

Tesis Doctoral

# Desarrollo de tecnología para el estudio de la activación rápida de canales iónicos

Auzmendi, Jerónimo Andrés

2012

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

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

Cita tipo APA:

Auzmendi, Jerónimo Andrés. (2012). Desarrollo de tecnología para el estudio de la activación rápida de canales iónicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Auzmendi, Jerónimo Andrés. "Desarrollo de tecnología para el estudio de la activación rápida de canales iónicos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Desarrollo de tecnología para el estudio de la activación  
rápida de canales iónicos.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

**Jerónimo Andrés Auzmendi**

Director de tesis: Dr. Luciano Moffatt

Consejero de Estudios: Dra. Lidia Szupack

Lugar de trabajo: Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2012

# **Desarrollo de tecnología para el estudio de la activación rápida de canales iónicos.**

## **RESUMEN:**

Los canales iónicos son proteínas multiméricas que regulan el pasaje de iones a través de la membrana celular acoplado su funcionamiento a factores externos como el voltaje de membrana y/o presencia de ligandos específicos. Sus dinámicas de cambio de estado pueden ser descritas cuantitativamente en términos de un proceso de Markov, aleatorio y sin memoria. Las constantes cinéticas de estos procesos pueden ser obtenidas, a partir de resultados experimentales, con la estimación de la máxima verosimilitud (EMV), empleando el algoritmo recursivo de cadenas ocultas de Markov. En el caso particular de los canales activados por ligando se han postulado estados parciales de energía intermedia (FLIP-STATE), para explicar retardos durante la activación del receptor. Para dilucidar si la existencia de estos estados es una propiedad del receptor o de cada una de las subunidades es necesario poder realizar aplicaciones de agonista aún más breves que las del estado de arte (0.2 ms). Por tal motivo en esta tesis se presenta la creación de un método que permite realizar aplicaciones discretas de agonista ultra-rápidas (20  $\mu$ s), sobre una preparación de outside-out patch clamp, marcando una mejora sustancial de 10-50 veces comparado con el estado del arte actual y a los dispositivos comerciales, respectivamente. Se analizó el rango de condiciones en el que esta técnica puede ser empleada y se realizaron modificaciones para generar aplicaciones arbitrarias del agonista maximizando la información cinética obtenida por experimento. Por último, se realizó un análisis teórico, bajo la óptica de la estadística Bayesiana, de la respuesta de canales a aplicaciones ultra-cortas de agonista. Empleando esta técnica y método de análisis puede discriminarse entre modelos que ajustan igualmente los datos experimentales.

Palabras Claves: Canales iónicos, Flip State, patch clamp, aplicaciones de agonista ultra-rápidas, piezoeléctrico, estadística Bayesiana.

# Development of technology for study of the quick activation of ion channels

## ABSTRACT

Ion channels are multimeric proteins that regulate the passage of ions through cell membrane coupling their functioning to external factors like membrane voltage and/or the presence of specific ligands, etc. Their change of state dynamics can be quantitatively described in terms of a Markov's process, random and without memory. The kinetic constants of these processes can be obtained, from experimental results, with the maximum likelihood estimation (MLE), using the recursive algorithm of hidden chains of Markov. In the particular case of ligand-activated channels there had been postulated states of intermediate energy (FLIP-STATE), to explain delays during the activation of the receptor. To elucidate whether the existence of these states is a property of the receptor or each one of the subunits it is necessary to make applications of agonist even shorter than art state (0.2 ms). Therefore in this thesis presents the creation of a method that allows discrete ultra-fast applications of agonist (20  $\mu$ s), on an outside-out patch clamp preparation, marking a substantial 10-50 fold improvement compared with actual art state and commercial devices, respectively. We analyzed the range of conditions in which this technique can be used and we made modifications to generate random applications of agonist maximizing the kinetic information obtained by experiment. Finally, we made a theoretical analysis, under the viewpoint of Bayesian statistics, of the response of channels to ultra-fast applications of agonist. Using this technique and this method of analysis can discriminate between models that also fit the experimental data.

Keywords: Ion Channels, Flip State, Patch Clamp, Ultra-fast Agonist Applications, Piezoelectric Bayesian Statistics.

## Agradecimientos

A mi hija Bianca Auzmendi y a su madre Valeria Boti por apoyarme en este desarrollo y cumplir con migo el sueño de ser una hermosa familia que crece....

A mis compañeros de trabajo, en especial al Dr. Luciano Moffatt por dirigir mi tesis doctoral

A los amigos y a la familia por estar presentes en los momentos más importantes.

Al Instituto de Química Física de los Materiales Medio Ambiente y Energía, por permitir el desarrollo de este trabajo en sus instalaciones

A la Agencia Nacional de Promoción Científico Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por subsidiar este proyecto.

A todos aquellos que colaboraron directa o indirectamente con este trabajo.

## Dedicatorias.

.... A Bianca Auzmendi, mi hija, porque su llegada a este mundo, sus primeros descubrimientos y logros cotidianos, su constante ternura y amor me dieron la fuerza necesaria para seguir adelante, aun cuando parecía que la cumbre de la montaña era inalcanzable.

.... A Oscar Auzmendi, mi padre, ya que su constante perseverancia fue la leña que generó en mí el deseo de seguir avanzando a pesar de todas las dificultades encontradas en este camino.

.... A Cristina Safari, mi madre, quien con su amor y devoción apoyó su mano en mi hombro y susurró en mi oído "fuerza hijo".

.... A la Señora presidenta de la República Argentina, Dra. Cristina Fernández de Kirchner, por que su gobierno continuó apuntalando el desarrollo de nuevos científicos en el país.

.... A la memoria del ex presidente de la República Argentina, Dr. Néstor Kirchner quien inició el camino de recuperación del país, marcando en él, el rol preponderante de la ciencia a tal fin.

# *Prefacio*

Hace aproximadamente 5 años atrás, durante los primeros días del mes de mayo de 2008 llegué al Instituto de Química Física de los Materiales Medio Ambiente y Energía de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, en donde años atrás había obtenido mi título de grado y a la cual había jurado no volver. Luego de un rato de esperar en el hall del instituto, para una entrevista con el Dr. Moffatt, quien poco tiempo después se convertiría en el director de mi tesis doctoral, este se hizo presente. Lucía como un hombre despreocupado y de mediana edad. Por el contrario ese día yo estaba formalmente preparado para la entrevista.

Durante aproximadamente treinta minutos el Dr. Moffatt revisó mis antecedentes e hizo las preguntas de rutina para luego de conversar otros treinta minutos ir a recorrer las instalaciones del instituto y del laboratorio. El espacio era amplio y muy bien equipado. Luego fuimos a la oficina del grupo de superficies, del cual el Dr. Moffatt formaba parte como investigador asistente. Mis antecedentes, aunque no eran demasiados, me permitían tener un panorama de que era lo que buscaba como tema de trabajo. Después de graduarme como Licenciado en Ciencias Biológicas me había dedicado a la investigación en el área de neurociencias y durante ese tiempo había decidido que definitivamente no deseaba trabajar en electrofisiología. Luego de la recorrida formal por el laboratorio llegamos al lugar que ocupaba el “equipamiento” del Dr. Moffatt. En un enorme laboratorio, contra un rincón había una gran mesada de cinco metros de largo, de la que solo podía utilizarse unos treinta centímetros. En frente, como delimitando un pasillo de no más de un metro de ancho, un escritorio bastante sucio, lleno papeles y cajas de distinto tamaño; al fondo contra una ventana que no cerraba bien y dejaba entrar la brisa matinal junto a una importante cantidad de polvo, había una jaula de Faraday y una

mesita anti vibratoria muy casera. Con un tono de entusiasmo mezclado con vergüenza el Dr. Moffatt reconoció aquel espacio como propio y exclamó que ese sería el lugar donde se llevarían a cabo los experimentos. Tamaña decepción fue la mía y no por la carencia de material, si no por enterarme que los experimentos serian de electrofisiología. Creo que en ese momento el Dr. Moffatt advirtió que algo no estaba en su lugar y comenzó a hablar con grandilocuencia de la importancia de aquellos experimentos y que si las cosas funcionaban podía ser un avance importante para la comprensión de los cambios conformacionales que ocurren cuando un ligando interacciona con un canal iónico y produce la apertura del poro, dado que si se aplicaba el agonista lo suficientemente rápido podría llegar a separarse el efecto de la unión del ligando del efecto del cambio conformacional y de esa forma se podrían identificar estados conformacionales del canal que hasta el momento solo podían presuponerse. Aquel día me retiré del instituto convencido de no aceptar la propuesta del Dr. Moffatt y tomarme algunos días para encontrar una excusa razonable que me permitiese quedar en buena forma con aquel investigador. Esta fue la primera impresión que despertó en mí aquella entrevista, tal es así que prácticamente no recabé en el hecho de que prácticamente no había material propio para realizar los experimentos propuestos, sino hasta algunos días después. Con el correr de los días y el análisis de otras propuestas laborales opté por aceptar la propuesta del doctor Moffatt ya que sería un verdadero desafío realizar la tesis en un campo en el que tendría que aprender muchas cosas nuevas que escapan a la formación de un biólogo clásico y utilizar mucho la imaginación para solucionar todos los problemas técnicos que fuesen apareciendo. Así es que durante el transcurso de esta tesis tuve que adquirir nociones de electrónica y aprender a emplear programas como Labview para comandar todas las funciones del setup de patch clamp y la adquisición de los datos. Para realizar el tratamiento de los datos y crear los generadores de pulsos necesarios para obtener los pulsos únicos y aleatorios tuve que aprender a utilizar Matlab. Además desarrollé un método muy simple e ingenioso para evaluar los retardos en la respuesta a un comando de voltaje para válvulas solenoides. Construí un sistema de perfusión de soluciones que propulsa las soluciones empleadas en los experimentos, de manera neumática sin generar burbujas que puedan romper el patch. Por ultimo estudié la relación entre la

arquitectura de la pipeta de perfusión y la estabilidad del sistema encontrando que las pipetas que fueron construidas con sus paredes en ángulo generan una interfase que oscila aun cuando el piezo eléctrico, empleado para comandar el movimiento del sistema, permaneció inmóvil, mientras que aquellas pipetas construidas con paredes paralelas generaron una interfase más estable. Independientemente del tipo de pipeta, el ancho del septum que separa los canales de la pipeta de perfusión tuvo un efecto en el ensanchamiento de la interfase conforme se incrementó la velocidad. Todos estos avances dieron lugar a dos publicaciones: *Increasing the reliability of solution exchanges by monitoring solenoid valve actuation*. (J Neurosci Methods, 2010. **185**(2): p. 280-3.128) y *Achieving maximal speed of solution exchange for patch clamp experiments*. (PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42275).

Durante el transcurso de estos años muchas veces me pregunté si había tomado una buena decisión, ya que podría haber optado por realizar la tesis en algún tema en el que bajo alguna hipótesis y con algún modelo determinado hiciera algunas mediciones de importancia biológica con técnicas convencionales, en vez de tener que generar la metodología para poder llegar a resolver los mecanismos de activación de los canales iónicos. Claro está que el hecho de incrementar la resolución temporal con la que se puede aplicar el agonista a un canal iónico abrirá nuevas preguntas con relevancia biofísica y llevará al planteamiento de nuevos modelos del comportamiento de los canales. Incluso las técnicas desarrolladas en este trabajo permitirán estudiar el mecanismo de acción de drogas que tienen como target tanto a los canales iónicos activados por ligando como a los activados por voltaje.

Por ultimo quiero enfatizar que todo este trabajo no hubiese sido posible sin el incentivo permanente y la libertad suficiente que el Dr. Moffatt me ha brindado. Por eso usted que va a leer este trabajo tan particular comprenderá el énfasis puesto en el desarrollo tecnológico, a pesar de que la progresión de los sucesos que fueron determinando las distintas decisiones tomadas no está relatada cronológicamente ya que muchas de estos han ocurrido de forma simultánea. Quizás esa pregunta que tantas veces me hice sobre la correcta decisión de trabajar en este tema se conteste

en visión retrospectiva de aquella jaula de Faraday tapizada de polvo, a un setup de patch clamp funcional adaptado para emplear una tecnología de punta. Quizás vea en aquel muchacho de la entrevista que estaba a punto de ser padre, al hombre que siguió su intuición y que hoy puede decir

... "Remember back, the early days  
When you were young, and less amazed  
Suddenly the channel changed  
The first time you saw blood

Cut to later, now you're strong  
You've bled yourself, the wounds are gone  
It's rare when there is nothing wrong  
Survived and you're amongst the fittest

Love ain't love until you feel it  
Up riding high amongst the waves

I can feel like I  
Have a soul that has been saved  
I can see the light  
Coming through the clouds in rays

I gotta say it now  
Better loud than too late  
I gotta say it now  
Better loud than too late"

(Pearl Jam - "\_Amongst The Waves\_")

# Índice

<b>PREFACIO</b> .....	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
CONTEXTO HISTÓRICO.....	12
UN VIEJO PROBLEMA DE LA FARMACOLOGÍA DE CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR UN LIGANDO.....	49
UNA POSIBLE SOLUCIÓN A UN VIEJO PROBLEMA .....	56
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>
OBJETIVOS GENERALES.....	59
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
<b>CAPÍTULO 1 “CARACTERIZACIÓN DINÁMICA DE VÁLVULAS SOLENOIDES”</b> .....	<b>61</b>
INTRODUCCIÓN.....	61
METODOLOGÍA Y RESULTADOS. ....	63
<i>Comportamiento de las válvulas solenoides.....</i>	<i>63</i>
<i>Evaluación de la señal del émbolo. ....</i>	<i>69</i>
DISCUSION.....	73
<i>Razones para utilizar este método.....</i>	<i>74</i>
<i>Válvulas de pellizco o de diafragma?.....</i>	<i>74</i>
<i>Posibles áreas donde aplicaciones donde la señal de émbolo es potencialmente útil. ....</i>	<i>75</i>
<b>CAPÍTULO 2 “DESARROLLO DE APLICACIONES ULTRA-RÁPIDAS SOBRE PREPARACIONES DE PATCH”</b> .....	<b>77</b>
INTRODUCCIÓN.....	77
METODOLOGIA Y RESULTADOS.....	79
<i>Armado de un dispositivo de patch clamp con un sistema ultra-rápido de intercambio de soluciones.....</i>	<i>79</i>
<i>Relación entre variables dependientes del sistema de perfusión de soluciones. ....</i>	<i>82</i>
<i>Medición sistemática de la interfase. ....</i>	<i>88</i>
<i>Análisis de las vibraciones del piezo eléctrico y obtención de pulsos ultra-rápidos (20 <math>\mu</math>s).....</i>	<i>96</i>
DISCUSIÓN.....	109
<i>Comparación con otros dispositivos. ....</i>	<i>111</i>

<i>Pulsos ultra-cortos son una poderosa herramienta experimental</i> .....	115
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>"BARRIDO EN FRECUENCIAS Y OPTIMIZACIÓN DE LA</b>
<b>VELOCIDAD"</b> .....	<b>116</b>
INTRODUCCIÓN.....	116
RESULTADOS Y METODOLOGIA .....	118
<i>Estabilización del sistema y escaneo de las frecuencias</i> .....	118
<i>Generando pulsos aleatorios.</i> ....	128
<i>Efecto de la velocidad de los jets de solución</i> .....	131
DISCUSIÓN.....	137
<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>"SIMULACIONES Y MÉTODO MACROSCÓPICO RECURSIVO."</b> .....
	<b>140</b>
INTRODUCCIÓN.....	140
METODOLOGÍA Y RESULTADOS.....	141
<i>MacroR vs MacroDR</i> .....	141
<i>Simulaciones</i> .....	149
DISCUSIÓN.....	165
<i>Comparación del método macroscópico recursivo con su modificación.</i> ....	166
<i>Utilidad de los pulsos ultra-rápidos.</i> ....	167
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>169</b>
<b>APÉNDICE A</b> .....	<b>172</b>
<i>Setup commander 3.1 (S_C_3.1)</i> .....	173
<i>General control, custom function &amp; frequencies (G_C_fx_fr)</i> .....	173
<i>Tuned function (T_F)</i> . ....	175
<i>Analog input – analog Output (AI_AO)</i> . ....	176
<i>Valves commander (V_C)</i> .....	177
<i>Function mean interface (F_M_I)</i> .....	177
<i>Frequency Scanning (Fscan)</i> . ....	178
<i>Re – Scale (R_S)</i> .....	179
<i>G from waveform (G_F_W)</i> :.....	180
<i>Measure one G (M_O_G)</i> :.....	180
<i>Control G within limits (C_G_W_L)</i> . ....	181
<b>APÉNDICE B</b> .....	<b>183</b>
<b>APÉNDICE C</b> .....	<b>190</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>205</b>

# ***Introducción***

Es quizás el desarrollo de nuevas tecnologías sumado a la capacidad de cómputo e interpretación de resultados lo que llevó a que disciplinas como la neurociencia, la biofísica, la farmacología, la biología celular y molecular y la genética, a experimentar un gran avance en el último siglo. Basta solo revisar comentarios de los biógrafos de personalidades como Ludimar Hermann que aseguran que el éxito de sus investigaciones fue debido a “su excepcional habilidad en el diseño, construcción y uso de aparatos, según fuera necesario, para resolver los problemas en los que investigaba. La mayoría de estos problemas dependían para su solución de la medida exacta de magnitudes físicas”. En el campo del estudio de las propiedades biofísicas de canales iónicos, ciertos resultados y descubrimientos llevaron a la comprensión de sus roles fisiológicos mediando la generación y propagación del impulso nervioso y la transmisión sináptica rápida. Esta introducción revisa el contexto histórico en el que las hipótesis, resultados y teorías más sobresalientes fueron planteadas y obtenidas. Luego analiza la relación existente entre estudios de estructura-función y por último propone una solución para la corrección de los problemas planteados anteriormente dejando abierta la puerta para el desarrollo de las técnicas que se presentan y discuten en las secciones posteriores.

## CONTEXTO HISTÓRICO.

A fines del siglo XIX, el fisiólogo alemán *L. Hermann*, cuyo mayor aporte en el campo de la fisiología fue demostrar que las fibras musculares sanas son isopotenciales, publicó varias hipótesis acerca de la localización de las fuerzas electromotrices en un nervio lesionado [1-3] donde las dos más probables fueron, por

un lado la “*Teoría de la alteración*” y la “*Teoría de la pre-existencia*”. La primera hacía referencia a la formación de una fuerza electromotriz entre los segmentos lesionados y sanos de una fibra muscular mientras que por otro lado, la teoría de la pre-existencia se refería a la existencia de una fuerza electromotriz en la superficie de las fibras sanas. *J. Bernstein, fisiólogo alemán*, fue el principal defensor de la “*Teoría de la pre-existencia*” y basado en ésta, elaboró una hipótesis sobre el papel de la membrana celular en la generación del impulso nervioso, que descansaba en tres puntos principales:

- Todas las células vivas tienen un interior electrolítico rodeado por una membrana permeable a algunos iones;
- A través de la membrana en reposo existe una diferencia de potencial, y;
- Durante la actividad la permeabilidad iónica de la membrana disminuye, de manera que la diferencia de potencial se reduce a un valor relativamente bajo.

Inicialmente *Bernstein* desarrolló el primero de esos tres puntos. En un trabajo publicado en 1868 propuso que una célula viva está rodeada por una membrana que es ligeramente permeable a los iones y que el interior está lleno de electrolitos donde los iones se mueven libremente, en forma parecida a como lo hacen en el exterior [4]. Posteriormente analizó el segundo punto basándose en el trabajo de Walter Hermann Nernst (1864-1941) y en 1902 propuso que las membranas del nervio y del músculo se encontraban polarizadas debido a su permeabilidad selectiva al potasio, que se sabía existía en altas concentraciones dentro de la célula [5]. Por lo tanto, si la membrana que rodea las células era permeable a ese catión pero no a los aniones intracelulares, la difusión del potasio debido a su gradiente de concentración tendería a separar las cargas en la membrana, creando una doble capa de cargas, donde en el interior celular predominarían las cargas negativas y en el exterior celular abundarían las cargas positivas tal como lo sugirió Nernst. De esta forma podía explicarse la aparición de un

potencial de membrana al que se lo llamó “potencial de reposo”, dado que si no cambiaban las concentraciones de los iones, el potencial debía permanecer constante.

Según el pensamiento de *Bernstein*, la pérdida transitoria de la permeabilidad selectiva al potasio conduciría a la excitación de la fibra, anulando temporalmente el potencial de reposo y dando origen a una perturbación o impulso que se propagaría a lo largo de la fibra. A medida que las investigaciones en electrofisiología fueron estimuladas por el uso del electrómetro capilar y del galvanómetro de espejo, Bernstein encontró más apoyo para su teoría, elaborándola con más detalle en su monografía "*Elektrobiologie*".

La especulación básica de Bernstein era que las células vivas estaban rodeadas de una membrana que tenía una permeabilidad baja para los iones. Por lo tanto, si se hacía pasar una corriente constante a través de una cámara que contuviera células, la mayor parte de la corriente fluiría alrededor de ellas sin penetrarlas. Si la membrana era una estructura aislante debería comportarse como un capacitor; esto es, además de su conductancia también tendría una impedancia. Dado un voltaje aplicado, la cantidad de corriente que cruza la membrana dependerá de su frecuencia, de tal manera que cuando fuese cero fluiría solamente a través de la resistencia; sin embargo, las corrientes alternas serían capaces de cruzar tanto a través del resistor como del capacitor de la membrana. Por lo tanto, midiendo la impedancia de la membrana a diferentes frecuencias sería posible distinguir las contribuciones relativas de la conductancia y de la capacitancia. Entre 1910 y 1913 *R. Höber* publicó los resultados de la medida de la impedancia de una masa de eritrocitos. *Höber* encontró que la impedancia era de 1,200 Ohmios a 1 KHz, mientras a 10 MHz éste valor decrecía a 200 Ohmios [6-8]. Estos resultados corroboraban la hipótesis de Bernstein ya que la resistencia de la suspensión de células estaba localizada en la membrana superficial y no en el interior de las células, por lo tanto la membrana de los eritrocitos era un mal conductor, mientras que en el interior celular había una conductancia del orden de cualquier electrolito biológico.

A principios del siglo XX los fisiólogos empezaron a pensar que los iones generaban fuerzas electromotrices solamente si la difusión de al menos una de las

especies iónicas presentes era restringida. Fue el físico químico alemán *W. Nernst*, durante su estadía como profesor y director del Instituto de Química Física de la Universidad de Humboldt de Berlín, quien definió una ecuación que fue utilizada como base para la teoría moderna del potencial de la membrana. Esta ecuación define, en términos de las concentraciones de un ion específico a cada lado de la membrana, el potencial al cual no habrá movimiento neto de este ion para ningún lado. En otras palabras, define el potencial requerido para oponerse exactamente al movimiento de un ion particular a favor de su gradiente de concentración o potencial de equilibrio. Así, si la membrana celular fuese exclusivamente permeable a un ion específico entonces el potencial de la membrana estaría dado por el potencial de equilibrio a ese ion en particular. Entonces para cualquier ión la ecuación de Nernst queda definida como:

$$E_{\text{ion}} = \frac{RT}{Fz} \ln \frac{[\text{ION}]_i}{[\text{ION}]_o}$$

donde  $E_{\text{ion}}$  es el potencial de equilibrio del ion,  $R$  es la constante de los gases ideales,  $T$  es la temperatura,  $F$  es la constante de Faraday,  $z$  es la valencia del ion,  $[\text{ION}]_i$  es la concentración interna y  $[\text{ION}]_o$  es la concentración externa del ion.

Usando las concentraciones de sodio y potasio medidas en la sangre y axoplasma del calamar, la ecuación de Nernst proporciona valores de -75 mV para el potencial de equilibrio del potasio y +55 mV para el del sodio. Empleando estos valores *A. L. Hodgkin* y *B. Katz* propusieron en 1949 que mientras la membrana celular se encuentra en reposo es predominantemente permeable al potasio y por lo tanto el potencial de reposo es cercano al potencial de equilibrio del potasio, pero durante el potencial de acción se hace predominantemente permeable al sodio y por lo tanto el potencial se mueve hacia el potencial de equilibrio del sodio [9]. En algunos casos, hacia el final del aumento en la permeabilidad al sodio hay un gran aumento en la permeabilidad al potasio, lo que devuelve al potencial un valor cercano al de equilibrio de  $K^+$ .

Según la hipótesis de Bernstein debería haber un aumento inespecífico de la conductancia de la membrana durante el potencial de acción, con lo cual el potencial transmembrana llegaría a cero milivoltios. En 1939 *Hodgkin* y *Huxley* lograron introducir un electrodo axial en el axoplasma del axón gigante de calamar y pudieron registrar un potencial de reposo de -50 mV en el interior, mientras que la amplitud del potencial de acción fue de 100 mV [10]. De manera independiente *H. J. Curtis* y *K. S. Cole* también lograron introducir un electrodo axial en el axón gigante de calamar y registraron potenciales de reposo de 41 – 59 mV mientras que los potenciales de acción variaron de 78 – 168 mV con respecto al electrodo externo [11, 12]. En conjunto las mediciones realizadas por *Hodgkin* y *Huxley* en 1939 y por *Curtis* y *Cole* en 1942 mostraron claramente que la amplitud máxima del potencial de acción era mayor a la predicha por *Bernstein*, por lo que su hipótesis no era válida. En 1949 *Hodgkin* y *Katz* acuñaron el nombre de “overshoot”, para explicar el fenómeno observado y propusieron a través de la “hipótesis del sodio” que la despolarización y la inversión de la polaridad de la membrana (de negativo a positivo en el interior celular) durante el valor máximo del potencial de acción, eran debidos a un gran aumento en la conductancia de la membrana celular al sodio y un consecuente movimiento de este ión hacia el interior de la célula [9]. De esta manera, con la hipótesis del sodio podían explicarse fenómenos que estaban más allá de los que podían ser explicados con el concepto de permeabilidad selectiva a los iones potasio que había postulado *Bernstein*. De hecho, una pérdida transitoria de la permeabilidad al potasio llevaría simplemente a la despolarización de la membrana.

En 1902 se publicó un trabajo de *E. Overton* que sentó las bases para la posterior explicación del fenómeno del “overshoot” durante el potencial de acción. En este trabajo se demostró que la excitabilidad del músculo de rana se perdía si el cloruro de sodio extracelular se reducía a menos del 10% de la concentración normal [13]. Además, la excitación del músculo se acompañaba de una pérdida del potasio intracelular y de una ganancia en el sodio intracelular.

Para 1945 *Hodgkin* y *Huxley* terminaron el trabajo sobre los potenciales de reposo y de acción, que habían empezado en 1939 [14]. En este trabajo compararon mediciones de los potenciales de reposos y de acción registrados en el interior del

axón gigante del calamar (*Loligo forbesi*) y registros externos tanto en axón gigante como en fibras nerviosas de cangrejos (*Carcinus maenas*) y langostas (*Homarus vulgaris*).

*Hodgkin* y *Huxley* comenzaron a diseñar un sistema químico como base para explicar el potencial de acción. Comparando la composición iónica del axoplasma con la del agua de mar se demostraba que la concentración interna de K es aproximadamente 40 veces mayor, mientras la del cloro y del sodio eran aproximadamente 1/10 de las del agua de mar. Por lo tanto, la enorme inversión en el potencial de membrana que ocurre durante el potencial de acción podía ser explicada suponiendo que la membrana del axón no pierde su permeabilidad selectiva al potasio, sino que se vuelve específica para el sodio. Si la concentración interna de sodio era 1/10 de la concentración externa, esto llevaría a una inversión de aproximadamente 60 mV. Así, su hipótesis inicial fue que los iones sodio eran transportados a través de la membrana por un portador cargado negativamente, fijo en el estado de reposo debido a cargas electrostáticas, pero que se movería debido a la despolarización pasiva. Este efecto aumentaría y se haría asimétrico por la combinación con iones de calcio externo. En 1947 *Huxley* incluso calculó el potencial de acción resultante de esas características y en él incluyó un aumento rápido de la permeabilidad al sodio y uno lento para la del potasio.

Las dos consecuencias principales de esa hipótesis fueron, por un lado, que la amplitud del potencial de acción debería depender de la concentración externa de sodio, y por otra parte, que la magnitud de la inversión del potencial de acción u “overshoot”, debía aumentar si la concentración externa de sodio aumentaba.

*Hodgkin* y *Katz* decidieron investigar el efecto de la concentración externa de sodio sobre el potencial de acción registrado intracelularmente en axones de la pata del cangrejo y en poco tiempo obtuvieron la mayor parte de los resultados experimentales contenidos en un trabajo publicado en 1949 [9]. Ellos pudieron confirmar experimentalmente ambas predicciones demostrando que el potencial de acción desaparecía cuando la fibra se encontraba en una solución sin sodio, pero recuperaba su valor inicial cuando se restituía el agua de mar, mientras que la dilución

del agua de mar con dextrosa isotónica producía una ligera disminución del potencial de reposo y, además, había una disminución importante y reversible de la magnitud del potencial de acción. Todas esas observaciones fueron consistentes con la hipótesis y confirmaban tanto el trabajo de *Overton* [13] como los hallazgos de *Katz* en 1947 [15], quien había mostrado que las fibras nerviosas de *Carcinus* se bloqueaban si el cloruro de sodio en el medio externo disminuía a menos del 10-15% del normal.

Basados en los resultados obtenidos en 1940 por *Webb* y *Young* [16] y por *Katz* en 1947, *Hodgkin* y *Huxley* mostraron que bajando la concentración de sodio externo en axones aislados de cangrejo se reducía la amplitud del potencial de acción por una cantidad semejante a la calculada con la ecuación de Nernst; esto es, bajando la concentración de sodio por 1/5, el potencial de acción se reducía de 120 a 72 mV. Con estos resultados *Hodgkin* y *Huxley* confirmaron la validez de la teoría del sodio sobre el potencial de acción, pero aún no podían establecer la naturaleza mecánica de su modelo.

La técnica de “fijación de voltaje” o “voltage clamp” fue desarrollada inicialmente por *Cole* y *Marmont* en 1947 empleando el axón gigante del calamar. Esta técnica, que en la actualidad es la que más ha contribuido al entendimiento de los cambios en la conductancia de la membrana, responsables de la generación del potencial de acción, consiste en mantener constante el potencial transmembrana, a pesar de los cambios inducidos por las corrientes iónicas que circulan a través de la membrana. Así un circuito electrónico inserta en el sistema corriente de la misma amplitud pero de signo contrario para compensar los cambios en el potencial inducidos por el cambio en la conductancia. El diseño experimental original que *Cole* y *Marmont* emplearon contaba con un electrodo largo colocado en el eje del axón para llevar la corriente y otro electrodo externo coaxial con guardas equipotenciales a cada extremo; además, un circuito electrónico de retroalimentación que permitiría inyectar la corriente necesaria para mantener constante el potencial transmembrana. Este arreglo tenía la ventaja de que tanto la densidad de corriente como el potencial serían los mismos a cada momento. El sistema permitió hacer por primera vez una medición directa de la densidad absoluta de la corriente de membrana y de su relación con el potencial de membrana. Ese nuevo enfoque tuvo grandes complicaciones

experimentales, colocar el axón, colocar los electrodos interno y externo, circular el medio externo y ajustar la velocidad y estabilidad del control electrónico [17], pero desde el punto de vista de las posibilidades teóricas y de análisis, las ventajas eran muy superiores a las dificultades. Si bien el desarrollo de la técnica de *voltage clamp* fue un concepto novedoso en la fisiología, el concepto de retroalimentación ya había sido desarrollado y aplicado ampliamente por el profesor de matemáticas del *Massachusetts Institute of Technology*, *Norbert Wiener* bajo el nombre de “*cibernética*” [18]. En la aplicación de la cibernética, el control de voltaje y la diferencia entre la posición actual del sistema y la deseada sería usada para controlar el voltaje y reducir el error. Además el potencial constante era un concepto que había sido usado para estabilizar el alambre de hierro [19] y le pareció a *Cole* que su aplicación en el caso del axón era prometedora. Así, un pulso cuadrado de potencial a partir del potencial de reposo descargaría transitoriamente la capacitancia de la membrana, pero después la corriente capacitiva sería cero durante el tiempo en que no hubiera cambio de potencial. Esto simplificaría la situación al extremo, ya que entonces solamente fluiría corriente iónica y ésta podría ser medida directamente.

Probablemente de la misma importancia era la convicción de que la membrana tenía una resistencia característica con forma de N en el plano corriente/voltaje. Como cuando se aplicaban pulsos de corriente constante el axón había mostrado inestabilidad, generando potenciales de acción con características todo-o-nada, había buenas razones para esperar que bajo un potencial constante la membrana sería estable, sin el umbral ni el comportamiento todo-o-nada desarrollados en una situación inestable.

Los primeros resultados obtenidos por *Cole* y *Marmont* les permitieron concluir que:

- no había señales del umbral o comportamiento inestable en función del tiempo o el potencial;

- la corriente inicial entrante era pequeña y lenta para despolarizaciones de 18 mV, pero aumentaba suavemente en amplitud y velocidad hasta los 38 mV;
- conforme los pulsos de potencial eran mayores la corriente era más rápida, pero disminuía en tamaño hasta desaparecer entre 64 y 128 mV;
- para todos los potenciales siguientes la corriente fluía hacia afuera.

Así, Cole encontró que había tenido éxito no solamente en evitar la propagación del impulso, sino que también había evitado que la membrana respondiera de una manera todo-o-nada.

