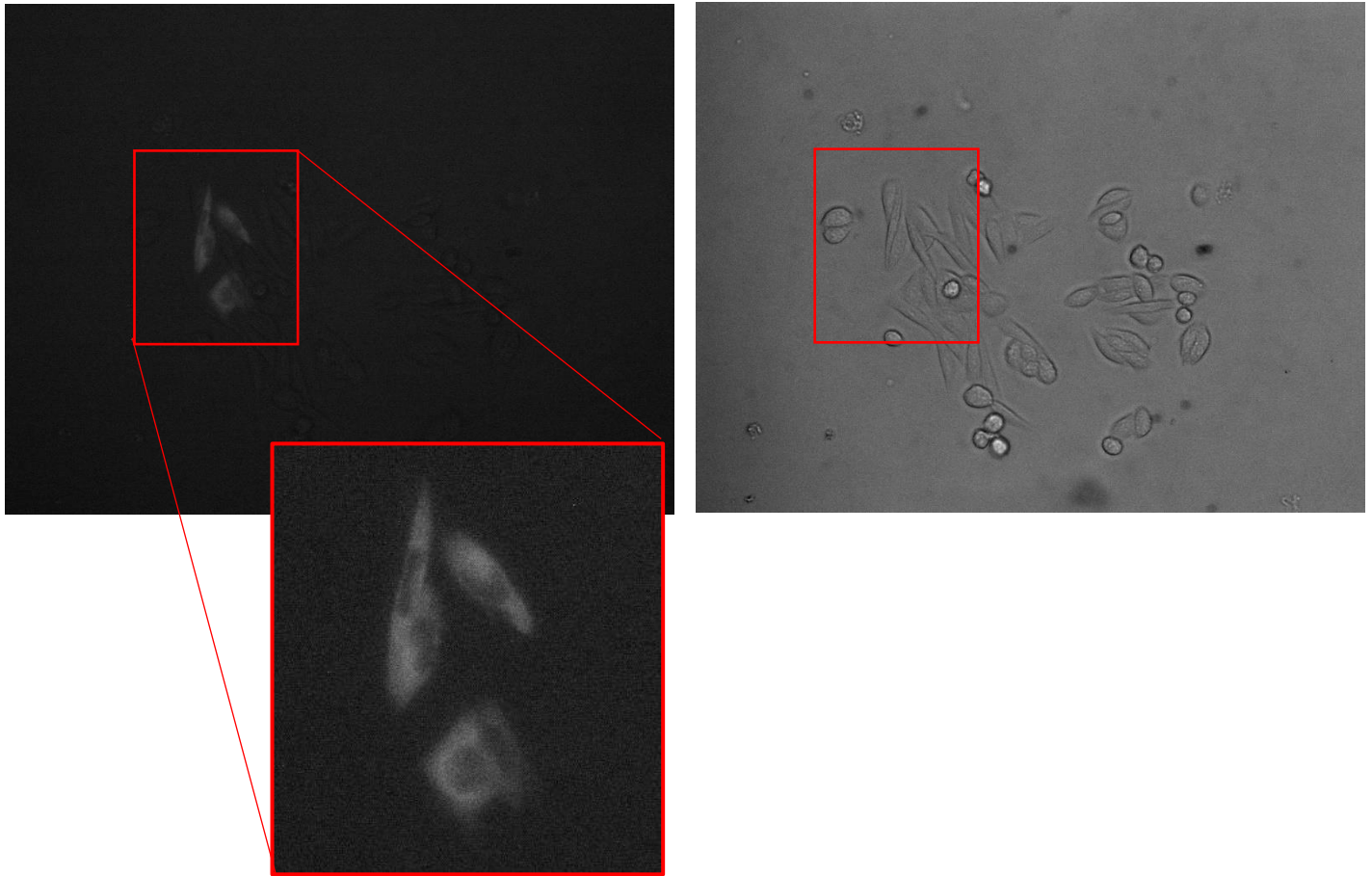


Figura 15: Células transfectadas bajo fluorescencia (A) y bajo iluminación de campo claro (B). El porcentaje de transfección en este caso fue del 30%. Las células se encontraban a baja confluencia, pero el estado general era bueno a pesar de encontrarse células redondas,

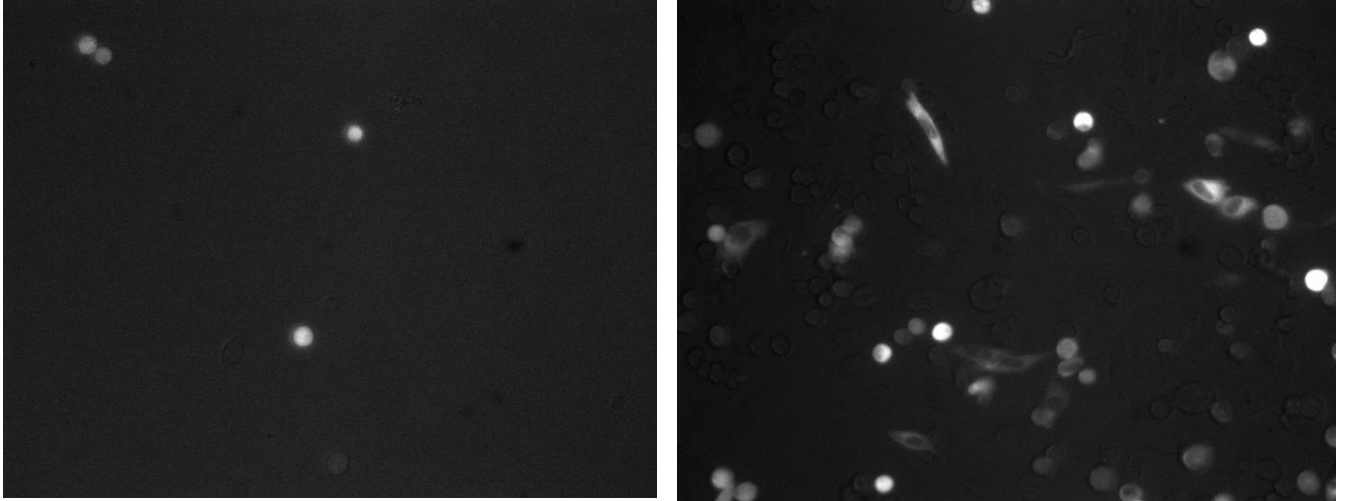


Figura 16: Izquierda transfección hecha a confluencia 30%. Derecha transfección hecha al 80% de confluencia.

Las primeras transfecciones con RGECO (de la segunda purificación) daban muy baja eficiencia, encontrándose muy pocas células fluorescentes por campo. Luego, se comenzó a transfectar a confluencias más altas y se obtuvieron mejores resultados (Figura 16). Se decidió transfectar a confluencia entre 50% y 60% para poder dar el tiempo suficiente a las células para que expresen la proteína reportera (24 a 48 hs) y que a la hora de experimentar no estuviesen demasiado confluentes.

