



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA CASCADA
DE FOSFOINOSITOLES EN CÉLULAS HEK293 Y EVALUACIÓN
DE LOS EFECTOS DEL LITIO SOBRE CORRIENTES DE
MEMBRANA ACTIVADAS POR ESTA VÍA**

SARA DURÁN FERRO

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2016

INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA CASCADA DE FOSFOINOSITOLES EN CÉLULAS HEK293 Y EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL LITIO SOBRE CORRIENTES DE MEMBRANA ACTIVADAS POR ESTA VÍA

SARA DURÁN FERRO

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias – Biología

Directora:
María del Pilar Gómez Correa M.D. PhD.

Línea de Investigación:
Fisiología Celular

Grupo de Neurofisiología Celular:
Biofísica de la Señalización Celular

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2016

1 RESUMEN

El litio ha sido ampliamente utilizado como el principio activo en medicamentos psiquiátricos, pero el conocimiento de sus mecanismos de acción a nivel celular y molecular es limitado. Estudios bioquímicos han establecido que uno de los diversos blancos sobre los cuales podría actuar el litio es la vía de señalización de fosfoinositoles, pero se carece de estudios funcionales para comprobar esta hipótesis. Estudios previos en células sensoriales de anfibio, que responden a la luz a través de la activación de esta vía revelaron un aumento robusto de la respuesta fisiológica ante la exposición aguda a litio extracelular en altas dosis. Para extender esta observación a un contexto clínicamente relevante y con el propósito de tener un mayor entendimiento de los efectos fisiológicos definidos del litio en células individuales, se propuso desarrollar un sistema apto para evaluar la modulación de las corrientes de membrana activadas por la vía de fosfoinositoles en células mamíferas en cultivo. Se realizaron ensayos de western blot e inmunofluorescencia para corroborar la expresión de los elementos clave de señalización de esta vía: M3-mAChR, Gq, PLC β 1 e IP3R-I en células HEK293, que de manera endógena expresa receptores muscarínicos acoplados a Gq. Para asegurar la presencia de una conductancia iónica acoplada a Gq y para corroborar la mediación de la vía de fosfoinositoles se realizaron registros de patch clamp activando la cascada por diálisis con GTP- γ -S y exponiendo las células a un antagonista de la fosfolipasa C, respectivamente. La estimulación de los receptores muscarínicos con carbacol, un análogo de la acetilcolina, produjo corrientes similares a las inducidas por GTP- γ -S, y la utilización de bajas concentraciones reveló corrientes de salida que se exacerbaban con la exposición aguda a litio. Basados en los resultados obtenidos, se propone la posibilidad de que se presenten dos poblaciones de receptores con diferente sensibilidad al carbacol y que el litio ejerza efectos diferenciales sobre ellos.

Palabras Clave

Acción farmacológica, Fisiología del litio, Trastorno bipolar, Receptor colinérgico metabotrópico, Vía de señalización de fosfoinositoles

2 ABSTRACT

Lithium has been widely used as the active principle in psychiatric medications, but knowledge of its mechanisms of action at the cellular and molecular level is limited. Biochemical studies have established that one of the various targets on which lithium could act is the phosphoinositol signaling pathway, but functional studies are lacking to test this hypothesis. Previous studies in amphioxus sensory cells, that respond to light through the activation of this pathway revealed a robust increase in the physiological response to acute exposure to extracellular lithium in high doses. To extend this observation to a clinically more relevant context and with the purpose of having a better understanding of the defined physiological effects of lithium in individual cells, we proposed to develop a system suitable for evaluating the modulation of membrane currents activated by the phosphoinositol signaling pathway in mammalian cells in culture. Western blot and immunofluorescence assays were performed to corroborate the expression of the key signaling elements of this pathway: M3-mAChR, Gq, PLC β 1 and IP3R-I in HEK293 cells, which endogenously expresses muscarinic receptors coupled to Gq. To ensure the presence of an ionic conductance coupled to Gq and to corroborate the mediation of the phosphoinositol pathway, patch clamp recordings were performed by activating the cascade by GTP- γ -S dialysis and exposing the cells to a phospholipase C antagonist, respectively. Stimulation of muscarinic receptors with carbachol, an analog of acetylcholine, evoked similar currents to those induced by GTP- γ -S, and the use of low concentrations revealed outward currents that were exacerbated with acute lithium exposure. Based on the results, we propose the possibility of the existence of two populations of muscarinic receptors with different sensitivity to carbachol and that lithium exerts differential effects on them.

Key Words

Pharmacological action, Lithium physiology, Bipolar disorder, Metabotropic cholinergic receptor, Phosphoinositol signaling pathway

3 CONTENIDO

1	RESUMEN	3
	Palabras Clave	3
2	ABSTRACT	4
	Key Words	4
3	CONTENIDO.....	5
4	LISTA DE TABLAS.....	6
5	LISTA DE FIGURAS.....	6
6	INTRODUCCIÓN	7
7	OBJETIVOS	11
	7.1 Objetivo general.....	11
	7.2 Objetivos específicos.....	11
8	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
	8.1 Cultivo de células.....	12
	8.2 Inmunodetección de las proteínas involucradas en la cascada de fosfoinositoles	13
	8.2.1 SDS PAGE y Western blot	13
	8.2.2 Inmunocitoquímica	15
	8.3 Registros electrofisiológicos.....	19
	8.3.1 Patch clamp	19
	8.3.2 Estimulación química	22
	8.4 Transfección de células HEK293 con mSlo1-eGFP	23
	8.5 Estudios electrofisiológicos piloto en células de neuroblastoma	24
9	RESULTADOS	25
	9.1 Evaluación de células HEK293 como modelo de estudio de los mecanismos fisiológicos celulares y moleculares de los efectos del Li ⁺ sobre la vía de señalización de fosfoinositoles.....	25
	9.1.1 Detección de proteínas clave de la vía de señalización de fosfoinositoles en células HEK293 mediante western blot e inmunofluorescencia.....	25
	9.1.2 Registros electrofisiológicos en células HEK293	34
	9.2 Evaluación de la susceptibilidad de la respuesta eléctrica ante la exposición aguda a Li ⁺	44
	9.3 Estudios piloto en modelos alternativos.....	47
10	DISCUSIÓN.....	50
11	CONCLUSIONES	54
12	LITERATURA CITADA.....	55
13	FINANCIACIÓN.....	60

4 LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios comerciales utilizados en ensayos de inmunodetección de proteínas de la cascada de señalización de fosfoinositoles en células HEK293	17
Tabla 2. Anticuerpos secundarios para la detección de proteínas clave en la cascada de señalización de PLC por <i>Western blot</i> en HEK293.....	18
Tabla 3. Anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos para la detección y localización de proteínas de la vía de señalización de la fosfolipasa C en células HEK293	18

5 LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cascada de señalización de la fosfolipasa C.....	9
Figura 2. Se detecta el receptor de membrana M ₃ -mAChR en células HEK293 por <i>SDS-PAGE</i> e inmunoblot.....	26
Figura 3. Inmunodetección de receptores muscarínicos de acetilcolina del subtipo M ₃ en células HEK293.....	27
Figura 4. Inmunodetección de la proteína G _q en células HEK293 por <i>Western blot</i>	29
Figura 5. La presencia de la proteína G _q en células HEK293 se demuestra en ensayos de inmunocitoquímica	30
Figura 6. Se demuestra la presencia de la proteína PLCβ1 en células HEK293.....	31
Figura 7. Evidencia inmunocitoquímica de que las células HEK293 expresan la proteína PLCβ1....	32
Figura 8. La proteína IP3R-I se expresa en células HEK293.....	34
Figura 9. Célula HEK293 bajo registro de <i>patch clamp</i> (40X).....	35
Figura 10. Las células HEK293 generan corrientes de membrana con la activación directa de proteínas G.....	37
Figura 11. El carbacol, un agonista de la acetilcolina, activa corrientes en células HEK293.....	39
Figura 12. La aplicación local de carbacol 100 μM genera una corriente de entrada cuya amplitud máxima se alcanza progresivamente	40
Figura 13. La estimulación con carbacol 5 μM revela una corriente de salida en células HEK293...	41
Figura 14. El inhibidor de la PLC, U-73122, modifica las corrientes que activa el carbacol en células HEK293	43
Figura 15. El análogo del diacilglicerol, DOG activa corrientes de entrada en células HEK293	44
Figura 16. La exposición de células HEK293 a Litio 4 mM desenmascara corrientes de salida	46
Figura 17. Aparente reducción de la corriente de entrada en células HEK293 por exposición a litio 4 mM	47
Figura 18. Transfección del canal de potasio activado por calcio, mSlo1, en células HEK 293.....	48
Figura 19. Células de neuroblastoma humano responden a carbacol con una corriente de entrada de cinética rápida	49

6 INTRODUCCIÓN

El trastorno bipolar, también conocido como enfermedad maniaco-depresiva, es una enfermedad severa, crónica y potencialmente mortal (Gould et al., 2004). Este desorden se caracteriza por cambios de estado de ánimo opuestos y alternantes: la euforia y la depresión, que son drásticos en referencia al modo de actuar habitual. Los episodios maníacos, están definidos por un estado hiperalterado —eufórico o irritable— de alta energía y actividad motora. Esto se acompaña también de pensamientos acelerados, juicio pobre, habla rápida y la ejecución de comportamientos riesgosos. Por su parte, en las fases de depresión —que duran aproximadamente 3 veces más que los episodios maníacos— se observan comportamientos típicos de depresión severa tales como desmotivación, tristeza, baja energía y baja actividad motora. Asimismo, son típicos la alteración en hábitos de sueño y del apetito, dificultad para concentrarse y para tomar decisiones y la recurrencia de pensamientos suicidas (Goodwin & Jamison, 1990).

Se estima que la prevalencia del trastorno bipolar es del 2.4 % de la población global (Merikangas et al., 2011) y está categorizado por la Organización Mundial de la Salud como sexto en la lista de causas principales de discapacidad (López, 1996; Gould et al., 2004). También se ha establecido que entre el 10 y el 20 % de los pacientes cometen suicidio (Dinan, 2002) y es ampliamente reconocido que las consecuencias a nivel económico, social, médico y en las relaciones interpersonales de quienes padecen esta enfermedad y no son tratados oportunamente son muy graves (Gould et al., 2004; Kleinman et al., 2003; Woods, 2000).

No existe un entendimiento completo sobre la fisiopatología del trastorno bipolar —se considera que se trata de varios factores que contribuyen a la enfermedad y/o a incrementar el riesgo de padecerla, incluidos la predisposición genética y los eventos desencadenantes (Craddock & Jones, 1999) y a la fecha no existe cura. No obstante, los síntomas del trastorno bipolar se pueden controlar con una combinación de medicamentos y terapias. Lo anterior es cierto aun cuando a nivel del comportamiento, los efectos de los medicamentos más ampliamente utilizados (anticonvulsivos como valproato, antipsicóticos y litio) son altamente complejos y ampliamente variables entre individuos.

El litio ha sido por décadas el ingrediente activo más ampliamente utilizado en medicamentos psiquiátricos para el tratamiento de pacientes con trastorno bipolar (Maj, 2000). Sus efectos y primera descripción como agente para el tratamiento de esta enfermedad se atribuyen a John Cade en 1949 (Cade, 1949; Cruceanu et al., 2009). Desde entonces se ha demostrado la eficacia del litio como tratamiento a corto plazo (Schou, 1983; Cruceanu et al., 2009) y a largo término (O'Connell et al., 1991; Malhi et al., 2013). Otros estudios han demostrado el rol del litio como agente anti maníaco, agente profiláctico de la manía y de la depresión, como un antidepresivo y también como un potenciador del efecto de otros antidepresivos (Jope, 1999; Gould et al., 2004).

La relevancia clínica del tratamiento con litio es indiscutible por su poder de suprimir las oscilaciones entre los estados de manía y de depresión y por ejercer un efecto anti-suicida que no se observa con otros medicamentos estabilizadores del ánimo (Lewitzka et al., 2013). El tratamiento con litio permite que se lleve una vida saludable y productiva. Sin embargo, aún se carece de un

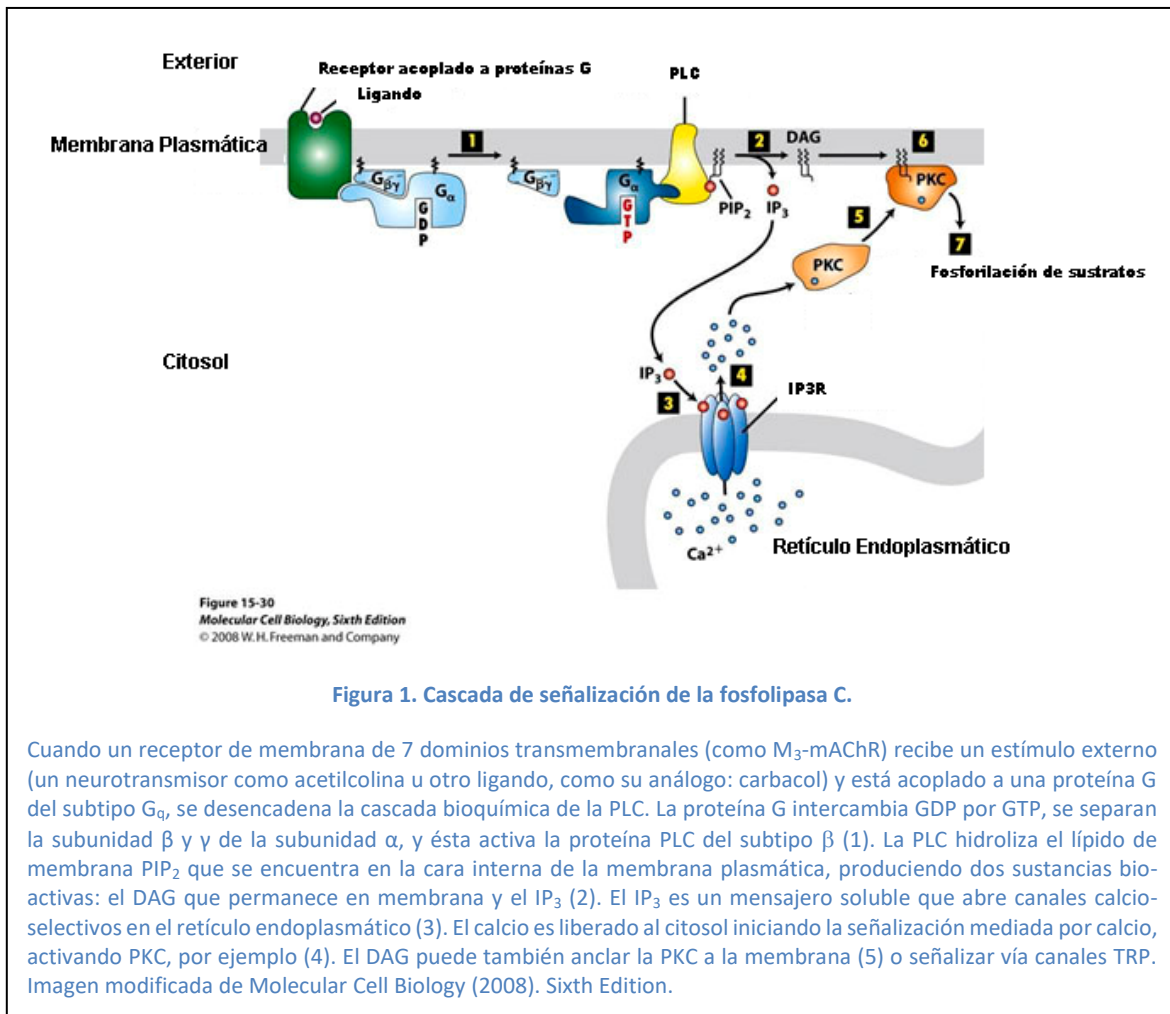
entendimiento claro y detallado de los efectos de este ion –administrado como una sal– a nivel celular y molecular. Los efectos fisiológicos directos y a largo plazo –mediante una reprogramación de la expresión genética, por ejemplo– que permitan explicar una alteración de las funciones neuronales y su eficacia clínica (Berridge et al., 1982) también son objeto de discusión.

Varios posibles mecanismos de acción del litio han sido propuestos y examinados (ver revisión en Jope & Williams, 1994; Phiel & Klein, 2001; Malhi et al., 2013): entre ellos, están (1) la posibilidad de que el litio compita con iones de Na⁺, K⁺, Mg²⁺ o Ca²⁺ por sitios de interacción con enzimas y transportadores (Birch, 1974; Ryves & Harwood, 2001; Mota de Freitas et al., 2006), (2) disminución de receptores metabotrópicos de glutamato (Sourial-Bassillious et al., 2009), (3) efectos sobre cascadas de señalización, especialmente aquellas mediadas por proteínas G heterotriméricas (Berridge et al., 1982; Carli et al., 1994; Farhy et al., 2014) y (4) efectos bioquímicos en moléculas involucradas en el metabolismo de fosfoinosítoles (Hallcher et al., 1980; Song et al., 1982; Drummond, 1988; Berridge & Irvine, 1989). No obstante, estos estudios no demuestran cambios fisiológicos celulares que puedan relacionarse con mecanismos de acción específicos que ayuden a explicar el efecto estabilizador del litio sobre los síntomas del trastorno bipolar.

Las proteínas G heterotriméricas, regulan una variada gama de procesos celulares y por lo tanto constituyen excelentes candidatos para explicar la modulación de la actividad neuronal por parte del litio. No obstante, no ha habido consenso sobre el tipo de proteínas G que podrían estar involucradas, ni tampoco sobre el mecanismo de acción implicado (Wang & Friedman, 1999) o su relación con un posible cambio en la señalización iniciada por diversos neurotransmisores.

Una de las cascadas bioquímicas mediadas por proteínas G heterotriméricas, en las que se ha propuesto una acción del litio, es la que involucra hidrólisis del fosfatidilinositol, y uno de los caminos canónicos de control de esta vía está regulado por proteínas G del subtipo q. Las proteínas G_q acoplan la señalización entre receptores de 7 dominios transmembranales y la enzima efectora fosfolipasa C (PLC). Una vez activa, la PLC hidroliza el lípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), dejando como productos dos sustancias bio-activas: el inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG) (véase la Figura 1).

El IP₃ es un mensajero soluble que se liga a receptores ionotrópicos, calcio-selectivos, en el retículo endoplasmático. Como consecuencia de ello, se libera al citosol, el calcio que se acumula allí por efecto de las bombas SERCA (Kaprielan et al., 1989). El IP₃ es por lo tanto uno de los elementos críticos de la señalización iniciada por G_q/PLC; el resultante aumento de Ca²⁺ puede alterar el comportamiento eléctrico de neuronas, por ejemplo, activando canales potasio-selectivos o cloro-selectivos, y causando efectos inhibitorios (Goodwin & Jamison, 1990; Gilman et al., 1990). Por su parte, el DAG es un lípido con capacidad de activar varios subtipos de proteínas quinasa C (PKC; las así llamadas ‘convencionales’: α, βI, βII y γ), y también puede ejercer efectos directos sobre canales iónicos, especialmente de la familia TRP. Adicionalmente, el DAG puede dar origen a metabolitos activos como el ácido fosfático.



Esta vía está implicada en diversos procesos celulares como son metabolismo, secreción, proliferación (Berridge & Irvine, 1989) y cabe resaltar que la expresión de los elementos moleculares de esta vía es muy abundante en el sistema nervioso central, especialmente en el cerebelo, corteza e hipocampo (Nishida et al., 1988; Sharp et al., 1999), lo cual proporcionaría un substrato morfológico a posibles efectos del litio a nivel de interacción neuronal.

En vista de estas lagunas sobre el modo de acción del litio –pese a su incuestionable efectividad como agente terapéutico–, en este trabajo se propuso implementar un sistema que permita evaluar a nivel de células individuales los efectos fisiológicos del litio. En particular, considerando que la electricidad constituye el lenguaje biológico por excelencia en el sistema nervioso, es razonable suponer que los efectos del litio sobre vías de señalización se manifiesten como cambios en corrientes de membrana. Las mediciones eléctricas en un modelo experimental robusto constituyen un método de alta sensibilidad y resolución temporal útil para evaluar la modulación de las corrientes iónicas ante la exposición a litio como la respuesta fisiológica aguda inmediata.

La viabilidad de esta propuesta surgió a raíz de un hallazgo fortuito obtenido en otra línea de estudio de nuestro laboratorio, sobre la naturaleza de las corrientes iónicas generadas por luz en neuronas intrínsecamente fotosensibles del tubo neural del anfibio. Se había podido establecer que la región fotosensible de dichas neuronas expresa selectivamente proteínas G de subtipo q y que la fotorespuesta involucra la activación de una fosfolipasa C y de la rama IP₃/Ca²⁺ de esa vía de señalización (Angueyra et al., 2012). También se encontró que la conductancia iónica que subyace el potencial de receptor consiste de canales tipo TRP (Pulido et al., 2012). La observación que dio inicio a ésta investigación fue que al exponer dichas células a una solución extracelular con litio en reemplazo de sodio durante la estimulación lumínica (un experimento control para delinear al calcio como mensajero final del proceso), se produjo un inesperado incremento marcado y reproducible en la señalización de la cascada de fosfoinosítoles –que se manifestó como un aumento en la liberación de calcio desde depósitos intracelulares, y un incremento en la amplitud de la fotocorriente (Peinado et. al., 2015).

Un modelo experimental para evaluar funcionalmente a nivel de células individuales la modulación de las corrientes iónicas de la vía de la PLC ante la exposición a litio no ha sido establecido, y sería altamente deseable para extraer información mecanística sobre el cambio en la señalización mediada por Gq/PLC/IP₃.

Habiendo examinado la literatura referente a algunas de las más comunes líneas celulares, se encontró viable realizar dicha evaluación en la línea celular humana Human Embryonic Kidney 293 (HEK293). Las líneas celulares en cultivo constituyen un modelo experimental adecuado y conveniente por su homogeneidad y facilidad para obtener registros electrofisiológicos reproducibles a nivel de célula única. Esta línea en particular, resultaba ser conveniente ya que cuenta con la expresión nativa de receptores muscarínicos (Luo et al., 2006) y el respaldo de ensayos efectuados en poblaciones de células, que indican que su activación está acoplada a proteínas Gq y a la movilización de calcio, (Luo et al., 2008).