En 1948 *Hodgkin* y *Huxley* decidieron que usarían la técnica de control de voltaje para probar su hipótesis del portador de sodio. Para esto diseñaron un electrodo con dos alambres de plata, uno para el voltaje y otro para la corriente, trenzados alrededor de una delgada varilla de vidrio y junto con *Katz* publicaron sus primeros resultados en 1949; sin embargo, todavía no tenían buenos electrodos de guarda, mantenían la hipótesis del portador y no tenían evidencias claras de la inactivación del sodio. Todos esos problemas fueron resueltos en julio de 1949, cuando el equipo fue mejorado, de manera que los experimentos publicados en 1952 fueron hechos durante ese verano. *Hodgkin*, *Huxley* y *Katz* todavía pasaron dos años analizando los resultados, parcialmente debido a su frustración al tener que dejar el modelo del portador en el que habían estado pensando durante tanto tiempo y que reemplazaron por una compuerta dependiente de voltaje. Los resultados experimentales fueron publicados en un solo número del *Journal of Physiology* (1952) y las ecuaciones que las describen en el siguiente número de la misma revista.

En el verano de 1947 *Hodgkin* escribió a *Cole* contándole que junto con *Katz* habían encontrado que el responsable de la despolarización y el “overshoot” del potencial de acción del axón gigante del calamar era el sodio. Para esto, hicieron experimentos que mostraron que el potencial de acción era proporcional al logaritmo de la concentración externa de sodio, incluso para soluciones hiperosmóticas [9].

Luego interpretaron sus datos experimentales de acuerdo con la ecuación de *Goldman* [20], obteniendo un aumento transitorio de la permeabilidad en reposo para el sodio, relativa a la del potasio y cloruro, que pasaba de ( $P_K:P_{Na}:P_{Cl} = 1.0:0.04:0.45$ ) a ( $P_K:P_{Na}:P_{Cl} = 1.0:20:0.45$ ), para después del máximo del potencial de acción regresar a ( $P_K:P_{Na}:P_{Cl} = 1.8:0:0.45$ ). Así, antes de 1948, *Hodgkin, Huxley y Katz* tenían una idea clara del significado de la permeabilidad transitoria al sodio durante el impulso, así como ideas sobre sus fases de despolarización y repolarización.

La serie de trabajos por *Hodgkin, Huxley y Katz* [21-25] es de importancia trascendental para el desarrollo de nuestra ideas sobre la excitabilidad de la membrana. Esos trabajos proporcionan información obtenida con la técnica del control de voltaje, que no había estado accesible por ningún otro método experimental y además, como están basados en ideas desarrolladas por muchos investigadores en años previos, reúnen todo lo que sabía hasta entonces sobre el proceso de la excitación que da origen al potencial de acción.

*Hodgkin y Huxley* se propusieron probar la hipótesis de que la membrana tiene “canales” que permiten el paso de iones en la dirección que determine su potencial electroquímico. Este movimiento iónico produce corrientes eléctricas responsables de la generación del potencial de acción, debido a un aumento en la conductancia al ion sodio ( $g_{Na}$ ) que le permite entrar a la célula volviendo positivo su interior, lo que a su vez aumenta aún más la  $g_{Na}$  y permite la entrada de más iones  $Na^+$ . Esa conductancia también cambia como función del tiempo y empieza a disminuir aproximadamente hacia el máximo del potencial de acción, por lo que es función del tiempo y del voltaje. Simultáneamente, la conductancia a los iones potasio ( $g_K$ ) también es función del potencial y del tiempo. Así, el problema a resolver era: ¿cuál es la función del tiempo y del voltaje que describe las conductancias para el sodio y el potasio?

En ese proceso hay tres variables dependientes del tiempo ( $g_{Na}$ ,  $g_K$  y  $V$ ) que interactúan entre sí y, para hacer el problema más complicado, todo el proceso de cambios en el potencial se desarrolla a una gran velocidad, con un cambio máximo de aproximadamente 700 V/s. Esta serie de eventos fue probada por medio de experimentos hechos con la técnica del control de voltaje, cambiando el potencial

transmembrana en pasos concretos lo que requiere trabajar con un área de membrana isopotencial (control espacial) y además con un control instantáneo del potencial (control de voltaje).

La corriente  $I_m$  que atraviesa la membrana tiene que ser separada en sus tres componentes

$$I_m = I_k + I_{Na} + I_L$$

donde  $(I_k + I_{Na})$  es la corriente iónica, mientras que  $I_L$  es la corriente de fuga.

A partir de las componentes individuales y aplicando la ley *de Ohm*, se puede calcular las conductancias individuales. Esto es posible porque los otros parámetros de las ecuaciones son conocidos, ya que el voltaje transmembrana ( $V_m$ ) es determinado por el circuito electrónico y los potenciales de equilibrio de los iones sodio y potasio ( $E_{Na}$  y  $E_k$ ) pueden ser medidos. Por lo tanto midiendo el movimiento iónico se pueden calcular las conductancias iónicas.

$$I_k = g_K(V_m - E_k)$$

$$I_{Na} = g_{Na}(V_m - E_{Na})$$

Una prueba de que el procedimiento era adecuado sería calcular un potencial de acción a partir de las expresiones matemáticas empíricas. Si el potencial calculado era parecido y además tenía propiedades como las del verdadero, esto se consideraría como una prueba adecuada de que la hipótesis inicial era correcta.

Para describir el inicio y la terminación de la conductancia al sodio, así como el inicio de la del potasio, *Hodgkin y Huxley* expresaron los resultados obtenidos durante los experimentos con el control de voltaje en términos de tres parámetros sin dimensiones,  $n$ ,  $m$ ,  $h$ , que varían entre 0 y 1 [21], representando las probabilidades de que “sitios” o “partículas” en la membrana puedan ser activados para permitir la recepción y el paso de los iones. La activación simultánea de cuatro de esos sitios sería

necesaria para el paso de iones K mientras que se requerirían tres sitios para el paso de iones Na, pero en este caso también sería necesario desbloquear otro sitio adicional, denominado  $h$ , que corresponde a la inactivación.

*Hodgkin y Huxley* supusieron que cada uno de estos parámetros obedecía a una cinética de primer orden, por lo que las ecuaciones con las que describieron el cambio de cada uno fueron:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n (1 - n) - \beta_n n$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m (1 - m) - \beta_m m$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h (1 - h) - \beta_h h$$

donde  $\alpha$  es la tasa de cambio entre el estado “no permisivo” y el estado “permisivo” y  $\beta$  la tasa de inversas y ambas dependen del potencial de membrana pero no del tiempo. Para ajustar las ecuaciones a los datos experimentales expresaron la conductancia como,

$$g_K = \bar{g}_K n^4 \qquad g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h$$

y escogieron las expresiones analíticas de las  $\alpha$  y  $\beta$  para proporcionar el mejor ajuste al patrón del análisis de *Goldman* (1945). Las ecuaciones de *Hodgkin y Huxley* son expresiones empíricas de los datos obtenidos durante experimentos con el control de voltaje y producen una representación razonable de ellos. Con esas descripciones de las corrientes iónicas de la membrana como función del potencial de la membrana fue entonces posible regresar y observar la fisiología de un axón en condiciones normales, ya que los factores adicionales son relativamente simples.

La adición de la capacitancia de la membrana completa la descripción de la corriente a través de la membrana

$$I_m = C \frac{dV}{dt} + I_i$$

Estas corrientes y potenciales fueron llamados "de membrana," aunque el término menos ambiguo de "control de espacio" también ha sido usado.

Además de su uso como expresiones de las corrientes iónicas obtenidas durante experimentos con el control de voltaje, *Hodgkin* y *Huxley* interpretaron estos datos como corrientes iónicas de sodio y potasio, con lo que las ecuaciones son una representación formal y completa de la "*Teoría del Sodio*"

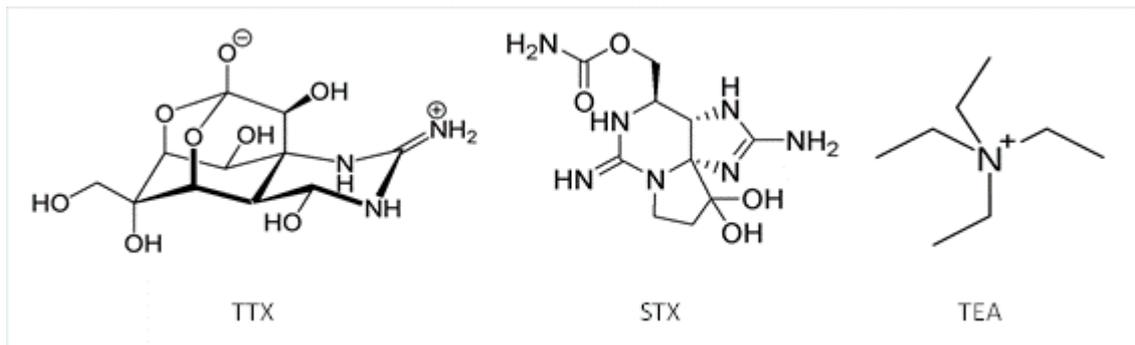
Ya que el axón de *Hodgkin* y *Huxley* separa los componentes del sodio y potasio de las corrientes iónicas, está postulando mecanismos membranales independientes y por tanto podría considerarse un modelo. Sin embargo, las ecuaciones y el circuito equivalente son expresiones puramente empíricas de los datos experimentales, como las descripciones de dos cajas negras vistas desde el exterior. Así, al no basarse en hipótesis o modelos de los mecanismos internos de la membrana, no pueden considerarse modelos. *Hodgkin* y *Huxley* presentaron como su primer resultado el potencial de acción obtenido en respuesta a un breve estímulo supra-umbral, que compararon muy favorablemente con un registro real [21]. Otro parámetro del potencial de acción real también obtenido por *Hodgkin* y *Huxley* fue la velocidad de propagación. Para esto superaron el problema de obtener soluciones analíticas para la ecuación no-lineal del cable originada por *Kelvin* y explicaron que era relativamente más fácil resolver la ecuación si el impulso se propagara a una velocidad uniforme.

La técnica de fijación del voltaje aplicada por *Hodgkin* y *Huxley* en 1952 fue extendida a más laboratorios y nuevas preguntas biológicas y mecánicas empezaron a ser respondidas. Este campo, con el correr del tiempo se volvió cada vez más multidisciplinario, hasta llegar a combinar en la actualidad aproximaciones biofísicas,

farmacológicas, de química de proteínas, genética médica y molecular y biología celular.

Hasta la década de 1960 fueron pocas las evidencias de como los iones atravesaban la membrana de células excitables. Una amplia variedad de mecanismos fueron sugeridos, entre los que se postularon, permeación a través de una membrana homogénea, unión y migración entre sitios cargados, pasaje a través de moléculas “*carriers*” y flujo a través de poros. Las vías para diferentes iones podrían ser las mismas (solo un tipo de “canal”) con afinidades que varían dependiendo del tiempo, o con el radio del poro variable o por el contrario las vías podrían ser diferentes para cada ion. Las vías para diferentes iones podrían estar marcadas por moléculas especializadas o podrían ser creadas espontáneamente por agitación térmica como defectos o vacancias en el empaquetado molecular de la membrana. Las vías podrían estar formadas por fosfolípidos, proteínas o ácidos nucleicos, marcando un panorama muy amplio de posibilidades. Experimentos realizados entre 1965 a 1975 mostraron que los canales de sodio y de potasio dependientes de voltaje eran entidades separadas con un poro acuoso y una compuerta que abre hacia el lado citoplasmático y permite el pasaje de iones.

La primera evidencia de que los canales iónicos eran entidades separadas provino de los experimentos farmacológicos que realizó *T. Narahashi* con *tetrodotoxina* (TTX) (*figura 1*), un veneno parálítico de algunos peces globo, con ocasionales efectos fatales, dado que bloquea la conducción del potencial de acción tanto en el nervio como en el músculo [26]. Sus primeros estudios con axones gigantes de langosta mostraron que la TTX, a concentraciones nanomolares, inhibía selectivamente la corriente de sodio ( $I_{Na}$ ), sin modificar a la corriente de potasio ( $I_K$ ) ni la de fuga ( $I_L$ ). Este bloqueante de la  $I_{Na}$  fue verificado posteriormente en axones gigantes de calamar y en axones mielinizados de rana [27-32]. Así la entidad separada de las corrientes de sodio y de potasio confirmaba el tratamiento de *Hodgkin* y *Huxley* en 1952. Otra toxina natural proveniente de dinoflagelados marinos del género *Gonyaulax*, la *saxitoxina* (STX), es una pequeña molécula soluble en agua que también bloquea la  $I_{Na}$  [27, 33, 34].



**Figura 1. Estructura química de las toxinas empleadas como bloqueantes de canales.** La tetrodotoxina (TTX) y la saxitoxina (STX) son toxinas paralizantes naturales que bloquean canales de Na. Tetraetilamonio (TEA) es un compuesto de amonio cuaternario usado experimentalmente para bloquear canales de K. Estos tres agentes bloquean canales uniéndose reversiblemente en el poro del canal.

Otra toxina útil para la separación en distintas entidades de canales iónicos fue el ion *tetraetilamonio* (TEA), que bloquea  $I_K$  pero no  $I_{Na}$ . Los primeros experimentos en los que fue empleada esta toxina fueron realizados empleando células ganglionares del molusco *Onchidium verruculatum* [35], luego en el axón gigante del calamar [36] y luego en nodos de Ranvier de rana [28]. A finales de la década de 1960 los términos “canales de Na” y “canales de K” comenzaron a emplearse para referirse a estas entidades que permitían el pasaje de iones y que podían ser discriminadas farmacológicamente.

Las toxinas anteriormente mencionadas no podrían alterar las funciones fisiológicas sin tener algún tipo de interacción molecular con algún componente del tejido. En los experimentos de farmacología se definieron a estos sitios con los que ocurre la interacción como “receptores”.

La aproximación más simple al receptor supone que la toxina se une reversiblemente a una sola clase de sitio en el receptor y que la unión de una molécula de toxina al receptor bloquea una fracción de la función sin influir en la unión de otras moléculas de toxina a otros receptores. Entonces es posible plantear una reacción bimolecular reversible y definir una constante de disociación del equilibrio en términos de las constantes de reacción. Realizando una curva de dosis respuesta en la que se mide la amplitud de la corriente inhibida con la toxina, puede plantearse que la mitad

de la respuesta ocurrirá cuando el valor de la concentración de la toxina libre sea numéricamente igual a la constante de disociación del equilibrio. De esta manera se estableció que STX se une al receptor en una relación 1:1 cuando es aplicada extracelularmente [27], pero si se la aplica intracelularmente la  $I_{Na}$  no es bloqueada, mostrando que el sitio de unión de la toxina está del lado extracelular. Si las toxinas pueden ser marcadas con radioisótopos puede determinarse cuantos receptores hay en un tejido particular empleando un contador de radiación y considerando que la toxina unida que se determine en realidad es toxina unida específicamente al receptor más aquella que se une inespecíficamente a cualquier otro componente del tejido. Así cuando se realizaron experimentos de *binding* sobre el nervio vago de conejo expuesto a incrementos en la concentración de [<sup>3</sup>H] STX de 2 a 85 nM, el equilibrio de captura primero aumentó rápidamente y luego más lentamente. Si se adiciona una concentración saturante de TTX sin marcar para saturar los receptores y medir el componente del *binding* no específico, puede de esta manera restarse al *binding* total y calcularse la unión específica. Así puede calcularse la constante de disociación del equilibrio y la concentración saturante de la toxina. Conociendo el área superficial del tejido puede calcularse cuantos receptores puede haber por unidad de superficie. Siguiendo este procedimiento *J. M. Ritchie* logró establecer en 1976 que el nervio vago de conejo tiene 110 receptores por micrómetro cuadrado [37].

Las primeras evidencias de que los “canales” tienen una compuerta de la cara citoplasmática llegaron a finales de la década de 1960 de la mano de *C. Armstrong* [36, 38, 39]. En ellos se describe que una concentración milimolar de TEA intracelular es suficiente para bloquear al canal de K, solo cuando éste está abierto después de un pulso despolarizante. Como lo descrito por *Hodgkin y Huxley*, la corriente de potasio se activa con un retardo después de un pulso despolarizante y crece con un curso temporal sigmoideo a un nuevo nivel estacionario después de que cada paso de voltaje despolarizante es aplicado. Al aplicar TEA o un análogo de TEA en el axoplasma este solo puede bloquear al canal una vez que el pulso despolarizante fue aplicado, causando un nuevo decaimiento en la  $I_K$ . Esto sugiere que la compuerta no sólo regula la capacidad de los iones para cruzar la membrana.

La relación droga-receptor depende del estado del canal como tal. Esta hipótesis cinética sugirió que el canal tenía propiedades topológicas. Para principios de la década de 1970 se podía decir que como los canales de sodio y potasio tenían receptores para las distintas toxinas accesibles para las toxinas axoplásmicas solo cuando la compuerta estaba abierta, el canal podría tener una topología de diafragma.

Una generación previa a la cristalización de la primera estructura de un canal iónico, algunos argumentos biofísicos fueron desarrollados apoyando la idea de que el canal tenía un poro acuoso. En este sentido los trabajos con TEA de *Armstrong* fueron los pioneros. Como lo mencionado en los párrafos anteriores, él encontró que el TEA solo bloqueaba el canal de K cuando era aplicado del lado axoplásmico y que podía desconectarse si del lado extracelular se agregaban al medio más iones  $K^+$  y luego se cambiaba el potencial. Esta visión era congruente con la existencia de un poro acuoso, en el que la irrupción de iones  $K^+$  podía barrer una oclusión provocada por el TEA durante su pasaje. Además argumentó que se podría determinar el potasio que fluye por canal, por medición directa de la tasa de aparición de TEA. *Armstrong* calculó a partir de la tasa de bloqueo por TEA que los canales de potasio pueden transportar alrededor de 600 iones por milisegundo. Esta tasa es posible para un canal pero no para una molécula *carrier*, marcando una clara evidencia en favor del poro acuoso [38, 39].

Otras evidencias a favor del poro del canal vienen de estudios de la selectividad iónica de los canales de sodio y de potasio. Estos canales son permeables hasta un cierto tamaño iónico limitante y son estrictamente impermeables a iones más grandes [40-46]. Tal selectividad iónica sugiere la existencia de un poro actuando como un filtro mecánico.

Del trabajo inicial de *Hodgkin* y *Huxley* se desprenden una serie de preguntas importantes:

¿Cómo es que diferentes células excitables en diferentes organismos se adaptaron a diferentes funciones?

¿Todas ellas usan canales de sodio y potasio o son diferentes mecanismos correspondientes a la variabilidad funcional?

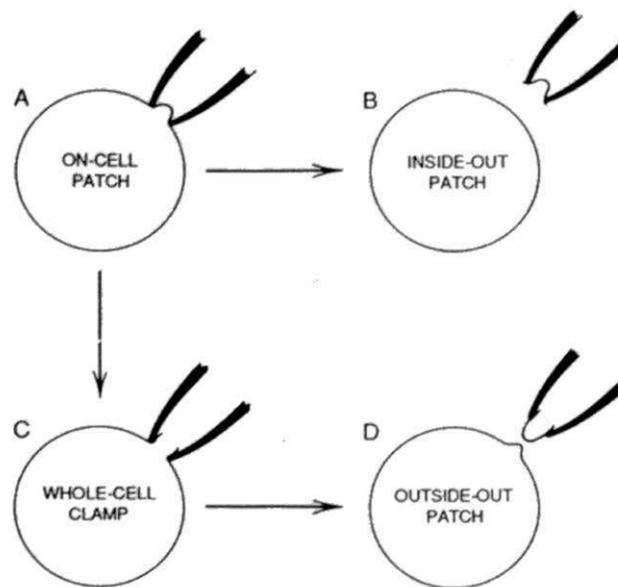
Si ellas usan canales de sodio y de potasio ¿éstos son los mismos en axones, cuerpos celulares y músculos o cada tipo celular tiene su propio tipo de canal?

La respuesta a estas preguntas es que todos los tipos de axones utilizan canales de sodio y potasio muy similares a aquellos descritos inicialmente en el axón gigante del calamar, aunque al mismo tiempo existe una gran variedad de canales activados por voltaje. Por ejemplo la variedad de canales de potasio de las células pueden regular actividad de potenciales marcapasos, generar trenes espontáneos y ráfagas de potenciales de acción, hacer largos “plateaus” en el potencial de acción y sobre todo regular excitabilidad celular. La diversidad de canales de potasio comenzó a ser descrita a principios de la década de 1970, por ejemplo se encontraron canales en el corazón de la rana que son duramente afectados por 20 mM de TEA externo, aunque los del músculo esquelético de la rana requieren 8 mM de TEA para la mitad del bloqueo y los de los nodos de Ranvier requieren solo 0.4 mM de TEA [28, 47, 48]. La cinética de activación de estos canales también puede diferir. En el corazón de la rana, la cinética de activación de la  $I_K$  es 1000 veces más lenta que la de los nodos de Ranvier. La  $I_K$  de muchas células no solo se activan por un pulso despolarizante si no también que se desactivan [49-51]. Este fenómeno no fue reportado por *Hodgkin*, *Huxley* ni *Katz* porque para visualizarlo requiere de despolarizaciones más largas de las que ellos usaron. Un análisis más profundo de la cinética de activación y de la farmacología mostró más de un componente en la  $I_K$  de un nodo de Ranvier. *J. Dubois* encontró que hay un componente que se activa rápidamente pero se inactiva muy lentamente ( $f_1$ ) y es selectivamente bloqueado por un péptido toxina del veneno de la serpiente mamba (género *Dendroaspis*). Además encontró un segundo componente que se activa rápidamente y se inactiva lentamente ( $f_2$ ) y es bloqueado selectivamente por la catepsina presente en los chiles. Además existe un componente que se activa lentamente y no se inactiva por alrededor de 3 minutos ( $s$ ). Éste es insensible a la 4-aminopiridina que bloquea totalmente a los componentes ( $f_1$ ) y ( $f_2$ ). La razón de los subtipos rápidos a los subtipos lentos es mayor en la membrana del axón entre los nodos que en el nodo mismo [52]. Estas y otras diferencias fenomenológicas sugirieron que los nervios de los vertebrados y músculos cardiaco y esquelético tienen diferentes canales de potasio codificados por distintos genes.

Por otra parte los canales de sodio son menos diversos que los de potasio, generan una rápida y regenerativa subida del potencial de acción y pueden contribuir a la actividad de marcapasos y a los potenciales sub-umbrales que subyace a la decisión de disparar o no un nuevo potencial. Las evidencias más claras de la diversidad en este tipo de canales, son a nivel cinético, entre canales *Na* rápidos sensibles a TTX del musculo esquelético de vertebrados y canales de *Na* insensibles a TTX cuando el mismo musculo es denervado [53]; entre canales rápidos de neuronas centrales de vertebrados y canales lentos de células de la glía [54]; etc. Algunas neuronas del sistema nervioso central de vertebrados tienen una población separada de canales de *Na* sensibles a TTX que están especializados en operar sin una inactivación completa en el rango sub-umbral de potenciales de membrana. El efecto despolarizante de estos canales juega un rol fundamental en la propagación del potencial hacia la dendrita y en la iniciación del *spike* [55, 56]. Estas y otras pequeñas diferencias funcionales sugieren que los canales de sodio podrían ser productos multigénicos.

Un avance increíblemente grande en la electrofisiología se dio con el desarrollo de la técnica de *patch clamp*. A mitad de la década de 1970 E. Neher y B. Sakmann deseaban registrar una pequeña área de la membrana celular presionando una pipeta de vidrio pulida a fuego contra la superficie de una célula viva. De esta manera reportaron el primer registro de corriente de un canal individual activado por acetilcolina (ACh) [57]. El verdadero punto de corte fue cuando mostraron que pipetas de vidrio limpias podían fusionarse con la membrana de la célula para formar un sello de alta resistencia eléctrica ( $10^9 \Omega$ ) y gran estabilidad mecánica. Como la resistencia eléctrica que se lograba era del orden de los gigaohms ellos llamaron a este sello "gigaseal" [58]. Esta nueva técnica permitió al menos cuatro formas nuevas de medir sólo una pequeña fracción del área celular. Una vez que la pipeta toca la membrana de la célula y se produce por succión el gigasello, puede registrarse la corriente iónica en el modo de control de voltaje en la configuración on-cell o cell attached (*figura 2*). Si se desea analizar mecanismos relacionados con el interior de la membrana se puede trabajar en la *configuración inside-out*, mientras que si se desea registrar la totalidad de la célula se puede generar la configuración *whole-cell* por ruptura del gigasello. Por último si se desea registrar los fenómenos que ocurren del lado extra celular, la

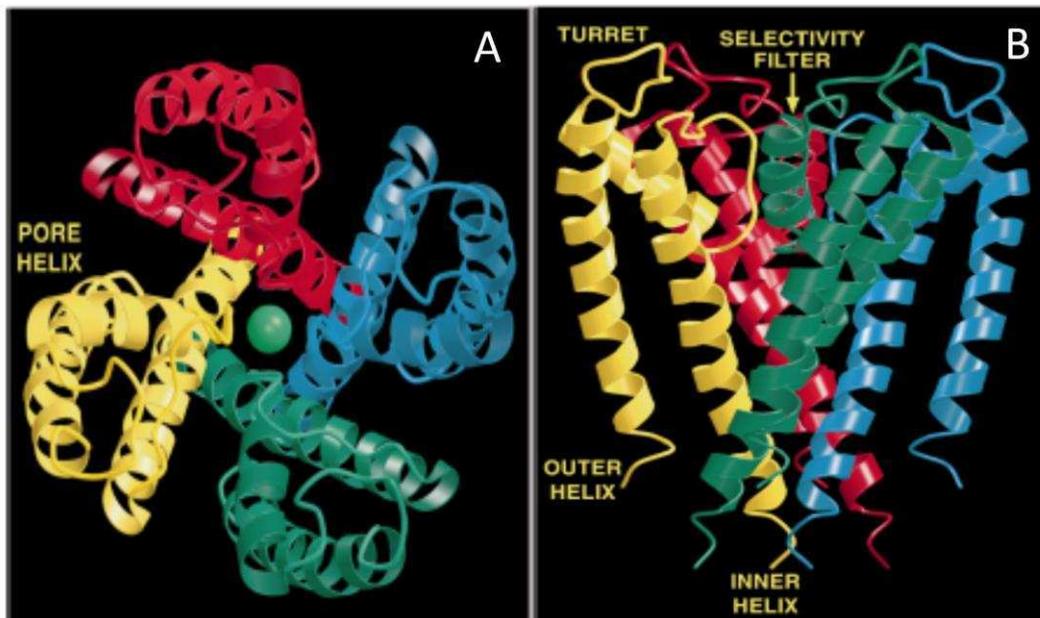
configuración a emplear es *outside-out* [58, 59]. La técnica de *patch clamp* reveló corrientes unitarias de canales únicos haciendo posible, por primera vez en la biología, el registro de una molécula única por más de una hora con resolución temporal de sub-milisegundos. De este modo se pudo determinar que la corriente en un canal aumenta unos picoamperes y convirtiendo esta corriente en unidades de flujo de iones monovalentes se demostró que cada ion tarda menos de 10 nanosegundos en atravesar el canal. Este resultado es solo compatible con un modelo de poro acuoso.



**Figura 2. Cuatro métodos para registrar empleando el *gigasello*.** Todos los métodos comienzan de la misma manera cuando la pipeta es presionada suavemente contra la membrana intacta de la célula y mediante una pequeña presión negativa se forma un sello de  $G\Omega$  entre la pipeta y la membrana que es tocada. Los canales pueden ser registrados como una pequeña corriente que pasa entre la solución de la pipeta y el citoplasma. Manipulaciones adicionales posteriores permiten que la misma pipeta pueda ser empleada para registrar la célula entera o pequeños parches de membrana escindidos de esta en la configuración *inside-out* o *outside-out*, donde se registra el interior o el exterior de la membrana respectivamente.

La aparición de la técnica de *patch clamp* también forzó la revisión de la cinética de activación de los canales iónicos. El modelo de *Hodgkin* y *Huxley* fue desarrollado como un ajuste empírico de curvas a los resultados, antes de que cualquier propiedad molecular de los canales iónicos fuese conocida. Desde que se sabe que los canales

iónicos activados por voltaje están compuestos por cuatro subunidades idénticas, los modelos cinéticos que se plantean permiten separar eventos similares que ocurren en cada subunidad, como eventos concertados que después se involucran todos simultáneamente. Estos modelos, aunque en la actualidad involucran más estados, tienen una similitud formal con el modelo de *Hodgkin y Huxley* (con sus parámetros  $n$ ,  $m$ ,  $h$ ) planteado en 1952 [21]. A pesar de que ya se contaban con varias evidencias de que los canales iónicos tenían un poro acuoso, su existencia no fue confirmada, sino hasta la aparición del primer cristal de un canal. Estos cristales fueron obtenidos a partir de canales de bacterias que tienen alta homología con los canales de K [60-62], con la ventaja de que al no presentar glicosilaciones los cristales pueden formarse mucho mejor. Este primer cristal del canal de potasio fue obtenido de bacteria *Streptomyces lividans* y por lo tanto se lo llamó Kcs A. Su estructura mostró un tetrámero transmembrana con un poro acuoso a través del eje de simetría rotacional cuádruple [63]. La sección externa del poro es el filtro de selectividad con grupos carbonilos polares que permiten que permeen cationes. La parte interna es una amplia cavidad acuosa. En el borde citoplasmático del poro hay cuatro  $\alpha$ -hélices que cierran la compuerta (*figura 3*). Esta estructura solo tiene el canal conductor, pero no posee el sensor de voltaje ni los elaborados mecanismos de control de los canales iónicos eucariotas. Trabajos posteriores determinaron la existencia de dos grandes piezas citoplasmáticas en canales de K de mamíferos, el extremo amino de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  accesoria [64-66].



**Figura 3. Vistas del tetrámero Kcs A.** El cristal fue obtenido de la proteína purificada a partir de la bacteria *Streptomyces lividans*. A) Vista frontal donde se ve el poro y las hélices alfa que lo forman, donde las que corresponden a cada subunidad se muestran en distintos colores. B) Vista lateral donde se ven las hélices alfa que forman el poro y las hélices alfa externas. Además se muestran la región extracelular donde están los grupos que forman el filtro de selectividad. Las imágenes fueron obtenidas de “*The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity*” Dolye et al. 1998

Los canales iónicos pueden dividirse en dos grandes familias. Por un lado, aquellos activados por el voltaje de la membrana celular, responsable de la conducción del impulso nervioso a través de la membrana de celular; mientras que por otra parte podemos encontrar canales iónicos activados por un ligando o agonista, responsables de la propagación sináptica del impulso nervioso. Durante la transmisión sináptica rápida estos canales, ubicados en la postsinapsis son activados por el neurotransmisor liberado desde la presinapsis y generan una despolarización suficiente como para activar canales dependientes de voltaje, iniciando un nuevo potencial de acción. Otro grupo de canales pueden asociar su activación a otro estímulo físico como presión o temperatura.

A nivel estructural los canales iónicos activados por ligando pueden clasificarse por la cantidad de subunidades en tres grandes grupos: aquellos que poseen cinco subunidades y que son conocidos como la supe familia de receptores Cys-loop,

incluyen al receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), al receptor de glicina (glyR), los receptores del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA<sub>A</sub>R), el receptor de serotonina (5-HT<sub>3</sub>R) y el canal permeable a cloro activado por glutamato (GluClR) de invertebrados; aquellos que poseen cuatro subunidades como los receptores de glutamato (GluRs) y finalmente aquellos que tiene 3 subunidades como los receptores purinérgicos (P2XRs).

La mayoría de los descubrimientos realizados sobre los canales iónicos activados por ligando provienen de los trabajos realizados con el receptor de acetilcolina que se encuentran en la unión neuromuscular de vertebrados. Los nAChR fueron los primeros a los que se les registro la corriente unitaria empleando la técnica de *patch clamp* [57], los primeros que se lograron purificar de la membrana [67, 68] y los primeros en ser determinada su secuencia génica y de aminoácidos [69, 70]. Además son los primeros para los cuales su función pudo ser reconstituida por inserción de la macromolécula purificada en una membrana lipídica artificial [71] y los primeros en ser expresados en células foráneas por inserción de mRNA clonado [72]. Por último, fueron los primeros en obtenerse imágenes de la estructura cristalina [73, 74].

Para el estudio biofísico de la permeabilidad y el *gating* de canales iónicos activados por ligando la técnica a emplear es el *voltage clamp*, aunque los saltos de voltaje no son un buen estímulo. En este caso la aplicación del agonista natural es el estímulo correcto. En el caso de los nAChR se conocen varios métodos para aplicar el agonista a la unión neuromuscular:

- Una simple descarga eléctrica al nervio motor libera estocásticamente múltiples cuantos desde la terminal nerviosa con un pequeño tiempo de dispersión [75].
- Liberación espontánea cuántica aleatoria. Libera una vesícula cargada con ACh con una constante temporal de 200  $\mu$ s a 22 C° [76].
- El agonista puede aplicarse uniformemente a todo el baño o localmente a través de flujos miniatura.

- Llenando la pipeta de registro con el agonista y realizando un pequeño *patch* de membrana conteniendo los canales [77].
- Microiontoforésis [78].
- Foto-liberación y foto-conversión donde flashes de luz de diferentes longitudes de onda pueden liberar al agonista de algún compuesto que lo encapsula o pueden transformarlo en isómero activo en aproximadamente 1  $\mu$ s [79, 80].

Cuando el estudio está focalizado sobre el canal y sus propiedades más que sobre la sinapsis, las subunidades de los canales son expresadas en sistemas heterólogos y los *patches* que contiene los canales son expuestos a un sistema de flujos rápidos de soluciones. La aplicación de agonista suele ser menor a 1 ms.

