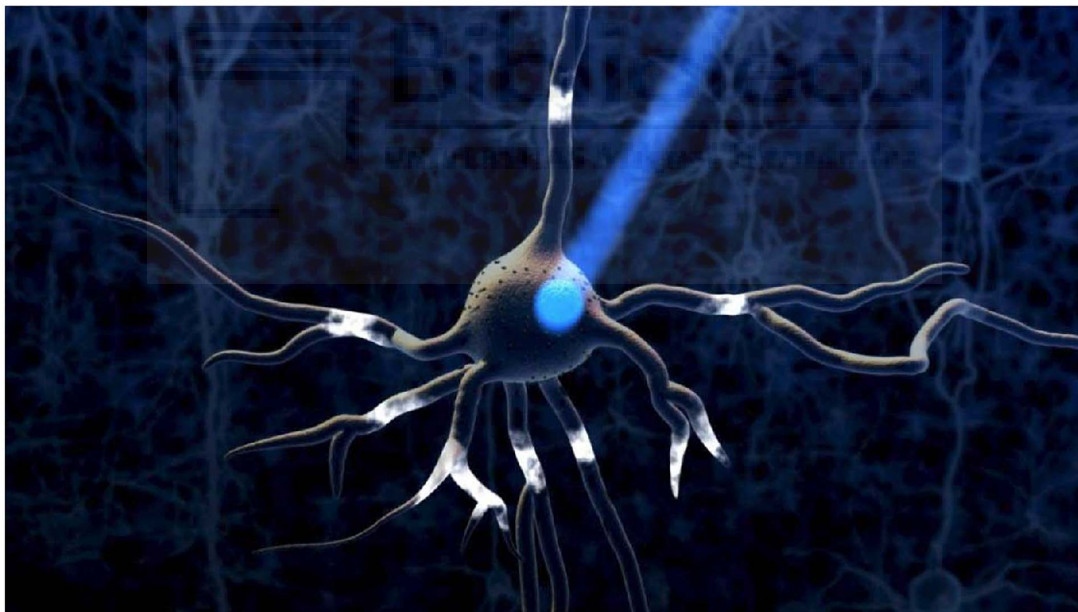


Validación de la utilización de vectores no virales para la modulación de la actividad neuronal mediante técnicas de optogenética para su aplicación en terapia génica



Autor: Alejandro Gombau García

Tutor: Dr. Eduardo Fernández Jover

Cotutores: Dra. Cristina Soto Sánchez y José David Celdrán López

Máster de Biotecnología y Bioingeniería (Curso 2020 – 2021)

D. EDUARDO FERNANDEZ JOVER, Doctor y Catedrático de la Universidad Miguel Hernández de Elche, D. Cristina Soto Sánchez, Profesora Contratada Doctora de la UMH, y D. José David Celdrán López,

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado:

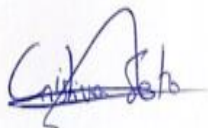
“Validación de la utilización de vectores no virales para la modulación de la actividad neuronal mediante técnicas de optogenética para su aplicación en terapia génica”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

Alejandro Gombau García

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Bioingeniería, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 01 de septiembre de 2021.



Fdo.: D. Eduardo Fernández Jover D.ª Cristina Soto Sánchez D. José David Celdrán López

Contenido

1. Resumen.....	1
2. Abstract	2
3. Introducción.....	3
3.1. Terapia génica	3
3.1.1. Tipos	4
3.1.2. Vectores.....	5
3.2. Optogenética.....	8
3.2.1. Opsinas.....	9
4. Objetivos.....	12
5. Material y métodos	13
5.1. Extracción del plásmido y cuantificación de la pureza	13
5.2. Experimentos in vitro	13
5.2.1. Preparación de las placas multipocillo de cultivo celular y electrodos.....	13
5.2.2. Cultivo primario de corteza cerebral embrionaria de rata.....	14
5.2.3. Cultivo de la línea celular NSC-34	15
5.2.4. Construcción del complejo plásmido - vector	16
5.2.5. Transfección	17
5.2.6. Ensayos de citotoxicidad.....	17
5.3. Registro de actividad neuronal y fotoestimulación	19
5.3.1. MEA.....	19
5.3.2. Análisis de los registros de multielectrodo.....	22
5.3.3. Voltage clamp y fotoestimulación.....	23
6. Resultados.....	24
6.1. Resultados de la transfección.....	24
6.1.1. Transfección en cultivos primarios	24
6.1.2. Transfección en línea celular	26
6.2. Resultados del registro de actividad neuronal y fotoestimulación.....	27
6.2.1. MEA.....	27

6.2.2. Patch clamp	31
6.3. Resultados de los ensayos de citotoxicidad.....	32
6.3.1. Cultivos primarios de corteza embrionaria de rata.....	33
6.3.2. Cultivos de la línea celular inmortalizada NSC – 34	33
7. Discusión.....	36
7.1. Transfección en cultivos primarios y la línea celular NSC - 34.....	36
7.2. Registros electrofisiológicos y fotoestimulación.....	37
7.3. Ensayos de citotoxicidad.....	38
8. Conclusiones.....	40
9. Bibliografía.....	41
10. Anexos.....	47



1. Resumen

Durante la última década el desarrollo de métodos novedosos para vectorizar genes de interés en células y tejidos ha suscitado gran interés de cara a hacer que esta tarea sea fácil y segura. Los vectores virales son los más utilizados en el campo de la terapia génica tanto en investigación básica como en clínica para realizarlo, sin embargo, presentan una serie de inconvenientes, como su precio, capacidad de carga y seguridad. Es por ello por lo que durante los últimos años se están desarrollando vectores no virales con propiedades fisicoquímicas que les permiten actuar como transportadores de material genético de interés. En este trabajo tratamos de validar dos novedosas formulaciones de vectores tipo niosoma evaluando su capacidad *in vitro* de transfectar en dos modelos celulares: la línea celular NSC-34 y los cultivos primarios de córtex embrionario de rata. Además de la capacidad de transfección tratamos de establecer si existe una funcionalidad asociada a la transfección mediante técnicas de registro electrofisiológico tanto de célula única utilizando la técnica de *patch clamp* como, nuestro mayor interés, que es conseguir actividad poblacional en placas de cultivo multielectrodo. Por último, valoramos la citotoxicidad de los vectores a distintos ratios usando el ensayo MTT. Las formulaciones de vectores no virales basados en niosomas que se propusieron en este trabajo, no consiguieron una tasa de transfección suficiente en ninguno de los modelos celulares utilizados, por lo que se descartó su uso en los experimentos de electrofisiología, con los cuales, sin embargo, sí se consiguió obtener respuesta tanto individual como poblacional al utilizar el control positivo. No obstante, se requieren futuros experimentos en los que mejorar las condiciones de reproducibilidad y en cuanto a la eficiencia de transfección del control positivo. Las formulaciones presentaron distintas propiedades citotóxicas en función del modelo celular utilizado, siendo poco o nada citotóxico en los cultivos primarios mientras que redujeron la viabilidad a casi la mitad en los cultivos celulares de líneas inmortalizadas.

Palabras clave: optogenética; terapia génica; no viral; electrofisiología; cultivo celular

2. Abstract

During last decade, the development of new methods for vectorizing genes of interest has raised interest to make this task easier and safer. Viral vectors are the most used in basic and clinic research in the gene therapy field. However, they have several drawbacks like its price, cargo capacity and safety. That is why in recent years non-viral vectors are being developed since they have physical and chemical properties that allow them to act as a genetic material transporter. In this work we try to validate *in vitro* two novel niosome based vector. We evaluate their capacity for transfecting using two cellular models: cell line NSC – 34 and primary embryonic rat cortical neuronal culture. Besides the transfection efficiency we try to establish functionality and ability for optogenetic modulation by electrophysiological recordings using single cell recording with patch clamp technique and multielectrode culture plate since cell population is our main interest. Finally, we evaluate vector cytotoxicity in different ratios using MTT assay. Novel niosome based formulated used in this work were unable to achieve a sufficient transfection efficiency nor in immortalized cell line nor in primary culture in order to keep going with them in electrophysiology experiments. Despite that we were able to optimize the electrophysiology recordings and optogenetic modulation and response were obtained in both single a population recording. Nevertheless, future experiments are required to improve the culture condition and reproducibility with the aim of advance in the positive control transfection efficiency. Both formulations had different cytotoxic properties depending the cellular model used. The cytotoxic effect was null in primary cell culture but highly significant in the cell line culture, reaching a fifty percent descent in viability in several cases.

Keywords: optogenetic; gene therapy; non-viral; electrophysiology; cell culture

3. Introducción

3.1. Terapia génica

La terapia génica es el conjunto de técnicas que introducen ácidos nucleicos (ADN o ARN) en las células para tratar una enfermedad, con el objetivo de restaurar la función de uno o varios genes cuya función se encuentra alterada.

Para restaurar esta función se introduce el material genético en lo que se conoce como vectores. Estos vectores son el vehículo que utilizan los ácidos nucleicos para llegar a las células diana y restaurar la función normal de las células.

Esta terapia, con cerca de 30 años de desarrollo, se está convirtiendo en una prometedora herramienta para el tratamiento de muchas enfermedades humanas conforme se van aprobando en las agencias del medicamento europeas y americanas [1]. En la última década se han realizado más de 300 ensayos clínicos en fase I y fase II para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades genéticas [2].

Como industria, las empresas biotecnológicas que trabajan en este tipo de terapia y cotizan en la bolsa americana, concretamente incluidas en el índice NASDAQ, en 2016 tenían un valor de mercado que excedía los 4.000 millones de dólares americanos [3].

Las nuevas tecnologías para terapia génica no solo incluyen el uso de vectores para trasladar los ácidos nucleicos al tejido diana. En los últimos años, han surgido una serie de tratamientos para edición genómica basados en nucleasas bacterianas. Estos tratamientos, a diferencia de los que consisten en transportar material genético a través de los vectores, pueden potencialmente realizar otras maniobras a nivel génico, tales como la adición, delección, silenciamiento, etc [1].

Dentro de las enfermedades genéticas, se diferencian tres tipos principales. Las enfermedades cromosómicas, que afectan a grandes regiones del genoma mediante delecciones, duplicaciones o inserciones aberrantes en los distintos cromosomas; las de herencia compleja o multifactoriales, las cuales la alteración se da en múltiples genes al mismo tiempo y a menudo están fuertemente influidas por factores ambientales; y las monogénicas o mendelianas, que están asociadas a un solo gen.

La terapia génica está dirigida principalmente al tratamiento de las enfermedades monogénicas debido a la sencillez que presenta el hecho de tener que reemplazar la función de un solo gen bien definido y no dependiente de alteraciones ambientales [4].

Las enfermedades neurodegenerativas también son un foco de atención para el desarrollo de terapias génicas, sin embargo, la complejidad y el origen multigenético que presentan muchas de ellas, hace que su desarrollo sea un desafío mucho mayor que el tratamiento de enfermedades mendelianas [1].

Pese a la naturaleza compleja de las enfermedades neurodegenerativas, existen en desarrollo numerosas terapias génicas para tratarlas como por ejemplo terapias para Alzheimer, Parkinson, o la enfermedad de Huntington [5].

Numerosas enfermedades neurodegenerativas, aunque sean de naturaleza distinta, comparten rutas moleculares, patrones de reordenamiento del citoesqueleto, y defectos en los mecanismos de reparación del ADN [6]. Este hecho sumado al rápido avance en las tecnologías de secuenciación y la medicina personalizada abre un nuevo paradigma en el uso de las terapias génicas para tratar este tipo de enfermedades.

3.1.1. Tipos

Podemos clasificar las terapias génicas según varios criterios. Dos de ellos son el tipo celular al que van dirigidas, y el lugar donde se produce la manipulación.

En función del lugar en el que se produzca la manipulación podemos clasificar estas técnicas en terapia génica *in vivo* y terapia génica *ex vivo*:

- *In vivo*: En este tipo de terapia, los ácidos nucleicos que corrigen la función alterada serán introducidos directamente en el tejido diana donde se encuentra el tipo celular a tratar. Desde el punto de vista manipulativo, este método tiene como principal ventaja su simplicidad, puesto que simplemente basta con la inyección del vector en el tejido diana. Como desventaja tendríamos la inespecificidad, ya que al inyectarse en tejido, puede llegar mediante circulación sistémica a tejidos no deseados [7]. Este tipo de terapia ha sido utilizada con bastante éxito en el tratamiento de hemofilia, así como enfermedades visuales y neurológicas [8].
- *Ex vivo*: En este tipo de terapia las células afectadas son extraídas del paciente para ser modificadas y que se restaure el fenotipo correcto. Después se vuelven a introducir en el paciente. Como principal ventaja es que el tratamiento se dirige única y exclusivamente contra las células que han sido extraídas, lo que le da una especificidad absoluta. Otra ventaja es la inmunocompatibilidad, puesto que son células del propio paciente, por lo que se reduce considerablemente la posibilidad de rechazo. Su principal desventaja es la viabilidad celular. Puesto que deben ser capaces de soportar el procedimiento *in vitro*, y tener capacidad de dividirse posteriormente, hace que en algunos tipos celulares este tipo de procedimiento no sea posible [7]. Este tipo de terapia ha sido realizada con éxito en el tratamiento de enfermedades metabólicas hereditarias, enfermedades inmunitarias y algunos tipos de cáncer [8].

En función del tipo celular al que van dirigidas, las podemos clasificar en somáticas y germinales.

- La terapia génica germinal implica la modificación permanente del genoma en espermatozoides o en óvulos germinados, lo cual la hace potencialmente

transmisibles a la descendencia. Este hecho hace que, por razones éticas y legales, la terapia génica en células germinales no se pueda llevar a cabo [9].

- La terapia génica somática es la terapia dirigida a las células que proceden de las células madre durante el desarrollo embrionario y que no pertenecen a la línea germinal. Estas células conforman la mayoría de los tejidos de los seres vivos pluricelulares. La manipulación del material genético en este tipo celular no se transmite a la descendencia [7].

3.1.2. Vectores

Una vez se ha identificado el gen mutante que causa una enfermedad determinada, se procedería al siguiente paso que es la producción del gen terapéutico, el cual debe restaurar la función en las células diana. Para ello, como ya mencionamos previamente, ha de ser dispuesto en un vehículo llamado vector, cuya función es la de llevar el gen terapéutico a las células diana del paciente para que pueda introducirse y restaurar la función perdida [10].

La idoneidad del vector dependerá de la célula diana y sus características, así como la duración que se pretende que tenga la expresión y el tamaño del material genético que va a ser incorporado al vector [11].

No solo tiene que ser idóneo para el tipo celular, sino que además debe proteger al material genético de la degradación por nucleasas y otros sistemas enzimáticos, además de evitar reacciones inmunes [10]. Esto es especialmente importante en terapias *in vivo*.

Existen dos grandes categorías de vectores en este tipo de terapia, los virales y los no virales.

En el caso de los vectores virales se utilizan virus recombinantes para llevar el material genético a las células diana. De lo que se trata es de imitar los mecanismos de infección viral clásicos pero evitando la expresión de los genes virales que dan lugar a replicación y finalmente la patogenicidad del virus [12]. Estos vectores son los más usados en terapia génica. Aproximadamente el 70% de los vectores usados en los ensayos clínicos son vectores virales [13]. Pese a haber avanzado tanto el campo de las terapias génicas, tienen una serie de limitaciones que los hace poco interesantes en algunos casos. Entre ellas están: la posibilidad de producir fenómenos de carcinogénesis, gran inmunogenicidad, tamaño para cargar ADN bastante limitado, y dificultad de producción [14]–[16].

El uso de vectores no virales tiene el potencial de poder superar estas dificultades ya que tienen menor inmunogenicidad, pueden llevar material genético de mayor tamaño, y además son más fáciles de sintetizar [13], [17]. Sin embargo, los vectores no virales tienen como mayor desventaja la baja eficiencia de transfección que presentan con respecto a los vectores virales. Estos vectores sintéticos tienen muchas dificultades para llevar el material genético a la célula o tejido diana debido a la gran cantidad de barreras a las que tienen que hacer frente. Tales como la degradación de por las endonucleasas del suero sanguíneo,

interacciones no específicas, mediar la entrada celular, y conseguir la correcta expresión del material genético [13].

Además, en el caso de las células que no se dividen, como es el caso de las neuronas, siendo este uno de los tipos celulares que vamos a utilizar en este trabajo, y la impermeabilidad de la membrana nuclear presentan una dificultades añadidas a la llegada y expresión del plásmido en el núcleo debido a que estas características dificultan en gran medida la entrada del material genético [18].

Esta característica de baja eficiencia de transfección que se da los cultivos primarios frente a los cultivos de líneas celulares inmortalizadas es extrapolable hasta los contextos *in vivo*, donde las eficiencias de transfección de los vectores no virales también son muy bajas [19].

Entre los métodos no virales más comunes se encuentran los métodos físicos, como la electroporación, que pese a ser muy efectivo, se encuentra restringido a terapias *ex vivo*, debido a la dificultad que presenta el control de los parámetros físicos que permiten la entrada del material genético en la célula [20].

Otra estrategia muy usada son los métodos químicos, entre los que se encuentra el uso de lípidos o polímeros catiónicos, que interactúan de forma electrostática con el material genético, cargado negativamente [21]. En ocasiones se encuentran combinados con fosfolípidos en vesículas llamadas liposomas.

Durante años, el grupo de Neuroprótesis de la Universidad Miguel Hernández mantiene una colaboración con el grupo de investigación NanoBioCel (Universidad del País Vasco, Vitoria) en el que se ha trabajado con vectores no virales. Uno de los enfoques, usados tanto en este trabajo como en anteriores, para mejorar las formulaciones e intentar superar estos inconvenientes, como la dificultad de llegada al núcleo, ha sido la adición de una serie de compuestos a su formulación [22]. Estos vectores se llaman Niosomas.

3.1.2.1. Niosomas

Los niosomas son unos vectores no virales capaces de unirse al ADN y protegerlo de la degradación enzimática e introducirlo en la célula. Su formulación consiste en tres componentes: el lípido catiónico, responsable de la interacción electrostática con el material genético cargado negativamente; el surfactante o tensioactivo no iónico, que incrementa la estabilidad a largo plazo del niosoma, y los aditivos, los cuales se añaden para mejorar sus propiedades bioquímicas con el objetivo de mejorar la eficiencia de la transfección [23].

