

Tesis Doctoral

Síntesis, diseño y caracterización de compuestos enjaulados para su uso in vivo

Andino Pavlovsky, Victoria

2015-03-13

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Andino Pavlovsky, Victoria. (2015-03-13). Síntesis, diseño y caracterización de compuestos enjaulados para su uso in vivo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Andino Pavlovsky, Victoria. "Síntesis, diseño y caracterización de compuestos enjaulados para su uso in vivo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-13.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Síntesis, diseño y caracterización de compuestos enjaulados para su uso *in vivo*

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Victoria Andino Pavlovsky

Director de tesis: Dr. Roberto Etchenique

Consejera de estudios: Dra. Valeria Levi

Lugar de Trabajo: Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE) - Dpto de Química Inorgánica, Analítica y Química Física - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA

Ciudad de Buenos Aires, 2015

Síntesis, diseño y caracterización de compuestos enjaulados para su uso *in vivo*

En este trabajo se describe la síntesis y caracterización de compuestos enjaulados a base de rutenio para ser utilizados en experimentos neurofisiológicos *in vivo*. Estos compuestos pueden liberar diversos neurotransmisores/neuromoduladores al ser irradiados con luz visible, ya fueron probados con éxito en distintas preparaciones *in vitro* y existen resultados preliminares de su posible uso en animales bajo anestesia. Aquí se muestra por primera vez la posibilidad de alterar la actividad cerebral a través de la administración y posterior activación con luz de compuestos enjaulados de rutenio en animales moviéndose libremente. En particular, se presenta un nuevo miembro de la familia de estos compuestos, la RuBi-Dopa, la cual libera el neuromodulador dopamina al ser irradiado con luz. Su funcionalidad es probada tanto en régimen de un fotón con luz visible (405-532 nm) como de dos fotones con luz infrarroja (800 nm), demostrando así el amplio espectro de posibilidades que ofrece este nuevo complejo. Luego de su liberación, el neuromodulador actúa sobre los receptores correspondientes provocando cambios en la actividad neuronal. Para mostrar esto, RuBi-Dopa fue liberada en régimen de dos fotones logrando una gran resolución espacial tal que permitió estimular neuronas a nivel de espinas dendríticas. El compuesto también se administró en ratas vivas y moviéndose libremente, observando alteraciones en la actividad cerebral luego de su activación a través de una fibra óptica ubicada en el cerebro, demostrando así su funcionalidad *in vivo*, sin efectos secundarios detectables.

Palabras clave:

compuesto enjaulado – rutenio – dopamina – dos fotones – acoplamiento fase-amplitud

Synthesis, design and characterization of caged compounds to be used *in vivo*

Ruthenium-based caged compounds are complexes capable of releasing biologically relevant molecules when irradiated with visible light. This raises the possibility of stimulating neurons and tissues with high spatial and temporal resolution. In past studies, they have been used in different systems to activate neuronal receptors *in vitro* as well as *in vivo* experiments. A recently incorporated member of the ruthenium-based caged compounds family is RuBi-Dopa, a complex that releases the neuromodulator dopamine when irradiated with blue/green light. This complex has recently been used to activate dopamine receptors at the level of single dendritic spines. In the present work, we report for the first time the use of a ruthenium-based caged compound in live, freely-moving rats. The animals were chronically implanted in prefrontal cortex with a multi-electrode matrix containing a cannula through which the complex is injected and a fiber optic is placed that allows the light to activate it. As the animal is allowed to freely explore the arena, neuronal activity is recorded before, during and after the dopamine release. We found significant changes in neuronal activity induced by dopamine uncaging, as changes in the strength and frequency range of the phase-amplitude modulation in prefrontal cortex. Thus, we present here a novel method for the administration and activation of ruthenium-based caged compounds in live, freely-moving animals, opening the possibility to stimulate many kinds of neuronal receptors without any previous treatment.

Keywords:

caged compound – ruthenium – dopamine – two photon – phase-frequency coupling

Gracias a mis padres, Enrique y Mariana, por darme primero la vida y luego las herramientas necesarias para transitarla por un camino de amor y honestidad.

Gracias a los investigadores que me recibieron en sus laboratorios y me brindaron sus recursos tanto humanos como materiales para desarrollarme: Rafa Yuste y Roberto Araya en *Columbia University*, Sidarta Ribeiro en el *Instituto do Cérebro*.

Gracias a mis colegas brasileños Annie da Costa Souza y Robson Scheffer, grandes profesionales que desinteresadamente y con toda la dedicación del mundo me enseñaron todo lo que saben y sin cuya invaluable ayuda nunca hubiese podido llevar a cabo gran parte de este trabajo.

Gracias nuevamente a Annie, pero esta vez por haberse convertido en mi confidente, mi compañera, mi sostén en momentos difíciles lejos de casa, y por haber convertido una relación profesional en una gran y, espero, eterna amistad.

Gracias a las personas que hicieron más felices mis años en el Inquimae, a mis amigos de pasillo y compañeros de mate que me dieron esas risas cotidianas que pueden ser un detalle o pueden ser todo: Rolo, Andre Atias y mi “tía” Sara Bari.

Gracias a Oscar Filevich, porque fue Oski quien en momentos de poca inspiración me inyectó con energía científica positiva y me incentivó a pensar que todo esto vale la pena.

Y el gracias más grande y más profundo que pueda dar, a Rober Etchenique, por no haber dudado un instante en invitarme a trabajar con él cuando lo necesité; por confiar en mí mucho más que yo misma y mandarme siempre hacia aventuras desconocidas, dándome el honor de representar a nuestro laboratorio en otros países y por creer que podía hacerlo bien; por respetar todos mis altibajos y preocuparse más por mi bienestar que por los resultados de mis experimentos; por demostrarme que se puede ser el director y tener todos los días ganas de jugar el juego de la ciencia, y por enseñarme a jugarlo.

*Este trabajo está dedicado a todos los animales que sin elegirlo dan su vida para que
nosotros podamos mejorar la nuestra.*

INDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Compuestos enjaulados.....	7
1.2 Microscopía de dos fotones y compuestos enjaulados.....	25
1.3 Oscilaciones neuronales.....	34
1.4 Técnicas ópticas de manipulación neuronal.....	48
1.5 Dopamina.....	53
1.6 Compuestos enjaulados de dopamina.....	58
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
2.1 Síntesis del complejo [Ru(bpy) ₂ (PMe ₃)(dopamina)] (RuBi-Dopa).....	62
2.2 Preparación de rodajas de cerebro y electrofisiología.....	63
2.3 Desenjaulado de RuBi-Dopa en régimen de dos fotones y mediciones de calcio en Rodajas.....	65
2.4 Animales y cirugía.....	67
2.5 Registros electrofisiológicos <i>in vivo</i>	68
2.6 Histología.....	69
2.7 Desenjaulado de RuBi-Dopa <i>in vivo</i>	69
2.8 Análisis de Datos.....	71
3 RESULTADOS.....	75
3.1 Síntesis y Caracterización de RuBi-Dopa.....	75
3.2 Experimentos en Rodajas de Cerebro.....	87
3.3 Experimentos <i>in vivo</i>	94
4 DISCUSIÓN.....	123
5 CONCLUSIONES.....	138
6 REFERENCIAS.....	140
7 TRABAJOS PUBLICADOS.....	155

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Compuestos enjaulados

Hoy en día asistimos a un llamativo fenómeno. Mientras que hasta hace unos años las únicas situaciones que nos encontraban hablando sobre el sistema nervioso probablemente transcurrían dentro de un ámbito académico, hoy observamos una innumerable cantidad de informes, libros, notas en todo tipo de medios de difusión masiva, y hasta charlas de café, abordando preguntas relacionadas al cerebro. Y es que, como sentenció recientemente un destacado investigador en el área, *el cerebro está de moda*¹. Si bien el interés de los académicos sobre el funcionamiento de este órgano tan misterioso se remonta a tiempos muy antiguos, nos encontramos hoy en una era del desarrollo científico que ha propiciado avances fundamentales para lograr su estudio y entendimiento. Prácticamente todas las ciencias exactas y naturales, la física, la química, la matemática, la computación y la biología forman hoy en día una combinación indispensable para conformar la interdisciplina llamada Neurociencia.

En las últimas décadas, el desarrollo de numerosas técnicas ha permitido los avances a los que nos referimos en el párrafo anterior. Dentro de estas técnicas, se destacan aquellas que permiten la estimulación de neuronas en distintas preparaciones, de

¹“Entrenar al cerebro”, nota del día 12 de octubre del 2014 al Dr. Diego Golombek en el Diario “El territorio” en su versión impresa (<http://www.territorioidigital.com/notaimpresa.aspx?c=3177218953492168>).

manera de alterar su actividad en el espacio y tiempo que el experimentador necesite. El método más intuitivo y básico para realizar este tipo de estimulación es el de aplicar directamente sobre la preparación, una solución conteniendo la molécula bioactiva cuyo receptor se quiere activar. Sin embargo, esto carece completamente de resolución tanto espacial como temporal, ya que debemos bañar el cultivo o tejido con la solución de interés y no podemos elegir qué tipo de neuronas y cuándo activarlas. Una mejora a este método básico es la aplicación de fármacos mediante *picospritzer*, una herramienta que lanza volúmenes minúsculos de solución (picolitros) conteniendo la molécula de interés. Su resolución espacial y temporal es mejor, pero aun alejada de los tiempos y distancias propias de la acción fisiológica. Otro método de estimulación de neuronas únicas es la activación mediante estímulos eléctricos, para lo cual se debe impalar la célula con electrodos a través de los que se hace pasar una corriente. En los años '70, surgió un trabajo que presentó por primera vez un método óptico para la estimulación de neuronas individuales [1]. En su innovador trabajo, Fork creó un arreglo experimental a través del cual logró estimular por láser neuronas del ganglio abdominal de *Aplysia californica*. Hasta ese momento, la aplicación de la técnica era muy limitada, extendiéndose solamente a la irradiación de las neuronas con luz a través de perforaciones en la membrana plasmática. Sin embargo, esto dio lugar a la idea de combinar métodos ópticos con técnicas electrofisiológicas, la cual fue intensamente estudiada para permitir su desarrollo.

El extenso estudio y profundización en este tema dio lugar a la aparición de lo que hoy conocemos como compuestos enjaulados. Un compuesto enjaulado es una entidad molecular que consiste en un grupo protector (la “jaula”) y una molécula de interés biológico (el ligando) que carece de función cuando se encuentra “enjaulada”; al irradiar este complejo con luz, la molécula bioactiva se libera de su jaula y recupera instantáneamente su función, pudiendo unirse a sus correspondientes receptores en la célula que queremos estimular (Figura 1.1).

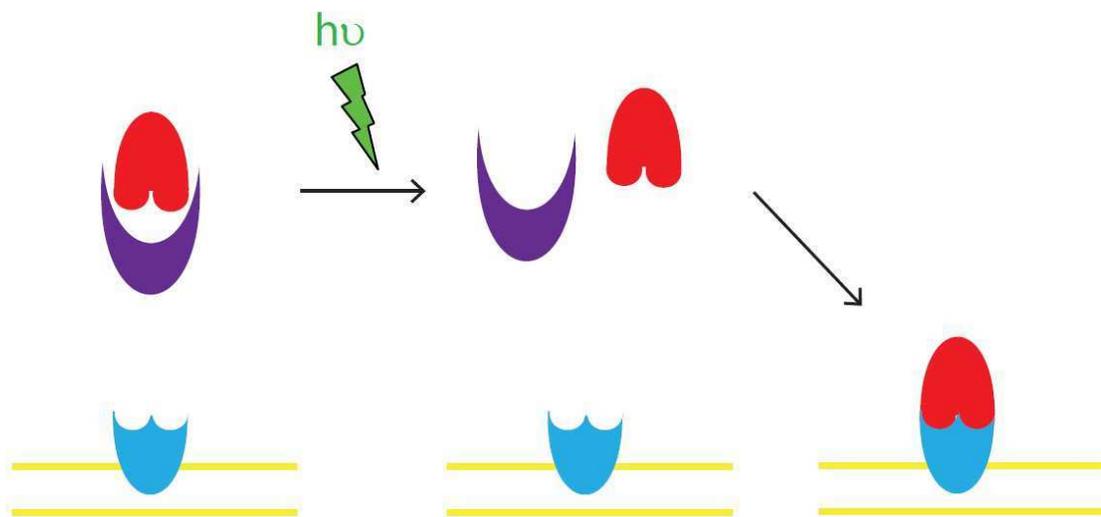


Figura 1.1. Esquema ilustrando el concepto de un compuesto enjaulado: al estar unido al grupo protector o jaula (violeta), el ligando de interés biológico (rojo) no puede interactuar con su receptor funcional (azul) ubicado en la membrana plasmática de la célula y se encuentra inactivo. Al ser irradiado con luz de longitud de onda adecuada, la unión entre la jaula y el ligando se rompe y este se libera, pudiendo unirse a su receptor y volviéndose biológicamente activo.

Claro que en este caso la “jaula” no es una jaula y el neurotransmisor no se encuentra encerrado en ningún lado, sino que ésta es una licencia poética que se utiliza para describir el hecho de que el neurotransmisor se encuentra unido a otra molécula, llamada grupo protector, que al unirse a él impide que pueda unirse a sus receptores funcionales y así le quita su función. La unión entre el neurotransmisor y su grupo protector se rompe al irradiar el complejo con luz, de manera tal que el primero se vuelve biológicamente activo. Un ejemplo más real se muestra en la Figura 1.2.

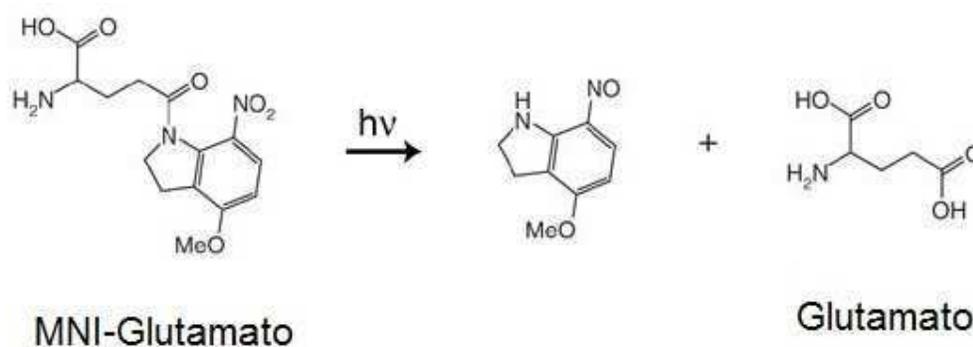


Figura 1.2. Se muestra a modo de ejemplo la liberación del neurotransmisor glutamato a partir de su versión enjaulada con base orgánica (4-metoxi-7-nitroindolinglutamato, “MNI-Glutamato”). Al ser irradiado con un haz de luz, en este caso luz ultravioleta, el glutamato se libera de su jaula y puede actuar sobre sus receptores.

Numerosos trabajos se han llevado a cabo con el fin de perfeccionar la estructura de los compuestos enjaulados, así como de desarrollar nuevos tipos de complejos que permitan ampliar las posibilidades de aplicación hacia una mayor variedad de

preparaciones y experimentos biológicos. La primera molécula de interés biológico que se logró unir a un grupo protector para ser activada por la irradiación con luz fue la molécula de ATP [2]. Sin embargo, no fue hasta la década de los '80 que aparecieron los primeros trabajos reportando el uso de compuestos enjaulados para la estimulación de receptores neuronales [3-7]. Pocos años después aparecieron las versiones enjauladas de los neurotransmisores más ubicuos del sistema nervioso, GABA y glutamato [8-11].

Prácticamente todos los compuestos enjaulados nombrados anteriormente están basados en la fotoquímica del nitrobenzilo, nitrofenilo y sus derivados, que requieren ser irradiados con luz de longitudes de onda en el rango de la luz ultravioleta (UV). Esto presenta importantes desventajas a la hora de trabajar en preparaciones biológicas. Primero, nunca es conveniente irradiar un tejido biológico con luz UV, ya que al estar compuesta por fotones de alta energía, la irradiación puede causar daños irreversibles en el ADN de las células (Figura 1.3). Por otro lado, los compuestos enjaulados de base orgánica a menudo presentan inestabilidad en medios acuosos, los cuales son necesarios para trabajar en biología, provocando así niveles apreciables de descomposición en ausencia de luz, resultando esto en una actividad basal provocada por la solución de complejo y por lo tanto en experimentos más "sucios". Otra desventaja proviene del hecho de que la luz de corta longitud de onda (por ejemplo UV) sufre mayor dispersión al atravesar un tejido, lo cual desvía el haz de luz

aplicado disminuyendo sustancialmente la resolución espacial a la que puede llegarse en la liberación. Por otro lado, y no menos importante, la óptica de cuarzo y las fuentes de luz necesarias para trabajar con luz UV son significativamente más costosas que las necesarias para trabajar con luz visible.

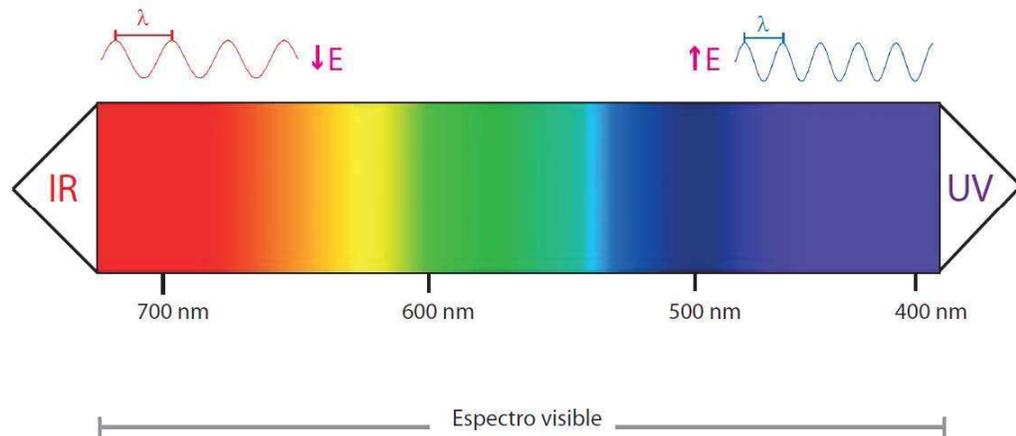


Figura 1.3. Al observar el espectro electromagnético vemos que mientras que la luz de rango visible presenta longitudes de onda entre 400 y 700 nm, la luz de menor longitud de onda cae en el rango del ultravioleta (UV), presentando por lo tanto mayor energía y más probabilidad de fotodaño, mientras que el rango infrarrojo (IR) posee mayor longitud de onda y menor energía.

La respuesta a la necesidad de contar con un nuevo tipo de compuestos enjaulados que permita sobrepasar este tipo de limitaciones llegó con el desarrollo de una nueva

familia de complejos que, en vez de poseer una base orgánica como los existentes hasta ese momento, están basados en un complejo de coordinación inorgánico. Esta “jaula” inorgánica consta de un átomo central de rutenio unido a dos moléculas de bipyridina en configuración *cis*, más dos posiciones adicionales adyacentes de modo de completar una geometría octaédrica (Figura 1.4). Este tipo de compuestos están basados en la química de coordinación del rutenio (Ru).

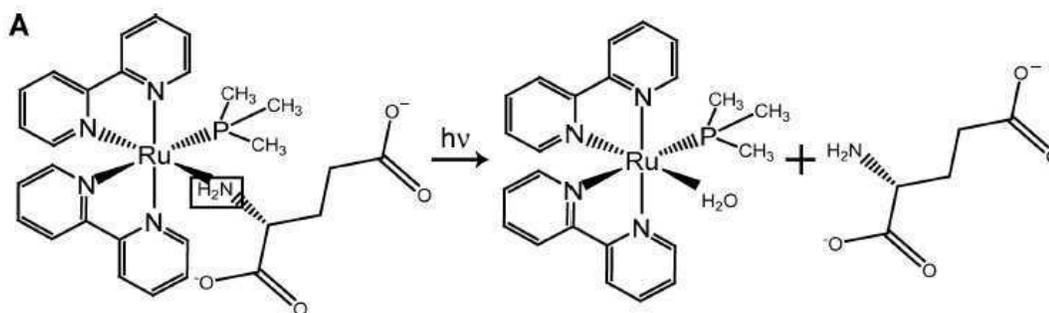


Figura 1.4. Ejemplo de un compuesto enjaulado con base inorgánica. En este caso, la jaula consiste en un átomo central de rutenio unido a dos bipyridinas, una trimetilfosfina, y el ligando enjaulado que es el neurotransmisor glutamato. Al irradiar el complejo con luz visible, la unión entre la jaula y el glutamato se rompe y éste es reemplazado por una molécula de agua. Tomado de Fino 2009 [12].

Una de las familias de complejos más estudiadas por sus múltiples aplicaciones es la estructura $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$, en donde X e Y son ligandos que presentan un solo punto de unión al rutenio (II) y se denominan ligandos monodentados. Esto se debe a

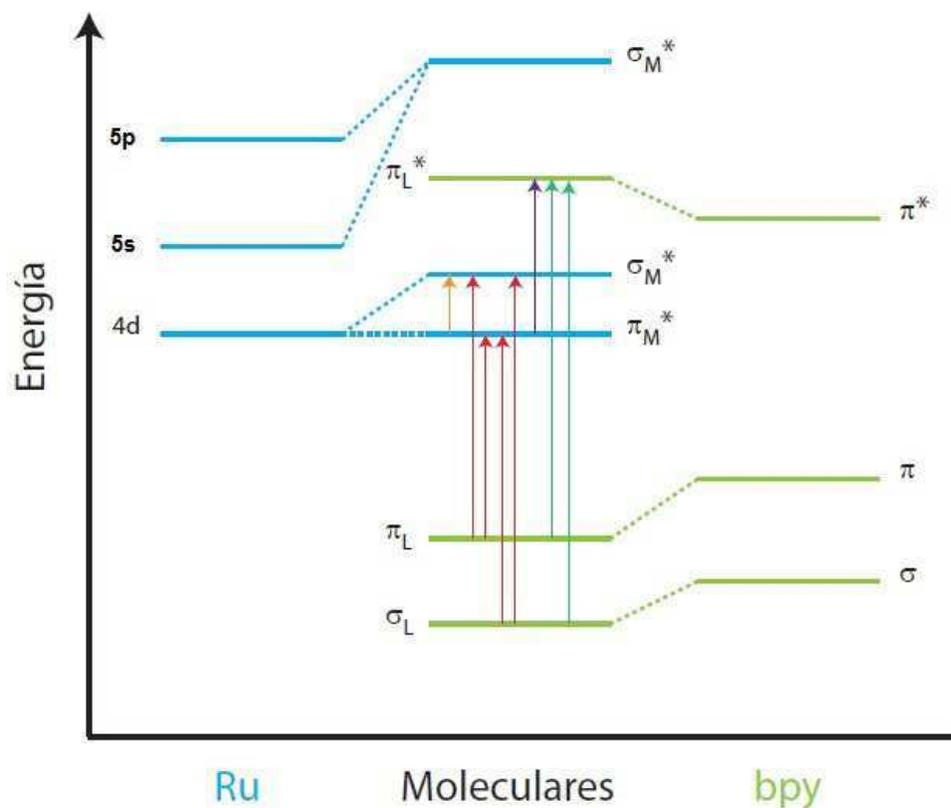
que este tipo de complejos presenta ventajas que lo resaltan como una base química que cumple requisitos muy útiles:

- Absorción en el rango de luz visible
- Alta eficiencia de sustitución de ligandos (eficiencia cuántica)
- Estabilidad frente a descomposición térmica y fotoquímica.

En el complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$ los ligandos se disponen alrededor del átomo central metálico, estableciendo con él enlaces de coordinación. De manera simplificada, puede decirse que en este tipo de enlace es el ligando quien aporta el par de electrones para que la unión química tenga lugar, de manera tal que resulta intuitivo el pensar que para que se concrete este tipo de enlace, el ligando debe tener alta capacidad donora de electrones hacia el metal. En el caso del rutenio, el tipo de complejo más común que forma es estableciendo 6 uniones de coordinación y adoptando una geometría molecular octaédrica. Dentro de estas 6 uniones, podemos encontrar distintos tipos de ligandos, presentado uno o más puntos de unión al centro metálico, lo que les dará el nombre de ligandos monodentados, bidentados, etc.

El rutenio es un metal de transición que se encuentra en el grupo VIII, bloque d, y su configuración electrónica es $[\text{Kr}] 4d^7 5s^1$. Cuando se presenta como Ru^{2+} , posee 6 electrones ubicados en los orbitales d. Las bipyridinas son moléculas con orbitales

donores localizados tanto en los átomos de nitrógeno como en los anillos aromáticos. Cuando se forma el enlace de coordinación, el rutenio acepta densidad electrónica de las bipyridinas (a través de enlaces sigma), mientras que las bipyridinas a su vez aceptan densidad electrónica del metal (a través de interacciones por solapamiento de orbitales π de la bipyridina y d del metal). Cuando se forma el complejo del tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$, se produce la aparición de distintos orbitales moleculares asociados (Figura 1.5). Estos orbitales moleculares serán designados con distintos nombres según reciban una mayor contribución por parte del metal (orbitales M) o por parte del ligando (orbitales L).



Transiciones: MC
LMCT
MLCT
LC

Figura 1.5. Esquematación de los distintos niveles de energía que poseen los orbitales moleculares que aparecen al formarse el complejo a base de Ru-bpy. Se muestran las distintas transiciones electrónicas que pueden producirse: centradas en el metal (MC, naranja), centradas en el ligando (LC, verde), de transferencia de carga ligando-metal (LMCT, rojo) y de transferencia de carga metal-ligando (MLCT, violeta).

Mientras que en el estado basal los orbitales de menor energía se encuentran completos y los de mayor energía se encuentran vacíos, distintos procesos como la absorción de luz o la oxido-reducción pueden producir transiciones a estados excitados. Los orbitales moleculares involucrados en las transiciones se clasifican según: si se encuentran sobre el átomo metálico, será una transición centrada en el metal (MC), también llamada d-d, mientras que si ocurre lo mismo pero con orbitales localizados sobre los ligandos, será una transición centrada en el ligando (LC); si los orbitales involucrados en la transición son de carácter diferente, se nombrarán dependiendo del sentido en el que se produce la transferencia electrónica, pudiendo ser desde el metal hacia el ligando (*Metal to Ligand Charge Transfer*, MLCT) o viceversa (*Ligand to Metal Charge Transfer*, LMCT).

Para el complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$, el estado excitado que resulta útil en procesos de luminiscencia corresponde a la transición del tipo MLCT ubicada en la región de luz visible, razón por la cual las rutas de excitación y relajación asociadas a este estado [13,14] han sido las más estudiadas para su explotación en el campo de los compuestos enjaulados. Es importante destacar que este estado también puede alcanzarse por procesos multifotónicos [15], otra característica muy valiosa para la investigación en este campo.

Resumiendo todo lo mencionado hasta acá, podemos enumerar algunas características de los procesos de excitación y relajación que ocurren en el complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$, como camino para comprender cómo se produce la fotoliberación de ligandos de interés biológico y cómo se pueden utilizar estas características para diseñar y sintetizar compuestos de coordinación. Primero, el espectro de absorción es dominado por una transición de excitación hacia un estado MLCT de carácter singulete ($^1\text{MLCT}$), que luego de la excitación decae a un estado de carácter triplete ($^3\text{MLCT}$), en menos de 1 ps y con una eficiencia muy cercana a 1. Segundo, además de los distintos estados excitados MLCT, existe también un estado excitado no enlazante d-d del rutenio (centrado en el metal) que puede ser poblado por activación térmica desde los estados $^3\text{MLCT}$. Tercero, que estos estados d-d constituyen la vía principal de fotosustitución química y representan una vía importante de desactivación del estado $^3\text{MLCT}$ a temperatura ambiente. Cuarto, que el estado no enlazante d-d es un estado prohibido termodinámicamente y por lo tanto no es accesible desde el estado basal. Todas estas transiciones y sus constantes cinéticas asociadas se esquematizan en la Figura 1.6. Observando este diagrama de Jablonski puede comprenderse por qué la posición de la banda de absorción respecto de la energía del estado d-d determina la probabilidad de que el estado excitado se relaje a través de un mecanismo fotodisociativo y produciendo la fotosustitución de los ligandos. Interesantemente, la vía de relajación a través de fotosustitución de los ligandos será

la más favorable cuanto menor sea la diferencia de energías del estado $^3\text{MLCT}$ con respecto al estado d-d, y esta diferencia a su vez disminuye cuanto más alta se encuentre la banda $^1\text{MLCT}$ (Figura 1.7). Las posiciones relativas de los estados excitados $^3\text{MLCT}$ y d-d dependen de la combinación de ligandos alrededor del átomo central de rutenio y de su capacidad de modificar la densidad electrónica sobre él [13].

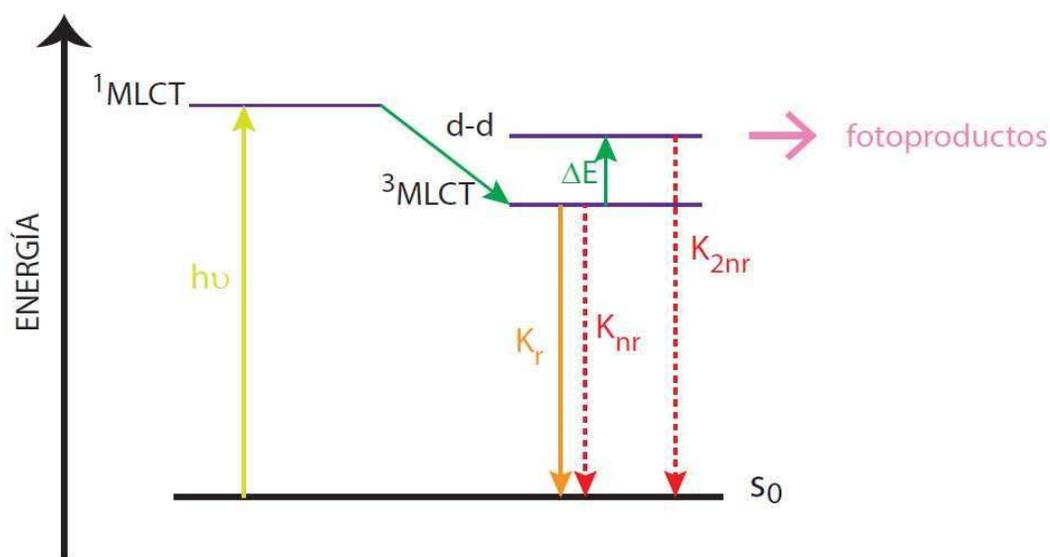


Figura 1.6. Diagrama de Jablonski mostrando los estados excitados de baja energía en $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$. K_r : constante cinética de la vía radiativa. K_{nr} : constante cinética de la vía no radiativa. ΔE : energía necesaria para pasar del estado $^3\text{MLCT}$ al estado d-d. S_0 : estado fundamental. $h\nu$: fotón absorbido.

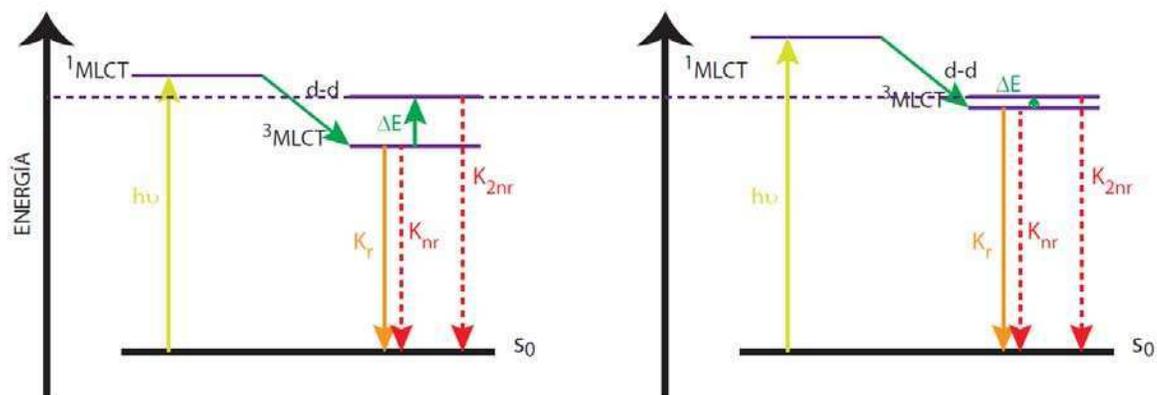


Figura 1.7. Esquema para comprender por qué al aumentar la energía de la banda MLCT aumenta la eficiencia cuántica de fotoliberación. Notar cómo los niveles de energía de $^1\text{MLCT}$ y $^3\text{MLCT}$ aumentan juntos, mientras que la energía de la banda d-d se mantiene casi igual. De esta forma, la energía necesaria ΔE para pasar de $^3\text{MLCT}$ a d-d disminuye, aumentando la probabilidad de pasar a este estado y por lo tanto generar fotoproductos.

Para el complejo que venimos analizando de fórmula general $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$, los ligandos monodentados X e Y modifican la posición de la banda MLCT dependiendo de su carácter donador o aceptor de electrones. De esta manera, los ligandos aceptores, que reducen la densidad electrónica sobre el metal, provocan el corrimiento de esta banda a longitudes de onda más cortas, es decir, de mayor energía lo cual ha sido explicado por la estabilización de los orbitales *d* del metal y el consecuente aumento en la separación de los orbitales $d\pi(\text{Ru})-\pi^*(\text{bpy})$ [16]. Por otro lado, la coordinación de

un ligando donador baja la energía de la transferencia de carga desde el rutenio hacia las bipyridinas (es decir baja la energía necesaria para la transición hacia el estado $^1\text{MLCT}$). Sin embargo, es importante destacar que la estabilización de los orbitales d del metal prácticamente no modifica la energía de la transición $d-d$, ya que al estar centrada en el metal esta transición no depende de las diferencias de energía entre orbitales del metal y del ligando. Por todo esto, el corrimiento de la banda MLCT influye directamente sobre la eficiencia cuántica de fotosustitución: cuanto mayor es la energía requerida para la transición hacia el estado $^1\text{MLCT}$, más alta es la tasa de fotoliberación de los ligandos monodentados, ya que se produce una reducción de la energía necesaria para alcanzar el estado excitado $d-d$, favoreciendo así las vías de relajación disociativas.

También puede observarse que la naturaleza aceptora o donora de electrones del ligando tendrá influencia directa sobre el potencial de oxidación de la cupla $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$, lo cual ha sido descrito por Pinnick y Durham (1984) [17]. De esta forma, a medida que el ligando es más aceptor, aumenta el potencial de oxidación de la cupla antes mencionada.

Al producirse la fotorreacción de liberación del ligando de interés a partir de complejos enjaulados de rutenio, se produce el intercambio de este ligando por otra molécula, que en general es el solvente o bien un contraión. Esta reacción de fotosustitución de

ligandos puede presentar distintos valores de eficiencia cuántica dependiendo de la naturaleza de los ligandos unidos al rutenio. En la Tabla 1.1 se muestran los valores de eficiencia cuántica de fotosustitución para complejos de fórmula general $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$.

	XY	$\lambda_{\text{MLCT}}/\text{nm}^{\text{a}}$	$E_{1/2}/\text{V}^{\text{b}}$	$\phi_{\text{lib}}^{\text{a}}$
1	(piridina)(Cl)	505	0.79	0.04
2	(4-acetilpiridina)(Cl)	495	0.82	0.07
3	(imidazol) ₂	488	1.02	0.001
4	(N-metilimidazol) ₂	483	0.94	0.001
5	(CH ₃ CN)(Cl)	481	0.86	0.12
6	(piridina) ₂	454	1.3	0.2
7	(4-acetilpiridina) ₂	442	1.45	0.29
8	(3-iodopiridina) ₂	442	1.36	0.24
9	(piridazina) ₂	440	1.42	0.06
10	(CH ₃ CN) ₂	426	1.44	0.31

^a Determinado en diclorometano. ^b Determinado en acetonitrilo vs SSCE

Tabla 1.1. Posición de la banda MLCT (λ_{MLCT}), potencial de oxidación ($E_{1/2}$) y eficiencia cuántica de fotosustitución (ϕ_{lib}) para distintos compuestos del tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$. Adaptado de Pinninck y Durham 1984 [17].

En las Figuras 1.8 y 1.9 se muestran los gráficos de eficiencia cuántica y de potencial redox de la cupla $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ en función de la absorbancia máxima de la banda MLCT. Se observa que existe una correlación lineal entre estos parámetros en ambos casos, de manera tal que a medida que aumenta la energía de la transición hacia la banda MLCT (o sea que se desplaza la banda hacia longitudes de onda más cortas), la eficiencia cuántica y el potencial redox aumentan [17].

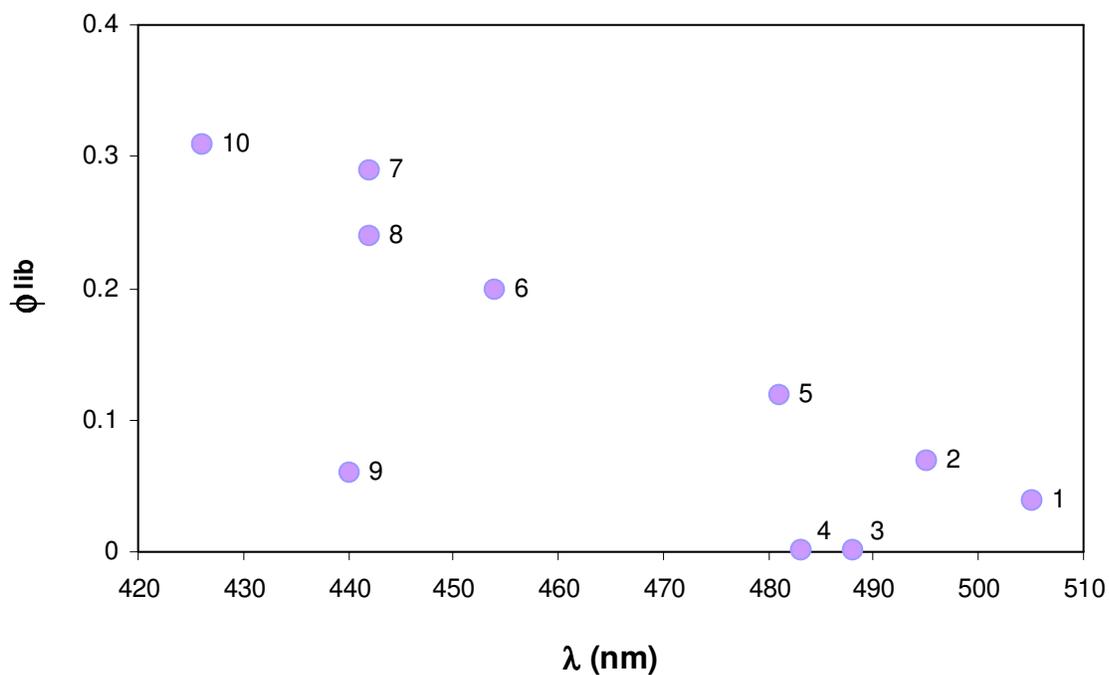


Figura 1.8. Correlación entre la longitud de onda de la banda MLCT y la eficiencia cuántica de fotoliberación (ϕ_{lib}) para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$. Datos en la Tabla 1.

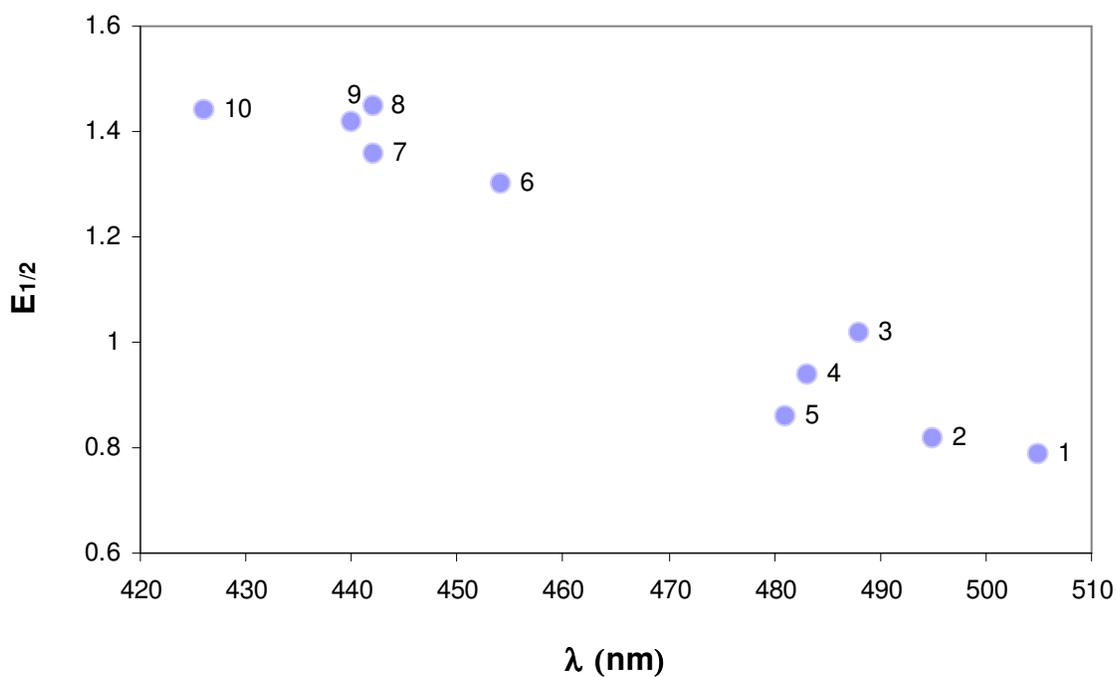


Figura 1.9. Correlación de la longitud de onda de la banda MLCT con el potencial redox ($E_{1/2}$) de la cupla Ru^{II}/Ru^{III} para $[Ru(bpy)_2(X)(Y)]^{n+}$. Datos en la Tabla 1.

En términos generales, los ligandos monodentados aceptores coordinados al rutenio central modifican la banda MLCT que se corre hacia energías mayores, aumentando consecuentemente la eficiencia cuántica de fotosustitución. Teniendo en cuenta esto, resulta evidente que la manipulación de estos ligandos puede utilizarse como herramienta para el diseño y desarrollo de compuestos enjaulados que cumplan con requisitos fundamentales para su uso como herramienta de liberación de moléculas de interés biológico.

Dentro de lo que es la familia de compuestos enjaulados a base de rutenio, ya han sido enjaulados en nuestro laboratorio neurotransmisores y agonistas como ácido γ -amino butírico (GABA), glutamato, glicina, serotonina, 4-aminopiridina, entre otros y moléculas con actividad moduladora en el sistema nervioso como nicotina. Estos compuestos han sido caracterizados y varios de ellos han sido utilizados exitosamente por diversos grupos de investigación en distintas preparaciones biológicas [18-23].

Sin embargo, mientras que su función ha sido probada de manera robusta en preparaciones *in vitro*, muy pocos antecedentes existen del uso de compuestos enjaulados con base de rutenio en experimentos biológicos *in vivo* [24,25]. Resulta evidente que la posibilidad de manipular ópticamente la actividad neuronal en un modelo animal vivo representa una poderosa herramienta a la hora de responder todo tipo de preguntas sobre el funcionamiento del sistema nervioso. Además, sumando la posibilidad de activar el complejo con luz visible, puede apuntarse a desarrollar técnicas accesibles a un mayor número de investigadores y ampliar así la gama de dispositivos disponibles para responder preguntas importantes de la neurofisiología.

