



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de la actividad unitaria del canal oncogénico
humano Kv10.1 por análisis de ruido de su corriente iónica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ABELARDO AGUILAR CÁMARA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ARTURO PICONES MEDINA

Ciudad Universitaria, CD.Mx., 2019





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	Aguilar
Apellido materno	Cámara
Nombre(s)	Abelardo
Teléfono	55 4471 9744
Universidad Nacional Autónoma de México	
Facultad de Ciencias	
Carrera	Biología
Número de cuenta	312223584

2.- Datos del tutor

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

3.- Datos del sinodal 1

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

4.- Datos del sinodal 2

Grado	Fís.
Nombre(s)	César Oliver
Apellido paterno	Lara
Apellido materno	Figueroa

5.- Datos del sinodal 3

Grado	Dr.
Nombre(s)	Adán Oswaldo
Apellido paterno	Guerrero
Apellido materno	Cárdenas

6.- Datos del sinodal 4

Grado	Dr.
Nombre(s)	Oscar
Apellido paterno	Fontanelli
Apellido materno	Espinosa

7.- Datos del trabajo escrito

Título	Estudio de la actividad unitaria del canal oncogénico humano Kv10.1 por análisis de ruido de su corriente iónica
Número de páginas	47pp
Año	2019

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Canalopatías en el Instituto de Fisiología Celular-UNAM en la Ciudad de México, México.



Laboratorio Nacional de Canalopatías



Como parte del proyecto de investigación: “Desarrollo de un contraceptivo masculino basado en la inhibición específica de los canales iónicos CatSper y Slo3 del espermatozoide humano”

Financiado por la Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación, con el número de proyecto 039/2013.



Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Fisiología Celular, al Laboratorio Nacional de Canalopatías y a la Facultad de Ciencias, por ser las instituciones en donde me he formado.

A la Secretaria de Ciencia Tecnología e Innovación, este trabajo fue realizado con los financiamientos del proyecto 039/2013.

A mi tutor el Dr. Arturo Picones Medina por introducirme a los temas que soportan las herramientas utilizadas para alcanzar los objetivos planteados en el presente proyecto, así como su constante apoyo académico, siempre constante y cercano. Por su amistad y por recibirme en su laboratorio mostrando siempre una atención especial en el desarrollo de mi tesis.

A la Biól. Erika Monserrat Torres Morales por su ayuda para la generación de los registros electrofisiológicos utilizados. También por brindarme mucho de su tiempo y atención instruyéndome en los procesos experimentales.

Al Fís. Cesar Oliver Lara Figueroa y el Dr. Enoch Luis Baltazar por recibirme siempre con un amistoso y cálido ambiente de trabajo en el laboratorio, por sus pláticas intelectuales y futboleras.

A los miembros del jurado que revisaron esta tesis y cuyos comentarios enriquecieron el trabajo, desde sus bases teóricas, hasta sus posibles alcances. Al Dr. Oscar Fontanelli Espinosa, quien también fue el primer profesor que conocí en mi carrera, por avivar mi interés en las matemáticas de los fenómenos biológicos. Al Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas por sus valiosos comentarios sobre el trabajo escrito.

A mi mamá y papá, Martha Cámara (Ata) y Miguel Ángel Aguilar (Kikitos) por su inmenso amor servido en licuados de mamey cada mañana y sándwiches de mediodía. Por todos los consejos, siempre bienvenidos incluso sin ser pedidos. Por tanto consentir al niño que deseaba convertirse en "Paleontólogo futbolista" y cultivar ese sueño en cada etapa de mi vida. Los amo.

A mi amadísima Diana por enredarme en sus chinos desde el primer día de clases y mantenerme siempre y para siempre allí. Porque los obstáculos se libran fácilmente desde que aprendimos a volar tomados de la mano. Por alimentar mis sueños con los suyos y agigantarlos. Por llenarme de besos y abrazos siempre que lo necesito y nunca hacerme falta. Te amo chinita.

A toda mi familia y amigos por encontrarme sus agradables sonrisas en todas partes.

Al club del spike: Toro, Sebas, Milo, Chepe, Chips, Centella, Dominó, Dianx y Erick, por nunca injalar y tener los días (y noches) más divertidos juntos, por dejarse spikear y ganar en los videojuegos, dominó, morir por fax y romper mi sello.

A los otros dos mosqueteros: Gustavo y Erick por todos los recuerdos de apocalipsis zombis y copas de árboles.

A Carmina, Vero, Mitzi y Zubi por todo el tiempo juntos y nunca hacerme falta

Al Crew por ser siempre el mal ejemplo

Índice

1.-Resumen	1
2.-Introducción	2-21
Sección I.- Marco Biológico	2
Membrana celular y canales iónicos	2
La conductancia de un canal	3
Canales dependientes de voltaje	3
Canales de potasio	4
Kv10.1 (Eag1) canal potásico dependiente de voltaje	5
Características electrofisiológicas	6
Canalopatías	8
El cáncer como canalopatía	8
Sección II.- Marco Matemático	9
Análisis de Varianza	10
Análisis de la Densidad Espectral	17
3.-Justificación	22
4.-Objetivos	23
5.-Métodos	24-28
Modelo de estudio	24
Electrofisiología	24
Eliminación de los registros erróneos	25
Gráficas de varianza vs corriente promedio	26
Ajuste no-lineal y obtención de los parámetros unitarios	27
Funciones Lorentzianas en las gráficas de densidad espectral	27
6.-Resultados y Discusión	29-40
7.-Conclusiones	41-42
8.-Referencias	43-46
9.-Anexos	47

Resumen

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que gobiernan el flujo de partículas con carga eléctrica denominadas iones, permitiendo de forma regulada y selectiva su paso por difusión. El enfoque biomédico de su estudio ha identificado enfermedades llamadas "canalopatías", causadas por su funcionamiento o expresión anómala. Condiciones atípicas de canales de potasio han sido relacionadas con diversos tipos de cáncer, promoviendo su estudio fisiológico y biofísico para el desarrollo de posibles terapias. El canal potásico dependiente de voltaje, Kv10.1 (también denominado Eag1), presenta una sobreexpresión en tejidos tumorales, desregulación que sugiere un papel clave en el desarrollo de la enfermedad y como objetivo terapéutico potencial.

La conductancia es la propiedad física de un canal iónico que describe su accionar, pues denota la cantidad de flujo iónico que éste permite bajo determinadas condiciones. La investigación de posibles terapias contra el cáncer, dirigidas al canal Kv10.1, se centra en la búsqueda de moléculas inhibitorias, idealmente a bajas concentraciones, que puedan silenciar su actividad, es decir, que tengan un fuerte impacto, ya sea sobre su conductancia iónica o sobre la presencia misma del canal.

El presente trabajo describe el estudio de la conductancia a nivel unitario del canal Kv10.1 expresado en la línea celular HEK, modelo de estudio utilizado en el Laboratorio Nacional de Canalopatías para la búsqueda activa de compuestos inhibitorios. La conductancia unitaria fue estimada a partir de las fluctuaciones en estado no-estacionario de las corrientes macroscópicas generadas por la población de canales activos en toda una célula aislada (conocido como análisis de ruido, *Noise Analysis*), haciendo uso de dos métodos independientes: análisis de varianza (*Non-stationary Fluctuation Analysis*) y de distribución de la densidad espectral (*Spectral Density Distribution Analysis*).

Gracias a diversos criterios matemáticos seguidos para el correcto procedimiento, fue posible resolver la conductancia unitaria mediante ambos métodos. El resultado mediante el análisis de varianza fue $\gamma = 7.4 \pm 0.9$ y efectuando el análisis de distribución de la densidad espectral, $\gamma = 5.3 \pm 1.5$. Los intervalos de los valores obtenidos se solapan, siendo estadísticamente indistinguibles entre sí, así como coincidentes con los reportados en la literatura.

Membrana celular y canales iónicos

Las células de todos los seres vivos se encuentran delimitadas por una bicapa lipídica que separa el medio interior del exterior y constituye una barrera selectiva para el intercambio de materia en ambas direcciones (Alberts *et al.*, 2015). La así llamada "membrana celular" alberga múltiples elementos que le confieren funciones esenciales. Los canales iónicos son proteínas transmembranales formadores de poros macromoleculares que gobiernan el flujo de partículas con carga eléctrica, llamados iones, permitiendo su paso por difusión pasiva (Karp, 2012).

Desde su origen, los canales iónicos han evolucionado de la mano con la función de movilizar substratos iónicos al interior y exterior, alcanzando niveles extraordinarios de selectividad y rendimiento (Hille, 2001). Gracias a su pronta aparición en la historia de la vida, han sido involucrados en prácticamente todos los procesos biológicos a nivel celular, debido a la amplia gama de mecanismos fisiológicos que controlan su actividad (Hille, 2001). La prevalencia de estas macromoléculas proteicas en todos los linajes de seres vivos y lo esencial de los procesos que llevan a cabo, permite categorizarlas dentro de las moléculas más importantes incluso para el entendimiento mismo de la vida. Además de su destacado papel central en la excitabilidad celular, la lista de los procesos conocidos que en alguna etapa se remiten al accionar de un canal iónico, se incrementa continuamente.

Erwin Neher y Bert Sakmann desarrollaron entre los años setenta y ochenta el avance metodológico más importante en el estudio de biomoléculas a nivel unitario. Con la técnica electrofisiológica denominada *patch-clamp* es posible registrar la corriente a través de un pequeño parche de la membrana, esto permite resolver la actividad funcional de canales iónicos individuales (Hille, 2001). Hoy en día el entendimiento de muchos procesos biológicos se enfoca en el estudio de estas proteínas, sumándose disciplinas de auge reciente como la genómica, la optogenética y la imagenología.

La conductancia de un canal

En esencia, la función de un canal iónico es el permitir el movimiento de partículas con carga, lo que puede ser abordado como un fenómeno eléctrico. La biofísica conjunta el entendimiento de fenómenos físicos, contextualizándolos en sistemas biológicos. Muchos son los conceptos y principios físicos de la electricidad que deben tomarse en cuenta para el estudio de los canales iónicos, aunque para los fines del presente estudio se introducirá uno que da cuenta directa de la actividad del canal; la conductancia eléctrica.

En física, la medida de la facilidad de flujo de corriente entre dos puntos es la conductancia, ésta se mide en siemens (S) y se define por la ley de Ohm, estableciendo que la corriente de un circuito es igual al producto de la conductancia y la diferencia de voltaje. Para los canales iónicos, la conductancia es una medida natural de su habilidad para permitir el movimiento de iones (Hille, 2001). La conductancia de un canal iónico es una propiedad que puede ser modificada por factores externos, detectados por diversos mecanismos fisiológicos de los canales que le otorgan la inmensa gama de funciones a la que ya se ha hecho alusión.

Medir la conductancia de un canal iónico provee información para realizar conclusiones sobre su actividad bajo distintos escenarios fisiológicos, y en el caso de canales iónicos de interés biomédico, sobre su farmacología. Los efectos deseados de un fármaco pueden medirse directamente en cambios sobre la conductancia del canal, y de no verse reflejados en ella, pueden ser atribuidos a otros factores.

Canales dependientes de voltaje

Los canales iónicos tienen diversas formas regular su actividad (Fig.1). En general se distinguen tres grandes grupos de canales según su mecanismo de activación: 1) los canales dependientes de ligando, donde la unión de una molécula o partícula específica induce el estado conductor del canal. Estos canales son altamente específicos y funcionan principalmente como transductores de señales químicas para disparar señales eléctricas (Purves *et al*, 2015); 2) los canales dependientes de voltaje, cuya activación depende de cambios en el voltaje, siendo en última instancia regulados por el cambio en el campo eléctrico transmembranal (Hille, 2001). Estos canales propagan y gobiernan la señalización eléctrica y el potencial de acción en células excitables.

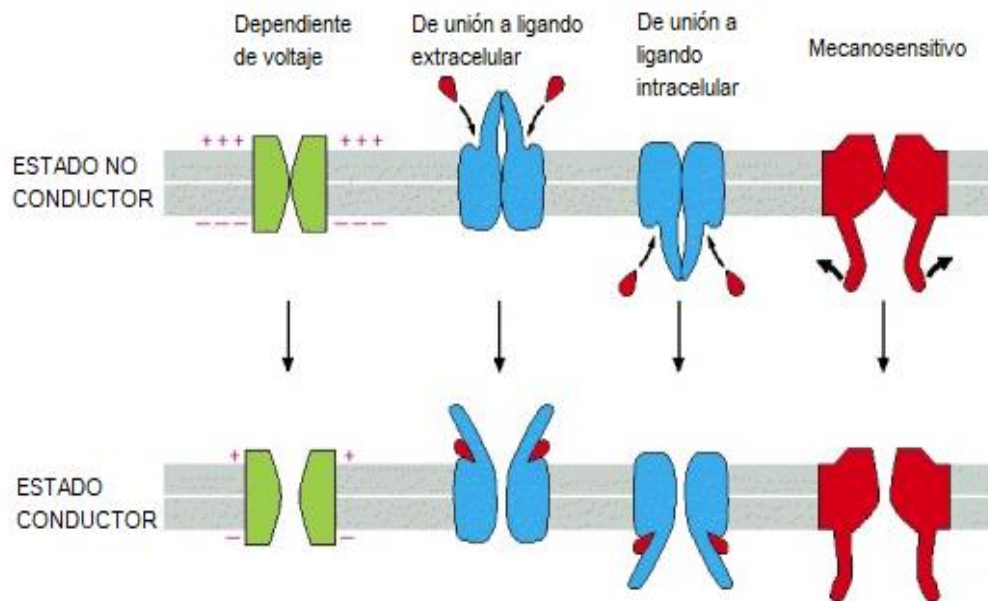


Figura 1.-Estados de actividad funcional de los canales iónicos. Los canales iónicos fluctúan entre el estado conductor (abierto) y no conductor (cerrado o inactivado) en respuesta a diversos estímulos como lo son (de izquierda a derecha) : cambios en el voltaje, unión de un ligando extracelular, unión de un ligando intracelular o estímulos mecánicos. (Modificado de Alberts *et al.*, 2008)

Canales de potasio (K⁺)

Los canales también pueden ser agrupados atendiendo al ión de mayor permeabilidad, de ahí que se les clasifique principalmente en Na⁺, K⁺ y Ca²⁺. A su vez, éstos pueden ser divididos en subgrupos bajo diversos criterios.

Los canales de potasio llevan el prefijo K en su nombre, y aquellos mediados por voltaje se denominan Kv, que constituyen el mayor subgrupo para dicho catión. Su estructura general es similar, están compuestos por cuatro subunidades alfa (α) que alineadas circularmente conforman la vía conductora y selectivamente permeable, cada una de ellas con seis dominios transmembranales (Litan & Langhans, 2015). Los segmentos 5 y 6 conforman el poro, mientras que las regiones transmembranales 1 a 4 constituyen los dominios sensibles al voltaje (Huang & Jan, 2014), que permiten la coordinación de apertura y cierre del canal con el papel fisiológico que desempeñan.

Kv10.1 (Eag1) canal potásico dependiente de voltaje

El canal Kv10.1, es un canal de potasio dependiente de voltaje, que recibe también el nombre de Eag1 por la homología de su secuencia con el canal *ether-a-go-go* de *Drosophila* (Wang, 2017). Forma parte de la superfamilia de canales de potasio KCNH, subfamilia Eag.