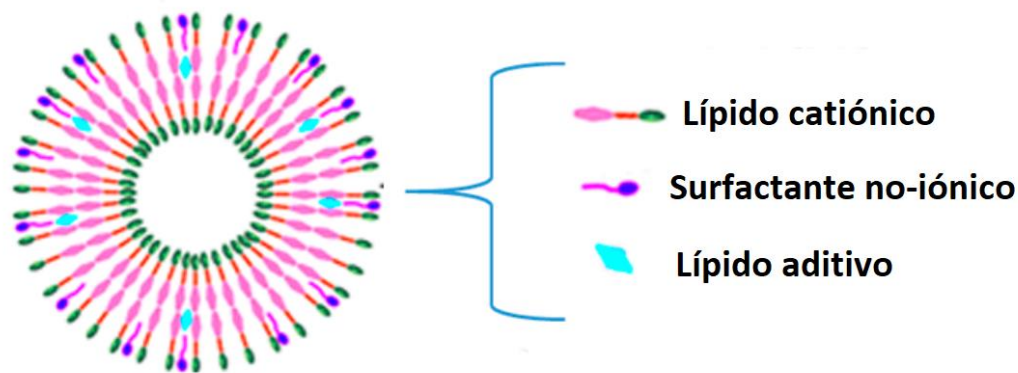


Figura 1 Estructura de los niosoma [21].

El nioplexo, que es la unión del niosoma al ADN, presenta baja toxicidad, son osmóticamente activos, tienen una formulación estable y son fáciles de manejar [23]–[25]. Estos nioplexos se forman con la simple adición del material genético a la dilución coloidal de los niosomas. Debido a la interacción electrostática entre los grupos amino de los lípidos catiónicos del niosoma cargados positivamente y los grupos fosfato del material genético cargados negativamente, la construcción (Nioplexo), puede conseguirse a diferentes ratios lípido/material genético con mucha facilidad [25].

El modo de acción de estos nioplexos cuando se utilizan *in vitro*, es a través de complejos de endocitosis. La transferencia de material genético al citoplasma ocurre cuando los complejos se fusionan con la membrana y se produce la ruptura del endosoma [26].

En las formulaciones basadas en niosomas utilizadas en este trabajo se planteó el uso de nanodiamantes o de esfingolípidos como compuesto aditivos para mejorar la eficiencia de transfección de estos vectores no virales.

3.1.2.2. Esfingosomas

Una de las mayores limitaciones a las que se encuentran los liposomas, vectores no virales basados en lípidos, es la inestabilidad química y física una vez se han administrado. Es por ello por lo que, en nuevos enfoques a la hora de sintetizar nuevas formulaciones, se ha propuesto el uso de esfingolípidos, lípidos complejos derivados de la esfingosina.

La inclusión de estas moléculas ha resultado en una mejora en parámetros tales como: eficacia de encapsulación, tiempo de circulación, resistencia a la hidrólisis y oxidación [27], y en el caso de la terapia génica, mejorar su eficiencia de transfección [28].

Otra de las aplicaciones de los esfingolípidos es su uso como compuesto aditivo en los niosomas. Los nioesfingosomas es el nombre que reciben los niosomas que utilizan los esfingolípidos como aditivo en la formulación, como es el caso de una de las formulaciones utilizadas en este trabajo (P10). El hecho de añadir esfingolípidos como aditivo a los niosomas les confiere estabilidad, mayor tiempo de circulación en sangre así como una reducción de la citotoxicidad [29].

3.1.2.3. Nanodiamantes

Los nanodiamantes (ND) son un tipo de nanopartícula de esqueleto de carbono incluida dentro de una familia de nanopartículas de similar naturaleza y cuya clasificación está basada en su síntesis y su posterior procesamiento [30].

El interés de este tipo de nanopartículas reside en su producción masiva a gran escala, su pequeño tamaño (~ 4 a 5 nm) y su biocompatibilidad, lo que le otorga gran potencial en aplicaciones biotecnológicas [31].

Una de estas aplicaciones es la terapia génica, concretamente por su potencial de actuar a modo de vector o *nanocarrier* al ser capaz de unir ácidos nucleicos y transportarlos de forma específica al tejido diana.

Para ello, los nanodiamantes deben estar acomplejados con otros polímeros o lípidos catiónicos, de forma que puedan unirse a ácidos nucleicos de interés por atracciones electrostáticas [32].

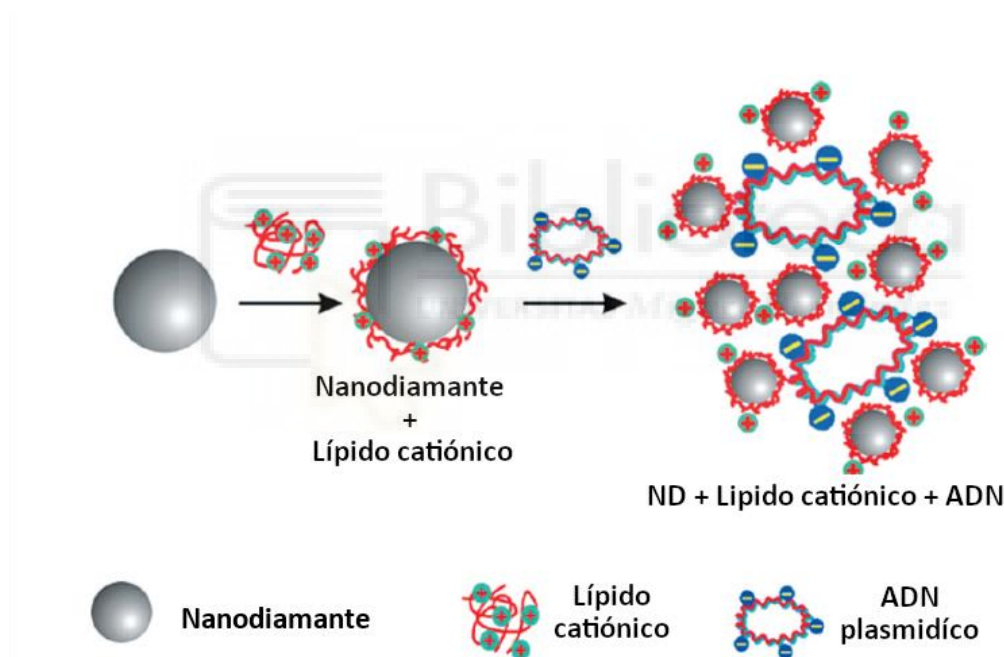


Figura 2 Formación del complejo nanodiamantes - lípido catiónico - plásmido [33]

Una de las formulaciones utilizadas en este trabajo, llamada ND12, utiliza los nanodiamantes monodispersos como compuesto aditivo del niosoma para aumentar la eficiencia de transfección del vector no viral. Este tipo de niosoma recibe el nombre de nanodiasoma.

3.2. Optogenética

La optogenética es la combinación de las técnicas de la genética y de la óptica para modular funciones de ganancia o de pérdida de función en células y/o tejidos nerviosos. Esta tecnología nos permite controlar de forma rápida y precisa fenómenos de excitación e

inhibición neuronal y monitorizar esta actividad en toda una suerte de seres vivos, incluidos humanos [34].

Los métodos optogenéticos surgieron a partir de la identificación y clonación de proteínas transmembrana de conocidas como opsinas microbianas, las cuales son similares en cuanto a la función transportadora de iones, a las opsinas de las retinas de animales, aunque con diferentes mecanismos. Puesto que las opsinas modulan los potenciales de membrana al absorber fotones, estas proteínas pueden utilizarse para controlar la actividad nerviosa cuando, con métodos de bioingeniería, se introducen en otras células excitables de interés.

3.2.1. Opsinas

En animales vertebrados, las opsinas son proteínas transmembrana que forman parte de la molécula fotosensible rodopsina y conopsina. Funcionan como moléculas fotorreceptoras en animales [35]. Estas proteínas, sin embargo, no son homólogas con las encontradas en arqueas, bacterias, y algas aunque si análogas [36].

Por otra parte, las canalrodopsinas son proteínas transmembrana ionotrópicas, no así las opsinas de las retinas animales, que son metabotrópicas. Esto significa que funcionan y tienen formas y mecanismos de activación distintos (Figura 3), así como con orígenes filogenéticos diferentes, sin embargo, el resultado final de la activación de una y otra es un cambio de cargas iónicas.

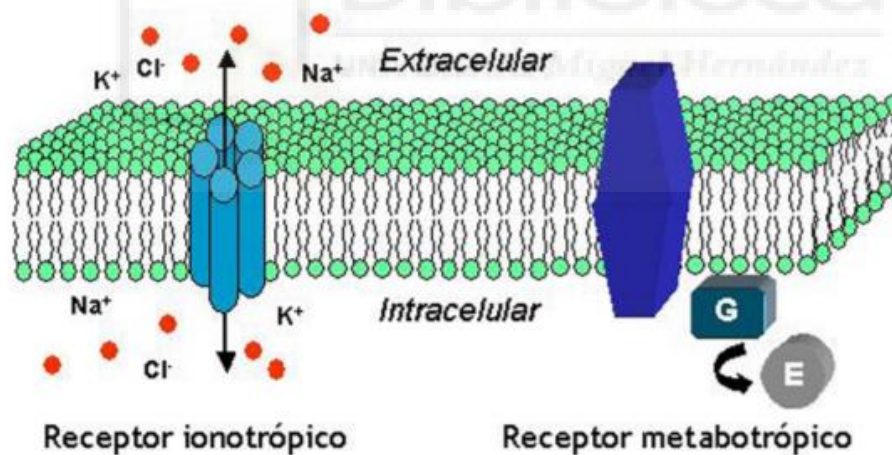


Figura 3 Representación esquemática de los receptores ionotrópicos y los metabotrópicos. Ionotrópicos, forman canales transmembrana que dejan pasar iones; metabotrópicos, acoplados a proteínas G (G), que modulan la actividad de enzimas (E) [37].

Las opsinas microbianas que se han usado en el campo de la optogenética para modificar la excitabilidad neuronal son tres: bacteriorodopsina, halorodopsina y canalrodopsina. Las dos primeras tienen efectos hiperpolarizantes, es decir inhibitorios de la actividad nerviosa, mediante distintos mecanismos.

La bacteriorodopsina saca protones desde el interior celular, y la halorodopsina conduce los aniones Cl desde el medio extracelular al interior celular, haciendo el potencial de la

membrana neuronal más negativo, hiperpolarizándolo y haciéndolo por tanto menos excitable [38, p. 12].

Canalrodopsina por su parte, presenta diferentes variantes que pueden ser estimuladas por diferentes longitudes de onda y que pueden transportar tanto cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) con función despolarizante, favoreciendo así la excitación, como aniones (Cl^-), que favorecen la hiperpolarización, provocando inhibición [38, p. 13].

Estas opsinas microbianas pueden ser selectivamente excitadas con luces de longitud de onda distinta, lo que permite modular de una forma mucho más rápida y precisa en paso de iones a través de la membrana y por tanto la actividad neuronal puesto que este tipo de células tienen mecanismos que generan señales eléctricas basándose en el flujo de iones a través de sus membranas plasmáticas.

Las neuronas tienen un potencial en reposo, llamado “potencial de membrana en reposo”, es el voltaje que hay entre el interior y el exterior de las células neuronales. Se produce como consecuencia de una separación de cargas a través de la membrana, causado por la existencia de un gradiente de concentración de un lado a otro de la membrana.

El potencial de acción se es un fenómeno que suprime la negatividad potencial de reposo y lo convierte en positivo. Los potenciales de acción se transmiten a través de axones neuronales actuando como señal básica de transmisión de información.

Para que se den lugar todas estas señales debe haber un sistema de intercambio iónico con permeabilidad selectiva y una distribución de cargas no uniforme entre el medio intracelular y extracelular respectivamente. Ocurre gracias a la existencia de canales iónicos dependientes de voltaje.

El potencial de acción no es sumable, esto significa que no se puede crear dos potenciales de acción en un mismo momento y que la respuesta sea doble; al mismo tiempo que no es graduable, ya que presenta respuestas de “todo o nada”, sin puntos intermedios. Es por esto por lo que se propaga sin decremento a lo largo de la membrana, ya que se regenera en cada punto.

El interés de las opsinas microbianas en neurociencia, reside en el hecho de que son canales transmembrana ionotrópicos que van a activarse de forma selectiva a determinadas longitud de onda dejando pasar iones y por tanto modulando la actividad neuronal de una formas más rápida y eficiente que con las opsinas de vertebrados [39]

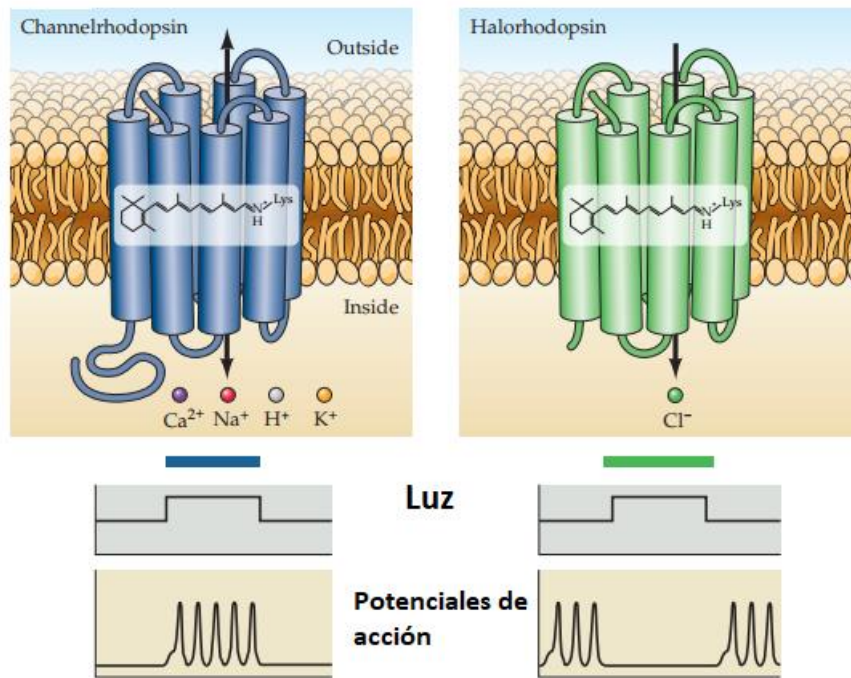


Figura 4 Estructura molecular de las opsinas bacterianas y función electrofisiológica. Izquierda, canalrodopsina, provoca excitación al hacer entrar cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) cuando se estimula con luz azul y por tanto mas potenciales de acción, representados abajo. Derecha, halorodopsina, inhibición dejando entrar aniones Cl^- , representando abajo la inhibición al estimular con la luz verde [38, p. 14].

En el transcurso de este trabajo nos centraremos en canalrodopsina (ChR). Consiste en una proteína transmembrana con el extremo N-terminal orientado hacia el exterior, y un dominio C-terminal orientado hacia el exterior. El módulo N-terminal comprende siete hélices transmembrana y el cromóforo retinal [40].

Hasta 2014 todas las canalrodopsinas se activaban en el espectro del azul – verde (430 – 550 nm) [41]. No fue hasta 2014, cuando mediante una serie de investigaciones en el campo de la ingeniería de proteínas, pudieron dar lugar ChrimsonR (ChRR), una proteína que se activa con una longitud de onda cercana en el espectro del rojo – amarillo con una cinética igual de rápida que ChR2, hecho importante debido a la necesidad de que la cinética de apertura y cierre de la proteína transmembrana sea lo más rápida posible, para así poder modular el flujo de cationes sodio con más precisión [41].

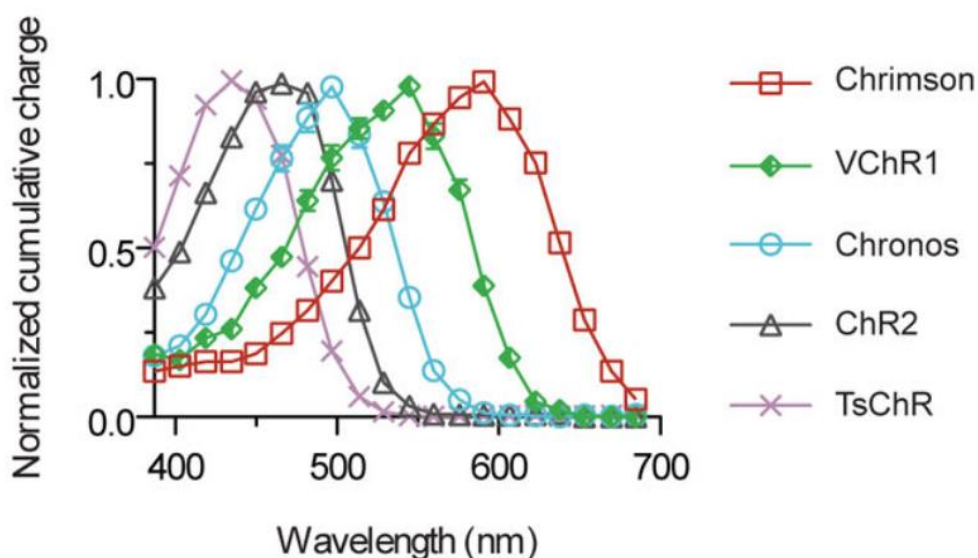


Figura 5 Representación del espectro de acción de las canalrodopsinas en función de un flujo de fotones normalizado a escala 0 – 1 [42]. Los picos de absorción de fotones de Chrimson y ChR2 están desplazados uno hacia el rojo y otro al azul respectivamente.

El pico de absorción de fotones de ChrimsonR es de 590 nm de longitud de onda [42], lo cual la hace mucho más segura para la clínica, puesto que la luz azul es menos penetrante que la luz ámbar (590 nm) [43]. Por estas razones, hemos seleccionado esta proteína para nuestro estudio.

4. Objetivos

El grupo de investigación de Neuroprótesis en el Instituto de bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández, mantiene desde hace varios años una colaboración con el grupo de investigación NanoBioCel (Universidad de País Vasco, Vitoria) para validar la capacidad de transfección de vectores no virales para transfectar células del sistema nervioso.

El objetivo principal de este trabajo es la validación de vectores no virales como posibles aproximaciones terapéuticas en la recuperación funcional de poblaciones neuronales mediante técnicas de optogenética para su aplicación en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en dos modelos celulares distintos: los cultivos primarios de corteza embrionaria de rata, utilizados en previos trabajos [21], [44], [45] como modelo para enfermedades neurodegenerativas cerebrales y la línea celular NSC – 34 como modelo base para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la medula espinal.

Para ello hemos establecido varios objetivos específicos:

- Validar la capacidad de transfección de dos formulaciones de vectores no virales ND12 y P10 con el plásmido ChrimsonR frente al vector comercial control, tanto en cultivos primarios de corteza cerebral embrionaria de rata como en la línea

celular con actividad electrofisiológica NSC – 34, derivada de células de neuroblastoma N18TG2 y neuronas motoras embrionarias de la médula espinal de ratón.

- Validar la funcionalidad de las células neuronales transfectadas mediante la caracterización electrofisiológica en respuesta a la estimulación lumínica.
- Conocer los efectos citotóxicos asociados al tratamiento con ambas formulaciones de vectores no virales.