PASO 3: APERTURA DE LOS CANALES NICOTÍNICOS CON NICOTINA.

- Ensayo nicotina

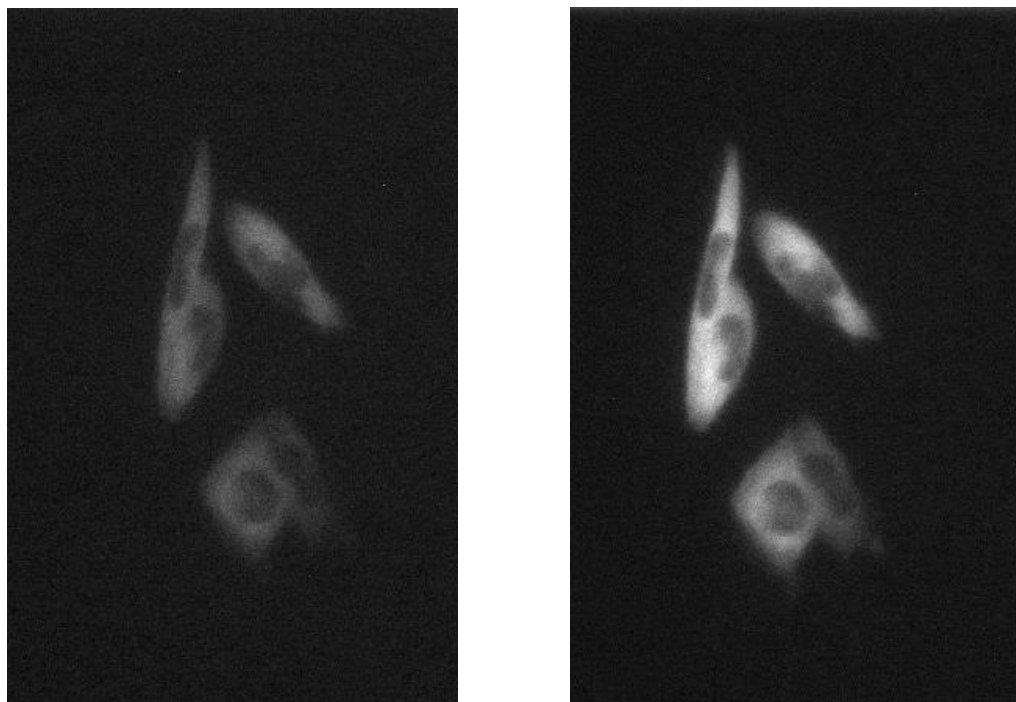


Figura 17: Células antes y después de la aplicación de nicotina. (Para ver secuencia completa referirse al video número 1 en CD adjunto).

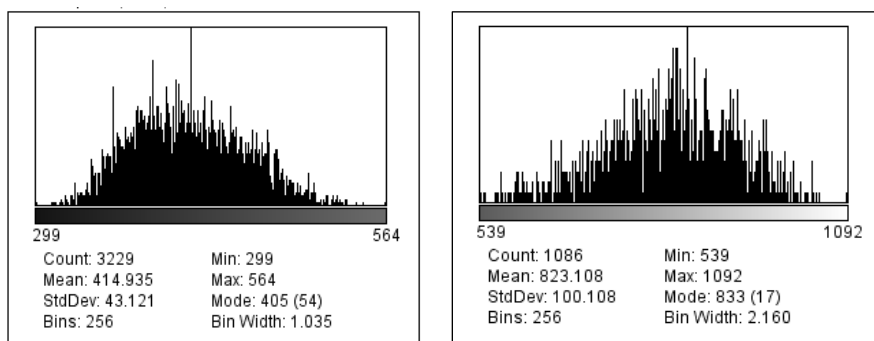


Figura 18: Histograma de una célula antes y después de la aplicación de nicotina.

El cambio en la fluorescencia se cuantifica del siguiente modo (sin tener en cuenta el photobleaching en el mismo período):

Sea F la intensidad de fluorescencia medida en una célula después de cierto tratamiento. Sea F_b la fluorescencia del "background" (fondo sin RGECO).

Por otro lado, sea F_0 la intensidad en esa misma célula antes del tratamiento, y F_{0b} su "background" correspondiente, entonces podemos decir que: el cambio en fluorescencia debida al tratamiento $(\Delta F/F_0) = (F - F_b) / (F_0 - F_{0b})$. Estos valores se encuentran en el ítem "Mean" del histograma; en la figura 18 se puede encontrar F_0 y F .

En este ensayo se observó un aumento de fluorescencia $(\Delta F/F_0) = 2,7$ veces producto de la apertura de los canales nicotínicos musculares de las CHO-K1/A5 e ingreso de iones Ca^{2+} provenientes de la solución aplicada al medio extracelular.

También se vio que el photobleaching del reporter fluorescente era alto y que se debía trabajar rápido para que la fluorescencia no decayera al punto de constituir un "artifact" apreciable. Se tomó la precaución para los siguientes ensayos de disminuir al mínimo la exposición de las células a la luz de la lámpara de mercurio para evitar este problema.

- Control negativo aumento de la fluorescencia

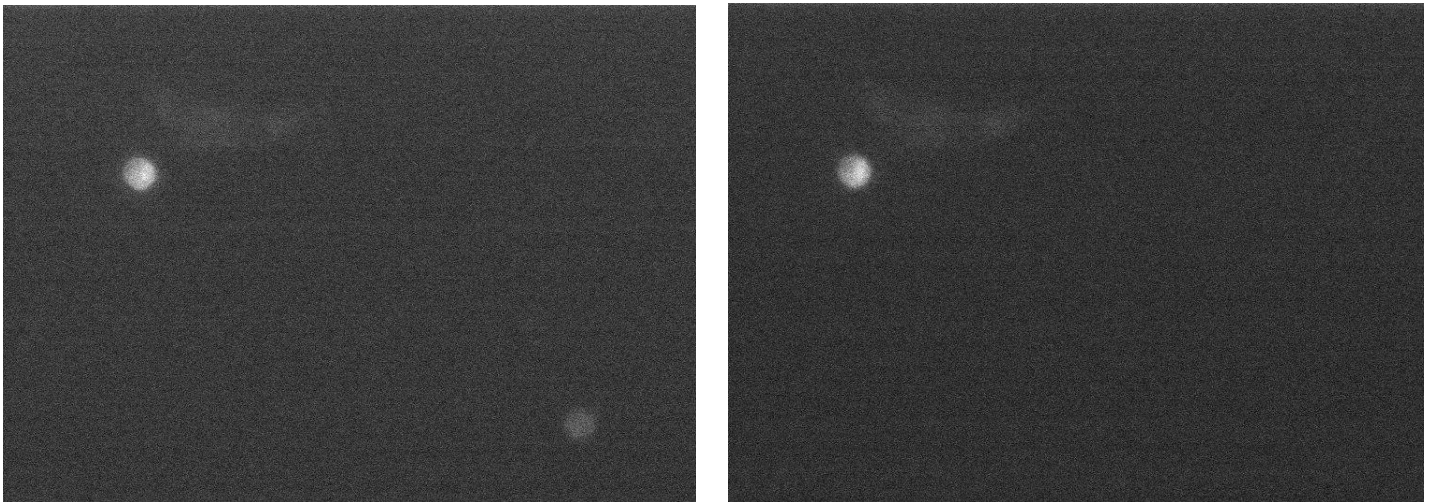


Figura 19: Antes y después de la aplicación de nicotina sin Ca^{2+} extracelular. La célula en el extremo inferior derecho se pierde por culpa del flujo generado al aplicar la solución con nicotina. (Para ver secuencia completa referirse al video 2 en CD adjunto).