En los humanos, la expresión normal de este canal ocurre principalmente en el sistema nervioso central (SNC), en menor grado en la placenta, testículos, glándula adrenal y de forma transitoria en mioblastos (Wang, 2017). En el cerebro, actúa como un modulador del potencial de acción a nivel local, especialmente durante ráfagas de alta frecuencia, cuando otros canales de potasio sufren inactivación acumulativa (Mortensen *et al.*, 2015).

Como particularidades presenta dominios estructurales PAS(Per-Arnt-Sim) y CNB (*cyclic nucleotide binding*) en los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminal respectivamente, (Warmke *et al.*, 1991). La estructura general del canal Kv10.1 sigue el esquema de los canales dependientes de voltaje (Fig. 2)

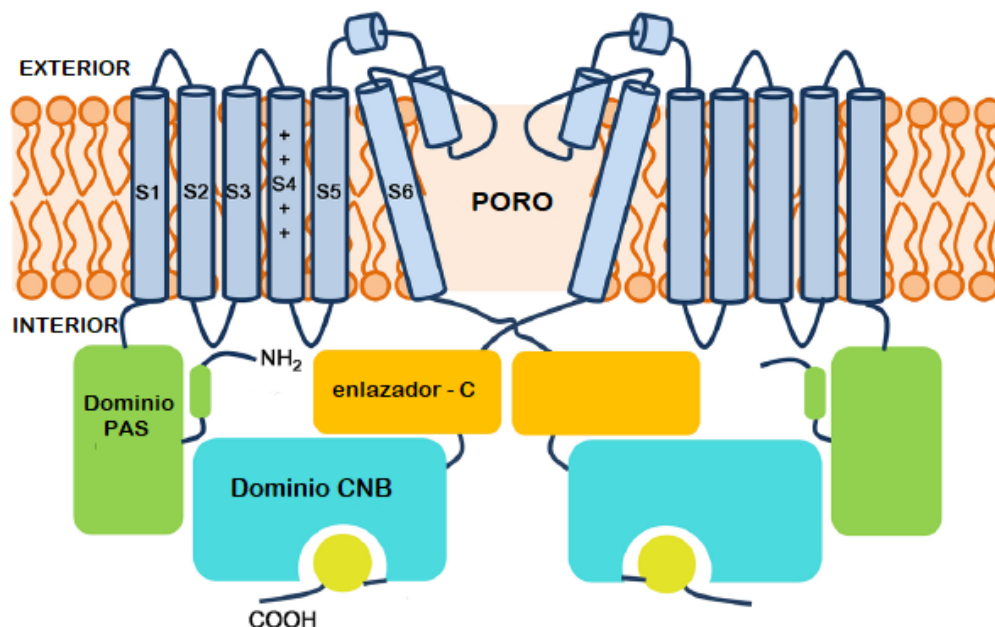


Figura 2.-Esquema de la estructura del canal Kv10.1. Representación de dos de las cuatro subunidades del canal iónico Kv10.1 o Eag1, se muestran los dominios más importantes de la proteína. El dominio PAS en el extremo amino y el dominio CNB en el extremo carboxilo unido a ligandos intrínsecos. Los

cilindros azules atravesando la membrana representan los seis segmentos transmembranales de cada subunidad (Modificado de Wang, 2017)

Este canal es de creciente importancia en el campo biomédico, pues un nivel elevado en su expresión fuera del SNC, ha sido identificado como un marcador y/o causa potencial de cáncer cervical, de colon y de seno (Wang, 2017). El Laboratorio Nacional de Canalopatías del Instituto de Fisiología de la UNAM en México, participa en la búsqueda activa de agentes farmacológicos con actividad inhibitoria sobre el canal Kv10.1.

Características electrofisiológicas

Las características de las corrientes macroscópicas producidas por el canal Kv10.1 (Fig. 3) han sido estudiadas en sistemas heterólogos (Wang *et al.*, 2017), expresando mediante transfección, de manera transitoria o estable el exón del gen que lo codifica.

La activación del canal es lenta y no presenta inactivación (Wang *et al.*, 2017). En ocasiones las corrientes macroscópicas obtenidas mediante la técnica electrofisiológica de *patch clamp*, también conocida como fijación de membrana (Fig. 3), pueden mostrar un descenso en su magnitud (*run-down*), el cual se debe a una disminución del número de canales funcionales aportando a la corriente macroscópica con el paso del tiempo.

Figura 3.- Corriente representativa del canal Kv10.1. a) La línea negra corresponde a la corriente registrada mediante *patch-clamp* manual en la configuración de célula completa (*whole cell*), en la línea celular HEK, expresando de forma estable el canal Kv10.1 por transfección. b) Se muestra el curso temporal del impulso suministrado a la célula para provocar la apertura de los canales.

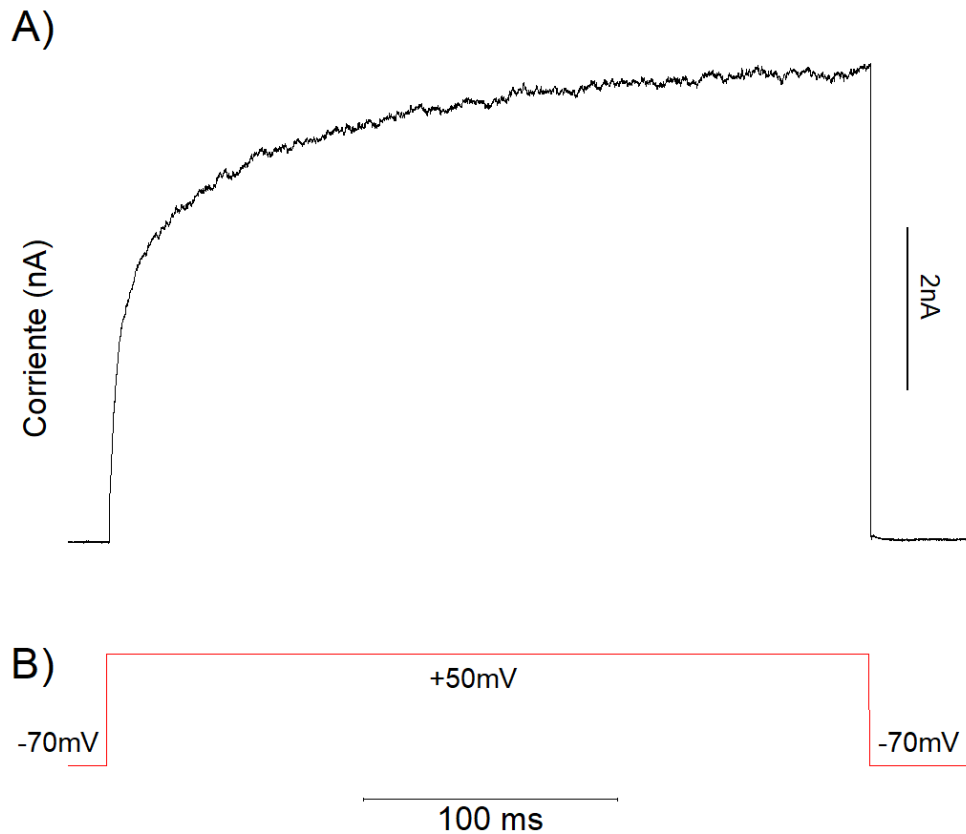


Figura 3.- Corriente macroscópica representativa del canal Kv10.1. La figura muestra datos experimentales provenientes de la técnica electrofisiológica de patch clamp, en la configuración de célula completa. a) La línea negra corresponde a la corriente registrada en células HEK, expresando por transfección y de forma estable el canal Kv10.1. b) Curso temporal del pulso de voltaje suministrado a la célula para provocar la apertura de los canales, generándose así la corriente. En ambos gráficos el eje x, corresponde al tiempo en escala similar.

En concentraciones iónicas similares a las fisiológicas, el canal recombinante proveniente de la mosca *Drosophila melanogaster* presenta una conductancia unitaria de 4.9 pS expresado heterologamente en ovocitos por inyección de su RNA mensajero (Bruggemann *et al.*, 1993), mientras que la conductancia unitaria es de 7.4 pS en células HEK expresando el gen Eag de rata (Stansfeld *et al.*, 1996) y de 8.4 pS en mioblastos expresando el hEag1 (Bijlenga *et al.*, 1998); 7.5 pS también en rEag1 (Hsu *et al.*, 2012) y 19.73 pS para hKv10.1 (Zakany *et al.*, 2019).

Canalopatías

Debido a la amplia y conspicua prevalencia de los canales iónicos en procesos fisiológicos, la ocurrencia de condiciones anómalas de estas proteínas puede derivar en múltiples perturbaciones a la homeostasis del organismo. Al conjunto de enfermedades provocadas por la pérdida o aumento de actividad de los canales iónicos, se les denomina canalopatías.

En el genoma humano existen al menos 232 genes distintos que codifican para canales iónicos (Nayak *et al.*, 2009). Es por ello que su condición anómala puede derivar en condiciones patológicas bajo múltiples escenarios, éstas pueden ser tanto adquiridas a lo largo de la vida del organismo, cómo heredadas (Kim, 2014). Al igual que la lista de los roles fisiológicos de los canales, la lista de enfermedades conocidas que han podido ser etiquetadas como canalopatías es cada vez mayor gracias a múltiples estudios recientes, esto ha provocado también el incremento en importancia de líneas investigación centradas en la búsqueda de agentes terapéuticos novedosos con actividad sobre distintos canales iónicos (Litan & Langhans, 2015).

El cáncer como canalopatía

Además de regular el potencial de membrana, la homeostasis iónica y la señalización eléctrica, los canales iónicos juegan un rol importante en la proliferación, migración, apoptosis y diferenciación celular (Litan & Langhans, 2015), procesos determinantes en la progresión del cáncer.

Si bien sería inadecuado resumir al cáncer únicamente como canalopatía, existe evidencia reciente de que ciertos canales iónicos pueden ser piezas clave en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Litan & Langhans, 2015), describiéndose inicialmente en glioblastoma y granuloblastoma (Sontheimer, 2014; Hatten & Roussel, 2011).

El papel de los canales iónicos en el cáncer se centra en la regulación de los cambios en el volumen de las células, señalizados particularmente con flujos de potasio (Litan & Langhans, 2015), este proceso es similar a lo observado en la embriogénesis, sanación de heridas y migración neuronal. Existen estudios que muestran que, al inhibir la actividad de canales potásicos, se mitiga la migración celular, pues no pueden ocurrir los cambios de volumen celular necesarios (Weaver *et al.*, 2006), o de manera alternativa, interrumpiendo cascadas de señalización con

proteínas de adhesión que interrumpen el ciclo celular previniendo la proliferación. (Pardo *et al.*, 1999)

El canal iónico Kv10.1 ha sido estudiado como un posible objetivo terapéutico, debido a que su sobreexpresión está relacionada con el surgimiento potencial de tumores, y su expresión anómala se correlaciona con baja supervivencia del paciente en múltiples tipos de cáncer (Pardo & Stühmer, 2008).

Sección II. Marco matemático

Como fue mencionado antes, la conductancia es un parámetro que da cuenta directa de la actividad de un canal, este valor puede ser estimado por diversos métodos.

Las técnicas electrofisiológicas actuales permiten registrar la actividad de un solo canal y con ello conocer su probabilidad de apertura ante cierto estímulo, la conductancia unitaria y la corriente que pasa a través de un sólo canal (Hille, 2001). A pesar de ser tan informativo, un registro de canal unitario es una técnica electrofisiológica complicada debido al control necesario sobre el nivel de expresión del canal a estudiar en el modelo de estudio, que requiere además de ciertas condiciones experimentales y amplia preparación del experimentador (Heinemann & Conti, 1992). Cuando el canal de interés existe en gran cantidad en la membrana, realizar registros de canal unitario no representa la opción más sencilla, pues aislar un canal individual resulta imposible en la práctica. Tal es el caso del modelo utilizado en este estudio, la línea celular HEK-293 transfectada para la expresión constitutiva del canal Kv10.1.

De manera alternativa a los registros de canal único, existen métodos basados en propiedades y observaciones estadísticas sobre conjuntos de registros electrofisiológicos, que permiten calcular el valor de la conductancia unitaria. En el presente trabajo utilizamos dos de ellos: análisis de varianza y análisis de densidad espectral.

Análisis de Varianza

El objetivo del análisis de varianza, también conocido como análisis de ruido, es relacionar observaciones macroscópicas, como la corriente total de una célula aislada, con parámetros moléculares, tales como la corriente de un sólo canal, el número de canales funcionales en la membrana y la probabilidad de que los canales se encuentren abiertos bajo una condición dada (Heinemann & Conti, 1992).

De una manera muy intuitiva, en 1980 fue descrito el análisis de fluctuaciones, "*Nonstationary Fluctuation Analysis*" (Sigworth, 1980), un método basado en la distribución parabólica de la varianza de un ensamble de registros (Fig.4), cuyas corrientes registradas provienen de la población total de canales funcionales en cada célula. Este procedimiento de análisis tiene como finalidad conocer: el número de canales en la preparación, corriente unitaria, la máxima probabilidad de apertura y conductancia unitaria.

Desde su publicación original, el análisis de ruido ha sido ampliamente utilizado, citado en más de 250 publicaciones científicas. Al día de hoy existen investigaciones que continúan haciendo uso del análisis de fluctuaciones para profundizar en los mecanismos por los cuales distintas moléculas influyen la actividad de un canal iónico de interés, por ejemplo, para saber si la acción inhibitoria se debe a un efecto sobre la corriente que atraviesa cada canal o sobre el número de canales (Herrmann *et al.*, 2012) y conocer la corriente unitaria cuando no existe la posibilidad de ser resuelta por *patch-clamp* (Scheppach & Robinson, 2017). La importancia de este análisis trasciende el campo biomédico, siendo también utilizado para desentrañar y explicar los mecanismos moleculares que acontecen durante un evento fisiológico de interés (Lanore & Angus, 2016).

El análisis de fluctuaciones no estacionarias presenta las siguientes ventajas (Heinemann & Conti, 1997):

- La configuración de *patch-clamp* más sencilla de realizar, célula completa (*whole cell*), representa la preparación idónea para realizar el análisis de varianza, debido a que la proporción de ruido provocado por los canales iónicos excede en varios órdenes al producido de manera instrumental.
- Se puede obtener el número de registros necesarios para efectuar el análisis de una manera sencilla y variando las condiciones experimentales en una misma preparación.

- El análisis no involucra nunca la elección subjetiva de eventos y puede ser fácilmente automatizado.

