



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis de Ruido aplicado a un sistema biológico.
Determinación de parámetros cinéticos moleculares de una
conductancia al potasio

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Física

PRESENTA:

María del Lucero Pacheco Blas



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Froylán Gómez Lagunas

México, DF. Marzo 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno

Apellido paterno	Pacheco
Apellido materno	Blas
Nombre(s)	María del Lucero
Teléfono	6234 1769
Universidad Nacional Autónoma de México	
Facultad de Ciencias	
Carrera	Física
Número de cuenta	301213048

2. Datos del tutor

Grado	Dr
Nombre(s)	Froylán Miguel
Apellido paterno	Gómez
Apellido materno	Lagunas

3. Datos del sinodal 1

Grado	Dra
Nombre(s)	Gertrudis Hortensia
Apellido paterno	González
Apellido materno	Gómez

4. Datos del sinodal 2

Grado	Dr
Nombre(s)	Arturo
Apellido paterno	Picones
Apellido materno	Medina

5. Datos del sinodal 3

Grado	Dr
Nombre(s)	Irving Omar
Apellido paterno	Morales
Apellido materno	Agiss

6. Datos del sinodal 4

Grado	Dra
Nombre(s)	Carolina
Apellido paterno	Barriga
Apellido materno	Montoya

7. Datos del trabajo escrito.

Título	Análisis de ruido aplicado a un sistema biológico.
Subtítulo	Determinación de parámetros cinéticos moleculares de una conductancia al potasio
Número de páginas	50 p
Año	2015

Este trabajo es parte de una colaboración con el Dr. Walter Stümmer del Instituto Max Planck, del Departamento de Medicina Experimental, quien proporcionó las células HEK empleadas en este trabajo.

Agradecimientos

Empecé mis estudios de licenciatura en física en 2003, recuerdo a María felicitandome doblemente porque me inscribí al primer semestre el día de mi cumpleaños 18, éste es el trabajo con el que al fin concluyo esa etapa de mi vida. A lo largo de todos estos años he vivido incontables experiencias, aventuras y siempre ha habido alguien para compartirlas. Este trabajo es por y para ellos: amigos, familia y maestros; porque cada uno ha enriquecido mi crecimiento como persona y como científica y, en algún momento, me han dado la fuerza para salir adelante.

En particular quiero agradecer a mi familia, porque en medio de todos mis titubeos ellos siempre me apoyaron y no me dejaron rendir. Los quiero muchísimo y sin su apoyo económico, moral y, sobretodo, su cariño no habría llegado hasta aquí. Gracias a mi papá y a mi mamá, porque sé lo difícil que puedo ser y que a pesar de eso siempre he gozado de su apoyo y bendiciones.

Me doy cuenta de que soy verdaderamente afortunada de haber cursado mis estudios en la UNAM, donde he tenido grandes maestros y muchas oportunidades para desarrollarme académicamente y de manera personal.

Académicamente tuve la oportunidad de trabajar con el Dr. Novaro y el Dr. del Castillo quienes me ayudaron a tomar responsabilidad de lo que quiero hacer como científica. A nivel personal he tenido el privilegio de entrenar judo con Sensei Hilario Ávila, quien desde el primer día me ha ayudado a superar muchos miedos y limitaciones que me ponía a mí misma, tanto físicas como mentales.

Agradezco, a cada uno de mis sinodales por haber aceptado leer mi trabajo y por darme sus oportunos comentarios que contribuyeron a mejorar la calidad y contenido, sobretodo a mi tutor el Dr. Froylán Gómez-Lagunas, quien ha sido por demás paciente conmigo y siempre se muestra con una gran disponibilidad para fomentar el aprendizaje.

A lo largo de estos años hubo buenos y malos ratos. Agradezco a la familia Chávez Estrada por el gran apoyo que me brindaron en momentos difíciles. Son personas admirables con quienes siempre estaré en deuda. Agradezco a mis amigos por su confianza, por las interminables horas en la biblioteca, por las fiestas y los buenos momentos que hacen la vida más amena. A Jesael y a Stephanie por aguantarme tantos años.

Índice general

Introducción	VI
Marco Teórico	1
Análisis de Ruido	2
Canales iónicos	5
Modelo de Hodgkin y Huxley	6
Canales de K^+	10
Canal EAG	11
Mibefradil	12
Objetivos e Hipótesis	13
Descripción del método	14
Materiales	14
Métodos	15
Resultados y Análisis	19
Características generales de la corriente control y con Mb	19

Análisis de ruido	24
Modelo cinético	25
Conclusiones	31
Apéndice A	32
Ecuación de Nernst	32
Sensores de Voltaje	33
Corrientes de compuerta	34
Apéndice B. Patch-Clamp	36
Pipetas de <i>Patch</i>	38
Apéndice C: Códigos	40
Programa para análisis de ruido analisis1.R	40
Código para el modelo cinético	42
Apéndice D: Cultivo de las células HEK	43
Bibliografía	47
Glosario	48

Introducción

Las membranas celulares están formadas con capas dobles de fosfolípidos, un tipo de sustancias que en su misma molécula tienen un grupo fosfato unido a dos ácidos grasos. Los fosfolípidos constituyen la estructura básica de la membrana, actúan como una película de recubrimiento y aislante¹ que evita el paso de la mayor parte de las sustancias que se encuentran dentro o fuera de la célula. Sin embargo, se requieren elementos, como las proteínas de membrana, que permitan el intercambio con el exterior tanto de sustancias como de interacciones de comunicación, contacto, etc.

Las proteínas son estructuras complicadas, todas están formadas por los mismos 20 aminoácidos. Cada proteína tiene su propio arreglo de estos aminoácidos, llamado secuencia primaria, la cuál puede tener, como el caso de nuestra proteína de estudio, 989 aminoácidos² o más. Las proteínas en la membrana celular forman poros llamados *canales iónicos* a través de los cuales fluye una corriente de iones que varía con el estado (abierto, cerrado o inactivado) y el tipo de canal (voltaje-, ligando- dependientes, etc.). Su estudio es de gran interés para desarrollar fármacos que activen o bloqueen canales

¹ Investigaciones recientes [6] muestran que también forman poros que permiten el flujo de corrientes

² con clasificación O95259 en UniProt

específicos de tal forma que se obtenga la máxima efectividad terapéutica con el mínimo de efectos secundarios [11].

Estas corrientes pueden ser estudiadas con la técnica de *fijación de voltaje* (ver), la cual permite registrarlas y conocer cómo fluyen los iones a través de la membrana celular, así como si son entrantes o salientes, y al variar las soluciones externas podemos saber cuál es el ión al que son permeables estos poros. Existen diversas sustancias que modifican el comportamiento del canal como inhibidores, bloqueadores o activadores, etc. Por ejemplo, el compuesto orgánico Ro 40-5967 también conocido como **mibefradil**, que se estudia en este trabajo.

En la búsqueda de un fármaco que actúe sobre el canal $hEAGK^+$ de potasio activado por voltaje asociado a tumores se eligió el mibefradil. Inicialmente, fue descrito como un antagonista selectivo a los canales de calcio tipo T. Sin embargo, más tarde se demostró que también inhibe varios tipos de canales de potasio. Más recientemente se reportó que el mibefradil frena el desarrollo de tumores.

El análisis de ruido es una técnica que permite, a partir de la corriente macroscópica, es decir la corriente promedio, producto del flujo a través de los canales en toda la célula, conocer las propiedades de la corriente a través de un solo canal, como su probabilidad de apertura y el número de canales funcionales que hay en la membrana. El análisis del espectro de potencias de la varianza sirve para calcular las tasas de apertura y cierre que pueden ayudar a discriminar entre diferentes modelos cinéticos posibles de la activación del canal [4].

En este trabajo se utilizará análisis de ruido para discernir si el mibefra-

dil bloquea el canal o si su efecto inhibitorio se debe a una variación de los mecanismos de apertura y cierre o *gating* de este canal. Además, como parte de este estudio, se hará la comparación de la cinética de la corriente en presencia y ausencia de mibefradil.

Marco Teórico

Las mediciones de la corriente macroscópica hechas en las membranas con la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa (o *whole-cell*) dan valores promedio de la variable en estudio. El estudio del análisis de ruido eléctrico en las membranas ayuda a obtener información acerca de los mecanismos de operación a un nivel microscópico. Al menos cuatro fuentes de ruido están presentes en la membrana [16]; el análisis de cada tipo brinda diferente información sobre las propiedades de la membrana. Los tipos de ruido son:

- a) **Ruido Térmico** o de Johnson-Nyquist. El ruido de la corriente y el potencial de membrana surge de la agitación térmica de los portadores de carga, tanto de iones pequeños como del sistema de registro; de su análisis se obtiene la impedancia pasiva de la membrana.
- b) **Ruido de Disparo** (Shot noise). Debido a que el paso de cada ión a través de la membrana es análogo al movimiento de los electrones del cátodo al ánodo en tubos de electrones, un tipo de ruido eléctrico análogo al efecto de disparo en estos dispositivos debe estar presente. El análisis de este tipo de ruido puede dar información sobre el movimiento

promedio de un único canal dentro de la membrana.

- c) **Ruido** $1/f$. Este ruido está asociado con el flujo de corriente en sistemas con únicamente un pequeño número de portadores de carga disponibles; a partir de su amplitud se puede inferir el número de portadores de carga y la movilidad de un ión dentro de la membrana.
- d) **Fluctuaciones en la conductancia**. Dado que los mecanismos subyacentes a la permeabilidad de la membrana son probabilísticos, la conductancia de la membrana debe fluctuar. Al ser sometidos un potencial mayor a su potencial de reposo, cada canal pasa, de manera individual, del estado cerrado al abierto de manera aleatoria, aunque el promedio de canales abiertos se mantiene constante. El análisis de estas variaciones en la conductancia brindan una forma de verificar la validez de diferentes modelos microscópicos y hace posible estimar cantidades como la conductancia de canal unitario.

En este trabajo se analizaron las fluctuaciones en la conductancia para encontrar la conductancia de canal unitario, la probabilidad de apertura, etc. como se explica en la siguiente sección.

