



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la Actividad Unitaria del Receptor P2X4 de Humano por Fluorescencia.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

L. en C. JOSE PABLO OCELOTL OVIEDO

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL

Instituto de Biotecnología- UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ADÁN O. GUERRERO CÁRDENAS

Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada

DR. LUIS VACA DOMÍNGUEZ

Instituto de Fisiología Celular – UNAM

Cuernavaca, Morelos, Diciembre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El presente trabajo se llevó a cabo en el Consorcio de la
Fisiología del Espermatozoide**

**Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología
Molecular**

Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional Autónoma de México

Agradecimientos:

Primeramente a mi familia: en especial a mi papa y mi mama porque siempre han creído en mi y me han apoyado de todas las maneras inimaginables para superarme y llegar a ser una persona de éxito. Gracias por todo su amor, apoyo y cariño, los amo.

A mis hermanos Josué y Jeremy porque a pesar de todos los roces que hemos tenido se que siempre estarán dispuestos a apoyarme y ayudarme cuando lo necesite. Gracias por hacer mas amenas las noches post- trabajo.

Al Consorcio de la Fisiología del Espermatozoide y a parte de sus lideres académicos: Dra. Claudia Treviño Santa Cruz y el Dr. Takuya Nishigaki por permitirme integrarme a su equipo de trabajo y poner en mí la confianza para la realización de este proyecto.

Al Dr. Alberto Darzson, primeramente por aceptarme como su alumno y por que siempre me creyó capaz de realizar este proyecto a pesar de que no me consideré la persona mas apta para el mismo. Gracias por su confianza y por siempre impulsarme a tener más curiosidad por el tema y alentarme a adquirir más conocimientos.

A Adán, infinitas gracias por todo el apoyo que recibí de tu parte para la realización de este proyecto, sin tu ayuda nada de esto hubiera sido posible.

Al Dr. Luis Vaca Domínguez, por alentarme a no rendirme en la realización de este proyecto. Gracias por todas las ideas y herramientas que proporcionó para poder cumplir con el objetivo del mismo.

A Carlos “Bastián”, porque tu súper construcción ayudo infinitamente a la realización de este proyecto. Gracias por tu valiosa aportación, te deseo el mejor de los éxitos.

Al Dr. “Chávez” y a “Nachito” por siempre estar dispuestos a ayudarme cuando tenia alguna duda, por todos sus comentarios y aportaciones tanto al proyecto como a las platicas ajenas al tema tuvimos.

A Gastón “Gas”, porque siempre estuvo en toda la disposición de ayudarme con el microscopio y a la realización de los experimentos.

A Yolo, por todos los valiosos conocimientos que me transmitiste al llegar al laboratorio, gracias por toda la disposición de ayudarme a superar el tema de la biología molecular.

A mis amigos del Consorcio: Pau "Pauwi", Arturo "Bb", Gaby A. "Gabita", Sandra "Sand", Gaby "Mami", Vale "Val", Mariana "Marianita" y Columba "Coluuu", porque con ustedes el trabajo del laboratorio siempre fue muy ameno y agradable. Gracias por todos los momentos inolvidables y chismes que compartimos, los quiero un montón.

A mis amigos del LNMA: David y Haydee, porque siempre tenían una taza de café y un chisme para compartirme y despejarme un rato entre las horas de trabajo. Gracias también por todos los momentos recreativos que compartimos, les deseo el mejor de los éxitos.

A los chicos internacionales que conocí siendo parte de este equipo de trabajo: Cintia Stival, Lis Puga, Catalina Berrios y Nico Bruckman. Gracias por su amistad y los tantos lindos momentos que pudimos compartir me llevo muchos buenos recuerdos, los quiero y espero verlos pronto.

A los miembros del jurado, los Drs. Rosario Vera, Nina Pastor, Enrique Salas, Arturo Picones y Arturo Hernández por su tiempo, observaciones ideas y comentarios que ayudaron a mejorar el escrito.

Financiamiento:

La realización de esta tesis fue financiada por proyectos de investigación, becas de mantenimiento y apoyo de tesis de las siguientes instituciones:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) Fronteras de la Ciencia 71
- DGAPA/UNAM IN205516 AD
- Beca Nivel Maestría Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) No. 583250
- Ayudante de Investigador SNI nivel III o Emérito (Sistema Nacional de Investigadores) No. 15005
- Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

Índice

RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
Los canales iónicos	12
Las características de los canales iónicos	13
Los canales iónicos: La importancia fisiológica y estudio	13
ANTECEDENTES	15
TIRFM	16
Imagenología de canal unitario (ICU)	18
Receptor P2X4	20
Las características biofísicas del receptor P2X4	21
La potencialización por Ivermectina	22
Los metales traza como moduladores alostéricos del receptor P2X4	24
JUSTIFICACION	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
METODOLOGÍA	26
CULTIVO CELULAR, TRANSFECCIÓN Y EXPRESIÓN	26
Cultivo Celular	26
Transfección de la construcción receptor P2X4-RGECO 1.2 en células HEK293	27
Microscopía TIRF	28
Ensayo de expresión funcional del receptor P2X4-RGECO1.2	28
Ensayo de evaluación del efecto de la IVM y el Cu²⁺ sobre la actividad del receptor P2X4-RGECO1.2	29
IMAGENOLOGÍA DE CANAL UNITARIO	31
Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas aplicado a fluorescencia.	33
DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES ASOCIADAS A LA ACTIVIDAD DE CANAL UNITARIO	35
Microscopía de Súper Resolución por SRRF	35
Idealización de Trazos de Fluorescencia	36
RESULTADOS	37
IMAGENOLOGÍA DE CANAL UNITARIO	43
El estudio de las probabilidades de apertura del receptor humano P2X4	58
El cálculo de tiempos de latencia del receptor humano P2X4	63
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	76
REFERENCIAS	77

Índice de Figuras:

Figura 1: Estructura general de un canal iónico.	12
Figura 2: La técnica de Patch-Clamp o fijación de membrana.	14
Figura 3: Microscopía de Reflexión Interna Total (TIRFM).	17
Figura 4: Estructura del receptor purinérgico P2X4.	20
Figura 5: Propiedades biofísicas del receptor humano P2X4.	22
Figura 6: Estructura molecular de la Ivermectina (IVM).	23
Figura 7: Visualización de la expresión del receptor humano P2X4-RGECO1.2 en cultivos celulares HEK293.	38
Figura 8: Ensayo de la expresión funcional del receptor humano P2X4-RGECO1.2 en células HEK293.	40
Figura 9: Evaluación del efecto de la IVM y Cu^{2+} sobre la actividad del receptor humano P2X4.	42
Figura 10: Establecimiento de las condiciones experimentales para evaluación de actividad de canal unitario por fluorescencia.	45
Figura 11: Establecimiento de las condiciones experimentales para evaluación de actividad de canal unitario por fluorescencia.	46
Figura 12: Evaluación de la presencia de actividad de canal unitario en registros de fluorescencia a través de la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario. .	50
Figura 13: Niveles digitales asociados a la actividad de canal unitario determinada por ARNE.	50
Figura 14: Evaluación de la presencia de actividad de canal unitario en registros de fluorescencia a través de la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario en presencia de IVM.	53
Figura 15: Evaluación de la presencia de actividad de canal unitario en registros de fluorescencia a través de la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario en presencia de Cu^{2+}	54
Figura 16: Método de obtención de máximos locales en imágenes de Súper Resolución de Fluctuaciones Radiales o SRRF.	57
Figura 17: Probabilidad de apertura del receptor humano P2X4 en presencia de ATP 3 μM	59
Figura 18: Probabilidades de apertura del receptor humano P2X4 en presencia de CTP 50 μM	60
Figura 19: Probabilidades de apertura del receptor humano P2X4 en presencia de CTP 200 μM	61
Figura 20: Cálculo de tiempos de latencia en el estado abierto y cerrado del receptor humano P2X4 en presencia de ATP 3 μM	64
Figura 21: Cálculo de tiempos de latencia en el estado abierto y cerrado del receptor humano P2X4 en presencia de CTP 50 μM	65
Figura 22: Cálculo de tiempos de latencia en el estado abierto y cerrado del receptor humano P2X4 en presencia de CTP 200 μM	66

Índice de tablas:

Tabla 1: Tiempos de Latencia del Receptor Humano P2X4..... 44

Abreviaturas:

P2X	Familia de receptores purinérgicos
Ca²⁺	Calcio
Na⁺	Sodio
Cl⁻	Cloro
H⁺	Iones hidrogeno
TIRFM	Microscopía de Reflexión Interna Total
ICU	Imagenología de Canal Unitario
EM-CCD	Dispositivo Cargado Acoplado a Multiplicador Electrónico
CMOS	Semiconductor complementario de óxido metálico
AN	Apertura numérica
ATP	Adenosina-5-Trifosfato
2-me-S-ATP	2-metiltiolATP
CTP	Citidina-5-Trifosfato
PPADS	Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico
pS	Pico Siemens
CHO	Células de ovario de hámster chino
HEK 293	Células de riñón embrionario humano
IVM	Ivermectina
αβ-met-ATP	Alfa-beta-metil-ATP
Zn²⁺	Zinc
Cu²⁺	Cobre
Cd²⁺	Cadmio

Hg²⁺	Mercurio
Co²⁺	Cobalto
Mn²⁺	Manganeso
Ba²⁺	Bario
Ni²⁺	Níquel
Pb²⁺	Plomo
ARNE	Análisis de Ruido No Estacionario
ADMEM	Medio de cultivo DMEM avanzado
PBS	Buffer de Fosfatos
FBS	Suero Fetal Bovino
μM	Micro molar
mM	Mili molar
SRRF	Súper resolución por fluctuaciones radiales
Mm	Milímetros
ng	nano gramos
P2Y	Familia de receptores metabotrópicos
SCCaFTs	Transitorios fluorescentes de canales unitarios de Ca ²⁺
SCA	Actividad de Canal Unitario
nm	Nanómetros
PSF	Función de Dispersión Puntual
mV	Mili volts
K_{off}	Constante de apagamiento

RESUMEN

El calcio juega un papel crítico en la fisiología celular debido a que puede actuar como segundo mensajero en diversos procesos de señalización. La señalización por Ca^{2+} se caracteriza por tener un mecanismo de regulación sumamente fino a través de la generación de pequeños transitorios altamente localizados. Este tipo de regulación es posible debido a la existencia de mecanismos que mantienen un enorme gradiente de concentración entre el citoplasma y el medio extracelular, causando un gran influjo localizado de iones Ca^{2+} una vez que un canal se abre.

La actividad de canal unitario ha sido ampliamente estudiada por técnicas como el Patch-Clamp además de una gran variedad de señales elementales de Ca^{2+} como resultado de este fenómeno.

No obstante, el estudio de dichas señales elementales de Ca^{2+} asociadas a la actividad de canal unitario, de canales con conductancias unitarias muy pequeñas ó en células con morfologías complejas y reducido tamaño aún presentan un gran reto para su estudio por electrofisiología.

El establecimiento de una metodología experimental que permita el registro y estudio de las señales elementales de Ca^{2+} asociadas a la actividad de canal unitario se hace imperativo para entender el papel que puedan tener las mismas en los procesos fisiológicos y moleculares de células o en sitios inaccesibles a la pipeta de Patch-Clamp.

En este trabajo se presenta la generación de una nueva técnica no invasiva que permite el registro de la actividad de canales de Ca^{2+} a nivel unitario basada en la metodología de "Imagenología de Canal Unitario" la cual se sustenta en la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas clásica de la electrofisiología.

INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos

Los canales iónicos pertenecen al tipo de proteínas integrales de membrana formadoras de un poro hidrofílico con permeabilidad selectiva, los cuales participan en funciones biológicas esenciales para la célula. Ellos se encargan del movimiento preciso y controlado de iones hacia dentro y fuera de la célula y en los organelos, en dirección de su gradiente electroquímico, al formar un camino restringido a través de la membrana impermeable lipofílica (Greenberg M. R., 2014).

Los flujos iónicos, resultado de la actividad de los canales iónicos, median procesos tanto en organismos unicelulares como en superiores, como lo pueden ser: señalización celular, balance de pH, regulación del volumen celular, excitabilidad eléctrica, neurotransmisión rápida, secreción entre otras (Gadsby C. D., 2009).

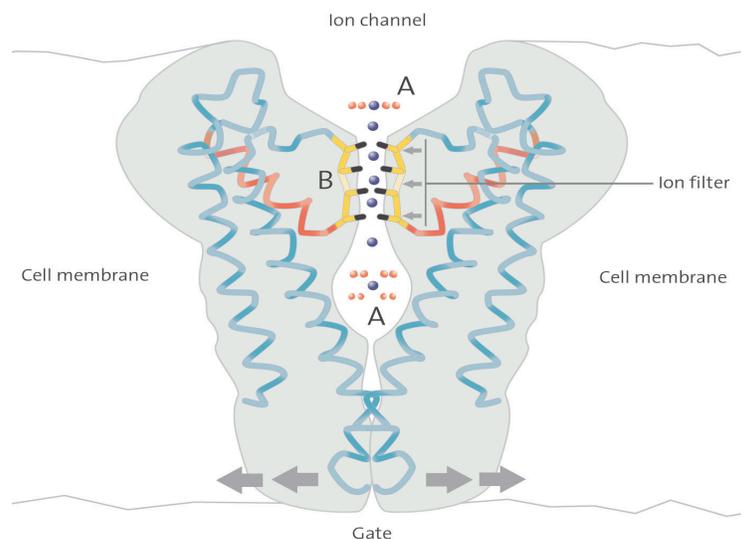


Figura 1: Estructura general de un canal iónico.

Los canales iónicos en general son proteínas que se conforman de múltiples subunidades las cuales forman un camino selectivo e hidrofílico que permite el paso de iones específicos a través del mismo. Cada uno de los canales iónicos que existen se caracteriza por tener propiedades biofísicas únicas asociadas a su estructura y función. (Hille B. 2001)

Las características de los canales iónicos

Los canales iónicos se caracterizan por formar un camino selectivo, hidrofílico y energéticamente favorable para el paso de iones seleccionados a favor de su gradiente de concentración. El pasaje de iones a través de un canal, a pesar de encontrarse controlado, puede llevarse a cabo con una eficiencia y rapidez de 10^6 a 10^8 iones por segundo (Álvarez O. et al., 2014).

Estas proteínas generan corrientes iónicas, que en algunos casos, son capaces de alterar el balance iónico celular, contribuyendo al establecimiento y modificación del potencial de membrana y pueden modular indirectamente múltiples procesos de señalización.

Es de destacar que los canales iónicos exhiben una rica farmacología y han sido motivo de amplio estudio en procesos como la fertilización o la respuesta inmune donde su participación es indispensable, entre muchos otros. (Gadsby C. D., 2009).

Los canales iónicos: La importancia fisiológica y estudio

La presencia ubicua de los canales iónicos en organismos superiores sugiere que las funciones mediadas por los mismos resultan ser esenciales para la vida.

Aún cuando los canales iónicos son un constituyente minoritario del total de la proteína membranal, la importancia de su estudio ha sido evidente desde que se demostró que juegan un papel vital como las entidades moleculares capaces de alterar el estado homeostático de la célula.

El estudio y caracterización de los canales iónicos se basa en el hecho de que su apertura genera el movimiento de cargas eléctricas (corrientes iónicas) que se pueden medir, medidas que proporcionan información acerca de la función y las características biofísicas del canal.

Los cambios conformacionales ocasionados por la apertura de un canal iónico junto a la clase y magnitud de las corrientes generadas por el mismo se encuentran asociadas a sus propiedades intrínsecas (conductancia, permeabilidad y selectividad). No obstante, estos cambios conformacionales ocurren estocásticamente con cinéticas complejas que, en algunos casos, han sido difíciles de estudiar (Hille B. 2001).

La actividad unitaria de los canales iónicos se ha estudiado empleando técnicas electrofisiológicas, como el “patch-clamp”, dichas técnicas requieren de la formación de sellos eléctricos entre la pipeta de registro y la membrana en estudio. El reducido tamaño de algunas células, y particularmente los compartimientos intracelulares, dificulta registrar corrientes de canal unitario. Este problema se agrava si solo se expresan unos cuantos canales iónicos en la membrana plasmática o los pedazos de membrana que se utilizan en el parche.

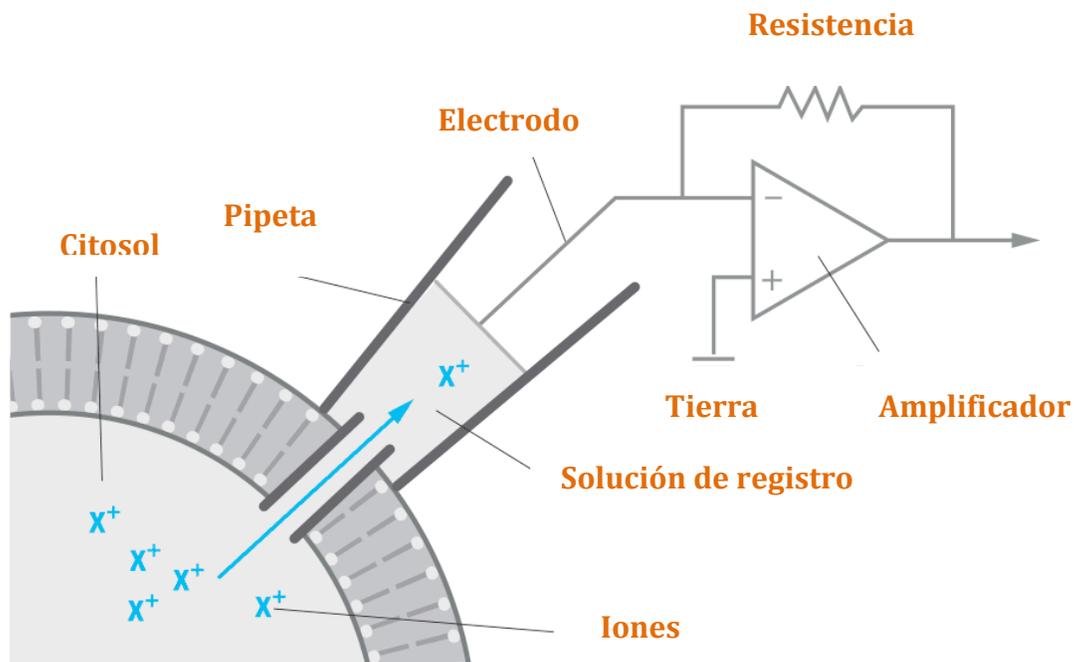


Figura 2: La técnica de Patch-Clamp o fijación de membrana.

La técnica de patch-clamp o fijación de membrana se basa en el estudio de las propiedades eléctricas de una célula mediante el registro de corrientes generadas por el movimiento de cargas a través de un canal iónico. A partir del estudio de la propiedades de las corrientes es posible describir y caracterizar las propiedades biofísicas asociadas al canal de estudio. (Neher y Sakmann, 1991)

ANTECEDENTES

Desde su descubrimiento hasta la actualidad, la función y propiedades de los canales iónicos se ha investigado a través de diversas metodologías las cuales incluyen: reconstitución en bicapas lipídicas, tecnología de DNA recombinante, inmunocitoquímica, farmacología y en mayor grado patch-clamp; los estudios con esta última técnica han proporcionado información valiosa acerca de las propiedades biofísicas de los canales iónicos y su función en la célula (Lievano A. et al., 1995).