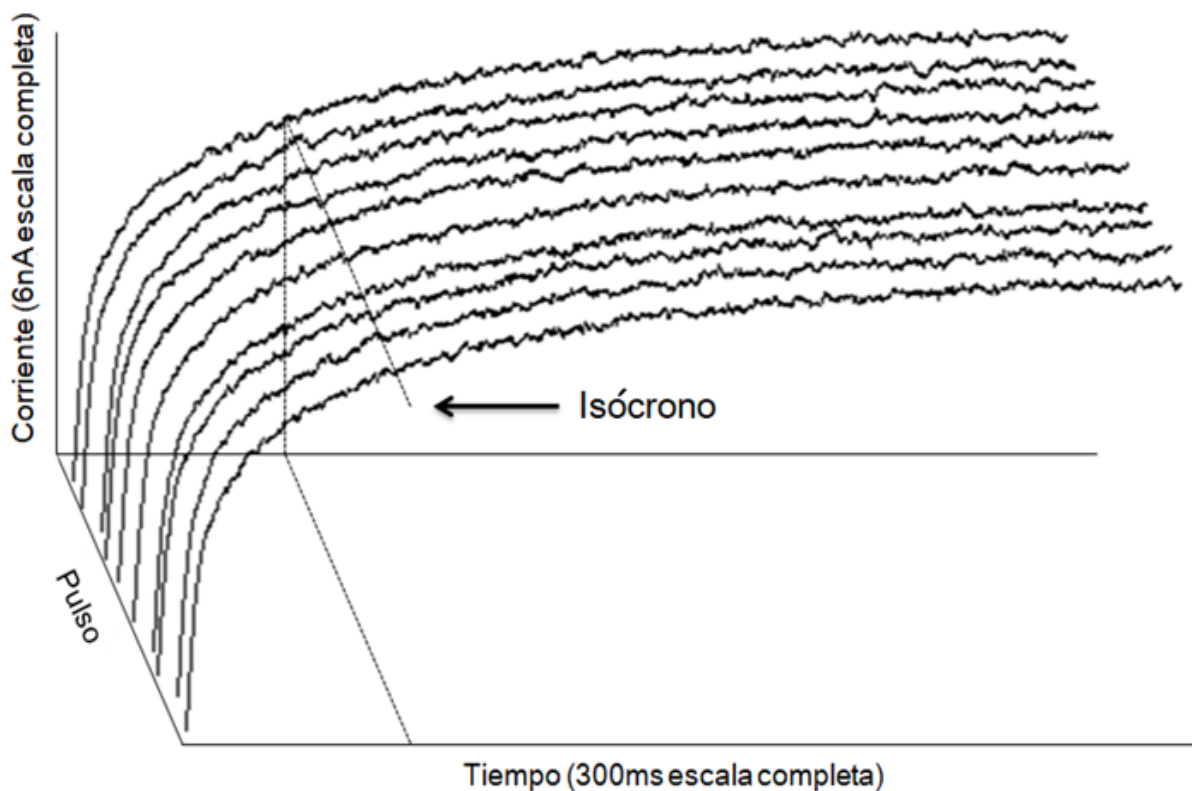


Figura 4.- Isocrono. En un ensamble de registros, un isócrono es una línea en el eje temporal que atraviesa a todos los registros en el punto equivalente en cada uno de ellos. La varianza en el análisis de ruido se calcula a lo largo de un isocrono, es decir, las fluctuaciones en torno a la corriente promedio para un tiempo específico del conjunto de registros. La figura fue realizada con registros obtenidos en el Laboratorio Nacional de Canalopatías durante el desarrollo de esta tesis, mismos que fueron utilizados para el análisis posterior. Basada en la gráfica original de Álvarez *et al.*, 2002.

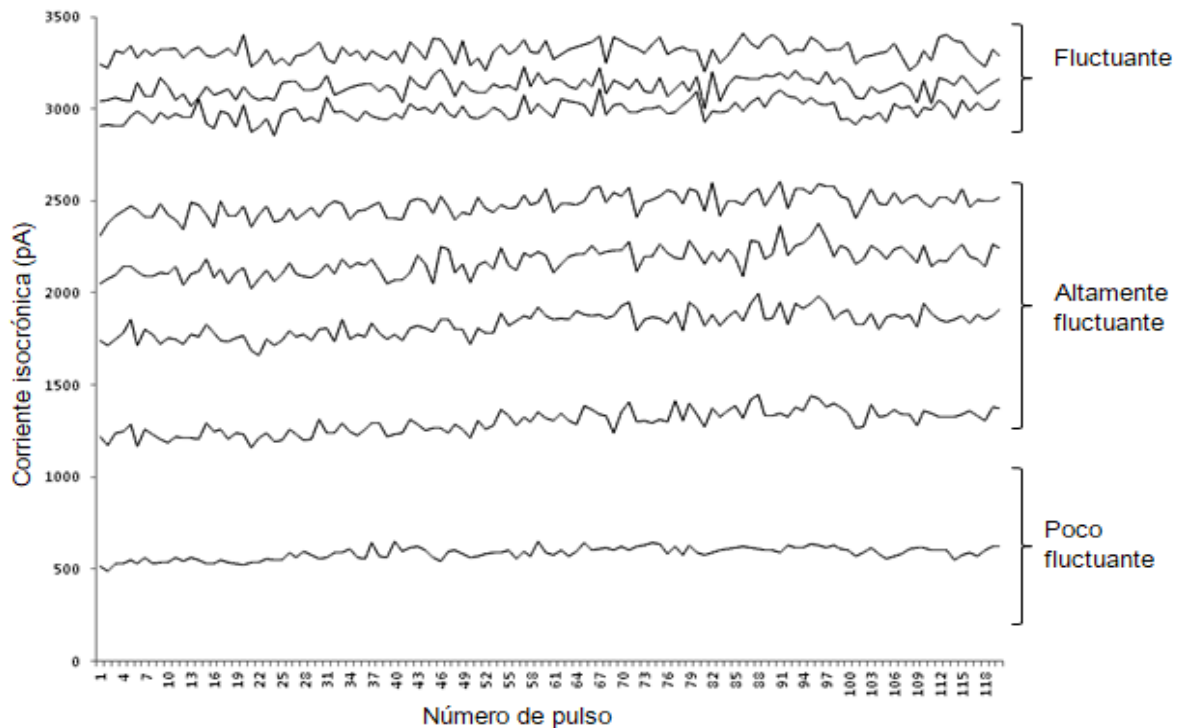


Figura 5.- Varianza isocrónica. Se muestran ocho isocronos tomados en tiempos distintos a lo largo del ensamble de la figura anterior. Cada trazo muestra el valor instantáneo de la corriente obtenida para un mismo tiempo en cada uno de los 120 pulsos. La dispersión de la corriente es menor en los extremos, en comparación con los valores medios donde los trazos son más fluctuantes. La figura fue realizada con registros obtenidos en el Laboratorio Nacional de Canalopatías, mismos que fueron utilizados para el análisis posterior. Basada en la gráfica original de Álvarez et al., 2002.

Inferencia del modelo

Tanto la teoría del análisis de la varianza de un ensamble de registros electrofisiológicos, como aquella del análisis de su distribución espectral, se basan en tres suposiciones fundamentales (Sigworth, 1980), originadas en la naturaleza y actividad de los canales iónicos:

1. Existen únicamente dos estados o conformaciones posibles: conductor y no-conductor, asignando una probabilidad de apertura P_o al estado conductor.
2. El proceso de apertura y cierre (*gating*) de cada canal es independiente del estado conformacional de los otros canales.
3. La población de canales es homogénea, los canales son similares entre si.

Para poder describir las ecuaciones que subyacen el análisis de fluctuaciones de Sigworth (1980), es necesario definir los siguientes conceptos.

Corriente macroscópica (I). Es la corriente generada por el total de canales, observada en un registro electrofisiológico proveniente de toda una célula. Es el producto de distintos elementos, los cuales son: la probabilidad de apertura (P_0), el número de canales (N), la conductancia (γ) y la diferencia entre el voltaje de membrana y el voltaje reverso.

Probabilidad de apertura (P_0). Los canales iónicos, debido a estímulos externos, fluctúan poblacionalmente con valores continuos de probabilidad de apertura entre 0 y 1, donde 0 significaría que todos los canales estuvieran cerrados y 1, que todos estuvieran abiertos. Es necesario hacer mención de que los límites de dicho valor son teóricos, no necesariamente observables en una preparación real.

Número de canales (N). Es la cantidad total de canales funcionales aportando la corriente observada en un registro.

Conductancia unitaria (γ). Propiedad fundamental para describir el accionar de un canal iónico. El valor de la conductancia unitaria denota la permisividad de flujo iónico a través de un sólo canal.

Corriente unitaria (i). Similar a la conductancia unitaria, la corriente unitaria denota la amplitud del flujo iónico a través de un sólo canal.

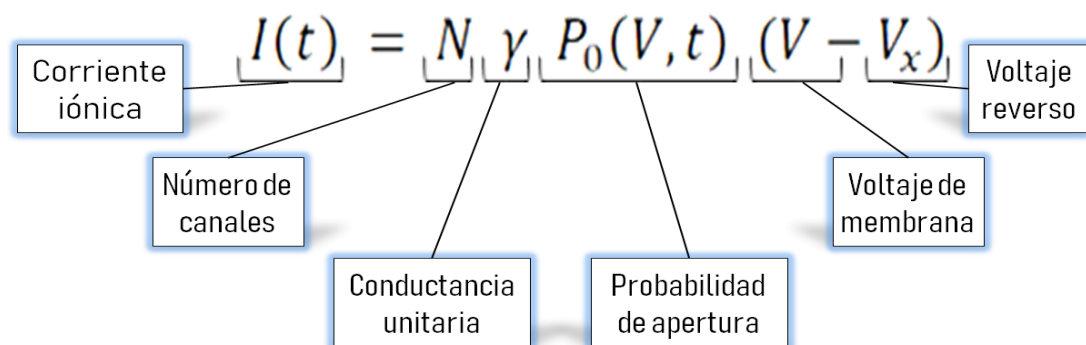


Figura 6.- Corriente macroscópica. Elementos que conforman la corriente total observada en un registro. Con base en la ley de Ohm, esta ecuación surge al considerar lo siguiente: La corriente que atraviesa por cada canal, es igual al producto de la conductancia unitaria (γ) y la sustracción del voltaje reverso al voltaje de membrana. Al multiplicarse por el número total de canales en la membrana, se obtiene la corriente máxima de la célula mientras que la probabilidad de apertura en un momento específico permite acotar dicha corriente máxima a la fracción de canales abiertos.

El ruido de la corriente macroscópica se refiere al cambio en la corriente macroscópica generado por la apertura o cierre espontáneo y aleatorio de un canal individual (Alvarez *et al.*, 2002), dichas desviaciones espontáneas constituyen una gran proporción de la varianza de un ensamble de registros (Fig.5), a su vez, la varianza está en función de P_o , N e i (Fig.7).

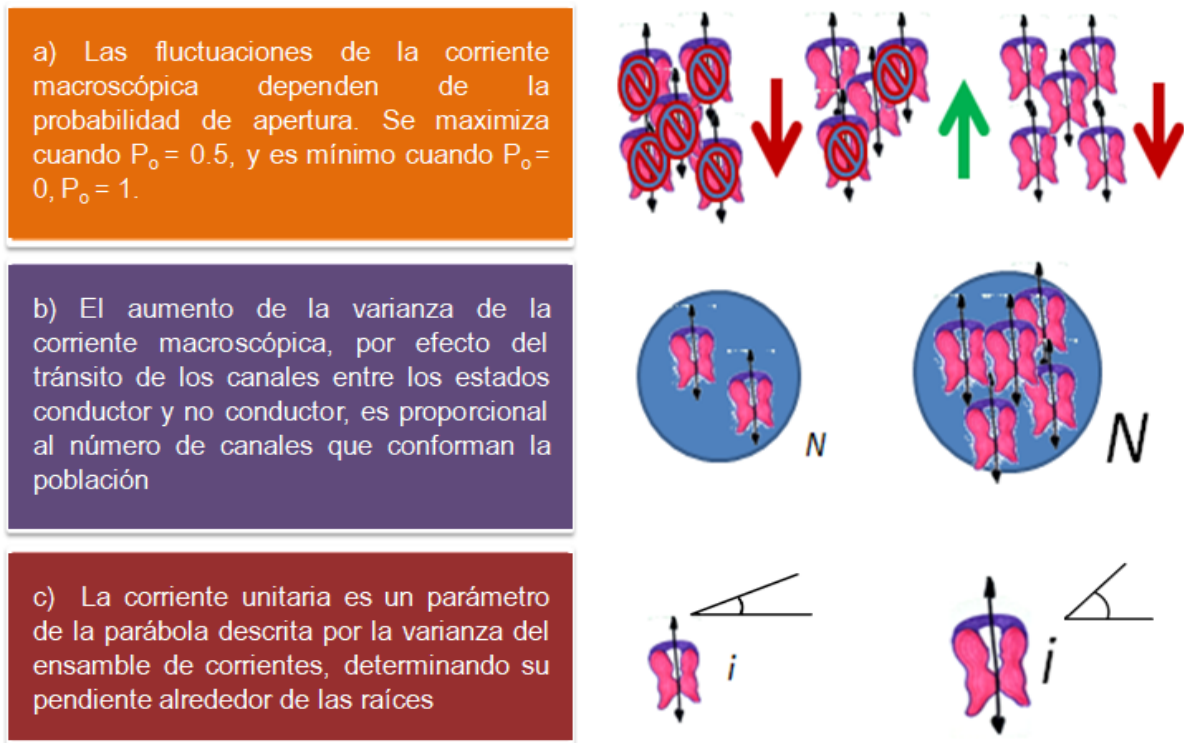


Figura 7. El “ruido” en contexto. Relaciones del ruido con la probabilidad de apertura, el número de canales en la membrana y la corriente unitaria del canal.

Ecuaciones del modelo

Si asumimos una membrana con solamente un canal, (p) es la probabilidad de encontrarlo abierto y (q) probabilidad de encontrarlo cerrado,

$$p + q = 1.$$

La corriente promedio de dicha membrana será entonces el producto de la probabilidad de encontrarle abierto (p) y su corriente unitaria (i),

$$\langle I \rangle = i p.$$

La varianza de la corriente proviene de la suma de cada posible desviación cuadrática del promedio, dos en total debido a que se considera que los canales sólo presentan dos estados, 0, el estado no conductor, e i , el estado conductor multiplicada por su probabilidad,

$$\sigma_I^2 = q(0 - ip)^2 + p(i - ip)^2.$$

Si reducimos y consideramos ahora una membrana con N canales, ambas, corriente y varianza serán N veces mayores,

$$\langle I \rangle = Ni p,$$

$$\sigma^2 = Ni^2 pq.$$

Combinando las ecuaciones anteriores, obtenemos la siguiente ecuación que describe la varianza en función de la corriente macroscópica promedio, la corriente unitaria y el número de canales funcionales. Esa ecuación es una parábola en el plano σ^2 vs $\langle I \rangle$,

$$\sigma_I^2 = i \langle I \rangle - \frac{\langle I \rangle^2}{N}. \quad (1)$$

Es conveniente transformar el resultado de la corriente unitaria estimada en un valor de conductancia unitaria con la siguiente ecuación:

$$\gamma = \frac{i}{E_{com} - E_{rev}}, \quad (2)$$

donde E_{com} y E_{rev} son el voltaje de mantenimiento y el suministrado a la célula durante el pulso.

El gráfico de la corriente macroscópica promedio contra la varianza corresponde a una parábola (Fig.8), a partir de la cual deben destacarse los siguientes hechos:

1.- Los puntos en los que el gráfico cruza el cero corresponden a la mínima ($P_{o_{min}}$) y máxima ($P_{o_{max}}$) probabilidad de apertura. No hay fluctuaciones (ruido) cuando todos los canales están cerrados, ni cuando todos están abiertos.