Posee un $\Delta F/F_0 = 0,97$ veces

De acuerdo al valor arrojado por el $\Delta F/F_0$, sin calcio extracelular no hay aumento de la fluorescencia. Esto se debe a que, a pesar de que los canales se abrieron, no hubo flujo de iones calcio que se unieran a RGECO.

PASO 4: BÚSQUEDA DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA DE NICOTINA SUFICIENTE PARA CAUSAR UN AUMENTO EN LA FLUORESCENCIA.

Concentración 100 μ M

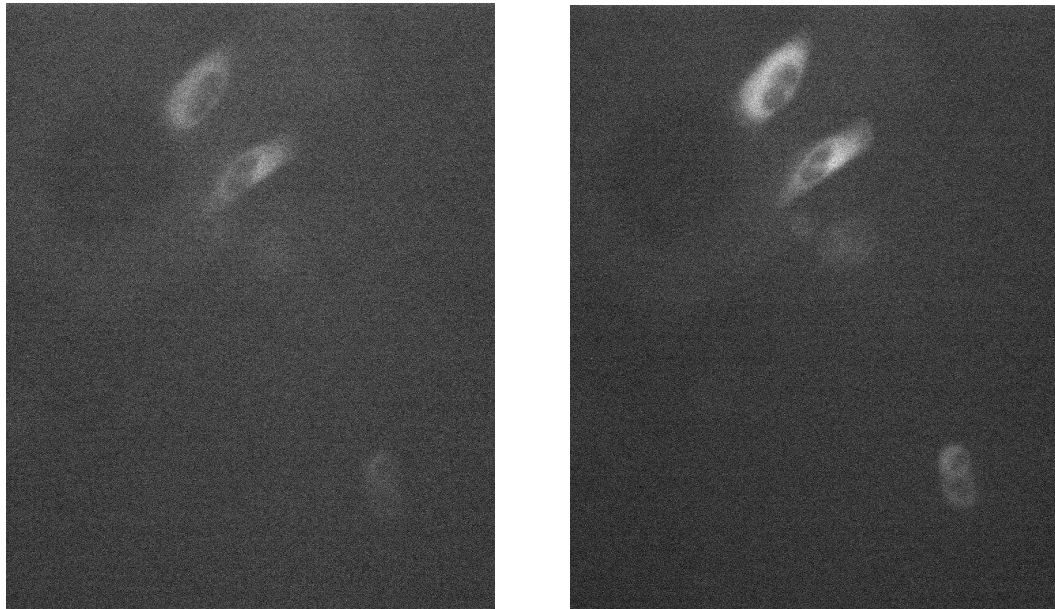


Figura 20: Antes y después de la aplicación de nicotina a concentración 100 μ M. (Para ver secuencia completa referirse al video 3 en CD adjunto).

Posee un $\Delta F/F_0 = 2,2$ veces

Concentración 20 μ M

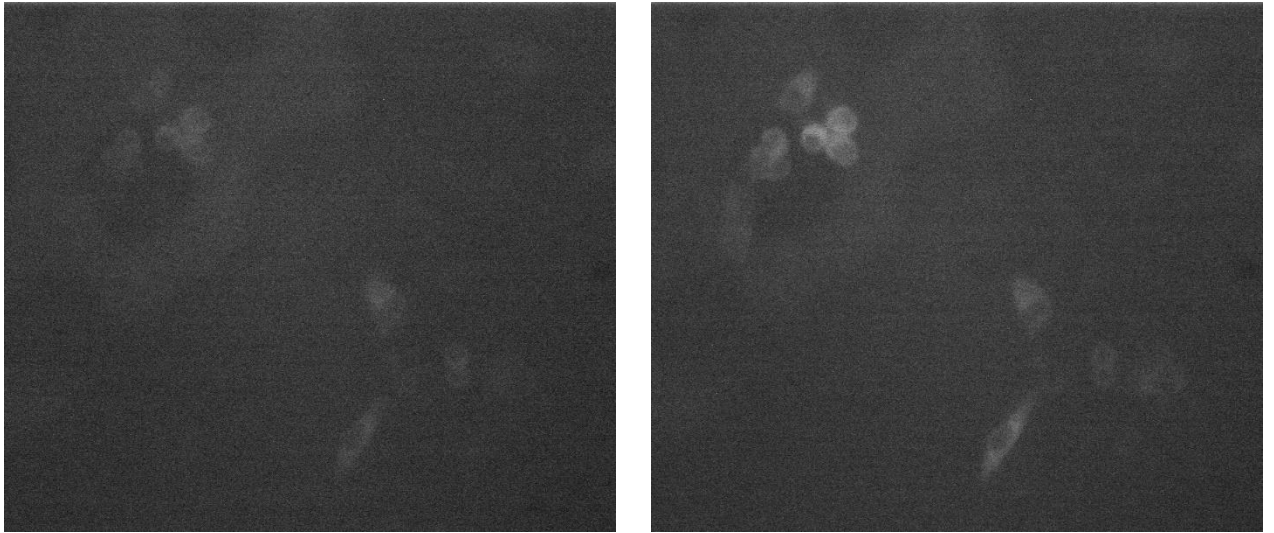


Figura 21: Antes y después de la aplicación de nicotina a concentración 20 μ M. (Para ver secuencia completa referirse al video 4 en CD adjunto).