No obstante, en los últimos años el surgimiento de metodologías basadas en el registro de corrientes unitarias utilizando sondas ópticas que cambian su capacidad para emitir absorber y emitir fotones en respuesta a cambios en la concentración local de iones como el Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- y H^+ , entre otros, en conjunto con el uso técnicas de microscopía con alta resolución, ha permitido el estudio y caracterización de canales iónicos inaccesibles a la pipeta de patch-clamp.

Las primeras evidencias de registros de canal iónico mediante el uso de técnicas ópticas provienen de estudios de Zou H. y colaboradores en 2002. Ellos combinaron técnicas ópticas (microscopía de epifluorescencia) y electrofisiológicas para registrar simultáneamente la corriente que fluía a través de un canal de Ca^{2+} activado por estrés mecánico, así como estados transitorios en la fluorescencia de la sonda Fluo-3 resultantes de la apertura y cierre de este canal (Zou et al., 2002).

Posteriormente, Demuro A. y Parker I. en 2003 lograron registrar la actividad unitaria de canales voltaje dependientes tipo N utilizando microscopía confocal de rastreo. Los estudios se realizaron mediante la expresión heteróloga de dicho canal en ovocitos de *Xenopus Laevis*. Los transitorios causados por la actividad de los canales se registraron con ayuda de la sonda fluorescente Fluo-4 (Demuro & Parker, 2003).

A pesar de la implementación de dichas tecnologías de microscopía para lograr la visualización de eventos unitarios, la optimización de la resolución tanto espacial como temporal es crucial en el registro óptico de canales iónicos.

Las técnicas de visualización con resolución mejorada en las dimensiones tanto lateral ($x - y$) como axial (z) proveen no solamente una mejor resolución espacial sino también temporal al monitorear la fluorescencia dependiente de la actividad del canal en volúmenes de muestreo mucho más pequeños y restringidos inmediatamente adyacentes al canal. Múltiples técnicas ópticas se han utilizado para visualizar transitorios fluorescentes resultado de la actividad unitaria, incluyendo: epifluorescencia, microscopía confocal de rastreo y microscopía de reflexión interna total (TIRFM). A pesar de que cada una presenta ventajas particulares, hasta el momento la microscopía TIRF ha resultado tener las características más adecuadas para lograr la visualización de actividad unitaria por fluorescencia. Esta permite visualizar rápidamente y de manera bidimensional los eventos, generando una sección óptica extremadamente delgada (100 nm) adyacente a la membrana plasmática (Demuro & Parker, 2005).

TIRFM

TIRFM, es una técnica basada en el principio de que cuando la luz incide con un ángulo apropiado (ángulo crítico), en una interface con dos medios de diferente índice de refracción, ésta se refleja completamente generando un campo electromagnético altamente restringido en grosor en el medio con menor índice de refracción. Mientras el campo electromagnético (onda evanescente) tiene propiedades idénticas a las de la luz incidente, su intensidad decae exponencialmente con una distancia perpendicular a la dirección de rayo incidente, de tal manera que la iluminación se extiende solo decenas de nanómetros dentro de la célula (~100 nm). Esta iluminación restringida limita los efectos nocivos de la exposición a la luz que tiene sobre las células ya que produce un campo de excitación muy fino, permitiendo una resolución excepcional para “blancos” embebidos o directamente adyacentes a la membrana (Nystoriak M. et al., 2013).

El campo evanescente que se genera por TIRFM permite iluminar selectivamente un fluoróforo que se encuentre dentro de la rebanada óptica determinada por la onda evanescente, minimizando la fluorescencia que se genera de regiones intracelulares. TIRFM se utiliza en una gran variedad de estudios para lograr la visualización de dinámicas espacio/temporales de moléculas en o cerca de la membrana. No obstante, mediante la manipulación del plano focal o el ángulo crítico se puede aumentar el rango de visualización más allá de la membrana plasmática (Mattheyses L. et al., 2010).

A partir del uso de la microscopía TIRF se ha propuesto el registro óptico de señales discretas que se generan como resultado de la apertura de uno o un pequeño grupo de canales (actividad de canal unitario) en una región altamente localizada (Demuro and Parker, 2005).

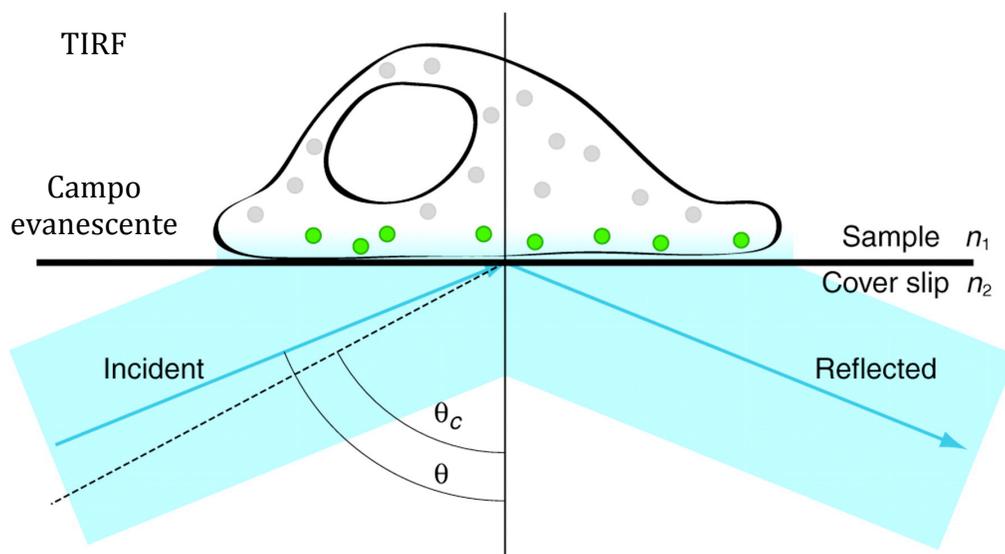


Figura 3: Microscopía de Reflexión Interna Total (TIRFM).

La microscopía TIRF se encuentra basada en el principio de que cuando la luz incidente que ilumina la muestra, choca con un medio cuyo índice de refracción es menor al índice del medio en el que viaja la luz, a un ángulo apropiado, esta es totalmente reflejada formando un campo evanescente o de excitación altamente restringido adyacente a la membrana permitiendo iluminar selectivamente fluoróforos cercanos a la misma. (Mattheyses L. et al. 2010)

Imagenología de canal unitario (ICU)

La Imagenología de Canal Unitario (ICU) por microscopía TIRF se basa en el registro y estudio de los cambios en la fluorescencia generados por sondas altamente sensibles como consecuencia del pasaje de un ión en específico a través de un canal. Dichos registros son obtenidos mediante la adquisición de imágenes a través del uso cámaras digitales tipo EM-CCD y CMOS.

La ICU es una técnica que permite estudiar actividad de canal unitario, misma que resulta muy útil en circunstancias donde los estudios de electrofisiología no son posibles de efectuar. Uno de los aspectos atractivos de la ICU es que es una técnica no invasiva que no requiere de electrodos ni de perturbaciones mecánicas para manipular la membrana en estudio. La ICU se ha empleado para estudiar diversos tipos de canales de Ca^{2+} , empleando sondas fluorescentes sensibles al Ca^{2+} , algunas solubles como el Fluo-3, Fluo-4, y Fluo-5, además de otras ligadas genéticamente al canal en estudio. No obstante, a pesar de que la ICU se ha utilizado exitosamente, es importante tener presentes las limitaciones experimentales que presenta.

Por un lado, como se mencionó anteriormente, la ICU se encuentra basada en el uso de la microscopía TIRF en combinación con cámaras digitales tipo EM-CCD y CMOS. En ambos dispositivos la tasa de adquisición se encuentra en el orden de 10-100 ms, limitada por la velocidad de transferencia de información hacia el convertidor análogo digital para la formación de la imagen. Dichas características presentan limitaciones importantes para este tipo de estudio dado que las constantes de tiempo de un número de canales iónicos usualmente son inferiores a los 10 ms.

Por otra parte, la resolución y el contraste de una imagen digital se encuentran determinada por el sistema óptico y de adquisición, los cuales también contribuyen con limitaciones al sistema experimental. El contraste representa la fidelidad de los valores de intensidad mínima y máxima que se transfieren desde el plano del objeto al plano de la imagen.

La resolución (r_{xy}) es la capacidad para resolver o separar dos objetos a una distancia dada, está limitada por la óptica (interferencia de la luz consigo misma); depende de la longitud de onda de la luz, y de apertura numérica de la lente AN, ($r_{xy} = 0.61 / AN$). La resolución de una imagen digital no solo esta limitada por la óptica, sino también por el número de píxeles, o en un sentido físico por la separación entre ellos.

Teniendo en cuenta la vasta complejidad de las propiedades biofísicas de los distintos tipos de canales iónicos que existen, el estudio de las propiedades de un canal iónico ya caracterizado electrofisiológicamente, por microscopía TIRF, permitirá el establecimiento de las condiciones para aproximar la implementación de ICU en otro tipo de canales y diversos tipos celulares.

A diferencia de otros canales iónicos con cinéticas complejas, los receptores ionotrópicos P2X han sido motivo de amplio estudio ya que presentan gran importancia para la fisiología de los mamíferos. Lo anterior se debe a que se encuentran involucrados en la regulación de diversos procesos biológicos tales como: secreción endocrina o paracrina, respuestas inmunes, inflamación, dolor, agregación plaquetaria, vasodilatación, entre otros; además, se ha demostrado su presencia en prácticamente todos los tejidos (Surprenant A. & North A.R. 2008). Estos receptores se han clasificado como canales catiónicos, no selectivos activados por ligando con una permeabilidad equiparable tanto a sodio (Na^+) como a potasio (K^+). Además, poseen una permeabilidad significativa a calcio (Ca^{2+}) y otras moléculas catiónicas inorgánicas, permitiendo la entrada de dichos iones una vez que ocurre su apertura. La características antes mencionadas lo hacen un modelo de estudio ampliamente utilizado debido a su fácil expresión y registro para la realización de este proyecto de investigación.

Receptor P2X4

La primera estructura cristalográfica que se obtuvo de un receptor P2X fue la del receptor P2X4 de pez cebra.

El gen del receptor P2X4 se encuentra localizado en el cromosoma 12 en el humano y se piensa es el receptor más ampliamente distribuido de la subfamilia de receptores P2X. No obstante, la función del mismo en la gran mayoría de los tejidos donde se expresa aún se desconoce (Gever R. J. et al., 2006).

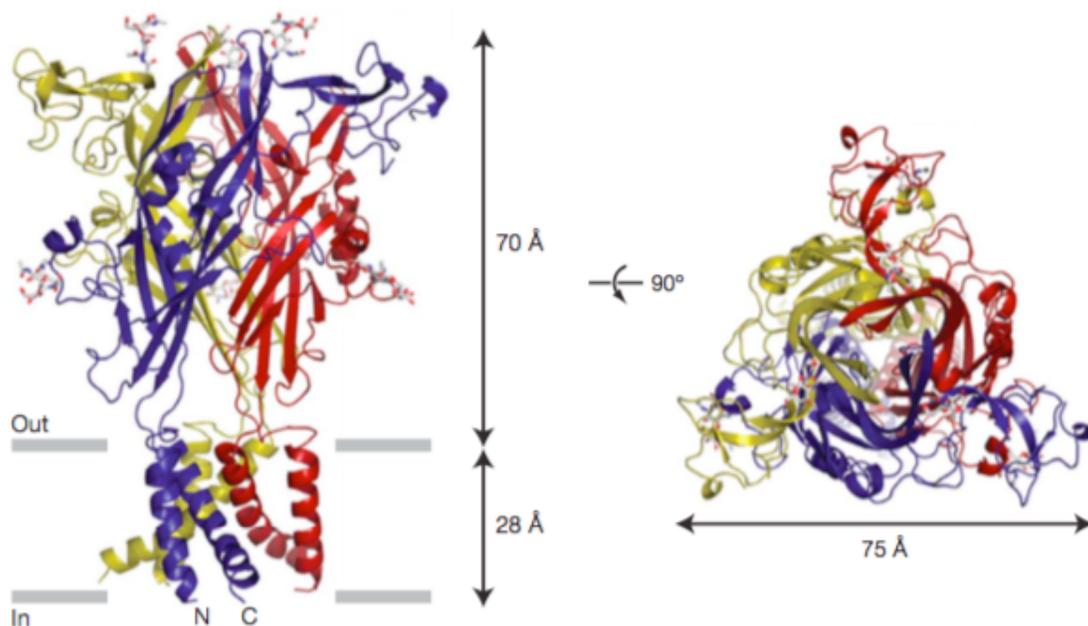


Figura 4: Estructura del receptor purinérgico P2X4.

El receptor P2X4 al igual que otros receptores de la familia P2X son proteínas oligoméricas compuestas por más de una subunidad por receptor funcional (trímeros). Además no parecen contener un sitio canónico de unión a ATP, no obstante, se presume que contienen 3 sitios de unión (uno por cada interfaz de contacto entre subunidad) y la ocupación de al menos dos de estos sitios es necesaria para su activación. (Khahn S.B. et al., 2001).

Las características biofísicas del receptor P2X4

Los receptores homoméricos P2X4 generalmente son potentemente activados por ATP (pEC_{50_s} en sistemas recombinantes para P2X4_h \approx 6.3 μ M) generando una corriente entrante de desensibilización lenta. El receptor P2X4 también es capaz de activarse en menor medida en respuesta a 2Me-S-ATP (2-Metiltio-adenosina) y CTP (Citidina-5-Trifosfato) (Gever R. J. et al., 2006).

Otra propiedad inusual es la existencia de diferencias entre especies sobre la sensibilidad del P2X4 a múltiples antagonistas y/o agonistas. El receptor de humano suele inhibirse en respuesta a PPADS (piroxidalfosfato-6azofenil-2'-4'-acido disulfónico), Suramina, Azul de Bromofenol y Azul de Cibacron; en contraste, los mismos compuestos son capaces de potencializar las corrientes inducidas por ATP en el receptor P2X4 de ratón (Burnstock G. 2007).

Por otro lado, registros de corriente unitaria en células CHO y células HEK 293 expresando P2X4 también han permitido describir una conductancia unitaria de \sim 9 pS para el mismo (Negulyaev A. Y. et al., 2000). Los receptores P2X4 usualmente operan como canales catiónico-selectivos con una permeabilidad relativamente alta a Ca^{2+} mientras la aplicación de ATP sea breve. En el receptor humano el Ca^{2+} contribuye al \sim 8% de la corriente entrante total en condiciones fisiológicas normales. Cuando la aplicación de ATP es por un tiempo más prolongado (varios segundos), el receptor aumenta su permeabilidad por cationes inorgánicos como el NMDG (N-metil-D-glucamina). Finalmente, la desensibilización/inactivación de la corriente típicamente decae entre los cinco a diez segundos siguientes a la aplicación de una máxima concentración de ATP (\sim 100 μ M).

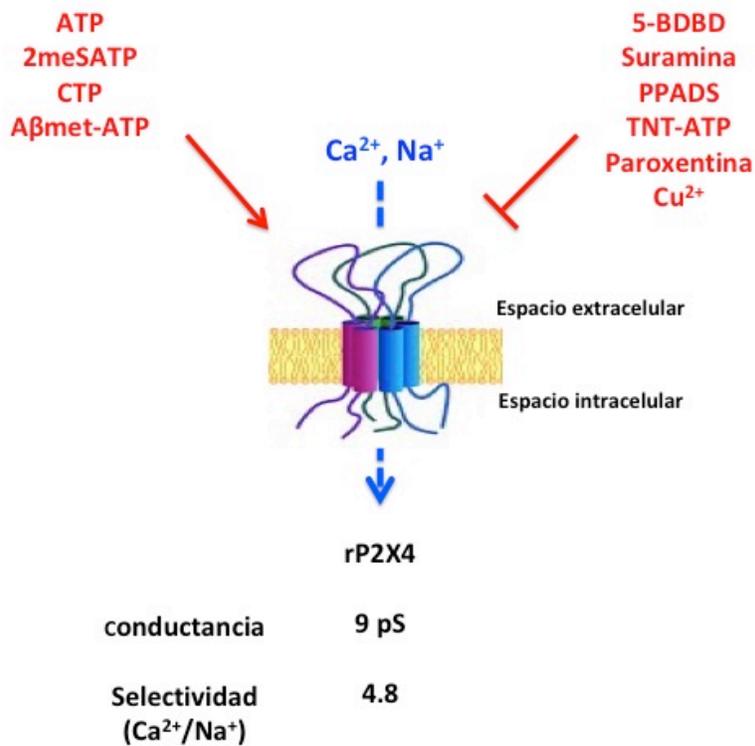


Figura 5: Propiedades biofísicas del receptor humano P2X4.

El receptor humano P2X4 al igual que otros miembros de la familia P2X funciona como un canal catiónico no selectivo con una selectividad mayor por Ca²⁺ que por Na⁺; a diferencia de otros receptores P2X este receptor es capaz de activarse selectivamente por CTP y ser inhibido por Cu²⁺. (Khakh S. B. et al. 2001)

La potencialización por Ivermectina

La característica más distinguible del receptor humano P2X4 es que las corrientes generadas en respuesta a ATP se pueden potencializar por la Ivermectina (IVM por sus siglas en ingles).

La IVM es un compuesto lipofílico de alto peso molecular resultado del metabolismo de fermentación del organismo *Streptomyces avermitilis* perteneciente a la familia de las avermectinas. El primer efecto descrito para la IVM fue el de potencializar la neurotransmisión al interrumpir la señalización a través de canales de cloro activados por glutamato en parásitos nematodos.

La IVM es el resultado de una mezcla semisintética de 2 avermectinas modificadas: 80% 22,23-dihidroavermectina-B1a y 20% 22,23-dihidroavermectina-B1b. (Crump A. 2017).

Funciona como modulador alostérico selectivo y específico del receptor P2X4 de humano. La aplicación extracelular de IVM tiene como consecuencia el aumento de la sensibilidad del receptor por ATP, incrementa la amplitud de la corriente en respuesta a concentraciones supra máximas de ATP, $\alpha\beta$ metATP y CTP entre otros, y prolonga la cinética de inactivación (Jelínkova I. et al., 2008).

El estudio a nivel de canal unitario ha mostrado que la IVM también es capaz de incrementar la probabilidad de apertura y prolonga el tiempo de vida media de apertura del canal sin afectar la conductancia (Priel A. & Silberberg D. S. 2004).

La Ivermectina no potencializa las corrientes de otros receptores P2X homoméricos como: P2X2, P2X3, P2X7 y P2X_{2/3}.

