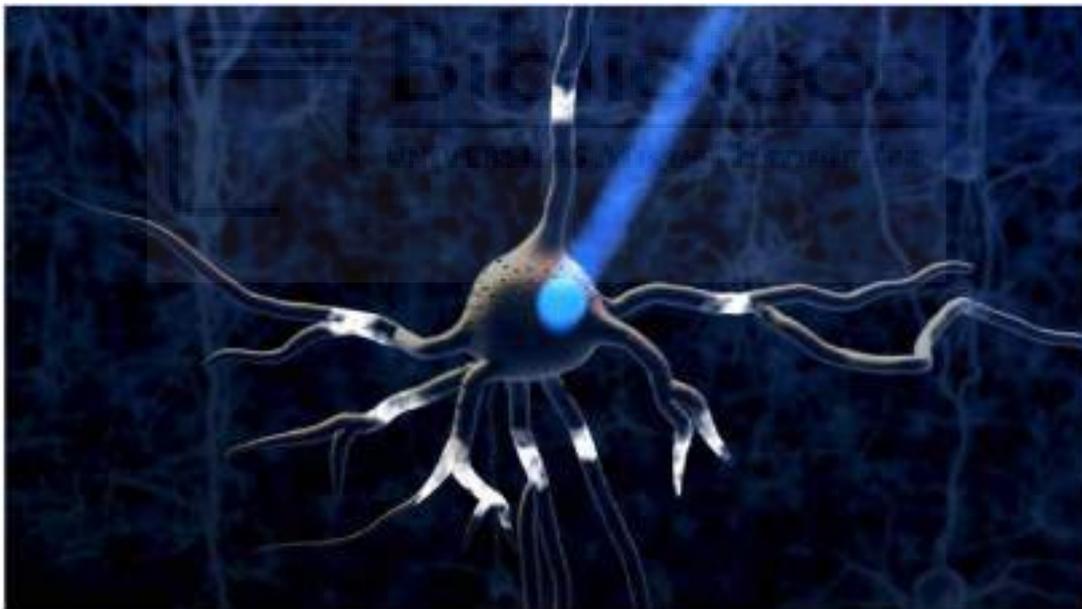


Validación de la utilización de vectores no virales para la modulación de la actividad neuronal mediante técnicas de optogenética para su aplicación en terapia génica



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. Clonación genética.....	3
3.1.1. Tipos.....	4
3.1.2. Vectores.....	5
3.2. Oligonucleótidos.....	8
3.2.1. Oligos.....	9
4. Objetivos.....	12
5. Material y métodos.....	13
5.1. Extracción del plásmido y montaje de la muestra.....	13
5.2. Experimentos in vitro.....	13
5.2.1. Preparación de las placas multicélicas de cultivo celular y electrodos.....	13
5.2.2. Cultivo primario de corteza cerebral embriónica de ratón.....	14
5.2.3. Cultivo de la línea celular NSC34.....	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 potenciales f.é.....	19
5.3.1. MEA.....	19
5.3.2. Análisis de los registros de multi-electrodo.....	22
5.3.3. Voltage clamp y fotostimulación.....	23
6. Resultados.....	24
6.1. Resultados de la transfección.....	24
6.1.1. Efecto de los cultivos primarios.....	24
6.1.2. Transfección en línea celular.....	26
6.2. Resultados del registro de actividad neuronal y potenciales f.é.....	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 conización de rata.....	33
6.3.2.	Cultivos de la línea celular inmetalizada NSC-32.....	33
7.	Discusión.....	36
7.1.	Traslocación en ovarios prenatales y la línea celular NSC-32.....	36
7.2.	Registros electrofisiológicos y autoestimulación.....	37
7.3.	Ensayos de citotoxicidad.....	38
8.	Conclusiones.....	40
9.	Bibliografía.....	44
10.	Anexos.....	47



1. Resumen

Durante la última década se desarrolló un método zootécnico para vectorizar genes de interés en células y tejidos susceptibles de gran interés de cultivos tanto que esta técnica sea fácil y segura. Los vectores víricos son los más utilizados en el campo de la terapia génica tanto en investigación básica como clínica, para realizar sus estudios, presentan una serie de inconvenientes, como su propia capacidad de carga y seguridad. Es por ello por lo que durante los últimos años se están desarrollando vectores no víricos con propiedades Biotecnológicas que les permitan actuar como transportadores de material genético de interés. En este trabajo tratamos de validar dos nuevas formulaciones de vectores tipo nisoma, evaluando su capacidad de transcribir en dos modelos celulares, la línea celular NSC-32 y los cultivos primarios de córtex embrionario de ratón. Además de la capacidad de transcribir, tratamos de establecer si existe una funcionalidad asociada a la transcripción, mediante técnicas de registro electrofisiológico tanto de célula única utilizando la técnica de *patch clamp* como nuestro método favorito, que es conseguir actividad por acción en pares de cultivos multi-hipocampo. Por último, valoramos la citotoxicidad de los vectores en distintas células usando el ensayo MTT. Las formulaciones de vectores no víricos basados en nisomas que se propusieron en este trabajo, no consiguieron una tasa de transcripción suficiente en ninguno de los modelos celulares utilizados, por lo que se desistió su uso en los experimentos de electrofisiología con los cuales, sin embargo, sí se consiguió una respuesta tanto individual como poblacional con la zona de control positiva. No obstante, se reportaron buenos experimentos en los que mejoran las condiciones de reproducibilidad y en cuanto a la eficiencia de transcripción del control positivo, las formulaciones presentaron distintas propiedades citotóxicas en función del modelo celular utilizado, siendo poco o nada citotóxico con los cultivos primarios mientras que redujeron la viabilidad y casi lo eliminaron en cultivos celulares de líneas immortalizadas.

Palabras clave: terapia génica, terapia génica no viral, electrofisiología, cultivo neuronal

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 clinical 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 lipid-based vectors. We evaluate their capacity for transfecting using two common models: cell line NSC-31 and primary embryonic cortical neuronal culture. Besides the transfection efficiency we try to establish functionality and ability for epigenetic modulation by electrophysiological recordings using single cell recording with patch clamp technique and multi-electrode arrays plate since cell population is our main interest. Finally, we evaluate vector cytotoxicity in different ratios using MTT assay. Novel liposome-based formulation used in this work were unable to achieve a sufficient transfection efficiency, not in immortalized cell line nor in primary culture in order to set going with them in electrophysiology experiments. Despite that we were able to optimize the electrophysiology recordings and epigenetic modulation and response were obtained in both single cell 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 cell death or decrease in viability in several cases.

Keywords: epigenetic, gene therapy, non-viral, electrophysiology, cell culture

3. Introducción

3.1. Terapia génica

La terapia génica es el conjunto de técnicas que manipulan 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 transporta 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 crónicas, especialmente cuando se encuentran 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 terapias y cotizan en la bolsa americana, e incluso incógnitas en el índice NASDAQ, en 2016 tenían un valor de mercado que excedió los 4000 millones de dólares americanos [3].

Las nuevas tecnologías para la terapia génica incluyen el uso de vectores para trasladar los ácidos nucleicos al tejido diana. En los últimos años, ha surgido una serie de tratamientos para edición genómica basados en enzimas bacterianas. Estos tratamientos, a diferencia de los que consisten en transportar material genético a través de los vectores, pueden potencialmente realizar otras modalidades de ingeniería tales como la edición del gen, silenciamiento, etc [1].

Dentro de las enfermedades genéticas, se diferencian tres tipos principales. Las enfermedades cromosómicas, que afectan a grandes regiones del genoma mediante deleciones, duplicaciones o inserciones aberrantes en los distintos cromosomas; las de herencia compleja o multifactoriales, las cuales la etiología se debe a múltiples genes al mismo tiempo y a menudo están fuertemente influidos 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 el porcentaje de alteraciones ambientales [1].

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

Al ser el sistema de complejidad de los elementos neurodegenerativos, existen en desarrollo numerosas terapias génicas para trastornos como por ejemplo terapias para Alzheimer, Parkinson o la enfermedad de Huntington [7].

Numerosas terapias moleculares neurodegenerativas, aunque son de naturaleza distinta, comparten rutas moleculares, particularmente en el citoesqueleto y defectos en los mecanismos de reparación del ADN [6]. Este hecho servirá 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, o el lugar donde se produce la manipulación.

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

- *Ex vivo*: En este tipo de terapia, los células madre que corrigen el defecto alterado serán introducidas 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 de 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 no será utilizada con bastante éxito en el tratamiento de hemofilia así como enfermedades visuales y neurodegenera [8].
- *In vivo*: En este tipo de terapia las células madre son extraídas del paciente para ser modificadas y que se restablezca 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 dañadas, lo que le da una especificidad absoluta. Otra ventaja es su tamaño compacto debido, 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 división post-tratamiento, 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 inmunológicas y algunos tipos de cáncer [8].

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

- La terapia génica *germinal* implica la modificación permanente del genoma en espermatozoides o en óvulos germinales, a lo cual la han por ahora

transmitirse a la descendencia. Este hecho hace que, por razones éticas y legales, la terapia génica en células germinales no se pueda llevar a cabo [6].

- La terapia génica somática es la terapia dirigida a las células que poseen a las células madre durante el desarrollo embrionario y que no pertenecen a la línea germinal. Estos 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

Cada vez se va identificando el gen mutante que causa una enfermedad de herencia autosómica recesiva al siguiente paso que es la producción de genes recombinados que se restituirán la función en las células diana. Para ello, como ya mencionamos previamente, lo de ser dispuesto en un vehículo llamado vector, cuyo también 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 depende de la célula diana y sus características, así como la duración que se pretende que tenga la expresión y el tamaño del fragmento genético que va a ser incorporado al vector [11].

No se quiere que se utilicen para el diagnóstico, sino que además de no proteger al material genético de la degradación por nucleasas y otros sistemas enzimáticos, además se eviten respuestas inmunes [10]. Esto es especialmente importante en terapias in vivo.

Existen tres 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 recombinados para llevar el material genético a las células diana. De lo que se trata es de imitar los mecanismos de infección viral, así como se va virando la expresión de los genes virales que dan lugar a replicación y finalmente a la patogénesis 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 víricos [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 inmunogénesis, 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 se pueden evitar de sintetizar [16] – [17]. Sin embargo, los vectores no virales tienen como mayor desventaja la baja eficiencia de transferencia 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. Tal es el caso la degradación de por las endonucleasas del sistema inmune,

interacciones no específicas, mediante la entrada celular, y conseguir la correcta exposición 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 importante utilidad de la memoria neuronal, presentan una dificultad específica y la necesidad de expresión del plásmido en el núcleo del Dicho que este es un sistema bastante eficiente 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, inmutabilizadas es extrapolable hasta los contextos *in vivo*, donde las dificultades de entrada del vector no vírico tal, débil son muy bajas [19].

Entre los métodos de vectores más comunes se encuentran los métodos físicos, como la electroporación, que pese a ser muy efectiva se encuentra restringida a tejidos *in vitro*, 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 encuentran 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 los lípidos en vesículas llamadas liposomas.

Durante años, el grupo de Neurogénesis de la Universidad Miguel Hernández mediante una colaboración con el grupo de investigación NeuroBio del Universidad del País Vasco, Miranda de Ebro, que se ha trabajado con vectores no víricos, uno de los enfoques más usados en este tipo de aplicaciones, para superar las barreras celulares, intentar superar estas limitaciones, como la dificultad de llegar al núcleo, la posibilidad 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 víricos 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 físicas con el objetivo de mejorar la eficiencia de la transfección [23].

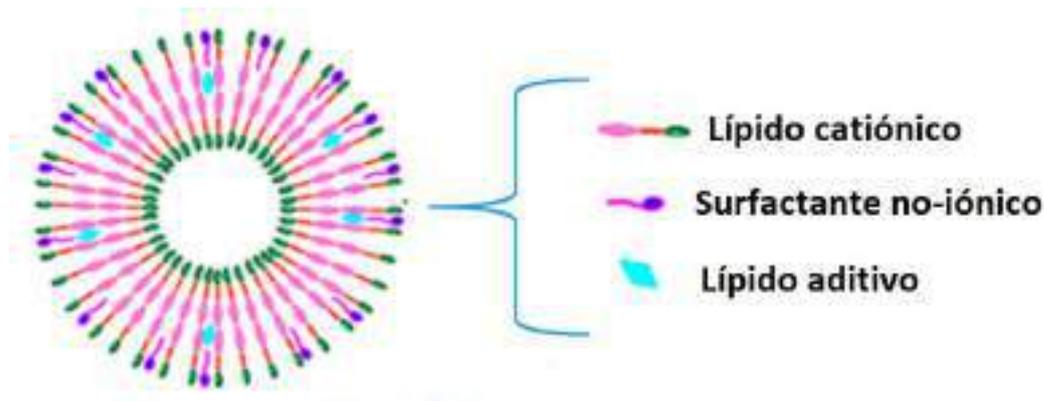


Figura 1 Estructura de un liposoma (19).

za, nioplexos, que es la unión del niosome al ADN, por su mayor toxicidad, son osmóticamente estables, tienen una formulación estable y son fáciles de mezclar (24–25). Estos nioplexos se forman con la simple adición del material genético y la dilución osmótica de los niosomes. Debido a la interacción electrostática entre los grupos amino de los lípidos catiónicos del niosome y cargados positivamente y los grupos fosfato del material genético cargados negativamente, la construcción (Nioplex) puede conseguirse a diferentes ratios lípido-material genético (es decir, la relación) (25).

La 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 niosomes utilizadas en este trabajo se planteará el uso de mezclas ricas en lípidos esfingolípido como coadyuvantes para mejorar la eficiencia de transfección de estos vectores virales.

3.1.2.2. Esfingosomas

Una de las mayores limitaciones a las que se encuentran los liposomas, vectores virales basados en lípidos, es la inestabilidad química y física una vez se han administrado. Es por ello por lo que en muchos trabajos a la hora de sintetizar nuevas formulaciones, se ha propuesto el uso de esfingolípido, lípidos relacionados con la esfingosina.

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

Otra de las aplicaciones de los esfingolípido es su uso como coadyuvante en los niosomes. Los niوسفingosomas es el nombre que reciben los niosomes utilizar los esfingolípido como aditivo en la formulación, como es el caso de una de las formulaciones utilizadas en este trabajo (19). La inclusión de estos esfingolípido como aditivo a los niosomes, les confiere estabilidad, mayor tiempo de liberación en sangre, así como una reducción de la toxicidad (29).

3.1.2.3. Nanodiamantes

Los nanodiamantes (ND) son un tipo de nanopartícula de espaldar 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 (1 a 5 nm) y su biocompatibilidad, lo que le otorga gran potencial en aplicaciones biotecnológicas [31].

Una de estas aplicaciones es la terapia génica, donde uno de sus principales potenciales radica en su capacidad de ser capaz de unir ácidos nucleicos y transportarlos de forma específica al tejido diana.

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

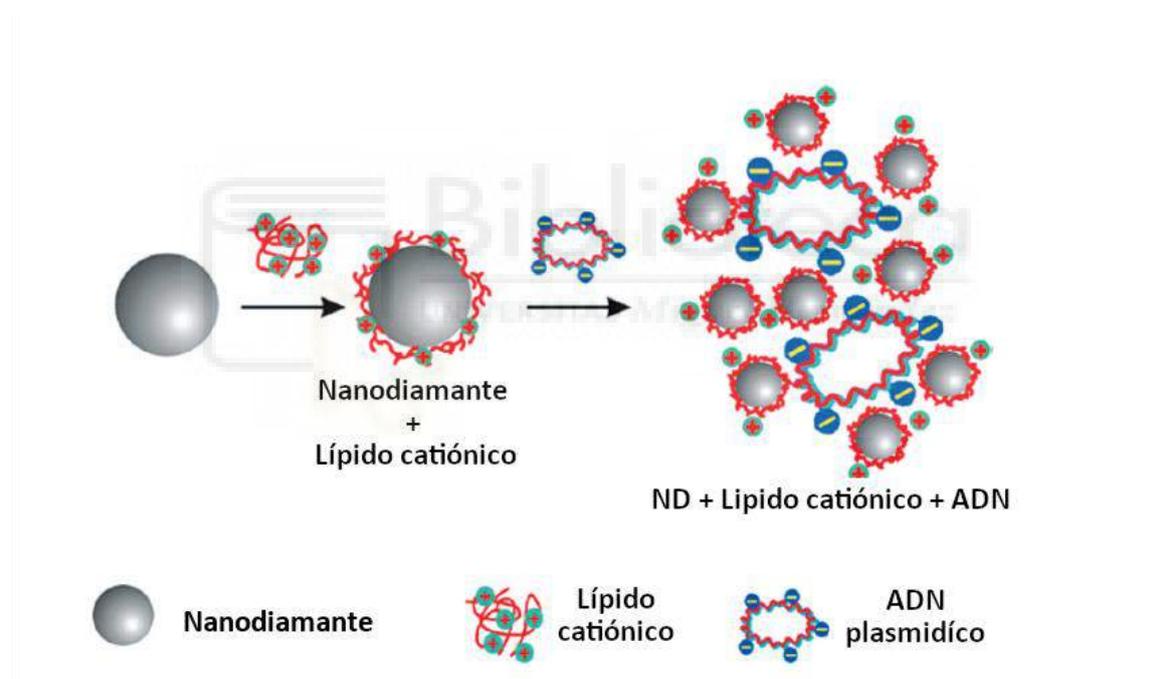


Figura 3.1. Ensamblaje del complejo nanodiamante – lípido catiónico – plásmido [32].