Análisis de Ruido

Las primeras estimaciones confiables de los parámetros de un canal unitario se obtuvieron con análisis de ruido, dando así evidencia de la existencia de canales formados por proteínas integradas en la matriz lipídica de la membrana celular. Es una herramienta poderosa para el estudio de transporte iónico

mediado por canales. [15]

La manera más directa de medir las propiedades de canal unitario es registrar eventos unitarios con la técnica de *patch-clamp*, con la configuración de parche escindido (*outside-out* o *inside-out*) o de célula unida (*on-cell*). Los registros de canal unitario proporcionan la información más completa sobre la cinética de las transiciones conformacionales que experimentan estas proteínas que dan las bases de operación de las proteínas de canal individuales, para obtener toda esa información, se requiere que haya un sólo canal en el parche de membrana bajo estudio, sólo pueden ser fácilmente analizadas cuando el parche de la membrana contiene pocos canales, idealmente una (condición muy difícil de lograr) y sólo se pueden analizar directamente eventos de canal unitario que sean mayores que el ruido de fondo.

El análisis de las fluctuaciones no-estacionarias de corrientes macroscópicas es una forma clásica de estimar la conductancia de canal unitario, sin el problema técnico de tener que lograr registros en donde sólo exista un canal. La configuración *whole-cell* aplicada a células cultivadas, que expresan un solo tipo de canal iónico, es la preparación ideal para este tipo de estudio gracias a que la proporción entre el ruido del canal y el ruido de fondo que se obtiene con esta técnica es muy grande.

Las ventajas principales de este método contra mediciones de canal unitario son:

- Brinda buenas estimaciones de la conductancia de canal unitario para la mayoría de las preparaciones.
- Se pueden obtener suficientes muestreos útiles de la misma preparación, para diferentes condiciones experimentales.

- El análisis no requiere una selección subjetiva de eventos (situación frecuente en el estudio de canales unitarios).
- Requiere mucho menos tiempo.
- Se puede automatizar fácilmente.

El análisis de ruido sirve para relacionar observables macroscópicas [15], tales como la corriente iónica total, con parámetros microscópicos, como la corriente de canal unitario i , el número de canales funcionales en la membrana N , y la probabilidad de apertura de los canales bajo una condición dada P_o .

En una población homogénea de canales estadísticamente independientes, que tienen dos estados posibles, abierto o cerrado, la probabilidad de tener un número de canales abiertos en un tiempo dado está dada por una distribución binomial³ esto implica que la media de la corriente $I(t)$, y su varianza $\sigma_I(t^2)$ están dados por [12, 13, 16]

$$I(t) = NiP_o(t) \quad (1)$$

$$\sigma_I(t)^2 = Ni^2P_o(t)[1 - P_o(t)] \quad (2)$$

Donde I y σ^2 están estimadas para varias probabilidades de apertura, i y N pueden ser determinadas con el siguiente ajuste:

$$\sigma_I(I)^2 = Ii - I^2/N \quad (3)$$

³el planteamiento detallado se puede consultar en las referencias [7] o [16].

La corriente de canal unitario i se usa para calcular la conductancia γ , las cuales tienen una relación lineal siempre y cuando la conductancia se asuma como constante.

$$\gamma = \frac{i}{V_k - V_i}$$

donde el valor específico del potencial de inversión es V_i y el **potencial de holding** V_k

Canales iónicos

Las células vivas están delimitadas por una membrana formada por una bicapa lipídica, que separa el ambiente interno del drásticamente distinto medio externo. A pesar de que la concentración total es similar en ambos lados de la bicapa, la concentración de iones específicos es diferente. La difusión eléctrica a favor del gradiente electroquímico genera esta separación de cargas a través de la membrana, lo que se traduce en un **potencial de membrana** del orden de $-100mV$ (negativo dentro de la célula). Los gradientes se disiparían eventualmente de no ser por las bombas iónicas de ATP que los mantienen. En las células animales estas bombas no tienen un rol importante en la generación del potencial de membrana.

La parte hidrofóbica de la bicapa lipídica actúa como el dieléctrico de un **capacitor**, el cual separa la diferencia de cargas generando así el potencial de membrana. Como esta región es muy delgada (alrededor de 30\AA), el potencial de membrana se convierte en un campo eléctrico intenso alcanzando valores de $10^7V/m$. Varias proteínas de la membrana usan este campo eléctrico para regular el funcionamiento de la célula, destacando entre ellas los llamados

canales iónicos. Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que permiten el flujo selectivo y pasivo (a favor de su gradiente electroquímico) de distintos iones a través de la membrana. La primera vez que se registró la actividad de estas proteínas se realizó por Hodgkin y Huxley [8] en su estudio clásico de las bases iónicas del potencial de acción, (la señal todo o nada que utilizan las neuronas para comunicarse).

Modelo de Hodgkin y Huxley

En su artículo de 1952, Alan Lloyd Hodgkin y Andrew F. Huxley describieron el flujo de corriente eléctrica a través de la superficie de membrana de una fibra nerviosa gigante. Su famoso modelo matemático consiste en un sistema de cuatro ecuaciones diferenciales parciales no-lineales que simulan las características de las células excitables, se obtuvieron a partir de sus experimentos de fijación de voltaje variando las concentraciones extracelulares de sodio y potasio. Primero, Hodgkin y Huxley proponen un circuito equivalente para el cambio en la permeabilidad de la membrana, como se ve en la figura 1.

En donde la bicapa lipídica está representada por una capacitancia, los canales iónicos dependientes de voltaje por las resistencias variables (las cuales dependen del voltaje y el tiempo) y los canales de fuga se representan por resistencias fijas. Los gradientes electroquímicos están representados por las fuentes de voltaje, los cuales son proporcionales al logaritmo del cociente de concentración intra y extracelular (ver) de las especies iónicas de interés. Las bombas de iones están representadas por fuentes de corriente.

Una vez establecido el circuito equivalente, como un circuito RC, se plan-

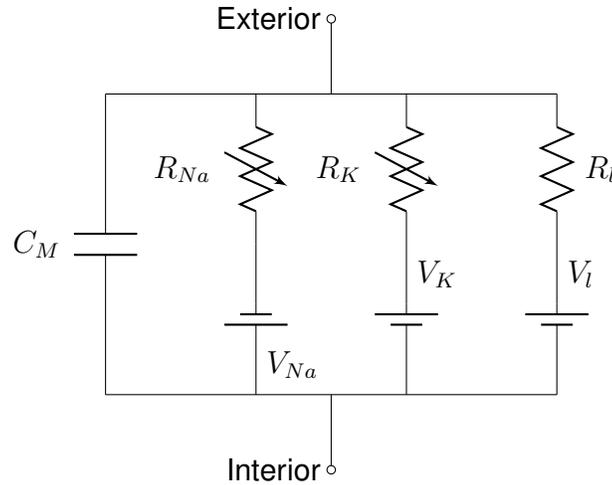


Figura 1: Circuito eléctrico del modelo de Hodgkin y Huxley.

tean las ecuaciones para el cambio en la permeabilidad. La tasa de cambio del potencial debido a la corriente capacitiva I_C , que en el modelo de HH corresponde a la corriente a través de la bicapa, se obtiene de la ecuación:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{I_C}{C} = -\frac{V}{RC}$$

cuya solución es: $V = V_0 \exp\left(-\frac{t}{RC}\right)$

En general, la capacitancia retarda la respuesta del voltaje a cualquier corriente un tiempo característico $\tau = RC$ llamado constante de tiempo de la membrana.

La corriente a través de una resistencia, en este contexto de un canal iónico, es: $I_i = \frac{V_m - V_i}{R_i}$. Utilizando la conductancia en lugar de la resistencia la

ecuación queda

$$I_i = g_i(V_m - V_i)$$

donde V_i es el **potencial de inversion** del i -ésimo canal iónico. Entonces, para una célula con canales de sodio y potasio la corriente total que fluye a través de la membrana está dada por:

$$\begin{aligned} I &= C_m \frac{dV_m}{dt} + \bar{g}_k n^4 (V_m - V_k) + \bar{g}_k m^3 (V_m - V_{Na}) + \bar{g}_l (V_m - V_l) \\ \frac{dn}{dt} &= \alpha_n (1 - n) - \beta_n n \\ \frac{dm}{dt} &= \alpha_m (1 - m) - \beta_m m \\ \frac{dh}{dt} &= \alpha_h (1 - h) - \beta_h h \end{aligned}$$

donde I es corriente por unidad de área; α_i, β_i son constantes de velocidad del i -ésimo canal, dependen del voltaje pero no del tiempo y tienen unidades de $[t]^{-1}$; g_i es el valor máximo de la conductancia; $n, m, h \in [0, 1]$ son cantidades adimensionales asociadas a la activación del canal de potasio, del canal de sodio e inactivación del canal de sodio respectivamente [8].

Hodgkin y Huxley explicaron la relación entre la conductancia y el potencial de membrana utilizando el principio de Boltzmann. Partieron de que una molécula cargada, con una afinidad especial por el sodio puede reposar en cualquier lado de la membrana, pero está presente en concentraciones despreciables en cualquier otro lado; también supusieron que la conductancia de sodio es proporcional al número de tales moléculas en el interior de la membrana pero independiente de la cantidad afuera. Entonces, del principio de Boltz-

mann se tiene que la proporción de moléculas en el interior de la membrana P_i está relacionado con la proporción externa P_o como: $\frac{P_i}{P_o} = \exp \left[\frac{(w+zeV)}{kT} \right]$ y tales que $P_i + P_o = 1$, obtenemos

$$P_i = \frac{1}{1 + \exp \left[-\frac{(w+zeV)}{kT} \right]}$$

donde V es la diferencia de potencial entre el exterior y el interior de la membrana; w es el trabajo necesario para mover la molécula del interior al exterior de la membrana cuando $V = 0$; e es el valor absoluto de la carga eléctrica; z es la valencia de la molécula (i.e. el número de cargas positivas en ella); k es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta.

Ajustando esta función a sus datos experimentales encontraron el número de cargas involucradas en el movimiento de sodio. Es fácil imaginar cómo una carga eléctrica o un dipolo eléctrico puede ser reorientado dentro de una proteína cuando el campo cambia y por lo tanto puede producir un cambio conformacional en la proteína que puede regular su función. El movimiento de la carga o el dipolo induce una corriente transitoria o corriente de compuerta que se puede medir experimentalmente y da información directa de tales cambios conformacionales [1].

Las proteínas que detectan el voltaje tienen roles fundamentales en muchas funciones de la célula como fijar el potencial de reposo, generar un impulso nervioso y mediando la regulación del voltaje de la fosforilación. Estas proteínas también están involucradas en la transmisión sináptica y regulando la homeostasis en la mayoría de las células.