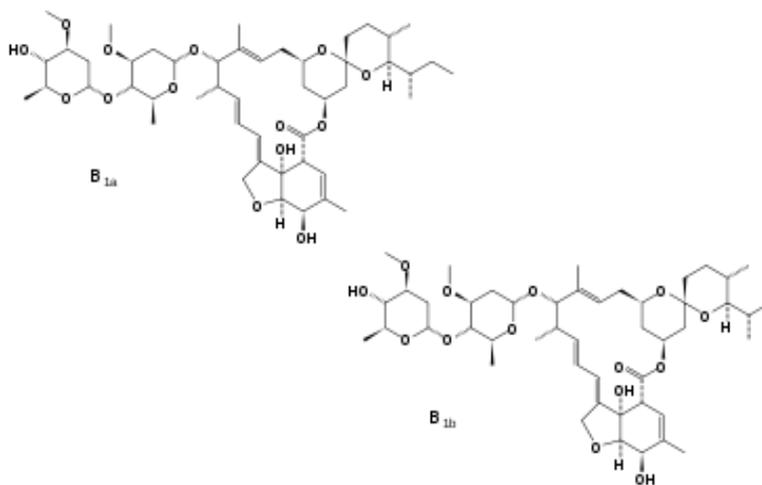


Figura 6: Estructura molecular de la Ivermectina (IVM).

La ivermectina se encuentra formada por una mezcla de 2 avermectinas modificadas; B1a y B1b en una porción 80:20. La ivermectina es capaz de modificar las propiedades biofísicas del receptor P2X4, no así la de otros receptores de la familia P2X. (Crump. A, 2017)

Los metales traza como moduladores alostéricos del receptor P2X4

Otra de las características más destacables de los receptores P2X4 es su modulación alostérica diferencial por metales. El efecto varía por acción de los diferentes metales. La característica más excepcional de este receptor es su modulación diferencial por zinc (Zn^{2+}) y cobre (Cu^{2+}). Mientras que el Zn^{2+} potencia la actividad del receptor el Cu^{2+} lo inhibe.

La acción alostérica de los metales en el receptor P2X4 no se limitan al Cu^{2+} y al Zn^{2+} ya que el cadmio (Cd^{2+}), el mercurio (Hg^{2+}) y el cobalto (Co^{2+}) también son capaces de modular la actividad del receptor P2X4. Los efectos del Cd son similares a los del Zn^{2+} (modulación positiva). En contraste, el Hg inhibe al receptor P2X4 de manera similar al Cu^{2+} ; sin embargo, estos 2 metales no interaccionan en un sitio único alostérico, ya que el sitio de modulación del Hg permanece sin conocerse. Mientras que otros metales tales como el manganeso (Mn^{2+}), bario (Ba^{2+}), níquel (Ni^{2+}) y plomo (Pb^{2+}) no afectan la actividad del receptor P2X4.

JUSTIFICACION

La actividad unitaria de canales iónicos se ha estudiado ampliamente usando técnicas como el patch-clamp en diversos tipos celulares. No obstante, el conocimiento sobre las señales elementales que se generan en respuesta a la apertura de un o un grupo pequeño de canales de muy baja conductancia como los SOCs, que podrían estar en el espermatozoide, no se han podido resolver con esta técnica, aunado a la complejidad morfológica de esta célula que se suma a las limitaciones. Debido a estas razones es importante establecer metodologías alternativas para estudiar dicho tipo de canales, particularmente en sitios de difícil acceso y en organelos. Una de estas alternativas es la medición de actividad de canal unitario por fluorescencia.

HIPÓTESIS

Es posible derivar propiedades de canal unitario del receptor P2X4 al estudiar su actividad por fluorescencia.

OBJETIVO

Establecer una metodología no invasiva basada en microscopía TIRF para el estudio actividad unitaria de canales iónicos tomando como modelo al receptor P2X4 en las células HEK 293 de humano con el fin de caracterizar en un futuro las entidades moleculares existentes en otros tipos celulares como en el espermatozoide.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer la expresión funcional del receptor humano P2X4 en células HEK 293 y evaluar el efecto de la IVM y el Cu^{2+} sobre su actividad.
2. Establecer las condiciones experimentales para lograr el registro de actividad de canal unitario del receptor humano P2X4 por fluorescencia utilizando microscopía TIRF.
3. Evaluar la presencia de actividad de canal unitario en registros de fluorescencia a través de la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario (ARNE).
5. Determinar propiedades de canal unitario a partir del estudio de Análisis de Ruido No Estacionario.

METODOLOGÍA

CULTIVO CELULAR, TRANSFECCIÓN Y EXPRESIÓN

Cultivo Celular

Se utilizaron células HEK-293 las cuales se mantuvieron en cajas Petri de 60 x 15 mm en presencia de medio Eagle modificado de Dulbecco avanzado (ADMEM por sus siglas en inglés; Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS por sus siglas en inglés; Gibco, Invitrogen) y 1% de antibióticos, a una temperatura de 37°C y en presencia de 5% de CO₂ en una incubadora VWR Scientific 2100. Las células se resembraron cada 48 horas, después de haber alcanzado el 70% de confluencia siguiendo el siguiente protocolo: se comenzó retirando el medio de cultivo y a continuación se añadió 1 ml de PBS para después retirarlo por succión. Para despegar las células de la caja de cultivo se adicionó 0.5 mL de tripsina (TryPLE™ Express, Gibco, Life Technologies) y se incubaron por tres minutos a 37°C. La reacción de tripsina se inactivó añadiendo 2 mL de medio completo (ADMEM suplementado con FBS). Finalmente a una caja nueva que contenía 5 mL de medio completo fresco, se añadieron 500 µl de suspensión celular del cultivo anterior.

Construcción del receptor humano P2X4 - sensor de calcio RGECO1.2

Para llevar a cabo el ensayo funcional de actividad del receptor humano P2X4 se utilizó una construcción del mismo receptor acoplado a un sensor de Ca^{2+} genéticamente codificado en su región amino-terminal (por subunidad); denominado: RGECO1.2. Este sensor se basa en los sensores GCaMPs que están compuestos por proteínas GFP permutadas circularmente, acopladas a la región de unión a calmodulina (CAM) de la cadena ligera de la miosina de pollo en su región amino-terminal y un dominio CAM de vertebrados en el extremo carboxilo-terminal. La versión del sensor RGECO1.2, a diferencia de los GCaMPs, se encuentra unido a una proteína roja fluorescente mApple, y en términos de eficiencia tiene un cambio en la intensidad de fluorescencia en respuesta a Ca^{2+} de 1600 % y una K_d de 480 nM (Zhao Y. et al. 2011).

Transfección de la construcción receptor P2X4-RGECO 1.2 en células HEK293

La transfección se realizó en cultivos celulares con 24 h post-pase. En un tubo eppendorf de 2 ml se colocaron 600 ng del DNA de interés; la construcción de receptor humano P2X4-RGECO1.2 (donada por el laboratorio del Dr. Luis Vaca). A continuación se agregó cuidadosamente 5 μl de ReactivoPlus (Gibco, Life technologies) y 100 μl de medio OptiMEM sin suero. Se mezcló cuidadosamente y se incubó durante 15 min. Transcurrido el tiempo se agregaron 7 μl de lipofectamina (Invitrogen) a la mezcla anterior y se incubó por 20 min más. Subsecuentemente, las células a transfectar se retiraron del medio de cultivo, y se añadió 1 mL de medio OptiMEM sin suero. Seguido se agregó el medio OptiMEM que contenía el DNA, ReactivoPlus y lipofectamina. Las células se incubaron durante 24 hrs en presencia de dicha mezcla. Pasado el tiempo de cultivo se retiró este medio y se sustituyó con 2 mL de medio ADMEM suplementado con FBS y antibiótico. Las células transfectadas se incubaron a 37°C y 5% CO_2 durante 24 h más previo a realizar el experimento.

Microscopía TIRF

Todos los registros se realizaron en un microscopio invertido Olympus IX-81 configurado para realizar excitación de la fluorescencia por reflexión interna total (TIRF) (cellTIRF Illuminator; Olympus). El ángulo de excitación se estableció para que el campo de evanescencia tuviera una profundidad de penetración de alrededor de 100 nm (Xcellence software v1.2, Olympus Soft Imaging Solution GMBH). Las muestras se iluminaron continuamente utilizando una fuente de excitación dependiendo del fluoróforo utilizado. En este caso se utilizó un láser de estado sólido bombeado con un diodo de longitud 561 nm.

La potencia láser máxima, medida en la parte posterior del plano focal de la lente objetivo, oscilaba entre 20 y 25 mW. La selección del haz y la modulación de las intensidades láser se controlaron a través del software. Se utilizó un conjunto completo de cubos láser multibanda para discriminar las fuentes de luz seleccionadas (LF 405/488/561/635 A-OMF, Bright Line y Semrock). La fluorescencia se recolectó usando un objetivo de inmersión en aceite Olympus UApo de apertura numérica $N 60 \times / 1.49$.

Ensayo de expresión funcional del receptor P2X4-RGECO1.2.

Para realizar los ensayos de expresión funcional del receptor humano P2X4-RGECO1.2 se propuso utilizar cultivos de células HEK293 previamente transfectados con dicha construcción.

Como se mencionó anteriormente, el receptor P2X4 trabaja como un canal catiónico no selectivo con alta permeabilidad a Ca^{2+} . El uso de canales con permeabilidad a Ca^{2+} permite obtener señales discretas y sumamente localizadas como consecuencia de la baja concentración que debe mantenerse internamente del ión y la existencia de “amortiguadores” que son capaces de inhibir su difusión mas allá de unos cuantos micrometros. La suma del sensor (RGECO1.2, indicador fluorescente genéticamente codificado basado en otro sensor de Ca^{2+} denominado GCaMP) (Zhao Y. et al., 2011) asociado a la región intracelular del receptor, posiblemente nos permitirá poder detectar actividad adyacente al poro de conducción (actividad de canal unitario) (Demuro A. & Parker I., 2006).

A partir de lo mencionado anteriormente, se realizaron registros de célula única estimulando la actividad del receptor por medio de ATP [3 μM]_f en presencia de una solución fisiológica con una concentración de Ca^{2+} [2 mM]_f. Los registros se realizaron por microscopía TIRF con las especificaciones antes mencionadas. Se obtuvo una serie de imágenes cuya tasa de adquisición fue de 100 ms; la duración total del registro fue de tres minutos veinte segundos dejando el primero minuto como condición basal (sin estímulo), posteriormente se añadió la concentración de ATP señalada y veinte segundos antes de finalizado el registro se añadió ionomicina [10 μM]_f.

Del registro realizado se generó un stack de imágenes final que se almacenó en formato .TIFF para posteriormente realizar un análisis de las imágenes por medio del software FIJI (Image J) y así determinar la cinética de la respuesta.

Ensayo de evaluación del efecto de la IVM y el Cu^{2+} sobre la actividad del receptor P2X4-REGECO1.2

Con base en Priel & Silberberg, 2004 y Coddou, et al. 2003, se decidió probar la actividad de dos principales compuestos: un “potencializador” de la respuesta de ATP/CTP específico para el receptor P2X4 humano conocido como Ivermectina (IVM) y un ión bloqueador de la respuesta; el Cu^{2+} . Dicho enfoque se realizó con el fin de corroborar si la actividad registrada era resultado de la activación del receptor P2X4-REGECO1.2. Por otro lado, el compuesto IVM también se utilizó como aproximación para tratar de aumentar el tiempo y la frecuencia de las aperturas y cierres como parte de la actividad del receptor como se menciona en Priel A. & Silberberg D. S. 2004.

Para esto, se realizaron registros de célula única estimulando la actividad del receptor por medio de ATP [3 μM]_f o CTP [50 μM]_f / [200 μM]_f en presencia de una solución fisiológica con una concentración de Ca^{2+} [2 mM]_f; adicionalmente, para evaluar la actividad de la IVM y el Cu^{2+} , dichos compuestos se incubaron durante tres minutos a una concentración de [3 μM]_f previo a comenzar el registro. Los registros se realizaron por microscopía TIRF con las especificaciones antes mencionadas. Se obtuvieron una serie de imágenes cuya tasa de adquisición fue de 100 ms; la duración total del registro fue de tres minutos veinte segundos dejando el primero minuto como condición basal (sin estímulo), posteriormente se añadió la concentración de ATP señalada y veinte segundos antes de finalizado el registro se añadió ionomicina [10 μM]_f.

Del registro realizado se generó un stack de imágenes final que se almacenó en formato ".TIFF" para posteriormente realizar un análisis de las imágenes por medio del software FIJI (Image J) y así determinar el efecto sobre la cinética de la respuesta en presencia de IVM y Cu^{2+} .

IMAGENOLOGÍA DE CANAL UNITARIO

Establecimiento de condiciones experimentales para evaluación de actividad de canal unitario por fluorescencia.

Con el fin establecer las condiciones experimentales para ICU se realizó la transfección de cultivos de células HEK 293 como se mencionó anteriormente. Los registros de actividad de canal unitario se realizaron con células 48 horas post-transfección siguiendo el protocolo siguiente:

Al cultivo 48 h post-transfección, se le retiró el medio ADMEM completo y a continuación se le agregaron 2 ml de PBS para lavar el resto de medio que pudo haber quedado en el mismo. Seguido, se añadió 1ml de solución fisiológica suplementada con 2 mM de Ca^{2+} y posteriormente, se colocó la muestra en el microscopio para visualización. Los registros se realizaron por microscopía TIRF con las especificaciones antes mencionadas. Posteriormente se llevó a cabo el siguiente protocolo de adquisición / estimulación. Se utilizaron diferentes concentraciones de ATP y Ca^{2+} en el medio para determinar las condiciones en donde obtuviéramos respuestas discretas. Se realizó la adquisición de videos individuales probando en cada uno las siguientes concentraciones: 0.1, 0.3, 1, 3, 10, y 30 μM de ATP, y además, se añadió ionomicina [10 μM]_f 20 segundos antes de finalizado el protocolo de adquisición para visualizar la respuesta máxima.

Se obtuvieron una serie de imágenes cuya tasa de adquisición fue de 12 ms; la duración total del registro fue de tres minutos veinte segundos dejando el primero minuto como condición basal (sin estímulo), posteriormente se añadió la concentración de ATP [3 μM]_f o CTP [50 μM]_f / [200 μM]_f y veinte segundos antes de finalizado el registro se añadió ionomicina [10 μM]_f.

Del registro realizado se generó un stack de imágenes final que se almacenó en formato ".TIFF" para posteriormente realizar un análisis de las imágenes por medio del software FIJI (Image J) para determinar la magnitud de la respuesta.

Evaluación de la presencia de actividad de canal unitario en registros de fluorescencia a través de la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario.

Una vez determinada la aproximación a las condiciones experimentales ideales para realizar registros de fluorescencia con posible actividad de canal unitario, se llevaron a cabo registros de células transfectadas 48 h post- transfección con el receptor P2X4-RGECO1.2.

Se realizaron registros de fluorescencia estimulando la actividad del receptor por medio de ATP [3 μM]_f o CTP [50 μM]_f / [200 μM]_f. Adicionalmente, en algunos casos, se registro la actividad del receptor en presencia de IVM [3 μM]_f o Cu^{2+} [100 μM]_f los cuales fueron incubados previo a iniciar el registro.

Del registro se obtuvo una serie de imágenes cuya tasa de adquisición fue de 12 ms y por microscopía TIRF con las especificaciones antes mencionadas; la duración total del registro fue de tres minutos veinte segundos dejando el primero minuto como condición basal (sin estímulo), posteriormente se añadió la concentración de ATP o CTP señalada y veinte segundos antes de finalizado el registro se añadió ionomicina [10 μM]_f.

Del registro realizado se generó un stack de imágenes final que se almacenó en formato “.TIFF”. A continuación del set de imágenes obtenido se realizó un paso de segmentación de la imagen por medio del software FIJI (Image J) para delimitar el área de estudio (32 x 32 píxeles). Posteriormente la imagen fue procesada y analizada mediante un algoritmo capaz de determinar la fluorescencia asociada a la actividad de un o un pequeño grupo de canales basado en la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas programado en el software R y que se explica a continuación.

Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas aplicado a fluorescencia.

Como alternativa a los registros de canal unitario, el Análisis de Ruido No Estacionario (ARNE) de corrientes macroscópicas es una metodología indirecta que permite derivar propiedades de canal único de las corrientes macroscópicas $\hat{I}(t)$ tomando en cuenta que son el resultado de varios eventos unitarios que ocurren en la misma ventana de tiempo. Estas propiedades pueden ser: conductancia, probabilidad de apertura y la distribución del tiempo de estancia en el estado abierto o cerrado y número activo de eventos unitarios.

La teoría de Análisis de Ruido No Estacionario se basa en el análisis de las fluctuaciones de la señal al considerar la corriente media y la varianza asociada:

Si la probabilidad de apertura del canal es baja, la corriente media, $\langle \hat{I} \rangle$, está dada por el producto de la corriente de canal unitario, \bar{I} , el número de canales N , y la probabilidad de apertura p_o :

$$\langle \hat{I} \rangle = \bar{I} N p_o \quad (1)$$

Dado que, un canal puede estar en estado de conducción o no conducción, entonces sus variables de estado {abierto, cerrado} siguen una distribución binomial con varianza:

$$\sigma^2 = \bar{I}^2 N p_o (1-p_o) \quad (2)$$

Es importante notar que la varianza es cero si todos los canales no conducen ($p_o = 0$), o si todos los canales están conduciendo ($p_o = 1$). La varianza alcanza un máximo cuando la mitad de los canales están conduciendo.

Al usar las ecuaciones (1) y (2), se puede describir la varianza en términos del producto de las corrientes unitaria y macroscópica, $\sigma = \bar{I} \langle \hat{I} \rangle (1-p_0)$ Note que, en los casos donde la probabilidad de apertura es pequeña,

$$\bar{I} = \sigma^2 / \langle \hat{I} \rangle \quad (3)$$

Lo anterior implica que es posible calcular la magnitud de la corriente unitaria a partir de $\langle \hat{I} \rangle (t)$, donde I es la pendiente de la regresión lineal de $\langle \hat{I} \rangle$, vs σ^2 . Los valores de $\langle \hat{I} \rangle$, y σ^2 se calculan sobre una ventana de tiempo con un ancho de banda fijo que se desplaza a lo largo de toda la serie de tiempo $\hat{I}(t)$ (Álvarez O. et. al., 2014).

Cuando las corrientes macroscópicas son registradas en respuesta a estimulaciones repetitivas idénticas (o simultáneas). En este caso, la varianza se calcula sobre todos los puntos registrados a cada tiempo.

