



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

Secuencia de conductividad aniónica
en un canal de Cl^- tipo CLC-K

Tesis profesional que para obtener el título de
Licenciatura en Física

Presenta

Ramón Heberto Martínez Mayorquin

17 de Agosto de 2012

Agradecimientos

Quisiera plasmar mis agradecimientos: En primer lugar quiero agradecer a mis padres por el apoyo, en el sentido amplio del termino, que he recibido de su parte y si el cual ninguna tarea que yo emprendiera sería posible. Al departamento de Física de la Universidad de Sonora por su apoyo tanto económico como de gestión que ha brindado a mi desarrollo académico y intelectual. A mi director de tesis Juan José Bolívar por su paciencia con mi persona y su disponibilidad a compartir su conocimiento y tiempo. Finalmente, pero no por eso menos importante, a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA, UNAM, proyectos IN206609 e IN214312) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACyT, proyecto CB-2007/83356) por el apoyo recibido para la realización de este trabajo de tesis.

Índice general

1. Introducción	7
2. Antecedentes	9
2.1. Biofísica de Membranas	9
2.1.1. Estructura de la membrana	9
2.1.2. Tráfico a través de la membrana	14
2.1.3. Potencial de membrana	15
2.2. Teoría básica de circuitos	16
2.2.1. La membrana como un capacitor	16
2.2.2. Circuitos básicos	17
3. Materiales y métodos	21
3.1. Registro de célula completa	21
3.1.1. Registro intracelular	22
3.1.2. Fijación de voltaje	23
3.1.3. Modo de registro de célula completa	24
3.2. Materiales necesarios	26
3.2.1. Mecanismos ópticos y mecánicos	27
3.2.2. Electrodo y micropipetas	33
3.3. Protocolos del experimento	36
3.3.1. Protocolo de pulsos	36
3.3.2. Protocolo de corrientes de cola	37
3.3.3. Protocolo de rampas	37
4. Resultados	39
5. Discusión y conclusiones	43

Capítulo 1

Introducción

En este trabajo se midieron las variaciones en la conductancia de células del conducto colector de la médula interna renal de rata (en cultivo primario) cuando se variaban los iones en el baño celular.

La estructura de este trabajo es como sigue: En el primer capítulo se presentan los antecedentes, entendidos estos como los elementos en cuyo contexto se desarrolla el trabajo. En particular incluimos una sección de Biofísica de Membranas donde se repasa tanto la estructura como la funcionalidad de esta componente biológica. También incluimos la teoría de circuitos necesaria para poder interpretar los elementos biológicos del problema en términos de parámetros físicos cuantitativos.

En el segundo capítulo se incluyen los materiales necesarios para montar el aparato experimental y se describe como estos cumplen sus funciones particulares. Por otro lado en esta sección también se desarrollan los protocolos experimentales, es decir, la manera particular en que utilizamos los instrumentos para obtener los datos deseados.

En la sección denominada resultados experimentales se presentan tal como fueron obtenidos los resultados producto de este trabajo. Se tomó el enfoque de presentar solamente los datos y se postergó su discusión e interpretación a la siguiente sección.

Por último en la discusión se describe como se integran y relacionan entre si estos resultados y se discuten las interrogantes restantes.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. Biofísica de Membranas

Comenzaremos hablando del lugar donde reside nuestro objeto de interés: la membrana celular. La membrana celular en un sentido coloquial es la frontera de la célula, la estructura que define lo que es la célula de lo que no es y por lo tanto diferencia lo que está vivo de lo que no lo está. Dado esto, es necesario que la membrana celular posea un mecanismo que le permita separar de manera adecuada el exterior del interior. Por otro lado, la célula requiere sustancias del exterior que ella misma es incapaz de generar y además requiere eliminar sustancias de su interior que ya no necesita, en otras palabras requiere de un control selectivo del tráfico de sustancias a través de su membrana. En esta sección revisaremos de manera sucinta la base biológica de esta frontera y sus propiedades.

2.1.1. Estructura de la membrana

Los lípidos y las proteínas son los ingredientes básicos de la membrana [1]. El modelo de membrana más aceptado actualmente es el modelo del **mosaico fluido** [7]. De acuerdo con este modelo la membrana es una estructura fluida con proteínas incrustadas en una **bicapa lipídica**, a manera de un mosaico [7]. Revisaremos primero las características de la bicapa lipídica.

La bicapa lipídica

Los lípidos más abundante en la membrana son los fosfolípidos [1], revisemos pues su estructura lo que nos revelará las características generales de los lípidos. La estructura de estos nos dará pie a entender como es que

ciertas propiedades de la membrana se derivan de las propiedades de sus componentes.

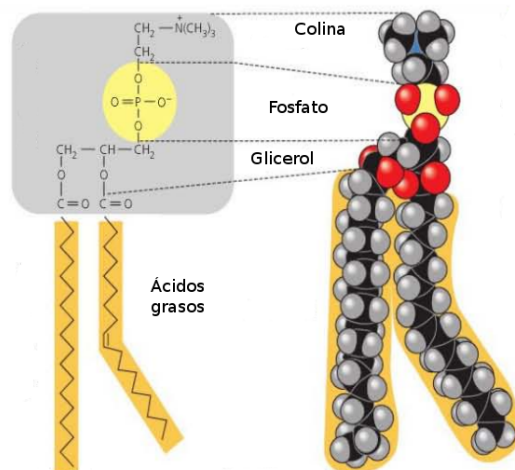


Figura 2.1: En este esquema se muestran las representaciones estructurales (Izquierda) y espacial (Derecha). Podemos apreciar, arriba, dentro del recuadro en gris, la parte polar de la molécula, donde se encuentran (de arriba a abajo) la colina, el grupo fosfato y el glicerol. Mientras que en la parte de abajo y en color amarillo tenemos los ácidos grasos que son la parte no polar o hidrofóbica de la molécula (Modificado de [7])

En general los fosfolípidos están formados por dos **ácidos grasos**, ambos unidos a un **glicerol** y este último unido a un grupo **fosfato**. Pequeñas moléculas usualmente con carga o polares pueden enlazarse al grupo fosfato para formar una gran variedad de fosfolípidos distintos. Lo más usual es que esta última molécula sea colina formando el fosfolípido fosfatidilcolina [1].

De la figura 2.1 podemos ver que la molécula posee una parte polar y otra parte no polar. Debido a su naturaleza polar, la cabeza del fosfolípido es fácilmente soluble en agua. A las moléculas, o porciones moleculares, que son atraídas por el agua y solubles en ésta se les denomina **hidrofilicas**. Por otro lado, la cola no polar, debido al llamado efecto hidrofóbico [3], es “repelida” por el agua. A las moléculas, o porciones moleculares, que tienen esta última propiedad se les llama **hidrofóbicas**. Por último a las moléculas que tienen un extremo hidrofóbico y otro hidrofílico se les llama **anfipáticas**. Podemos ver un esquema de la situación anteriormente descrita en la figura 2.2.

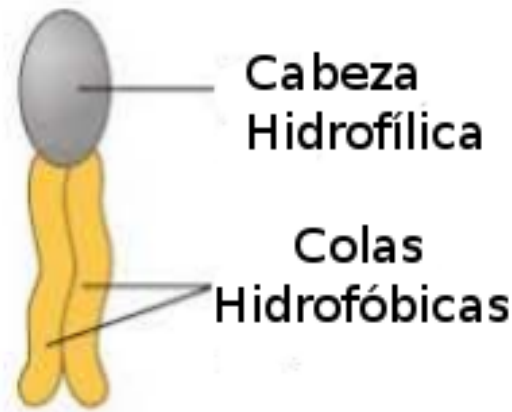


Figura 2.2: Símbolo de un fosfolípido donde se muestra claramente la naturaleza anfipática de la molécula (modificado de [7])

Cuando los fosfolípidos son colocados en solución acuosa, debido a su naturaleza anfipática, estos se autoensamblan en una estructura de **bicapa lipídica** donde la partes hidrofílicas están en contacto con el agua y las partes hidrofóbicas se cierran sobre sí mismas alejándose del agua creándose como resultado de esta interacción una estructura como la que se muestra en la figura 2.3.