Una de las formulaciones utilizadas en este trabajo, llamada ND12, utiliza los nanodiamantes monodispersos como el agente catiónico del liposoma para aumentar la eficiencia de transcripción del vector no viral. Este tipo de liposoma recibe el nombre de nanodiamante.

3.2. Optogenética

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

inhibición neuronal y modifican esta actividad en toda una serie de seres vivos, incluidos humanos (31).

Los métodos optogenéticos surgieron a partir de la identificación y clonación de proteínas transmembrana de conejillos con opsinas microbianas, los cuales son similares en cuanto a la función transportadora de iones y a las opsinas de las retinas de mamíferos, aunque con diferentes mecanismos. Estos tipo de opsinas modulan los potenciales de membrana al conectar iones, estas proteínas pueden utilizarse para controlar la actividad nerviosa cuando con métodos de bioingeniería se introducen en otras células o animales de laboratorio.

3.2.1. Opsinas

En animales vertebrados, las opsinas son proteínas transmembrana que forman parte de la molécula heteroóptica rodopsina y coneopsina. Funcionan como moléculas heteroópticas en células (35). Estas proteínas, sin embargo, no son homólogas con las encontradas en hongos, bacterias, y algas (aunque se relacionan (36).

Por otra parte, los canales opsinaes son proteínas transmembrana ionotrópicas, no así las opsinas de las retinas animales, que son meta ionotrópicas. Esto significa que funcionan y tienen formas y sus mecanismos de activación distintos (Figura 30), así como con orígenes filogenéticos diferentes, sin embargo el resultado final de la activación de uno y otro es un cambio de carga iónica.

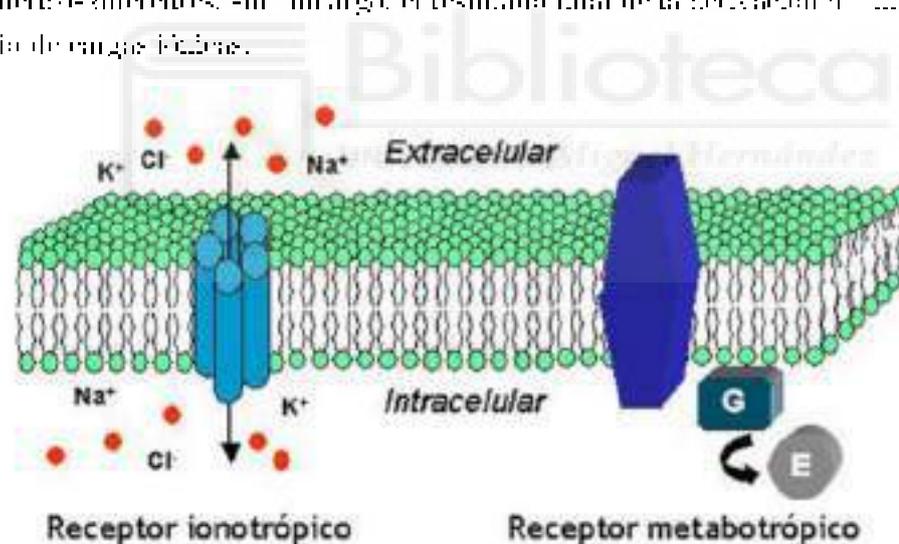


Figura 3. Representación esquemática de los receptores ionotrópicos y los metabotrópicos. Ionotrópicos: canal iónico transmembrana que permite el paso de iones; metabotrópicos: asociados a proteínas G (G), que regulan la actividad de canales iónicos.

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

La bacteriorodopsina es un protón desde el interior celular, y la canalopsina conecta los canales Cl⁻ desde el medio extracelular al interior celular, teniendo el potencial de la

membrana neuronal más negativa, hiperpolarizable y haciéndolo por tanto menos excitable (38, p. 12).

Las axonas de gusano por su parte, poseen canales iónicos variables que pueden ser estimuladas por diferentes longitudes de onda y que también transportan iones como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} con función despolarizante, hiperpolarizante, o de acción como canales Cl^- que hacen con la hiperpolarización, provocando inhibición (38, p. 14).

estas opsinas microbianas pueden ser selectivamente excitadas en un área de longitud de onda distinta, lo que permite modular de una forma mucho más rápida y precisa el paso de iones a través de la membrana y por tanto la actividad neuronal, puesto que, este tipo de células tienen avanzadas 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 ión a uno de la membrana.

el potencial de acción es un fenómeno que significa la negatividad potencial de reposo y lo convierte en positivo. Los potenciales de acción se transmiten a través de axones neuronales utilizando 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 equilibrada entre el medio intracelular y extracelular, respectivamente. Consecuencia de 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 de todo al mismo tiempo que sea gradual, ya que presenta respuestas de todo o nada, sin puntos intermedios. Es por esto por lo que se prepara sin descanso a lo largo de la membrana, ya que se regenera en cada punto.

La función de las opsinas microbianas en neurociencia, reside en el hecho de que son canales transmembrana ionotrópicos que van a activarse de forma selectiva u autorreguladas longitud de onda de luz que pasará a través y por tanto modular la actividad neuronal de una forma más rápida y eficiente que con las opsinas de vertebrados (39).

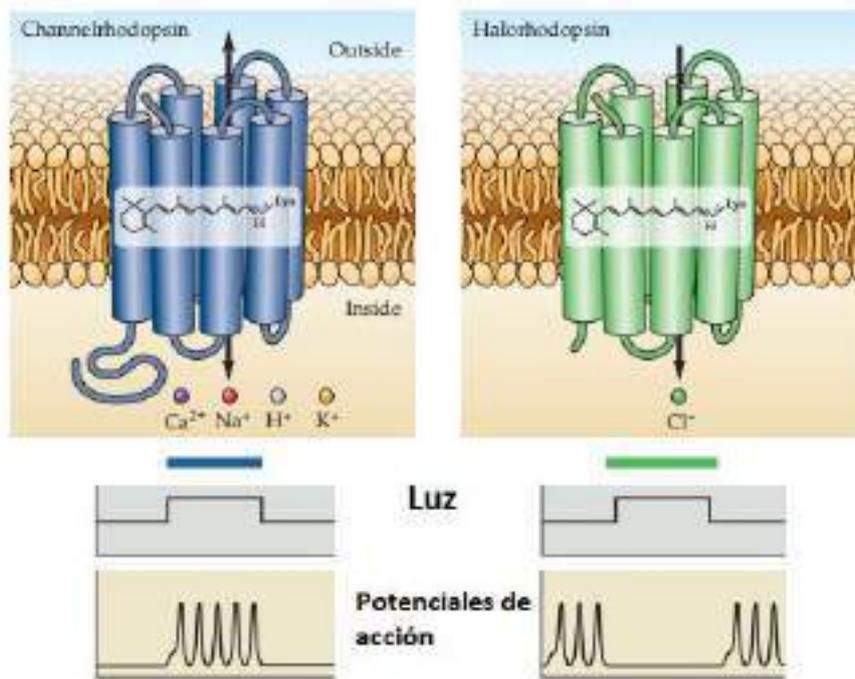


Figura 4. Estructura molecular de las opsinas bacterianas y sus vías de transducción. El canal de cationorrodopsina transporta cationes al interior celular (cationes Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), cuando se ilumina con luz azul y por tanto más potenciales de acción se producen (abajo). El canal halorodopsina inhibe los potenciales de acción (Cl^-) por el contrario (abajo) con el estímulo con luz amarilla (abajo).

22. El transceptor de este malaparejo contrarrestado es el canalorrodopsina (ChR2). Consiste en una proteína transmembrana con el extremo N-terminal en el interior de la célula y un dominio C-terminal orientado hacia el exterior. El módulo N-terminal comprende siete hélices transmembrana y el dominio C-terminal (10).

Hasta 2011 todas las canalorrodopsinas se activaban en el espectro del UV ($\lambda = \text{valor en } 100 - 550 \text{ nm}$) (11). No fue hasta 2011 cuando mediante una serie de investigaciones en el campo de la ingeniería de proteínas, pudieron crear el canal ChR2msudR (ChR2), una proteína que se activa con una longitud de onda cercana al espectro del rojo ($\lambda = \text{valor en } 600 - 650 \text{ nm}$) (12) que ChR2. Se ha mejorando de nuevo la zona sitio de que se encuentra el grupo amino de la proteína transmembrana sea lo más rápida posible para así poder aumentar el flujo de cationes salidos con más precisión (11).

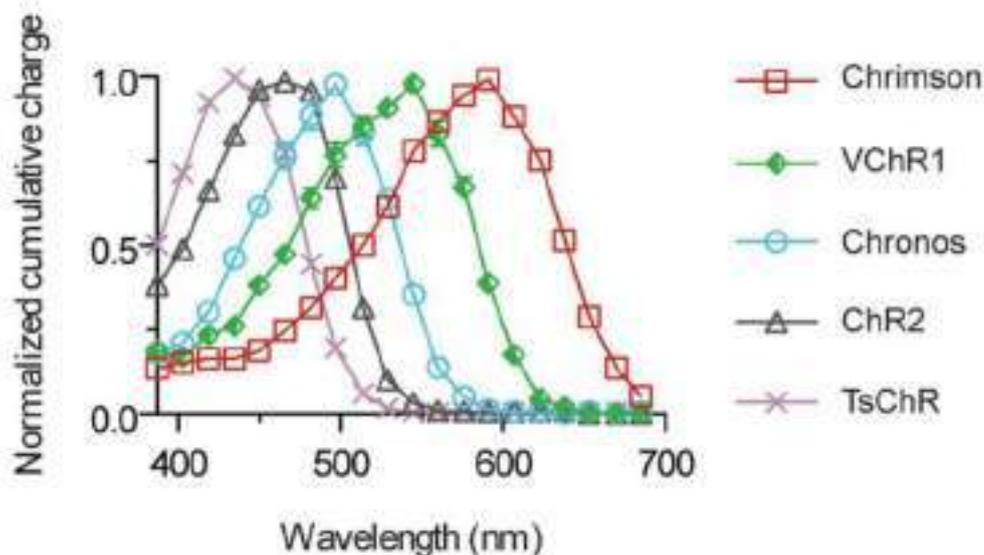


Figura 4. Representação da carga cumulativa normalizada dos cromóforos em função do comprimento de onda (400-700 nm) calculada sobre a equação $I = I_0 e^{-\lambda}$. Os picos de absorção de corantes de Chrimson e VChR1 estão deslocados para fora do campo visual humano respectivamente.

o comprimento de absorção de fotões de Chrimson é de 590 nm de comprimento de onda [12], lo qual lhe permite atuar mais segura para a clínica, pois sabe-se que a luz azul é menos penetrante que a luz amarela (590 nm) [13]. Por estas razões, lemos selecionamos esta proteína para o nosso estudo.

4. Objetivos

O grupo de investigação de Neurogénese tem, Instituto de Ciências Médicas da Universidade Miguel Hernández, mantém desde há vários anos uma colaboração com o grupo de investigação NeuroBioCell da Universidade de País Vasco, Vitoria para validar a capacidade de transferência de vetores não virais para a medula espinhal do sistema nervioso.

o objetivo principal de este trabalho é a validação de vetores não virais como possíveis aproximaciones terapéuticas em doenças degenerativas. Para tal, as proteínas recombinadas mediante técnicas de engenharia genética para sua aplicação em a transferência de enfermidades neurodegenerativas em dois modelos celulares distintos: os cultivos primários de células endoteliais de rato, utilizados em provas preliminares [21] - [24], como modelo para enfermidades neurodegenerativas cerebrais e a linha celular NSC-32 como modelo base para a transferência de enfermidades neurodegenerativas da medula espinhal.

Para ello, hemos establecido varios objetivos específicos:

- Validar la capacidad de transferencia de dos formulaciones de vectores no virales (M123 y M10) en el pénsulo Chrimson? frente al vector comercial control tanto en cultivos primarios de células endoteliais de rato, como en la línea

celular con actividad electrofisiológica (NEC) = 3a) derivada de células de neuroblastoma MSTC2 y neuronas motoras en cultivos de la médula espinal de R304.

- Validar la funcionalidad de las células neurocitos transcortales mediante la caracterización electrofisiológica en respuesta a la estimulación eléctrica.
- Conocer los efectos citotóxicos asociados a la combinación con algunas formulaciones de antivirales no virales.

5. Material y métodos

5.1. Extracción del plásmido y cuantificación de la pureza

El plásmido utilizado fue pCMV-GFP-musculoD1 [12], obtenido a partir de bacterias *Escherichia coli*. 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.

Después de la incubación de las células durante 24 horas a 37 °C, se centrifugó en una ultracentrífuga (Beckman Coulter, *Avanti J-26*) a 60000 rpm durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se utilizó el kit comercial *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen) para la lisis celular y la precipitación por gravedad y filtros de intercambio iónico para separar y purificar distintos tipos de moléculas de interés, en este caso ADN plasmídico.

La concentración y contaminación del material genético obtenido se cuantificó mediante un *NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific (NanoDrop)*. Este dispositivo mide la concentración de ADN en μg por μL , además de la proporción o ratio de contaminación en A260/A280 indicando contaminación por polisacáridos y compuestos fenólicos, y el ratio A260/A280, indicando contaminación por componentes proteicos [16], [17].

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 microelectrodos (MEA) *compact-electrode array (MEA 296-296E-Tsq, Multi Channel Systems MCS GmbH)*. Las placas multipocillo de 24 pocillos fueron empleadas para realizar los ensayos de transfección y optimizar las propiedades de transfección en células para cada tipo de cultivo, mientras que los de 96 pocillos se utilizaron para los ensayos de citotoxicidad. En vez de realizar los parámetros óptimos se realizaron los cultivos sobre los electrodos de registro.

El primer paso en la preparación de cultivo en monocapas fue limpiar la superficie del pocillo de Poly-L-Lisina hidrocálcico (PLL) para los cultivos primarios y Poly-L-Lisina

MEM para la línea celular NSC-31, análisis de la tasa emendial *Syngon. Mito* y una concentración de 0.01 y 0.02 mg/ml, respectivamente, en el tivo de los esteros que tanto PDL como PDL, evolucionó a la adhesión de las células al sustrato del pozo ya que el ser un compuesto polimerizable, interacciona con las zonas ricas en lípidos de las células. Es permitiendo una adhesión 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, el ácido cítrico es el componente principal de la membrana que afecta a la proliferación y una señal celular con 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 realizan en placas multi pozos tanto para los experimentos de puesta a punto de la transcripción y electrofisiología, y en MEAs en el caso de los cultivos para los registros de electroestimulación.

La técnica de corteza fue extraída de embriones de rata *Syngon. Doble* en el día 17 de gestación. Fueron el postados en un medio HBSS (*Heath's Balanced Salt Solution, Gibco*) con *calcium and magnesium chloride*. Una vez extraída y separada, la corteza cerebral embrionaria se diseca y se trituró cuidadosamente.

Es importante trabajar en condiciones de esterilidad, por lo que el proceso se realizó en una cámara de flujo laminar y con material estéril. La tija disecada fue recogida y poseída en un tubo Corning de 15 mL.

Después de la desagregación mecánica se procedió a hacer una digestión química con tripsina (*Trypsin-EDTA 9.900*, *Gibco*). La solución de este tubo se colocó para posteriormente añadir una solución de tripsinización mecánica en 1 mL de MEMM (*Basal Media Modified Eagle Medium, Gibco*) y 200 µL de tripsina. Este tubo se incubó a 37 °C durante 10 minutos.

Para eliminar la necesidad de pre-digestión de la tripsina se eliminó el sobrenadante, se añadió medio de cultivo celular con suero meso de cultivo NSC = 34 [Amgen](#) y se centrifugó a 1750 revoluciones por minuto durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y añadido a 1 mL de medio de cultivo primario [Amgen](#) con suero disgregado celular.

Para las placas de 96 pozos se sembraron 150.000 células por pocillo para las de 24 pozos se sembraron 150.000 células por pocillo y para las placas de cultivo MEA se sembraron unas 300.000 células por pocillo intentando que quedara la más cantidad posible sobre la región de los electrodos para optimizar el posterior registro.

Las placas fueron lavadas y se incubaron 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 (*HLHomas Hoesystrast*) es una línea immortalizada de células de neuroblastoma NS102 y zebras neuroepiteliales de la médula espinal de ratón (16).