Cuando la amplitud de la señal $\hat{I}(t)$ varía en función del tiempo, la probabilidad p_0 no es constante, ni tampoco pequeña. En estos casos la gráfica de σ^2 contra $\langle \hat{I} \rangle$, resulta en una parábola que cruza por cero cuando la corriente media es máxima $\langle \hat{I} \rangle = \bar{I} N$, y la pendiente al origen proporciona la amplitud de la corriente unitaria \bar{I} , tal que:

$$\sigma^2 = \bar{I} \langle \hat{I} \rangle - \langle \hat{I} \rangle^2 / N \quad (4)$$

Esta ecuación resulta útil para entender la relación entre el ruido debido a la apertura y cierre de un canal iónico, así como para poder derivar sus propiedades fundamentales (Hille, 2001).

DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES ASOCIADAS A LA ACTIVIDAD DE CANAL UNITARIO

Microscopía de Súper Resolución por SRRF

A partir de los registros previamente obtenidos, se generaron sets de imágenes para super-resolución. Todas las películas se grabaron en una cámara EM-CCD (Andor, Ixon 888) tomando un tamaño de chip (512x32 píxeles) a 265 nm por píxel. Las imágenes de subdifracción se derivaron del plug in Super Resolución por fluctuación radial (SRRF) (Gustafsson N. et al. 2016).

Para cada reconstrucción de super-resolución (ya sea muestras fijas: x, y, o imágenes de células vivas, x, y, t), se adquirieron 20,000 imágenes en modo TIRF dentro del campo evanescente. Las imágenes se recolectaron estroboscópicamente, cada una con un tiempo de exposición de 12 ms y a 100 Hz. Cada serie de imágenes se analizó con el plug in eNanoJ-core y NanoJ-SRRF del software imagen J, teniendo en cuenta los bloques temporales de 20,000 imágenes. Se consideraron los siguientes parámetros: radio de anillo 0,5, aumento de radialidad 5, ejes en anillo 10; todos los demás parámetros se configuraron como opciones predeterminadas. Los mapas de la radialidad se corrigieron en cuanto a movimiento usando tablas de movimiento calculadas con la herramienta Estimate Drift de NanoJ-SRRF, considerando un promedio de tiempo de 20,000 imágenes.

Estos mapas de radialidad corregidos de movimiento fueron finalmente integrados en una imagen de super-resolución mediante el cálculo “acumulate” de segundo orden de las Autocorrelaciones de Radialidad Temporal (para imágenes de super-resolución de células fijas) o a través de la Media del Producto de Paralelo de Radialidad Temporal para imágenes en super-resolución de células vivas).

Idealización de Trazos de Fluorescencia.

Posterior a la adquisición de los datos y, por una parte, tras su procesamiento por súper resolución, se determinó utilizar un algoritmo de idealización con el objetivo de convertir los registros de fluorescencia con posible actividad de canal unitario obtenidos en series consecutivas de niveles de fluorescencia menos ruidosas con amplitudes y duraciones bien definidas.

La información de canal unitario, no importa que tan compleja sea, consiste de 2 componentes principales: transiciones y amplitudes.

El objetivo de utilizar un algoritmo de idealización es estimar exactamente la duración y amplitud de todos los niveles o sub-estados de conductancia que puedan resolverse del canal a partir de registros “ruidosos”.

La duración de un nivel se determina a través del intervalo de tiempo que separa 2 eventos o transiciones, mientras que la amplitud se determina al promediar los puntos entre 2 transiciones. Normalmente, la información que respecta a la actividad unitaria contiene grandes cantidades de ruido, lo cual, fuerza a utilizar umbrales dependiendo de la amplitud de la transición. Lo anterior puede resultar en dos tipos de problemas: transiciones más pequeñas que el umbral no detectarán y transiciones espurias que pueden aparecer cuando su amplitud exceda el umbral. Las transiciones espurias suelen ser un problema fundamental asociado a la idealización. El algoritmo final utilizado emplea dos tipos de umbrales: un umbral de pendiente que detecta transiciones y un umbral relativo de amplitudes que elimina transiciones espurias.

RESULTADOS

Establecimiento de la expresión del receptor humano P2X4-RGECO1.2 en células HEK 293: Ensayo de evaluación funcional y del efecto de la IVM y el Cu^{2+} sobre su actividad.

Ensayo de evaluación funcional del receptor P2X4-RGECO 1.2

La línea celular HEK 293 se ha utilizado ampliamente como herramienta para la expresión de proteínas recombinantes ya que su maquinaria bioquímica permite la generación de proteínas funcionales. Por otra parte, esta línea celular carece de corrientes de Ca^{2+} endógenas, proveyendo una plataforma robusta y confiable para lograr la expresión de canales permeables a Ca^{2+} además de una gran eficiencia de transfección y tamaño adecuado para poder realizar registros electrofisiológicos (Gandini A. M., et al. 2014).

Por las razones previamente mencionadas se decidió utilizar células HEK 293 las cuales se mantuvieron en cultivo en presencia de medio ADMEM completo. Para llevar a cabo la expresión del receptor P2X4, del cultivo “madre” se obtuvieron cultivos “secundarios” en cajas Petri de 35 mm con fondo de vidrio con un grosor de 17 mm (World Precision Instruments, INC). Las células se cultivaron por 24 h antes de llevar a cabo la transfección y por un tiempo de 48 horas post-transfección para lograr la expresión estable del receptor humano P2X4-RGECO 1.2.

Los cultivos se monitorearon antes y durante el experimento por microscopía TIRF con las especificaciones antes mencionadas (Figura 1).

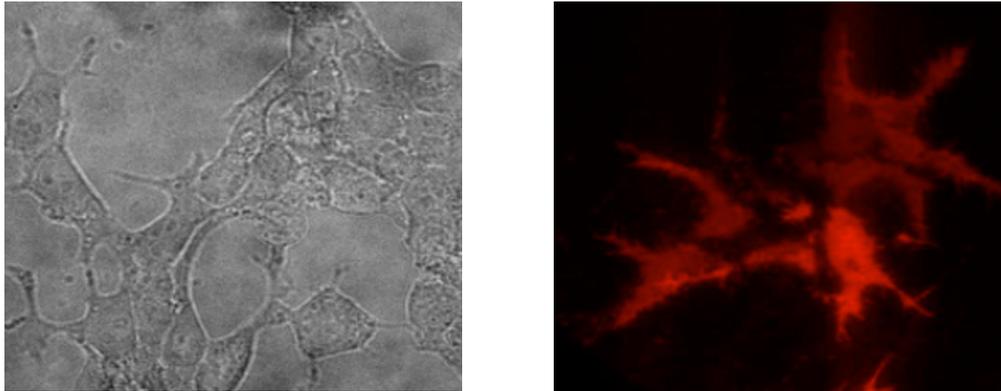


Figura 7: Visualización de la expresión del receptor humano P2X4-RGECO1.2 en cultivos celulares HEK293.

En campo claro (Izquierda) y en microscopía TIRF (Derecha). El campo de la derecha muestra la expresión del receptor humano P2X4-RGECO1.2 visto por microscopía TIRF con una configuración de 100nm.

Como podemos observar, se lograron obtener cultivos sanos y con niveles considerablemente altos de expresión del receptor humano P2X4-RGECO1.2. aún con bajas cantidades de DNA (600 ng). Cabe señalar que después de iniciar el proyecto encontramos en la literatura indicaciones de que el modelo de células HEK pueda no ser el más adecuado para estudiar influjos de Ca^{2+} expresando el receptor P2X4 debido a la existencia de receptores purinérgicos P2Y endógenos que podrían co-activarse por ATP (Alexander P.H.S. et. al., 2011).

Posteriormente, se llevo a cabo el ensayo funcional sobre la expresión del receptor humano P2X4-RGECO1.2 mediante la estimulación de su actividad por medio de su agonista específico: ATP a una concentración de $[3 \mu\text{M}]_i$.

Los protocolos de adquisición y estimulación son aquellos que se mencionaron anteriormente. Como resultado del ensayo funcional, podemos observar que la estimulación del receptor P2X4 con ATP en un medio con Ca^{2+} , provoca su apertura y el concomitante transporte de dicho ión a través de su poro de conducción, lo cual es reportado como un cambio en la intensidad del sensor RGECO1.2 una vez que entra en contacto con el mismo. Por otro lado, el ionoforo de Ca^{2+} , ionomicina, se utilizó como control para provocar una entrada masiva de Ca^{2+} y determinar la cantidad máxima de fluorescencia emitida por el sensor en presencia de la saturación. Es de notar que la respuesta observada es característica del receptor P2X4, teniendo una subida de fluorescencia inmediata al contacto con el estímulo como resultado del transporte de Ca^{2+} y presenta una cinética de desensibilización por la constante presencia de ATP lo que se refleja en la caída de la respuesta antes de aplicada la ionomicina.

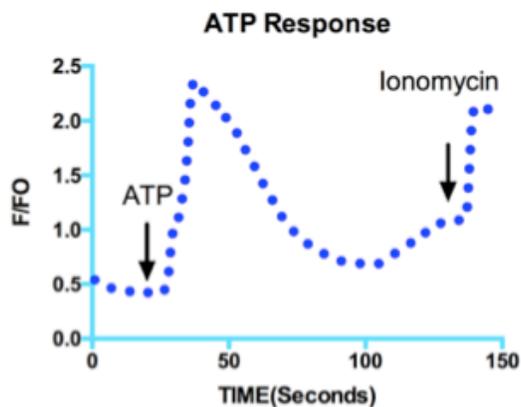
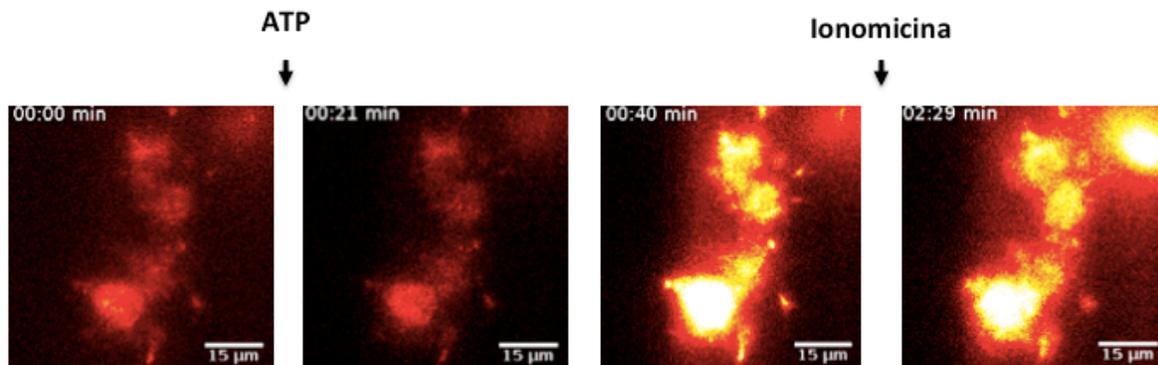


Figura 8: Ensayo de la expresión funcional del receptor humano P2X4-RGECO1.2 en células HEK293.

(Arriba) Representación del registro de fluorescencia por microscopía TIRF de una célula expresando el receptor humano P2X4-RGECO1.2 estimulada con ATP 1 μ M en presencia de 2 mM de Ca^{2+} . (Abajo) Trazo de fluorescencia correspondiente a la célula representada en A. El trazo refleja una típica respuesta del receptor humano P2X4 con una activación rápida y un proceso de inactivación post-estímulo.

Evaluación del efecto de la IVM y el Cu^{2+} sobre la actividad del receptor humano P2X4-RGECO 1.2.

A continuación se llevo a cabo la evaluación del efecto de la IVM y el Cu^{2+} sobre la actividad del receptor como parte de la metodología para lograr el registro de actividad de canal unitario y por otro lado, tener un control positivo de actividad del receptor P2X4.

Como se puede observar, la respuesta a ambos compuestos replicaron los efectos anteriormente descritos, pudiendo nosotros describir de igual manera, la potencialización de la respuesta del receptor humano P2X4 a ATP o CTP en presencia de IVM ($[3 \mu\text{M}]_f$) y enlenteciendo la cinética de desensibilización. Por otro lado, el ión Cu^{2+} ($[100 \mu\text{M}]_f$) logro bloquear gran parte de la respuesta a ATP o CTP. No obstante, se puede observar un pequeño remanente de corriente. Este ultimo fenómeno nos llevó a concluir que la expresión endógena de otros receptores de la familia P2X como lo pueden ser P2X2 pudieran estar respondiendo a la incubación con Cu^{2+} , mismo que puede tener un efecto homologo a la IVM sobre dicho subtipo de receptor.

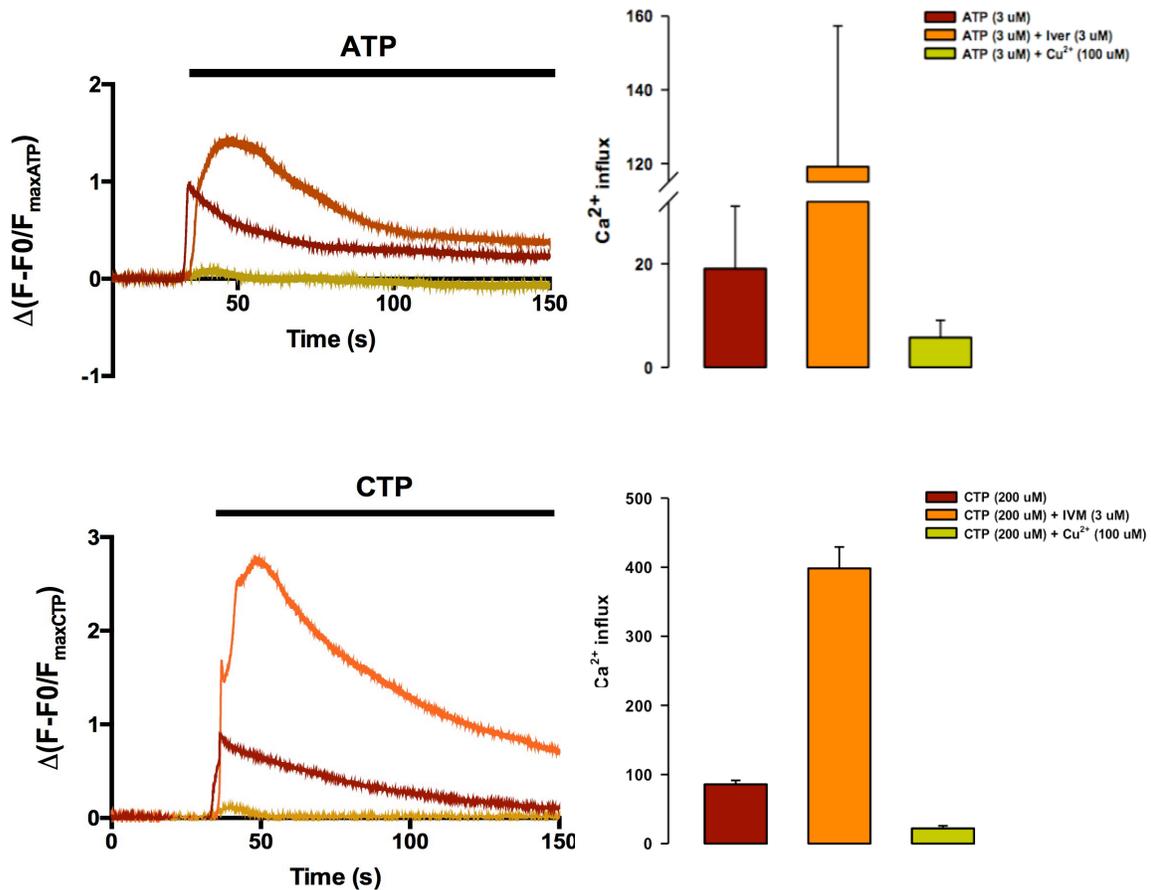


Figura 9: Evaluación del efecto de la IVM y Cu²⁺ sobre la actividad del receptor humano P2X4.

(Arriba) Trazos promedio de fluorescencia de células transfectadas expuestas a ATP 3 μ M, ATP 3 μ M + IVM 3 μ M y ATP 3 μ M + Cu²⁺ 100 μ M y CTP 200 μ M, CTP 200 μ M + IVM 3 μ M y CTP 200 μ M + Cu²⁺ 100 μ M. (Abajo) Cuantificación del efecto de la IVM y Cu²⁺ sobre el influjo de Ca²⁺ generado por la activación del receptor con ATP 3 μ M y CTP 200 μ M; es de notar que la IVM es capaz de aumentar la magnitud de la respuesta del receptor a su activación mientras que el Cu²⁺ lo bloquea casi por completo.

IMAGENOLOGÍA DE CANAL UNITARIO

Establecimiento de condiciones experimentales para evaluación de actividad de canal unitario por fluorescencia.

Las primeras evidencias de la posibilidad de registrar un canal iónico mediante el uso de técnicas ópticas provinieron de Zou H. y colaboradores en 2002. Ellos combinaron técnicas ópticas y electrofisiológicas para obtener los primeros registros simultáneos de la corriente que fluía a través de un solo canal junto con el registro de transitorios fluorescentes de canal unitario de Ca^{2+} (SCCaFTs por sus siglas en Inglés) utilizando como modelo canales activados por estiramiento (SCAs por sus siglas en inglés) en células de músculo liso.

Con base en lo anterior, nos propusimos aproximar las condiciones experimentales necesarias para lograr el registro de actividad unitaria utilizando como modelo el receptor humano P2X4 previamente descrito. A diferencia de otros canales, el receptor humano P2X4 no es sensible a voltaje y su actividad se puede desencadenar por acción de agonistas como el ATP o CTP; esto nos permitió evitar la necesidad de llevar a cabo registros electrofisiológicos y ópticos simultáneos pudiendo controlar la apertura del canal utilizando solamente un agonista general (Adenosina-5-Trifosfato) ó específico (Citidina-5-Trifostato).

Otro punto importante es que la actividad (apertura y cierre) de un canal en general es un proceso estocástico y suele suceder en una escala de tiempo de milisegundos (ms), con cinéticas que pueden ser difíciles de resolver con sondas fluorescentes, por lo cual, tuvimos que tomar en cuenta la cinética descrita para el canal a fin de poder capturar eventos de apertura y cierre. Es por eso que se determinó obtener registros de una región delimitada de la célula, 48 horas post-transfección, buscando distintas condiciones en las cuales hipotetizamos pudiéramos estar activando un menor número de canales ó provocando una menor entrada de Ca^{2+} . Estas aproximaciones se realizaron utilizando diferentes concentraciones de ATP y Ca^{2+} en el medio. La adquisición se realizó por microscopía TIRF con las especificaciones antes mencionadas.