El trabajo experimental contempló la validación del modelo, corroborando primero la presencia de los componentes de la cascada de fosfoinosítoles en las células HEK293 utilizando técnicas de inmunodetección, y luego, explorando la viabilidad de activar de una manera controlada esta vía mientras se monitoreaban en células individuales respuestas fisiológicas reproducibles. Esta caracterización es pre-requisito para los estudios posteriores en los cuales se pretendió evaluar los efectos de la exposición a litio.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Evaluar si la línea celular humana HEK293 posee los elementos críticos que acoplen receptores metabotrópicos a la cascada de señalización de la fosfolipasa C y determinar si la estimulación de esta vía, activa corrientes iónicas que podrían ser susceptibles a modulación por litio.

7.2 Objetivos específicos

1. Detectar mediante western blot e inmunofluorescencia la presencia de proteínas clave de la vía de señalización de fosfoinositoles en células HEK293, utilizando anticuerpos contra Gq, PLC β , IP3R y M3-mAChR.
2. Medir las corrientes y cambios de conductancia de membrana activadas por carbacol, un agonista de la acetilcolina que actúa selectivamente sobre receptores metabotrópicos.
3. Verificar la mediación de la vía de fosfoinositoles en las corrientes muscarínicas, estimulando directamente proteínas G con GTP- γ -S y evaluando el efecto de un antagonista de la PLC (U-73122).
4. Evaluar la susceptibilidad de la respuesta eléctrica (obtenida por estimulación muscarínica con carbacol) a la exposición aguda a litio, reemplazándolo iso-osmóticamente por sodio, hasta llegar a niveles terapéuticos.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cultivo de células

Dos alícuotas de la línea embrionaria humana de riñón, HEK293 fueron obtenidas: Una donada por la Dra. Marcela Camacho del Laboratorio de Biofísica Centro Internacional de Física, Universidad Nacional de Colombia, y otra por personal del curso de Neurobiología del Marine Biological Laboratory, Woods Hole, EE.UU. Aunque el número exacto del subcultivo al recibir las células fue desconocido en ambos casos, se estima que se trataba del subcultivo diez y tres, respectivamente. Dichas células se mantuvieron en cultivo durante el transcurso del trabajo experimental.

El medio de cultivo utilizado fue Gibco® DMEM (alta glucosa, L-glutamina, cloruro de piridoxina, 110 mg/L piruvato de sodio), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco®) y 3,7 g/L de bicarbonato de sodio (SIGMA-ALDRICH®). Ocasionalmente se utilizó el medio Gibco® GlutaMAX™ que contiene una forma estable de L-glutamina para promover la viabilidad y el crecimiento celular. Inicialmente se hizo uso de concentraciones estándar de penicilina-estreptomina (100 unidades/mL y 100 µg/mL respectivamente (Thermo Fisher SCIENTIFIC). Más adelante se estableció que, mientras se respetaran rigurosamente prácticas asépticas, el uso de antibióticos no era necesario, y por lo tanto se omitió sin que se notaran diferencias.

Las células fueron cultivadas a 37°C, con suministro de CO₂ al 5% en incubadora de chaqueta de agua (Thermo SCIENTIFIC, Series 8000) y las manipulaciones para el cultivo se hicieron en cabina de flujo laminar. La confluencia de las células se mantuvo entre el 70% y 90% en frascos de cultivo con área de crecimiento de 25 cm² y tapa de filtro (T25; Corning®). Para lograr el desprendimiento de la monocapa y hacer el subcultivo, se hizo semanalmente tratamiento de 1 a 2 minutos, con solución de tripsina (Gibco®) al 0.05% disuelta en buffer HBSS-EDTA (Thermo Fisher SCIENTIFIC) o buffer de fosfato salino (PBS; 0.1 M fosfato de sodio, 0.15 M NaCl, pH 7.2; SIGMA-ALDRICH®) a 37°C. La agitación mecánica fue necesaria para obtener células individuales, que, diluidas en medio de cultivo fresco a una confluencia inicial del 5% o el 10%, serían luego utilizadas para la continuación del cultivo y para la siembra de células a ser empleadas en experimentos.

Adicionalmente, se mantuvo un stock de células HEK293 crio-preservadas bajo nitrógeno líquido y/o, alternativamente, a -80°C. Lo anterior, con el fin de renovar el cultivo tras aproximadamente quince subcultivos, para así evitar cambios celulares que pudieran llevar a la pérdida de funcionalidad. Para su almacenamiento, las células eran resuspendidas en medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO; Thermo Scientific) o en medio de cultivo estándar en conjunto con la misma proporción de Gibco™ Recovery™ Cell Culture Freezing Medium. El medio de cultivo nutritivo DMEM/F-12 – L-glutamina (Gibco®) (también suplementado con piruvato de sodio, cloruro de piridoxina y bicarbonato de sodio) se utilizó para lograr un crecimiento más acelerado del cultivo.

Las células para registros electrofisiológicos fueron sembradas sobre laminillas de vidrio (CITOGLOSS) dispuestas en cajas de 24 pozos (TPP®). Las laminillas eran de borosilicato, de 160 µm de grosor y aptas para cultivo (se realizaron tres lavados en etanol al 96% y agua destilada para

eliminar sustancias contaminantes del vidrio, se esterilizaron y secaron). Para los ensayos de western blot, se utilizaron células crecidas en pozos de 9.6 cm² (FALCON™) o en frascos T25 a una confluencia del 70% a 90% y las células para ensayos de inmunocitoquímica se sembraron en láminas cubre-objetos (Gold Seal™ – Thermo SCIENTIFIC) y se utilizaron cuando la confluencia de las células era del 80%.

8.2 Inmunodetección de las proteínas involucradas en la cascada de fosfoinositoles

8.2.1 SDS PAGE y Western blot.

Para comprobar por western blot la expresión de los componentes clave de la cascada de señalización de fosfoinositoles en las células HEK293: la proteína Gq, el receptor muscarínico de membrana del subtipo M3 –M3-mAChR– y la proteína PLCβ-1, el medio de cultivo era retirado y las células eran lavadas 1 vez con PBS frío. Luego, se adicionaba sobre las células adheridas a los recipientes –T25 y 9.6 cm²– el buffer de lisis de acción moderada Pierce® IP (150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 5% glicerol, 25 mM Tris HCl, pH 7.4; Thermo SCIENTIFIC) suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF; SIGMA-ALDRICH®) en concentración final de 0.2 mM y coctel inhibidor de proteasas (P1860; SIGMA-ALDRICH®) en volúmenes de 500 µL o 200 µL con el fin de solubilizar proteínas sin liberar ADN genómico. La incubación se realizó en hielo y bajo agitación cada 30 segundos por 5 minutos.

Para la inmunodetección de IP3R, que se localiza en la membrana del retículo endoplasmático rugoso, hizo falta utilizar buffers de lisis de acción más fuerte, con los detergentes no aniónicos NP-40 (Surfact-Amps®, Thermo Scientific) o Triton™ X-100 (TX-100) al 1% y 150 mM NaCl, 50 mM Tris - HCl pH 7.4. Alternativamente, también se utilizó el buffer RIPA de acción más severa (0.1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS (BIORAD), 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 % TX-100, NaCl 140 mM, 10 mM Tris-HCl (Fisher Scientific, Invitrogen™), pH 8.3 (componentes de SIGMA-ALDRICH® a menos que se indique de otra forma). Estos buffers también fueron suplementados con PMSF y coctel inhibidor de proteasas.

Los buffers con detergentes no aniónicos se utilizaron con los mismos parámetros de incubación y agitación que con el buffer Pierce® IP, y en el caso de la utilización del buffer RIPA (utilizado en la detección de IP3R y también de M3-mAChR), donde se genera también liberación de ADN, se utilizó el doble de volumen de buffer, el lisado se expuso a sonicación (Laboratory Supply) por 15 segundos dos veces, con receso en hielo de 1 minuto con el fin de disgregar el ADN y liberar las proteínas de interés. Adicionalmente, bajo este procedimiento, la muestra se sometió a desnaturalización de proteínas con un tratamiento por 10 minutos a 100°C.

El lisado resultante de cualquiera de las preparaciones se centrifugó a 13,000 g por 10 minutos. El pellet con los remanentes celulares se descartó y al sobrenadante le fue añadido 3 volúmenes de acetona (Millipore) y permaneció a -20°C por 2 a 4 horas para precipitar las proteínas. Seguidamente se realizó una centrifugación a 8,000 g por 10 minutos y el pellet resultante se secó al aire por un

máximo de 10 minutos y se resuspendió en buffer de carga 1X (5 mM EDTA, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol, 10% glicerol (SIGMA-ALDRICH®), 62.5 mM Tris HCl pH 6.8) con 1% de β -mercaptoetanol (SIGMA-ALDRICH®) añadido inmediatamente antes de ser utilizado.

La separación electroforética de las proteínas se realizó en gel de poliacrilamida discontinuo (29:1; BIO RAD) con fase de carga al 4% y fase de separación entre el 6% y 12%. Para la detección de IP3R se utilizó fase de separación al 6% –para así lograr la migración de monómeros de la proteína debido a su tamaño de \approx 314 kDa–. Para la detección del receptor muscarínico del subtipo M3, con un peso de \approx 66 kDa, la fase de separación fue del 8%, la detección de PLC β 1 (138 kDa) se logró con un gel al 7% y la separación de la proteína Gq (42 kDa), fue posible con un gel de separación del 12%.

Para la polimerización del gel se utilizó 1% v/v del iniciador persulfato de amonio al 10% y 0.1% del agente catalizador TEMED (ambos de SIGMA-ALDRICH®). Se utilizó butanol o etanol (Mallinckrodt Pharmaceuticals) sobre la fase de separación con el propósito de limitar la exposición a oxígeno durante la polimerización y también obtener una superficie regular; este fue removido antes de introducir la mezcla del gel de carga.

Se sembraron entre 5 a 20 μ L de muestra en cada pozo, y las condiciones de corrida fueron corriente constante de 25 mA, por aproximadamente 3 horas, para un gel con dimensiones de 8 cm de largo. La composición del buffer de corrida utilizado fue 1.92 M glicina (Fisher Scientific), 250 mM Tris base, 1% SDS, pH 8.3. Los patrones de peso molecular utilizados fueron Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standards (BIO-RAD) o Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

La electrotransferencia del gel a membrana de nitrocelulosa se hizo bajo condiciones de corriente constante de 30 mA, por aproximadamente 1 hora, mediante el método semi-seco (SemiPhor™, TE 70 Series, Amersham Biosciences) o con el sistema de cámara líquida Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD) en voltaje constante (100 V). La composición del buffer de transferencia utilizado fue 153 mM glicina, 20 mM Tris, 20% metanol (Mallinckrodt Pharmaceuticals), pH 8.3.

El bloqueo de la membrana se realizó con buffer tris salino (TBS; 50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7.5) y 3% albumina de suero bovino (BSA; SIGMA-ALDRICH), durante 30 minutos a temperatura ambiente y seguidamente por 8 a 12 horas a 4°C.

A continuación, se realizó incubación con anticuerpos primarios (Tabla 1) por 4 horas y luego se realizaron 3 lavados con TBS (de diez minutos cada uno) para remover el excedente. Inmediatamente después, se incubó por 1 hora con el anticuerpo secundario –contra la especie respectiva– acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:200 (Tabla 2). Lo anterior se llevó a cabo a temperatura ambiente y con rotación constante (30 a 50 rpm). Posteriormente, la membrana fue lavada con TBS por 10 minutos, tres veces, para remover el anticuerpo que no se hubiera unido. Los controles incluyeron la evaluación de anticuerpos secundarios en ausencia del anticuerpo primario.

El revelado se hizo mediante incubación con Western Blue (Promega), en ausencia de luz, por un tiempo no mayor a 12 minutos. La aparición de las bandas se monitoreó con iluminación roja tenue ($\lambda > 600$ nm); las reacciones rápidas se detuvieron con ácido acético al 5 % (Chemí) en TBS y las reacciones lentas con agua destilada.

Con el fin de evaluar el éxito de la lisis y la presencia e integridad de proteínas en el gel, se cargaron carriles adicionales los cuales, fueron luego teñidos con azul de Coomassie; de la misma manera se tiñó el gel residual post-transferencia para corroborar que fracción de las proteínas se transfirió a la membrana de nitrocelulosa.

Las membranas y geles se documentaron fotográficamente con una cámara digital (CMOS, Thorlabs) y se procesaron con software de edición de imágenes para su posterior análisis (Fiji, GNU GPL, Wayne Rasband, y Photoshop CS6, Adobe, para la creación de figuras).

8.2.2 Inmunocitoquímica

La marcación inmunocitoquímica para la detección y localización de M3-mAChR, Gq, PLC e IP3R en células HEK293, se realizó sobre células adheridas a láminas cubreobjetos.

Las células se fijaron con 2% de paraformaldehído (PFA; SIGMA-ALDRICH) en solución externa para células HEK (véase más adelante) por 15 minutos a temperatura ambiente. Tras 2 lavados sucesivos con PBS (Fisher Scientific, GIBCO), de diez minutos cada uno, se permeabilizaron con PBS, 0.2% TX-100 por 5 minutos. Para bloquear sitios inespecíficos, las células se incubaron en PBS con 1% de suero fetal bovino (FCS) y 0.002% de TX-100 por 10 minutos (excepto para M3-mAChR, para el que se utilizó PBS con 0.5% de suero de cabra (Gibco®) y 0.002% de TX-100).

Se realizó incubación por 1 hora con los anticuerpos primarios respectivos, en diluciones de 1:50 a 1:200 de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes (Tabla 1) en PBS, 0.5 % de BSA y 0.002% de TX-100. Seguidamente, se realizaron 2 lavados con 0.1 M PBS y 0.0002% de TX-100, de 10 minutos cada uno. Luego, se realizó la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor® 546 (Life Technologies, Invitrogen) en dilución 1:200 en PBS, 0.5% de BSA, 0.002% de TX-100, por 1 hora, protegidos de la luz (Tabla 3).

Para remover los anticuerpos excedentes se hicieron lavados con PBS 3 veces, por 10 minutos cada uno. Todos los cambios de solución se hicieron con un sistema de intercambio con micropipetas, cuidando de la desecación total y los periodos de incubación se realizarán bajo agitación constante. El exceso de solución fue retirado por adsorción y las laminillas se montaron sobre láminas de vidrio con 50% glicerol en PBS antes de la observación de la fluorescencia. Previo a la observación y su almacenamiento a 4°C, las laminillas fueron selladas sobre la lámina con esmalte para evitar la evaporación de la solución.

La observación se realizó a través de microscopia de fluorescencia, con la combinación de filtro de excitación, filtro de barrera y dicroicos estándar para la detección de rodamina en un microscopio

Zeiss Axioimager Z2, utilizando magnificación 63X o 100X y una lámpara de mercurio de 80 W para estimular las moléculas fluorescentes.

Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital acoplada al microscopio (cámara Zeiss AxioCam) controlada por el software AxioVision. Los parámetros de adquisición de imágenes de fluorescencia fueron idénticos para las muestras y sus respectivos controles, que consistieron de células incubadas únicamente con los anticuerpos secundarios, omitiendo el anticuerpo primario.

Las imágenes de fluorescencia –monocromáticas– de las células control y de las células expuestas al anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo, fueron procesadas con pseudo-coloración para mejor visualización. Adicionalmente, cada imagen de fluorescencia fue complementada por micrografías del mismo campo tomadas con óptica de Nomarski.

Tabla 1. Anticuerpos primarios comerciales utilizados en ensayos de inmunodetección de proteínas de la cascada de señalización de fosfoinosítoles en células HEK293

Proteína a ser detectada	Anticuerpo	Referencia Fabricante	Concentración	
			Western blot	Inmuno-citoquímica
PLC β 1	Anti Fosfolipasa C beta 1 Huésped: Ratón Policlonal	Ab21824-100 abcam	1:1000 1:500	1:200
IP3R-I	Anti-Receptor de IP3 tipo I Huésped: Ratón Policlonal Anti-Receptor de IP3 (ITPR1) Huésped: Conejo Policlonal	H00003708-A01 Novus ab5804 abcam	1:500 1:500	- 1:100
IP3R-I/II/III	Anti-Receptor de IP3 I/II/III IgG (H-300) Huésped: Conejo Policlonal	sc-28613 Santa Cruz Biotechnology	1:500	-
G $_q$	Anti-G $_q/11\alpha$, CT IgG Huésped: Conejo Policlonal	06-709, Lot # 2384658 Merk Millipore	1:1000, 1:500	1:200
M $_3$ -mAChR	Anti-Receptor muscarínico subtipo M $_3$ Chrm3 Huésped: Conejo Policlonal	#AMR-006 Alomone labs	1:200	1:100, 1:50

Dilución en TBS, 0.5% BSA para detección por *Western blot* y dilución en PBS, 0.5% BSA, 0.002% TX-100 para detección por inmunocitoquímica.

Tabla 2. Anticuerpos secundarios para la detección de proteínas clave en la cascada de señalización de PLC por *Western blot* en HEK293

Utilizado en la detección de la Proteína:	Anticuerpo	Referencia Fabricante
PLC β 1 IP3R-I (Novus)	Cabra anti-ratón IgG (H+L) Conjugado a fosfatasa alcalina (AP)	S3721 Promega
IP3R-I/II/III G _q M ₃ -mAChR IP3R-I (abcam)	Cabra anti-conejo IgG (H+L) Conjugado a fosfatasa alcalina (AP)	S3731 Promega

Anticuerpos utilizados en dilución 1:2000 en TBS, 0.5% BSA.

Tabla 3. Anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos para la detección y localización de proteínas de la vía de señalización de la fosfolipasa C en células HEK293

Utilizado en la detección de la proteína:	Anticuerpo	Referencia, Fabricante
PLC β 1	Cabra anti-ratón IgG1 Conjugado a Alexa Fluor [®] 546	Referencia: A-11003 Thermo- Scientific
G _q M ₃ -mAChR IP3R-I	Cabra anti-conejo IgG (H+L) Conjugado a Alexa Fluor [®] 546	Referencia A-11035 Invitrogen

Anticuerpos disueltos en PBS, 0.5% BSA, 0.002% TX-100 utilizados en dilución 1:200.

8.3 Registros electrofisiológicos

Los registros electrofisiológicos de células únicas se realizaron luego de permitir su adherencia por aproximadamente 3 a 7 días a la laminilla de vidrio. Este tiempo se eligió considerando que se hubieran disipado posibles efectos de la tripsina sobre los receptores de membrana, y antes de que se superara la confluencia óptima (10% a 20%) para el registro de células únicas con microelectrodos, evitando de esta manera artefactos causados por el establecimiento de acoplamiento eléctrico entre células.

Las laminillas eran colocadas en la cámara de registro ubicada sobre la platina de un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100 equipado con óptica de Nomarski o un microscopio NIKON Diaphot. La cámara de registro se mantuvo con perfusión constante haciendo uso de un sistema de reservorios y válvulas de distribución que permitía el intercambio de solución sobre las células (transcurridos 2 minutos, la solución en la cámara de perfusión era reemplazada por completo). Se utilizó la solución externa imitación del fluido extracelular de células mamíferas compuesta de 140 mM NaCl, 1.5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ (FLUKA), 2.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES (Sigma), 11 mM glucosa (Sigma Aldrich®), pH 7.4 (sales de AppliChem Panreac) y de 270 a 280 mOsmol/kg, a menos que se especifique que las células se expusieron a litio. La solución externa con litio (LiCl, de AppliChem Panreac), en concentración de 4, 14 ó 140 mM se preparó reemplazando de una manera iso-molar el Sodio y la temperatura de las soluciones sobre las células bajo registro fue temperatura ambiente y el flujo, idealmente laminar, se mantuvo entre 0.5 y 1 mL/min.

Usualmente, se seleccionaron células de diámetro aproximadamente entre 10 a 15 μm , con morfología típica y de apariencia voluminosa. Las células permanecían viables para registro en las laminillas hasta por cinco horas. No obstante, se prefirió utilizar cada laminilla de vidrio con células adheridas por un tiempo no mayor a dos horas antes de ser cambiadas por láminas con células mantenidas en condiciones óptimas de cultivo.

En las situaciones en que se adicionaban reactivos al baño (Véase la sección de Estimulación química), se prefería iniciar los registros en las células sobre la sección de la lámina más cercana al canal de salida de la cámara de perfusión, con el fin de evitar la contaminación de la lámina entera. En caso de utilizar reactivos que pudieran desensibilizar las células, se prefería hacer un cambio de lámina después de cada registro.

8.3.1 Patch clamp

La medición de la corriente total de membrana de células individuales se realizó utilizando la técnica de patch clamp en configuración de célula entera (Whole-cell Patch clamp) o en modalidad de parche perforado (Perforated-Patch clamp).

Para la fabricación de los microelectrodos se utilizaron capilares de borosilicato (World Precision Instruments). Éstos eran estirados en dos pasos mediante un 'puller' (Narishige, modelo pc- 10 o un puller KOF, modelo 720). Seguidamente, en algunos casos, para facilitar el posicionamiento del electrodo sobre la célula, se generaba un doblez (ángulo de $\approx 45^\circ$) por presión en un extremo del

electrodo expuesto a un filamento caliente (montaje fabricado en el laboratorio). Por último, la punta era pulida acercándola a una distancia de pocos micrómetros de un filamento de platino caliente bajo visualización microscópica (NIKON Labophot) y micromanipulación (Narishige). La punta resultante era roma, sin imperfecciones que pudieran dañar la membrana de la célula y de aproximadamente 2 μm de diámetro.

Los microelectrodos eran llenados con una solución que imita aspectos esenciales del contenido interno de las células mamíferas, compuesta de 110 mM K-glutamato, 15 mM KCl, 20 mM NaCl, 4 mM MgATP (Sigma), 0.5 mM CaCl₂, 1.5 mM Na₂EGTA (Sigma), 5 mM HEPES, 0.2 mM LiGTP, pH 7.2. Variantes a esta solución interna se describen más adelante en la sección Estimulación química.

Para el llenado de los electrodos, se utilizaba una jeringa estirada con calor para adelgazar su punta con el fin de poderla introducir al interior del electrodo (diámetro externo: 1.5 mm; diámetro interno 1.1 mm). Los electrodos con filamento interno se prefirieron sobre capilares estándar por la facilidad de eliminar burbujas que pudieran impedir la continuidad eléctrica.