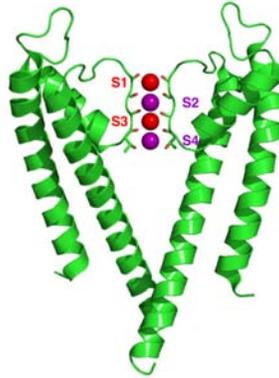


Figura 2: Cristal del canal de potasio KcsA

Canales de K^+

Un modelo de canales activados por voltaje

Los canales activados por voltaje de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} tienen roles cruciales en células excitables y forman las bases del inicio y propagación del impulso nervioso. Estos canales poseen un poro selectivo a la conducción de un ión dado y sensores de voltaje. Sus características estructurales generales son similares: los tres canales están formados por cuatro subunidades de proteínas independientes (en canales K^+ .) o un péptido que contiene cuatro dominios homólogos (canales de Na^+ y Ca^{2+} eucarióticos). Cada uno de los dominios o subunidades contiene seis segmentos transmembranales (S1-S6) y un asa entre los segmentos S5 y S6.

El sensor de voltaje está hecho de los primeros cuatro segmentos transmembranales, y el poro de conducción está hecho de los últimos dos segmentos y el asa. Los canales están acomodados de forma simétrica alrededor de un poro central de conducción que tiene cuatro sensores de voltaje a su al-

rededor. La probabilidad de que el canal se abra (P_o) está regulada por el sensor de voltaje, que en cambio es controlado por el potencial de membrana. La característica más sobresaliente de estos canales es su exagerada dependencia al voltaje P_o aumenta 150 veces con un cambio de $10mV$.

El sensor de voltaje del canal de K^+

El canal *Shaker* o temblorosa K^+ la *Drosophila melanogaster* fue llamado así en nombre de la mosca que en su ausencia entra en un estado de agitación anormal. El Shaker fue el primer canal de K^+ clonado y ha sido usado como el prototipo de los canales activados por el voltaje debido a que puede ser expresado en un alta densidad en los ovocitos *Xenopus*.

Canal EAG

Una vez que se clonó el canal *Shaker* y familias relacionadas, posteriormente se clonó el canal , también identificado por primera vez en *Drosophila* con base en el fenotipo que agita las piernas (por eso es ether a go go), las mutaciones de EAG provocan un disparo repetitivo y una mayor liberación de transmisor en motoneuronas, lo cual provoca la agitación de las piernas. Por medio de la comparación de secuencias de aminocácidos se identificaron otras dos familias de polipéptidos de canales relacionados al EAG los cuales comprenden una familia: EAG, ELK y ERG. Al expresarlos en ovocitos de rana los canales EAG se comportan como canales de potasio dependientes de voltaje.

El canal EAG de humano, hEAG o Kv10.1, normalmente se expresa en el

sistema nervioso central, particularmente en el hipocampo [2,5,9]. La función precisa en el sistema nervioso central se desconoce. Sin embargo, resulta interesante y de manera relevante para este trabajo, que se observó que su presencia en células que no sean del sistema nervioso se considera el primer indicio del desarrollo de un tumor canceroso [10].

Mibefradil

El Mibefradil es un bloqueador de canales de calcio T y L (con mayor selectividad por el tipo T) desarrollado para tratar hipertensión; fue retirado del mercado por sus interacciones secundarias con antibióticos, antihistamínicos, algunas enzimas del hígado [3, 14]. Sin embargo, pronto se demostró que el Mb también inhibe canales de potasio. Por otro lado, recientemente el Mb se ha descrito como una droga para suprimir actividad tumoral, la cual surgiría a través de su efecto inhibitorio de canales de Calcio. Por esta razón y por su efecto inhibitorio en canales de potasio decidimos estudiar la interacción entre este compuesto y el canal de potasio asociado a tumores Kv10.1 o hEAG.

Objetivos e Hipótesis

Objetivos

Describir la interacción del fármaco mibefradil con el canal activado por voltaje permeable al K^+ hEAG.

Hipótesis

El fármaco mibefradil (Mb) provoca una inhibición de la corriente de K^+ afectando el movimiento del sensor de voltaje del canal hEAG.

Materiales y Métodos

Materiales

Cultivo de las células HEK

- células HEK *Human Embryonic Kidney*
 - mantenidas a 37°C con 5% de CO_2 con 5ml de medio de cultivo
- Medio de cultivo DMEM
 - con 30 μ g/ml de zeozina
 - 40% de suero fetal bovino
- tripsina
- PBS *Phosphate Buffer Saline*

Soluciones de registro

- Solución de Potasio interna
- Solución de sello
- Solución de Sodio
- Solución de Mibefradil

MÉTODOS

	K_i		Sello		de registro o de Na		Mb
90	KF	145	NaCl	145	NaCl	145	NaCl
30	KCl	2	KCl			0.5/ μ M o	Mibefradil
2	MgCl ₂	10	MgCl ₂			10 μ M	
10	EGTA – K	0.5	CaCl ₂	10	CaCl ₂	10	CaCl ₂
10	HEPES	10	HEPES	10	HEPES	10	HEPES
pH	7.2KOH	pH	7.2NaOH	pH	7.2NaOH	pH	7.2NaOH

Cuadro 1: Soluciones interna, para hacer el sello y *whole-cell*, de control y con Mb.

Equipo

- microscopio invertido
- amplificador para *patch-clamp*
- osciloscopio
- micromanipulador

Programas de cómputo

CLAMPEX adquisición de datos en formato binario *.abf (axon binary file)

clampfit visualización del archivo binario y cambio de formato a texto *.atf
(axon text file)

R procesamiento estadístico de los datos y graficación

Métodos

Esta sección se divide en tres secciones:

El cultivo de las células

El registro electrofisiológico

El procesamiento de los datos

Cultivo de las células HEK

Las células que se utilizaron fueron modificadas con un plásmido que tiene el gen del canal *hEAG* y que las hace resistentes a la zeozina (antibiótico). Así el gen se expresa constitutivamente y al estar en un medio con el antibiótico, las células que no expresaran el gen morirían, garantizando así que la célula que se escoja para registrar tiene el canal. Se mantienen en cajas de cultivo dentro de la cámara con la tapa semiabierta para que haya reintercambio de CO_2 .

El procedimiento para llevar a la cámara de registro es a grandes rasgos el siguiente: se escoge la caja que se va a resembrar, se remueven las células por tripsinización para resembrar algunas en una caja y otras en cubreobjetos para ser observadas en la cámara de registro. Mayores detalles sobre el cultivo se encuentran en el .

Registro Electrofisiológico

El registro electrofisiológico se hace con la técnica de *patch-clamp* descrita en el [Apéndice B: Patch Clamp](#) en la configuración de *whole-cell*. Se utilizó un amplificador Axopatch 1D con un convertidor analógico digital DIGIDATA 1322A con el programa de adquisición *CLAMPEX 9*©y con los protocolos que definimos apropiadamente para análisis de ruido.

Se coloca un cubreobjetos con las células adheridas dentro de la cámara de registro en el microscopio invertido, las células están inmersas en la solución de sello. La solución de sello, tiene una baja concentración de calcio de lo contrario éste formaría cristales en la punta de la pipeta cuya presencia impediría la formación del sello. Hay que recordar que esta solución será

MÉTODOS

reemplazada por la de registro después de levantar la célula.

Primero, se busca una célula que se vea redonda, aislada y con la membrana en buen estado. A continuación buscamos que la pipeta esté casi sobre el centro de la célula. Se manda un pulso cuadrado de voltaje, al tocar la célula con la pipeta comienza a formarse un sello con una resistencia de alrededor de $2G\Omega$. En el microscopio, se ve cómo se expande la célula ligeramente al tocarla con la pipeta, se baja la pipeta con movimientos muy finos mientras se observa en el osciloscopio cómo disminuye la amplitud del pulso.

Lo siguiente es romper la membrana, por medio de succión, para hacer *whole-cell* y posteriormente levantar la célula. Una vez levantada se perfunde la solución de sodio, que tiene una concentración 145mM de CaCl_2 . Se realiza el registro de la corriente dando diferentes voltajes con un protocolo que llamamos IV pues los datos que se obtienen serán para hacer las gráficas I-V, después se toman los registros de los pulsos al mismo potencial con el protocolo de análisis de ruido que llamamos EAG. Finalmente, se perfunde la solución Mb $0.5\mu\text{M}$ se toma un registro con el protocolo IV y después con el protocolo EAG.

El protocolo EAG consiste en dar un pulso de -80mV a 0mV con el cuál se abren los canales. Cada pulso tiene una duración de 3600ms y se toman entre 20 y 50 registros con un intervalo de 3s entre cada pulso para formar el ensamble a partir del cuál se hará el análisis.

Procesamiento de los datos

Lo siguiente es cambiar el formato de los datos de binario a texto para poder exportarlo a otros programas. Una vez en el formato de texto importamos

MÉTODOS

los datos a R o a un programa de análisis estadístico para obtener la media y la varianza de los datos. Utilizamos los datos de la media y la varianza como se explica en la sección [Análisis de Ruido](#) para obtener la probabilidad de apertura, la corriente unitaria y el número de canales funcionales.

Resultados y Análisis

En esta sección se muestran las gráficas de los experimentos realizados, así como el análisis de las mismas.

Características generales de la corriente control y con Mb

Se comenzó por obtener las gráficas de la figura 3 en la que se muestran la corriente contra tiempo a diferentes voltajes y el cambio de la corriente. Arriba (figura 3a), para empezar, se obtuvieron las gráficas del cambio de la corriente en función del voltaje utilizando el pulso que se indica en la figura 3b. A partir de estos trazos obtendremos la curva I-V que se ve abajo (figura 3c), la cual es la caracterización más básica de la función de un canal iónico. En la figura 3a se observa en el panel izquierdo la corriente en condición control y en el de la derecha se muestra cómo el Mb inhibe la corriente. Este efecto inhibitorio está mejor caracterizado con la curva I-V (figura 3c).