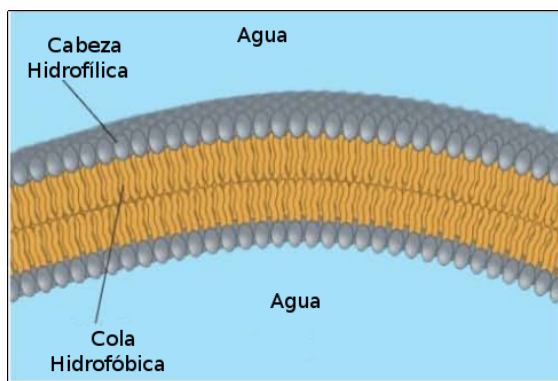


Figura 2.3: Autoensamblaje de la bicapa lipídica (modificado de [7])

La fluidez de la membrana

Las membranas no son simplemente una conjunto de moléculas rígidas y sin movimiento [7]. Los experimentos han demostrado que existen dos tipos de movimientos de los lípidos en la membrana. El primero de ellos consiste en la **difusión lateral** de un lípido sobre el plano de la membrana y es relativamente rápido, mientras que el segundo llamado **flip-flop** consiste en la tranposición de un lípido de un lado de la membrana a otro. Este último movimiento es relativamente raro, según estimaciones para un lípido individual,

ocurre menos de una vez cada mes [1]. Se ilustran estos dos movimientos en la figura 2.4.

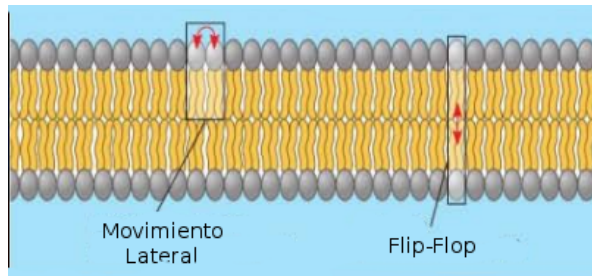


Figura 2.4: A la izquierda vemos una representación de la difusión lateral de los lípidos sobre la bicapa y a la derecha tenemos un caso de Flip-Flop o transposición de los lípidos de un lado de la bicapa a otro (modificado de [7])

A continuación pasaremos a la parte proteica del modelo de mosaico, es decir a las proteínas que interactúan con la bicapa lipídica.

Las proteínas de membrana

Como vimos en la sección anterior, la propiedad anfipática de los fosfolípidos es en gran medida responsable de la **estructura** de la membrana. La pregunta prudente sería entonces ¿qué elementos son los responsables de sus **funciones**? La respuesta a esta interrogante es proporcionada por las **proteínas de membrana**.

En general se reconocen dos familias principales de proteínas de membrana: Las **proteínas integrales** y las **proteínas periféricas**. Las proteínas integrales usualmente son proteínas que atraviesan la membrana con regiones hidrofóbicas, que interactúan con el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica, y regiones hidrofílicas, que sobresalen a ambos lados de la superficie de la bicapa. Las proteínas periféricas, por otro lado, están adheridas debilmente a la superficie de la membrana, incluso a veces a las partes expuestas de las proteínas integrales. Se muestra un esquema de esto en la figura 2.5.

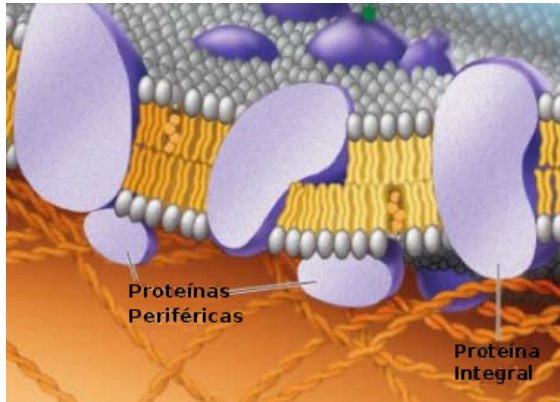


Figura 2.5: En la figura se muestra un esquema de la membrana (la bicapa lipídica con las proteínas incluidas). Podemos apreciar proteínas integrales que atraviesan la membrana de un lado a otro (A la derecha en el esquema) y proteínas periféricas que están adheridas a la superficie de la membrana (En el centro en la imagen). Imagen tomada de [7]

Entre las funciones conocidas de las proteínas de membrana se encuentra el **transporte** de sustancias de un lado a otro de la membrana, **actividades enzimáticas**, **transducción de señales**, funcionar como medio de **unión intercelular** y servir como **elementos estructurales** a la matriz extracelular para la regulación de la forma de la célula [7].

Historia del modelo del mosaico fluido

En 1885 **Charles Overton** postuló que las membranas estaban hechas de lípidos basado en el hecho de que las sustancias que se disolvían en lípidos entraban a las células a mayor velocidad que las sustancias que era insolubles en lípidos. Veinte años más tarde se analizaron químicamente membranas de globulos rojos y se encontró que efectivamente estaban compuestos parcialmente de lípidos [7].

En 1917 **Irving Langmuir** construyó membranas artificiales agregando fosfolípidos disueltos en benceno al agua. Después de que el benceno se evapora los fosfolípidos forman una capa delgada que recubre la superficie del agua. Langmuir propuso que en esta capa las partes polares de los fosfolípidos apuntaban hacia el agua y la parte no polar hacia afuera [3] [7].

En 1925 **E. Goerter** y **F. Grendel** usando técnicas desarrolladas previamente por Langmuir determinaron el área superficial de los lípidos. Se tomó una célula y se disolvió en una superficie acuosa de tal manera que los lípidos quedaran distribuidos en la superficie y se midió su área. El resultado fue que el área superficial de la monocapa disuelta sobre la superficie acuosa

era aproximadamente dos veces el área superficial de la célula que se había disuelto. Basados en estos resultados los investigadores propusieron que las membranas celulares están compuestas por dos capas delgadas de lípidos. Por otro lado los resultados eran consistentes con la hipótesis de la orientación hecha previamente por Langmuir [3]. Como podemos ver el problema con este modelo es que es incapaz de explicar las otras funciones usualmente atribuidas a las membranas celulares, en palabras modernas: carece de proteínas.

El primero modelo de membrana en incluir proteínas fue propuesto por **Danielli** y **Davson** en 1935. En su modelo la membrana se encontraba recubierta en ambos lados por una capa de proteínas hidrofílicas. Su modelo recuerda una estructura de sandwich, una bicapa de fosfolípidos entre dos capas de proteínas globulares [7]. En 1958 **Robertson** en un artículo de revisión publicó evidencia directa del modelo ayudándose de los avances en microscopía electrónica. En su artículo Robertson presenta imágenes de varios tipos de membranas apuntando un principio organizacional común en la estructura de todas las membranas [3].

En 1960 **Signer** y **Lenard** descubrieron que también existían proteínas que atravesaban la membrana. Esto los llevó a formular el famoso modelo conocido como **mosaico fluido**.

2.1.2. Tráfico a través de la membrana

Debido a que el interior de la bicapa lipídica es hidrofóbico, la membrana celular tiende a bloquear el paso de la mayoría de las sustancias que son solubles en agua. Por otro lado, algunas moléculas indispensables para la nutrición celular como los aminoácidos y los azúcares son solubles en agua. El transporte de estas moléculas a través de la membrana es mediado por **proteínas de transporte de membrana**. En general, estas proteínas caen dentro de dos grandes familias: **transportadores**, los cuales poseen partes móviles y mueven moléculas de un lado a otro de la membrana alterando su conformación y **canales iónicos** que en contraste forman pequeños poros hidrofílicos en la membrana a través de los cuales los solutos pueden pasar por **difusión** [1]. Otra característica que los diferencia es que mientras los canales iónicos discriminan principalmente basándose en el tamaño y la carga eléctrica, los transportadores lo hacen basándose en que molécula encaja específicamente en un sitio de ligando de la proteína. En este trabajo trataremos de los canales iónicos.

Otra distinción importante en la naturaleza del transporte es el uso de

energía o no para lograrlo. Las moléculas se mueven a favor de su gradiente electroquímico (si este camino existe). Este movimiento es llamado **transporte pasivo** ya que no requiere otra fuerza para realizarse. Por otro lado existen situaciones en donde es necesario mover ciertos solutos en contra de su gradiente electroquímico. En este último caso, es necesario realizar trabajo sobre la molécula para que la acción se lleve a cabo y este tipo de transporte en consecuencia es llamado **transporte activo** ya que requiere energía.

Canales iónicos

En principio la manera más sencilla de permitir que una pequeña molécula soluble en agua atraviese la membrana es crear un canal hidrofílico mediante el cual ésta pueda difundir. Los canales iónicos cumplen precisamente esta función en las membranas celulares.

Sin embargo existen dos importantes propiedades que destruyen el sencillo modelo que plantea a los canales iónicos como simples agujeros en la membrana. La primera es la **selectividad** o **especificidad**, es decir, su capacidad para permitir que unos iones pasen y otros no. La selectividad de un canal iónico depende de la forma del canal iónico y de la distribución de aminoácidos con carga eléctrica que se encuentran en su estructura [1]. Otra propiedad que distingue a los canales es que estos **no se encuentran siempre abiertos**, en lugar de eso, los canales iónicos se abren y cierran en respuesta a ciertos estímulos que pueden ser de naturaleza química, eléctrica o mecánica [4]. En particular nuestro trabajo se remitirá a estudiar las respuestas a voltaje de un tipo especial de estos canales iónicos: los canales de cloro.