2.- El límite de la derivada $\frac{d\sigma^2}{d\langle I \rangle}$ por la izquierda cuando $\langle I \rangle$ tiende a 0, es igual a la corriente unitaria (i). Esto significa que el segmento pseudolinear del inicio de la

corriente macroscópica promedio $\langle I \rangle$ tiene el mayor peso que el resto de la parábola para la medición de la corriente unitaria.

$$\begin{aligned} \frac{d\sigma^2}{d\langle I \rangle} i \langle I \rangle - \frac{\langle I \rangle^2}{N} &= i - \frac{2\langle I \rangle}{N} \\ \lim_{\langle I \rangle \rightarrow 0} i - \frac{2\langle I \rangle}{N} & \\ &= i - \frac{2\langle I \rangle}{N} \\ &= i \end{aligned}$$

3.- Utilizando el criterio de la primera derivada, es posible observar que la parábola alcanza su punto de inflexión cuando la probabilidad de encontrar al canal abierto es la misma que de encontrarle cerrado, $P_o = 1/2$, punto en el que existe una mayor cantidad de transiciones individuales de los canales entre ambos estados.

$$\begin{aligned} \frac{d\sigma^2}{d\langle I \rangle} i \langle I \rangle - \frac{\langle I \rangle^2}{N} &= i - \frac{2\langle I \rangle}{N} \\ i - \frac{2\langle I \rangle}{N} = 0 &\therefore \langle I \rangle = Ni \frac{1}{2} \end{aligned}$$

Los parámetros, corriente unitaria i y número de canales N , se obtienen a partir del ajuste no lineal de los datos observados de corriente macroscópica promedio y varianza con la ecuación (1). La probabilidad de apertura más alta, alcanzada durante el registro, puede calcularse dividiendo la corriente macroscópica promedio máxima observada $\langle I \rangle_{max}$, entre la corriente esperada para una membrana con N canales abiertos, $P_{max} = \frac{\langle I \rangle_{max}}{i N}$.

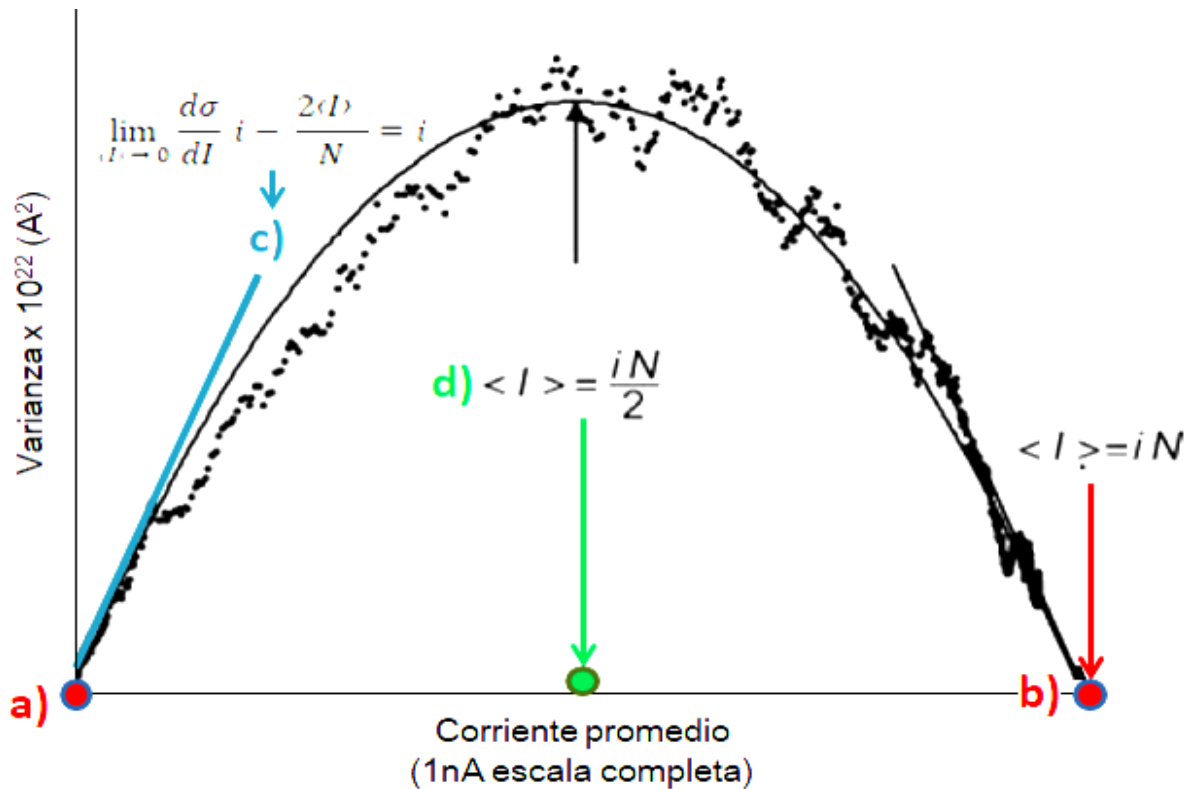


Figura 8.- Varianza en función de la Corriente Macroscópica Promedio. Parábola describiendo la distribución de la varianza en función de la corriente promedio del ensamble. No hay ruido cuando todos los canales están cerrados, ni cuando todos están abiertos (a y b, respectivamente). Cuando la corriente promedio tiende a cero por la izquierda, la pendiente de la parábola es igual al valor de la corriente unitaria (c). La varianza es máxima cuando $P_o = 0.5$.(d). (Modificado de Álvarez *et al.*, 2002).

Análisis de la Densidad Espectral

Las características en el dominio del curso temporal y en el dominio de la frecuencia de las fluctuaciones de la corriente macroscópica, reflejan también los eventos unitarios subyacentes (Gray, 1994). La autocovarianza es una medida de similitud de una señal consigo misma, ésta surge de la estimación de las diferencias entre pares de puntos de la señal separados por un intervalo de tiempo determinado. Para entender la relación entre el curso temporal y las fluctuaciones de la corriente macroscópica, debe considerarse la autocovarianza entre los valores de una señal con ruido (Fig.9), obtenida en intervalos temporales denotados como Δt , dados por la ecuación:

$$C(\Delta t) = \sum \frac{x(t).x(t+\Delta t)}{n-1},$$

donde $x(t)$ es el valor de la señal en el tiempo t , mientras que $x(t + \Delta t)$ es el valor de la señal después de un incremento de tiempo denotado como Δt , y n es el número de valores muestreados en dicho intervalo. La amplitud de la corriente para cada registro se mide relativa al valor promedio.

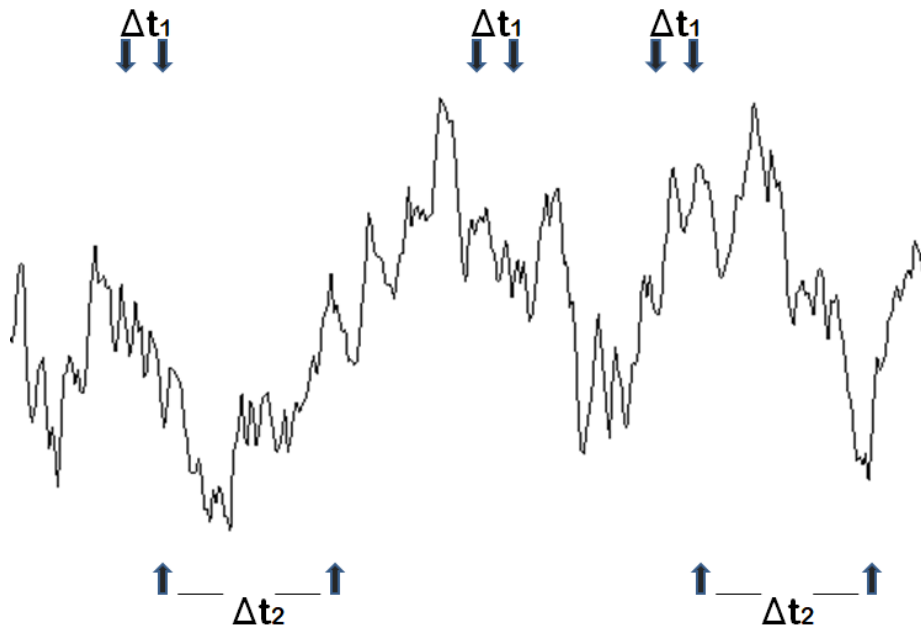


Figura 9. Autocovarianza de la corriente macroscópica. La autocovarianza se calcula tomando el producto de la magnitud de la corriente al tiempo (t) y al tiempo ($t + \Delta t$). Cuando el intervalo de tiempo es más pequeño que los principales componentes de frecuencia de las fluctuaciones en la corriente (ruido), entonces la autocovarianza será alta, ya que la probabilidad de que los canales fluctúen entre de uno a otro estado en dicho periodo de tiempo, es baja. A medida que el intervalo de tiempo se incrementa, la probabilidad de que un canal pueda fluctuar es mayor. La figura fue realizada con registros obtenidos en el Laboratorio Nacional de Canalopatías, mismos que fueron utilizados para el análisis posterior. (Modificada de Gray, 1994)

Para poder hacer conclusiones a nivel de canal unitario debe considerarse que, si la población de canales que aportan a la corriente macroscópica es homogénea, entonces la autocovarianza es igual a N veces la autocovarianza de un sólo canal (Gray, 1994).

$$C(\Delta t) = N \sum \frac{x(t) \cdot x(t + \Delta t)}{n - 1}$$

$$= N [i(t) \cdot i(t + \Delta t)]$$

donde $i(t)$ es el valor de la corriente que atraviesa por un sólo canal en el tiempo t , mientras que $i(t+\Delta t)$ es la corriente del mismo canal en $t+\Delta t$.

La corriente unitaria en un determinado tiempo puede ser igual a cero o a i , dados por los estados no conductor y conductor del canal respectivamente.

El valor promedio del producto $i(t) \cdot i(t+\Delta t)$ está dado por la probabilidad de que el canal se encuentre en su estado conductor en ambos tiempos, t y $t + \Delta t$.

$$C(\Delta t) = Ni^2 P_{abierto\ en\ t\ y\ t+\Delta t}$$

Esto puede reformularse como el producto de la ocurrencia independiente de ambos eventos (Gray,1994). Dado que la probabilidad de apertura en el tiempo t , es simplemente P_o , entonces la probabilidad de que el canal se mantenga abierto después de Δt es igual a la probabilidad de que el tiempo de vida (*lifetime*) del canal (período mínimo que el canal se mantiene en su estado conductor) sea mayor a Δt . Cuya distribución para un valor promedio τ está dada por la siguiente ecuación (Gray,1994):

$$P[lifetime \geq \Delta t] = e^{-\Delta t/\tau}$$

$$C(\Delta t) = \bar{I}i e^{-\Delta t/\tau}$$

Convenientemente puede escribirse en términos de conductancia por las propiedades Óhmicas de la membrana (Neumcke & Stämpfli, 1981).

$$C(\Delta t) = \bar{I}\gamma(V - V_{eq})e^{-\Delta t/\tau}$$

La gráfica de la autocovarianza en función de Δt decae exponencialmente regulada por una constante igual al valor promedio de tiempo de apertura (*lifetime*) del canal (Fig. 8A). Algunos programas de análisis para datos electrofisiológicos, como *Clampfit* y *PulseTools* contienen herramientas para el cálculo del espectro de frecuencias de la señal (*power spectrum density*). Dicho espectro es la transformada de Fourier, la cual consiste en descomponer una función (en este caso la autocovarianza de una señal eléctrica) en sus componentes oscilatorios (armónicos, representados por funciones oscilatorias, típicamente sinusoidales) a lo largo de un dominio continuo de frecuencias.

La función de la densidad espectral $G(f)$ es la siguiente:

$$G(f) = 4\bar{I}\gamma(V - V_{eq}) \frac{1}{1+(f/f_c)^2},$$

donde f es la frecuencia y f_c (llamada "corner frequency") es la frecuencia en la que el valor del cuadrado de la corriente (*power*) ha disminuido a la mitad respecto a $G(0)$, que es a su vez el límite de la densidad espectral cuando la frecuencia se aproxima a cero (Gray, 1994).

La anterior es una función Lorentziana que al ser graficada en un plano log/log (Fig. 10) muestra ciertas propiedades (Gray, 1994)

La corriente unitaria puede ser estimada dividiendo la varianza del espectro Lorentziano entre la corriente promedio. Dicha varianza está dada por el área bajo la curva descrita por la función de densidad espectral y se puede calcular a partir de la integral de la Lorentziana ajustada entre 0 e ∞ (DeFelice, 1981)

$$\sigma_I^2 = \frac{\pi G(0) f_c}{2}.$$

La relación entre la varianza y la corriente promedio está dada por la ecuación

$$\frac{\sigma_I^2}{\langle I \rangle} = i (1 - P_o) \quad \therefore i = \frac{\sigma_I^2}{\langle I \rangle (1 - P_o)}$$

Al resolver las dos ecuaciones anteriores para la conductancia (γ), partiendo de la ley de Ohm ($\gamma = i / V - V_{eq}$), obtenemos la siguiente ecuación para calcularla:

$$i = \gamma (V - V_{eq}) = \frac{\sigma_I^2}{\langle I \rangle (1 - P_o)}$$

$$\therefore \gamma = \frac{\pi G(0) f_c}{2 \langle I \rangle (V - V_{eq}) (1 - P_o)} \quad (3)$$

El método de análisis de la densidad espectral de fluctuaciones en la corriente macroscópica para el cálculo de la conductancia unitaria es totalmente independiente al del análisis de varianza. Gracias a ello es posible aplicar ambos tipos de análisis a datos provenientes de un mismo conjunto de registros y comparar los resultados obtenidos. Si el resultado de dicha contrastación arrojase resultados similares, se tendría entonces una robusta indicación de haber caracterizado correctamente el

fenómeno así estudiado, es decir, el valor de la conductancia de canal único y sus características cinéticas.

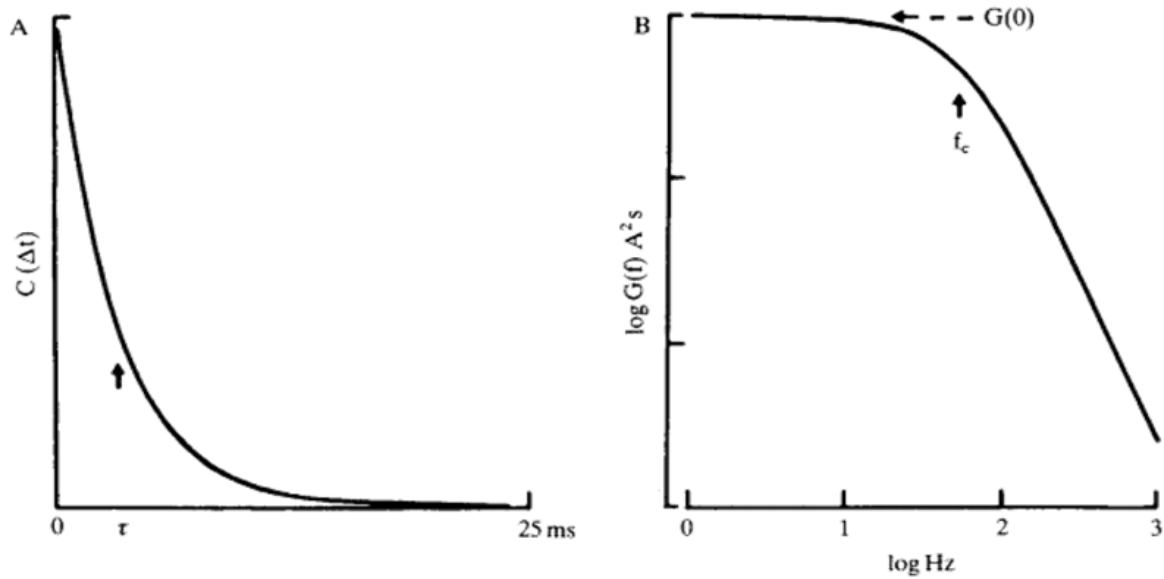


Figura 10. Autocovarianza y densidad espectral. La autocovarianza de una función decae exponencialmente con una constante de tiempo igual al valor promedio de la corriente macroscópica (A). Cuando la corriente macroscópica es consecuencia de eventos individuales de aparición aleatoria y amplitud similar, el espectro de frecuencias describe una curva Lorentziana al graficarse en un plano log/log, siendo posible observar la frecuencia de corte (f_c) y la asíntota para la frecuencia cero $G(0)$. (Modificada de Gray, 1994).