Posee un $\Delta F/F_0 = 2,5$ veces

Concentración 10 μ M

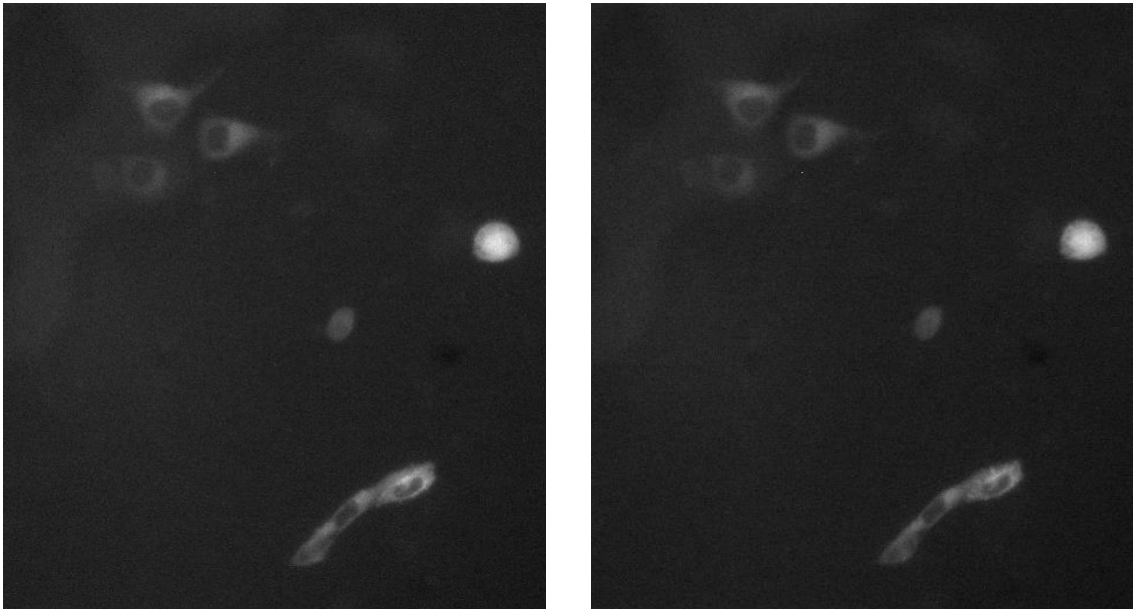


Figura 22: Antes y después de la aplicación de nicotina a concentración 10 μ M. (Para ver secuencia completa referirse al video 5 en CD adjunto).

Posee un $\Delta F/F_0 = 1,08$ veces

Concentración 4 μ M

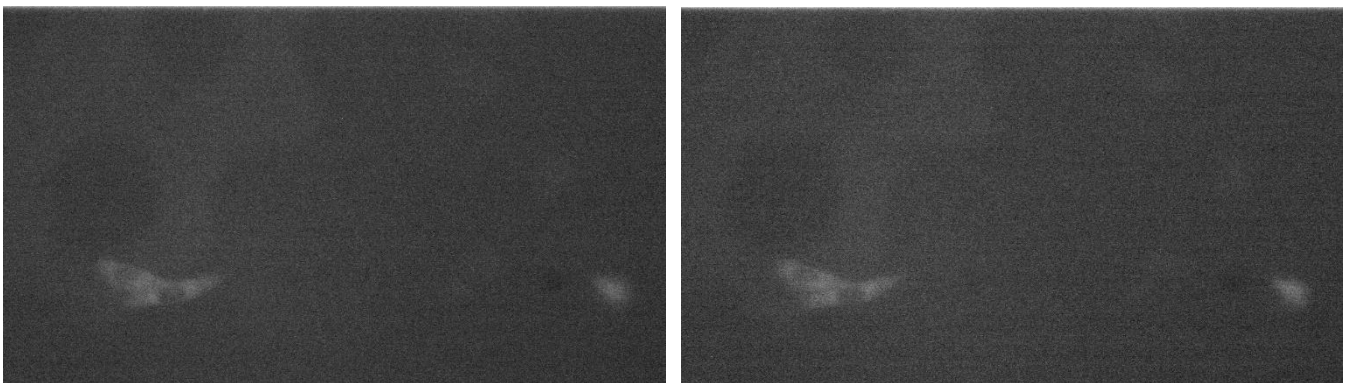


Figura 23: Antes y después de la aplicación de nicotina a concentración 4 μ M. (Para ver secuencia completa referirse al video 6 en CD adjunto).

Posee un $\Delta F/F_0 = 0,99$ veces

Viendo los $\Delta F/F_0$ se puede ver que la mínima concentración de nicotina que logra un aumento de la fluorescencia, producto de la apertura los canales nicotínicos y paso de calcio, es 20 μM .

PASO 5: APERTURA DE LOS CANALES NICOTÍNICOS CON NICOTINA ENJAULADA.

- Ensayo 1 apertura de los canales nicotínicos con nicotina enjaulada

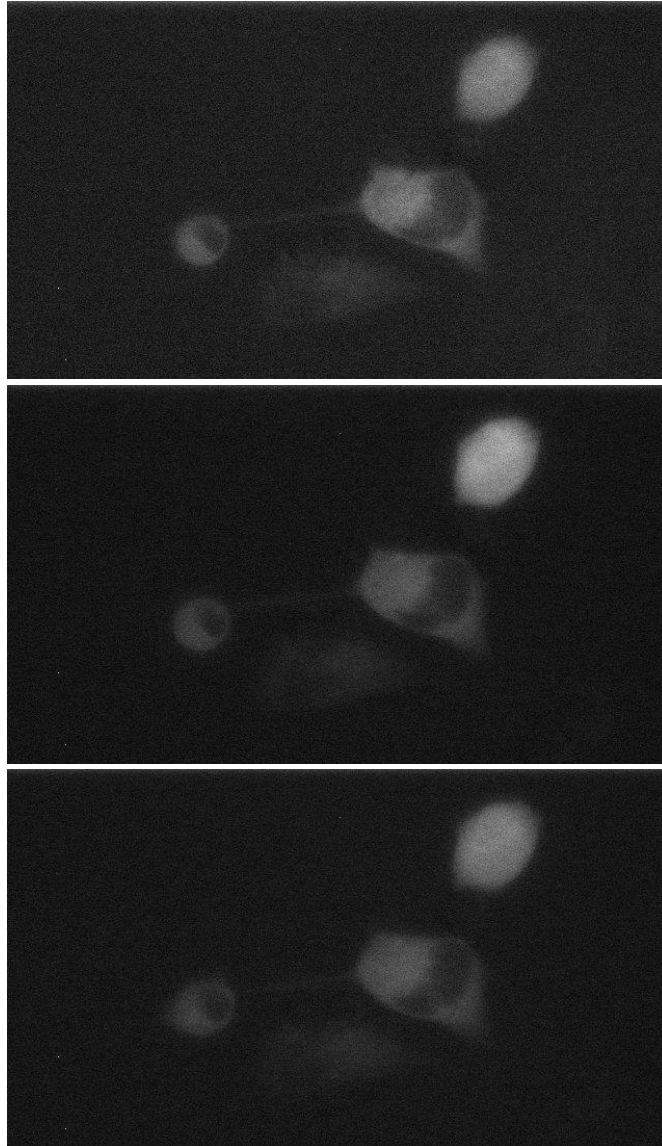


Figura 24: Arriba foto previa a la fotólisis. En medio foto justo después de la aplicación de luz. Abajo luego de 2 min de aplicada la luz