2.1.3. Potencial de membrana

Todas las células tienen una diferencia de potencial eléctrico o **potencial de membrana** a través de su membrana plasmática [4]. Para entender las causas por las cuales existe este potencial hagamos un breve recordatorio de teoría electromagnética básica. En los metales las corrientes eléctricas son flujos de electrones, pero en solución acuosa las corrientes eléctricas son flujos de iones. Los movimientos de iones a través de la membrana se pueden detectar como una corriente eléctrica. Análogamente el acumulamiento de cargas de un signo en un lado de la membrana de modo que éstas no estén balanceadas se traduce en un potencial de membrana.

Debido a la acción de un transportador activo de sodio y potasio, que bombea continuamente potasio hacia el citosol, la célula usualmente tiene una alta concentración interna de potasio, esto crearía un exceso de cargas positivas de no ser por la existencia de un gran número de moléculas orgánicas cargadas negativamente, y un número menor de aniones inorgánicos, en el interior de la célula (siendo precisos la bomba de sodio y potasio saca $3Na^+$ de la célula al tiempo que mete $2K^+$ a su interior). Por otro lado la célula posee unos canales de potasio llamados de *fuga* que aleatoriamente oscilan entre estar abiertos y cerrados independientemente de las condiciones interiores o exteriores. Cuando estos canales están abiertos el potasio difunde hacia afuera siguiendo su gradiente de concentración, este flujo neto de cargas positivas hacia afuera, crea una situación en la que se acumula un exceso de carga negativas en la superficie interna de la membrana, al tiempo que se acumula un exceso (de igual magnitud) de cargas positivas en la superficie externa de la membrana. De esta forma se genera un potencial de membrana que se opone a la salida de K^+ (o que impulsa un flujo de K^+ en sentido contrario). Cuando la fuerza del potencial de membrana, que impulsa un flujo de K^+ hacia adentro, iguala a la fuerza del gradiente de concentración, que impulsa un flujo de K^+ hacia afuera, se llega a una situación en la que el flujo neto de K^+ a través de la membrana es igual a cero. Al potencial de membrana en que esto ocurre se le denomina **potencial de equilibrio del K^+** . [1].

2.2. Teoría básica de circuitos

En este capítulo estableceremos los elementos necesarios de la teoría de circuitos básicos para poder interpretar el problema en términos de la instrumentación usada en los experimentos. También presentaremos un esquema preliminar de los circuitos que fueron usados en el experimento para la obtención de datos como mostraremos en el siguiente capítulo.

2.2.1. La membrana como un capacitor

Desde un punto de vista meramente eléctrico la membrana separa dos materiales conductores (las soluciones intra y extra celular) mediante un material dieléctrico (la bicapa lipídica) lo cual la convierte en un **capacitor** [4].

Recordemos que la capacitancia es una medida de la carga que puede almacen un capacitor y que se define como [2].

$$C = \frac{Q}{V} \quad (2.1)$$

Donde Q y V son la carga y el voltaje entre el material dieléctrico respectivamente.

Las dimensiones físicas de la membrana son importantes para determinar la capacitancia, entre más membrana tengamos más carga podrá ser acumulada y esto nos da una idea de por qué la capacitancia debe ser proporcional al área de la membrana. La fuerza del campo electromagnético que atrae a los iones del otro lado de la membrana decrece con la distancia, luego entonces la capacitancia es inversamente proporcional a la anchura de la membrana, por último la capacidad para almacenar carga también depende de las propiedades del material dieléctrico que cuantificamos mediante la constante dieléctrica. Un poco de análisis dimensional nos revela que [6]:

$$C = \frac{A\epsilon}{d} \quad (2.2)$$

Donde A , ϵ y d son el área, la constante dieléctrica y la anchura de la membrana respectivamente.

2.2.2. Circuitos básicos

Circuitos resistivos

Los canales iónicos pueden ser interpretados como zonas de conductividad con resistencia finita, es decir, **resistencias**. Dado que en la sección anterior ya vimos que la membrana se puede presentar como un capacitor, es útil y necesario ver las propiedades básicas de estos elementos de circuitos y además las propiedades que surgen de su interacción.

Recordemos que un aspecto central en la teoría de circuitos básica es la **ley de Ohm** que establecemos a continuación:

$$V = RI \quad (2.3)$$

Donde V , R e I son el voltaje, la resistencia y la corriente respectivamente.

Recordemos también que se le llama **circuito en serie** cuando los elementos del circuito se conectan en sucesión [2]. En particular cuando estos elementos en serie son resistencias podemos interpretar el circuito entero con

un **circuito equivalente** considerando una sola resistencia cuyo valor es la suma de las resistencias del sistema original [6].

Otra configuración importante es la de **circuito en paralelo** que se define como aquella en la que todas las entradas de los elementos del circuito coinciden en un solo nodo y lo mismo para las salidas [2]. En particular en el caso de las resistencias podemos obtener un circuito equivalente cambiando el circuito por otro con una sola resistencia en la cual el inverso de esta resistencia sea igual a la suma de los inversos de las resistencias del sistema completo [6]. En la figura 2.6 se muestra un esquema de ambos casos.

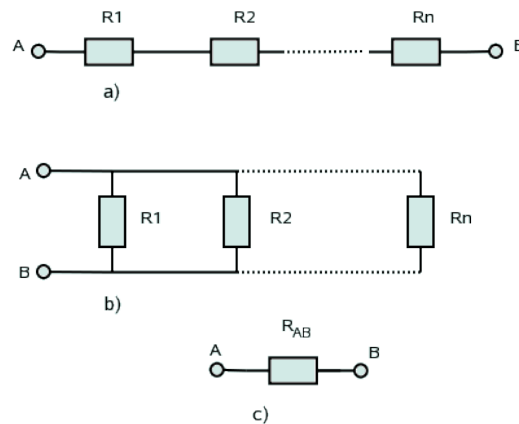


Figura 2.6: En la parte superior de la figura tenemos un circuito de resistencias en serie. Podemos sustituir este circuito de varias resistencias por un circuito simple con una resistencia igual a la suma de de las resistencias individuales. En la imagen de la mitad tenemos un circuito de resistencias en paralelo, de igual manera podemos sustituir este sistema por un circuito con una sola resistencia cuyo valor sea el recíproco de la suma de los recíprocos de las resistencias que queremos convertir

Circuito RC

Un resistor y un capacitor en serie son llamados circuito RC. Si un voltaje es aplicado a un capacitor la diferencia de potencial en el capacitor crecerá de manera exponencial hasta alcanzar un valor estable, similar al votaje aplicado [2]. En la figura 2.7 se muestra el esquema del circuito.

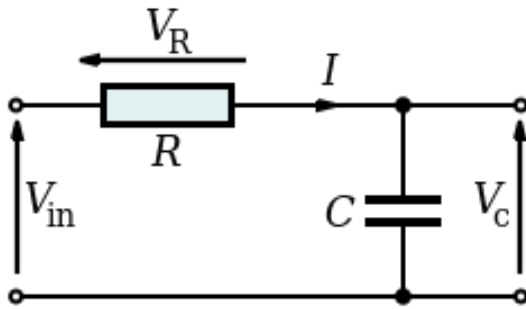


Figura 2.7: Representación esquemática de un circuito RC

Si aplicamos un voltaje en V_{in} como se muestra arriba la diferencia de potencial en el capacitor comenzará a crecer con el perfil $V_C = V_{in}(1 - e^{-\frac{t}{\tau}})$ donde $\tau = RC$. Esto último nos permite inferir la capacitancia conociendo el perfil de crecimiento de voltaje en un circuito RC.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1. Registro de célula completa

En términos generales y siendo poco específicos la técnica de **registro de célula completa** consiste penetrar la célula, que se encuentra bañada en una solución de nuestra elección (baño; usualmente algo que se parezca al medio extracelular) mediante una micropipeta que contiene una solución (usualmente algo que se parezca al medio intracelular) en contacto con un electrodo. Como otro electrodo se encuentra en la solución de baño, podemos obtener información sobre las características eléctricas de la membrana celular. Ilustramos la idea mediante la imagen [3.1](#).