Justificación

El Laboratorio Nacional de Canalopatías participa activamente en la búsqueda de compuestos inhibitorios del canal Kv10.1, haciendo ensayos electrofisiológicos mediante *patch-clamp* manual y automatizado en la línea celular HEK 293 transfectada para la expresión estable del gen Kv10.1. Esta proteína se encuentra sobre-expresada presentando un elevado número de canales en las membranas de las células estudiadas en el laboratorio, lo cual imposibilita la obtención de registros de canal único para poder conocer las propiedades a nivel de molécula individual, y discernir entre los elementos que afectan la corriente macroscópica observada bajo distintas condiciones experimentales.

A partir de los datos generados para la descripción general de la actividad del canal en condiciones control, es posible efectuar un procedimiento para analizar las fluctuaciones en la conductancia de la membrana (*nonstationary noise*), causada por la apertura y cierre de canales iónicos. El uso de dicha metodología puede revelar el número de canales, la corriente unitaria que atraviesa por cada canal y la máxima probabilidad de apertura del canal, información muy útil para poder realizar conclusiones sobre el efecto de los compuestos con actividad biológica sobre el canal que pudiesen ser así encontrados. Para los mismos objetivos, puede efectuarse un análisis distinto y completamente independiente, con ecuaciones que describen densidades espectrales (*power spectrum analysis*), a fin de encontrar resultados coincidentes que soporten el primer reporte de la conductancia del canal Kv10.1 por ambos métodos.

Así mismo, la estandarización del proceso de análisis con las condiciones generales que presenta el modelo de estudio será un primer paso para conducir estudios sobre la actividad de los compuestos inhibitorios a nivel de canal unitario en el modelo de estudio.

Objetivos

Objetivo general

Reportar por primera vez mediante ambos métodos, la conductancia unitaria del canal oncogénico Kv10.1, efectuando un análisis de la fluctuación de las corrientes macroscópicas mediante análisis de varianza y de densidad espectral. Haciendo uso de datos provenientes de la técnica electrofisiológica de *patch clamp* manual de los experimentos realizados en el Laboratorio Nacional de Canalopatías para la caracterización de las corrientes eléctricas generadas en respuesta a protocolos de estimulación de pulsos fijos de voltaje.

Objetivos particulares

- Caracterizar cuantitativamente los distintos componentes (número de canales, corriente unitaria y probabilidad máxima de apertura) de la corriente macroscópica provocada por el canal Kv10.1.
- Generar mediante *patch clamp* manual los datos experimentales necesarios, con la cantidad y calidad necesaria para estimar la conductancia del canal en forma robusta, comparando dicho resultado con lo reportado previamente en la literatura.
- Estandarizar el proceso de análisis de las fluctuaciones de la corriente macroscópica en estado no estacionario (*Nonstationary fluctuation analysis*) de la varianza y de la distribución de densidades espectrales y de distribución de densidades espectrales (*Power spectrum distribution*) sobre el modelo de estudio, instrumentación y condiciones típicas de experimentación del Laboratorio Nacional de Canalopatías, a fin de consolidar una guía teórica y metodológica para la realización de futuros estudios con nuestro modelo de estudio.

Métodos

Modelo de estudio

Para el estudio de la actividad del canal iónico Kv10.1, fue utilizada la línea celular HEK 293, expresando dicha proteína de forma constitutiva. El proceso de clonación y transfección del gen fue llevado a cabo en el laboratorio del Dr. Walter Stühmer del Instituto Max Planck. Las células fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM, 10% suero fetal bovino, adicionado con zeocina para conferir selectividad al cultivo. Esta línea celular es referente en la caracterización de la fisiología del canal Kv10.1 y ha sido ampliamente utilizada en el Laboratorio Nacional de Canalopatías, tanto para la caracterización del canal bajo condiciones normales, como en la búsqueda y evaluación de efectos provocados por toxinas polipeptídicas y otros compuestos.

Electrofisiología

Se utilizó un sistema de registro de *patch clamp* manual en la modalidad célula completa (*whole cell*) para registrar la corriente de toda la célula, y que en nuestro modelo de estudio, gracias al sistema de expresión constitutiva, proviene fundamentalmente de la actividad de una numerosa población de canales Kv10.1.

Se optimizó el protocolo de estimulación para los análisis del ruido, basado en el descrito por Heinemann y Conti, 1992, el cual es un trabajo centrado en la estimación de los parámetros unitarios de canales de sodio y su relación con la presión y temperatura de células cromafines (Heinemann & Conti, 1992). Este protocolo consistió en la repetición de una secuencia alternada de 20 pulsos idénticos de prueba a +50 mV y 5 pulsos negativos a -90 mV, ambos con una duración de 300 ms. Las estimulaciones sucesivas fueron espaciadas por periodos de pausa de 3 s, hasta coleccionar un total de 100 repeticiones del pulso de prueba y 25 del pulso negativo. El voltaje de mantenimiento de la célula se sostuvo en -70 mV.

Las corrientes fueron registradas con un amplificador *Axopatch 200B* (*Molecular Devices*), filtrando analógicamente a una frecuencia de 5 kHz y muestreando digitalmente a 25 kHz. La señal fue digitalizada haciendo uso del conversor analógico-digital *Axon Digidata 1550* (*Molecular Devices*). El control de los estímulos y la

adquisición de datos para el análisis fueron realizados con el programa *pClamp 10.0* (*Molecular Devices*).

Eliminación de los registros erróneos

Los registros obtenidos por cada célula fueron observados con el programa *Clampfit 10.0* (*Molecular Devices*) para descartar de forma manual aquellos afectados por la pérdida transitoria del sello de la pipeta, señales eléctricas exógenas, fallas con el sistema de perfusión y otras fuentes de error experimental que provocasen desviaciones evidentes de la amplitud de la corriente. Este primer filtro permite eliminar aquellos registros que resulten atípicos de manera muy notoria.

Todos los registros fueron depurados por segunda ocasión siguiendo el protocolo descrito por Heinemann & Conti 1992, calculando la varianza de la corriente en la línea base (σ_B^2), es decir en los primeros 15 milisegundos durante el voltaje de mantenimiento a -70 mV. A partir de σ_B^2 fue calculada la varianza base promedio $\langle \sigma_B^2 \rangle$, así como la desviación cuadrática media $\Delta\sigma_B^2$.

Esta segunda depuración de registros anómalos se basó en el criterio objetivo de que, cualquier registro cuya varianza en la línea base fuese mayor a la suma de la varianza base promedio y cuatro veces la desviación cuadrática media, estaría siendo afectado por factores ajenos y desconocidos, de manera que, si $\sigma_B^2 > \langle \sigma_B^2 \rangle + 4\Delta\sigma_B^2$ el registro es desechado.

Finalmente, partiendo de la corriente unitaria del canal Kv10.1 reportada por Stansfield *et al.*, 1993, se estableció un último criterio de aceptación sobre pares de registros, en base a la comparación de la desviación estándar esperada y la diferencia de dos puntos equivalentes de registros sucesivos (Heinemann & Conti, 1996), denotada como Δ_i , tal que, si $|\Delta_{(i)}| < 7[\gamma(E_{com} - E_{rev})I + \langle \sigma_B^2 \rangle]^{1/2}$, es decir, si la diferencia entre un par de puntos equivalentes contiguos, es menor a siete veces la desviación estándar esperada, entonces el par de registros es conservado para continuar con el análisis (Heinemann & Conti, 1996).

Gráficas de varianza vs corriente promedio (I, σ^2).

Las tablas de valores de los registros de corriente para cada célula fueron exportadas haciendo uso de *Clampfit*. La primera columna de dicha tabla contiene el tiempo de cada muestreo a lo largo del protocolo. Las columnas sucesivas están conformadas por los valores de voltaje registrados en cada punto temporal para cada repetición de los pulsos.

Para el cálculo de la varianza isocrónica se distinguieron dos métodos que fueron denominados como: 1) varianza convencional (σ^2) y 2) varianza Heinemann & Conti ($\sigma_{H\&C}^2$). La primera fue obtenida mediante las herramientas de estadística descriptiva del programa *OriginPro 2016* (*OriginLab Corporation, 2016*) mediante la siguiente ecuación:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

Es necesario recordar, como fue mencionado anteriormente, que los datos para el cálculo de la varianza se toman a lo largo de un isócrono, dicho de otra forma, a lo largo de una fila en la tabla de valores del registro electrofisiológico.

Por otra parte, el cálculo de la "varianza Heinemann & Conti" ($\sigma_{H\&C}^2$) se fundamenta en la medida de las diferencias de corriente entre puntos equivalentes, sucesivos en el eje isócrono (y_i):

$$y_i = \frac{1}{2} (x_n - x_{n+1})$$

$$\sigma_{H\&C}^2 = \frac{2}{N-1} \sum_1^N (y_i - \bar{y})^2$$

donde x_n es el enésimo punto a lo largo del isocrono.

La varianza $\sigma_{H\&C}^2$ tiene como objetivo la reducción de la desviación de la varianza como efecto del denominado *channel rundown*, término que hace referencia a la disminución del número de canales funcionales aportando flujo iónico a la corriente macroscópica en el curso temporal del experimento. El uso del promedio de dos puntos equivalentes sucesivos en vez de puntos individuales reduce la tendencia

al aumento de la varianza como consecuencia de la pérdida de canales funcionales y su consecuente cambio en la magnitud de la corriente total.

Previo a la construcción de la gráfica de varianza vs. corriente promedio se efectuó una reducción de puntos, con la finalidad de optimizar el proceso de ajuste, evitando la sobre representación de la zona estable de la corriente. Considerando que, debido al muestreo constante de la señal, una gráfica $\{I, \sigma_I^2\}$, mostrará una mayor densidad de puntos para valores de corriente colectados durante la fase lenta (menos variable o estacionaria), atribuyendo entonces demasiado peso independiente a datos que en realidad no lo son. Por lo tanto, los datos de corriente media y varianza fueron agrupados en intervalos correspondientes a la división de la duración del pulso administrado en secciones sucesivas de longitud variable, tal que la corriente I no variase en más de un veinteavo de la corriente máxima $(\frac{I_p}{20})$.

Finalmente, las gráficas $\{I, \sigma_I^2\}$, fueron realizadas haciendo uso del programa *OriginPro 2016*.

Ajuste no-líneal y obtención de los parámetros unitarios

Para la obtención de los parámetros unitarios se realizó un ajuste no lineal de la parábola descrita por la ecuación 1, en cada una de las gráficas generadas, con el algoritmo de iteración de Levenberg Marquardt, programando la herramienta de ajuste no-lineal del software *OriginPro 2016*. A partir del análisis fueron obtenidos los parámetros de ajuste: corriente unitaria (i) y número de canales (N), por cada célula. Haciendo uso de la ecuación 2, el valor de corriente unitaria se dispuso en términos de conductancia unitaria.

Funciones Lorentzianas en las gráficas de densidad espectral

Utilizando el programa *Clampfit 10.0*, se obtuvo el promedio a lo largo del curso temporal de los pulsos para cada célula, concatenando y distinguiendo entre los archivos con pulsos a +50 y -90mV. El promedio se restó a cada una de las repeticiones, obteniendo únicamente las fluctuaciones respecto del curso temporal promedio. Debido a la cinética no inactivante del canal, la zona más estable de cada corriente se presenta al final de la misma, por lo que el espectro de frecuencias de la

señal (*power spectrum density*) se calculó con los 4096 puntos finales de cada registro, situando el primer cursor en el punto 3793 y el segundo en el 7888.

Finalmente se obtuvo la diferencia de los espectros de +50 y -90 mV, con el objetivo de restar los componentes del ruido ajenos al canal, presentes durante el pulso de -90 mV durante el cual los canales Kv10.1 se encuentran en su estado no conductor.

Graficando en escala logarítmica, se generaron las gráficas de la distribución espectral de los distintos componentes oscilatorios en el dominio de la frecuencia, de la diferencia entre las señales en respuesta a los pulsos a +50 y -90 mV. Por último, se ajustaron las siguientes ecuaciones a los espectros de cada célula, con un componente (DeFelice, 1981) y dos componentes Lorentzianos (Picones & Korenbrot, 1994):

$$G(f) = \frac{G(0)_c}{1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^2} \quad (4)$$

$$G(f) = \frac{G(0)_l}{1 + \left(\frac{f}{f_l}\right)^2} + \frac{G(0)_h}{1 + \left(\frac{f}{f_h}\right)^2} \quad (5)$$

Con los parámetros obtenidos fue calculada la conductancia unitaria mediante la ecuación (3). El análisis fue, programado en la herramienta de ajuste no-lineal del software *OriginPro 2016*. El hecho de poder describir el patrón resultante mediante funciones Lorentzianas, se aborda más adelante en la sección de Resultados y Discusión.

Resultados y Discusión

En primer lugar, se realizó la caracterización de las corrientes macroscópicas obtenidas por *patch clamp* manual en la modalidad de célula completa (Fig. 11). Como se esperaba, el pulso de voltaje depolarizante provocó la activación de la población de canales Kv10.1, generándose una corriente que asciende más rápido en los primeros milisegundos (Fig. 11), periodo en el que la mayoría de los canales transitan desde el estado no conductor en el voltaje de mantenimiento de -70 mV, al estado conductor, causado por el cambio drástico del voltaje hasta +50 mV. El ritmo de aumento en magnitud de la corriente macroscópica disminuye hasta alcanzar una fase semi-estacional, entre los 5 y 6 nA, en el número de canales reclutados fluctúa alrededor de un máximo posible para el voltaje suministrado.