En 1951 *P. Fatt* y *B. Katz* dedujeron que los potenciales post-sinápticos de la placa neuromuscular evocados por la estimulación del nervio motor estaban generados por una pequeña corriente iónica de entrada confinada a la región de la placa terminal de la membrana muscular [81]. Esta deducción fue confirmada en 1972 por las mediciones de las corrientes post-sinápticas registradas por *K. Magleby* y *C.F. Stevens* en el modo *voltage clamp* [82]. Ellos observaron un retardo entre el estímulo y el comienzo de la corriente que asociaron a la liberación del neurotransmisor desde la presinapsis y la difusión del mismo hasta encontrar un receptor de ACh. Además la corriente post-sináptica tenía una fase en la que caía, la cual describieron con un decaimiento exponencial simple con una constante temporal  $\tau_{epc}$ . Ellos fueron los primeros en interpretar el significado biofísico de esta constante y plantearon dos hipótesis contrastantes. Por un lado  $\tau_{epc}$  podía representar la desaparición de la ACh libre en el botón sináptico, mientras que por otro lado la ACh libre desaparecía mucho más rápido y la constante representaba el tiempo en el que el canal se cerraba naturalmente [76]. La primera hipótesis implicaba que la constante intrínseca del canal debería ser mucho más rápida que  $1/\tau_{epc}$  por lo que la tasa de desaparición de ACh sería la limitante. Dado que la difusión extracelular no depende del potencial de la membrana y  $\tau_{epc}$  es voltaje dependiente, la primera hipótesis no fue tomada en cuenta. En base a esto *Magleby* y *Stevens* adoptaron el modelo de tres estados

publicado por *del Castillo y Katz* en 1957 (ver Esquema 1, sección El Problema) [83], ya que suponían que en esencia el comportamiento del canal podía parecerse a un proceso catalítico donde seguido a la unión entre el sustrato y la enzima, el complejo enzima-sustrato realiza un cambio conformacional como primer paso de la secuencia catalítica [84, 85]. De esta manera ellos asumieron que la reacción de *binding* inicial era tan rápida que el complejo de agonista unido al receptor estaba siempre en equilibrio con ambos libres. Como la desaparición de la ACh libre era tan rápida el decaimiento de la corriente post-sináptica reflejaba totalmente el cierre exponencial de los canales abiertos, donde su constante  $\alpha$  era el paso limitante.

Una predicción de la hipótesis de *Magleby y Stevens* es que si se mantenía constante la concentración de ACh los canales individuales permanecerían activados con una constante temporal  $\tau_{epc}$ . *Katz y Miledi* analizaron las fluctuaciones y descubrieron que una aplicación estacionaria de ACh a la unión neuromuscular induce fluctuaciones en la respuesta post-sináptica causada por la apertura y el cierre aleatorios de nAChR del musculo y establecieron que tanto la duración como la amplitud elementales podían ser calculadas [86, 87]. En 1973 *C. Anderson* realizó los espectros de poder de las fluctuaciones para aplicaciones estacionarias de ACh y ajustó dichos espectros a una función lorentziana, que a frecuencias bajas era plana pero a frecuencias altas tenía una pendiente de -2, lo que sugirió que las relajaciones del registro original en promedio eran exponenciales simples [88]. Así encontró que las fluctuaciones inducidas por la aplicación estacionaria de ACh podían ser descritas por una relajación exponencial, cuya constante temporal  $\tau$ , era idéntica a la constante temporal de decaimiento  $\tau_{epc}$ , cuando las corrientes post-sinápticas fueron evocadas por la estimulación del nervio motor y la ACh estuvo disponible solo transientemente [78].

A partir de 1980 más observaciones sobre los estados de los nAChR mostraron que el modelo de tres estados no era adecuado para describir su cinética y se identificaron nuevos estados con transiciones entre ellos con constantes temporales más lentas y más rápidas que las relajaciones descritas anteriormente [89-91]. El modelo de tres estados implicaba la unión de sólo una molécula de agonista, con lo que una curva de dosis-respuesta debería saturar a concentraciones altas y ser lineal

para concentraciones bajas de ACh, como las curvas clásicas de la ecuación de Michaelis-Menten para la cinética enzimática. Sin embargo las curvas de dosis-respuesta típicas para los nAChR no son lineales a concentraciones bajas, estas curvas muestran un incremento de la conductancia de cuatro veces cuando se duplica la concentración de agonista, lo que equivale a decir que la ACh tiene un coeficiente de Hill igual a dos [92-94] o que por lo menos dos moléculas de ACh son necesarias para la apertura del canal. Entre 1981 y 1985 el grupo de *David Colquhoun* encontró que en un evento de apertura podían ocurrir varios eventos de cierre del canal. Ellos fueron capaces de distinguir estos *gaps* extremadamente cortos en la apertura de los nAChR ya que aumentaron la velocidad de registro a 16 KHz [90, 91]. También encontraron *gaps* en la apertura de canales de glutamato [95, 96]. El modelo de tres estados supone que la disociación de la ACh unida al receptor es casi instantánea. Para explicar la aparición de los *gaps* fue necesario desechar este supuesto y asumir que la disociación del ligando tiene una tasa comparable a la de los eventos de activación, por lo que el canal puede reabrirse varias veces, generando una ráfaga de reaperturas, antes de perder una molécula de agonista. Con esta nueva visión,  $\tau_{epc}$  describe la duración media de una ráfaga de reaperturas hasta que eventualmente el agonista se disocia del receptor. La reapertura del canal es un indicio de que el agonista permanece unido durante la apertura y si bien puede disociarse del canal abierto lo hace con una constante temporal órdenes de magnitud más lenta que la constante de cierre del canal por lo que se vuelve un evento improbable. Ciertas mutaciones como la P121L en el péptido señal y G8R en un sitio consenso de glicosilación, ambas en la cadena  $\epsilon$  de los nAChR, contribuyen a una disminución en la duración de la ráfaga de reaperturas, causando un aumento de eventos infrecuentes y un fenotipo de síndrome miasténico [97].

A nivel macroscópico la conductancia de una placa terminal expuesta a una aplicación estacionaria de ACh falla en unos segundos. Este fenómeno llamado desensitización fue descrito por *Katz* en 1957 [98]. A nivel microscópico muchos canales se abren inicialmente pero después de un tiempo se cierran y no pueden volver a abrirse al aumentar la concentración de ACh. Solo pueden recuperarse luego de algunos segundos o hasta minutos de que la ACh ha sido removida. Además

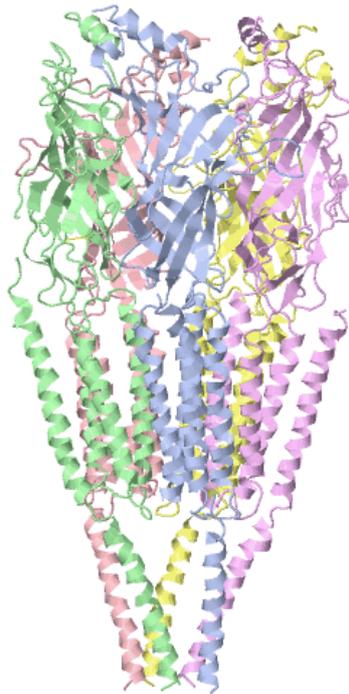
mediante estudios de *voltage clamp* y registros de canales únicos se pudo demostrar que pueden haber desensitizaciones rápida y lentas [99-101].

A partir de la década de 1990 trabajos principalmente de *A. Auerbach* mostraron que los nAChR podían abrirse espontáneamente en ausencia de agonista [102]. Estos resultados condujeron a considerar que el modelo cinético de la activación del nAChR podría ser alostérico donde cada unión sucesiva del agonista incrementa la probabilidad de que ocurra el cambio conformacional para la apertura del canal.

En condiciones fisiológicas el potencial de reversión de las corrientes de nAChR es aproximadamente -5 mV [82], el cual no corresponde a ninguno de los potenciales de reversión de los iones fisiológicamente relevantes. Al comienzo de la década de 1960 los trabajos de *N. Takeuchi* mostraron que los canales nicotínicos de acetilcolina son permeables a iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y a  $\text{Ca}^{2+}$ , pero eran impermeable a aniones [103-105]. En la década de 1980 los estudios de la permeabilidad se hicieron más extensivos y se determinó que podían permear cationes de metales alcalinos y alcalinos térreos y algunos cationes orgánicos como la triaminoguanidina, colina e histidina con una permeabilidad de 0.3-0.04 relativa al sodio

Las subunidades que componen a los receptores de la supe familia de Cys-loop pueden ser clasificadas en subunidades  $\alpha$  y no  $\alpha$ . Todas las subunidades están compuesta por un gran extremo amino terminal extracelular de aproximadamente 200 aminoácidos, tres dominios transmembrana separados por *loops* cortos, un *loop* citoplasmático de tamaño variable y un cuarto dominio transmembrana con un extremo carboxilo extracelular relativamente corto. La mayoría de los estudios estructurales de los receptores de esta familia han sido realizados en los últimos diez años [106]. Gran parte del conocimiento del dominio extracelular de los receptores *Cys-loop* provino de la resolución de la estructura de la proteína de unión de acetilcolina de *L. stagnalis*, una proteína soluble que es sintetizada en células de la glía y liberada en el botón sináptico donde regula la transmisión sináptica [107-109]. Cada uno de los dos sitio de *binding* que poseen los receptores de esta supe familia están ubicados entre dos subunidades adyacentes [110]. El poro está tapizados por los segmentos M2 del dominio transmembrana, rodeados por quince hélices  $\alpha$

correspondientes a los segmentos M1, M3 y M4 del dominio transmembrana [111, 112]. La región intracelular entre los segmentos M3 y M4 tiene sitios de unión a proteínas del citoesqueleto que le permite agruparse en regiones específicas de la membrana, además esta región tiene sitios de fosforilación que en receptores de serotonina regulan la conductancia del canal y en receptores colinérgicos modulan la desensitización [113-115].



**Figura 4. Estructura del pentamérico del receptor de nACh.** Se muestra la estructura general para un receptor de la familia de *Cys-loop*. Cada subunidad (un color distinto) tiene cuatro hélices  $\alpha$  que participan en la formación del poro del canal (M2) mientras que las otras tres hélices  $\alpha$  (M1, M3 y M4) forman un anillo externo en torno al poro. El dominio extracelular contiene al sitio de unión del ligando PDB 2bg9.

Otros miembros de la supe familia de receptores *Cys-loop* modulan la transmisión sináptica inhibitoria como los recetores  $\text{GABA}_A$  y los receptores de glicina. Ambos receptores son selectivos para aniones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) y su potencial de reversión está próximo al de los iones cloruros. A partir de la década de 1960, Del Castillo y sus colaboradores demostraron que la aplicación de GABA en la musculatura somática del nematodo parásito *Ascaris lumbricoides* produjo una inhibición robusta de potenciales de acción [116]. Esta evidencia temprana de la presencia de receptores

de GABA en los nematodos se corroboró décadas después cuando Holden-Dye investigó el receptor GABA en el músculo somático del nematodo *Ascaris suum* y demostró que presentaba un perfil farmacológico único [117-121]. Por ejemplo, mientras demostró que el receptor de *Ascaris* podía ser activado por muchos de los agonistas de los receptores GABA<sub>A</sub> clásicos tales como muscimol y isoguvacine, que era insensible a derivados de ácidos sulfónicos tales como piperidina-4-sulfónico y del ácido 3-aminopropano sulfónico [122]. Además, a diferencia de los receptores GABA<sub>A</sub> de vertebrados, el receptor de *Ascaris* no fue potenciada por pentobarbitona o flurazepam [120]. Tal vez lo más intrigante, era la observación de que el receptor GABA de *Ascaris* no responde a antagonistas GABA<sub>A</sub> de vertebrados como bicuculina ni el bloqueante canal PTX y dieldrin [120].

En la década de 1990 se estableció la existencia de una gran familia génica que codifica las seis subunidades de los GABA<sub>A</sub>R ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\pi$ ). Si bien muchas combinaciones son posibles la mayoría de los GABA<sub>A</sub>R están compuestos por 2 subunidades  $\alpha$ , 2  $\beta$  y una subunidad  $\gamma$  [123]

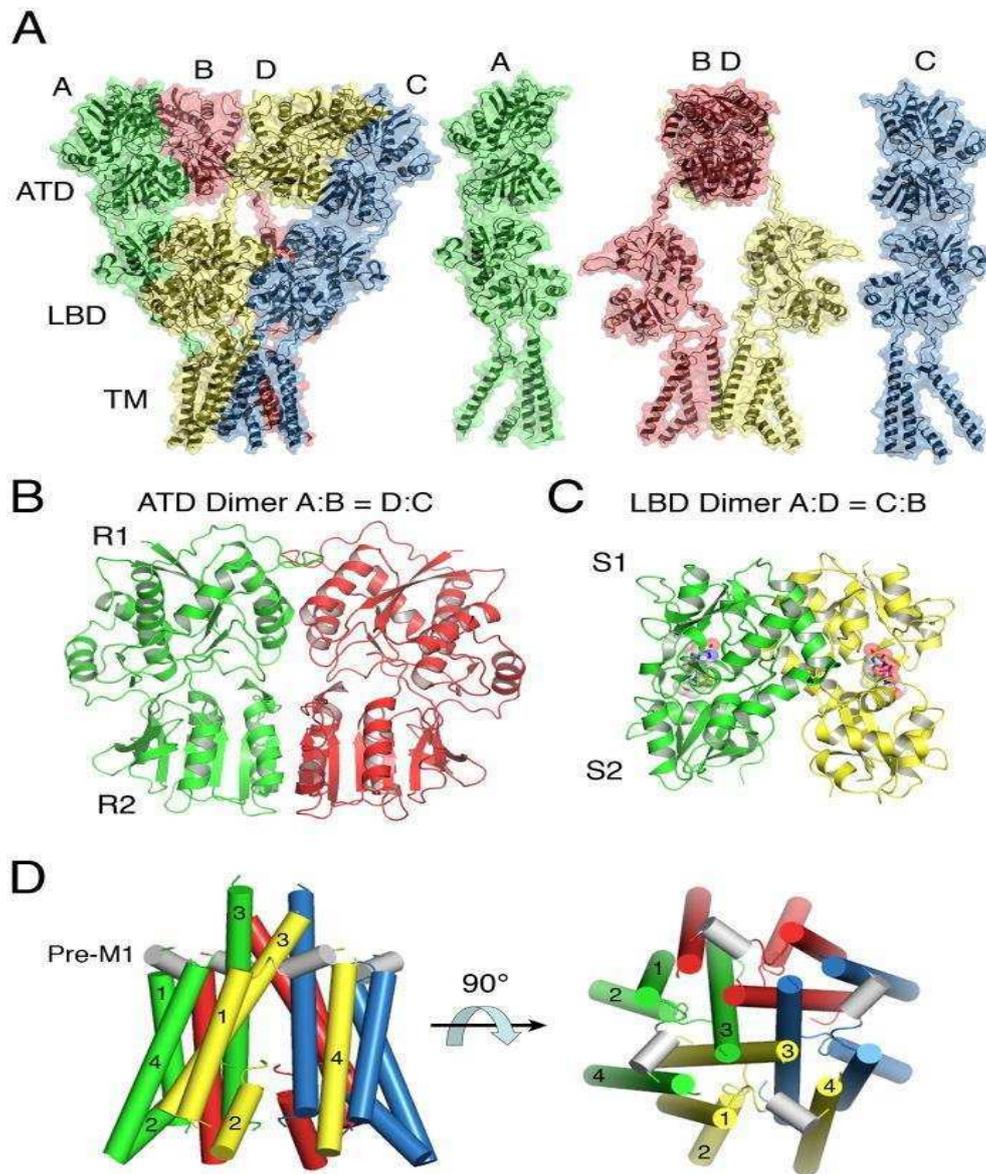
A fines de la década de 1980 se determinó que tanto los canales activados por GABA como los activados por glicina tenían múltiples niveles de conductancia lo que llevó a plantear que podían tener más de un estado abierto lo que puede ser entendido como una activación separada de cada subunidad que induce un cambio conformacional antes que todas las subunidades estén en el estado activado.

Por su parte los GlyR fueron los primeros receptores en ser aislados del sistema nervioso central de mamíferos [124] y están compuestos por tres subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  que tienen la estructura general de las subunidades de los receptores de esta supe familia y tienen una homología de secuencia del 35% aproximadamente con los nAChR y los GABA<sub>A</sub>R especialmente en el dominio transmembrana. Experimentos de inmunoprecipitación mostraron que precipita junto con la subunidad  $\beta$  una proteína de unión al citoesqueleto llamada gefirina [125], que se une al *loop* intracelular entre secuencias consenso para fosforilación de PKA y tirosin kinasas.

La otra supe familia de canales iónicos activados por ligando son los receptores ionotrópicos de cuatro subunidades que unen glutamato. A finales de 1970, basándose en su sensibilidad diferente para el ligando N-metil-D-aspártico, GluRs de vertebrados fueron clasificados en dos subtipos receptores de NMDA y “no”NMDA [126]. En los subsiguientes 40 años, esta clasificación se amplió para incluir otros subtipos, y una serie de 18 genes para los GluR humanos fueron clonado. Basándose en sus propiedades de unión a ligandos selectivos y secuencias de ADN, cuatro clases principales de GluRs codificadas por 8 familias génicas han sido identificados en los vertebrados. Cada familia tiene distintos perfiles de expresión específicos de la célula con un rol único en la función cerebral [127]. Los receptores NMDA juegan un papel clave en la plasticidad sináptica, participando en fenómenos como la potenciación a largo plazo involucrada en el aprendizaje [128]. Son heterómeros formados como tetrámeros por co-ensamble de diferente combinaciones de la subunidades GluN1, GluN2A-GluN2D, GluN3A, y GluN3B, que forman canales permeables a iones  $Ca^{2+}$ , bloqueado por  $Mg^{2+}$  extracelular en un modo dependiente de voltaje [129, 130]. Los NMDAR necesitan simultáneamente como agonistas glutamato y glicina [131]. Los así llamados receptores “no”NMDA son canales iónicos insensibles a  $Mg^{2+}$  codificadas por tres familias génicas de los cuales GluA1-GluA4 forman receptores AMPA que median la transmisión sináptica rápida excitatoria en la mayoría de los sinapsis centrales. Receptores de kainato codificadas por dos familias de genes regulan la excitabilidad neuronal y están formados por un co-ensamble de GluR5-7 con KA1 o KA2. Los otros dos genes GluR, Glu-D1 y GLUD2, no forman canales iónicos funcionales, a pesar de compartir la estructura general similar a otros subtipos GluR. Búsquedas de BLAST en el genoma de Drosophila recientemente han identificado una familia de 61 genes relacionados con GluR llamado IRS, que forman receptores heteroméricos quimio sensoriales [132]. Sobre la base de alineamientos de secuencias de aminoácidos, estas proteínas están estructuralmente relacionadas con GluRs de vertebrados pero divergen en las propiedades de unión al ligando [132, 133]. La familia GluR de canales iónicos activados por ligando tiene sus propias características estructurales distintas de las de otros receptores de neurotransmisores. Los dominios extracelulares forman el 85% de la masa de un núcleo GluR y puede ser subdivididos en dominios discretos amino terminal (ATD) y de unión a ligando (LBD). En los subtipos del receptor de

NMDA, el extremo carboxilo terminal citoplasmático tiene aproximadamente 500 residuos. Los estudios estructurales realizados en la última década se centraron en gran medida en el dominio extracelular de unión al ligando expresado en bacterias como una proteína soluble genéticamente aislada del resto de la receptor. Este trabajo ha sido ampliamente revisado y dio visión sin precedentes de los mecanismos moleculares de reconocimiento del ligando [127, 134-136], dando lugar a una opinión consensuada de los modelos para la activación y la desensibilización, con sutil aunque biológicamente diferencias importantes entre los subtipos GluR.

La primera estructura cristalina para un GluR intacto, fue para un receptor de AMPA homotetramérico GluA2, purificado a partir de las membranas de las células de insectos infectadas por baculovirus. La estructura se resolvió con una resolución de 3,6 Å utilizando las estructuras de mayor resolución de la aislada ATD GluA2 (3H5V 2,3 ° Å) y LBD (1FTL 1,8 ° Å) como sondas para reemplazo molecular y como guías para la construcción de modelos. La estructura completa de GluA2 reveló numerosas características inesperadas no previstas en trabajos con los dominios de unión a ligando solubles. En el receptor de longitud completa, los dominios extracelulares son conjuntos sueltos con dos capas claramente distintas, cada uno de los cuales está montado como un dímero de dímeros pero con diferencias locales y globales de 2 veces el eje de simetría. Por el contrario, los segmentos de transmembrana comparten una arquitectura tetramérica central conservada en la que se encuentra un poro dependiente de voltaje (*figura 5*). En cada una de las cuatro subunidades de GluR, el dominio de unión a ligando tiene 280-residuos (LBD), está conectado por cortos polipéptidos a el dominio amino terminal de 380 residuos (ATD) y 120 residuos del canal iónico (TM). Inesperadamente, diferentes pares de subunidades forman dímeros ensamblados en la ATD y el LBD tiene contactos solo en la parte superior.



**Figura 5. Estructura del receptor GluA2 AMPA de rata.** (A) Estructura del tetrámero GluA2 vista del lado, con las subunidades A-D de color verde, rojo, amarillo y azul, respectivamente; como se muestra por la disección de la derecha, el par de subunidades A y C muestran una envoltura molecular continua, y las subunidades B y D adoptan una conformación diferente con una amplia separación entre las capas ATD y LBD. (B) Los dímeros AB y DC tienen estructuras idénticas en el ATD la ATD GluA2 expresada como una proteína soluble, con los contactos inter-subunidad mediados por tanto la parte superior (R1) e inferior (R2) lóbulos. (C) El LBD de los dímeros AD y CB también adopta la misma conformación encontrado de estructuras cristalinas para la construcción del LBD GluA2 soluble, con contactos intermoleculares mediados exclusivamente por los lóbulos de la parte superior (S1). (D) El canal iónico visto de lado (a la izquierda) y rotado 90° (derecha) con las hélices del manguito pre-M1 de color gris.

En experimentos electrofisiológicos sobre AMPA y kainato, mutante de cisteína en el LBD, que conectan distintos pares de subunidades dentro o entre conjuntos de dímero, proporcionado la primera evidencia de efectos funcionales causada por la no equivalencia de subunidad en ensamblajes de GluR homoméricos [137-139] y, además, trabajar con este enfoque debe dar un mayor conocimiento del papel de la asimetría en los mecanismos de activación de GluRs.

La tercer supe familia de canales iónicos activados por ligando son los receptores purinérgicos, llamados así ya que su agonista natural es la adenosina 5'-trifosfato (ATP). Esta es una macromolécula esencial para todas las formas de vida y muy probablemente evolucionó bajo condiciones pre-bióticas prevalecientes en la tierra primitiva[140]. La investigación de los últimos 40 años ha demostrado que el ATP no es sólo una fuente de energía principal y el componente de los ácidos nucleicos dentro de la célula, sino que desempeña un papel crucial en la comunicación intercelular [141]. Receptores P2X están presentes en todos los tejidos de mamíferos y median una variedad grande de respuestas de rápida transmisión en las sinapsis centrales, contracción de las células musculares lisas, la agregación plaquetaria, y la activación de macrófagos con la proliferación y la muerte celular, por nombrar sólo unos pocos procesos [142].

Los siete subunidades de P2X clonadas humanos y en rata tienen entre 379 – 595 aminoácidos (P2X6 de rata y P2X7 humana respectivamente) y comparten secuencia con un 35-54% de identidad. Todos los receptores tienen una topología común con dos dominios transmembrana (TM), un gran dominio de unión al ligando extracelular y extremos amino y carboxilo terminal intracelulares. El dominio extracelular que conecta los dos TM constituye la mayor parte del polipéptido y posee diez residuos de Cisteína conservados entre todos los receptores de vertebrados formando cinco puentes disulfuro [143, 144]. Además, todas las subunidades de rata contienen de tres a seis secuencias consenso para N-glicosilación. Los extremos amino tienen 20-30 aminoácidos y contienen un sitio consenso para la fosforilación por proteína quinasa C [145]. Los extremos carboxilos difieren en La longitud de entre 26 y 239 aminoácidos (P2X6 y P2X7, respectivamente) y solo tienen secuencias relacionadas en los primeros 25

residuos indicando que podrían tener propiedades específicas de cada subunidades [146]. Además contienen varios motivos implicados en el tráfico y la estabilización de los receptores en la membrana y de interacciones con proteínas específicas. La secuencia primaria de los receptores P2X no tiene ningún homología significativa con otros canales iónicos activados por ligando, proteínas de unión a ATP, u otras proteínas conocidas [147].

En la década de 1990, las primeras mediciones electrofisiológicas en el ganglio de la raíz dorsal (DRG), predijeron que al menos eran necesarias tres moléculas de ATP para abrir un canal de P2X [148] y el posteriormente análisis de canal único sobre los receptores P2X2 apoyo esta idea [149]. La primera evidencia bioquímica de la organización trimérica de los canales P2X provino de los estudios de *cross linking* y de *PAGE* nativo sobre P2X1 y P2X3 expresados heterologamente en oocitos de *Xenopus laevis* [150]. En 2005 la arquitectura trimérica se confirmó por microscopía de fuerza atómica [151], microscopía electrónica y análisis de partícula única [152, 153], y, finalmente *T. Kawate* en 2009, por cristalización del subtipo P2X4 de zebrafish (zP2X4) con una resolución de 3.1 Å [154]. La estructura cristalina reveló que el dominio extracelular se extiende a aproximadamente 70 Å de la membrana y que la región transmembrana está formada por seis hélices  $\alpha$  (*figura 6*). La forma de cada subunidad se asemeja a la de un delfín donde los dominios TM representas las aletas y el dominio extracelular representa el cuerpo que es estructuralmente rígido, que se caracteriza por un motivo de  $\beta$ -*sandwich*, con contactos entre el *sándwich* de formación de las hojas  $\beta$ -. Aunque los receptores P2X tengan la topología de los dominios TM y la estructura cuaternario trimérica como la de los canales epitelial de  $\text{Na}^+$  (ENAC), esta supe familia de proteínas no tiene similitudes de secuencia en el dominio extracelular [154-156].

Los receptores homoméricos P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X7, expresados heterologamente, se han caracterizado ampliamente en términos de sus propiedades biofísicas y farmacológicas [157]. Sin embargo, sus propiedades no coinciden con las observadas en tejidos nativos, lo que sugiere que los receptores P2X pueden ser tanto homo como hetero-oligómeros [158].

Solo la subunidad 7 [159] no parece capaz de formar canales heterotriméricos con otras subunidades [160, 161]. Por el contrario, la subunidad 6 es incapaz de formar homómeros [151, 162]. Para receptores P2X5, que se producen en los seres humanos como variantes de *splicing* no funcionales, se observaron diferencias especie específicas en la eficacia de expresión heteróloga y en propiedades funcionales tales como la permeabilidad [163, 164]. En cuanto a los receptores heteroméricos, el mejor caracterizado es el complejo P2X2/3, con estequiometría de una subunidad 2 y dos subunidades 3 [159, 165], y su presencia e importancia en tejidos nativos ha sido demostrado en numerosos estudios [166-169]. En astrocitos corticales los receptores heterómeros P2X1/5 median las corrientes evocadas por ATP, ya que las propiedades farmacológicas y cinéticas concuerdan con las de dicho complejo expresadas heterológicamente [170]. Ninguna de las otras combinaciones de subunidades caracterizadas en sistemas de expresión heterólogos (P2X1/2, P2X1/4, P2X2/6, P2X4/6) ha sido convincentemente verificadas en tejidos nativos [157].

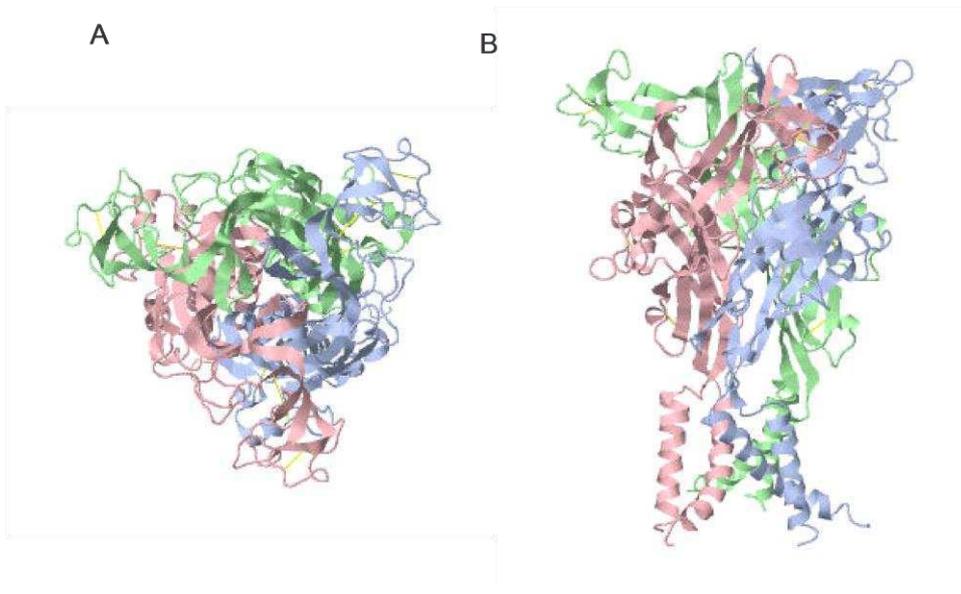
Antes de que la estructura cristalina de zP2X4 estuviera disponible, muchos estudios sobre receptores P2X1, P2X2, P2X3 y P2X4 [171-176], empleando mutagénesis, fueron realizados para localizar el sitio de unión del agonista [157, 172]. Estos estudios llevaron a la conclusión de que el bolsillo de unión de ATP generalmente se conserva dentro de la familia de receptores P2X, donde los residuos cargados positivamente coordinan los oxígenos del fosfato del ATP cargados negativamente. Para el receptor P2X1 se ha demostrado que los residuos Lys68, Lys70, Arg292, y Lys 309, son de importancia para la potencia de ATP [171, 175, 177]. Además, conservan residuos aromáticos Phe185 / Thr186 (P2X1) y Asn290/Phe 291 (P2X1) de un motivo NFR conservado, que se ha demostrado que contribuyen a la acción agonista [178] y se ha propuesto para que participan en la coordinación de la anillo de adenina [179, 180]. Los aminoácidos conservados también participan en la unión del agonista que utilizan en los receptores P2X2, P2X3 o P2X4 [171-176]. Sin embargo, los residuos de aminoácidos no conservados contribuyen a la heterogeneidad de las propiedades farmacológicas y desempeñan un papel en la definición de la función del receptor P2X [172, 180-184]. Mediante

un estudio de co-expresión de dos subunidades 1 mutadas puntualmente en residuos que intervienen en la unión del agonista por cisteínas (K68C y F291C) se determinó que el sitio de unión del ligando se encuentra entre dos subunidades adyacentes, ya que en ausencia de ATP se formó un puente disulfuro entre las subunidades, pero en presencia de ATP no [185]. Todos estos hallazgos están de acuerdo con la posición de los aminoácidos en la estructura cristalina del receptor zP2X4 con ATP [186, 187], resuelta por KK ¿? en 2012 con 2.8 Å (*figura 7*). Sobre esta base el sitio de unión del ATP está a 45 Å de distancia, lejos de los dominios TM. Estudios *in silico* utilizando el receptor P2X2 modelado por homología revelaron que los residuos Arg290 o Gly72 también son importantes en la acción del ATP [187].

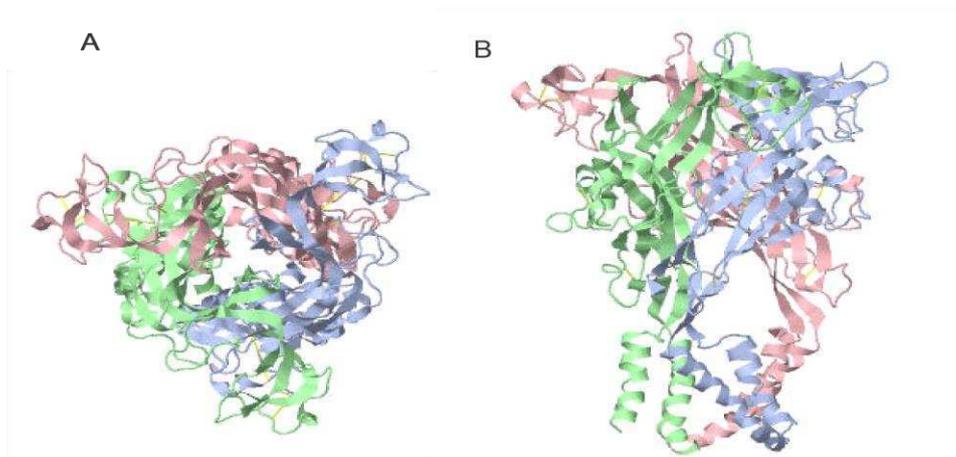
Varios estudios de exploración con mutagénesis de cisteínas sobre receptores P2X2, sugirieron que la línea central del TM2 incluye un poro del canal y la compuerta en la Thr336 y que el TM1 se coloca periféricamente a TM2 [154, 175, 186, 188-190]. Las hélices TM dentro de una subunidad están orientada de forma anti paralela entre sí y forman un ángulo de 45°. Basándose en la estructura de rayos X, la puerta de canal iónico es presumiblemente formada por los residuos Leu340 y Asn341 (Correspondiente a Ile332 y Asn333 en P2X2) en el lado extracelular y por Leu346 y Ala347 (correspondiente a Leu338 y Thr339 en P2X2) en el lado intracelular de TM2.