TABLE I
Significant Exponential Components Fit to the Open and Shut Dwell Time Distributions

Patch IVM Events Po open	Mean		Open components					Shut components				
	Time constant and (area)		Time constant and (area)					Time constant and (area)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
μM	%	ms	ms	ms	ms	ms	ms	ms	ms	ms		
C02	2,018	2	3.4	0.30 (0.27)	2.7 (0.45)	6.1 (0.28)		0.95 (0.63)	11 (0.11)	260 (0.14)	1,100 (0.12)	
C04	1,382	0.7	1.9	0.79 (0.63)	3.5 (0.37)		0.078 (0.55)	0.85 (0.31)	5.7 (0.046)	53 (0.026)	1,600 (0.065)	
C05	1,992	2	3.9	0.27 (0.28)	4.5 (0.72)		0.79 (0.65)	2.6 (0.21)	47 (0.032)	660 (0.082)	3,300 (0.032)	
C07	2,182	1.5	6.8	0.82 (0.45)	6.3 (0.30)	16 (0.25)		0.65 (0.48)	2.3 (0.11)	12 (0.17)	400 (0.12)	3,200 (0.12)

Tabla 1: Tiempos de Latencia del Receptor Humano P2X4

Tiempos de latencia reportados para el receptor humano P2X4 obtenidos de registros de canal unitario. Se pueden observar las diferentes componentes exponenciales tanto para el estado abierto como el estado cerrado. La firma cinética característica de las aperturas y cierres se encuentra en la escala de milisegundos (Priel A. & Silberberg D. S. 2014).

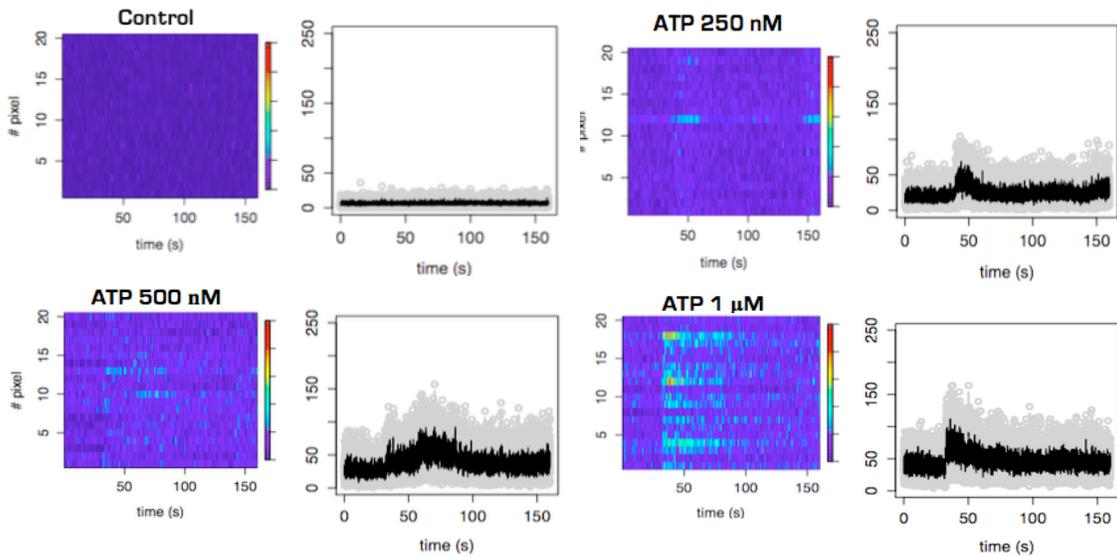
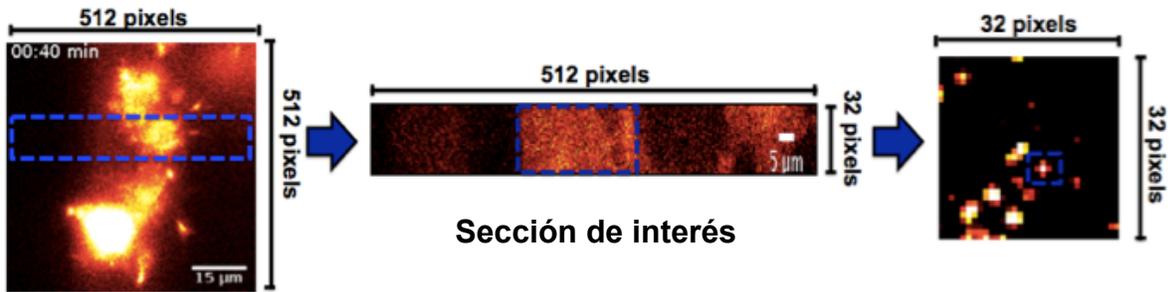


Figura 10: Establecimiento de las condiciones experimentales para evaluación de actividad de canal unitario por fluorescencia.

(Arriba) Registros ópticos obtenidos de células HEK 293 expresando el receptor humano P2X4-RGECO1.2. La región de interés se definió como una imagen de 32x32 píxeles. (Abajo) Series de tiempo documentando los cambios de fluorescencia en los píxeles de la imagen. Se muestra la serie completa y secciones de ella antes y después del estímulo con ATP a distintas concentraciones.

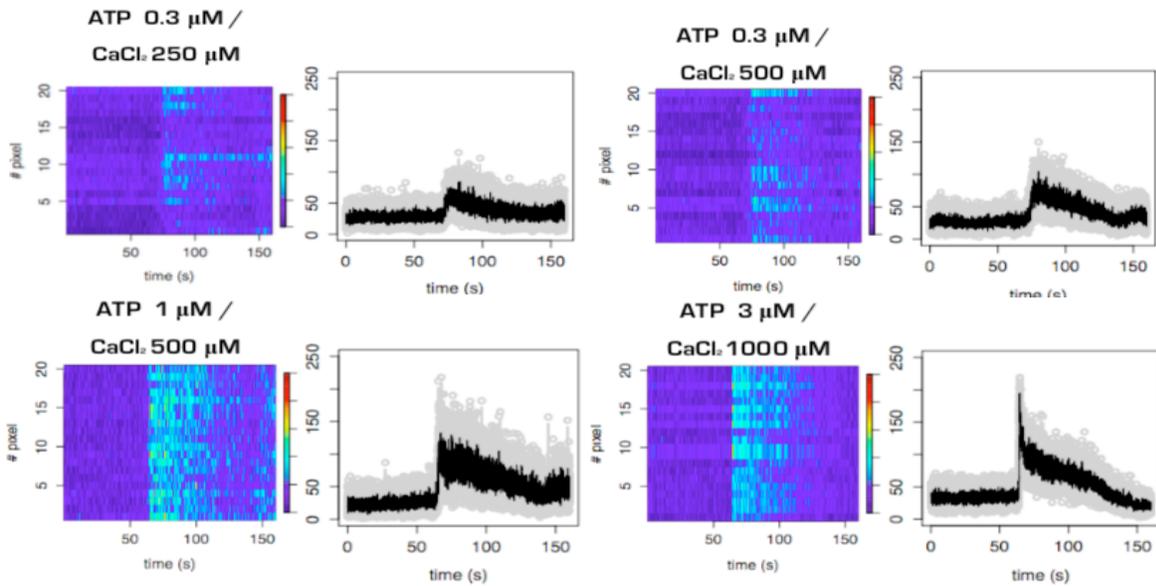


Figura 11: Establecimiento de las condiciones experimentales para evaluación de actividad de canal unitario por fluorescencia.

Series de tiempo documentando los cambios de fluorescencia en los pixeles de la imagen. Se muestra la serie completa y secciones de ella antes y después del estímulo con ATP y Ca^{2+} a distintas concentraciones.

A partir de las condiciones que probamos, pudimos concluir que posiblemente una baja concentración de ATP (250 nM a 3 μ M) en combinación con bajas concentraciones de Ca^{2+} (250 a 500 nM) en el medio provoca una menor activación de receptores P2X4; sin embargo hubo que tomar en cuenta que la contribución de la corriente de Ca^{2+} a la corriente total generada por el receptor es solo del 8%, es por eso que se decidió continuar trabajando a una concentración extracelular fisiológica de Ca^{2+} [2 mM]_f.

Posteriormente como meta principal, establecimos medir la actividad de canal unitario con esta metodología. Para esto también probamos si la utilización del agonista CTP, específico para el P2X4, sería la mejor opción para activar solo un o un pequeño grupo de receptores y determinar si es posible medir actividad de canal unitario. Teóricamente en estas condiciones estaremos evitando la activación de canales metabotrópicos endógenos de esta línea celular, los cuales interferirían con la interpretación de los resultados.

Evaluación de la presencia de actividad de canal unitario en registros de fluorescencia a través de la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario.

La Imagenología de canal unitario (ICU) se basó en la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas previamente descrita.

A lo largo de los años se ha descrito que la apertura de un canal iónico ocurre como consecuencia de un cambio conformacional en respuesta a un estímulo fisiológico tal como un cambio en el potencial, respuesta a un agonista, cambios de temperatura, estrés mecánico ó, en otros casos, la unión de un grupo fosfato.

El estudio de algunas de las propiedades de un canal iónico se puede derivar del estudio de un proceso intrínseco de los mismos denominado “gating”. El gating involucra el proceso por el cual el canal se transforma entre su estado de conducción y no conducción. Este termino deriva de la idea que un canal iónico involucra un poro de conducción el cual se encuentra resguardado por una o varias compuertas que deben estar en la posición de apertura para que los iones puedan fluir a través del canal.

La tasa a la cual ocurre el “gating” o transición entre estados se denomina “cinética de gating” o de transición entre estados. Más aún, la existencia de moléculas que alteran la “cinética de gating”, pueden ser de gran utilidad para el estudio de un canal iónico.

Usualmente el “gating” o las transiciones entre estados suelen ocurrir de manera estocástica lo que influye en el tiempo en el que el canal permanece en estado de conducción ó no conducción. Es importante tomar en cuenta que como resultado de este fenómeno, la temporalidad de eventos de conducción y no conducción se encuentra dentro de una escala de tiempo de entre 1 a 10 ms con cinéticas complejas lo que hace que su estudio sea difícil al enfrentarse con limitaciones experimentales tales como las que se encontraron en la realización de este proyecto.

No obstante, a pesar de dichas limitaciones, la extrapolación de la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas (ARNE) a registros de fluorescencia por microscopía TIRF de la actividad del receptor humano P2X4 nos permitió estudiar propiedades asociadas a la actividad de canal unitario como lo son probabilidades de apertura en las condiciones fisiológicas utilizadas o tiempos de latencia de los diferentes posibles sub-estados de conducción al determinar la fluorescencia asociada a la apertura de uno o un pequeño grupo de canales.

El Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas (ARNE) fue la forma inicial clásica de estimar propiedades unitarias de un canal (Álvarez O. et al. 2014)

Con base en lo anterior, se realizaron registros de fluorescencia tomando en cuenta las limitaciones espaciales como las temporales. Se estableció un protocolo de registro que tomó en cuenta la duración temporal del estado de conducción y de no conducción (1 a 10 ms). La velocidad máxima de registro se fijó en 12 ms tomando en cuenta todas las restricciones de la cámara EM-CCD.

A continuación, se realizaron registros de fluorescencia con la configuración antes mencionada estimulando la actividad del receptor por medio de ATP [$3 \mu\text{M}$]_f o CTP [$50 \mu\text{M}$]_f / [$200 \mu\text{M}$]_f en presencia de una solución fisiológica con una concentración de Ca^{2+} [2mM]_f; adicionalmente, para evaluar la actividad de la IVM y el Cu^{2+} , dichos compuestos se incubaron durante tres minutos a una concentración de [$3 \mu\text{M}$]_f y [$100 \mu\text{M}$]_f respectivamente, previo a comenzar el registro. Se obtuvieron registros cuya la duración total fue de tres minutos veinte segundos dejando el primero minuto como condición basal (sin estímulo), posteriormente se añadió la concentración de ATP ó CTP señalada y veinte segundos antes de finalizado el registro se añadió ionomicina [$10 \mu\text{M}$]_f. En seguida, se procesaron las imágenes para llevar el acabo el estudio de ARNE utilizando un algoritmo programado en R.

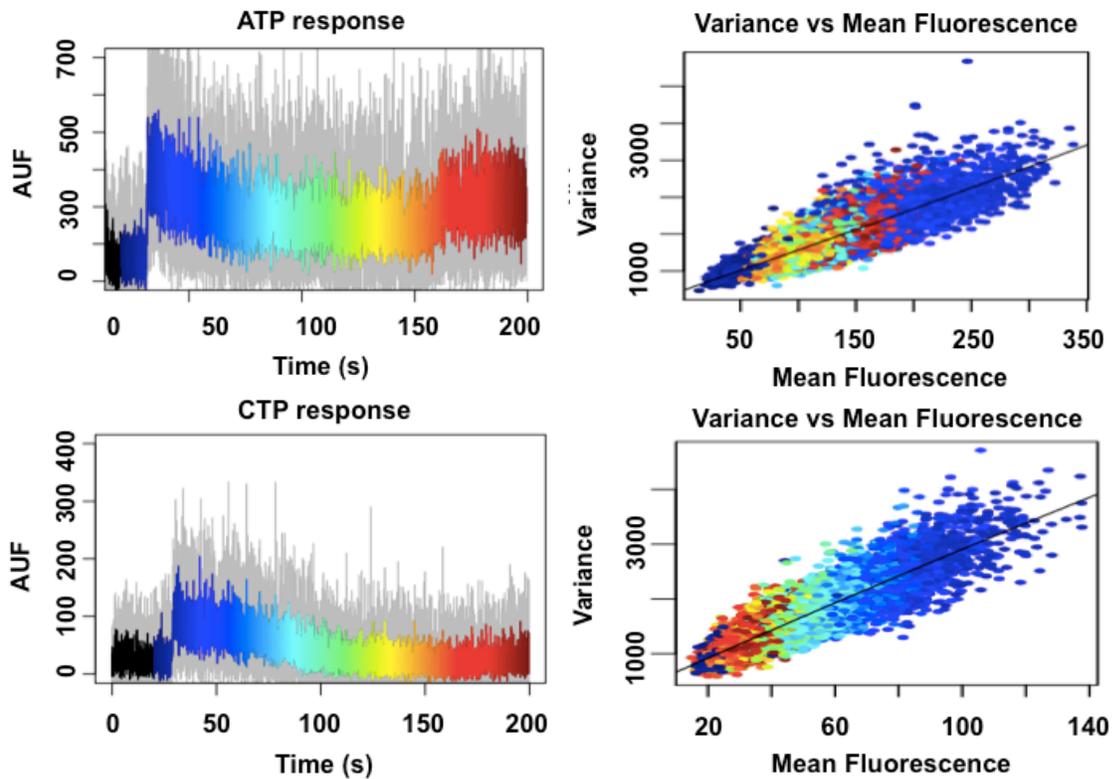


Figura 12: Evaluación de la presencia de actividad de canal unitario en registros de fluorescencia a través de la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario.

(Izquierda) Representación de la señal de fluorescencia macroscópica generada durante la estimulación de células transfectadas con el receptor $P2X_4$ – REGECO1.2 con ATP [$3 \mu\text{M}$]_i. (Derecha) Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas sobre la señal representada en A. La gráfica se generó al calcular la varianza y la fluorescencia media de un intervalo de 100 puntos con un desfase de 1 segundo entre intervalos en la señal macroscópica. Cada punto de color representa cada uno de los intervalos analizados en la gráfica en A. Resultado del análisis se obtuvo un valor de fluorescencia unitaria que durante su digitalización en la imagen se tradujo en niveles digitales en una escala de grises.

Para llevar a cabo el Análisis de Ruido no Estacionario sobre los datos obtenidos se tomó en cuenta la siguiente afirmación: cuando la amplitud de la señal $\langle \hat{I} \rangle$ varía en función del tiempo, por ejemplo como resultado de las variaciones en la concentración de agonista interactuando sobre una población de canales iónicos, esta se puede subdividir en pequeñas secciones donde se calcula la varianza (σ^2) y el valor medio $\langle \hat{I} \rangle$ de la fluorescencia macroscópica.

Con base en lo anterior, se decidió subdividir la señal macroscópica en pequeñas secciones de 100 puntos (intervalos de 1 segundo) la información total de los cambios de la fluorescencia a lo largo del tiempo y calcular la varianza y la fluorescencia media asociada a cada stack de puntos, dejando un desfase de un punto entre grupos de datos.

Posteriormente con los valores de varianza y fluorescencia media se construyó la parábola asociada a la ecuación:

$$\sigma^2 = \bar{I} \langle \hat{I} \rangle - \langle \hat{I} \rangle^2 / N$$

a partir de la cual podemos derivar la fluorescencia \bar{I} asociada a la actividad de uno o un pequeño grupo de receptores al resolver dicha ecuación.

Para lograr dicho objetivo se establecieron las condiciones experimentales para poder lograr permanecer en el rango lineal de actividad de los canales iónicos. En este caso, logramos derivar los valores de \bar{I} al utilizar una concentración baja de agonista con esto mantuvimos la probabilidad de apertura (P_o) baja, con lo cual, el término de la ecuación de varianza contra fluorescencia media ($\langle \hat{I} \rangle^2 / N$) se hace indeterminado y la relación de la varianza, y la corriente media se vuelve lineal y la pendiente al origen proporciona la amplitud de la fluorescencia \bar{I} .

$$\bar{I} \approx \sigma^2 / \langle \hat{I} \rangle$$

A partir de la resolución de la ecuación se obtuvieron los siguientes valores de \bar{t} asociadas a la condiciones con ATP y se realizó un promedio de las mismas. Posteriormente se calculo el mismo valor de \bar{t} para las condiciones restantes y se normalizaron los datos a la respuesta de ATP para realizar el estudio de las propiedades biofísicas asociadas a la actividad de canal unitario: Cálculo de probabilidades de apertura y tiempos de latencia.

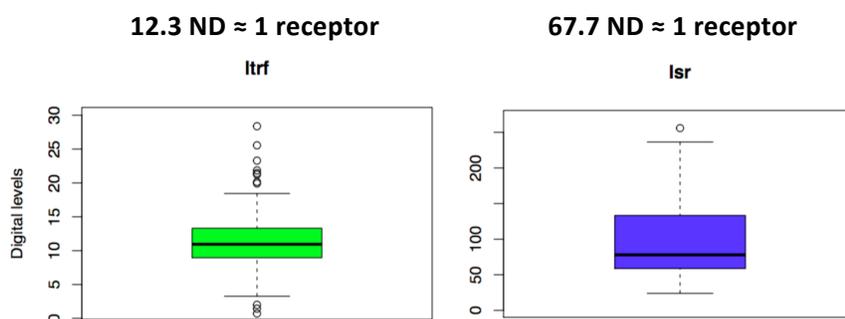


Figura 13: Niveles digitales asociados a la actividad de canal unitario determinada por ARNE.

Determinación de los niveles digitales asociados a la actividad de un o un pequeño grupo de receptores P2X4 mediante la aplicación del Análisis de Ruido No Estacionario a los registros de fluorescencia obtenidos por microscopía TIRF. Se calculó el valor para los datos limitados por difracción y los datos procesados por súper-resolución.