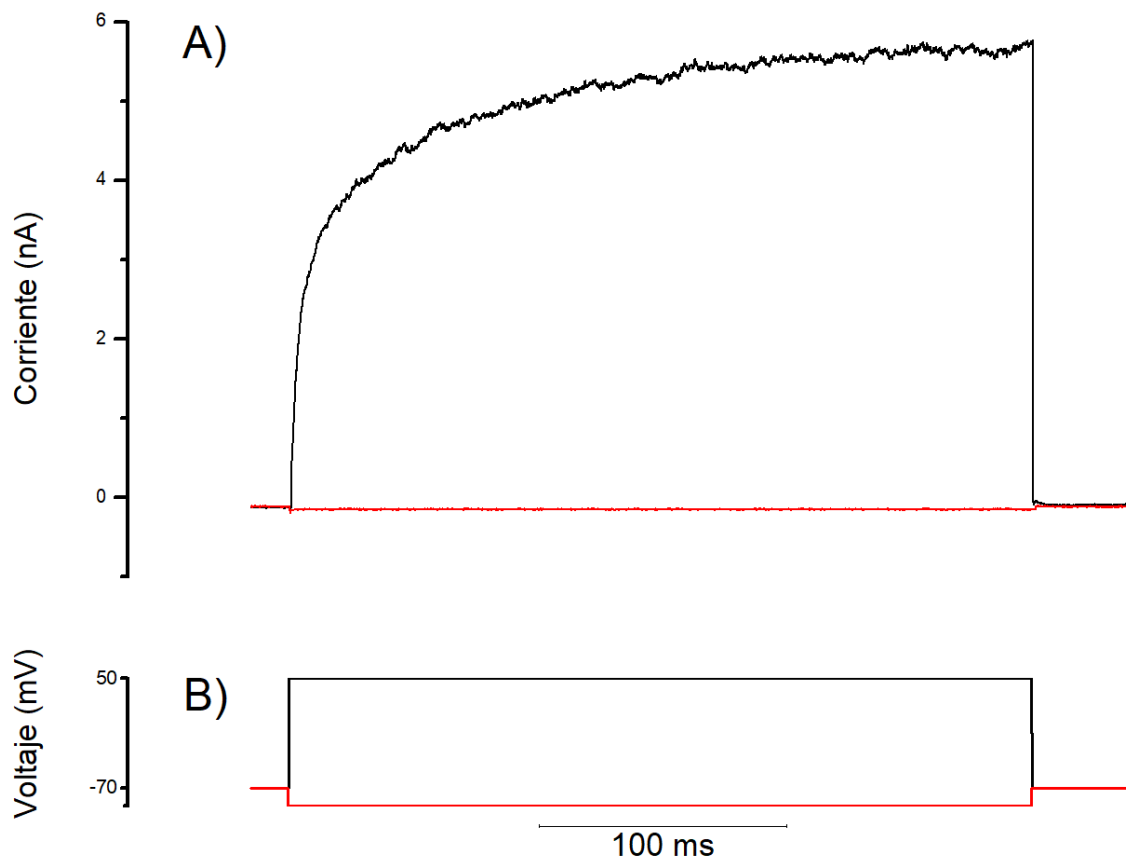


Figura 11.- Corrientes representativas. Se muestran las corrientes generadas (A), así como los pulsos que les generaron (B). En color negro la corriente generada por los canales Kv10.1 al activarse la población de canales debido al pulso de +50 mV, por otra parte, en rojo, los canales no permiten el flujo de iones puesto que el pulso a -90 mV no los activa.

Por otra parte, la estimulación por un pulso de voltaje negativo no evoca la actividad de los canales Kv10.1 (Fig. 11). A pesar de que, debido a la dependencia al voltaje, éste podría ser un punto a obviar, los archivos obtenidos a partir de la estimulación por voltajes negativos son muy útiles, permitiéndonos restar el componente del ruido que no se debe a la actividad de los canales, para obtener así únicamente las fluctuaciones que tienen causa en el tránsito espontáneo entre la configuración activa y no activa del canal.

Con la selección realizada mediante el cálculo de la varianza de la corriente en la línea base, descartamos 3 de las 14 células iniciales, ya que era mayor el número de registros que estaban siendo afectados por factores externos no identificados.

El criterio de aceptación aplicado sobre la diferencia entre pares de registros continuos (Fig. 12) permitió asegurar aún más la calidad del análisis. De los registros provenientes del protocolo de estimulación por pulsos de prueba de las 11 células restantes, fueron eliminadas entre 0 y 4 repeticiones de las 100 correspondientes a cada célula. Aunque éste es un número bajo en proporción a la cantidad total de repeticiones, su eliminación impactó considerablemente de forma positiva la confianza en la estimación de los parámetros unitarios, evitando la aparición de cambios abruptos (picos) de varianza en la zona estable de la corriente macroscópica promedio.

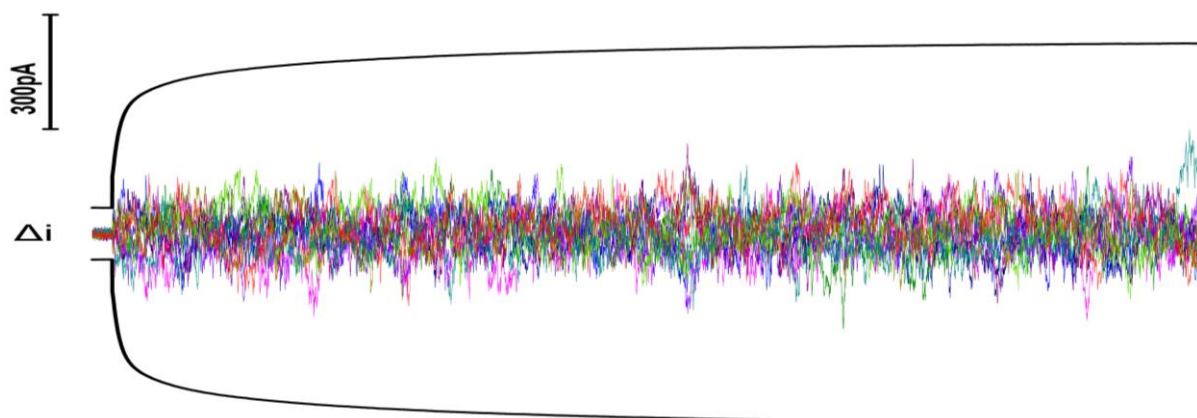


Figura 12.- Eliminación de registros anómalos. La gráfica muestra la depuración de un conjunto de registros provenientes de una célula, fijando como límites (en color negro) una diferencia (Δi) máxima entre dos puntos de dos registros contiguos igual a 7 veces la desviación estándar calculada.

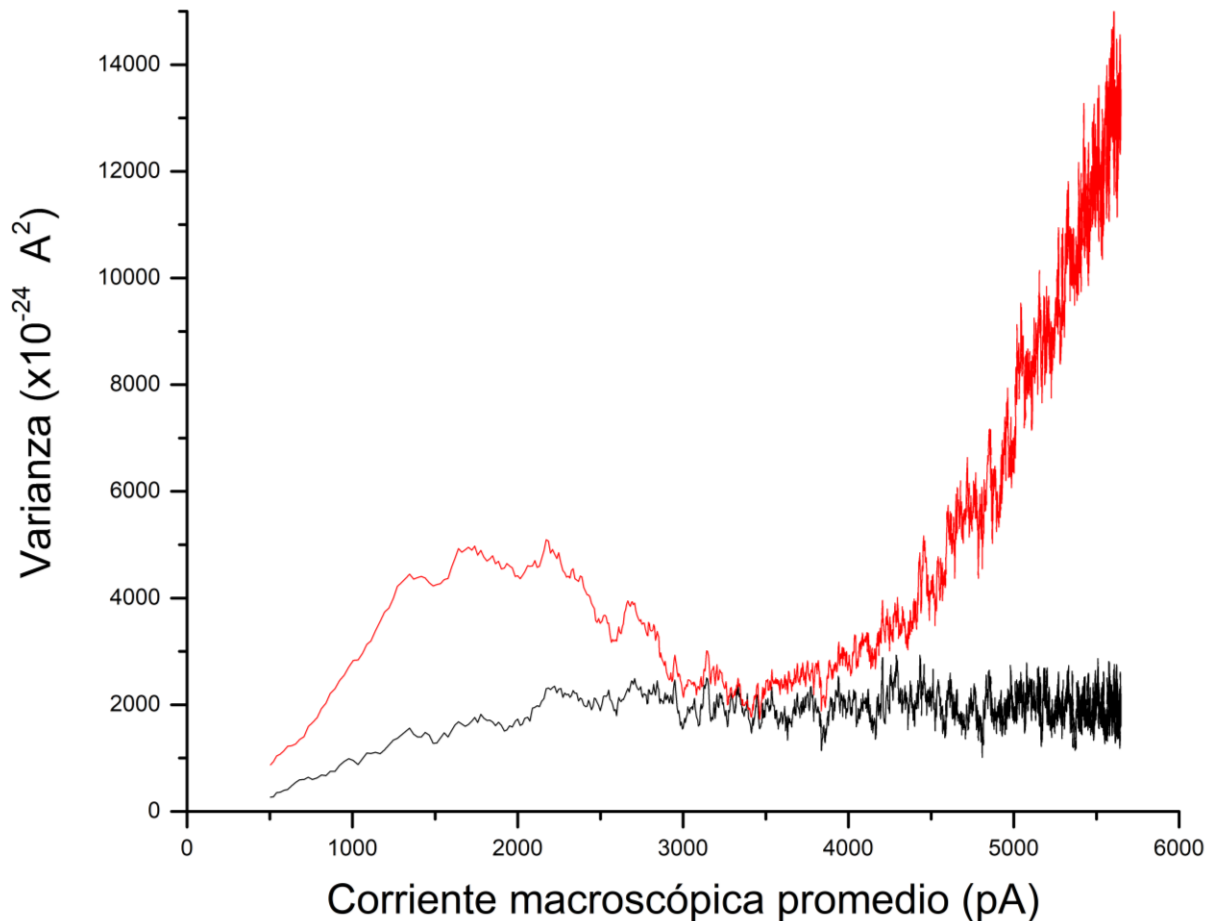


Figura 13.- Varianza convencional y Heinemann & Conti. La varianza convencional (color rojo) aumenta indefinidamente debido al eventual channel –rundown, causado por una disminución gradual en el número de canales funcionales a lo largo de la duración de algunos experimentos. Para solventar dicha tendencia, la varianza Heinemann & Conti (color negro) se calcula tomando pares de puntos de dos registros

La presencia reportada de *run-down* en las corrientes generadas por el canal Kv10.1 (Wang *et al.*, 2017) motivó el uso de dos métodos distintos para el cálculo de la varianza del ensamble de registros. La comparación entre ambos concluyó en la selección de la denominada varianza Heinemann & Conti ($\sigma_{\text{H\&C}}^2$) sobre la varianza convencional (Fig. 13), ya que esta última no solamente reflejaba las fluctuaciones de la corriente provenientes de cambios aleatorios en el número de canales activos, sino también incluye la tendencia al decremento en número de canales funcionales. Sin embargo, el efecto del *run-down* pudo ser minimizado utilizando la diferencia de un par de puntos equivalentes provenientes de pulsos contiguos como unidad para el cálculo de la varianza (Álvarez *et al.*, 2002) mostrándose de esta manera la distribución en forma parabólica esperada (Fig. 13).

Aunque la forma completa de la parábola es utilizada con igual peso para el cálculo de los parámetros unitarios, la pendiente inicial tiene una mayor incidencia en el valor que resulte para la conductancia unitaria (Alvarez *et al.*, 2002). Debido a la cinética de los canales Kv10.1, son pocos los puntos que constituyen el inicio del trazo, por lo que proceder sin la agrupación de datos derivaría en una estimación sesgada. Gracias al uso de un criterio objetivo para su agrupación (Heinemann & Conti, 1992), fue posible atribuir adecuadamente el peso de los datos para el ajuste de la curva (Fig. 14), evitando la sobrerrepresentación de la zona estable de la corriente. Durante el análisis de los resultados, notamos además mayor consistencia para las iteraciones del proceso de ajuste.

Fueron generados los ajustes de las gráficas de varianza contra corriente macroscópica promedio de 11 células (Anexo 1). Un punto importante para la evaluación realizada de los parámetros unitarios es el cálculo de los valores de máxima probabilidad de apertura ($P_{o\ max}$), ya que estos pueden ser fácilmente transformados en porcentajes que indiquen la fracción de la parábola que podemos observar, mientras mayor sea, el ajuste obtenido culminará en una aproximación más precisa (Lingle, 2006). Pese a que la máxima probabilidad de apertura deriva de la obtención misma de los parámetros unitarios, debido a las correlaciones entre N e i , las desviaciones del valor calculado de P_o respecto al real son menores (Steffan & Heinemann, 1997). El resultado de ello entre los registros generados fue de $P_{o\ max}=0.662 \pm 0.102$, es decir, pudo observarse alrededor de un 66% de la parábola, un valor conveniente (Lingle, 2006), que indica que ambos, voltaje y duración del protocolo de estimulación fueron correctamente seleccionados.

El número de canales funcionales (N) determinados por el método del análisis de varianza fue de 9570 ± 2307 canales Kv10.1 (Tabla 1). La figura 15 ilustra las diferencias entre los parámetros unitarios determinados por el método de análisis de varianza, la contribución de N puede notarse principalmente en la distancia entre los puntos de término de las parábolas. Un error estándar del promedio de 2307 en el valor de N canales puede parecer alto, no obstante, es de esperarse que la cantidad de unidades proteicas varíe de célula en célula en relación a su tamaño. Además, es sabido que debido al proceso de ajuste de la curva, existe una propensión a la sobreestimación de N proporcional a la magnitud de la corriente macroscópica (Steffan & Heinemann, 1997), es por ello que como resultado final, más allá de un

valor determinado de N , consideramos un rango entre 7000 y 12000 canales Kv10.1 expresados por cada célula de la línea transfectada HEK 293.

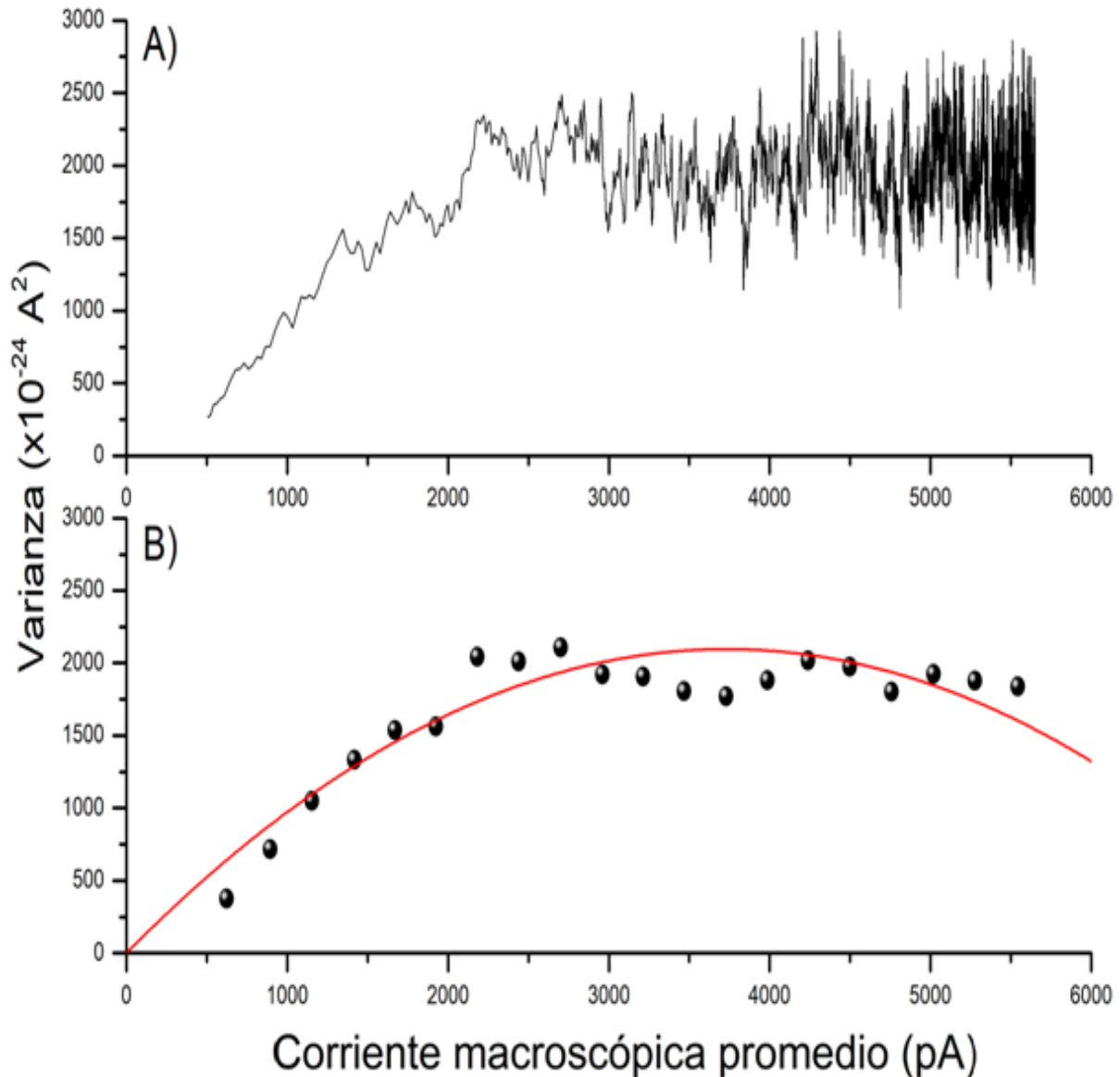


Figura 14.- Gráficas representativas Varianza vs. Corriente Macroscópica Promedio. La gráfica de la varianza como función de la corriente promedio describe una parábola (A). Nótese una mayor densidad de puntos en la segunda mitad del eje correspondiente a la corriente promedio (abscisa). Esta sobre-representación de la zona estable del registro imposibilitaría un ajuste por mínimos cuadrados, por lo que es conveniente realizar una reducción de puntos (B). Los puntos de la gráfica corresponden a los valores promedio obtenidos del trazo en el gráfico A mediante los intervalos establecidos para la reducción de puntos (ver texto). El trazo color rojo es la parábola con los parámetros obtenidos mediante un ajuste por mínimos cuadrados ($i = 0.948 \pm 0.05$, $N = 8920 \pm 1022$).