La resistencia de los electrodos de registro, medida con las soluciones estándar oscilaba entre 8 y 10 M Ω . Esta resistencia eléctrica era monitoreada considerando la Ley de Ohm, aplicando un estímulo de voltaje de magnitud conocida (1 a 10 mV) impartido desde el software Collect o un estimulador externo (IonOptix Stim-6) y midiendo la corriente resultante una vez el electrodo entraba en el baño.

La resistencia en serie no se compensó electrónicamente debido al tamaño modesto de las corrientes registradas (ver Resultados); los errores de resistencia en serie eran pequeños, del orden de 1 mV.

Para la manipulación precisa de electrodos de registro y puffers para eyección de sustancias se utilizaron micromanipuladores manuales tipo Huxley (Custom Medical Research Equipment) y motorizados (Eppendorf PatchMan). Por otra parte, durante el descenso de las micropipetas en el baño, se impuso presión positiva leve (0.2 pulgadas de H₂O) con el fin de evitar la entrada de partículas que pudieran obstruir la punta del electrodo e impedirían la continuidad eléctrica.

La punta de la micropipeta se colocaba sobre la superficie de la célula blanco mediante micromanipulación. El descenso de la micropipeta era observado al microscopio en magnificación 10X y 40X con ayuda de un monitor externo (GBC) conectado a una cámara CCD (Genwac). La cámara estaba acoplada a un amplificador de contraste de video (Colorado Video Inc.) y se enfocaba en el plano focal conjugado del plano imagen del puerto lateral del microscopio.

A continuación, se utilizaba presión negativa (0.2 a 10 pulgadas de H₂O) en el interior del electrodo de registro para propiciar la formación de un sello de alta resistencia entre el electrodo y la membrana ('giga-sello', 1 a 10 G Ω). Esta resistencia eléctrica era monitoreada siguiendo el procedimiento antes descrito. Las corrientes capacitivas no fueron compensadas, ya que la mayoría de los procedimientos experimentales implicaban imposición de un voltaje de membrana estacionario.

Para lograr la configuración de célula entera, luego de la formación del giga-sello, se aplicaban pulsos breves de presión negativa fuerte (15 a 100 pulgadas de H₂O) también con un sistema de bombas y reguladores o con un sistema de tubo Pitot. Así se propiciaba la ruptura del parche de membrana bajo el electrodo y se lograba comunicación directa con el interior celular y como consecuencia de ello también ocurría un intercambio entre el citosol y la solución con la que era llenado el microelectrodo previamente.

Cuando se hizo uso de la técnica de parche perforado, se utilizó el compuesto anti-micótico lipofílico, nistatina (Calbiochem), como el agente formador de poros. Los poros transmembranales inducidos por este agente son permeables solamente a pequeños aniones inorgánicos y permiten la continuidad eléctrica con el microelectrodo sin la posibilidad de que la célula presente pérdida de componentes intracelulares esenciales y segundos mensajeros (tales como ATP, GTP, Ca²⁺). La nistatina se diluyó en DMSO y seguidamente en solución interna sin ATP y sin GTP para lograr una concentración final de 0.3 mg/mL de nistatina (\approx 0.05% de DMSO). Se mezcló con vortex y se sometió a sonicación (protegida de la luz y en recipiente de vidrio) previo a cada uso.

Esta variante de solución interna se introdujo por la parte posterior del electrodo de registro mientras que la punta era pre-llenada con solución interna sin nistatina (introduciendo brevemente el electrodo en la solución por 5 segundos, bajo observación en un estéreo-microscopio). De esta manera, se limitaba la fuga de nistatina desde la punta del electrodo durante el acercamiento a la célula –conservando de esta manera la integridad de la membrana de la célula-blanco y de otras en el área–. Por el mismo motivo, en este procedimiento, el microelectrodo se hizo descender sin aplicar presión positiva.

El crecimiento de la corriente capacitiva, observado entre 30 segundos y 5 minutos más tarde, indicaba la gradual permeabilización del parche de membrana y el acceso al interior de la célula.

Para la conversión entre corrientes iónicas propias del entorno celular y las corrientes electrónicas, propias de los componentes eléctricos del 'setup' se utilizó un electrodo reversible de Ag/AgCl sumergido en la solución en el interior del microelectrodo de registro. A su vez, el electrodo estaba en conexión a un conversor corriente-voltaje de alta sensibilidad y este a su vez a un amplificador (CAIRN Research Optopatch o fabricado en el laboratorio).

La señal del amplificador fue filtrada análogamente por medio de un filtro pasa-bajos, con el objetivo de reducir ruido y evitar frecuencias espurias en el registro, antes de ser digitalizada con un conversor análogo-digital (Data Translation 9847 ó 9834, ambos de 16 bits).

En el baño se dispuso un puente de agar que servía como electrodo de referencia. El potencial de unión (junction potential) se ajustó una vez el electrodo entraba en el baño y el potencial de mantenimiento (voltage potential) se ajustó a -50 mV (en algunos experimentos el potencial se estableció en otros valores, entre -30 mV y -60 mV).

El voltaje de la membrana de la célula bajo estudio podía ser controlado por el mismo amplificador y conversor, mientras se registraban las corrientes iónicas a través de ella. En el transcurso del

experimento los cambios eléctricos en la célula podían ser visualizados utilizando un osciloscopio digital Nicolet 310 o Hewlett Packard 54603B.

El software Collect fue utilizado para configurar los protocolos de estimulación y adquisición de los datos en los experimentos electrofisiológicos. El programa Analyze se utilizó para el procesamiento de los mismos, utilizando, entre otras, rutinas para representar trazos, extraer y graficar conjuntos de valores puntuales y filtrar digitalmente (filtro Gaussiano). Collect y Analyze son programas diseñados y escritos en el laboratorio por el Dr. Enrico Nasi.

8.3.2 Estimulación química

Para estimular químicamente las células, con el fin de activar la cascada de PLC a nivel de los receptores muscarínicos, se utilizó el compuesto carbacol (Alfa aesar), un agonista de la acetilcolina. Para su eyección –en concentraciones de 10 a 100 μM disuelto en medio extracelular– se utilizó una micropipeta tipo puffer (punta de ≈ 10 micras de diámetro) para lograr una aplicación rápida y local.

El puffer se fabricó de la misma manera que los electrodos de registro, utilizando para ello capilares de vidrio de borosilicato (KIMAX-51). El puffer se introdujo a la cámara de perfusión por un posicionador programable (Eppendorf, PatchMan) y la eyección controlada se realizó a una distancia aproximada de 10 μm de la célula bajo registro aplicando presión positiva controlada por un regulador y una válvula de operación manual o por una válvula electromecánica bajo el control de Collect.

Alternativamente, el carbacol se eyectó sobre el baño, directamente sobre la región de la laminilla con la célula bajo registro, haciendo uso de una micropipeta.

La aplicación del inhibidor de PLC, U-73122 (Enzo) en concentración de 50 μM y del análogo del diacilglicerol, DOG (Calbiochem), en concentración de 50 ó 100 μM disueltos en solución externa también se realizó con una micropipeta dirigida al área de registro.

Por otra parte, el análogo no hidrolizable de GTP, GTP- γ -S (ENZO, SIGMA ó Boehringer) en concentración de 100 μM , disuelto en solución interna sin GTP, se dializó en la célula a través del electrodo de registro. La misma técnica se utilizó para introducir en las células el compuesto DOG en concentración de 100 μM disuelto en solución interna normal.

Todos los fármacos se utilizaron a partir de stocks frescos; aquellos insolubles en agua (como el DOG y la nistatina), se disolvieron inicialmente en el solvente apolar DMSO (mezclando con vortex y exponiendo a sonicación) antes de diluirse en la solución externa (para aplicación por puffer) o en solución interna (para su uso en diálisis).

La eficacia de la perfusión de fármacos se evaluó en experimentos control con anilina en solución. En todos los experimentos que hicieran uso puffers se procuró que estos fueran de boca ancha y sin irregularidades (dado que mostraban ser los más aptos para lograr una eyección dirigida).

El movimiento de la solución circundante a la célula resultado de la eyección de los fármacos, se visualizó a través de la cámara acoplada al microscopio y el posicionamiento del puffer fue lo más cercano posible a la célula sin que el electrodo de registro sufriera movimientos.

8.4 Transfección de células HEK293 con mSlo1-eGFP

Con el fin de disponer de células HEK293 con la capacidad de generar respuestas eléctricas más robustas (véase los Resultados y Discusión) ante la estimulación con carbacol y así facilitar los experimentos electrofisiológicos, se dio inicio a estudios pilotos de transfección de células HEK293 con un canal de potasio activado por calcio (mSlo1e) reconocido por su alta conductancia.

El vector de expresión (pBScMXT, en un core pBluescript II SK) contenía la secuencia codificante de mSlo1e acoplada a la proteína verde fluorescente (eGFP), el gen de resistencia a ampicilina, sitios de secuenciación T3 y T7 y sitios de clonaje 5' Clal y 3' NotI, y fue proporcionado por el Laboratorio Lingle (Dr. Christopher Lingle; Washington University, St. Louis, MO, EE.UU).

Los plásmidos fueron amplificados, extraídos y transfectados en células HEK293. Para ello, las bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa JM109 (Promega) fueron transformadas con el plásmido por medio de un choque térmico (20 minutos en hielo, 45 segundos a 42°C y 2 minutos en hielo nuevamente), fueron cultivadas a 37°C por 2 horas en medio SOC (Sigma Aldrich®) con agitación a 450 rpm y seleccionadas cultivándolas en medio LB con ampicilina por 13 a 18 horas a 37°C a 300 rpm hasta alcanzar la densidad óptica de 2.8 a 2.9 A (a 600 nm)–.

Para la purificación de los plásmidos se utilizó el kit Qiagen Midi Kit y se siguieron las recomendaciones del fabricante. El ADN purificado fue eluído en 100 µL de buffer TE (Tris, EDTA, pH 8; Millipore Sigma) y almacenado a -20°C.

Adicionalmente, el plásmido fue secuenciado de manera bi-direccional con el método de Sanger (extensión/terminación con dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos para aproximadamente 800 bases a cada lado del sitio de multiclonaje) por la compañía GeneWiz Inc. Los primers de secuenciación utilizados estaban dirigidos contra las regiones que se encuentran flanqueando el sitio de inserción de productos externos en el plásmido. Las secuencias fueron analizadas usando el Software Bioedit v7.1.3.0.

Para la transfección de células HEK293, 1 µg de plásmido fue diluido en 200 µL de OptiMEM bajo en suero (Life Technologies) y posteriormente este se añadió a 200 µL de OptiMEM en donde se había diluido 1.6 µL de Lipofectamina LTX (Invitrogen Life Technologies). La mezcla se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, 100 µL de los complejos de DNA-Lipofectamina se añadieron a un plato de cultivo de 35 mm con células a una confluencia del 60% al 80% que habían sido dispuestas con 300 µL OptiMEM bajo en suero o alternativamente en DMEM estándar y habían sido tripsinizadas con 1 día de anterioridad. Se agitó suavemente y tras 4 horas de incubación a 37°C se realizó cambio del medio por DMEM normal en ambos casos.

La expresión del canal en las células fue verificada mediante microscopía de fluorescencia in vivo (ya que en células fijadas se detectó autofluorescencia debida al uso de paraformaldehído) 24 horas más tarde, haciendo uso de epi-excitación con un LED con longitud de onda de 480 nm (THORlabs).

8.5 Estudios electrofisiológicos piloto en células de neuroblastoma

Células de neuroblastoma humano (provenientes de una línea celular) fueron obsequio del laboratorio del Dr. Gonzalo Arboleda del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia. Se cultivaron en medio de cultivo nutritivo DMEM/F-12 – L-glutamina, suplementado con piruvato de sodio, cloruro de piridoxina, bicarbonato de sodio y 10% penicilina-estreptomina, las condiciones de incubación y siembra sobre laminillas de vidrio fueron las mismas que para las células HEK293 y se realizaron registros electrofisiológicos cuando se alcanzaba una confluencia de aproximadamente 70%. Para efectuar registros de patch clamp en la modalidad de célula entera y estimulación química se siguieron los mismos procedimientos y parámetros previamente utilizados con células HEK293.

Estos estudios preliminares se realizaron con el fin de comparar cualitativamente la respuesta electrofisiológica observada en células HEK293 y disponer de un modelo alternativo de células en cultivo para la futura evaluación de los efectos del litio sobre la cascada de señalización de fosfoinositoles en un sistema más cercano a las neuronas.

9 RESULTADOS

9.1 Evaluación de células HEK293 como modelo de estudio de los mecanismos fisiológicos celulares y moleculares de los efectos del Li⁺ sobre la vía de señalización de fosfoinositoles

Para evaluar las corrientes iónicas reguladas por la cascada de fosfoinositoles, y su posible modulación por litio en células humanas, se eligió la línea celular HEK293. Ésta, sin embargo, debía establecerse como un sistema modelo de receptores de membrana acoplados a proteínas G, que a su vez estuvieran articuladas a la PLC y culminaran con regulación de conductancias iónicas de membrana.

9.1.1 Detección de proteínas clave de la vía de señalización de fosfoinositoles en células HEK293 mediante *western blot* e inmunofluorescencia

En primer lugar, se corroboró la presencia de los principales elementos que median el acoplamiento de señales externas a la vía de fosfoinositoles. Los receptores muscarínicos, la proteína G heterotrimérica del subtipo G_q, la enzima PLC β y los receptores de IP₃ (IP₃R), todos asociados a esta vía fueron los blancos de detección.

9.1.1.1 Detección del receptor metabotrópico M₃-mAChR

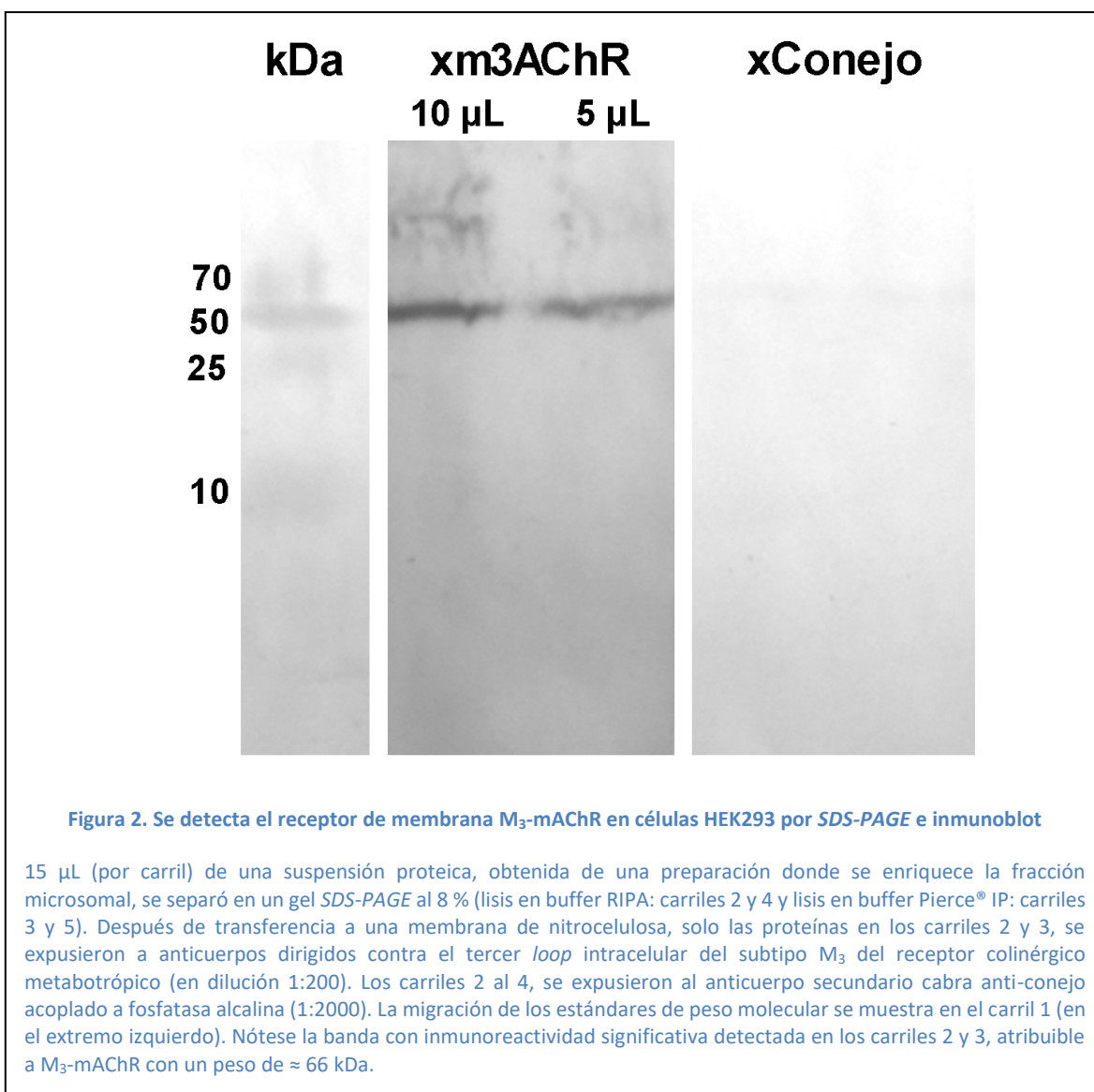
Debido a la necesidad de estimular de una manera controlada la cascada de PLC en los estudios fisiológicos previstos, era preciso corroborar la presencia de receptores de 7 dominios transmembranales que se acoplan a G_q, y dentro del abanico de candidatos, se encuentran receptores colinérgicos metabotrópicos. En células HEK293 se ha establecido que el subtipo M₃ cumple con ese requisito (Luo et al., 2006; Mundell & Benovic, 2000) y se ha verificado que los subtipos M₁ y M₅ lo hace en otros sistemas (Ishii & Kurachi, 2006).

Sin embargo, la inmunodetección se centró en los receptores muscarínicos del subtipo M₃ (M₃-mAChR), porque además de los estudios farmacológicos que indican su expresión endógena en las células HEK293 (Luo et al., 2006) y detectan la presencia de mRNA por microarreglos (Atwood et al., 2011; Hakak et al., 2003), M₃-mAChR también resulta ser el subtipo donde el compuesto Carbacol (a utilizarse para activar y así controlar la cascada) tiene el efecto más potente (Langmead et al., 2008).

Para su detección por western blot el lisado celular fue obtenido con el buffer Pierce[®] IP, o alternativamente, con el buffer RIPA. Para la electroforesis se utilizó un gel de separación al 8% y en el inmunoblot se utilizó un anticuerpo primario altamente específico contra un epítipo intracelular del subtipo M₃ en rata en dilución 1:200 (xM₃-AChR). La secuencia TLAKRFALKTRSQITKRKR, correspondiente a los residuos 461 a 479, ubicados en el loop 3 presenta homología a las proteínas humanas y el fabricante declara que el péptido inmunogénico debería reconocer el receptor M₃-

mAChR humano. El anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina se utilizó en dilución 1:2000.

Se observó el marcaje de una banda del tamaño esperado a una altura aproximada de 66 kDa. Por su parte, las proteínas que migraron en los carriles 4 y 5 (de izquierda a derecha en la Figura 2), que no se expusieron al anticuerpo primario, no muestran un marcaje significativo.



Los resultados de la detección por western blot fueron complementados por ensayos de inmunocitoquímica. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario en dilución 1:50 ó 1:100 y con el anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor® 546 (1:200).

Todas las imágenes se tomaron con una magnificación de 63X y las imágenes monocromáticas de fluorescencia se adquirieron con la misma exposición (550 ms).

En la Figura 3, se muestran micrografías representativas de los resultados obtenidos. Los paneles superiores corresponden a células incubadas con anticuerpo primario en dilución 1:50, las del medio corresponden a células expuestas al anticuerpo primario en dilución 1:100 y los paneles inferiores corresponden al control, células incubadas con el anticuerpo secundario exclusivamente utilizado en dilución 1:200 (tal como se hizo en las láminas experimentales).

Las imágenes de fluorescencia (Figura 3B y 3D) –además de la detección por western blot– ratifican la presencia del receptor M3-mAChR en células HEK293.

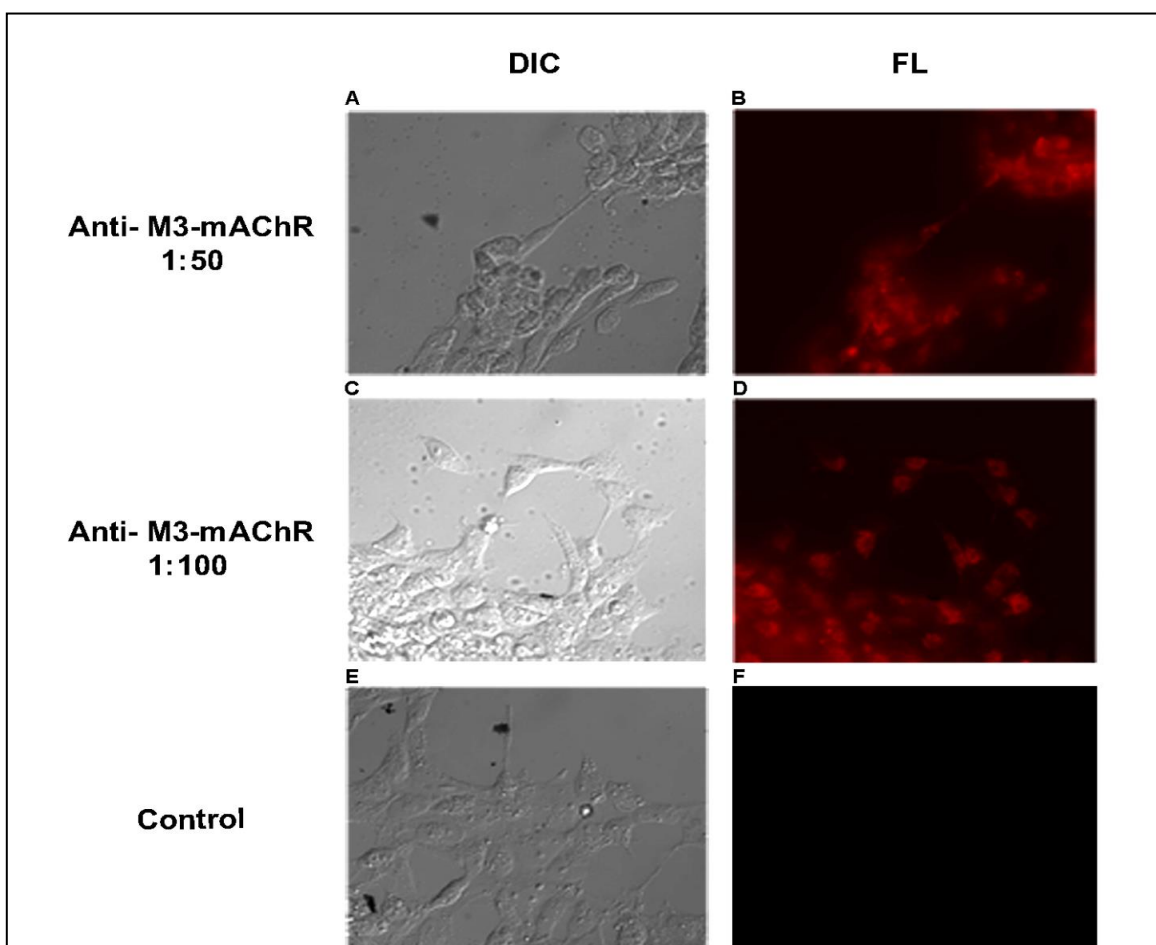


Figura 3. Inmunodetección de receptores muscarínicos de acetilcolina del subtipo M₃ en células HEK293.