La curva I-V se hace como sigue: se obtiene el cambio de corriente entre el valor inicial del pulso y un punto cerca del promedio de la corriente al final del

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA CORRIENTE CONTROL Y CON MB

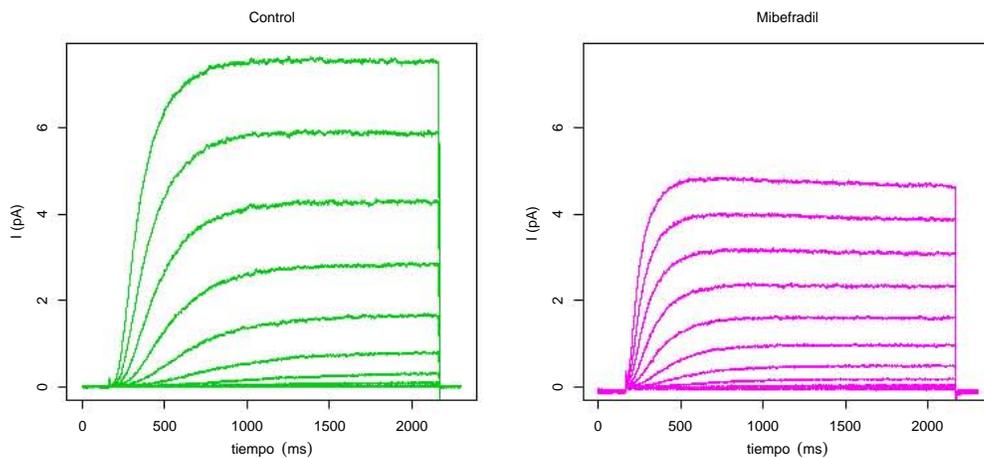
pulso. Esto se hace con Clampfit a ojo y se crea un archivo de datos con las diferencias entre voltajes consecutivos. Se hizo para tres registros diferentes y se muestra una gráfica representativa (figura 3c).

En la curva I-V, observamos cómo a partir de $-30mV$ se empiezan a abrir los canales tanto en la condición control como en presencia de Mb. También se observa cómo el Mb inhibe la corriente en cada valor del voltaje, más aún se observa que la caída de la corriente es mayor a valores más positivos del voltaje. En otras palabras esto muestra que el Mb inhibe la corriente y que esta inhibición es voltaje dependiente.

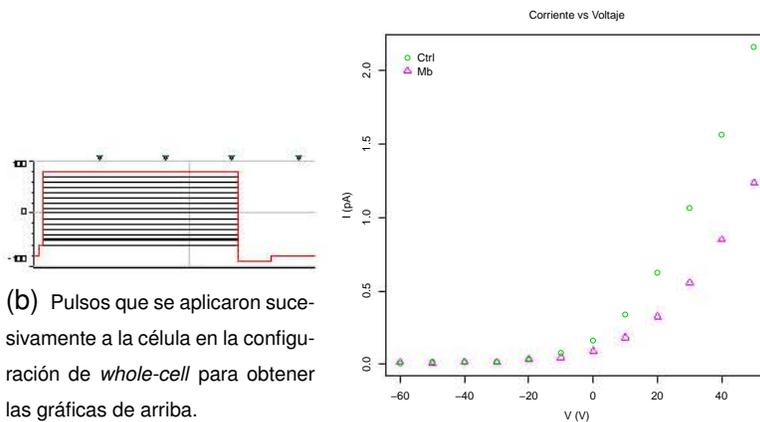
Después a partir de los datos I-V se obtuvo la fracción inhibida f_i vs voltaje V (figura 4a) utilizando la siguiente ecuación: $f_i = 1 - \frac{I_{Mb}}{I_C}$ en cada voltaje. La gráfica presenta la fracción inhibida promedio con su error estándar desde $-30mV$, para un total de tres células. Esta gráfica es una manera de ver la inhibición representada en la gráfica 3c. Observamos que a partir de $-20mV$ es una curva creciente y a medida que el voltaje aumenta se llega a una meseta.

Con el fin de hallar el significado de la curva de fracción inhibida (figura 4a) se obtuvo la gráfica de la conductancia de cuerda normalizada $g = \frac{1}{V-V_i}$ de los canales no modificados (figura 4b). Esta curva se denomina *curva de activación de los canales* porque nos indica cómo varía la probabilidad de apertura de los canales (la cual es proporcional a la conductancia g) en función del voltaje. En la figura 4b se ajustó una función de Boltzmann, con un potencial de $V_h = 17mV$ (valor en que la conductancia unitaria es $g/g_{max} = 0.5$) y una valencia de $z = 2.7$, que concuerdan con valores reportados en la literatura [17].

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA CORRIENTE CONTROL Y CON MB



(a) Curvas corriente vs tiempo a diferentes voltajes, se ve cómo la corriente control (izquierda) es mayor que la corriente después de perfundir el fármaco (derecha).

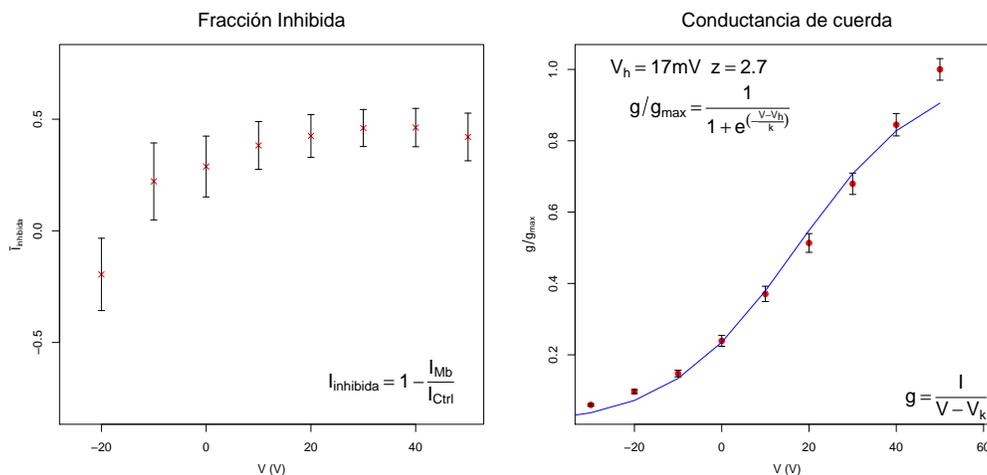


(b) Pulsos que se aplicaron sucesivamente a la célula en la configuración de *whole-cell* para obtener las gráficas de arriba.

(c) Curva Corriente vs Voltaje, a partir de -30mV se empiezan a abrir los canales, y de nuevo se observa que una vez abiertos los canales la corriente del control siempre es mayor que en presencia del Mb.

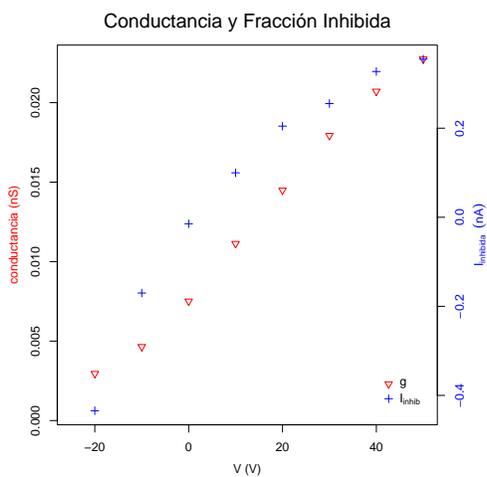
Figura 3

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA CORRIENTE CONTROL Y CON MB



(a) Promedio de la fracción inhibida.

(b) Conductancia normalizada promedio y su función de Boltzmann con parámetros ajustados $V_h = 17mV$ y $z = 2.7$.



(c) Conductancia de cuerda en contraste con fracción inhibida. Este empalme muestra un parecido entre ambas curvas el cuál sugiere que el Mibefradil se acopla al sensor de voltaje para inhibir la corriente.

Figura 4

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA CORRIENTE CONTROL Y CON MB

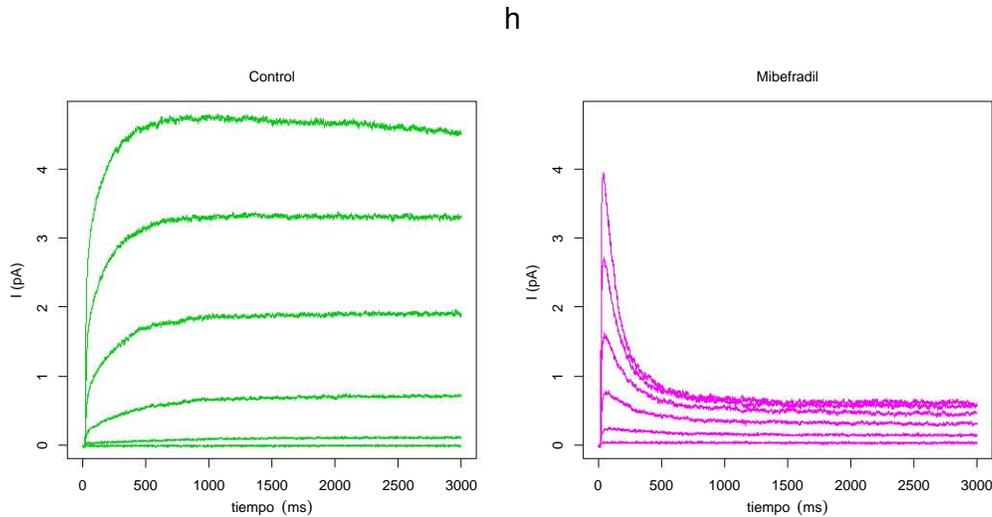


Figura 5: Curva de la corriente en el control (verde) y en presencia de $10\mu\text{M}$ de Mb.

La figura 4c es una comparación de la voltaje dependencia de la fracción inhibida f_i con la de la activación de los canales g . Obsérvese que ambas curvas tienen cualitativamente la misma voltaje dependencia, sugiriendo que la inhibición ejercida por Mb está acoplada al movimiento del sensor de voltaje, es decir, que el porcentaje de inhibición depende del porcentaje de activación de los canales. En otras palabras esto *apunta a que el Mb inhibe la corriente afectando el movimiento del sensor de voltaje*.

Aunque los datos en la figura 4c, advierten que el efecto inhibitorio del Mb podría ser debido sólo a un efecto en el *gating* de activación de los canales, cabe la posibilidad de que haya un efecto de bloqueo del poro, esto es, que el Mb interactuara con el poro y bloqueara la corriente. Verificar esta posibilidad requirió por un lado aumentar la concentración de Mb para ver un efecto inhibitorio más marcado y por otro lado hacer análisis de ruido.