En contraste con N , la corriente unitaria i es un parámetro que debe variar en mucho menor proporción entre cada célula, ya que depende del canal en sí, este hecho se puede observar en las pendientes de arranque de la figura 15. Relacionada con la sobreestimación del número de canales mencionada, es la subestimación de la corriente unitaria (Steffan & Heinemann, 1997), sin embargo, dicha desviación fue mitigada con la agrupación de puntos en intervalos. La corriente unitaria estimada fue de $i=0.896 \pm 0.117 \text{ pA}$ en condiciones control (Tabla 1).

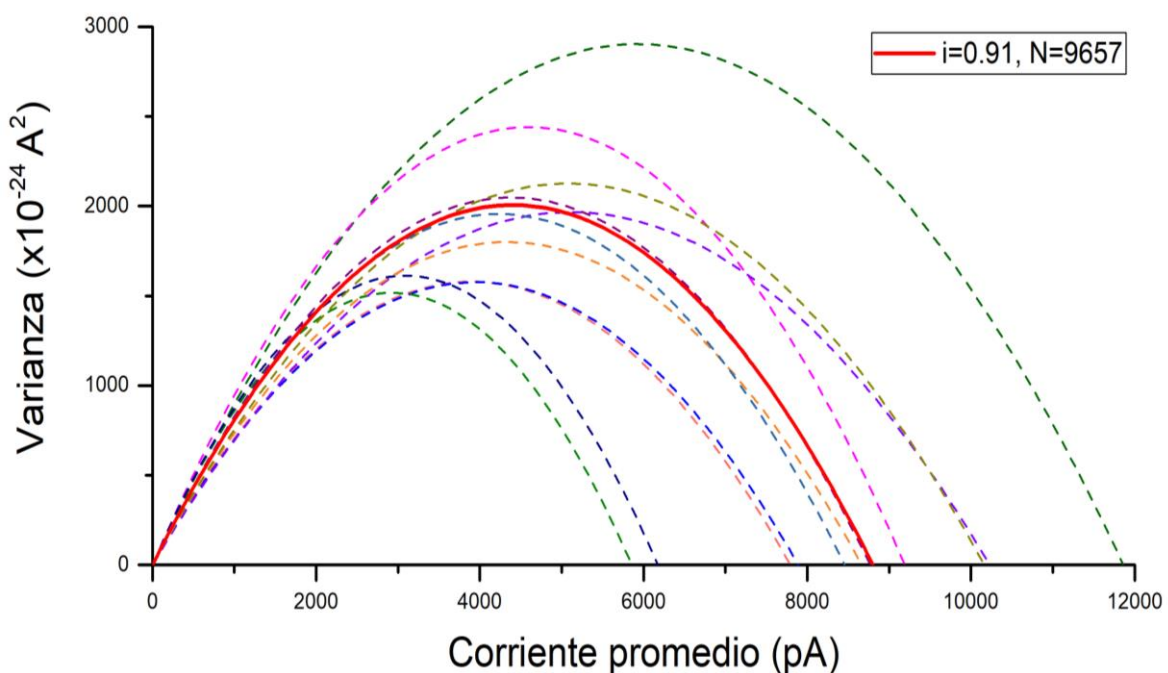


Figura 15.- Parábolas ajustadas. Los trazos punteados describen cada una de las 11 parábolas obtenidas por el ajuste de las gráficas de varianza vs. corriente promedio de cada célula. La parábola roja dibujada con una línea continua corresponde al promedio de las 11 estimaciones de los parámetros de corriente unitaria i y número de canales funcionales N .

El valor de la conductancia obtenido mediante el análisis de fluctuaciones no estacionarias (NSF) fue de $\gamma = 7.463 \pm 0.973 \text{ pS}$, este resultado coincide con un análisis de varianza realizado previamente por Pardo y colaboradores (2012), donde encontraron $\gamma = 6.5 \text{ pS}$, en canales Kv10.1 expresados en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

Parámetro	Método	Valor
Número de canales funcionales, N	NSF	9570 ± 2307
Máxima probabilidad de apertura, Po max	NSF	0.662 ± 0.102
Corriente unitaria, i (pA)	NSF	0.896 ± 0.117
Conductancia unitaria, γ (pS)	NSF	7.463 ± 0.973
Corriente unitaria, i (pA)	PS	0.637 ± 0.181
Conductancia unitaria, γ (pS)	PS	5.305 ± 1.507

Tabla 1.-Resumen de los valores obtenidos para los parámetros unitarios. Se muestran los resultados obtenidos para cada elemento de la corriente macroscópica (canales funcionales, máxima probabilidad de apertura, corriente unitaria y conductancia unitaria), mediante el método de análisis de varianza (NSF) y de distribución de densidad espectral (PS). Los valores resaltados corresponden a la conductancia, nótese que estos no son significativamente distintos entre ambos métodos.

La figura 16 muestra gráficos representativos de densidad espectral. Como ya se mencionó, el protocolo de estimulación mediante un voltaje negativo (-90 mV) no evoca la actividad de los canales iónicos, a partir de los registros así generados, pudimos obtener espectros constituidos por fluctuaciones que no provienen de la actividad del canal, sino esencialmente del resto del sistema de registro (propiedades pasivas de la membrana, cables, circuitos eléctricos, etc.). Por su parte, los espectros derivados de pulsos depolarizantes contienen, además de los ya enlistados para las corrientes en respuesta a pulsos hiperpolarizantes, muy promisoriamente elementos provenientes de la actividad de los canales Kv10.1. Nótese de manera evidente además que la forma de los espectros correspondientes al pulso positivo y al negativo es totalmente distinta (Fig. 16A). Consecuentemente, la diferencia directa entre ambas parejas de gráficas resultó en espectros generados únicamente debido a las fluctuaciones en la actividad de apertura y cierre de los canales y cuya forma se relaciona directamente con su cinética (Fig. 16B).

La aparición de una función Lorentziana en la caracterización de un fenómeno en el dominio de la frecuencia, identifica un proceso de "relajación" exponencial en el dominio del tiempo. Es muy importante señalar que la descripción mediante una distribución Lorentziana en las gráficas de distribución de la densidad espectral (Figs.

16 y 17) es una poderosa indicación de la existencia de un proceso de activación-deactivación espontáneo y aleatorio, lo cual pertenece a un proceso característico de la actividad unitaria de canales iónicos (Stevens, 1972; Neumcke & Stampfli, 1982; Heinemann & Conti, 1992).

Se completaron los ajustes de las 11 gráficas de densidad espectral (Anexo II) mediante uno (Fig. 17) y dos funciones Lorentzianas (ecuaciones 4 y 5, respectivamente). Los valores provenientes de un sólo espectro mostraron, en general, un mejor ajuste y fueron seleccionados para el cálculo de la conductancia, sin embargo, no dejamos de mencionar la existencia de casos particulares donde ambos escenarios eran indistinguibles. Esto abre la posibilidad de que el canal posea 2 estados distintos, dos funciones Lorentzianas en el dominio de la frecuencia identifican dos procesos exponenciales en el dominio del tiempo (Picones & Korenbrot, 1994).

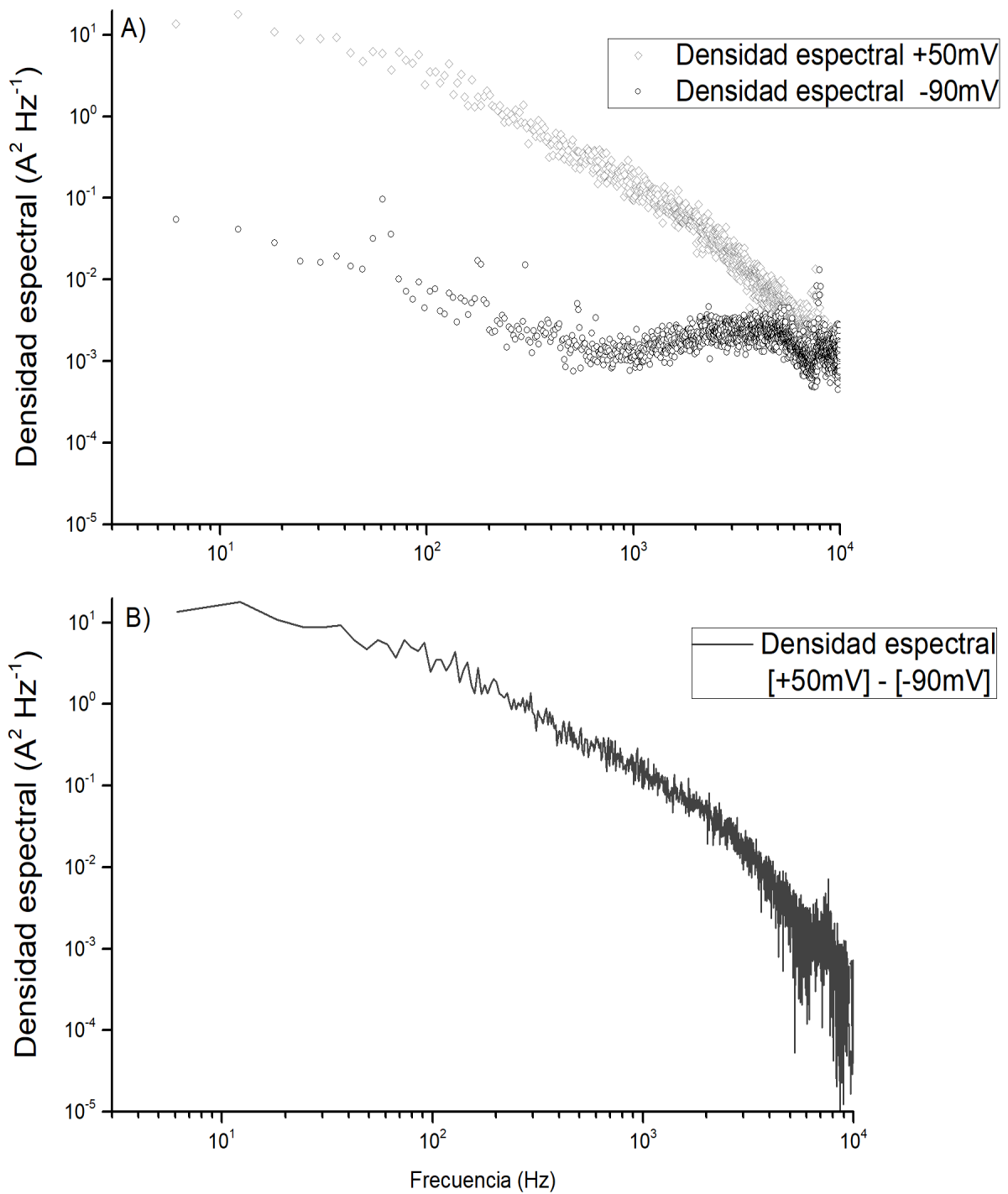


Figura 16.- Gráficas representativas de densidad espectral. A) Se muestran los espectros representativos generados por los protocolos de voltaje depolarizante (positivo) evocando la actividad de los canales Kv10.1(+50 mV arriba) y negativo (-90 mV debajo), sin actividad del canal. B) Espectro resultante de la diferencia directa entre los dos trazos anteriores.

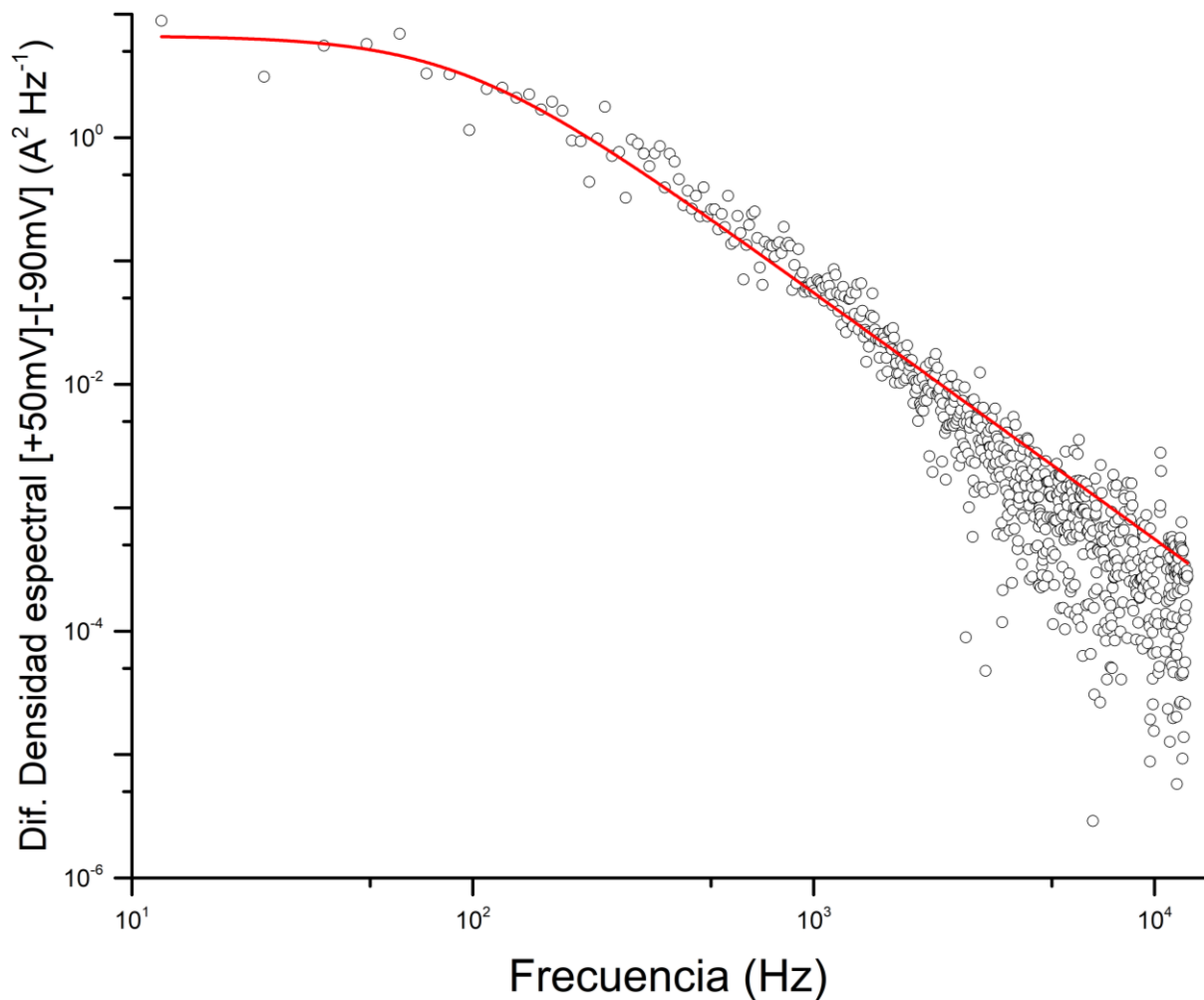


Figura 17.- Ajuste del espectro Lorentziano. La línea roja describe el mejor ajuste de una función Lorentziana al conjunto de datos de la densidad espectral de un registro representativo.