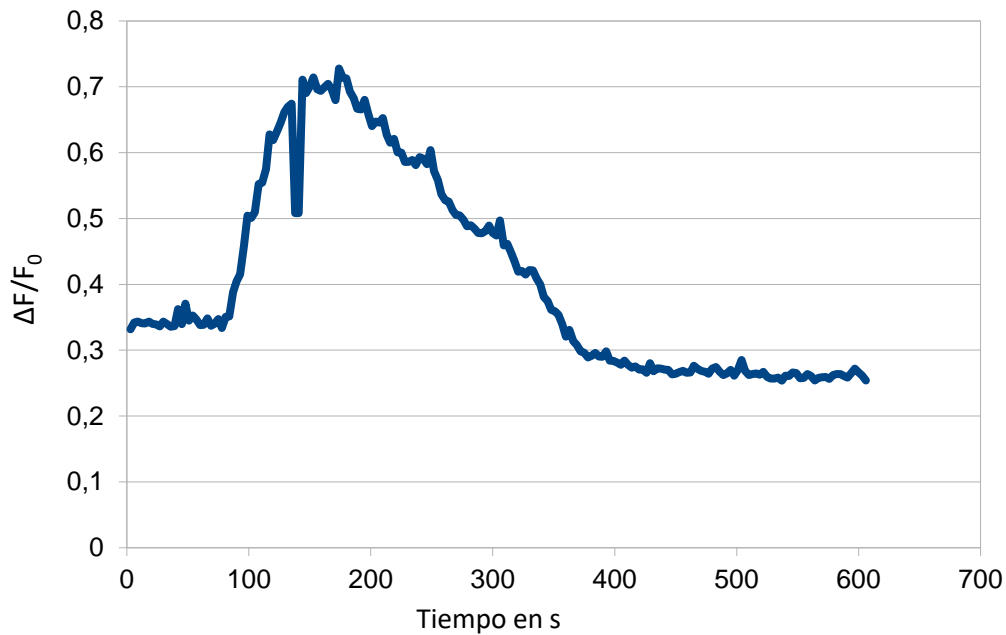


Figura 25: Cambio en la fluorescencia vs tiempo

En la figura 25 podemos ver un paulatino aumento de la señal fluorescente. De acuerdo a la bibliografía y como muestra la figura 11, podemos considerar que este aumento se debe a una fotólisis lenta producto de la baja eficiencia de fotólisis de la luz verde emitida por la lámpara de mercurio. Con este ensayo deducimos que, para observar un pico de fluorescencia similar al encontrado con la nicotina, es necesario un pulso de luz fuerte y corto.

- Ensayo 2 apertura de los canales nicotínicos con nicotina enjaulada

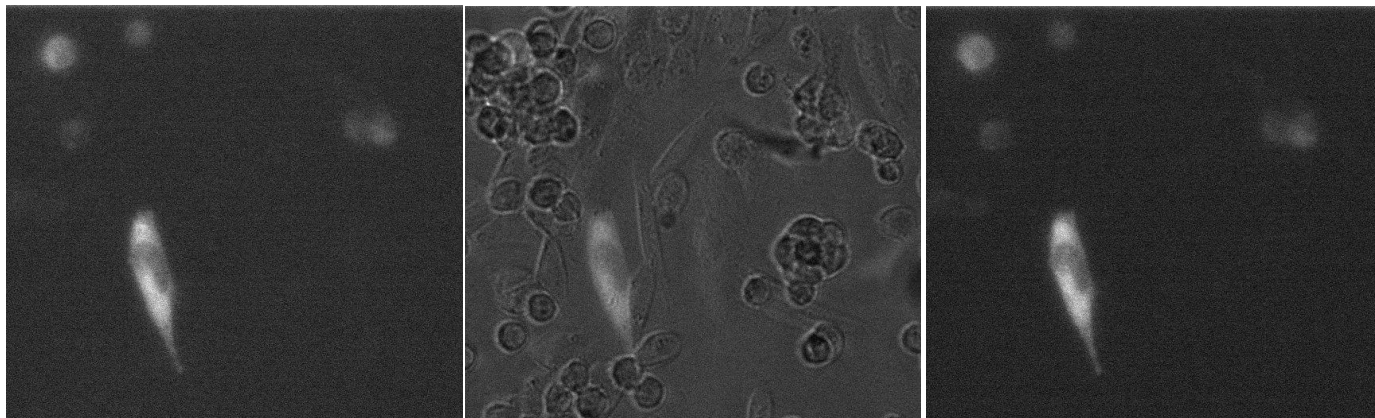


Figura 26: Antes de la aplicación de luz, durante la aplicación de luz y después de la aplicación de luz. (Para ver secuencia completa referirse al video 7 en CD adjunto).

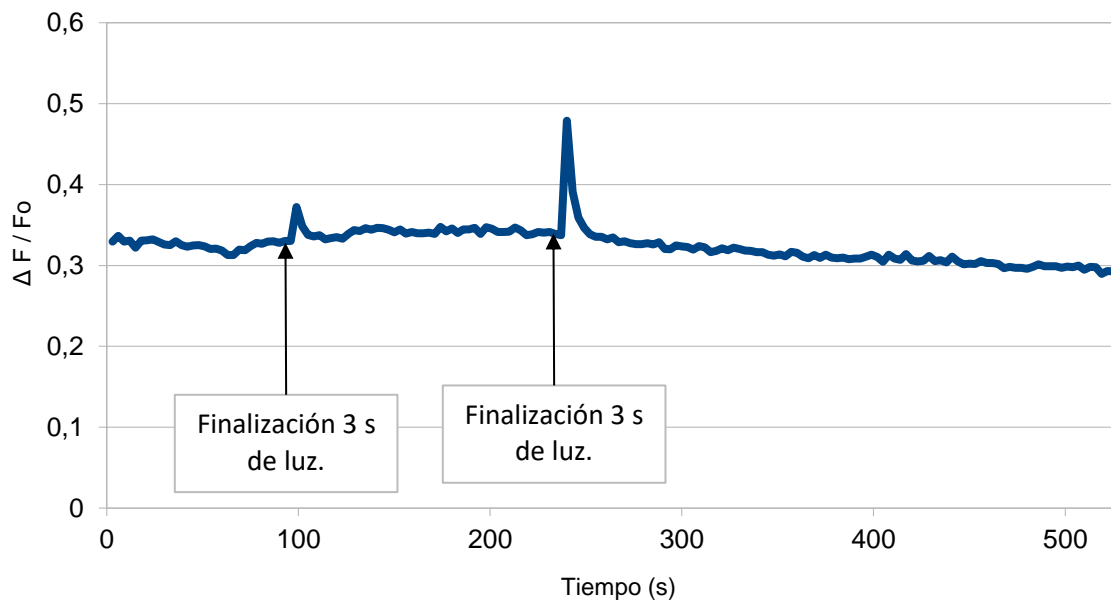


Figura 27: Aumento de la fluorescencia sobre la fluorescencia basal, respecto del tiempo.

Como se puede ver en la figura 27, luego de la aplicación de luz se ve un aumento de la fluorescencia de RGECO debido al ingreso de calcio a las células por la apertura de los canales nicotínicos.