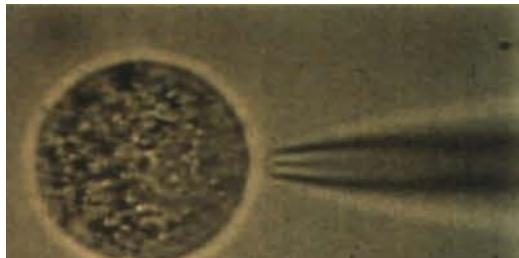


Figura 3.1: Podemos apreciar la micropipeta a punto de hacer contacto con la célula en esta imagen (Tomado de [\[8\]](#))

A pesar de que en este trabajo usamos la técnica de **registro de célula completa** es conveniente primero hablar sobre el **registro intracelular** para introducir terminología y dejar en claro algunas ideas básicas.

3.1.1. Registro intracelular

El registro intracelular involucra pinchar la membrana plasmática con una micropipeta para crear contacto entre la punta de la pipeta y el interior de la célula. Una vez hecho esto último tendremos un electrodo haciendo contacto con el citosol y el otro en el baño en el que tengamos a nuestra célula. Debido a que ambos electrodos están en lados opuestos de la membrana podemos medir directamente el potencial de membrana. Tomando en cuenta que vamos a pinchar la membrana se requiere de una pipeta con una punta muy afilada para reducir el daño provocado a la célula. Las dimensiones de la punta limitan tanto la conductividad de la misma como la difusión rápida de la sustancia dentro de la pipeta al citoplasma. A continuación, en la figura 3.2, presentamos un esquema del registro intracelular. [6] [8].

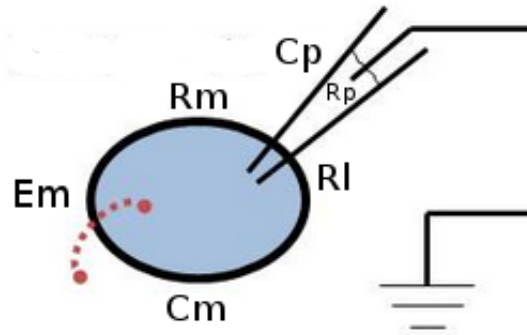


Figura 3.2: Esquema del registro intercelular. Podemos apreciar que se introduce una resistencia de fuga R_i debido al daño producido a la membrana durante el pinchado.

En la figura 3.2 tenemos indicada la resistencia de la membrana R_m , la capacitancia de membrana C_m y el potencial de membrana dado por E_m . Además tenemos otros parámetros que describimos a continuación.

- **Resistencia de la pipeta R_p .** Debido al pequeño tamaño de la punta de la pipeta se produce una resistencia muy alta. Esta resistencia es usualmente minimizada usando una solución altamente conductiva para llenar la pipeta, esto puede ser usado gracias a que la punta es muy pequeña y entonces la fuga de la solución de la pipeta en el citoplasma es muy pequeña.
- **Capacitancia de la pipeta C_p .** El vidrio de la pipeta es un aislante entre dos soluciones conductoras y por lo tanto forma un capacitor. Los

capacitores tienden a retrasar los cambios en el potencial y esta situación no es la excepción, muchos amplificadores tienen en su circuitería métodos para eliminar/compensar esta capacitancia.

- **La resistencia de fuga R_l .** Como se menciona en el pie de figura esta se presenta debido a que al pinchar a la célula se causa un daño sobre la membrana de ésta creando un cortocircuito entre el citosol y el baño. Lo ideal es que esta resistencia sea lo más grande posible, lo cual equivale a que la célula sea dañada lo menos posible en el proceso de pinchado.

Por último mostramos en la figura 3.3 el circuito equivalente del esquema.

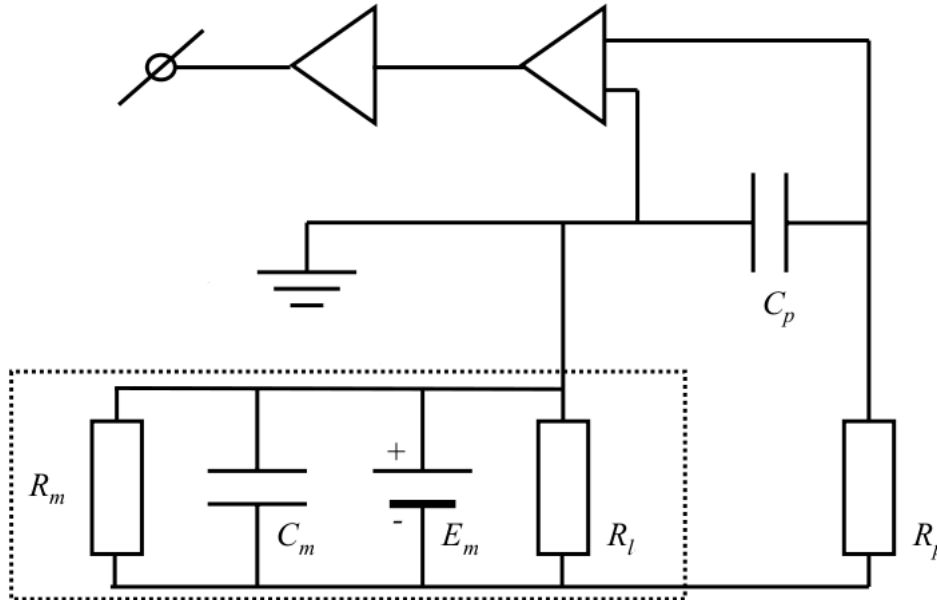


Figura 3.3: Circuito equivalente para un registro intracelular. Los amplificadores operacionales representan la circuitería que procesa y filtra la información recabada por los electrodos (Modificado de Molleman).

3.1.2. Fijación de voltaje

La actividad de los **canales iónicos** puede ser registrada en forma de cambios en el potencial de membrana ya que estos reflejan la respuesta de la membrana a los iones saliendo o entrando a la célula [9] [6]. Por otro lado estudiar el comportamiento de los canales iónicos directamente es complejo

debido a que cambios en el potencial de membrana retroalimentan cambios en los canales iónicos de al menos tres maneras independientes [6]:

- El flujo iónico a través de los canales cambia debido al cambio de la fuerza impulsora (F_I) que depende del potencial de membrana (E_m) y del potencial de equilibrio del ión (E_i); de manera que $F_I = E_m - E_i$.
- Muchos canales iónicos son dependientes del voltaje.
- Algunos canales iónicos tienen sus flujos iónicos restringidos a ciertos potenciales de membrana.

Luego entonces es deseable controlar el potencial de membrana y registrar las corrientes de membrana directamente, dicha situación es conocida como el nombre de **voltage clamp** o **fijación de voltaje**. Esta situación se logra usualmente en la práctica mediante circuitos de retroalimentación, que en respuesta a cualquier desviación de un potencial dado, inyecten una corriente que compensa el cambio [6].

Por último, debido a que la medición de voltaje y la inyección de corriente usan la misma pipeta y la retroalimentación mencionada debe ser instantánea, una pipeta con una punta igual de pequeña (por lo tanto con una resistencia muy alta) como la usada en el registro intracelular es indispensable. Sin embargo, con otro tipo de pipetas de mayores dimensiones el objetivo es completamente factible y es el método usado en el **registro de célula completa** que revisaremos en la siguiente sección.

3.1.3. Modo de registro de célula completa

En el registro de célula completa tenemos que el electrodo correspondiente a la pipeta hace contacto directo con el citosol. Esta situación es muy parecida al registro intracelular que planteamos con anterioridad, sin embargo, la diferencia reside en el hecho de que usamos pipetas con una punta no tan aguda, lo que permite inyectar corrientes mayores, lo que a su vez permite fijar el voltaje por retroalimentación. Además, la punta de la pipeta es lo suficientemente ancha como para permitir que el líquido en el interior de la pipeta sustituya completamente el del interior de la célula (debido a que el volumen de la célula es muy pequeño comparado con el volumen de la pipeta). Por otra parte, la membrana no se pincha, sino que la punta de la pipeta es adherida (sellada) a la membrana mediante una ligera succión; después, el parche de membrana comprendido dentro de la circunferencia de la punta se rompe mediante una succión más fuerte. Luego entonces, se puede controlar

las condiciones interiores de la célula mediante la preparación adecuada de la solución correspondiente a la pipeta. Se presenta un esquema del registro en la figura 3.4.

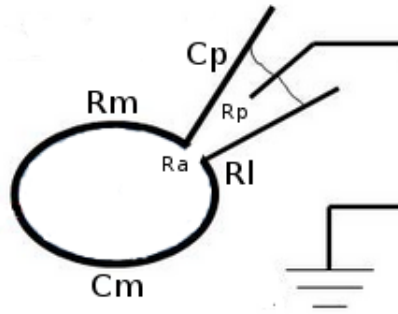


Figura 3.4: Esquema de registro de célula completa. Podemos apreciar que las sustancias en la pipeta y en el interior de la célula coinciden y además que la pipeta es más grande que la usada en el registro intracelular, comparase la situación con la figura 3.2.