La figura 5 muestra el efecto de agregar Mb $10\mu\text{M}$. Se nota cómo la corriente comienza a activarse y luego cae abruptamente, lo cual es consistente con un efecto de *gating*. Sin embargo no excluye la posibilidad de que hubiera un efecto directo sobre el poro. En caso de que existiera un bloqueo se esperaría que hubiera una reducción significativa de la corriente unitaria. Dado que la inhibición de corriente es muy fuerte con la concentración Mb $10\mu\text{M}$ y esto dificulta el análisis de ruido se trabajó con Mb $0.5\mu\text{M}$.

Análisis de ruido

Con el objeto de comprobar la hipótesis del efecto del Mb sobre el *gating* se realizaron los experimentos de análisis de ruido, como se explicó en la sección Registro electrofisiológico, el pulso que se aplicó para obtener cada elemento del ensamble se muestra en la figura 6b. A partir del ensamble de corrientes macroscópicas obtenidas en la configuración de *whole-cell* se tomó la media y la varianza de la corriente para cada tiempo de digitalización durante el pulso. En la figura 6a, se puede observar en el fondo el gris el ensamble, la figura 6c contrasta la caída de la corriente, en verde el promedio del ensamble del control y en magenta el del Mb.

La figura 7 muestra las gráficas de la varianza, la primera contra el tiempo y la segunda contra la corriente macroscópica promedio I . En la primera (figura 7a) se ve la fluctuación de la varianza en el mismo ensamble a lo largo del tiempo.

Los parámetros de interés (la corriente unitaria i y el número de canales funcionales N) se obtuvieron a partir de la gráfica de varianza contra corriente

promedio (figura 7b), como se explica en la sección de análisis de ruido del marco teórico. Las curvas de color muestran el ajuste de la parábola $\sigma_I(I)^2 = Ii - I^2/N$, cuyos parámetros de ajuste son la corriente unitaria i y el número de canales abiertos N . A partir de estos parámetros se calcula la probabilidad de apertura P_o .

Una vez determinados estos parámetros para una muestra de 3 células, se calculó el promedio y error estándar (figura 8), a estos datos se les aplicó una prueba t de Student, para determinar si son estadísticamente distintos. En las corrientes de canal unitario i y se obtuvo un valor p o *p-value* de 0.23, lo cual significa que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los valores del control y en presencia de Mb. En cambio, el número de canales abiertos N y la probabilidad de apertura P_o son mayores para el control que en presencia de mibefradil con p-values de 0.06 y 0.08, respectivamente, sí tienen una diferencia significativa. Esto quiere decir, que existe un acoplamiento del mibefradil con el sensor de voltaje tal que resulta en una inhibición de la corriente.

Modelo cinético

Finalmente, se tradujo la hipótesis (de que el Mb inhibe mediante un efecto en el *gating* de los canales) en un modelo cinético tentativo que se muestra en los esquemas de la figura 9. Las gráficas obtenidas a partir de cada modelo se muestran en la figura 10. En el control se utilizó un modelo de cuatro estados cerrados y uno abierto (esquema 9a y figura 10a), al igual que en el modelo de Hodgkin y Huxley para el canal de potasio del axón de calamar.

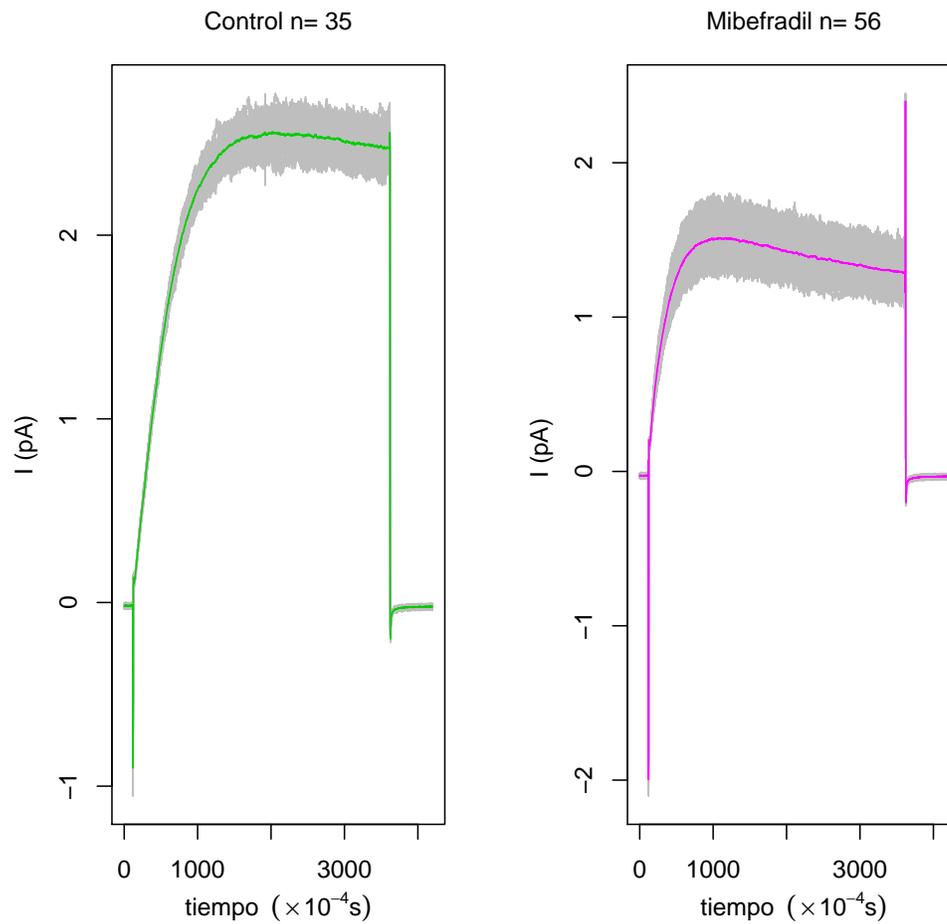
MODELO CINÉTICO

Constantes cinéticas				
Control	Mibefradil			
A_0	A_1	A_2	A_3	A_4
	0.00192	0.0033942	0.00489	0.019
0.00034287	0.0150	0.009	0.0008795	0.009

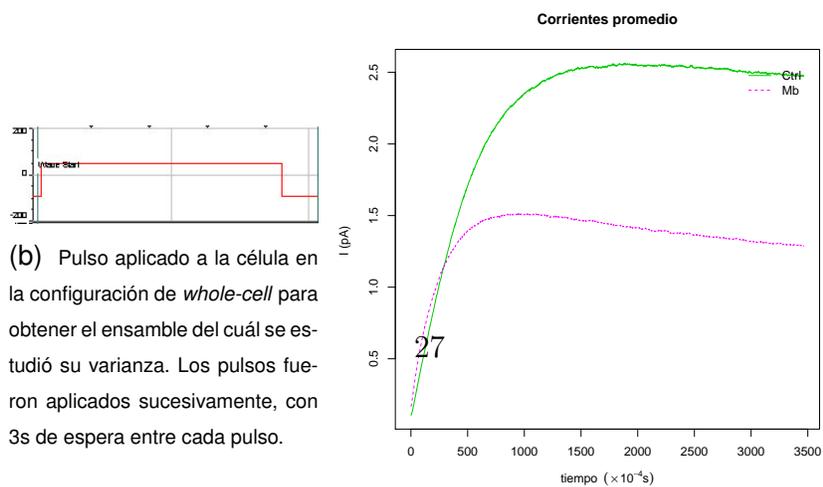
Cuadro 2: Constantes cinéticas del control y con el fármaco obtenidas a ojo para iniciar la búsqueda de un modelo cinético apropiado.

En presencia de mibefradil el modelo cinético (esquema [9b](#)) tiene que incluir el efecto del *gating*, esto se logra por medio de la introducción de un estado inactivado aparente (que por sí solo no tiene el canal, por eso el adjetivo de aparente). El modelo cinético consta de cuatro estados cerrados, uno abierto y uno inactivado ([10b](#)).

MODELO CINÉTICO



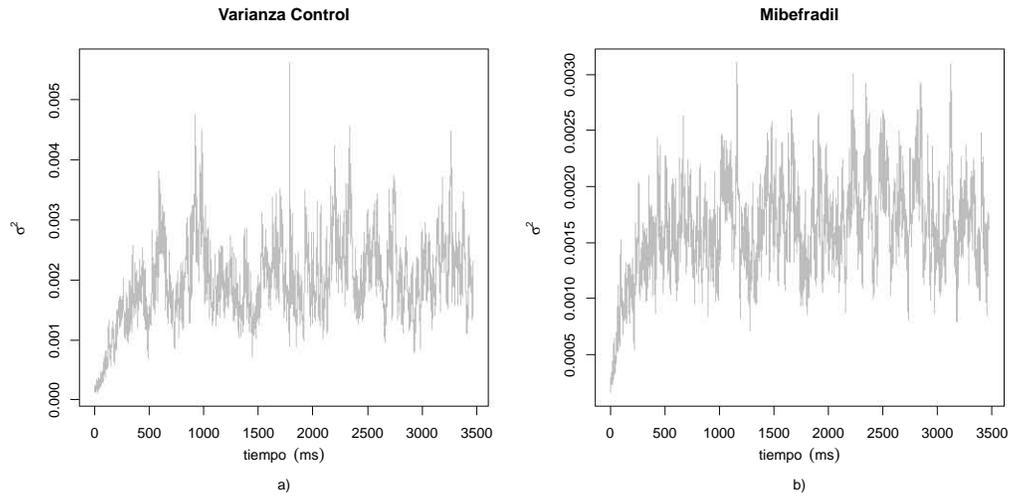
(a) Gráficas de cada ensamble (control y Mb) que se analizó con su promedio.