1.2 Microscopía de dos fotones y compuestos enjaulados

A la hora de trabajar con compuestos enjaulados, una de las ventajas más importantes que se encuentran es la gran resolución espacial que puede alcanzarse en la

liberación de la molécula biológica de interés. De esta manera, el área de la célula o tejido a estimular estará limitada solamente por la capacidad del investigador de reducir al máximo el área en la cual incide la luz con la que irradiará la muestra. Ya ha sido descrito antes cómo la gran dispersión de la luz UV en tejidos biológicos presenta una desventaja fundamental en este sentido. Al abrirse la posibilidad de desenjaular con luz en el rango visible, usando compuestos enjaulados de rutenio, puede dirigirse la liberación hacia puntos mucho mejor definidos en el espacio. Para trabajar en tejidos u órganos en experimentos biológicos, las herramientas que nos ofrece la microscopía tradicional de 1 fotón (1P) incluyen la combinación de microscopía de campo amplio y técnicas más avanzadas de procesamiento con deconvolución y microscopía confocal. Para esto se utiliza en general excitación con luz UV o visible en el rango verde/azul. Como se ha descrito anteriormente, la luz UV presenta altos niveles de dispersión en el tejido, mientras que la luz visible la presenta en menor medida, pero aún la profundidad en el tejido que puede alcanzarse con ella es poca. Además, al utilizar fotones en ese rango de longitudes de onda, la relación lineal existente entre la intensidad de la luz y la absorción hace que la liberación se produzca no sólo en el punto focal, sino también en buena medida en los conos de luz que se forman arriba y abajo de ese punto. Efectivamente, si se integra la cantidad de fotoliberación total que ocurre en cada sección del cono de luz, la misma es constante. Es decir, la cantidad de biomoléculas totales fotoliberadas en el volumen focal será la

misma que las que se liberaron 1 mm sobre el foco. Aunque la concentración de luz en este plano superior es mucho menor ya que el diámetro del haz es mucho mayor a esta altura, la cantidad de moléculas difundiendo desde todos estos planos constituyen un problema debido a su acumulación cuando se pretenden excitar muchos puntos durante un experimento.

Una solución técnica de gran valor para este fenómeno es el uso de microscopía de dos fotones (2P) para la liberación. En este tipo de microscopía, se utiliza luz de longitud de onda en el rango IR (menor energía), de manera tal que la excitación ocurrirá cuando dos fotones IR sean absorbidos de manera prácticamente simultánea por la molécula fotoactiva; esto resulta en una dependencia cuadrática de la absorción con la intensidad de la luz, disminuyendo drásticamente la absorción fuera de la zona focal. Para la excitación en 2P, se utiliza luz IR y se considera que la absorción de dos fotones de esta energía provoca un estado de excitación similar al que ocurriría con un fotón del doble de energía (mitad de la longitud de onda). Utilizando el método de 2P se logra una resolución espacial que puede llegar a menos de $1 \mu\text{m}^3$. Otra ventaja del uso de luz de menor energía es el hecho de que esta luz sufre muy poca dispersión dentro del tejido y además se absorbe menos, limitando su acción a un volumen muy pequeño y por lo tanto reduciendo las posibilidades de provocar fotodaño. Para poder obtener señales de fluorescencia (o excitar una molécula enjaulada) en régimen de 2P, la densidad de fotones en el punto focal debe ser extremadamente alta, y a la vez no

dañar el tejido en estudio. Para lograr esto, se utilizan láseres pulsados de femtosegundos o picosegundos, que emiten pulsos de luz con una alta potencia instantánea, separados por un periodo inter-pulso en el que no emiten fotones [26]. Esto es esquematizado en la Figura 1.10. La Figura 1.11 muestra la enorme diferencia en los patrones de excitación de fluorescencia con regímenes de 1P y 2P.

El uso de microscopía de dos fotones en sistemas biológicos [27,28] combinado con el uso de compuestos enjaulados ha sido utilizado para el mapeo funcional de receptores colinérgicos con alta resolución espacial [29], así como también se ha logrado la excitación de sinapsis individuales utilizando la versión enjaulada del neurotransmisor glutamato [30-33]. En sus trabajos publicados en el año 2006, Araya et al. logran estimular sinapsis individuales a nivel de espinas dendríticas utilizando glutamato enjaulado. Las espinas dendríticas son una característica ubicua del sistema nervioso; reciben señales de llegada (*inputs*) excitatorias en muchos tipos de neuronas, mientras que en neuronas sin espinas esas señales de llegada excitatorias contactan con el cuerpo de la dendrita (*dendritic shaft*). La función de las espinas aún no ha sido comprendida totalmente y en los últimos años han sido objeto de numerosos estudios, ya que se cree que su función no sólo se limita a la recepción de señales sinápticas, sino que probablemente realizan una función específica con esas señales. Las espinas son compartimentos de calcio y por lo tanto restringen reacciones bioquímicas locales a *inputs* únicos, pero como las neuronas sin espinas también pueden presentar una

compartimentalización de calcio similar, se cree que las espinas podrían llevar a cabo otras funciones adicionales.

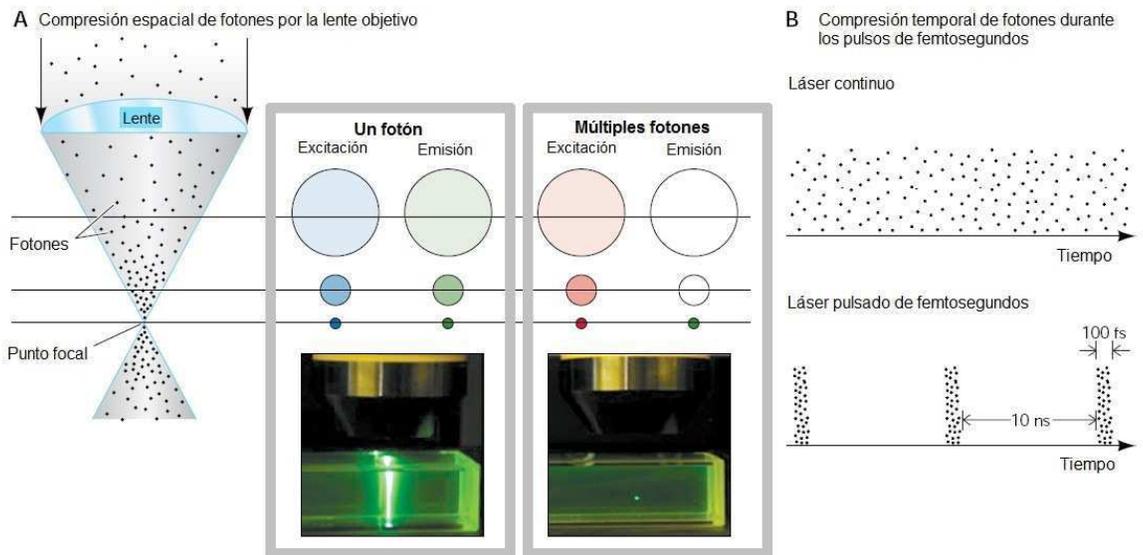


Figura 1.10. Principios de microscopía de dos fotones. A) Diferencias entre excitación por uno y dos fotones. En ambos casos la compresión espacial de los fotones por el objetivo es máxima en el punto focal, y la densidad de fotones disminuye con la distancia hasta este punto. Sin embargo, en régimen tradicional de un fotón la excitación del fluoróforo ocurre a través de todo el camino óptico, provocando emisión de fluorescencia por encima y por debajo del plano focal. La excitación por dos fotones restringe la emisión al punto focal, debido a la relación cuadrática entre la intensidad de la excitación y la emisión de fluorescencia. Las fotografías ilustran la fluorescencia en una cubeta con fluoresceína como resultado de la irradiación con un láser de un fotón a 488 nm (izquierda) o un láser de dos fotones emitiendo pulsos de femtosegundos a 780 nm (derecha). B) la compresión temporal de los fotones en paquetes de 100 fs permite alcanzar la alta potencia instantánea requerida para la excitación por dos fotones. Adaptado de Stutzmann 2005 [26].



Figura 1.11. Imagen tomada del website del *Belfield Research Group* en donde irradian una cubeta con fluoresceína en régimen de un fotón y otra en régimen de dos fotones (en este caso ambos pulsados), para mostrar la alta localización espacial de la excitación por dos fotones. Tomado de <http://chemistry.cos.ucf.edu/belfield/photophysics>.

El uso de glutamato enjaulado combinado con microscopía de 2P ha permitido responder importantes preguntas con respecto a la función de las espinas dendríticas. En la Figura 1.12 se muestra un ejemplo de estos experimentos que permite apreciar la alta resolución espacial alcanzada para la estimulación. En este trabajo publicado por Araya et. al. [33], se utilizó glutamato enjaulado (MNI-glutamato, el cual posee base orgánica) para estimular espinas dendríticas en rodajas de cerebro de ratón. Se seleccionaron dos puntos cercanos a la cabeza de la espina, uno más cerca de ella y otro más lejos, con tan sólo $1 \mu\text{m}$ de distancia entre los puntos (puntos 1 y 2 en la Figura 1.12). El aumento en el voltaje medido en soma sólo se observó en el caso en

que fue estimulado el punto 1. Esto evidencia la gran resolución espacial que puede lograrse usando esta herramienta molecular.

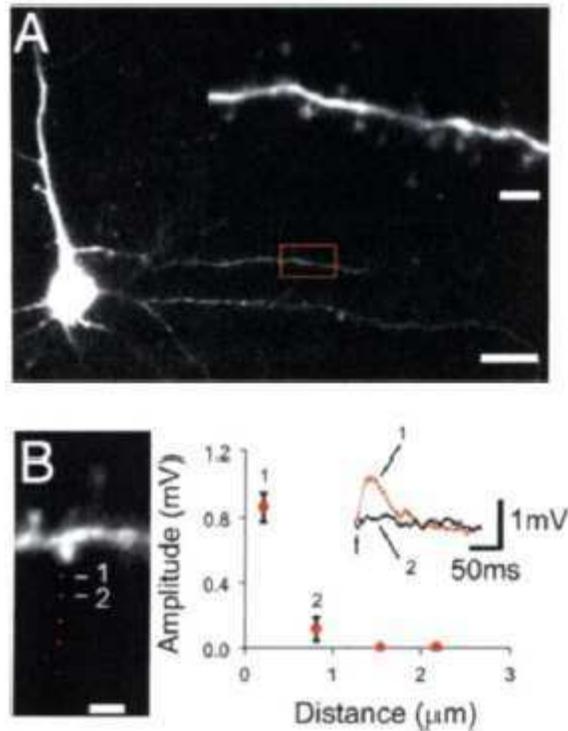


Figura 1.12. Experimento que utiliza glutamato enjaulado para estimular sinapsis a nivel de espina dendrítica. A) célula piramidal de la capa 5 cargada con Alexa Fluor 488 (barra de escala: 20 μm). Inserto: dendrita representativa (barra de escala: 3 μm). B) Resolución espacial del desenjaulado. Los puntos rojos indican distintas distancias de activación con respecto a la cabeza de la espina (barra de escala: 1 μm). El gráfico muestra el efecto de la distancia sobre la potencia del desenjaulado. Inserto: promedio de 10 potenciales excitatorios post-sinápticos (*Excitatory Post Synaptic Potentials*, EPSPs) en la posición 1 (trazo rojo) y 2 (trazo negro). Tomado de Araya 2006a [33].

En cuanto a los compuestos enjaulados a base de rutenio, también han sido liberados en régimen de dos fotones [12,21,34,35] demostrando que tienen la capacidad de ser utilizados en este tipo de configuración experimental (Figura 1.13). En estos experimentos realizados por Fino et. al. [12], se utilizó glutamato enjaulado a base de rutenio (RuBi-Glu) para evocar potenciales de acción estimulando múltiples puntos del soma celular (se estimulan puntos múltiples ya que la estimulación de un solo punto no generaba una depolarización suficiente para disparar potenciales de acción). Estos experimentos mostraron por primera vez la capacidad de RuBi-Glu de ser activado por la absorción casi simultánea de dos fotones de luz IR (régimen de dos fotones).

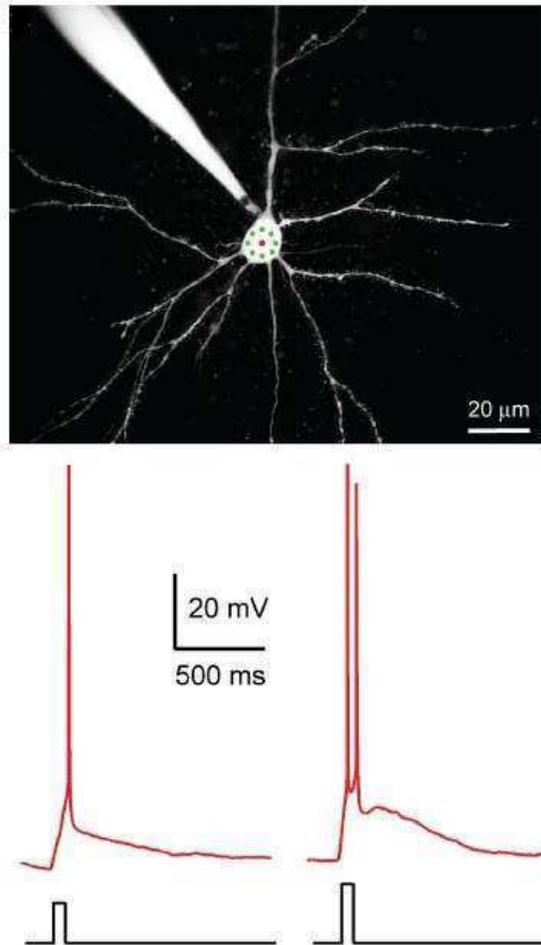


Figura 1.13. Ejemplo de un experimento en el cual se utilizó RuBi-Glutamato (glutamato enjaulado a base de rutenio) para estimular una neurona en régimen de 2P. En la fotografía se muestra una célula piramidal de la capa 2/3 cargada con Alexa-594 y las posiciones de múltiples puntos blanco para el desenjaulado ubicados en el soma celular (panel superior). En el panel inferior, potenciales de acción disparados por el desenjaulado de RuBi-Glu (300 μM), medidos en configuración de fijación de corriente. En este ejemplo, un potencial de acción fue evocado con una potencia sobre la muestra de 180 mW y dos con 200 mW. Tomado de Fino 2009 [12].

1.3 Oscilaciones neuronales

La cuestión del tiempo ha sido abordada por distintas disciplinas académicas a lo largo de la historia y hasta nuestra actualidad. La filosofía, la física, la ingeniería, las ciencias sociales entre otras nos brindan distintas concepciones, interpretaciones y hasta definiciones de su significado. Mientras que desde una mirada el tiempo es una magnitud física objetiva y que se puede medir, desde una mirada opuesta se lo interpreta como una abstracción subjetiva sin ningún tipo de sustrato físico. Interesantemente, cuando trabajamos en neurociencias, sin darnos cuenta estamos asumiendo que el tiempo es una magnitud medible y, más interesante aún, que el cerebro tiene una manera de medirlo.

Y si hablamos del tiempo y de los procesos naturales que en él ocurren, debemos referirnos necesariamente al concepto de periodicidad: esta propiedad rige tanto a los sistemas vivos como no vivos, y se refiere al hecho de que un patrón o estructura se repite a lo largo del tiempo o el espacio. El cerebro obviamente no escapa a esta ley, y es así que hoy en día se sabe que tiene la habilidad de generar y de percibir información temporal en distintas escalas, y que de esta habilidad dependen las más diversas de sus funciones, desde tareas cognitivas hasta la posibilidad de ejercer control sobre las funciones motoras. El estudio detallado de estas oscilaciones neuronales es hoy en día un campo cada vez más estudiado dentro de las

neurociencias, ya que se ve a estas oscilaciones como el “puente funcional” que existe entre la actividad de neuronas únicas y el comportamiento.

Se sabe hoy que oscilaciones neuronales en distintas bandas de frecuencias representan distintos estados comportamentales, y se cree que tienen su correlato fisiológico en la actividad coherente de poblaciones neuronales cooperativas. Estas oscilaciones han sido relacionadas en diferentes estudios con importantes procesos neuronales: facilitación de la plasticidad neuronal [36], correlación con procesos de atención [37] y relaciones perceptuales [38], así como también se ha propuesto que juegan un rol en la coordinación transiente entre distintas regiones cerebrales [39].

Para el estudio de este tipo de oscilaciones se utiliza el registro de Potenciales de Campo Local (*Local Field Potential* - LFP por sus siglas en inglés). El LFP es el potencial eléctrico existente en el espacio extracelular del cerebro (medido siempre entre la zona de interés y otro punto del cerebro que se toma como referencia), y representa la integración de la actividad de una gran población de neuronas. Cualquier membrana excitable, sea un axón, una dendrita, o el soma, y cualquier corriente transmembrana, rápida o lenta, puede influir en el potencial eléctrico en un determinado punto del espacio extracelular. El rango de la señal electrofisiológica que típicamente se asocia al LFP es abajo de 300 Hz. Como las componentes de frecuencia de los potenciales de acción son altas, arriba de 500 Hz, estos son filtrados

cuando se analiza solamente el LFP (ya que sólo se toma la señal comprendida entre 0 y 300 Hz). Es común, por lo tanto, decir que el LFP comprende sólo la actividad subumbral de las neuronas (potenciales excitatorios e inhibitorios). A pesar de que su nombre sugiere localidad, en su origen también están oscilaciones distantes (de otras áreas), que llegan por “conducción de volumen” [44].

El LFP se obtiene a través de electrodos extracelulares que pueden ser de metal, de silicio o micropipetas de vidrio, y es diferente a otros métodos clásicos de registro de la actividad neuronal, como el EEG (electroencefalograma), que se se obtiene a través de electrodos colocados en la superficie del cráneo, y el ECoG que se hace en contacto directo con el cerebro, sin penetrar en él. El LFP tiene una amplitud mayor por registrarse más cerca de las neuronas en actividad, y brinda información específica de la región del cerebro en la cual ubiquemos los electrodos, a diferencia del EEG, en el cual pueden estar varias poblaciones neuronales distintas “aportando” al registro.

Actualmente el registro de LFP es ampliamente utilizado ya que brinda información muy valiosa sobre la función cerebral al nivel de poblaciones neuronales. A través de su estudio detallado puede obtenerse información en una escala diferente a aquella que observamos al analizar frecuencias de disparo de potenciales de acción. De este modo, el LFP es sensible a procesos integrativos que no se observan al registrar

neuronas únicas, y lleva información correspondiente a la actividad excitatoria/inhibitoria de redes neuronales así como también de circuitos modulatorios.

A lo largo del tiempo han existido controversias en cuanto a cuál es el correlato fisiológico de los potenciales de campo local. Inicialmente se creyó que eran producto de potenciales post-sinápticos provenientes de la excitación sincronizada de una población de neuronas. Actualmente se acepta que provienen de corrientes sinápticas sincronizadas que forman dipolos en la dirección perpendicular a la de propagación de las señales [40,41,42]. Sin embargo, todavía no existe consenso absoluto en la comunidad científica y aún siguen apareciendo artículos que proponen alternativas al modelo dipolar que ha sido aceptado en las últimas 6 décadas [43].

También se han desarrollado diferentes teorías sobre a qué cantidad de neuronas corresponde la actividad que se está registrando. En un artículo publicado en 2001, Kajikawa et al. [44] realizaron registros en corteza auditiva de primates no humanos, y llegaron a la conclusión de que si bien tradicionalmente se creía que el área que aportaba al LFP no llegaba a ser más que algunos cientos de micrómetros, en algunos casos este área podía llegar a superar el centímetro. Linden et al. (2001) [41] utilizaron el método de modelado de redes neuronales para simular LFP y mostraron que la cantidad de neuronas que aportan a este registro depende de su morfología, de la distribución de las sinapsis y del nivel de correlación entre esas sinapsis: cuanto más

correlacionadas estén las neuronas cuya actividad está aportando al LFP, mayor será la región cerebral generando la señal.

Lo que también se acepta actualmente y que puede resultar llamativo, es que los potenciales de acción aportan una parte muy pequeña al potencial de campo local. Esto ocurre ya que el tejido cerebral actúa como un filtro pasabajos, y las frecuencias altas, como aquellas generadas por los potenciales de acción, son filtradas más eficientemente mientras que las frecuencias más bajas como aquellas generadas por potenciales sinápticos sufren una atenuación menor al propagarse por el tejido.

Como dijimos antes, el LFP comprende las frecuencias bajas (< 300 Hz) del registro electrofisiológico extracelular. Existe un amplio rango de tamaños de poblaciones neuronales generando cada tipo de señal; sin embargo, luego de muchos años de estudio sobre el LFP se han encontrado distintas bandas de frecuencia que presentan cambios característicos como respuesta a eventos sensoriales, motores y cognitivos [46-48].

La banda de menor frecuencia y de mayor amplitud que se define es la banda *delta*, que comprende entre 1 y 4 Hz y ha sido relacionada principalmente con la etapa de sueño de ondas lentas [49], ya que su amplitud aumenta considerablemente en este momento del ciclo sueño-vigilia, y también es observada cuando el animal se

encuentra despierto y quieto. Estudios más recientes han relacionado a la banda *delta* con los procesos de toma de decisiones [50].

La banda *theta* comprende las frecuencias entre 4 y 12 Hz y ha sido estudiada en profundidad en el hipocampo de roedores [51], donde se la ha relacionado con la exploración espacial [52], la memoria [53] y el sueño [54] (en particular, la etapa de sueño REM en la cual la amplitud de las oscilaciones *theta* aumenta considerablemente con respecto a su amplitud durante la vigilia en hipocampo). Además, las oscilaciones *theta* también se han encontrado en otras áreas del cerebro, tanto corticales como subcorticales [55-58]. En particular, la amplitud de las oscilaciones *theta* en corteza prefrontal y su acoplamiento y/o sincronización con las oscilaciones *theta* y *gamma* (30 – 110 Hz) tanto en hipocampo como en otras regiones corticales son parámetros que han sido relacionados con la memoria espacial tanto en roedores [59] como en humanos [60,61].

La banda de frecuencia más alta se conoce como *gamma* y corresponde a valores entre 30 y 110 Hz. Esta banda es generada por poblaciones neuronales más pequeñas que la banda *theta*, la cual está asociada a poblaciones neuronales de mayor extensión. En el hipocampo y en la corteza, la banda *gamma* juega un importante rol tanto en la adquisición como en la evocación de distintos tipos de memorias [62-64]. Por otro lado, también se ha encontrado que guarda relación con procesos patológicos asociados a esquizofrenia [65,66].

En la Figura 1.14 Se muestra a modo de ejemplo un LFP. Este registro fue realizado por Scheffer et. al. [72] a través de electrodos extracelulares ubicados en la región CA1 del hipocampo de ratas. El trazo negro muestra un típico registro de LFP en crudo (sin filtrar), en donde puede verse que las frecuencias bajas poseen una alta amplitud y las frecuencias altas, baja amplitud. Típicamente, el LFP varía entre 0.5 y 2 mV. Para poder analizar cada frecuencia por separado, el LFP debe ser filtrado. En este ejemplo, el trazo rojo representa la señal luego de ser filtrada para la banda *high-gamma*, entre 80 y 110 Hz.

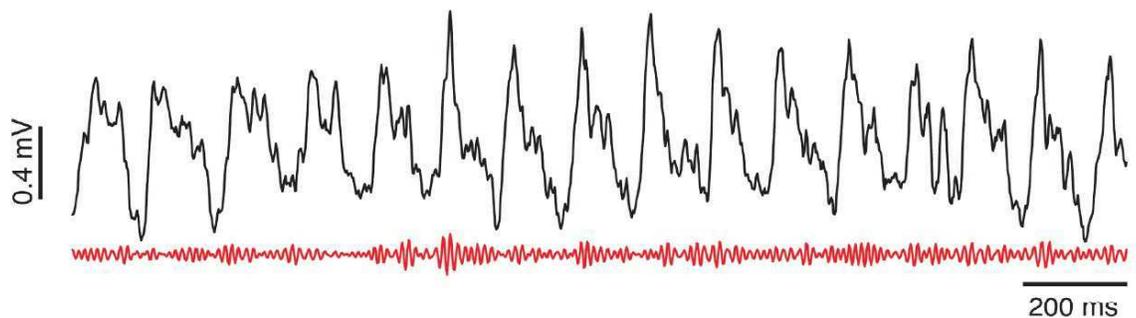


Figura 1.14. LFP crudo (negro) y filtrado para la banda de frecuencia *high-gamma* (80-110 Hz, rojo). Tomado de Scheffer 2011 [72].

Hasta aquí, hemos hecho una tarea descriptiva de algunas de las bandas de frecuencias en las que se divide al LFP, listando una gran cantidad de procesos con los que se las ha asociado en numerosos artículos sobre el tema. Sin embargo, en los últimos años han surgido interrogantes acerca de cuál es el rol que juegan las oscilaciones neuronales en el cómputo y comunicación entre distintas regiones cerebrales a gran escala. Se cree hoy que la información y su procesamiento están integrados a través de múltiples escalas espaciales y temporales, y que la interacción entre distintas oscilaciones podría ser un proceso plausible para llevar a cabo esta integración. Esta interacción se denomina acoplamiento entre frecuencias (AEF) y puede encontrarse entre distintos parámetros de las oscilaciones neuronales: puede ser entre sus fases, entre sus amplitudes o puede observarse que la fase de una determinada frecuencia está modulando la amplitud de una frecuencia mayor. Este último tipo de AEF es el que nos interesa en este trabajo.

La Figura 1.15 fue realizada por Tort et. al. [123] en una publicación donde presentan un método propio para calcular la fuerza (o magnitud) del acoplamiento entre frecuencias del tipo fase-amplitud, método que es utilizado en el presente trabajo. La figura muestra en detalle el procedimiento para calcularlo. Primero, se obtiene el LFP crudo, que debe ser filtrado en las frecuencias que se quieren estudiar. En este caso, se filtra la frecuencia *theta*, entre 5 y 12 Hz. Luego, para el mismo periodo de tiempo se obtiene la fase a lo largo del tiempo, cuyo valor varía entre 0° y 360°. Cabe recordar

que cuando la fase es 0° o 360° corresponde a un valle, y cuando es 180° corresponde a un pico. En el siguiente paso la señal es filtrada para *low-gamma* (*LG*, entre 30 y 60 Hz), y se calcula la amplitud de esta banda, representada por el trazo grueso en la Figura 1.15D. Este trazo corresponde a la envolvente de la onda, es decir un “delineado” de su forma que termina representando la amplitud de esta onda a lo largo del tiempo. Finalmente, se construye una serie temporal de amplitud de *LG* versus fase de *theta* (Figura 1.15E), y la fuerza de la comodulación se calcula como el Índice de Modulación (IM), midiendo la divergencia entre la distribución observada y una distribución uniforme.

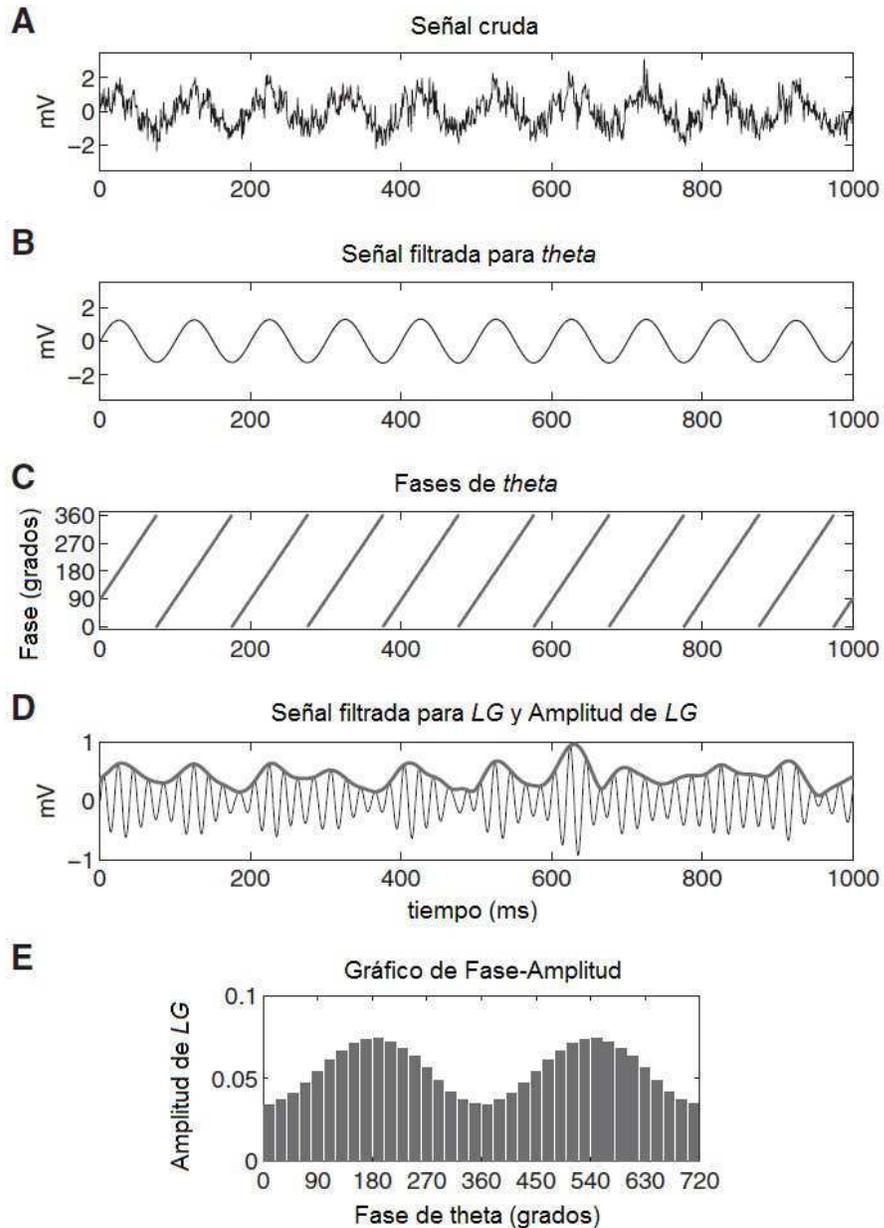


Figura 1.15. Pasos en el cómputo del gráfico fase-amplitud y el Índice de Modulación (IM). La señal cruda (A) es filtrada para las bandas de frecuencia de interés, tanto de fase (B) como de amplitud (D, trazo fino). Luego se calcula la serie temporal de la fase (C) y la envolvente de la onda (D, trazo grueso), a partir de las señales filtradas. Luego se construye una serie temporal compuesta de fase-amplitud y es utilizada para obtener la distribución de la amplitud sobre los intervalos de fase (E). El IM se obtiene midiendo la divergencia entre la distribución de amplitud observada con respecto a la distribución uniforme. LG, low-gamma (30-60 Hz). Adaptado de Tort 2010 [123].

Para ilustrar el concepto de fuerza de la comodulación, en la Figura 1.16 se muestran 4 casos en los cuales se observan 4 valores diferentes de IM. En el Caso 1, la distribución fase-amplitud es uniforme, no se encuentra dependencia entre la fase de una frecuencia y la amplitud de la otra, por lo tanto no hay comodulación y el IM es cero. En el Caso 2, la distribución se aparta de una distribución uniforme y el IM aumenta. En los Casos 3 y 4, es interesante observar como la amplitud de la frecuencia más alta (llamada frecuencia de amplitud, f_A , trazos inferiores en la Figura 1.16A) es dependiente de la fase en la que se encuentra la frecuencia más baja (llamada frecuencia de fase, f_i , trazos superiores). Es decir, cuando la frecuencia baja (f_i) se encuentra en un pico (fase de 180°), la amplitud de la frecuencia alta (f_A) es máxima, mientras que en los valles (fase de 0° o 360°), su amplitud es mínima. Por supuesto, en estos casos el IM, valor que representa la fuerza de la comodulación, es alto.

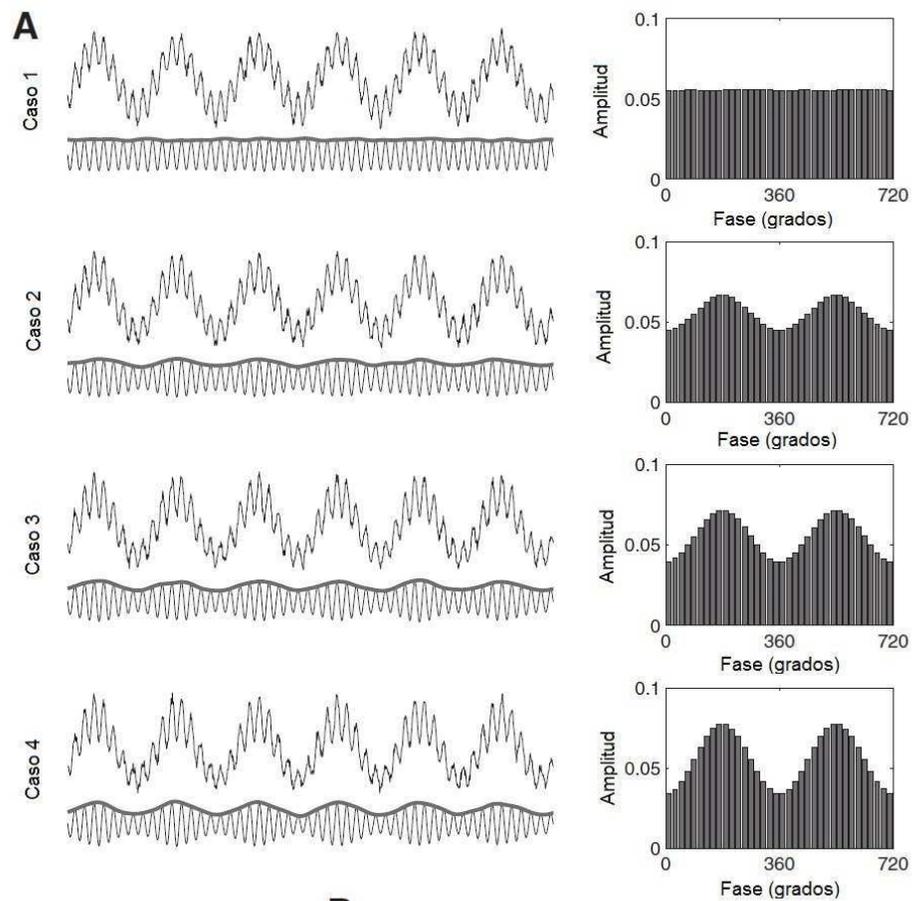


Figura 1.16. Utilidad del Índice de Modulación (IM) para estimar el acoplamiento fase-amplitud. A, izquierda: se muestran 4 casos que difieren en la fuerza de la comodulación (trazos superiores) junto con sus correspondientes gráficos de fase-amplitud (paneles de la derecha). Los trazos finos y gruesos mostrados debajo muestran la señal filtrada para LG y la envolvente de la onda, respectivamente. B, valores de IM para los 4 casos mostrados en A. Adaptado de Tort 2010 [123].

La correlación fase-amplitud ha sido observada en hipocampo de roedores [67-72], en ganglios basales [69] y en neocortex de monos [55], además de múltiples áreas corticales y subcorticales en humanos [56,73-78,80]. Si bien existen robustas evidencias sobre la existencia de acoplamiento entre la fase de una frecuencia baja con la amplitud de una frecuencia alta, se han planteado distintas respuestas sobre el rol funcional que el acoplamiento entre frecuencias (fenómeno conocido como “comodulación”) podría tener. En uno de los trabajos más importantes sobre el tema, Tort et al. (2009) [69] mostraron que existe una fuerte correlación entre la fuerza de la comodulación *theta – high-gamma* (en donde *high-gamma* o *HG* corresponde a la banda entre 80 y 110 Hz) y el desempeño de roedores en una tarea de aprendizaje y memoria. En su trabajo encontraron que cuanto más aumenta la fuerza de la comodulación, mejor se desempeña el roedor en la tarea que se le ha enseñado. Este y otros trabajos han posicionado a la comodulación fase-amplitud como el marcador neurofisiológico de mejor valor predictivo de aprendizaje encontrado hasta ahora. Cabe mencionar un interesante dato que podría servir como guía para comprender la relación existente entre la comodulación *theta-HG* y procesos de aprendizaje y memoria. Es sabido que uno de los protocolos más efectivos para inducir LTP (potenciación de largo término) consiste en aplicar *bursts* de alta frecuencia (100 Hz) con un intervalo entre *bursts* de entre 300 y 200 mseg (frecuencia entre 3 y 5 Hz) [79,78]. Este patrón corresponde a un *burst* en la frecuencia de *highGamma* recurrente

en la frecuencia de *theta*, es decir exactamente el fenómeno que se produce cuando existe fuerte comodulación entre *theta* y *highGamma*. También se ha logrado inducir LTD (depresión de largo término) cambiando la sincronización de esos *bursts* con respecto a la fase de *theta* endógeno [81,82]. Se postula entonces que los mecanismos artificiales para inducir LTP y LTD (mecanismos fuertemente relacionados con la formación y eliminación de memorias) podrían estar emulando a un proceso natural a través del cual la fuerza sináptica es regulada por comodulación *theta-HG* [83]. En un trabajo más reciente, Lisman y Jensen (2013) [84] realizan un interesante análisis sobre el código neuronal que podría portar el acoplamiento entre *theta* y *HG*, sugiriendo fuertemente que este acoplamiento subyace mecanismos por los cuales el cerebro logra retener información de ítems múltiples. Según esta teoría, diferentes posiciones espaciales son representadas en distintas fases de *theta*, mientras que la tasa de disparo de distintas poblaciones neuronales es agrupada en periodos discretos a través del ritmo *gamma*. Tanto estas oscilaciones como sus interacciones cambian durante procesos de memoria de trabajo y de largo plazo, lo cual es consecuente con la idea de que estas oscilaciones cumplen funciones en distintas operaciones neuronales. Axmacher et al. (2010) [85] proponen un rol crucial del acoplamiento *theta-HG* en el mantenimiento de memoria de trabajo en humanos. En su estudio, indican que la capacidad de los pacientes de retener ítems múltiples en una tarea de memoria de trabajo se encuentra estrechamente relacionada a la fuerza del acoplamiento *theta-*

HG. Además, encuentran que al aumentar el número de ítems en la tarea, la frecuencia moduladora (*theta*) se corre hacia valores más bajos (ciclos más largos), lo cual explican proponiendo que la cantidad de ítems que se pueden retener estaría representado en el cerebro por la cantidad de ciclos de *HG* que pueden ocurrir dentro de un ciclo de *theta*, de manera que si el ciclo es más largo, aumenta la capacidad de memoria de trabajo.

Sin embargo, todavía faltan herramientas que permitan manipular los parámetros de amplitud e interacción entre las oscilaciones neuronales para poder probar las distintas teorías que han surgido en los últimos estudios sobre el tema. Sería necesario por ejemplo encontrar métodos para alterar las oscilaciones y/o su interacción y observar si esto conlleva un cambio en la performance en distintas tareas. Este tipo de análisis podría echar luz sobre el verdadero rol, si es que existe, del acoplamiento entre frecuencias en procesos cognitivos de gran importancia como son la memoria y el aprendizaje.

1.4 Técnicas ópticas de manipulación neuronal

En los últimos años se ha prestado especial atención al uso de diferentes técnicas que permitan la manipulación óptica de sistemas neuronales ya sea en configuraciones

experimentales *in vitro* como *in vivo*. El estudio y desarrollo de estas técnicas ha cobrado especial relevancia ya que a través de su uso pueden abordarse numerosas preguntas que han sido sujeto de estudio de las neurociencias durante muchos años, tanto en modelos sanos como patológicos a distintas escalas. Las técnicas ópticas son aquellas a través de las cuales puede activarse o silenciarse un tipo neuronal o región cerebral específicos al irradiar la muestra con luz. La posibilidad de utilizar este tipo de metodología en animales moviéndose libremente ha revolucionado la capacidad de investigación en neurociencias, ya que permite un estudio detallado de cómo determinados elementos de un circuito neuronal contribuyen a distintas funciones del cerebro.

Una de las técnicas ópticas más utilizadas hoy en día es la optogenética. En este tipo de experimentos se induce, utilizando técnicas de ingeniería genética, la expresión de canales iónicos activables por luz en una población neuronal de interés [86-89]. De esta manera, al iluminar la muestra se activarán determinadas corrientes transmembrana provocando cambios en el potencial de membrana que modificarán la actividad neuronal. Utilizando distintos tipos de canales optogenéticos, se puede depolarizar o hiperpolarizar una célula, cambiando así su habilidad para disparar potenciales de acción. En la Figura 1.17 se esquematiza de manera sumamente simplificada la técnica de optogenética.

En pos de mejorar la tecnología disponible para explotar la técnica de optogenética en animales moviéndose libremente, recientemente se han desarrollado mejoras sustanciales en los métodos utilizados para irradiar las regiones cerebrales de interés. Estas novedosas alternativas incluyen la posibilidad de activar de manera inalámbrica un LED implantado [90], una fibra óptica con un conector rotatorio para evitar el problema del superenrollamiento [91], fibras ópticas que permiten activar patrones de múltiples puntos a la vez [92] y hasta la posibilidad de activar canales optogenéticos mediante la producción interna de luz [93].

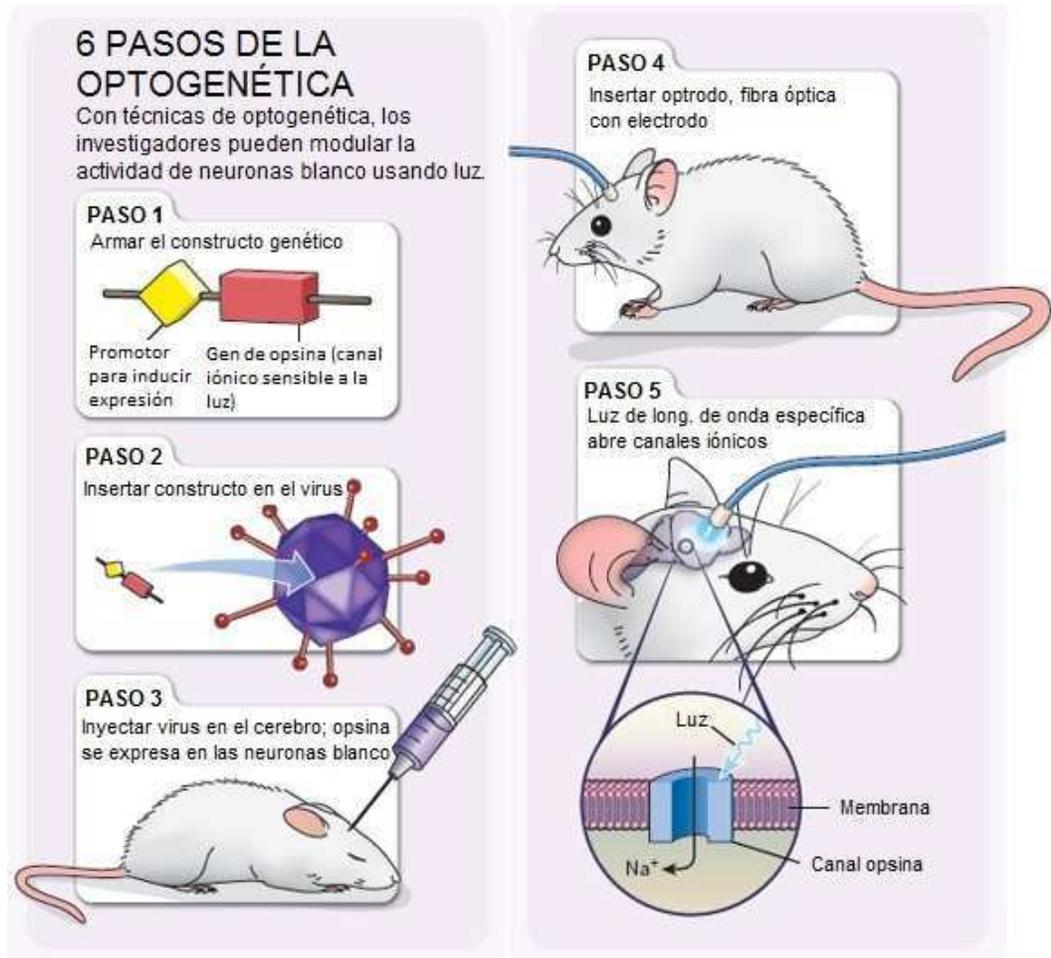


Figura 1.17. El gráfico resume muy brevemente el proceso detrás de la optogenética. Esta técnica posee dos fases: en la primera fase, el gen sensible a la luz es insertado en el organismo del modelo animal en estudio a través de técnicas de ingeniería genética. En la segunda fase, los canales iónicos sensibles a la luz son activados mediante la irradiación con láseres de determinada longitud de onda. Adaptado de <http://optogen.weebly.com/>.