En la figura 3.4 tenemos de nuevo los elementos R_m representando la resistencia de la membrana, C_m representando la capacitancia de la membrana, R_l representando la resistencia de fuga producto del cortocircuito creado al sellar la punta de la pipeta a la membrana celular,, R_p la resistencia de la pipeta y C_p la capacitancia de la pipeta descrita con anterioridad. Además, también agregamos una resistencia llamada de acceso que representa la dificultad con la cual los componentes de la pipeta ingresan en el citosol, para el registro de célula completa este valor es muy bajo y se denota por R_a . En la figura 3.5 presentamos el circuito equivalente del experimento.

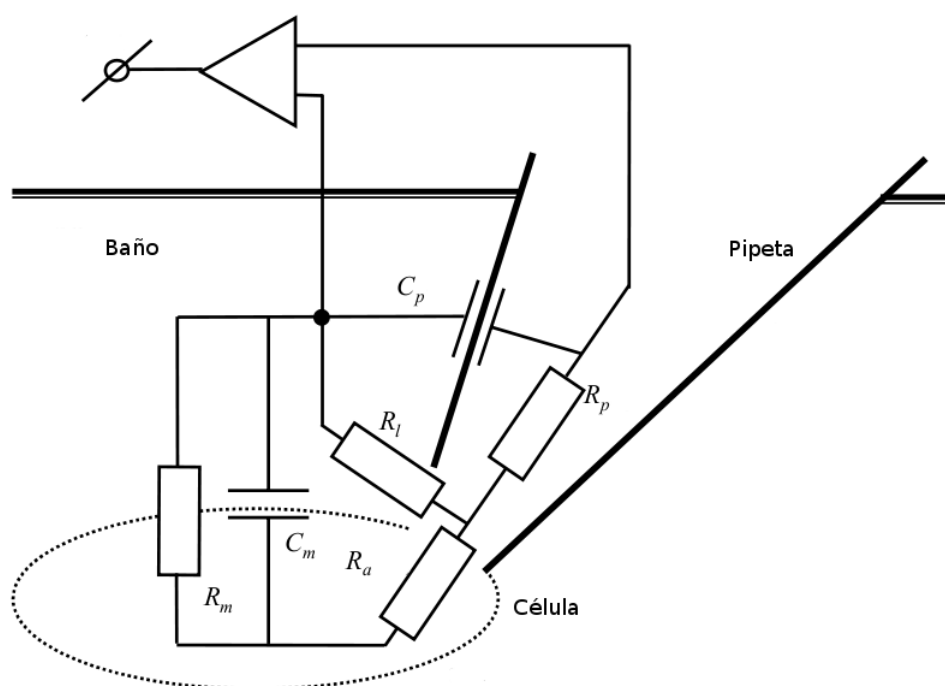


Figura 3.5: Circuito equivalente para el modo de registro de célula completa . Los amplificadores operacionales representan la circuitería de procesamiento y filtrado de la información (Modificado de [6]).

En ciertas situaciones puede ser indeseable que se elimine completamente la identidad del citosol. Por ejemplo, es posible que se pierdan factores desconocidos relevantes para el estudio de los canales iónicos. En estos casos se utiliza la técnica de **parche perforado** donde el contacto eléctrico con el citosol se establece usando un agente perforante (usualmente nystatina o anfotericina B). El agente perfora la membrana, permitiendo solo a los iones más pequeños pasar, lo cual posibilita a los contenidos del citoplasma quedar intactos [6]. Esta última variante del registro de célula completa es la que usamos en este trabajo.

3.2. Materiales necesarios

En esta sección describiremos los materiales necesarios y preféricos para ensamblar el dispositivo experimental.

3.2.1. Mecanismos ópticos y mecánicos

Para trabajar las micropipetas con la delicadeza necesaria que se requiere son necesarios dos mecanismos: Uno que nos permita realizar movimientos muy finos de las micropipetas y otro que nos permita observarlos. Al primero se le llama micromanipulador y por el segundo nos referimos al microscopio con la óptica y estructura adecuadas.

El micromanipulador

La función esencial del micromanipulador en estos experimentos consiste en posicionar de una manera muy controlada las micropipetas sobre la membrana celular. En el proceso mencionado se cambian drásticamente las escalas de manipulación, desde acercar la pipeta a la preparación ($10^{-2}m - 10^{-3}m$), encontrar el lugar perfecto sobre la membrana celular ($10^{-5}m$), hasta hacer contacto con la membrana ($10^{-7}m$). Debido a esto los manipuladores contienen tres escalas de ajuste: La primera permite el fácil cambio de pipetas y además la colocación de estas sobre la muestra (figura 3.7). La segunda consiste de un ajuste grueso en tres dimensiones que nos permite acercarnos a la célula a un rango de $100\mu m$, donde la pipeta y la célula casi se encuentran en un mismo plano (figura 3.7). Por último, la tercera escala es un ajuste fino hidráulico para llevar a cabo la aproximación final a la membrana celular (Figura 3.6).



Figura 3.6: Mecanismo encargado del ajuste fino, cada una de las ruedas corresponde a movimientos controlados por fuerza hidráulica en la dirección de cierto eje

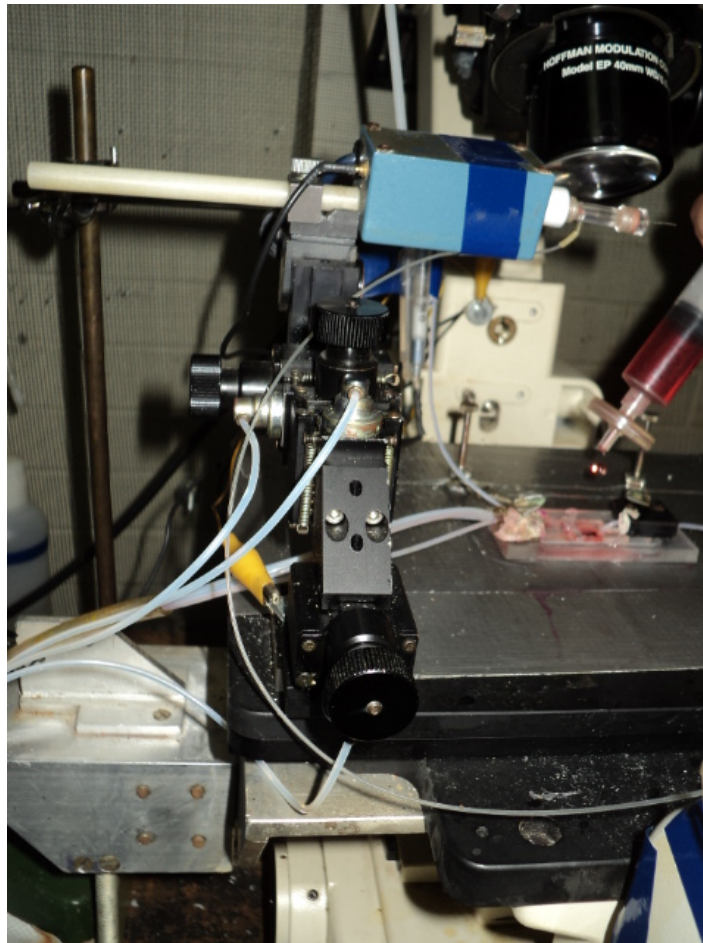


Figura 3.7: En esta imagen se observa el mecanismo (En el centro de la fotografía) que nos permite ajustar la escala media. Arriba el paralelepípedo azul claro es el llamado **Probe**, con el llamado **Holder** enchufado a su derecha (cilindro casi transparente), que tienen un grado de libertad que permite el fácil cambio de pipetas y la primera escala de movimiento mencionada en el texto

El microscopio

Enlistamos a continuación el conjunto de condiciones que debe tener un microscopio para ser funcional en el contexto de los experimentos electrofisiológicos.

- Tipo de óptica. El tejido vivo es usualmente transparente ante las fuentes de luz convencionales [6]. En esta clase de experimentos es fundamental tener visión clara de la membrana, esto lleva a que en estos

experimentos se usen microscopios con ópticas especiales como las de contraste de fase y de Normanski. En el laboratorio se cuenta con una **óptica de contraste tipo Hoffman**.

- El espacio de trabajo. En un microscopio normal el objetivo se acerca a la muestra desde arriba. Dado esto, el espacio que queda entre el objetivo y la muestra es demasiado pequeño para poder manipular una pipeta-electrodo. Por otro lado como las escalas en las que se trabaja usualmente requieren grandes magnificaciones es impensable pensar en separar el objetivo y la muestra a distancias prácticas. De esto último se concluye que estos experimentos requieren de microscopios invertidos.
- La plataforma del microscopio. La plataforma del microscopio debe de ser estable y facil de ajustar. El sistema que usamos cuenta con mecanismos para mover la plataforma a lo largo del plano donde ésta reside.