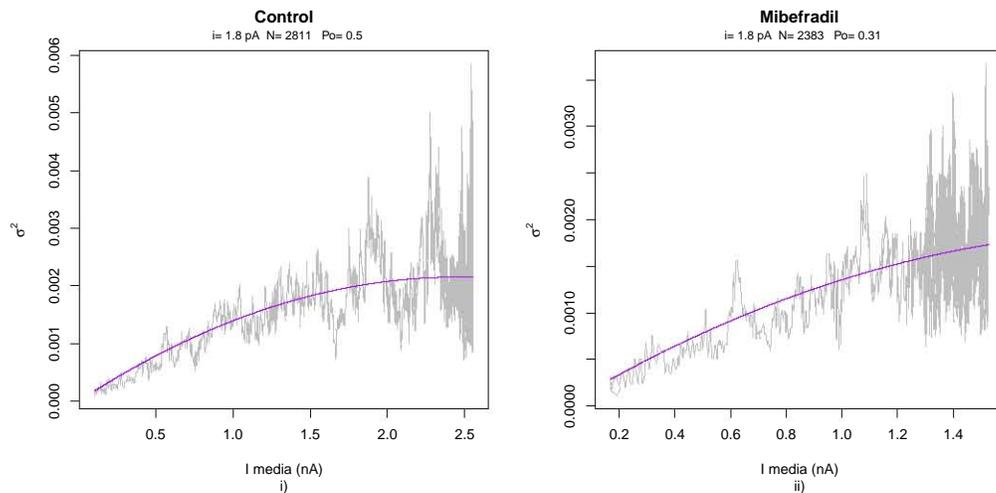
(b) Pulso aplicado a la célula en la configuración de *whole-cell* para obtener el ensamble del cuál se estudió su varianza. Los pulsos fueron aplicados sucesivamente, con 3s de espera entre cada pulso.

(c) Contraste de la caída de la corriente promedio en

MODELO CINÉTICO



(a) Varianza de la corriente del ensamble a lo largo del tiempo.



(b) Varianza de la corriente vs corriente promedio. A esta gráfica se ajustó la parábola $\sigma_I(I)^2 = Ii - I^2/N$ para encontrar la corriente unitaria i y el número de canales funcionales N

Figura 7: Varianza de la corriente vs corriente promedio analizados con el método de Conti [15].

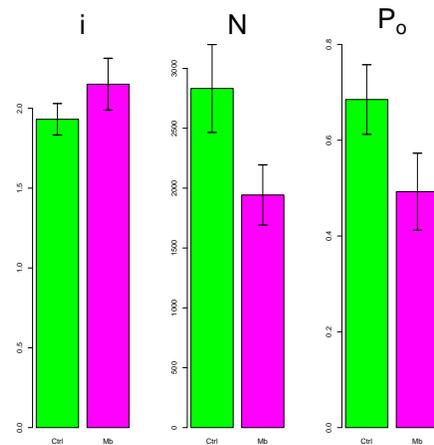
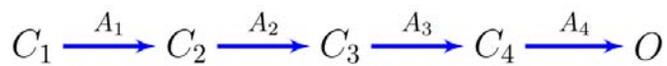
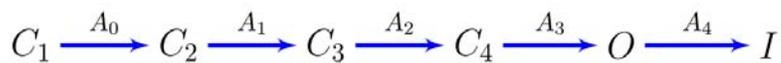


Figura 8: Promedio de la corriente unitaria, número de canales abiertos y probabilidad de apertura. Observamos que i no muestra una diferencia significativa entre el control y Mb, mientras que para N y P_o sí la hay.

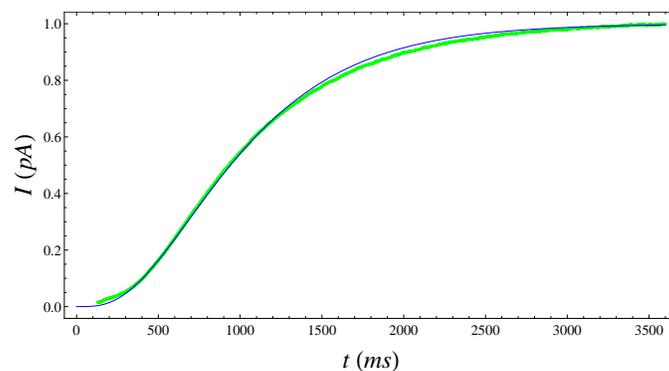


(a) Esquema del modelo cinético de cuatro estados cerrados y uno abierto del control.

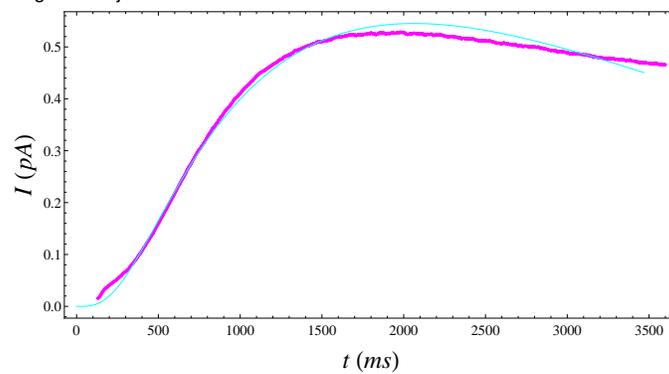


(b) Esquema del modelo cinético de cuatro estados cerrados, uno abierto y uno inactivado para el Mb.

Figura 9



(a) Se grafica el modelo cinético de cuatro estados cerrados y uno abierto para el control. En verde la curva experimental y en azul y un trazo más delgado el ajuste.



(b) Se grafica el modelo cinético de cuatro estados cerrados, uno abierto y uno inactivado para el Mb. En magenta la curva experimental y en cian y con trazo más delgado el ajuste.

Figura 10: Modelo cinético del control y el Mibefradil, respectivamente.

Conclusiones

En este trabajo se utilizó la técnica de fijación de voltaje para obtener la corriente de un canal de potasio en condiciones normales y en presencia de mibefradil, un fármaco que ha mostrado suprimir actividad tumoral a través de la inhibición de canales de Calcio. Los datos aquí presentados sugieren que dicho efecto se debe a la modulación del *gating* en canales hEAG (Kv10.1).

Además, se estudió si el efecto inhibitorio del mibefradil era debido a un bloqueo del poro o a una modulación de la apertura y cierre del canal (*gating*), ya que al hacer la caracterización de la corriente y comparar la curva de conductancia con la de fracción inhibida se vió una similitud que apuntaba a que el efecto del fármaco era de modular el *gating*. La verificación de esta hipótesis requirió análisis de ruido de la varianza de la corriente para encontrar la corriente unitaria y la probabilidad de apertura.

Finalmente, concluimos que una concentración Mb $0.5\mu\text{M}$ tiene un efecto en el *gating* y no en la corriente unitaria. Entonces, parece ser que el Mb afecta el movimiento del sensor de voltaje de tal forma que dicha alteración inactiva al canal reduciendo así la magnitud de la corriente total a través de la membrana.

Apéndice A

Ecuación de Nernst

El potencial de reposo es el potencial para el que se alcanza el equilibrio iónico. Para encontrar el potencial de reposo (V_o), supongamos que la membrana separa dos soluciones de una sal, el medio 1 uno con una mayor concentración del ión X^+ que el medio 2 y que la membrana sólo es permeable al ión X^+ . Sabemos que hay una tendencia, debida a su movimiento térmico, a que las soluciones se mezclen a favor del gradiente de concentración, es decir, del grupo más denso al más diluido (Ley de Fick $\phi_{Fick} = -ukT \frac{dn_i}{dx}$). Además, la ley de Ohm establece que el flujo de las prtículas es proporcional al campo $\phi_{Ohm} = -zenu \frac{dV}{dx}$. Por lo tanto, el flujo a través de la membrana será igual a:

$$\phi = \phi_{Fick} + \phi_{Ohm}$$

Consideremos el caso en el que se tiene un flujo estacionario, i.e. se ha alcanzado el equilibrio iónico. En este caso la ley de Kirchhoff dice que: $\sum z_i \phi_i = z_1 \phi_1 + z_2 \phi_2 = 0$. Dado que estamos suponiendo que la membrana sólo es permeable al ión positivo, $\phi_1 = 0$, entonces las condiciones se reducen a:

APÉNDICE A

$$z_2\phi_2 = 0$$

Entonces,

$$-\phi_2 = ukT \frac{dn_1}{dx} + z_2en_1u \frac{dV}{dx} = 0$$

Al resolver para dV obtenemos:

$$\frac{dV}{dx} = -\frac{ukT}{z_2eu} \frac{1}{n_1} \frac{dn_1}{dx}$$
$$\Delta V = -\frac{kT}{z_2e} \ln \frac{n_1''}{n_1'}$$

Que multiplicando por el número de Avogadro y reacomodando llegamos a la ecuación de Nernst:

$$V = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{n_1''}{n_1'}$$

donde n_1' y n_1'' son la concentración de un lado y otro de la membrana.

Sensores de Voltaje

El campo eléctrico es detectado a través de la traslocación de las cargas o el movimiento de dipolos dentro del campo de la membrana. Los grupos cargados, arreglos, intensidad del campo, disposición y movimientos de las cargas o dipolos pueden variarse; sin embargo, el resultado final es que los cambios en el campo se transducen en un cambio conformacional que consigue el funcionamiento de la proteína. Por ejemplo, una de las formas en las que las proteínas perciben el voltaje es a través de las cavidades contenidas en la proteína en las que los iones libres se pueden asociar. Cambios en un campo eléctrico pueden mover al ión libre, el cual puede iniciar o dar como

resultado un cambio conformacional. El movimiento de las cargas o la reorientación de una región de la proteína puede representar un paso inicial que está acoplado con cambios conformacionales o el cambio conformacional final que regula el funcionamiento de la proteína.

Es importante notar que el alcance del movimiento de las cargas depende de la magnitud de la carga y de la intensidad del campo eléctrico en la región en la que se mueve la carga. Debido a la compleja estructura molecular, la intensidad del campo cerca del sensor de voltaje puede ser distinta de la intensidad en la bicapa lipídica, la cual tiene una estructura molecular homogénea. De tal forma que a pesar de conocer la carga total del sensor, una medición del movimiento de las cargas no puede ser usado para inferir la distancia desplazada a menos que la intensidad del campo sea conocida.

Corrientes de compuerta

Cualquier movimiento de cargas o dipolos dentro de un campo eléctrico produce una corriente eléctrica. En el caso de los sensores de voltaje de las proteínas, éstas cargas se mueven dentro de la proteína y usualmente están confinadas a una región intramembranal. Sin embargo, para mantener la continuidad, las cargas en el exterior y el interior se mueven en proporción al movimiento de la carga en la membrana, generando una corriente que se pueda detectar en el circuito externo.

Cuando se midió la corriente en canales de Na^+ , se encontró una correlación con la apertura del canal; por eso se le llamó **corriente de compuerta** o *gating*. Desde entonces corrientes de detección similares se han medido

APÉNDICE A

en muchas otras proteínas. El movimiento de las cargas de compuerta es un marcador eléctrico de cambios conformacionales dentro de la proteína, su medición es extremadamente útil para detectar cambios intermoleculares.