Estas células han demostrado tener características, por lo que se usa línea celular immortalizada similares a las zebras neuronas, como por ejemplo los neurofilamentos (16), sirve como modelo experimental para enfermedades como la esclerosis lateral amiotrofica (70) y de más importante, presenta actividad electrológica (71).

al zorro de trabajar con líneas celulares, pero una gran serie de ventajas frente a los cultivos primarios, como son, reproducibilidad, proceso que son células clonales (aplicación de un dependiente de animales de experimentación) y posibilidad en sitios de ensayo y métodos importantes, reducción del uso de animales de experimentación.

esta línea celular ha sido estudiada especialmente como modelo para comprender los mecanismos de la esclerosis lateral, diferenciación y estrés oxidativo (72, 73). Sin embargo, apenas ha sido estudiada sus propiedades electrológicas (74, 54).

estas células, al igual que los cultivos de las células neuronales de corteza cerebral se sembraron en placas multi-pocillos tanto para los experimentos de potencia y punto de la transición y electrológica, y en MEM en el caso de los cultivos para los registros de la estimulación.

Para la siembra se utilizó uno de las placas de nueve pocillos en un estado de crecimiento 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 tampón salino (PBS) a una concentración de 0.5% en. Esto es necesario puesto que el suero bovino fetal (FBS) que contiene el medio inhibe la trypsin a enzimas proteasas como Alfa 1-antitripsina y por tanto las células no se separan. Este líquido se diluyen 3 ml de trypsin y se pasan las incuban durante unos minutos. Describiendo 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 previene necesario, y la fue pasarla con 5 ml de medio de cultivo para centrifugar a unos 400G. Este procedimiento se hizo para inhibir o quitar la trypsin. 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 multi-bocillo.

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 325 μg en las placas de 96 pocillos, 1.25 μg en las placas de 24 pocillos, y de 2.5 μg en las 48EA. 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 lo que puzamos o queramos conseguir.

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron los nanodispositivos ND42 -32 y los nanodispositivos ND19, proporcionados por el grupo de investigación *Nanobio4U*. Los nanodispositivos y los microdispositivos son una formación de nanosomas en las que se utiliza el ligando catiónico (30TMA (1,2-di-(3)-octadecilo-3-trimetilpropilammonio) de amonio) el surfactante no iónico Polisorbato 20, y nanodispositivos (*Nanodispositivos*) microdispositivos como soporte. En el caso de ND42 los *nanodispositivos* (*nanodispositivos*) en el caso de ND19. Los detalles en cuanto a la formulación y sus dosis son tarea del grupo *Nanobio4U*, y por tanto el objetivo de este trabajo se centra exclusivamente en la evaluación y validación *in vitro* de dichas formulaciones en modelos orgánicos del sistema nervioso.

Para la construcción de los vectores se usaron diferentes proporciones y plásmido + vector a saber: 10:5:5 o 2 μg de vector por cada 1 μg de plásmido. Para el control positivo, utilizamos *Lipofectamina (Lipofectamina 2000 Transfection Reagent, Thermo Fisher Scientific)* como 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 añadamos *Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific)*, que es un medio mínimo que permite una reducción del estrés, lo que afecta positivamente a la eficiencia de transfección. Los ligandos catiónicos (50 μg) se añaden final de *Opti-MEM* de modo del tamaño del pocillo, siendo de 500 μl para los pocillos multi-bocillo (48EA), 250 μl para las placas de 24 pocillos y de 50 μl para las placas de 96 pocillos.

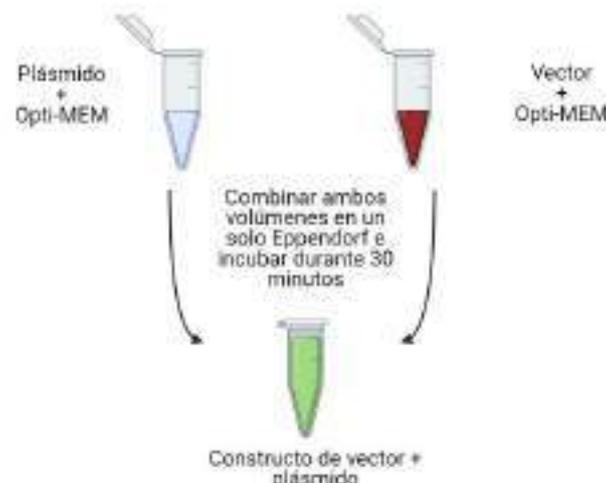


Figura 5.2.4. Esquema del procedimiento utilizado en el laboratorio y por la construcción del complejo plásmido + vector.

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

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

Las proporciones utilizadas para los vectores M12 y P10 fueron:

Tabla 1. Proporciones utilizadas para el vector de plásmido y el vector de vector.

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

Para realizar esta preparación, se juntaron los dos volúmenes en un mismo tubo para dejarlos incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Este tiempo de incubación es necesario para que plásmido y vector se unan para formar el complejo por medio electrostático.

5.2.5. Transfección

Durante la preparación, se quitó la mitad del medio de cultivo de cada poquito para evitar tanto que haya el mismo volumen como que el suero que contiene el medio de cultivo pueda interferir con el complejo.

En el caso de los cultivos primarios, esta mitad del medio de cultivo se guardó para ser reemplazado posteriormente, de modo que contiene factores nutricionales que evitarían estrés a las células de nuestro cultivo primario (76).

Una vez pasados los 30 minutos de incubación se transfirió el volumen de los tubos al poquito correspondiente. Tras ello, las placas se incuban durante 3 horas en el caso de la línea control y 1 hora en el caso de los cultivos primarios.

Una vez transcurrido el tiempo, se retiró de los poquitos el medio de cultivo con Opti-MEM y se reemplazó con medio de cultivo nuevo a 37 °C, siendo en el caso de los cultivos primarios la mitad del suero que se había previamente añadido de los complejos a los poquitos.

5.2.6. Ensayos de citotoxicidad

Para evaluar la citotoxicidad de los distintos tratamientos con los vectores utilizados, se realizaron los ensayos de MTT o Brnuno de 3-(4,5-dimetiltiliazol-2-il)-2,5-difenilmetanol (Thiazol Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich). El propósito de este experimento es el de medir la cantidad de viabilidad celular en placas de 96 poquitos y por tanto comparar la citotoxicidad de este tratamiento.

Las células en buen estado tendrán mayor actividad mitocondrial, la cual es capaz de transformar el MTT a azul de metileno en cristales de formazina, el cual al disolverse en DMSO (dimetil sulfoxido) da un color naranja (77). La intensidad del color, que es directamente proporcional a la vitalidad celular, se medirá en un espectrofotómetro a 570 nm de longitud de onda. De ahí por tanto obtenemos un valor que a mayor intensidad de color, menor es la misma, mayor al ser ha de mayor viabilidad celular.

En estos ensayos experimentales se puede realizar tanto en líneas celulares como en cultivos primarios. En nuestro caso fue realizado tanto en cultivos de células embrionarias de corteza de ratón como en la línea celular NSC-31.

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-31. Los tiempos de incubación que se usaron en las diferentes series de aplicar los tratamientos fueron de 7 días para los cultivos primarios y de 18 horas para las células NSC-31.

Para preparar los vectores M312 como el P110, se hicieron dos placas, una en la que se aplicó el tratamiento asignado al protocolo de los aparatos [\(Construcción del vector pGL3 plasmídico - vector y transfección\)](#). En una placa el tratamiento fue aplicado durante 18 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 y causa de su metecolismo más lento en relación a las líneas celulares inestabilizadas (78).

Los grupos experimentales siguientes fueron los dos vectores por separado usando las ratios 1:1, 5:1 y 20:1 con y sin péptido unido en el caso de las células NSC-31 y solo vector no viral para el cultivo celular primario. El objetivo de este diseño experimental fue encontrar las proporciones óptimas de transfección y viabilidad.

Una vez que se aplicó el tratamiento con vectores durante las 18 horas o 72 horas respectivas, se añadió a los pocillos 10 μ l de una disolución de MTT en PBS (5 mg/ml) y se incubó durante 24 horas en el caso de la línea celular NSC-31 y 48 horas en el caso de los cultivos primarios.

Tabla 5. Resumen de los tratamientos aplicados y parámetros utilizados en cada caso ya de elección relativa en función del tipo celular.

Tipo celular	Número de células/pocillo	Tiempo de aplicación del tratamiento	Tiempo de incubación con MTT	Ratio de vector µg de plásmido
Cultivo primario de córtex embrionario de rata	30,000	18 horas	1 hora	10:1 8:1 5:1 2:1
Cultivo línea celular NSC - 34	20,000	18 horas	3 horas	10:1 8:1 5:1 2:1
		72 horas		

En las mediciones hechas durante la incubación, se retiró todo el medio y se añadió 100 µl de DM500 por pocillo para solubilizar los cristales de formazán. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm usando un lector de placas (Biotek Microplate Reader HT-1960, BioVivo).

5.3. Registro de actividad neuronal y fotostimulación

5.3.1. MEA

Una de las formas que se pueden utilizar para medir la actividad electrofisiológica de un cultivo neuronal es utilizar las MEA. Estas 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 registrado por los electrodos de la placa.

La configuración básica de una MEA consiste en una placa de cultivo adherida en su base por serie de electrodos cuya composición normalmente es una mezcla de óxido de indio y estaño o titanio y con un diámetro por electrodo de entre 10 y 40 µm. Los electrodos van a ser capaces de detectar cambios en el voltaje extracelular a causa de la entrada iónica de sodio en una célula durante una potencial de acción (20, p. 22).

Una placa 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. Lo único que no sería posible con electrodos individuales convencionales (40-60 electrodos) para registrar en una célula única es que 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

mejoramiento de las condiciones ambientales de tiempo y temperatura para grabar y procesar las señales (11).



Figura 7. Imagen de la placa de circuitos multicapa de *Melitt Chaper Systems MC 8 Cobble* (México).

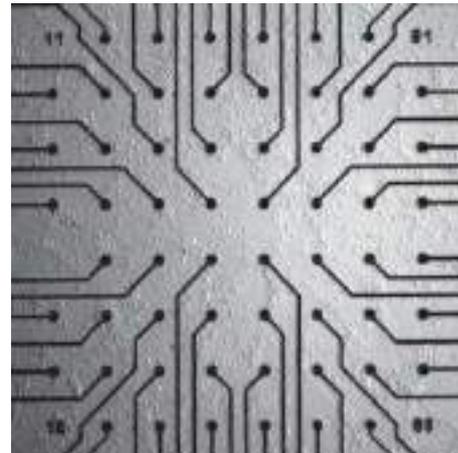


Figura 8. Disposición de los contactos eléctricos del microchip *Melitt Chaper Systems MC 8 Cobble* (México).

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 (70, p. 22).

Para sembrar las MEAs con células de cultivo primario y dejarlas en incubación se les permite incubar entre 7 y 23 días para que desarrollen actividad espontánea, es decir, potenciales de acción. Se dejan en transcurso esos días para que ocurran los procesos de sinaptogénesis y diferenciación celular (62). en el caso de la línea celular NSC-31, el tiempo es de 7 días y vitando que lleguen a más de un 70% de confluencia (71), una vez comprobado que tenían actividad espontánea, se transfieren siguiendo el protocolo de la apartado [Construcción del complejo plástico-vector y la siembra celular](#).

Los registros fueron grabados con el hardware de adquisición MEA-1040-130 (16bits) *Chaper Systems MC 8 Cobble*, conectado a un software de estimulación: *Acústimo (Acústima Evis-1000, Acústima)* como controlador de la fotoestimulación que nos permitió modular tanto el tiempo como la duración de los pulsos de luz emitidos a través de MEA.

La plataforma a su vez está conectada a un controlador de temperatura (TC96) *Melitt Chaper Systems MC 8 Cobble* que nos permitió mantener la temperatura del MEA a 37 °C durante el tiempo de incubación de los registros.

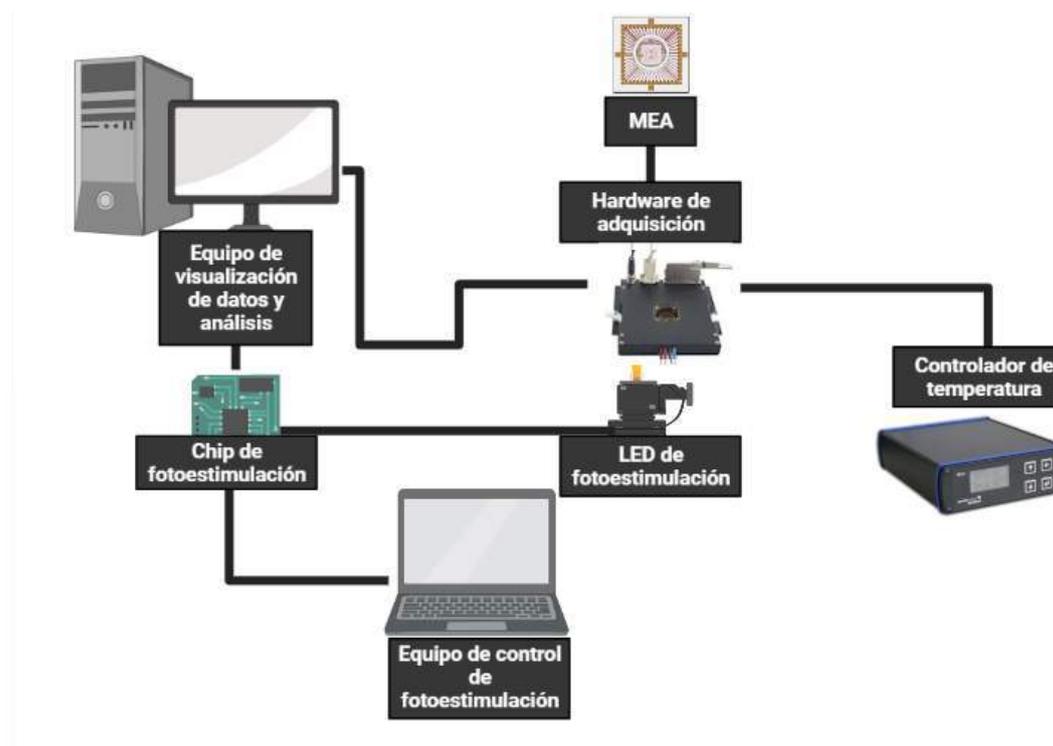


Figura 3. Representación esquemática de la configuración utilizada para los experimentos de fotoestimulación.

Se dejó 5 minutos previos de reposo al MEA en el setup para estabilizar en la medida de lo posible las condiciones del cultivo, es decir, la temperatura, se adquirieron 5 registros de actividad. En primer registro de 200 segundos en el que no se utilizó la fotoestimulación con el propósito de obtener una referencia inicial de actividad eléctrica y en el registro en el que se aplicaron 100 pulsos de fotoestimulación exponencial de duración 150 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 habiéndolo desconectado el LED previamente.

El LED utilizado fue de luz láser a 665 nm de longitud de onda (*LED095, W = 100 mW, 10 mW, 100-60, Thorlabs*), ya que es la óptima para la activación de la proteína *ChR2* (Chen et al., 2012).

Tabla 5.1: *Detalle de los 5 parámetros de registro y pulsos de los que se componen por canal. Véase el video correspondiente.*

Número de registro	Registro 1	Registro 2	Registro 3	Registro 4	Registro 5
Tiempo de pulso de LED	50 ms	70 ms	100 ms	250 ms	700 ms
Tiempo de LED apagado	50 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 1.6.2 (*Motor Control Systems, M.C. Gálvez*) guardándose a la toma de señales el filtro *Bandstop passfilter* con una frecuencia de 50 Hz y el filtro *Butterworth Low pass filter* con una frecuencia de corte de 200 Hz.

Los registros fueron guardados para su posterior análisis *el Hernández*.

5.3.2. Análisis de los registros de multielectrodo

Una vez terminados los registros se extraerán los potenciales de acción con el software *MC_Rack* versión 1.6.2. Para ello se utilizó la aplicación *Spike Sorter* del programa *MC_Rack* que nos permite estableciendo un umbral de voltaje, determinar que cada oscilación que los supera sea contabilizada como un evento o *spike*. El umbral utilizado fue 5 veces la desviación estándar de la señal de ruido de cada canal.

Una separada los *spikes* de los registros, se guardaron de nuevo, pero esta vez solamente los *spikes* y los pulsos de fotostimulación para su posterior análisis con el software *NeuroExplorer* versión 7.0.55 (*NeuroTechnology*).

Con este programa se realizaron los siguientes análisis:

1. Histogramas de fotostímulo: este análisis muestra la probabilidad de que haya un *spike*, representados en el eje Y, un tiempo antes y un tiempo después, representados en el eje de los X, tomando como referencia un evento, en nuestro caso la fotostimulación. El objetivo de este análisis es el de verificar si la cantidad de *spikes* aumenta en el fotostímulo (> 1).
2. Histogramas de frecuencia: este histograma muestra la frecuencia de *spikes*, representados en el eje de los Y, a lo largo del tiempo, en el eje de los X. El objetivo

de este análisis es el determinar si, پس از از تاثیر و تعدیل‌کننده مانند در اثر
 the stimulation y la respuesta, hay un aumento generalizado de la frecuencia de
 spikes en el electrodos, en comparación con el control.