5. Material y métodos

5.1. Extracción del plásmido y cuantificación de la pureza

El plásmido utilizado fue pCAG-ChrimsonR-tdT [42], obtenido a partir de bacterias crioconservadas. Para conseguir una alta cantidad de material bacteriano, se cultivó de forma selectiva en medio LB (*Lysogeny Broth*) con ampicilina, ya que la bacteria que contiene de interés posee genes de resistencia este antibiótico.

Tras la incubación de las células durante 24 horas a 37 °C, se centrifugó en una ultracentrifugadora (*Beckman Coulter, Avanti J-30I*) a 6.000 revoluciones por minuto durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se utilizó el kit comercial *QIAGEN Plasmid Mini Kit (MaxiPrep)*. Este tipo de kits se basan en la precipitación por gravedad y filtros de intercambio iónico, para separar y purificar distintos tipos de moléculas de interés, en nuestro caso ADN plasmídico.

La concentración y contaminación del material genético extraído se cuantificó mediante un *NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific (NanoDrop)*. Este dispositivo mide la concentración de ADN en ng por μL , además de la proporción o ratio de absorbancia en A260/A230 indicando contaminación por polisacáridos y compuestos fenólicos, y el ratio A260/A280, indicando contaminación por componentes proteicos [46], [47].

5.2. Experimentos in vitro

5.2.1. Preparación de las placas multipocillo de cultivo celular y electrodos

Para este trabajo se utilizaron tres tipos de placas de cultivo: placas de 24 pocillos, placas de 96 pocillos y placas de multielectrodo o MEA o *multi-electrode array (60MEA200/30iR-Ti-gr, Multi Channel Systems MCS GmbH)*. Las placas multipocillo de 24 pocillos fueron empleadas para realizar los ensayos de transfección y optimizar las proporciones de transfección adecuadas para cada tipo celular, mientras que los de 96 pocillos se utilizaron para los ensayos de citotoxicidad. Una vez obtenidos los parámetros óptimos, se realizaron los cultivos sobre los electrodos de registro.

El primer paso en la preparación del cultivo en monocapa es la adición en la superficie del pocillo, de Poli-D-Lisina hidrobromuro (PDL) para los cultivos primarios y Poli-L-Lisina

(PLL) para la línea celular NSC-34, ambas de la casa comercial *Sigma-Aldrich* a una concentración de 0,01 y 0,02 mg/mL respectivamente. El motivo de hacer esto es que tanto PDL como PLL ayudan a la adhesión de las células al suelo del pocillo ya que al ser un compuesto policatiónico, interactúa con las zonas aniónicas de las células [48] permitiendo una atracción electrostática que las mantiene unidas.

Las placas fueron incubadas durante 24 horas en unas condiciones de 5% de oxígeno, 5% CO₂ y 37 °C de temperatura. Tras pasar las 24 horas retiramos el PDL y hacemos 3 lavados con tampón fosfato salino. Por último, añadimos laminina, componente principal de las membranas que mejora la proliferación y adhesión celular a una concentración de 12 µg/µL.

5.2.2. Cultivo primario de corteza cerebral embrionaria de rata

Los cultivos de las células embrionarias de corteza de rata se sembraron en placas multi pocillos tanto para los experimentos de puesta a punto de la transfección y citotoxicidad, y en MEAs en el caso de los cultivos para los registros de fotoestimulación.

El tejido de corteza fue extraído de embriones de rata *Sprague Dawley* en el día 17 de gestación. Fueron depositados en medio HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution formulations with calcium and magnesium, Gibco™*). Una vez extraída y separada la corteza cerebral embrionaria se disgregó mecánicamente.

Es importante trabajar en condiciones de esterilidad, por lo que en proceso se realizó en cabina de flujo laminar y con material estéril. El tejido disgregado fue recogido y pasado a un tubo *Corning* de 15 mL.

Después de la disgregación mecánica se procedió a hacer una disgregación química con tripsina (*Trypsin-EDTA 0.05%, Gibco™*). El sobrenadante de este tubo se descartó para posteriormente añadir una solución de tripsinización consistente en 1 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco™*) y 200 µL de tripsina. Este tubo se incubó a 37 °C durante 10 minutos.

Para detener la reacción de proteólisis de la tripsina, se eliminó el sobrenadante, se añadió medio de cultivo celular con suero (medio de cultivo NSC – 34 [Anexos](#)) y se centrifugó a 1750 revoluciones por minuto durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y añadimos 1 mL de medio de cultivo primario ([Anexos](#)) a nuestro disgregado celular.

Para las placas de 96 pocillos se sembraron 15.000 células por pocillo, para las de 24 pocillos se sembraron 150.000 células por pocillo y para las placas de cultivo MEA se sembraron unas 300.000 células por pocillo intentando que queden lo más centradas posible sobre la región de los electrodos para optimizar el posterior registro.

Las placas fueron mantenidas en el incubador en unas condiciones de 5% CO₂ y 37 °C de temperatura a lo largo de toda la duración de los experimentos.

5.2.3. Cultivo de la línea celular NSC-34

Además de los cultivos primarios de corteza cerebral, la línea celular NSC-34 (*CELLutions Biosystems*), es una línea inmortalizada híbrida entre las células de neuroblastoma N18TG2 y neuronas motoras embrionarias de la médula espinal de ratón [49].

Estas células han demostrado tener características, pese a ser una línea celular inmortalizada, similares a las neuronas motoras, como por ejemplo los neurofilamentos [49], sirve como modelo experimental para enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica [50] y lo más importante, presenta actividad electrofisiológica [51].

El hecho de trabajar con líneas celulares presenta una serie de ventajas frente a los cultivos primarios como son: reproducibilidad, puesto que son células clonales; rapidez, al no depender de animales de experimentación; y por último cuestiones de coste y, no menos importante, reducción del uso de animales de experimentación.

Esta línea celular ha sido estudiada especialmente como modelo para comprender los mecanismos del desarrollo neuronal, diferenciación y estrés oxidativo [52], [53]. Sin embargo, apenas ha sido estudiada sus propiedades electrofisiológicas [51], [54].

Estas células, al igual que los cultivos de las células embrionarias de corteza de rata se sembraron en placas multi pocillos tanto para los experimentos de puesta a punto de la transfección y citotoxicidad, y en MEAs en el caso de los cultivos para los registros de fotoestimulación.

Para la siembra se utilizó una de las placas de mantenimiento en un estado de confluencia superior al 50% para que el número de células sea lo suficientemente alto.

Para sembrar se aspiró el medio de cultivo y se lavó la placa dos veces con 5 mL de una disolución de tampón fosfato salino (PBS) a una concentración de 9,55 g/L. Esto es necesario puesto que el suero bovino fetal (FBS) que contiene el medio, inhibe la tripsina al contener proteasas como Alfa 1-antitripsina y por tanto las células no se separan. Tras lavar se añadieron 3 mL de tripsina y la placa fue incubada durante unos minutos. Posteriormente se recogió un volumen de entre 0,5 y 3 mL de células disgregadas en la placa, en función de la cantidad de células que prevemos necesitar, y la fue pasada a unos 5 mL de medio de cultivo para centrifugar a unos 40 G. Este procedimiento se hizo para inhibir y quitar la tripsina. Una vez centrifugado se retiró el sobrenadante y resuspendimos el pellet en 1 mL de medio de cultivo. Para las placas de 24 pocillos se sembró a una concentración de 5.000 células/pocillo, para las de 96 pocillos se sembraron a una concentración de 2.000 células/pocillo y de 20.000 células/pocillo en las placas de multielectrodo.

Al igual que con el cultivo primario, las placas fueron mantenidas en el incubador en unas condiciones de 5% CO₂ y 37 °C de temperatura durante todo el experimento.

5.2.4. Construcción del complejo plásmido - vector

La cantidad de plásmido utilizada por pocillo fue de 0,25 µg en las placas de 96 pocillos, 1,25 µg en las placas de 24 pocillos, y de 2,5 µg en los MEA. El proceso de construcción del complejo es el mismo en todos los vectores que se utilizan en este trabajo, solo cambiando las cantidades para que se ajuste a la concentración de plásmido o de vector de la que partimos o queremos conseguir.

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron los nanodiasomas ND-12 [32] y los nioesfingosomas P10, proporcionados por el grupo de investigación NanoBioCel. Los nanodiasomas y los nioesfingosomas son una formulación de niosomas en las que se utiliza el lípido catiónico DOTMA (1,2- di -O - octadecenilo -3- tri metil propano de amonio), el surfactante no iónico Polisorbato 20, y nanodiamantes ([Nanodiamantes](#)) monodispersos como aditivo en el caso de ND12 o esfingolípidos ([Esfingosomas](#)) en el caso de P10. Los detalles en cuanto a la formulación y síntesis son tarea del grupo NanoBioCel y por tanto el objetivo de este trabajo se centra exclusivamente en la evaluación y validación *in vitro* de ambas formulaciones en modelos celulares del sistema nervioso.

Para la construcción de los vectores se usaron diferentes proporciones plásmido - vector, a saber 10, 8, 5, o 2 µg de vector por cada 1 µg de plásmido. Para el control positivo, utilizamos Lipofectamina (*Lipofectamine 2000 Transfection Reagent, Thermo Fisher Scientific*) a una proporción de 2 µg de Lipofectamina por cada 1 µg de plásmido.

Para la construcción del complejo plásmido - vector, utilizaremos dos tubos Eppendorf en los que añadimos Opti-MEM (*Reduced Serum Medium, Gibco™*). Este es un medio mínimo, que permite una reducción del suero, lo que afecta positivamente a la eficiencia de transfección con lípidos catiónicos [55]. El volumen final de Opti - MEM dependió del tamaño del pocillo, siendo de 500 µL para los pocillos multielectrodo (MEA), 250 µL para las placas de 24 pocillos y de 50 µL para las placas de 96 pocillos.

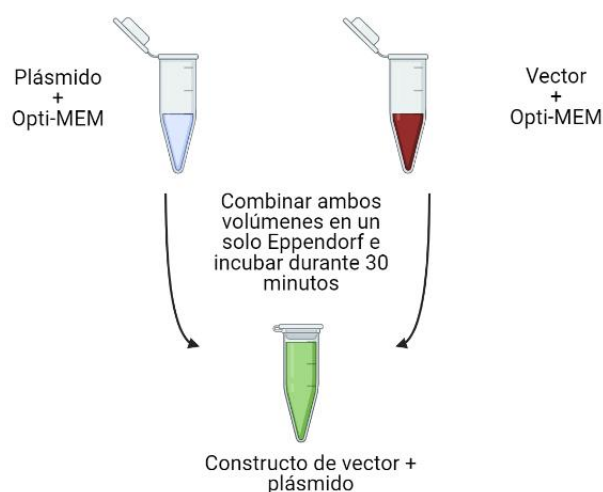


Figura 6 Esquema del procedimiento seguido en el laboratorio para la construcción del complejo plásmido - vector.

En el tubo del plásmido se pipeteo el volumen ajustado a la concentración que tenemos, del plásmido purificado en el apartado [Extracción del plásmido](#), con la cantidad adecuada de Opti-MEM hasta alcanzar el volumen final en función del tamaño del pocillo.

En el tubo del vector se pipeteo el volumen de vector en función de la ratio que fuera a utilizarse junto con el volumen de Opti-MEM necesario hasta alcanzar el volumen final en función del tamaño del pocillo.

Las proporciones utilizadas para los vectores ND12 y P10 fueron:

Tabla 1 Proporciones utilizadas para en el constructo plásmido - vector

Vector (μg)	Plásmido (μg)
10	1
8	1
5	1
2	1

Tras realizar esa preparación, se juntaron los dos volúmenes en un mismo tubo para dejarlos incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos. Este tiempo de incubación es necesario para que plásmido y vector se unan para formar el complejo por unión electrostática.

5.2.5. Transfección

Durante la incubación, se quitó la mitad del medio de cultivo a cada pocillo para evitar tanto que haya demasiado volumen como que el suero que contiene el medio de cultivo pueda interferir con el nioplex.

En el caso de los cultivos primarios, esta mitad del medio de cultivo se guardó para ser repuesto posteriormente, debido que contiene factores neurotróficos que evitan el estrés a las células de nuestro cultivo primario [56].

Una vez pasados los 30 minutos de incubación se transfirió el volumen de los tubos al pocillo correspondiente. Tras ello, las placas se incubaron durante 3 horas en el caso de la línea celular y 4 horas en el caso de los cultivos primarios.

Una vez transcurrido el tiempo, se retiró de los pocillos el medio de cultivo con Opti-MEM y el nioplex y se repuso con medio de cultivo nuevo a 37 °C, siendo en el caso de los cultivos primarios la mitad del recogido previo a la adición de los nioplexos a los pocillos.

5.2.6. Ensayos de citotoxicidad

Para comprobar la citotoxicidad de los distintos tratamientos con los vectores utilizados, se realizaron los ensayos de MTT o Bromuro de 3 - (4, 5 - dimetiltiazol -2 - ilo) - 2, 5 - difeniltetrazol (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich*). El propósito de este experimento es el de medir la cantidad de viabilidad celular en placas de 96 pocillos y por tanto extrapolar la citotoxicidad de este tratamiento.

Las células en buen estado tendrán mayor actividad mitocondrial, la cual es capaz de transformar el MTT o sal de tetrazolio en cristales de formazan, el cual al disolverse en DMSO (Dimetil sulfóxido) da un color morado [57]. La intensidad del color, que es directamente proporcional a la viabilidad celular, se medirá en un espectrofotómetro a 570 nm de longitud de onda. De ahí por tanto debemos extrapolar que, a mayor intensidad de color, o a lo que es lo mismo, mayor absorbancia, mayor viabilidad celular.

Este ensayo experimento se puede realizar tanto en líneas celulares como en cultivos primarios. En nuestro caso fue realizado tanto cultivos de células embrionarias de corteza de rata, como en la línea celular NSC-34.

Las placas de 96 pocillos se sembraron con 30.000 células por pocillo en el caso de los cultivos primarios y con 2.000 en el caso de la línea celular NSC-34. Los tiempos de maduración que se dejaron tras la siembra, antes de aplicar los tratamientos, fueron de 7 días para los cultivos primarios y de 48 horas para las células NSC-34.

Tanto para los vectores ND12 como los P10, se hicieron dos placas, una en la que se aplicó el tratamiento siguiendo el protocolo de los aparatados [Construcción del complejo plásmido - vector](#) y [Transfección](#). En una placa el tratamiento fue aplicado durante 48 horas y otra durante 72 horas. Para los cultivos primarios solo se aplicó el tratamiento durante 72 horas, puesto que es necesario esperar más tiempo para ver resultados en la variación de la viabilidad a causa de su metabolismo, más lento en relación a las líneas celulares inmortalizadas [58].

Los grupos experimentales aplicados fueron los dos vectores por separado usando las ratios 10:1, 8:1, 5:1, y 2:1, con y sin plásmido unido en el caso de las células NSC – 34 y solo vector no viral para el cultivo celular primario. El objetivo de este diseño experimental fue encontrar las proporciones optimas de transfección y viabilidad.

Tras estar aplicado el tratamiento con vectores durante las 48 horas o 72 horas necesarias, se añadió a los pocillos 40 µL de una disolución de MTT en PBS (5 mg/mL) y se incubó durante 3 horas en el caso de la línea celular NSC-34 y 4 horas en el caso de los cultivos primarios.

Tabla 2 Resumen de los tratamientos aplicados y parámetros utilizados en cada ensayo de citotoxicidad celular en función del tipo celular.

Tipo celular	Número de células/pocillo	Tiempo de aplicación del tratamiento	Tiempo de incubación con MTT	Ratio μg de vector μg de plásmido
Cultivo primario de córtex embrionario de rata	30.000	48 horas	4 horas	10:1
				8:1
				5:1
				2:1
Cultivo línea celular NSC - 34	2.000	48 horas	3 horas	10:1
				8:1
				5:1
		72 oras		2:1

Transcurridas las horas de incubación, se retiró todo el medio y se añadió 100 μL de DMSO por pocillo para solubilizar los cristales de formazan. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm usando un lector de placas (*Rayto Microplate Reader RT-2100C, PioWay*).

5.3. Registro de actividad neuronal y fotoestimulación

5.3.1. MEA

Una de las formas que se pueden utilizar para medir la actividad electrofisiología de un cultivo neuronal es utilizar los MEA. Estos se basan en los principios previamente mencionados sobre el intercambio iónico, el cual causa un cambio en el voltaje en el medio extracelular que es recogido por los electrodos de la placa.

La configuración física del MEA consiste en una placa de cultivo atravesada en su base por serie de electrodos cuya composición normalmente se trata de óxido de indio y estaño o titanio y con un diámetro por electrodo de entre 10 y 30 μM . Los electrodos van a ser capaces de detectar cambios en el voltaje extracelular a causa de la entrada rápida de sodio en una célula durante un potencial de acción [59, p. 22].

Trabajar con este tipo de electrodos puede servirnos para obtener información sobre la dinámica espacial y temporal de las células que generan actividad y para monitorizar cambios en la actividad electrofisiológica en largos periodos de tiempo. Técnica que no sería posible con electrodos individuales convencionales [60] o técnicas para registrar en una célula única como por ejemplo *patch clamp*.

El equipo necesario para trabajar con este tipo de electrodos comprende: una placa de cultivo específica para las células, un amplificador para las señales, un dispositivo de

mantenimiento de las condiciones celulares de temperatura y un ordenador para guardar y procesar las señales [61].



Figura 7 Imagen de la placa de electrodos 60MEA100 (l Multi Channel Systems MCS GmbH, Alemania).

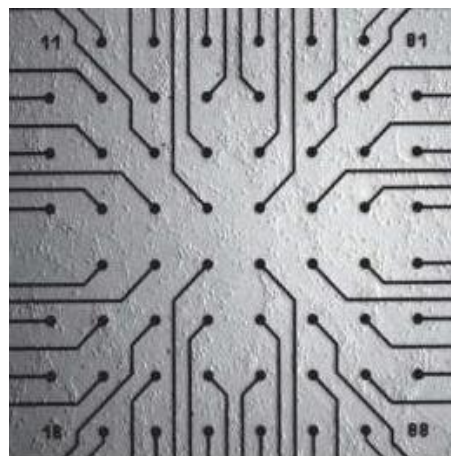


Figura 8 Disposición de los electrodos vistos al microscopio óptico de campo claro a 10 aumentos.

La principal ventaja de estos multi electrodos es su resolución espacial, es decir, la capacidad de registrar la actividad en poblaciones neuronales, en contraste con otras técnicas, como *patch clamp*, que utilizan células individuales [59, p. 22].