Los receptores P2X se puede dividir en receptores que desensibilizan rápidamente (P2X1 y P2X3) y receptores que desensibilizan lentamente (P2X2, P2X4, P2X5, P2X7 y) [169, 191]. El grado de desensibilización de los receptores P2X es de gran importancia fisiológica, ya que determina el curso temporal de la transducción de la señal de P2X y regula la capacidad de respuesta durante la presencia sostenida de ATP. La desensibilización representa la transición a una serie de estados cerrados y está seguida por el proceso de recuperación que requiere la disociación del agonista y el cambio conformacional del estado desensibilizado al estado de reposo libre de agonista [147]. El hecho de que la presencia de sitios de alta afinidad para la unión ATP,  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP, y TNP-ATP parece estar asociada con la desensibilización rápida, y la lenta recuperación de la

desensitización está de acuerdo con estudios que muestran que el receptor P2X1 tiene que abrirse antes de que pueda entrar en el estado desensitizado, y que disociación del agonista del estado desensibilizado al estado libre de agonista es la etapa limitante en la velocidad para la recuperación de la desensitización [147, 192, 193]. Los mecanismos moleculares que controlan la desensibilización no se han entendido y aparentemente implican múltiples segmentos de receptores (dominios intracelular, TM, y extracelular) y posiblemente también las interacciones con otras proteínas o mensajeros intracelulares [147, 194, 195]. Receptores P2X quimeras compuestas de partes de P2X desensitizante y no desensitizante indican la participación del extremo N-terminal y TM1 [193, 196] y una parte corta del ectodominio N-terminal [197].



**Figura 6. Estructura cerrada del receptor purinérgico P2X4.** Se ve que el receptor es un homotrímero y las hélices  $\alpha$  que forman el poro del canal en el dominio transmembrana están cerradas, ocluyendo el poro. A) vista frontal. B) vista lateral. (pdb 4db0)



**Figura 7. Estructura del receptor purinérgico zP2X4 en la conformación abierta.** Se ve que el receptor es un homotrímero y las hélices alfa que forman el poro del canal están separadas. A) vista frontal. B) vista lateral. (pdb 4dw1).

## **UN VIEJO PROBLEMA DE LA FARMACOLOGÍA DE CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR UN LIGANDO**

Un postulado que fue de enorme influencia fue realizado por Stephenson a mediados de la década de 1950. En él marcó que para comprender la acción del agonista, además de la constante de afinidad son necesarias algunas mediciones de como el agonista activa el receptor, es decir medidas de su eficacia [198]. Al menos que estas cantidades fuesen identificables, hacer una comparación de la relación estructura-función para distintos agonistas no tendría demasiado sentido porque el efecto de un cambio en la estructura producido por un agonista podría ser muy diferente para cada uno de ellos. Desafortunadamente afinidad y eficacia, en el contexto de un canal iónico binding y gating, son difíciles de medir.

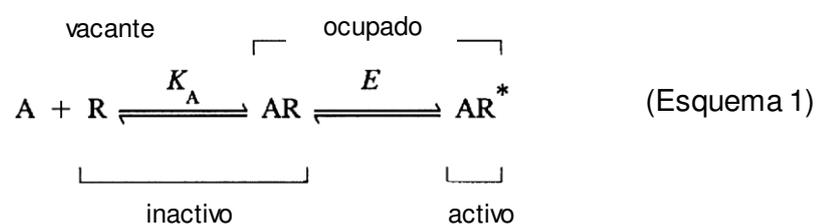
Varios métodos fueron propuestos para medir ambas cantidades como el método que Furchgott propuso en 1966 [199] y en el modelo operacional de Black & Leff de 1983 [200]. Debido a que estos métodos derivan del razonamiento inicial de Stephenson, no son válidos. El error de Stephenson es que su teoría presupone que la

ocupación del receptor está ligada con la concentración de agonista y que depende solo de la afinidad. Como una consecuencia física del principio de reciprocidad la ocupación del receptor debería depender de todos los pasos de la reacción y no solo de la afinidad de la reacción inicial de binding. El problema radica en que para cualquier ligando que produzca un cambio conformacional, la tasa total de unión depende no solo de la afinidad inicial del binding sino también del cambio conformacional que se produce una vez que el ligando se unió, por lo tanto el resultado de un experimento de binding depende de la afinidad y de la eficacia. El mismo error también ha sido propagado a los trabajos de Venter en 1997 y Clarke & Bond en 1998 [201-203].

Un enorme avance fue hecho, cuando se dio cuenta de que algunas proteínas podrían sufrir cambios globales de conformación, y que las propiedades de unión del ligando de las dos conformaciones puede ser muy diferentes.

*Wyman y Allen* sugirieron que las propiedades de la hemoglobina podrían ser explicadas muy económicamente si el cambio de la afinidad durante el binding del oxígeno estuviera basado en un cambio concertado de la estructura entre una conformación y la otra. El equivalente en términos de canales iónicos sería decir que la propiedad de apertura del canal debería ser independiente del agonista que causó la apertura, siendo la única diferencia el tiempo que el canal está abierto. La observación directa del cambio de conductancia de un estado al otro, a nivel de canal único proveyó la evidencia más directa de que un canal tiene distintas conformaciones.

La idea de un cambio conformacional también apareció en la década de 1950 cuando *del Castillo & Katz* escribieron el paso de binding del agonista y el cambio conformacional como dos casos separados para explicar el agonismo parcial.



En su modelo el agonista (**A**) se une al receptor vacío (**R**) y forma el complejo (**AR**) con el canal todavía cerrado y este puede luego cambiar su conformación y pasar al estado activo (**AR\***). En el esquema la constante de disociación del equilibrio para el paso de binding es  $K_A$  y la constante para la isomerización de abierto a cerrado es  $E$ , definida como la tasa de apertura / la tasa de cierre. Si se desea evaluar el sitio de binding se debería poder determinar  $K_A$ . Esta tarea no es sencilla, porque este mecanismo predice que la respuesta y el binding del agonista serán curvas hiperbólicas y que ambos tendrán la misma afinidad aparente ( $EC_{50}$ ) definida como:

$$EC_{50} = \frac{K_A}{1 + E}$$

Entonces es evidente que  $EC_{50}$  depende del binding y el cambio de conformación, por lo tanto no dice nada directamente sobre el sitio de binding. Por lo que resulta claro que el problema radica en separar estas dos cantidades.

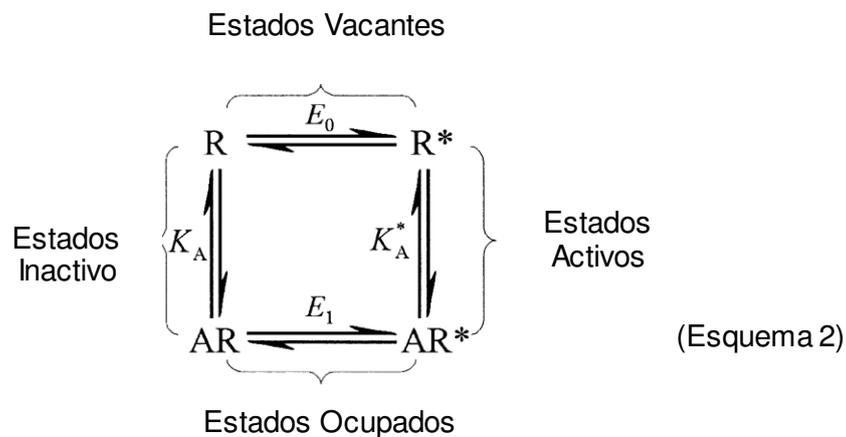
La máxima fracción de receptores en el estado activo, a una concentración muy alta de agonista está determinada por:

$$P_{AR*} = \frac{E}{1 + E}$$

la cual toma valores entre 0 y 1 conforme se incrementa  $E$ . Para mecanismos simples, cambios en el binding ( $K_A$ ) y cambios conformacionales ( $E$ ) son indistinguibles para agonistas muy eficaces, por cuanto  $E$  es grande la  $P_{AR*}$  es muy cercana a 1.

Una vez que la idea de un cambio de conformación global había echado raíces, era natural, de hecho era una necesidad termodinámica, considerar que cantidad del receptor se encontraba en su conformación activa en ausencia de agonista. El postulado de *Wyman* convergió con el enfoque de *Katz*, cuando *Monod et al.* (1965) propuso su conocido mecanismo de cooperación enzimática.

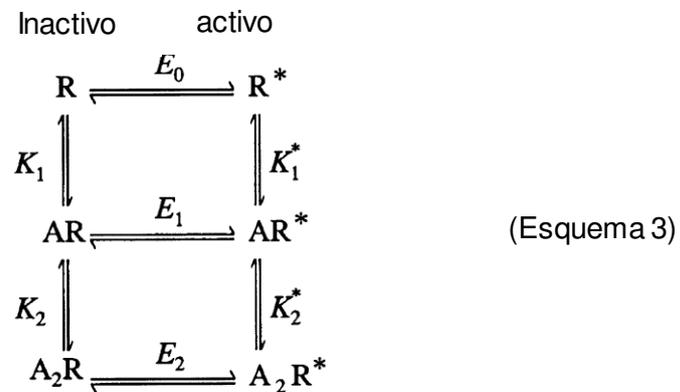
En el caso de una sola subunidad, esto equivale meramente a agregar un estado adicional al mecanismo de del *Castillo-Katz*, el estado activo sin ligando ( $R^*$ ) que producirá “actividad constitutiva”, como se muestra en el Esquema 2. Estos esquemas son llamados esquemas de dos estados ya que el receptor puede estar en una conformación inactiva o en una conformación activa. Aquí  $E_0$  es la constante equilibrio conformacional en ausencia de agonista, y es por tanto una medida de la actividad constitutiva, mientras que  $E_1$  es una medida de la eficacia.



Al igual que antes  $K_A$  sigue siendo la constante microscópica que hace referencia al sitio de binding. Aquí aparece una nueva constante que hace referencia al comportamiento del sitio de binding para los receptores con actividad constitutiva  $K_A^*$ . Los modelos de dos estados cíclicos solo tienen tres constantes de equilibrio independientes. La cuarta constante puede ser definida como combinación de las tres restantes, según el principio de reversibilidad microscópica.

$$E_1 = E_0 \frac{K_A}{K_A^*}$$

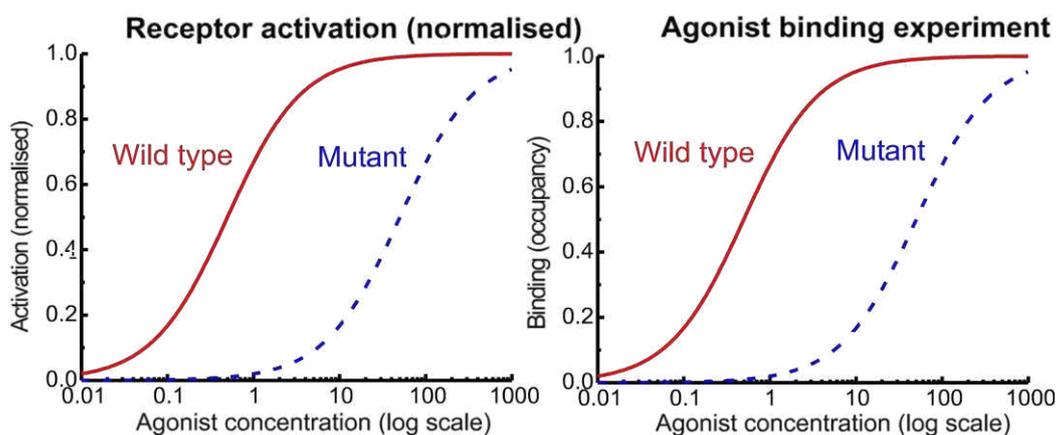
Esta ecuación muestra como la habilidad de cambiar de conformación depende de la afinidad relativa del agonista por las conformaciones activas e inactivas, es decir que la eficiencia está intrínsecamente ligada a la afinidad de binding.



La situación se vuelve más compleja al considerar más subunidades, dado que habrá tantas constantes de equilibrio de asociación del agonista como subunidades que tengan sitio de binding. El panorama es aún más complicado si existe interacción entre las subunidades o si estas poseen varios estados conformacionales previos a la activación [204].

La naturaleza del problema ha sido reconocida y planteada claramente por David Colquhoun quien ha discutido que la máxima dificultad en la interpretación de los estudios de estructura función sobre canales iónicos radica en separar la unión del agonista de la consecuente activación del receptor [205-207]. Un claro ejemplo de este problema se ilustra por las curvas del panel izquierdo de la *figura 8*, la cual ilustra una mutación en un receptor que produce un aumento de 100 veces en la  $EC_{50}$  para un agonista. Experimentos de binding del ligando con el mismo agonista, en el mismo receptor mutante (*figura 8, panel derecho*) muestra que la medida de la afinidad ha sido reducida unas 100 veces [206]. La interpretación de estos resultados podría ser que evidentemente la mutación ha afectado el sitio de unión del agonista y es probable que el aminoácido afectado esté en ese sitio de unión. Esta noción, que parece tan evidente, no lo es en absoluto. El ejemplo de la *figura 8* fue calculado sobre la base de que la afinidad de la reacción de binding, no fueron afectados por la mutación dado que las constantes de equilibrio fueron de 100  $\mu\text{M}$  para el receptor

salvaje como para el mutante. Por lo tanto la única diferencia entre el receptor salvaje y el mutante es que este ha cambiado su habilidad para cambiar la conformación al estado activo, una vez que el ligando está unido. En otras palabras el receptor mutante ha modificado su eficacia pero no su afinidad. No hay ninguna razón en absoluto, para pensar que el aminoácido mutado que afecta la capacidad de cambiar la conformación se encuentra cerca del sitio de unión del agonista. Experimentos de binding no miden afinidad, para cualquier ligando que causa un cambio de conformación. El término “afinidad aparente” se utiliza a menudo para describir  $EC_{50}$  para la respuesta, pero no tiene sentido, según *David Colquhoun*, a menos que se defina lo que quiere decir “aparente” [206].



**Figura 8. Curvas concentración-respuesta (izquierda) y curvas de binding de agonista (derecha).** Ambas fueron calculadas con el esquema de del Castillo-Katz. La reacción de binding tiene una constante  $K_A = 100$  mM para la proteína wild type y la mutante, por lo que esta última no afecta el sitio de binding. La constante para el equilibrio de isomerización al estado abierto es 200 para la wild type (alta eficacia) pero es solo 1 para el receptor mutante, por lo que la mutación afecta solo la habilidad de la proteína para cambiar de conformación y el sitio de binding no es afectado. Fuente: “*Binding, gating, affinity and efficacy: The interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors*”. D. Colquhoun 1998.

Hacer la distinción entre los efectos sobre la unión del agonista y los efectos sobre el cambio conformacional es sin duda el problema fundamental de los estudios modernos moleculares de los receptores. No es sólo un problema teórico, así es como

los canales iónicos realmente se comportan. Sin embargo, la existencia misma del problema no ha sido siempre reconocida. Las siguientes frases tomadas de la discusión de D. Colquhoun sirven para ejemplificar el problema

*“De manera simplista, la eficacia de un agonista completo puede ser igual a 1, la de un antagonista a 0, y la de un agonista parcial a un valor entre 0 y 1”* [208]. Esta afirmación oscurece el punto que es crucial tanto para la interpretación de la relación estructura-actividad y de los estudios de mutantes que, la eficiencia no tiene límite superior, en principio, y que cuando es grande, cambios en ella no se distinguen de los cambios en la afinidad.

*“Este cambio en la sensibilidad del mutante Y190F podría deberse ya sea a un cambio en la afinidad de unión del receptor o un cambio en la energética de apertura del canal después de la unión del agonista. Para distinguir entre estas posibilidades, se evaluó la afinidad de unión de ACh de los mutantes midiendo la capacidad de ACh para competir con el binding de [125I]- $\alpha$ -bungarotoxina”* [209]. La figura 4 muestra claramente que tales mediciones no hacen la distinción requerida.

*“De particular interés a este respecto es la capacidad de medir de forma independiente tanto la afinidad del ligando del receptor (por técnicas de binding de ligando) y la actividad biológicas ( $EC_{50}$  y  $E_{max}$ ). Estos dos procesos independientes proporcionan la información sobre...”* [210]. El punto del problema es, por supuesto, que estas medidas están lejos de ser independiente. Si el binding afecta la activación (transducción, apertura de la compuerta), a continuación, la activación debe afectar el binding.

*“Medición de la afinidad de un agonista total puede ser hecha por el procedimiento desarrollado por Furchgott”* [211]. Esto sería verdad sólo si la activación no tuviese efecto sobre el binding, lo cual no es cierto para cualquier mecanismo de acción agonista que se propone actualmente [205].

En el caso de los canales iónicos, los registros de canal único permiten “ver” el estado de actividad del receptor de manera muy directa. Por lo tanto, si pudiéramos “ver” con la misma claridad cuando una molécula queda unida al receptor, el problema

de separar el binding del gating quedaría resuelto y se podrían tener medidas confiables de la afinidad ( $K_A$ ).

## **UNA POSIBLE SOLUCIÓN A UN VIEJO PROBLEMA**

En la sección anterior se planteó que el problema radica en separar el fenómeno de la unión del agonista y la apertura del canal iónico. Muchos experimentos fueron realizados en pos de entender la acción de agonistas sobre el canal y plantear modelos del mecanismo de acción del canal.

Como se explicó antes experimentos de binding y curvas de dosis respuesta no son suficientes para describir el comportamiento de un canal iónico. El uso de los receptores mutados sin duda, ha conducido a enormes avances, pero algunos tipos de experimentos son mucho más fáciles de interpretar que los demás. No es casual que los primeros estudios se concentraron en buscar en las propiedades de un canal mientras que estaba abierto (es decir, a la penetración de iones), en lugar de hacer frente a los problemas mucho más difíciles implicado en la unión del agonista y la sincronización. Tales estudios, rápida y claramente, establecieron que la región M2 del canal nicotínico (en lugar de la inicialmente postulada región anfifílica) formó parte del revestimiento del canal y los efectos de las cargas sobre la permeación [212, 213].

Del mismo modo muchas de las conclusiones de los estudios de mutación (y a partir de estudios electrofisiológicos mucho antes), relativos a la vía de penetración en los canales de potasio han sido verificadas por la determinación de la estructura cristalina [63]. Pero ninguno de estos estudios incluyeron nuestra principal preocupación aquí, que es la manera de desentrañar los efectos en el sitio de unión al ligando, del cambio de conformación que tiene lugar para la apertura del poro del canal.

Si bien los registros de canal único son esenciales para cualquier tipo de análisis riguroso, es mucha la información que se puede extraer mediante el uso saltos de concentraciones muy rápidos sobre registros macroscópicos. Hay pocas posibilidades de llegar a conclusiones a partir de curvas de equilibrio de concentración-respuesta y

curvas de binding por sí solas, excepto en los casos más extremos (por ejemplo, los cambios muy grandes observados en la potencia de NMDA). Como tantas otras veces, es sólo una cuestión de métodos. Por ejemplo, durante la década de 1970, los métodos que estaban disponibles entonces (como el análisis de ruido) resultaron insuficientes para distinguir entre la unión y la sincronización [214].

Una manera práctica de separar los efectos de la unión y de la apertura del poro puede resultar de un razonamiento teóricamente sencillo, aunque metodológicamente complicado. Si se pueden hacer aplicaciones discretas del agonista a un canal determinado, a concentración saturante, lo suficientemente rápidas, la corriente resultante será inversamente proporcional a la constante de disociación del agonista. Una molécula de agonista puede unirse al receptor y separarse antes de provocar un cambio conformacional en el canal o puede permanecer unida hasta que el cambio ocurra. En cualquier caso, el accionar del agonista dependerá de la eficacia de atrapamiento, que puede ser definida como la probabilidad condicional de que el canal totalmente unido se abra al menos una vez antes de que la molécula de agonista abandone el receptor, dado que al comienzo, el canal se encuentre en el estado cerrado totalmente unido.

$$\Pi = P\{\textit{finaliza en est abierto tot unido} \mid \textit{inicia en est cerrado tot unido}\}$$

Para llegar a que estas medidas tengan un significado apropiado y real el pulso de agonista debe ser más corto que la duración media de la disociación del agonista. Entonces así la razón de la corriente en respuesta a pulsos muy cortos sobre la corriente medida a pulsos largos refleja la eficiencia de atrapamiento.

L. Moffatt & R. Hume mostraron en 2007 que empleando un sistema intercambiador de soluciones a base de un piezo eléctrico podían realizar pulsos de agonista sobre receptores purinérgicos (P2X<sub>2</sub>), en la configuración outside-out patch clamp, tan cortos como 200 μs [204]. Ellos llamaron a estos pulsos ultra-rápidos y propusieron un método de corrección de las vibraciones del piezoeléctrico para producir estos pulsos de manera confiable y robusta. Gracias a esta metodología,

podieron plantear la existencia de un estado “Flip” intermedio entre los estados cerrado totalmente unido al agonista y abierto. En su análisis del mecanismo de activación de P2X<sub>2</sub> pudieron discriminar modelos sencillos y llegaron a plantear modelos que poseen hasta cuarenta estados conformacionales posibles, aunque no pudieron distinguir entre dos modelos muy complejos uno donde el estado de flip se da para cada subunidad, similar al que planteó el grupo de D. Colquhoun para el receptor de glicina [215]; y otro donde el flip se da en todo el receptor como el modelo de activación para el sensor de voltaje de los canales de calcio voltaje dependientes [216]. La distinción entre estas dos posibilidades podría hacerse, con el mismo criterio explicado más arriba, si se logran obtener una segunda generación de pulsos ultrarápidos, además esto permitiría comenzar a analizar la cinética de canales que se activan aún más rápido, como los receptores AMPA de glutamato. Por otra parte estos modelos están planteados sobre el supuesto de que los canales purinérgicos son trímeros, aunque su estructura fue confirmada por cristalización [154], dos años después de la publicación de sus modelos y recientemente se ha cristalizado su estructura en estado abierto (figura 6 y 7) [186]

# *Objetivos*

## **OBJETIVOS GENERALES**

Dentro del marco del estudio de la relación estructura función de los canales activados por ligando, este proyecto hace especial énfasis en la obtención de modelos cinéticos robustos y confiables que permitan reproducir el comportamiento de dichos canales, en especial de P2X2. La utilidad de dichos modelos es doble. Por un lado, son una herramienta cuantitativa que complementa a la biología estructural para entender los mecanismos de activación de los canales, especialmente si se utilizan modelos alostéricos. Por el otro, son los ladrillos con los que se construyen los modelos computacionales que permitirán entender el procesamiento de la información en el sistema nervioso. Para determinar un modelo cinético para los receptores purinérgicos, se cuenta con cuatro herramientas: la posibilidad de aplicar pulsos ultracortos de agonista a preparaciones de outside out patch cinco veces más breves que en otros laboratorios (0.2 ms contra 1ms), la posibilidad de realizar pulsos aleatorios, la posibilidad de medir la duración y tiempo de aplicación de los pulsos con la preparación de patch intacta y el desarrollo de un método estadístico que permite estimar constantes cinéticas de las fluctuaciones de corrientes macroscópicas.

La combinación de estas herramientas abre la posibilidad de desarrollar una estrategia de experimentos sucesivos que permitirían determinar con robustez un modelo cinético que reproduzca el comportamiento de los canales activados por ligando en general.

El objetivo general consiste en aplicar estas herramientas para dilucidar la relación estructura-función de P2X2, establecer como modulan esta relación otros factores como el zinc, el pH y la temperatura y eventualmente extender este análisis a

otros miembros de la familia de receptores purinérgicos, a receptores de la familia Cys-loop y a canales de glutamato (AMPA). En una segunda etapa el uso de estas herramientas puede extenderse al análisis de las interacciones farmacológicas de distintos agonistas con los canales iónicos, incluso con canales activados por voltaje

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

La generación y control de sistemas de aplicación ultra-rápidos podría favorecer el avance de los campos de modelado cinético entre proteínas receptoras y sus ligandos. Por tal motivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener intercambios ultra-rápidos.
  - a) Estudiar el comportamiento de válvulas solenoides ante un voltaje comando y optimizar su funcionamiento para ser empleadas como sistema intercambiador de soluciones.
  - b) Diseñar y construir un intercambiador de soluciones con resolución temporal de 0.01ms.
  - c) el movimiento de todos los componentes del sistema intercambiador de soluciones (piezo, pipeta de aplicación, interface líquida entre soluciones e interface líquida entre la solución la pipeta). A partir de estas mediciones, manipular la señal para obtener un comando optimizado que permita conseguir el movimiento deseado del sistema al aplicarlo al piezo eléctrico
  - d) Diseñar una interfaz funcional que permita el control del intercambiador de soluciones y el control de todos los elementos del sistema.
  - e) Obtener pulsos ultra-cortos de intercambio de soluciones y ampliarlo a la generación de intercambios aleatorios
- 2 Analizar la utilidad de los pulsos ultra-rápidos para resolver constantes y modelos cinéticos.

# Capítulo 1

# *“Caracterización dinámica de válvulas solenoides”*

## **INTRODUCCIÓN.**

Conforme avanza el conocimiento sobre la complejidad de la respuesta de circuitos neuronales [217, 218] es necesario obtener mejor información sobre los receptores químicos que están involucrados [219]. Uno de los factores que determina la calidad de la información cinética medida es la precisión temporal de la estimulación química realizada a dichos receptores [204, 220]. Los efectos de los compuestos químicos sobre preparaciones biológicas son comúnmente testeados utilizando sistemas de perfusión de soluciones donde las válvulas solenoides son un componente clave en la mayoría de estos sistemas y son empleadas en sistemas intercambiadores de soluciones. Los estudios cinéticos incrementan su poder de análisis al aumentar la información disponible sobre el curso temporal del intercambio de solución [221-224]. Por lo tanto es de gran interés poder determinar la demora entre la aplicación del voltaje que comanda la apertura de las válvulas y el momento en el cual éstas efectivamente se abren. En líneas generales dos clases de válvulas solenoides son

empleadas en sistemas de perfusión. En primer lugar las válvulas directas, que permiten realizar intercambios rápidos, y en segundo lugar las válvulas de pellizco en las que el flujo de solución no entra en contacto con las partes internas de la válvula. Esto se logra haciendo que la válvula al activarse mueva un émbolo que comprime la cánula por donde circula la solución [225]. Ambos tipos de válvulas son accionadas por un potencial que se aplica a su bobina. Este potencial induce una corriente eléctrica que acorde a la ley de Ampere, genera un campo magnético que mueve un émbolo ferromagnético desde su posición de reposo a su posición activada en el interior de la bobina [226]. Las válvulas pueden ser de configuración cerrada, donde el movimiento del émbolo permite el pasaje de fluido, o de configuración abierta, donde el movimiento del pistón impide dicho pasaje de fluido. En algunas de las válvulas directas el movimiento del émbolo activa la apertura de un diafragma, mientras que en otras el movimiento dispara un mecanismo de oclusión directo.

En la configuración cerrada de las válvulas de pellizco, la activación del émbolo libera una cánula elástica, mientras que en la configuración abierta se comprime la cánula. En ambos tipos de válvulas, una vez que el potencial es removido, el émbolo retorna a su posición de reposo por medio de un resorte.

Cada uno de los pasos contribuye en cierto grado al retardo en la apertura de la válvula [226]. En primer lugar, la corriente no aumenta instantáneamente, solo lo hace después de un delay igual a una constante inductiva. En segundo lugar, el cambio en el flujo magnético se retrasa por el tiempo de difusión magnética. En tercer lugar, el flujo magnético requiere un cierto tiempo para acelerar el émbolo. Finalmente, el mecanismo de la válvula necesita tiempo para actuar. Cada uno de los mecanismos de obstrucción tienen sus propios tiempos de retardo en particular; tanto el mecanismo de amplificación de diafragma así como el mecanismo de oclusión por constricción de la cánula elástica.

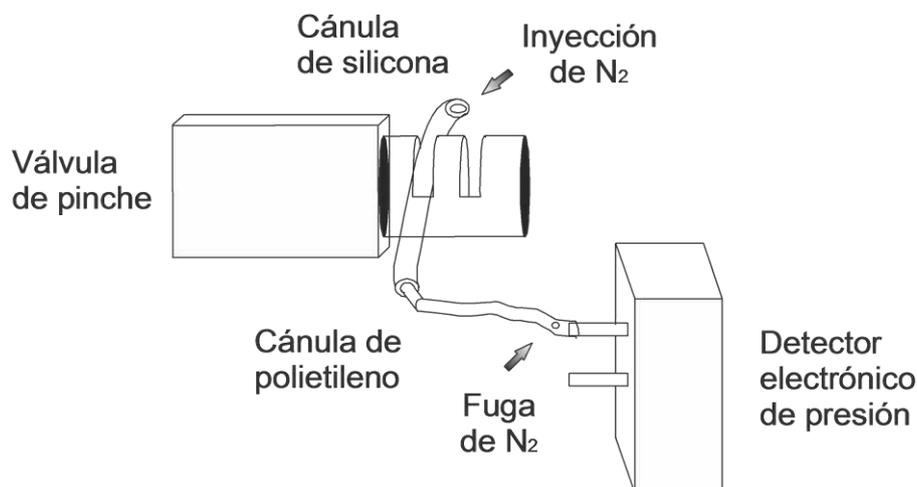
## **METODOLOGÍA y RESULTADOS.**

### **Comportamiento de las válvulas solenoides.**

Los sistemas intercambiadores de soluciones a base de válvulas solenoides son ampliamente utilizados y de configuraciones variables. Pueden producirse aplicaciones de soluciones discretas sobre la pipeta de patch empleando una pipeta de aplicación de un único canal sobre la que confluyen varias soluciones a través de un conector múltiple de manera que disponiendo de aperturas y cierres sucesivos de distintas válvulas pueden producirse trenes de soluciones. Otra configuración posible se basa en disponer dos pipetas en forma de Y de modo que los flujos que salen de cada canal confluyan formando una interfase delgada entre las soluciones y por apertura y cierre de una de las válvulas lograr un desplazamiento de dicha interfase sobre la pipeta de registro. En cualquiera de los casos al menos dos fuentes de error son identificables. Por un lado la resolución temporal en la aplicación de un pulso de solución estará relacionada directamente con la activación de la válvula, por lo que un retardo en la activación o en la inactivación con respecto al comando se traducirá en una duración distinta del pulso si es que se emplea en el sistema una única válvula, mientras que en sistemas que producen trenes de soluciones aumentarán la mezcla entre los frentes de soluciones contiguas o producirá pulsaciones separadas entre las soluciones. Por otra parte una segunda fuente de error tiene que ver con la difusión de las soluciones una vez que estas abandonan la pipeta de aplicación.

Para evaluar la acción de las válvulas solenoides como sistema intercambiador de soluciones fue necesario encontrar una manera de establecer cuál es el error en la respuesta frente a la aplicación de un estímulo. La *figura 1.1* muestra el dispositivo experimental empleado. A cada válvula solenoide se le registraba la corriente que circula por la bobina ante un pulso comando empleando una resistencia, en serie con la válvula, de 1 – 6  $\Omega$  para válvulas de pellizco de 3 vías (bobina Z036S, Sirai Elettromeccanica, Bussero, MI, Italy) o para válvulas de diafragma (LFAX0524100AB, The Lee Company, Westbrook, CT, US), respectivamente. La resistencia total para las válvulas de pellizco fue de 34  $\Omega$  y de 293  $\Omega$  para las válvulas de diafragma. Además se colocó en el circuito de medición un arreglo protector formado por un diodo y un

diodo Zener 47V invertido. A cada válvula solenoide se le colocó una cánula de silicona en la configuración cerrada y ésta fue conectada por medio de una cánula de polietileno a un detector digital de presión (ASCX30DN, Honeywell, Freeport, IL). Por el extremo libre de la cánula de silicona se inyectaba nitrógeno a una presión de  $1 \text{ Kg/cm}^3$ , el cual fluía a través de la cánula de polietileno hasta el sensor, cada vez que la válvula era accionada. Cuando el pulso de voltaje finalizaba la válvula se cerraba impidiendo el pasaje de nitrógeno. La presión remanente se equilibraba con la atmosférica a través de un orificio de fuga de 1.2 mm de diámetro en la cánula de polietileno próximo a la unión con el detector de presión. Dado que este orificio permanecía abierto durante todo el registro la presión máxima detectada no llegaba a equilibrarse con la presión inyectada sino que solo alcanzaba  $0.15 \text{ Kg/cm}^3$ . Cuando la válvula se cerraba, la presión registrada por el sensor se igualaba con la presión atmosférica con una constante temporal de aproximadamente 1 ms. Esta constante se estimó dividiendo el volumen muerto entre la válvula y el sensor (0,3 ml) por la velocidad nominal de flujo de gas a 1 bar (0,3 l/s). Esta velocidad se obtuvo de diagramas de flujo para tuberías suponiendo que la restricción de flujo principal era de 30 mm de largo con un diámetro interno de 0.8 mm.