Otra técnica actual que permite modificar la actividad de un sistema neuronal a través de la luz es el uso de compuestos enjaulados. En este tipo de experimentos, el

complejo es aplicado sobre la muestra y se deja difundir a través de ella. Al irradiar con luz, el neurotransmisor de interés será liberado y ya estará listo para actuar directamente sobre sus receptores. Los compuestos enjaulados presentan valiosas ventajas sobre las técnicas de optogenética. Por un lado, libera al investigador del paso previo que implica técnicas de ingeniería genética que podrían traer complicaciones experimentales, además de modificar *per sé* el estado original del sistema que se está estudiando. Por otra parte, no todos los modelos animales son susceptibles de ser modificados genéticamente de esta forma, a la vez que esta modificación implicaría dificultades muy grandes en el eventual traslado de las técnicas a alguna terapia médica. Además, la expresión de canales optogenéticos puede ser inespecífica, resultando esto en la activación de muchas poblaciones neuronales distintas a la misma vez, volviendo el experimento menos prolijo e informativo. El uso de compuestos enjaulados permite la aplicación y liberación del complejo en el mismo momento del experimento, activando canales iónicos específicos de cada neurotransmisor y que son expresados constitutivamente en las neuronas que se están registrando. Por otro lado, permiten el diseño de experimentos combinados con más de un neurotransmisor, pudiendo el investigador elegir el momento y la región cerebral específicos para la liberación de cada uno de ellos.

Por lo expuesto anteriormente, cobra gran relevancia la posibilidad de utilizar compuestos enjaulados en configuraciones experimentales *in vivo*. Estudios anteriores [24,25] han logrado probar la actividad de RuBi-GABA en animales anestesiados. Sin embargo, si bien la optogenética ha avanzado mucho en los últimos años y se han reportado métodos para utilizar esta técnica en animales moviéndose libremente [94,95], no se han reportado hasta ahora resultados que muestren la utilidad de los compuestos enjaulados en este tipo de configuración experimental. Al demostrar esta posibilidad, se desarrolla una nueva herramienta para la manipulación óptica de la actividad neuronal en modelos animales vivos. Siguiendo en este camino, podría combinarse el uso de compuestos enjaulados con las novedosas técnicas de activación por luz desarrolladas recientemente, abriendo un sinfín de configuraciones experimentales para el estudio de animales despiertos y comportándose libremente.

1.5 Dopamina

La dopamina es un neurotransmisor que pertenece al grupo de las catecolaminas. Estas últimas pertenecen a un grupo mayor, el de las monoaminas, es decir moléculas que presentan un grupo funcional amino ($-NH_2$), y tienen la particularidad de poseer un núcleo de catecol (un anillo bencénico con dos grupos hidroxilo adyacentes) y una cadena de etilamina o algún derivado de ella (Figura 1.18).

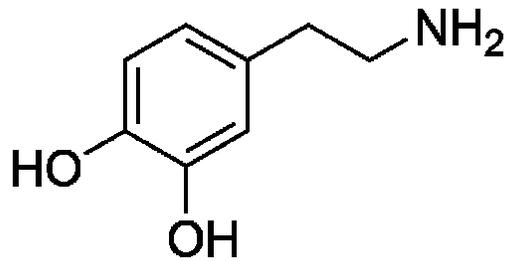


Figura 1.18. Estructura molecular de la dopamina.

Existen 5 tipos diferentes de receptores dopaminérgicos descritos hasta el momento, y se dividen en dos subfamilias llamadas Tipo D1 (receptores D1 y D5) y Tipo D2 (receptores D2, D3 y D4). Todos ellos pertenecen a la superfamilia de receptores asociados a proteína G. A diferencia de los receptores ionotrópicos, que son ellos mismos canales iónicos y poseen cinéticas de activación muy rápidas, estos receptores son del tipo metabotrópico, poseen cinéticas más lentas y su función radica en regular otros sistemas de receptores o bien directamente otros canales iónicos [96,97], a través de segundos mensajeros como AMP cíclico (cAMP). Es por este motivo que la activación de receptores dopaminérgicos no produce grandes corrientes o cambios de voltaje a través de la membrana y por lo tanto no puede ser detectada a través de ese tipo de cambios en mediciones electrofisiológicas.

Los miembros la subfamilia Tipo D1, los receptores D1 y D5, son agrupados juntos por poseer alto nivel de homología en su secuencia de aminoácidos, y porque los dos

estimulan la formación de cAMP cuando son estimulados por su ligando o por otras moléculas agonistas.

La subfamilia Tipo D2, al contrario de la de Tipo D1, se encontró que o bien inhibe la enzima adenilato ciclasa, o bien no tiene efecto sobre su actividad.

En cuanto a los efectos fisiológicos de la dopamina, este neurotransmisor es definido como un neuromodulador. Significa que la presencia de dopamina en una determinada red neuronal no es suficiente para alterar su funcionamiento, sino que lo que hace es modular el efecto de otros neurotransmisores, sean excitatorios o inhibitorios. Por nombrar sólo uno de muchos ejemplos existentes, la inyección de bajos niveles DA o de un agonista no tiene efecto en la actividad espontánea de neuronas del estriado, pero sí potencia el incremento en la tasa de disparo producida por el neurotransmisor excitatorio glutamato [98,99]. Curiosamente, la inyección de altos niveles de DA o sus agonistas tiene un efecto inhibitorio en la tasa de disparo de potenciales de acción evocados por glutamato [99,100].

Existen varios circuitos dopaminérgicos en el cerebro; uno de los principales es el circuito mesocortical, el cual se extiende desde el Área Tegmental Ventral (ATV) hacia la Corteza Prefrontal (CPF) (Figura 1.19). Este circuito está relacionado con importantes funciones cognitivas como motivación, respuestas emocionales, placer, atención, memoria de trabajo y control motor, y también está relacionado con algunos

síntomas y disfunciones cognitivas asociados a esquizofrenia. En este trabajo nos centraremos en aquellas sinapsis dopaminérgicas que ocurren en la corteza prefrontal (CPF).

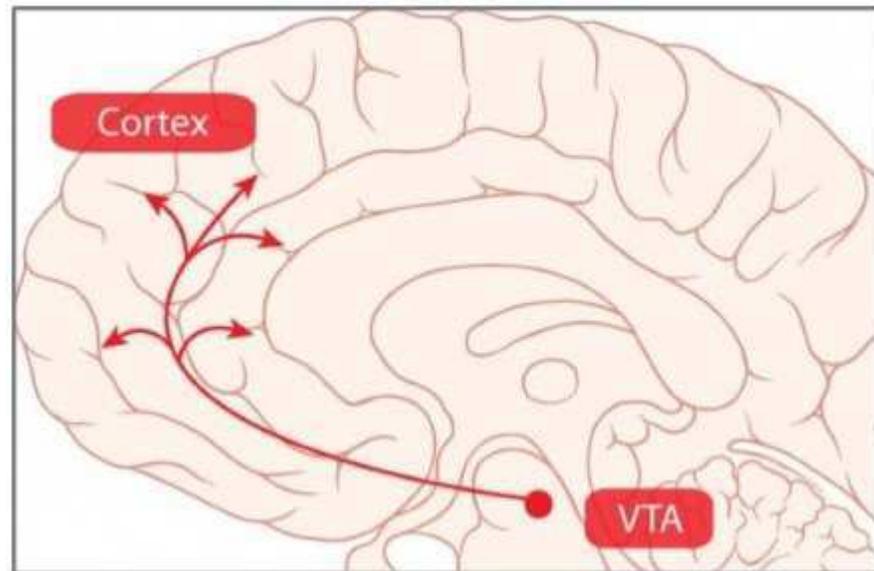


Figura 1.19. Vía mesocortical.

Existe abundante bibliografía al respecto de este tema indicando que los mecanismos de regulación de la DA en CPF son complejos. En este sentido, y nombrando sólo algunos ejemplos, se ha encontrado que existe una función en forma de “U” invertida relacionando la capacidad cognitiva con el nivel de estimulación de receptores D1, indicando que el efecto de DA no es lineal. Otro descubrimiento que indica la complejidad que tiene la acción de DA en CPF tiene que ver con el efecto bifásico que se encontró en varios tipos neuronales diferentes [101-105]: al aplicar DA, se produce

un decremento inicial en la tasa de disparo evocada por pulsos depolarizantes, mientras que luego el efecto se invierte y se ve un incremento en la actividad.

Hay investigaciones que señalan que una alteración en la circuitería neuronal de la CPF puede ser la causa de la hipofunción cognitiva en pacientes esquizofrénicos [106,108]. Trabajos recientes profundizan en este tema y señalan detalles relevantes.

Se sabe [109,110] que los ritmos neuronales en la banda *gamma* (80 – 110 Hz) están relacionados con procesos de atención y memoria de trabajo, así como también que este tipo de oscilaciones se ven alteradas en pacientes con esquizofrenia [111,112].

Estas oscilaciones de alta frecuencia están correlacionadas con un aumento en la atención durante el desarrollo de tareas cognitivas y mientras que su amplitud aumenta ante la demanda cognitiva en CPF de pacientes sanos, este aumento no se ve en pacientes con esquizofrenia [113]. Todos estos datos juntos sugieren que alteraciones en la correcta modulación de las oscilaciones *gamma* en CPF podrían ser la causa de una parte de la sintomatología asociada a la esquizofrenia.

El factor común que viene a unir los distintos aspectos discutidos más arriba es el neuromodulador dopamina. Distintos trabajos [114,115] señalan la importancia de la DA en la CPF para el correcto desarrollo de funciones cognitivas, mientras que por otro lado se ha encontrado que la DA está relacionada con la dinámica de la oscilación de redes neuronales en general, y en particular se ha encontrado que su presencia

aumenta la potencia de oscilaciones de distintas bandas de frecuencia en la CPF. Estudios más específicos sobre el tema [116,117] muestran que la modulación por DA está relacionada con la potencia de la banda *gamma* en distintas áreas del cerebro, e interesantemente volvemos a encontrarnos con la complejidad que presenta esta modulación, ya que la DA puede aumentar, disminuir o mantener intacta la potencia de la banda *gamma* dependiendo del área del cerebro en estudio, del tipo de receptor que se esté activando y/o del mecanismo fisiológico de las oscilaciones.

Debido a las evidencias que relacionan a la transmisión dopaminérgica en la CPF con la modulación de las oscilaciones *gamma*, y a la propuesta de alteraciones en este tipo de oscilaciones como una posible causa de la sintomatología asociada a la esquizofrenia, se vuelve importante el estudio de cómo se ven relacionados estos distintos eventos fisiológicos.

1.6 Compuestos enjaulados de Dopamina

En la actualidad sólo existe un compuesto enjaulado que libera dopamina al ser irradiado con luz. Este compuesto que tiene como base un grupo protector fotoactivable orgánico, se llama (N)-1-(2-Nitrofenil)etilcarboxi-Dopamina y se conoce como NPEC-dopamina (Figura 1.20).

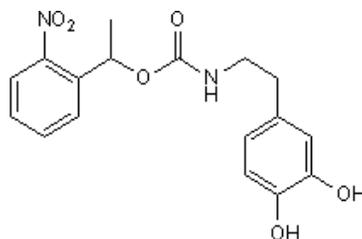


Figura 1.20. NPEC-dopamina

NPEC-dopamina se activa al ser irradiado con luz ultravioleta de 360 nm en régimen de un fotón (1P) y no tiene posibilidad de ser utilizado en régimen de dos fotones (2P). Esto presenta una desventaja al utilizar este enjaulado ya que la luz UV es potencialmente dañina para las células y los tejidos, lo cual limita las posibilidades de ser utilizado en experimentos biológicos y más aún si se trata de preparaciones *in vivo*. De hecho, NPEC-dopamina ha sido utilizado con éxito hasta el momento sólo en preparaciones *in vitro* [118-121].

En cambio, el compuesto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PMe}_3)(\text{dopamina})]^{2+}$ (RuBi-Dopa) que presentamos en este trabajo se activa al ser irradiado con luz en el rango visible (405 - 532 nm) (Figura 1.21) en régimen de 1P y además posee sensibilidad en régimen de 2P, lo cual permite su activación con una resolución espacial muy alta, como fue explicado anteriormente.

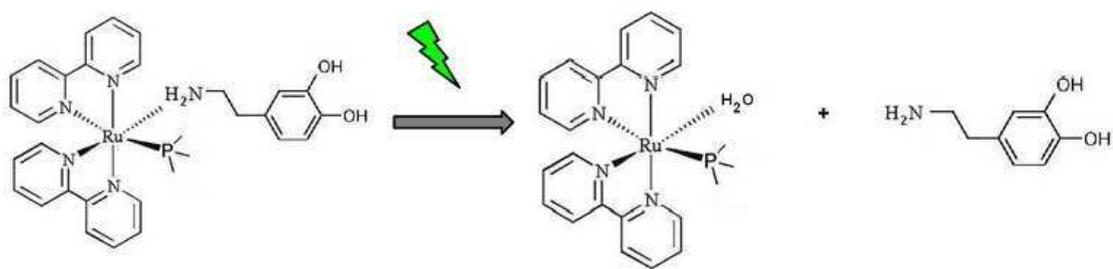


Figura 1.21. RuBi-Dopa. El esquema representa la estructura molecular de RuBi-Dopa y cómo la unión entre la jaula y el neuromodulador dopamina se rompe al irradiar el complejo con luz del rango verde/azul.

Distintos trabajos preliminares en el área de los compuestos enjaulados muestran cómo se utilizó RuBi-GABA en animales vivos anestesiados [24,25], logrando manipular exitosamente la actividad cerebral *in vivo* a través de la activación de compuestos enjaulados con luz visible. En este trabajo nos proponemos demostrar la actividad del nuevo miembro de la familia de enjaulados de rutenio, RuBi-Dopa, en régimen de 2P así como también la posibilidad de ser utilizado en experimentos *in vivo*. Si bien en trabajos previos se ha mostrado la presencia de receptores dopaminérgicos a nivel de espinas dendríticas, esto sólo se ha podido demostrar mediante ensayos bioquímicos con anticuerpos específicos para distintos subtipos de esta familia de receptores [122]. Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible estimular electrofisiológicamente sinapsis dopaminérgicas individuales a este nivel. Utilizando RuBi-Dopa combinado con microscopía de dos fotones abordamos esta

cuestión, presentando así una de las muchas aplicaciones que este nuevo enjaulado de rutenio podría tener para responder preguntas relacionadas a la neurofisiología.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Síntesis del complejo [Ru(bpy)₂(PMe₃)(dopamina)] (RuBi-Dopa)

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos comercialmente y usados sin purificaciones adicionales. Toda la síntesis fue realizada en condiciones de baja iluminación para prevenir la descomposición causada por la luz. La síntesis del precursor [Ru(bpy)₂(PMe₃)Cl]PF₆ se realizó según descrito en bibliografía [21]. Para solubilizar el complejo en agua, se disolvieron 100 mg de [Ru(bpy)₂(PMe₃)Cl]PF₆ en 3 ml de acetona y se agregaron 2 ml de una suspensión acuosa de 1 g de resina aniónica Dowex-22 (cloruro). Luego de 10 minutos para permitir el intercambio PF₆/Cl, la acetona se eliminó por evaporación con rotación. Antes de comenzar con la síntesis, la solución del complejo precursor fue burbujeada con N₂ durante 15 minutos para eliminar el oxígeno presente en solución. Luego se disolvieron 100 mg de dopamina.HCl en la solución del complejo precursor, manteniéndola en atmósfera de nitrógeno. A continuación, se agregaron 2,5 equivalentes (50 mg) de NaOH sólido. La solución fue calentada bajo atmósfera de nitrógeno (para evitar la oxidación de la dopamina) durante 16 hs, luego se enfrió a 0°C y se neutralizó con 120 µL de ácido acético glacial. Luego la solución se filtró para eliminar material insoluble, y por último se precipitó utilizando exceso de una solución saturada de KPF₆. El producto de esta

precipitación fue purificado por redisolución tres veces en suspensión acuosa de resina Dowex-Cl y posterior reprecipitación con KPF₆. Rendimiento: 62%. Anal.Calcd: C, 41.16; H, 4.01; N, 4.65. Found C, 40.2; H, 4.4; N, 4.5. Luego de estas tres redisoluciones no se reprecipitó más, y la solución acuosa obtenida fue liofilizada en oscuridad, obteniéndose 36 mg de un polvo anaranjado muy higroscópico. RMN (D₂O): 1H δ 0.95 (d, 9H), 1.78 (m, 2H), 2.30 (m, 2H), 2.70 (t, 1H), 3.52 (t, 1H), 6.15 (s, 1H), 6.23 (d, 1H), 6.58 (d, 1H), 7.02 (t, 1H), 7.20 (t, 7H), 7.36 (d, 1H), 7.42 (d, 1H), 7.57 (t, 1H), 7.67 (t, 1H), 7.71 (t, 1H), 7.89 (t, 1H), 8.08 (t, 1H), 8.16 (t, 1H), 8.19 (d,1H), 8.29 (d,1H), 8.37 (d,1H), 8.39 (d,1H), 8.73 (d,1H), 8.76 (d,1H).

2.2 Preparación de rodajas de cerebro y electrofisiología

Se utilizaron ratones C57BL/6 de 14 días. Sus cerebros fueron extraídos y colocados en solución de corte helada y equilibrados con 95% O₂/5% CO₂. Composición de la solución de corte (en mM): 27 NaHCO₃, 1.5 NaH₂PO₄, 222 Sacarosa, 2.6 KCl, 1 CaCl₂, 3 MgSO₄. Se prepararon rodajas coronales de 300 μm de espesor utilizando un vibrátomo Leica VT1000-S y usando solución de corte. Las rodajas fueron mantenidas a 36°C en fluido cerebro-espinal artificial (ASCF por sus siglas en inglés) y saturados con 95%O₂ y 5% CO₂ por 30 minutos y mantenidos a temperatura ambiente por lo menos 30 minutos antes de ser transferidas a la cámara de registro. Composición de

ACSF (en mM): 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 10 Dextrosa, 1.15 NaH₂PO₄, 3 KCL, 2 CaCl₂, 2 MgSO₄. En la cámara de registro las rodajas fueron bañadas en ASCF (pH 7,4). Los registros electrofisiológicos fueron hechos en configuración de fijación de corriente de célula entera (*whole cell current-clamp*) utilizando amplificadores Multiclamp 700b (Axon). Se usaron electrodos de célula entera (*whole cell patch electrodes*) de 4-7 MΩ. Los registros se realizaron con solución intracelular conteniendo (en mM): 135 KMeSO₄, 10 KCl, 10 HEPES, 5 NaCl, 2.5 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, y 0.2 Alexa Fluor 488 y 0.2 Fluo-4 (ver abajo). Durante los registros, el potencial de membrana fue mantenido en -65 mV. Todos los experimentos fueron realizados a 37°C.

Se realizaron registros del soma en células piramidales de la capa 5, adquiriendo las señales a través de una placa de adquisición National Instruments PCI 6259 y utilizando software programado a medida en LABView o Matlab. Se usó SCH 23390 (10 μM, Tocris) para bloquear los receptores D1 durante el registro de respuestas de calcio en espinas dendríticas y de potenciales post-sinápticos (EPSPs) en el soma.

La medición de calcio luego del desenjaulado por dos fotones fue puramente óptica y por lo tanto menos invasiva que las técnicas eléctricas clásicas. Más aún, mediciones simultáneas de fijación de corriente demostraron que la liberación de Ca²⁺ en la espina no induce cambios de voltaje importantes en el soma celular (n = 13 espinas, 5 experimentos; Amplitud pico en una ventana temporal de 10 ms post-desenjaulado = 0.21 ± 0.1 mV, y 0.06 ± 0.08 mV de amplitud pico en una ventana temporal de 30 ms

post-desenjaulado, $n = 253$ eventos de desenjaulado), y por lo tanto la activación dopaminérgica de espinas dendríticas hubiese sido indetectable a través de técnicas electrofisiológicas. El análisis *offline* de los datos fue realizado usando Matlab o Igor Pro con el paquete Neuromatic v2.0. Para determinar significancia estadística se utilizó el test *t* de Student.

2.3 Desenjaulado de RuBi-Dopa en régimen de dos fotones y mediciones de calcio en Rodajas

$\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PMe}_3)(\text{Dopamina})(\text{PF}_6)_2$ (RuBi-Dopa, $300 \mu\text{M}$) fue aplicada en el baño de las rodajas de cerebro, y se usó una bomba peristáltica Dynamax (Rainin Instruments Inc., Woburn, MA) para controlar la perfusión del baño, recirculando el medio. La concentración elegida para los experimentos en dos fotones, $300 \mu\text{M}$, fue seleccionada basándose en experimentos previos con RuBi-Glutamato [12]. El *imaging* en dos fotones de las espinas fue realizado a 725 nm y el desenjaulado en dos fotones de RuBi-Dopa e *imaging* de calcio a 820 nm . El haz de luz emitido por el láser de dos fotones fue posicionado aproximadamente a $0,2 \mu\text{m}$ de las cabezas de las espinas de las neuronas piramidales de la capa 5, que fueron llenadas con $200 \mu\text{M}$ de Alexa 488 (para revelar la estructura de la espina) y $200 \mu\text{M}$ de Fluor-4 (Molecular Probes, para registrar respuestas de calcio en la cabeza de la espina) a través de las pipetas de

registro. La solución interna de la pipeta fue la misma que la descrita más arriba. La potencia del láser de Ti-Safiro fue controlada a través de una celda Pockels (Quantum Technology, Lake Mary, FL), activado con pulsos cuadrados de voltaje (Master-8; AMPI, Jerusalem, Israel). Se seleccionaron espinas de las dendritas basales de neuronas piramidales de la capa 5 para *imaging* (725 nm) y desenjaulado (820 nm). Luego, el haz del láser (seteado en 820 nm para desenjaular Rubi-Dopamina y realizar *imaging* de calcio) fue posicionado en la cabeza de la espina por 500 ms a un nivel de potencia baja para *imaging* (aproximadamente 5-8 mW de potencia del láser sobre la muestra) (Figura 3.6A, punto verde), luego un pulso de 4 ms de duración y de alta potencia (aproximadamente 25 mW sobre la muestra) para desenjaulado (Figura 3.6A, desenjaulado de dopamina) fue generado en la posición indicada por un punto rojo en la Figura 3.6A, siendo esto seguido inmediatamente por el reposicionamiento del láser durante 1 segundo hacia la misma posición en la cabeza de la espina para el *imaging* de calcio, nuevamente a bajos niveles de potencia. Las señales de fluorescencia de calcio en espinas fue colectada con un tubo fotomultiplicador (H7422P-40; Hamamatsu, Hamamatsu City, Japón) tal cual lo descrito en Araya 2006. La detección de la señal fluorescente fue bloqueada por algunos milisegundos antes, durante (trazo del medio) y después del pulso de desenjaulado usando un *shutter* ultrarrápido (trazo superior) para prevenir la potencial saturación de tubo fotomultiplicador y consecuentes errores en la detección de la señal (Figure 3.6C). El

promedio de las señales de calcio en las cabezas de espina fue suavizado con una ventana temporal de 4 ms y luego utilizado para calcular el cambio porcentual de la fluorescencia basal, expresado como $\Delta F/F$.

Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio de escaneado por láser de dos fotones hecho a medida, basado en el sistema Olympus FV-200 (montado al lado de un microscopio con objetivo de inmersión en agua 60x, 0,9 AN) y un láser de Ti:Safiro (Chameleon Ultra II, Coherent, >3 W a 800nm, pulsos de 140 fs, frecuencia de repetición 80 MHz). El tubo fotomultiplicador fue conectado a un amplificador de señal (Signal Recovery AMETEK Advanced Measurement Technology, Wokingham, UK) cuya salida fue conectada al software Fluoview.

Todo el control del setup experimental fue automatizado y los experimentos realizados en oscuridad.

2.4 Animales y cirugía

Todo el trabajo con animales incluyendo el *housing*, procedimientos quirúrgicos y de registro se realizó en concordancia estricta con guías del Instituto Nacional de Salud y fueron aprobados por el Comité de Ética en la Experimentación con Animales de la UFRN (Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Brasil, lugar en el cual fueron realizados estos experimentos). Se utilizaron ratas Wistar macho (2-3 meses de edad,

250-350 g) provenientes del bioterio perteneciente al *Instituto do Cérebro* (Natal, RN, Brasil), mantenidos en un ciclo de 12 hs luz-oscuridad (se prende la luz a las 7:00). Tres animales fueron anestesiados con ketamina-xylazina (100 mg/kg - 8mg/kg) e implantados con matrices de multielectrodos de 4x4 (micro-alambres de tungsteno con cobertura de Teflon de 50 μm ; espaciado electrodo-electrodo y electrodo-cánula: 300 μm ; impedancia: $\sim 100\text{ k}\Omega$) conteniendo una cánula central de 900 μm de diámetro, dirigida hacia el área de la corteza prefrontal (centrada en anteroposterior (AP): 2.95 mm y mediolateral (ML): 0,5 mm respecto de Bregma; y dorsoventral (DV): -4 mm respecto de la superficie pial)

2.5 Registros electrofisiológicos in vivo

Los experimentos comenzaron entre 7 y 14 días luego de la cirugía y consistieron en registros electrofisiológicos y de video de animales moviéndose libremente en una cámara rectangular (60 x 60 x 40 cm) ubicada en una habitación con luminosidad regulable. Los registros se realizaron durante la tarde a través del ciclo espontáneo de sueño-vigilia, y de manera continua durante 3 horas utilizando una placa de adquisición RHA2000 y un preamplificador RHA2116 (Intan Technologies, Los Angeles, CA, USA) que cuenta con un conector Omnetics NSD-18-AA-GS (Omnetics Connector Corporation, Minneapolis, MN, USA). Para la adquisición de datos se utilizó

el software de interfaz con la PC que provee Intan Technologies. Los animales fueron grabados en video durante toda la sesión de experimentos. La ubicación de los electrodos en corteza prefrontal fue confirmada por histología de secciones coronales de cerebro coloreadas con violeta de Cresyl.

2.6 Histología

Luego de los experimentos los animales fueron anestesiados y sacrificados a través de perfusión transcardíaca. Sus cerebros fueron removidos, congelados en TissueTek (OCT Compound) y almacenados en freezer de -80°C. Luego se realizaron cortes histológicos coronales de 50 µm de espesor utilizando un criostato con cámara fría de -20°C. Enseguida los cortes fueron sometidos a coloración de violeta Cresyl (coloración de Nissl) para visualización de la histología general del tejido, más específicamente para verificar el posicionamiento de los electrodos y la cánula.

2.7 Desenjaulado de RuBi-Dopa in vivo

Para inyectar el complejo RuBi-Dopa en corteza prefrontal se utilizó una inyectora mecánica en la cual se montó una jeringa Hamilton de 10 µL, cuya salida fue colocada a través de una microinyectora (microcánula) en la cánula presente en la matriz de

multielectrodos implantada en el animal. Se inyectaron 5 μL del complejo a una tasa de 1 $\mu\text{L}/\text{minuto}$. Al terminar la inyección, se dejó la microinyectora instalada por 10 minutos, esto evita que el líquido inyectado sea succionado por la microinyectora al retirarla.

Para el desenjaulado de dopamina, se utilizó un sistema de láser hecho a medida. Se usó un láser de estado sólido bombeado por diodo (DPDSS) de Nd-YAG, $\lambda = 532 \text{ nm}$, potencia de 5 mW continuo, al cual se le colocó una lente de plástico de manera de enfocar los haces de luz hacia una de las puntas de una fibra óptica multimodo de material orgánico de 250 μm (diámetro externo). El recubrimiento de la fibra fue removido utilizando acetona y una hoja de Gillette. La punta de la fibra con el núcleo expuesto fue introducido en una aguja de calibre 25G, que a su vez fue introducida en otra aguja de calibre 20G que se pegó con resina epoxi al módulo láser; de esta manera la fibra fue fijada de manera adyacente a la lente plástica, con una rosca que permitía variar la distancia entre ellas y así poder modificar la posición de la fibra respecto al foco. El otro extremo de la fibra también fue cubierto con una aguja de calibre 25G. En el momento del experimento, la fibra se introduce a través de la cánula presente en la matriz de multielectrodos, que fue hecha a partir de una aguja de calibre 20G. El láser se activó a través de un generador de funciones que envía un pulso cuadrado de duración variable a un controlador en base a un transistor tipo darlington TIP122 en configuración on-off. Para poder tener información del momento del registro

en el que se activó el láser, la misma señal es enviada a una entrada TTL en la placa de adquisición Intan.

2.8 Análisis de Datos

Todo el análisis fue realizado utilizando rutinas de Matlab (MathWorks, Natick, MA) existentes y otras hechas a medida.

Estimación del Acoplamiento Fase-Amplitud

Para evaluar el acoplamiento fase-amplitud, se utilizó el análisis de Índice de Modulación (IM) y comodulación asociada que fue introducido por primera vez por Tort et al. (2008) [69] y luego descrito en detalle por Tort et al. (2010) [123]. El IM mide la fuerza del acoplamiento entre frecuencias (AEF) entre dos bandas de frecuencia de interés: una fase moduladora (f_f) y una amplitud modulada (f_A). Brevemente, el IM se obtiene de la siguiente manera: las fases de f_f son partidas en 18 intervalos (*bins*) de 20° y se computa la amplitud media de f_A asociada a cada *bin* de fase; luego la amplitud media es normalizada dividiendo el valor de cada *bin* por la suma de todos los *bins*, creando una función de distribución de fase-amplitud (para una mejor comprensión de este tipo de análisis, ver la Figura 2.1). Una distribución fase-amplitud

uniforme significa que la amplitud de f_A es en promedio la misma para todos los intervalos de fase de f_i , lo que ocurre en ausencia de acoplamiento fase-amplitud. Cuanto mayor es el acoplamiento, más se aleja la distribución fase-amplitud de una distribución uniforme. La diferencia entre la distribución de fase-amplitud empírica (P) y la distribución uniforme (U) puede ser evaluada por la divergencia de Kullback-Leibler: $KL(P,U) = \log(N_{bins}) + \sum p_j \log(p_j)$, donde $N_{bins}=18$ es el número de intervalos de fase y p_j es la “probabilidad de amplitud” del j -ésimo intervalo de fase. Finalmente, el IM es dado por $KL(P,U)/\log(N_{bins})$.

Para obtener el mapa de comodulación (comodulograma), se computa el IM para varios pares de banda de frecuencia (f_i , f_A) y los valores de IM son expresados en un gráfico bidimensional de colores. Las bandas de frecuencia son señales filtradas para un determinado ancho de banda (frecuencia de fase: ancho de banda 4 Hz; frecuencia de amplitud: ancho de banda de 10 Hz), y cada coordenada en el comodulograma representa la frecuencia central. Los ejes x e y denotan las bandas de frecuencia analizadas como fase moduladora (f_i) y amplitud modulada (f_A), respectivamente. De esta forma, un color cálido en determinada coordenada (f_i , f_A) significa que la fase de f_i modula la amplitud de f_A (Figura 2.1).

Notar que el mapa de comodulación no contiene información de tiempo. Para observar cómo el IM se comporta en el tiempo, se hizo un comodulograma continuo (Figura 3.18). En este caso, se computó el IM para dos bandas de frecuencia de interés. Para

estas dos bandas, el IM instantáneo fue computado para todo el registro utilizándose un periodo de 50 segundos con solapamiento de 25 segundos. Esto produce valores de IM para este par de frecuencias a lo largo de todo el registro.

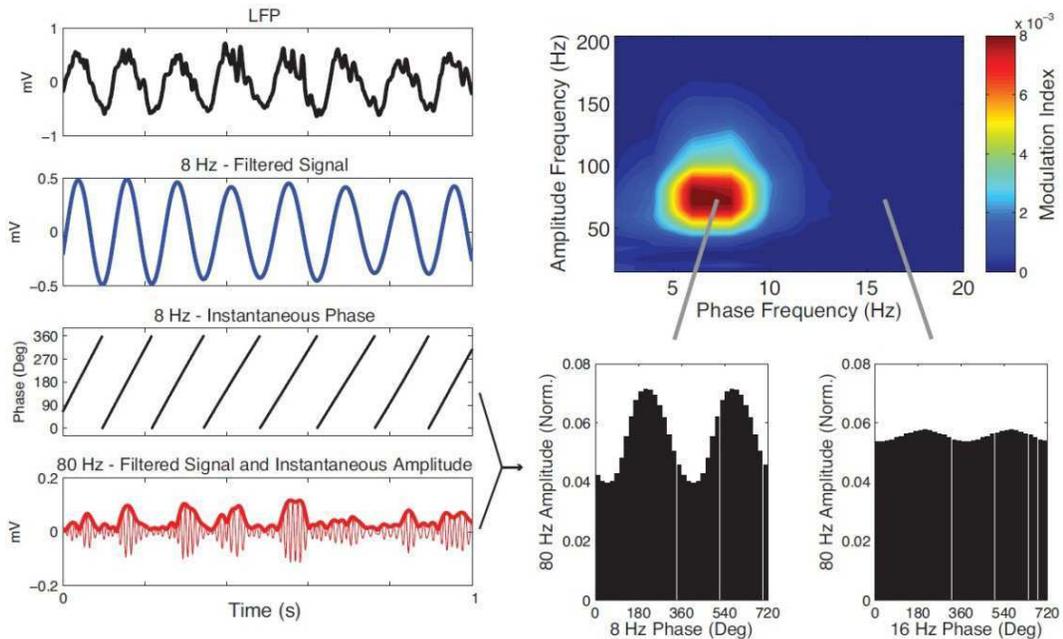


Figura 2.1. Resumen del análisis de datos realizado para obtener los valores de comodulación. El trazo negro corresponde al LFP crudo. A partir de esa señal, se utilizan filtros para obtener distintas bandas de frecuencia. En este ejemplo, se utiliza la frecuencia de 8 Hz (trazo azul) y la de 80 Hz (trazo rojo). Luego, la señal filtrada se divide en intervalos (*bins*) y se calcula para cada uno la fase (de la frecuencia de fase) y la amplitud (de la frecuencia de amplitud), y son graficados estos valores de manera de obtener un gráfico de distribución. Los gráficos de abajo a la derecha representan esta distribución para dos pares de frecuencia distintos; en un caso es un par que presenta comodulación (izquierda) y en el otro un par de frecuencias que no presenta comodulación. La comparación de todos los pares posibles de frecuencia se representa después en un comodulograma (arriba a la derecha). Tomado de Scheffer 2011 [72].

Filtrado de la Señal y obtención de Amplitud y Fase a lo largo del tiempo

El filtrado de la señal fue realizado con un filtro lineal a través de la función “*eegfilt*” del *Toolbox EEGLAB*.

La amplitud instantánea y la fase en función del tiempo de la señal filtrada fueron computadas a través de la transformada de Hilbert, que fue obtenida con la función “*hilbert*” del *Toolbox Signal Processing*.

Análisis Espectral

La estimación del espectro de frecuencias fue realizada a través del método del periodograma de Welch usando la función “*pwelch*” del *Toolbox Signal Processing* (50% de superposición de ventanas de Hamming con una duración de 4 seg). Las descomposiciones espectrales de tiempo-frecuencia (“espectrogramas”) fueron obtenidas usando la función “*spectrogram*” del *Toolbox Signal Processing*.

3 RESULTADOS

3.1 Síntesis y Caracterización de RuBi-Dopa

El complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PMe}_3)(\text{dopamina})](\text{PF}_6)_2$ (bpy = 2,2' bipyridina, PMe_3 = trimetilfosfina) fue sintetizado según lo descrito en la sección Materiales y Métodos. El producto es un sólido cristalino anaranjado, con solubilidad de hasta 5 mM en agua a pH = 7 y es estable en solución a 37°C a pH menor a 8 (aunque la dopamina puede ser oxidada por el aire a pH mayor). El espectro ^1H -RMN del complejo muestra los 16 picos característicos de las bipyridinas, correspondientes a un complejo *cis* asimétrico y las señales aromáticas de la dopamina coordinada (Figura 3.1).

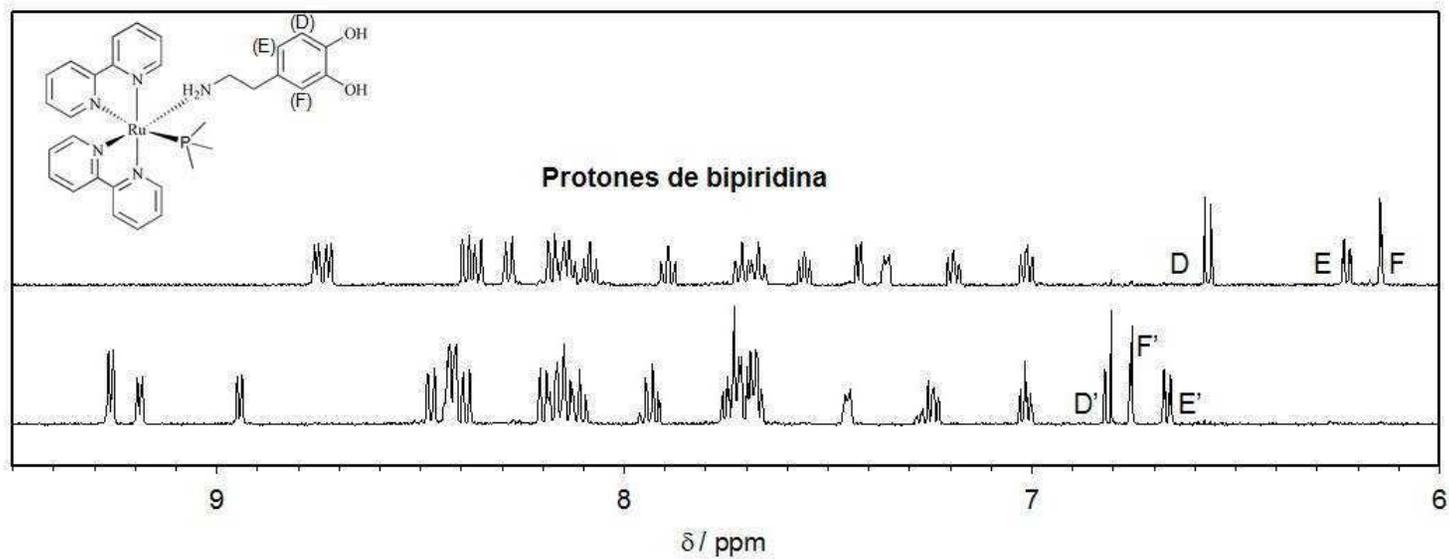


Figura 3.1. Parte aromática del espectro ^1H -RMN de RuBi-Dopa en D_2O antes (arriba) y después (abajo) de la irradiación del tubo de RMN con un LED verde de 525 nm. Se aprecian las señales de dopamina coordinada (D, E y F) y de dopamina libre (D', E' y F'). El inserto muestra la estructura de RuBi-Dopa con los protones aromáticos de la dopamina marcados entre paréntesis. Las señales a $\delta > 6.9$ ppm corresponden a los protones de bipyridinas de RuBi-Dopa (arriba) y del fotoproducto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PMe}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (abajo).

La Figura 3.2 muestra la porción alifática del espectro ^1H -RMN antes (trazo superior) y después de 30 segundos de irradiación *in situ* (trazo inferior) con un arreglo de LED verdes ($\lambda = 525$ nm, 20 nm FWHM, $p = 150$ mW). Antes de la irradiación (trazo superior), el doblete a 0.95, que corresponde a la trimetilfosfina coordinada (PMe_3), es evidente. Además, los tripletes A_1 y A_2 , a 3.52 y 2.70 ppm, respectivamente, son característicos de un grupo amino coordinado. La presencia de A_1 y A_2 en D_2O indica que el NH_2 no puede intercambiar protones, y por lo tanto el ligando está efectivamente coordinado a través del grupo amino, como suele ser el caso en complejos de la forma Ru-bpy [18,22]. Más aún, los metilenos adyacentes se encuentran fuertemente desplazados hacia campos más altos debido a la proximidad con Ru^{2+} , y aparecen como multipletes (Figura 2, señales B y C a 2.30 y 1.78 ppm respectivamente).

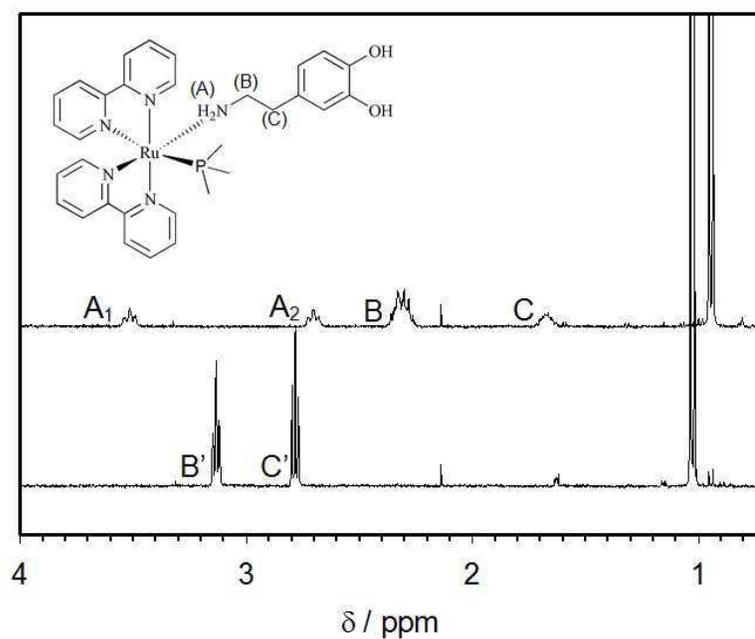


Figura 3.2. Porción alifática del espectro RMN de RuBi-Dopa en D₂O antes (trazo superior) y después (trazo inferior) de la irradiación del tubo de RMN con un LED verde de 525 nm. Los dobletes debajo de 1.2 ppm pertenecen a la trimetilfosfina coordinada (PMe₃) en RuBi-Dopa (trazo superior) y en el acuo-complejo formado luego de la fotorreacción (trazo inferior). Las señales de dopamina coordinada (B y C) también se muestran en el espectro. Los tripletes A₁ y A₂, correspondientes al -NH₂ coordinado, desaparecen luego de la irradiación debido al rápido intercambio con D₂O. Las señales de los metilenos de dopamina libre (B' y C') indican la fotoliberación exitosa del ligando. Los espectros RMN confirman que luego de la irradiación el compuesto fotolibera dopamina. Las señales B y C, correspondientes al ligando coordinado desaparecen, y las dos señales de metilenos de la dopamina libre (B' y C') aparecen a 2.77 y 3.13 ppm respectivamente. El subsecuente agregado de dopamina confirmó que la identidad del fotoproducto es exclusivamente este neurotransmisor, y que durante la fotólisis no se degradó ni aparecieron nuevas especies (datos no mostrados). Más aún, en la región

aromática del espectro RMN luego de la irradiación, se encontraron los picos correspondientes al acuo-complejo $[\text{Ru}-(\text{bpy})_2(\text{PMe}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ formado y el resto de los protones de la dopamina (Figura 3.2), corroborando la transición completa de dopamina coordinada a dopamina libre inducida por la irradiación.