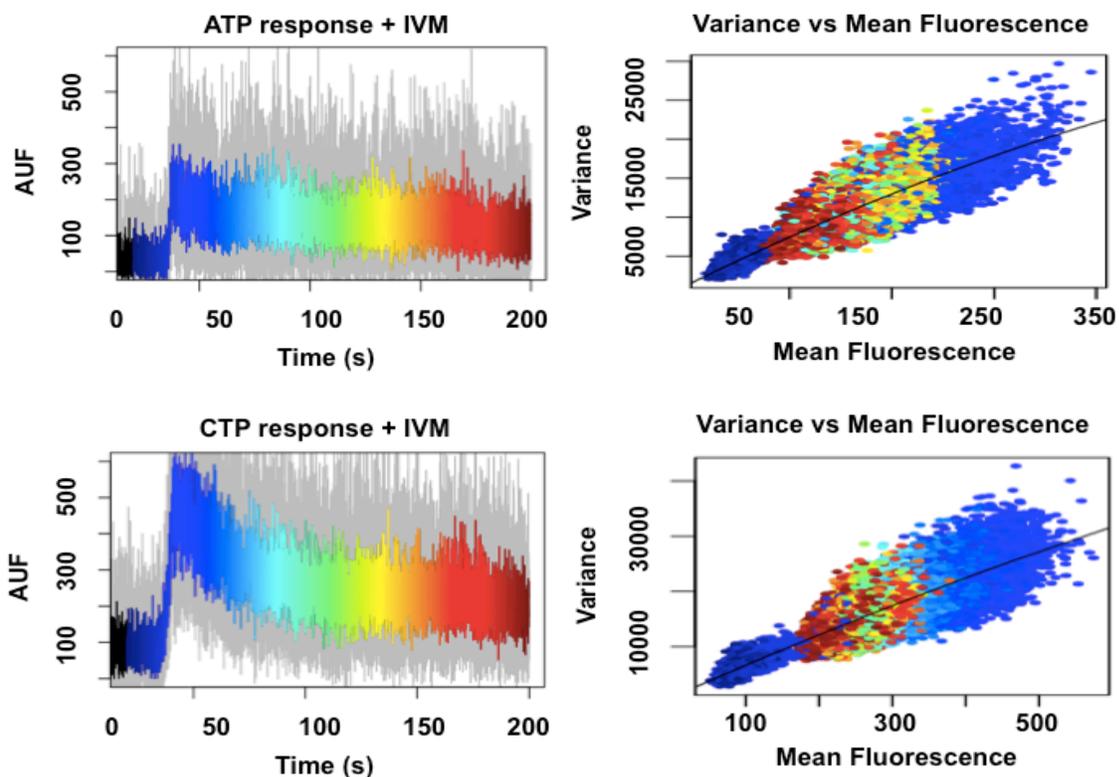


Figura 14: Evaluación de la presencia de actividad de canal unitario en registros de fluorescencia a través de la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario en presencia de IVM.

(Izquierda) Representación de la señal de fluorescencia macroscópica generada durante la estimulación de células transfectadas con el receptor $P2X_4$ – REGECO1.2 con ATP [$3 \mu\text{M}$]_i en presencia de IVM [$3 \mu\text{M}$]_i. (Derecha) Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas sobre la señal representada en A. La gráfica se generó al calcular la varianza y la fluorescencia media de un intervalo de 100 puntos con un desfase de 1 segundo entre intervalos en la señal macroscópica. Cada punto de color representa cada uno de los intervalos analizados en la gráfica en A. Resultado del análisis se obtuvo un valor de fluorescencia unitaria que durante su digitalización en la imagen se tradujo en niveles digitales en una escala de grises.

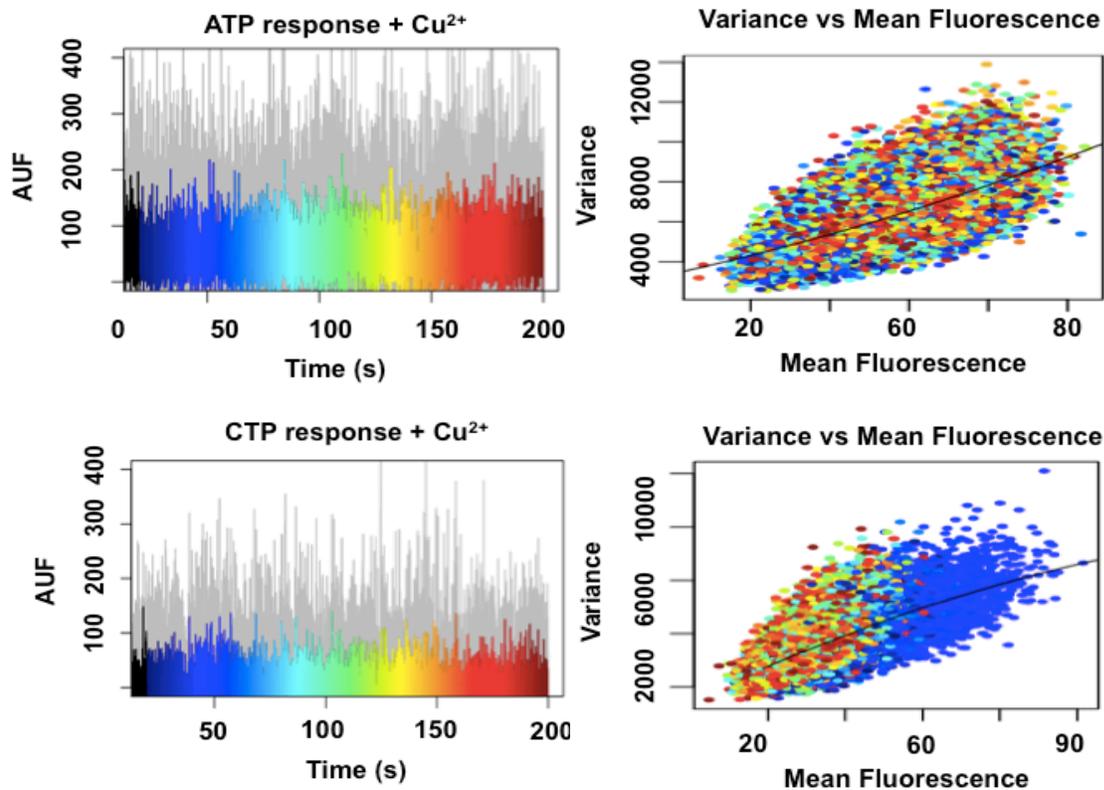


Figura 15: Evaluación de la presencia de actividad de canal unitario en registros de fluorescencia a través de la teoría de Análisis de Ruido No Estacionario en presencia de Cu^{2+} .

(Izquierda) Representación de la señal de fluorescencia macroscópica generada durante la estimulación de células transfectadas con el receptor $\text{P2X}_4\text{h} - \text{REGECO1.2}$ con ATP [$3 \mu\text{M}$]_f en presencia de Cu^{2+} [$100 \mu\text{M}$]_f. (Derecha) Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas sobre la señal representada en A. La gráfica se generó al calcular la varianza y la fluorescencia media asociada a ventanas de tiempo de 1 segundo con un desfase de 10 ms en la señal macroscópica. Cada punto de color representa cada uno de los intervalos analizados en la gráfica en A. Resultado del análisis se obtuvo un valor de fluorescencia unitaria que durante su digitalización en la imagen se tradujo en niveles digitales en una escala de grises.

Idealización y Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas en imágenes de Súper Resolución

La Imagenología de canal unitario se encuentra basada en el estudio tanto temporal como espacial del ruido asociado a la señal que se genera como resultado de la activación de canales y/o receptores, tales como el receptor humano P2X4.

Tal es el caso de esta nueva metodología para el estudio de actividad de canal unitario, la cual utiliza como herramienta de estudio, imágenes digitales generadas a través de microscopios de alta resolución. No obstante, hay que destacar que la microscopía óptica se encuentra limitada a una resolución máxima la cual se encuentra directamente asociada a los fenómenos físicos que sufre la luz, como lo son la interferencia, al viajar por un medio determinado. La máxima resolución estará dada por la longitud de onda utilizada y la apertura numérica asociada al objetivo utilizado.

Cuando la luz viaja a través del microscopio, esta atraviesa la óptica y se convoluciona con la función de dispersión puntual (PSF). La función de dispersión puntual ó PSF se define como el patrón de difracción que se genera como consecuencia de la interferencia de la luz consigo misma, cerca del intermedio del plano focal. Como consecuencia de este fenómeno, la información que se recupera en microscopía, es la suma de la señal generada junto con los fenómenos de interferencia (PSF) que sufrió durante su viaje por la óptica; con una resolución máxima en nuestro caso de 265 nm al utilizar un objetivo con AN = 1.49 y una longitud de onda de 561 nm.

Lo expuesto anteriormente, es de suma importancia al tomar en cuenta las dimensiones moleculares al estudiar canales iónicos y/o receptores.

Estudios recientes han determinado el tamaño molecular de un receptor humano P2X₄, ronda los 7 nm. Si tomamos en cuenta dicho dato, tenemos altas probabilidades de encontrar decenas de canales en un pixel de 265 nm, Más aún la probabilidad de que la señal que se genere durante su apertura contamine pixeles vecinos es alta. Dicho fenómeno nos puede llevar a realizar una sobre estimación de canales debido al ruido de fondo que se genera por señal que no proviene directamente del punto de donde se generó.

.A raíz de dichas complicaciones, se decidió utilizar el método de Súper Resolución de fluctuaciones radiales o SRRF (por sus siglas en ingles) el cual se basa en el cálculo de la derivada de la señal la cual nos dará la magnitud y dirección de los centros de donde proviene la misma.

Dicho procesamiento de imágenes nos ha permitido discretizar la información en pixeles de menor tamaño (26 nm) y determinar el origen de la señal pudiendo así calcular indirectamente a partir de la fluorescencia asociada a la actividad un o un pequeño grupo de canales derivada del estudio de ARNE , el numero de canales, dada un intensidad determinada en los puntos máximos de fluorescencia.

Para aplicar este método se proceso cada serie de imágenes para determinar los máximos de fluorescencia justo en el momento del estímulo con base en las imágenes de Súper Resolución. Tras determinar los máximos, la misma metodología se extrapoló a los datos limitados por difracción y se calcularon las variaciones de la fluorescencia de cada una de las condiciones en cada uno de los casos (limitados y súper resolución).

Posteriormente, se aplicó un algoritmo de idealización para poder realizar los estudios asociados a la probabilidad de apertura y tiempos de latencia. Dicho algoritmo nos permitió determinar las amplitud y duración de las transiciones de esta de conducción y no conducción. Por otra parte se determinó convertir los valores de fluorescencia a valores de corriente unitaria utilizando una relación que determina que la fluorescencia unitaria obtenida por ARNE se encuentra relacionada linealmente a la corriente que se genera por la conductancia ya reportada del receptor (9 pS) y el voltaje de reposo medido para las células HEK 293 (-40mV).

A partir de los datos anteriormente obtenidos pudimos determinar la probabilidad de apertura bajo los diferentes regímenes experimentales y calculamos los tiempos de latencia en el estado abierto y cerrado.

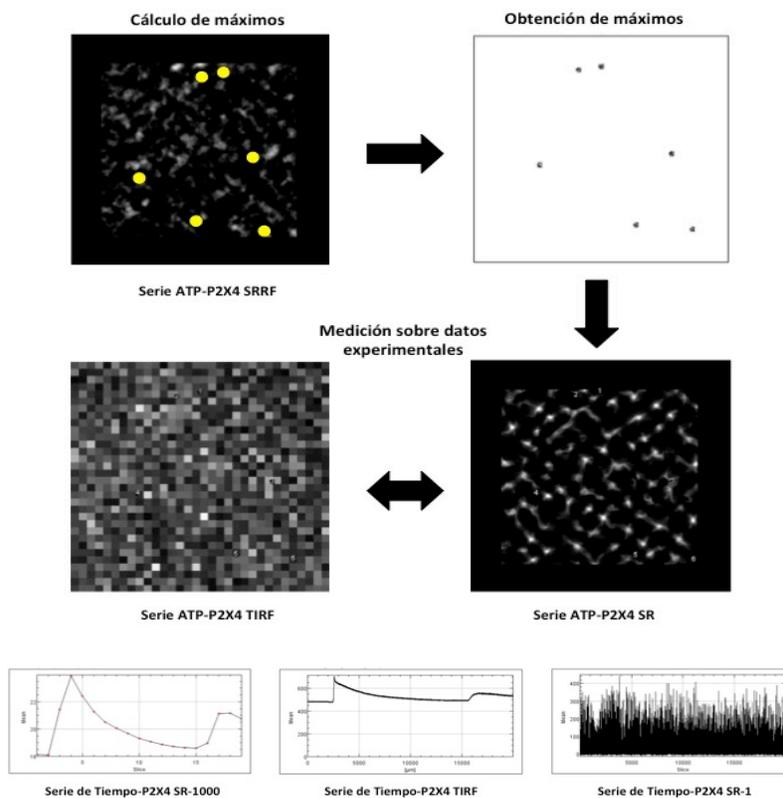


Figura 16: Método de obtención de máximos locales en imágenes de Súper Resolución de Fluctuaciones Radiales o SRRF.

Los datos experimentales fueron procesados por SRRF con el fin de definir mejor los sitios de influjo de Ca^{2+} donde se realizó el Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas.

El estudio de las probabilidades de apertura del receptor humano P2X4

Los registros de canal unitario usualmente son indispensables ya que a partir de ellos se pueden derivar propiedades biofísicas asociadas a procesos moleculares como cambios conformacionales, transiciones entre estados y duración del fenómeno de conducción.

Como se mencionó anteriormente, las transiciones entre estados son un evento importante que determinará la conducción o no conducción de un ion específico y su respuesta fisiológica asociada. En términos generales las transiciones entre estados dependen de algún estímulo fisiológico que las dispare, no obstante, la magnitud o fuerza que derive en la transición determinará la probabilidad de que ésta ocurra. Es por eso que, el estudio de las transiciones entre estados pueden ser descritas a través de probabilidad estadística.

Los canales iónicos pueden sufrir transiciones entre múltiples estados y sub estados de conducción una vez estimulados. En el caso ideal, un canal iónico podría describirse solamente a través de dos estados; fluctuando entre el estado de conducción y no conducción, cada uno adquiriendo un valor discreto.

La dinámica de trayectoria del canal se puede describir por una variable que cambia en función del tiempo y que adquiere diferentes valores. Por otro lado, si imaginamos el tiempo discretos en segmentos de tiempo definidos, la trayectoria se ajustará a esta serie de valores que dependerán de si el canal está saliendo o entrando de un estado a otro a lo largo del tiempo.

Podemos determinar la probabilidad de apertura de un canal al definir los valores que corresponderán a un estado de conducción y no conducción. A partir de dicha definición, es posible encontrar que fracción de tiempo un canal permanece en un estado y después usar esa información para determinar la probabilidad de apertura al construir un histograma en donde dividimos el tiempo total en pequeños intervalos de longitud Δt y después preguntar por el valor de fluorescencia durante cada intervalo. Si integramos el histograma sobre todos los puntos que corresponden a un estado de interés obtendremos el tiempo total de estadía en ese estado.

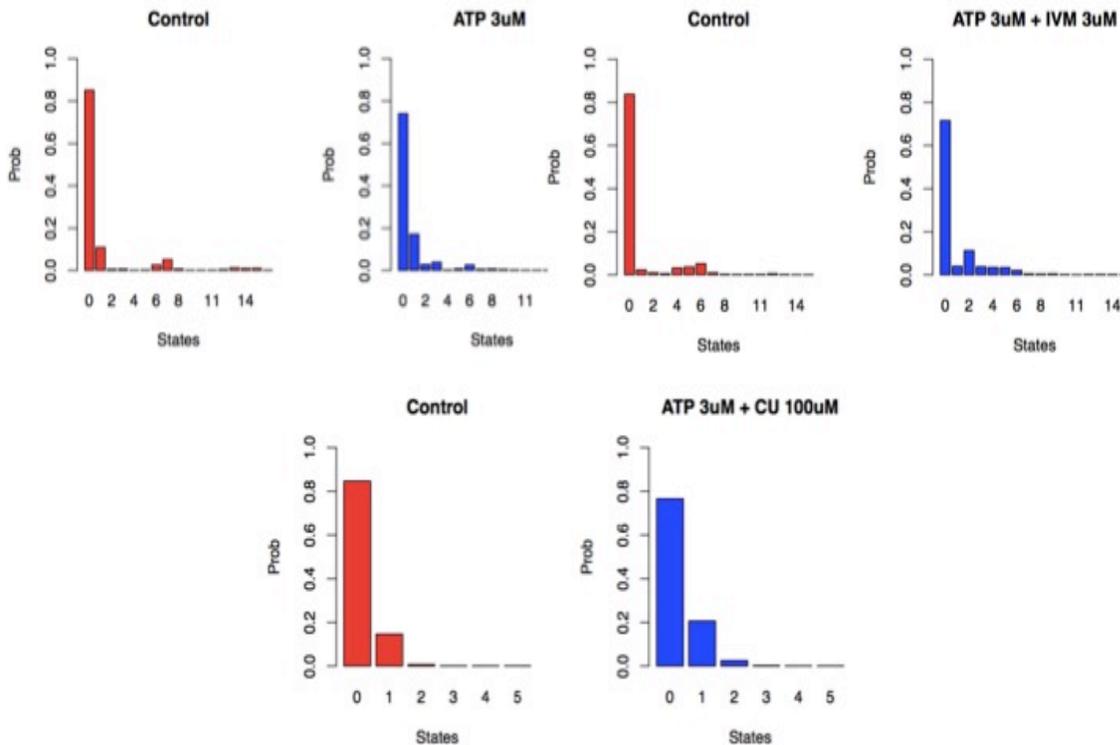


Figura 17: Probabilidad de apertura del receptor humano P2X4 en presencia de ATP 3 μ M.

Determinación de las probabilidades de apertura del receptor P2X4_h en presencia de ATP y en combinación con IVM y Cu²⁺. Las probabilidades se determinaron a partir de los datos de “Súper Resolución” y en las condiciones utilizadas para realizar los registros ópticos de actividad unitaria.