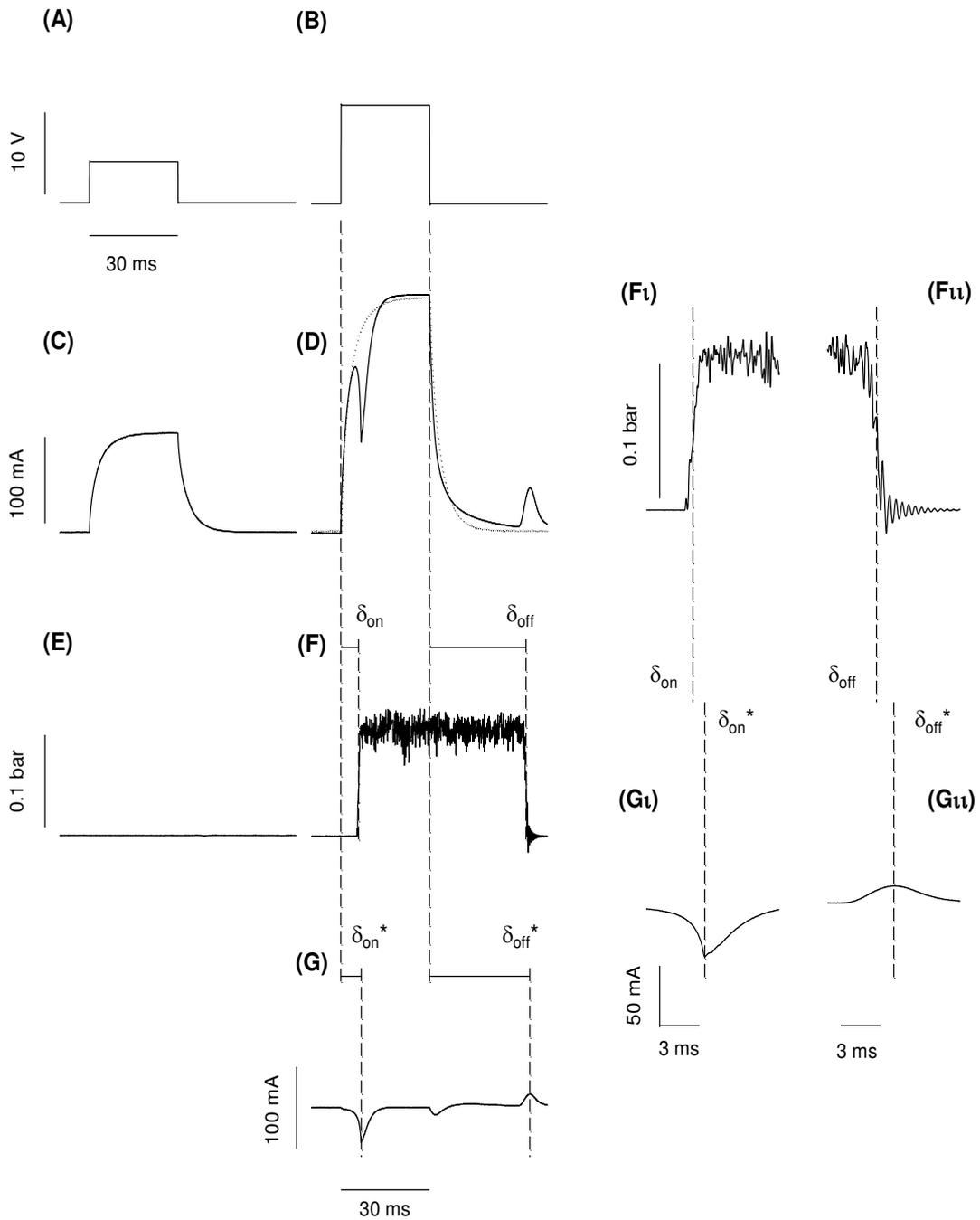
**Figura 1.1. Dispositivo experimental para la medición de la actividad de las válvulas solenoides.** Se muestra una válvula de pinche con una cánula de silicona en la configuración cerrada de manera que impide el pasaje de N<sub>2</sub>. Del otro lado una cánula de polietileno conectada un sensor digital de presión y con un punto de fuga para equilibrar la presión remanente con la desactivación de la válvula.

La adquisición de los datos se realizaba empleando una tarjeta de adquisición NI PCI 6229 (National Instruments, Austin, TX) que permitió sincronizar el manejo de la válvula con la medición de la presión de nitrógeno y el flujo de corriente a través de la bobina. Las señales fueron adquiridas a 250 KHz y filtradas a 10 KHz. El comando para la válvula fue amplificado 10 veces empleando un amplificador (PAD115, PowerAmp Design, Tucson AR), fabricado a medida, con un ancho de banda de 50 KHz.

La figura 1.2 muestra el resultado de las medidas realizadas y la construcción de la señal del émbolo. Para construir la señal del émbolo fue necesario darle a la válvula un voltaje comando en el que efectivamente cambie de configuración y otro en el que permanezca en la misma configuración. Por tal motivo se eligió el voltaje nominal de las válvulas para la activación (se testearon válvulas de 12 y 24 V) y la mitad de este como comando para que la válvula no cambie de configuración (*figura 1.2 A-B*). Independientemente del voltaje aplicado a la válvula y de que esta cambie su configuración, por su bobina siempre circula alguna cantidad de corriente (*figura 1.2 C-D*). Cuando el voltaje comando aplicado a la válvula fue sub umbral la corriente que circulo por la bobina la cargó y descargó inductivamente. Cuando se aplicó un pulso de voltaje nominal, la carga y descarga de la bobina también fue inductiva pero se observaron picos máximos y mínimos que presumiblemente se debían al movimiento del émbolo ferromagnético y al consecuente cambio de configuración.

Para corroborar si los picos máximos y mínimos se debían al cambio de conformación se midió el cambio de presión de  $N_2$  como se explicó anteriormente (*figura 1.2 E-F*). Así se vio que el cambio en la configuración de cerrado a abierto, cuando se empleó el comando al voltaje nominal, permitió el pasaje de  $N_2$ . Una vez acabado el voltaje comando, la válvula volvió a la configuración cerrada y se interrumpió el flujo del gas. Este dispositivo permitió realizar el cálculo del retardo en la apertura de la válvula ( $\delta_{on}$ ) como la diferencia de los tiempos entre el 50% ( $P_{50}$ ) (*figura 1.2 Fi*) de la presión máxima registrada ( $P_{max}$ ) y el tiempo del inicio del voltaje comando. De la misma manera se calculó el retardo en el cierre de la válvula ( $\delta_{off}$ ) como la diferencia de los tiempos  $P_{50}$  y el fin del voltaje comando (*figura 1.2 Fii*). La señal del émbolo (*figura 1.2 G*) fue construida restando los registros de la corriente

cuando se aplicó el comando de voltaje nominal con la corriente del pulso sub umbral normalizada.



**Figura 1.2. Construcción de la señal del émbolo.** A-B) Pulsos de voltaje comando sub umbral (5V) y nominal (12-24 V) respectivamente. C-D) Corriente sub-umbral y nominal consumida por la válvula, respectivamente. La línea punteada representa la corriente que circula por la válvula al aplicar un comando de voltaje sub-umbral normalizado a la corriente nominal para construir la señal del émbolo. E-F) Presión de nitrógeno detectada por el

detector.  $\delta_{on}$  es el retardo medido en la apertura de la válvula,  $\delta_{off}$  retardo medido en el cierre de la válvula. G) señal del émbolo calculada como la diferencia entre la corriente nominal y la corriente sub-umbral.  $\delta_{on}^*$  retardo estimado en la apertura de la válvula,  $\delta_{off}^*$  retardo estimado en el cierre de la válvula a partir de la señal del émbolo. F<sub>i</sub>) Escala expandida del punto F mostrando el punto al 50% tomado para la medición del retado de apertura. F<sub>ii</sub>) Escala expandida del punto F mostrando el punto al 50% tomado para la medición del retado del cierre de la válvula. G<sub>i</sub>) Punto mínimo de la señal del émbolo empleado para el cálculo del error de apertura. G<sub>ii</sub>) Punto máximo de la señal del émbolo utilizado para el cálculo del error en el cierre

Las líneas punteadas representan el valor de cada uno de los retardos y muestran la relación entre los retardos medidos y los calculados a partir de la señal del émbolo (*figura 1.2 D línea de puntos*). De esta manera se pudieron estimar los retardos en la apertura y el cierre de la válvula ( $\delta_{on}^*$  y  $\delta_{off}^*$  respectivamente), como la diferencia entre el tiempo del punto mínimo (*figura 1.2 G<sub>i</sub>*) y el punto máximo de la señal del émbolo (*figura 1.2 G<sub>ii</sub>*) con el tiempo del inicio y el tiempo de finalización del pulso comando. La diferencia entre los retardos de apertura y cierre, medidos y estimados están ejemplificados por las *figura 1.2 F<sub>i</sub>-G<sub>ii</sub>*. Este gráfico muestra que la estimación de los retardos a partir de las mediciones de la corriente consumida (y su posterior transformación a la señal del émbolo) es un buen estimador de los retardos que tiene el accionar de la válvula.

La *tabla 1.1* muestra los valores de los retardos medidos y estimados para tres tipos de válvulas, dos válvulas de pellizco con distintos voltajes nominales (12 y 24 V) y una válvula de diafragma (12 V). Si bien todos los valores de los retardos medidos y estimados para los tres tipos de válvulas son parecidos, la mejor relación ( $\delta_{on}^* - \delta_{on}$ ) la poseen las válvulas de diafragma, mientras que las válvulas de pellizco con el mismo voltaje nominal poseen casi el doble de relación y las válvulas de pellizco de 24 V poseen el triple. Entre las válvulas de diafragma y de pellizco de 12 V la diferencia entre retado estimado y medido, es mayor para la válvula de pellizco, debido a un incremento en el retardo estimado. Por otro lado en la comparación con las válvulas de pellizco de 24 V la diferencia es debida a un incremento de 1 ms en el retardo estimado. Por otra parte el tiempo que dura la activación (Tiempo de subida), que fue calculado como la diferencia de tiempos correspondiente al 10% de  $P_{max}$  menos el 90% de  $P_{max}$ , se incrementó un 45 – 55 % para válvulas de pellizco de 12 – 24 V

respectivamente respecto de las válvulas de diafragma. Por tal motivo el tipo de válvula que tuvo un mejor rendimiento tanto en la velocidad de apertura como los en los retardos estimados respecto de los medidos fueron las válvulas de diafragma.

En cuanto a la desactivación de los tres tipos de válvulas, es notoria la diferencia entre los retardos de las válvulas de diafragma y las de pellizco, sin embargo la diferencia entre los retardos medidos y estimados de los tres tipos es similar, mostrando que el *método de la "señal del émbolo"* es un buen estimador del retardo real de las válvulas. Por otra parte el tiempo que dura la desactivación (tiempo de bajada), que fue calculado como la diferencia de tiempos correspondiente al 90 / de  $P_{max}$  menos el 10 / de  $P_{max}$ , no mostró diferencias para ninguno de los tres tipos.

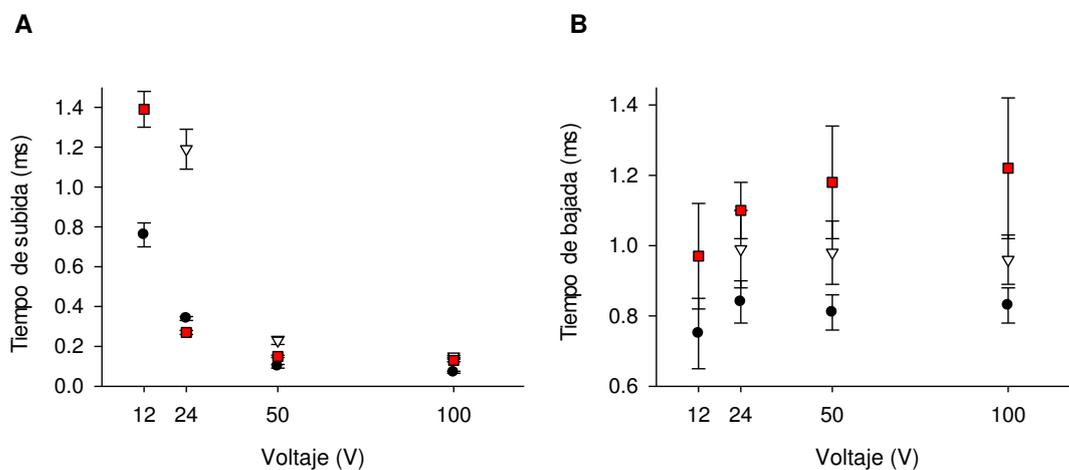
	Válvula de diafragma (12V)	Válvula de pellizco (12V)	Válvula de pellizco (24V)
$\delta_{on}$	$6.51 \pm 0.35$	$6.52 \pm 0.10$	$6.78 \pm 0.39$
$\delta_{on}^*$	$6.92 \pm 0.37$	$7.33 \pm 0.15$	$7.92 \pm 0.43$
$\delta_{on}^* - \delta_{on}$	$0.41 \pm 0.02$	$0.81 \pm 0.02$	$1.14 \pm 0.15$
T de subida (10 - 90 / )	$0.76 \pm 0.06$	$1.14 \pm 0.12$	$1.25 \pm 0.11$
$\delta_{off}$	$3.26 \pm 0.07$	$34.40 \pm 5.68$	$24.93 \pm 4.03$
$\delta_{off}^*$	$2.53 \pm 0.13$	$35.50 \pm 5.81$	$25.82 \pm 4.12$
$\delta_{off}^* - \delta_{off}$	$0.74 \pm 0.16$	$1.01 \pm 0.04$	$0.90 \pm 0.13$
Ti de bajada (90 - 10 / )	$0.75 \pm 0.10$	$0.77 \pm 0.11$	$0.85 \pm 0.08$

**Tabla 1.1. Eficiencia y sensibilidad de la señal del émbolo para la estimación del retardo de la apertura y el cierre de las válvulas.** La tabla muestra los valores obtenidos para válvulas de diafragma con un voltaje nominal de 12 voltios y para válvulas de pellizco con voltaje nominal de 12 y 24 voltios respectivamente, durante 30 ms. Todos los valores están en ms y se muestran la media  $\pm$  el desvío estándar de 150 mediciones. Al igual que en la Figura 1.1  $\delta_{on}$ ,  $\delta_{off}$  son los retardos medidos y  $\delta_{on}^*$  y  $\delta_{off}^*$  son los errores estimados. Tiempo de subida y tiempo de bajada son calculados entre 0.1 y 0.9 de la presión máxima detectada por el detector ( $P_{max}$ ) y viceversa.

### ***Evaluación de la señal del émbolo.***

Dado que las válvulas solenoides tienen retardos considerables con respecto a la aplicación del comando, fue necesario investigar como varían los distintos parámetros que se calculan con la señal del émbolo. Por tal motivo se evaluó en esta sección la evolución de los distintos parámetros en distintas condiciones en pos de optimizar el funcionamiento de las válvulas para producir aplicaciones ultra-rápidas de soluciones. En este contexto, la primera evaluación realizada fue sobre la velocidad de activación y de desactivación de los tres tipos de válvulas, medidas como Tiempo de subida y el tiempo de bajada, conforme al incremento en el voltaje. La *figura 1.3 A* muestra como disminuye el Tiempo de subida con el aumento del voltaje, a partir del voltaje nominal de cada tipo de válvula. En cualquiera de los tres casos el mayor incremento en la velocidad de activación se da al duplicar el voltaje nominal, mientras que incrementos mayores en el voltaje no producen un cambio proporcional en la velocidad. Sin embargo la máxima velocidad de activación (40 – 80  $\mu$ s) se alcanzó al máximo voltaje empleado (100 V). Estas velocidades son compatibles con la generación de pulsos ultra-rápidos. Por otra parte aumentar el voltaje no produce cambios significativos en la velocidad de desactivación de cualquiera de los tres tipos de válvulas (*figura 1.3 B*). Estos fenómenos están en relación directa con los mecanismos de funcionamiento de las válvulas solenoides. Mientras que la activación de una válvula solenoide depende de la formación de un campo electromagnético que impulsa al émbolo ferromagnético a su posición activada, el pasaje a la posición de relajo del émbolo y la consecuente desactivación dependen no solo de la remoción del campo eléctrico sino también de un mecanismo mecánico. Los tiempos de decaimiento de los tres tipos de válvulas permanecieron en un rango de 0.7 – 1.2 ms. Estos tiempos no son compatibles con la generación de pulsos ultra-rápidos ya que la aplicación y remoción de la solución que lleve el agonista del canal iónico debe estar en el orden del submilisegundos. Por más que la aplicación sea lo suficientemente rápida, como para generar pulsos ultra-rápidos la remoción de la solución limita el ancho del pulso a aproximadamente 0.8 ms para la válvula de diafragma y a más de 1 ms para las válvulas de pellizco, siempre y cuando se utilicen 100 V en la amplitud del comando. Teniendo en cuenta que este es un voltaje excesivo y que probablemente

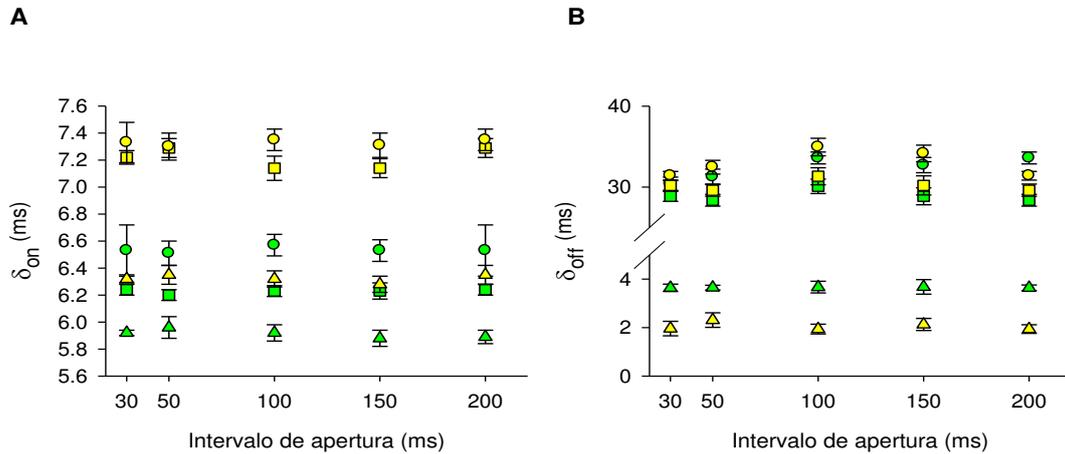
dañe el funcionamiento de las válvulas, el panorama es más desalentador, dado que la disminución de la amplitud del comando conlleva a incrementar el tiempo de activación y consecuentemente a aumentar el ancho del pulso. Por ejemplo, para un comando de voltaje nominal para la válvula de diafragma el mínimo ancho del pulso que se podría lograr sería aproximadamente 1.5 ms. Pulsos aún más cortos pueden ser logrados empleando un arreglo de válvulas donde el inicio de la aplicación de la solución esté dado por la activación de una válvula y el final de la aplicación este dada por la activación de otra válvula. En este caso el ancho de la aplicación estará determinado por los tiempos de activación de cada válvula.



**Figura 1.3. Evaluación en voltaje de la velocidad de apertura y cierre de la válvula.** A) Evaluación de la velocidad en la apertura de la válvula. B) Respuesta de las válvulas al aumento de voltaje. Válvula de diafragma de 12V (negro), válvula de pellizco de 12V (rojo), válvula de pellizco de 24V (blanco). Todos los puntos son la media de 100 mediciones  $\pm$  desvío estándar.

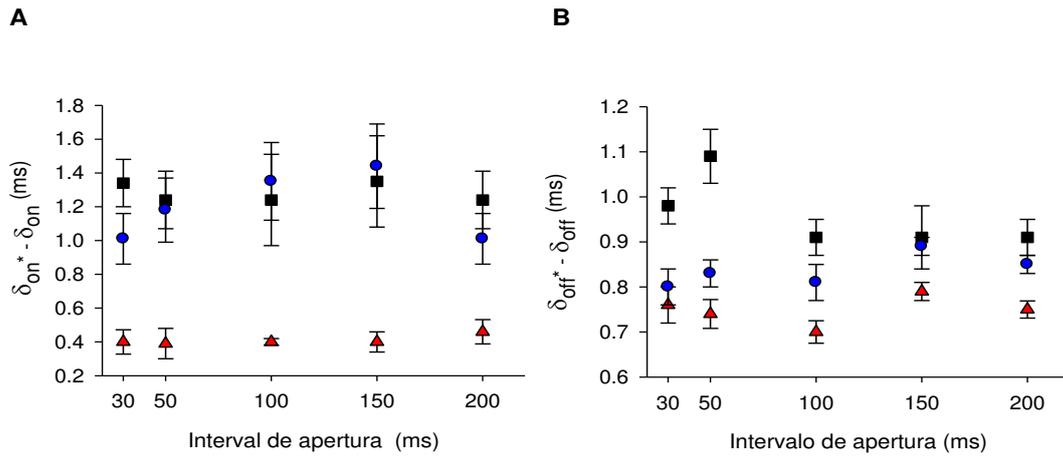
Dado que el pasaje de corriente por la bobina de las válvulas induce la generación de un campo electromagnético y a su vez magnetiza al émbolo ferromagnético, este puede tener influencia en el retardo de desactivación conforme se incrementa el tiempo que permanece magnetizado, aunque no debería tener efectos sobre el retardo de activación. Al evaluar los retardos en la activación, en un intervalo de tiempo de 30 a 200 ms, se observó que el tiempo que la válvula permanece activada no influye sobre el retardo (*figura 1.4 A*).

Contrariamente a lo esperado el retardo en la desactivación no se modificó con el incremento del tiempo de activación, mostrando que el tiempo que la válvula permanece activada no provoca un efecto adicional sobre la magnetización del émbolo inducida por el campo electromagnético (*figura 1.4 B*).



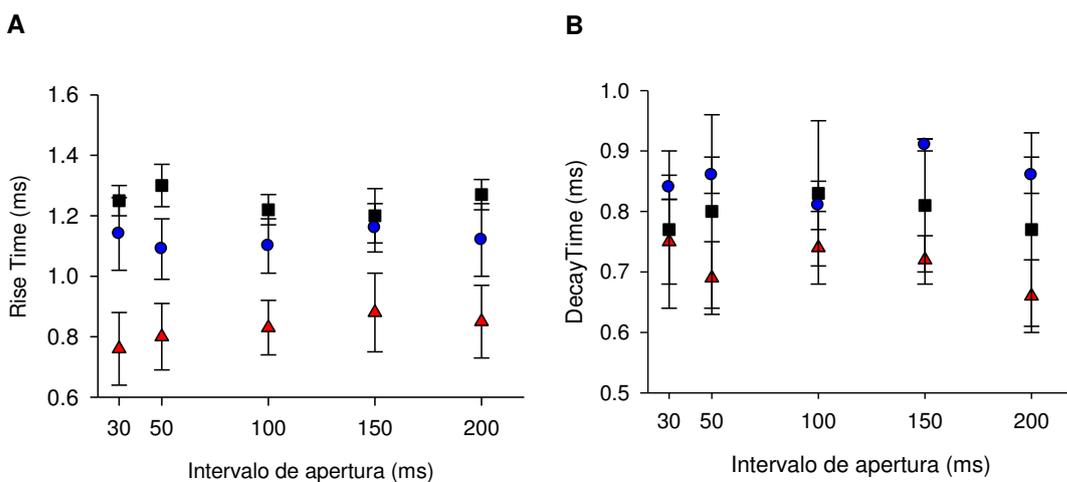
**Figura 1.4. Evolución de los retardos con el incremento en el tiempo de activación.** A) Evolución del retardo en la activación. B) Evolución de los retardos para la desactivación de las válvulas. Cada punto es la media de 100 repeticiones  $\pm$  la desviación estándar. Los retardos medidos figuran en verde mientras que los retardos estimados figuran en amarillo. Válvula de diafragma de 12V (círculo), válvula de pellizco de 12V (triángulo), válvula de pellizco de 24V (cuadrado).

En base a las mediciones de los retardos, resulta natural que el *método de la "señal del émbolo"* describe igualmente bien los retardos para cada tipo de válvula, tanto en la activación como en la desactivación (*figura 1.5*), dado que la diferencia entre los retardos medidos y estimados por el método permanecen constantes en el tiempo, tanto para la apertura como para el cierre de las válvulas.



**Figura 1.5. Exactitud del método de la señal del émbolo con el tiempo de activación.** A) Exactitud en el retardo de apertura. B) exactitud del retardo en el cierre de las válvulas. En todos los casos la exactitud es calculada como la diferencia entre el valor del retardo estimado a partir de la señal del émbolo y el valor medido a partir del voltaje nominal para cada válvula. Cada punto es la media de 100 repeticiones  $\pm$  desvío estándar. Válvula de diafragma (rojo), válvula de pellizco de 12 V (azul), válvula de pellizco de 24 V (negro).

Para terminar de analizar la influencia del tiempo que la válvula permanece activada sobre la magnetización del pistón ferromagnético, se midió la velocidad de apertura y cierre, aunque ningún efecto fue observado (*figura 1.6*). Todos estos resultados indicaron que los efectos descritos dependen de la magnitud del voltaje y no del tiempo que la válvula permanece activada.



**Figura 1.6. Relación entre el tiempo de activación y las velocidades de activación y desactivación.** A) Evaluación del tiempo de apertura con el aumento del tiempo que las válvulas permanecen activadas. B) Medición del tiempo de desactivación con el incremento de en el tiempo que las válvulas permanecen activadas. Cada punto es la media de 100

repeticiones  $\pm$  desvío estándar. Todas las medidas se realizaron a voltaje nominal Válvula de diafragma (rojo), válvula de pellizco de 12 V (azul), válvula de pellizco de 24 V (negro)

Con toda esta información disponible se procedió a fabricar un controlador de válvulas que permita activar las válvulas de manera de optimizar su rendimiento. De esta manera para activar las válvulas, el controlador dispara un comando de 1 ms del doble del voltaje nominal y sostiene su activación a un voltaje sub-umbral. Así se logra la máxima velocidad de activación sin riesgo de quemar la bobina, dado que el voltaje no es importante para el mecanismo de desactivación de la válvula.

## **DISCUSION.**

En este capítulo se propone un método simple para detectar aperturas y cierres de válvulas solenoide mediante la medición de la señal del émbolo. Con la señal de émbolo fue posible determinar el tiempo absoluto de apertura y cierre de las válvulas con un error sistemático en el rango de 0.4 - 1.15 ms y determinar los cambios relativos en el tiempo requerido para abrir y cerrar las válvulas en una serie de pruebas sucesivas con un error aleatorio en un rango de 0.02 - 0.16 ms. Además se analizó la posibilidad de obtener pulsos ultra-rápidos en base a las respuestas de las válvulas a comandos de distinta amplitud y distinto tiempo, llegando a establecer que voltajes muy elevados permiten obtener pulsos de 0.8 – 1.2 ms, por el accionar de una única válvula. y que esta situación empeora al trabajar a voltajes nominales (dependiendo el tipo de válvula empleada). Sin embargo un arreglo de distinta configuración puede emplearse para producir pulsos ultra-rápidos ya que los tiempos de activación fueron compatibles con la generación de dichos pulsos, (40 – 80  $\mu$ s para 100 V y 0.1 – 0.2 ms para 50 V). Concordantemente con el mecanismo de acción de las válvulas solenoides los tiempos de inactivación fueron mucho mayores a los de activación, debido a que esta última depende de la formación de un campo electromagnético que impulse al émbolo, mientras que la inactivación depende de la remoción de dicho campo y el retorno del émbolo a su posición de equilibrio mediante un sistema mecánico.

### **Razones para utilizar este método.**

El movimiento del émbolo ferromagnético de la válvula de solenoide provoca un cambio en el potencial eléctrico de la bobina que es proporcional a la velocidad del émbolo, como describe la ley Faraday [226]. Este cambio puede ser detectado mediante la colocación de una pequeña resistencia en serie con la válvula. De este modo, sólo se mide el potencial eléctrico resultante a través de ella contendría información acerca del movimiento del émbolo. Después de restar la respuesta inductiva de la bobina (determinada mediante la medición de la respuesta a una aplicación de voltaje sub-umbral), se determinó la respuesta de la bobina al movimiento del émbolo, es decir, la señal de émbolo. El movimiento del émbolo hacia el interior de la bobina apareció como una disminución transitoria en la señal de émbolo y el movimiento opuesto se tradujo en un aumento transitorio de la señal. Cambios similares en la corriente que circula por la bobina de la válvula fueron también evidentes después de hacer funcionar manualmente el émbolo de la válvula de pellizco mientras se aplica potencial de voltaje cero a la bobina. El método propuesto utiliza el tiempo cuando la señal de émbolo alcanza los valores mínimo y / o máximos como aproximaciones a los tiempos de apertura y cierre de la válvula.

### **Válvulas de pellizco o de diafragma?**

Válvulas de pellizco son ampliamente utilizadas debido a que sus componentes internos no entran en contacto con la solución que circula por el sistema de perfusión. Si existe la preocupación sobre una posible contaminación, es fácil cambiar el tubo elástico. Las válvulas de diafragma, por otro lado, disponen de partes internas que necesariamente entrar en contacto con la solución; cuidados adicionales tiene que ser tomados para evitar la acumulación de cristales de sal o de cualquier tipo de contaminación entre las partes internas de este tipo de válvulas. Las válvulas de diafragma tiene la ventaja de que cuentan con un retraso de cierre mucho más corto,

con una variabilidad mucho menor entre las repeticiones. Las válvulas solenoide de diafragma utilizan un mecanismo de amplificación del diafragma que no está presente en válvulas de pellizco, que exhiben una mayor potencia consumo.

### **Posibles áreas donde aplicaciones donde la señal de émbolo es potencialmente útil.**

Las válvulas son un componente esencial de los sistemas de perfusión de solución y, como tal, cualquier mejora de su rendimiento tiene el potencial para ser útil en muchos contextos, aunque no todos ellos requieren resoluciones en la escala de milisegundos. Se identificaron tres contextos ilustrativos en los que esta señal de émbolo podría ser de interés.

La señal de émbolo puede ser utilizado para la detección de fallos. Las válvulas de pellizco en ocasiones fallan en su apertura o en el cierre, y estas fallas pueden ser detectadas por la ausencia de uno o ambos picos en la señal de émbolo. La detección de la falta es especialmente útil cuando la falta de respuesta de la preparación ante la señal constituye un dato experimental-por ejemplo, en condiciones de respuesta umbral. Otra aplicación posible está dada por la prevención del mezclado de soluciones que se produce después del intercambio de solución que fluyen consecutivamente por una misma cánula cuando la válvula de pellizco es activada. Las válvulas de pellizco presentan retrasos asimétricos para la apertura y el cierre: se abren mucho más rápido de lo que se pueden cerrar. Por lo tanto, si se envía al mismo tiempo el comando para cerrar una válvula y abrir otra, la segunda solución comenzará a fluir desde la válvula que se abre antes de la otra válvula se cierra realmente. Por lo tanto, la solución fluirá desde ambas válvulas para el tiempo que el retardo de cierre supera el tiempo de apertura (30-40ms en las condiciones que se utilizan). Que la mezcla de la solución sea inofensiva, molesta o problemática dependerá del caso en particular. Este problema puede ser prevenido ya sea mediante el uso de válvulas solenoides de diafragma (que se muestran casi simétrica retrasos) o mediante la medición de la diferencia entre los retrasos de la apertura y el cierre utilizando la señal

de émbolo y teniendo esa información en cuenta al diseñar los protocolos de intercambio de soluciones.

Un tercer contexto implica el uso de válvulas de pellizco para aplicaciones ultra-rápidas en la configuración outside-out patch clamp [220, 222, 227, 228]. Es por esta aplicación especial que el *método de la "señal del émbolo"* puede ser especialmente valioso. En tal escenario, dos tubos están dispuestos a 20-50°, cerca de la pipeta de patch [222, 229]. Una única válvula de restricción se utiliza para activar el flujo en un tubo mientras simultáneamente se produce la desactivación de la otra válvula que controla el flujo por el otro tubo. La señal de émbolo puede ser muy útil para acelerar la optimización de la válvula. Los cursos temporales de aplicaciones son usualmente evaluados para destruir el parche al final de un experimento, sin mover la pipeta [228]. Sin embargo, el momento exacto en el que se produce el intercambio de las soluciones durante cada ensayo varía con la incertidumbre intrínseca de la constante temporal de la válvula de pellizco (0,5 - 2.4 ms para el cierre). Por registro simultáneo de la señal de émbolo, debería ser posible para corregir esta variabilidad y en consecuencia para disminuir el incertidumbre de la temporización del intercambio soluciones por un factor de mayor a 10 (de 0,5 - 2.4 ms a 0.04 - 0.12 ms, en el caso del cierre de la válvula), y así aumentar la resolución temporal del análisis cinético

## Capítulo 2

# ***”Desarrollo de aplicaciones ultra-rápidas sobre preparaciones de patch”***

### **INTRODUCCIÓN.**

El estudio cinético de la activación de canales iónicos por el ligando depende de la habilidad para aplicar el mismo sobre una preparación adecuada durante un lapso de tiempo breve y definido. En este campo las aplicaciones cortas de agonistas se utilizan para la determinación cinética de cambios conformacionales previos a la apertura del canal [204, 227, 230]; estos cambios conformacionales están relacionados con el mecanismo de activación [231, 232] y la separación de los pasos de unión y apertura [206, 215, 231] . Muchos son los métodos que se han diseñado para lograr aplicaciones cortas del agonista, entre los que se encuentran técnicas de foto-liberación y técnicas hidráulicas, aunque estas técnicas presentan limitaciones importantes. Por un lado la foto-liberación tiene tiempos de liberación muy rápidos,

pero requiere la síntesis de compuestos que pueden resultar tóxicos para el patch. Además la concentración del agonista durante el pulso depende de múltiples factores. Del mismo modo, el fin del pulso depende de la remoción del ligando de las inmediaciones del canal iónico, con una constante temporal mucho más lenta que la de la liberación [233, 234]. En cambio, las técnicas hidráulicas no requieren de la síntesis de compuestos especiales y la concentración de agonista que llega al patch puede ser determinada mediante experimentos de control bien definidos. Estas técnicas se basan en el movimiento sobre la preparación de una delgada interfase líquido-líquido, generada entre dos jets de soluciones que fluyen muy próximas entre sí. Dos mecanismos son utilizados para generar el movimiento de la interfase. Uno se basa en la interrupción abrupta de uno de los jets, para lo cual se emplea una válvula solenoide (ver capítulo anterior) el otro procedimiento se basa en el desplazamiento de ambos jets, usando generalmente un piezo eléctrico [235, 236] o un motor a pasos [237]. Estos dispositivos intercambiadores tienen tiempos de subida cercanos a los de la foto-liberación.