Ambos tipos de análisis se realizan en el cuando en los spikes de los electrodos en los canales
 del electrodos en un solo canal para obtener la respuesta global del MEA y la
 heterogeneidad.

5.3.3. Voltage clamp y fotoestimulación

Una de las técnicas utilizadas para caracterizar el comportamiento de las células es el
 método *voltage clamp*, una metodología ampliamente usada en múltiples de campos de la
 biología celular y la fisiología celular. En esta técnica, una pequeña pipeta de cristal se utiliza
 para hacer contacto con un área específica de la membrana celular con el objetivo de detectar
 el flujo de iones y controlar el flujo de iones en la membrana celular mediante la medición
 y posterior extrapolación de datos electrofisiológicos.

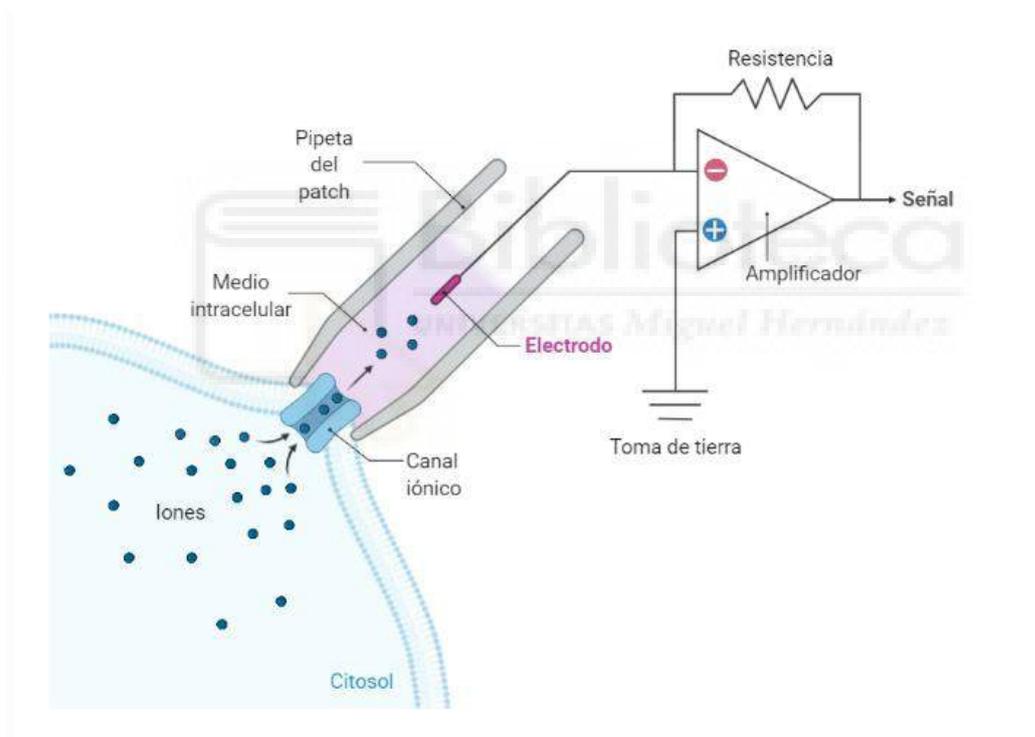


Figura 16. Representación esquemática del funcionamiento de la técnica *voltage clamp*.

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, tal lo que ocurre en
 un estudio *patch clamp*. La técnica *patch clamp* fue utilizada para la caracterización
 electrofisiológica de las células NSC-1a debido a la imposibilidad de detectar potenciales
 de acción mediante este tipo de cultivos en los MEA. Las células fueron sembradas en
 placas de 24 pozos con un cubreobjetos con un diámetro de 12 mm (*Corning Costar*
FRANCO) de manera que pudiera transportarse las células adheridas a cubreobjetos en

de la placa los demás se prepararon previamente tratando sigiéndolo el procedimiento [Programación de las placas multipuerto de cultivo celular y los canales](#). La densidad de siembra fue de 10.000 células por pocillo. Las placas fueron sembradas durante 5 días ya que es el tiempo de incubación necesario para que las células tengan actividad espontánea [5].

Después de 5 días de incubación y haberse alcanzado un porcentaje de confluencia superior al 70% se aplicó el protocolo de [Transfección](#) usando únicamente como vector el control positivo de lipofectamina de Ecken los resultados negativos obtenidos previamente con los vectores M12 y P13.

Los registros se realizaron utilizando el amplificador HEKA ePC10. Las pipetas de registro tenían una resistencia de entre 2 y 5-25 MΩ. El medio intracelular fue preparado a las siguientes concentraciones: 130 mM K-gluconato, 10 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0,135 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 3,5 mM MgATP y 1 mM NaGTP. Durante el experimento se utilizó como medio extracelular la disolución de [Bicuculina](#) [5].

Las células que expresaban ChR2-son2 fueron fotoestimuladas con dos pulsos de 5 ms de duración cada uno dejando 1 segundo entre pulsos. El LED utilizado fue *coolLED pE-660 ultra LED* con luz azul en 480 nm de longitud de onda.

La voltaje que se mantuvo durante el registro de *patch-clamp* fue de -70 mV. Todos los registros fueron filtrados a 10 kHz y adquiridos a 20 kHz. El software de adquisición y de análisis utilizado fue *PatchMaster* y *NeofHEKA*.

Nuestro objetivo usando *patch-clamp* fue el de observar la actividad espontánea si la hubiera a una resolución de célula única, así como la respuesta del canal transmembrana ChR2-son2 a la fotoestimulación usando una fuente de luz con longitud de onda de 480 nm.

6. Resultados

6.1. Resultados de la transfección

6.1.1. Transfección en cultivos primarios

La eficiencia de transfección de los vectores M12 y P13 fue baja en términos cualitativos. En todos los experimentos realizados tanto en placas de cultivo de 24 pocillos ($n = 2$) como en las MEA ($n = 1$) y a las ratios vectores-plásmido 10:1, 8:1, 5:1, 2:1. En ninguno de ellos se creó una transfección suficiente para continuar con los experimentos de registro electrofisiológico. La cantidad de células transfectadas que expresan el marcador fluorescente fluorescente 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 $n = 1$ en las MEA.

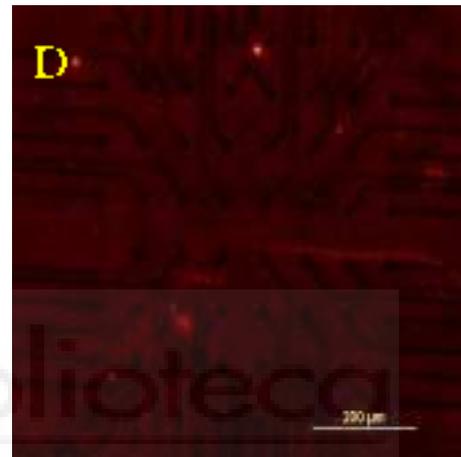
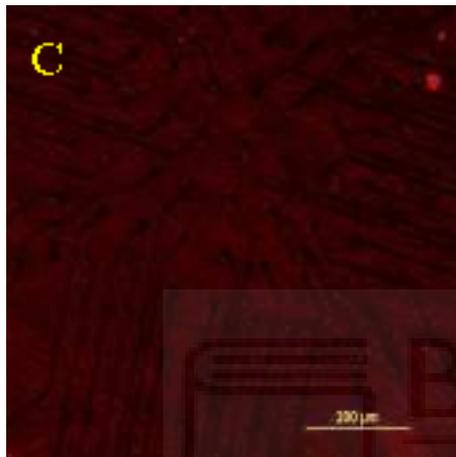
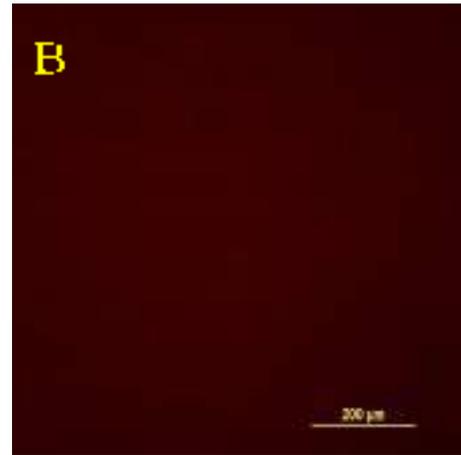
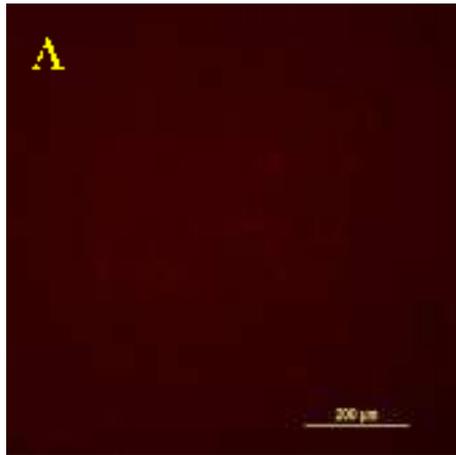
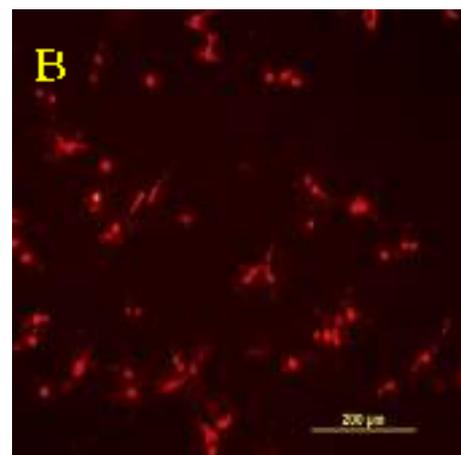
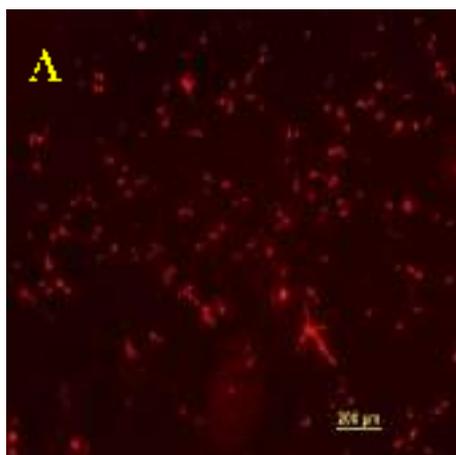


Figura 11. Análisis de la translocación del plásmido *Chryseobacterium* al *Stenotrophomonas* AD17 y *Corynebacterium* y *Mycobacterium* presentes en el suelo de la zona de estudio (Pajarito). No se observó ninguna expresión del gen *nanA* en el *Stenotrophomonas* AD17 y en el *Corynebacterium*.



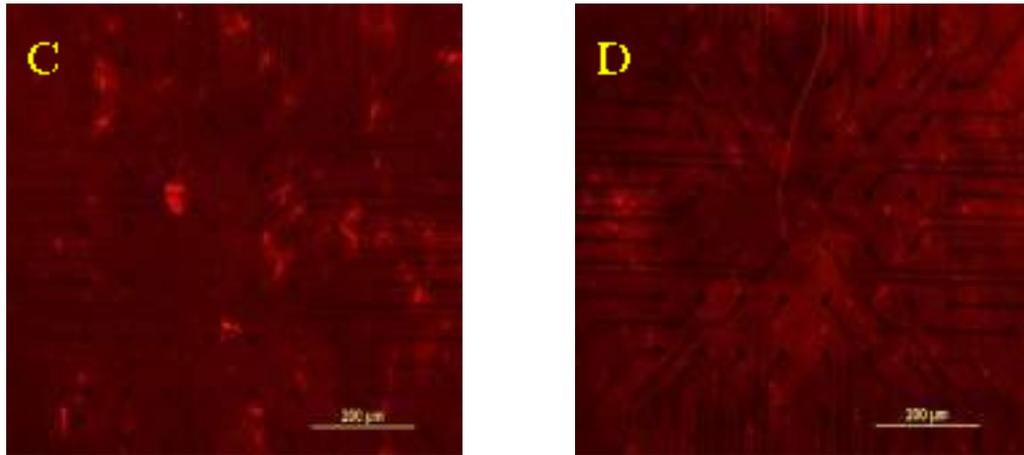


Figura 1. Localización de la transcripción del plásmido pCAGGS en las culturas celulares, obtenida a control positivo de transfección (2000 transfecciones) (Panel A) como vector (Scientific) (Panel B) y plásmid no etiquetado (Panel C) como control negativo (Panel D) en las células en fase de crecimiento que expresan el promotor del plásmido en la nucleosoma celular.

Debido a la baja eficiencia de los vectores FLD y ND2 para transfectar en todos los experimentos realizados, se propuso utilizarlos para los posteriores experimentos de registro en el núcleo celular, en el que principalmente estudiar la eficiencia de la funcionalidad por acción de forma que reservarse los registros celulares exclusivamente para estar la capacidad de controlar la actividad funcional mediante la técnica propiamente utilizando el vector comercial Lipofectamine.

6.1.2. Transfección en línea celular

Los vectores no virales utilizados en este trabajo presentaron una muy baja eficiencia de transfección a la línea celular NSC-32 en relación con el vector comercial Lipofectamine utilizado como control positivo ($n = 10$). En ninguno de los ratios de vector-plásmido, siendo $n = 2$ para cada ratio de vector-plásmido, se observó transfección de forma significativa. La cantidad de células transfectadas que expresó el marcador fluorescente (EGFP) fue insuficiente para continuar con los experimentos posteriores de registro celular biológico.

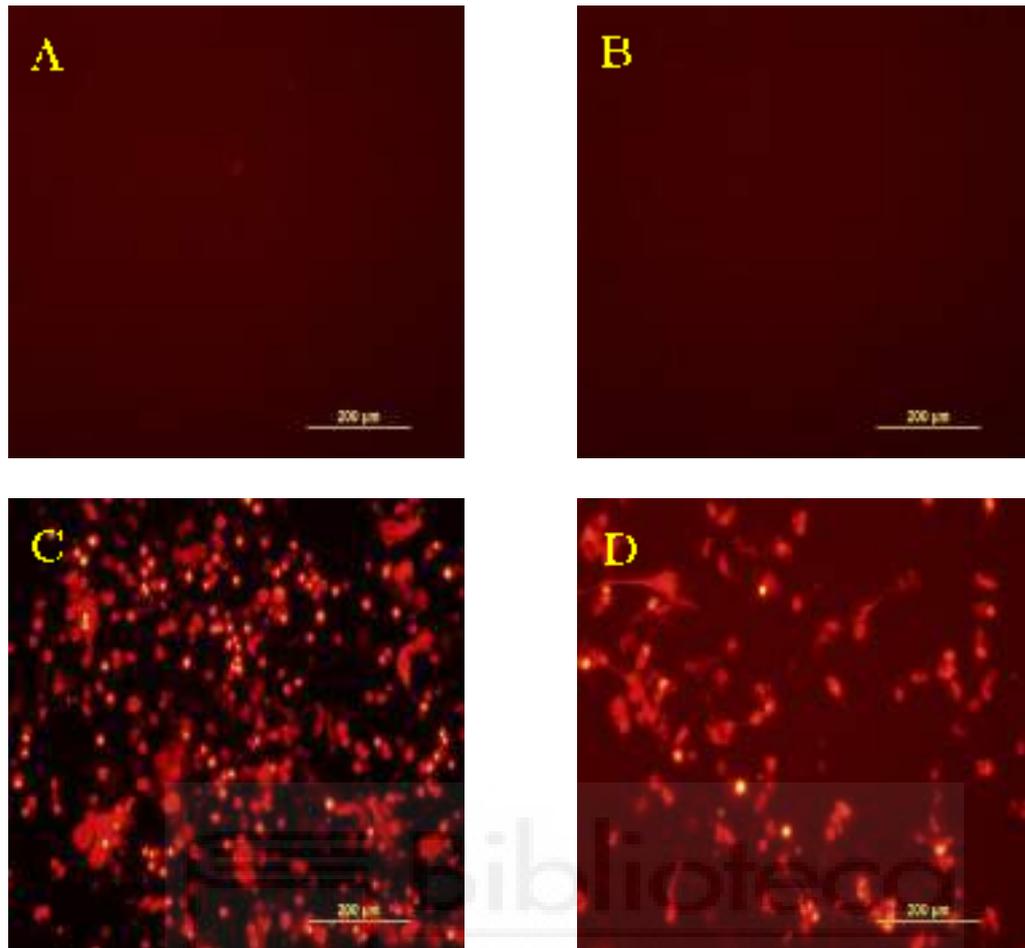


Figura 1. Imágenes de la transfección con el *Chlorella* en la línea celular NSC-34 y las células neuronales NG2 (+). *Puro* (D) es el control positivo. *Cg* (A). Las células con fluorescencia son las que expresan el material genético del plásmido en su nucleoma.