A) Imagen en campo claro de células expuestas a un anticuerpo dirigido contra M3-mAChR en dilución 1:50. B) Imagen de fluorescencia del mismo campo documentado en A, presentada con pseudo-coloración. C) Imagen DIC de células expuestas al anticuerpo primario en concentración 1:100. D) Imagen de fluorescencia del mismo campo documentado en C con pseudo-coloración. E) Células expuestas únicamente al anticuerpo secundario cabra anti-conejo (1:200) documentadas con DIC. E) Imagen del mismo campo en C, tomada con microscopía de fluorescencia y pseudo-coloreada. 63X; 550 ms (B, D, F).

9.1.1.2 *Detección de la proteína G heterotrimérica acoplada a la PLC: G_q*

Se tiene amplio conocimiento de que el subtipo q de la sub-unidad α de las proteínas G se acopla selectivamente a la enzima fosfolipasa C (Neves et al., 2002), y por lo tanto constituye el eslabón de enlace crítico entre receptores de membrana e hidrólisis de lípidos de inositol. Se quiso por lo tanto corroborar la presencia de proteínas G_q en las células HEK293 utilizadas en el presente estudio.

Las células HEK293 se expusieron al buffer de lisis Pierce® IP con el objetivo de aislar estas proteínas, las cuales se encuentran ancladas en la cara interna de la membrana plasmática. El lisado se separó por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, según se describió en la sección de materiales y métodos. La membrana fue incubada con un anticuerpo policlonal comercialmente disponible (Millipore), el cual fue generado en conejo y reconoce los aminoácidos 350 a 359 (QLNLKEYNLV) de G_q (α G_q), una secuencia altamente conservada entre especies (con reactividad a proteínas humanas comprobada por el fabricante). Se ensayaron diluciones del anticuerpo entre 1:500 y 1:1000.

El marcaje se detectó utilizando un anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina (dilución 1:2000) y fue visualizado con el sustrato Western Blue®. La Figura 4 muestra los resultados del ensayo con dos cargas diferentes de lisado de proteína, e indica el reconocimiento de una banda del peso esperado (42 kDa).

En el carril número 4 (de izquierda a derecha), la ausencia de marcaje al exponer la muestra exclusivamente al anticuerpo secundario, corroboró la ausencia de reactividad directa por los anticuerpos secundarios.

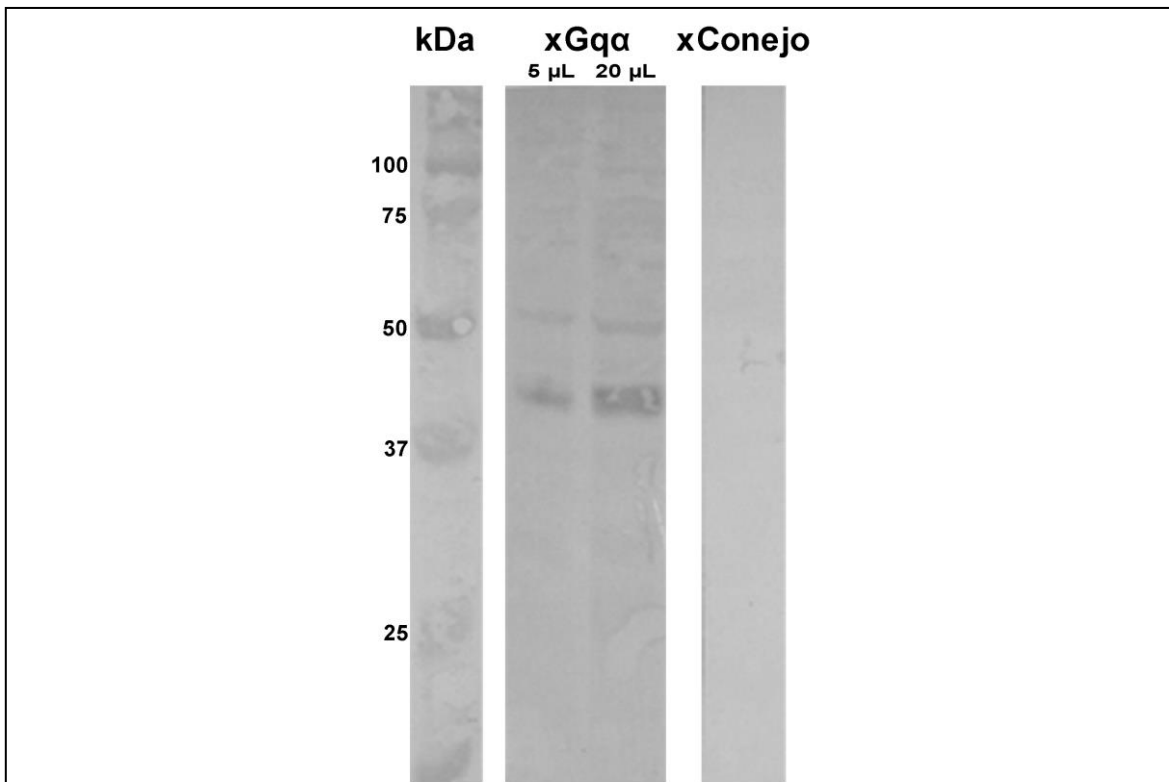
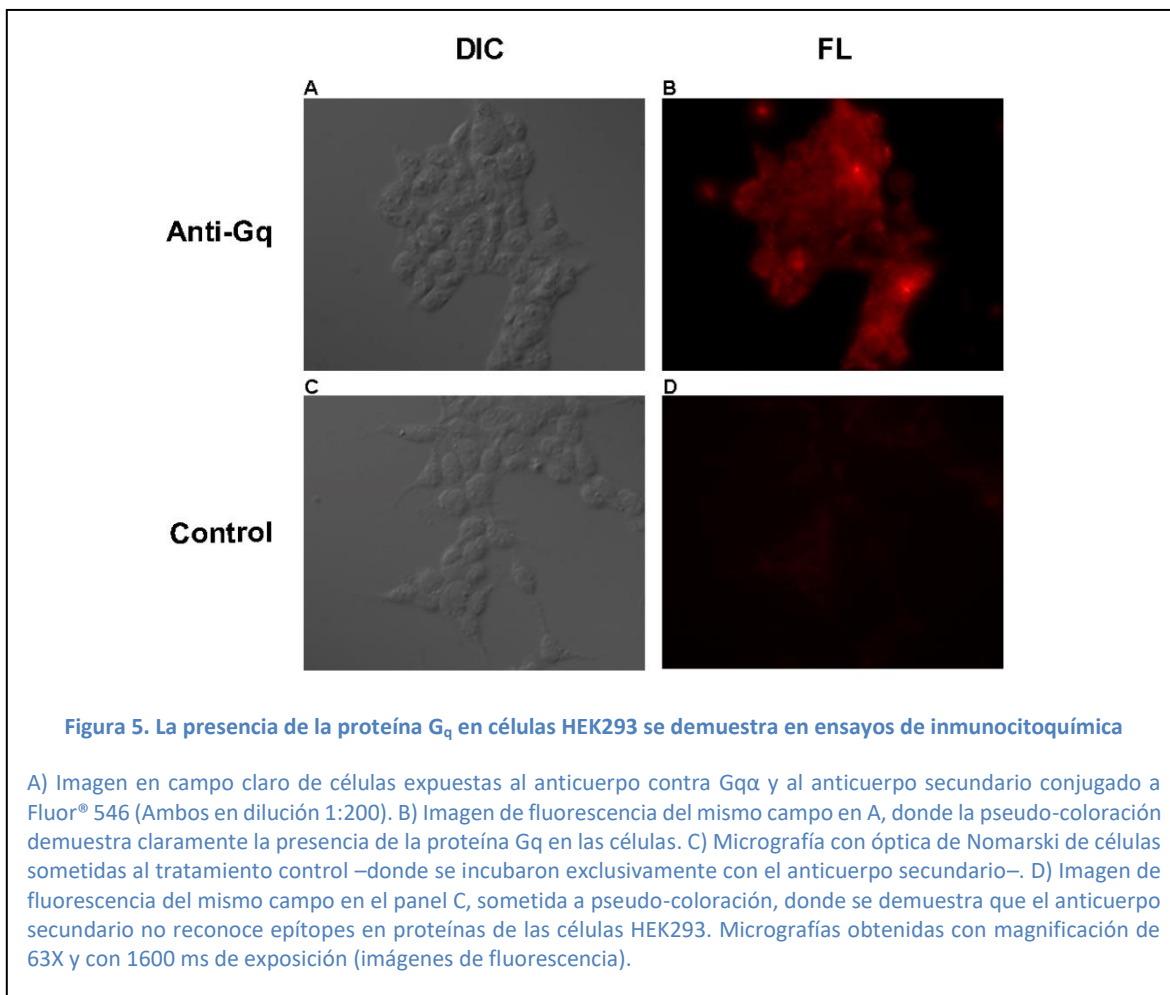


Figura 4. Inmunodetección de la proteína G_q en células HEK293 por *Western blot*.

De izquierda a derecha, se sembraron 10 μ L de marcadores de peso molecular, 5 μ L de muestra en el carril 2 y 20 μ L de muestra en los carriles 3 y 4. Las proteínas se separaron por electroforesis (gel de separación al 12%) y luego se transfirieron a membrana de nitrocelulosa donde se expusieron a un anticuerpo contra Gq α (dilución 1:500) y a un anticuerpo secundario (anti-conejo) conjugado a fosfatasa alcalina (dilución 1:2000). La banda reconocida puede atribuirse a Gq α (42 kDa). El carril 4 corresponde al control, en donde las proteínas se incubaron exclusivamente con el anticuerpo secundario permitiendo demostrar que no se presenta reactividad cruzada.

Nuevamente, la detección de la proteína Gq en células HEK293 se evaluó por inmunocitoquímica. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario contra Gq α antes descrito y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa Fluor® 546, ambos en concentración 1:200. Como control, grupos de células se expusieron exclusivamente al anticuerpo secundario.

Cada campo evaluado se documentó con un par de micrografías tomadas con una magnificación de 63X. Las imágenes en campo claro se obtuvieron con óptica de Nomarski y las imágenes de fluorescencia se adquirieron con tiempos de exposición idénticos (1600 ms). En la Figura 5 se exponen micrografías representativas de células experimentales (Figuras 5A y 5B) y células control (Figuras 5C y 5D). La señal de fluorescencia demuestra la presencia de Gq en las células HEK293 (Figura 5B).



9.1.1.3 Detección de la enzima efectora: PLC β 1

Se buscó detectar la presencia de la proteína PLC β , la enzima efectora regulada por proteínas G_q (Neves et al., 2002). En particular, los ensayos se focalizaron en el subtipo 1 (PLC β 1), dado que esta podría ser la isozima involucrada en la activación de la cascada mediante el compuesto carbacol (véase más adelante), con base a los resultados de Wu et al., 1993, donde el knock out de PLC β 1, pero no de PLC β 4 atenuó la activación por carbacol de la vía de la PLC.

Las células se lisaron con buffer Pierce® IP y las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida, tras lo cual se transfirieron a membrana de nitrocelulosa para tratamiento con los anticuerpos.

El anticuerpo primario dirigido a los residuos 410 a 509, SFENVHVDSPKQQAKMAEYCRLIFGDALLMEPL EKYPLESGVPLPSPMDLMYKILVKNKKKSHKSSSEGSKGLKSEQASNTYSDDSSVFEPPSPGAGEADT de la enzima de rata, fue empleado dada la predicción de funcionar en proteínas humanas. La concentración utilizada fue de 1:1000. Las proteínas se visualizaron utilizando un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (dilución 1:2000) y la detección del precipitado insoluble formado por Western Blue® sobre la enzima.

La Figura 6 muestra el resultado: en los dos carriles incubados con el anticuerpo primario (xPLC β 1, con distintas cantidades de carga), se obtuvo una banda definida de peso molecular en exceso de 100 kDa –que resulta ser compatible con el peso esperado de 138 kDa–. En la Figura 6B, se demuestra la ausencia de reactividad cruzada de antígenos especie-dependiente, al no observarse marcaje alguno cuando grupos de células fueron expuestas al anticuerpo secundario exclusivamente.

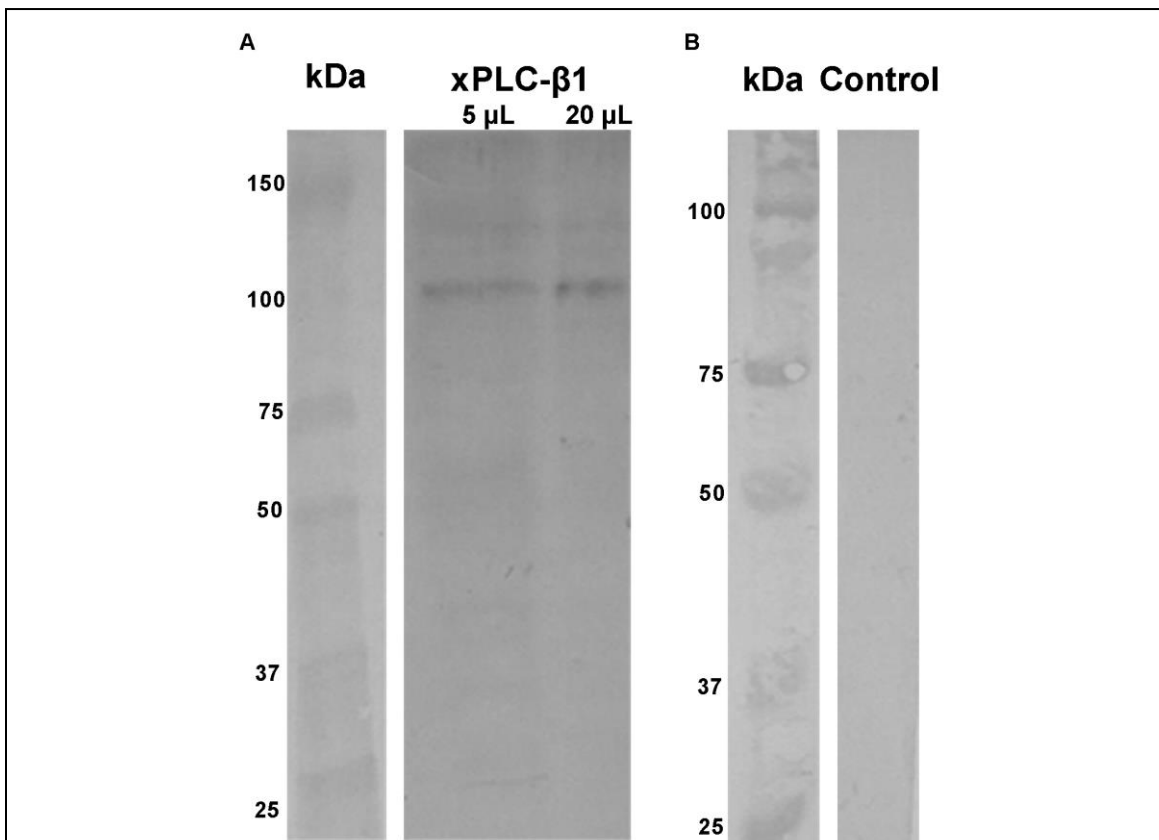


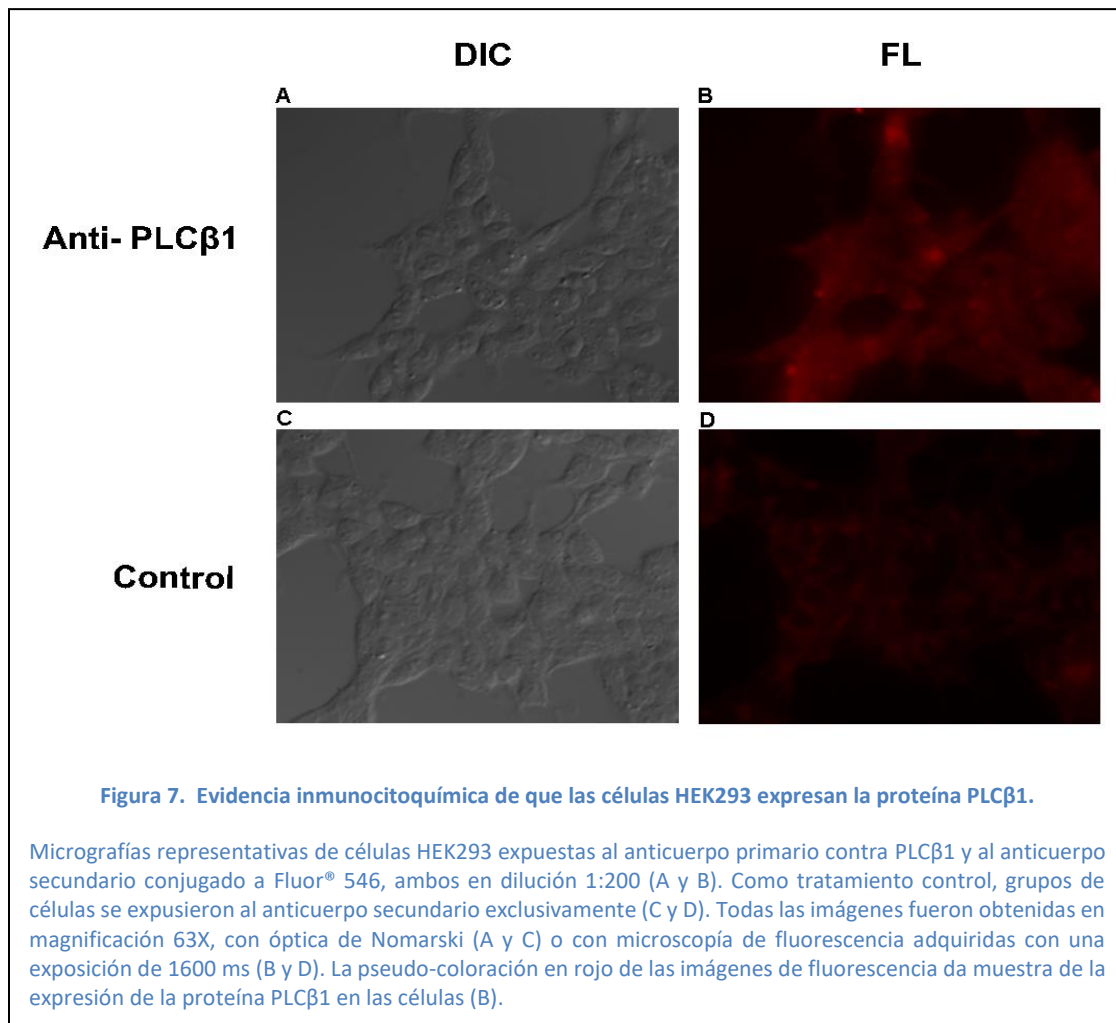
Figura 6. Se demuestra la presencia de la proteína PLC β 1 en células HEK293.

A) Detección de una banda en exceso de 100 kDa que se atribuye a PLC β 1. Para ello se hizo uso de anticuerpo primario en dilución 1:1000 sobre proteínas obtenidas de la lisis de las células con buffer Pierce® IP y separadas electroforéticamente en un gel al 7%. En el primer carril, de izquierda a derecha, se muestra la migración del patrón de peso molecular, en el segundo carril se sembraron 20 μ L de muestra y en el tercero 5 μ L (la banda se observa en ambas cargas de proteína). B) Inmunoblot donde se demuestra la ausencia de reactividad de la muestra al ser expuesta exclusivamente al anticuerpo secundario anti-ratón en dilución 1:2000 –la misma dilución utilizada sobre la membrana en el panel A– (SDS-PAGE 12%; 20 μ L muestra).

Al igual que con los dos casos anteriores, la presencia de la enzima PLC del subtipo β 1 en las células HEK293 se corroboró con el ensayo de inmunocitoquímica. El anticuerpo primario (el mismo utilizado en la detección por western blot) y el anticuerpo secundario (anti-ratón; conjugado a Alexa

Fluor® 546) se utilizaron, ambos, en dilución 1:200 (Figura 7, pánels A y B), o se utilizó exclusivamente el anticuerpo secundario como control (Figura 7, pánels C y D).

La pseudo-coloración aplicada a las imágenes de fluorescencia (63X y adquiridas con exposición de 1600 ms, tanto en las células experimentales como en las células control) demuestra la expresión de PLCβ1 en las células HEK293 (Figura 7B).



9.1.1.4 Detección del receptor de IP₃: IP3R-I

Finalmente, en base a las observaciones que indican movilización de Calcio intracelular en poblaciones de células HEK expuestas a agonistas muscarínicos (Luo et al., 2008), se quiso determinar la presencia de receptores de IP₃ (IP3R). Para este fin, un extracto de proteínas obtenido de una lisis en frío con buffer RIPA y denaturado a 100°C por 10 minutos, fue sometido a un protocolo de liberación de ADN contaminante por sonicación, y luego separado por electroforesis

en un gel SDS-poliacrilamida al 6 % con el fin de detectar unidades del tetrámero de IP3R, cada unidad con un peso aproximado de 314 kDa.