Las condiciones necesarias para obtener aplicaciones ultra cortas de agonista sobre una preparación de outside-out patch clamp fueron analizadas por Fred Sachs [238]. En este trabajo, Sachs propuso que algunas variables determinan ciertos límites prácticos respecto de cuán rápido puede intercambiarse soluciones sobre una preparación de patch. El caso analizado por Sachs emplea un sistema de perfusión en cuyo extremo hay una pipeta de aplicación tabicada (pipeta theta), donde la interfase que forman los jets que fluyen a partir de la pipeta de perfusión, es movida sobre el patch, alternando entre ambas soluciones. Así los factores relevantes que controlan la velocidad de respuesta son la velocidad del flujo de las soluciones, la proximidad del patch a la pipeta de aplicación, la velocidad de desplazamiento lateral con que los jets de solución cruzan la posición del patch, el ancho de la partición entre los jets de soluciones y la viscosidad de las soluciones. De todos estos factores, tiene gran importancia la velocidad del movimiento del elemento motor (generalmente un piezoeléctrico) que traslada a los jets de soluciones a través del patch que es proporcionalmente similar a la velocidad con la que la interfase entre las soluciones se mueve sobre el patch.

En el estado de arte, estos dispositivos logran aplicaciones de 200  $\mu$ s [204] o 400  $\mu$ s [239]. Los dispositivos disponibles comercialmente pueden generar pulsos tan breves como 1ms. Estos pulsos son demasiado largos para estudiar cinéticas muy importantes como las de los receptores de acetilcolina (AChR) [90, 91, 240-243], que tienen una constante de apertura de 100  $\mu$ s, la de los receptores ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) [233, 234, 244], que dependiendo del subtipo tienen constantes de apertura de 12-100  $\mu$ s [233, 234]. Por otra parte pulsos de esa duración (1 ms) tampoco permiten discriminar estados parciales de activación (Flip State,[215] cita), en receptores que se activan con una cinética más lenta, como es el caso de los receptores purinérgicos de la familia P2X [204].

En este capítulo y en el siguiente se describen los pasos que se siguieron en pos de obtener pulsos ultrarrápidos ( $\sim$ 20  $\mu$ s). En primer lugar se describió la estructura de la interfase entre jets de solución y se procuró lograr que la misma sea compatible con la generación de dichos pulsos. Luego se muestra un procedimiento que permite generar aplicaciones ultra-rápidas y se demuestra la importancia de medir el movimiento de la interfase para obtener los mismos.

## **METODOLOGIA Y RESULTADOS**

### **Armado de un dispositivo de patch clamp con un sistema ultra-rápido de intercambio de soluciones.**

Para realizar los experimentos fue necesario armar un setup de patch clamp adaptado a la generación de pulsos ultra-rápidos. El setup consta de 1) un sistema antivibratorio, 2) un sistema de neumático de perfusión, 3) un sistema ultrarrápido de intercambio de soluciones, 4) un sistema de microscopía y 5) un sistema de registro electrofisiológico.

El sistema antivibratorio consta de una mesa óptica apoyada sobre una mesa antivibratoria.

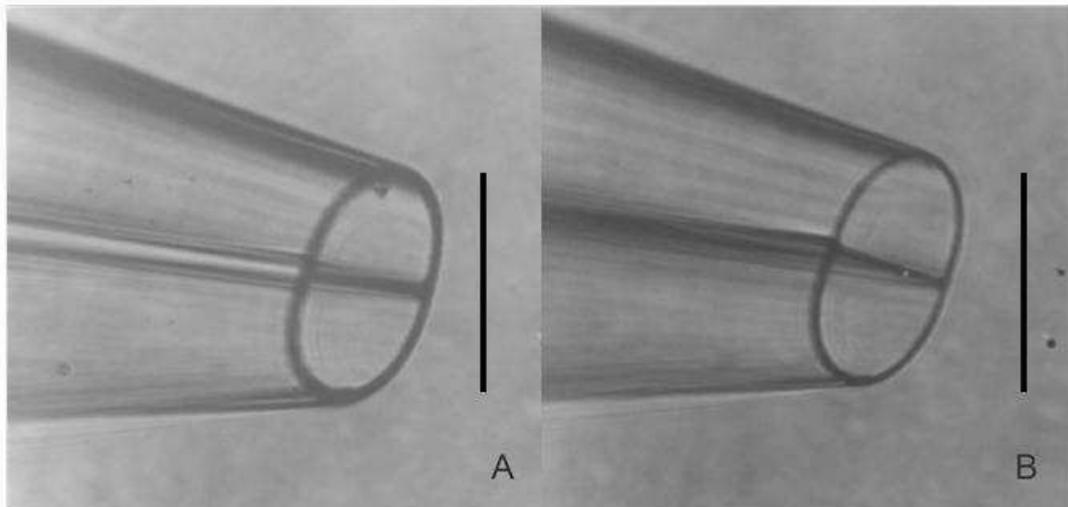
El sistema de intercambio ultrarrápido de soluciones consta de a) un posicionador micrométrico manual XYZ al que se le adosó un b) piezoeléctrico sobre el que se fija c) un cabezal que soporta la pipeta de perfusión. El sistema de registro electrofisiológico consta de a) una pipeta de registro sostenida por b) un cabezal de patch clamp adosado a b) un posicionador motorizado XYZ al cual se le adaptó c) un goniómetro que permite medir el ángulo de incidencia de la pipeta de registro respecto de la superficie. El cabezal de patch está conectado a d) un amplificador de patch clamp conectado a e) un conversor analógico digital.

El sistema de microscopía consta de un microscopio invertido con iluminación por transmisión y epifluorescencia a base de LEDs ultra brillantes y una cámara web interfaceada con la computadora y comandada desde el programa Setup commander 3.1 (*Apéndice A*)

El sistema neumático de perfusión de soluciones cuenta con un rack de válvulas solenoides de pellizco (pinch valves) que permiten alternar las soluciones que fluyen por las cánulas desde los reservorios hacia la pipeta de perfusión. Además cuenta con un soporte de aluminio que sostiene dos pares de jeringas capaces de soportar una presión de  $20 \text{ kg/cm}^3$ . Las jeringas de la parte inferior son cargadas con las soluciones que fluirán por el sistema y las de la parte superior están conectadas al sistema de inyección de nitrógeno. Ambas se ubicaron con los émbolos contrapuestos y se abrió el sistema de inyección de nitrógeno hasta alcanzar la presión de trabajo deseada. El sistema de nitrógeno consta de un tanque maestro cargado a  $200 \text{ kg/cm}^3$  con una válvula reductora de presión (Solbron) conectada a un tubo que se carga con una presión aproximada de  $5 \text{ kg/cm}^3$ , con el que se lleva a la presión deseada a un último tubo que mantiene constante la presión inyectada en el sistema. Este sistema permite generar una presión constante sin utilizar para ello una válvula reguladora, de este modo se evita la presencia de los picos de presión, inherentes al funcionamiento de toda válvula reguladora los cuales podrían resultar en picos en la velocidad de la solución que abandonan la pipeta de perfusión. Este último tubo se conecta a un distribuidor que lleva la misma presión a todas las jeringas. La presión es monitoreada permanentemente con un par de sensores electrónicos. Así, una vez equilibrada la presión de trabajo, las soluciones empezaron a fluir por el sistema a través de cánulas

de polietileno PE 50, que se conectaron a cánulas de silicona, de 2 mm de diámetro interno, las que fueron o no comprimidas por las válvulas solenoides. Las cánulas de silicona se conectan a su vez a otra sección de cánulas de polietileno y estas a su vez a conectores múltiples fabricados con cánulas de silicona de paredes gruesas. Los conectores múltiples se conectan a una cánula de teflón que es insertada en cada uno de los puertos de la pipeta de perfusión.

Las pipetas de perfusión se estiraron a partir de capilares theta de borosilicato (BT 150-10, Sutter Instruments, Novato, CA), en un puller horizontal (P-97, Sutter Instruments). La pipeta fue estirada con una temperatura igual a la temperatura de rampa, una velocidad de 10 y sin estiramiento. El diámetro de la punta recién estirada es de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  y con las paredes en ángulo de 15°. La punta de la pipeta es llevada a un diámetro de 90-110  $\mu\text{m}$  puliéndolas con una lija de diamante de 6;-3 y/o-1 micras (LFGxD, Thorlabs, Newton, NJ). Luego de llevar las pipetas a su diámetro final se las limpia sumergiendo la punta en una solución de  $\text{KMnO}_4$  0.1 M y  $\text{NaOH}$  2.5 mM durante 1 h y luego brevemente en una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  7.5/ en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2.5 mM. La oxidación del peróxido de hidrogeno por el permanganato es exotérmica y termina por eliminar cualquier rastro de materia orgánica en la pipeta. Cuando las pipetas estuvieron totalmente limpias fueron fotografiadas bajo el microscopio (*figura 2.1*) y el ancho del septum fue medido. Para ello se construyó una escala a partir de fotografías de una cámara de Neubauer tomadas en las mismas condiciones. En el paso siguiente las pipetas fueron sumergidas en una solución de HF 10/ en EtOH absoluto para reducir el espesor del septum. Experimentalmente se determinó que esta solución degrada el vidrio controladamente, a razón de 0.3  $\mu\text{m}/\text{min}$ , mucho más suave que distintas diluciones de HF en agua. De esta manera se calculó el tiempo para llegar a un ancho del septum de 2-4 micrómetros. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavó la pipeta cinco veces con agua. Y se fotografió bajo el microscopio con un aumento total de 50x para determinar el ancho real del septum y la integridad de la pipeta. En todos los casos el análisis de las imágenes de las diferentes etapas de producción se realizó con el programa Image J



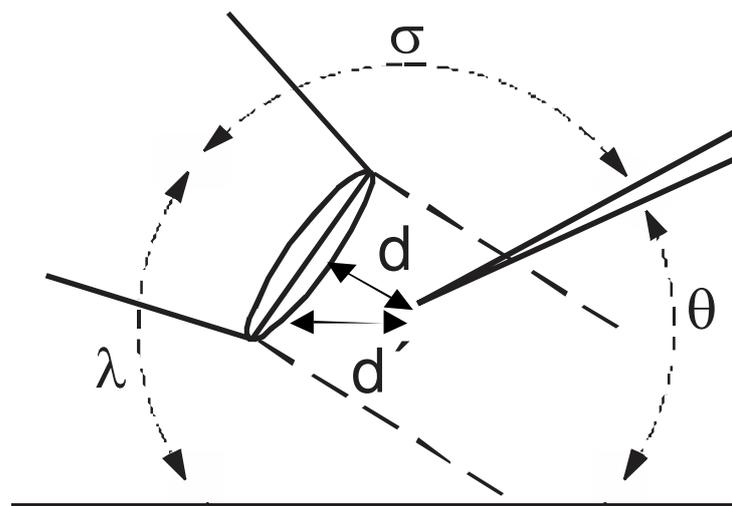
**Figura 2.1. Tratamiento con HF 10%.** Micrografías de la pipeta de perfusión antes (A) y después (B) del tratamiento con HF 10% en EtOH absoluto. Las barras verticales representan una longitud de 100  $\mu\text{m}$ . Aumento 50x.

### **Relación entre variables dependientes del sistema de perfusión de soluciones.**

En esta sección se analiza la relación entre las variables que limitan el intercambio ultra rápido de soluciones, dependientes del sistema de perfusión. Las variables que dependen de otros factores, como las inducidas por el piezo eléctrico serán analizadas posteriormente.

Como primera aproximación al entendimiento de los fenómenos que ocurren en la interfase entre las soluciones que fluyen desde los puertos de la pipeta de perfusión, se determinó el ancho de dicha interfase. Para realizar esta medición fue necesario posicionar las pipetas como muestra la *figura 2.2*, donde las pipetas de registro y de perfusión fueron colocadas, con respecto a la superficie, a  $35^\circ$  y  $40^\circ$  respectivamente, de manera que el ángulo entre las pipetas fuese de  $105^\circ$ . Este ángulo fue elegido con el fin de minimizar los efectos difusivos sobre la punta de la pipeta de registro. La distancia entre las pipetas fue basada en el radio de la pipeta de aplicación. Así la distancia inicial elegida fue  $0.5 R$  ( $R$  es el radio de la pipeta de aplicación,  $0.5R$  son aproximadamente  $20 - 25 \mu\text{m}$ ) y la pipeta de registro fue posicionada en el centro del plano perpendicular a la dirección de las soluciones que fluyen desde la pipeta de perfusión y que pasa por ese punto. Los datos fueron adquiridos empleando un

amplificador de patch clamp (2400, A-M Systems, Sequim, WA), con un ancho de banda de 80 KHz. Las salidas del amplificador fueron conectadas a una placa multifunción (NI USB 6259, National Instruments, Austin, TX) y esta placa a su vez fue conectada a una computadora. El software empleado para el control de la adquisición como para el control de todos los componentes que interactúan en cada uno de los experimentos fue diseñado específicamente para cada caso con Labview 8.5. (Apéndice A). La medición de la interfase se realizó registrando el potencial de juntura entre las soluciones que fluyen de la pipeta de perfusión. Los movimientos de la interfase sobre la pipeta de registro fueron realizados comandando el desplazamiento del piezoeléctrico con un amplificador de 50 KHz y 30 A, empleando un amplificador operacional (PAD115, PowerAmp Design, Tucson AR),, que mueve la pipeta de perfusión y por ende la interfase, con una función triangular generada por el programa *T\_F* (Apendice) Así se realizaron intercambios entre las soluciones externa 100% (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH= 7.2) y una dilución de la misma solución al 10% , mientras que la solución del baño también fue externa 100% . Los registros fueron normalizados y ajustados a una función error. Se calculó el ancho de la interfase definido como la distancia entre los puntos que correspondientes al 5 - 95% del cambio entre las soluciones.



**Figura 2.2. Posicionamiento de las pipetas.** El esquema muestra a la pipeta de aplicación con un tabique central (septum) que separa los dos canales de aplicación. También muestra a la pipeta de registro.  $\lambda$  es el ángulo entre la pipeta de aplicación y la superficie,  $\sigma$  es el ángulo entre las pipetas ( $110^\circ$ ),  $\theta$  es el ángulo entre la pipeta de registro y la superficie,  $d$  es la distancia real y  $d'$  es la distancia aparente

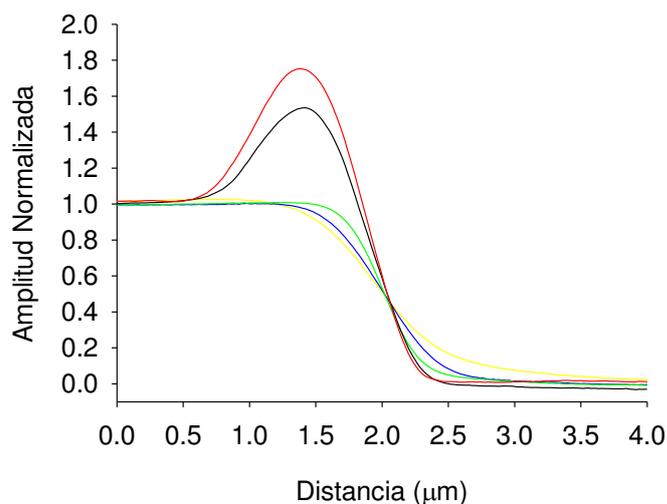
La *tabla 2.1* muestra los valores obtenidos para el ancho de la interfase, a partir de los promedios de 200 ajustes para distintas velocidades de los flujos. En cada uno de los casos las velocidades fueron seleccionadas modificando la presión de nitrógeno que impulsa los pistones neumáticos de inyección de soluciones. Como lo indica la intuición el aumento en la velocidad conduce a una disminución en el grosor de la interface (tabla 2.1 Septum 10  $\mu\text{m}$ ), ya que los flujos colisionan con un ángulo aproximado de 15°, Como es natural pensar, mientras más angosta sea la interface menor tiempo requerirá atravesarla. Por tal motivo se intentó obtener pulsos ultrarápidos (ver más adelante) empleando la mayor velocidad.

Velocidad (cm/s)	Septum grueso (10 $\mu\text{m}$ )	Septum fino (3 $\mu\text{m}$ )
100	0.680 $\pm$ 0.014	0.663 $\pm$ 0.051
200	0.555 $\pm$ 0.040	0.591 $\pm$ 0.053
400	0.403 $\pm$ 0.011	0.349 $\pm$ 0.021
600	0.324 $\pm$ 0.007	0.352 $\pm$ 0.012
800	0.186 $\pm$ 0.008	0.339 $\pm$ 0.022

**Tabla 2.1. Medición del ancho de la interface.** Se muestra la medición en micrómetros del ancho de la interface entre las soluciones que salen de la pipeta de aplicación para velocidades del fluido en el rango de 100-800 cm/s, a una distancia de separación entre las pipetas de 25  $\mu\text{m}$  (0.5 R), para dos anchos de septum diferentes, producto del tratamiento de la punta de la pipeta con HF 10% en etanol absoluto. Los valores corresponden a las medias de 200 ajustes  $\pm$  SD.

Contrariamente a lo esperado, los experimentos en estas condiciones fueron muy dificultosos y rara vez se logró obtener algún resultado alentador. Por ende surgieron dos hipótesis, por un lado podría haber alguna variable que afecte la estabilidad de la interface y que no haya sido claramente establecida. Por otra parte podría haber un efecto de distorsión de la interface producido por la pipeta de

aplicación. Para comenzar a investigar la veracidad de estas hipótesis, se investigó que pasaba con la forma de la interfase. Para esto se registró el potencial de juntura de la interfase en el punto medial del plano transversal manteniendo constante la distancia “d” de separación entre las pipetas. Aunque esta vez la estrategia experimental fue similar a la aplicada anteriormente, se hicieron fluir solución externa al 30/ y al 10/ mientras que se mantuvo en el baño la solución externa de 100/. Así se pudo determinar que a velocidades mayores a 400 cm/s hay un doble ajuste a la función error (figura 2.3). Este fenómeno puede deberse a una contaminación con la solución del baño, donde el primer ajuste a la función error se da entre la solución externa al 10/ con la del baño y el segundo ajuste se da entre la solución del baño y la solución externa al 30/.



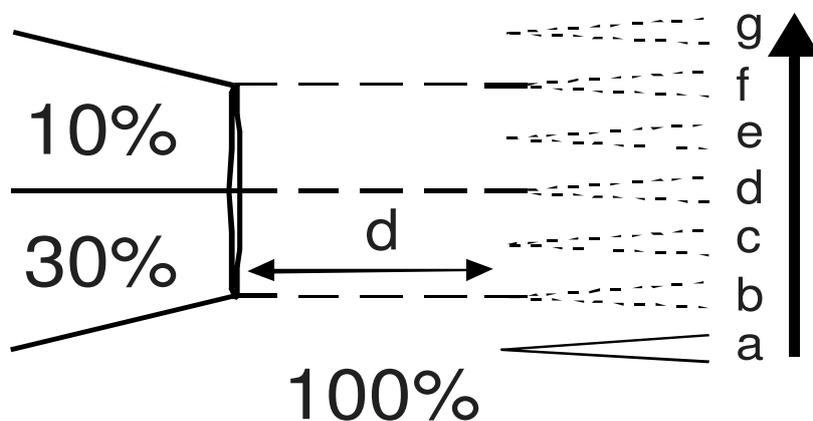
**Figura 2.3. Ajuste de la interfase a una función error.** El ajuste para distintas velocidades de los flujos entre soluciones externas al 10/ y al 30/ con la solución del baño al 100/. Cada uno de los trazos representa la media de 200 ajustes. La distancia entre las pipetas fue fijada en 0.5 R (25 µm, aproximadamente). En amarillo 100 cm/s, en azul 200 cm/s, en verde 400 cm/s, en negro 600 cm/s y en rojo 800 cm/s.

Lógicamente cuando la solución del baño fue la misma que una de las dos soluciones que fluyo por la pipeta de aplicación, este fenómeno quedó enmascarado y el ancho de la interface fue subestimado. Para descartar que el efecto observado fuese debido a una

distorsión de la interface producida por la pipeta de registro, se modificó el ángulo entre las pipetas a  $90^\circ$  y se observó el mismo fenómeno.

Como el ancho de la interface está determinado no solo por la velocidad de las soluciones que conforman la interface, sino también por el ancho del septum que separa los dos canales de la pipeta de aplicación, reducir su espesor puede conducir a solucionar esta presunta contaminación.

Para corroborar esta posibilidad se puso a punto una hidrolisis con ácido fluorhídrico al 10% en etanol absoluto como se comentó previamente. En esas condiciones la hidrolisis resultó mucho más controlada que la misma dilución en agua o que con HF 40%, además tuvo una tasa de  $0.3 \mu\text{m}/\text{min}$ . La *figura 2.4* muestra la estrategia experimental que fue empleada en este caso. A diferencia de los casos anteriores, estos experimentos fueron realizados registrando el potencial de juntura entre las soluciones, pero esta vez se desplazó la pipeta de registro a una velocidad constante de  $400 \mu\text{m}/\text{s}$ , a través de las soluciones siguiendo la trayectoria horizontal que pasa por el punto medial del plano transversal a la distancia "d" (*figura 2.4 a-g*).

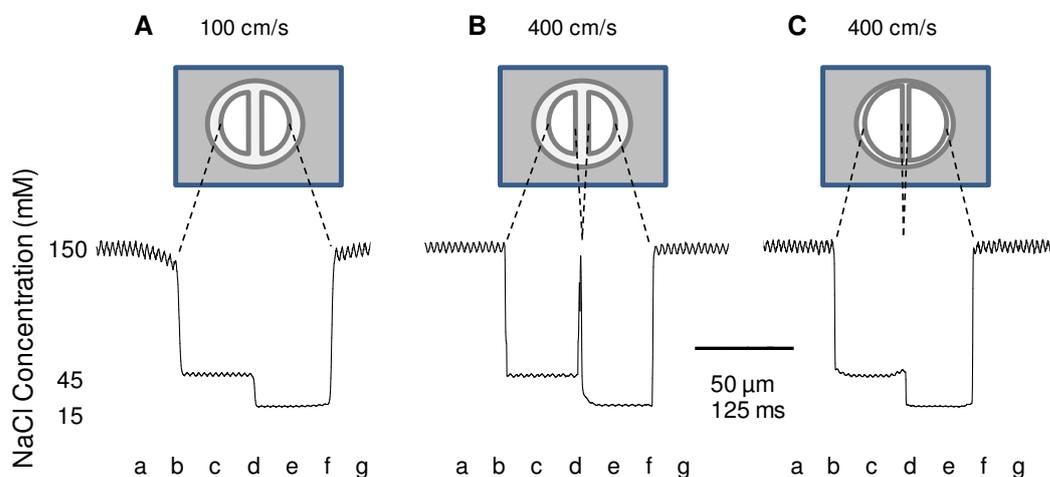


**Figura 2.4. Esquema experimental.** Vista superior del experimento para determinar si existe contaminación de la interfase. 100% solución externa (150 mM NaCl), 30 y 10 % diluciones de la solución externa. "d" distancia entre las pipetas. Puntos "a-g" donde el potencial de juntura tiene distintos valores acorde a las soluciones presentes.

Luego de realizar la hidrolisis del septum de la pipeta se evaluó nuevamente el perfil de potenciales de juntura en la misma posición anterior (mitad del plano que

pasa por 0.5 R de distancia entre las pipetas). La *figura 2.5* muestra los registros en estos puntos del plano para septum grueso (10  $\mu\text{m}$ ) a velocidad de los fluidos de 100 cm/s, a otra de 400 cm/s y por último manteniendo la velocidad pero para el septum más delgado (3  $\mu\text{m}$ ). En los registros del potencial de juntura, los puntos *a* y *g* correspondían al potencial de la solución externa al 100/ (150 mM NaCl), mientras que los puntos *c* y *e* corresponden a las soluciones de 30/ y al 10/ respectivamente. El punto *b* representa la interfase entre la solución del baño y la solución al 30/ Por otra parte las interfase entre la solución al 10/ y la solución del baño es representada por el punto *f*. La interface entre las soluciones que fluyen desde la pipeta está representada por el punto *d*.

Cuando la velocidad de las soluciones fue de 100 cm/s la transición entre soluciones que fluyen de la pipeta de perfusión fue directa, mostrando que el gradiente de concentración de la interfase está formado por las dos soluciones (*figura 2.5 A*).



**Figura 2.5. Relación del ancho del septum con la velocidad de los fluidos.** La figura muestra la punta de la pipeta de aplicación y los registros del potencial de juntura expresados como concentración de cloruro de sodio de cada una de las soluciones externas empleadas. Los registros fueron realizados a altura media de los fluidos y la separación entre las pipetas fue de 0.5 R. los puntos a-g se corresponden con los de la figura 2.3.

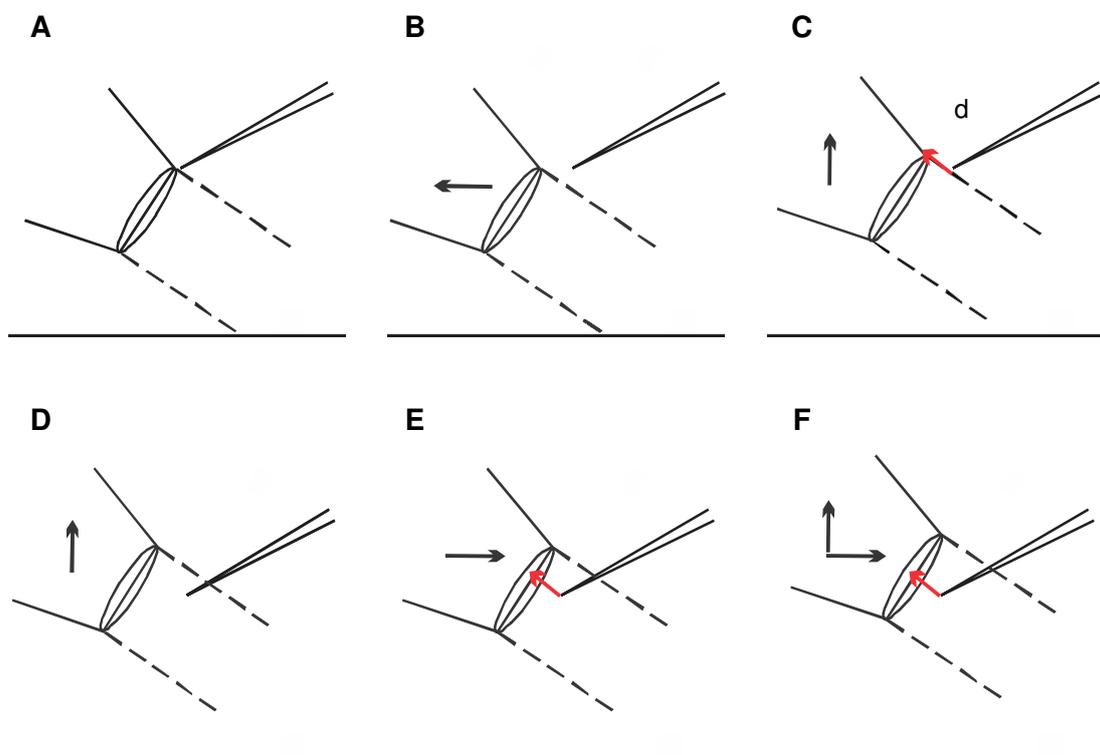
Al subir la velocidad a 400 cm/s la interfase entre las soluciones al 30/ y al 10/ mostro un pico con un potencial comparable a la solución del baño (100/ ) (*figura 2.5 B*), marcando que el gradiente de concentraciones se establece entre las tres soluciones y el ajuste a la doble exponencial, mostrado anteriormente (*figura 2.3*), hace referencia a una doble interfase entre las soluciones al 30/ y al 100/ y las soluciones al 100/ y al 10/ , corroborando la hipótesis de la contaminación de la interfase. Cuando la pipeta de aplicación fue tratada con HF 10/ y la velocidad se mantuvo en 400 cm/s, la interfase recobro su estado anterior (*figura 2.5 C*). De esta manera y contrariamente a lo pensado al comienzo de los experimentos, se confirmó que a medida que aumenta la velocidad de los fluidos, la interface incrementa su grosor. Este efecto puede ser contrarrestado tratando la punta de la pipeta de perfusión con HF 10/ . Por último se midió el ancho de la interface con un septum de 3  $\mu\text{m}$  (*tabla 2.1 Septum fino*) en las mismas condiciones que se comentaron anteriormente. Así se determinó que las pipetas de perfusión con un septum de 3  $\mu\text{m}$ , a 400 cm/s o velocidades mayores producen una interfase con un ancho mínimo de 0.3  $\mu\text{m}$ .

### **Medición sistemática de la interfase.**

Teniendo en cuenta que los efectos de contaminación de la interfase que se describen en la sección anterior, fueron medidos a en el punto medio del plano transversal a los fluidos ubicado a la distancia “*d*”, el siguiente paso fue realizar un estudio sistemático del comportamiento de la interfase a través de todo el plano transversal, tomando registros del potencial de juntura, escalonados a 10  $\mu\text{m}$  a lo largo del plano. También se estudió el comportamiento de los fluidos a lo largo del plano transversal ubicado a distintas distancias. Para una mayor visualización del efecto de contaminación de la interfase se tomó el mismo esquema de soluciones que el que se empleó anteriormente (*figura 2.4*). La *figura 2.6* muestra el sistema utilizado para posicionar las pipetas en distintos planos transversales ubicados a una distancia “*d*” (flecha roja) y en distintas posiciones dentro del mismo plano (*figura 2.6 F*). En el primer paso se posicionó ópticamente la pipeta de registro lo más próximo posible al

extremo superior de la pipeta de perfusión. Este paso se completa con el registro del potencial de juntura para corroborar que la pipeta de registro se encuentre inmediatamente por encima de los flujos que sale de la pipeta de aplicación.

Se tomó como posición inicial, la posición del primer registro cuyo potencial corresponde al de la solución del baño (*figura 2.6 A*). El siguiente paso fue buscar la distancia “*d*” entre las pipetas a la que se deseó realizar el registro del potencial de juntura (flecha roja).