6.2. Resultados del registro de actividad neuronal y fotoestimulación

6.2.1. MEA

Uno de los requisitos para poder medir electrogénicamente la actividad electrofisiológica del cultivo primario de corteza es el tamaño de las células, conseguir una transfección de suficiente número. Al no haber conseguido transfectar con las bombas de *NG2* y *Puro*, se postuló caracterizar la respuesta funcional de las células únicamente con el control positivo (lipofectamina).

En la mayoría de experimentos de electrofisiología en los que se utiliza lipofectamina para como vector del plásmido electrofisiológico el método de registro es el de célula única (patch clamp) (36), sin embargo cuando se trabaja con poblaciones (cultivos de cultivo multicelulares) es necesario de introducir el plásmido es mediante transfección usando vectores virales (66, 67), siendo por tanto el uso de lipofectamina como vector no viral en el cultivo en placas de cultivo multicelulares algo novedoso.

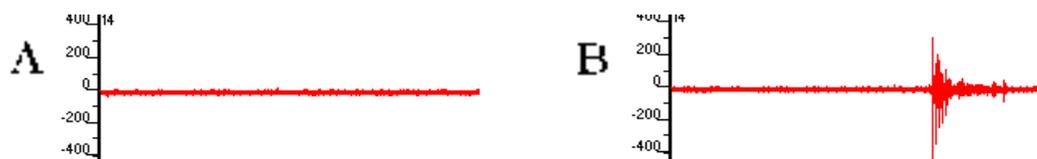
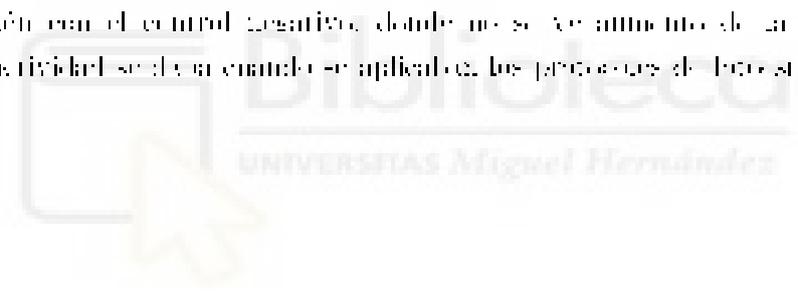
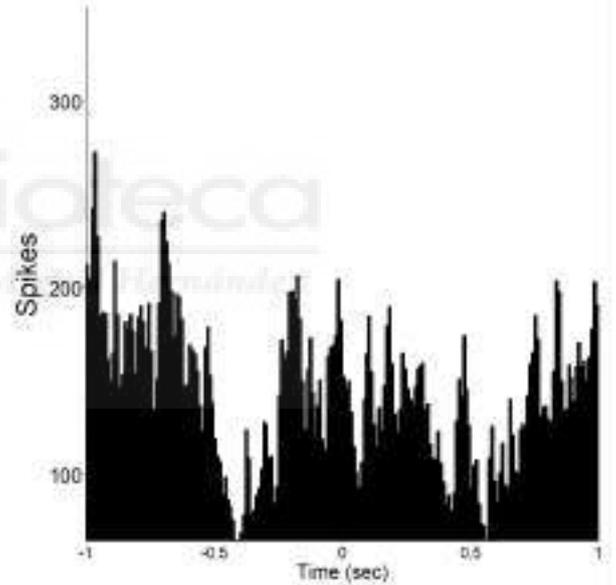
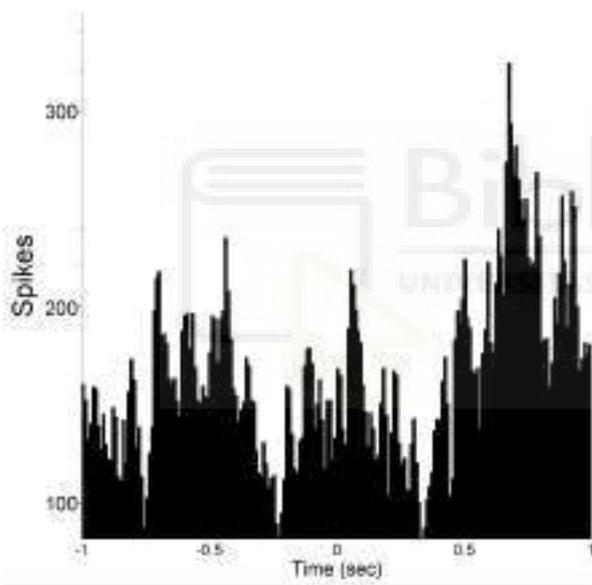
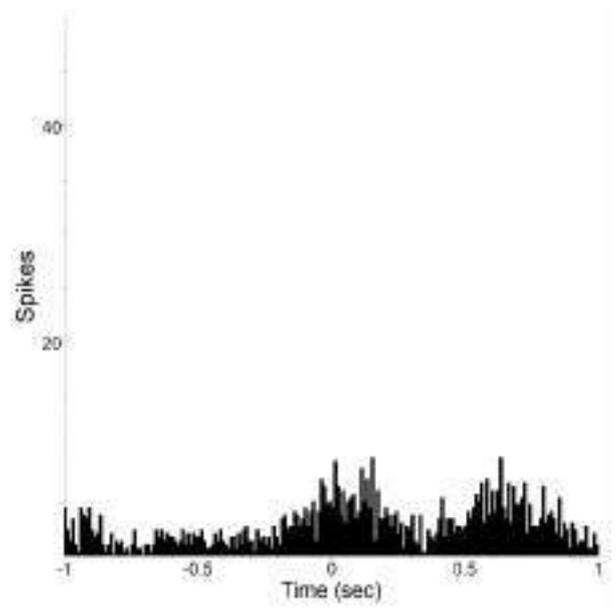
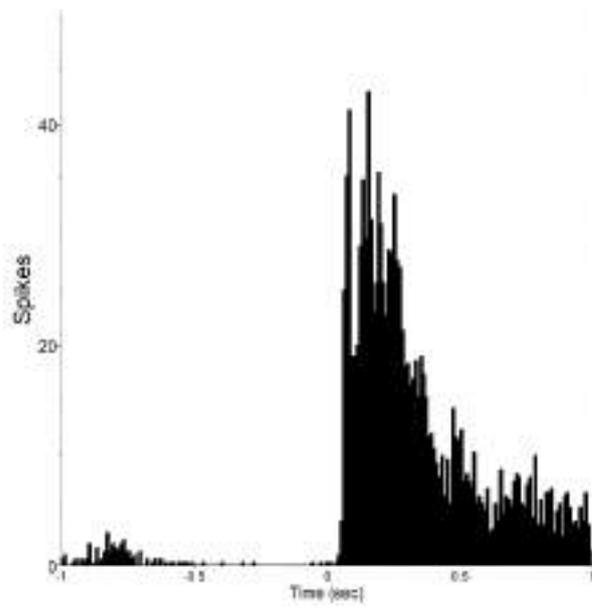


Figura 14. Registro de un canal durante un registro de un MEA. En el eje Y se representa la actividad en el eje de la escala temporal (1000 ms). A) Inactivación de un canal durante el registro en el que se detecta actividad espontánea. B) Activación de un canal durante el registro en el que se detecta actividad espontánea.

Según el 3 de los registros ($n = 3$) se observó respuesta a la estimulación de las células de cultivo primario en caso control con Chloramfenicol utilizando Lipofectamina como vector, en media de canales de las placas de cultivo multi bienal en los que se obtuvo respuesta que en la estimulación en el 20 canales de los 50 totales con los que cuenta la placa MEA. El hecho de no haber sido capaces de conseguir una eficiencia de activación reproducible en los electrodos a lo largo del trabajo usando Lipofectamina, así como la imposibilidad de transferir neuronas de tipo excitatorio de forma selectiva hicieron que los resultados de la estimulación fueran inconsistentes.

En los tres experimentos en los que se consiguió respuesta (Figura 15) se observó un aumento generalizado de los potenciales de acción espigados después del 100 pulso de estimulación en comparación con el control negativo donde no se ve aumento de la actividad. El aumento de actividad se dio cuando se aplicaron los protocolos de estimulación 1 y 7 (Tabla 3).





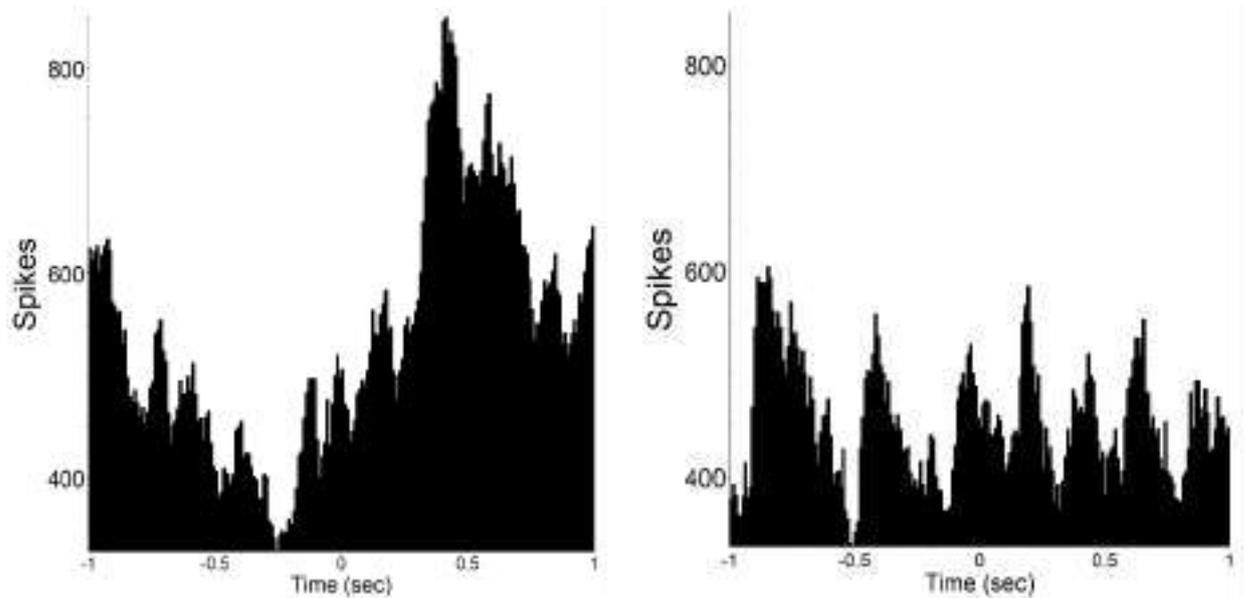
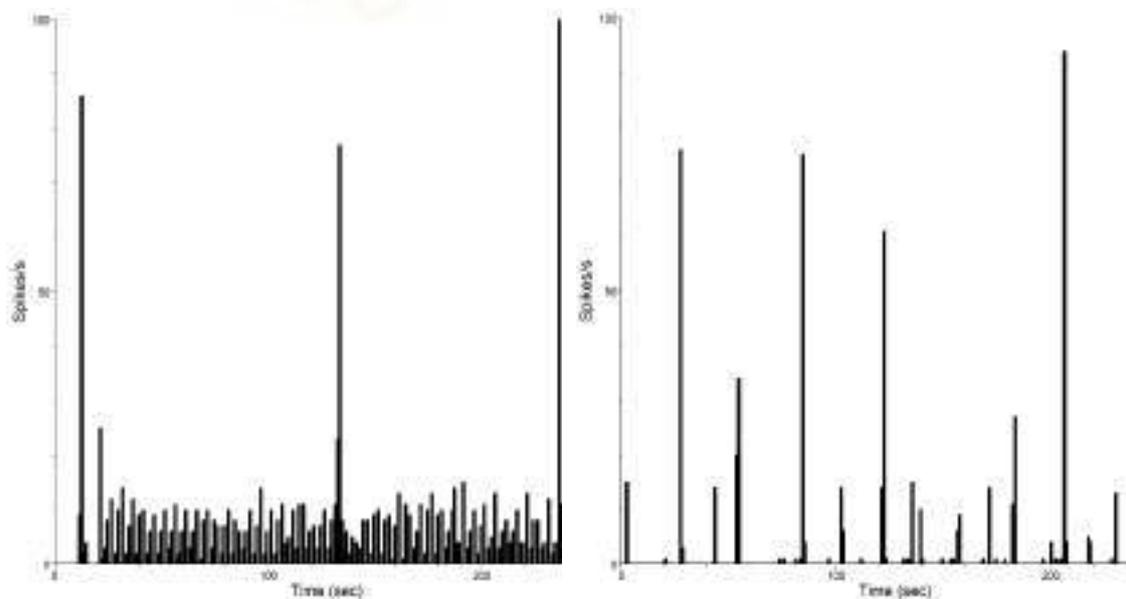


Figura 14. Se muestran histogramas para dos niveles de actividad global de MI_1 en los dos registros que se analizaron para esta parte con los valores de μ y σ de $\mu = 0.1$ y $\sigma = 0.05$ para los spikes detectados en el tiempo de los picos antes de aplicar el segundo después del primer, representado en el eje X.

En cuanto a los histogramas de frecuencia de los registros que tienen actividad en caso de tener los estímulos (Figura 14), en todos se observa un aumento generalizado de la actividad debido a la mayor presencia de potenciales de acción de las células neuronales que expone. El mismo efecto se observa en el número de spikes por segundo (Fig. 14) y también en el largo de la duración de tiempo de registros (Fig. 14). No en comparación con el tiempo negativo no detectado.



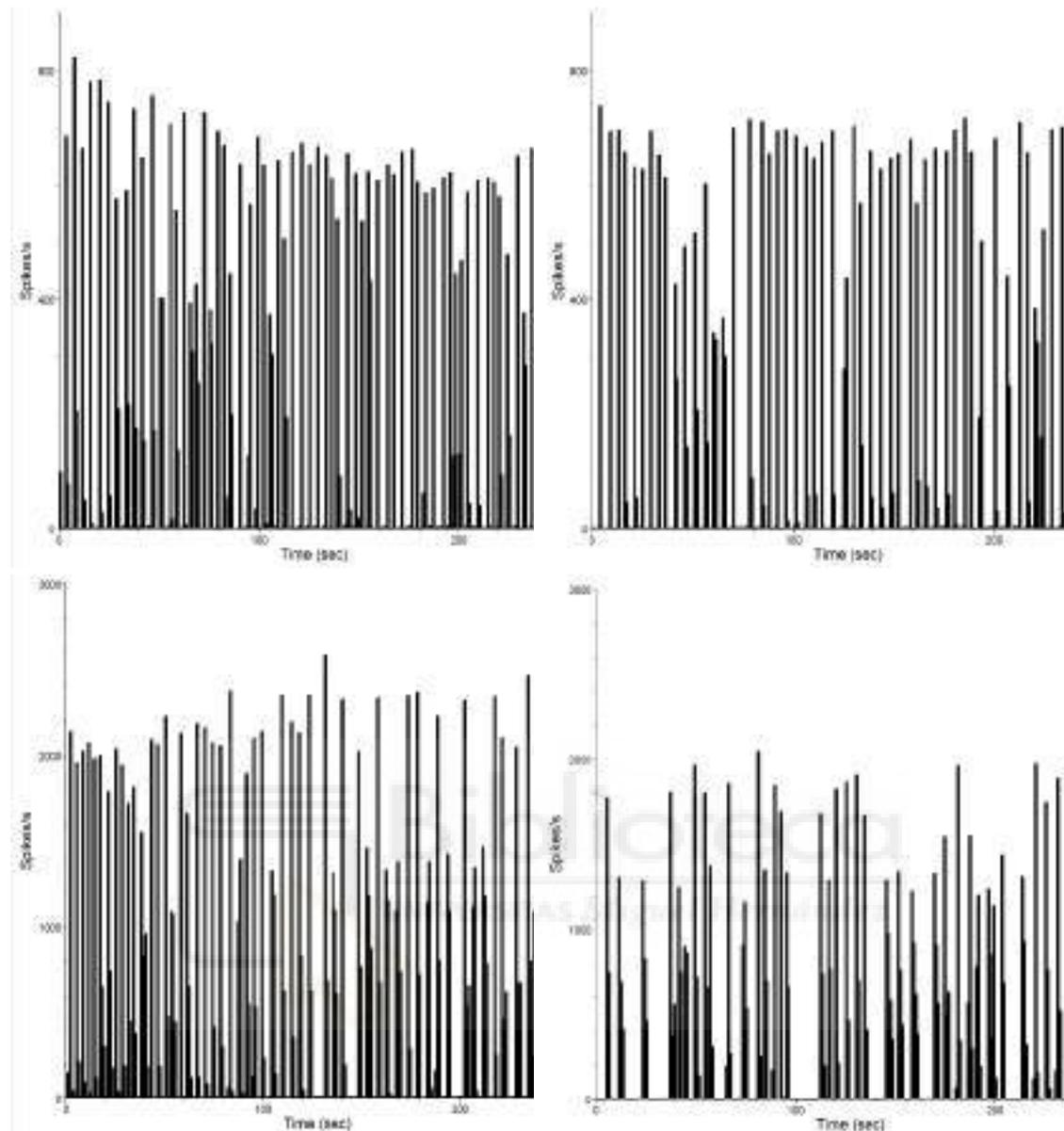


Figura 16. Histogramas de frecuencia de la actividad global del MEA en los dos registros que se observan a grandes y a pequeña escala. Los datos se obtuvieron con el sistema de adquisición de datos de SpikeRecorder. En estos registros se muestra la frecuencia de spikes por segundo. El N representa el número de los 30 segundos de grabación. El eje de tiempo es arbitrario.