Se utilizó sobre el inmunoblot un anticuerpo diseñado para reconocer los receptores de los subtipos I, II y III, dirigido al dominio de unión altamente conservado en el extremo C-terminal de la proteína de origen humano (residuos 2402 a 2701; Santa Cruz Biotechnology). Alternativamente, también se utilizaron anticuerpos dirigidos al receptor de IP3 del subtipo I específicamente, al estar establecido que es el subtipo predominante y más ampliamente distribuido (Ross et al., 1992) y del que se reconoce ampliamente que está altamente enriquecido en el tejido neuronal y el sistema nervioso central. Estos anticuerpos estaban dirigidos a los residuos 2470 a 2578: (EHTCETLLMCIVTVLSHGLRGGGVGDVLRKPSKEEPLFAARVIYDLLFFFMVIIIIVLNLIFGVIIIDTFADLRSEKQKKE EILKTTFCICGLERDKFDNKTVTFEHI; Novus), o a los residuos 1829 a 1848 con la secuencia NKKKDEVD RDAPSRRKAKE (anticuerpo sintético, abcam).

Con el primer anticuerpo no se obtuvo señal alguna, mientras que una señal inmunoreactiva débil se hizo presente con el anticuerpo Novus (resultado no se muestra). Hay que recalcar que solubilizar IP3R para detección por western blot es notoriamente arduo, y según otros autores requiere implementar condiciones de lisis y de separación mediante ultracentrifugación que permitan por una parte liberar la proteína de agregados insolubles que posiblemente son resultado de contaminación por ADN y, por otra parte, que permitan enriquecer aún más la fracción microsomal del retículo endoplasmático.

Se procedió de todos modos con ensayos de inmunocitoquímica, ya que a veces un epítipo discontinuo puede hacer que un anticuerpo funcione con la proteína nativa pero no lo haga una vez ésta ha sido denaturada y linearizada por el SDS, como ocurre en un western blot. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario sintético y específico contra IP3R-I (abcam) en dilución 1:100, y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa Fluor® 546 en dilución 1:200. Como control, grupos de células co-cultivadas se expusieron exclusivamente al anticuerpo secundario.

Cada campo evaluado se documentó con un par de micrografías tomadas a una magnificación de 100X con óptica de Nomarski o con microscopía de fluorescencia con una exposición de 50 ms. En la Figura 8, se exponen micrografías representativas de células experimentales (Figuras 8A y 8B) y células control (Figuras 8C y 8D). La pseudo-coloración aplicada a las imágenes de fluorescencia de ambos grupos de células demuestra la presencia de IP3R-I (Figura 8B) y la ausencia de reactividad cruzada con el anticuerpo secundario.

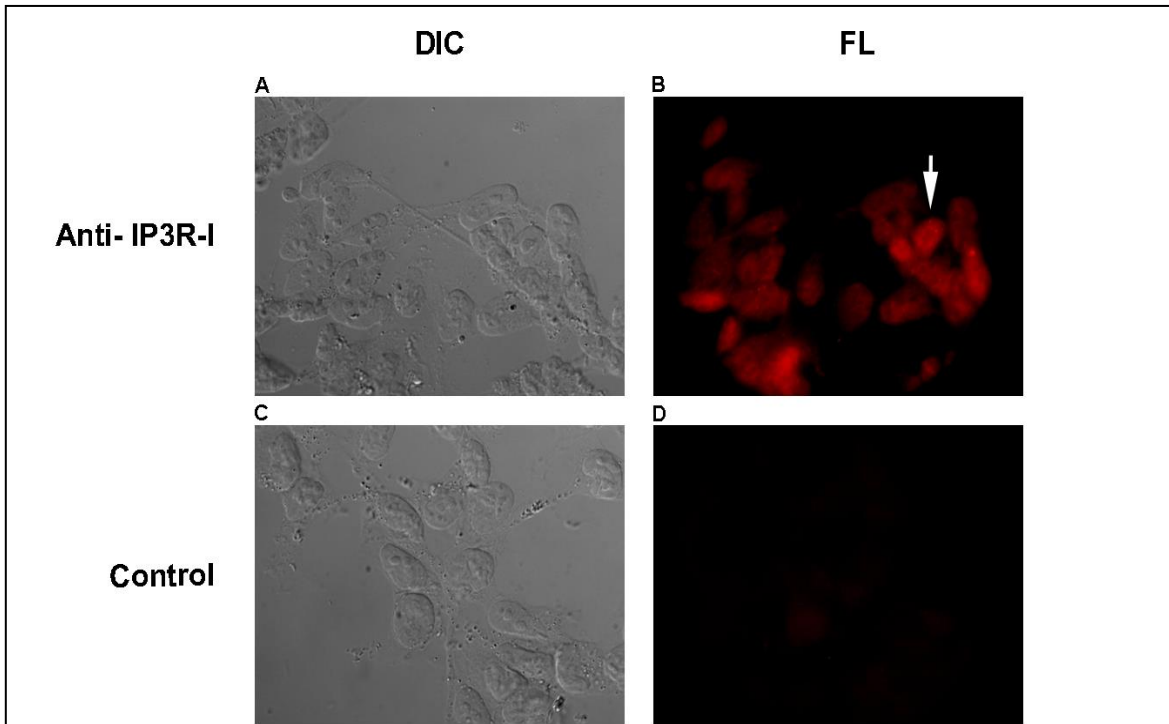


Figura 8. La proteína IP3R-I se expresa en células HEK293.

Micrografías tomadas con una magnificación de 100X. A y B) Células expuestas a un anticuerpo específico contra IP3R-I en dilución 1:100 y al anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa Fluor® 546 en dilución 1:200. C y D) Células co-cultivadas y expuestas únicamente al anticuerpo secundario. Las imágenes tomadas con microscopía de fluorescencia (B y D, que corresponden a los campos en A y C, respectivamente) se tomaron con exposición de 50 ms y fueron pseudo- coloreadas. La señal en rojo demuestra la presencia de IP3R-I. Una célula donde claramente se puede observar un enriquecimiento de IP3R en el área que delimita el núcleo, donde el retículo endoplasmático está enriquecido se señala por una flecha.

9.1.2 Registros electrofisiológicos en células HEK293

Para los propósitos de este estudio se necesita que la línea celular bajo evaluación tenga un proceso fisiológico medible, robusto, y que pueda ser desencadenada por una estimulación controlada de la cascada de fosfoinosítoles. Conductancias iónicas acopladas a la activación de receptores M3-AChR pueden cumplir este requisito.

La viabilidad de este acercamiento fue evaluada monitoreando corrientes de membrana con gran sensibilidad y resolución temporal, haciendo uso de la técnica de patch clamp en configuraciones que permitieran el registro de la actividad eléctrica total de la célula: modalidad de célula entera o modalidad de parche perforado. En la Figura 9, se puede observar una imagen de una célula HEK293 bajo registro electrofisiológico.

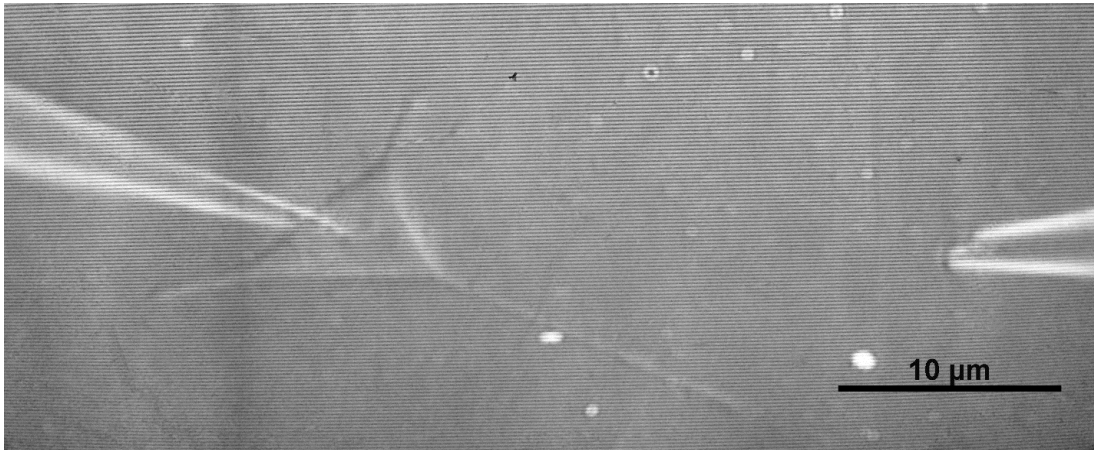


Figura 9. Célula HEK293 bajo registro de *patch clamp* (40X).

La célula que se encuentra adherida a una laminilla de vidrio y bajo perfusión con una solución que imita la composición del medio extracelular, está en contacto directo con un microelectrodo de registro. El microelectrodo de registro ha sido llenado con una solución con componentes esenciales de la solución interna de células mamíferas, y dado que su volumen supera al de la célula, se presenta un recambio de contenido. En el extremo derecho de la imagen se puede observar un puffer de estimulación, cuya función es eyectar un agonista químico.

9.1.2.1 Activación de corrientes de membrana por un análogo no hidrolizable de GTP: GTP- γ -S

Para asegurar que las células bajo estudio tengan la capacidad de generar corrientes de membrana mediadas por proteínas G, primero se llevaron a cabo mediciones electrofisiológicas, en donde se estimularon directamente proteínas G heterotriméricas con el activador GTP- γ -S.

El GTP- γ -S es un análogo del GTP que puede intercambiarse con el GDP acoplado a la subunidad α de toda proteína G heterotrimérica en el estado inactivo, induciendo su activación. Además, es poco susceptible a la acción de GTP-asas endógenas, por lo cual la estimulación resultante es persistente –el funcionamiento de la proteína G como interruptor biológico permanece en el estado activado, transduciendo la señal a la proteína efectora (Dowling et al., 2004)–.

Se utilizó una concentración de 100 μ M en solución intracelular modificada (reemplazando el GTP en la solución interna convencional por el GTP- γ -S). Esta se dializó al interior de la célula a través de la micropipeta de registro una vez se generaba la ruptura del parche de membrana y, por ende, todos los registros en esta evaluación se realizaron con la técnica de whole-cell patch clamp.

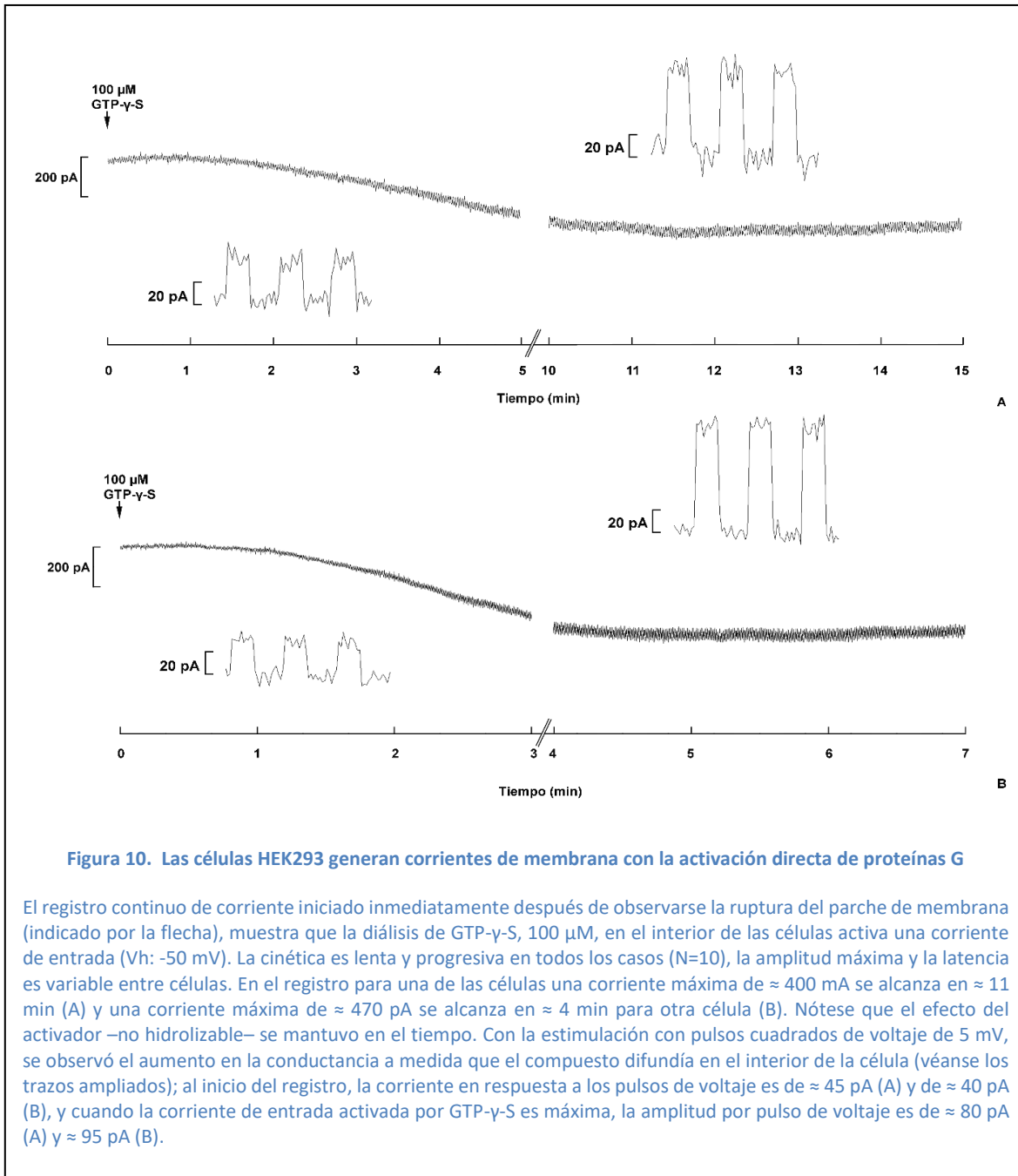
Dado que se esperaba una acción con latencia relativamente corta del GTP- γ -S tras difundir en la célula, se inició un registro continuo de corriente inmediatamente después de realizada la ruptura del parche de membrana. Incluso, en algunas oportunidades, se inició el registro desde el momento en que se aplicaba la presión negativa fuerte para lograr la ruptura del parche.

La activación de corrientes de entrada, con una cinética lenta y progresiva después de la ruptura del parche membrana –y la diálisis del activador–, fue evidente en 10 registros realizados bajo estos

parámetros de activación. En la Figura 10, se muestran trazos representativos que son consistentes en presentar la cinética antes descrita.

Por otra parte, se quiso evaluar los cambios de conductancia que acompañaban los efectos del GTP- γ -S en el transcurso del registro. Para este fin, el protocolo contemplaba la administración repetitiva de perturbaciones rectangulares en el voltaje de membrana (5 mV) mientras se realizaba el registro continuo de corriente. Éstos daban origen a correspondientes cambios en la corriente.

A medida que el compuesto difundía al interior de la célula, se observó un aumento gradual en la amplitud de los cambios cíclicos de corriente. Esto se puede apreciar en la Figura 10 comparando los trazos ampliados que se muestran por debajo (al inicio) y por encima (al final) del registro de la respuesta eléctrica obtenida en presencia de GTP- γ -S al interior celular; de acuerdo a la Ley de Ohm, donde el voltaje es el producto de la corriente por la resistencia ($V=I \times R$); a medida que la corriente inducida por carbacol incrementa, la resistencia de membrana (R_m) decrece –la conductancia aumenta–. Lo anterior es un indicio de que nuevos canales iónicos se abren como respuesta a la activación de vías de señalización activadas por GTP- γ -S.



Los registros de células expuestas a una solución interna estándar constituyen el control a este experimento (resultado no se muestra), y como era de esperarse, durante el intervalo de registro no se presentaron cambios significativos, ni en el valor promedio, ni en la amplitud de los saltos repetitivos de la corriente de membrana.

9.1.2.2 *Activación de los receptores colinérgicos metabotrópicos con un análogo de la acetilcolina: carbacol*

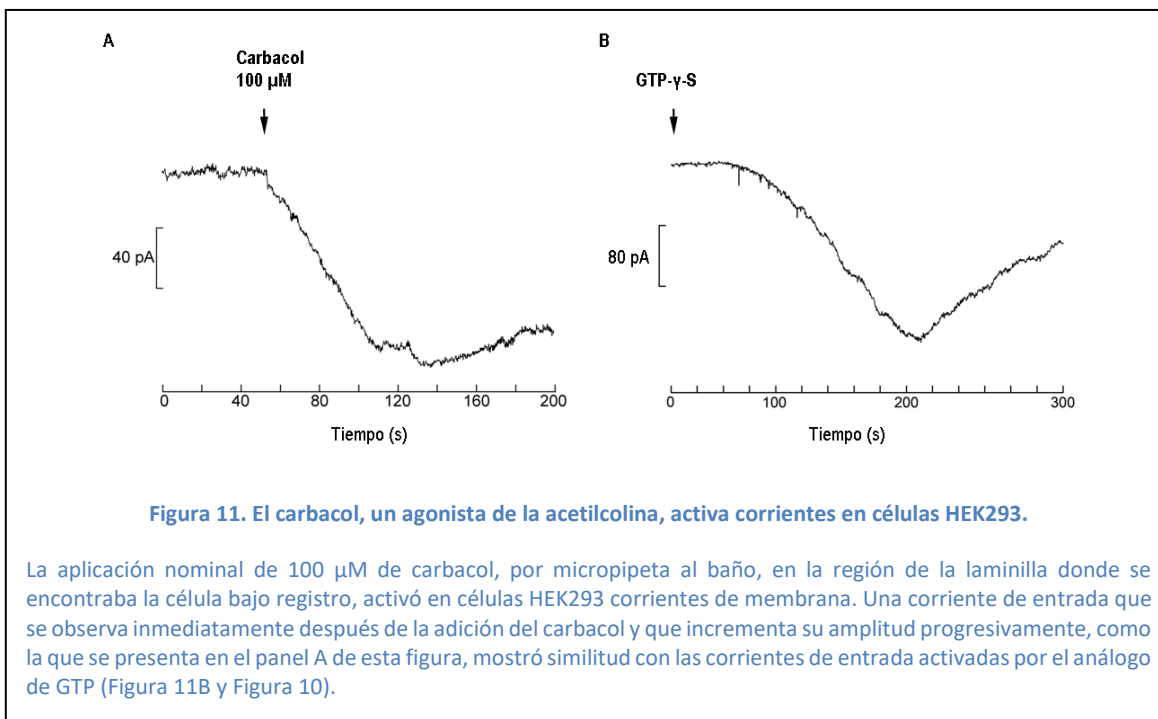
Habiéndose observado la activación de corrientes por proteínas G, debía demostrarse que era posible producir respuestas eléctricas con la estimulación de receptores de membrana M3-mAChR, lo cual permite la aplicación repetitiva y controlada del estímulo (lo cual no es posible con diálisis intracelular) y el reclutamiento selectivo de las proteínas Gq (ya que el GTP- γ -S puede actuar indiscriminadamente sobre todas las proteínas G heterotriméricas).

Se eligió hacer uso del éster de colina sintético carbacol para estimular la activación de la cascada de señalización. El carbacol es un agonista de la acetilcolina con susceptibilidad reducida a la acetilcolinesterasa, por lo cual, su efecto sobre los receptores depende únicamente de su difusión hasta la célula bajo registro y su afinidad por el receptor. Además de su estabilidad, es de destacar su efecto preferencial sobre receptores muscarínicos (dado que la acetilcolina también puede activar receptores nicotínicos, que son ionotrópicos y no reclutan proteínas G), y su actividad biológica intrínseca superior, comparada con otros esteres de colina (Wood et al., 1999; Spalding et al., 2002), lo que hacen de este compuesto una herramienta experimental adecuada.

Para comprobar su efectividad, se eligió evaluar cambios en las corrientes de membrana producidos por el compuesto. Se realizaron registros continuos de la actividad eléctrica basal de la célula por aproximadamente 10 segundos, después de los cuales se aplicó carbacol a la cámara de perfusión, y se continuó el registro hasta completar \approx 3 minutos. La concentración evaluada fue 100 μ M –la cual había demostrado ser saturante en experimentos llevados a cabo en paralelo para medir por fluorescencia la liberación de calcio desde depósitos intracelulares (Landinez, 2016; Landinez et al., 2015).

La Figura 11A muestra un ejemplo representativo de una corriente de entrada producida por carbacol. El panel B de la misma figura ilustra la comparación con las corrientes obtenidas con GTP- γ -S; como se espera, la cinética de la respuesta al carbacol es más rápida, ya que no implica la lenta difusión por el diminuto orificio de la micropipeta de patch.

La aplicación de solución externa normal por micropipeta o por puffer, constituyeron los controles para este tipo de experimentos, permitiendo así descartar el posible rol de factores espurios, tales como la perturbación mecánica resultante del flujo hidrodinámico y la turbulencia ocasionadas por el fluido eyectado. La actividad eléctrica de las células en estas circunstancias no sufrió un cambio aparente, demostrando que la respuesta observada por la aplicación de carbacol es genuina.



En todos los experimentos electrofisiológicos se dejaron transcurrir al menos 10 minutos entre estímulos de carbacol aplicados a una misma célula. Este tiempo prudencial obedece a las siguientes consideraciones: en primer lugar, teniendo en cuenta la rata de perfusión (0.5 - 1 mL/min) y el volumen de la cámara (≈ 0.5 mL), en 10 minutos fluye una cantidad de solución 10 a 20 veces mayor, con lo cual se permite un recambio total, eliminado así residuos de carbacol; en segundo lugar, este intervalo permite la recuperación de posibles procesos de desensibilización de los receptores de membrana. En síntesis, transcurrido este tiempo, tanto el sistema experimental como los componentes de la cascada vuelven a estar en las condiciones iniciales, disponibles para generar una respuesta como la original.