Tras sembrar los MEAs con células de cultivo primario y dejarlos en incubación se les permitió madurar entre 7 y 12 días para que desarrollaran actividad espontánea, es decir, potenciales de acción. Se dejaron transcurrir esos días para que ocurran los procesos de sinaptogénesis y diferenciación celular [62]. En el caso de la línea celular NSC – 34, el tiempo es de 5 días y evitando que lleguen a más de un 70% de confluencia [51]. Una vez comprobado que tenían actividad espontánea, se transfectaron siguiendo el procedimiento del apartado [Construcción del complejo plásmido - vector](#) y [Transfección](#).

Los registros fueron grabados con el hardware de adquisición MEA 1060 -BC (*Multi Channel Systems MCS GmbH*), conectado a un chip de fotoestimulación Arduino (*Arduino Uno Rev3, Arduino*) como controlador de la fotoestimulación, que nos permitió modular tanto la frecuencia como la duración de los pulsos de luz a emitidos a través de LED.

La plataforma a su vez está conectada a un controlador de temperatura (*TC02, Multi Channel Systems MCS GmbH*) que nos permitió mantener la temperatura del MEA a 37 °C durante el tiempo de duración de los registros.

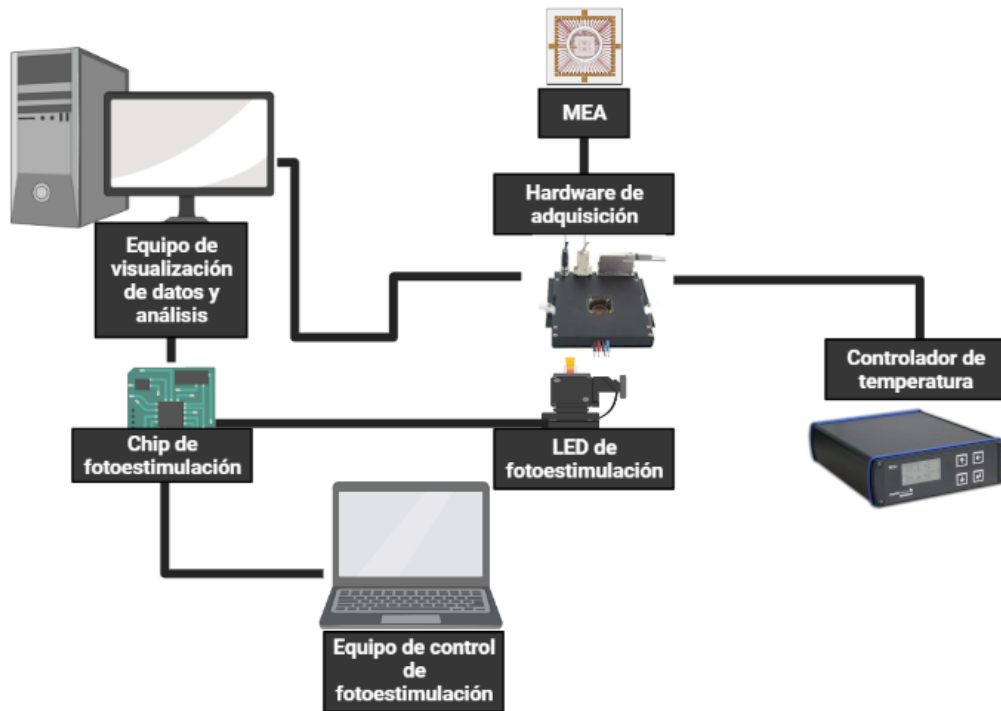


Figura 9 Representación esquemática de la configuración utilizada para los registros y fotoestimulación.

Tras dejar 5 minutos previos de reposo al MEA en el *set-up* para estabilizar en la medida de lo posible las condiciones del cultivo, especialmente la temperatura, se hicieron 5 registros de actividad. Un primer registro de 260 segundos en el que no se utilizaba fotoestimulación, con el propósito de obtener una referencia o control de la actividad basal, y otros 4 registros en los que se aplicaron 100 pulsos de fotoestimulación en orden creciente de duración (50 ms, 100 ms, 250 ms, 500 ms) con el fin de encontrar el pulso óptimo de estimulación. Para los controles negativos se utilizaron los mismos protocolos de fotoestimulación habiendo desconectado el LED previamente.

El LED utilizado fue de luz ámbar a 595 nm de longitud de onda (*LED595LW - 595 nm, 45 mW, TO-39, ThorLabs*), ya que es la óptima para la activación de la proteína optogenética ChrimsonR [42].

Tabla 3 Detalle de los 5 protocolos de registros y fotoestimulación que se tomaron por cada MEA en orden secuencial

Número de registro	Registro 1	Registro 2	Registro 3	Registro 4	Registro 5
Tiempo de pulso de LED	0 ms	50 ms	100 ms	250 ms	500 ms
Tiempo de LED apagado	0 ms	2000 ms	2000 ms	2000 ms	2000 ms
Número total de pulsos	0	100	100	100	100

Los registros fueron adquiridos mediante el software MC_Rack versión 4.6.2 (*Multi Channel Systems MCS GmbH*) aplicándose a la toma de señales el filtro *Bandstop resonator* a una frecuencia de 50 Hz y el filtro *Butterworth 2nd order* con una frecuencia de corte de 200 Hz.

Los registros fueron guardados para su posterior análisis.

5.3.2. Análisis de los registros de multielectrodo

Una vez tomados los registros se extrajeron los potenciales de acción con el software MC_Rack versión 4.6.2. Para ello se utilizó la aplicación *Spike Sorter* del programa MC_Rack que nos permite, estableciendo un umbral de voltaje, determinar que toda oscilación que lo supere sea contabilizada como un evento o *spike*. El umbral utilizado fue 5 veces la desviación estándar de la señal de ruido de cada canal

Tras separar los *spikes* de los registros, se guardaron de nuevo, pero esta vez solamente los *spikes* y los pulsos de fotoestimulación para su posterior análisis con el software NeuroExplorer versión 5.035 (*Nex Technologies*).

Con este programa se realizaron los siguientes análisis:

1. Histogramas periestímulo: este análisis muestra la probabilidad de que haya un *spike*, representado en el eje Y, un tiempo antes y un tiempo después, representado en el eje de las X, tomando como referencia un evento, en nuestro caso la fotoestimulación. El objetivo de este análisis es el de cuantificar si la cantidad de *spikes* aumenta en t_0 (fotoestimulación) + t.
2. Histogramas de frecuencia: Este histograma muestra la frecuencia de *spikes*, representados en el eje de las Y, a lo largo del tiempo en el eje de las X. El objetivo

de este análisis es el determinar si, pese a no haber coordinación en cuanto a la fotoestimulación y la respuesta, hay un aumento generalizado en la frecuencia de *spikes* cuando fotoestimulamos en comparación con el control.

Ambos tipos de análisis se realizaron combinando todos los *spikes* detectados en los canales del electrodo en un solo canal para ofrecer la respuesta global del MEA a la fotoestimulación.

5.3.3. Voltage clamp y fotoestimulación

Otra de las técnicas utilizadas para caracterizar electrofisiológicamente las células es el método *voltage clamp*, una metodología ampliamente usada en multitud de campos, desde la neurociencia a la cardiología [63]. En esta técnica, una pequeña pipeta de cristal se utiliza para hacer contacto con un área pequeña de la membrana celular con el objetivo de obtener datos específicos y concretos del flujo de iones en la membrana celular mediante la medición y posterior extrapolación de datos electrofisiológicos.

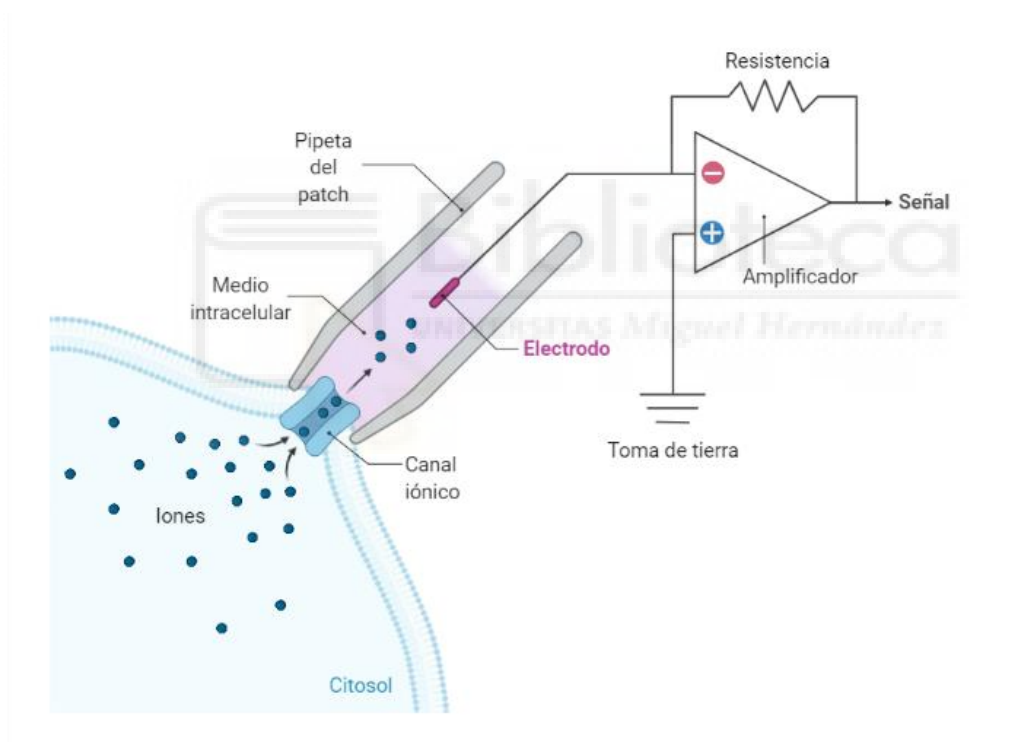


Figura 10 Representación esquemática del funcionamiento de la técnica *voltage clamp*

El *voltage clamp* nos permite mantener el potencial de membrana a un nivel deseado y observar las variaciones del voltaje producidas como consecuencia de la actividad espontánea de la célula o en respuesta a la aplicación de un estímulo. En lo que concierne a nuestro trabajo, la técnica *patch clamp* fue utilizada para la caracterización electrofisiológica de las células NSC - 34 debido a la imposibilidad de detectar potenciales de acción mediante en este tipo de cultivo con los MEA. Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos con un cubreobjetos con un diámetro de 12 mm (*BPD011, RS FRANCE*) de manera que puedan transportarse las células adheridas al cubreobjetos fuera

de la placa habiendo sido previamente tratadas siguiendo el procedimiento [Preparación de las placas multipocillo de cultivo celular y electrodos](#). La densidad de siembra fue de 10.000 células/pocillo. Las placas fueron incubadas durante 5 días ya que es el tiempo de maduración necesario para que las células tengan actividad espontánea [51].

Tras los 5 días de incubación y habiendo alcanzado un porcentaje de confluencia superior al 50% se aplicó el protocolo de [Transfección](#) usando únicamente como vector el control positivo de Lipofectamina debido a los resultados negativos obtenidos previamente con los vectores ND12 y P10.

Los registros se realizaron utilizando el amplificador HEKA EPC10. Las pipetas de registro tenían una resistencia de entre 2 y 5 $2-5 \text{ M}\Omega$. El medio intracelular fue preparado a las siguientes concentraciones: 130 mM K⁺-gluconato, 10 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.133 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 3.5mM MgATP y 1mM NaGTP. Durante el experimento, se utilizó como medio extracelular la disolución de Tyrodes [54] ([Anexos](#)).

Las células que expresaban ChrimsonR fueron fotoestimuladas con dos pulsos de 5 ms de duración cada uno dejando 1 segundo entre pulsos. El LED utilizado fue *coolLED pE-300 ultra LED* con luz ámbar (580 nm de longitud de onda).

El voltaje que se mantuvo durante el registro de *voltage clamp* fue de -73 mV. Todos los registros fueron filtrados a 10 kHz y adquiridos a 20 kHz. El software de adquisición y de análisis utilizado fue *PatchMaster Next (HEKA)*.

Nuestro objetivo usando *patch clamp* fue el de observar la actividad espontánea, si la hubiera, a un nivel de resolución de célula única, así como la respuesta del canal transmembrana ChrimsonR a la fotoestimulación usando una fuente de luz con longitud de onda de 580 nm.

6. Resultados

6.1. Resultados de la transfección

6.1.1. Transfección en cultivos primarios

La eficiencia de transfección de los vectores ND12 y P10 fue baja en términos cualitativos, en todos los experimentos realizados tanto en placa de cultivo de 24 pocillos ($n = 2$) como en los MEA ($n = 4$) y a las ratios vector - plásmido 10:1, 8:1, 5:1, 2:1. En ninguno de ellos se alcanzó una transfección suficiente como para continuar con los experimentos de registro electrofisiológico. La cantidad de células transfectadas que expresan el marcador fluorescente tdTomato fue baja en términos cualitativos en comparación con las transfecciones realizadas con el control positivo Lipofectamina, siendo $n = 3$ en placas de 24 pocillos y $n = 9$ en los MEA.

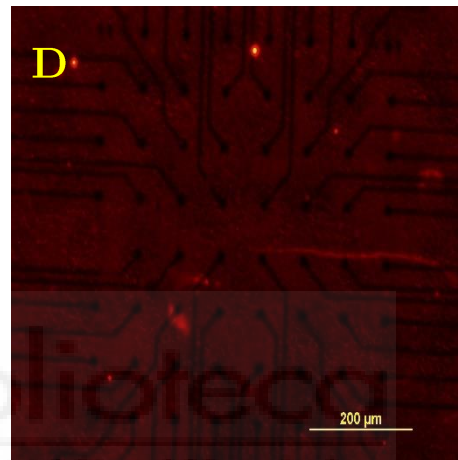
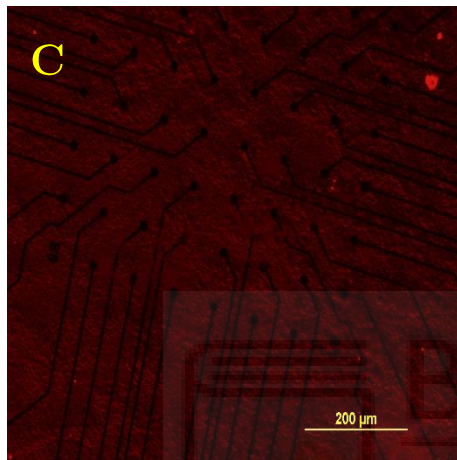
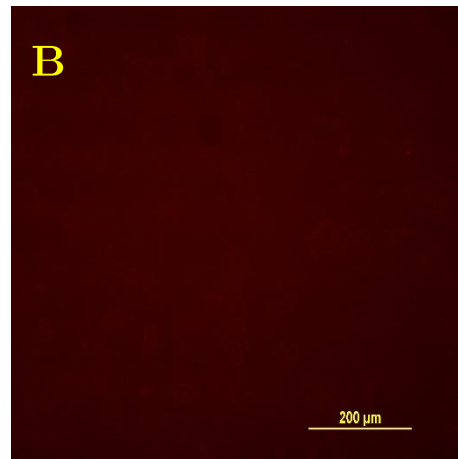
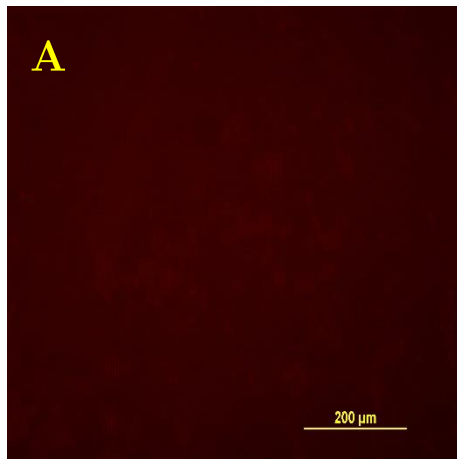
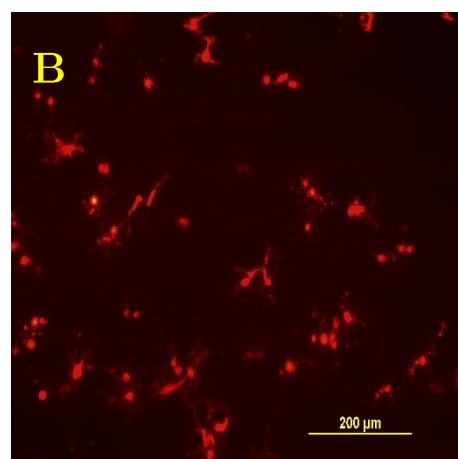
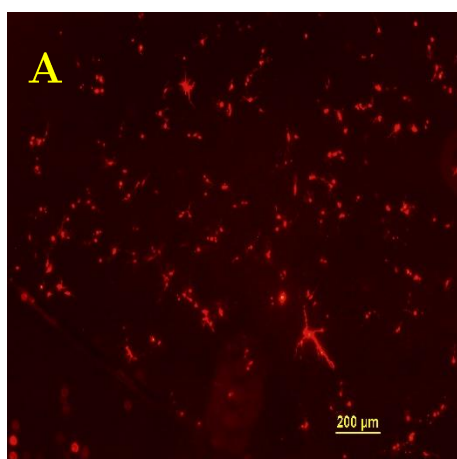


Figura 11 Imágenes de la transfección del plásmido *ChrimsonR* utilizando los vectores ND12 (A y C) y P10 (A y D) tanto en placas multipocillo (Arriba) como en pocillos multielectrodo (Abajo). No se consiguió ver células con expresión del gen marcador fluorescente *TdTomato* del plásmido optogenético *ChrimsonR*.



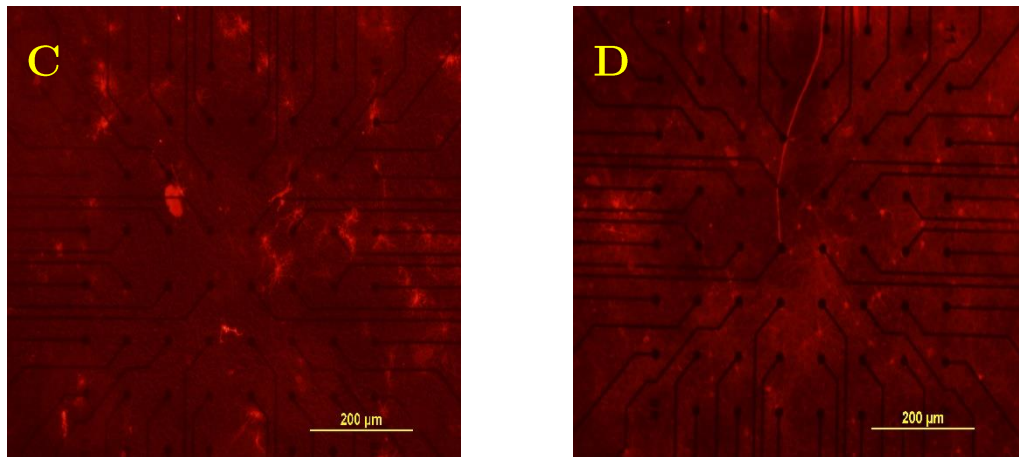


Figura 12 Imágenes de la transfección del plásmido *ChrimsonR* en los cultivos primarios, utilizando el control positivo (*Lipofectamine 2000 Transfection Reagent, Thermo Fisher Scientific*) tanto en placas multipocillo (Arriba) como en pocillos multielectrodo (Abajo) Las células con fluorescencia son las que expresan el gen marcador fluorescente *TdTomato* del plásmido en la membrana celular.