6.2.2. Patch clamp

El hecho de que tal o cual célula exhiba actividad espontánea en el sistema MEA con la línea celular NSC-34 y por tanto ser incapaces de establecer contactos extracelulares, la actividad electrofisiológica de las células, nos llevó a utilizar la técnica *patch clamp* para comprender si el canal expresado en el eje celular puede ser modulado por la estimulación optogenética en las células transfecidas.

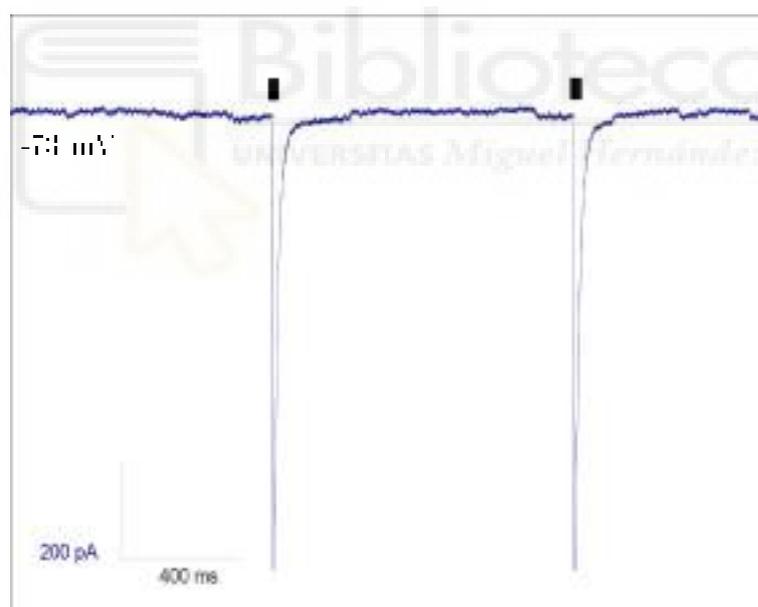
Los registros electrofisiológicos de células únicas muestran que el canal ionotrópico ChR2sensB se activaba durante la aplicación de corrientes de entrada de catiónes (Figura 18) cuando se aplicaba la estimulación con luz visible de 780 nm de longitud de

culas, sin embargo, estas variaciones no fueron capaces de causar ni la generación de potenciales de acción por parte de las células.



*Figura 17. Registro intracelular de la actividad espontánea de una célula NSC ($n = 4$) transfecida con *Cholera toxin subunit B* (*ctxB*) (*potencial de reposo* -71 mV), en el que no se quisieron observar variaciones de membrana correspondientes a la generación de potenciales de acción.*

Del total de células NSC = 34 transfecidas registradas con potencial de reposo -71 mV ninguna se vio actividad espontánea o posesión iva mediante cambios en el amperaje. De las 5 células registradas la media en la variación del amperaje al broestímular fue de 566.56 pA, con media de tiempo de latencia hasta llegar al pico de máximo amperaje fue de 7.56 ms.



*Figura 18. Imagen de registro de células *ctxB* en células NSC ($n = 4$) transfecidas con *Cholera toxin subunit B* (*ctxB*) (*potencial de reposo* -71 mV). Se observan dos variaciones en el amperaje por parte de la estimulación. Resolviendo se puede ver un segundo de latencia hasta el pico.*

6.3. Resultados de los ensayos de citotoxicidad

La toxicidad de los vectores no víricos y su eficiencia de transfección son parámetros que dependen en gran medida del tipo celular (8). Por este motivo, se requirió encontrar un balance específico entre eficiencia de transfección y citotoxicidad para cada tipo celular (9).

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 eficiencia es mínima cuando se aplica el tratamiento durante 72 horas.

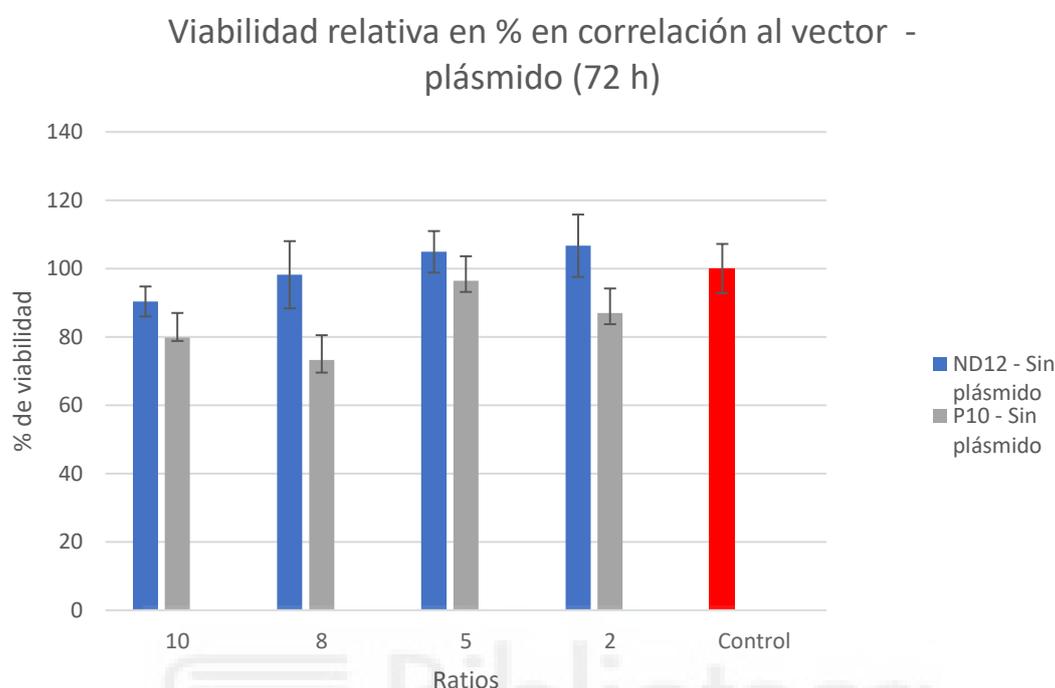


Figura 16. Viabilidad relativa de los cultivos primarios con el plásmido de histaglutina en los cultivos de células sin plásmido durante 72 horas. Medida porcentual usando P10. Los datos se representan como la media de los porcentajes de viabilidad obtenidos por cada tratamiento \pm la desviación estándar.

En tratamientos como ND12 a la razón 2:1 se puede observar como la viabilidad es prácticamente la misma que en los peñiles control ($n = 8$). En ninguno de los ratios mencionados la viabilidad baja por debajo del 75%, pudiendo considerarse por tanto estas formulaciones como eficientes cuando se utilizan en cultivos primarios de corteza embrionaria 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 $\pm 5,062$.

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 peñiles control ($n = 8$). Existe una mala proporcionalidad directa entre mayor concentración de vector y descenso en la viabilidad.

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

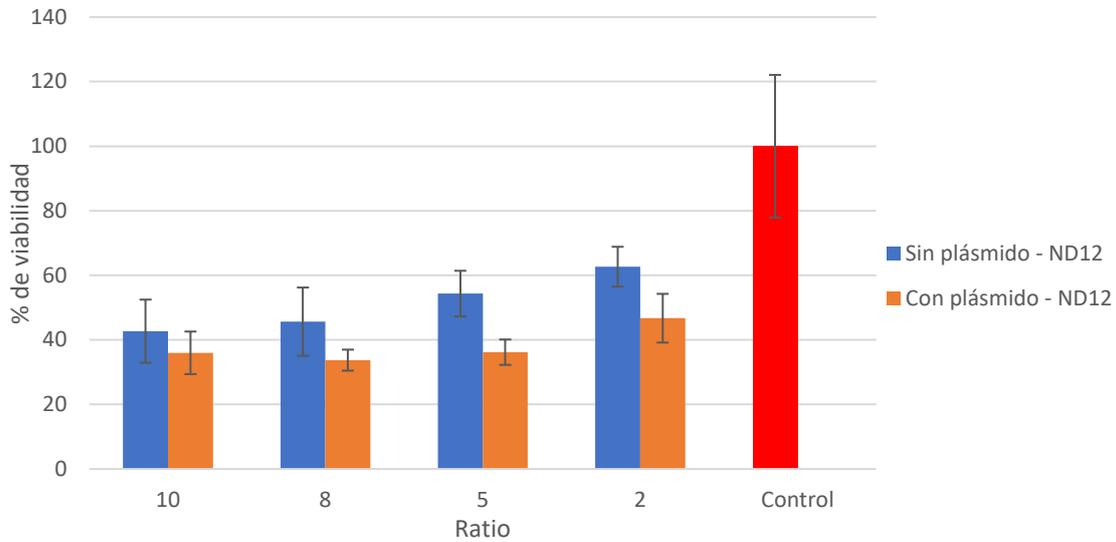


Figura 11. Viabilidad relativa de las células de la línea celular V873 en respuesta al tratamiento con el vector no viral ND12 y con o sin plásmido durante 48 horas. Medidas promedio \pm error estándar (EE). Las datos se representan como la media de los porcentajes de viabilidad obtenidos por cada tratamiento \pm la desviación estándar.

Los resultados de los medios de los porcentajes de viabilidad en \pm 8 de cada tratamiento presentan baja dispersión, con media de las desviaciones estándar es \pm 8.97.

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

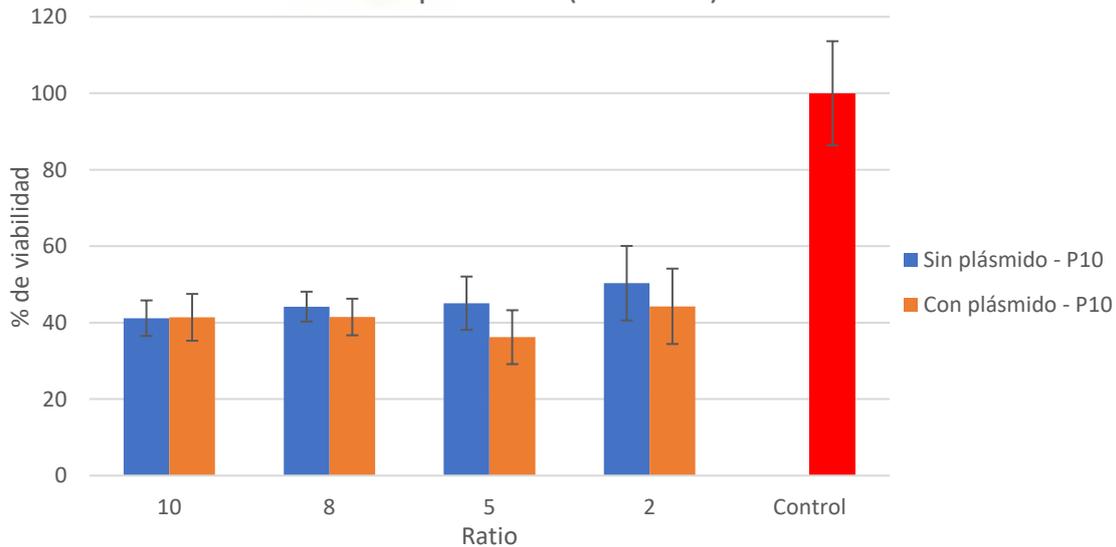


Figura 12. Viabilidad relativa de las células de la línea celular V873 en respuesta al tratamiento con el vector no viral P10 y con o sin plásmido durante 48 horas. Medidas promedio \pm error estándar (EE). Las datos se representan como la media de los porcentajes de viabilidad obtenidos por cada tratamiento \pm la desviación estándar.

0-3.2.2. Resultados a 72 horas

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

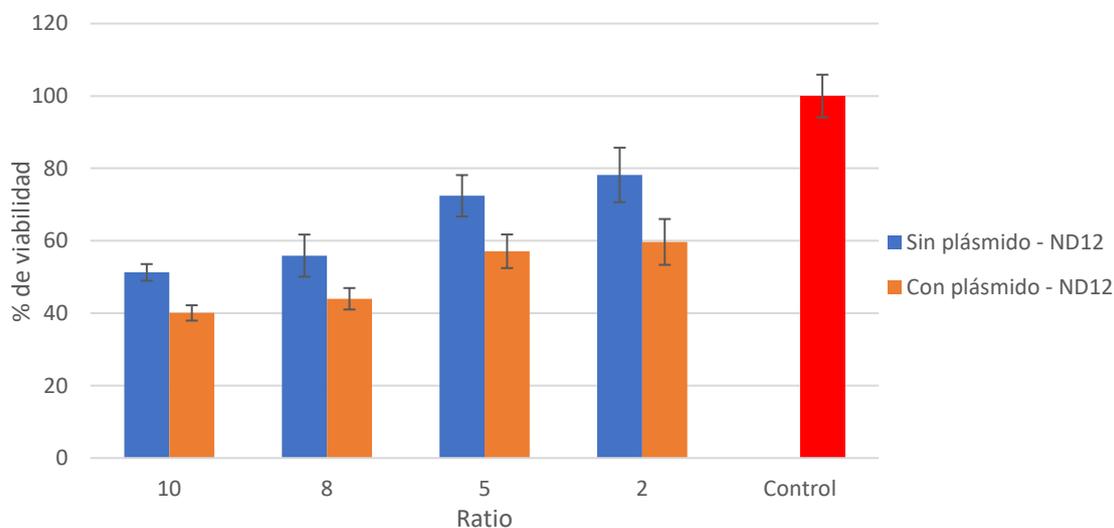


Figura 3. Viabilidad relativa de los cultivos de la línea celular V877, en respuesta al tratamiento con el vector genético V01 y con plásmido durante 72 horas. Medida en relación con el Control. Las barras se representan como la media de los porcentajes de viabilidad obtenidos por cada tratamiento \pm 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 relación con los peíllos control (100%). Además, sigue existiendo una proporcionalidad directa entre mayor ratio o concentración de vector y descenso en la viabilidad.

Viabilidad relativa en % en correlacion al vector P10 - plásmido (72 horas)

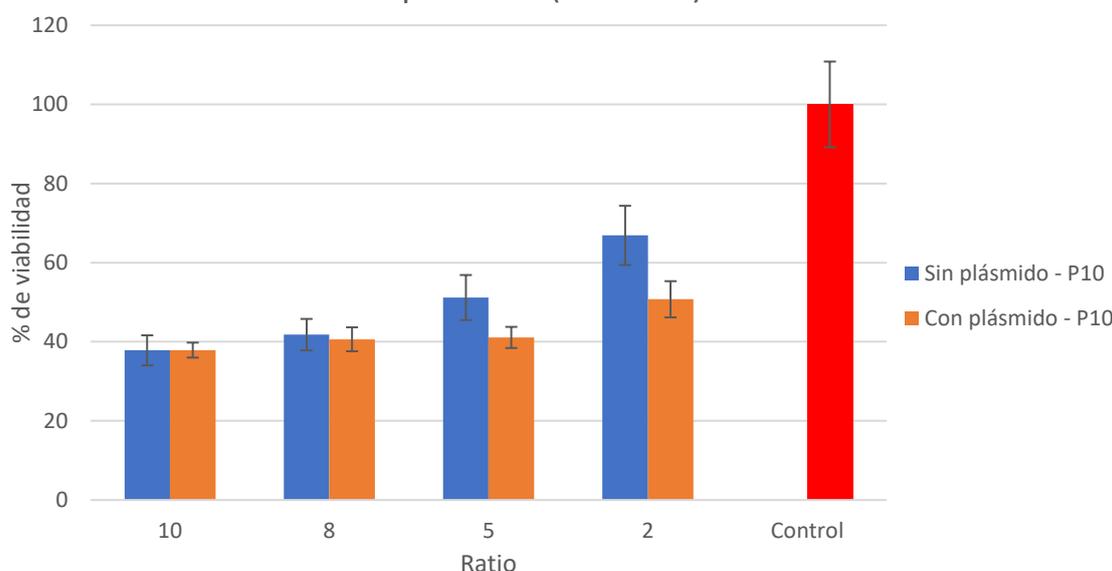


Figura 6. Viabilidad relativa de los cultivos de la línea celular NSC-34 en respuesta al tratamiento con el vector no viral P10 con y sin plásmido durante 72 horas. Medias relativas en % ± 1.1. Las barras representan la media de los porcentajes de viabilidad obtenidos por cinco experimentos y la desviación estándar.

Los resultados de las medias de los porcentajes de viabilidad en $n=5$ se muestran en el gráfico presentando baja dispersión. La media de las desviaciones estándar es de 1.1%.