9.1.2.3 Múltiples componentes de la respuesta colinérgica en células HEK 293: dependencia de la concentración del agonista

El planteamiento de evaluar una posible modulación por parte del litio sobre corrientes eléctricas producidas por estimulación colinérgica requiere determinar dosis adecuadas del agonista colinérgico, que permitan revelar tales efectos. En particular, dosis excesivamente altas podrían impedir la manifestación de un incremento (up-regulation) por encontrarse el sistema respondiendo al máximo de sus capacidades. De una manera similar, podrían también ocultarse efectos depresores (down-regulation) si éstos operan en un eslabón previo al efector (la conductancia iónica) el cual se puede encontrar en saturación, y aún con una reducción de su activador seguiría produciendo una respuesta máxima.

En vista de estas consideraciones, se examinaron diferentes dosis de carbacol sobre las corrientes de membrana de las células HEK293. Además, se exploró también la posibilidad de aplicar el

agonista utilizando micropipetas de puffer colocadas en proximidad de la célula mediante micromanipulación y visualización microscópica; este acercamiento puede brindar un mayor control experimental en algunos aspectos (por ejemplo, menor variabilidad en cuanto a dilución y tiempo cuando el compuesto llega a la célula-blanco), aunque puede ser propenso a otras falencias (oclusión de la punta de la micropipeta, e incertidumbre en cuanto a la dirección exacta del cono de eyección).

En primer lugar, se repitieron las estimulaciones con 100 μM de carbacol, pero aplicado localmente con una micropipeta de puffer. La Figura 12 muestra registros continuos de corriente de tres células tratadas de esta manera. El resultado fue semejante a la respuesta producida por la aplicación de Carbacol 100 μM al baño por micropipeta: la corriente fue de entrada, y su amplitud alcanzó el máximo de manera progresiva, después de lo cual empezó a disminuir (en todos los casos retornando a su línea de base antes del siguiente ensayo, 10 minutos más tarde).

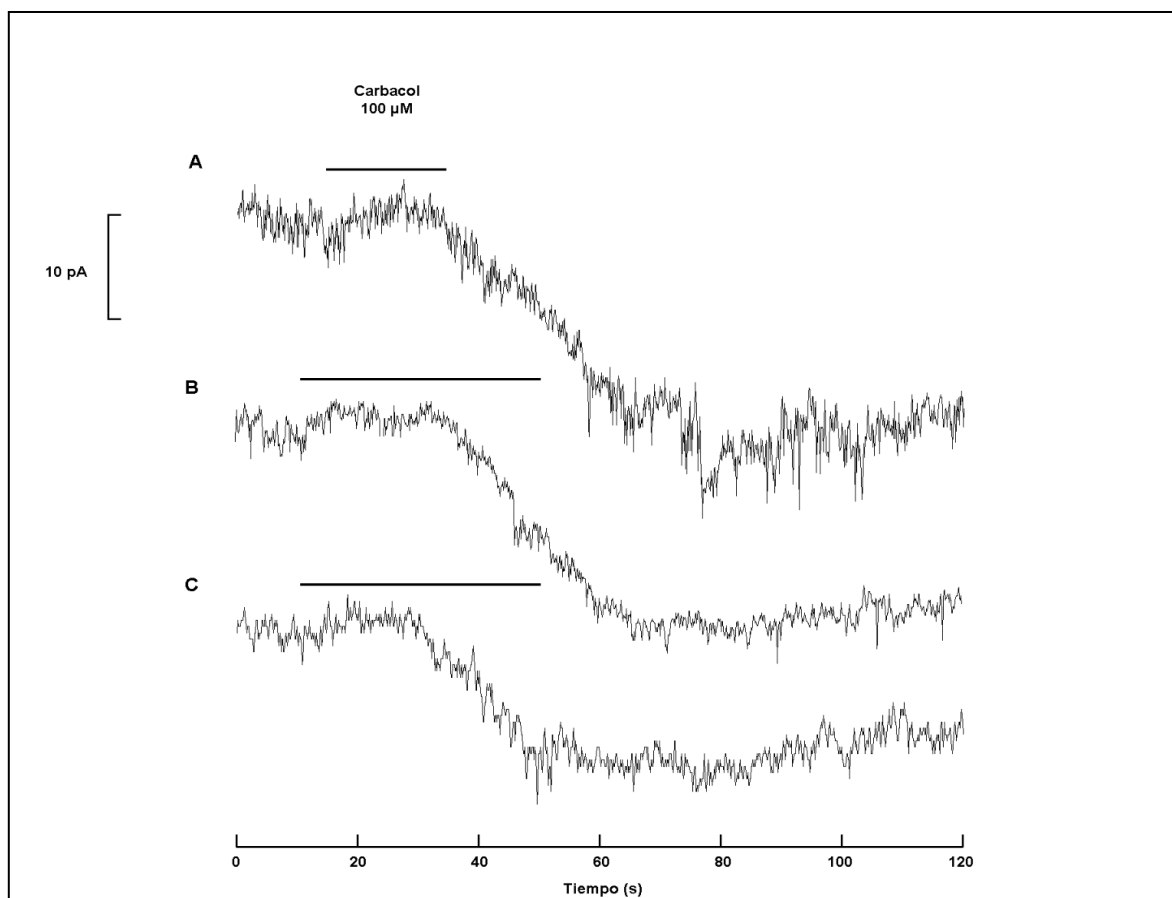


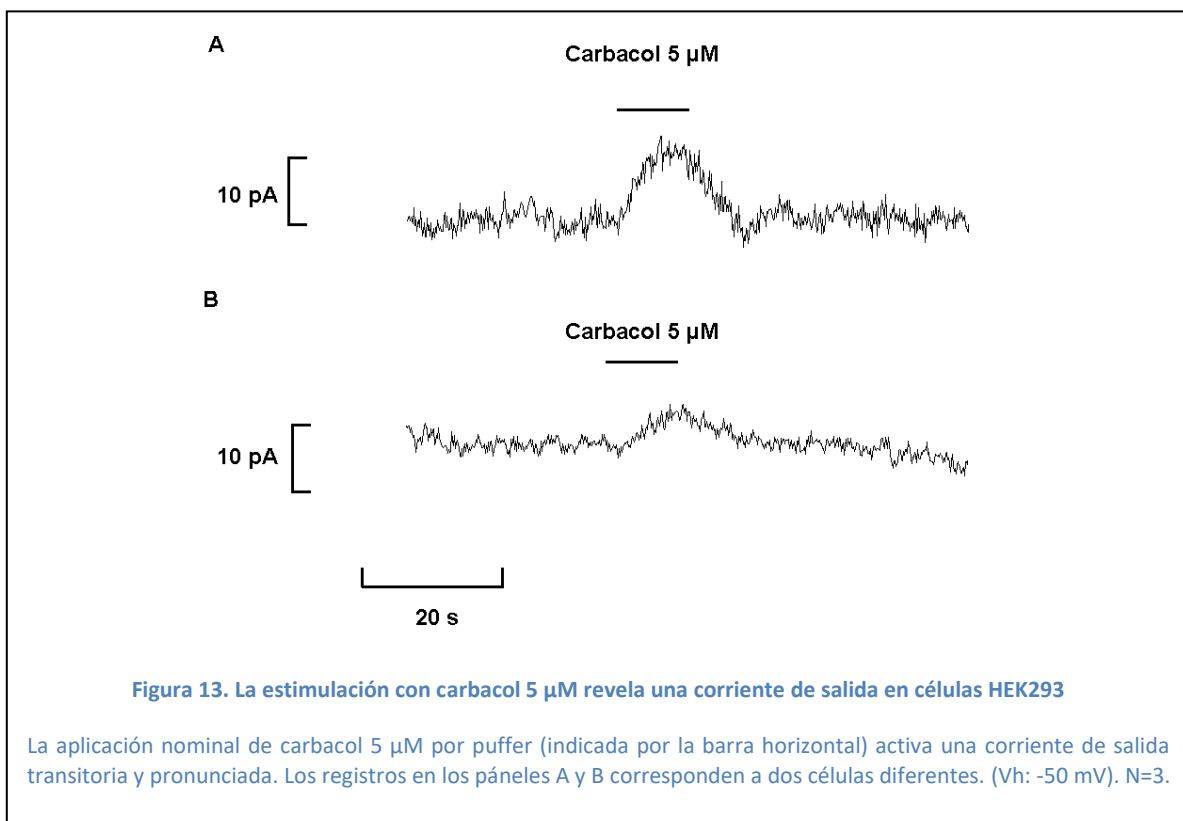
Figura 12. La aplicación local de carbacol 100 μM genera una corriente de entrada cuya amplitud máxima se alcanza progresivamente

Corrientes de entrada producidas por la aplicación local de 100 μM de carbacol por puffer. Las barras horizontales indican el tiempo de eyección a presión del compuesto. Los registros corresponden a tres células diferentes y en todos los casos la amplitud máxima se alcanzó de manera progresiva (Vh: -50 mV). N=7

Aunque éste fue el patrón predominante (N=7), en unas cuantas instancias la corriente de entrada manifestó un curso bi-fásico, con una fase inicial pequeña, seguida, muchos segundos más tarde, por un cambio abrupto (N=3). Además, se observó ocasionalmente una pequeña corriente de salida transitoria, con amplitud que no superó los 5 pA, seguida de una corriente de entrada más robusta –con amplitud máxima de ≈ 30 pA–.

Estas observaciones sugirieron la posibilidad de la existencia de múltiples conductancias desencadenadas por la estimulación colinérgica, con componentes menores que normalmente podrían estar siendo enmascarados por la respuesta dominante.

En efecto, estudios con microarreglos sugieren que las células HEK293 pueden expresar, aunque a niveles más moderados, otros receptores colinérgicos, fuera del M3. Puesto que la afinidad para el carbacol varía de un subtipo a otro, se examinó el efecto de aplicar dosis más bajas de agonista. Al disminuir sustancialmente (20 veces) la concentración de carbacol, se obtuvieron resultados cualitativamente diferentes. La Figura 13 muestra dos instancias representativas de registros en los cuales la concentración de carbacol aplicado por micropipeta de puffer fue de $5 \mu\text{M}$: el efecto fue una corriente de salida transitoria (N=4). La amplitud de la corriente fue entre 5 y 15 pA. Este tipo de respuesta mostró ser reproducible, pudiéndose replicar hasta 3 veces en una célula dada (separando los ensayos por el acostumbrado intervalo de recuperación de 10 minutos).



En resumen, la respuesta de células HEK a estimulación con un agonista colinérgico consiste predominantemente de una corriente de entrada que se activa a dosis altas. Sin embargo, también incluye un componente de salida el cual puede aislarse utilizando dosis menores de carbacol y que por lo tanto estaría mediado por receptores de más alta afinidad, pero que reclutan una población reducida de canales; esa corriente se encontraría por lo tanto enmascarada por la corriente de entrada cuando se utilizan concentraciones mayores de carbacol. En consecuencia, no hay dosis óptima de carbacol para evaluar posibles efectos modulatorios, y se ha de mantener un rango de dosis relativamente amplio.

9.1.2.4 Efecto del Inhibidor de la PLC –U-73122– en las corrientes de membrana activadas por carbacol

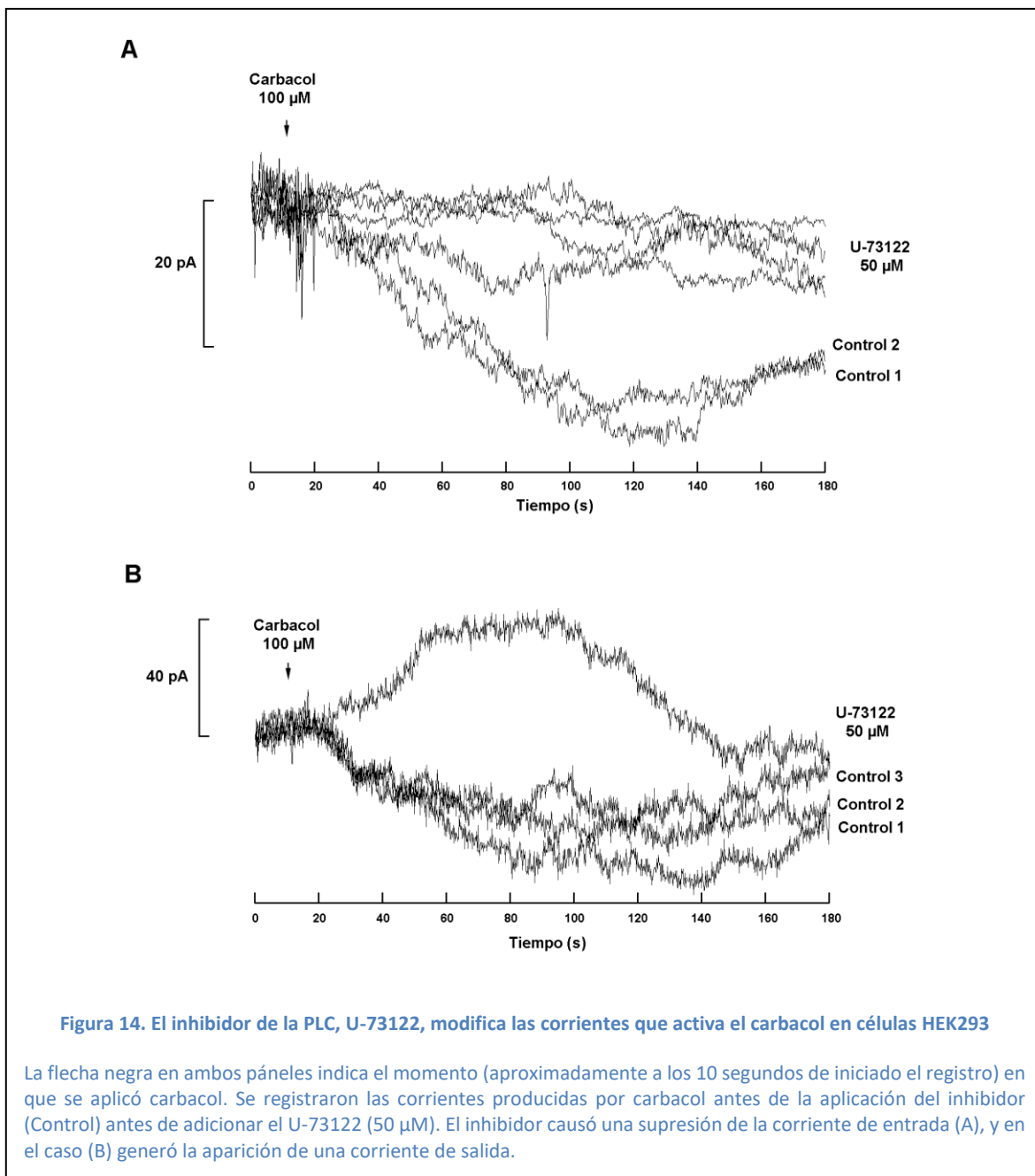
Antes de proceder con la evaluación de los posibles efectos del litio, un aspecto importante a verificar era la mediación de la vía de fosfoinositoles en las corrientes muscarínicas activadas por este agonista. Para ello, se realizó una evaluación del efecto –selectivo, potente y presuntamente no reversible (Bleasdale & Fisher, 1993)– del inhibidor de enzimas PLC, el compuesto U-73122, sobre las corrientes de membrana.

La actividad eléctrica basal de la célula se registró por aproximadamente 10 segundos, tras lo cual se añadió carbacol a la cámara de perfusión en una concentración saturante de 100 μM . El registro continuo de corriente se detuvo al completar 3 minutos. Luego, tras un intervalo de 10 minutos, se realizó un segundo registro aplicando carbacol nuevamente. Ambos constituirían el control en estos experimentos y permitieron evaluar la estabilidad de la respuesta.

Transcurridos 10 minutos más, el inhibidor se aplicó en la cámara de perfusión en una concentración de 50 μM (20 μL aplicados con micropipeta en una región cercana al microelectrodo de registro) y un minuto más tarde, cuando se presume que el inhibidor se haya distribuido en la cámara, se reiniciaron los registros de corriente estimulada por carbacol, cada diez minutos.

En todos los registros de control obtenidos el carbacol generó corrientes de entrada estereotipadas y consistentes, similares a las que se describieron en secciones previas. Estas corrientes fueron profundamente alteradas por la presencia de U-73122. Aunque el efecto predominante, ejemplificado por el panel A de la Figura 14, fue una simple supresión de la corriente de entrada, en una única célula se observó un fenómeno adicional: la aparición de una corriente de salida, como se muestra en la Figura 14B. Esto podría atribuirse al desenmascarar un segundo componente de la corriente, como se discutió previamente.

La conclusión tentativa de este experimento sería que este segundo componente es menos sensible a interferencia con la actividad de PLC (tal vez implicando una isoforma diferente). En todos los casos los efectos del inhibidor fueron duraderos, consistentemente con la noción de que el U-73122 actúa de una manera semi-irreversible. En conclusión, se puede afirmar que las corrientes muscarínicas producidas por el carbacol son resultado –al menos en parte– de la señalización por la vía de los fosfoinositoles.

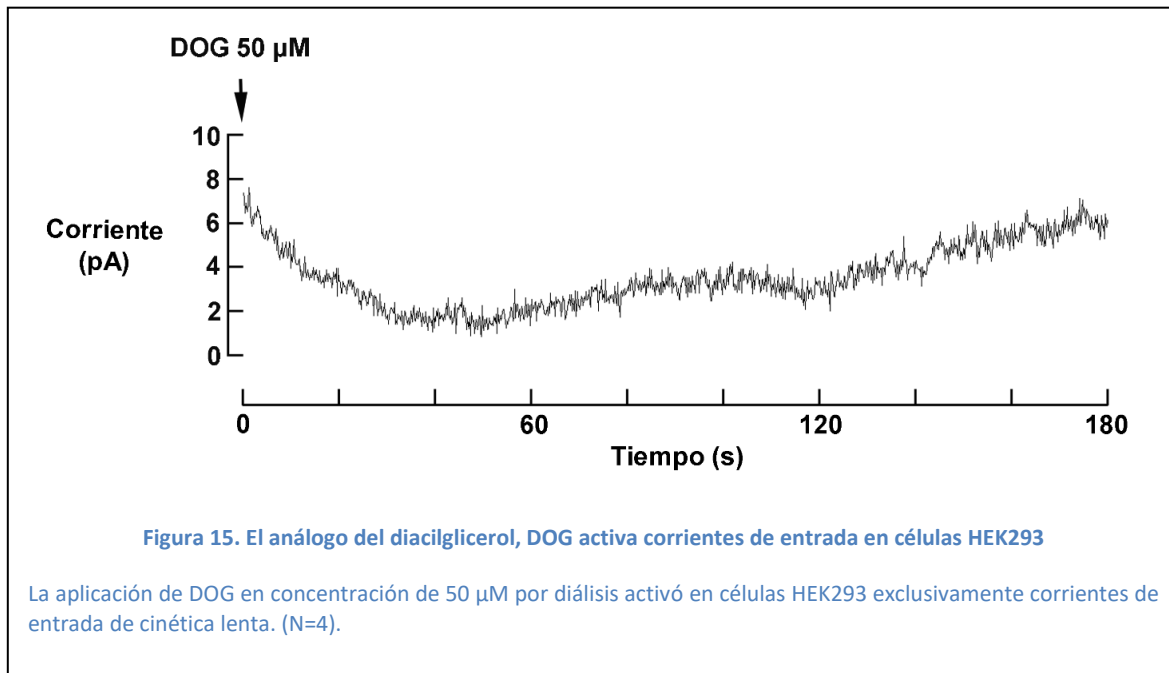


9.1.2.5 Activación directa de la señalización por diacilglicerol con su análogo: DOG

Con el fin de determinar la posible existencia de corrientes de membrana desencadenadas por la activación de la rama alterna a el $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ en la vía de señalización de los fosoinositoles, –el diacilglicerol–, se optó por estimular la cascada directamente a este nivel con su análogo DOG.

Pese a la naturaleza liposoluble del compuesto, se detectó un comportamiento diferencial entre la aplicación externa y la diálisis de DOG. La perfusión de 50 μM fue insuficiente para generar una respuesta eléctrica detectable en las células evaluadas, aquí también atribuido a los efectos de la

difusión en la cámara de perfusión. En cambio, la diálisis de 50 μM del compuesto desde el electrodo de registro generó en cuatro células una corriente de entrada de cinética lenta y una amplitud de ≈ 7 pA. La Figura 15 muestra un trazo representativo, donde la corriente de entrada se presenta tan pronto se accede al interior de la célula, alcanzando una amplitud máxima de 6 pA luego de lo cual regresa a línea de base en 3 minutos.



Estos resultados abren la posibilidad de que el litio tenga un efecto sobre canales iónicos estrechamente relacionados a la rama del DAG de la vía de la PLC, como son los canales de la familia TRP, o más aún sobre un eslabón corriente abajo de la generación de calcio y DAG como sería la activación de una PKC la cual sufriría una translocación desde el citoplasma a la membrana plasmática donde también podría cumplir una función en la señalización al fosforilar diversas moléculas.

9.2 Evaluación de la susceptibilidad de la respuesta eléctrica ante la exposición aguda a Li^+

El fin último de esta investigación era iniciar mediciones electrofisiológicas en el modelo experimental establecido para evaluar si existen efectos moduladores del litio sobre las conductancias de membrana activadas por la cascada de fosfoinositoles; se evaluaron los efectos de la exposición aguda de las células HEK293 a litio, a una concentración (4mM) que se acerca al límite superior de los niveles terapéuticos, para dar continuidad a los resultados obtenidos previamente en células expuestas a 140 mM y 14 mM de litio (Landinez, 2016).

El tratamiento se realizó modificando la solución externa al reemplazar el sodio por litio de una manera iso-osmótica. El protocolo implicaba realizar dos o tres registros de control en presencia de solución externa normal (aquí también dejando transcurrir un tiempo aproximado de 10 minutos entre un registro y otro, o dejando fluir 10 mL de solución para garantizar la recuperación de la célula). Luego se perfundió la preparación con la solución externa con litio y, pasados 10 minutos, se repetía la medición de corriente en respuesta a carbacol (siempre a una concentración de 100 μM).