Debido a la baja eficacia de los vectores P10 y ND12 para transfectar en todos los experimentos realizados, se propuso no utilizarlos para los posteriores experimentos de registro con multielectrodo, en el que pretendíamos estudiar la eficiencia de funcionalidad poblacional, de forma que reservamos los registros multielectrodo únicamente para testar la capacidad de controlar la actividad funcional mediante la técnica optogenética utilizando el reactivo comercial control Lipofectamina.

6.1.2. Transfección en línea celular

Los vectores no virales utilizados en este trabajo presentaron una muy baja eficiencia de transfección en la línea celular NSC-34 en relación con el reactivo comercial Lipofectamina utilizado como control positivo ($n = 4$). En ninguno de las ratios de vectores- plásmido, siendo $n = 2$ para cada ratio de vector - plásmido, se observó transfección de forma cualitativa. La cantidad de células transfectadas que expresó el marcador fluorescente *tdTomato* fue insuficiente para continuar con los experimentos posteriores de registro electrofisiológico.

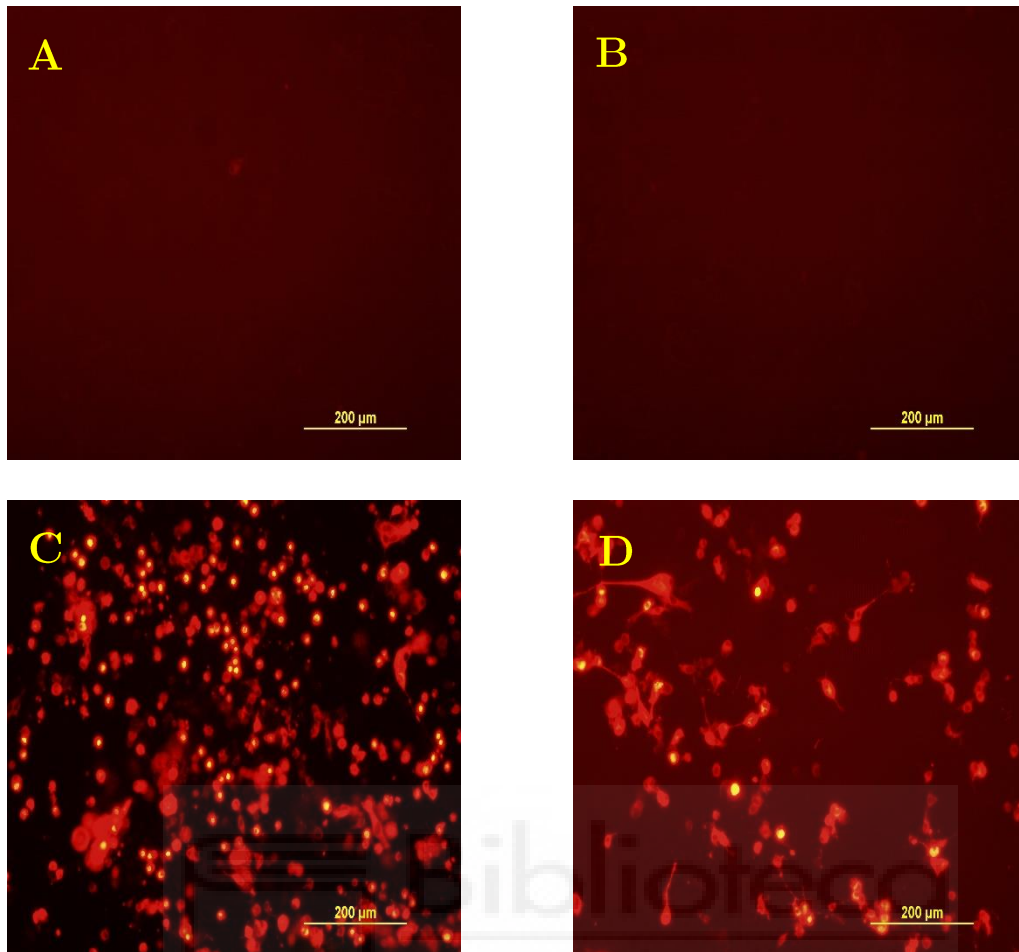


Figura 13 Imágenes de la transfección con *ChrimsonR* en la línea celular NSC - 34 y los vectores no virales ND12 (A), P10 (B) y el control positivo (C y D). Las células con fluorescencia son las que expresan el marcador o reporter *TdTomato* del plásmido en su membrana.

6.2. Resultados del registro de actividad neuronal y fotoestimulación

6.2.1. MEA

Uno de los requisitos para poder modular optogenéticamente la actividad electrofisiológica del cultivo primario de córtex embrionario de rata es conseguir una transfección lo suficientemente alta. Al no haber conseguido transfectar con las formulaciones ND12 y P10, se pasó a caracterizar la respuesta funcional de las células únicamente con el control positivo Lipofectamina.

En la mayoría de experimentos de optogenética en los que se utiliza Lipofectamina para como vector del plásmido optogenético, el método de registro es el de célula única o *patch clamp* [64], [65] sin embargo cuando se trabaja con poblaciones en placas de cultivo multielectrodo, el método de introducir el plásmido es mediante transducción usando vectores virales [66], [67], siendo por tanto el uso de Lipofectamina como vector no viral en el cultivo en placas de cultivo multielectrodo algo novedoso.

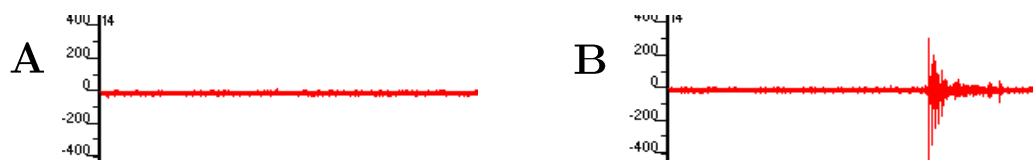
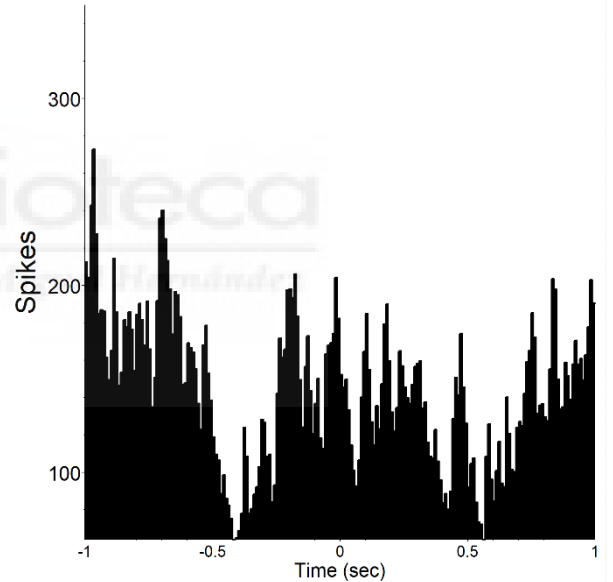
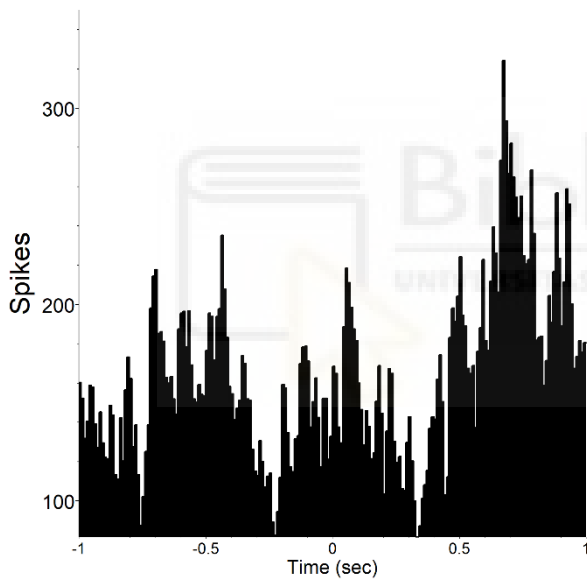
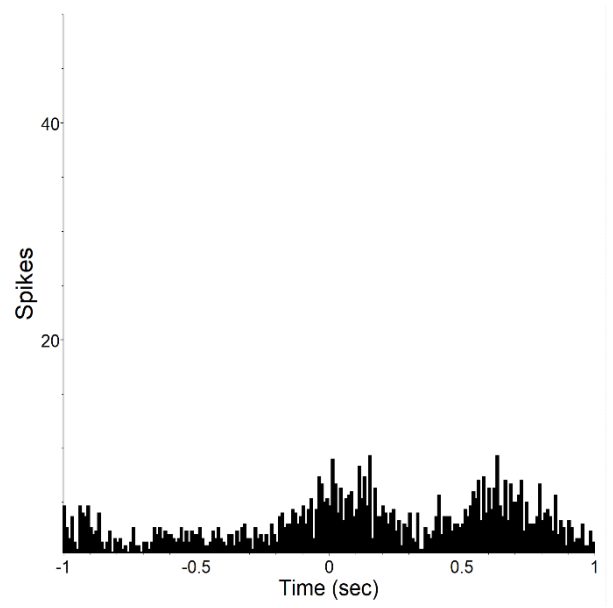
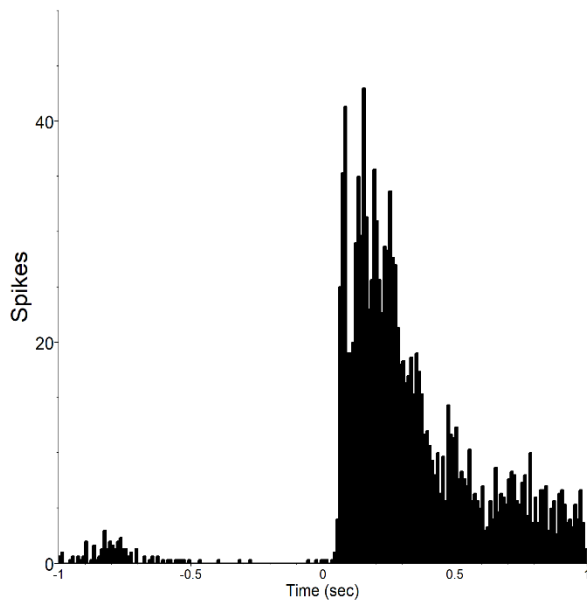


Figura 14 Representación de un canal durante un registro de un MEA. En el eje Y se representa la variación en μV y en el eje X la escala temporal (1000 ms). A: instantánea de un canal durante el registro en el que no se detecta actividad espontánea. B: instantánea de un canal durante el registro en el que se detecta actividad espontánea.

Solo en 3 de los registros ($n = 9$) se observó respuesta a la fotoestimulación de las células de cultivo primario transfectadas con ChrimsonR utilizando Lipofectamina como vector. La media de canales de las placas de cultivo multielectrodo en los que se obtuvo respuesta aparente a la fotoestimulación fue de 29 canales de los 60 totales con los que cuenta la placa MEA. El hecho de no haber sido capaces de conseguir una eficiencia transfección reproducible en los electrodos a lo largo del trabajo usando Lipofectamina, así como la imposibilidad de transfectar neuronas de tipo excitatorio de forma selectiva, hicieron que los resultados de fotoestimulación fueran inconsistentes.

En los tres electrodos en los que se consiguió respuesta (Figura 15) se observa un aumento generalizado de los potenciales de acción o spikes después del t_0 o pulso de fotoestimulación en comparación con el control negativo, donde no se ve aumento de la actividad. El aumento de actividad se daba cuando se aplicaban los protocolos de fotoestimulación 4 y 5 (Tabla 3).



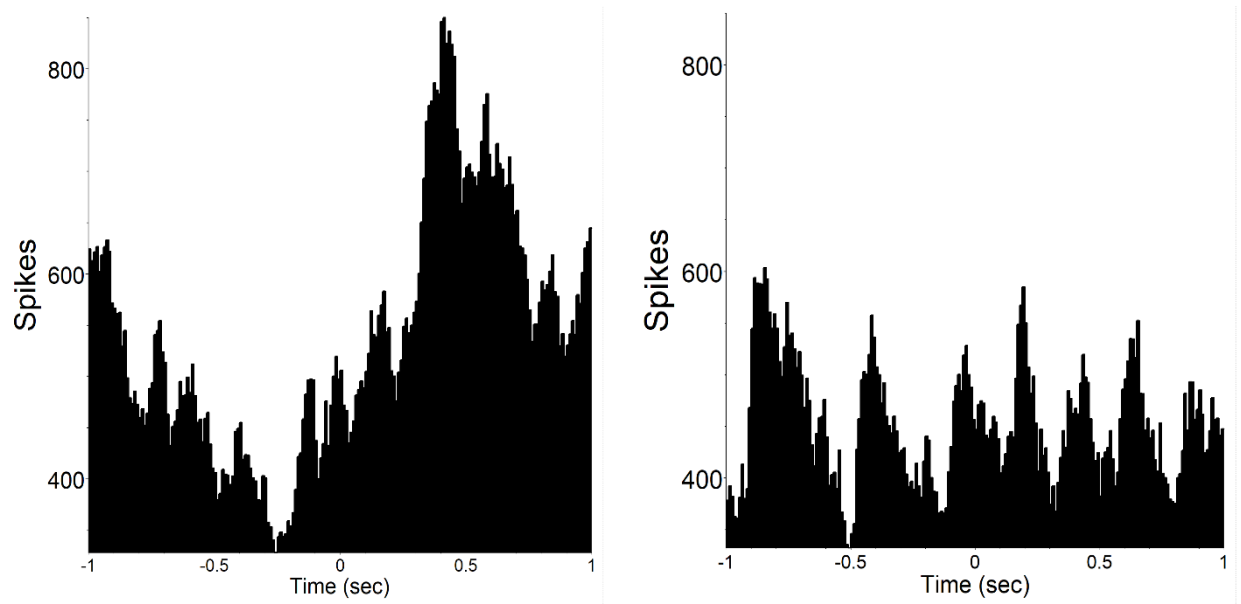
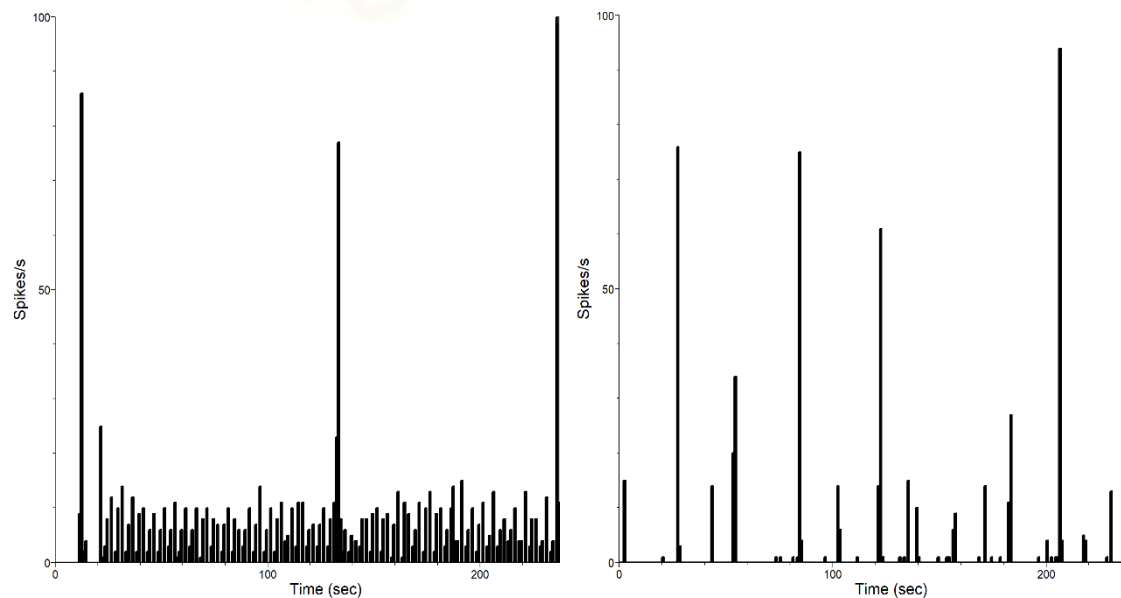


Figura 15 Izquierda: histogramas periestímulo representativos de la actividad global del MEA en los tres registros que se consiguió respuesta junto con los controles negativos (Derecha). En el eje Y se representan los spikes detectados en un rango temporal de 1 segundo antes del pulso de luz (t_0) y 1 segundo después del pulso, representado en el eje X.

En cuanto a los histogramas de frecuencia de los registros que tenían actividad cuando fueron fotoestimulados (Figura 16), en todos se observa un aumento generalizado de la actividad debido a la mayor descarga de potenciales de acción de las células neuronales que expresan ChrimsonR. La frecuencia de eventos o *spikes* por segundo (eje Y) aumenta a lo largo de la duración de tiempo de registro (eje X) en comparación con el control negativo no fotoestimulado.