Establecer los detalles energéticos del movimiento de las cargas en un nivel de molécula-única es crucial para construir un modelo atómico detallado del movimiento del sensor de voltaje. Un cambio súbito en el potencial de membrana reorienta las cargas del sensor y la cinética de este movimiento depende del panorama energético que esas cargas deben atravesar hasta llegar a su nueva posición. En un nivel de molécula-única, una corriente de *gating decayente* indica que las cargas de apertura se mueven a lo largo de un *potencial de energía poco profundo*. En contraste, si la carga encuentra una *barrera de alta energía*, un mecanismo de tipo salto a través de la membrana va a generar un *disparo de carga súbito* [1].

Apéndice B: *Patch Clamp*

A mediados del siglo XX, Alan Lloyd Hodgkin y Andrew Huxley sentaron las bases para el entendimiento de la generación y propagación del potencial de acción. En su modelo Hodgkin y Huxley propusieron el concepto de “canal iónico” sin embargo no existía evidencia directa acerca de su existencia. Fue a principios de los años setenta que Erwin Neher y Bert Sakmann⁴ desarrollaron una técnica para aislar pequeñas áreas de membrana muscular, con el fin de mejorar la calidad del registro eléctrico, disminuyendo el ruido intrínseco.

Lo lograron mediante el sistema de pulir con fuego la punta de pipetas de vidrio de $1 - 5\mu\text{m}$ de diámetro, de manera que al aplicar un poco de succión a la pipeta cuando ésta toca la membrana se establece un sello de alta resistencia eléctrica. Con ello se evita que la corriente escape al medio extracelular por la vía acuosa que pudiera quedar entre la pipeta y la membrana. La corriente que fluye a través de la porción de membrana (*parche*) delimitada por la pipeta es medida con un amplificador específicamente diseñado.

El valor de potencial impuesto por el experimentador V_h se compara con el valor del potencial de membrana V_m registrado mediante la pipeta de *patch*. La salida del amplificador operacional está conectada a una resistencia de

⁴Galardonados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1991.

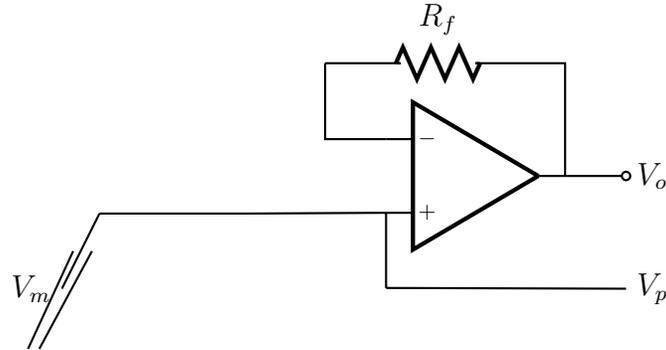


Figura 11: Circuito reducido de *Patch-Clamp*

alto valor R_f con la entrada que detecta el valor del potencial de membrana V_m . Cualquier diferencia entre V_h y V_m genera una corriente I_f que fluye entre V_0 y V_m a través de la resistencia R_f , hasta que el potencial impuesto y el de membrana son iguales, es decir, V_m se mantiene en el valor fijado por V_h a través de la corriente I_f . Esta corriente representa la corriente que fluye por la membrana a través de los canales iónicos activados.

Los diferentes modos del *patch-clamp* son:

1. Cell attached (adherida a la célula)
2. *whole-cell* (célula completa)
3. Outside-out (exterior hacia afuera)
4. Inside-out (interior hacia afuera)

En la configuración de ***whole-cell*** se produce un sello de alta resistencia, tras lo cual, y aplicando un pulso de presión negativa a la pipeta, se puede producir la ruptura del parche de membrana delimitado por la punta de la

pipeta. De esta manera, se pone en comunicación la pipeta con el interior celular y se registra toda la célula.

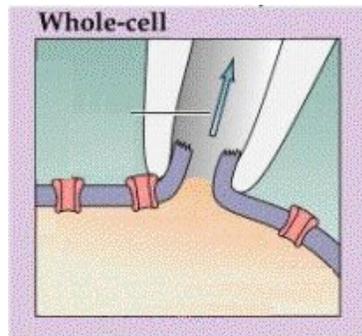
Los modos 3 y 4 pertenecen a la configuración de **parche escindido**. Si se retira la pipeta de la superficie celular se arrastran porciones de membrana que, debido a sus propiedades hidrofóbicas, se resellan, formando una especie de parche de membrana en el que puede haber canales iónicos. Al aumentar la ganancia del amplificador en esta configuración se puede observar que la corriente de membrana presenta una serie de eventos discretos (como escalones de corriente) que indican la apertura de los canales.

Los primeros registros realizados en la configuración parche escindido fueron publicados en 1976 y demostraban la existencia de flujos de corrientes con aspecto de pulsos cuadrados, de características todo-nada que podían representar las aperturas de canales iónicos individuales. Con el perfeccionamiento de la técnica se pudo demostrar fehacientemente que, en las membranas biológicas, los canales iónicos se abren y cierran, siguiendo un proceso estocástico.

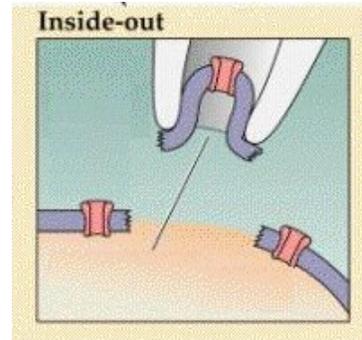
Pipetas de *Patch*

Las pipetas utilizadas en esta técnica son una parte experimental importante debido a que el buen logro de la geometría, ancho y pulido adecuados facilitan la formación del sello. En este trabajo se utilizaron tubos capilares de porosilicato marca KIMAX-51 de tamaño $0.8 - 1.10 \times 100\text{mm}$. El diámetro final de las micropipetas utilizadas fue de $1\mu\text{m}$.

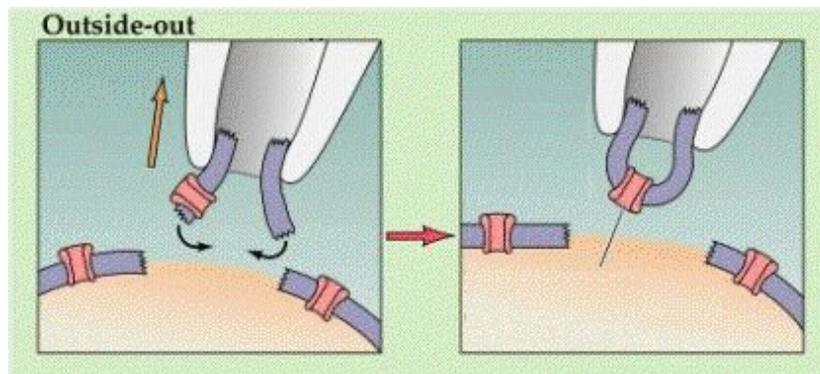
PATCH-CLAMP



(a) Con un pulso de succión el citoplasma queda comunicado a la pipeta.



(b) Se expone al aire y el dominio citoplasmático queda accesible.



(c) Se retrae la pipeta, los extremos de la membrana se resellan por propiedades hidrofóbicas y queda accesible el dominio extracelular.

Figura 12: Configuraciones de *Patch-Clamp*, figuras modificadas de <https://www.uic.edu/orgs/psych/pages/15/sld016.htm>.

Apéndice C: Códigos

Programa para análisis de Ruido analisis1.R

```
files <- c("/home/lupbla/Lucero_Docs/biomed/licenciatura/datosEAG/data/13826/data_3.atf",
           "/home/lupbla/Lucero_Docs/biomed/licenciatura/datosEAG/data/13826/data_5.atf")
datos <- lapply(files,function(.file){
  dat <- read.table(.file,header=F,skip=12) })

muestra <- names(datos) <- c("Control","Mibefradil")

#los datos están acomodados como t I V I V...
Curr <- seq(4,floor(10/10*length(datos[[1]])),2)
CrrMb <- seq(6,floor(6/6*length(datos[[2]])),2)
#cargo la librería para sacar promedios por fila
library(matrixStats)

#promedios x tiempo:
I.C <- rowMeans(datos[[1]][Curr],na.rm=T)
I.Mb <- rowMeans(datos[[2]][CrrMb],na.rm=T)

D.I.C.var <- rowVars(as.matrix(datos[[1]][Curr]-datos[[1]][Curr-2]),na.rm=T)
D.I.Mb.var <- rowVars(as.matrix(datos[[2]][CrrMb]-datos[[2]][CrrMb-2]),na.rm=T)
rango <- 119:3600
#ajuste de varianza contra corriente promedio
# var= Ii-I2/N
i <- I.C[rango]; N <-(I.C[rango])2
i.Mb <- I.Mb[rango]; N.Mb <-(I.Mb[rango])2

fit2= lm( D.I.C.var[rango] ~ 0+I(i)+I(N))
fit2Mb= lm( D.I.Mb.var[rango] ~ 0+I(i.Mb)+I(N.Mb))

N1 = c( -1/fit2[[1]][2], -1/fit2Mb[[1]][2])
corrientes = c(fit2[[1]][1], fit2Mb[[1]][1])*103
Popen = c(round(I.C[3467]*1000/(corrientes[2]*N1[2]),digits=2),
round(I.Mb[3467]*1000/(corrientes[4]*N1[4]),digits=2))

#####3333#Gráficas
pdf("/home/lupbla/Lucero_Docs/biomed/licenciatura/imagenes/graph/13826-I.pdf",12,6)
par(mfrow=c(1,2))
# graficar los datos antes de promediar
ts.plot(datos[[1]][Curr],col="grey",xlab="",ylab="" )
```