En un espectro UV-vis, el complejo muestra la típica banda de absorción de transferencia de carga metal-ligando ($^1\text{MLCT}$) presente en todos los complejos de Ru(II)-bipiridina. La irradiación en esta banda provoca la población del estado $^1\text{MLCT}$, con la consecuente caída hacia el estado $^3\text{MLCT}$ que puede desactivarse por emisión, o hacia un estado d-d disociativo que promueve la pérdida de ligandos monodentados [17] y el intercambio por moléculas de solvente. En el caso de RuBi-Dopa, el único fotoproducto detectado fue dopamina (Figuras 3.1 y 3.2).

La eficiencia cuántica de fotoliberación fue medida realizando el análisis del espectro UV-vis de soluciones acuosas del complejo. Se obtuvieron espectros entre 350 y 700 nm durante la irradiación en ángulo recto con un módulo de diodo láser de 405 nm. Las muestras fueron irradiadas sin desgasar.

La velocidad de formación de productos puede ser calculada con la siguiente expresión:

$$\frac{dn_P}{dt} = I_{beam} \cdot (1 - 10^{-A_T}) \cdot \frac{A_R}{A_T} \cdot \Phi_{pr}$$

Ecuación 1

donde n_P son los moles de acuo-complejo y dopamina liberados; I_{beam} es la intensidad del láser en Einstein/s; A_T y A_R son la absorbancia total de la solución y la absorbancia del reactivo, respectivamente; y ϕ_{pr} (también llamado ϕ_{lib}) es la eficiencia cuántica de la fotorreacción. Para obtener el valor de ϕ_{pr} se integra esta ecuación, utilizando para ello los valores de absorbancia a lo largo del tiempo para un experimento de fotólisis, el valor de A_T que se lee del espectrofotómetro y es la absorbancia máxima de la solución de complejo RuBi-Dopa, y el coeficiente de absortividad molar (ϵ) del complejo y del producto. Todos los otros valores necesarios para resolver la ecuación se obtienen a partir de estos datos.

La integración de la ecuación 1 fue realizada por el método de diferencias finitas utilizando una planilla de cálculo de Excel. Resumidamente, para un experimento de 1000 s de duración, se realizó una medición cada $\Delta t = 2$ s. Introduciendo los valores

conocidos de volumen, concentración inicial de RuBi-Dopa, absorptividad molar de RuBi-Dopa y su fotoproducto y la potencia del láser, se calculó la cantidad de complejo fotolizado para el primer intervalo Δt usando la ecuación 1. Los nuevos valores de concentración para RuBi-Dopa y el acuo-complejo se obtuvieron usando la ley de Beer y fueron utilizados para calcular los siguientes intervalos. De esta manera, no sólo la pendiente inicial es usada para ajustar ϕ_{pr} , sino que se usa todo el set de datos, incluyendo aquellos en los cuales la absorción del producto es importante (que de otro modo no podrían usarse para el análisis). La Figura 3.3 (inserto) muestra un subset de datos durante la fotólisis.

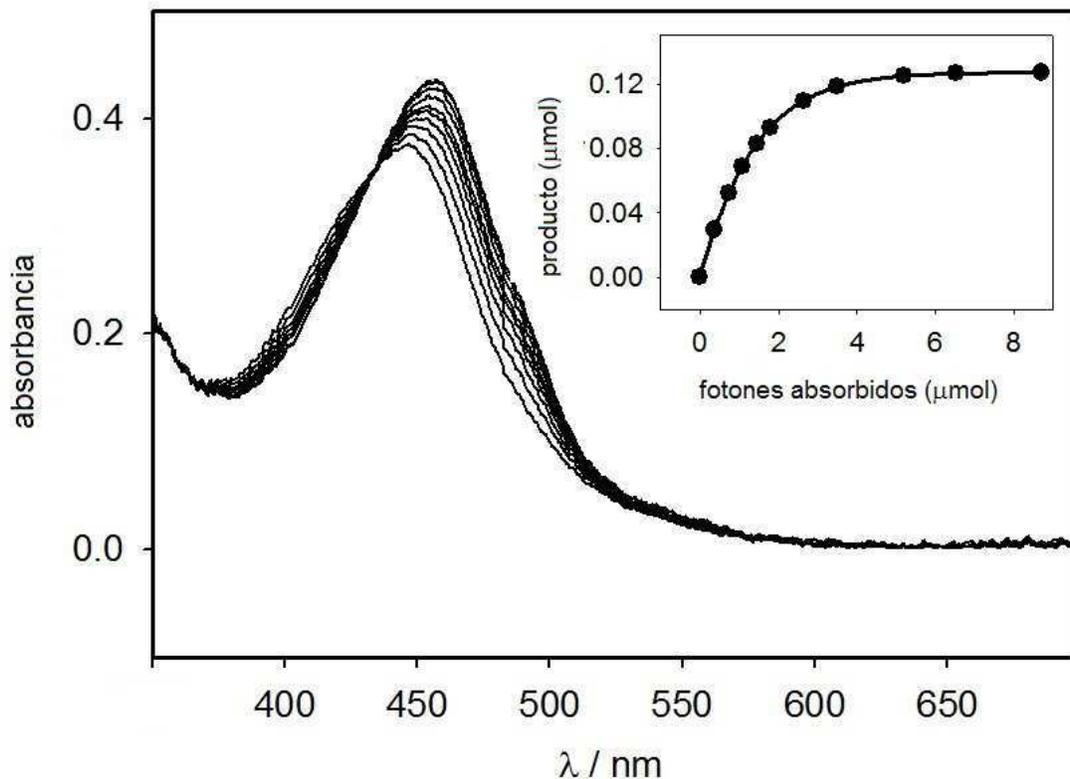


Figura 3.3. Espectro UV-vis de una solución acuosa de RuBi-Dopa 75 μM durante la fotólisis a T = 25°C y pH = 7. Las muestras fueron irradiadas a 405 nm, y los espectros tomados entre 350 y 700 nm. Inserto: cálculo de eficiencia cuántica usando la ecuación 1. La línea negra representa todos los puntos medidos y los círculos representan los puntos cuyo espectro se muestra en el gráfico principal.

La eficiencia cuántica de fotoliberación obtenida es $\phi_{pr} = 0.110 \pm 0.011$ ($p < 0.05$) a 37°C y 0.085 ± 0.004 ($p < 0.05$) a 25°C. Pinnick y Durham (1984) [17] han estudiado la correlación entre la eficiencia cuántica de fotoliberación y el máximo de la banda MLCT para varios complejos de Ru-bpy, demostrando que ambos parámetros son

controlados de una manera sencilla: a través de la capacidad del ligando de donar electrones. Para una banda MLCT centrada cerca de 450 nm, se espera un ϕ_{pr} de 0.1, lo cual concuerda con nuestros resultados experimentales. Se obtuvieron resultados similares usando irradiación de 445 nm y de 532 nm. Con su absorptividad molar de aproximadamente $4900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 447 nm, el complejo muestra muy alta sensibilidad de liberación ($\epsilon\phi > 580$) en la región de luz visible. Este valor da una idea de la eficiencia real que va a tener la liberación de la molécula de interés, ya que representa la cantidad de luz que el complejo va a absorber y a la vez, de esa cantidad de luz, cuánta va a ser “aprovechada” para producir fotoliberación.

Para determinar la capacidad de RuBi-Dopa de ser utilizada en régimen de dos fotones, se utilizó una solución del compuesto colocado en una cubeta de 4 caras pulidas (1 cm de camino óptico), que fue irradiada con un láser pulsado de Ti-Safiro (frecuencia $f = 80 \text{ MHz}$, ancho del pulso $\tau = 100 \text{ fs}$, $\lambda = 800 \text{ nm}$, potencia promedio = 460 mW) enfocado en la muestra con un objetivo 10x. Con esta técnica, se encontró que RuBi-Dopa sigue el típico comportamiento de un proceso de absorción por dos fotones con emisión únicamente en el punto focal.

Adicionalmente, utilizando un amplificador paramétrico (Coherent Legend Elite, $f = 1$ kHz, $\tau = 120$ fs, $\lambda = 800$ nm, potencia promedio 730 mW, diametro del haz 3 mm), la potencia instantánea de los pulsos (6.1×10^9 W) fue suficiente para excitar soluciones de RuBi-Dopa sin necesidad de enfocar. Bajo estas condiciones, el progreso de la reacción puede ser seguido a través de la débil emisión de fluorescencia de RuBi-Dopa a ~ 630 nm (Figura 3.4). Se midió el espectro de emisión de RubiDopa en distintos tiempos (Figura 3.4), y el pico de emisión a 630 nm fue usado para calcular la dependencia de la emisión con el tiempo durante la fotólisis (Figura 3.4, inserto).

Ya que la excitación de RuBi-Dopa se produce a 800 nm, la emisión a energías mucho más alta indica que hay un proceso no lineal involucrado. Además, variando la potencia del láser con un filtro reflectivo a valores entre 730 y 360 mW, la tasa de fotólisis mostró una dependencia con el cuadrado de la potencia promedio, lo cual es típico de un régimen de excitación por dos fotones (Figura 3.5). Por otro lado, la irradiación en las mismas condiciones usando un LED de 1.1W y 810 nm (Shenzhen Hanhua Opto Co, HH-1WP2IR12-T) no provocó fotólisis, descartando la posibilidad de excitación lineal detectable a esta longitud de onda.

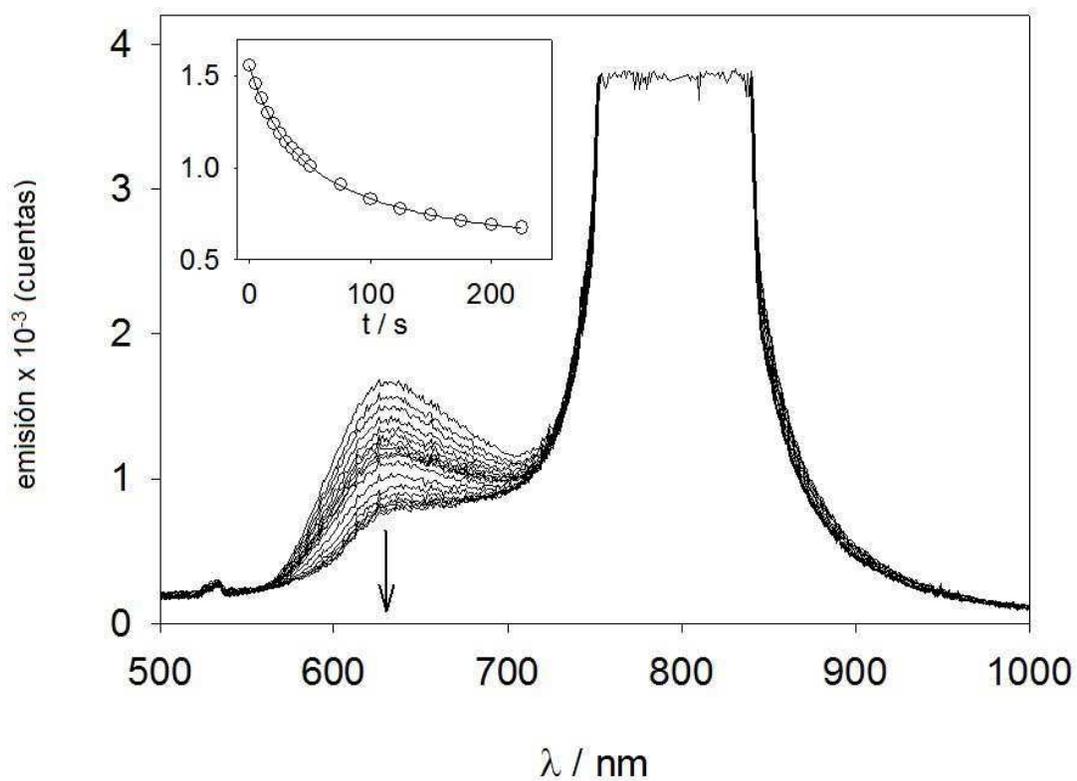


Figura 3.4. Fotólisis de RuBi-Dopa en régimen de dos fotones. Una solución de RuBi-Dopa 22 mM fue irradiada con un láser de Ti-Sa a 800 nm y la fotorreacción fue seguida por su espectro de emisión. Inserto: dependencia de la emisión a 630 nm con el tiempo durante la fotólisis.

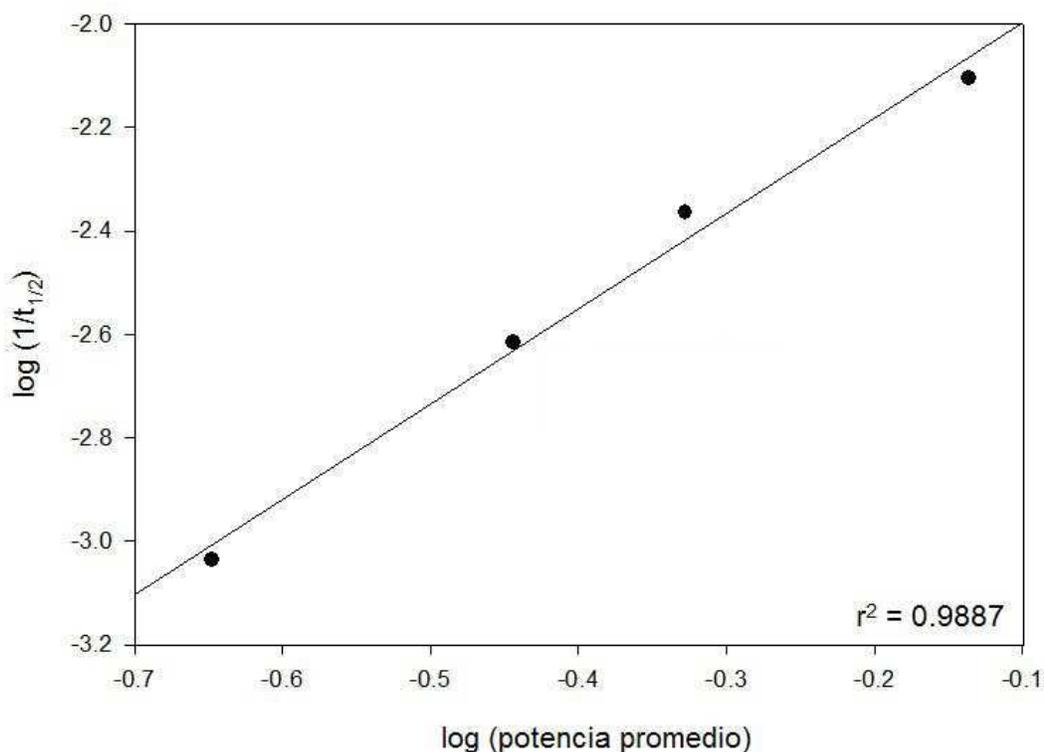


Figura 3.5. Dependencia del tiempo medio de foto-disociación de RuBi-Dopa ($t_{1/2}$) con la potencia del láser pulsado. Notar que el gráfico log-log tiene una pendiente $m = 1.94 (\approx 2)$, lo cual indica una respuesta cuadrática con la intensidad de la luz, característico de un proceso de dos fotones.

A través de la comparación del $t_{1/2}$ de fotólisis de una solución de RuBi-Dopa con una solución del complejo análogo RuBi-Glutamato, del cual se sabe que presenta una sección eficaz funcional de 0.14 GM a 800 nm [21], se puede calcular el mismo parámetro para RuBi-Dopa. La sección eficaz (σ) describe la eficiencia de una molécula en el estado basal para alcanzar un estado excitado a través de un proceso de absorción de dos fotones, mientras que la sección eficaz funcional es el mismo

valor pero multiplicado por la eficiencia cuántica de fotoliberación de la molécula, de modo tal que tiene en cuenta la capacidad de esta molécula de “aprovechar” los fotones que llegan a ella para que ocurra una reacción de fotoliberación. Es una magnitud que se mide en unidades de GM (en honor a su descubridora Maria Goeppert-Mayer, y 1 GM es $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s fotón}^{-1}$).

Si se mantienen constantes la concentración del complejo, la potencia del láser y el volumen de irradiación, se obtiene la siguiente expresión:

$$\sigma_2^{\text{dopa}} \phi_{\text{dopa}} = \sigma_2^{\text{glut}} \phi_{\text{glut}} \frac{t_{1/2}^{\text{glut}}}{t_{1/2}^{\text{dopa}}} = 0.24 \pm 0.04 \text{ GM}$$

Ecuación 2

Teniendo en cuenta que la eficiencia cuántica de fotoliberación de RuBi-Glutamato es ligeramente mayor que la de RuBi-Dopa [21], este resultado sugiere que la mayor sección eficaz funcional se debe a una mayor absorción en dos fotones.

3.2 Experimentos en Rodajas de Cerebro

Una vez que se determinó que RuBi-Dopa es activa en régimen de dos fotones, puede ser usada para manipular ópticamente un tejido neuronal de 3 dimensiones.

El arreglo experimental utilizado para realizar el desenjaulado en dos fotones fue hecho a medida en el Laboratorio de circuitos corticales y espinas dendríticas (*Columbia University, New York, NY, USA*), construyendo un microscopio de dos fotones a partir de un dispositivo para escaneo por microscopía confocal [124].

Básicamente, se utiliza un láser de femtosegundos que puede ser sintonizado en cualquier longitud de onda entre 690 y 1080 nm. Luego se utiliza un sistema modificado de escaneo por microscopía confocal (Olympus FluoView); el haz de luz es llevado hacia este sistema a través de un set de lentes y espejos montados en un banco óptico (Figura 3.6). En nuestro caso, el elemento más destacable de este set óptico es una celda Pockels, que permite la modulación dinámica de la intensidad del láser con alto nivel de contraste y resolución temporal menor al microsegundo. Además, el galvanómetro de espejo presente en el *setup* permite modificar con una resolución espacio-temporal muy alta la localización del láser, gracias a lo cual se puede ubicar en la cabeza de la espina para realizar *imaging* de calcio, luego moverlo

por algunos microsegundos hacia el lugar de desenjaulado y volver rápidamente a la cabeza de la espina para registrar cambios en la concentración de calcio en ese lugar.

Utilizando rodajas coronales de corteza prefrontal de ratón, se hicieron registros electrofisiológicos en configuración de *whole-cell patch-clamp* en somas de células piramidales de la capa 5.

Se seleccionaron espinas dendríticas (diámetro de la cabeza: menos de 1 μm) de las dendritas basales y se ubicaron en o cerca del centro de campo de microscopio. Sabiendo que en neuronas corticales la activación de receptores D1 puede disparar señales de calcio intracelular [125], se realizó *imaging* en dos fotones para revelar la dinámica de Ca^{2+} en la espina, para lo cual se inyectó en la célula una solución 200 μM del indicador de calcio Fluo-4 en combinación con otra solución 200 μM de Alexa-488 para revelar la estructura de la espina (Figura 3.7).

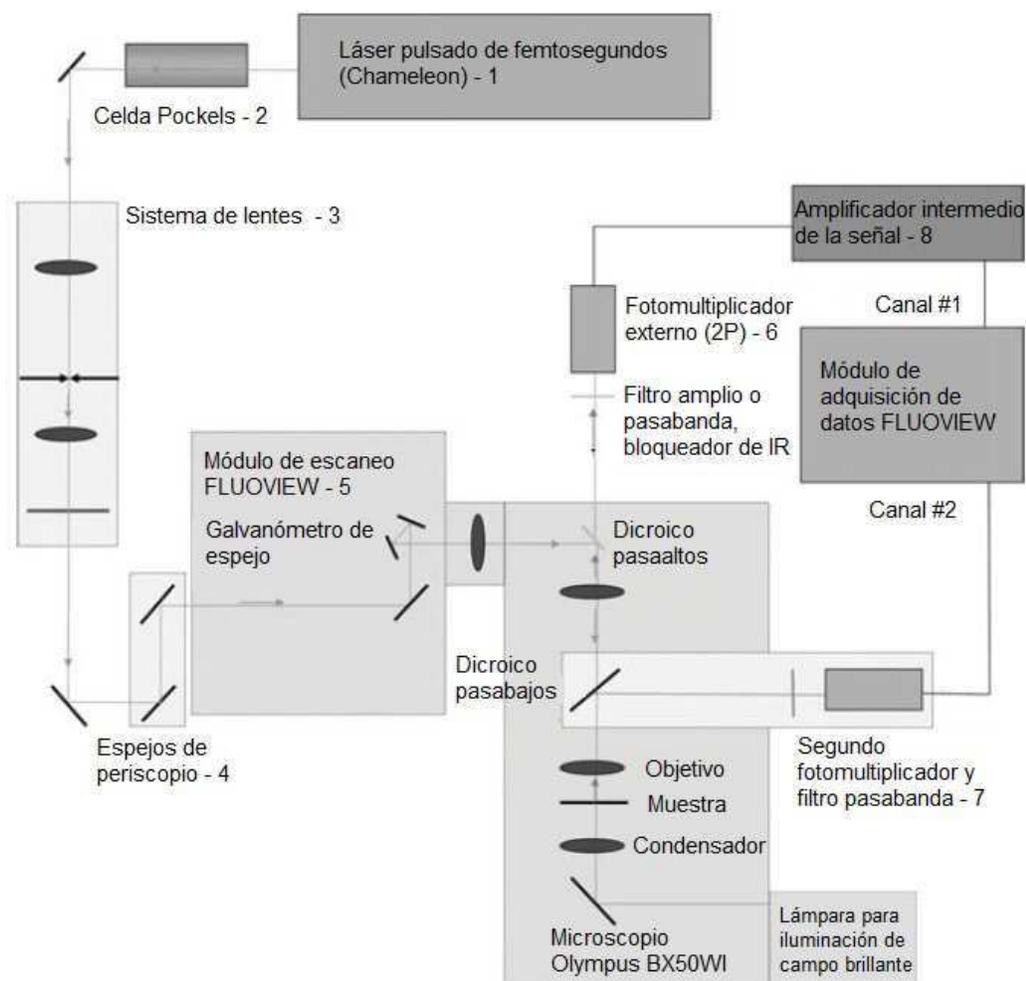


Figura 3.6. Arreglo experimental utilizado para *imaging* de calcio y desenjaulado en dos fotones en espinas dendríticas. (1) Láser pulsado de femtosegundos (infrarrojo cercano, *Near InfraRed*, NIR por sus siglas en inglés); (2) Modulador celda Pockels; (3) sistema de lentes que sirve como filtro espacial y expensor del haz de luz; (4) espejos de periscopio, llevan el haz de luz desde el nivel del banco óptico hacia el módulo de escaneo FluoView; (5) módulo de escaneo Olympus FluoView modificado; (6) detector fotomultiplicador (PMT) externo para señal de fluorescencia en dos fotones (2P), conectado al puerto de la cámara del microscopio; (7) segundo fotomultiplicador externo conectado al microscopio a través de un adaptador hecho a medida; (8) amplificador intermedio de la señal para coincidir el rango dinámico de la fuente de la señal (PMT) y el módulo de adquisición FluoView. Adaptado de Nikolenko 2013 [124].

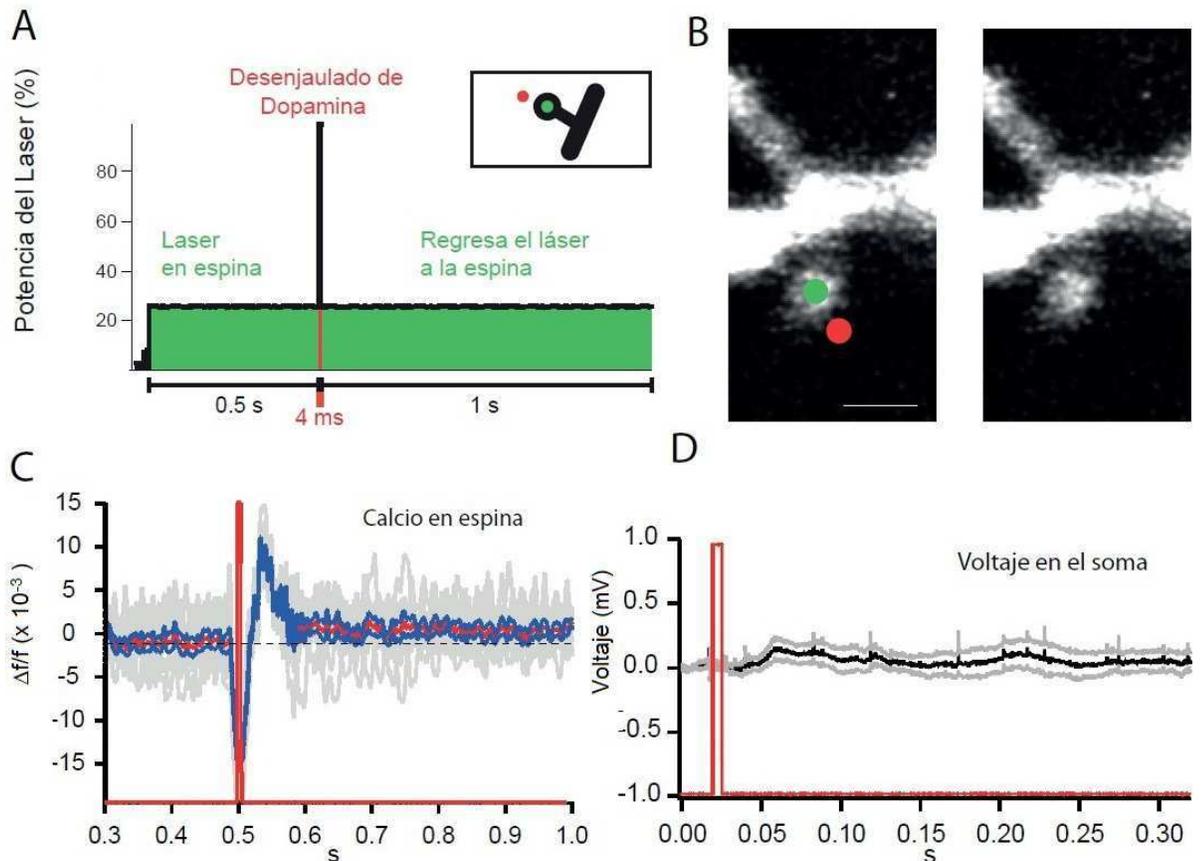


Figura 3.7. Desenjaulado de RuBi-Dopa en espinas dendríticas. (A) Configuración experimental: un láser de Ti-Safiro (820 nm) escanea inicialmente la cabeza de la espina (con una potencia de láser de aproximadamente 5-8 mW) para monitorear las concentraciones basales de Ca^{2+} en la ubicación marcada con un círculo verde en (B) y luego se mueve a una ubicación cercana (círculo rojo), donde la potencia del láser es aumentada (a aproximadamente 25 mW sobre la muestra) para desenjaular dopamina a partir de RuBi-Dopa por 4 ms. Luego del desenjaulado el láser vuelve a la potencia y ubicación iniciales en la cabeza de la espina. (B) Se aplica RuBi-Dopa en la solución que baña una rodaja cortical, y una neurona piramidal de la capa 5 se carga con una solución 200 μM del indicador de calcio Fluo-4 y 200 μM de Alexa-488. Barra de escala: 1 μm . (C) Señales de fluorescencia en la espina (trazos individuales en gris ($n = 10$), trazo promedio en rojo y \pm StEr en azul) mostrando el incremento en la concentración de Ca^{2+} luego del pulso utilizado para desenjaular dopamina. La señal de detección de la fluorescencia, a través de un tubo fotomultiplicador (PMT), fue bloqueado por algunos milisegundos antes, durante y después del pulso con el uso de un *shutter* ultrarrápido para prevenir la potencial saturación del PMT y consecuentes errores en la detección de la señal. (D) Mediciones de voltaje en el soma durante el desenjaulado de dopamina.

Se aplicó en el baño una solución de RuBi-Dopa 300 μM y se utilizó un láser pulsado de Ti-Safiro a 725 nm (Coherent Chameleon Ultra II, $f = 80$ MHz, $\tau = 140$ fs) con un objetivo de alta apertura numérica (60 \times , 0.9NA, objetivo de inmersión en agua) para revelar la imagen de la espina y descubrir sus características morfológicas. La longitud de onda fue cambiada a 820 nm para desenjaular RuBi-Dopa en una posición inmediatamente al lado de la cabeza de la espina (punto rojo en la Figura 3.7) y monitorear la acumulación de Ca^{2+} allí antes y después del desenjaulado de RuBi-Dopa (punto verde en la Figura 3.7).

Los experimentos de desenjaulado fueron realizados en neuronas fijadas a un potencial de reposo de -65 mV y con un baño a 37°C. La cantidad de corriente necesaria para mantener las neuronas piramidales de la capa 5 en este potencial de reposo no presentó cambios antes y después de la aplicación al baño de RuBi-Dopa. Estos resultados sugieren que la célula no se ve afectada por la presencia de RuBi-Dopa en el baño. Un pulso de irradiación en dos fotones de 4 ms de duración inmediatamente al lado de la cabeza de la espina provocó la liberación de dopamina a partir del complejo RuBi-Dopa y un rápido incremento en la concentración de Ca^{2+} en la espina en 11 de 13 espinas registradas (Figura 3.7), indicando dos cosas: una

fotoliberación de dopamina exitosa y la presencia de receptores de dopamina funcionales en la espina, como había sido sugerido en trabajos previos de inmunorreactividad de receptores D1 [126-129]. De hecho, el agregado del bloqueador específico [130] para receptores D1 SCH-23390 a una concentración que había mostrado previamente ser específica para receptores D1 en estas neuronas [131] bloqueó completamente las señales evocadas de Ca^{2+} registradas luego del desenjaulado de RuBi-Dopa (Figura 3.8).

Interesantemente, en sólo 2 de las 13 espinas registradas, no se observaron señales de Ca^{2+} en la cabeza de la espina luego del desenjaulado de dopamina, lo cual sugiere que algunas espinas de neuronas piramidales de la capa 5 podrían no tener receptores de dopamina funcionales. Mediciones simultáneas en configuración de fijación de corriente demostraron que la liberación de Ca^{2+} en la espina no induce cambios importantes de voltaje en el soma celular (Figura 3.7D) y por lo tanto la activación dopaminérgica de espinas sería indetectable con técnicas electrofisiológicas.

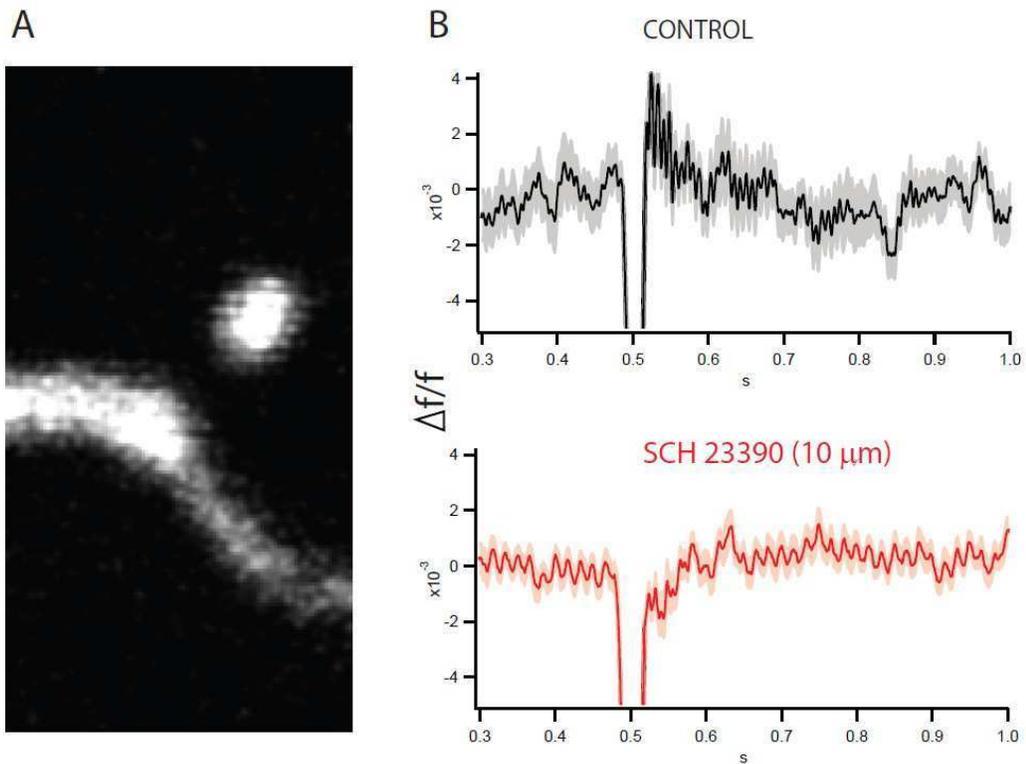


Figura 3.8. La activación en dos fotones de receptores de dopamina del tipo D1 dispara señales de Ca^{2+} en la cabeza de espinas dendríticas. (A) Imagen en dos fotones de una espina dendrítica de una neurona piramidal de la capa 5 cargada con 200 μM del indicador de calcio Fluo-4 y 200 μM del colorante Alexa-488. El ancho del campo en A es de 3.4 μm . El láser fue posicionado en la cabeza de la espina para monitorear la señal de calcio basal y luego se movió hacia afuera de la cabeza de la espina, donde se realizó el desenjaulado de RuBi-Dopa. Luego, el láser vuelve a su potencia y localización iniciales en la cabeza de la espina para registrar la respuesta de calcio post-desenjaulado. La visualización de la morfología de la espina fue realizada a 725 nm (A), y el desenjaulado e *imaging* de Ca^{2+} a 820 nm (B, C). Los gráficos en B y C ilustran las respuestas de Ca^{2+} en dos fotones registradas en la cabeza de la espina mostrada en A antes y después del desenjaulado de RuBi-Dopa en dos fotones (desenjaulado a 0.5 seg, duración del pulso 4 ms). Estas respuestas fueron registradas en la misma espina (A) en condiciones control (B) o en presencia del bloqueador de receptores D1, SCH-23390 (C). Notar cómo el agregado de SCH-23390 elimina completamente las respuestas de Ca^{2+} inducidas por dopamina. El trazo negro en B corresponde al promedio ($n = 15$ para la condición control, $n = 30$ con SCH-23390), y los trazos grises son \pm SEM.

3.3 Experimentos *in vivo*

Los animales fueron sometidos a cirugía de implante crónico en corteza prefrontal (CPF) (Figura 3.9) de una matriz conteniendo 16 microelectrodos de tungsteno y una cánula central (Figura 3.10). Esta cánula cuya salida se encuentra ubicada en la misma posición que la punta de los electrodos, permite la inyección del compuesto de interés en la región cerebral cuya actividad se está registrando, y luego la colocación de una fibra óptica en la misma posición; al activarse el láser, se ilumina esta zona del cerebro provocando la liberación y consecuente recuperación de la actividad de la biomolécula antes enjaulada.

En la fotografía presente en la Figura 3.10, puede observarse como en la punta de la cánula se realiza un delicado pulido de manera que ésta posea una terminación filosa en vez de roma. Esto se realiza para lograr que la cánula provoque el menor daño posible en el tejido al ser colocada, ya que su diámetro es considerablemente grande y es fundamental para el éxito del experimento que el tejido conserve su integridad para obtener un buen registro electrofisiológico.

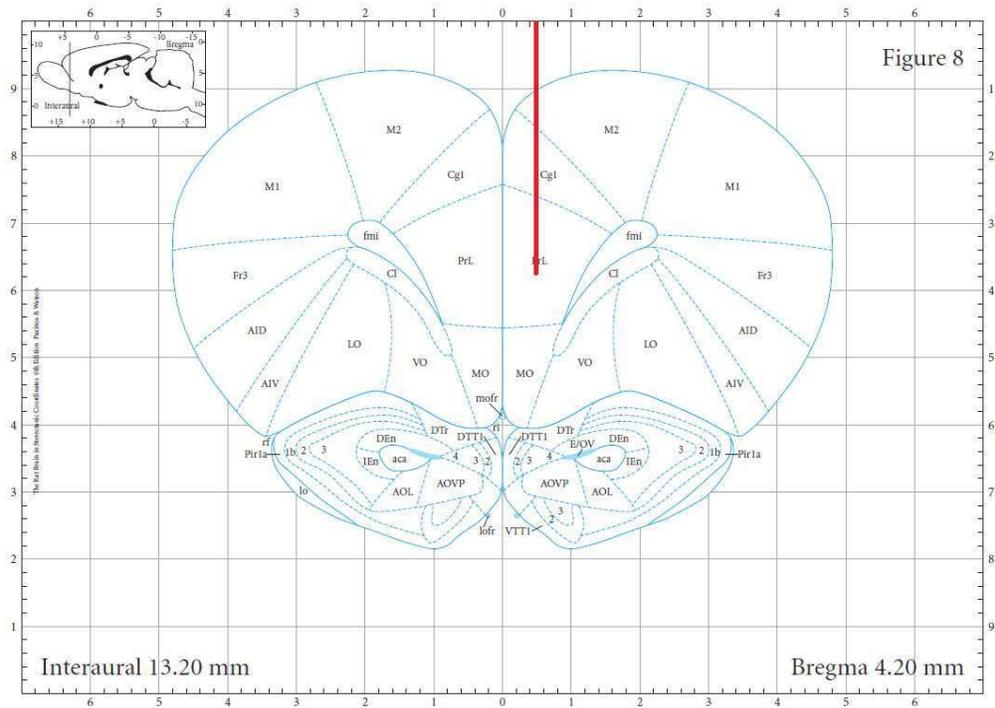


Figura 3.9. Esquema tomado del Atlas Paxinos (*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6ta Ed) correspondiente a las coordenadas en las que fue implantada la matriz de electrodos. La línea roja representa la cánula, ubicada en el centro de la matriz. El registro corresponde al área prelímbica (PrL) de la corteza prefrontal.

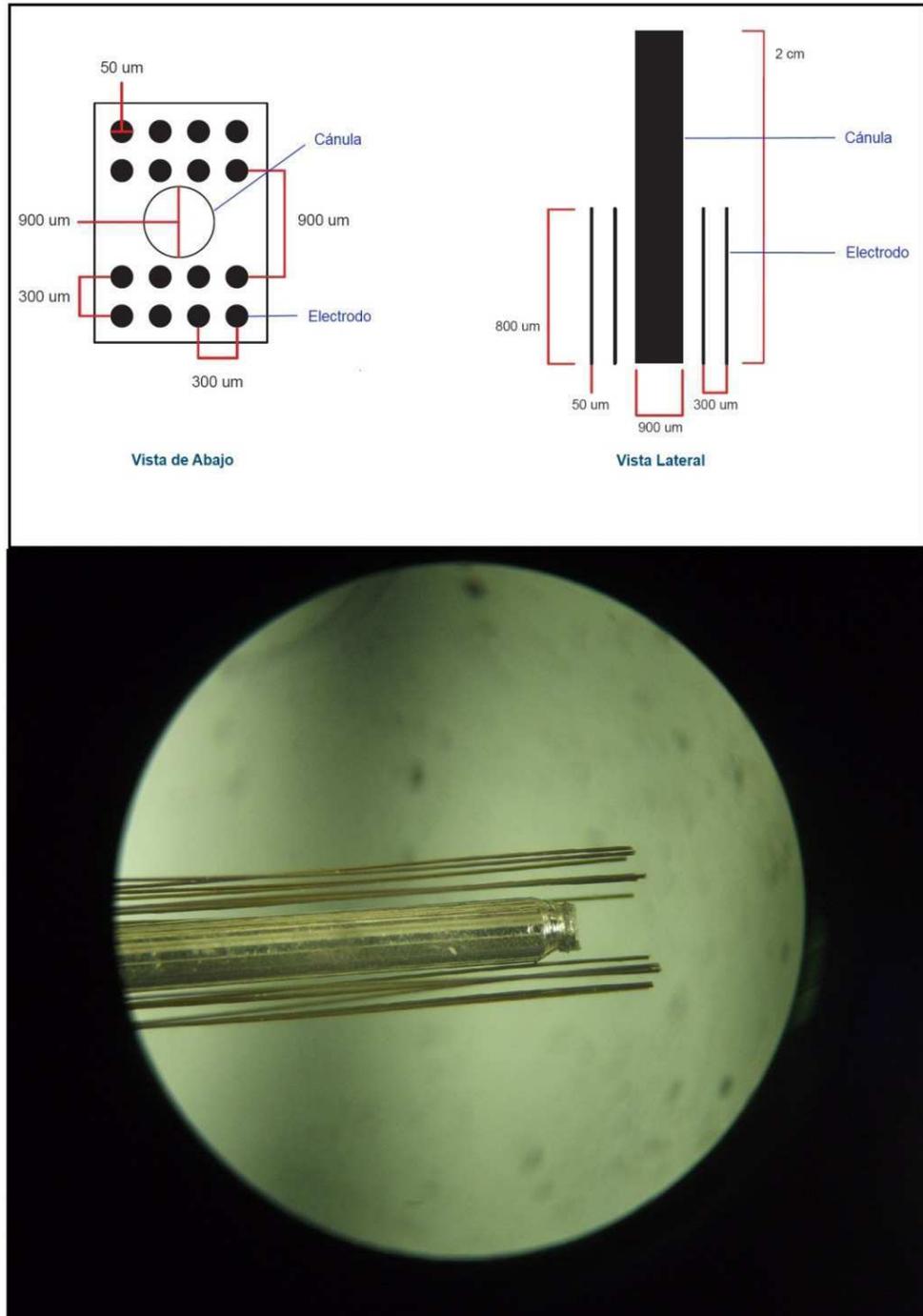


Figura 3.10. Arriba: esquema (no a escala) de la matriz construida a medida para este experimento. La misma consta de 16 electrodos de tungsteno de 50 μm de diámetro, espaciados entre sí por una distancia de 300 μm . En el centro y separando los electrodos en dos grupos de 8 cada uno, se ubica una cánula cuyo diámetro es de 900 μm . Abajo: fotografía de una de las matrices ya listas para ser implantadas.

En la Figura 3.11 se muestra el módulo láser utilizado, hecho a medida para estos experimentos. Una fibra óptica de material orgánico y 250 μm de diámetro externo es acoplada a un láser verde a través de una lente orgánica que sirve para enfocar el haz de luz en la entrada de la fibra. El encastre se logra a través de agujas de calibre 20G y 25G. A la salida de la fibra, se coloca otra aguja 25G que será insertada en la cánula (20G) presente en la matriz de multielectrodos para facilitar su posicionamiento en el momento del experimento.

Después de la cirugía, se deja pasar una semana para permitir la recuperación total del animal. En este periodo, los animales son manipulados diariamente por el experimentador para reducir el estrés generado el día del experimento, en primer lugar por el bienestar del animal y en segundo lugar porque lo que se busca es que al momento de registrar la actividad neuronal, el animal se encuentre en un estado de bajo estrés. De esta manera tanto la señal basal como los cambios registrados en ella serán más confiables y extrapolables a otros animales.