Al igual como se observó en otros ensayos se ve como en los pechillos en los que se aplicó el vector con plásmido es el plásmido hay más viabilidad que cuando únicamente se aplicó el vector. Al contra con todo cuando el número 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 aumentó en los cultivos primarios y en las células NSC-34 cuando se utilizó con los vectores tanto P10 como M12 no fue lo suficientemente alta como para considerarla en los próximos experimentos de electroporación.

Una de las requisites para que pueda haber una respuesta a la electroestimulación es que la proteína electrogénica, en nuestro caso ChR2, se exprese en la membrana. La expresión de la proteína puede ser cuantificada de forma cualitativa y cuantitativa. Para nuestro trabajo la expresión cuantitativa se usó las formulaciones M12 y P10, provistas por el grupo Nancéñocel no fue necesaria debido a la marginal eficiencia de transfección de sus vectores.

el uso de M12 y P10 como formulaciones de vectores no víales en dado resultado en artículos recientes de publicación en nuestro campo de investigación cuando se trata de un plásmido de la proteína verde fluorescente (GFP), sin embargo, no se obtienen esos resultados al utilizar el plásmido Chr15000.

Uno de los motivos para esta desigualdad de resultados al utilizar plásmidos distintos puede ser el tamaño del plásmido. El plásmido Chr2 utilizado en nuestro laboratorio ($pl\text{-Chr} = 6.9\text{Kb}$, *Abbey et al.*, 2011) tiene un tamaño de 5.5 kilobases nucleares que Chr15000 es de 7.5 kilobases. El tamaño del plásmido está relacionado de forma directamente proporcional con la eficiencia de transcripción debido a mayor posibilidad de introducirse en células en el proceso de internalización en la célula.

La baja eficiencia de transcripción de los vectores no víales es una peculiaridad común cuando se trabaja con este tipo de vectores (10%, 13%, 25). Pocas formulaciones han superado esta dificultad. Uno de ellos es el negativo comercial Lipofectamina, utilizado en nuestro trabajo como control positivo y *gold standard* a la hora de valorar eficiencias de transcripción de formulaciones nuevas (50%).

Un parámetro relevante para considerar y que va a influir mucho en la eficiencia de transcripción de los ácidos nucleicos es el potencial zeta (ζ), relacionado con la carga superficial del ácido nucleico 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 (74).

En futuras experimentos se debería valorar el potencial zeta de las formulaciones M12 y P10 en comparación con Lipofectamina para considerar el hecho de que haya grandes diferencias que puedan estar afectando a los resultados de los vectores no víales, de ahí lo es de formar agregados y por tanto disminuyendo su eficiencia de transcripción.

Como experimentos adicionales, se podrían evaluar la influencia tanto de las formulaciones M12 y P10, el control positivo Lipofectamina y plásmido mediante ensayos de movilidad de electroforesis. Analizar en estos experimentos si se diferencia el efecto de la fuerza electrostática como 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 transcripción en múltiples clones nos permiten validar la Lipofectamina utilizada como vector para transferir Chr15000 en cultivos primarios de cortez embriónica de rata, esto, como mínimo, a que mejores vectores no víales más eficientes y con resultados más reproducibles puedan ser comparados con este vector comercial utilizado en nuestro trabajo como control positivo.

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

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

La cultura positiva requiere de una reproducibilidad máxima y la zona de ser capaz de mantener la actividad electrofisiológica de los circuitos cerebrales de manera comparable con formulaciones neuronales de vectores no víricos.

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

Los registros de electrafinen mediante patch clamp en la línea celular NSC⁺-31 de una muestra viable electiva de la cual transmembrana enzimas como estimulador. No haber conseguido mantener actividad espontánea con las células NSC⁺-31 en las placas multicelulares *collage* *clayp* puede ser debido a múltiples factores en cuanto a falta de optimización del cultivo o de la maduración de las células ya que, en el tiempo de duración de este PBL, durante el cual además hemos tenido que enfrentarnos a distintas restricciones de recursos que se generaron a raíz de la presencia de la pandemia de Coronavirus-19, no hemos tenido tiempo de replicar las condiciones descritas en la bibliografía al ser una línea cerebral resistente introducción en el laboratorio y por lo tanto de los meses según catalogando en la optimización de las condiciones de cultivo y mantenimiento de las placas ([Preparación de las placas multicelulares de cultivo celular y electrodos!](#)).

El hecho de no haber conseguido actividad puede haberse debido a múltiples factores como son: interacción de las células con el revestimiento previo es el aminoácido y PDL, PLL, ya que la bibliografía es escasa en cuanto al revestimiento siendo el PDL la opción mejorada [74], [75] que sin embargo no nos dio los resultados esperados en nuestra biométrica teniendo que utilizar PLL y retirando los experimentos drásticamente y por tanto imposibilitando la optimización en cuanto a la conductancia y la maduración de las células NSC⁺-31.

Otra posible causa de ausencia de actividad podría ser la falta de diferenciación de las células a formas *neuroblast*, que eventualmente podrían ser capaces de tener potenciales de acción [51], [54], [76]. La bibliografía parece indicar que el uso de factor trófico puede actuar como canalizador de la diferenciación y ser capaz de aumentar los procesos neuríticos de las células neuronales de distinto tamaño [77], incluyendo la línea celular NSC⁺-31 [78], y por lo tanto se propone continuar la optimización de la muestra a punto de iniciar cultivos utilizando este compuesto, con el fin de conseguir mostrar actividad *neuroblast* en los mismos.

7.3. Ensayos de citotoxicidad

Los resultados de estos ensayos son confusos en los cultivos primarios de cortejo maduración de rata. La viabilidad celular en los cultivos primarios no es evidente tanto como en el ensayo

de citotoxicidad con las células NSC = 32 cuando se aplicados los tratamientos con los vectores no víricos, además de presentar valores de viabilidad superior en pocas células tratadas con el vector más alto frente a otros con un ratio menor.

Las células de cultivos primarios tienen naturalmente más facilidad de presentar más variabilidad (78) lo que ser una línea celular sino tejido vivo extraído del animal. De hecho, el cultivo de cultivos primarios de células de tipo nervioso es uno de los más problemáticos dentro del campo de la biología celular (79).

Con los estos resultados se puede afirmar que el resultado de los ensayos de citotoxicidad en el cultivo celular primario tras su uso una mayor optimización y refinamiento del tamaño molecular.

Los resultados de estos mismos ensayos en la línea celular NSC = 32 al contrario que en los cultivos celulares primarios muestra 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 viral aún puede tener efectos citotóxicos específicamente si es de origen bacteriano, como un plásmido, debido a la capacidad de estos para producir respuestas inmunes y seración de citoquinas proinflamatorias (80).

Otra explicación que podría explicar estos resultados es la posible toxicidad causada por las opsoninas microbianas, de forma que pueden provocar una entrada constitutiva de iones de calcio que sería dañina para la célula o formar agregados citotóxicos, como ya se ha demostrado en algunos trabajos con Chlamydia (81, 82). Sin embargo, hasta el momento, no existen trabajos similares que caractericen la toxicidad de un prototipo epigenético Chlamydia y de hecho existen incluso ensayos clínicos en humanos en los que se utiliza Chlamydia sin haber reportado hasta ahora efectos adversos (83, 84).

Como opción alternativa para aminorar el incremento de la toxicidad cuando el vector y el plásmido están acompañados es el repetir los experimentos de citotoxicidad añadiendo los nuevos grupos experimentales a uno de estos grupos experimentales pre-establecidos plásmido de control para observar si existe un aumento de citotoxicidad propio del plásmido. Otro de los grupos es utilizar un control sin vector = plásmido de control para determinar si el GFP está protegiendo al ser un canal ionotrópico sino un simple marcador (85). Se puede obtener información sobre el efecto que el canal Chlamydia está teniendo sobre la citotoxicidad.

Los nanodiosomas, pese a existir consenso en el uso de su baja toxicidad (87) en el caso de los tejidos neuronales se ha demostrado en algunos trabajos en los que se están utilizando los nanodiosomas como un vehículo dirigido para algunos fármacos, que afectan tanto a la morfología como a la funcionalidad electrolítica (88).

En uno de estos trabajos se observó como el tratamiento con el agente diamante reduce hasta en un 30% por ciento la actividad electrológica de los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón registradas con electrodos de MEA (88). En nuestro caso, además, las formulaciones de ribosomas utilizados no tuvieron la suficiente eficiencia de transfección como para continuar con los experimentos de epigenética y electrofisiología.

Por otro lado, en otros artículos se ha demostrado que además tienen efectos en la morfoloía de las células neuronales del sistema nervioso central y periférico de ratón al generarlos en cultivos de tal forma que intervienen en la regeneración de los puentes neuríticos, poseen actividad electrológica (89).

Los datos que pudimos tener este tipo de nanopartículas cuando se utilizan para terapia génica con células del sistema nervioso están poco caracterizadas por lo que se requiere de un estudio en mayor profundidad de cara a seguir validando los protocolos de ensayo y error y evaluarlos 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 con vectores no víricos para su uso en terapia génica, son las siguientes:

- La eficiencia de transfección de los vectores no víricos ND12 y P10 sintetizados por el grupo de investigación Nanodiol (Unos) es suficiente para como punto de partida ser usado en futuros experimentos con los tipos celulares NSC = 31 y los cultivos celulares de corteza cerebral de ratón.
- Se necesitan futuros experimentos de cara a seguir optimizando el cultivo de la línea celular NSC = 31 con el objetivo de que las células alcancen la madurez necesaria para generar actividad espontánea de forma que pueda usarse como modelo celular funcional para experimentos en electrofisiología y epigenética.
- Los resultados obtenidos en los registros de actividad de poblaciones neuronales (MEA) con cultivos celulares primarios, permiten validar la lipodexamina como control positivo que se va a implementar de obtener tasas de transfección reproducibles y mantener de forma selectiva neuronas de tipo excitatorio por lo que se requieren futuras optimizaciones tanto de plásmido (epigenético) como de vector no vírico.
- Los registros de célula madre usando la línea celular NSC = 31 transfectada con el plásmido ChR2-mCherry muestran una respuesta de despolarización cuando son estimuladas. No se consiguen potenciales de acción y por lo tanto se requieren futuros experimentos de cara a optimizar la maduración de las células.
- Los experimentos de citotoxicidad en los cultivos cerebrales primarios de corteza cerebral de ratón muestran una baja citotoxicidad de las formulaciones ND12 y P10 cuando son aplicadas durante 72 horas de uso posible mente a la toxicidad muy alta de la de internalización.

- Los resultados de los experimentos de citotoxicidad en la línea celular NSC-32 muestran una relación directamente proporcional entre la citotoxicidad y la mayor concentración de los vectores MD2 y P13 en caso se aplicó el tratamiento durante 18 y 72 horas, siendo mayor este efecto cuando se utilizó conjunto el plasmato.

9. Bibliografía

- [1] C. a. Dumbat, K. A. High, J. K. Jung, H. B. Koh, K. Ozawa, y M. Sordain. «Gene therapy comes of age». *Stem Cells*, vol. 35, n.º 3472, ene. 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.06.023.
- [2] G. Boncompagni, P. Mitchell, C. Pavilio, y A. Giordano. «Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications». *Stem Cells Devol. Clin.*, vol. 18, n.º 1, pp. 19-33, 2008, doi: 10.1081/stem.18-1-19.
- [3] S. H. Ory, y P. Reilly. «MIDICINE: Paving for future success in gene therapy». *Stem Cells*, vol. 35, n.º 3289, pp. 1-5-91062, may. 2016, doi: 10.1126/scstem.aad1774.
- [4] M. L. Friedrich, M. B. Abed, J. Wilson, y R. M. Edelstein. «Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2011—an overview». *J. Gene Med.*, vol. 6, n.º 6, pp. 597-602, 2004, doi: 10.1002/jgm.549.
- [5] A. Zhai, Y. Zhang, X. Yang, C. Huo, y H. Duan. «Gene Therapy for Neurodegenerative Disease: Clinical Potential and Directions». *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 11, p. 68471, 2021, doi: 10.3389/fmnc.2021.68471.
- [6] B. Chiu, A. Chiu, y B. J. Traynor. «New genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications». *Leu. J. Neurol.*, vol. 17, n.º 1, pp. 94-102, ene. 2018, doi: 10.1016/S1471-1422(17)30101-5.
- [7] «estructuras orgánicas. Material didáctico. Sesión 2». Genotipia.
- [8] S. Komag, D. Markusic, M. Biswas, K. Higazi, y R. Herzog. «Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes». *Med. Ther. Methods Drug Dev.*, vol. 3, p. 1061, may. 2016, doi: 10.1038/mtm.2016.31.
- [9] W. F. Anderson. «Human Gene Therapy: Scientific and Ethical Considerations». *J. Med. Philos. Franc. Biotech. Philos. Med.*, vol. 19, n.º 3, pp. 277-292, ago. 1987, doi: 10.1093/jmp/19.3.277.
- [10] M. Ramamoorthy y A. Norvick. «Non-Viral Vectors in Gene Therapy: An Overview». *J. Gene. Devel. Res. Biotech.*, vol. 9, n.º 1, pp. 6401-6406, ene. 2015, doi: 10.7891/1078-2015-10113.5201.
- [11] A. Scahill y J. M. Verma. «Gene therapy: trial and tribulations». *Nat. Rev. Genet.*, vol. 1, n.º 2, pp. 94-99, nov. 2000, doi: 10.1038/3506874a.
- [12] C. K. Thomas, A. Engelhardt, y M. A. Kay. «Progress and problems with use of viral vectors for gene therapy». *Nat. Rev. Genet.*, vol. 1, n.º 5, Art. n.º 5, may. 2000, doi: 10.1038/14036.

- 13 H. Yin, B. L. Kanasty, A. A. Elzekky, A. J. Vegas, J. B. Dorzoi, y D. G. Anderson. «Non-viral vectors for gene-based therapy». *Nat. Rev. Genet.*, vol. 17, n.º 8, Art. n.º 8, ago. 2016, doi: 10.1038/nrg3763
- 14 C. Baum, O. Ivinskaya, U. Modlich, Z. Li, y B. Fahren. «Mitogenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer viruses». *Hum. Gene Ther.*, vol. 17, n.º 3, pp. 252-263, mar. 2006, doi: 10.1089/hum.2005.17.253
- 15 N. Bossis, F. J. Garcébalan, y M.-C. Boissier. «Immune responses to gene therapy vectors influence on vector function and Aberrant methylation». *Gene Ther.*, vol. 11, n.º 1, Art. n.º 1, oct. 2004, doi: 10.1038/s1023802304
- 16 D. Bouard, D. Alzates-Bany, y F.-L. Chesse. «Viral vectors: from virology to transgene expression». *Br. J. Pharmacol.*, vol. 177, n.º 2, pp. 153-165, may 2003, doi: 10.1038/s120080319
- 17 D. W. Park, A. S. Hoffman, S. Park, 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/nrd1777
- 18 G. L. Lukacs, P. Haggie, O. S. Kozak, D. Lemaire, N. Freudenstein, y A. S. Verkhran. «Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus». *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n.º 3, pp. 1627-1629, ene. 2000, doi: 10.1074/jbc.275.3.1627
- 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 1, p. 7745, jul. 2021, doi: 10.3390/ijms22177745
- 20 J. M. Mendez y C. L. Cepas. «Electroporation and DNA intercalation in the rodent retina: in vivo and in vitro». *Prog. Neurobiol.*, vol. 101, n.º 1, pp. 16-22, ene. 2009, doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.08.014
- 21 N. M. Ghaheri *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, pp. 26-29, feb. 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12030198
- 22 G. *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. 703, n.º 1-2, ene. 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.02.043
- 23 B. Rajwa, K. Nagpal, S. K. Singh, y D. S. Mishra. «Niosomes, a controlled and novel drug delivery system». *Ind. Pharm. Bull.*, vol. 31, n.º 7, pp. 645-653, 2011, doi: 10.1218/1-phb31-057
- 24 W.-J. Choi, J.-K. Kim, S.-H. Choi, I.-S. Park, W. S. Ahn, y C.-K. Kim. «Low toxicity cationic lipid-based emulsion for gene transfers». *Biomaterials*, vol. 25, n.º 27, pp. 7894-7906, dic. 2004, doi: 10.1054/jbiomater.2004.04037
- 25 I. Gallego *et al.* «Non-viral vectors based on cationic niosomes and minicapsid DNA technology enhance gene delivery efficiency for biomedical applications in retinal disease». *Nanomedicine: Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 17, pp. 3098-3118, abr. 2019, doi: 10.1016/j.nano.2018.12.018
- 26 J. C. Ross y S. W. Hui. «Lipid particle size is a major determinant of in vitro liposome efficiency». *Gene Ther.*, vol. 6, n.º 1, Art. n.º 1, abr. 1999, doi: 10.1038/s102380239904
- 27 B. Abdul M., A. B. Harshita, P. Sawant, y A. J. Parthasarathy. *Advances in Nanotechnology for Contemporary Biomedical Applications*. CRC Global, 2018.