CÓDIGOS

```
lines(rowMeans(datos[[1]][Curr],na.rm=T),xlab="",ylab="",type="l", col="3")
mtext( " I (pA) ",col=1,side=2,line=2.5)
mtext( paste("Control"),col=1,side=3,line=1)
mtext(expression(tiempo~~ (ms)),side=1,col="black",line=2.5)

ts.plot(datos[[2]][CrrMb],col="grey",xlab="",ylab="" )
lines(rowMeans(datos[[2]][CrrMb],na.rm=T),xlab="",ylab="",type="l", col="6")
mtext("I (pA) ",col=1,side=2,line=2.5)
mtext(paste("Mibefradil"),col=1,side=3,line=1)
mtext(expression(tiempo~~ (ms)),side=1,col="black",line=2.5)
dev.off()
#####.....

pdf("/home/lupbla/Lucero_Docs/biomed/licenciatura/imagenes/graph/13826-II.pdf",12,6)
par(mfcol=c(1,2))#####revisar la siguiente línea las leyendas.
side=3,line=0.5,cex=0.8)
plot(I.C[rango], D.I.C.var[rango], type="l", col="grey", main="Control",sub="i)",
xlab="I media (nA)",ylab=expression(sigma^2))
side=3,line=0.5,cex=0.8)
mtext( paste("i=",round(corrientes[2],digits=1),"pA\t","N=",round(N1[2],digits=0),
"\t","Po=",round(I.C[3467]*1000/(corrientes[2]*N1[2]),digits=2)), side=3,line=0.5,cex=0.8)
lines(I.C[rango], predict(fit2, data.frame(x=I.C[rango])), col='purple')

(length(datos[[2]])-1)/2),side=3,line=0.5,cex=0.8)
plot(I.Mb[rango], D.I.Mb.var[rango], type="l", col="grey", main="Mibefradil",
sub="ii)",xlab="I media (nA)",ylab=expression(sigma^2))
(length(datos[[2]])-1)/2),side=3,line=0.5,cex=0.8)
paste("i=",round(corrientes[4],digits=1),"pA\t","N=",round(N1[4],digits=0),"\t","Po=",
round(I.Mb[3467]*1000/(corrientes[4]*N1[4]),digits=2)),side=3,line=0.5,cex=0.8)
lines(I.Mb[rango], predict(fit2Mb, data.frame(x=I.Mb[rango])), col='purple')
dev.off()

pdf("/home/lupbla/Lucero_Docs/biomed/licenciatura/imagenes/graph/13826-III.pdf")
par(mfrow=c(1,1))
plot(I.C[rango],type="l", col=3, main=c("Corrientes promedio"),
xlab=expression(tiempo~~ (ms)),ylab="I (pA) ",lty=1)
lines(I.Mb[rango],type="l", col=6, lty=2)
legend("topright", inset=0.03, c("Ctrl","Mb"), col=c(3,6), lty=c(1,2), bty="n" )
dev.off()

pdf("/home/lupbla/Lucero_Docs/biomed/licenciatura/imagenes/graph/Popen.pdf")
boxplot(Po,col=c(3,6))
title("Probabilidad de apertura")
dev.off()
```

Código para el modelo cinético

```
(*modelo cinetico ctrl*)
pfun = ParametricNDSolveValue[Join[{
  open'[t] == A1*closed1[t],
  closed1'[t] == -A1*closed1[t] + A2*closed2[t],
  closed2'[t] == -A2*closed2[t] + A3*closed3[t],
  closed3'[t] == -A3*closed3[t] + A4*closed4[t],
  closed4'[t] == -A4*closed4[t],
  open[0.] == 0,
  closed1[0.] == 0,
  closed2[0.] == 0,
  closed3[0.] == 0,
  closed4[0.] == 1}], {open[t]}, {t, 0, 3470}, {A1, A2, A3, A4}];

(*modelo cinetico Mb*)
pfunMb = ParametricNDSolveValue[Join[{
  inactivated'[t] == A0*open[t],
  open'[t] == -A0*open[t] + A1*closed1[t],
  closed1'[t] == -A1*closed1[t] + A2*closed2[t],
  closed2'[t] == -A2*closed2[t] + A3*closed3[t],
  closed3'[t] == -A3*closed3[t] + A4*closed4[t],
  closed4'[t] == -A4*closed4[t],
  inactivated[0.] == 0,
  open[0.] == 0,
  closed1[0.] == 0,
  closed2[0.] == 0,
  closed3[0.] == 0,
  closed4[0.] == 1}], {open[t]}, {t, 0, 3470}, {A0, A1, A2, A3,
A4}];
```

Apéndice D: Cultivo de las células HEK

Las células HEK es una línea celular derivada de células de riñón de un embrión humano. Algunas de las características que las hacen útiles en la electrofisiología son: que son fáciles de mantener y de transfectar; tienen una alta eficiencia de transfección y de producción de proteínas y son células pequeñas con procesos mínimos apropiadas para experimentos de fijación de voltaje [18].

La caja que se escoje depende de la densidad de células que se observen en el microscopio, del color del medio y del aspecto de las células. Se busca que tenga una confluencia entre el 70-80 %, que el color del medio sea el más rosado posible (se torna amarillento con el intercambio de gases), que las células no formen muchos cúmulos y su superficie se vea lisa.

Las células están adheridas a la superficie de la caja que las contiene, para separarlas se utiliza una enzima llamada tripsina. Antes de añadir 1ml de tripsina es necesario lavar con PBS para eliminar el calcio del medio de cultivo, pues éste inhibe la acción de la tripsina.

Primero, se retiran 4ml de medio, no hay peligro de perder las células pues la mayoría están adheridas a la caja. El lavado consiste en agregar 5ml

CULTIVO DE LAS CÉLULAS HEK

de PBS y retirarlo. Luego añadimos 1ml de tripsina cuya acción frenamos de inmediato añadiendo 4ml de medio. Finalmente, pipeteamos aproximadamente 20 veces, para que las células se separen, y sembramos 2ml en una caja nueva y 1ml en los cubreobjetos de 1×5 mm. Se puede empezar a hacer registros 2hrs después de sembrar.

Bibliografía

- [1] BEZANILLA, F. How membrane proteins sense voltage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 4 (2008), 323–332. ([document](#))
- [2] BRÜGGEMANN, A., PARDO, L. A., STÜHMER, W., AND PONGS, O. Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to k^+ and ca^{2+} and modulated by camp. *Nature* (1993). ([document](#))
- [3] CHRISTOPH WANDEL, RICHARD B. KIM, F. P. G., AND WOOD, A. J. Mibefradil is a p-glycoprotein substrate and a potent inhibitor of both p-glycoprotein and cyp3a in vitro. *Drug Metabolism and Disposition* 28 (2000), 895–898. ([document](#))
- [4] DEMPSTER, J. *Computer analysis of electrophysiological signals*. Academic Press London, 1993. ([document](#))
- [5] GANETZKY, B., ROBERTSON, G. A., WILSON, G. F., TRUDEAU, M. C., AND TITUS, S. A. The eag family of k^+ channels in drosophila and mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868, 1 (1999), 356–369. ([document](#))
- [6] HEIMBURG, T. Lipid ion channels. *Biophysical chemistry* 150, 1 (2010), 2–22. 1

- [7] HILLE, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, second ed. Sinauer Associates Inc., USA, 1992. [3](#)
- [8] HODGKIN, A. L., AND HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology* 117, 4 (1952), 500. [\(document\)](#)
- [9] LUDWIG, J., TERLAU, H., WUNDER, F., BRÜGGEMANN, A., PARDO, L., MARQUARDT, A., STÜHMER, W., AND PONGS, O. Functional expression of a rat homologue of the voltage gated either a go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the drosophila channel and its mammalian counterpart. *The EMBO journal* 13, 19 (1994), 4451. [\(document\)](#)
- [10] PARDO, L. A., DEL CAMINO, D., SÁNCHEZ, A., ALVES, F., BRÜGGEMANN, A., BECKH, S., AND STÜHMER, W. Oncogenic potential of eag k⁺ channels. *The EMBO Journal* 18, 20 (1999), 5540–5547. [\(document\)](#)
- [11] PEÑA, A. *Las membranas de las células*, vol. 18. Fondo de Cultura Económica, 2004. [\(document\)](#)
- [12] SIGWORTH, F. The conductance of sodium channels under conditions of reduced current at the node of ranvier. *The Journal of physiology* 307, 1 (1980), 131–142. [\(document\)](#)
- [13] SIGWORTH, F. The variance of sodium current fluctuations at the node of ranvier. *The Journal of Physiology* 307, 1 (1980), 97–129. [\(document\)](#)
- [14] SORELLE, R. Withdrawal of posicor from market. *Circulation* 98, 9 (1998), 831–832. [\(document\)](#)

BIBLIOGRAFÍA

- [15] STEFAN H. HEINEMANN, F. C. Nonstationary noise analysis and application to patch clamp recordings. *Methods in enzymology* 207 (1992), 131–148. ([document](#)), 7
- [16] STEVENS, C. F. Inferences about membrane properties from electrical noise measurements. *Biophysical journal* 12, 8 (1972), 1028–1047. ([document](#)), 3
- [17] TERLAU, H., LUDWIG, J., STEFFAN, R., PONGS, O., STÜHMER, W., AND HEINEMANN, S. H. Extracellular mg^{2+} regulates activation of rat eag potassium channel. *Pflügers Archiv* 432, 2 (1996), 301–312. ([document](#))
- [18] THOMAS, P., AND SMART, T. G. Hek293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 51, 3 (2005), 187–200. ([document](#))

Glosario

capacitor Dispositivo que almacena carga eléctrica. En presencia de un campo eléctrico en su interior, cuando aumenta la diferencia de potencial en sus terminales almacena carga y se descarga cuando disminuye. [5](#)

corriente de compuerta es la corriente transitoria que se produce por los movimientos de las cargas dentro del campo eléctrico de la membrana. [34](#)

potencial de holding Es el potencial que fija el experimentador V_p contra el cuál se compara el voltaje medido de manera que cualquier diferencia entre el voltaje medido y éste sea compensada por medio de una inyección de corriente. [5](#)

potencial de inversion Es el potencial en el que el flujo neto de un ión particular es cero. Se llama de inversión porque a partir de este potencial se invierte el sentido del flujo de iones. Coincide con el potencial de equilibrio en sistemas de un único ión y en este caso se puede calcular con la ecuación de Nernst.. [8](#)

potencial de membrana Es la diferencia entre el potencial interno menos el externo en una membrana. [5](#)

ruido En electrónica, el ruido es la presencia de señales impredecibles y aleatorias que contaminan la señal principal. [1](#)

valor p Es un valor entre cero y uno que nos permite saber qué tan verosímil es obtener una muestra como la actual si la hipótesis nula es cierta. [25](#)

Índice alfabético

patch-clamp, [36](#)

análisis de ruido, [4](#)

canales iónicos, [10](#)

Shaker, [11](#)

 EAG, [11](#)

corriente de *gating*, [34](#)

potencial de inversión, [8](#)

potencial de membrana, [5](#)

potencial de reposo, [32](#)