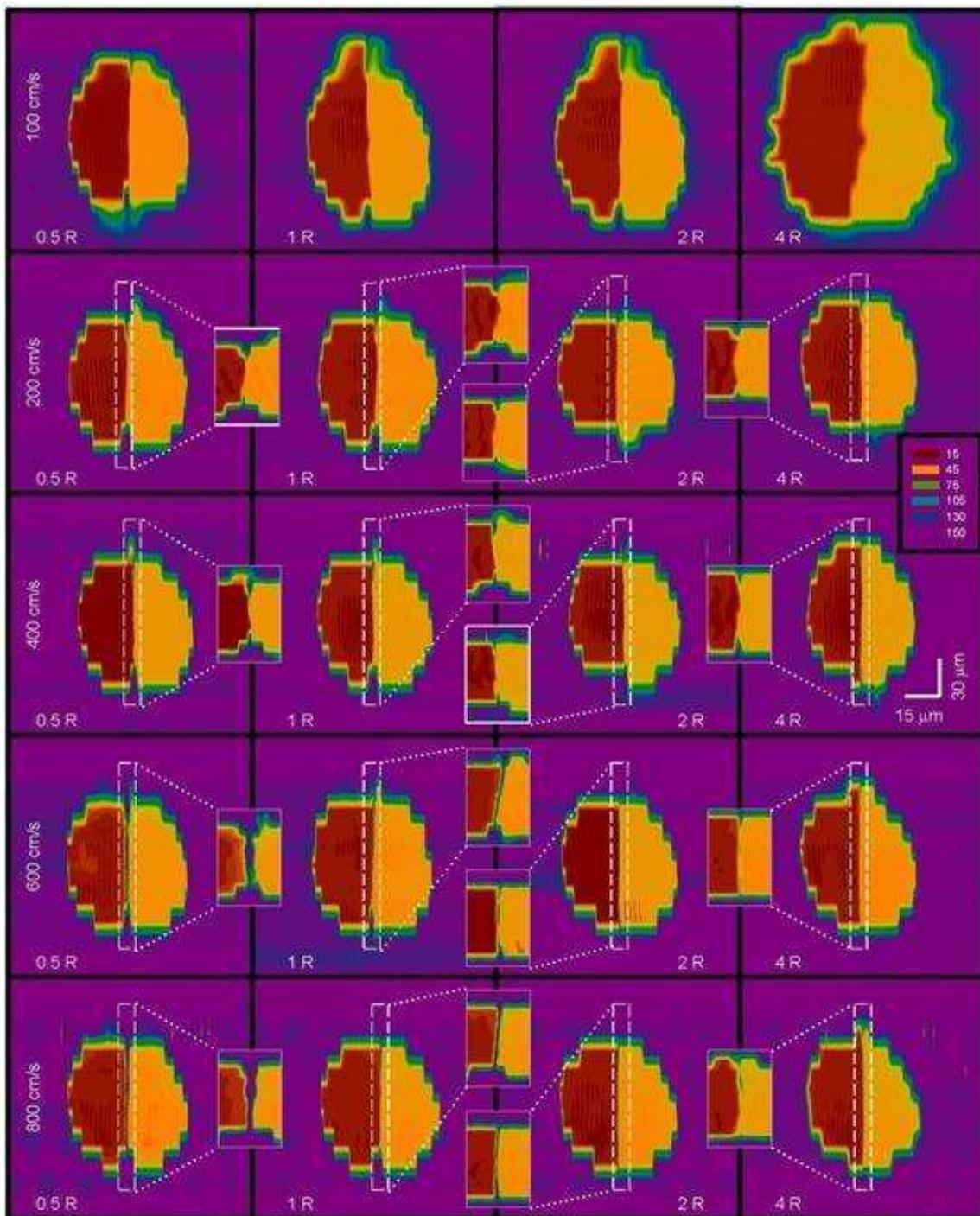
**Figura 2.6. Posicionamiento de las pipetas en el plano transversal de las soluciones.** Se muestran las pipetas en cuadros sucesivos (A-E) que resumen el sistema empleado para seleccionar el plano transversal al flujo de las soluciones (línea punteada) ubicado a una distancia “*d*” de la pipeta de perfusión (flecha roja). F) posicionamiento en el punto medial del plano producido por un salto de 10  $\mu\text{m}$  a partir de E. Las flechas negras representan los movimientos realizados con la pipeta de aplicación

Para esto se desplazó la pipeta de perfusión hacia atrás y hacia arriba (*figura 2.6 B-C*) tantos micrómetros como sea necesario según el cálculo con la distancia aparente (*figura 2.2 “*d*”*). En este punto la pipeta de registro está inmediatamente por

encima de las soluciones pero separada efectivamente una distancia “d” de la punta superior de la pipeta de perfusión. Nuevamente se realizó un registro del potencial de juntura para corroborar que la pipeta de registro esta por fuera de los flujos. Para realizar el mapeo transversal de las soluciones manteniendo constante la distancia que separan a las pipetas, fue necesario desplazar hacia arriba la pipeta de perfusión (*figura 2.6 D*) una cantidad de micrómetros determinada y luego desplazarla hacia adelante (*figura 2.6 E*). Nuevamente la cantidad de micrómetros de desplazamiento en ambos sentidos es calculada a partir de la distancia aparente de modo de producir un salto de  $10\ \mu\text{m}$ . Así se conserva el mismo plano transversal pero se produjo un salto de posición en la profundidad del plano. Como antes, se realizó un registro del potencial de juntura en esta posición. En este caso el potencial correspondió al de las dos soluciones que salen de la pipeta de perfusión. Los saltos de posición con el registro del potencial correspondientes se repitieron sucesivamente hasta llegar a la posición final donde el registro del potencial de juntura correspondió otra vez al potencial de la solución del baño (*figura 2.6 F*).

El estudio sistemático del comportamiento de la interfase a través de todo el plano transversal, para pipetas de perfusión con septum de  $10\ \mu\text{m}$ , se realizó empleando distintas velocidades de los flujos que variaron de 100 a 800 cm/s y se tomaron cuatro planos transversales separados a distintas distancias (0.5, 1, 2 y 4 R), siempre expresados como radios de la pipeta de perfusión (*figura 2.7 primera fila*). Cuando la velocidad empleada fue de 100 cm/s se vio un efecto difusivo y que este aumenta con la distancia entre las pipetas. Un detalle particular se distinguió sobre la superficie de la interfase. En esta región no hay un continuo entre las soluciones que fluyen desde la pipeta y la interface está en contacto con la solución del baño. Este detalle particular, presumiblemente generado por la forma semicurva que toma el septum al unirse a las paredes de la pipeta de perfusión, puede explicar la aparición de solución del baño en la interface a velocidades mayores. Si esta idea era cierta debería verse que a medida que se aumenta la velocidad de las soluciones mayor debería ser la penetración de la solución del baño en la interfase. Al aumentar la velocidad de los flujos a 200 cm/s se vio que el efecto de la difusión disminuyo considerablemente y

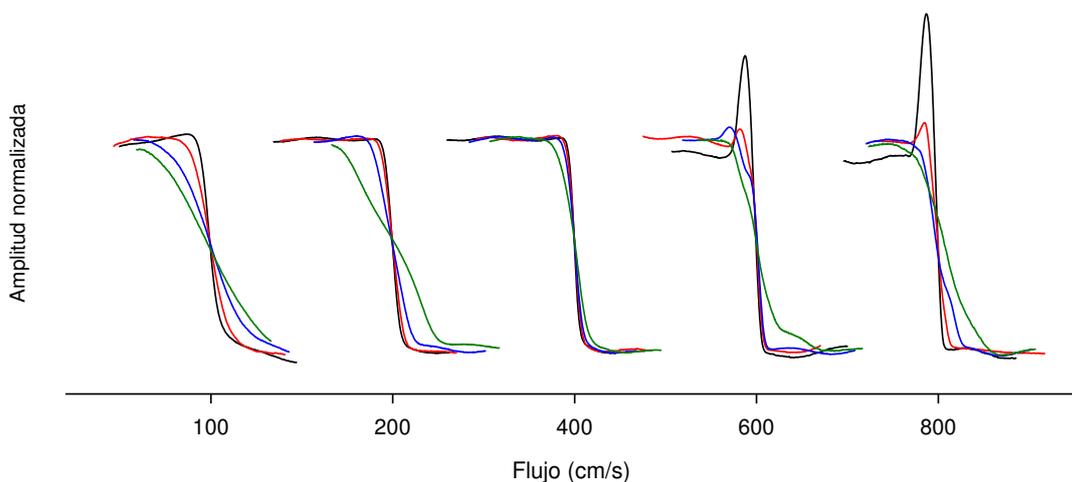
que el diámetro de ambas soluciones se mantuvo medianamente constante (*figura 2.6 segunda fila*).



**Figura 2.7 Avance de la contaminación de la interface con la velocidad y la distancia.** Cada una de las filas representa las distintas velocidades para las cuatro distancias entre las pipetas expresadas como radios de la pipeta de la aplicación (0.5-4 R). La escala de colores representa los distintos potenciales de junta transformados en concentración de NaCl (en mM) de cada una de las soluciones empleadas. Los recuadros pequeños son ampliaciones de las regiones que rodean a la interface (7 x 90  $\mu\text{m}$ ).

Por otra parte no se distinguió una contaminación evidente en la totalidad de la interface, aunque la solución del baño, penetra en la interfase más profundamente de lo que lo hizo a velocidades menores (*figura 2.7 inset fila2*).

Un nuevo aumento de la velocidad, esta vez a 400 cm/s, mostró un claro incremento en la profundidad de la contaminación de la interfase (*figura 2.7 tercera línea y recuadros pequeños*). Cuando la velocidad fue de 600 a 800 cm/s la contaminación a lo largo de toda la interfase fue muy notoria mostrando que este efecto es debido a la arquitectura de la pipeta (*figura 2.7 cuarta y quinta fila*). En estas condiciones el ancho de la interfase fue estimado en 3  $\mu\text{m}$  aproximadamente, 20 veces más ancho que el cálculo del ancho de la interfase mostrado en *la tabla 2.1*. A medida que aumenta la separación entre pipetas parece desaparecer la contaminación de la interfase, sugiriendo que la interfase puede tener un ancho menor a distancias mayores y por lo tanto la posibilidad de obtener pulsos ultracortos puede ser mayor. Para investigar esta alternativa se evaluó el ajuste a la función error para todas las combinaciones de distancias y velocidades, perfundiendo soluciones al 10/ y al 30/ , mientras que la solución al 100/ fue utilizada como solución del baño. Nuevamente se posicionó la pipeta de registro en el centro del plano transversal y se comandó el movimiento del piezoeléctrico con una función triangular. De esta manera se

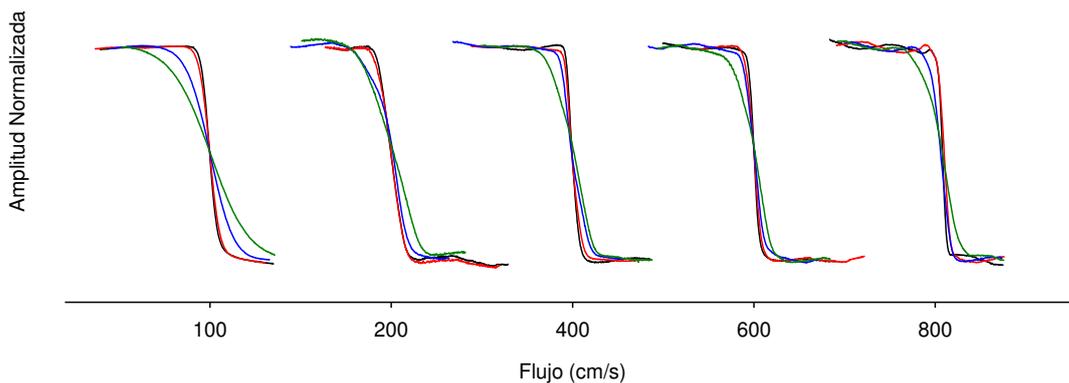


**Figura 2.8. Variación de la forma de la interface con la velocidad y la distancia para pipetas de perfusión con septum grueso (10  $\mu\text{m}$ ).** Para cada combinación de distancias y velocidades, los registros fueron normalizados entre los valores de los potenciales correspondientes al de las soluciones al 10 y 30/ . Además cada conjunto de registros fue alineado por su punto medio para comparar diferencias en la pendiente. Cada uno de los

registros representa la media de 200 ajustes a la función error para cada combinación. Las distancias son expresadas como radios de la pipeta de aplicación. En negro 0.5 R, rojo 1 R, azul 2 R, verde 4 R

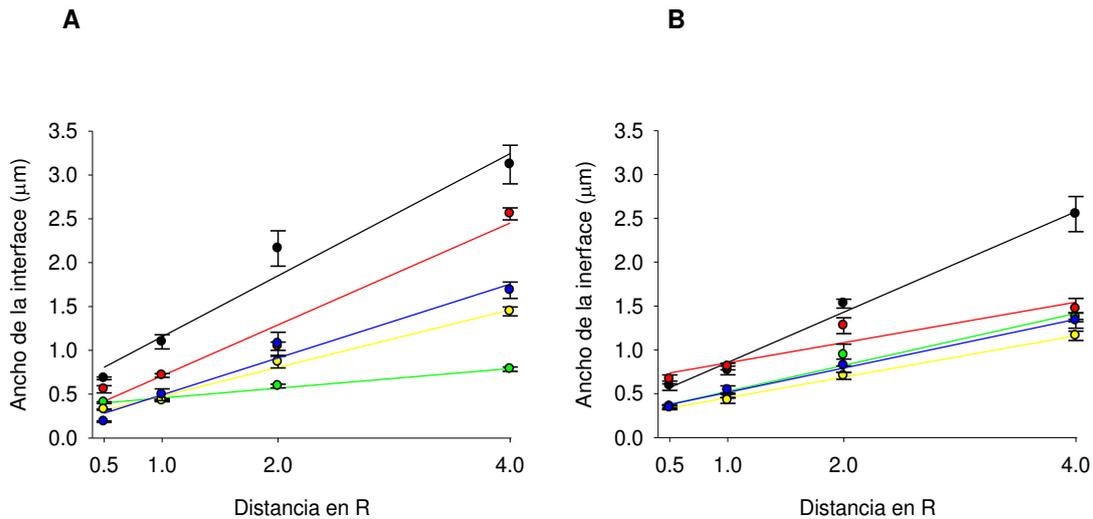
determinó que el aumento en la distancia involucró un aumento en el ancho de la interfase, visto como un incremento en la pendiente del ajuste a la función error, presumiblemente por efecto de la difusión. Este fue mucho más notorio a velocidades bajas, mientras que a velocidades de 600 a 800 cm/s se observó un artefacto en el ajuste a la función error el cual va disminuyendo con la distancia por difusión (*figura 2.8*).

En cuanto a la caracterización de la interfase generada con pipetas de septum fino por el tratamiento con HF (*figura 2.9*), se vio que a velocidades bajas se conserva el efecto de la difusión, mientras que a velocidades mayores, la interface pierde el artefacto del ajuste a la función error, mostrando que la contaminación con la solución del baño estuvo ausente, al menos en el centro del plano transversal a la dirección de las soluciones perfundidas.



**Figura 2.9. Variación de la forma de la interface con la velocidad y la distancia para un septum de 3  $\mu\text{m}$ .** Se muestran las medias de 200 ajustes a funciones error para cada combinación de distancias con velocidades del flujo. Las distancias son expresadas como radios de la pipeta de aplicación. En negro 0.5 R, rojo 1 R, azul 2 R, verde 4

Al igual que en la sección anterior se realizó la cuantificación del ancho de la interfase (*figura 2.10 A*) y para pipetas de septum grueso se vio que a velocidades bajas, conforme se separan las pipetas, el ancho de la interfase se incrementa de 0.8 a 3.1  $\mu\text{m}$ , por la difusión. Por otra parte cuando la velocidad fue de 400  $\text{cm/s}$  permaneció constante para las distintas distancias entre las pipetas.



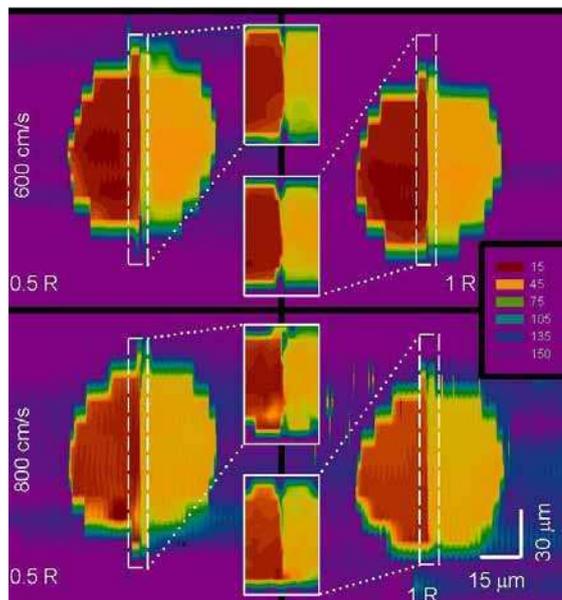
**Figura 2.10. Cuantificación del ancho de la interfase.** Se muestran los valores para el ancho de la interfase para cada combinación de velocidad y distancia. A) Septum grueso (10  $\mu\text{m}$ ). B) Septum fino (3  $\mu\text{m}$ ). Cada punto corresponde a la media de 200 mediciones  $\pm$  el desvío estándar. Cada una de las rectas corresponde a las regresiones lineales para cada velocidad. En negro 100  $\text{cm/s}$ , en rojo 200  $\text{cm/s}$ , en verde 400  $\text{cm/s}$ , en amarillo 600  $\text{cm/s}$  y en azul 800  $\text{cm/s}$ .

Como lo comentado anteriormente, la contaminación de la interfase con solución del baño produce un ensanchamiento de la interfase provocando un doble ajuste a la función error y conduciendo a un error en la determinación del ancho. Así los primeros puntos de las rectas de 600-800  $\text{cm/s}$  muestran este efecto y luego a medida que la separación entre las pipetas aumenta, también lo hace el ancho de la interfase por difusión. Al realizar la cuantificación de la interfase con pipetas tratadas de septum fino también se observó un efecto difusivo que conduce al aumento del ancho conforme aumenta la separación entre las pipetas, aunque en este caso fue menor que cuando el septum fue más grueso (*figura 2.10 B*). Al aumentar la velocidad

de las soluciones perfundidas por encima de los 400 cm/s se vio un incremento en el ancho de la interfase de 0.3 a 1  $\mu\text{m}$ , mostrando que el ancho de la interfase fue determinado principalmente por el ancho del septum y la difusión que aumenta con la distancia.

Para confirmar que el tratamiento de la punta de la pipeta de perfusión con HF 10% contribuye con la disminución de la contaminación de la interfase con la solución del baño, se repitieron las mediciones de todo el plano transversal a la dirección de las soluciones perfundidas, para cada uno de las distancias entre pipetas. La *figura 2.11* muestra las dos velocidades y las dos distancias donde los efectos de la contaminación fueron más notorios para el septum de 10  $\mu\text{m}$ .

A simple vista se observó que la contaminación de la interfase con la solución del medio disminuyó con el tratamiento con HF. A 600 cm/s la contaminación solo se limitó a la periferia de la interfase, mientras que a 800 cm/s la contaminación fue más pronunciada hacia el interior de la interfase, aunque no alcanzó el punto central del plano. El efecto Venturi observado también fue menor con la distancia permaneciendo los anchos de la interfase prácticamente constantes (*figura 2.10 B*).



**Figura 2.11. La contaminación de la interfase para un tabique de 3  $\mu\text{m}$ .** Cada una de las filas representa las distintas velocidades para las cuatro distancias entre las pipetas expresadas

como radios de la pipeta de la aplicación. La escala de colores representa los distintos potenciales de juntura transformados en concentración de NaCl (en mM) de cada una de las soluciones empleadas. Los recuadros pequeños son ampliaciones de las regiones que rodean a la interface (5 x 100  $\mu\text{m}$ ).

De esta manera se pudo establecer que las condiciones para intentar obtener pulsos ultracortos eran:

Trabajar con pipetas de perfusión que tuviesen un septum de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  para lograr una interfase sin contaminación.

Trabajar con una velocidad del flujo entre 400 cm/s para lograr una interfase de aproximadamente 0.4  $\mu\text{m}$ . Si bien es posible trabajar con velocidades mayores, un aumento de esta conduce a que reaparezca, al menos parcialmente, la contaminación de la interfase con solución del baño limitando el rango de posicionamiento de la pipeta de registro al punto central del plano.

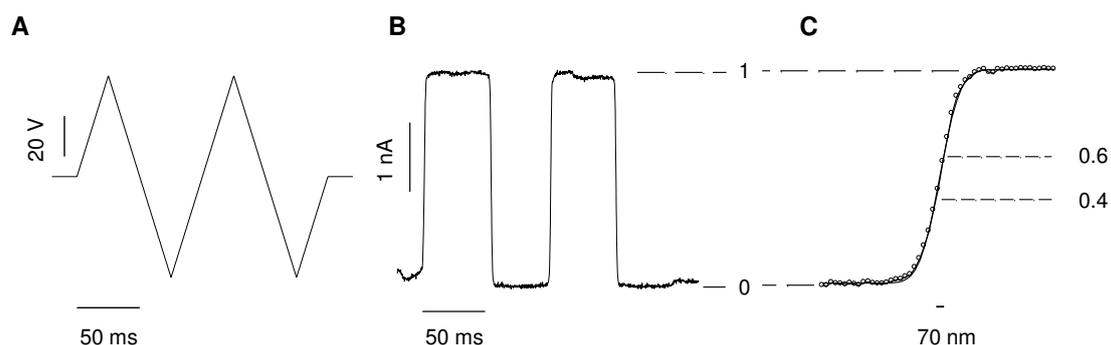
Trabajar con una distancia entre las pipetas de 0.5 R para minimizar el ensanchamiento de la interfase por difusión. De nuevo aquí también es posible trabajar con mayores distancias, por ejemplo 1 R, dado que el ancho de la interfase solo se incrementa en un 15/ .

### **Análisis de las vibraciones del piezo eléctrico y obtención de pulsos ultra-rápidos (20 $\mu\text{s}$ ).**

En las secciones anteriores se describieron las variables que pueden afectar la obtención de pulsos ultra-rápidos y sus interrelaciones. A partir de estos análisis se establecieron las condiciones de medición que maximizarían la posibilidad de conseguir estos pulsos. En esta sección se comentará como se realizaron las mediciones de las vibraciones del piezo para finalmente obtener los pulsos ultracortos. Luego de posicionar ambas pipetas como se muestra en la *figura 2.2*, el primer paso fue registrar la interfase para calibrar el movimiento. Para realizar estos experimentos se hizo fluir por cada uno de los canales de la pipeta de aplicación

soluciones NaCl 150 mM (100%) y NaCl 15 mM (10%) ambas en buffer HEPES 10 mM. Estas concentraciones fueron elegidas para incrementar la relación señal ruido que resulta crítica en registros de alta frecuencia. Las pipetas de patch fueron estiradas a partir de tubos de borosilicato de paredes gruesas (GC150F-7.5, Harvard Apparatus, Holliston, MA) y tuvieron resistencias de 8-12 M $\Omega$ . La solución de registro estuvo compuesta por CsF 145 mM, NaCl 5 mM, MgCl 1.3 mM en buffer HEPES 10 mM. Desde el punto de vista de la cinética de los canales iónicos el parámetro importante es el perfil de concentraciones de las moléculas de agonista que se genera al pasar de una solución a la otra. Por este motivo se midieron los cambios en la corriente sobre la pipeta de patch, manteniendo el voltaje constante en -100 mV. Puesto que el potencial de juntura esperado es de solo 14 mV, solo una pequeña parte de los cambios de la corriente (menos del 14%) pueden ser explicados por una relación lineal con los cambios en el potencial de juntura, la mayor parte de los cambios se deben a un cambio en la conductividad de la solución, la cual es linealmente dependiente con la mezcla de soluciones.

Las vibraciones del piezoeléctrico fueron registradas a través de la medición de las vibraciones de la interfase entre las soluciones seleccionando la velocidad de los fluidos entre 400 y 500 cm/s, a una distancia de 0.5 R (25  $\mu$ m aproximadamente), el



**Figura 2.12. Interfase entre las soluciones.** Las medidas se hicieron con una pipeta de registro que permaneció quieta mientras se movió la pipeta de aplicación con el piezoeléctrico. (A) Onda triangular como voltaje comando causando que la pipeta de aplicación

desplace alternativamente las dos soluciones sobre la pipeta de registro (B) Registro de perfiles de corriente con un voltaje de sostén de -100 mV cruzando entre la solución externa y la solución externa diluido 1:10. (C) Perfil de corriente de mayor resolución con las coordenadas utilizado en B. La anchura de la interfase fue estimado suponiendo un movimiento lineal del actuador piezoeléctrico de  $0,1 \mu\text{m} / \text{V}$ . Las líneas discontinuas indican la región donde los cambios en la corriente son aproximadamente proporcionales a los cambios en la posición. La línea continua indica un ajuste a la función error como se explica en materiales y métodos.

ancho del septum de la pipeta de aplicación se mantuvo en 3-4  $\mu\text{m}$  por tratamiento con HF al 10%, y una tasa de adquisición de datos se realizó a 1 MHz. En todos los casos los movimientos fueron realizados comandando el piezoeléctrico con un amplificador construido a medida que se comentó en la sección anterior, y las mediciones de corriente fueron realizadas con el amplificador de patch clamp en el modo de voltage clamp. La calibración del movimiento a través del registro de la interfase se realizó aplicando al piezo eléctrico una onda triangular (*figura 2.12 A*) con el sub programa *T\_F* (*Anexo A*).

De esta manera el desplazamiento del piezoeléctrico produjo un movimiento alternante de ambas soluciones sobre la pipeta de patch. Así se encontró que la corriente se mantuvo constante mientras se produce el desplazamiento dentro de cada solución y que solo hubo un cambio abrupto en el momento de cruzar la interfase (*figura 2.12 B*). El perfil de concentración de la interfase puede ser bien descrito por una función error (*figura 2.12 C*), donde a región cercana al punto de inflexión es aproximadamente lineal. Por lo tanto, posicionando la pipeta de registro en ese intervalo se pueden registrar cambios en la corriente proporcionales al movimiento de la interfase. Así es que el desplazamiento medido de esta región fue de 70 nanómetros, mientras que el rango de 10 al 90% de cambio del perfil de concentraciones abarcó una distancia de 360  $\mu\text{m}$ .

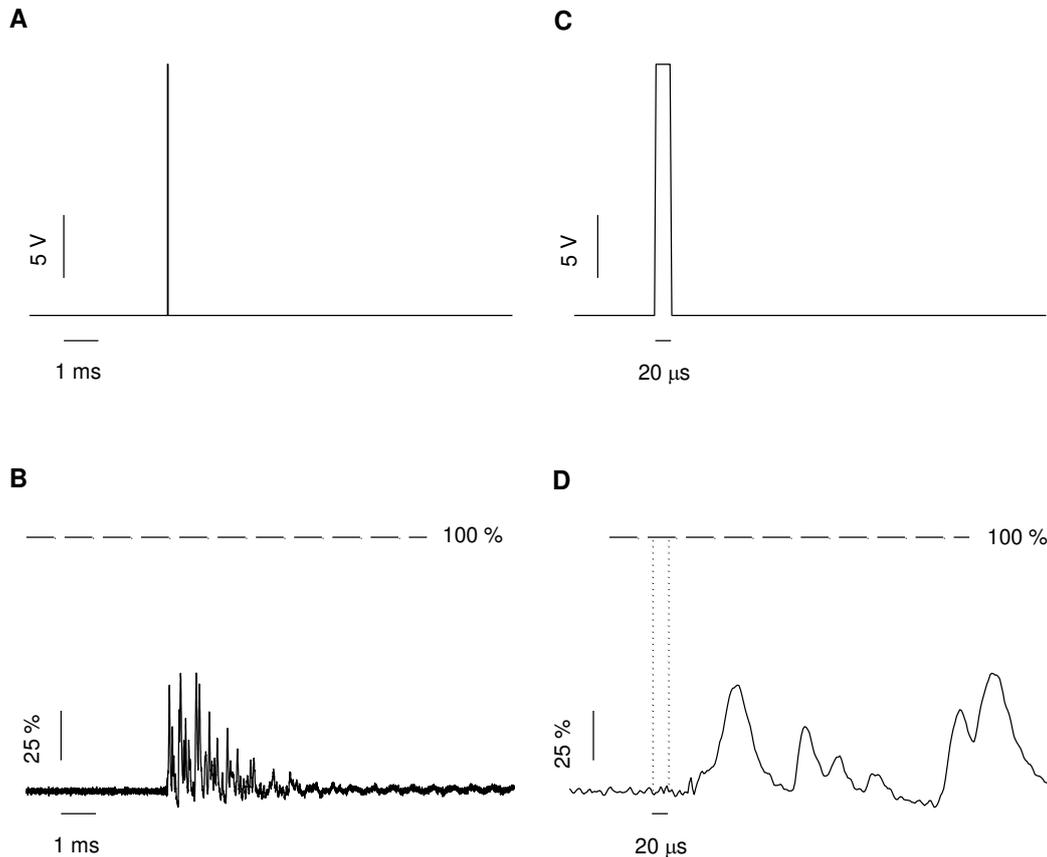
Aprovechando la información presente en la *figura 2.12*, se colocó la pipeta de medición a  $0,85 \pm 0,05 \mu\text{m}$  de la interfase y se aplicó un pulso cuadrado a la piezo con una amplitud de 20 V, una duración de 20  $\mu\text{s}$ , generado con el programa *G\_C\_fx\_fr* (*Anexo A*), y se registró la corriente con la pipeta de patch. Solo los registros que inicialmente se encontraron en el rango 0-10% de la interfase (*figura 2.12 C*) y que

alcanzaron la máxima respuesta, fueron promediados. El ajuste de la posición inicial se realizó variando escalonadamente el voltaje de sostén aplicado al piezo en un 0.1%. Luego se registraron y promediaron la misma cantidad de líneas de base, desplazando la pipeta de registro lejos de la interfase y aplicando el mismo pulso, de manera que el movimiento generado no permitiera que la interfase alcance a la pipeta de registro. Así cualquier variación en la señal es producida por el ruido eléctrico. Ambas señales, la de la interfase y la del ruido eléctrico se restaron y se obtuvo el movimiento de la interfase. El promedio de 148 respuestas se muestra en la *figura 2.13*. Para asegurar que la interfase no se desplace lejos de la pipeta de registro, su ubicación se verificó cada 10 impulsos aplicados. Esto se logró mediante la modulación de la posición interfase del flujo por medio de la aplicación de una nueva onda triangular al piezoeléctrico (*programa T\_F. Anexo A*).

La respuesta promediada mostró que el pulso 20  $\mu$ s indujo un comportamiento complejo en el desplazamiento del piezo reflejado en la corriente registrada ya que esta tuvo picos múltiples, ninguno de los cuales alcanzó el 100% del intercambio de solución. Esto sugirió que la interfase repetidamente estuvo cerca de la posición de la pipeta de registro, pero nunca superó completamente esa posición (*figura 2.13 B*). El movimiento de la interfase duró varios milisegundos y se produjo un retraso de 50  $\mu$ s entre el impulso comando de tensión y el movimiento de la interfase (*figura 2.13 C y D*).

Para determinar si las vibraciones medidas en la interfase entre las soluciones son debidas principalmente a vibraciones del piezo o son el reflejo de las vibraciones de todo el sistema de perfusión, se midió ópticamente el movimiento del piezo mediante la reflexión de un láser en un espejo de oro pegado al piezo empleando un detector de fotodiodos de cuatro cuadrantes y aplicando un pulso de 50 V y 20  $\mu$ s (*figura 2.13 B y E*). El ángulo de incidencia del haz fue de 45 °; el detector de fotodiodos fue colocado a 6 cm desde el punto de incidencia. La lectura del detector de fotodiodos de cuatro cuadrantes fue calibrada después de mover el piezoeléctrico una distancia conocida con el manipulador motorizado (860 Newport). El pulso indujo un movimiento complejo y oscilante del piezo con una amplitud de pico a pico de 45  $\mu$ m (0,9  $\mu$ m/V), que fue completamente amortiguado después de 10 ms (*figura 2.13*).

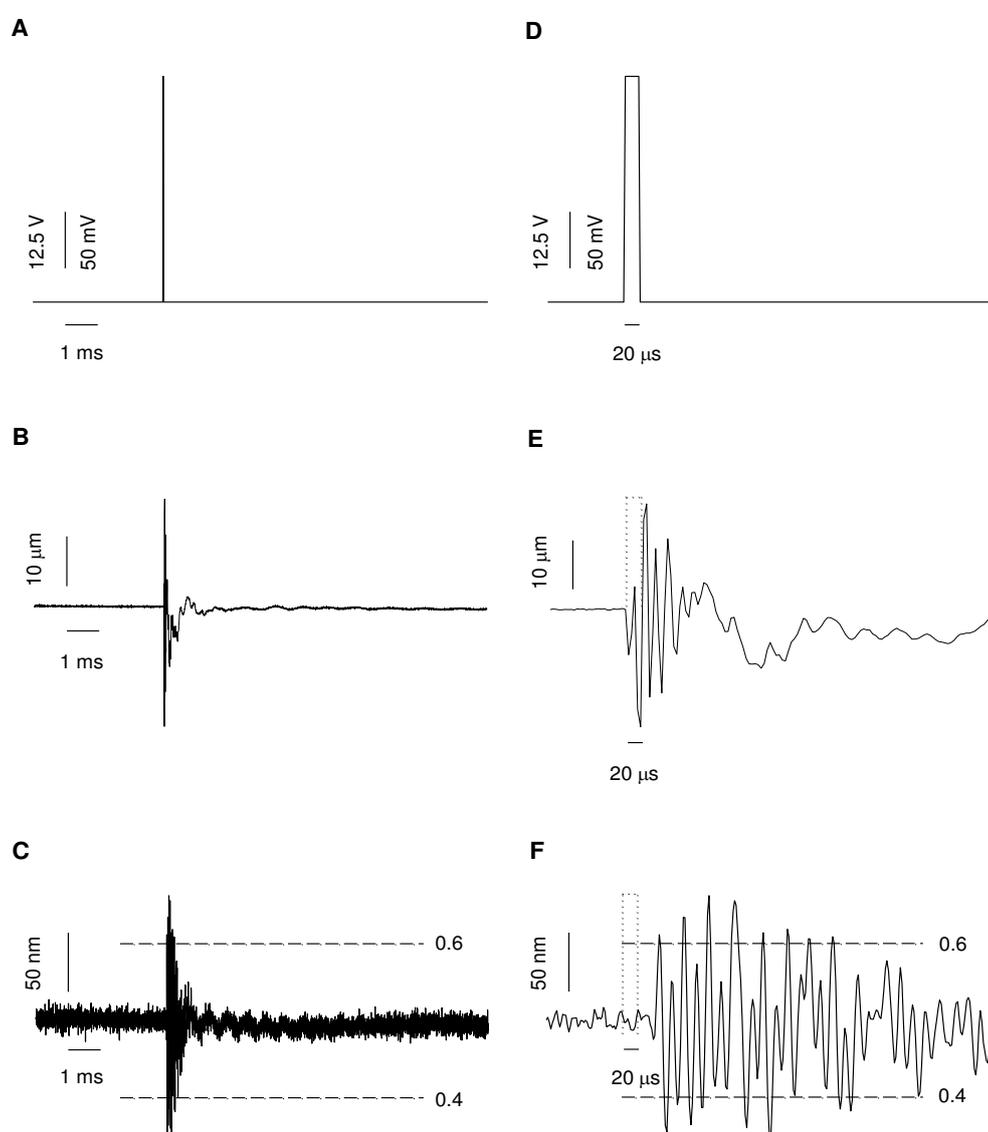
La primera de las cuatro oscilaciones rápidas se completó en  $18 \mu\text{s}$ . El piezo tuvo un retardo de  $2 \mu\text{s}$  comenzar a moverse después de que el pulso de voltaje fue aplicado. Las oscilaciones medidas ópticamente reflejan el hecho de que las vibraciones de la interfase corresponden a todo el sistema.