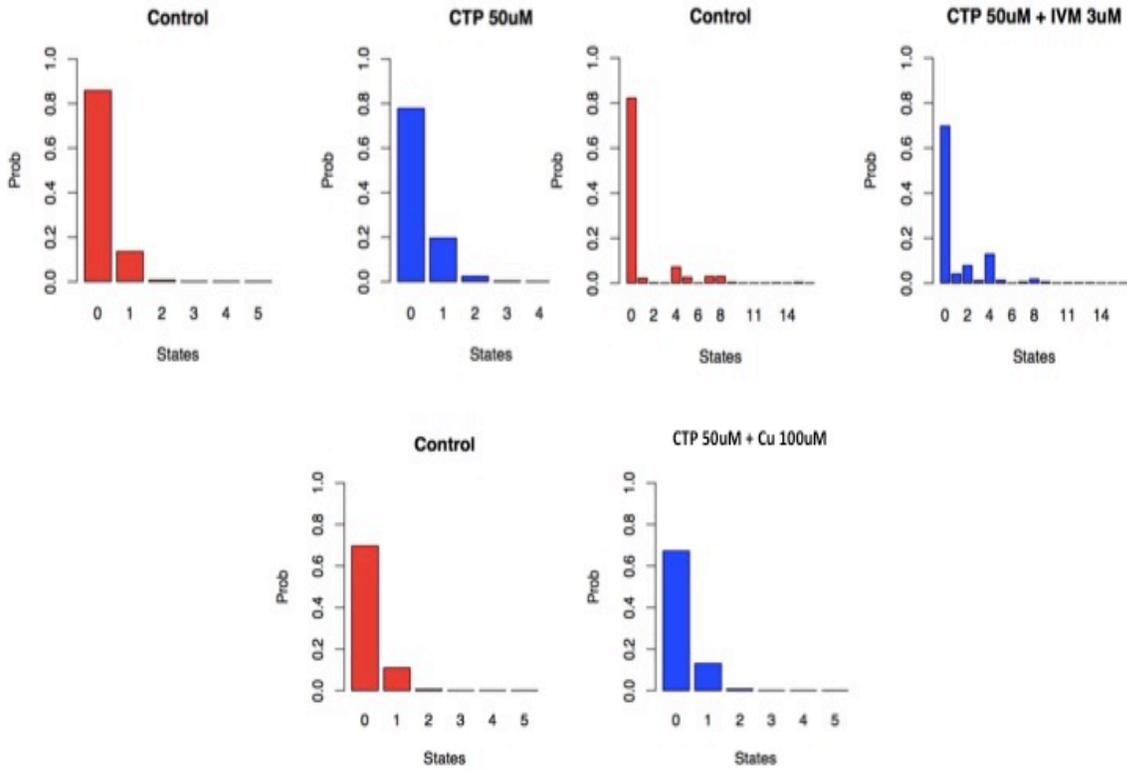


Figura 18: Probabilidades de apertura del receptor humano P2X4 en presencia de CTP 50 μ M.

Determinación de las probabilidades de apertura del receptor P2X4_h en presencia de CTP y en combinación con IVM y Cu²⁺. Las probabilidades se determinaron a partir de los datos de “Súper Resolución” y en las condiciones utilizadas para realizar los registros ópticos de actividad unitaria.

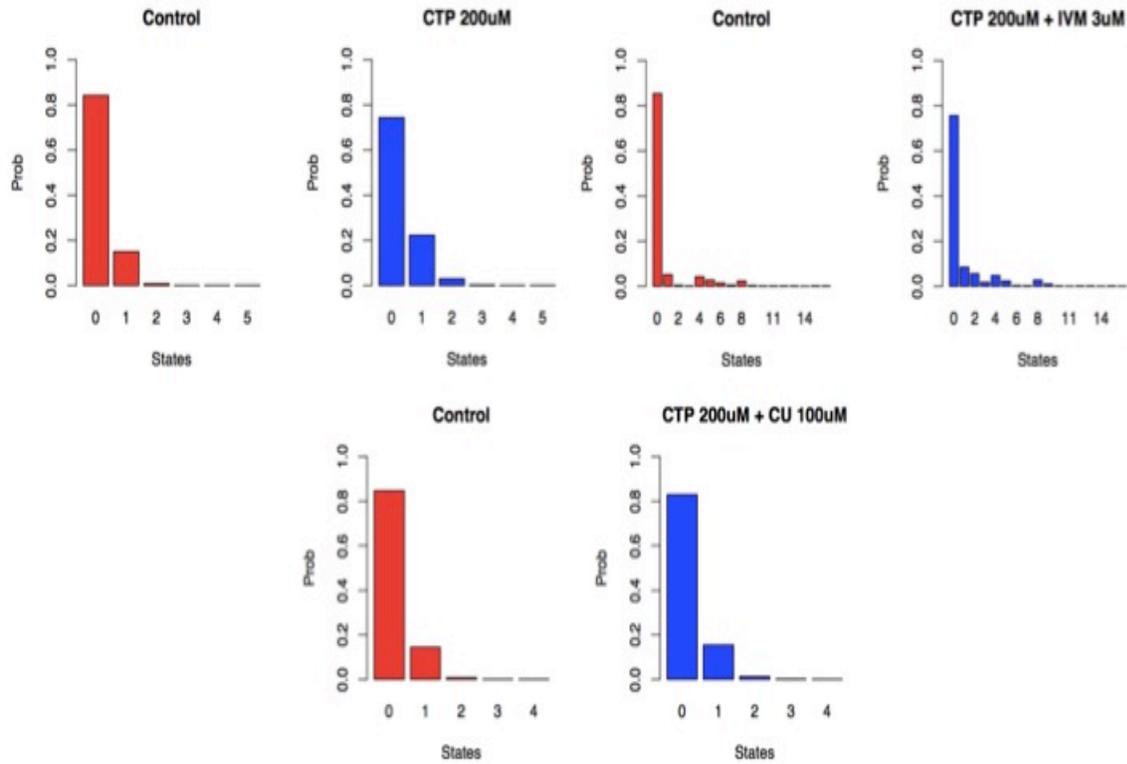


Figura 19: Probabilidades de apertura del receptor humano P2X4 en presencia de CTP 200 μM .

Determinación de las probabilidades de apertura del receptor P2X_{4h} en presencia de CTP y en combinación con IVM y Cu²⁺. Las probabilidades se determinaron a partir de los datos de “Súper Resolución” y en las condiciones utilizadas para realizar los registros ópticos de actividad unitaria.

El cálculo de las probabilidades de apertura se hizo en base al resultado sobre corriente (fluorescencia) de evento unitario obtenido del Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas sobre los datos idealizados.

Es claro y observable que el receptor humano P2X4 cuenta con una actividad basal per se. No obstante, la probabilidad de encontrar al canal activo es baja, siendo mayor a 80% la probabilidad de no encontrar canales activos. Por otra parte, la estimulación tiene como resultado la activación de un mayor número de canales. Hay que destacar que la actividad inducida por ATP es mayor en comparación que con CTP, lo que estaría directamente relacionado a la potencia que tiene cada uno de los agonistas para activar al receptor; es cierto que el CTP es un agonista específico del P2X4, sin embargo, es bien sabido que la potencia con la que activa al mismo es 100 veces menor.

Cabe destacar que la IVM y el Cu^{2+} se utilizaron como controles de activación específica. No obstante, la IVM tuvo como principal objetivo alterar las probabilidades de transiciones entre estados y aumentar el número de canales abiertos. Esto es debido a que, como se mencionó anteriormente, la IVM potencializa las corrientes inducidas por ATP y/o CTP y además, aumenta la sensibilidad del receptor por ambos agonistas.

Los resultados parecen ser contundentes al observar que la IVM tuvo un efecto sinérgico sobre la actividad del receptor al estimularlo con ATP y/o CTP. Aún en las condiciones utilizadas, la IVM tuvo un claro efecto en el aumento de canales abierto siendo mayor en ambos casos.

Finalmente el ión Cu^{2+} logro abatir cualquier respuesta inducida por ATP y/o CTP, permitiendo corroborar la activación y el registro específico del receptor humano P2X4.

El cálculo de tiempos de latencia del receptor humano P2X4

En términos de función, un canal/receptor puede ser caracterizado y/o descrito a través de la amplitud y duración de los diferentes niveles que adquiere su corriente estacionaria. Un análisis más detallado y preciso sobre la actividad del canal se puede derivar del estudio estadístico de las amplitudes y duraciones de su transiciones entre el estado de conducción y no conducción (p.e. Tiempo de latencia: En el caso de los canales iónicos se define como el intervalo de tiempo que permanece en un estado (conducción) antes de pasar a uno nuevo (no conducción)).

Una visión general del comportamiento y función del canal se pueden deducir conociendo los tiempos de latencia en el estado de conducción y no conducción. El estudio de los tiempos de latencia nos otorga una visión de la firma cinética del mecanismo de apertura/cierre y provee pistas de cómo es que funciona el mismo. La distribución de frecuencias de tiempos de latencia se puede describir como la suma de funciones exponenciales de decaimiento del tiempo.

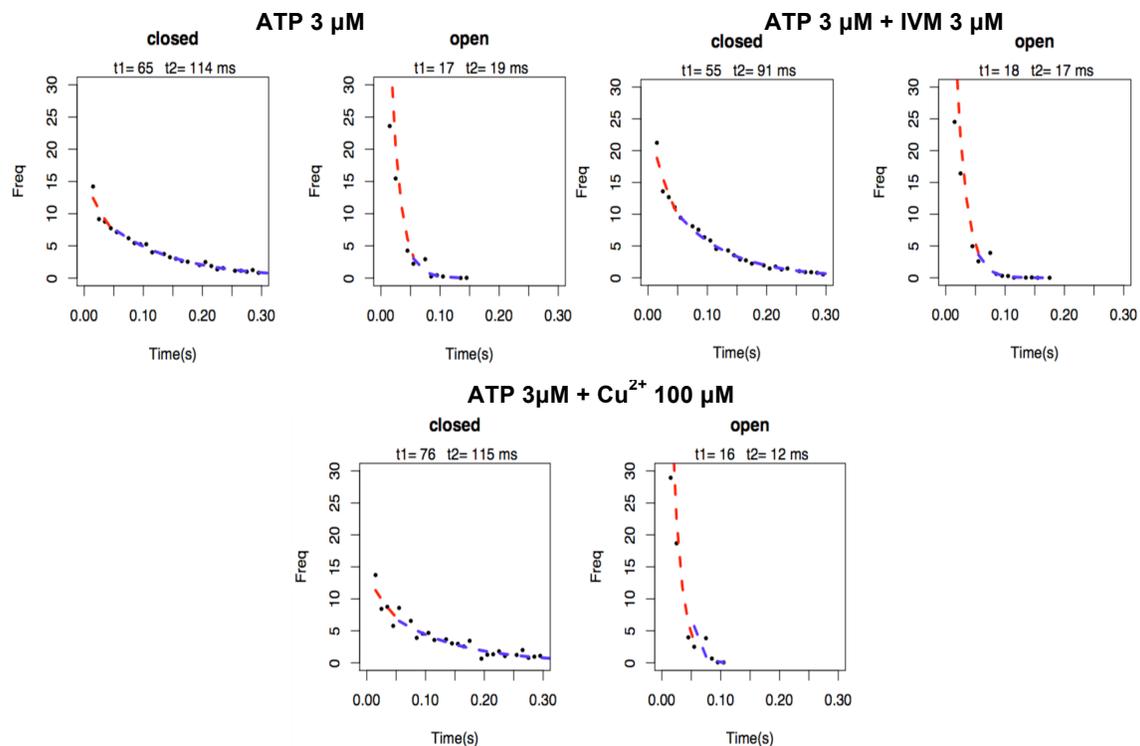


Figura 20: Cálculo de tiempos de latencia en el estado abierto y cerrado del receptor humano P2X4 en presencia de ATP 3 μ M.

Determinación de los tiempos de latencia del receptor P2X4_h en presencia de ATP y en combinación con IVM y Cu²⁺. Los tiempos fueron determinados al ajustar un sistema de 2 exponenciales capaces de describir la cinética de apertura y cierre. Dichos datos fueron obtenidos sobre los datos de súper resolución idealizados.

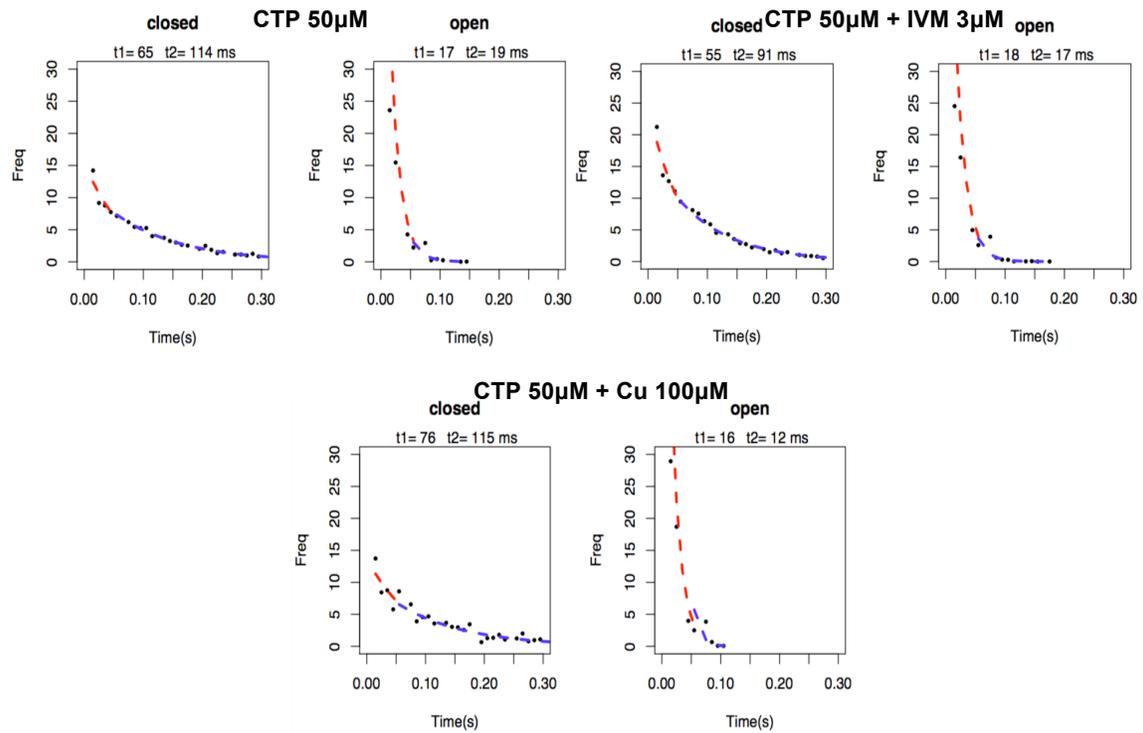


Figura 21: Cálculo de tiempos de latencia en el estado abierto y cerrado del receptor humano P2X4 en presencia de CTP 50 μ M.

Determinación de los tiempos de latencia del receptor P2X4_h en presencia de CTP y en combinación con IVM y Cu²⁺. Los tiempos fueron determinados al ajustar un sistema de 2 exponenciales capaces de describir la cinética de apertura y cierre. Dichos datos fueron obtenidos sobre los datos de súper resolución idealizados.

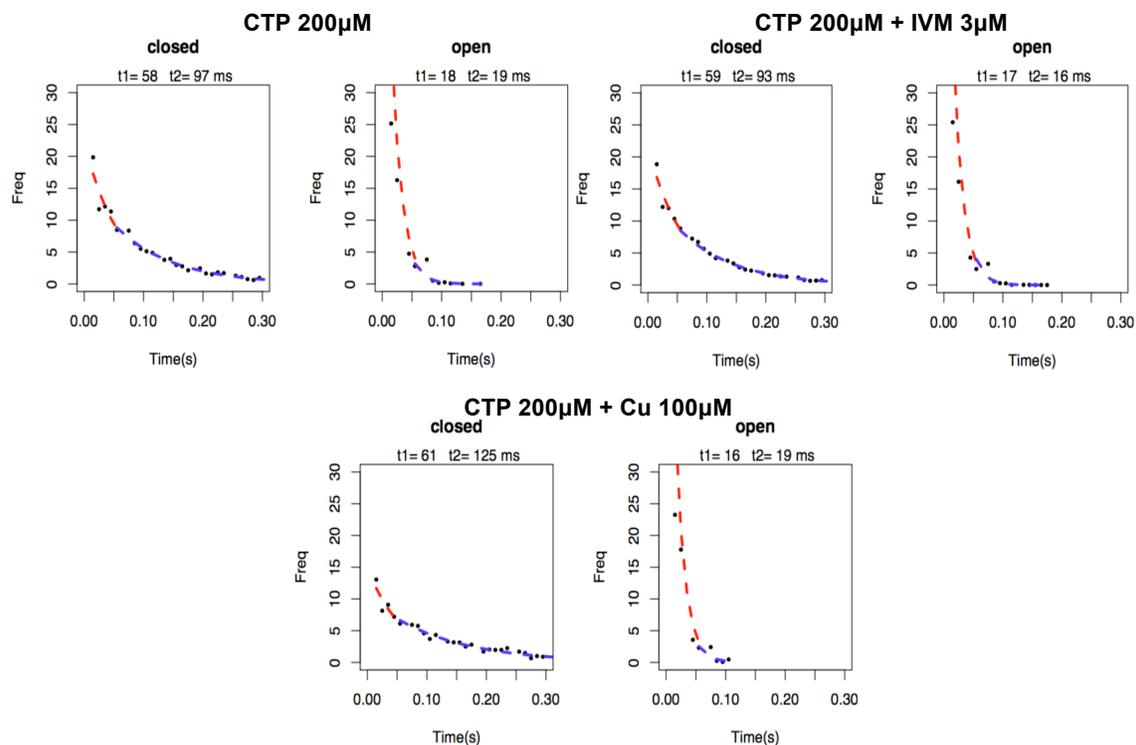


Figura 22: Cálculo de tiempos de latencia en el estado abierto y cerrado del receptor humano P2X4 en presencia de CTP 200 µM.

Determinación de los tiempos de latencia del receptor P2X4_h en presencia de CTP y en combinación con IVM y Cu²⁺. Los tiempos se fueron determinados al ajustar un sistema de 2 exponenciales capaces de describir la cinética de apertura y cierre. Dichos datos fueron obtenidos sobre los datos de súper resolución idealizados.

Los tiempos de latencia observables se encuentran descritos para el estado basal y post-estimulación. En este caso se realizó un ajuste de dos exponenciales que revelan la existencia de una distribución binomial de posibles estados por los que transita el receptor. Cabe señalar que el ajuste revela que dicha distribución se encuentra compuesta por tiempos rápidos (exponencial roja) y tiempos un poco más lentos (exponencial azul). No obstante, es de destacar que la pendiente tan pronunciada en el decaimiento de los tiempos rápidos quizá se debe a las limitaciones que se presentaron durante el tiempo de adquisición y posiblemente existan tiempos de duración mas cortos no puedan resolverse. Por otra parte, es visible que existe una distribución de tiempos lentos que tiene en promedio una duración de 14 ms.

Notablemente, la incubación con IVM logró aumentar el tiempo de latencia en el estado abierto con una constante de tiempo de 17 ms, confirmando su capacidad de mantener por más tiempo el canal abierto. La incubación con Cu^{2+} como era de esperarse aumenta la frecuencia de los eventos en el estado cerrado y parece no tener ningún efecto sobre la actividad basal del receptor, siendo comparables las constantes del estado abierto en presencia de ATP ($\tau = 14\text{ms}$) y en combinación con Cu^{2+} ($\tau = 15\text{ms}$).

A diferencia de la estimulación con ATP, el agonista CTP en ambas concentraciones logró tener un efecto mucho más marcado sobre el aumento en el tiempo de latencia en el estado abierto, pudiendo revelar la especificidad de activación del receptor humano P2X4. Por otra parte, la IVM de igual manera aumentó el tiempo de latencia en el estado abierto, aumentando la frecuencia del número de eventos en dicho estado y disminuyéndolos en el estado cerrado. Por último el Cu^{2+} en combinación con CTP tuvieron un efecto sobre la reducción de la frecuencia de eventos del estado abierto y aumentó el tiempo de latencia en el estado cerrado.