28. A. M. Qureshi *et al.*, «Colloidal dispersion of nitroplungosone vesicles as an efficient non-viral vector for gene delivery to retina and brain», *CRS*, vol. 3, ene., 2021.
29. P. Szilagyi y T. G. Szekely, «Sphuzosomes: A Novel Lipoidal Vesicular Drug Delivery System», vol. 7, n.º 1, jul., 2020, doi: <https://doi.org/10.1021/jst.2020.0511>, pp.261-267.
30. G. A. Shengereva, V. A. Zakharenko, y D. W. Breuer, «Carbon Nanostuctures», *Créd. Rev. Solid State Mater. Sci.*, vol. 27, n.º 3-4, pp. 227-356, jul., 2002, doi: [10.1081/10985129cs500107](https://doi.org/10.1081/10985129cs500107).
31. A. M. Schmand, S. A. C. Teus, y G. A. Shengereva, «Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications», *Créd. Rev. Solid state Mater. Sci.*, vol. 31, n.º 1-2, pp. 48-74, may 2009, doi: [10.1080/10985129.2009.330528](https://doi.org/10.1080/10985129.2009.330528)1987.
32. A. Parvizi *et al.*, «Nanodiamond-Form Complexes As Effective Non-viral Vectors for Gene Therapy», presentado en CRS 2020 Virtual Annual Meeting, jul., 2020, Available: <https://www.crs-conference.com/lineup/available-on-line/>, <https://pubs.crs-conference.com/publications/nanodiamond-form-complexes-as-effective-non-viral-vectors-hg-ge>
33. X.-Q. Zhang, M. Chen, R. Li, X. Xu, K. Osawa, y D. Liu, «Polymer-functionalized Nanodiamond Platforms as Vehicles for Gene Delivery», *ACS Nano*, vol. 3, n.º 3, pp. 2609-2616, sept., 2009, doi: [10.1021/nr900867g](https://doi.org/10.1021/nr900867g).
34. K. Deisseroth, «Optogenetics», *Nat. Methods*, vol. 8, n.º 1, Art. n.º 1, ene., 2011, doi: [10.1038/nmeth1321](https://doi.org/10.1038/nmeth1321).
35. L. P. Sakalian, S. L. Memon, E. P. Martin, y E. S. Ayoub, «Rhodopsin: Insights from recent structural studies», *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 31, pp. 143-184, 2002, doi: [10.1146/annurev.biophys.31.052901.134328](https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.31.052901.134328).
36. A. Terakita, «Chloropsins», *Genes. Biol.*, vol. 6, n.º 3, p. 213, mar., 2005, doi: [10.1186/gb-2005-6-3-213](https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-3-213).
37. J. Loflin, «Clases moleculares de la señalización neuronal», *Choc. Al Día Int.*, vol. 3, n.º 2, 2001.
38. D. Parvez *et al.*, *Neuroscience*, Sixth edition, New York, Stamford, 2018.
39. K. Deisseroth, «Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience», *Nat. Neurosci.*, vol. 16, n.º 3, pp. 1213-1225, sept., 2017, doi: [10.1038/nrn.1091](https://doi.org/10.1038/nrn.1091).
40. E. Schweizer, C. Grünwald, y P. Tölgemann, «Biophysics of Channelrhodopsins», *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 44, n.º 1, pp. 167-186, 2015, doi: [10.1146/annurev-biophys-060414-031011](https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-031011).
41. J. Marini *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/nmeth1808](https://doi.org/10.1038/nmeth1808).
42. N. C. Klapper *et al.*, «Independent optical excitation of distinct neural populations», *Nat. Methods*, vol. 11, n.º 3, pp. 328-336, mar., 2014, doi: [10.1038/nmeth2836](https://doi.org/10.1038/nmeth2836).
43. G. Chauvin *et al.*, «Optogenetic therapy: high spatial-temporal resolution and partial disinhibition compatible with vision restoration in nonhuman primates», *Chronic. Biol.*, vol. 1, n.º 1, p. 125, ene., 2021, doi: [10.1038/s42003-020-01514-w](https://doi.org/10.1038/s42003-020-01514-w).

- 14 J. Villan-Botia *et al.* - Non-viral vectors: use of our magnetopores, liposomes and polyplexes for YFGG gene delivery into central nervous system cells. *Int. J. Pharm.*, vol. 521, n.º 1-2, pp. 133-140, feb. 2017. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.02.016
- 15 K. Ogura *et al.* - The influence of the polar headgroup of synthetic cationic lipids on the transfection efficiency mediated by microvesicles in rat retina and organ. *Biomaterials*, vol. 77, pp. 267-279, mar. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.017
- 16 S. J. Alm, J. Casero y J. Bortig-Emanouel. -Pfe-0500: Quantitative of DNA, electro-oxidation of Sulfuric Peroxide-Peroxide. *Neurochem Res.*, vol. 21, n.º 13, pp. 2623-2625, jul. 1996, doi: 10.1006/nrn.1996.2623
- 17 K. Moxang. -Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Anal. Biochem.*, vol. 105, n.º 1, pp. 47-50, may 1981, doi: 10.1016/0003-2670(81)90021-2
- 18 L. K. Kim, K. J. Dommend, M. Huh, D. A. Williams, T. J. O'Brien, y M. Moulaf. -A Simple and Reliable Protocol for the Preparation and Culturing of Fresh Surgically Resected Human Glioblastoma Tissues. *Methods Protoc.*, vol. 3, n.º 1, Art. n.º 1, mar. 2020, doi: 10.3390/mp301011
- 19 X. R. Chahman, *et al.* - Neuroblastoma x spinal cord NSC hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn Off Publ Int Assoc Anat.*, vol. 191, n.º 3, pp. 209-221, jul. 1992, doi: 10.1002/dv.100190309
- 20 O. Maiti, S. Ghim, M. Palani, S. Hück, C. Bevan, y S. Johann. -Differentiated NSC-34 neuroblastoma-like cells as experimental model for choline receptor generation. *Neurochem. Int.*, vol. 62, n.º 8, pp. 1329-1338, jun. 2013, doi: 10.1016/j.neuint.2013.03.008
- 21 K. B. Subitha, D. Sanjay, B. Savina, T. R. Raju, y T. R. Laxmi. -Electrophysiological characterization of Nsc34 cell line using Microelectrode Arrays. *J. Neuro. Sci.*, vol. 379, pp. 134-139, nov. 2016, doi: 10.1016/j.jns.2016.09.038
- 22 K. Kusama-Eguchi *et al.* - Sulfur amino acids deficiency caused by grass-pan diet plays an important role in the toxicity of L-β-DOPA in increasing oxidative stress: studies on a motor neuron cell line. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Food Bi. Food. Rad. Res. Assoc.*, vol. 29, n.º 3, pp. 636-643, mar. 2011, doi: 10.1016/j.fct.2010.07.019
- 23 H. Ryu, G. S. Joo, X. R. Chahman, X. W. Kowall, y J. Lee. -Beta-tubulin expression of c-β1 in motor neurons versus non-motor cells is linked to the pathogenesis of ALS. *Mol. Brain.*, vol. 04, n.º 3, pp. 312-352, mar. 2011, doi: 10.1038/168201203
- 24 S.-X. Wu, C.-C. Yeh, H.-C. Huang, K. C. Su, y Y.-C. Lu. -Electrophysiological characterization of sodium-activated potassium channels in NSC108-15 and NSC34 motor neuron-like cells. *Acta Physiol. (Oxf. Engl.)*, vol. 206, n.º 2, pp. 129-134, oct. 2012, doi: 10.1111/j.1748-1716.2012.02338.x
- 25 S. Eghtesabi, L. Hyldeg, y W. A. Kues. -A versatile bulk cloning/transfection protocol for murine embryonic fibroblasts and iPSC cells. *Sci. Rep.*, vol. 10, n.º 1, Art. n.º 1, ago. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-70278-w
- 26 D. Marziani, M. Mozzini, M. Ravasi, G. Trovati, y A. Serreri. -Neurological morbidity in mature cortical neurons. *NeuroReport*, vol. 26, n.º 16, pp. 329-321, abr. 2015, doi: 10.1097/WNR.0000000000000312

- 57 J. van Meijdon, G. F. L. Kasprows, y J. Chos, «Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay», in *Current Cell Culture: Methods and Protocols*, L. A. Cox, Ed., Brown, NJ: Humana Press, 2011, pp. 237-245, doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_20.
- 58 K. Dettmer *et al.*, «Differences in metabolic differences between various mammalian and primary cells», *Electrophoresis*, vol. 31, n.º 19, pp. 2836-2847, oct. 2010, doi: 10.1002/elps.201000228.
- 59 R. E. A. Rao, *Human Computer Interaction: An Introduction*, New York: Cambridge University Press, 2013, doi: 10.1017/C9780521893280.
- 60 A. Stern *et al.*, «Biological application of micro-needle arrays in drug delivery and basic research», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 377, n.º 3, pp. 189-197, oct. 2002, doi: 10.1007/s00216-002-2119-x.
- 61 E. O. Mehin, Y. Takamitsu, y K. Tamiya, «Investigating neuronal activity with plasma micro-needle arrays: advantages and new perspectives», *J. Biosci. Biotech.*, vol. 109, n.º 2, pp. 131-133, ago. 2005, doi: 10.1263/jbb.131.131.
- 62 G. K. Begey, S. C. Fitzgerald, B. K. Sahajpal, y P. G. Nelsen, «Neuronal maturation in mammalian cell culture is dependent on spontaneous electrical activity», *Brain Res.*, vol. 207, n.º 1, pp. 14-58, nov. 1981, doi: 10.1016/0006-8993(83)90078-8.
- 63 S. M. Kurokioku, «The patch-clamp technique: principles and technical considerations», *J. Vet. Clinitol. Off. J. Eur. Soc. Clinitol.*, vol. 9, n.º 1, pp. 25-37, may 2007, doi: 10.1016/j.jvc.2007.02.004.
- 64 M. M. Hassan, L. Ragnasson, 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. e0213645, mar. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0213645.
- 65 T. Asano, H. Iguchi, J. Ishizuka, y K. Yanai, «Optimell: Open access, Python Manipulation of Image Data (2+): Dynamics of Light», *Front. Neurosci.*, vol. 12, p. 561, 2018, doi: 10.3389/fnins.2018.00561.
- 66 J. K. Jung, C.-A. Gurekmut, y R. E. Gross, «Small Group Immunopins: genetically-encoded fluorescent pins for versatile, scalable, and highly cost-effective genetic inhibition», *Sci. Rep.*, vol. 7, n.º 1, p. 11366, sep. 2017, doi: 10.1038/srep11366.
- 67 A. El Hady *et al.*, «Cytogenetic stimulation objectively enhances functionally generated network synchrony», *Front. Neural Circuits*, vol. 7, p. 107, 2013, doi: 10.3389/fnirc.2013.00107.
- 68 Z. Zhang y E. Wagner, «History of Polymeric Gene Delivery Systems», *Top. Gene. Cell. Biol.*, vol. 377, n.º 2, p. 26, feb. 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-9112-0.
- 69 P. Krzes *et al.*, «Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipopolyplex 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 E. Carballo *et al.*, «The inner-membrane unfolding mechanism of lipopolyplexes of 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. Paul, A. Sundberg, E. Locken, W. Song, y S. S. et al., «Protein adsorption and cellular uptake of zwitterionic nanospheres as a function of zeta potential», *Biomaterials*, vol. 28, n.º 31, pp. 404-407, may 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.029.

- 72 E. Llanero y R. Khandakul. «An impulse to the brain—using in vivo electroporation». *Acta Neurosc.*, vol. 1, n.º 11, pp. 1156-1158, nov. 2001, doi: 10.1008/acta1101-1156.
- 73 M. Sánchez-Merino, G. Martínez-Naveas, A. Bernalte-Zoroza, I. Humphreys, y E. Fernández. «Evaluation and Optimization of Poly-d-lysine as a Non-Natural Cationic Polyelectrolyte for Gene Transfer in Neuroblastoma Cells». *Nanoparticle*, vol. 11, n.º 7, Art. n.º 7, feb. 2021, doi: 10.3390/nan11071750.
- 74 J. Myskovic, M. P. Fenech, M.-L. Boger, y R. A. Bush. «Characterization and use of the NSC-34 cell line for study of neurotrophin receptor trafficking». *J. Neurosci. Res.*, vol. 86, n.º 3, pp. 556-565, 2008, doi: 10.1002/jnr.21507.
- 75 A. L. Gill, M. Z. Wang, B. Levine, A. Prunastri, y F. G. Vieira. «Primary Neurotrophic DBB-Induced NSC-34 Cells Are More Susceptible to Arginine-Rich Aβ8 Dipeptide Repeat Protein-Associated Toxicity than Non-DBB-Induced NSC-34 and CHO Cells». *J. Mol. Biol.*, vol. 20, n.º 21, Art. n.º 21, ene. 2016, doi: 10.3390/jms20210216.
- 76 K. A. Sokalen *et al.*. «Neuron-Specific Function Model Optimized by Electrical Parameters». *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 27, n.º 1, pp. 212-252, nov. 2021, doi: 10.1089/ten.c.2021.0212.
- 77 M. Claret-Doménech, E. M. McNally, y P. D. Mukherjee. «Role of all-trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation». *J. Neurobiol.*, vol. 66, n.º 7, pp. 734-756, jun. 2006, doi: 10.1002/jne.20241.
- 78 O. Malin *et al.*, S. M. Palm, S. Brück, C. Böhm, y S. Jahnke. «Differentiated NSC-34 neuroblastoma-like cells as experimental model for axonal regeneration». *Neurobiol. Ageing*, vol. 62, n.º 8, pp. 1024-1038, jun. 2016, doi: 10.1016/j.neurobiol.2016.05.008.
- 79 J. González y S. Amini. «General Overview of Neuronal Cell Cultures», en *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*, S. Amini y M. K. White, Eds. New York, NY, Springer US, 2021, pp. 1-8, doi: 10.1007/978-1-4939-937-2_1.
- 80 X. S. Yew *et al.*. «Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs». *Mol. Ther. J. Adv. Sci. Gene Ther.*, vol. 1, n.º 3, pp. 255-262, mar. 2000, doi: 10.1006/mthe.2000.0036.
- 81 L. Mavshina, Y. B. Shao, J. Chung, G. Pizzini, y D. E. Feldman. «Long-term channelrhodopsin-2 (ChR2) expression can induce a chronic axonal morphology remodeling in cerebral cortex». *Front. Neural Circuits*, vol. 7, p. 8, 2013, doi: 10.3389/fnirc.2013.00008.
- 82 M. Peng, L. Mori, H. Dawson, y S. Kandelberg. «Chronic activation of the D156A polar mutant of Channelrhodopsin-2 signals apoptotic cell death: the good and the bad». *Cell Death Dis.*, vol. 7, n.º 11, pp. 1-11, nov. 2016, doi: 10.1038/cdd.2016.371.
- 83 GenSight Biologics. «A Phase 1, 2a, Open-label, Non-Randomized, Dose-Escalation Study to Evaluate the Safety and Tolerability of GS001 in Subjects With Parkinson's Disease», clinicaltrials.gov. Clinical trial registration NCT03226336, feb. 2021, Accessed: agosto 21, 2021. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03226336>.

84. J.-A. Sahel *et al.*. «Partial recovery of visual function in a blind patient after epigenetic therapy». *Nat. Med.*, vol. 27, n.º 7, pp. 1226-1229, jul. 2021, doi: 10.1038/s41591-021-01351-1.
85. M. B. Sobol'ski, I. Orlak, y W. P. Halloran. «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. 114-112, mar. 2005, doi: 10.1096/fj.04-3180j.
86. M. Zuzarte. «Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior». *Chem. Rev.*, vol. 102, n.º 3, pp. 757-782, mar. 2002, doi: 10.1021/cr010142e.
87. A. M. Searund *et al.*. «Acidimetric nanoparticles cytotoxicity». *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, n.º 1, pp. 2-7, ene. 2007, doi: 10.1021/jp066867y.
88. L. Gracina *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 effects of fluorescent nanodiamonds on neuronal survival and morphogenesis». *Sci. Rep.*, vol. 4, n.º 1, p. 6019, nov. 2014, doi: 10.1038/srep06019.

10. Anexos

Porcentaje (%)	Medio de cultivo celular primario
97.5	Neurobasal [®] Medium 1X + Lipids without Platelet Rich Plasma (Heraeus-Fisher) + β-27 [®] + Supplement 05X + serum free (Gibco [®])
1	Biocoat FBS + rat. Bovine Serum
0.25	Penicilline-Streptomycin 100+0.1 i.u. (Gibco [®])
0.25	β-27 [®] + Supplement 05X + minus vitamin A (Gibco [®])

Porcentaje (%)	Medio de cultivo celular NSC ⁺ - 34
89	DMEM high glucose, GlutaMAX [®] Supplement, (Gibco [®])
10	Biocoat FBS + rat. Bovine Serum
1	Penicilline-Streptomycin 100+0.1 i.u. (Gibco [®])

Concentración (mM)	Medio extracelular Tyroses
136.5	NaCl
5.1	KCl
1.8	CaCl ₂
0.53	MgCl ₂
5.5	Glucosa
5.5	HEPES - 8.0M
pH [7.2]	