- Control negativo de la jaula

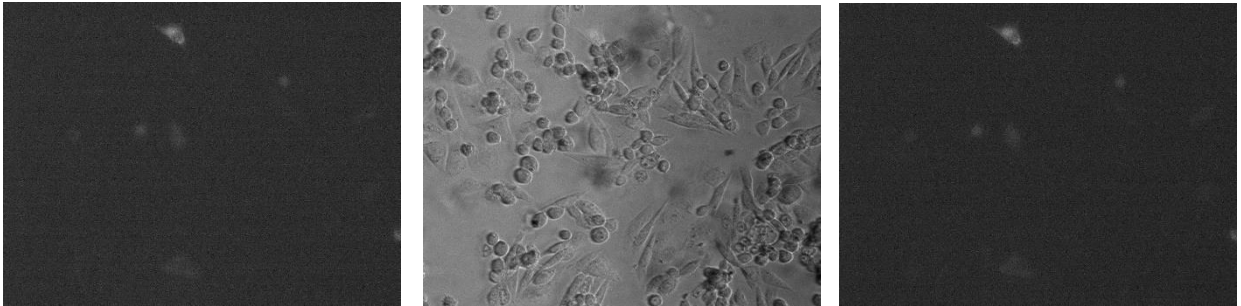


Figura 28: Antes de la aplicación de luz, durante la aplicación de luz y después de la aplicación de luz. (Para ver secuencia completa referirse al video 8 en CD adjunto).

Posee un $\Delta F/F_0 = 0,97$

No se observó variación de la fluorescencia al aplicar la jaula. Con esto se puede asumir que el enjaulado no afecta el normal funcionamiento del canal.

Con este ensayo queda validada la hipótesis demostrando que, al aplicar nicotina enjaulada y luz, la nicotina se fotolibera y provoca la apertura de los canales nicotínicos.

Discusión de resultados

Con el ensayo 1 de apertura de los canales nicotínicos con nicotina enjaulada pudimos observar una fotólisis lenta producto de la luz verde emitida por la lámpara de mercurio. Esta fotólisis es producto de que la probabilidad de que un fotón sea absorbido por RGECO, en vez de por RuBiNico, a 532 nm es de tan solo 6 a 7 veces más. Esto se podría solucionar para próximos experimentos utilizando luz a 580 590 nm donde la probabilidad de que RGECO absorba un fotón es mucho mayor y la absorbancia de RuBiNico mucho menor.

Por otro lado, en la figura 27 luego de la aplicación de los pulsos de luz se puede observar un pico de fluorescencia. Sin embargo, estos picos son pequeños y consideramos que no se encuentran completos. Puede verse en los videos que el aumento de fluorescencia al aplicar nicotina no es abrupto. Probablemente esto dependa del tiempo difusional de la nicotina en el medio extracelular, sumado al tiempo de mezcla de fluídos, al reemplazar uno con nicotina por el que bañaba a las células, sin nicotina. Cuando aplicamos nicotina enjaulada y esperamos unos segundos antes de irradiar, estamos permitiendo que los fluídos se mezclen, quitando uno de los factores que dictan el "rise time" (pendiente ascendente) del aumento de señal de GECO. Sólo queda el componente rápido, difusional, permitiendo ver una latencia muy corta entre la fotoliberación y la respuesta de GECO.

Para mejorar este ensayo y ver el pico de fluorescencia completo se debería aplicar luz por menos tiempo (1 s). También, se necesitaría conseguir un tiempo entre fotos de como máximo 1 s; actualmente esto no se pudo lograr por una limitación de la velocidad de Windows, pero se está intentando solucionar cambiando el sistema operativo de la computadora que controla la cámara.

Mi proyecto de doctorado incluye continuar con este trabajo, mejorando la velocidad de captura de imágenes, utilizando un láser para demostrar la precisión espacial que posee esta técnica, y utilizar la combinación de tecnologías para responder preguntas biológicas.

Se podría utilizar esta técnica para hacer delivery de drogas solo en lugares afectados. Como, por ejemplo, en zonas del cerebro dañadas, donde actualmente se usan técnicas que involucran aplicar droga en todo el individuo trayendo aparejados múltiples efectos secundarios. También, dentro de esta línea se podría utilizar para delivery de droga a tumores.

Otra aplicación podría ser activar receptores específicos en células que no estén funcionando correctamente, sin tener que activar todos los receptores del cuerpo como pasaría al agregar una droga generalizada.

Se sabe que, en modelo de zebrafish, exponer embriones a nicotina altera el ruteo de axones motores. ¿Se trata de un efecto de la nicotina en el soma? o ¿se trata de interacción entre nicotina y los conos de crecimiento axonal? Esta técnica permite aplicar nicotina en una u otra parte de la neurona, y diseccionar el target molecular.

Conclusión

En este trabajo se logró ver el ingreso de Ca^{2+} , evocado por la aplicación de nicotina tanto libre como enjaulada. Con estos resultados se ve el potencial de la combinación de las técnicas optogenéticas y la tecnología de compuestos enjaulados. La facilidad con la que se pueden manipular (utilizando compuestos enjaulados) o medir variables fisiológicas (utilizando optogenética) acelera mucho el proceso de captura de datos. El análisis de la información se hace mediante algoritmos de análisis de imágenes, que también ha tenido amplio desarrollo en los últimos años.

Usando estas dos tecnologías juntas, se facilita el trabajo a la hora de realizar ensayos que requieran precisión nanométrica y aislación mecánica. Además, la técnica permite (utilizando láseres) direccionar luz hacia un punto específico, con lo cual se podrían activar solo los canales de la célula a la cual se ilumina, sin activar los canales de las células vecinas. Esto permite otra forma de pensar los tejidos, más como un conjunto de células individuales con variaciones estocásticas que como una población homogénea de células idénticas.

ANEXOS

ANEXO I – Composición medios de cultivo y soluciones.

LB para el crecimiento de bacterias:

- 10 g Triptona
- 5 g Extracto de levadura
- 10 g NaCl
- Agua bidestilada hasta completar volumen final de 1 litro.