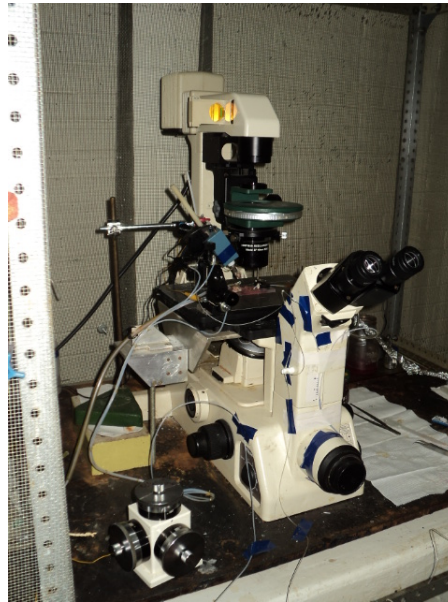


Figura 3.8: Microscopio usado en los experimentos donde se pueden observar algunas de las características que hacen a éste funcional en nuestro contexto experimental: Objetivo inverso, plataforma móvil y de un tamaño considerable, óptica Hoffman.

Presión en la pipeta

Mientras la pipeta se acerca a la célula es necesario mantener una pequeña presión positiva sobre el fluido dentro de la pipeta para evitar la contaminación del borde de la punta de la micropipeta por micropartículas suspendidas en el baño. Por otro lado, en la formación del sello se usa una pequeña succión para maximizar la resistencia del sello. Para ello en la figura 3.9 se muestra el sistema que utilizamos en nuestro experimento.



Figura 3.9: Sistema de presiones. La pieza blanca, a la izquierda del centro de la figura, es un distribuidor de 3 vías conectado mediante tubos de plástico a: a) el holder (tubo superior); b) un manómetro de mercurio (tubo central); y c) una jeringa (tubo inferior). En el centro de la figura se muestra el manómetro de mercurio que permite controlar la succión aplicada sobre la base de la micropipeta (base que se encuentra contenida dentro del holder)

Baño

En el contexto de los experimentos de electrofisiología se le llama **cámara de superfusión** al recipiente donde se colocan las células y **baño** a la solución en la que las células se encuentran inmersas. Esta estructura requiere usualmente estar **superfusiónada**, lo cual quiere decir que cuenta con un sistema que permite el cambio y la agregación de sustancias al exterior de la célula y además su drenado. En la figura 3.10 se muestra la mencionada estructura.

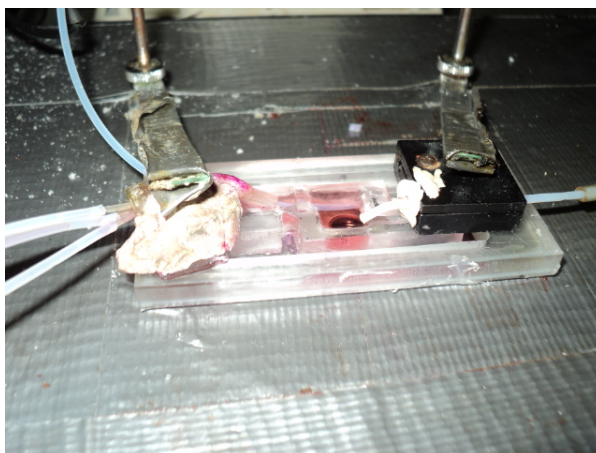


Figura 3.10: Podemos apreciar el compartimiento central donde se coloca el cubreobjetos que contiene nuestras células, a la izquierda tenemos los conductos que vienen del sistema de superfusión y permiten el intercambio de soluciones (centro izquierda) y, arriba de estos conductos, se muestra el puente salino que conecta el baño con el electrodo de referencia. Del lado derecho tenemos el conducto de drenado. Se cuenta con dos elementos de fijación en ambos lados como se puede observar

Superfusión

Un sistema de superfusión consta de dos partes. Primero un conjunto de contenedores conectados de alguna manera al baño a través de conexiones cuyo flujo pueda ser controlado. La segunda parte consiste de un sistema de drenaje. Mostramos la primera parte del sistema en la figura 3.11 mientras que la segunda parte ya se mostró en la figura 3.10.

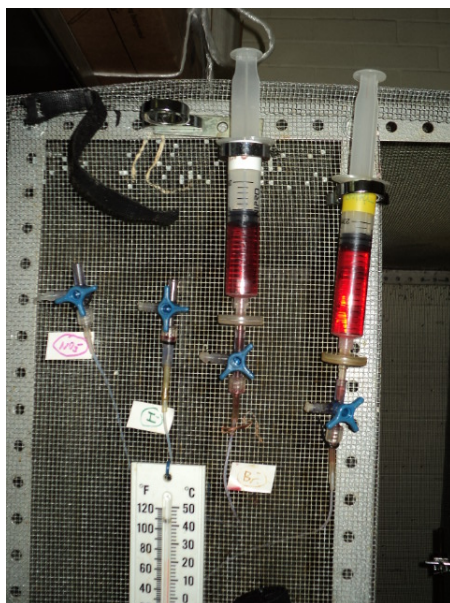


Figura 3.11: Sistema de superfusión, aquí los fluidos bajan al aplicar presión manual sobre los émbolos de las jeringas. Se cuenta con válvulas (en azul) que nos dan control sobre las soluciones que perfundimos

3.2.2. Electrodo y micropipetas

Nos referimos al electrodo como a un sólido conductor que hace contacto eléctrico con el fluido [6] [9]. En nuestro trabajo usamos dos variedades: a) un electrodo explorador, que consiste en un alambre de plata clorada que se encuentra dentro de la pipeta; y b) un electrodo de referencia, que consiste en un electrodo de calomel que se conecta con el baño mediante un puente salino.

Potencial de unión entre sólido líquido y polarización

Las reacciones de oxidación-reducción entre metales y soluciones iónicas provocan la creación de una diferencia de potencial entre los dos medios [6]. Por otro lado también ocurre que los electrodos se polarizan, esto último sucede debido a la acumulación de iones cerca de electrodos que poseen una diferencia de potencial entre ellos. La polarización tiene un efecto parecido al de las capacitancias sobre el experimento: retrasa los cambios que se llevan a cabo en el potencial. Dado esto, es necesario tomar medidas contra los efectos negativos que estos fenómenos pueden tener sobre nuestro experimento. Para mitigar los efectos del potencial de unión se usan materiales con ba-

jos potenciales de oxido reducción mientras que para evitar la polarización se usan materiales poco polarizantes. En nuestro experimento los materiales que cumplían en lo posible tales disposiciones y eran accesibles al mismo tiempo resultaron ser plata (plata clorurada; $Ag - AgCl$) con una cubiera de cloruro en la parte exterior de la misma para el electrodo de la pipeta, mientras que para el baño se usó un electrodo de calomel, el cual se compone de tres fases: 1) mercurio; 2) una pasta formada con mercurio, calomel (cloruro mercurioso: Hg_2Cl_2) y una solución de KCl 3M; y 3) una solución de KCl 3M. Este electrodo de calomel (la 3a fase) se puso en contacto con el baño mediante un puente salino de agar disuelto y gelificado en una solución de KCl 3M.

Micropipetas, el estirador de micropipetas y flameo

Las pipetas que contienen el electrodo de $Ag - AgCl$ y permiten aislar la solución que tendrá contacto con la membrana celular están hechas a partir de tubos capilares de vidrio de **borosilicato**. Se muestra uno de los capilares en la figura 3.12.



Figura 3.12: Un tubo capilar de vidrio de borosilicato, con moneda para referencia de escala.

Una vez que los capilares pasan por el proceso de **flameo** (que describiremos en secciones subsecuentes) nos referimos a ellos como **micropipetas**.

Para convertir los capilares de la presentación cilíndrica en la que son adquiridos al estado en el cual su punta es la adecuada para el experimento se usa un **estirador de micropipetas**. Estos aparatos trabajan calentando los capilares al rojo vivo y aplicando fuerzas en direcciones opuestas en los

extremos, en pasos, hasta que solo queda una delgada porción del mismo entre los dos. Por último un esfuerzo final los separa en dos pipetas idénticas. La magnitud de los esfuerzos, el calor aplicado y el tiempo de los pasos están determinados por las rutinas internas del programa y son programables para ajustarse a las necesidades que presente la situación. Se muestra el aparato en la figura 3.13.