Un total de 14 células fueron examinadas de esta manera, pero los resultados obtenidos mostraron considerable variabilidad, aunque en todos los casos la corriente producida por carbacol en condiciones control fue de entrada, al repetir el procedimiento en presencia de litio se observaron diferentes consecuencias. En 7 casos se produjo una corriente de salida. La Figura 16 ilustra un registro obtenido en una célula HEK293 mediante la técnica de parche perforado, luego de dos estimulaciones con carbacol en condiciones control (bajo la exposición de sodio), las cuales produjeron consistentemente corrientes de entrada de cinética lenta. La tercera aplicación en presencia de litio mostró una respuesta de salida con activación rápida. En cambio, en 2 instancias el litio causó una reducción aparente de la corriente de entrada (Figura 17). Este comportamiento podría también ser reflejo de una potenciación del componente de salida, sólo que de magnitud insuficiente para arrojar una corriente neta de salida. Finalmente, en 5 casos más no se observaron efectos consistentes. Parecía existir una correlación entre la magnitud de la respuesta de entrada en condiciones control, y el tipo de efecto: entre más pequeña la corriente inicial, más probable que el litio produjera una respuesta de salida, y cuando la corriente control era inusualmente grande, era más difícil discernir un efecto del litio.

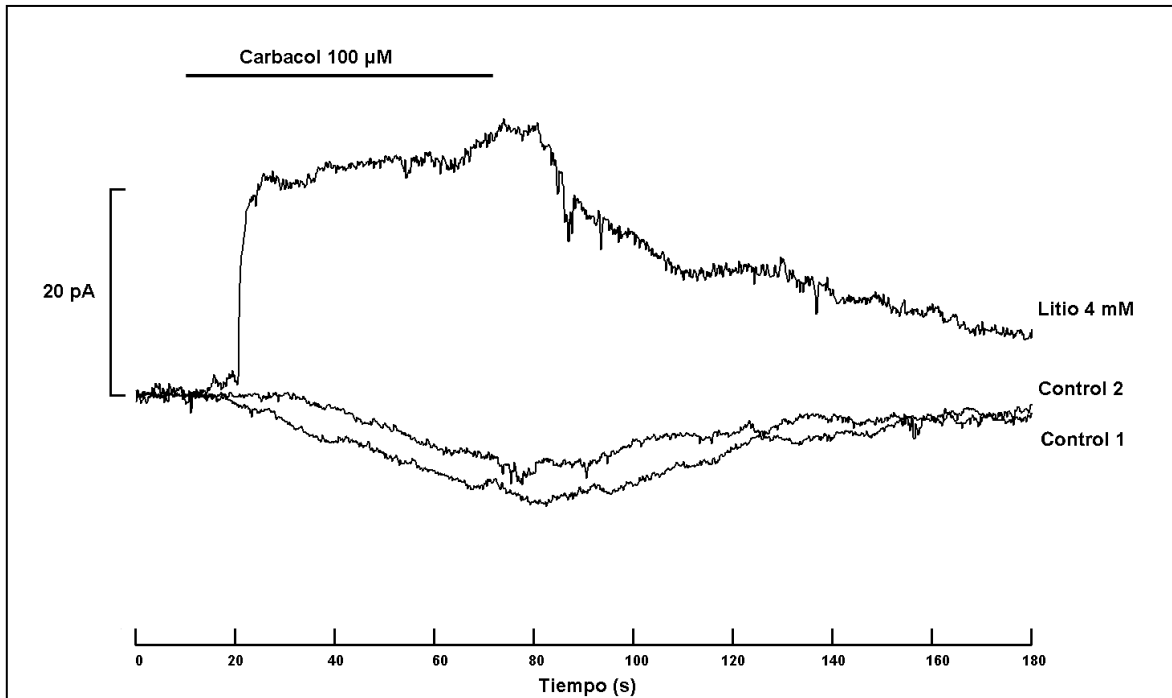
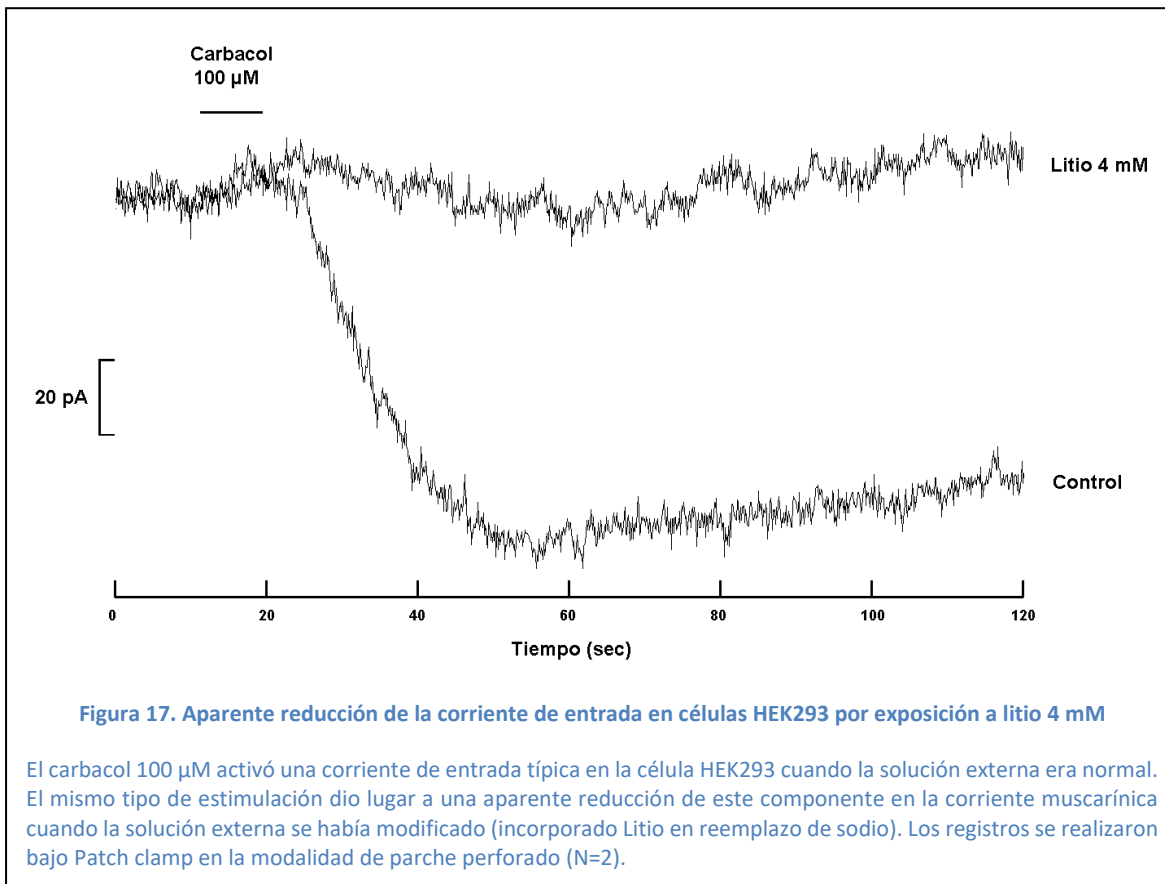


Figura 16. La exposición de células HEK293 a Litio 4 mM desenmascara corrientes de salida

Una célula HEK293 bajo Patch clamp en la modalidad de parche perforado fue estimulada con Carbacol 100 μM por aplicación por puffer mientras la solución externa contenía 140 mM de sodio y cuando la célula era expuesta a litio 4 mM (reemplazando el sodio). En contacto con solución externa normal, las corrientes producidas eran de entrada y al ser expuestas a litio 4 mM en la solución externa modificada, se observaron corrientes de salida no antes observadas a esta concentración de carbacol. (N=7).



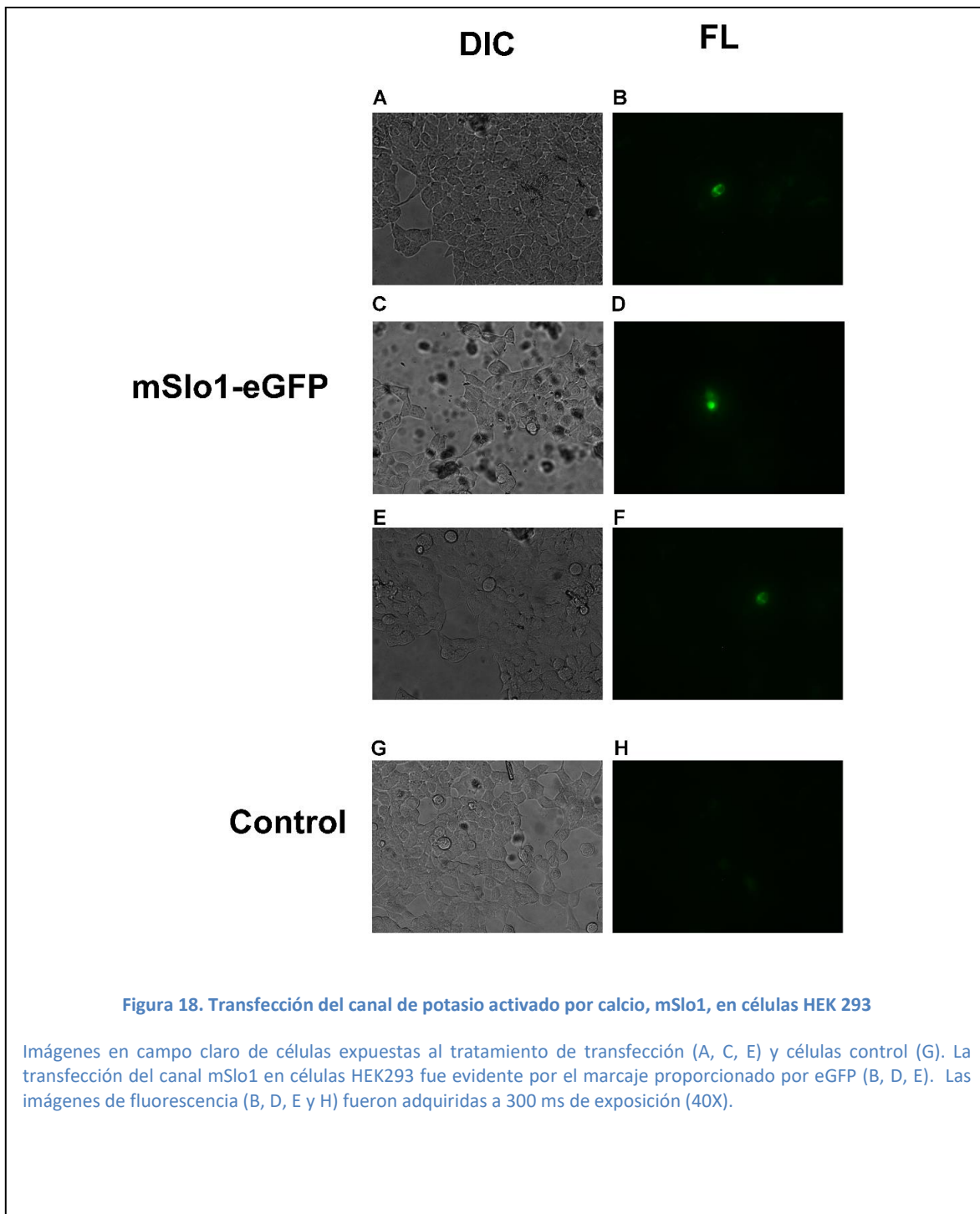
9.3 Estudios piloto en modelos alternativos

La limitada reproducibilidad de los efectos del litio sobre la respuesta muscarínica evaluada electrofisiológicamente contrasta con la robusta potenciación de la movilización de Ca^{2+} PLC-dependiente ante estimulación con el mismo agonista colinérgico; ese efecto lo hemos reportado previamente (Landinez et al., 2015). Una posible explicación de esta discrepancia es que la modulación de fenómenos bioeléctricos probablemente requeriría la presencia de canales iónicos con una pronunciada dependencia de calcio, los cuales podrían escasear o manifestar un nivel de expresión variable en las células HEK293 nativas.

Una estrategia remedial que ayudaría a determinar si el incremento de calcio liberado inducido por litio es suficiente para reflejarse en alteraciones en corrientes de membrana, es transfectando canales de potasio activados por calcio (Big Potassium/ slo1). Estos canales son ventajosos por su gran conductancia unitaria (>200 pS), pues pueden mediar corrientes conspicuas, y su sensibilidad a cambios en el calcio intracelular se puede modular cambiando el potencial de membrana.

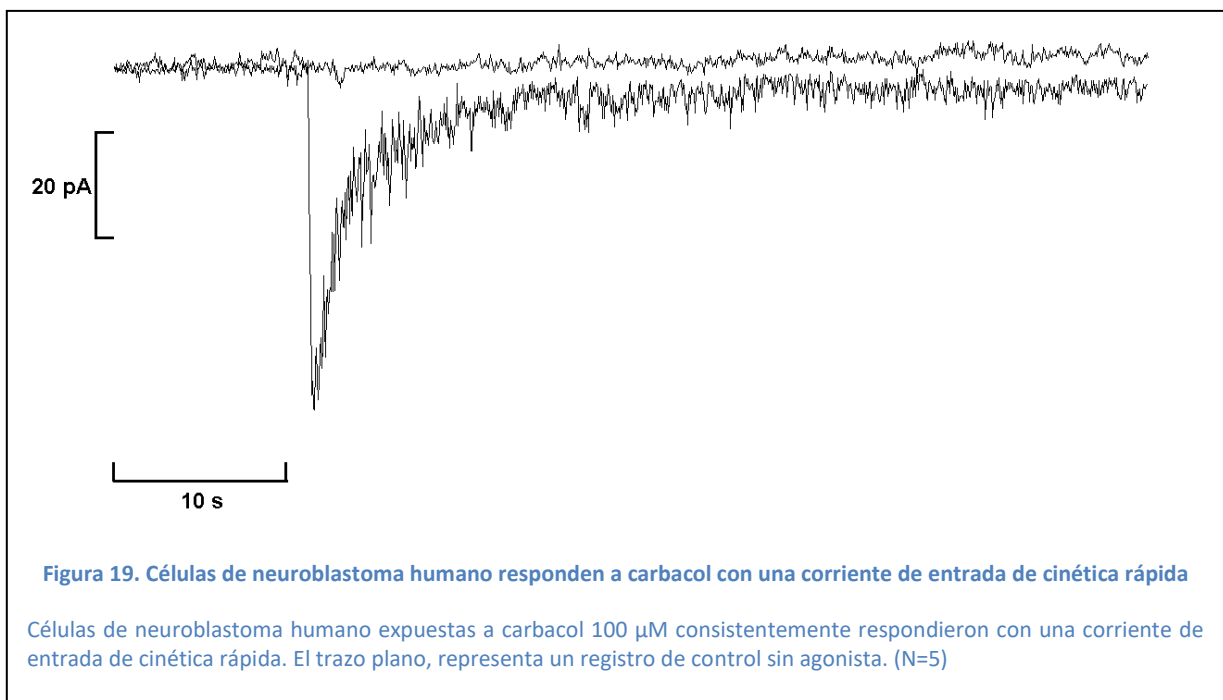
Esfuerzos incipientes en esta dirección consistieron en amplificar y purificar plásmidos en los cuales se había insertado un constructo de fusión de slo1 unido a la proteína reportera eGFP (ver Métodos). Cultivos celulares de HEK293 fueron transfectados con el plásmido por el método de lipofectamina

y 24 horas más tarde, éstos fueron visualizados por microscopía de fluorescencia. La Figura 18 muestra una instancia en la cual se observa marcaje en el cultivo transfectado, pero no en el control (utilizando los mismos parámetros).



Aunque a primera vista tanto la eficiencia de transfección como el nivel de expresión en las células positivas parecen bajos, el acercamiento se muestra promisorio. Estudios sistemáticos para optimizar la expresión y evaluar funcionalmente las corrientes mediadas por mSlo1 están planeados a futuro en el laboratorio.

Un segundo enfoque, que también se ha empezado a explorar, es el uso de líneas celulares alternativas. Entre ellas, células de neuroblastoma podrían prestarse para ese propósito sin requerir expresión heteróloga. Se iniciaron cultivos celulares en el laboratorio, conjuntamente con una caracterización incipiente de sus propiedades eléctricas y de respuestas a agonistas colinérgicos metabotrópicos. La Figura 19 ilustra registros realizados en whole-cell patch clamp, en los cuales se aprecia una corriente activada por la aplicación local de carbacol.



10 DISCUSIÓN

Aunque el litio es un medicamento de uso muy común en psiquiatría, aún no se conocen en detalle los diferentes blancos de acción, ni los mecanismos específicos de cómo opera. El propósito principal del presente trabajo era desarrollar un modelo de células humanas en las cuales se evaluara la proposición de que la exposición a litio ejerce un efecto modulador sobre la vía de señalización de los fosfoinositoles; esto basado en reportes bioquímicos que exponen que el litio inhibe la enzima mio-inositol-4-monofosfatasa (Hallcher et al., 1980), enzima que se ve involucrada en la ruta de inactivación del IP₃, conduciendo a que no haya reposición de inositol monofosfato en la membrana –precursor de PIP₂ y sobre el cual actúa la PLC (Berridge et al., 1982; Sherman et al., 1986)–, o que actúe inhibiendo la enzima inositol poli-fosfato-1-fosfatasa (Inhorn & Majerus, 1988), que además de participar en la disminución de inositol –global o altamente selectiva–, genera que la disponibilidad de IP₃ se prolongue, lo que conlleva a un aumento de la liberación de calcio desde el retículo endoplasmático (Berridge et al., 1982).

Esta cascada de señalización es prominente en diversas estructuras cerebrales. Se ha reportado que, en el cerebelo, el IP₃R se expresa masivamente (Nishida et al., 1988), en la corteza retrosplenial, la capa CA1 del hipocampo y la porción anterior del núcleo olfatorio (Mailleux et al., 1993; Nakanishi et al., 1993). La presencia de otras moléculas clave de la vía (Gq y PLC) también se ha comprobado (Sharp et al., 1999). En el sistema nervioso, esta vía cumple un rol en las respuestas post-sinápticas a neurotransmisores (Dunigan et al., 1995; Dziedzicka-Wasylewska et al., 1996), y se ha propuesto también en los mecanismos pre-sinápticos y su modulación (Dixon et al., 1994; Acquas et al., 1996; Carli et al., 1997).

Sin embargo, se carece de evidencia fisiológica que respalde la noción de que esta vía pueda ser el blanco del litio, especialmente con acercamientos que permitan, bajo condiciones de alto control experimental, discernir efectos a nivel de células individuales. La idea de emprender este tipo de estudio surgió de observaciones fortuitas en neuronas sensoriales de un cordado primitivo que produjeron un incremento marcado y reproducible en la señalización de la cascada de fosfoinositoles al ser expuestas a litio extracelular (Peinado et al., 2014). No obstante, el anfibio no constituye un modelo apto para investigaciones sistemáticas del tema.

La disponibilidad de un sistema confiable y robusto abriría las puertas a futuros estudios para dilucidar mecanismos celulares que pudieran ayudar a esclarecer cómo se genera el bien conocido efecto estabilizador del litio sobre el estado de ánimo, lo cual podría contribuir a entender también cuál es el perfil molecular característico de los pacientes que responden a este tratamiento. A largo plazo, toda información que contribuya a esclarecer como este agente actúa puede tener gran importancia práctica, como es el caso de la síntesis dirigida de fármacos con estructuras de mayor especificidad y efectividad y a la generación de terapias optimizadas que resulten útiles en el manejo farmacológico de trastornos de tipo bipolar.

Las líneas celulares en cultivo pueden ofrecer un punto de partida útil por su homogeneidad y facilidad para obtener registros electrofisiológicos a nivel de célula única, además de permitir la estimulación exógena controlada. La línea celular HEK293 fue elegida debido a evidencia que sugería

la presencia de la vía de los fosfoinositoles; la expresión nativa de receptores muscarínicos se había detectado por microarreglos (Atwood et al., 2011; Hakak et al., 2003), y por ensayos efectuados en poblaciones de células indicaban que su activación está acoplada a proteínas Gq y a la movilización de calcio (Luo et al., 2008).

Una parte importante del presente estudio fue corroborar la presencia de la maquinaria de la cascada de fosfoinositoles y mostrar la posibilidad de poderla activar experimentalmente mediante aplicación de carbacol (un agonista muscarínico), mientras se monitorean conductancias iónicas de membrana a nivel de célula única utilizando la técnica de patch clamp. Mediante métodos de inmunodetección se pudo comprobar la expresión de receptores metabotrópicos colinérgicos del subtipo M3, la expresión de la proteína Gq y de la enzima PLC β . En el caso del receptor de IP3, su gran tamaño impidió la detección por western blot desde el lisado; a futuro se requerirá implementar condiciones de lisis y de separación mediante ultracentrifugación como lo sugieren Arguin et al., (2010), que permitan por una parte liberar la proteína de agregados insolubles que posiblemente son resultado de contaminación por ADN y, por otra parte, que permitan enriquecer aún más la fracción microsomal del retículo endoplasmático. Sin embargo, la detección mediante ensayos de inmunocitoquímica fue exitosa.

Para llevar a cabo una evaluación electrofisiológica de efectos del litio en células HEK293, fue importante establecer que las cascadas de señalización controladas por proteínas G se acoplan funcionalmente a las conductancias de membrana, esto se demostró mediante la diálisis de GTP- γ -S. El control de estas vías se hace más conveniente mediante la aplicación extracelular de carbacol, que produjo claras respuestas estereotipadas; se observaron corrientes de entrada al aplicar el agonista en concentración de 100 μ M y corrientes de salida con la aplicación de la dosis nominal de 5 μ M. Estos resultados sugieren la presencia de dos subtipos de receptores muscarínicos de diferente afinidad para el agonista, acoplados a distintas clases de canales iónicos; la acción de los receptores de menor afinidad parece ser dominante, de tal manera que a altas dosis del agonista la corriente de salida se encuentra enmascarada por la corriente de entrada. El rol mediador de la vía de la PLC en las corrientes iónicas resultantes de la estimulación colinérgica fue corroborado mediante el inhibidor U-73122, que causó una supresión de las respuestas.

La presencia de múltiples clases de receptores requerirá mantener estudios paralelos a dosis diferentes de agonistas, o encontrar manera de bloquear farmacológicamente de una manera selectiva los subtipos de receptores. Por ejemplo, los fármacos AF-DX 116, pirenzepina diclorhidrato o VU0255035 muestran una inhibición preferencial sobre el subtipo M1, mientras los fármacos darifenacina bromohidrato, DAU-5884 y glicopirrolatoque son selectivos sobre el subtipo M3.