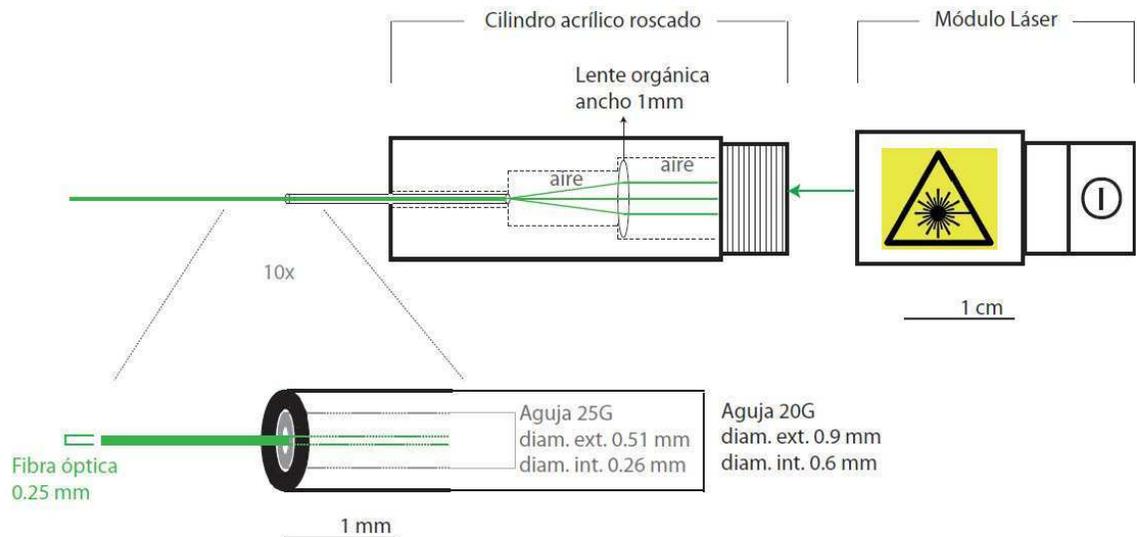


Figura 3.11. Esquema del módulo láser hecho a medida para estos experimentos. Luego de quitarle su recubrimiento, una fibra óptica de 250 μm (diámetro externo) es insertada en una cánula realizada con una aguja de 260 μm de diámetro interno (calibre 25G). Esa cánula es luego insertada en otra realizada con una aguja de 600 μm de diámetro interno (calibre 20G), que es unida con pegamento al cilindro acrílico roscado. El haz de luz emitido por el láser es acoplado a la fibra a través de una lente de material orgánico, colocando la punta de la fibra a una distancia correspondiente a la distancia focal de la lente.

En la Figura 3.12 se muestran fotografías para observar el resultado de la cirugía de implante crónico de la matriz de electrodos. Primero, se observa al animal ya colocado en la caja del experimento, con un cable a través del cual se transmite la señal, que se coloca en el conector que posee la matriz para este fin, y que une al animal con el

dispositivo de registro electrofisiológico Intan®. Luego, se muestra una vista desde arriba del implante crónico, donde se observa el conector Omnetics® con sus 16 orificios cada uno correspondiente a un canal, y la entrada de la cánula por la que se inyectará el compuesto y se colocará la fibra óptica. En esta fotografía, el animal ya se encontraba totalmente recuperado de la cirugía, con su herida cicatrizada, y un implante así realizado puede durar hasta meses si se toman los recaudos necesarios para prevenir infecciones, así como también se debe evitar que el animal se quite el implante o bien que éste sea extraído al engancharse con algún elemento de la jaula. Por último, la tercera fotografía corresponde al momento en que se enciende la fibra óptica que emite luz verde, con el objetivo de desenjaular el compuesto. La fibra entra directamente al cerebro del animal.



Figura 3.12. Arriba: el animal ya colocado en la caja del experimento y enchufado mediante su conector Omnetics® al dispositivo de registro Intan®. Abajo-izquierda: vista desde arriba del implante crónico. Se observa el conector y la entrada de la cánula. Abajo-derecha: a través de una fibra óptica que emite luz verde, se activa el compuesto enjaulado.

El día del experimento, el animal es colocado en una caja de 60 x 60 x 40 cm en donde se le permite todo el tiempo explorar libremente (Figura 3.13). La caja utilizada para el experimento está recubierta de un material conductor, de manera tal que actúa como

jaula de Faraday; de otra forma no es posible lograr un registro electrofisiológico limpio ya que el ruido proveniente del ambiente enmascara completamente la señal fisiológica. Este material conductor (aluminio) se conecta al pin “tierra” del dispositivo de registro Intan®.

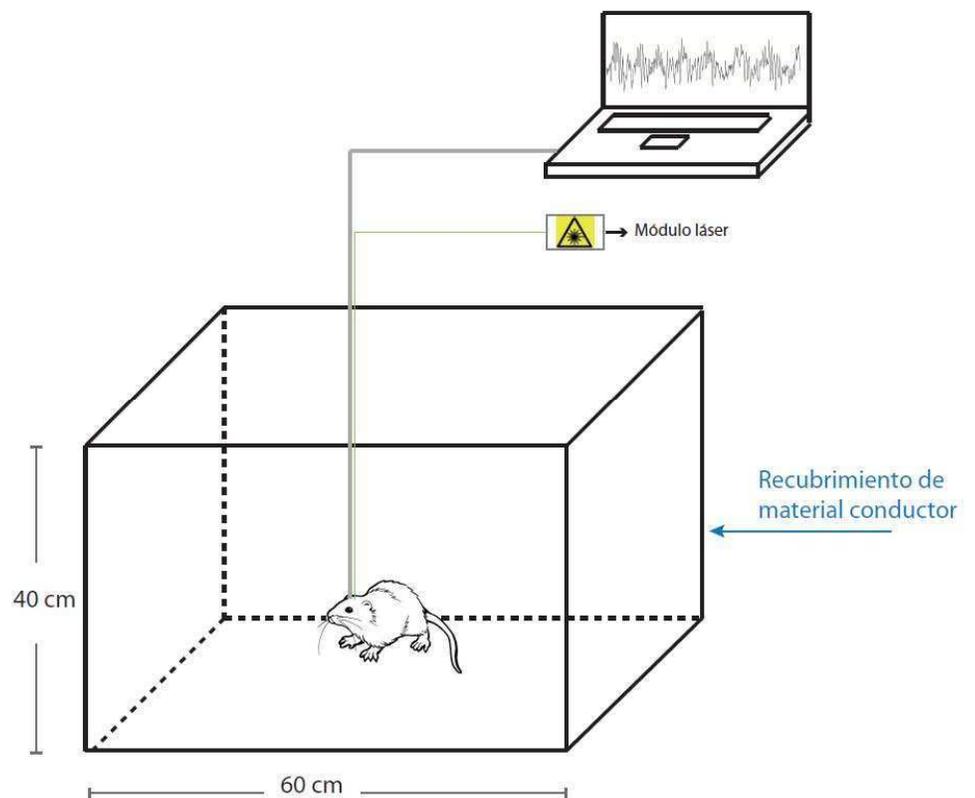


Figura 3.13. Durante el registro, se monitorea a través de una cámara de video el ciclo de sueño-vigilia en animales moviéndose libremente la arena. El registro electrofisiológico se sigue en vivo a través de una PC conectada a la placa de adquisición Intan. La caja funciona a su vez como jaula de Faraday ya que está recubierta por un material conductor.

Luego de un periodo de registro basal, se inyecta el compuesto enjaulado a una tasa de 1 $\mu\text{l}/\text{minuto}$. Una vez que 5 μl de la solución fueron inyectados, se dejan pasar 15 minutos para permitir su difusión en el tejido. Transcurrido este tiempo, se coloca a través de la cánula una fibra óptica acoplada a un láser de 532 nm (verde), el cual se enciende para liberar a la dopamina de su jaula y consecuentemente permitir que actúe sobre sus receptores. El registro de la actividad neuronal se realiza durante una hora más para evaluar la recuperación del efecto (Figura 3.14).

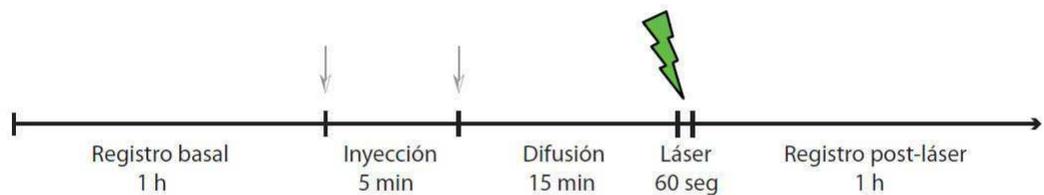


Figura 3.14. Protocolo experimental. Luego de un registro basal de 1 hora, se inyectan 5 μl de RuBi-Dopa 300 μM (tasa de inyección 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, las flechas grises indican el comienzo y el final de la inyección). El compuesto se deja difundir por 15 minutos antes de aplicar un pulso de luz verde de 60 segundos de duración (potencia del láser 1 mW) (los tiempos no están en escala).

Antes de realizar un análisis específico de los cambios generados por la liberación de dopamina en CPF, uno debe asegurarse que el registro fisiológico es normal y confiable; debe descartarse por ejemplo que en el momento del implante, el tejido cerebral haya sido dañado irreversiblemente y que en consecuencia no se obtenga una señal adecuada. Una manera de controlar esto es observando la presencia de potenciales de acción (*spikes*). Mientras que el LFP es un tipo de señal que proviene de un gran número de neuronas, los potenciales de acción sólo se podrán registrar si provienen de neuronas ubicadas inmediatamente al lado de la punta del electrodo. De esta manera, la presencia de LFP es más perdurable en el tiempo y de alguna manera resistente a daños en el tejido, mientras que si las neuronas cercanas al electrodo fueron dañadas irreversiblemente durante la cirugía, no se podrán encontrar potenciales de acción en el registro obtenido. Cabe aclarar en este punto que el recíproco de este razonamiento no es válido, es decir la ausencia de potenciales de acción no alcanza para decir que un registro es malo y debe ser descartado. En este caso la validación de la utilidad del registro deberá hacerse observando otras características del LFP, las cuales en gran medida tienen que ver con el ojo del investigador acostumbrado a mirar registros de este tipo. En la Figura 3.15 se grafica

un breve periodo del registro basal, antes de la infusión del complejo, utilizado para comprobar que la actividad neuronal es normal luego del implante y que los electrodos implantados dan una buena señal. El hecho de poder registrar potenciales de acción demuestra que las neuronas inmediatamente cercanas al electrodo se encuentran intactas y funcionales. Además, se utilizó el método de *spike sorting* para detectar *spikes* y asignarlos a distintas neuronas únicas. El *spike sorting* consiste en un proceso de análisis de todos los potenciales de acción presentes en un registro, de manera tal que son agrupados según sus características morfológicas, y cada grupo de potenciales de acción obtenido luego del análisis es asignado a una neurona distinta que está disparando. En la Figura 3.15 se grafican dos grupos distintos y bien diferenciados, en donde los *spikes* rojos corresponden a una neurona y los *spikes* verdes son disparados por una neurona distinta.

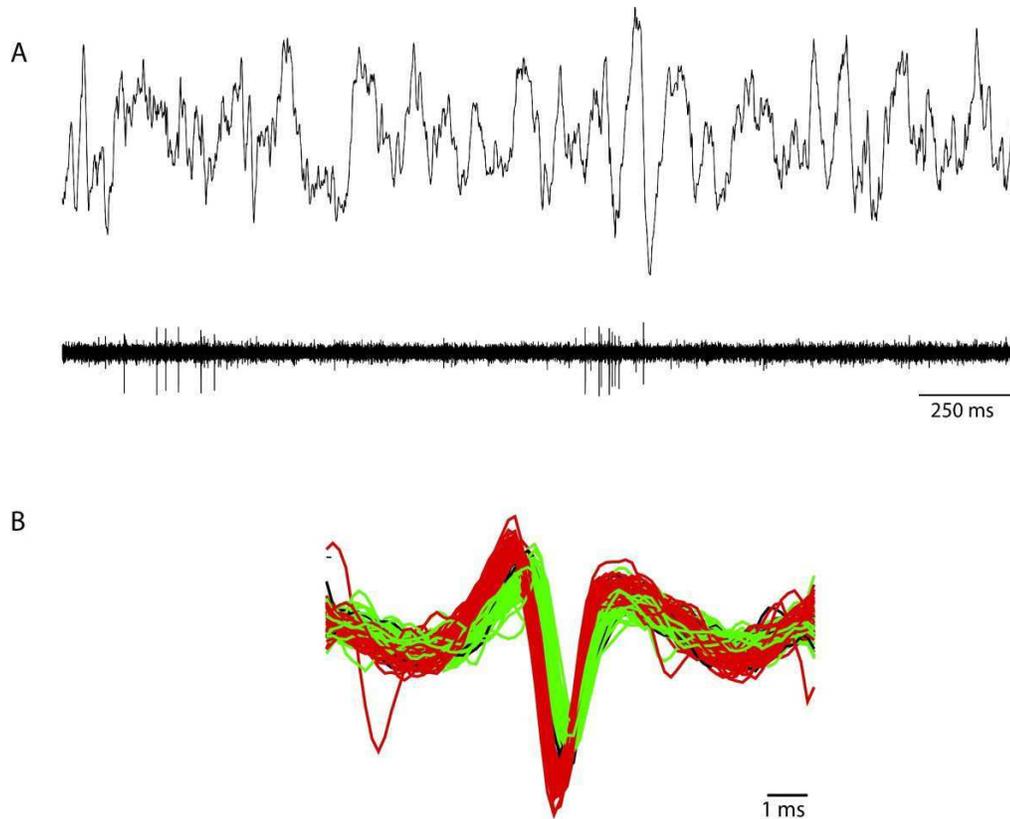


Figura 3.15. A) Un breve periodo del registro basal mostrando una señal de LFP normal (trazo superior) y el mismo periodo filtrado para frecuencias por arriba de 600 Hz, de manera de poder observar potenciales de acción (trazo inferior); su presencia indica que las neuronas cercanas al electrodo se encuentran intactas y funcionales. B) *Spike Sorting* realizado para identificar potenciales de acción generados por diferentes neuronas. En este caso, se encontraron dos neuronas diferentes, cada una representada con un color.

A partir de los datos obtenidos durante el registro, se procedió a analizar la presencia de comodulación fase-amplitud en corteza prefrontal. En el periodo de registro basal, se encontró que existe una modulación por parte de la fase de la frecuencia *theta* (8-12 Hz) sobre la amplitud de la banda *high-gamma* (HG, 80-110 Hz). Esto es ilustrado en

la Figura 3.16, en donde se muestra un comodulograma a modo de ejemplo. Como fue explicado anteriormente, en este tipo de gráfico se ubica en cada eje un rango de frecuencias y el valor de IM para cada par de frecuencias analizado es representado en una escala de colores.

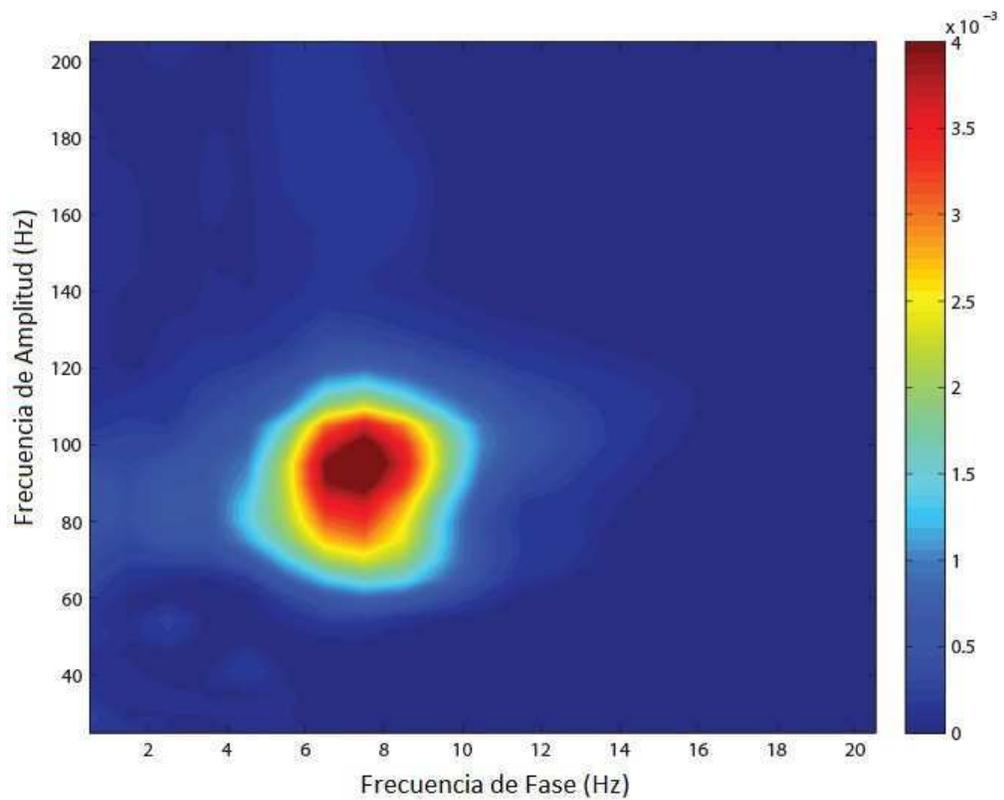


Figura 3.16. Comodulograma mostrando que la fase de la banda *theta* (8-12 Hz) está modulando la amplitud de la banda *high-gamma* (registro correspondiente al periodo basal). En el eje de colores se ven los distintos valores del Índice de Modulación (IM), el parámetro utilizado para cuantificar la fuerza de la comodulación.

La Figura 3.17 muestra el efecto de acoplamiento entre frecuencias del tipo fase-amplitud del que venimos hablando. En esta figura, se muestra un periodo de un segundo de duración. El trazo negro corresponde a la señal cruda, sin filtrar. Luego, el mismo periodo es filtrado para dos bandas de frecuencia distintas, en este caso *theta* (trazo azul, 5 a 12 Hz) y *high-gamma* (trazo rojo, 80 a 110 Hz). Al observar la superposición de las dos señales filtradas, se ve la relación que existe entre ellas: en los picos de *theta* la amplitud de *HG* aumenta, mientras que en los valles de *theta* su amplitud es mínima.

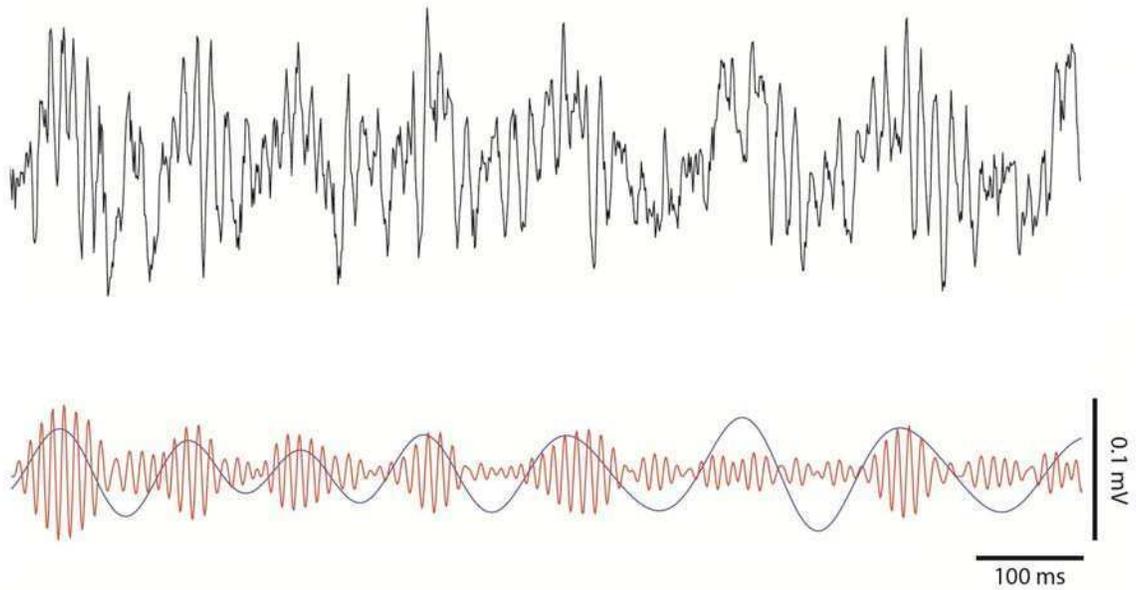


Figura 3.17. Arriba: un periodo de registro de 1 segundo de duración mostrando que la fase de *theta* (trazo azul) está modulando la amplitud de *HG* (trazo rojo). Obsérvese como la amplitud de *HG* aumenta en los picos de *theta*, mientras que la amplitud de *HG* es mínima en los valles de *theta*. Abajo: LFP del mismo periodo.

El siguiente paso fue estudiar el efecto de la liberación de dopamina a partir de RuBi-Dopa en CPF de estos animales. Es sabido que la amplitud de las distintas bandas de frecuencia del registro de LFP varía constantemente a lo largo de un registro en animales moviéndose libremente, dependiendo de la actividad del animal, y de las funciones cerebrales que se están llevando a cabo, ya que cada una de ellas está asociada a distintos procesos fisiológicos y comportamentales. De esta manera, la amplitud de cada frecuencia va a depender, por ejemplo, de la actividad que el animal

esté desarrollando. Por ejemplo, la amplitud de la banda *theta* aumenta cuando el animal está explorando el ambiente, y más aún cuando se encuentra en etapa de sueño REM (*Rapid Eye Movement*), mientras que la banda *delta* será más amplia si se encuentra en la etapa del sueño de ondas lentas (SWS, *Slow Wave Sleep*). Estas variaciones a lo largo de todo el experimento se evidencian en la Figura 3.18, donde se grafica la amplitud de las distintas bandas de frecuencia a lo largo del tiempo. No se encontraron cambios apreciables en la potencia de ninguna de las bandas de frecuencia analizadas al momento de encender el láser. Sin embargo, al analizar los valores de comodulación para todo el registro electrofisiológico comprendiendo la totalidad del experimento, se observan cambios al encender el láser. Durante las etapas basal y post-láser, aparece una comodulación de la banda *theta* sobre la banda *HG* (Figura 3.18), ya mostrada en figuras anteriores. Este tipo de interacción entre frecuencias ya ha sido reportada en trabajos anteriores y especialmente se la ha encontrado relevante en la zona del hipocampo, donde se la ha asociado a procesos de consolidación de memorias y donde sus valores máximos son alcanzados en estadios de exploración espacial y de sueño REM, es decir en aquellos momentos en los que la amplitud de la banda *theta* es mayor. No obstante, al analizar este tipo de

comodulación en CPF se observó una diferencia interesante con respecto al hipocampo: si bien la comodulación es alta en estadíos de exploración espacial, ésta desaparece totalmente en estadíos de sueño REM, aun cuando la amplitud de *theta* es máxima en este último. Esto podría sugerir una función diferente para este mecanismo en CPF, mientras que en hipocampo se asocia a la formación de memorias, proceso que se sabe ocurre durante el sueño REM, el hecho de que en CPF sólo esté presente en etapas de vigilia y no de sueño, hace pensar en la posibilidad de que la comodulación *theta-HG* en esta región del cerebro esté asociada a procesos cognitivos.

Interesantemente, al encender el láser, aparece una fuerte comodulación de la fase de la banda *delta* (1-4 Hz) sobre la amplitud de *high-gamma*, principalmente ausente o bien con valores muy bajos durante el resto del registro. Además del corrimiento de la fase de la comodulación, su intensidad aumenta considerablemente con respecto al valor presente en el estado basal. Es importante notar que cuando se analizan las variaciones de IM éste no necesariamente varía de manera proporcional a las variaciones en la amplitud de sus frecuencias, tanto de fase como de amplitud. El hecho de que la fuerza de la comodulación no se relacione linealmente con la amplitud

de las frecuencias que la componen, sugiere que este mecanismo opera en otro orden de organización de poblaciones neuronales, probablemente orquestando funciones que incluyen la integración de fenómenos de menor orden. La Figura 3.18 muestra la variación de IM a lo largo del tiempo para la comodulación *delta-HG*. Si bien se ve un aumento significativo en la fuerza de esta comodulación al momento de desenjaular dopamina, no se ven cambios asociados en las amplitudes de las frecuencias que componen esta modulación. Este resultado sugiere que la dopamina podría cumplir una función en la regulación de fenómenos asociados a la modulación de *delta* sobre *high-gamma*, pero sin afectar esto a otros parámetros fisiológicos relacionados como la amplitud general del LFP. El hecho de que esta amplitud no varíe al activar el láser también sugiere que el resultado obtenido se debe a la acción de la dopamina liberada actuando sobre sus receptores, y no a efectos inespecíficos producto de la activación del láser.

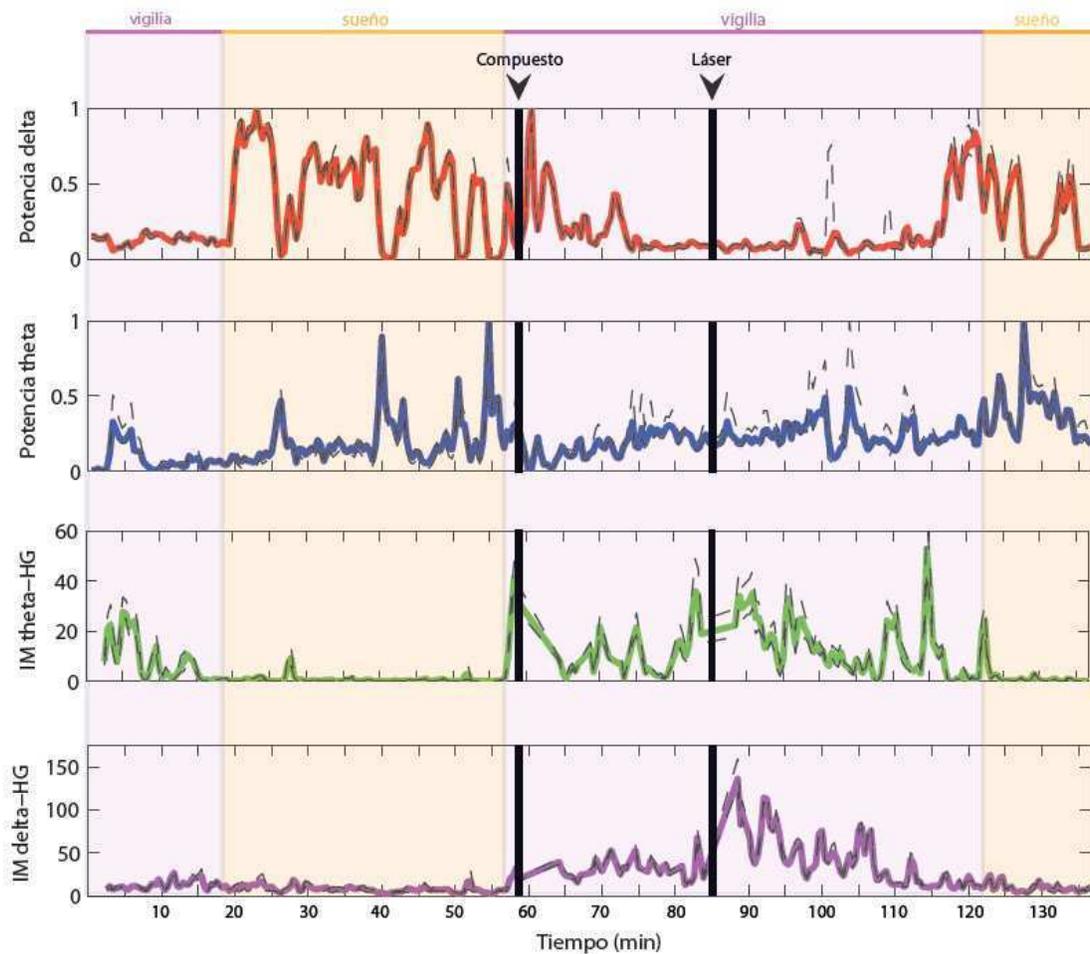


Figura 3.18. En periodos de exploración del ambiente durante el registro basal, se observa una comodulación entre la fase de *theta* y la amplitud de *high-gamma*. Cuando se activa el láser, aparece una fuerte comodulación entre la fase de *delta* y la amplitud de HG, que se encontraba o ausente o bien en valores bajos durante el resto del registro, representada por el valor del Índice de Comodulación (IM, unidades arbitrarias). Luego de la estimulación, los valores normales de comodulación se recuperan, sugiriendo fuertemente que los cambios observados son una consecuencia del neuromodulador dopamina actuando sobre sus receptores en la corteza prefrontal. Interesantemente, no se observan cambios asociados en la amplitud de ninguna de las bandas de frecuencia involucradas.

En la Figura 3.19 se ejemplifica la modulación de *delta* sobre *HG*. Nuevamente, el trazo negro corresponde a la señal cruda. Luego, se filtró la señal para las bandas *delta* (trazo azul, de 1 a 4 Hz) y *high-gamma* (trazo rojo). Esta vez, la amplitud de *HG* es máxima en los picos de *delta*, y es mínima en sus valles.

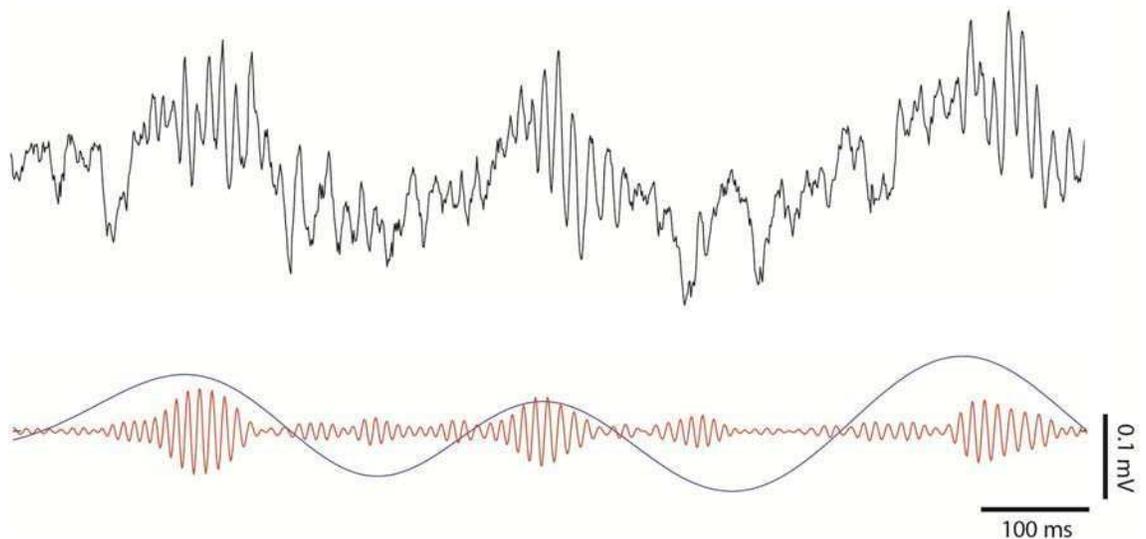


Figura 3.19. Arriba: un periodo de registro de 1 segundo de duración mostrando como la fase de *delta* (trazo azul) está modulando la amplitud de *HG* (trazo rojo). Obsérvese como la amplitud de *HG* aumenta en los picos de *delta*, mientras que la amplitud de *HG* es mínima en los valles de *delta*. Abajo: LFP del mismo periodo.

Para estar seguros que el efecto observado en el valor de IM *delta-HG* no se debe a un artefacto producto de un cambio brusco en la amplitud de las frecuencias de LFP

asociadas, en la Figura 3.20 se muestra un espectrograma perievento (siendo el evento la liberación de dopamina), de manera de observar posibles cambios abruptos en la potencia de alguna o todas las bandas de frecuencia involucradas. Un espectrograma nos permite representar en una escala de colores la potencia de cada frecuencia a lo largo de tiempo (en unidades de $\text{mV}^2 \cdot \text{s}/\text{Hz}$). Además, se grafican seis comodulogramas representativos de las cuatro etapas del registro: el estado basal antes de inyectar el complejo, el estado luego de inyectarlo, el momento del encendido del láser y el registro posterior que permite ver la recuperación del efecto. Como puede verse en la figura, en el momento del encendido del láser (trazo verde) la potencia de las bandas de frecuencia involucradas no cambia mientras que la fuerza de la comodulación sí lo hace.

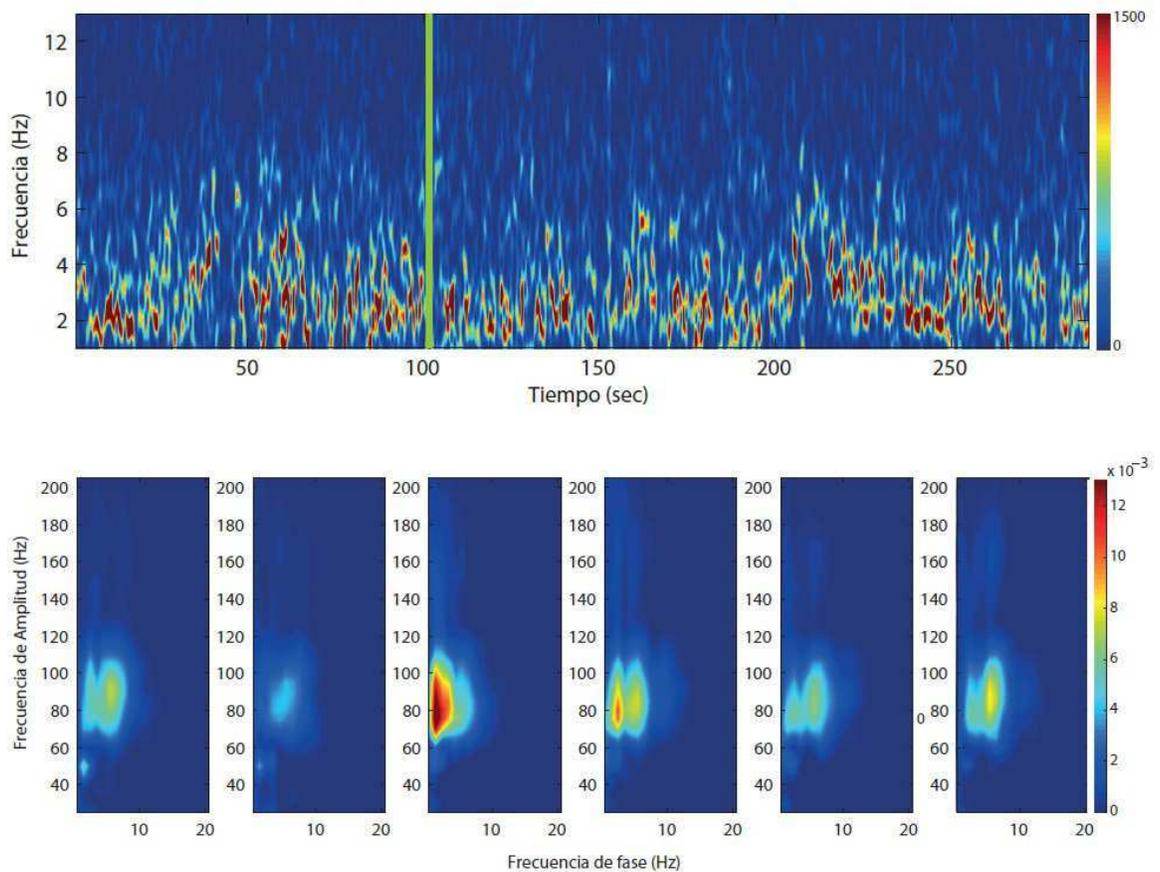


Figura 3.20. Efecto del desenjaulado de RuBi-Dopa sobre la comodulación *delta-HG*. Espectrograma (arriba) en donde se representa en una escala de colores la potencia de ambas bandas de frecuencia (en $\text{mV}^2 \cdot \text{s}/\text{Hz}$), *delta* (1 – 4 Hz) y *theta* (5 – 12 Hz). Al momento de activar el láser (trazo negro), no se registran cambios en la potencia de ninguna de estas bandas. Abajo, los seis comodulogramas correspondientes al mismo periodo de registro, representando las etapas previa y posterior al láser, mostrando el aumento en la fuerza de la comodulación como resultado del desenjaulado de dopamina. En la escala de colores, se representa el valor del Índice de Modulación (IM).

Otro aspecto interesante para observar es el aumento parcial en la fuerza de la comodulación que aparece durante la difusión del compuesto, antes de activar el láser.

En la Figura 3.21 se muestra el análisis estadístico comparado las 4 condiciones del

experimento. El efecto del compuesto enjaulado de dopamina se ve en el cambio de la fuerza de la comodulación *delta-HG* al aplicar en complejo, el cual aumenta significativamente al activar el láser (n = 25 canales, 2 animales).

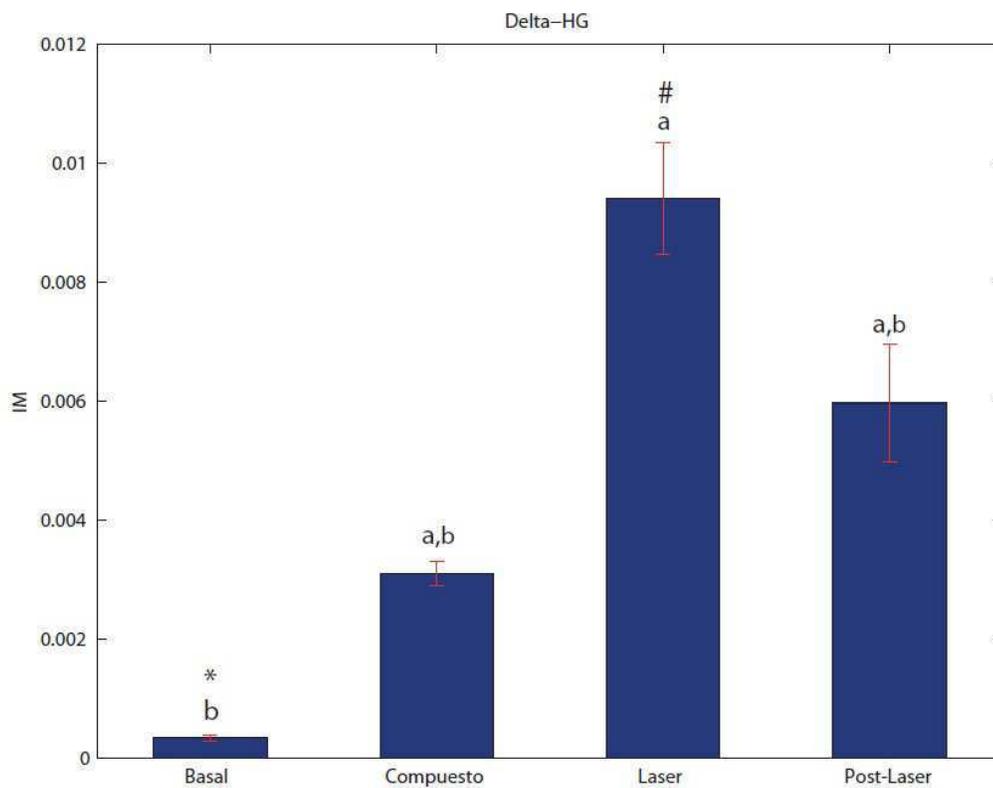


Figura 3.21. Resultados de grupo (n = 25 canales, 2 animales) mostrando el valor del Índice de Comodulación (IM) para *delta-HG* en las 4 condiciones del experimento. El compuesto utilizado es RuBi-Dopa. (“*” es significativamente diferente de ‘a’; ‘#’ es significativamente diferente de ‘b’, de acuerdo al test de Friedman). Las barras rojas representan \pm Std.

Este efecto se encuentra en todos los casos en los que se inyectó RuBi-Dopa (Figura 3.21 y 3.22) pero no en experimentos similares en donde se inyectó otro tipo de compuesto enjaulado: RuBi-GABA; en la Figura 3.23 se ve que no hay un aumento significativo en el valor de IM *delta-HG* en ninguna de las condiciones, al inyectar RuBi-GABA o activar el láser en esas condiciones, es decir que este efecto es específico de RuBi-Dopa y no es común a otros enjaulados que poseen exactamente la misma base molecular. Consecuentemente se atribuye el efecto del compuesto a la presencia de pequeñas cantidades de dopamina libre en la solución (impurezas), que estaría actuando sobre sus receptores y de alguna manera “adelantando” el efecto de la liberación de grandes cantidades de dopamina al iluminar el complejo.

Como control negativo, se realizó un experimento en el cual fue inyectado RubiDopa pero no fue encendido el láser. Nuevamente, se ve el efecto del compuesto sobre el valor de IM pero éste nunca llega a valores significativamente mayores al transcurrir el tiempo luego de la inyección pero sin encender el láser (Figura 3.22). Esto refuerza el resultado obtenido y permite mostrar con mayor robustez que se debe a la liberación de dopamina a partir de RuBi-Dopa y no a artefactos producto del protocolo

experimental como podrían ser la sola presencia del complejo de rutenio o el encendido del láser. Para todos los gráficos de barras, cada condición consiste en un periodo de 200 segundos de duración; condición "basal": periodo inmediatamente anterior a la inyección del compuesto. Condición "compuesto": periodo inmediatamente anterior a la activación del láser. Condición "láser": comienza en el momento en que se enciende el láser. Condición "post-láser": periodo inmediatamente posterior a la condición "láser". El análisis de datos que se realiza sobre los datos en este caso, calcula el promedio del valor de IM para cada condición. Si se analiza el registro entero para cada condición, podrían perderse los efectos observados ya que los aumentos y disminuciones naturales que presenta este parámetro se cancelan entre sí. Por este motivo, se seleccionaron periodos de sólo 200 segundos correspondientes a las etapas más relevantes de cada condición para hacer las comparaciones estadísticas.

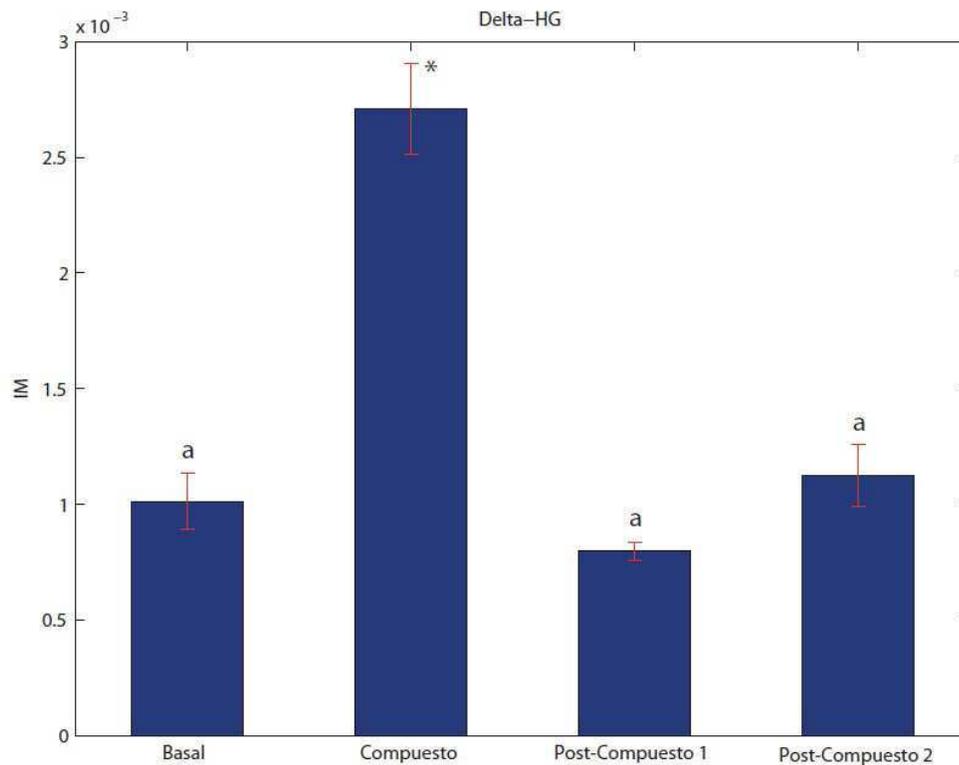


Figura 3.22. Resultados de grupo (n = 28 canales, 2 animales) mostrando el valor del Índice de Comodulación (IM) para delta-HG en un experimento en el cual se inyectó RuBi-Dopa pero no se activó el láser. Se observa el efecto del compuesto (ver texto) pero no se ve el aumento significativo en el valor de IM luego la inyección si el complejo no es activado por la luz. (“*” es significativamente diferente de ‘a’, test de Friedman). Las barras rojas representan \pm SD. Los registros “Post-Compuesto 1” y “Post-Compuesto 2” representan dos periodos de igual duración inmediatamente posteriores al periodo “Compuesto”.