Solución alta en Ca^{2+} :

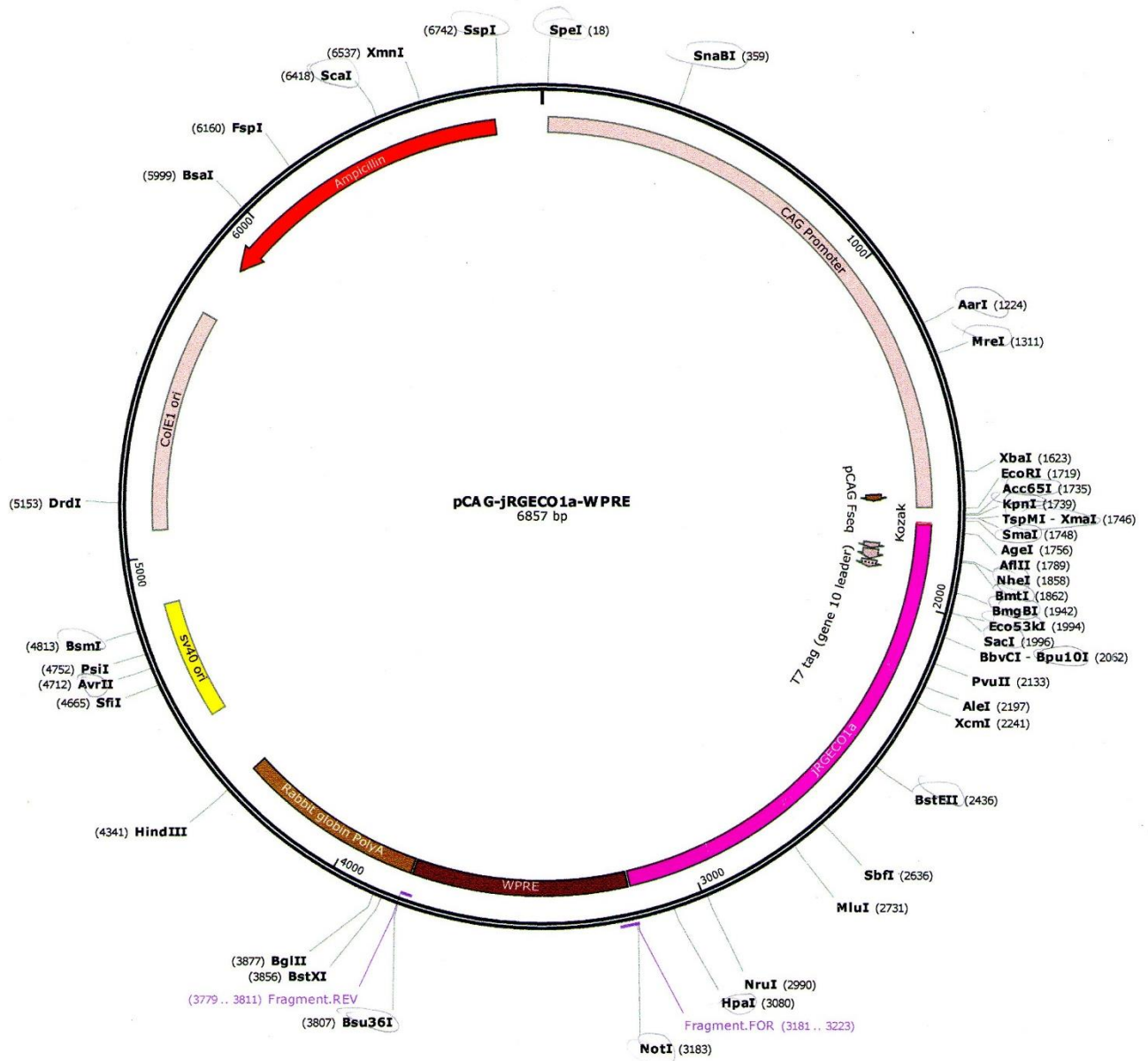
- La solución de Ca^{2+} fue preparada a partir de una solución de CaCl (Cloruro de calcio) 2M disuelto en HBSS.

Solución nicotina:

- La solución de nicotina fue preparada con tartrato de nicotina diluido en la solución alta en calcio (a menos que diga lo contrario). Peso molecular tartarato de calcio: 188,15 g/mol

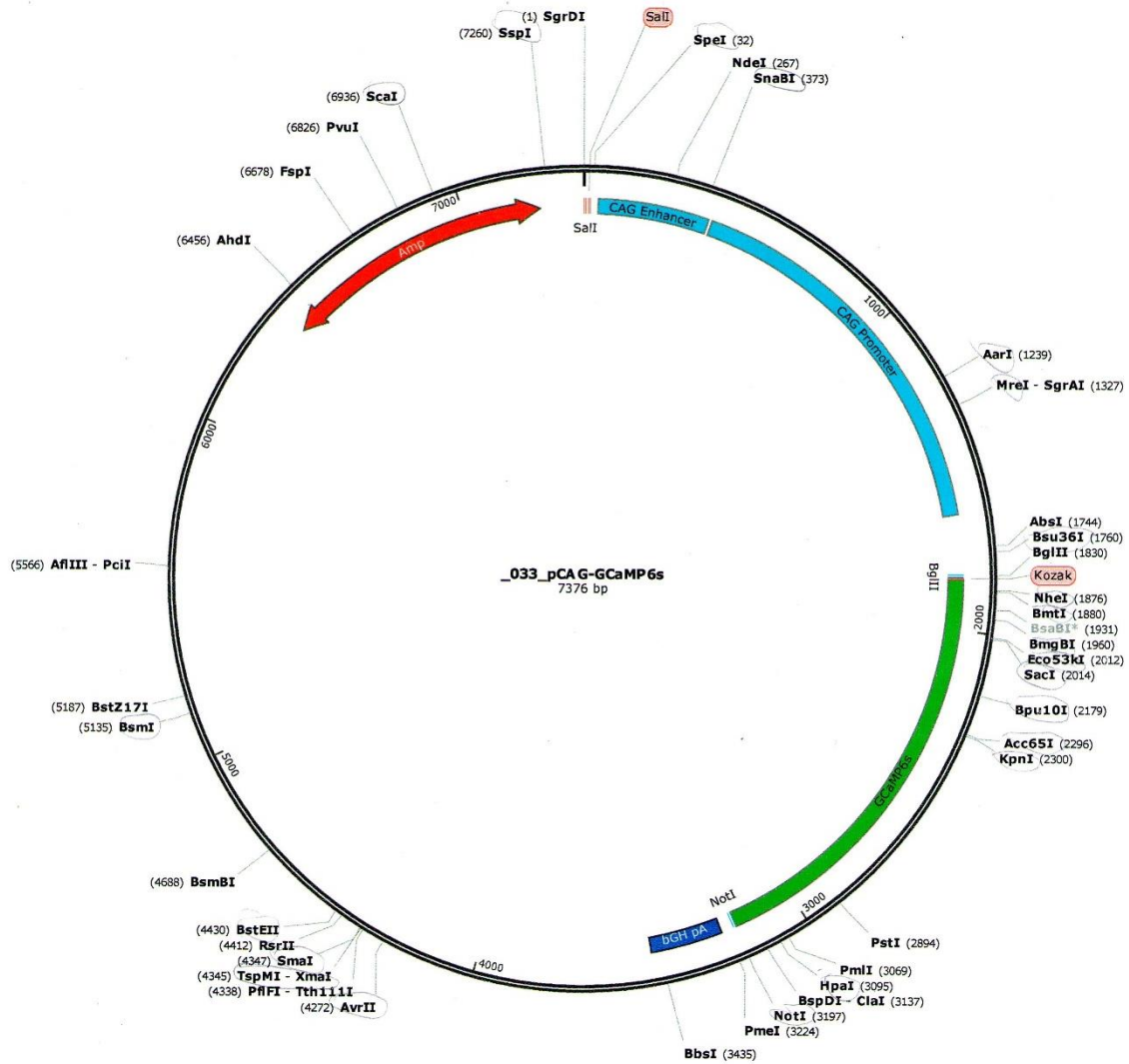
ANEXO II – Mapa plásmidos RGECO y GCaMP 6.