Figura 3.13: El sistema para estirar pipetas. En el cuadro del centro se encuentra una resistencia que sirve para elevar la temperatura del tubo capilar a niveles plásticos. A cada lado de la resistencia se encuentran rieles en color cromado que hacen las veces de soporte mecánico para el capilar. Por último podemos apreciar en el fondo a la derecha un solenoide encargado de producir los esfuerzos que se aplican al capilar.

El último pasó para tener una pipeta funcional en terminos del experimento es el **flameo**. Debido a la manera pipetas en la que el estirador de pipetas rompe el capilar, sus puntas son bastante irregulares e inadecuadas para acercarse a la membrana celular pues podrían dañar a esta última. Para resolver este problema, se acerca la pipeta a una resistencia al rojo vivo para que el calor uniformize las irregularidades. Para acercanos de manera adecuada se utiliza una microforja, que cuenta con un microscopio, la resistencia que se calienta y un micromanipulador con capacidad de sujetar las pipetas

y acercarlas a la resistencia a una distancia efectiva. Se muestra el conjunto en la figura 3.14.

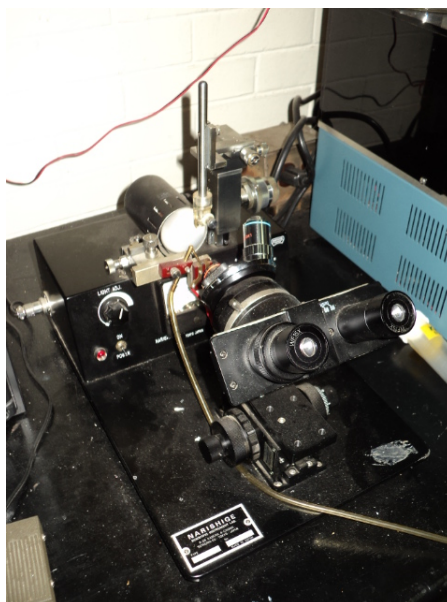


Figura 3.14: Podemos apreciar la microforja utilizada para el flameo. La microforja cuenta con manipuladores que permiten acercar de manera controlada la pipeta a la resistencia y así entonces proceder al flameo

3.3. Protocolos del experimento

En general los protocolos de fijación de voltaje y de lectura de corriente fueron llevados a cabo con el instrumento Axopatch 1D bajo el control del software pCmplamp (v.6; Axon Inst.) a través de una PC Pentium I y usando el convertidor A/D Digitadata 1200 (Axon Inst.). Las corrientes de membrana fueron procesadas con un filtro pasa bajas ($5KHz$) digitalizadas y guardadas en el disco duro para su análisis posterior. El análisis de datos fue llevado a cabo usando el módulo Clampfit del programa pClamp y para el ajuste de curvas es usado Sigmaplot (Jandel Scientific).

Para obtener información útil de la actividad eléctrica de la célula existen diversos protocolos que describiremos a continuación.

3.3.1. Protocolo de pulsos

El protocolo consiste en que desde un potencial fijado en -50 mV se aplican una serie de pulsos cuadrados que duran 720 ms desde -160 mV a 80 mV en

incrementos de 20 en 20 mV con un intervalo de 8 segundos entre cada pulso. Después de cada pulso, el potencial de membrana fue fijado a -150 mV durante 80 ms, para registrar las corrientes de cola.

3.3.2. Protocolo de corrientes de cola

El protocolo consiste en que desde un potencial fijado en -50 mV se activa la corriente con un prepulso de 80 mV durante 1.1 s y las corrientes de cola se evocan mediante una serie de pulsos cuadrados, de 880 ms, entre -60 y 60 mV en aumentos de 20 en 20 mV con un intervalo de 16 s entre cada pulso. Las corrientes instantaneas (I_{ins} ; definidas como las corrientes que se presentan durante los primeros 0.4 ms) son siempre restadas. El resultado es ajustado mediante la ecuación:

$$I_t = A([1 - e^{-t/\tau_t}] + [1 - e^{-t/\tau_f}]) \quad (3.1)$$

3.3.3. Protocolo de rampas

El protocolo consisten en que desde un potencial fijado en -50 mV se activa la corriente con un pulso de 80 mV durante 1.1 s, luego el voltaje se lleva a -60 mV por 3 ms permitiendo que ocurra la corriente capacitiva, luego mediante una rampa de voltaje (es decir, un perfil lineal) de 30 ms de duración se lleva el voltaje a 60 mV continuamente. La corriente lineal independiente del tiempo se registra igual pero sin el puslo inicial de activación (prepulso a 80 mV) y luego se le resta a la primera. La corriente registrada de esta manera es gráfícada con respecto al voltaje y la conductancia se obtiene mediante regresión lineal. El esquema se presenta en la figura [3.15](#).

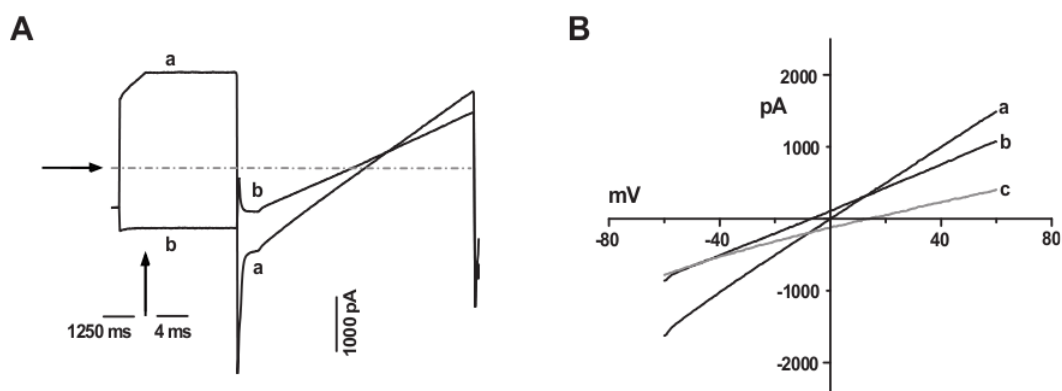


Figura 3.15: A: Respuestas de corriente a una rampa de voltaje (de -60 a 60 mV durante 30 ms) obtenidas cuando I_{out} fue activada con un prepulso a 80 mV durante 1.1s (a) y cuando no fue activada (b; prepulso a -80 mV). La línea punteada indica el nivel de corriente cero. B: Los registros de rampa de la figura A son presentados para ilustrar la sustracción (a-b), definida como la respuesta de I_{out} a la rampa de voltaje (c).

Capítulo 4

Resultados

Mostramos primero el resultado que obtenemos al aplicar el protocolo de pulsos en la figura 4.1.

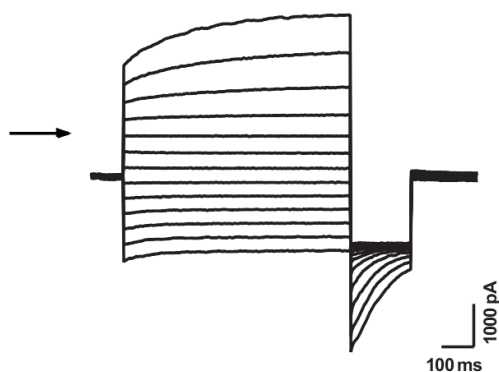


Figura 4.1: Gráficas superpuestas de corrientes registradas de una célula que expresa I_{ovt} . La flecha indica el nivel de corriente cero y las corrientes salientes se grafican hacia arriba en esta y las siguientes gráficas (excepto en la figura 4.2). La corriente I_{ovt} la definimos como una corriente saliente que se activa, en forma dependiente de tiempo, a potenciales más positivos que $0mV$.

Mostramos como se ajusta una curva exponencial a las corrientes de cola de I_{ovt} para obtener las constantes de tiempo en la figura 4.2.

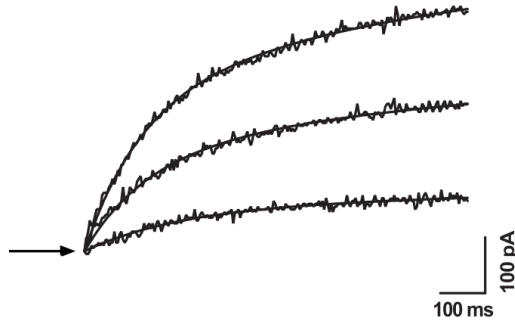


Figura 4.2: Corrientes de cola (a las que se restó la corriente instantánea) correspondientes a (de abajo hacia arriba) -20, -40 y -60 mV. Las líneas superpuestas a los registros corresponden a los mejores ajustes exponenciales. La constante de tiempo más breve (-60 mV) fue del orden de 200 ms.