En los estudios iniciales de efectos agudos a litio que se emprendieron, la concentración de carbacol se mantuvo en 100 μ M y los resultados fueron variables, pero fundamentalmente mostraron que mientras en condiciones control la respuesta colinérgica era consistentemente una corriente de entrada, ante el litio bien sea aparecía una corriente de salida, o bien se reducía la corriente de entrada. Ambos fenómenos podrían atribuirse al fortalecimiento selectivo del componente de salida activado por carbacol. Considerando que estudios previos en HEK293 mostraron una robusta

potenciación por litio de la liberación de calcio producida por carbacol, se puede inferir que la corriente de salida que fue potenciada es calcio-dependiente, mientras que el componente de entrada podría depender de la rama de DAG de la cascada. Esta conjetura es compatible con observaciones obtenidas al estimular las células con análogos de DAG, los cuales solo activaron la corriente de entrada.

Una vez se consolide la validez y reproducibilidad de estos efectos, futuros estudios podrán ubicar posibles sitios de acción a lo largo de la cascada. La hipótesis presentada arriba implícitamente contempla una acción cuesta abajo de la actividad de la PLC (por ejemplo, incrementando la apertura de los receptores inotrópicos de IP₃, incrementando la estimulación de las bombas SERCA, u otros mecanismos de regulación del calcio citosólico); esta sería la manera más fácil de explicar efectos diferenciales sobre dos efectores que dependen de la misma vía de la PLC (de lo contrario, si se alterara la actividad de la PLC, ocurrirían cambios paralelos en la producción tanto de IP₃ como de DAG).

Observaciones más precisas podrían, a futuro, evaluar la acción de litio cuando la vía se active directamente a nivel de diferentes eslabones de la cascada, en lugar de estimular los receptores. La lógica general es que, si los efectos moduladores del litio persisten, su lugar de acción se ubica cuesta abajo en la cascada, mientras que si desaparecen querría decir que el litio opera en un eslabón previo que no ha sido involucrado con esa modalidad de estimulación. En el caso de la PLC, la activación directa podría efectuarse aplicando el compuesto m-3M3FBS. Para estimular los receptores de IP₃ de una manera controlada y reproducible, se puede acudir a la liberación por fotólisis de IP₃ enjaulado introducido en la célula por diálisis. La fotólisis de calcio enjaulado por su parte, permitiría simular la activación de la porción final de esta rama de la cascada.

Es importante recalcar que la acción del litio es polifacética. No solamente pueden existir múltiples blancos celulares –entre ellos sobre la ATPasa Na⁺/K⁺ (El-Mallakh & Wyatt, 1995), proteínas G en la vía del AMPc (Wood & Goodwin, 1987) y en la vía de los fosfoinositoles (Avisar & Schreiber, 1992), las enzimas mio-inositol-4-monofosfatasa y poli-fosfato-1-fosfatasa o la PKC también en la vía de la PLC–, sino, clínicamente el litio ejerce gran parte de su acción estabilizadora de una manera paulatina con exposición crónica, y de la misma manera sus efectos se disipan lentamente. Cambios acumulativos pueden involucrar mecanismos adicionales o diferentes a los que se manifiestan con uso agudo. Esto requerirá evaluarse con cultivos de células expuestas a litio de manera prolongada –el litio sería añadido a una baja concentración (1 mM) al medio de cultivo por lo menos siete días antes de las mediciones electrofisiológicas–.

Los presentes datos complementan estudios paralelos en nuestro laboratorio que examinaron en la misma línea celular la movilización de calcio desde depósitos internos, un proceso esencial de la señalización por fosfoinositoles (Landinez et al., 2015; Landinez, 2016). Aunque esos resultados claramente indicaron que el litio potencia la liberación de calcio, en el uso clínico ha de esperarse que los efectos estabilizadores del litio, en última instancia, se reflejen en la actividad eléctrica neuronal, tal como en las corrientes post-sinápticas que subyacen la comunicación inter-neuronal –

mostrar los efectos sobre las corrientes iónicas mediadas por fosfoinositoles, por lo tanto, resulta particularmente relevante—.

Se eligió la línea HEK293 por dar indicios de tener una vía de fosfoinositoles que podría controlarse fácilmente y dar origen a respuestas fisiológicas medibles de una manera rigurosa; además, es fácil de mantener y es asequible. Sin embargo, antes de proponer extrapolaciones que miren a relevancia práctica, la validez de todo hallazgo relacionado con el tema deberá ser fortalecida en células con propiedades más cercanas a las que constituyen el blanco clínico del litio —las neuronas cerebrales—. Un acercamiento viable sería transfectar en células HEK293 canales iónicos que dieran lugar a una conductancia con una cinética caracterizada y de mayor amplitud. Para ese fin se inició una exploración de la factibilidad de expresar el canal mSlo1, un acercamiento que podría resultar en corrientes en el rango de nA, en lugar de pA.

Otra posibilidad, también bajo estudio, es utilizar líneas neuronales de vertebrados las cuales retienen muchas características de neuronas nativas —algunas generan potenciales de acción—, como neuroblastoma. Por ejemplo, podría haber efectos moduladores del litio sobre corrientes voltaje-dependientes que son esenciales en una neurona, pero ausentes en HEK293 —que es una línea derivada del riñón—. Estos efectos podrían, por ejemplo, involucrar fosforilaciones o defosforilaciones de canales iónicos por quinasas Ca^{2+} /DAG-dependientes (como PKCs), o fosfatasas calcio-dependientes.

Posteriormente, sería deseable examinar neuronas primarias bien sea en cultivo o recién disociadas de áreas cerebrales en las cuales la presencia de esta vía es dominante (neuronas de Purkinje del cerebelo, neuronas del hipocampo o del bulbo olfatorio). Las células de Purkinje resultan ser particularmente atractivas dado su excepcional enriquecimiento de receptores de IP3 (Katayama, et al., 1996; Supattapone, et al., 1988). Se propone obtenerlas del cerebelo de embrión de pollo (en estadio E16) en el cual se han identificado también otras moléculas de la vía de fosfoinositoles, así como proteínas que desempeñan un rol importante en la regulación del Ca^{2+} en el retículo endoplasmático, tal como la calreticulina (Perrin et al., 1991), las bombas SERCA (Kaprielan et al., 1989), y la calsecuestrina (Volpe et al., 1993). El cerebelo de embrión de pollo es un modelo atractivo por razones prácticas, entre ellas las robustas respuestas metabotrópicas robustas que incluyen tanto la movilización de calcio como corrientes de membrana.

Este estudio representa el primer eslabón de un programa que requerirá esfuerzos futuros, pero indica la viabilidad del acercamiento para traer el estudio de los complejos efectos de un fármaco de gran importancia clínica, a un contexto que puede brindar las herramientas para discernir mecanismos fisiológicos específicos a nivel celular.

11 CONCLUSIONES

1. Las células HEK293 expresan elementos clave de la vía de señalización de la PLC. Mediante western blot se detectó la proteína Gq, la enzima PLC β 1, y el receptor M3-mAChR. Los ensayos de inmunodetección corroboraron estos hallazgos y también expusieron la presencia del receptor IP3R-I en el retículo endoplasmático.
2. La estimulación directa de proteínas G con el análogo no hidrolizable GTP- γ -S, activa corrientes de entrada y la conductancia incrementa a medida que el compuesto difunde al interior celular. Corrientes semejantes se obtuvieron con la aplicación de carbacol, un análogo de la acetilcolina, cuando la dosis nominal era de 100 μ M.
3. La exposición de las células al compuesto U-73122, un inhibidor de la PLC, redujo las corrientes muscarínicas. El carbacol por lo tanto activa la vía Gq/PLC.
4. La aplicación nominal de carbacol 5 μ M generó corrientes de polaridad opuesta a las observadas con dosis mayores, implicando dos poblaciones de receptores con diferente afinidad al agonista y acoplados a canales que median corrientes opuestas.
5. En células expuestas a 4 mM de litio, el carbacol produjo una corriente de salida o resultó en una corriente de entrada reducida. Las observaciones sugieren que el litio potencia selectivamente el componente de salida de la respuesta muscarínica, el cual –en vista de los datos previos sobre incremento de liberación de calcio– podría implicar canales iónicos activados por calcio.

12 LITERATURA CITADA

- Acquas, E., Fibiger, H.C. (1996). Chronic lithium attenuates dopamine D1- receptor mediated increases in acetylcholine release in rat frontal cortex. *Psychopharmacology*, 125, 162-167.
- Aiff, H., Attman, P., Aurell, M., Bendz, H., Schön, S., Svedlund, J. (2014). End-stage renal disease associated with prophylactic lithium treatment. *European Neuropsychopharmacology*, 24, 540-544.
- Altinbas, K., Guloksuz, S., Caglar, I., Caglar, F., Kurt, E., Timucin, E. (2014). Electrocardiography changes in bipolar patients during long-term lithium monotherapy. *General Hospital Psychiatry*, 36, 694-697.
- Angueyra, J.M., Pulido, C., Malagón, G., Nasi, E., Gómez, MdP. (2012). Melanopsin-expressing amphioxus photoreceptors transduce light via a phospholipase C signaling cascade. *PLoS ONE*. 7(1): e29813.
- Avisar, S., Schreiber, G. (1992) The involvement of guanine nucleotide binding proteins in the pathogenesis and treatment of affective disorders. *Biol Psychiatry*, 31, 435-459.
- Berridge, M.J. (1989). Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium mobilization is localized in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 238, 235-243.
- Berridge, M.J., Downes, C.P., Hanley, M.R. (1982). Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem J*, 206, 587-595.
- Berridge, M.J., Downes, C.P., Hanley, M.R. (1989). Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell*, 59, 411-419.
- Berridge, M.J & Irvine, R.F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 341, 197-205.
- Birch, N.J. (1974). Letter: Lithium and magnesium-dependent enzymes. *Lancet*, 2, 965-966
- Bleasdale, J.E., Fisher, SK., (1993). Use of U-73122 as an Inhibitor of Phospholipase C-Dependent Processes. *Neuroprotocols*, 3(2), 125-133.
- Cade, J.F. (1949). Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med. J. Aust*, 2, 349 - 352
- Carli, M., Anand-Srivastava, M.B., Molina-Holgado. E., Dewar, K.M., Reader, T.A. (1994). Effects of chronic lithium treatments on central dopaminergic receptor systems: G proteins as possible targets. *Neurochem. Int*, 24, 13-22.
- Carli, M., Morissette, M., Hebert, C., Di Paolo, T., Reader, T.A. (1997). Effects of chronic lithium treatment on central dopamine transporters. *Biochem Pharmacol*, 54, 391-397.

- Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131, 1047-1058.
- Craddock, N & Jones, I. (1999). Genetics of bipolar disorder. *J Med Genet*, 36 (8), 585-594.
- Cruceanu, C., Alda, M., Turecki, G.(2009) Review Lithium: a key to the genetics of bipolar disorder. *Genome Med*, 8, 79.
- Cui, J., Cox, D., & Aldrich, R. (1997). Intrinsic Voltage Dependence and Ca²⁺ Regulation of mslo Large Conductance Ca-activated K⁺ Channels. *Journal of General Physiology*, 109 (5), 647-673.
- Dinan, T. (2002). Lithium In Bipolar Mood Disorder: Evidence Suggests That Lithium Should Still Be First Choice For Prophylactic Treatment. *British Medical Journal*, 324 (7344), 989-990.
- Dixon J.F., Los, G.V., Hokin, L.E. (1994). Lithium stimulates glutamate 'release' and inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation via activation of the N-methyl-d-aspartate receptor in monkey and mouse cerebral cortex slices. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 8358-8362.
- Dowling, M.R., Nahorski, S.R., John-Challiss R.A. (2004). Measurement of Agonist Stimulated [35S]GTPγS Binding to Assess Total G-Protein and Gα-Subtype Specific Activation by G-Protein-Coupled Receptors. *Methods in Molecular Biology – Receptor Signal Transduction Protocols*, 259, 197-206.
- Drummond, A.H. (1988). Lithium affects G-protein receptor coupling. *Nature*, 331, 440-442
- Dunigan, C.D., Shamoo, A.E. (1995). Li⁺ stimulates ATP-regulated dopamine uptake in PC12 cells. *Neuroscience*, 65, 1-4.
- Dziedzicka-Wasylewska, M., Mackowiak, M., Figat, K., Wedzony, K. (1996) Adaptive changes in the rat dopaminergic transmission following repeated lithium administration. *J Neural Trans*, 103, 765- 776
- Ehrlich, B., & Watras, J. (1988). Inositol 1,4,5 triphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Letters to Nature*, 338, 583-586.
- El-Mallakh, R.S., Wyatt, R.J. (1995). The Na, K-ATPase hypothesis for bipolar disorder. *Biol Psychiatry*, 37, 235-244.
- Evans, DL., Charney, DS. (2003). Mood disorders and medical illness: a major public health problem. *Biol Psychiatry*, 54, 177-180.
- Farhy, TI., Tsemakhovich, V., Rishala, I., Kahanovitcha, U., Dessauerb, CW., Nathan. (2014). Dual regulation of G proteins and the G-protein-activated K⁺ channels by lithium. *PNAS*, 111, 5018-5023

- Geddes, J., Goodwin, G., Rendell, J., Azorin, J., Cipriani, A., Ostacher, M., Juszczak, E. (2010). Lithium plus valproate combination therapy versus monotherapy for relapse prevention in bipolar I disorder: a randomised open-label trial. *Lancet*, 375 (9712), 385-395.
- Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. (1990). *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Octava edición). Nueva York: Mcgraw-Hill.
- Goodwin, F.K., Jamison, K.R. (1990) *Manic–Depressive Illness*. Oxford University Press, 938.
- Gould, T. D., Quiroz, J. A., Singh, J., Zarate, C. A., and Manji, H. K. (2004). Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. *Mol. Psychiatry*, 9, 734-755
- Hakak, Y., Shrestha, D., Goegel, M.C., Behan, D.P., Chalmers, D.T. (2003). Global analysis of G-protein-coupled receptor signaling in human tissues. *FEBS Lett*, 550, 11-17.
- Hallcher, L.M., Sherman, W.R. (1980). The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J Biol Chem*, 255, 10896 -10901.
- Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol*, 88, 49-92.
- Harwood, J. (2005) Lithium and bipolar mood disorder: the inositol-depletion hypothesis revisited. *Molecular Psychiatry*, 10, 117-126
- Inhorn, R.C., Majerus, P.W. (1988). Properties of inositol polyphosphate 1-phosphatase. *J. Biol. Chem*, 263, 14559-65
- Inoue, T., Kato, K., Kohda, K., Mikoshiba, K. (1998). Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required for induction of long-term depression in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci*, 18, 5366-73
- Jope, R.S. (1999). Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Molecular Psychiatry*, 4, 117-128.
- Jope, R.S., Williams, M.B. (1994). Lithium and brain signal transduction systems. *Biochem Pharmacol*, 47, 429-441.
- Kleinman, L., Lowin, A., Flood, E., Gandhi, G., Edgell, E., Revicki, D. (2003). Costs of bipolar disorder. *Pharmacoeconomics*, 21, 601-622.
- Kramarenko, Il., Bunni, M.A., Morinelli T.A., Raymond J.R., Garnovskaya, M.N. (2009). Identification of functional bradykinin B(2) receptors endogenously expressed in HEK293 cells. *Biochem Pharmacol*, 77, 269-76.

- Landinez M.P., Duran, S., Osorno. T., Gomez, Mdel P., Nasi, E. (2015). Acute Lithium Administration Enhances Gq/PLC-mediated signaling. *Journal of General Physiology*, 146: 9a (69th annual meeting of the Society of General Physiologists).
- Landinez, M.P. (2016). Evaluación fisiológica de los efectos del litio sobre la movilización de calcio intracelular en la línea celular HEK 293. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- Langmead, C.J., Watson, J., Reavill, C. (2008). Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther*, 117(2), 232-43.
- Lewitzka, U., Severus, E., Bauer, R., Ritter, P., Müller-Oerlinghausen, B., Bauer, M. (2015). The suicide prevention effect of lithium: more than 20 years of evidence—a narrative review. *International Journal of Bipolar Disorders*, 3, 15.
- Linley, J. (2013). Perforated Whole-Cell Patch-Clamp Recording. In *Ion Channels*, N. Gamper, 149-157.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2008). *Molecular Cell Biology* (Sexta edición). New York: W. H. Freeman and Company.
- Luo, J., Busillo, J.M., Benovic, J.L. (2008). M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol*. 74, 338-47.
- Mailleux, P., Albalá, N., Vanderhaeghen, J.J. (1993). Ontogeny of gene expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the rat brain: high mRNA levels in the cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett*. 156, 125-30.
- Maj, M. (2000). The impact of lithium prophylaxis on the course of bipolar disorder: a review of the research evidence. *Bipolar Disorder*, 2, 93-101.
- Majerus, P.W. (1992). Inositol phosphate biochemistry. *Annu Rev Biochem*. 61, 225-250.
- Malhi, G.S, Tanious, M. Bargh, D., Pritha Das, and I Berk, M. (2013). Safe and effective use of lithium. *Aust Prescr*, 36, 18-21.
- Malhi, G.S., Tanious, M., Das, P., Coulston, C.M., Berk, M. (2013). Potential mechanisms of action of lithium in bipolar disorder: Current understanding. *CNS Drugs*, 27 (2), 135-153.
- Mamdani, F., Groisman, I.J., Alda, M., Turecki, G. (2004) Pharmacogenetics and bipolar disorder. *Pharmacogenomics J*, 4, 161-170.
- Merikangas, K.R., Jin, R., He, J., Kessler, R.C., Lee, S., Sampson, N.A., Viana, M.C., Andrade, L.H., Hu, C., Karam, E.G., Mora, M.E.M., Browne, M.O., Ono, Y., Posada-Villa, J., Sagar, R., Zarkov, Z. (2011). Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the World Mental Health Survey Initiative. *Archives of General Psychiatry*, 68 (3), 241-251.

- Mota de Freitas, D., Castro, M.M., Geraldés, C.F. (2006). Is competition between Li⁺ and Mg²⁺ the underlying theme in the proposed mechanisms for the pharmacological action of lithium salts in bipolar disorder? *Acc Chem Res*, 39, 283-291.
- Mundell, S.J. & Benovic, J.L. (2000). Selective regulation of endogenous G protein-coupled receptors by arrestins in HEK293 cells. *J Biol Chem*, 275, 12900-12908.
- Nakanishi, S., Maeda, N., Mikoshiba, K. (1991). Immunohistochemical localization of an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, P400, in neural tissue: studies in developing and adult mouse brain. *J Neurosci*, 11, 2075-86.
- Neves, S.R., Prahlad, T.R., Ravi, I. (2002). G Protein Pathways. *Science*, 31, 1636-1639
- Nishida, A., Kaiya, H., Tohmatsu, T., Banno, Y., Wakabayashi, S., Nozawa, Y. (1988). Regional distribution of phosphoinositide-specific phospholipase C activity in rat brain. *Neurosci Lett*, 90, 354-7.
- O'Connell, R.A., Mayo, J.A., Flatow, L., Cuthbertson, B., O'Brien, O.B. (1991) Outcome of bipolar disorder on long-term treatment with lithium. *The British Journal of psychiatry*, 159 (1), 123-129.
- Peinado, G., Osorno, T., Gomez, M.D.P., Nasi, E. (2015). Calcium activates the light-dependent conductance in melanopsin-expressing photoreceptors of amphioxus. *Proceedings of the National Academy of Science (PNAS)*, 112, 7845-7850.
- Phiel, C.J., Klein, P.S. (2001). Molecular targets of lithium action. *Pharmacol. Toxicol.* 41, 789-813.
- Pulido, C., Malagón, G., Ferrer, C., Chen, J.K., Angueyra, J.M., Nasi, E., & Gomez MP. (2012). The light-sensitive conductance of melanopsin-expressing Joseph and Hesse cells in amphioxus. *Journal of General Physiology*, 139, 19-30.
- Ross, C. A., Danoff, S. K., Schell, M. J., Snyder, S. H. and Ullrich, A. (1992). Three additional inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: Molecular cloning and differential localization in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4265-4269.
- Ryves, W.J., Harwood, A.J. (2001). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 280, 720-725.
- Schou, M. (1983) Preventive lithium treatment in manic-depressive disease: experiences and progress in recent years. *Nervenarzt*, 54, 331-339.
- Sharp, A.H., Nucifora, F.C. Jr., Blondel, O., Sheppard, C.A., Zhang, C., Snyder, S.H., Russell, J.T., Ryugo, D.K., Ross, C.A. (1999). Differential cellular expression of isoforms of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in neurons and glia in brain. *J Comp Neurol*, 406, 207-20.

- Sherman, W.R., Gish, B.G., Honchar M.P., Munsell, L.Y. (1986). Effects of lithium on phosphoinositide metabolism in vivo. *Fed Proc*, 45, 2639-2646.
- Song L, Jope RS (1992). Chronic lithium treatment impairs phosphatidylinositol hydrolysis in membranes from rat brain regions. *J. Neurochem.* 58, 2200-2206.
- Sourial-Bassillious N, Rydelius PA, Aperia A, Aizman O (2009) Glutamatemediated calcium signaling: a potential target for lithium action. *Neuroscience*, 161, 1126-1134.
- Spalding, T. A., Trotter, C., Skjaerbaek, N., Messier, T. L., Currier, E. A., Burstein, E. S., et al. (2002). Discovery of an ectopic activation site on the M1 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol*, 61, 1297-1302.
- Wang, H.Y., Friedman, E. (1999). Effects of lithium on receptor-mediated activation of G proteins in rat brain cortical membranes. *Neuropharmacology*, 38, 403-414.
- Wood, A.J, Goodwin, G.M. (1987) A review of the biochemical and neuropharmacological actions of lithium. *Psychol Med*, 17, 579-600.
- Wood, M. D., Murkitt, K. L., Ho, M., Watson, J. M., Brown, F., Hunter, A. J., et al. (1999). Functional comparison of muscarinic partial agonists at muscarinic receptor subtypes hM1, hM2, hM3, hM4 and hM5 using microphysiometry. *Br J Pharmacol*, 126 (7), 1620-1624.
- Woods, S.W. (2000) The economic burden of bipolar disease. *J Clin Psychiatry*, 61 (13), 38-41.
- Wu, D., LaRosa, G.J., Simon, M.I. (1993). G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8. *Science*, 261, 101-103.

13 FINANCIACIÓN

Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá (DIB), Proyecto Hermes No. 28407