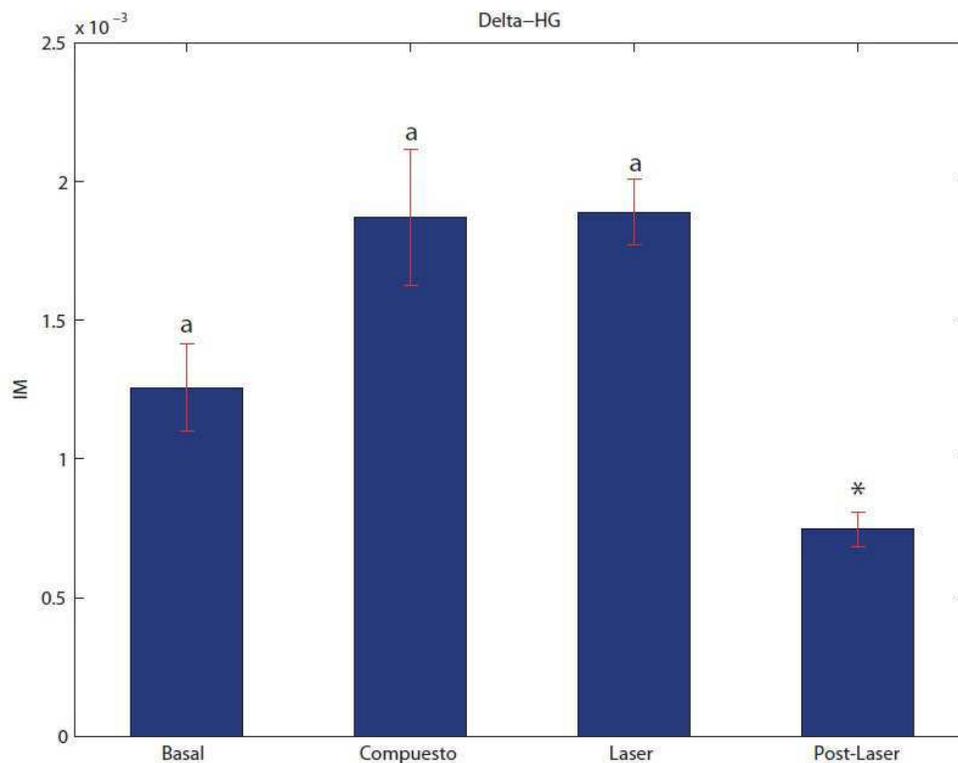


Figura 3.23. Resultados de grupo (n = 22 canales, 2 animales) mostrando el valor del Índice de Comodulación (IM) para delta-HG en las 4 condiciones del experimento. El compuesto utilizado es RuBi-GABA. (“*” es significativamente diferente de ‘a’, test de Friedman). Como se observa en la figura, la aplicación de este compuesto no tiene efecto sobre el valor de IM, y este valor tampoco se ve afectado por el encendido del láser, mostrando que el efecto encontrado es específico de RuBi-Dopa. Las barras rojas representan \pm SD.

Para confirmar que la cánula y los electrodos se encontraban en la ubicación deseada, se realizó un protocolo de histología en los cerebros de los animales luego de su sacrificio. En la Figura 3.24 se muestran imágenes representativas de los cortes histológicos superpuestos con la imagen correspondiente al atlas Paxinos (*The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6ta Ed.), donde puede verse que la huella de la cánula se encuentra en el área prelímbica (PrL) de la CPF.

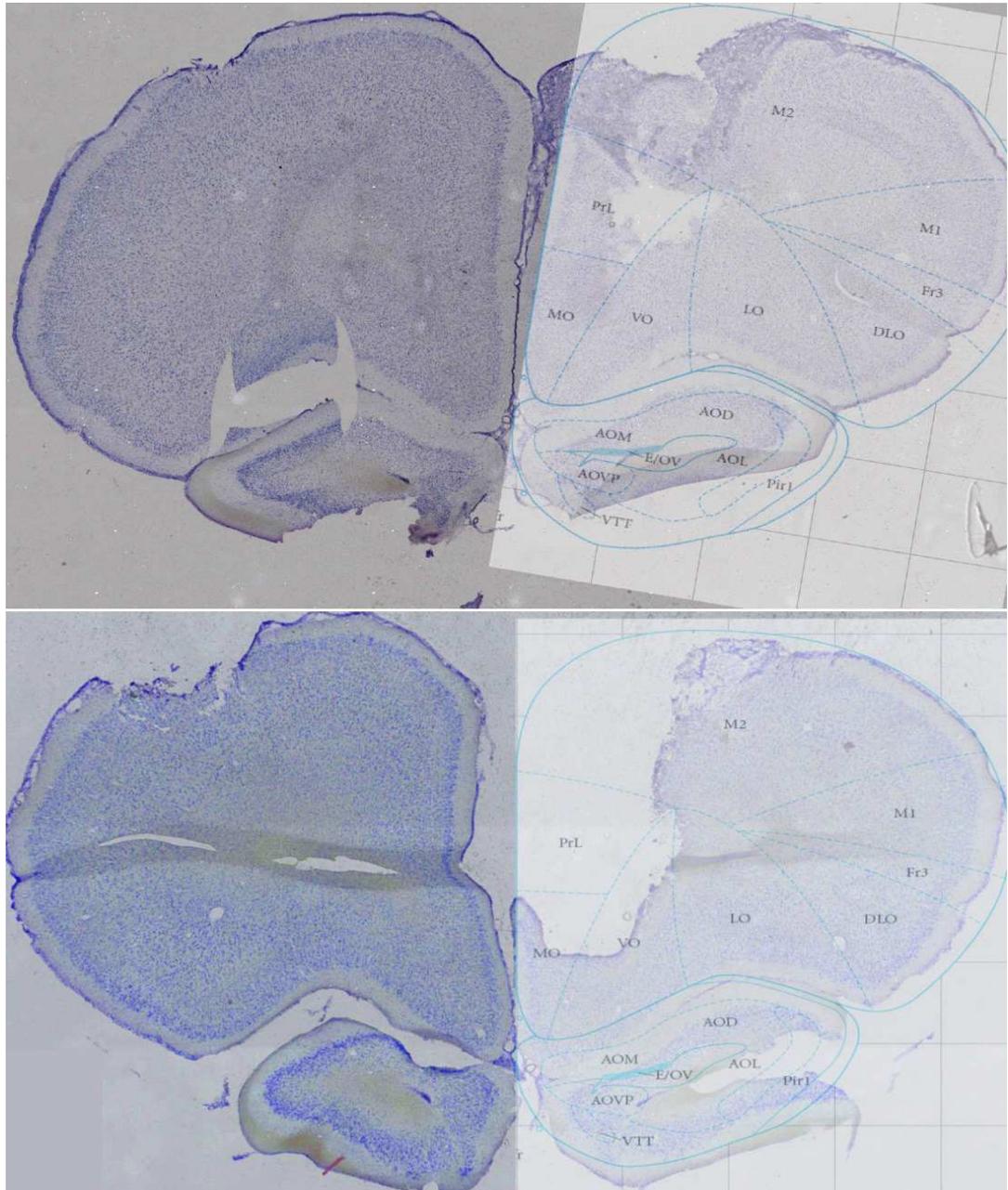


Figura 3.24. Corte histológico con coloración de Nissl superpuesto con la imagen correspondiente del atlas Paxinos, realizado para confirmar la ubicación correcta de los electrodos y la cánula. PrL: área prelímbica de la corteza prefrontal (cada fotografía corresponde a un animal diferente).

4 DISCUSIÓN

Hasta ahora, sólo se encontraba disponible en el mercado un enjaulado capaz de liberar dopamina (NPEC-Dopamina). Este compuesto es de base orgánica, y libera dopamina al ser irradiado con luz ultravioleta (360 nm). Como ya dijimos, RuBi-Dopa se activa con longitudes de onda en el rango visible (405-532 nm) y también en régimen de dos fotones.

A la hora de analizar las ventajas de RuBi-Dopa sobre NPEC-Dopamina, probablemente lo primero que surge es esta gran diferencia que supone el hecho de que la primera se libera con luz visible, mientras que la segunda sólo lo hace con luz ultravioleta. Esto representa ventajas tanto prácticas como económicas. Primero, la luz visible (longitudes de onda más largas, menor energía) no daña los tejidos biológicos, mientras que la luz ultravioleta (longitudes de onda más cortas, mayor energía) puede causar diversos efectos adversos tanto a nivel celular como tisular, alterando ácidos nucleicos y proteínas o desencadenando respuestas celulares a estrés, pudiendo interferir con el objeto de estudio. A la hora de experimentar en biología, debemos buscar justamente herramientas que disminuyan al máximo la probabilidad de interferir de manera no deseada con el sistema que estamos estudiando, ganando este factor más importancia aún si estamos utilizando animales vivos.

Por otro lado, si estamos buscando estimular con luz un tejido biológico de ubicación considerablemente profunda, como lo es por ejemplo una rodaja de cerebro o más aún un cerebro entero dentro de un animal vivo, vamos a necesitar que la luz penetre suficientemente en el tejido como para activar zonas profundas de interés. La penetrancia de la luz es directamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda. Gracias a que la luz visible sufre menos desviaciones al atravesar el tejido, no sólo llegará más profundo sino que además mejorará la resolución espacial de la estimulación.

Otra gran ventaja del uso de luz visible sobre luz UV tiene que ver con los gastos implicados en equipamiento para trabajar con una y con la otra. Tanto las fuentes luminosas utilizadas en régimen de un fotón (en nuestro caso, láseres DPSS de Nd-YAG de 532 nm) como la óptica asociada a ellas son considerablemente más económicas que las análogas de luz ultravioleta. En los experimentos *in vivo* presentados en este trabajo se ha utilizado un módulo láser verde comercial de muy bajo costo (\$5- \$50 USD), el cual fue acoplado a una fibra óptica en el laboratorio, a través de una lente de material orgánico de bajo costo también. En cambio, para trabajar con compuestos enjaulados orgánicos que necesitan longitudes de onda menores a los 400 nm para activarse, es necesario utilizar láseres UV y lentes de cuarzo, que son mucho más costosos. El hecho de poder utilizar luz visible para realizar estos experimentos abre la posibilidad de montar un *setup* con la óptica

necesaria para experimentos electrofisiológicos *in vivo* a muy bajo costo, lo que constituye uno de los principales factores a tener en cuenta a la hora de hacer ciencia en esta región del mundo.

Otra diferencia que surge de la comparación entre ambas es su solubilidad: mientras que NPEC-Dopamina precisa ser pre-disuelta en DMSO u otro solvente orgánico para luego diluirse con la solución salina correspondiente, alcanzando una solubilidad de 100 mM, RuBi-Dopa es un compuesto extremadamente hidrofílico. En este trabajo se ha utilizado la sal de hexafluorofosfato, que alcanza su límite de solubilidad en agua a pH=7 de aproximadamente 20 mM. Sin embargo, si se utiliza cloruro como contraión pueden alcanzarse concentraciones mucho más elevadas, mayores que 1M. Estas soluciones no son utilizables directamente en preparaciones biológicas pero agilizan la preparación de soluciones adecuadas mediante una solución madre de alta concentración.

Los compuestos enjaulados a base de rutenio, como RuBi-Dopa, presentan diversas características químicas que permiten su utilización en experimentos biológicos. Primero, el hecho de que al fotolizar la muestra a través de la irradiación con luz del tubo de RMN, sólo aparezcan las señales correspondientes a la dopamina libre y que estas sean las mismas que se encuentran al agregar dopamina pura, indica que durante la fotólisis no se produce la fotodegradación de los productos. Así, no se producen en el proceso de fotorreacción productos espurios no deseados que puedan

interferir con el sistema que se está estudiando. Además, contrariamente a las típicas reacciones de los compuestos enjaulados orgánicos, la reacción de fotosustitución del ligando de interés por una molécula de solvente no presenta pasos intermedios; esto permite asegurarse de que tampoco habrá intermediarios de reacción que puedan interferir en el tejido en estudio.

Es importante destacar que este parámetro la longitud de onda necesaria para desenjaular estos complejos se puede modular variando la naturaleza de los ligandos que se coordinan al rutenio. Así, los ligandos de naturaleza aceptora de electrones bajan la densidad electrónica sobre el metal, estabilizando sus orbitales *d* y provocando el aumento de la energía necesaria para pasar al estado MLCT, que ahora requerirá luz de mayor longitud de onda (el pico de absorción se corre hacia el azul). De manera contraria, ligandos de naturaleza donora de electrones corren la energía de la banda MLCT hacia longitudes de onda menores, requiriendo así luz de menor energía (el pico de absorción se corre hacia el rojo).

A la hora de trabajar en preparaciones biológicas, otro factor muy importante es el de trabajar con compuestos que sean de naturaleza hidrofílica, de manera tal que presenten baja afinidad por medios hidrofóbicos como la membrana plasmática y así sean menos citotóxicos. Si se trabaja con compuestos que se insertan en las membranas, esto será perjudicial para la célula o tejido en cuestión y por lo tanto su toxicidad será mayor. Esta característica también puede sintonizarse variando el

ligando monodentado que se utiliza en la síntesis del complejo. Un tipo de molécula que se utiliza para cumplir esta función es la fosfina; este tipo de ligando posee un gran carácter π aceptor, provocando un efecto de retrodonación π que baja la densidad electrónica sobre el metal aumentando la energía de la banda MLCT. Como ya fue explicado, al aumentar la energía de transición hacia la banda MLCT, disminuye la energía necesaria para saltar desde el estado $^3\text{MLCT}$ hacia el estado d-d y consecuentemente se facilita la vía de relajación disociativa y así la eficiencia cuántica de fotoliberación (Figura 1.7). Algunas versiones de neurotransmisores enjaulados a base de rutenio sintetizados en el laboratorio poseen trifenilfosfina (PPh_3) como ligando monodentado; si bien estos compuestos presentan buenas eficiencias cuánticas, su alta lipofilidad los hace menos compatibles con cultivos o tejidos biológicos por su posible toxicidad. La solución a este problema es el reemplazo del ligando PPh_3 por una molécula de trimetilfosfina (PMe_3); esta versión de compuestos enjaulados de rutenio presenta menor eficiencia cuántica que su versión con PPh_3 ; este último se encuentra 20 nm corrido hacia el azul o sea que su banda MLCT es de mayor energía y su ϕ_{lib} también es mayor. Es interesante destacar la gran ventaja que presenta la posibilidad de sintonizar diferentes características del complejo a través de la manipulación de los ligandos coordinados al rutenio. Sobre todo, porque las características que se pueden sintonizar, como ser su hidrofilidad, potencial redox, la longitud de onda de la luz con la que será necesario irradiar la muestra para

desenjaular, etc, permiten la mejora de estos compuestos sobre una base racional a la hora de trabajar en preparaciones biológicas.

Como se describió en la introducción de este trabajo, Pinnick y Durham [17] estudiaron la relación lineal existente entre la energía de la banda MLCT para este tipo de compuestos y su eficiencia cuántica de fotoliberación. Con el fin de verificar si RuBi-Dopa se comporta de manera similar a otros miembros de esta familia de enjaulados, se graficó su eficiencia cuántica de fotoliberación versus la longitud de onda de la banda MLCT para RuBi-Dopa y otros miembros reportados por los autores cuyo ϕ_{lib} fue determinado en solución acuosa (Tabla 4.1).

	XY	λ_{MLCT} (nm) ^a	ϕ_{lib} ^a
1	(acetonitrilo) ₂	423	0.44
2	(piridina) ₂	456	0.26
3	(pirazol) ₂	468	0.20
4	(H ₂ O) ₂ cis	480	0.05
5	(H ₂ O) ₂ trans	495	0.03
6	(PMe ₃)(dopamina)	449	0.11

^a Determinado en agua.

Tabla 4.1. Posición de la banda MLCT (λ_{MLCT}) y eficiencia cuántica de fotoliberación (ϕ_{lib}) para compuestos del tipo $[Ru(bpy)_2(X)(Y)]^{2+}$ en solución acuosa. Adaptado de Pinnick y Durham [17].

Como puede verse en la Figura 4.1, la eficiencia cuántica de fotoliberación para RubiDopa (representado por el punto A) cae en un valor que es aproximadamente la mitad del que uno esperaría según su banda MLCT. Esto se debe a que en este complejo se libera sólo una molécula de dopamina, mientras que en los otros complejos estudiados se liberan dos ligandos iguales. El mismo comportamiento se verifica en otros complejos similares como RuBi-Glutamato o RuBi-GABA. Dicho esto, podemos decir que RuBi-Dopa se comporta de acuerdo a lo esperado, comparándolo con otros miembros de su familia de enjaulados.

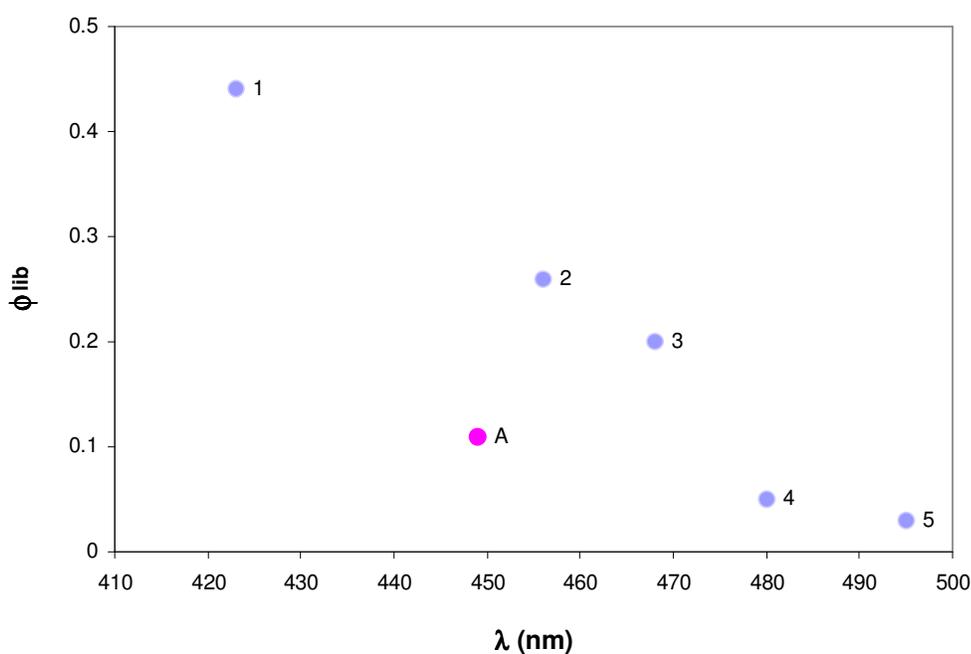


Figura 4.1. Relación entre la eficiencia cuántica de fotoliberación y la longitud de onda de la banda MLCT para compuestos reportados por Pinnick y Durham (lila) y para RuBi-Dopa (rosa). Datos en la Tabla 2.

Una característica importante que se ha demostrado en este trabajo es la posibilidad de utilizar RuBiDopa en régimen de dos fotones (2P), presentando así el primer enjaulado de dopamina con capacidad de ser activado en esta configuración experimental.

La posibilidad de desenjaular en 2P permite lograr una resolución espacial de activación del orden del micrómetro en el eje Z, decenas de veces mejor que lo que se obtiene mediante la excitación normal (1P). Esta es una característica clave a la hora de pensar en usar este enjaulado para el mapeo de receptores dopaminérgicos, ya que permite la estimulación a nivel de espinas individuales. Hemos mostrado aquí que RuBi-Dopa puede ser utilizada para estimular espinas dendríticas en corteza cerebral. Esto abre la posibilidad de realizar estudios de mapeo funcional de receptores dopaminérgicos a gran escala, lo que constituiría un importante aporte al conocimiento de las redes neuronales que involucran al neuromodulador dopamina, que se sabe está relacionado a importantes patologías neurológicas y desórdenes psiquiátricos.

El hecho de poder liberar dopamina a partir de RuBi-Dopa en régimen de dos fotones, una característica que pocos enjaulados tienen y ningún enjaulado de dopamina presentado hasta ahora, convierte a este enjaulado en una herramienta para activar neuronas a nivel de espinas dendríticas. En este trabajo se realizó la activación óptica y mediciones ópticas funcionales de calcio en cabezas de espinas dendríticas luego de

la liberación de dopamina. Estos experimentos requirieron la inyección de un indicador de calcio a través del electrodo de *patch*. Sin embargo, para realizar un mapeo funcional totalmente óptico de la transmisión dopaminérgica a nivel de espina dendrítica simple, se podría combinar el desenjaulado de RubiDopa con un indicador de calcio específico para neuronas codificado genéticamente (por ejemplo GCaMP). Usando estas técnicas, sería posible evitar las características invasivas de las técnicas electrofisiológicas estándar. También es posible utilizar en algunas preparaciones un indicador fluorescente con capacidad de permeación de membrana. A la concentración de RuBi-Dopa utilizada en este trabajo, no se observaron efectos deletéreos funcionales ni morfológicos en la espina (demostrado por la fidelidad de la respuesta de calcio) así como ningún daño se vio en la cabeza de la espina luego del desenjaulado. Esta ausencia de fototoxicidad aguda a nivel celular y de espina podría deberse al hecho de que en la fotorreacción de RuBi-Dopa no se generan radicales, ya que el enlace Ru-N se rompe heterolíticamente, generando dos moléculas enteras.

Químicamente, este es el primer compuesto enjaulado de dopamina activo en régimen de dos fotones. Biológicamente, estos experimentos son la primera prueba de que puede liberarse dopamina con precisión de dos fotones a espinas dendríticas simples, los principales receptáculos de información excitatoria en el cerebro, y generar una respuesta de calcio local.

Por último hemos demostrado en este trabajo el uso de RuBi-Dopa en experimentos *in vivo*. Cabe destacar que en los trabajos conocidos hasta la fecha que han utilizado dopamina enjaulada para estimulación en experimentos neurofisiológicos, sólo lo han hecho en rodajas de cerebro, es decir en configuraciones experimentales *in vitro*. Esto podría estar relacionado con la baja penetrancia en tejido que tiene la luz UV, que no permite estimular en preparaciones de relativamente considerable profundidad como lo es un cerebro entero.

Por otro lado, hasta el momento sólo se han reportado dos casos de uso exitoso de compuestos en base a rutenio en animales vivos (RubiGABA en ambos casos), y se trataba de animales anestesiados. En los experimentos que aquí se exponen, se ha desarrollado una nueva técnica para la administración y posterior activación del complejo. Primero, se diseñaron y construyeron matrices de multielectrodos extracelulares de tungsteno recubiertos en teflon que poseen una cánula central que tiene una función doble: por un lado la inyección del complejo, y por el otro lado el posicionamiento de una fibra óptica a través de la cual llega la luz proveniente de un láser que activa el complejo. Este fue otro paso en el cual se simplificó y se economizó en el montaje de la óptica necesaria, ya que se logró acoplar el láser a la fibra en el laboratorio utilizando tanto fibras ópticas como lentes de material orgánico de bajo costo, obteniendo una buena relación entre la potencia obtenida a la salida de la fibra

(~1 mW) y la potencia directa del láser (5 mW), lo cual alivia la tarea de preparación del *setup* experimental que generalmente incluye procedimientos de calibración costosos llevados a cabo por personas especializadas en sistemas ópticos.

Antes de ser utilizados, los animales son sometidos a una cirugía en donde las matrices son implantadas de manera crónica. Si el implante es realizado correctamente, puede durar varios meses permitiendo muchas sesiones experimentales en el mismo animal. Esto, además de una ventaja práctica para el investigador, representa una gran ventaja en el aspecto bioético de la experimentación con animales: mientras que los experimentos agudos nos obligan a utilizar un animal por cada registro que se realiza, el implante crónico permite múltiples sesiones de registro sacrificando un sólo animal. Además, en nuestro trabajo es muy importante poder monitorear la salud y el estado general del animal antes y después de haber realizado los experimentos, ya que esto nos permite sacar conclusiones sobre la inocuidad del complejo inyectado en el cerebro, debido a que los animales vivieron durante al menos un mes luego de haber recibido la inyección, sin alteraciones aparentes en su estado general ni en su comportamiento. Los animales fueron sometidos a eutanasia a distintos tiempos post-cirugía (siempre más de un mes), y todos presentaban buenas condiciones de salud.

Además de todo esto, a través del implante crónico de estas matrices es posible estimular exactamente en la misma región del cerebro en múltiples sesiones de

registro, cosa que es extremadamente dificultosa en los experimentos agudos en animales anestesiados que se hicieron hasta ahora, en los cuales los electrodos son colocados en determinada región en un animal que luego no puede volver a ser utilizado, sumando así un grado de libertad a los experimentos, que son las pequeñas diferencias anatómicas que existen entre distintos animales. Al registrar reiteradas veces en el mismo animal tenemos la certeza de estar estimulando siempre en el mismo lugar.

El novedoso diseño de las matrices de multielectrodos extracelulares presentadas en este trabajo, abre la posibilidad de inyectar y activar el compuesto exactamente en el mismo punto, y ambas cosas presentan ventajas importantes si comparamos nuestros experimentos con los anteriormente realizados liberando GABA a partir de RubiGABA [24,25]. En aquellos experimentos el complejo es administrado a través de difusión, colocándolo en la superficie de la corteza cerebral y luego permitiendo que difunda libremente por el cerebro. De esta forma se vuelve prácticamente imposible conocer exactamente a qué zonas del cerebro está llegando el compuesto enjaulado. Además en estos experimentos se activan los compuestos iluminando el tejido con LEDs o directamente con láseres. Al estimular con un LED o con un láser desde afuera del cerebro, si bien se obtiene un mecanismo simple que puede extrapolarse a posibles terapias médicas, se pierde la posibilidad de lograr una buena resolución en la activación. Además de esto, se vuelve dificultoso estimar qué tan profundo llegará la

luz en el tejido. Los factores recién descritos limitan quizás este tipo de configuración experimental a la liberación de compuestos enjaulados en la corteza cerebral. En cambio, si posicionamos una fibra óptica de manera tal que siempre quedará cerca de los electrodos con los que estamos registrando y del lugar en donde inyectamos el compuesto, tenemos una forma de restringir la activación al lugar que nos interese, pudiendo llegar potencialmente, conociendo las coordenadas adecuadas, a cualquier región del cerebro.

Cabe destacar también que todos los registros fisiológicos aquí presentados fueron realizados con un equipo que ha salido hace (relativamente) poco tiempo al mercado. El mismo se trata de una plaqueta de adquisición comercializada por Intan Technologies, y su precio es una mínima fracción del que tienen los muy costosos equipos utilizados por laboratorios del primer mundo para electrofisiología, permitiendo sin embargo registros neurofisiológicos de alta calidad y totalmente comparables con los que se obtienen utilizando esos equipos costosos. Esto se ha obtenido mediante un cambio radical en la estructura del equipo de registro. Mientras los sistemas tradicionales contienen un preamplificador que toma la señal extracelular, la amplifica y la envía en forma analógica al sistema central de digitalización a través de cables mallados, en este sistema la digitalización se hace directamente en el *headstage*, de modo que la señal enviada es digital, y por lo tanto no susceptible de ruido ni *crosstalk* entre los diversos canales. De esta manera se obtiene una medición

robusta y de gran calidad a un costo decenas de veces inferior al de los sistemas tradicionales.

Por otra parte, comparando con las técnicas optogenéticas en las que se transfectan determinado tipo de células a través de un vector específico, o bien se utilizan organismos genéticamente modificados, los compuestos enjaulados de rutenio son una opción ventajosa, ya que para ser utilizados sólo se necesita inyectar el compuesto sin ningún tipo de alteración permanente sobre la fisiología del objeto de estudio. Este hecho incrementa su importancia cuando se tienen en cuenta las aplicaciones médicas de estas técnicas, en las cuales la modificación genética de tejidos humanos puede ser muy dificultosa y/o peligrosa.

En este sentido, otro factor importante a tener en cuenta al trabajar con compuestos enjaulados es su potencial para ser usados farmacológicamente. Al permitir la administración de un gran número de neurotransmisores y otras moléculas neuroactivas, el uso de compuestos enjaulados tiene el potencial de ser aplicado en el área de la medicina para tratar afecciones que requieran la administración de estas moléculas en el cerebro. Potencialmente, podría administrarse el compuesto al paciente y en el momento requerido, activarlo a través de una fibra óptica implantada previamente en el cerebro. En su trabajo del año 2012, Yang et al. [25] discuten las numerosas e importantes ventajas de la utilización de GABA enjaulado (RuBi-GABA)

sobre otras técnicas usadas actualmente para prevenir convulsiones en modelos de epilepsia. Sin embargo, en su trabajo sólo realizan pruebas *in vivo* agudas, sin poder estimar por lo tanto potencial daño en el modelo animal estudiado. Aquellos resultados sumados a lo que se expone en este trabajo, son un paso importante en este camino, ya que demuestran no sólo la funcionalidad del compuesto sino que los animales continuaron intactos después de la administración y activación del compuesto, y que tanto la integridad física del animal como la calidad del registro neurofisiológico no se vieron afectados en los días posteriores al experimento. Por último, la administración in-vivo de compuestos enjaulados en base a rutenio en un sistema tan complejo como el cerebro sin haber detectado reacciones adversas importantes muestra la aplicabilidad de estas técnicas para la administración focalizada no sólo de compuestos neuroactivos sino de todo otro tipo de fármacos. En particular, la administración de drogas de alta toxicidad (p.ej. antitumorales) puede volverse factible al lograr una liberación localizada a la zona necesaria, reduciendo los efectos colaterales al mínimo.

5 CONCLUSIONES

En este trabajo se ha presentado en sociedad a la RuBi-Dopa, un compuesto enjaulado a base de rutenio-bipiridina que presenta ventajas notables sobre otros enjaulados disponibles hasta ahora. Además, se ha mostrado la capacidad de este compuesto de ser usado en experimentos neurofisiológicos *in vivo*, convirtiéndose así en uno de los pocos ejemplos que existen en la actualidad de manipulación exitosa de la actividad cerebral a través de liberación de compuestos enjaulados con luz visible en modelos animales vivos y la única involucrando este neuromodulador. En el caso de este trabajo, se ha logrado alterar la actividad neuronal en animales moviéndose libremente en una arena, mientras se registra su actividad con una matriz de 16 electrodos extracelulares.

Primero, se presenta aquí una herramienta que permite manipular ópticamente la actividad neuronal *in vivo*, una cosa que hasta ahora sólo era posible a través de técnicas de optogenética. Como ventaja adicional, RuBi-Dopa es el único enjaulado de dopamina que puede ser usado en régimen de dos fotones.

Por otro lado, se desarrolló una técnica novedosa y muy accesible tanto práctica como económicamente para poder obtener registros cerebrales de animales moviéndose libremente, a la vez que se altera su actividad neuronal normal a través de la activación con luz de complejos enjaulados de rutenio. Esta técnica puede ser utilizada potencialmente por cualquier laboratorio que cuente con elementos básicos de óptica y una placa de registro Intan de muy bajo costo, lo cual abre las posibilidades a muchos grupos de investigación de realizar una enorme variedad de experimentos electrofisiológicos.

La relativa facilidad con la que se sintetizan los compuestos enjaulados de rutenio y la amplia gama de moléculas de interés biológico que son potencialmente 'enjaulables', además de la gran familia que ya existe, nos dan una pauta de la importancia que tiene la posibilidad de su uso *in vivo* en el campo de la investigación en neurociencias, en otras ramas de la fisiología y en la farmacología en general, incluyendo terapias médicas.

6 REFERENCIAS

- [1] Fork, RL. *Laser Stimulation of Nerve Cells in Aplysia*. Science, 1971. **171**(3974): p. 907-908.
- [2] Kaplan, JH; Forbush, BI; Hoffman, J.F. *Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts*. Biochemistry, 1978. **17**(10): p. 1929-1935.
- [3] Walker, JW; McCray, JA; Hess, GP. *Photolabile protecting groups for an acetylcholine receptor ligand. Synthesis and photochemistry of a new class of o-nitrobenzyl derivatives and their effects on receptor function*. Biochemistry, 1986. **25**: p. 1799-1805.
- [4] Wilcox, M. *Synthesis of photolabile precursors of amino acid neurotransmitters*. J. Org. Chem., 1990. **55**: p. 1585-1589.
- [5] Marque, JJ. *Using caged neurotransmitters*. Nature, 1989. **337**(6207): p. 583-584.
- [6] Kaplan, JH; Somlyo, AP. *Flash photolysis of caged compounds: new tools for cellular physiology*. Trends Neurosci., 1989. **12**(2): p. 54-59.
- [7] McCray, JA; Trentham, DR. *Properties and uses of photoreactive caged compounds*. Annu Rev Biophys Biophys Chem., 1989. **18**: p. 239-270.
- [8] Gee, KR; Wieboldt, R; Hess, GP. *Synthesis and Photochemistry of a New Photolabile Derivative of GABA-Neurotransmitter Release and Receptor Activation in the Microsecond Time Region*. J. Am. Chem. Soc., 1994. **116**(18): p. 8366-8367.
- [9] Wieboldt, R. *Synthesis and photochemistry of photolabile derivatives of gamma-aminobutyric acid for chemical kinetic investigations of the gammaaminobutyric acid receptor in the millisecond time region*. Biochemistry, 1994. **33**(6): p. 1526-1533.

- [10] Wieboldt, R. *Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1994. **91**(19): p. 8752-8756.
- [11] Rossi, FM. *N-Nmoc-L-Glutamate, a New Caged Glutamate with High Chemical Stability and Low Pre-photolysis Activity*. J. Biol. Chem., 1997. **272**(52): p. 32933-32939.
- [12] Fino E; Araya R; Peterka DS; Salierno M; Etchenique R; Yuste R. *RuBi-Glutamate: Two-Photon and Visible-Light Photoactivation of Neurons and Dendritic spines*. Frontiers in Neural Circuits 2009; **3**:2. doi:10.3389/neuro.04.002.2009.
- [13] Balzani, V; Carassiti, V. *Photochemistry of Coordination Compounds*. 1970, London: Academic Press.
- [14] Caspar, JV; Meyer, TJ. *Photochemistry of MLCT excited states. Effect of nonchromophoric ligand variations on photophysical properties in the series cis-Ru(bpy)₂L₂²⁺*. Inorg. Chem., 1983. **22**(17): p. 2444-2453.
- [15] Castellano, FN. *Creation of Metal-to-Ligand Charge Transfer Excited States with Two-Photon Excitation*. Inorg. Chem., 1997. **36**(24): p. 5548-5551.
- [16] Suen, HF. *Photosubstitution reactions of terpyridine complexes of ruthenium(II)*. Inorg. Chem., 1989. **28**(4): p. 786-791.
- [17] Pinnick, DV; Durham, B. *Photosubstitution reactions of Ru(bpy)₂XYⁿ⁺ complexes*. Inorg. Chem., 1984. **23**(10): p. 1440-1445.
- [18] Zayat, L; Salierno, M; Etchenique, R. *Ruthenium(II) bipyridyl complexes as photolabile caging groups for amines*. Inorganic Chemistry, 2006. **45**(4): 1728-1731.

- [19] Verde, EMR; Zayat, L; Etchenique, R; Yuste, R. *Photorelease of GABA with visible light using an inorganic caging group*. *Frontiers in Neural Circuits*, 2008. Vol. 2. doi 10.3389/neuro.04.002.2008.
- [20] Zayat, L; Noval, MG; Campi, J; Calero, CI; Calvo, DJ. Etchenique, R. *A New Inorganic Photolabile Protecting Group for Highly Efficient Visible Light GABA Uncaging*. *ChemBioChem*, 2007. **8**(17): 2035-2038.
- [21] Salierno, M.; Marceca, E; Peterka, DS; Yuste, R; Etchenique, R. *A fast ruthenium polypyridine cage complex photoreleases glutamate with visible or IR light in one and two photon regimes*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2010. **104**(4): 418-422.
- [22] Filevich, O; Salierno, M; Etchenique, R. *A caged nicotine with nanosecond range kinetics and visible light sensitivity*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2010. **104**(12): 1248-1251.
- [23] Zayat, L; Calero, C; Albores, P; Baraldo, L; Etchenique, R. *A New Strategy for Neurochemical Photodelivery: Metal-Ligand Heterolytic Cleavage*. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**(4): 882-883.
- [24] Lopes-dos-Santos, V; Campi, J; Filevich, O; Ribeiro, S. Etchenique, R. *In vivo photorelease of GABA in the mouse cortex*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2011. **44**(7): 688-693.
- [25] Yang, XF; Rode, DL; Peterka, DS; Yuste, R; Rothman, SM. *Optical control of focal epilepsy in vivo with caged gamma-aminobutyric acid*. *Annals of Neurology*, 2012. **71**(1): 68-75.
- [26] Stutzmann, GE; Parker I. *Dynamic Multiphoton Imaging: A Live View from Cells to Systems*. *Physiology*, 2005. **20**(1): 15-21.
- [27] Helmchen, F; Denk, W. *Deep tissue two-photon microscopy*. *Nat. Methods*, 2005. **2**(12): p. 932-940.

- [28] Zipfel, WR; Williams, RM; Webb, WW. *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. Nat. Biotechnol., 2003. **21**(11): p. 1369-1377.
- [29] Denk, W. *Two-Photon Scanning Photochemical Microscopy: Mapping Ligand- Gated Ion Channel Distributions*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(14): p. 6629-6633.
- [30] Matsuzaki, M. *Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons*. Nat. Neurosci., 2001. **4**(11): p. 1051-1052.
- [31] Matsuzaki, M; Ellis-Davies, GCR; Kasai, H. *Three-Dimensional Mapping of Unitary Synaptic Connections by Two-Photon Macro Photolysis of Caged Glutamate*. J Neurophysiol, 2008. **99**(3): p. 1535-1544.
- [32] Araya, R; Jiang, J; Eiselthal, K. *The spine neck filters membrane potentials*. PNAS, 2006. **103**(47): 17961-17966.
- [33] Araya, R; Eiselthal, K; Yuste, R. *Dendritic spines linearize the summation of excitatory potentials*. PNAS, 2006. **103**(49): 18799-18804.
- [34] Nikolenko, V; Yuste, R; Zayat, L; Baraldo, LM; Etchenique, R. *Two-photon uncaging of neurochemicals using inorganic metal complexes*. Chemical Communications, 2005. **13**: 1752-1754.
- [35] Peterka, DS; Nikolenko, V; Fino, E; Araya, R; Etchenique, R; Yuste, R. *Fast two-photon neuronal imaging and control using a spatial light modulator and ruthenium compounds*. Photonic Therapeutics and Diagnostics VI, 2010. Vol. 7548.
- [36] Buzsaki, G; Draguhn, A. *Neuronal oscillations in cortical networks*. Science, 2004. **304**(5679): 1926-1929.
- [37] Womelsdorf, T; Fries, P. *Neuronal coherence during selective attentional processing and sensory-motor integration*. Journal of Physiology-Paris, 2006. **100**(4): 182-193.

- [38] Lachaux, JP; George, N; Tallon-Baudry, C. *The many faces of the gamma band response to complex visual stimuli*. *Neuroimage*, 2005. **25**(2): 491-501.
- [39] Fries, P. *A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence*. *Trends in Cognitive Sciences*, 2005. **9**(10): 474-480.
- [40] Niedermeyer E; Lopes da Silva, F. *Electroencephalography: Basic Principles. Clinical Applications and Related Fields* (2nd ed.). Baltimore, MD: Urban and Schwarzenberg, 1987.
- [41] Nunez, PL. *Electric Fields of the Brain*. New York: Oxford University Press, 1981.
- [42] Nunez, P; Srinivasan, R. *Electric Fields of the Brain. The Neurophysics of EEG* (2nd ed.). New York: Oxford University Press, 2006.
- [43] Ogawa, T; Riera, J; Goto, T; Sumiyoshi, A; Nonaka, H; Jerbi, K. *Pitfalls in the dipolar model for the neocortical EEG sources*. *J Neurophysiol*, 2012. **108**: 956–975, 2012.
- [44] Kajikawa, Y; Schroeder, CE. *How Local Is the Local Field Potential?*. *Neuron*, 2011. **72**(5): 847-858.
- [45] Linden, H; Tetzlaff, T; Potjans, TC. *Modeling the Spatial Reach of the LFP*. *Neuron*, 2011. **72**(5): 859-872.
- [46] Varela, F; Lachaux, JP; Rodriguez, E. *The brainweb: Phase synchronization and large-scale integration*. *Nature Reviews Neuroscience*, 2001. **2**(4): 229-239.
- [47] Engel, AK; Singer, W. *Temporal binding and the neural correlates of sensory awareness*. *Trends in Cognitive Sciences*, 2001. **5**(1): 16-25.

- [48] Jacobs, J; Kahana, MJ. *Direct Brain Recordings Fuel Advances in Cognitive Electrophysiology*. Trends in Cognitive Sciences, 2010. **14**(4): 162-171.
- [49] Hobson, JA; Pace-Schott, EF. *The cognitive neuroscience of sleep: Neuronal systems, consciousness and learning*. Nature Reviews Neuroscience, 2002. **3**(9): 679-693.
- [50] Nacher, V; Ledberg, A; Deco, G. *Coherent delta-band oscillations between cortical areas correlate with decision making*. PNAS, 2013. **110**(37): 15085-15090.
- [51] Buszaki, G. *Theta Oscillations in the Hippocampus*. Neuron, 2002. **33**: 325-340.
- [52] OKeefe, J; Recce, ML. *Phase Relationship Between Hippocampal place units and the EEG theta-rhythm*. Hippocampus, 1993. **3**(3): 317-330.
- [53] Hasselmo, ME., Bodelon, C., Wyble, BP. *A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning*. Neural Computation, 2002. **14**: 793–817.
- [54] Louie, K; Wilson, MA. *Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep*. Neuron, 2001. **29**(1): 145-156.
- [55] Lakatos, P; Shah, AS; Knuth, KH; Ulbert, I; Karmos, G; Schroeder, CE. *An Oscillatory Hierarchy Controlling Neuronal Excitability and Stimulus Processing in the Auditory Cortex*. J Neurophysiol, 2005. **94**: 1904–1911.
- [56] Canolty, RT; Edwards, E.; Dalal, SS. *High Gamma Power Is Phase-Locked to Theta Oscillations in Human Neocortex*. Science, 2006. **313**(5793): 1626-1628.