Ahora mostramos, en la figura 4.3, los resultados obtenidos mediante un protocolo de rampas, en condición control y en presencia de DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbeno-2,2'-ácido disulfónico), ambos resultados superpuestos para hacer evidentes las diferencias.

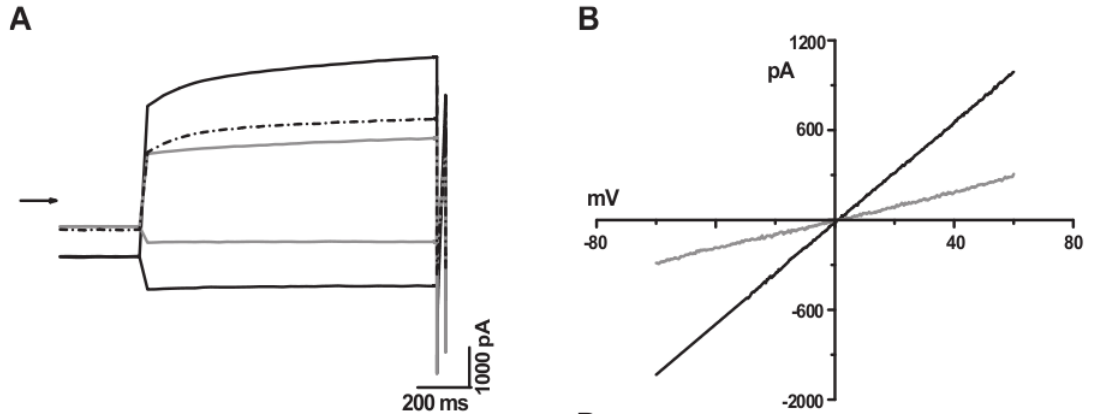


Figura 4.3: A: Registros de corrientes durante los prepulsos obtenidos en la misma célula en condición control (negro) y en presencia de 1mM DIDS (gris). En presencia de DIDS, I_{out} e I_{ins} fueron parcialmente inhibidas como se ilustra con el trazo punteado. B: Respuestas de I_{out} a rampas de voltaje correspondientes a los experimentos descritos en A. Notese que cuando se comparan con su control (negro), las corriente en rampa registradas con DIDS (gris) presentan una menor conductancia pendiente.

Por último mostramos como varía la conductividad de la misma corriente al cambiar la concentración de iones en el baño. Los resultados están resumidos en la figura 4.4.

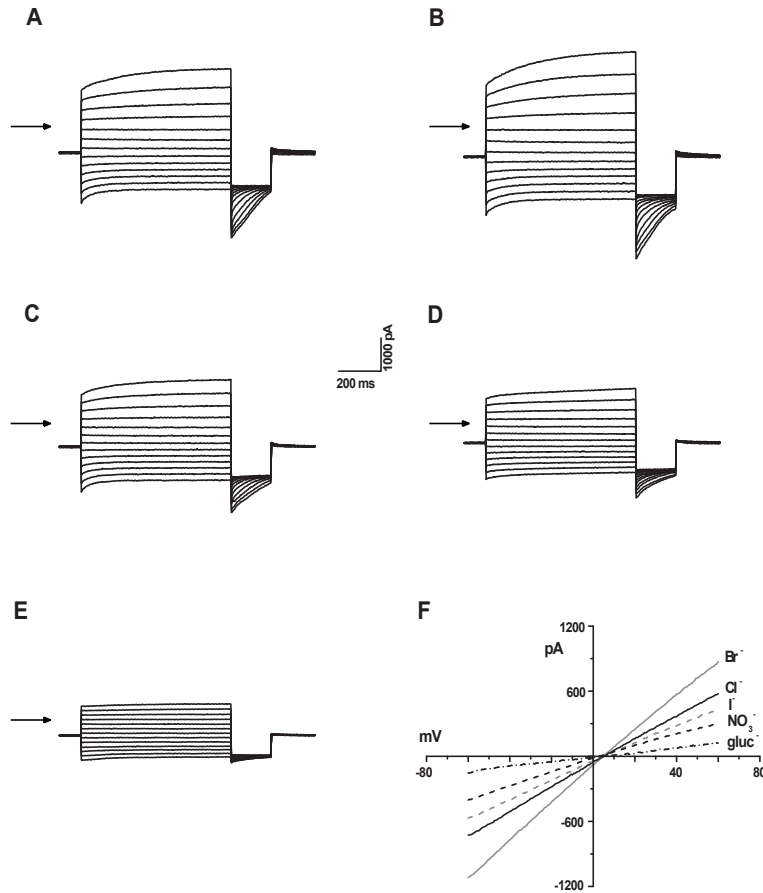


Figura 4.4: A,B,C,D,E: Registros de corriente en las condiciones: control cloruro (120 mM Cl^- ; A), bromuro (8mM Cl^- y 112mM Br^- ; B), yoduro (8 mM Cl^- y 112mM I^- ; C), nitrato (8mM de Cl^- y 112mM NO_3^- ; D) y gluconato- (8mM Cl^- y 112 mM gluconato $^-$; E). Notese que cuando se comparan con la condición control cloruro, las amplitudes de I_{out} y su corriente de cola fueron mayores en la condición bromuro, menores en la condición yoduro, aun menores en la condición nitrato y todavía menores en la condición gluconato. F: Respuesta de I_{out} a rampas de voltajes de una misma célula en las condiciones de A a E. Cuando son comparadas con respecto a su valor en la condición control cloruro (negro sólido) las corrientes en rampa registradas en la condición bromuro (gris sólido) presenta un incremento en la conductancia pendiente y las corrientes en la condición yoduro (gris punteado) presentan una menor conductancia pendiente. La conductancia pendiente fue aún menor en la condición nitrato (negro punteado) y todavía menor en la condición gluconato (puntos).

Capítulo 5

Discusión y conclusiones

El primer experimento que se encuentra ilustrado en la figura 4.1 muestra que efectivamente aparece una corriente saliente que se activa, en forma dependiente de tiempo, a potenciales más positivos que 0 mV; a la cual llamamos I_{out} . Sin embargo, para afirmar que la corriente I_{out} es efectivamente aniónica otros experimentos son necesarios.

Muchas corrientes aniónicas son bloqueadas por DIDS [5] luego entonces, la idea era realizar experimentos agregando DIDS a la solución para verificar si la corriente se inhibía o no y si se presentaban cambios de conductividad. Uno de los protocolos que permiten verificar cambios en la conductividad es el protocolo de rampas que se mencionó con anterioridad. Sin embargo, antes de usar dicho protocolo es un imperativo ver que efectivamente se dan las condiciones para aplicarlo. Estas condiciones se dan solo si la corriente se mantiene activada mientras se aplican las rampas. Para ello nos valemos del segundo experimento representado en la sección anterior (figura 4.2) donde pudimos mediante ajuste comprobar que efectivamente la constante de tiempo más breve a -60 mV fue de 200 ms. Esto último es un tiempo más largo que el intervalo en el cual aplicamos la rampa y por lo tanto el protocolo es válido.

Una vez con el protocolo de rampas validado podemos observar que en el experimento ilustrado en la figura 4.3, en presencia de DIDS, se inhiben parcialmente las corrientes mencionadas y se reduce la conductividad representada en la figura por la línea gris. Esto último nos da buenos argumentos para pensar que la corriente es efectivamente aniónica.

Por último, una vez que sabemos que efectivamente contamos con una corriente aniónica realizamos experimentos de rampas con diferentes concentraciones de iones como se ilustra en 4.4 y obtenemos finalmente la secuencia

de conductividades $Br^- > Cl^- > I^- > NO_3^- > Gluconato^-$ que es lo que se buscaba cuantificar en este trabajo.

Bibliografía

- [1] Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Ketih Roberts, and Peter Walter. *Essential Cell Biology*. Garland Science, 2010.
- [2] Robert L. Boylestad. *Introductory Circuit Analysis*. Prentice Hall, 2002.
- [3] Thomas Heimburg. *Thermal Biophysics of Membranes*. WILEY-VCH Verlag, 2007.
- [4] Bertil Hille. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc, 1992.
- [5] T.J. Jentsch, V. Stein, F. Weinreich, and A.A. Zdebik. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological Reviews*, 82(2):503–568, 2002.
- [6] Areles Molleman. *Patch Clamping, An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology*. John Wiley and Sons Ltd, 2003.
- [7] Jane B. Reece and Neil A. Campbell. *Biology*. Pearson, 2010.
- [8] Bert Sakmann and Erwin Neher. *Single Channel Recording*. Springer, 2009.
- [9] Wolfgang Walz. *Patch-Clamp Analysis, advanced techniques*. Humana Press, 2007.