DISCUSIÓN

Los canales iónicos representan la segunda clase de proteínas blanco del desarrollo de fármacos debido a su contribución en mantener la integridad celular (Mckee M. 1997). La gran diversidad de canales existentes y su participación en múltiples fisiopatologías ha promovido la implementación de nuevos enfoques para su estudio ya que algunas técnicas no son siempre aplicables a ciertos modelos celulares. En el caso del espermatozoide, al ser una célula morfológicamente compleja y pequeña, la implementación de técnicas canónicas como sondas fluorescentes, reconstitución en bicapas lipídicas, tecnología de DNA recombinante, inmunocitoquímica, farmacología y en mayor grado el patch-clamp no ha permitido la caracterización total de las entidades moleculares de interés para el campo de su fisiología. No obstante, a través de dichas aproximaciones se ha logrado demostrar la presencia de varios canales iónicos (Darszon et al. 2011).

Si bien, a pesar de las limitaciones antes mencionadas para algunos casos como el espermatozoide, hoy en día se ha intentado implementar una nueva técnica para el estudio de esta familia de proteínas. Esta estrategia se basa en técnicas ópticas de fluorescencia, combinándolas con análisis de ruido y fluctuaciones, que nos permiten alcanzar la resolución tanto espacial como temporal necesarias para caracterizar canales con características de baja conductancia, como los SOCs, o de presencia en muy bajas concentraciones o lugares inaccesibles a la electrofisiología clásica.

En este proyecto, se propuso el enfoque de utilizar una identidad molecular como el receptor purinérgico humano P2X4, cuyas propiedades electrofisiológicas ya se conocen, como modelo para implementar la técnica denominada: Imagenología de Canal Unitario.. Una vez logrado lo anterior, estaríamos en posición de estudiar los canales iónicos del espermatozoide involucrados en la reacción acrosomal, y los presentes en organelos internos, que no se conocen a detalle.

Entre las ventajas que nos otorga la utilización del receptor humano P2X4, como primera aproximación para establecer la técnica de Imagenología de Canal Unitario está que se ha caracterizado funcionalmente en sistemas de expresión heteróloga tales como células HEK 293 u ovocitos de *Xenopus laevis*. En dichos sistemas, las subunidades clonadas del P2X4 forman receptores homoméricos funcionales con propiedades farmacológicas y cinéticas únicas distintas a los demás receptores P2X (García-Guzmán M. et al. 1996). Su habilidad de expresarse en la membrana y además su propiedad de funcionar como un canal activado por ligando, ha hecho de las mismas, cualidades robustas que lo hacen un buen modelo de canal iónico que se ha caracterizado ampliamente por métodos convencionales electrofisiológicos, bioquímicos y ahora ópticos (Xu J. et al. 2014).

Como se mencionó anteriormente las células HEK 293 suelen ser un excelente vehículo para la expresión de proteínas recombinantes (canales y/o receptores en este caso) ya que presentan una eficiencia muy alta de transfección y producción de proteína. Por otro lado, también es sabido que las células HEK 293 carecen de corrientes endógenas de Ca^{2+} proveyendo de una plataforma robusta y confiable para la expresión de canales y/o receptores permeables a dicho ion con una alta fidelidad (Gandini A. M; et al. 2014).

Además de todas estas virtudes, cabe destacar que se utilizó una construcción del receptor humano P2X4 acoplada a un sensor genéticamente codificado en su región amino-terminal (por subunidad); denominado: RGECO1.2 el cual nos permitió restringir el área de estudio al poro de conducción.

El primer objetivo fue establecer la expresión funcional del receptor en nuestro sistema (células HEK 293) validando su actividad al estimular células transfectadas con ATP 3 μM en presencia de una solución de PBS suplementada con 2 mM de Ca^{2+} . Como era de esperarse, a partir de la estimulación del cultivo celular visualizado por TIRF en la **Figura 2**; logramos registrar la entrada de Ca^{2+} en respuesta a la adición de ATP a través de los sensores RGEEO 1.2 acoplados al receptor. La respuesta de fluorescencia obtenida mimetiza a las corrientes macroscópicas generadas al utilizar protocolos de electrofisiología reproduciendo el efecto de una corriente entrante de desensibilización lenta (North A. R. 2002).

A nivel de canal unitario, el receptor P2X4 presenta cinéticas bastante rápidas las cuales se encuentran compuestas por 3 diferentes constantes de apertura ó más (Priel A. & Silberberg D. S. 2014). Como consecuencia de dicha característica biofísica empleamos numerosas aproximaciones para lograr establecer las condiciones ideales de registro actividad de canal unitario del receptor humano P2X4.

Se logró el establecimiento de un protocolo de adquisición que nos permite captar los eventos con tiempos lentos, teniendo como limitación la velocidad máxima de adquisición (12 ms) al realizar ciertas modificaciones en el modo de adquisición del detector; esto fue, capturar solamente una región de 512 x 32 pixeles.

Hay que destacar que a pesar de que exploramos múltiples condiciones en donde los puntos de inflexión fueron los cambios en la concentración tanto de ATP como de Ca^{2+} , Khakh S. B. y colaboradores en 2001 reportaron que a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} la contribución de dicho ión a la corriente total es de solo 8%, por lo cual decidimos conservar una concentración fisiológica de 2 mM y continuar los registros con una concentración de ATP 3 μM . No obstante el resultado de la exploración para el establecimiento de las condiciones ideales para el registro de canal unitario, pudimos constatar que el receptor se estimula aún a concentraciones nanomolares de ATP y Ca^{2+} .

El trabajo se continuó realizando registros en concentraciones de Ca^{2+} fisiológico y bajo los regímenes del protocolo para registro de actividad de canal unitario.. Los datos obtenidos fueron analizados con base en la teoría de “Análisis de Ruido No Estacionario de Corrientes Macroscópicas” descrita anteriormente. El resultado obtenido a través de dicho enfoque nos permitió determinar la intensidad de fluorescencia asociada a la apertura de uno o un pequeño grupo de canales .

El enfoque experimental que se tomó para poder realizar los registros asociados a canal unitario fue el siguiente: utilizar tanto ATP (3 μM) como CTP (50 μM y 200 μM) para lograr la estimulación de la actividad del receptor. Aun siendo el ATP es el agonista más potente, se ha reportado que las células HEK 293, no suelen ser el tipo celular más adecuado para el estudio de movilización de Ca^{2+} a través de receptores P2X ya que presentan expresión endógena de receptores purinérgicos de la familia P2Y, los cuales pudieran co-activarse eficientemente por ATP (Thomas P. & Smart T. 2014).

Considerando lo anterior se realizaron registros de cultivos transfectados por 48 horas, utilizando el protocolo de adquisición previamente descrito. Se estimuló la actividad del receptor por medio de ambos agonistas (por separado) para posteriormente aplicar el análisis antes mencionado. El resultado del estudio a nivel de respuesta macroscópica nos permitió concluir que fuimos capaces de reproducir los resultados previamente reportados. El ATP (3 μM) fue capaz de generar respuestas de mayor magnitud en comparación a el CTP (50 μM y 200 μM) reiterando su eficacia para activar receptores purinérgicos. (Thomas P. & Smart T. 2014).

Sumado al ensayo funcional del receptor humano P2X4, también se realizó un ensayo sobre el efecto de la IVM como del Cu^{2+} . Los resultados obtenidos reflejan nuevamente que la IVM es capaz de potencializar la respuesta de ambos agonistas incrementando la magnitud de la entrada de Ca^{2+} , posiblemente manteniendo al receptor abierto más tiempo y disminuyendo su tasa de desensibilización (Priel A. & Silberberg D. S. 2014). Por su parte, el Cu^{2+} , también utilizado como control para verificar que la respuesta que observamos provenía de la activación de nuestro receptor, logró inhibir por completo la respuesta. Posterior a la comprobación de la eficiencia de nuestro sistema experimental y la obtención de resultados reproducibles, nos enfocamos en llevar a cabo el estudio de ARNE para dilucidar si era posible determinar actividad de canal unitario por fluorescencia.

A partir del estudio de ARNE sobre las respuestas fluorescentes generales obtenidas y manteniendo las condiciones ideales de poca probabilidad de apertura con las condiciones experimentales antes asociadas, se logró derivar la intensidad de fluorescencia asociada a la apertura de uno o un pequeño grupo de canales al resolver la ecuación de varianza contra intensidad media.. Este dato nos permitió relacionar los cambios de fluorescencia asociados a la cantidad de canales que pudieran abrirse en respuesta a nuestros estímulos, y por otro lado, el estudio de la respuesta en presencia de IVM y Cu^{2+} también logró revelar el efecto de los mismos a nivel unitario. A partir de los resultados obtenidos se decidió realizar dos estudios más basados en el cálculo de probabilidades (en función de la concentración de agonista) y tiempos de latencia en el estado abierto y cerrado.

Cabe destacar que para los estudios de cálculo de probabilidades y tiempos de latencia el uso de la IVM también fue una estrategia para poder revelar si nuestro sistema experimental podría registrar las constantes de tiempo de mayor duración que surgen mediante su co-incubación con ATP y/o CTP. Estas tienen tiempos de vida media de $\tau_4 = 92 \text{ ms}$ y $\tau_5 = 404 \text{ ms}$ ($n=3$). Es importante recalcar que el sistema actual tiene limitaciones en la velocidad de adquisición que pudieran no permitirnos revelar las cinéticas asociadas a los eventos rápidos.

En primer lugar, el estudio de probabilidades de apertura reveló que a pesar de no encontrarnos las condiciones ideales donde esperaríamos provocar un cambio grande en la probabilidad de apertura del canal logramos estimular su actividad en respuesta a ATP ó CTP visualizando el cambio en la distribución de probabilidades. Al estudiar los cambios en las distribuciones se puede observar el aumento de la probabilidad de activación de un número de canales determinado y la disminución de la probabilidad del estado cerrado de 80% a niveles mas bajos. Es de destacar que la simple estimulación con ATP [3 μ M]_f provoca en mayor grado la apertura del canal debido a que es un activador mas potente. La activación, llega a ser de hasta seis canales, comparando con CTP que solo se abren entre uno y dos canales. Por otro lado, la incubación con IVM incrementa en mayor grado el número de canales abiertos en ambas condiciones reflejando el aumento en el tiempo total que pasan más canales en el estado abierto. Para finalizar, la incubación con Cu²⁺ nos permitió corroborar el bloqueo que induce sobre la actividad del receptor humano P2X₄, ya que no observamos ningún cambio en la probabilidad de apertura en ausencia o presencia de ATP y/o CTP en células pre-incubadas con Cu²⁺.

El estudio para determinar propiedades biofísicas a partir de la Imagenología de Canal Unitario se concluyó realizando un análisis para calcular tiempos de latencia en el estado de conducción y no conducción del receptor en respuesta a ATP ó CTP y en presencia de IVM ó Cu²⁺.

Resultado de este estudio pudimos concluir y corroborar que el receptor humano P2X₄ cuenta con un nivel de actividad basal pequeño pero notable, siendo predominantemente el estado de no conducción en donde se distribuye la mayoría del tiempo el estado del receptor (exponencial azul – control). También es destacable que la incubación con ATP y/o CTP tiene como efecto, en comparación con el control, el aumento de la actividad del mismo al encontrar una distribución mucho más amplia hacia los tiempos lentos (mayor duración) con un promedio de 16 ms. Por otra parte, es de recalcar que, aunque no hubieron muchas diferencias, la IVM logró aumentar la distribución del tiempo de latencia en el estado abierto. Sin embargo, quizá la resolución temporal de nuestro sensor no fue lo suficientemente rápida para reflejar fielmente los cambios en los tiempos de apertura; aún así, el efecto fue contundente a nivel de probabilidades de apertura en el estudio previo.

Para finalizar, la participación del ión Cu^{2+} en el bloqueo de la actividad del receptor es indiscutible. La pre-incubación tiene como efecto abatir cualquier actividad inducida por la estimulación por ambos agonistas y corrobora la especificidad de activación del receptor humano P2X4. La duración del estado cerrado es mayor en condiciones sin estimular, y aún estimulando al sistema éste no provoca una diferencia significativa en los tiempos de latencia, del estado cerrado y los tiempos en el estado abierto son escasos.

El análisis de los resultados obtenidos en cuanto a medición de tiempos de latencia nos han permitido concluir dos importantes aspectos de la metodología que hemos propuesto como primera aproximación para realizar registros de canal unitario por fluorescencia. .

Por una parte como podemos observar, la resolución temporal con la cual contamos (12 ms) debida al detector no es lo suficientemente rápida para poder resolver los eventos de apertura y cierre rápidos del receptor en presencia solamente de ATP. Aún y con esta limitante logramos registrar los eventos de mayor duración en presencia de ATP y/o CTP, los cuales en promedio duran 16.5 ms, pero cuya frecuencia decae rápidamente. A partir de dicho razonamiento es que propusimos el uso de la IVM como herramienta potencial para alargar los tiempo de apertura del receptor y probar si nos era posible resolver las constantes de tiempo que surgen cuando se utiliza este compuesto en combinación ya sea de ATP o CTP. El resultado obtenido en presencia de IVM, aun cuando refleja un pequeño aumento en las constantes de tiempo del estado abierto, el cambio observado no es un cambio estadísticamente significativo, comparado con el tiempo obtenido solamente en presencia de ATP y/o CTP. Adicionalmente es importante mencionar otro punto que limita nuestra metodología, que está relacionado con las propiedades del sensor utilizado: RGECO 1.2.

La correspondiente K_{off} reportada para dicho sensor es de 0.752 s^{-1} . Dicho valor resulta ser crítico al tratar de relacionar los cambios de fluorescencia observados por el influjo de Ca^{2+} asociados a la actividad del receptor. Como podemos darnos cuenta, la resolución temporal de nuestro sensor se encuentra lejos de ser la ideal para reportar la actividad unitaria del receptor. A pesar de las limitaciones que confrontamos, pudimos caracterizar tiempos de latencia y determinar diferencias con ambos tratamientos y aunque los datos no reproducen aquellos obtenidos con electrofisiología. Posiblemente los pequeños cambios que observamos reflejen la cinética con la que el sensor detecta los influjos de Ca^{2+} .

Como resultado, parte de las futuras perspectivas que se plantean es la realización de pruebas con sondas fluorescentes con constantes de afinidad menores que nos permitan correlacionar los cambios en la fluorescencia debido a la entrada de Ca^{2+} directamente con la actividad del canal. Esto se logra con base en la teoría de que los sensores fluorescentes que se utilizarán solo serán capaces de detectar los cambios debido a un aumento muy grande en la concentración de Ca^{2+} lo cual solo se logra cerca del poro de conducción.

CONCLUSIONES

- Se logró establecer la expresión funcional del receptor humano P2X4 en células HEK 293 mediante ensayos funcionales de respuesta a ATP.
- Se evaluó y corroboró el efecto de la IVM y el Cu^{2+} sobre la actividad del receptor humano P2X4.
- Se exploraron y aproximaron las condiciones experimentales para lograr el registro de canal unitario por fluorescencia del receptor humano P2X4.
- Mediante la metodología de “Imagenología de Canal Unitario” se logró determinar la relación respecto a los cambios de fluorescencia asociados a la actividad de un o un pequeño grupo de canales activados por ATP ó CTP.
- Mediante el estudio de ARNE se determinaron las probabilidades de apertura en respuesta a los estímulos con ATP ó CTP y además se analizó el efecto de la IVM y el Cu^{2+} sobre la actividad del receptor, resultando en una mayor probabilidad de apertura en presencia de IVM y una inhibición de la respuesta por parte del ultimo.
- Se logró describir tiempos de latencia asociados a la actividad del receptor humano P2X4 en respuesta a los estímulos estímulos con ATP ó CTP y además se analizó el efecto de la IVM y el Cu^{2+} sobre la permanecía en entre un estado y otro.
- La utilización de sondas fluorescentes con mayor rango dinámico serán de gran utilidad para poder relacionar directamente la actividad del receptor/o canal a los cambios de fluorescencia.

REFERENCIAS

Alvarez, O., Gonzalez, C., & Latorre, R. (2002). Counting Channels: a Tutorial Guide on Ion Channel Fluctuation Analysis. *Advances in Physiology Education*, 26(4), 327–341. <http://doi.org/10.1152/advan.00006.2002>

Burnstock, G., & Knight, G. E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol. 240, 240, 31–304. [http://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](http://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3)

Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Trevino, C. L. (2011). Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiological Reviews*, 91(4), 1305–1355.

Demuro, A., & Parker, I. (2004). Imaging the activity and localization of single voltage-gated Ca^{2+} channels by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 86(5), 3250–3259. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74373-8](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74373-8)

Demuro, A. (2005). “Optical Patch-clamping”: Single-channel Recording by Imaging Ca^{2+} Flux through Individual Muscle Acetylcholine Receptor Channels. *The Journal of General Physiology*, 126(3), 179–192. <http://doi.org/10.1085/jgp.200509331>

Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1469(3), 197–235. [http://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](http://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6)

Gadsby C.D. (2010). Principle. *Currents*, 10(5), 344-352. <http://doi.org/10.1038/nrm2668.lon>.

Gandini, M. A., Sandoval, A., & Felix, R. (2014). Whole-cell patch-clamp recording of recombinant voltage-sensitive Ca^{2+} channels heterologously expressed in HEK-293 cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(4), 396–401. <http://doi.org/10.1101/pdb.prot073213>

Manuscript, A. (2008). NIH Public Access. *Growth (Lakeland)*, 23(1), 1–7. <http://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Hille, B. (1978). Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophysical Journal*, 22(2), 283–294. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(78\)85489-7](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85489-7)

Jelínková, I., Yan, Z., Liang, Z., Moonat, S., Teisinger, J., Stojilkovic, S. S., & Zemková, H. (2006). Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349(2), 619–625. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.084>

Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J.-J., & Clapham, D. E. (2012). The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels. *The Annual Review of Physiology*, 74(October), 10.1-10.23. <http://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153258>

Mattheyses, a. L., Simon, S. M., & Rappoport, J. Z. (2010). Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. *Journal of Cell Science*, 123(21), 3621–3628. <http://doi.org/10.1242/jcs.056218>

Nystoriak, M. a, Nieves-Cintrón, M., & Navedo, M. F. (2013). Capturing single L-type Ca(2+) channel function with optics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(7), 1657–64. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.10.027>

Priel, A., & Silberberg, S. D. (2004). Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *The Journal of General Physiology*, 123(3), 281–293. <http://doi.org/10.1085/jgp.200308986>

Receptors, G. P. (2011). Volume 164, Supplement 1, November 2011, 164(November).

Wertheimer, E., Krapf, D., De La Vega-Beltran, J. L., Sánchez-Cárdenas, C., Navarrete, F., Haddad, D., ... Visconti, P. E. (2013). Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 288(49), 35307–35320. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.489476>

Zou, H., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A., Fogarty, K. E., & Singer, J. J. (2002). Visualization of Ca²⁺ entry through single stretch-activated cation channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6404–6409. <http://doi.org/10.1073/pnas.092654999>