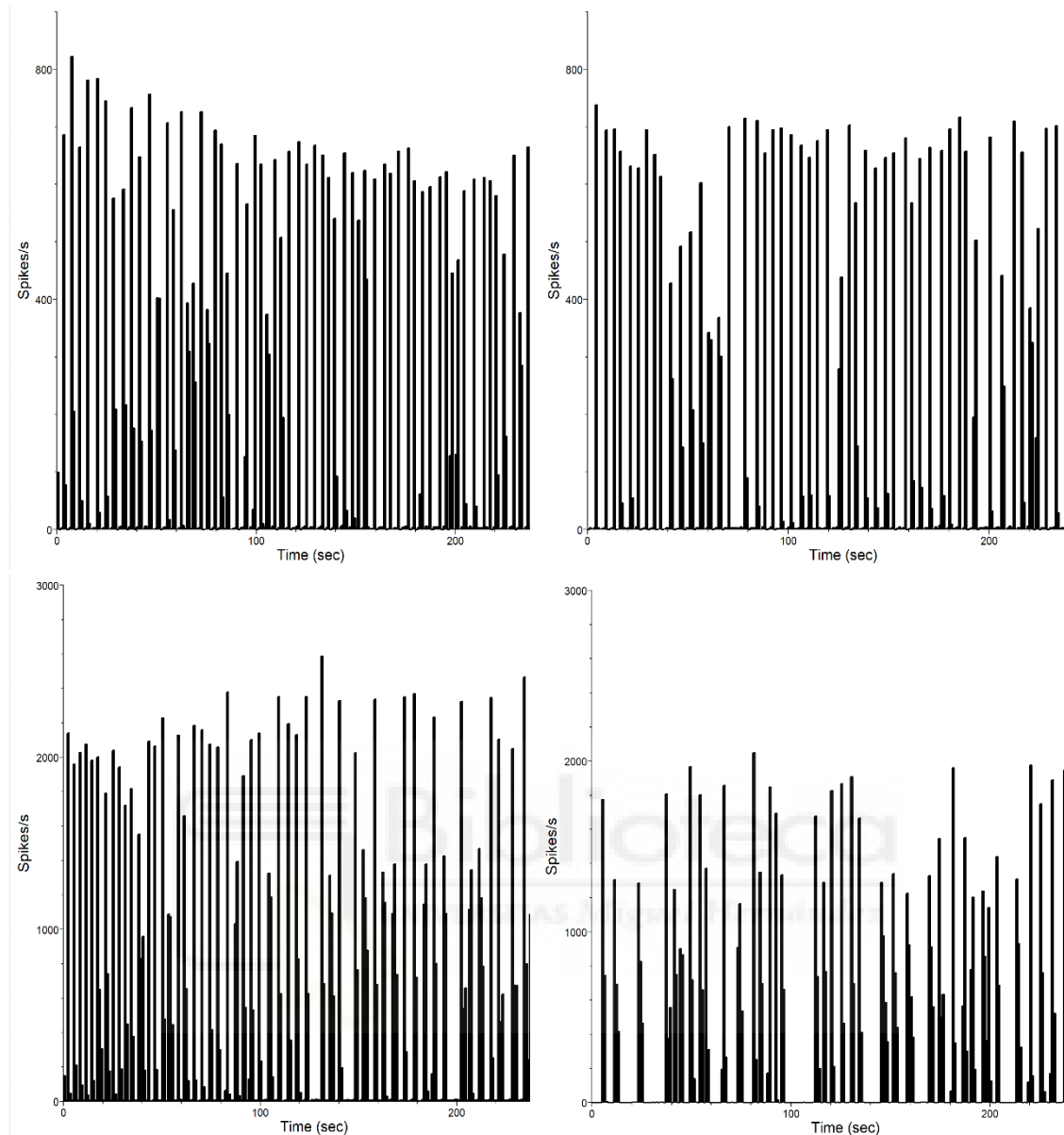


Figura 16 Histogramas de frecuencia de la actividad global del MEA en los tres registros que se observó respuesta a la fotoestimulación. Izquierda: registro con fotoestimulación. Derecha: control negativo. La frecuencia de spikes por segundo (eje Y) aumenta a lo largo de los 260 segundos de duración (eje X) del registro cuando es fotoestimulado.

6.2.2. Patch clamp

El hecho de no haber conseguido actividad espontánea al utilizar los MEA con la línea celular NSC – 34 y por tanto ser incapaces de estudiar extracelularmente la actividad electrofisiológica de las células, nos llevó a utilizar la técnica *voltage clamp* para comprobar si el canal expresado se activaba de algún modo ante la estimulación optogenética en las células transfectadas.

Los registros electrofisiológicos de célula única mostraron que el canal ionotrópico ChrimsonR se activaba dando lugar a la aparición de corrientes de entrada de cationes (Figura 18) cuando se aplicaba fotoestimulación con luz visible de 580 nm de longitud de

onda, sin embargo, estas corrientes no fueron capaces de dar lugar a la generación de potenciales de acción por parte de las células.

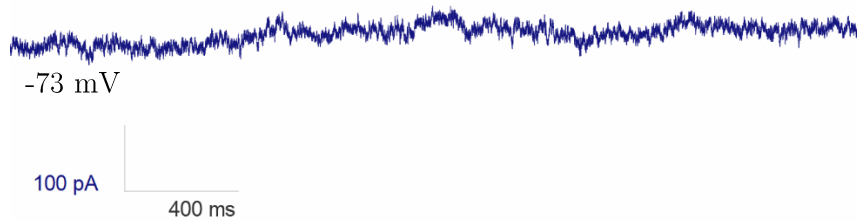


Figura 17 Registro representativo de la actividad espontánea de una célula NSC - 34 transflectada con ChrimsonR mediante voltage clamp (potencial de membrana -73 mV), en el que no se aprecian fluctuaciones de amperaje correspondientes a la generación de potenciales de acción.

Del total de células NSC – 34 transflectadas registradas con patch clamp ($n = 5$) en ninguna se vio actividad espontánea representada mediante cambios en el amperaje. De las 5 células registradas la media en la variación del amperaje al fotoestimar fue de 563,56 pA. La media de tiempo ascendente hasta llegar al pico de máximo amperaje fue de 7,56 ms.

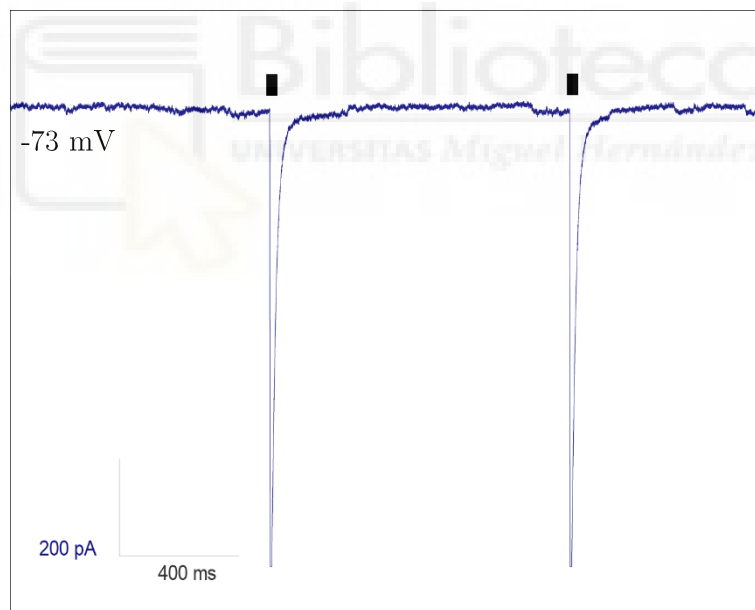


Figura 18 Imagen del registro de voltage clamp en célula NSC – 34 transflectada con ChrimsonR manteniendo el potencial de membrana a -73 mV. Se observan dos corrientes catiónicas por cada pulso de fotoestimulación (Rectángulo negro) con un segundo de diferencia entre pulsos.

6.3. Resultados de los ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad de los vectores no virales y su eficiencia de transfección son parámetros que dependen en gran medida del tipo celular [68]. Por este motivo, se requiere encontrar un balance específico entre eficiencia de transfección y citotoxicidad para cada tipo celular [19].

6.3.1. Cultivos primarios de corteza embrionaria de rata

Los resultados de viabilidad de los cultivos primarios con las formulaciones ND12 y P10 muestran que la citotoxicidad es mínima cuando se aplica el tratamiento durante 72 horas.

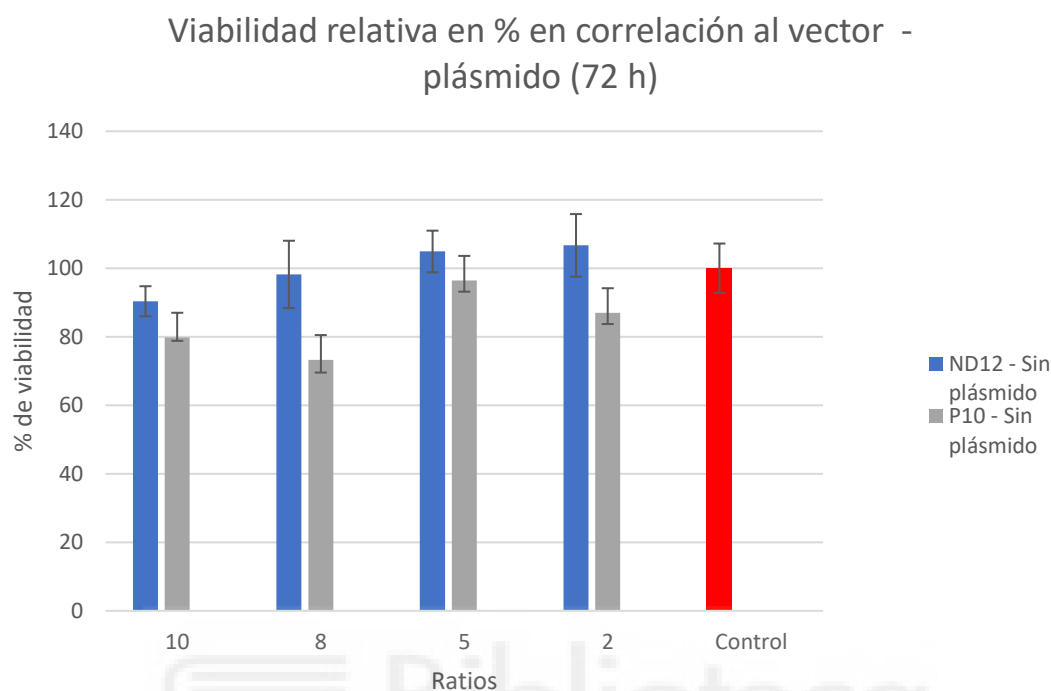


Figura 19 Viabilidad celular de los cultivos primarios en respuesta al tratamiento con los vectores no virales sin plásmido durante 72 horas. Medidos mediante ensayo MTT. Los datos se representan como la media de los porcentajes de viabilidad obtenidos por cada tratamiento \pm la desviación estandar.

En tratamientos como ND12 a la ratio 2:1 se puede observar como la viabilidad es prácticamente la misma que en los pocillos control ($n = 8$). En ninguno de los ratios tratamientos la viabilidad baja por debajo del 75%, pudiendo considerar por tanto estas formulaciones poco citotóxicas cuando se utilizan en cultivos primarios de córtex embrionario de rata.

Los resultados de las medias de los porcentajes de viabilidad de cada tratamiento presentan poca dispersión ($n = 8$), siendo la media de las desviaciones estándar $\pm 5,082$.

6.3.2. Cultivos de la línea celular inmortalizada NSC – 34

6.3.2.1. Resultados a 48 horas

En el caso de los cultivos celulares secundarios se puede ver un claro descenso en la viabilidad celular cuando los tratamientos de vector y plásmido son aplicados en comparación con los pocillos control ($n = 8$). Existiendo una proporcionalidad directa entre mayor ratio o concentración de vector y descenso en la viabilidad.

Viabilidad relativa en % en correlacion al vector ND12 - plásmido (48 horas)

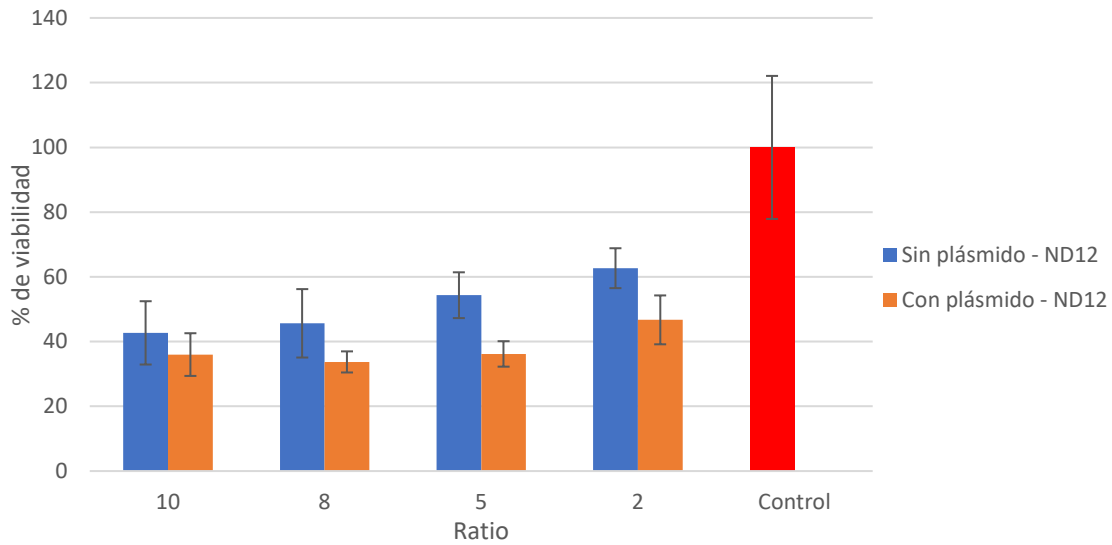


Figura 20 Viabilidad celular de los cultivos de la línea celular NSC-34 en respuesta al tratamiento con el vector no viral ND12 y con o sin plásmido durante 48 horas. Medidos mediante ensayo MTT. Los datos se representan como la media de los porcentajes de viabilidad obtenidos por cada tratamiento \pm la desviación estándar.

Los resultados de las medias de los porcentajes de viabilidad ($n = 8$) de cada tratamiento presentan baja dispersión. La media de las desviaciones estándar es $\pm 8,97$

Viabilidad relativa en % en correlacion al vector P10 - plásmido (48 horas)

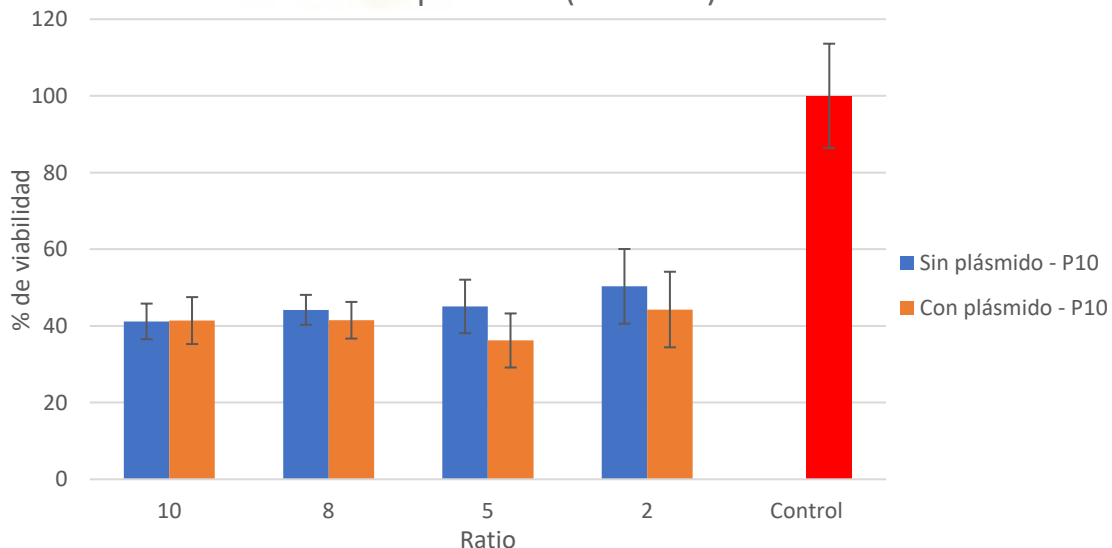


Figura 21 Viabilidad celular de los cultivos de la línea celular NSC-34 en respuesta al tratamiento con el vector no viral P10 y con o sin plásmido durante 48 horas. Medidos mediante ensayo MTT. Los datos se representan como la media de los porcentajes de viabilidad obtenidos por cada tratamiento \pm la desviación estándar.

6.3.2.2. Resultados a 72 horas

Viabilidad relativa en % en correlacion al vector ND12 -
plásmido (72 horas)

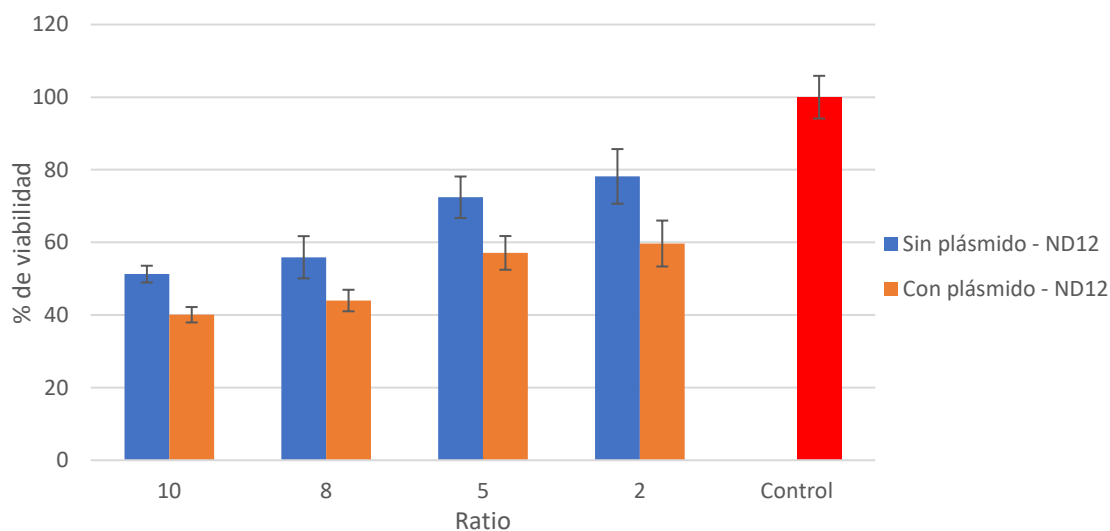


Figura 22 Viabilidad celular de los cultivos de la línea celular NSC-34 en respuesta al tratamiento con el vector no viral ND12 con y sin plásmido durante 72 horas. Medidos mediante ensayo MTT. Los datos se representan como la media de los porcentajes de viabilidad obtenidos por cada tratamiento \pm la desviación estándar.

Al igual que en los resultados a 48 horas se puede ver un claro descenso en la viabilidad celular cuando los tratamientos de vector y plásmido son aplicados en comparación con los pocillos control ($n = 8$). Además, sigue existiendo una proporcionalidad directa entre mayor ratio o concentración de vector y descenso en la viabilidad.