- [57] Pare, D; Collins, DR; Pelletier, JG. *Amygdala oscillations and the consolidation of emotional memories*. Trends in Cognitive Sciences, 2002. **6**(7): 306-314.
- [58] DeCoteau, WE; Thorn, C; Gibson, DL; Courtemanche, R; Mitra, P; Kubota, Y; Graybiel, A.M. *Learning-Related Coordination of Striatal and Hippocampal Theta Rhythms during Acquisition of a Procedural Maze*. PNAS, 2007. **104**(13): 5644-5649.
- [59] O'Neill, PK; Gordon, JA.; Sigurdsson, T. *Theta Oscillations in the Medial Prefrontal Cortex Are Modulated by Spatial Working Memory and Synchronize with the Hippocampus through Its Ventral Subregion*. J Neuroscience, 2013. **33**(35): 14211-14224.
- [60] Kaplan, R; Bush, D; Bonnefond, M. *Medial prefrontal theta phase coupling during spatial memory retrieval*. Hippocampus, 2014. **24**(6): 656-665.
- [61] Ferreira, CS; Marful, A; Staudigl, T. *Medial Prefrontal Theta Oscillations Track the Time Course of Interference during Selective Memory Retrieval*. J Cognitive Neuroscience, 2014. **26**(4): 777-791.
- [62] Nyhus, E; Curran, T. *Functional role of gamma and theta oscillations in episodic memory*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2010. **34**(7): 1023-1035.
- [63] Colgin, LL; Moser, EI. *Gamma Oscillations in the Hippocampus*. Physiology, 2010. **25**(5): 319-329.
- [64] Headley, DB; Pare, D. *In sync: gamma oscillations and emotional memory*. Frontiers In Behavioral Neuroscience, 2013. Vol. **7**, num 170.
- [65] Shin, YW; O'Donnell, BF.; Youn, S. *Gamma Oscillation in Schizophrenia*. Psychiatry Investigation, 2011. **8**(4): 288-296.

- [66] Furth, KE.; Mastwal, S; Wang, KH. *Dopamine, cognitive function, and gamma oscillations: role of D4 receptors*. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, 2013. Vol. 7 nro. 102.
- [67] Bragin, A; Jando, G; Nadasdy, Z. *Gamma (40-100-Hz) Oscillation In The Hippocampus Of The Behaving Rat*. *J Neuroscience* , 1995. **15**(1): 47-60.
- [68] Buzsaki, G; Buhl, DL; Harris, KD. Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience*, 2003. 116(1): 201-211.
- [69] Tort, ABL; Kramer, MA.; Thorn, C. *Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task*. *PNAS*, 2008. **105**(51): 20517-20522.
- [70] Wulff, P; Ponomarenko, AA.; Bartos, M. *Hippocampal theta rhythm and its coupling with gamma oscillations require fast inhibition onto parvalbumin-positive interneurons*. *PNAS*, 2009. **106**(9): 3561-3566.
- [71] Tort, ABL; Komorowski, RW.; Manns, JR. Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. *PNAS*, 2009. 106(49): 20942-20947.
- [72] Scheffer-Teixeira, R; Belchior, H; Caixeta, FV. *Theta Phase Modulates Multiple Layer-Specific Oscillations in the CA1 Region*. *Cerebral Cortex*, 2011. **22**(10): 2404-2414.
- [73] Bruns, A; Eckhorn, R. *Task-related coupling from high- to low-frequency signals among visual cortical areas in humansubdural recordings*. *International Journal Of Psychophysiology*, 2004. **51**(2): 97-116.
- [74] Mormann, F; Fell, J; Axmacher, N. *Phase/amplitude reset and theta-gamma interaction in the human medial temporal lobe during a continuous word recognition memory task*. *Hippocampus*, 2005. **15**(7):890-900.

- [75] Osipova, D; Hermes, D; Jensen, O. *Gamma Power Is Phase-Locked to Posterior Alpha Activity*. Plos One, 2008. **3**(12). Nro 3390.
- [76] Cohen, MX; Elger, CE; Fell, J. *Oscillatory Activity and Phase-Amplitude Coupling in the Human Medial Frontal Cortex during Decision Making*. J Cognitive Neuroscience, 2009. **21**(2):390-402.
- [77] Cohen, MX.; Axmacher, N; Lenartz, D. *Good Vibrations: Cross-frequency Coupling in the Human Nucleus Accumbens during Reward Processing*. J Cognitive Neuroscience, 2009. **21**(5): 875-889.
- [78] Voytek, B; Davis, M; Yago, E. *Dynamic Neuroplasticity after Human Prefrontal Cortex Damage*. Neuron, 2010. **68**(3): 401-408.
- [79] Larson, J; Wong, D; Lynch, G. *Patterned Stimulation At The Theta-Frequency Is Optimal For The Induction Of Hippocampal Long-Term Potentiation*. Brain Research, 1986. **368**(2): 347-350.
- [80] Grover, LM.; Kim, E; Cooke, JD. LTP in hippocampal area CA1 is induced by burst stimulation over a broad frequency range centered around delta. Learning & Memory, 2009. 16(1): 69-81.
- [81] Huerta, PT; Lisman, JE. *Bidirectional Synaptic Plasticity Induced By A Single Burst During Cholinergic Theta-Oscillation In CA1 In Vitro*. Neuron, 1995. **15**(5): 1053-1063.
- [82] Holscher, C; Anwyl, R; Rowan, MJ. Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation that can be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo. J Neuroscience, 1997. 17(16): 6470-6477.
- [83] Canolty, RT; Knight, RT. *The functional role of cross-frequency coupling*. Trends In Cognitive Sciences. 2010. **14**(11): 506-515.

- [84] Lisman, JE; Jensen, O. The Theta-Gamma Neural Code. *Neuron*, 2013. 77(6): 1002-1016.
- [85] Axmacher, N; Henseler, MM.; Jensen, O. Cross-frequency coupling supports multi-item working memory in the human hippocampus. *PNAS*, 2010. 107(7): 3228-3233.
- [86] Boyden, ES; Zhang, F; Bamberg, E. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 2005. 8(9): 1263-1268.
- [87] Han, X; Boyden, ES. *Multiple-Color Optical Activation, Silencing, and Desynchronization of Neural Activity, with Single-Spike Temporal Resolution*. *Plos One*, 2007. 2(3).
- [88] Chow, BY.; Han, X; Dobry, AS. *High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps*. *Nature*, 2010. 463(7277): 98-102.
- [89] Gradinaru, V; Zhang, F; Ramakrishnan, C. Molecular and Cellular Approaches for Diversifying and Extending Optogenetics. *Cell*, 2010. 141(1): 154-165.
- [90] Wentz, CT.; Bernstein, JG.; Monahan, P. *A wirelessly powered and controlled device for optical neural control of freely-behaving animals*. 39th Neural Interfaces Conference (NIC2010), 2010.
- [91] Klorig, DC.; Godwin, DW. *A magnetic rotary optical fiber connector for optogenetic experiments in freely moving animals*. *J Neural Engineering*, 2011. 8(4). Nro 046021.
- [92] Pisanello, F; Sileo, L; Oldenburg, IA. *Multipoint-Emitting Optical Fibers for Spatially Addressable In Vivo Optogenetics*. *J Neuroscience Methods*, 2014. 227: 132-139.

- [93] Land, BB.; Brayton, CE.; Furman, KE. *Optogenetic inhibition of neurons by internal light production*. *Frontiers In Behavioral Neuroscience*, 2014. **8**(108).
- [94] Kravitz, AV.; Owen, SF.; Kreitzer, AC. *Optogenetic identification of striatal projection neuron subtypes during in vivo recordings*. *Brain Research*, 2013. **1511**: 21-32.
- [95] Roux, L; Stark, E; Sjulson, L. *In vivo optogenetic identification and manipulation of GABAergic interneuron subtypes*. *Current Opinion In Neurobiology*, 2014. **26**: 88-95.
- [96] Lachowicz, HK; Neuweiler, A; Poplawski, F. On the origin of stress-anneal-induced anisotropy in FINEMET-type nanocrystalline magnets. *J Magnetism And Magnetic Materials*, 1997. **173**(3): 287-294.
- [97] Missale, C; Nash, SR; Robinson, SW. Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*, 1998. **78**(1): 189-225.
- [98] Chiodo, LA; Berger, TW. *Interactions Between Dopamine And Amino Acid-Induced Excitation And Inhibition In The Striatum*. *Brain Research*, 1986. **375**(1): 198-203.
- [99] Hu, XT; Wang, RY. *Comparison Of Effects Of D-1 And D-2 Dopamine Receptor Agonists On Neurons In The Rat Caudate Putamen - An Electrophysiological Study*. *J Neuroscience*, 1988. **8**(11): 4340-4348.
- [100] Shen, RY; Asdourian, D; Chiodo, LA. Microiontophoretic Studies Of The Effects Of D-1 And D-2 Receptor Agonists On Type-I Caudate-Nucleus Neurons - Lack Of Synergistic Interaction. *Synapse*, 1992. **11**(4): 319-329.
- [101] Williams, GV; Millar, J. *Differential Actions Of Endogenous And Iontophoretic Dopamine In Rat Striatum*. *European J Neuroscience*, 1990. **2**(7): 658-661.

- [102] Gribkoff, VK; Ashe, JH. *Modulation By Dopamine Of Population Spikes In Area Ca1 Hippocampal-Neurons Elicited By Paired Stimulus Pulses*. Cellular And Molecular Neurobiology, 1984. **4**(2): 177-183.
- [103] Gullledge, AT; Jaffe, DB. *Dopamine decreases the excitability of layer V pyramidal cells in the rat prefrontal cortex*. J Neuroscience, 1998. **18**(21): 9139-9151.
- [104] Gullledge, AT; Jaffe, DB. Multiple effects of dopamine on layer V pyramidal cell excitability in rat prefrontal cortex. J Neurophysiology, 2001. **86**(2): 586-595.
- [105] Gorelova, NA; Yang, CR. Dopamine D1/D5 receptor activation modulates a persistent sodium current in rat prefrontal cortical neurons in vitro. J Neurophysiology, 2000. **84**(1): 75-87.
- [106] Winterer, G; Weinberger, DR. Genes, dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia. Trends In Neurosciences, 2004. **27**(11): 683-690.
- [107] Tost, H; Meyer-Lindenberg, A; Ruf, M. *One decade of functional imaging in schizophrenia research. From visualisation of basic information processing steps to molecular brain imaging*. Radiologe, 2005. **45**(2): 113-+.
- [108] Tost, H; Ende, G; Ruf, M. *Functional imaging research in schizophrenia*. Neuroimaging, 2005. Colección: International Review Of Neurobiology Volumen: 67 Páginas: 95
- [109] Womelsdorf, T; Fries, P. *The role of neuronal synchronization in selective attention*. Current Opinion In Neurobiology, 2007. **17**(2): 154-160.
- [110] Benchenane, K; Tiesinga, PH.; Battaglia, FP.. *Oscillations in the prefrontal cortex: a gateway to memory and attention*. Current Opinion In Neurobiology, 2011. **21**(3): 475-485.

- [111] Herrmann, CS; Demiralp, T. Human EEG gamma oscillations in neuropsychiatric disorders. *Clinical Neurophysiology*, 2005. 116(12): 2719-2733.
- [112] Uhlhaas, PJ.; Singer, W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, 2010. 11(2): 100-113.
- [113] Cho, RY.; Konecky, RO.; Carter, CS. *Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia*. *PNAS*, 2006. **103**(52): 19878-19883.
- [114] Goldman-Rakic, PS; Muly, EC; Williams, GV. *D-1 receptors in prefrontal cells and circuits*. *Brain Research Reviews*, 2000. **31**(2-3): 295-301.
- [115] Robbins, TW.; Arnsten, AFT. *The Neuropsychopharmacology of Fronto-Executive Function: Monoaminergic Modulation*. *Annual Review Of Neuroscience*, 2009. **32**: 267-287.
- [116] Wojtowicz, AM; van den Boom, L; Chakrabarty, A. *Monamines Block Kainate- and Carbachol-Induced gamma-Oscillations but Augment Stimulus-Induced gamma-Oscillations in Rat Hippocampus In Vitro*. *Hippocampus*, 2009. **19**(3): 273-288.
- [117] Weiss, T; Veh, RW; Heinemann, U. *Dopamine depresses cholinergic oscillatory network activity in rat hippocampus*. *European J Neuroscience*, 2003. **18**(9): 2573-2580.
- [118] Lee, TH; Gee, KR; Ellinwood, EH. Combining 'caged-dopamine' photolysis with fast-scan cyclic voltammetry to assess dopamine clearance and release autoinhibition in vitro. *J Neuroscience Methods*, 1996. 67(2): 221-231.
- [119] Lee, TH; Gee, KR; Ellinwood, EH. Altered cocaine potency in the nucleus accumbens following 7-day withdrawal from intermittent but not continuous treatment: voltammetric assessment of dopamine uptake in the rat. *Psychopharmacology*, 1998. 137(3): 303-310.

- [120] Lee, TH; Gee, KR; Davidson, C. *Direct, real-time assessment of dopamine release autoinhibition in the rat caudate-putamen*. Neuroscience, 2002. **112**(3): 647-654.
- [121] Castro, LRV; Brito, M; Guiot, E. Striatal neurons have a specific ability to respond to phasic dopamine release. J Physiology-London, 2013. 591(13): 3197-3214.
- [122] Muly, EC; Maddox, M; Khan, ZU. Distribution Of D-1 And D-5 Dopamine Receptors In The Primate Nucleus Accumbens. Neuroscience, 2010. 169(4): 1557-1566.
- [123] Tort, ABL; Komorowski, R; Eichenbaum, H. Measuring Phase-Amplitude Coupling Between Neuronal Oscillations of Different Frequencies. J Neurophysiology, 2010. 104(4): 2302-23024
- [124] Nikolenko V; Yuste R. How to Build a Two Photon Microscope with a Confocal Scan Head. Cold Spring Harb Protoc; 2013 doi:10.1101/pdb.ip075135
- [125] Lezcano, N; Bergson, C. *D1/D5 dopamine receptors stimulate intracellular calcium release in primary cultures of neocortical and hippocampal neurons*. J Neurophysiology, 2002. **87**(4):2167-2175.
- [126] Smiley, JF; Levey, AI; Ciliax, BJ. D-1 Dopamine-Receptor Immunoreactivity In Human And Monkey Cerebral-Cortex - Predominant And Extrasynaptic Localization In Dendritic Spines. PNAS, 1994. **91**(12): 5720-5724.
- [127] Bergson, C; Mrzljak, L; Smiley, JF. Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in primate brain. J Neuroscience, 1995. **15**(12): 7821-7836.

- [128] Yung, KKL; Bolam, JP; Smith, AD. *Immunocytochemical Localization Of D-1 And D 2 Dopamine-Receptors In The Basal Ganglia Of The Rat - Light And Electron Microscopy*. Neuroscience, 1995. **65**(3): 709-730.
- [129] Bordelon-Glausier, JR; Khan, ZU; Muly, EC. *Quantification of D-1 and D-5 dopamine receptor localization in layers I, III, and V of Macaca mulatta prefrontal cortical area 9: Coexpression in dendritic spines and axon terminals*. J Comparative Neurology, 2008. **508**(6): 893-905.
- [130] Bourne, JA. *SCH 23390: The first selective dopamine D-1-like receptor antagonist*. CNS Drug Reviews, 2001. **7**(4): 399-414.
- [131] Rotaru, DC; Lewis, DA; Gonzalez-Burgos, G. *Dopamine D1 receptor activation regulates sodium channel-dependent EPSP amplification in rat prefrontal cortex pyramidal neurons*. J Physiology-London, 2007. **581**(3): 981-1000.

7 TRABAJOS PUBLICADOS

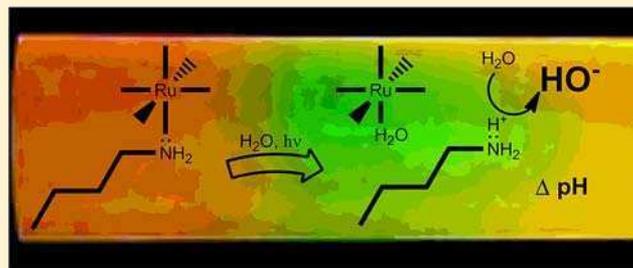
Fast Optical pH Manipulation and Imaging

Oscar Filevich, Guillermo Carrone, Victoria Andino Pavlovsky, and Roberto Etchenique*

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, INQUIMAE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria Pabellón 2, AR1428EHA Buenos Aires, Argentina

S Supporting Information

ABSTRACT: We describe a complete system for optical pH manipulation and imaging. The system consists of a photoactive Ruthenium complex capable of inducing a change of more than 5 pH units at the nanosecond time scale. A compatible imaging system acquires microscopic pH images at 1200 fps using a nonexpensive commercial digital camera and an LED illumination system. We use the system as a superb tool to investigate flow in Flow Injection Analysis (FIA) models.



Imaging tools are being widely used in many fields. Several imaging techniques use low-throughput sensors to make an image through a scanning procedure. However, since the advent and popularization of digital cameras, the use of imaging techniques to quantify many parameters that vary in space and time has been much easier. In particular, fluorescent probes have proven to be very useful at measuring cytosolic [Ca²⁺] in biological systems,^{1,2} as a tool for microfluidic testing,³ in corrosion monitoring,⁴ and so forth. Fluorescent ratiometric tools for direct pH imaging have been developed and used in several applications.⁵ Digital images provide a high-throughput way to obtain raw data, which can be easily related to chemical and biochemical parameters with high spatial resolution.

However, to achieve good spatial and temporal resolution at the same time, enough light is needed to record an image in the millisecond range. In fluorescence mode, a high intensity excitation light source and very efficient microscope objectives together with expensive high speed, low noise CCD sensors are required.

Absorption spectrometry is often regarded as the poor sister of fluorescence based techniques. Its major drawback is an inherent lack of sensitivity due to the maximum molar absorptivity that an indicator usually shows, around 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹. Nevertheless, for a specimen of about 100 μm thick, and a concentration of 0.5 mM of such an indicator, an optimal absorbance of around 0.5 is obtained, allowing a precise measurement of the desired magnitude.

In fluorescence microscopy, fluorescent molecules emit photons in any direction, and the fraction captured by the objective is strongly dependent on its numeric aperture. Expensive objectives are thus required to improve this. In transmission microscopy, on the other hand, the lamp optics shoots an arbitrarily large amount of photons through the sample toward the objective. Some photons are captured by the sample, creating contrast in the image, but the amount of photons entering the objective can always be large. Thus, transmission microscopy images are usually much brighter than

fluorescence images. The amount of light entering the objective is not a limiting factor and high speed digital videophotography becomes easier to acquire, achieving high spatial and temporal resolution at very low cost.

On the other hand, optical pH manipulation has been demonstrated⁶ and used for biological measurements. The need of UV light to achieve the pH jump is an important issue of this kind of phototrigger, that needs quartz optics and expensive light sources or lasers to develop their full capabilities. We have developed a series of Ruthenium-based caged compounds, capable of blue, and even green absorption.⁷⁻⁹ These tools have been proven robust and were used to photodeliver neurotransmitters,⁸ bioactive chemicals,⁹ and to release protease inhibitors,¹⁰ and anticancer drugs.^{11,12} They worked as an excellent tool to determine circuitry in neuronal systems, even with single-spine resolution.¹³⁻¹⁶ In addition, they were also proven capable to stop epileptic seizures¹⁷ in animal models. Other kind of Ru complexes, based in a different photochemistry were used to photorelease nitric oxide.¹⁸ Rhenium complexes were recently tested for phototriggering electron flow in mutants of a blue copper protein *Pseudomonas aeruginosa* azurin.¹⁹ Ruthenium complexes are capable also of photoactivating a fluorescent dye.²⁰

We present in this paper a new system for pH manipulation and imaging comprising two main parts: a Ruthenium-bipyridyl complex capable of causing a shift of up to 6 pH units in the tens of nanoseconds range, and a compatible imaging tool using an indicator in absorption mode, an LED illuminated bright field microscope, and a commercial digital camera to image up to 1200 fps in a reliable way.

Received: March 1, 2012

Accepted: June 6, 2012

Published: June 6, 2012

EXPERIMENTAL SECTION

All reagents were commercially available and used as received. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)\text{Cl}]\text{Cl}$ and $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ were synthesized according to the literature using water as solvent.^{9,21} UV–Vis spectra were taken with a HP8453 diode-array spectrometer. NMR spectra were obtained using a 500 MHz Bruker AM-500. IR spectral measurements (KBr pellets) were carried out using a Nicolet 150P FTIR spectrophotometer. The photouncaging quantum yield measurements were performed with a 405 nm Solid State laser module with a constant power of 6.93 mW inside a fluorescence glass cuvette. The light was collimated and sent through an optical path of 1 cm into the cuvette, with stirring. Total irradiation energy was measured using a Coherent Fieldmaster FM light meter with a visible light photodiode model SR45. A similar laser module was focused on the capillary to generate the pulsed pH increase. The pulses were obtained by means of a function generator and a TIP122 transistor to drive the laser module.

Images of FIA capillaries were acquired using an inverted Nikon TS-100 microscope with bright field illumination. The illumination system of the microscope was replaced with a two-LED set, irradiating green (535 ± 16 nm fwhm) and red (635 ± 11 nm fwhm) light and placed in the same focal point using a dichroic mirror. Images were taken using a compact digital camera (Casio Exilim EX-FC100) which made focus through a normal eyepiece and a custom adapter and set to ISO 100 sensitivity. Videos and image analysis were done using public access *ImageJ* software.²²

Synthesis. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{BuNH}_2)]\text{Cl}_2$. A total of 200 mg of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)\text{Cl}]\text{Cl}$ was dissolved in 20 mL of water and heated to 80 °C. The formation of the $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex was determined by its absorption band at 425 nm which moves to 450 nm at pH > 12. After formation of the aquo complex, a mixture of 20 equiv of butylamine (BuNH_2) and 5 equiv of *p*-toluenesulfonic acid previously dissolved in 5 mL of water was added. The solution was heated at 80 °C in a sealed tube and monitored by UV–Vis during about 4 h, until no further spectral changes were observed. All the following procedures were done in darkness. The solution was filtered to remove any insoluble particles and the EtOH and the excess of BuNH_2 were removed under vacuum. The aqueous solution was precipitated with saturated KPF_6 . Yield: 65%. NMR (Acetone- d_6): ^1H δ 0.46 (t, 3H), 0.76 (m, 2H), 0.90 (m, 1H), 1.01 (m, 1H), 1.32 (m, 1H), 1.64 (m, 1H), 2.90 (t, 1H), 3.25 (t, 1H), 7.01 (t, 1H), 7.09 (t, 7H), 7.14 (t, 1H), 7.20 (t, 6H), 7.32 (d, 1H), 7.36 (t, 3H), 7.47 (t, 1H), 7.73 (t, 1H), 7.84 (d, 1H), 7.88 (t, 1H), 7.91 (t, 1H), 7.96 (d, 1H), 8.00 (d, 1H), 8.09 (t, 1H), 8.40 (d, 1H), 8.50 (d, 1H), 8.58 (d, 1H), 9.03 (d, 1H). Anal. Calcd: C, 67.36; H, 5.65; N, 9.35. Found: C, 67.1; H, 5.4; N, 9.5. Exchange of PF_6^- for Cl^- counterion was performed before use by suspending the complex in a 1:1 acetone–water mixture and a Dowex anion exchange resin. Acetone was removed under vacuum and the obtained solution was used directly.

RESULTS AND DISCUSSION

The main actuator in the described system is the complex $\text{cis}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{BuNH}_2)]^{2+}$ (bpy = 2,2'-bipyridine, PPh_3 = triphenylphosphine, BuNH_2 = *n*-butylamine), depicted in Scheme 1. This compound comprises two bidentate bipyridines coordinated to an octahedral Ru(II). Besides these two ligands, a monodentate PPh_3 is coordinated through its phosphorus,

Scheme 1. Molecular Structure and States Diagram of the Complex $\text{cis}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{BuNH}_2)]^{2+}$

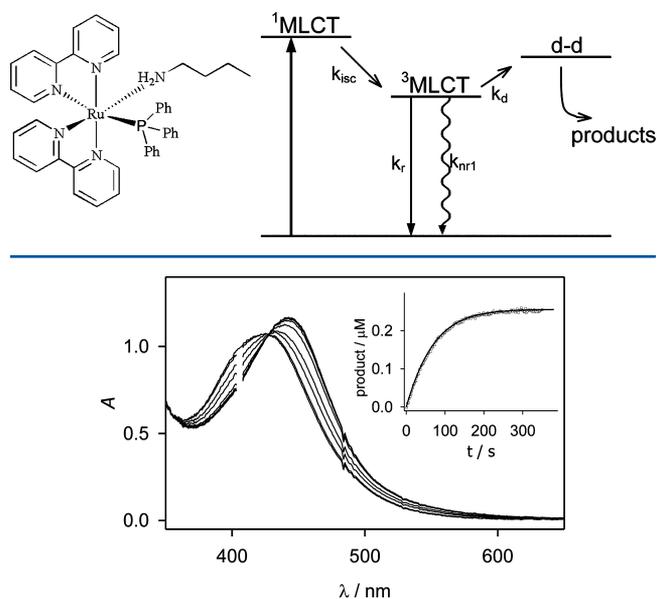


Figure 1. Photolysis of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{BuNH}_2)]^{2+}$ in aqueous solution, using a 405 nm laser module. The inset shows the number of moles of obtained products ($[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ and butylamine), and the fit with a quantum yield $\Phi_{\text{pr}} = 0.165$ at pH = 7.

and the amine, in *cis* position, is coordinated through nitrogen. The photochemistry of this kind of complexes is widely known²³ and is depicted in Scheme 1. In brief, irradiation of the $^1\text{MLCT}$ band leads to an excited state in which one bipyridine receives electronic density from the metal center, formally Ru(III)-bpy $^-$. This singlet state decays to a triplet, from which a d–d metal centered nonbonding state can be populated. This d–d state promotes the heterolytic cleavage of one of the ligands in tens of nanoseconds.²⁴

As bipyridines are bidentate ligands, the probability of bipyridine cleavage is very low, usually undetectable. On the other hand, phosphines present a very strong bond to the Rutenium center,²⁵ and even poor bases as PPh_3 show no photodecomposition in the conditions used. As a result, a clean photoreaction yielding solely BuNH_2 and the aquo complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ is observed.

This photoreaction can be followed through UV–Vis spectrometry as can be seen in Figure 1.

The irradiation was performed using a 405 nm solid-state laser module. The presence of an isosbestic point shows that only two colored species are present: the original complex and the aquo complex. Given the power of the incident beam and the volume and concentration of the complex solution, it is possible to calculate the differential amount of product as:

$$\frac{dn_p}{dt} = I_{\text{beam}}(1 - 10^{-A_T}) \frac{A_R}{A_T} \cdot \Phi_{\text{pr}} \quad (1)$$

where n_p are the moles of uncaged product, I_{beam} is the intensity of the incident light in einsteins/s, A_T and A_R are the solution's total absorbance and the reactant's absorbance, respectively, and Φ_{pr} is the photoreaction quantum yield. The integration of eq 1 is done by a finite differences approach and the photorelease quantum yield is obtained, yielding $\Phi_{\text{pr}} = 0.165$, close to that of similar complexes.⁹ Curves with the fitted

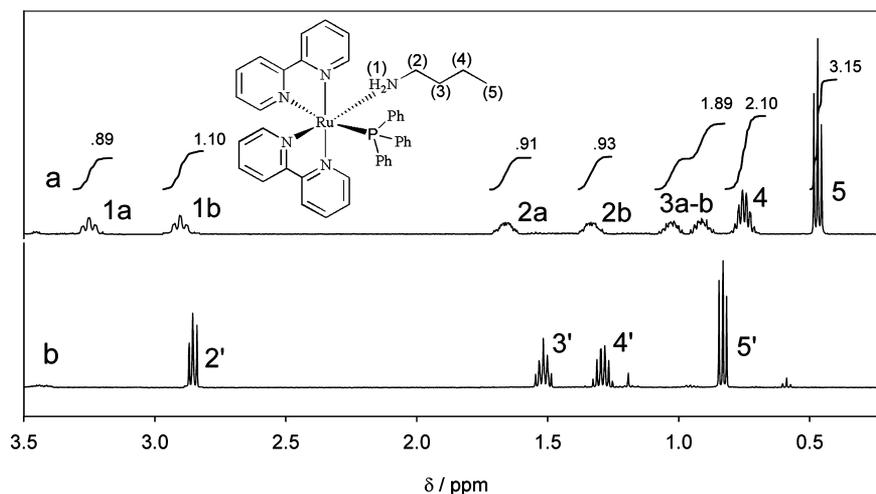


Figure 2. Photolysis of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{BuNH}_2)]^{2+}$ inside an NMR tube. (a) Aliphatic signals before irradiation correspond to coordinated BuNH_2 . Note the amine proton signals 1a and 1b. (b) after 3 min under a 450 nm LED, only the signals of free BuNH_2 (2',3',4', and 5') are visible.

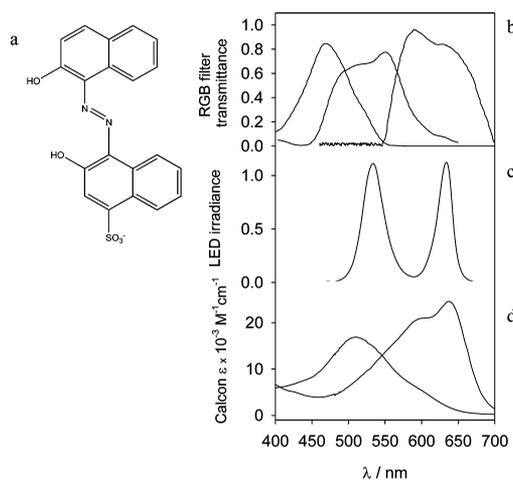


Figure 3. (a) structure of Calcon; (b) RGB filter transmittances on the camera; (c) emission of the illumination LEDs; (d) Calcon molar absorptivities at pH = 4 (left, absorbs mostly green light) and pH = 10 (right, absorbs mostly red light).

amount of photoreleased product versus irradiation time according to eq 1 are plotted in the inset, along with the corresponding experimental data.

The photoreaction was also followed by ^1H NMR spectroscopy and the results are shown in Figure 2. The characteristic

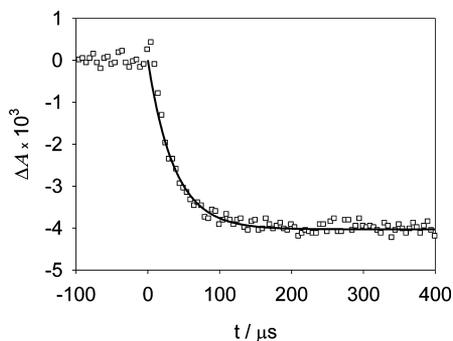


Figure 4. Absorbance transient for a solution containing 1.2 mM Calcon and 3 mM Ru complex at pH = 4 after irradiation with a Nd:YAG Q-Switched laser (532 nm, 7 ns, 0.5 J).

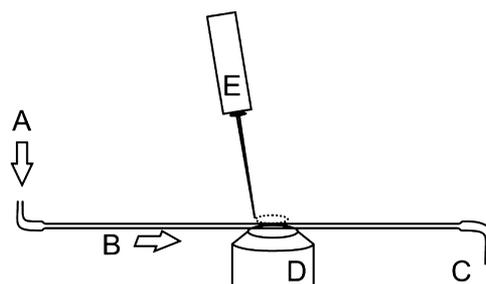


Figure 5. FIA capillary imaging at high speed. The inlet and outlet tubing (A, C) guide the flow through a FIA capillary (B) which is then discarded (C) after passing through the objective field (D). The complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{BuNH}_2)]\text{Cl}_2$ is photolyzed by a 405 nm violet laser (E) increasing the pH and changing absorbance of Calcon, which is monitored at two wavelengths at high speed through a $10\times$ objective.

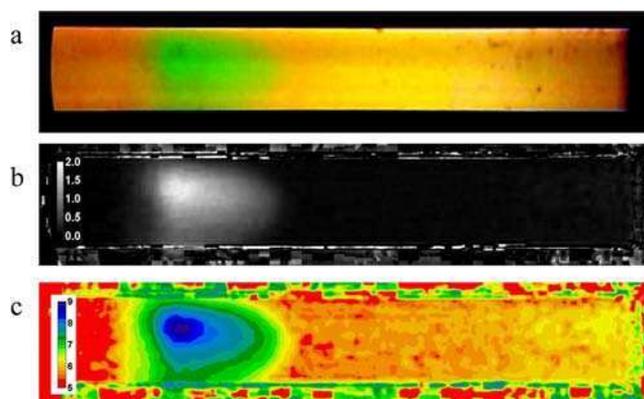


Figure 6. (a) Raw color image of a FIA capillary through which flows a solution containing 2 mM $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{BuNH}_2)]\text{Cl}_2$ and 0.5 mM Calcon at pH = 4. The picture was taken 200 ms after a 20 ms laser pulse was directed to the capillary. (b) Monochrome image of deprotonated Calcon concentration (scale in mM) obtained from absorbance analysis of previous image. (c) False color image of pH calculated as $\text{pH} = \text{pK}_a + \log[x_B/(1 - x_B)]$.

signals of the 16 protons in bipyridines and the three broad peaks of PPh_3 are apparent in the aromatic region (see Supporting Information). The signals in the aliphatic region in

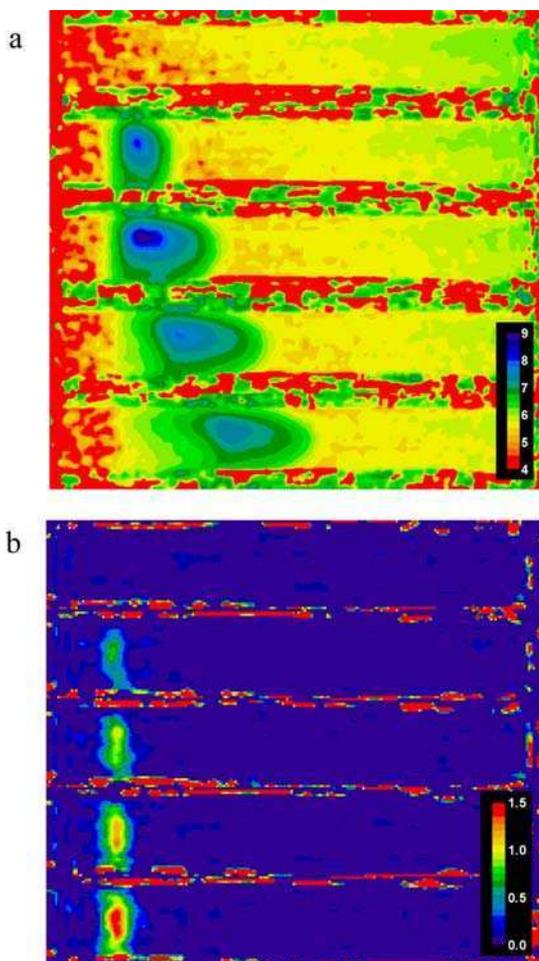


Figure 7. (a) False color pH images taken every 47.6 ms, from a video recorded at 210 fps. (b) False color base concentration taken every 1 ms from the beginning of the laser pulse. Scale in mM.

Figure 2a correspond to the coordinated butylamine. In particular, the triplets at 2.90 and 3.25 ppm are due to the coordinated $-\text{NH}_2$. This signals are stable in D_2O , showing that no isotopic exchange is possible in the coordinated amine, as expected for an electron pair involved in the coordination bond.

After irradiation inside the NMR tube with a 450 nm LED during 3 min, the original signals become negligible and the signals of the aquo complex in the aromatic region and that of free BuNH_2 in the aliphatic region appear without side reactions, which is the typical behavior of this family of complexes^{9,24}

Butylamine is a rather strong base. Its conjugate cation has a $\text{p}K_a = 10.77$. Coordinated butylamine, on the other hand, is not a base, given that the electron pair in the nitrogen is involved in the coordination bond. Thus, at millimolar concentrations, the photoreaction could be used to raise the pH value up to 11. The actual upper limit will be somewhat lower, due to the fact that the aquo complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ is a very weak acid that deprotonates to $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{OH})]^+$ with $\text{p}K_a \approx 10$, buffering the system above this pH value. Flash photolysis measurements were done using a Nd:YAG Q-switched 532 nm laser and recording the changes in absorbance due to loss of the ligand. After irradiation, butylamine is released to the medium with $t_{1/2} = 22$ ns, showing a similar value to other complexes of the family.^{7,24} This defines the

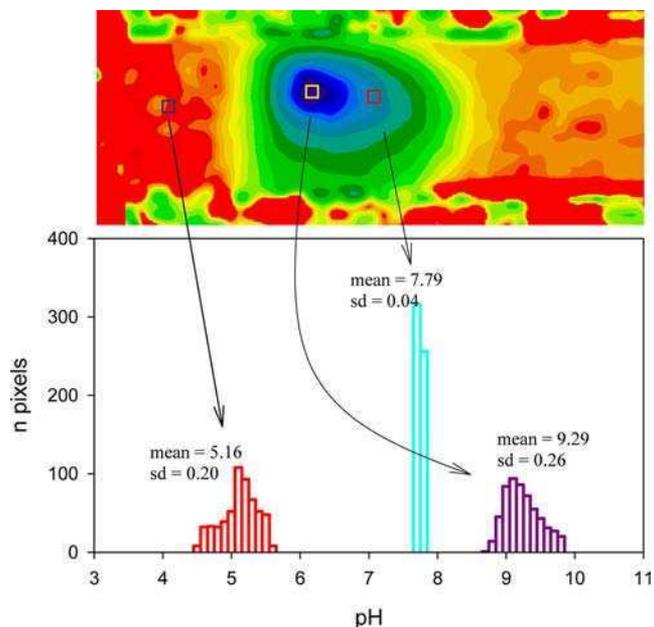
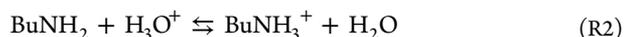
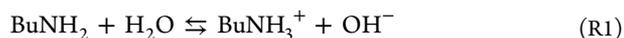


Figure 8. Histograms showing dispersion of obtained pH values at $\text{pH} = 5.16$, $\text{pH} = 7.79$, and $\text{pH} = 9.29$. The noise increases when pH is far from $\text{p}K_a$, due to the low concentration of one of the two indicator species. Histograms are obtained from a 20×20 pixels square in single frames taken at 210 fps.

maximum theoretical rate of the pH jump. However, the amine protonation equilibrium and diffusion have also to be taken into account. Water and butylamine need to diffuse and encounter for the proton exchange reaction to take place through one of the following reactions:



To estimate the maximum rate of the forward reaction due to diffusion control, some calculations can be done. For two molecules of diffusion coefficients D_A and D_B and reaction distance R , the diffusion rate constant is

$$k_d (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}) = 4 \times 10^3 \pi R (D_A + D_B) N_A$$

where N_A is Avogadro's constant.

Water self-diffusion coefficient is $D_W = 2.1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ and butylamine diffusion coefficient in water is $D_B = 8.7 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. We can use the Stokes–Einstein relation to estimate their effective radii $a = k_B T / 6\pi\eta D$, where k_B is the Boltzmann constant and T the temperature, to obtain $a_W = 0.12$ nm and $a_B = 0.28$ nm. Considering the reaction distance $R \cong R_W + R_B = 0.40$ nm, we can estimate $k_d \cong 9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which is a typical value for diffusion controlled rate constants. With water present at 55.5 M, the pseudo first order is $k_d' \cong 5 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$, corresponding to a $t_{1/2} = 1.4$ ps, much faster than the photorelease process. This is a consequence of the very high concentration of water molecules in the vicinity of any amine molecule. On the other hand, for the reaction of the amine with H_3O^+ , similar considerations give a value of $t_{1/2} = 75$ ns at $\text{pH} = 3$. The kinetics of protonation for some aliphatic amines has been measured. For methylamine, analogue of butylamine, the first-order rate constant for the forward reaction of eq R1 is $k_1 = 1.2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, corresponding to a $t_{1/2}$ of 58 ns, and the

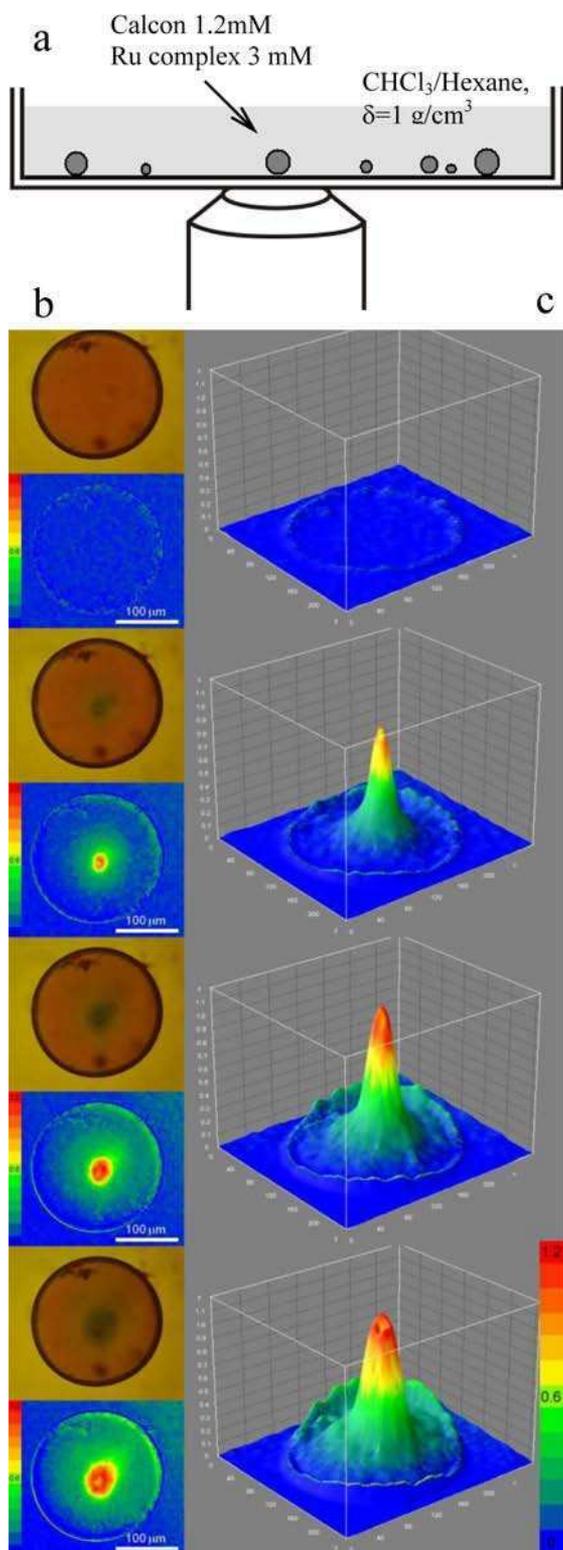


Figure 9. (a) Scheme of the experimental configuration used for imaging diffusion in droplets. (b) A sequence of 4 snapshots of a full video. Top: Unprocessed microscope image. Bottom: false color quantification of the basic form of Calcon in each pixel. Color scale in mM. (c) Surface plots corresponding to the pictures on the left.

second-order forward rate constant for eq R2 is $k_2 = 3.7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which at pH = 3 corresponds to a $t_{1/2}$ of 18 ns.