- Mapa RGECO



MEDICIÓN EN CÉLULAS DE CORRIENTES IÓNICAS EVOCADAS POR FOTOLIBERACIÓN DE COMPUESTOS ENJAULADOS Sirvan, Ana Laura

- Mapa GCaMP6



ANEXO III – Preparación células electrocompetentes

1. Crecer un cultivo over night de células *E. coli* en medio LB hasta una densidad óptica de 600 nm (0.8)
2. Retirar el medio centrifugando a 5000 rpm 4°C por 10 minutos
3. Lavar resuspendiendo en 500 ml de glicerol 10% enfriado en hielo y centrifugar nuevamente a 5000 rpm 4°C por 15 minutos.
4. Volver a lavar realizando el mismo protocolo que en el punto 3.
5. Resuspender en glicerol 10% (volumen total 2 ml).
6. Guardar a -80 °C hasta el momento de la electroporación.

ANEXO IV – Protocolo de electroporación

Se utilizó 1 ng de DNA, 500 V y 8 ms de longitud del pulso.

ANEXO V – Protocolo de sembrado

1. Retirar el medio de la botella.
2. Lavar 2 veces la botella con 3 ml de PBS 1X.
3. Agregar 3 ml de PBS 1X y 300 µl de Tripsina.
4. Colocar la placa en estufa a 37°C durante 5 min.
5. Una vez transcurrido el tiempo observar en microscopio que las células se hayan despegado.
6. Con una pipeta de 1000 homogeneizar el PBS con tripsina para eliminar posibles cúmulos de células.
7. Retirar con una pipeta de 1000 el contenido y colocar en Eppendorfs de 1,5 ml.
8. Centrifugar durante 40 segundos a 10000 RPM.
9. Retirar el sobrenadante.
10. Agregar 1 ml de medio con suero a cada Eppendorf y homogeneizar con pipeta.
11. Repetir pasos 8 y 10.
12. Tomar 15µl y cuantificar en cámara de Neubauer.
13. Sembrar en vidrios la cantidad de células requeridas.

ANEXO VI – Protocolo lipofectamina 2000

1. Cultivar células a confluencia entre 50% - 60%.
2. Diluir 3 μ l de lipofectamina 2000 en 50 μ l de medio HAM'S F12 sin suero fetal bovino en un Eppendorf de 1,5 ml.
3. Diluir 1 μ g de DNA en 50 μ l de medio HAM'S F12 sin SFB.
4. Mezclar el contenido del Eppendorf del paso 2 con el del paso 3.
5. Esperar 5 minutos sin moverlo.
6. Sembrar 50 μ l por well, no pipetear arriba y abajo.

El protocolo es para 2 wells de una placa multiwell de 24 wells, pueden ser multiplicadas sus cantidades para mayor cantidad de wells.

Bibliografía

1. Jonge WJ, Ulloa L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol*. Ago 2007. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707264
2. Unwin N, Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4 Å Resolution. *J Mol Biol*. Mar 2005. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.12.031
3. Shen JX1, Yakel JL. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin*. Jun 2009. DOI 10.1038/aps.2009.64
4. Alberts B *et al*. *Biología molecular de la célula*. 5 ta. Ed. Capítulo 11.
5. Hille B. *Ionic channels of excitable membrane*. 2da Ed. Capítulo 1.
6. Roccamo, M. F. *et al*. Cells defective in sphingolipids biosynthesis express low amounts of muscle nicotinic acetylcholine receptor. May 1999. PMID: 10215914
7. Berridge M. J. *et al*. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. Oct 2000. DOI:10.1038/35036035.
8. Miyawaki A. *et al*. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. Ago 1997. DOI: 10.1038/42264
9. Nagai T. *et al*. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Mar 2001 DOI:10.1073/pnas.051636098.
10. Wu J. *et al*. Red fluorescent genetically encoded Ca²⁺ indicators for use in mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*. Nov 2014. DOI: 10.1042/BJ20140931
11. Campbell R. *et al*. Highlightable Ca²⁺ Indicators for Live Cell Imaging. *J. Am. Chem. Soc*. Dic 2012. DOI: 10.1021/ja310184a
12. Campbell R. *et al*. An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca Indicators. *Science*. Sep 2011. DOI: 10.1126/science.1208592

13. Tian L. *et al.* Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature*. Dic 2009. DOI: 10.1038/nmeth.1398
14. Akerboom J. *et al.* Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Front Mol Neurosci*. Mar 2013. DOI: 10.3389/fnmol.2013.00002
15. Chang R. *Química*. 10 ma Ed. Capítulo 22.
16. Filevich O. *et al.* 1D and 2D Temperature Imaging with a Fluorescent Ruthenium Complex. *Anal. Chem*. Oct 2006. DOI: 10.1021/ac061382f
17. Chen CY. Highly Efficient Light-Harvesting Ruthenium Sensitizer for Thin-Film Dye-Sensitized Solar Cells. *ACS Nano*. Oct 2009. DOI: 10.1021/nn900756s.
18. McCray J. Trentham D. Properties and uses of photo reactive caged compounds. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem*. Jun 1989. DOI: 10.1146/annurev.bb.18.060189.001323
19. Wang P. *et al.* Enhance the Performance of Dye-Sensitized Solar Cells by Co-grafting Amphiphilic Sensitizer and Hexadecylmalonic Acid on TiO₂ Nanocrystals. *J. Phys. Chem*. Dic 2003. DOI: 10.1021/jp0365965
20. Chen C. Y. *et al.* A Ruthenium Complex with Superhigh Light-Harvesting Capacity for Dye-Sensitized Solar Cells. *Angewandte chemie*. Jul 2006. DOI: 10.1002/anie.200601463
21. Kuang D. *et al.* Stable, High-Efficiency Ionic-Liquid-Based Mesoscopic Dye-Sensitized Solar Cells. *Small*. Nov 2007. DOI: 10.1002/sml.200700211
22. Zayat L. *et al.* A New Strategy for Neurochemical Photodelivery: Metal-Ligand Heterolytic Cleavage. *J. Am. Chem. Soc*. Ene 2003. DOI: 10.1021/ja0278943
23. Zayat L. *et al.* Ruthenium(II) Bipyridyl Complexes as Photolabile Caging Groups for Amines. *Inorg. Chem*. Ene 2006. DOI: 10.1021/ic0512983

24. Filevich O *et al.* A caged nicotine with nanosecond range kinetics and visible light sensitivity. *J. In. Biochemistry*. Dic 2010. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2010.08.003.
25. Schindelin, J.; Rueden, C. T. & Hiner, M. C. et al. (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis, *Molecular Reproduction and Development*, PMID: 26153368.