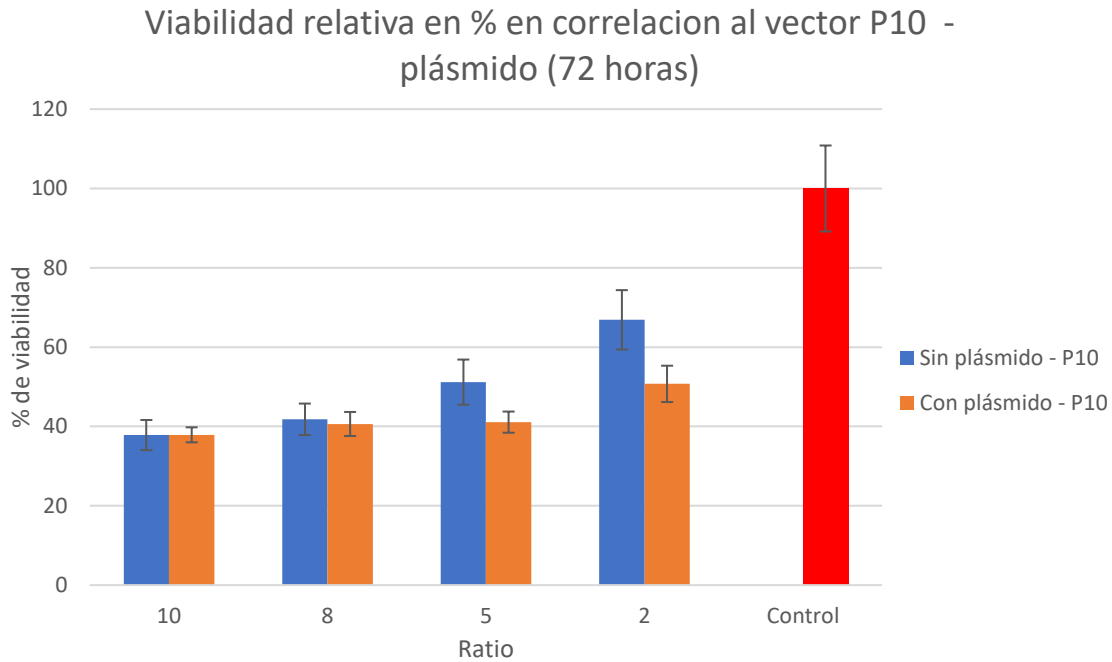


Figura 23 Viabilidad celular de los cultivos de la línea celular NSC-34 en respuesta al tratamiento con el vector no viral P10 con y sin plásmido durante 72 horas. Medidos mediante ensayo MTT. Los datos se representan como la media de los porcentajes de viabilidad obtenidos por cada tratamiento \pm la desviación estándar

Los resultados de las medias de los porcentajes de viabilidad ($n = 8$) de cada tratamiento presentan baja dispersión. La media de las desviaciones estándar es $\pm 4,49$.

Tal y como se observa en ambos ensayos se ve como en los pocillos en los que se aplica el vector conjugado con el plásmido hay más citotoxicidad que cuando únicamente se aplica el vector. Al contar con un tamaño de muestra muy pequeño no se ha podido realizar un estudio de significancia estadística para confirmar este hecho, por lo que se requiere repetir los ensayos de cara a analizar los resultados.

7. Discusión

7.1. Transfección en cultivos primarios y la línea celular NSC - 34

La eficiencia de transfección obtenida en los cultivos primarios y en las células NSC - 34 cuando se utilizaban los vectores tanto P10 como ND12 no fue lo suficiente alta como para considerar su uso en los posteriores experimentos de electrofisiología.

Uno de los requisitos para que pueda haber una respuesta a la fotoestimulación es que la proteína optogenética, en nuestro caso ChrimsonR, se exprese en la membrana. La expresión de la proteína puede ser cuantificada de forma cualitativa y cuantitativa. Para nuestro trabajo la expresión cuantitativa al usar las formulaciones ND12 y P10, provistas por el grupo NanoBioCel no fue necesaria debido a la marginal eficiencia de transfección de sus vectores.

El uso de ND12 y P10 como formulaciones de vectores no virales ha dado resultado en artículos pendientes de publicación en nuestro grupo de investigación cuando se transfecta el plásmido de la proteína verde fluorescente (GFP), sin embargo, no se obtienen esos resultados al utilizar el plásmido ChrimsonR.

Uno de los motivos para esta disparidad de resultados al utilizar plásmidos distintos puede ser el tamaño del plásmido. El plásmido GFP utilizado en nuestro laboratorio (*pCAG – GFP, Addgene*) [20] tiene un tamaño de 5,5 kilobases mientras que ChrimsonR es de 7,3 kilobases. El tamaño del plásmido está relacionado de forma inversamente proporcional con la eficiencia de transfección debido a mayor posibilidad de interacciones electroestáticas en el proceso de internalización en la célula [69].

La baja eficiencia de transfección de los vectores no virales es una problemática común cuando se trabaja con este tipo de vectores [10], [13], [25]. Pocas formulaciones han superado esta dificultad. Uno de ellos es el reactivo comercial Lipofectamina, utilizado en nuestro trabajo como control positivo y *gold standard* a la hora de valorar eficiencias de transfección de formulaciones novedosas [70].

Un parámetro relevante para considerar y que va a influir mucho en la eficiencia de transfección de los niosomas es el potencial zeta (ζ), relacionado con la carga superficial del niosoma y su magnitud de atracción y repulsión por cargas. Se considera que los potenciales zeta de ± 20 mV previenen la agregación de nanopartículas por repulsión electrostática [71].

En futuros experimentos se debería valorar el potencial zeta de las formulaciones ND12 y P10 en comparación con Lipofectamina, para considerar el hecho de que haya grandes diferencias que puedan estar afectando a la carga neta de los vectores no virales, llevándolos a formar agregados y por tanto disminuyendo su eficiencia de transfección.

Como experimentos adicionales, proponemos evaluar la interacción entre las formulaciones ND12 y P10, el control positivo Lipofectamina y plásmido mediante ensayos de movilidad de electroforesis. Analizado en estos experimentos si se diera en efecto la unión electrostática entre vector y plásmido, de forma que la formación del complejo es capaz de bloquear la migración del ADN a través del gel.

7.2. Registros electrofisiológicos y fotoestimulación

Los resultados obtenidos en la transfección en multielectrodo nos permite validar la Lipofectamina utilizada como vector para transfectar ChrimsonR en cultivos primarios de córtex embrionario de rata. Esto abre camino a que nuevos vectores no virales más eficientes y con resultados más reproducibles puedan ser comparados con este reactivo comercial utilizado en nuestro trabajo como control positivo.

Sin embargo, es necesario un aumento en la cantidad de células neuronales transfectadas de tipo excitatorio para obtener unos resultados más consistentes y demostrar que una tasa de transfección elevada pudiera servir para la modular la actividad del cultivo celular

primario. Un enfoque interesante sería el uso de plásmidos con promotores específicos para neuronas de tipo excitatorio o inhibitorio, de forma que las proteínas optogenéticas puedan expresarse en las células diana deseadas.

El control positivo requiere de una reproducibilidad máxima a la hora de ser capaz de modular la actividad electrofisiológica de los cultivos celulares de cara a compararlo con formulaciones novedosas de vectores no virales.

Es por esto que se proponen otros métodos físicos, como la electroporación [72] o químicos como el uso de Poli - D - Lisina [73] como posibles alternativas a modo de control para este tipo de cultivo celular.

Los registros de célula única mediante patch clamp en la línea celular NSC - 34 demuestran cierta activación del canal transmembrana cuando es fotoestimulado. No haber conseguido obtener actividad espontánea con las células NSC - 34 en las placas multielectrodo o *voltage clamp* ha podido ser debido a múltiples factores en cuanto de falta de optimización del cultivo y de la maduración de las células ya que, en el tiempo de duración de este TFM, durante el cual además hemos tenido que enfrentarnos a distintas restricciones laborales que se generaron como consecuencia de la pandemia de Coronavirus - 19, no hemos tenido tiempo de replicar las condiciones descritas en la bibliografía al ser una línea celular de reciente introducción en el laboratorio, y por lo tanto debemos seguir trabajando en la optimización de las condiciones de cultivo y revestimiento de las placas ([Preparación de las placas multipocillo de cultivo celular y electrodos](#)).

El hecho de no haber conseguido actividad puede haberse debido a múltiples factores como son: interferencia de las células con el revestimiento previo con laminina y PDL/PLL, ya que la bibliografía es confusa en cuanto el revestimiento, siendo el PDL la opción mayoritaria [74], [75] que sin embargo no nos dio los resultados esperados en nuestro laboratorio, teniendo que utilizar PLL y retrasando los experimentos drásticamente y por tanto imposibilitando la optimización en cuanto a la confluencia y la maduración de las células NSC - 34.

Otra posible causa de ausencia de actividad podría ser la falta de diferenciación de las células a formas *neuron-like*, que eventualmente, pudieran ser capaces de tener potenciales de acción [51], [54], [76]. La bibliografía parece indicar que el uso de ácido retinoico puede actuar como catalizador de la diferenciación y ser capaz de aumentar los procesos neuríticos de las células neuronales de distinta naturaleza [77], incluyendo la línea celular NSC - 34 [78], y por ello, nos proponemos continuar la optimización de la puesta a punto de estos cultivos utilizando este compuesto, con el fin de conseguir encontrar actividad *neuron-like* en los mismos.

7.3. Ensayos de citotoxicidad

Los resultados de estos ensayos son confusos en los cultivos primarios de córtex embrionario de rata. La viabilidad celular en los cultivos primarios no desciende tanto como en el ensayo

de citotoxicidad con las células NSC – 34 cuando son aplicados los tratamientos con los vectores no virales, además de presentar valores de viabilidad superior en pocillos de tratamientos con un ratio más alto frente a otros con un ratio menor.

Las células de cultivos primarios tienen un metabolismo más lento además de presentar más variabilidad [58] al no ser una línea clonal sino tejido vivo extraído del animal. De hecho, el cultivo celular primario de células de tipo nervioso es uno de los más problemáticos dentro del campo de la biología celular [79].

Todos estos motivos son por los que creemos que el resultado de los ensayos de citotoxicidad en el cultivo celular primario necesita de una mayor optimización y un aumento del tamaño muestral (n).

Los resultados de estos mismos ensayos en la línea celular NSC – 34 al contrario que en los cultivos celulares primarios muestran una relación directamente proporcional entre el aumento de la ratio vector – plásmido y descenso en la viabilidad. Siendo este descenso más acusado cuando el vector va acompañado en el plásmido.

Una posible explicación que podría atribuirse a este fenómeno es el hecho de que el material genético también puede tener efecto citotóxico, especialmente si es de origen bacteriano, como un plásmido, debido a la capacidad de estos para producir respuestas inmunes y secreción de citoquinas proinflamatorias [80].

Otra explicación que podría explicar estos resultados es la posible toxicidad causada por las opsinas microbianas, debido a que pueden provocar una entrada constitutiva de cationes de calcio que sería dañina para la célula, o formar agregados citotóxicos, como ya se ha demostrado en algunos trabajos con Canalrodopsina – 2 [81], [82]. Sin embargo, hasta el momento, no existen trabajos similares que caractericen la toxicidad de la proteína optogenética ChrimsonR, y de hecho existen incluso ensayos clínicos en humanos en los que se utiliza ChrimsonR sin haber reportado hasta ahora, efectos adversos [83], [84].

Como enfoque alternativo para abordar el incremento de la toxicidad cuando el vector y el plásmido están acoplados, es el repetir los experimentos de citotoxicidad añadiendo dos nuevos grupos experimentales. Uno de estos grupos experimentales propuestos es plásmido desnudo, para observar si existiera un aumento de citotoxicidad propio del plásmido. Otro de los grupos es utilizar un compuesto por vector – plásmido de proteína verde fluorescente (GFP). Esta proteína al no ser un canal ionotrópico sino un simple marcador [85], [86], puede darnos información sobre el efecto que el canal ChrimsonR está teniendo sobre la citotoxicidad.

Los nanodiamantes, pese a existir consenso acerca de su baja toxicidad [87], en el caso de los tejidos neuronales se ha demostrado en algunos trabajos en los que se han utilizado los nanodiamantes como *nanocarriers* dirigidos para algunos fármacos, que alteran tanto la morfología como funcionalidad electrofisiológica.

En uno de estos trabajos se observa como el tratamiento con nanodiamantes reduce hasta en un 36% por ciento la actividad electrofisiológica de los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón registrada a través de MEAs [88]. En nuestro caso, además, las formulaciones de niosomas utilizadas no tuvieron la suficiente eficiencia de transfección como para continuar con los experimentos de optogenética y electrofisiología.

Por otro lado, en otros artículos se ha demostrado que además tienen efectos en la morfología de las células neuronales del sistema nervioso central y periférico de ratón al aplicarlos *in vitro*, de tal forma que intervienen en la neurogénesis de los procesos neuríticos, pese a no tener efectos citotóxicos [89].

Los efectos que puedan tener este tipo de nanopartículas cuando se utilizan para terapia génica en tejidos del sistema nervioso están poco caracterizados por lo que requieren de un estudio en mayor profundidad de cara a seguir validándolos o descartarlos como vectores no virales para terapia génica en tejidos nerviosos.

8. Conclusiones

Las conclusiones alcanzadas en el desarrollo de este trabajo con respecto al uso de las formulaciones propuestas como vectores no virales para su uso en terapia génica son las siguientes:

- La eficiencia de transfección de los vectores no virales ND12 y P10 sintetizados por el grupo de investigación NanoBioCel no es lo suficiente alta como para considerar su uso en futuros experimentos con los tipos celulares NSC – 34 y los cultivos celulares de corteza embrionaria de rata.
- Son necesarios futuros experimentos de cara a seguir optimizando el cultivo de la línea celular NSC – 34 con el objetivo de que las células alcancen la madurez necesaria para generar actividad espontánea, de forma que pueda usarse como modelo celular fidedigno para experimentos en electrofisiología y optogenética.
- Los resultados obtenidos en los registros de actividad de poblaciones neuronales (MEA) con cultivos celulares primarios, permiten validar la Lipofectamina como control positivo pese a la incapacidad de obtener tasas de transfección reproducibles y transfectar de forma selectiva neuronas de tipo excitatorio por lo que se requieren futuras optimizaciones tanto de plásmido optogenético como de vector no viral.
- Los registros de célula única usando la línea celular NSC – 34 transfectada con el plásmido ChrimsonR muestran una respuesta de despolarización cuando son fotoestimuladas. No se consiguió potenciales de acción y por tanto se requieren futuros experimentos de cara a optimizar la maduración de las células.
- Los experimentos de citotoxicidad en los cultivos celulares primarios de córtex embrionario de rata muestran una baja citotoxicidad de las formulaciones ND12 y P10 cuando son aplicadas durante 72 horas, debido posiblemente a la capacidad muy limitada de internalización.

- Los resultados de los experimentos de citotoxicidad en la línea celular NSC – 34 muestran una relación directamente proporcional en la citotoxicidad y la mayor concentración de los vectores ND12 y P10 cuando se aplica el tratamiento durante 48 y 72 horas, siendo mayor este efecto cuando se utiliza conjugado al plásmido.

9. Bibliografía

- [1] C. E. Dunbar, K. A. High, J. K. Joung, D. B. Kohn, K. Ozawa, y M. Sadelain, «Gene therapy comes of age», *Science*, vol. 359, n.º 6372, ene. 2018, doi: 10.1126/science.aan4672.
- [2] G. Romano, P. Michell, C. Pacilio, y A. Giordano, «Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications», *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 18, n.º 1, pp. 19-39, 2000, doi: 10.1634/stemcells.18-1-19.
- [3] S. H. Orkin y P. Reilly, «MEDICINE. Paying for future success in gene therapy», *Science*, vol. 352, n.º 6289, pp. 1059-1061, may 2016, doi: 10.1126/science.aaf4770.
- [4] M. L. Edelstein, M. R. Abedi, J. Wixon, y R. M. Edelstein, «Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004—an overview», *J. Gene Med.*, vol. 6, n.º 6, pp. 597-602, 2004, doi: 10.1002/jgm.619.
- [5] X. Zhu, Y. Zhang, X. Yang, C. Hao, y H. Duan, «Gene Therapy for Neurodegenerative Disease: Clinical Potential and Directions», *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 14, p. 618171, 2021, doi: 10.3389/fnmol.2021.618171.
- [6] R. Chia, A. Chiò, y B. J. Traynor, «Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications», *Lancet Neurol.*, vol. 17, n.º 1, pp. 94-102, ene. 2018, doi: 10.1016/S1474-4422(17)30401-5.
- [7] «Estrategias terapéuticas. Material didáctico: Sesión 2». Genotipia.
- [8] S. Kumar, D. Markusic, M. Biswas, K. High, y R. Herzog, «Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes», *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, vol. 3, p. 16034, may 2016, doi: 10.1038/mtm.2016.34.
- [9] W. F. Anderson, «Human Gene Therapy: Scientific and Ethical Considerations», *J. Med. Philos. Forum Bioeth. Philos. Med.*, vol. 10, n.º 3, pp. 275-292, ago. 1985, doi: 10.1093/jmp/10.3.275.
- [10] M. Ramamoorth y A. Narvekar, «Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview», *J. Clin. Diagn. Res. JCDR*, vol. 9, n.º 1, pp. GE01-GE06, ene. 2015, doi: 10.7860/JCDR/2015/10443.5394.
- [11] N. Somia y I. M. Verma, «Gene therapy: trials and tribulations», *Nat. Rev. Genet.*, vol. 1, n.º 2, pp. 91-99, nov. 2000, doi: 10.1038/35038533.
- [12] C. E. Thomas, A. Ehrhardt, y M. A. Kay, «Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy», *Nat. Rev. Genet.*, vol. 4, n.º 5, Art. n.º 5, may 2003, doi: 10.1038/nrg1066.