In conclusion, all the rate constants for the steps between irradiation and the actual pH jump lie around the tens of

nanoseconds or less, with probably the reaction between amine and H_2O the rate-determining step. However, even if the pH jump occurs very rapidly, the measurement of such changes will be limited by the indicator reaction rates (see below). The described properties make this system an ideal pH photo-actuator capable of increasing the pH from 3–4 to 10 in a fast, reliable, and easily controlled way. Other similar complexes bearing amines as ligands can be used for the same purposes. The caged amino acids $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{GABA})]^+$ and $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PMe}_3)(\text{Glut})]$ have the advantage of their higher water solubility,^{9,24} although the carboxyl group prevents the jump at initial pH lower than 5 due to its buffer power.

Calcon is a sodium salt of 1-(2-hydroxy-1-naphthylazo)-2-naphthol-4-sulfonic acid which is used in complexometric titrations of calcium.²⁶ Its structure is shown in Figure 3a. Its phenolic group allows its use as a pH indicator with $\text{p}K_a = 7.40$. In the mononegative form (due to the presence of the $-\text{SO}_3$ group), Calcon presents a maximum in absorbance at 515 nm, while its deprotonated anion shows a strong absorption around 640 nm (Figure 3d). Contrary to most pH indicators, the maximum molar absorptivity of both species is rather similar. This property, and the fact that the position of the bands overlap in a good extent with the maxima of digital camera color filters (Figure 3b), makes Calcon an ideal indicator for digital photometric measurement of pH around 7.

Calcon presents maxima of $24500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for the basic form at 635 nm and of $14700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for the acid form at 535 nm. The high extinction coefficients of Calcon in both its acid and basic forms guarantee that the small differences of Ru complex absorption after photoreaction (see Figure 1) can be considered negligible. The complex molar absorptivities at 535 nm change from 344 to $628 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, while at 635 nm, its absorption is almost zero.

To obtain a reliable measure of absorbance using a digital camera, the color channels should be fed with monochromatic light. Although laser illumination would be optimal to achieve this goal, it introduces speckle into the image. LED illumination, on the contrary, presents no such spectral purity but results in a more homogeneous light field. White LEDs offering a broad light spectrum have been used for quantitative analysis using RGB cameras in normal (slow) mode.²⁷ Some works use monochromatic LED excitation,^{28,29} providing the RGB measurement from the emission of the sample. In our case, we extend these techniques to very fast measurements using camera with a fast CMOS sensor and a combined dual wavelength high power LED source to diminish error in absorbance determination. We chose LEDs as light sources, at 535 ± 16 and 635 ± 11 nm fwhm respectively, as depicted in Figure 3c. Both emitters are placed colinear using a dichroic mirror. Under this illumination, the acid form of Calcon appears orange and the basic form appears green. The blue channel of the digital camera was not used for measurement purposes.

This devised pH actuation-measurement chemical system is a powerful tool that can be used in many ways. We have tested the system to image the flow in a FIA capillary under the microscope, at a speed of 30–1000 frames/s (fps). Microscopic flow imaging in FIA or microfluidic devices is done with caged-fluorescent probes.^{20,30} Caged fluorophores present weak or no fluorescence until an uncaging light of the adequate wavelength activates them. The principal drawback of this kind of dyes is that fluorescence is difficult to measure in very fast video-microscopy, because of the limited amount of light that can be

collected in short times. On the other hand, almost any camera can be used in bright field microscopy, including cheap slow-motion digital cameras capable of imaging up to 1200 fps video during several minutes. Our combination of pH actuation and absorption measurement is ideal to achieve high resolution pH videos at very high frame rates.

The time resolution of the imaging system will be limited by the reaction rate of the indicator. For a typical indicator such as phenolphthalein, the rate of the forward reaction in the equilibrium $\text{InH}^- (\text{colorless}) + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{In}^{2-} + \text{H}_2\text{O} (\text{pink})$ has been determined to be $k_1 = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which implies that at the usual working concentrations, the color change of the indicator is much slower than the pH change induced by the light pulse.³¹

In the case of Calcon, there are no kinetic studies regarding its use as pH indicator. Therefore, we conducted flash photolysis experiments in order to determine the rate of the absorbance change in our experimental conditions. A sample containing 1.2 mM Calcon and 3 mM Ru complex at pH = 4 was placed in a 0.1 mm optical path flow cell, and its absorbance was measured using a 655 nm laser diode as light source. Laser pulses of 0.5 J and 7 ns were used to irradiate the sample. The result is shown in Figure 4.

The monoexponential decay can be fitted given the $t_{1/2} = 26.1 \mu\text{s}$. The rate of the photolysis is linearly dependent on the concentration of the indicator. By changing the concentration of Calcon, keeping pseudo-first-order conditions, the second-order kinetic constant for the reaction: $\text{CalconH}^- + \text{OH}^- \rightarrow \text{Calcon}^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ can be calculated to be $k_1 = 2.22 \times 10^7 \pm 0.09 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Other indicators, such as bromothymol blue, show faster responses, closer to that of phenolphthalein, but their absorption wavelengths do not match the wavelengths of the CCD camera filters as well as those of Calcon. With our photographic system in the milliseconds range, a response in the tens of microseconds is perfectly useful, even though for faster cameras other indicators should be used.

The imaging scheme is depicted in Figure 5. The FIA-size capillary is imaged through a 10 \times objective in an inverted microscope using 535 and 635 nm LEDs as light sources. A continuous flow of a solution containing 2 mM $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPh}_3)(\text{BuNH}_2)]\text{Cl}_2$ and 0.5 mM Calcon, to which HCl was added until pH = 4.00, was driven by gravity. At a fixed point in the capillary, a focused 405 nm laser was pulsed at a constant rate.

The digital camera was set to its minimum sensitivity (ISO 100) to minimize noise. The videos can be taken at 30, 210, or 1000 fps, adjusting the light intensity to allow a precise measurement at such speeds. The image frame at 30 fps is over 6 Megapixel resolution, and around 100 kpixel at the highest speed.

Figure 6a shows a typical raw RGB image taken at 210 fps. Image decomposition in R, G, and B colors (B is discarded) allows precise determination of the absorbance at 535 and 635 nm. Prior to this determination, the linear range of the response must be determined. This can be done using Calcon solutions of known absorbance at both wavelengths at buffered pH. The R and G pixels result to be rather linear between 35 and 210 counts, which cover the 68% of the entire light intensity range, and are suitable for the measurements with the required precision. The light level of both LED sources was adjusted to fit this linear range. During the measurement of pH *in-line*, distilled water or a solution containing only the Ru complex, which does not present absorption above 480 nm, can be used

as reference for absorbance measurement. However, it is easier to use a nonirradiated portion of the video to get the baseline. Both procedures gave the same results, and the second was chosen for simplicity. Concentrations of the basic and acid species can be obtained simply by applying Beer's law, and the local pH is calculated from this values. The results are shown in Figure 6, panels b and c, respectively.

Concentration and pH images can be taken at millisecond rate. Figure 7a shows selected frames of a video at 210 fps. Frames shown were taken every 47.6 ms. A much faster sequence at the beginning of the laser pulse, taken every 1 ms and depicting the deprotonated Calcon concentration, is shown in Figure 7b. (The corresponding videos are available as Supporting Information.)

The pH measurement can be very precise near the pK_a of Calcon, but the reliability obviously decreases when any one of the species becomes scarce. Figure 8 shows typical histograms of 400 pH pixels at different positions in the picture.

Even though some of the spread is due to real changes of pH in the measured area, particularly where pH gradient is higher, most of the dispersion is due to measurement error. Around pH = 7.8, standard deviation is $\sigma_{\text{pH}} = 0.04$, while at pH near 5 or 9, it increases to $\sigma_{\text{pH}} = 0.20$ and $\sigma_{\text{pH}} = 0.26$, respectively, although in some regions can be somewhat higher. Concentration measurements, on the other hand, present a relative dispersion between 6% and 12% within a 400 pixel square, before applying any spatial filtering. Contrary to the simple measurement of precision, accuracy is difficult to estimate, and has to be done at slow speed, by changing the pH of the carrier without altering the concentration, and measuring the solution pH independently. Using a glass electrode, differences of ± 0.06 pH units were obtained for pictures taken at 420 fps, using 20×20 pixel averages between pH 5.5 and 8.5 at 25 $^\circ\text{C}$. Differences are higher when pH is farther from the indicator pK_a .

The presented method not only allows for the fast measurement of pH, but it is also good for obtaining qualitative images of flow inside the capillary or any other translucent microdevices. These images are even better than those obtained using caged fluorescent probes.²⁰ This is due to the possibility of decreasing the ISO gain of the CCD sensor, reducing noise and increasing the SNR, simply by increasing the illumination power directed through the sample. The pH measurement method is ratiometric; moreover, it is robust against a small amount of photobleaching, which can appear when very high laser power density is used to change the pH. Alternatively, increasing illumination also allows for an increase in the frame rate without sacrificing SNR. In our equipment, the maximum possible frame rate was determined by the camera's features and required only moderate illumination, only a fraction of the excitation light required for the typical fluorescence microscope.

We have devised this method mainly to help visualization of flow and pH variations in microfluidics circuits and FIA systems, which are in continuous development nowadays. The new techniques to pump liquids in microdevices in the order of tens and hundreds of micrometers will surely allow new goals in the analysis of microsamples with high throughput.³² However, many other kind of measurements can also be done. As an example, Figure 9a depicts a method to measure the change of pH due to the diffusion of the photolyzed base into a stationary spheric drop with a size of a big cell (200 μm diameter). A 45/55% (v/v) mixture of chloroform and *n*-hexane, which density is slightly lower than that of water, is prepared. A drop of a

aqueous solution containing 1.2 mM Calcon and 3 mM Ru at pH 4 is placed in the organic mixture, and is divided into very small droplets with vigorous agitation. This suspension is then poured into a glass Petri dish and sealed to prevent evaporation. The droplets, with a size ranging from 10 to 500 μm , can be individually addressed with an inverted microscope.

A pulsed 405 nm laser spot (diameter = 800 nm) is directed through the microscope optics using a dichroic mirror and a slow-motion video is taken at 210 fps.

Sequence in Figure 9b shows the raw image obtained (true color) and the concentration of the indicator base in millimolar (mM) (false color) at four different times of irradiation. The corresponding frames in Figure 9c show the surface plot of the indicator base concentration in the z axis.

The black border in the raw image and the corresponding colors in the "crown" that appear at the edge of the droplet are not pH related. Note that after continuous irradiation (fourth frame), some photobleaching appears at the laser focal point. A video in slow motion is available as Supporting Information.

In conclusion, we have developed a system composed of a caged amine, which is used as a molecular actuator to increase more than 5 pH units in the submicrosecond range, and a fast and reliable measurement method based in the indicator Calcon. As a proof of principle, diffusion in a 200 μm drop and pH increase into a FIA system can be followed in situ using a nonexpensive digital camera capable of recording videos with up to 1000 fps. This last experiment allows the researcher to visualize in a very accurate way the parabolic profile of velocities inside any microfluidic channel without any disturbing mixture device. In this way, information on the laminar and/or turbulent flow in FIA and lab-on-a-chip devices can easily be obtained in a straightforward way.

As the amount of transmitted light can be modified, even faster recording can be achieved by means of a higher speed CCD sensor. In absorbance mode, light can be directed with precision through the specimen in analysis to the objective. This is an important advantage over the use of caged-fluorescent dyes, which emit light in all directions and need high aperture optics to guarantee enough light intensity at the detector.

This new approach to optical manipulation/imaging is therefore an excellent tool to measure pH in a fast and reliable way with very low cost of use and implementation.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

NMR, IR, and UV–Vis spectra of the butylamine complex and videos corresponding to the data depicted in Figures 6, 7, and 9. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: rober@qi.fcen.uba.ar.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the National Agency for Science and Technology Promotion (ANPCyT 00321) and the University of Buenos Aires (UBACyT X075). R.E. is a staff

member of CONICET. Fruitful discussions with Mabel Tudino and her invaluable assistance are highly appreciated.

■ REFERENCES

- (1) Clark, H. A.; Kopelman, R.; Tjalkens, R.; Philbert, M. A. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4837–4843.
- (2) Alonso, M. T.; Barrero, M. J.; Michelena, P.; Carnicero, E.; Cuchillo, I.; García, A. G.; García-Sancho, J.; Montero, M.; Alvarez, J. J. *Cell. Biol.* **1999**, *144*, 241–254.
- (3) Wolff, A.; Perch-Nielsen, I. R.; Larsen, U. D.; Friis, P.; Goranovic, G.; Poulsen, C. R.; Kuttera, J. P.; Tellemana, P. *Lab Chip* **2003**, *3*, 22–27.
- (4) Augustyniak, A.; Tsavalas, J.; Ming, W. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1* (11), 2618–2623.
- (5) Charier, S.; Ruel, O.; Baudin, J. B.; Alcor, D.; Allemand, J. F.; Meglio, A.; Jullien, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 4785–4788.
- (6) Abbruzzetti, S. S.; Sottini, S. S.; Viappiani, C. C.; Corrie, J. E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (27), 9865–9874.
- (7) Filevich, O.; Salierno, M.; Etchenique, R. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 1248–1251.
- (8) Zayat, L.; Calero, C.; Alborés, P.; Baraldo, L.; Etchenique, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 882–883.
- (9) Zayat, L.; Noval, M. G.; Campi, J.; Calero, C. I.; Calvo, D. J.; Etchenique, R. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2035–2038.
- (10) Respondek, T.; Garner, R. N.; Herroon, M. K.; Podgorski, I.; Turro, C.; Kodanko, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17164–17167.
- (11) Garner, R. N.; Gallucci, J. C.; Dunbar, K. R.; Turro, C. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 9213–9215.
- (12) Goldbach, R. E.; Rodriguez-Garcia, I.; van Lenthe, J. H.; Siegler, M. A.; Bonnet, S. *Chem.—Eur. J.* **2011**, *17*, 9924–9929.
- (13) Crandall, S. R.; Cox, C. L. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 2513–2522.
- (14) Poskanzer, K. E.; Yuste, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 18453–18458.
- (15) Yuste, R. *Neuron* **2011**, *71*, 772–781.
- (16) Woodruff, A. R.; McGarry, L. M.; Vogels, T. P.; Inan, M.; Anderson, S. A.; Yuste, R. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 17872–17886.
- (17) Yang, X.; Rode, D. L.; Peterka, D. S.; Yuste, R.; Rothman, S. M. *Ann. Neurol.* **2012**, *71*, 68–75.
- (18) Ortiz, M.; Torrén, M.; Mola, J. L.; Ortiz, P. J.; Fragoso, A.; Díaz, A.; Cao, R.; Prados, P.; de Mendoza, J.; Otero, A.; Antiñolo, A.; Lara, A. *Dalton Trans.* **2008**, 3559–3566.
- (19) Blanco-Rodríguez, A. M.; Di Bilio, A. J.; Shih, C.; Museth, A. K.; Clark, I. P.; Towrie, M.; Cannizzo, A.; Sudhamsu, J.; Crane, B. R.; Šýkora, J.; Winkler, J. R.; Gray, H. B.; Zális, S.; Vlček, A. *Chem.—Eur. J.* **2011**, *17*, 5350–5361.
- (20) del Mármol, J.; Filevich, O.; Etchenique, R. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6259–6264.
- (21) Viala, C.; Coudret, C. *Inorg. Chim. Acta* **2006**, *359*, 984–989.
- (22) Abramoff, M. D.; Magalhaes, P. J.; Ram, S. J. *Biophotonics Int.* **2004**, *7*, 36–42.
- (23) Campagna, S.; Puntoriero, F.; Nastasi, F.; Bergaminim, G.; Balzani, V. *Top. Curr. Chem.* **2007**, *280*, 117–214.
- (24) Salierno, M.; Merceca, E.; Peterka, D. S.; Yuste, R.; Etchenique, R. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 418–422.
- (25) Sullivan, B. P.; Salmon, D. J.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1978**, *12*, 3334–3341.
- (26) Hildebrand, G. P.; Reilley, C. N. *Anal. Chem.* **1957**, *29* (2), 258–264.
- (27) Tang, Z.; Yang, J.; Yu, J.; Cui, B. *Sensors* **2010**, *10*, 6463–6476.
- (28) Steiner, M. S.; Meier, R. J.; Duerkop, A.; Wolfbeis, O. S. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8402–8405.
- (29) Wang, X. D.; Meier, R. J.; Link, M.; Wolfbeis, O. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 4907–4909.
- (30) Ross, D.; Johnson, T. J.; Locascio, L. E. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2509–2515.
- (31) Massey, M. W.; Schelly, Z. A. *J. Phys. Chem.* **1978**, *78* (24), 2450–2454.
- (32) Leslie, D. C.; Easley, C. J.; Seker, E.; Karlinsey, J. M.; Utz, M.; Begley, M. R.; Landers, J. P. *Nat. Phys.* **2009**, *5*, 231–235.

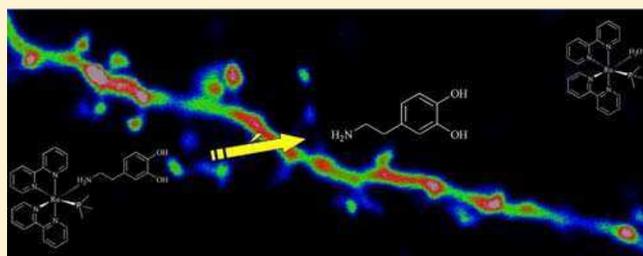
Two-Photon Optical Interrogation of Individual Dendritic Spines with Caged Dopamine

Roberto Araya,^{‡,§} Victoria Andino-Pavlovsky,[†] Rafael Yuste,^{*,‡} and Roberto Etchenique^{*,†}[†]Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, INQUIMAE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria Pabellón 2 AR1428EHA Buenos Aires, Argentina[‡]Department of Biological Sciences, Howard Hughes Medical Institute, Columbia University, New York, New York 10027, United States

Supporting Information

ABSTRACT: We introduce a novel caged dopamine compound (RuBi-Dopa) based on ruthenium photochemistry. RuBi-Dopa has a high uncaging efficiency and can be released with visible (blue-green) and IR light in a two-photon regime. We combine two-photon photorelease of RuBi-Dopa with two-photon calcium imaging for an optical imaging and manipulation of dendritic spines in living brain slices, demonstrating that spines can express functional dopamine receptors. This novel compound allows mapping of functional dopamine receptors in living brain tissue with exquisite spatial resolution.

KEYWORDS: Dopamine, ruthenium, two-photon, caged compound



Dysfunction of dopaminergic neurotransmission in the CNS underlies a variety of neuropsychiatric disorders, including social phobia,¹ Tourette's syndrome,² Parkinson's disease,³ schizophrenia,⁴ neuroleptic malignant syndrome (NMS),⁵ attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD),^{6,7} and drug and alcohol dependence.⁸ Dopamine transmission in the brain is mediated by a family of G protein-coupled (GPCR) dopamine receptors named D1 to D5.³ The D1 receptor³ has been implicated in motor function,^{9,10} cognition,^{11,12} and reward.^{13,14} However, how dopamine receptors modulate information flow in neuronal circuits, neurons, and synapses is still poorly understood. In fact, there is no unified agreement as to how dopaminergic inputs function and even whether they have an inhibitory or excitatory role on CNS circuits.¹⁵ Understanding these controversies is fundamental to explain why dopaminergic inputs selectively target different brain areas, different neurons, and different postsynaptic sites.

The lack of tools to study dopaminergic inputs with single synaptic resolution has made it difficult to dissect their role at a single neuronal/synapse level and to address fundamental questions on the diversity of dopaminergic inputs and their interaction with excitatory and inhibitory ones. Thus, to study the local function of dopaminergic inputs, it would be ideal to have a highly localized method to activate noninvasively dopamine receptors with a spatial resolution of the size of single synapse.

Local activation of receptors in living neurons can be achieved by two-photon photorelease (uncaging) of caged compounds,¹⁶ since two-photon opto-chemical tools can be used in highly scattering media, such as brain tissue, and afford

a spatial resolution of the order of 1 μm .³ With two-photon uncaging, one can control a given neurotransmitter's physiology and precisely probe the dendritic (or axonal) tree of a neuron, mapping its functional inputs. Indeed, two-photon uncaging of glutamate has revolutionized our current understanding of excitatory transmission and integration in mammalian neurons.^{17–20} Using a similar strategy, in this paper, we introduce RuBi-Dopa, the first two-photon caged dopamine compound based on ruthenium-bipyridine chemistry, and use it to optically activate dendritic spines.

The complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PMe}_3)(\text{Dopa})](\text{PF}_6)_2$ (bpy = 2,2'-bipyridine, PMe_3 = trimethylphosphine) is a crystalline orange solid synthesized from $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ in two steps (see the Supporting Information). It is soluble up to 5 mM in water at pH = 7 and is stable in solution at 37 °C below pH = 8 (although dopamine can be oxidized by air at higher pH). Its ¹H NMR spectrum shows the 16 characteristic peaks of bipyridines, corresponding to an asymmetric *cis* complex and the aromatic signals of the coordinated dopamine (Figure S1, see the Supporting Information).

Figure 1 shows the aliphatic portion of its ¹H NMR before (top trace) and after 30 s in situ irradiation (bottom trace) with a green LED array ($\lambda = 525$ nm, 20 nm fwhm, $p = 150$ mW). Before irradiation (top trace), the doublet at 0.95, that corresponds to the coordinated trimethylphosphine (PMe_3), is evident. In addition, the triplets A_1 and A_2 , at 3.52 and 2.70

Received: March 20, 2013

Accepted: May 14, 2013

Published: May 14, 2013

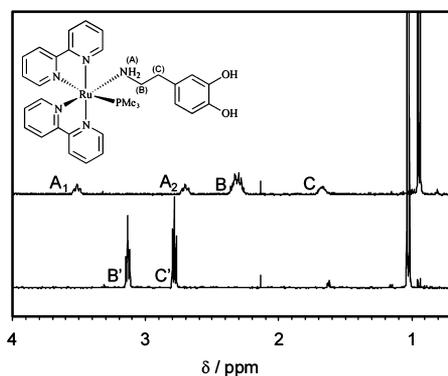


Figure 1. Structure (inset) and aliphatic section of the ^1H NMR spectra of RuBi-Dopa in D_2O before (top trace) and after (bottom trace) irradiation into the NMR tube with a 525 nm green LED. The doublets below 1.2 ppm belong to coordinated trimethylphosphine (PMe_3) in RuBi-Dopa (top trace) and in the aquo-complex formed after photoreaction (bottom trace). Signals of coordinated dopamine (B and C) are also apparent. The triplets A_1 and A_2 , corresponding to the coordinated $-\text{NH}_2$, disappear after irradiation due to rapid exchange with D_2O . The signals of the free dopamine methylenes (B' and C') are indicative of the successful photorelease of the ligand.

ppm, respectively, are characteristic of a coordinated amine group. The presence of A_1 and A_2 in D_2O indicates that NH_2 cannot exchange protons, and therefore, the ligand is indeed coordinated through its amine, as is usually the case in Ru-bpy complexes.^{21–23}

Furthermore, the adjacent methylenes are strongly shifted to higher fields due to the proximity to Ru^{2+} , and appear as multiplets (Figure 1, signals B and C at 2.30 and 1.78 ppm, respectively). After irradiation the compound successfully photoreleases dopamine. The signals B and C, corresponding to the coordinated ligand, disappear, and the two methylene signals of the free dopamine (B' and C') appear at 2.77 and 3.13 ppm respectively. Further addition of dopamine confirmed that the identity of the photoproduct is exclusively this neurotransmitter, and that ligand degradation did not occur throughout the photolysis (data not shown). Moreover, in the aromatic region of the NMR spectra after irradiation, we found the peaks corresponding to the formed aquo-complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PMe}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ and the rest of the dopamine protons (Figure S1, see the Supporting Information), further corroborating the irradiation-induced transition from coordinated-to-free dopamine.

The complex shows the typical metal-to-ligand charge transfer band ($^1\text{MLCT}$) found in all the Ru(II)-bipyridyl complexes. Irradiation on this band populates the $^1\text{MLCT}$ state, which further decays to a $^3\text{MLCT}$ state that can deactivate through emission, or to a dissociative d-d state that promotes the loss of monodentate ligands²⁴ and the exchange for solvent molecules. In the case of RuBi-Dopa, the only photoproduct detected was dopamine (Figure 1 and Figure S1).

The quantum yield of dopamine photouncaging was measured using UV-vis spectrum analysis of aqueous solutions. Spectra between 350 and 700 nm were obtained during irradiation at right angle with a 405 nm laser diode. The samples were irradiated at open air and not degassed.

The differential amount of products can be calculated with the following expression:

$$\frac{dn_p}{dt} = I_{\text{beam}}(1 - 10^{-A_T}) \frac{A_R}{A_T} \Phi_{\text{pr}} \quad (1)$$

where n_p are the moles of released aquo-complex and dopamine; I_{beam} is the intensity of the laser in Einsteins/s; A_T and A_R are the solution's total absorbance and the reactant's absorbance, respectively; and Φ_{pr} is the photoreaction quantum yield.

Integration of eq 1 was done by a finite differences method. In brief, for an experiment lasting about 1000 s, a measurement every $\Delta t = 2$ s was performed. Introducing the values of volume, initial concentration of RuBi-Dopa, molar absorptivities of RuBi-Dopa and its photoproduct and laser power, the amount of photolyzed complex were calculated for the first interval Δt using eq 1. The new concentration values of RuBi-Dopa and the generated aquo-complex and their respective absorbances were obtained using Beer's law and used to calculate the next intervals. The photorelease quantum yield Φ_{pr} is an adjustable parameter. In this way, not only the initial slope is used to fit Φ_{pr} but the entire set of data, including those in which the absorption of the product is important. Figure 2 (inset) shows a subset of the data during photolysis. The obtained photorelease quantum yield is $\Phi_{\text{pr}} = 0.119 \pm 0.011$ ($p < 0.05$) at 37°C and 0.085 ± 0.004 ($p < 0.05$) at 25°C .

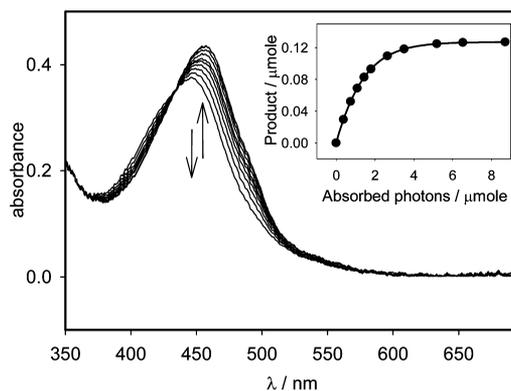


Figure 2. UV-vis spectra of a $75 \mu\text{M}$ aqueous solution of RuBi-Dopa during photolysis at $T = 25^\circ\text{C}$ and $\text{pH} = 7$. Samples were irradiated at 405 nm, and spectra collected from 350 to 700 nm. Inset: quantum yield calculation using eq 1.

Pinnick and Durham have studied the correlation between the photorelease quantum yield and the MLCT band maximum for several Ru-bpy complexes, finding that both parameters are controlled in a simple way: by the donor ability of the ligands.²⁴ For an MLCT band centered near 450 nm, a Φ_{pr} around 0.1 is expected, in agreement with our experimental results. Similar values were obtained using 450 and 532 nm irradiation. With its molar absorptivity of about $4900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 447 nm, the complex shows very high uncaging sensitivity ($\epsilon\Phi > 580$) in the visible light region.

Several complexes of this family have been proved to be active in a two-photon regime. Thus, in order to determine the activity of RuBi-Dopa and its two-photon absorption capabilities, we used a solution of RuBi-Dopa, contained in a fluorescence cuvette (1 cm optical path), that was irradiated with a Ti-Sapphire pulsed laser (frequency $f = 80$ MHz, pulse width $\tau = 100$ fs, $\lambda = 800$ nm, average power = 460 mW) and focused on the sample with a $10\times$ objective. With this technique, we found that RuBi-Dopa follows the typical

behavior of a two-photon absorption process with emission only at the focal point.

In addition, by using a parametric amplifier (Coherent Legend Elite, $f = 1$ kHz, $\tau = 120$ fs, $\lambda = 800$ nm, average power 730 mW, beam diameter 3 mm fwhm), the instantaneous power of the pulses (6.1×10^9 W) was sufficient to excite RuBi-Dopa without any focusing. Under these conditions, the progress of the photoreaction can be followed from the rather weak fluorescence emission of RuBi-Dopa at ~ 630 nm (Figure 3). We measured 18 consecutive times the fluorescence

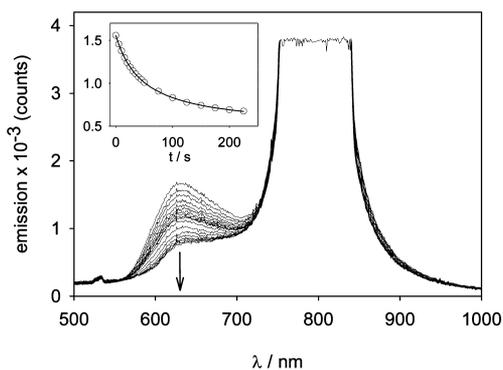


Figure 3. Photolysis of RuBi-Dopa in two-photon regime. A solution containing 22 mM RuBi-Dopa was irradiated with an amplified Ti-Sa laser at 800 nm and the photoreaction followed through its emission band. Inset: time dependence of the emission during photolysis. Details are given in the text.

emission band of RuBi-Dopa (Figure 3), and the peak emission at 630 nm used to calculate the time dependence during photolysis (Figure 3, inset). Being the excitation of RuBi-Dopa at 800 nm, the emission at much higher energies is indicative that a nonlinear process is involved. In addition, by varying the laser power with a reflective filter, to values between 730 and 360 mW, the photolysis rate showed a dependence with the square of the average power, typical of a two-photon excitation regime (Figure S2, Supporting Information). On the other hand, irradiation in the same conditions using a 810 nm, 1.1W LED (Shenzhen Hanhua Opto Co, HH-1WP2IR12-T) did not show any photolysis, ruling out the possibility of detectable linear excitation at this wavelength.

By comparing of the photolysis $t_{1/2}$ of a solution of RuBi-Dopa with a solution of the analogue complex RuBi-Glutamate, which is known to present a functional cross section of 0.14 GM at 800 nm,²³ the same parameter for RuBi-Dopa can be calculated. If the complex concentration, laser power, and irradiation volume are kept constant, then the following expression holds:

$$\sigma_2^{\text{dopa}} \phi_{\text{dopa}} = \sigma_2^{\text{glut}} \phi_{\text{glut}} \frac{t_{1/2}^{\text{glut}}}{t_{1/2}^{\text{dopa}}} = 0.24 \pm 0.04 \text{ GM} \quad (2)$$

With the quantum yield of photorelease of RuBi-glutamate being somewhat higher than that of RuBi-Dopa,²³ this result suggests that the higher functional cross section is due to a higher two-photon absorption.

Once determined that RuBi-Dopa is active in two-photon regime, it can be used to perform an optical manipulation of a 3-D neuronal tissue. Using acute coronal slices of mouse prefrontal cortex, whole-cell patch-clamp recordings from layer five pyramidal cell somata were performed. Dendritic spines

(less than 1 μm head diameter) from basal dendrites were selected and placed near or at the center of the microscope field. Since the activation of D1 receptors can trigger intracellular Ca^{2+} signals in cortical neurons,²⁵ two-photon imaging of spine Ca^{2+} dynamics were performed, after injecting into the cell 200 μM of the calcium indicator Fluo-4 in combination with 200 μM of Alexa-488 to reveal the spine structure (Figure 4A).

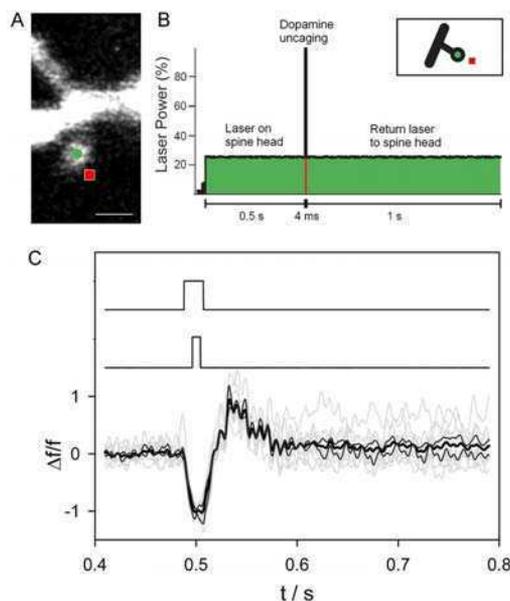


Figure 4. RuBi-Dopa uncaging onto dendritic spines. (A) RuBi-Dopa is bath applied to a cortical slice, and a layer five pyramidal neuron is loaded with 200 μM Fluo-4 Ca^{2+} indicator and 200 μM Alexa-488. Scale bar = 1 μm . (B) Experimental configuration: a Ti-Sapphire laser (820 nm) scans the spine head (at approximately 5–8 mW laser power on sample) first to monitor basal Ca^{2+} concentrations at the location marked with a circle in (A) and then moves to a nearby location (square), where the laser power is increased (to approximately 25 mW on the sample) to uncage dopamine from RuBi-Dopa for 4 ms. After uncaging the laser goes back to initial power and location on the spine head. (C) Spine fluorescent signals (bottom traces; individual traces in gray ($n = 10$), average trace in bold black, and \pm StEr traces in black) showing a sudden increase of Ca^{2+} concentration after the two-photon uncaging of dopamine. The middle trace shows the uncaging pulse. The fluorescent signal detection, by a photomultiplier tube (PMT), was blocked for a few milliseconds before, during, and after the uncaging pulse with the use of an ultrafast shutter (top trace) to prevent potential PMT saturation and errors in signal detection.

A 300 μM RuBi-Dopa solution was applied to the bath, and a Ti-Sapphire pulsed laser (Coherent Chameleon Ultra II, $f = 80$ MHz, $\tau = 140$ fs) with a high numerical aperture objective (60 \times , 0.9NA, water immersion objective) was used at 725 nm to image the spine and uncover its morphological features. The wavelength was switched to 820 nm to uncage RuBi-Dopa right next to the spine head (red dot in Figure 4) and monitor spine head Ca^{2+} accumulations before and after RuBi-Dopa uncaging (Figure 4, green dot).

Uncaging experiments were performed in neurons clamped at a resting potential of -65 mV, and bathed at 37 $^{\circ}\text{C}$. The amount of current needed to hold the layer five pyramidal neurons at this resting potential did not differ before and after bath application of RuBi-Dopa (data not shown). These results

suggest that the cell is not affected by the presence of RuBi-Dopa in the bath. A 4 ms two-photon irradiation pulse right next to the spine head elicited the release of dopamine from the RuBi-Dopa complex and a rapid increase in spine Ca^{2+} concentration in 11 of 13 spines tested (for one responsive spine, see example in Figure 4), indicating both the successful photorelease of dopamine and the presence of functional dopamine receptors on the spine, as suggested by previous studies of D1 receptor immunoreactivity.^{26–29} Indeed, addition of the specific D1 receptor blocker³⁰ SCH 23390, at a concentration previously shown to be specific for D1 receptors in these neurons,³¹ completely blocked the evoked spine Ca^{2+} signals recorded after uncaging of RuBi-Dopa (Figure S3, see the Supporting Information). Interestingly, in only 2 of the 13 spines tested, no Ca^{2+} signals were observed at the spine head after the two-photon uncaging of dopamine, suggesting that some spines in layer five pyramidal neurons may not have functional dopamine receptors. Simultaneous current clamp measurements demonstrated that the Ca^{2+} release in the spine does not induce important voltage changes into the cell soma (see the Supporting Information for details), and therefore, the dopaminergic activation of spines would go unnoticed with electrophysiological techniques.

These results demonstrate the capability of RuBi-Dopa as a tool for activating single spines, which arises from its two-photon sensitivity, a characteristic that just a few caged compounds have. We have performed an optical activation and functional optical measurement of various spines after two-photon uncaging of RuBi-Dopa. Our experiments required the injection of the Ca^{2+} indicator via the recording patch electrode. Thus, in order to perform a full-optical functional mapping of dopaminergic transmission at a single spine level, one could combine the use of RuBi-Dopa uncaging and a neuronal-specific genetically encoded calcium indicator (e.g., GCaMP). By using these techniques, it is possible to bypass the invasive characteristics of standard electrophysiological techniques.

At the concentration of RuBi-Dopa used in this study, we did not observe any morphological or functional deleterious effect in the spine functional and morphological characteristics (marked by the reliability of the calcium responses) nor any damage of the spine head after two-photon uncaging of RuBi-Dopa. The lack of acute phototoxicity at the cellular and single spine level could be due to the fact that no radicals are generated in the photoreaction of RuBi-Dopa, since the Ru–N bond is cleaved heterolytically, yielding two entire molecules. However, we cannot completely rule out a potential toxicity effect in experiments at longer time courses.

In conclusion, we have developed a caged dopamine (RuBi-Dopa), a novel tool for opto-manipulation and investigation of dopaminergic transmission of a subcellular neuronal entity, a single dendritic spine, with high spatial and temporal resolution by means of two-photon uncaging. Chemically, to our knowledge, this is the first design of a two-photon active caged dopamine. Biologically, this is the first proof of principle that dopamine can be released with two-photon precision in single dendritic spines, the main receptacles of excitatory information in the brain, and generate a local Ca^{2+} response. This novel compound together with state-of-the-art techniques such as two-photon excitation and calcium imaging allows the mapping of functional dopamine receptors in brain tissue with exquisite spatial resolution in a noninvasive way.

■ ASSOCIATED CONTENT

§ Supporting Information

Synthesis of the complex, ^1H NMR spectra during photolysis, and additional neurophysiological data. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Present Address

[§]R.A.: Département de Physiologie, Université de Montréal, 2960 Chemin de la Tour, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada.

Author Contributions

R.A., V.A., R.Y. and R.E. conceived and designed the experiments. R.A., V.A. and R.E. performed the experiments. R.A. and R.E. analyzed the data. R.A., R.Y. and R.E. wrote the manuscript.

Funding

V.A. and R.E. were supported by CONICET, UBA and ANPCyT. R.A. and R.Y. were supported by the Kavli Institute for Brain Science, NEI, NINDS, NIH, NIDA, MURI program, Keck Foundation and NARSAD.

Notes

R.E. is staff of CONICET.

The authors declare no competing financial interest.

■ REFERENCES

- (1) Schneier, F. R., Liebowitz, M. R., Abi-Dargham, A., Zea-Ponce, Y., Lin, S. H., and Laruelle, M. (2000) Low dopamine D(2) receptor binding potential in social phobia. *Am. J. Psychiatry* 157, 457.
- (2) Mink, J. W. (2006) Neurobiology of basal ganglia and Tourette syndrome: basal ganglia circuits and thalamocortical outputs. *Adv. Neurol.* 99, 89–98.
- (3) Beaulieu, J. M., and Gainetdinov, R. R. (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 63, 182–217.
- (4) Eyles, D., Feldon, J., and Meyer, U. (2012) Schizophrenia: do all roads lead to dopamine or is this where they start? Evidence from two epidemiologically informed developmental rodent models. *Transl. Psychiatry* 2, e81.
- (5) Adnet, P., Lestavel, P., and Krivosic-Horber, R. (2000) Neuroleptic malignant syndrome. *Br. J. Anaesthesia* 85, 129–135.
- (6) Swanson, J. M., Kinsbourne, M., Nigg, J., Lanphear, B., Stefanatos, G. A., Volkow, N., Taylor, E., Casey, B. J., Castellanos, F. X., and Wadhwa, P. D. (2007) Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis. *Neuropsychol. Rev.* 17, 39–59.
- (7) Gizer, I. R., Ficks, C., and Waldman, I. D. (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum. Genet.* 126, 51–90.
- (8) Kienast, T., and Heinz, A. (2006) Dopamine and the diseased brain. *CNS Neurol. Disord.: Drug Targets* 5, 109–131.
- (9) Gerfen, C. R. (2000) Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci.* 23, S64–70.
- (10) Campanella, G., Roy, M., and Barbeau, A. (1987) Drugs affecting movement disorders. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 27, 113–136.
- (11) Williams, G. V., and Goldman-Rakic, P. S. (1995) Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376, 572–575.
- (12) Zahrt, J., Taylor, J. R., Mathew, R. G., and Arnsten, A. F. (1997) Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *J. Neurosci.* 17, 8528–8535.
- (13) Self, D. W., Barnhart, W. J., Lehman, D. A., and Nestler, E. J. (1996) Opposite modulation of cocaine-seeking behavior by D1- and D2-like dopamine receptor agonists. *Science* 271, 1586–1589.

- (14) Smith-Roe, S. L., and Kelley, A. E. (2000) Coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the nucleus accumbens core is required for appetitive instrumental learning. *J. Neurosci.* *20*, 7737–7742.
- (15) Girault, J. A., and Greengard, P. (2004) The neurobiology of dopamine signaling. *Arch. Neurol.* *61*, 641–644.
- (16) Denk, W., Strickler, J. H., and Webb, W. W. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* *248*, 73–76.
- (17) Araya, R., Eiselthal, K. B., and Yuste, R. (2006) Dendritic spines linearize the summation of excitatory potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 18799–18804.
- (18) Araya, R., Jiang, J., Eiselthal, K. B., and Yuste, R. (2006) The spine neck filters membrane potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 17961–17966.
- (19) Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., and Kasai, H. (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* *4*, 1086–1092.
- (20) Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., and Kasai, H. (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* *429*, 761–766.
- (21) Zayat, L., Salierno, M., and Etchenique, R. (2006) Ruthenium(II) bipyridyl complexes as photolabile caging groups for amines. *Inorg. Chem.* *45*, 1728–1731.
- (22) Zayat, L., Noval, M. G., Campi, J., Calero, C. I., Calvo, D. J., and Etchenique, R. (2007) A new inorganic photolabile protecting group for highly efficient visible light GABA uncaging. *ChemBioChem* *8*, 2035–2038.
- (23) Salierno, M., Marceca, E., Peterka, D. S., Yuste, R., and Etchenique, R. (2010) A fast ruthenium polypyridine cage complex photoreleases glutamate with visible or IR light in one and two photon regimes. *J. Inorg. Biochem.* *104*, 418–422.
- (24) Pinnick, D. V., and Durham, B. (1984) Photosubstitution Reactions of $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{XY}^{n+}$ Complexes. *Inorg. Chem.* *23*, 1440–1445.
- (25) Lezcano, N., and Bergson, C. (2002) D1/D5 dopamine receptors stimulate intracellular calcium release in primary cultures of neocortical and hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* *87*, 2167–2175.
- (26) Smiley, J. F., Levey, A. I., Ciliax, B. J., and Goldman-Rakic, P. S. (1994) D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 5720–5724.
- (27) Bergson, C., Mrzljak, L., Smiley, J. F., Pappy, M., Levenson, R., and Goldman-Rakic, P. S. (1995) Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J. Neurosci.* *15*, 7821–7836.
- (28) Yung, K. K., Bolam, J. P., Smith, A. D., Hersch, S. M., Ciliax, B. J., and Levey, A. I. (1995) Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience* *65*, 709–730.
- (29) Bordelon-Glausier, J. R., Khan, Z. U., and Muly, E. C. (2008) Quantification of D1 and D5 dopamine receptor localization in layers I, III, and V of Macaca mulatta prefrontal cortical area 9: coexpression in dendritic spines and axon terminals. *J. Comp. Neurol.* *508*, 893–905.
- (30) Bourne, J. A. (2001) SCH 23390: The first selective dopamine D-1-like receptor antagonist. *CNS Drug Rev.* *7*, 399–414.
- (31) Rotaru, D. C., Lewis, D. A., and Gonzalez-Burgos, G. (2007) Dopamine D1 receptor activation regulates sodium channel-dependent EPSP amplification in rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J. Physiol.* *581*, 981–1000.