A partir del análisis de densidad espectral, calculamos el valor de corriente unitaria $i = 0.637 \pm 0.181$ pA y de conductancia $\gamma = 5.305 \pm 1.507$ pS. Al igual que los valores obtenidos mediante el análisis de varianza, no son significativamente distintos a los reportes previos (Tabla 2) conductancia unitaria del canal Kv10.1 de *Homo sapiens*, reportada en mioblastos y ovocitos de *Xenopus laevis* (Bijilenga *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 2012).

Encontramos que los valores de conductancia unitaria (γ) resultados a partir de dos métodos independientes, el análisis de fluctuaciones ($\gamma = 7.463 \pm 0.973$ pS) y análisis de densidad espectral ($\gamma = 5.305 \pm 1.507$ pS) poseen intervalos de confianza que se solapan. La coincidencia entre los procedimientos soporta la correcta

realización de ambos métodos. Los criterios matemáticos basados en diversas aproximaciones de la literatura permitieron sortear las dificultades experimentales para la obtención de los parámetros unitarios.

Gen Kv10.1 expresado	Sistema de expresión	Conductancia reportada (pS)	Referencia
<i>Drosophila melanogaster</i>	Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	4.9	Bruggemann <i>et al.</i> , 1993
<i>Rattus rattus</i>	HEK (human embryonic kidney)	7.4	Stansfeld <i>et al.</i> , 1996
	HEK (human embryonic kidney)	7.5	Hsu <i>et al.</i> , 2012
<i>Homo sapiens</i>	Mioblastos	8.4	Bijlenga <i>et al.</i> , 1998
	Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	6.5	Pardo <i>et al.</i> , 2012
	Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	19.73	Zakany <i>et al.</i> , 2019

Tabla 2.-Reportes de la conductancia unitaria del canal Kv10.1 en condiciones control. La conductancia unitaria del canal ha sido reportada haciendo uso de distintos métodos. Los valores de la proteína expresada por organismos más cercanos como la rata y el humano son similares.

Los análisis de fluctuaciones pudieron ser efectuados con registros electrofisiológicos de *patch clamp* manual en la configuración de célula completa. Debido a la cotidianidad y estandarización de dicha configuración en los laboratorios de electrofisiología, la obtención de datos útiles para los análisis de ruido es sencilla, sin embargo, la información derivada de ello es extraordinariamente valiosa, ya que el conocer el número de canales presentes en la membrana de la célula permitirá

hacer inferencias sobre los efectos observados de diversas toxinas en el Laboratorio Nacional de Canalopatías, profundizando en su mecanismo de acción. Además, si el número de canales se observa invariable, será posible identificar y cuantificar los cambios provocados sobre la conductancia unitaria. Esto es particularmente importante en el modelo de estudio del LaNCa, ya que la magnitud de la corriente unitaria es tan pequeña, que no puede ser resuelta con el uso de registros de canal unitario, esto sumado a que la alta prevalencia de los canales por el sistema de expresión imposibilita su aislamiento en parches de membrana. Demostramos que la metodología utilizada representa una alternativa práctica, sencilla pero poderosa para la descripción de los fenómenos en la escala molecular.

La abstracción matemática del fenómeno, en este caso la capacidad de discernir entre los componentes unitarios de la corriente macroscópica a través de las fluctuaciones permite anticipar los distintos escenarios posibles, dotando nuestro conocimiento de un carácter predictivo. Tomando las precauciones necesarias sobre la interpretación de los hallazgos, la predictibilidad supone una gran ventaja en el proceder de la investigación en farmacología de canales iónicos. Por la confianza alcanzada en los resultados, gracias a la objetividad de los criterios descritos por diversos autores, consideramos que este trabajo fungirá como una guía metodológica para próximos estudios del laboratorio.

Conclusiones

- Se logró resolver el valor de la conductancia unitaria del canal Kv10.1 mediante análisis de las fluctuaciones, en condiciones no estacionarias, de su corriente iónica macroscópica, tanto por análisis de varianza ($\gamma = 7.463 \pm 0.973$ pS), como por análisis de densidad espectral ($\gamma = 5.305 \pm 1.507$ pS), encontrando concordancia entre ambas aproximaciones analíticas, lo cual apoya sustancialmente la solidez de este resultado, dada la independencia teórica y metodológica de ambas modalidades de análisis.
- El número de canales Kv10.1 en las células HEK293 transfectadas, es de entre 7000 y 12000 unidades proteicas, de acuerdo con las determinaciones en 11 células con el análisis de varianza.
- Los criterios objetivos utilizados para el procesamiento de los datos, experimentales, culminaron en una estimación robusta de la conductancia unitaria, concordante con reportes previos realizados con métodos distintos.
- La relativamente sencilla, rápida y muy común configuración de fijación de voltaje por *patch clamp* en célula completa, permite la obtención de registros útiles y válidos para el cálculo de parámetros de la actividad unitaria de los canales iónicos, lo cual capacita la propuesta de mecanismos de acción de los efectos, incluso a nivel molecular, de distintas condiciones experimentales y muy particularmente la acción de moduladores (inhibitorios o potenciadores) de la actividad de canales iónicos.

- Debido a haber logrado un ruido instrumental suficientemente bajo, se pudo efectuar un estudio confiable del ruido proveniente de la apertura y cierre de los canales Kv10.1, los cuales, además, se expresaron en gran abundancia.
- Los valores obtenidos son una importante aportación al conocimiento de las propiedades normales del canal Kv10.1, particularmente en el modelo de estudio utilizado por el Laboratorio Nacional de Canalopatías.

Referencias

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. (5° edición). Estados Unidos de Norteamérica, Garland Science.
- Alvarez, O., Gonzalez, C. & Latorre, R. (2002). *Counting Channels: A Tutorial Guide On Ion Channel Fluctuation Analysis*. *Adv Physiol Educ* 26: 327-341
- Bijlenga, P., Occhiodoro, T., Liu, J.H., Bader, C.R., Bernheim, L., Fischer- Loughheed, J. (1998). *An ether -a-go-go K⁺ current, Ih-eag, contributes to the hyperpolarization of human fusion-competent myoblasts*. *J Physiol* 512(Pt 2):317–323
- Bruggemann, A., Pardo, L.A., Stuhmer, W., Pongs, O. (1993). *Ether-a-gogo encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP*. *Nature* 365:445–448
- DeFelice, L.J. (1981). *Introduction to Membrane Noise*. Plenum Press, New York.
- Gray, P.T.A. (1994). *Analysis of whole cell currents to estimate the kinetics and amplitude of unitary events: relaxation and 'noise' analysis*. en *Microelectrode Techniques* (2a Ed.) The Company of Biologist Limited, Cambridge, pp. 189-207
- Heinemann, S.H. & Conti, F. (1992). *Nonstationary Noise Analysis and Application to Patch Clamp Recordings*. *Methods Enzymol* 207: 131-148
- Herrmann, S., Ninkovic, M., Kohl, T., Lorinczi, E. & Pardo, L.A. (2012). *Cortactin Controls Surface Expression of the Voltage-gated Potassium Channel Kv10.1*. *J. Biol. Chem.* 287: 44151-44163
- Hille, B. (2001). *Ion Channels Of Excitable Membranes*. 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts U.S.A. 788pp
- Hatten, M.E., & Roussel, M. F. (2011). Development and cancer of the cerebellum. *Trends Neurosci* 34: 134-142 doi: 10.1016/j.tins.2011.01.002

- Huang, X., & Jan, L.Y. (2014). *Targeting potassium channels in cancer*. J. Cell Biol. 206, 151--162.doi:10.1083/jcb.201404136
- Hsu, P.O., Miaw, S.C., Chuang, C.C., Chang, P.Y., Fu, S.J., Jow, G.M., Chiu, M.M., & Jeng, C.J. (2012). *14-3-30 is a binding partner of rat Eag1 potassium uggy channels*. PLoS One. 7:e4103.
- Karp, G. (2016). *Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos* (5° edición). México: McGraw Hill Latinoamérica
- Kim, J.B. (2014). *Channelopathies*. Korean J Pediatr, 57 (1): 1-18
- Lanore, F. & Angus, S.R. (2016). *Extracting quantal properties of transmission at central synapses*. Neuromethods. 113: 193-211
- Lingle, C. J. (2006). *Empirical considerations regarding the use of ensemble-variance analysis of macroscopic currents*. J. Neurosci. Meth 158: 121-132
- Litan, A., & Langhans, S.A. (2015). *Cancer as a channelopathy: ion channels and pumps in tumor development and progression*. Front. Cell. Neurosci. 9:86-97
- Mortensen, L.S., Schmidt, H., Farsi, Z., Barrantes-Freer, A., Rubio, M.E., Ufartes, R., Eilers, J., Sakaba, T., Stuhmer, W., Pardo, L.A. (2015). *KV10.1 opposes activity-dependent increase in Ca²⁺ influx into the presynaptic terminal of the parallel fibre. Purkinje cell synapse*. J. Physiol. 593:181–196
- Nayak, S.K., Batalov, S., Jegla, J. & Zmasek, C.M. (2009). *Evolution of the Human Ion Channel Set*. Comb Chem High T Scr. 12: 2-23
- Neumcke, B., & Stämpfli, R. (1982). *Sodium currents and sodium-current fluctuations in rat myelinated nerve fibres*. J. Physiol. 329:163
- Pardo, L.A., del Camino, D., Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S. f (1999). *Oncogenic potential of EAGK.C/ channels*. EMBO J. 18, 5540 5547.
- Pardo, L.A., & Stühmer, W. (2008). *Eag1:an emerging oncological target*. Cancer Res. 68, 1611--1613.

- Picones, A.P., & Korenbrot, J.I. (1994). *Analysis of Fluctuations in the cGMP-Dependent Currents of Cone Photoreceptor Outer Segments*. *Biophys J.* 66: 360-365
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A. & White, L. (2015). *Neurociencia*. Editorial Médica Panamericana.
- Scheppach, C. & Robinson, H.P.C. (2017). *Fluctuation Analysis in Nonstationary Conditions: Single Ca²⁺ Channel Current in Pyramidal Neurons*. *Biophys J.* 113(11): 2383-2395
- Sigworth, F.J. (1980). *The Variance Of Sodium Current Fluctuations At The Node Of Ranvier*. *J. Physiol.* 307: 97-129
- Stevens, C.F. (1972). *Inferences about membrane properties from electrical noise measurements*. *Biophys J.* 12(8), 1028–1047. doi:10.1016/S0006-s3495(72)86141-1
- Sontheimer, H. (2004). *Ion channels and aminoacid transporters support the growth and invasion of primary brain tumors*. *Mol. Neurobiol.* 29: 61-71.
- Stansfeld, C.E., Roper, J., Ludwig, J., Weseloh, R.M., Marsh, S.J., Brown, D.A., Pongs, O. (1996). *Elevation of intracellular calcium by muscarinic receptor activation induces a block of voltage-activated rat ethera- go-go channels in a stably transfected cell line*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9910–9914
- Steffan, R, Heinemann, S.H. (1997). *Error estimates for results of nonstationary noise analysis derived with linear least squares methods*. *J Neurosci Meth.* 78: 51-63
- Wang, X., Chen, Y., Zhang, Y., Guo, S., Mo, L., An, H. & Zhan, Y. (2017). *Eag1 Voltage-Dependent Potassium Channels: Structure, Electrophysiological Characteristics, and Function in Cancer*. *J Membrane Biol.* 250:123-132
- Weaver, A.K., Bomben, V.C., & Sontheimer, H. (2006). *Expression and function of calcium-activated potassium channels in human glioma cells*. *Glia* 54, 223--233.

Zakany, F., Pap, P., Papp, F., Kovacs, T., Nagy, P., Peter, M., Szente, L., Panyi, G., Varga, Z. (2019). *Determining the target of membrane sterols on voltage-gated potassium channels*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1864(3):312-325

Anexos

I.- Valores de los ajustes obtenidos por el análisis de fluctuaciones no estacionarias (NSF).

Célula	Corriente unitaria i (pA)	Número de canales N	Conductancia unitaria γ (pS)	Po max
1	0.810 ± 0.03	9622 ± 852	6.75 ± 0.25	0.523 ± 0.06
2	0.979 ± 0.03	12116 ± 575	8.16 ± 0.22	0.630 ± 0.04
3	0.799 ± 0.02	9875 ± 349	6.66 ± 0.16	0.730 ± 0.04
4	1.062 ± 0.04	8655 ± 568	8.85 ± 0.31	0.581 ± 0.05
5	1.036 ± 0.02	5654 ± 154	8.63 ± 0.17	0.756 ± 0.03
6	1.045 ± 0.02	5908 ± 203	8.71 ± 0.19	0.690 ± 0.04
7	0.769 ± 0.01	13300 ± 260	6.41 ± 0.1	0.887 ± 0.03
8	0.934 ± 0.01	9389 ± 113	7.78 ± 0.06	0.643 ± 0.01
9	0.831 ± 0.01	10427 ± 136	6.93 ± 0.08	0.927 ± 0.02
10	0.837 ± 0.02	12140 ± 486	6.98 ± 0.15	0.567 ± 0.03
11	0.925 ± 0.02	9143 ± 238	7.71 ± 0.13	0.682 ± 0.03

II.- Parámetros unitarios estimados mediante el análisis de densidades espectrales (PS).

Célula	Corriente unitaria i (pA)	Conductancia unitaria γ (pS)
1	0.623 ± 0.004	5.19 ± 0.03
2	0.746 ± 0.004	6.22 ± 0.03
3	0.937 ± 0.006	7.81 ± 0.047
4	0.482 ± 0.001	4.02 ± 0.004
5	0.720 ± 0.245	6.00 ± 2.046
6	0.570 ± 0.121	4.75 ± 1.012
7	0.503 ± 0.297	4.19 ± 2.471
8	0.505 ± 0.172	4.21 ± 1.432
9	0.610 ± 0.148	5.08 ± 1.237
10	1.003 ± 0.236	8.36 ± 1.966
11	0.577 ± 0.126	4.81 ± 1.054