- [13] H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, y D. G. Anderson, «Non-viral vectors for gene-based therapy», *Nat. Rev. Genet.*, vol. 15, n.º 8, Art. n.º 8, ago. 2014, doi: 10.1038/nrg3763.
- [14] C. Baum, O. Kustikova, U. Modlich, Z. Li, y B. Fehse, «Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors», *Hum. Gene Ther.*, vol. 17, n.º 3, pp. 253-263, mar. 2006, doi: 10.1089/hum.2006.17.253.
- [15] N. Bessis, F. J. GarciaCozar, y M.-C. Boissier, «Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms», *Gene Ther.*, vol. 11, n.º 1, Art. n.º 1, oct. 2004, doi: 10.1038/sj.gt.3302364.
- [16] D. Bouard, D. Alazard-Dany, y F.-L. Cosset, «Viral vectors: from virology to transgene expression», *Br. J. Pharmacol.*, vol. 157, n.º 2, pp. 153-165, may 2009, doi: 10.1038/bjp.2008.349.
- [17] D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, y P. S. Stayton, «Design and development of polymers for gene delivery», *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, n.º 7, Art. n.º 7, jul. 2005, doi: 10.1038/nrd1775.
- [18] G. L. Lukacs, P. Haggie, O. Seksek, D. Lechardeur, N. Freedman, y A. S. Verkman, «Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus», *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n.º 3, pp. 1625-1629, ene. 2000, doi: 10.1074/jbc.275.3.1625.
- [19] M. Sainz-Ramos *et al.*, «How Far Are Non-Viral Vectors to Come of Age and Reach Clinical Translation in Gene Therapy?», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n.º 14, p. 7545, jul. 2021, doi: 10.3390/ijms22147545.
- [20] T. Matsuda y C. L. Cepko, «Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, n.º 1, pp. 16-22, ene. 2004, doi: 10.1073/pnas.2235688100.
- [21] N. AL Qtaish *et al.*, «Niosome-Based Approach for In Situ Gene Delivery to Retina and Brain Cortex as Immune-Privileged Tissues», *Pharmaceutics*, vol. 12, n.º 3, feb. 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12030198.
- [22] O. E *et al.*, «The role of helper lipids in the intracellular disposition and transfection efficiency of niosome formulations for gene delivery to retinal pigment epithelial cells», *Int. J. Pharm.*, vol. 503, n.º 1-2, abr. 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.02.043.
- [23] R. Rajera, K. Nagpal, S. K. Singh, y D. N. Mishra, «Niosomes: a controlled and novel drug delivery system», *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 34, n.º 7, pp. 945-953, 2011, doi: 10.1248/bpb.34.945.
- [24] W.-J. Choi, J.-K. Kim, S.-H. Choi, J.-S. Park, W. S. Ahn, y C.-K. Kim, «Low toxicity of cationic lipid-based emulsion for gene transfer», *Biomaterials*, vol. 25, n.º 27, pp. 5893-5903, dic. 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.031.
- [25] I. Gallego *et al.*, «Non-viral vectors based on cationic niosomes and minicircle DNA technology enhance gene delivery efficiency for biomedical applications in retinal disorders», *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, vol. 17, pp. 308-318, abr. 2019, doi: 10.1016/j.nano.2018.12.018.
- [26] P. C. Ross y S. W. Hui, «Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency», *Gene Ther.*, vol. 6, n.º 4, Art. n.º 4, abr. 1999, doi: 10.1038/sj.gt.3300863.
- [27] B. Abul Md, A. B. Harshita, B. Sarwar, y A. J Farhan, *Multifunctional Nanocarriers for Contemporary Healthcare Applications*. IGI Global, 2018.

- [28] N. AL Qtaish *et al.*, «Colloidal dispersion of niosphingosome vesicles as an efficient non-viral vector for gene delivery to retina and brain», *CRS*, vol. 3, ene. 2021.
- [29] P. Shilpa y U. G. Sneha, «Sphingosomes: A Novel Lipoidal Vesicular Drug Delivery System», vol. 5, n.º 4, jul. 2020, doi: <https://doi.org/10.46243/jst.2020.v5.i4.pp261-267>.
- [30] O. A. Shenderova, V. V. Zhirnov, y D. W. Brenner, «Carbon Nanostructures», *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.*, vol. 27, n.º 3-4, pp. 227-356, jul. 2002, doi: 10.1080/10408430208500497.
- [31] A. M. Schrand, S. A. C. Hens, y O. A. Shenderova, «Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications», *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.*, vol. 34, n.º 1-2, pp. 18-74, may 2009, doi: 10.1080/10408430902831987.
- [32] A. Paredes *et al.*, «Nanodiamond-dotma Complexes As Effective Non-viral Vectors For Gene Therapy», presentado en CRS 2020 Virtual Annual Meeting, jul. 2020. Accedido: ago. 13, 2021. [En línea]. Disponible en: <https://pure.qub.ac.uk/en/publications/nanodiamond-dotma-complexes-as-effective-non-viral-vectors-for-ge>
- [33] X.-Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, X. Xu, E. Osawa, y D. Ho, «Polymer-Functionalized Nanodiamond Platforms as Vehicles for Gene Delivery», *ACS Nano*, vol. 3, n.º 9, pp. 2609-2616, sep. 2009, doi: 10.1021/nn900865g.
- [34] K. Deisseroth, «Optogenetics», *Nat. Methods*, vol. 8, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2011, doi: 10.1038/nmeth.f.324.
- [35] T. P. Sakmar, S. T. Menon, E. P. Marin, y E. S. Awad, «Rhodopsin: insights from recent structural studies», *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 31, pp. 443-484, 2002, doi: 10.1146/annurev.biophys.31.082901.134348.
- [36] A. Terakita, «The opsins», *Genome Biol.*, vol. 6, n.º 3, p. 213, mar. 2005, doi: 10.1186/gb-2005-6-3-213.
- [37] R. Luján, «Bases moleculares de la señalización neuronal», *Cienc. Al Día Int.*, vol. 5, n.º 2, 2004.
- [38] D. Purves *et al.*, *Neuroscience*, Sixth edition. New York: Sinauer associates, 2018.
- [39] K. Deisseroth, «Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience», *Nat. Neurosci.*, vol. 18, n.º 9, pp. 1213-1225, sep. 2015, doi: 10.1038/nn.4091.
- [40] F. Schneider, C. Grimm, y P. Hegemann, «Biophysics of Channelrhodopsin», *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 44, n.º 1, pp. 167-186, 2015, doi: 10.1146/annurev-biophys-060414-034014.
- [41] J. Mattis *et al.*, «Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins», *Nat. Methods*, vol. 9, n.º 2, Art. n.º 2, feb. 2012, doi: 10.1038/nmeth.1808.
- [42] N. C. Klapoetke *et al.*, «Independent optical excitation of distinct neural populations», *Nat. Methods*, vol. 11, n.º 3, pp. 338-346, mar. 2014, doi: 10.1038/nmeth.2836.
- [43] G. Gauvain *et al.*, «Optogenetic therapy: high spatiotemporal resolution and pattern discrimination compatible with vision restoration in non-human primates», *Commun. Biol.*, vol. 4, n.º 1, p. 125, ene. 2021, doi: 10.1038/s42003-020-01594-w.

- [44] I. Villate-Beitia *et al.*, «Non-viral vectors based on magnetoplexes, lipoplexes and polyplexes for VEGF gene delivery into central nervous system cells», *Int. J. Pharm.*, vol. 521, n.º 1-2, pp. 130-140, abr. 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.02.016.
- [45] E. Ojeda *et al.*, «The influence of the polar head-group of synthetic cationic lipids on the transfection efficiency mediated by niosomes in rat retina and brain», *Biomaterials*, vol. 77, pp. 267-279, ene. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.017.
- [46] S. J. Ahn, J. Costa, y J. Rettig Emanuel, «PicoGreen Quantitation of DNA: Effective Evaluation of Samples Pre-or Post-PCR», *Nucleic Acids Res.*, vol. 24, n.º 13, pp. 2623-2625, jul. 1996, doi: 10.1093/nar/24.13.2623.
- [47] K. Manning, «Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation», *Anal. Biochem.*, vol. 195, n.º 1, pp. 45-50, may 1991, doi: 10.1016/0003-2697(91)90292-2.
- [48] L. K. Kan, K. J. Drummond, M. Hunn, D. A. Williams, T. J. O'Brien, y M. Monif, «A Simple and Reliable Protocol for the Preparation and Culturing of Fresh Surgically Resected Human Glioblastoma Tissue», *Methods Protoc.*, vol. 3, n.º 1, Art. n.º 1, mar. 2020, doi: 10.3390/mps3010011.
- [49] N. R. Cashman *et al.*, «Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons», *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, vol. 194, n.º 3, pp. 209-221, jul. 1992, doi: 10.1002/aja.1001940306.
- [50] O. Maier, J. Böhm, M. Dahm, S. Brück, C. Beyer, y S. Johann, «Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration», *Neurochem. Int.*, vol. 62, n.º 8, pp. 1029-1038, jun. 2013, doi: 10.1016/j.neuint.2013.03.008.
- [51] K. R. Sabitha, D. Sanjay, B. Savita, T. R. Raju, y T. R. Laxmi, «Electrophysiological characterization of Nsc-34 cell line using Microelectrode Array», *J. Neurol. Sci.*, vol. 370, pp. 134-139, nov. 2016, doi: 10.1016/j.jns.2016.09.038.
- [52] K. Kusama-Eguchi *et al.*, «Sulfur amino acids deficiency caused by grass pea diet plays an important role in the toxicity of L-β-ODAP by increasing the oxidative stress: studies on a motor neuron cell line», *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, vol. 49, n.º 3, pp. 636-643, mar. 2011, doi: 10.1016/j.fct.2010.07.049.
- [53] H. Ryu, G. S. Jeon, N. R. Cashman, N. W. Kowall, y J. Lee, «Differential expression of c-Ret in motor neurons versus non-neuronal cells is linked to the pathogenesis of ALS», *Lab. Invest.*, vol. 91, n.º 3, pp. 342-352, mar. 2011, doi: 10.1038/labinvest.2010.203.
- [54] S.-N. Wu, C.-C. Yeh, H.-C. Huang, E. C. So, y Y.-C. Lo, «Electrophysiological characterization of sodium-activated potassium channels in NG108-15 and NSC-34 motor neuron-like cells», *Acta Physiol. Oxf. Engl.*, vol. 206, n.º 2, pp. 120-134, oct. 2012, doi: 10.1111/j.1748-1716.2012.02438.x.
- [55] S. Eghbalsaied, I. Hyder, y W. A. Kues, «A versatile bulk electrotransfection protocol for murine embryonic fibroblasts and iPS cells», *Sci. Rep.*, vol. 10, n.º 1, Art. n.º 1, ago. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-70258-w.
- [56] D. Maggioni, M. Monfrini, M. Ravasi, G. Tredici, y A. Scuteri, «Neurobasal medium toxicity on mature cortical neurons», *NeuroReport*, vol. 26, n.º 6, pp. 320-324, abr. 2015, doi: 10.1097/WNR.0000000000000343.

- [57] J. van Meerloo, G. J. L. Kaspers, y J. Cloos, «Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay», en *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, I. A. Cree, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, pp. 237-245. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_20.
- [58] K. Dettmer *et al.*, «Distinct metabolic differences between various human cancer and primary cells», *Electrophoresis*, vol. 34, n.º 19, pp. 2836-2847, oct. 2013, doi: 10.1002/elps.201300228.
- [59] R. P. N. Rao, *Brain-Computer Interfacing: An Introduction*. New York: Cambridge University Press, 2013. doi: 10.1017/CBO9781139032803.
- [60] A. Stett *et al.*, «Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 377, n.º 3, pp. 486-495, oct. 2003, doi: 10.1007/s00216-003-2149-x.
- [61] F. O. Morin, Y. Takamura, y E. Tamiya, «Investigating neuronal activity with planar microelectrode arrays: achievements and new perspectives», *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 100, n.º 2, pp. 131-143, ago. 2005, doi: 10.1263/jbb.100.131.
- [62] G. K. Bergey, S. C. Fitzgerald, B. K. Schrier, y P. G. Nelson, «Neuronal maturation in mammalian cell culture is dependent on spontaneous electrical activity», *Brain Res.*, vol. 207, n.º 1, pp. 49-58, feb. 1981, doi: 10.1016/0006-8993(81)90678-8.
- [63] B. G. Kornreich, «The patch clamp technique: principles and technical considerations», *J. Vet. Cardiol. Off. J. Eur. Soc. Vet. Cardiol.*, vol. 9, n.º 1, pp. 25-37, may 2007, doi: 10.1016/j.jvc.2007.02.001.
- [64] M. M. Hasan, L. Ragnarsson, F. C. Cardoso, y R. J. Lewis, «Transfection methods for high-throughput cellular assays of voltage-gated calcium and sodium channels involved in pain», *PLOS ONE*, vol. 16, n.º 3, p. e0243645, mar. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0243645.
- [65] T. Asano, H. Igarashi, T. Ishizuka, y H. Yawo, «Organelle Optogenetics: Direct Manipulation of Intracellular Ca²⁺ Dynamics by Light», *Front. Neurosci.*, vol. 12, p. 561, 2018, doi: 10.3389/fnins.2018.00561.
- [66] J. K. Tung, C.-A. Gutekunst, y R. E. Gross, «Inhibitory luminopsins: genetically-encoded bioluminescent opsins for versatile, scalable and hardware-independent optogenetic inhibition», *Sci. Rep.*, vol. 5, n.º 1, p. 14366, sep. 2015, doi: 10.1038/srep14366.
- [67] A. El Hady *et al.*, «Optogenetic stimulation effectively enhances intrinsically generated network synchrony», *Front. Neural Circuits*, vol. 7, p. 167, 2013, doi: 10.3389/fncir.2013.00167.
- [68] P. Zhang y E. Wagner, «History of Polymeric Gene Delivery Systems», *Top. Curr. Chem.*, vol. 375, n.º 2, p. 26, feb. 2017, doi: 10.1007/s41061-017-0112-0.
- [69] P. Kreiss *et al.*, «Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency», *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, n.º 19, pp. 3792-3798, oct. 1999, doi: 10.1093/nar/27.19.3792.
- [70] F. Cardarelli *et al.*, «The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery», *Sci. Rep.*, vol. 6, n.º 1, p. 25879, may 2016, doi: 10.1038/srep25879.
- [71] S. Patil, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self, y S. Seal, «Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential», *Biomaterials*, vol. 28, n.º 31, pp. 4600-4607, nov. 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.029.

- [72] T. Inoue y R. Krumlauf, «An impulse to the brain—using in vivo electroporation», *Nat. Neurosci.*, vol. 4, n.º 11, pp. 1156-1158, nov. 2001, doi: 10.1038/nn1101-1156.
- [73] M. Sanchez-Martos, G. Martinez-Navarrete, A. Bernabeu-Zornoza, L. Humphreys, y E. Fernandez, «Evaluation and Optimization of Poly-d-Lysine as a Non-Natural Cationic Polypeptide for Gene Transfer in Neuroblastoma Cells», *Nanomaterials*, vol. 11, n.º 7, Art. n.º 7, jul. 2021, doi: 10.3390/nano11071756.
- [74] D. Matusica, M. P. Fenech, M.-L. Rogers, y R. A. Rush, «Characterization and use of the NSC-34 cell line for study of neurotrophin receptor trafficking», *J. Neurosci. Res.*, vol. 86, n.º 3, pp. 553-565, 2008, doi: 10.1002/jnr.21507.
- [75] A. L. Gill, M. Z. Wang, B. Levine, A. Premasiri, y F. G. Vieira, «Primary Neurons and Differentiated NSC-34 Cells Are More Susceptible to Arginine-Rich ALS Dipeptide Repeat Protein-Associated Toxicity than Non-Differentiated NSC-34 and CHO Cells», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, n.º 24, Art. n.º 24, ene. 2019, doi: 10.3390/ijms20246238.
- [76] E. A. Solomon *et al.*, «Neuromuscular Junction Model Optimized for Electrical Platforms», *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 27, n.º 4, pp. 242-252, abr. 2021, doi: 10.1089/ten.tec.2020.0292.
- [77] M. Clagett-Dame, E. M. McNeill, y P. D. Muley, «Role of all-trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation», *J. Neurobiol.*, vol. 66, n.º 7, pp. 739-756, jun. 2006, doi: 10.1002/neu.20241.
- [78] O. Maier, J. Böhm, M. Dahm, S. Brück, C. Beyer, y S. Johann, «Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration», *Neurochem. Int.*, vol. 62, n.º 8, pp. 1029-1038, jun. 2013, doi: 10.1016/j.neuint.2013.03.008.
- [79] J. Gordon y S. Amini, «General Overview of Neuronal Cell Culture», en *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*, S. Amini y M. K. White, Eds. New York, NY: Springer US, 2021, pp. 1-8. doi: 10.1007/978-1-0716-1437-2_1.
- [80] N. S. Yew *et al.*, «Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs», *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 1, n.º 3, pp. 255-262, mar. 2000, doi: 10.1006/mthe.2000.0036.
- [81] T. Miyashita, Y. R. Shao, J. Chung, O. Pourzia, y D. E. Feldman, «Long-term channelrhodopsin-2 (ChR2) expression can induce abnormal axonal morphology and targeting in cerebral cortex», *Front. Neural Circuits*, vol. 7, p. 8, 2013, doi: 10.3389/fncir.2013.00008.
- [82] M. Perny, L. Muri, H. Dawson, y S. Kleinlogel, «Chronic activation of the D156A point mutant of Channelrhodopsin-2 signals apoptotic cell death: the good and the bad», *Cell Death Dis.*, vol. 7, n.º 11, pp. e2447-e2447, nov. 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.351.
- [83] GenSight Biologics, «A Phase 1/2a, Open-Label, Non-Randomized, Dose-Escalation Study to Evaluate the Safety and Tolerability of GS030 in Subjects With Retinitis Pigmentosa», clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT03326336, feb. 2021. Accedido: ago. 24, 2021. [En línea]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03326336>

- [84] J.-A. Sahel *et al.*, «Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy», *Nat. Med.*, vol. 27, n.º 7, pp. 1223-1229, jul. 2021, doi: 10.1038/s41591-021-01351-4.
- [85] M. R. Soboleski, J. Oaks, y W. P. Halford, «Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells.», *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 19, n.º 3, pp. 440-442, mar. 2005, doi: 10.1096/fj.04-3180fje.
- [86] M. Zimmer, «Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior», *Chem. Rev.*, vol. 102, n.º 3, pp. 759-782, mar. 2002, doi: 10.1021/cr010142r.
- [87] A. M. Schrand *et al.*, «Are diamond nanoparticles cytotoxic?», *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, n.º 1, pp. 2-7, ene. 2007, doi: 10.1021/jp066387v.
- [88] L. Guarina *et al.*, «Nanodiamonds-induced effects on neuronal firing of mouse hippocampal microcircuits», *Sci. Rep.*, vol. 8, n.º 1, p. 2221, feb. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-20528-5.
- [89] Y.-A. Huang *et al.*, «The effect of fluorescent nanodiamonds on neuronal survival and morphogenesis», *Sci. Rep.*, vol. 4, n.º 1, p. 6919, nov. 2014, doi: 10.1038/srep06919.

10. Anexos

Porcentaje (%)	Medio de cultivo celular primario
97,5	Neurobasal™ Medium (1X) Liquid without Phenol Red (Thermo Fisher)
1	B-27™ Supplement (50X), serum free (Gibco™)
1	Biowest FBS: Fetal Bovine Serum
0,25	Penicillin-Streptomycin 10,000 U/mL (Gibco™)
0,25	B-27™ Supplement (50X), minus vitamin A (Gibco™)

Porcentaje (%)	Medio de cultivo celular NSC - 34
89	DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, (Gibco™)
10	Biowest FBS: Fetal Bovine Serum
1	Penicillin-Streptomycin 10,000 U/mL (Gibco™)

Concentración (mM)	Medio extracelular Tyrodes
136,5	NaCl
5,4	KCl
1,8	CaCl ₂
0,53	MgCl ₂
5,5	Glucosa
5,5	HEPES - NaOH
pH [7,2]	