**Figura 2.13. Respuesta del intercambio de soluciones a un pulso ultra-corto.** A) pulso cuadrado de 20 V y  $20 \mu\text{s}$ . aplicado al piezoeléctrico a 1 Hz como tasa de repetición. La pipeta de registro fue posicionada a  $0.85 \mu\text{m}$  de la interfase. B) Cambios en la corriente generados por el movimiento como respuesta al pulso de A. Las líneas punteadas representan la corriente esperada para un intercambio completo de soluciones-D) Escala expandida de A y B respectivamente. La línea punteada en D marca la posición del pulso comando.

Para evaluar las vibraciones del piezo la pipeta de registro se colocó cerca de la interfase, por ende sólo los movimientos de la interfase que ocurren cerca de la pipeta aplicación pueden ser detectados mientras que los movimientos que se producen lejos de ella se pierden. Por tal motivo, se colocó la pipeta de medición en el medio de la interfase y mediante la aplicación de un pulso de amplitud menor a la de los

experimentos anteriores, fue posible hacer una medición completa del movimiento de la interfase. La amplitud del pulso se seleccionó de manera que toda la respuesta de las vibraciones producidas por el pulso estuviesen comprendidas en la región lineal (40 – 60°) de la interfase (*figura 2.14 C y F*). La interfase fue recalibrada cada 10 impulsos mediante la aplicación de una señal triangular (*figura 2.12*). Se monitoreó constantemente la posición de la interfase haciendo una corrección fina en la posición de piezoeléctrico variando el potencial de sostén en pasos de 0,5 mV.



**Figura 2.14. Los movimientos del piezoeléctrico y la interfase tras un pulso ultra-rápido.** (A) Gran amplitud (50V) o una pequeña amplitud (200mV) para un voltaje comando de 20  $\mu$ s aplicado al piezo. Grandes pulsos de amplitud generan movimientos lo suficientemente grandes como para ser medidos adecuadamente. Pulsos de pequeña amplitud confinan el movimiento de la interfase a la región de desplazamiento lineal. (B) Movimiento del piezo, medido ópticamente, en respuesta a un pulso grande de 50V. (C) movimiento de la interfase, medido con la pipeta de registro, en respuesta a un pulso de 200 mV. Líneas punteadas 0.4-0.6 corresponden a la región lineal de la interfase. (D) Escala ampliada de A. (EF) Escala de mayor resolución del patrón de movimiento generado por la activación de impulsos del piezo B-C. La línea punteada indica el tiempo del pulso comando. 100 y 148 trazos fueron promediados para piezo y los movimientos de la interfase, respectivamente.

Esto permitió mantener la posición de la interface al comienzo de cada pulso entre 40 y 60% de la diferencia en la corriente en ambos lados de la interfase (*figura 2.12 C*). Sólo los trazos donde la posición inicial de la interfase se ubicó en este rango de linealidad fueron promediados. La *figura 2.14 C y F* muestran el promedio del movimiento (148 trazos) inducido por un pulso de tensión cuadrado de 200 mV y 20  $\mu$ s.

El pulso indujo un movimiento complejo oscilante de la interfase con una amplitud de pico a pico de 200 nm (1  $\mu$ m/V), que fue completamente amortiguado después de 10 ms (*figura 2.14*). La primera de 20 oscilaciones rápidas se completó en 18 microsegundos. Un retardo de 42  $\mu$ s fue observado entre que se aplicó el pulso y la interfase comenzó a moverse. Este retraso surge de los 3 cm de longitud del brazo de la pipeta aplicación y los 25  $\mu$ m de distancia entre la pipeta aplicación y la pipeta de registro.

El siguiente paso para obtener los pulsos ultra-rápidos fue estimar la función de transferencia para el movimiento registrado anteriormente. El sistema intercambiador de solución puede ser modelado como un sistema lineal donde la entrada está dada por el voltaje de alimentación del piezoeléctrico,  $x(t)$ , y la salida es el movimiento de la interfase. La función de transferencia de este sistema tiene la información suficiente para calcular el comando de voltaje necesario para generar con el piezoeléctrico, cualquier movimiento deseado dentro del ancho de banda del sistema electro-mecánico. El algoritmo Black Box (*Apéndice B*) que mide la función de transferencia de la respuesta de un piezoeléctrico, fue aplicado previamente para optimizar el

movimiento del piezoeléctrico [245]. Aquí se extendió esta idea para optimizar el movimiento de todo el sistema que está constituido por el piezoeléctrico + manipulador + pipeta de aplicación + interfase líquido. Para calcular la respuesta del sistema, se empleó el movimiento de la interfase medido anteriormente, como respuesta al pulso corto de 20  $\mu$ s y 200 mV aplicado al piezoeléctrico. La pipeta de patch fue colocada en el centro de la interfase. Como una aproximación de primer orden se supuso que el movimiento de este sistema podría ser descrito por un sistema lineal de ecuaciones diferenciales. Esto es equivalente a considerar que el sistema intercambiador de soluciones se comporta como una sola caja negra, que está completamente determinada por su función de transferencia  $G(\omega)$ , definida como la relación entre la transformada de Fourier del movimiento medido de la interfase  $y_m(t)$ , y la transformada de Fourier del voltaje comando aplicado al piezoeléctrico  $V_c(t)$ :

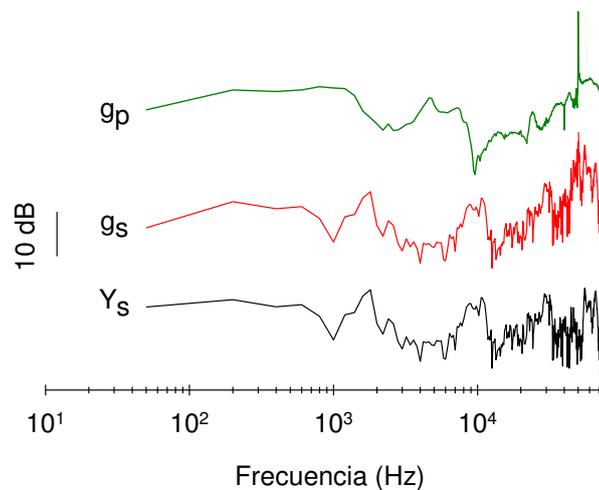
$$G(\omega) = \frac{F\{y_m(t)\}(\omega)}{F\{V_c(t)\}(\omega)} \quad (1)$$

donde  $F\{f(t)\}(\omega)$  representa la transformada de Fourier de la función  $f(t)$ . Entonces el voltaje comando  $V_c(t)$  que genera el movimiento deseado  $y_d(t)$  es:

$$V_{com}(t) = F^{-1} \left\{ \frac{F\{y_d(t)\}(\omega)}{G(\omega)} \right\}(t) \quad (2)$$

aquí  $F^{-1}$  indica la transformada inversa de Fourier. Debido a que las mediciones fueron limitadas en el tiempo y discretas en el muestreo, no se utilizó propiamente la transformación de Fourier sino la transformada rápida de Fourier (FFT), el cual permite obtener la transformada de Fourier discreta y su inversa. También se utilizó el enfoque de Caja Negra para corregir la función de transferencia del amplificador de patch clamp y obtener una mejor estimación de la subida y bajada de los pulsos.

La amplitud de la función de transferencia del sistema,  $g_s(\omega)$ , y del piezo solo,  $g_p(\omega)$ , y la transformada de Fourier del movimiento del sistema,  $Y(\omega)$ , son mostrados en la *figura 2.15*. Como la amplitud de la transformada de Fourier de un pulso cuadrado de entrada,  $X(\omega)$ , es casi plana a frecuencias inferiores a la duración del



**Figura 2.15. Espectro de poder y la función de transferencia para el movimiento de la interface y el del piezo.** Se muestra el espectro de poder para todo el sistema ( $Y_s$ ) y la función de transferencia para el movimiento de la interfase ( $g_s$ ) como reflejo del movimiento de todo el sistema. Además se muestra la función de transferencia para el movimiento del piezoeléctrico solo ( $g_p$ ). Todas las señales son mostradas como decibeles de la amplitud.

pulso, tanto  $Y(\omega)$  y  $g_s(\omega)$  muestran la dependencia de la frecuencia a la misma hasta aproximadamente. 50kHz, donde la amplitud de  $X(\omega)$  cae a cero. El pico aparente de  $g_s(\omega)$  y  $g_p(\omega)$  exactamente a 50kHz es un artefacto causado por el valor cero de  $X(\omega)$  a esa frecuencia. La función de transferencia del piezo solo, mostró múltiples resonancias (0,97 kHz; 4,54 kHz; 23,9 kHz; 43,6 kHz; 48,1 kHz; 60,4 kHz), que fueron diferentes de las resonancias de todo el sistema (1,76 kHz; 2,39 kHz; 8,8 kHz; 10,8 kHz; 29,4 kHz; 31,3 kHz; 44,6 kHz; 45,4 kHz; 51,0 kHz; 65.6kHz).

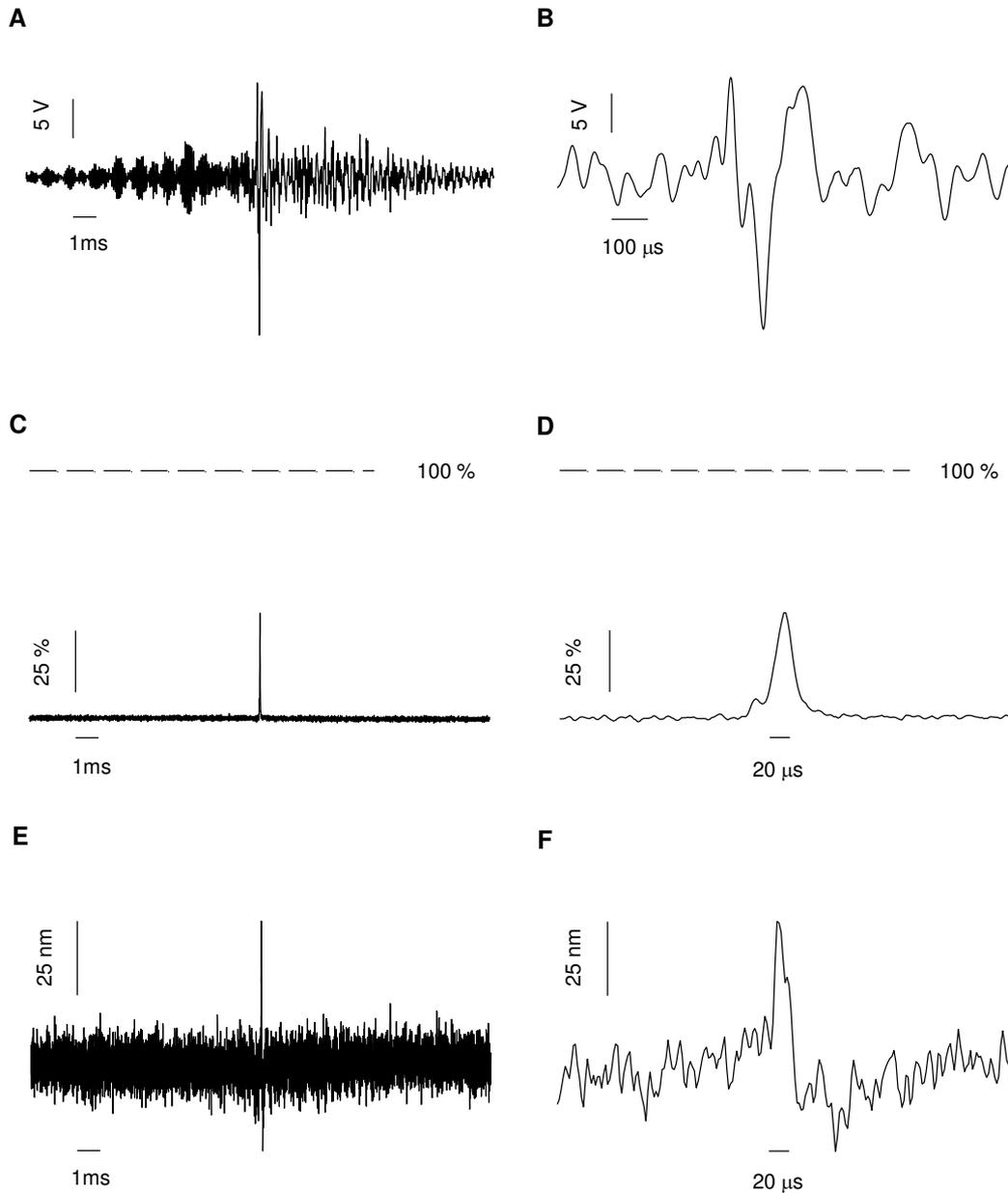
El voltaje comando optimizado para el piezoeléctrico, obtenido al aplicar el algoritmo Black – Box, fue una señal compleja que se inició 10 ms antes del tiempo del

pulso deseado (*figura 2.16 A*), alcanzó su máximo cerca del tiempo previsto para el pulso (*figura 2.16 B*) y se mantuvo 11 ms después del final del pulso previsto. La primera porción del comando sintetizado compensa el tiempo de retardo del sistema y la porción más tardía contrarresta parte de las oscilaciones resonantes. Para medir el intercambio solución que resultó de usar este impulso comando optimizado, se cambió la línea de base de voltaje del piezoeléctrico para posicionar la interfase de nuevo a 0,85  $\mu\text{m}$  de la pipeta de medición y se aplicó al piezoeléctrico el comando optimizado con una amplitud máxima de 10 V. Como era de esperar el intercambio de soluciones obtenido estuvo esencialmente libre de oscilaciones espurias aunque sólo se consiguió un 40% de intercambio, por debajo del objetivo de un cambio por lo menos del 90%. Además un aumento en la amplitud máxima otorgada al piezo condujo nuevamente a la aparición de oscilaciones espurias, que pudieron ser corregidas aumentando la distancia entre la interfase y la pipeta de registro, pero en ningún caso se logró obtener un intercambio mayor al 40%. Por lo tanto, se midió el movimiento de la interfase con el fin de obtener una nueva función de transferencia con mayor precisión.

Al igual que en la primera optimización el movimiento de la interfase fue medido en la región de linealidad (0.4-0.6 *figura 2.14*). El movimiento de la interfase estuvo cerca, aunque no fue igual, a la forma cuadrada previsto pulso (*figura 2.16 E*). La velocidad máxima del movimiento fue de 0,4 cm / s a una amplitud del comando optimizado de 250 mV. Una estimación de la velocidad máxima de 16 cm / s obtenidos a 10V de amplitud comando optimizado se obtuvo por extrapolación lineal.

Con el fin de optimizar aún más el movimiento y de obtener un intercambio de soluciones más definido se calculó de nuevo la transformada de Fourier del movimiento de la interfase,  $Y(\omega)$ , y la correspondiente función de transferencia  $g_s(\omega)$  (*figura 2.17*).  $Y(\omega)$  es casi plana mientras que  $g_s(\omega)$ , aunque similar a su estimación anterior, fue lo suficientemente diferente como para sugerir la posibilidad de que con su uso se podría conseguir un intercambio de solución más limpio. Se esperó esto porque, en la estimación anterior de la función de transferencia, la respuesta a algunas frecuencias fue demasiado pequeña para ser medida adecuadamente.

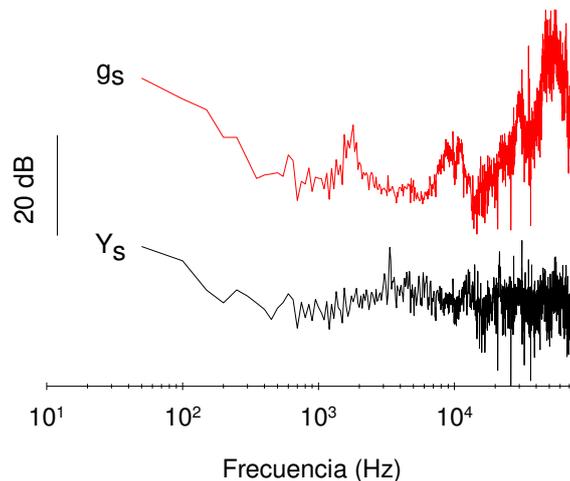
Aplicando la segunda ecuación del algoritmo “Black Box” se calculó el pulso necesario para generar un pulso cuadrado de intercambio líquido de 20  $\mu\text{s}$  (figura 2.18 A). La aplicación de esta señal de comando re-optimizado resultó en un pulso de  $26 \pm 1$   $\mu\text{s}$  de duración con una amplitud de intercambio de  $93 \pm 1$  / (figura 2.18 C-D).



**Figura 2.16. Respuesta a un comando de voltaje optimizado.** (A) Forma del comando optimizado, calculado sobre la base de la respuesta representada en la figura 2.13 B para obtener un 20  $\mu\text{s}$  pulso. (B) escala ampliada de A. (C) Medición del cambio de solución expresado como porcentaje de un intercambio completo, generado por la aplicación de mando optimizado de 20 V. Un intercambio limpio pero incompleto es claro. (D) escala ampliada de C. (E) Medición del movimiento de la interfase después de la aplicación del comando optimizado

de 250 mV. (F) a escala ampliada de E. Las mediciones se realizaron a la media de 100-120 trazos.

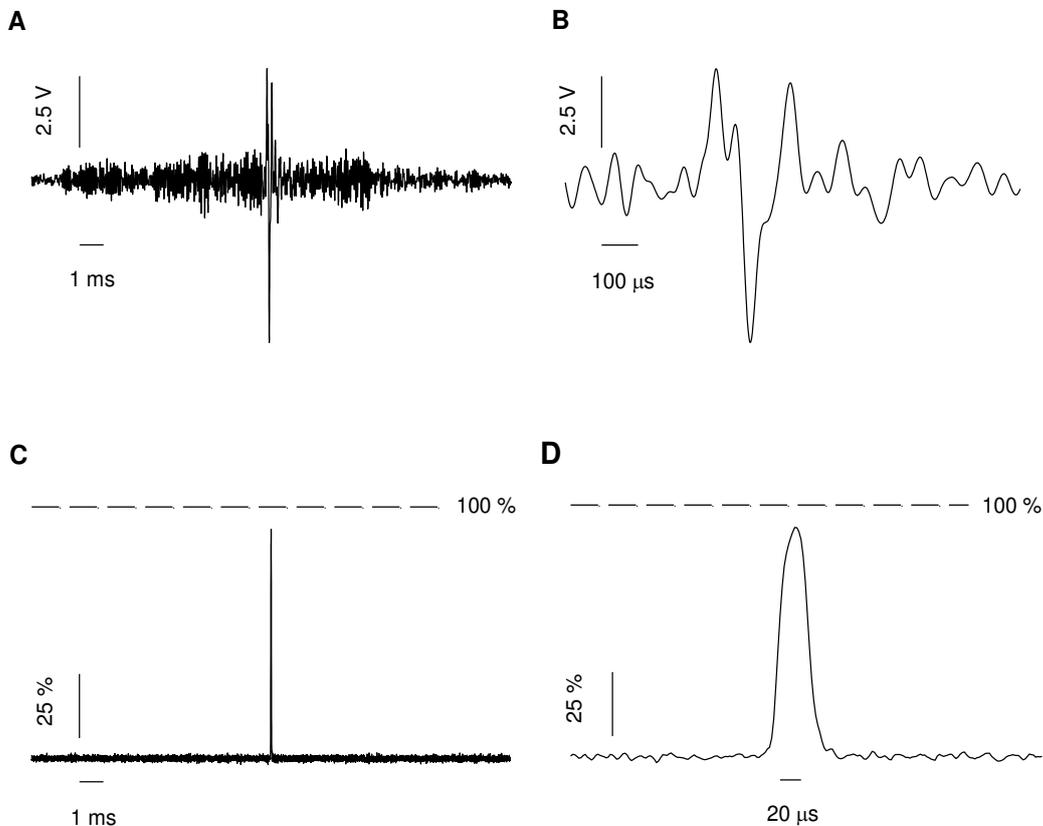
La desviación estándar de la duración del pulso y la amplitud de intercambio medido en pruebas sucesivas de  $1,9 \mu\text{s}$  y el  $3,2 /$ . El tiempo de subida, después de realizar una corrección con la función de transferencia del amplificador de después de realizar una corrección con la función de transferencia del amplificador de patch clamp, fue de  $8 \pm 1 \mu\text{s}$  ( $n = 4$ ).



**Figura 2.17. Espectro de poder y función de transferencia para el movimiento de la interfase.** Se muestra tanto el espectro de poder ( $Y_s$ ) y la función de transferencia ( $g_p$ ) para el movimiento de la interfase entre las soluciones, para calcular la segunda optimización a partir de los datos registrados en la figura 2.15. E. Las señales son expresadas como decibeles de la amplitud.

El comando optimizado también funcionó con pipetas de otras: pipetas de aplicación de diámetros desde 100 a 120 micrómetros y los septum de 3 a 4 micrómetros de espesor dio lugar a pulsos de duración de  $26 \pm 1 \mu\text{s}$  y amplitudes de  $92 \pm 1 /$ . Por este procedimiento también fue posible producir pulsos cuadrados de  $100 \mu\text{s}$  (figura 2.18). Después de la aplicación de la segunda ronda de optimización del

comando de voltaje con una amplitud de 10 V, se obtuvo un pulso único de  $97 \pm 3 \mu\text{s}$ , con  $10 \mu\text{s}$  tiempo de subida y  $12 \mu\text{s}$  tiempo de decaimiento (figura 2.19 B-D). La

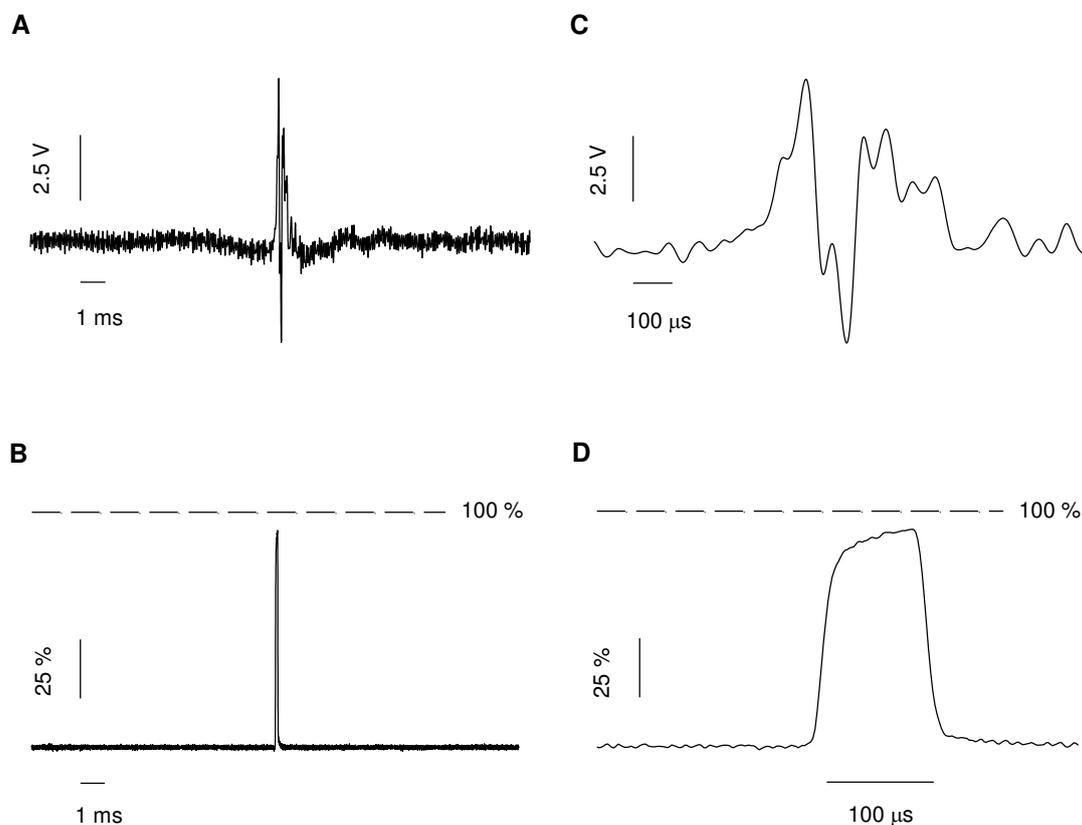


**Figura 2.18. Respuesta a una segunda optimización del comando.** (A) Forma del comando óptimo calculado sobre la base de la función de transferencia se representa en la figura 7. (B) escala ampliada de A. (C) Medida del intercambio de solución después de la aplicación del comando óptimo, expresado como porcentaje de un intercambio completo. Un pulso único que atraviesa casi toda la interfase se obtiene aplicando el comando óptimo con una excursión máxima de 10 V (D) escala ampliada de C. La anchura del pulso es de aproximadamente  $25 \mu\text{s}$ . Promedio de 150 trazos.

amplitud del intercambio de soluciones obtenido fue de  $95 \pm 2 \%$ . La desviación estándar de la duración del impulso y la amplitud del intercambiado medido en sucesivos ensayos eran  $3,4 \mu\text{s}$  y  $2 \%$ . Otras tres pipetas mostraron resultados similares:  $97 \pm 2 \mu\text{s}$  de duración,  $96 \pm 2 \%$  de amplitud del intercambio.

La obtención de pulsos aún más largos fue muy difícil ya que este método permitió obtener una buena estimación para frecuencias altas mientras que las

frecuencias bajas son subestimadas. Por tal motivo se construyó el método que se detalla en el capítulo siguiente y de esa forma se obtuvieron pulsos de toda duración.



**Figura 2.19. Respuesta al comando optimizado para los pulsos de 100  $\mu$ s.** (A) Comando optimizado calculado después de dos ciclos. (B) El mismo gráfico con una escala mayor. (C) Intercambio de soluciones muestra un solo pulso después de amplitud de 10 V. Una mayor escala se muestra en D. La duración media del pulso es de aproximadamente 100 microsegundos. Promedio de 130 trazos.

## DISCUSIÓN.

El objetivo general de este capítulo fue encontrar una estrategia experimental para la producción de los pulsos ultra-rápidos de intercambios de soluciones, necesarios para separar la unión del agonista de la apertura del poro en canales iónicos activados por ligando rápidos [206].

La unión del agonista conduce a la apertura del canal. Ambos procesos están estrechamente acoplados: la probabilidad de apertura aumenta con la unión de la molécula agonista y el cierre del poro aumenta la probabilidad de liberar el agonista. Porque tanto la unión del agonista como la cinética de activación (gating) periódica contribuyen al aumento de las corrientes macroscópicas después de aplicar el agonista, es difícil separar la contribución de ambas. Encontrar una estrategia experimental que permita estudiar la unión del agonista por separado del gating de la compuerta del canal, beneficiaría enormemente a los estudios de la estructura y la función de los canales iónicos activados por ligando. Una posible estrategia para resolver la cinética puede ser desarrollada marcando que hay un breve período de tiempo al comienzo de la aplicación de agonistas donde la activación de la compuerta del canal es pequeña, simplemente porque no hubo tiempo suficiente para que los receptores que acoplaron al menos una molécula de agonista puedan abrirse. Este período dura una fracción del tiempo de la constante de activación de la compuerta del canal. Al limitar la aplicación del agonista al comienzo de esa fracción de tiempo, la unión del agonista se produce casi sin la interferencia por el proceso de gating. Una aplicación muy rápida hace que la unión del agonista ya no esté limitada por la velocidad de la aplicación.

Por otra parte la unión del agonista es todavía limitado por la difusión y por la tasa de interacción con la unión sitio de unión una vez que el ligando está presente. La menor duración del impulso puede ser contrarrestada usando una mayor concentración del agonista que resulta en una tasa de unión incrementada. Mientras que los cambios conformacionales que conducen a la apertura de la compuerta son sustancialmente más lenta que período de unión (el cual es limitado por el tiempo que agonista está presente y disponible) la separación entre el fenómeno de unión del agonista y la apertura de la compuerta sería significativa. De esta manera la cinética de unión podría ser determinada por las mediciones de las corrientes macroscópicas [204, 223, 246]. La metodología y que aquí se presenta puede ser utilizada para alcanzar pulsos de 20  $\mu$ s que son suficientes para introducir el agonista al sitio de unión del canal iónico antes de su compuerta se active.

## **Comparación con otros dispositivos.**

La velocidad de flujo en nuestros experimentos es 40 veces más grande que la utilizada en los dispositivos comerciales o del estado de arte. Debido a que nuestro sistema aísla el gas a presión de las soluciones que están siendo inyectadas se evita la formación de burbujas que puedan colisionar y romper el patch. Además se retiraron cuidadosamente las burbujas de aire y se filtraron las soluciones de partículas contaminantes.

Con este sistema se obtuvieron velocidades de flujo entre 100 y 400 cm / s. Velocidades más altas también fueron alcanzadas pero puede comprometer la estabilidad de la medición [236, 239] por un gran presión dinámica en la membrana del patch. Por lo tanto mantener la presión dinámica por debajo del límite de rotura del patch, que es aprox. 0,08 bar por una pipeta de patch de 2 micrómetros [247], dando lugar a un límite de seguridad de 400 cm / velocidad s fluido. Por otra parte a esta velocidad se consiguió la mejor relación entre el ancho de la interfase y su estabilidad cuando el septum de la pipeta de patch fue de aproximadamente 3 micrómetros.

Dado que resulta extremadamente complejo, no fue posible medir el caudal real de la solución que llegar a la punta de la pipeta de medición. Si asumimos que el perfil de velocidades del flujo en un tubo cilíndrico es parabólico, aunque la situación aquí es más compleja, ya que dos corrientes que fluyen están separados por un delgado tabique y la columna de líquido se expulsa en un baño de solución estática. Por lo tanto, se presentó una estimación basada en la tasa de flujo volumétrico y las dimensiones de la punta de la pipeta de perfusión.

Una alta velocidad en el movimiento relativo de la punta de la pipeta de perfusión respecto de la interfase podría influir en el ancho efectivo de esta última en el caso de que la velocidad de traslación sea mayor que la velocidad de perfusión. Incluso esto puede llevar a corromper la interfase en el caso de tener un número de Reynolds que determine un régimen turbulento ( $>4000$ ). Esto no fue el caso en los experimentos actuales. Para el caso de 10 V, se estimó que la velocidad de traslación de la punta de la pipeta de perfusión fue de un máximo de 16 cm/s. Esta velocidad es

25 veces más lenta que la velocidad del fluido estimado. Además, incluso en las altas velocidades utilizadas en este trabajo, el número de Reynolds es de 400, lo que corresponde a un régimen laminar ( $<2300$ ). Por lo tanto, no esperamos un gran efecto de la translación del piezo sobre el ancho de la interfase.

Altas velocidades de flujo tendrían un efecto sobre la tensión de membrana que podrían activar canales mecano-sensibles. Este efecto se mostraría como un aumento de la corriente de fuga. Como es probable que la velocidad de flujo cambie a diferentes distancias de la interfase, es importante llevar a cabo experimentos de control con una solución externa, en ambos canales de la pipeta de perfusión. Esos experimentos de control podrían detectar si hay un efecto del gradiente de velocidad de flujo sobre canales mecano-sensibles (ver capítulo siguiente). Además, los experimentos a diferentes tasas de flujos son necesarias para hacer frente a la posibilidad de una modulación del receptor activado por ligando por la tensión de la membrana [248-250].

Además se encontró que la anchura de la interfase aumenta con la anchura de la partición entre los dos canales de la pipeta de perfusión. Este efecto fue más pronunciado a altas velocidades de flujo porque la solución del baño está siendo arrastrada al interior de la interfase especialmente cuando el tabique es relativamente grueso. Esto hace que la interfase entre las corrientes que fluyen desde la pipeta de perfusión se contamine con la solución del baño. Este hecho se hizo evidente mediante el uso de corrientes de soluciones con concentraciones más bajas que en que la solución del baño. Afortunadamente, esta contaminación puede ser aliviada al disminuir el espesor del tabique.

La velocidad del movimiento de la interfase en nuestros experimentos alcanzó 15 cm/s, 4 veces más rápido que el estado de arte de la técnica [204]. También se aumentó el ancho de banda a 100 kHz. Esta mejora en el rendimiento se debe a que se utilizó un piezoeléctrico de alta frecuencia (pero pequeña excursión) y que se lo comando con un amplificador de mayor ancho de banda, 100 kHz, y corriente, 30 A, el cual fue fabricado a medida. Se midió la función de transferencia de este sistema en su conjunto y después aplicar álgebra simple (Ec. 2 del algoritmo “black box”) se obtuvo el

curso temporal de la señal de tensión para aplicar al piezoeléctrico y producir un movimiento de pulsos de la interfase de solución. La combinación de las mejoras que se discutieron anteriormente hizo posible generar un enorme reducción en la duración del pulso: 25  $\mu\text{s}$  con tiempos de subida y caída de 8  $\mu\text{s}$  luego de aplicar la corrección con la función de transferencia del amplificador de patch. En comparación con arreglos anteriormente usados que produjeron pulsos de 200  $\mu\text{s}$  con tiempos de subida y bajada de 80  $\mu\text{s}$  utilizando el mismo algoritmo y un piezoeléctrico de 10 kHz, con 6 cm/s de velocidad de flujo y con un tabique 10 de espesor  $\mu\text{m}$ .

La respuesta del piezoeléctrico aislado compartió algunas características con la respuesta de la interfase, la cual es un reflejo de todo el sistema intercambiador de soluciones. Ambas respuestas presentaron oscilaciones que duraron alrededor de 10 ms y las oscilaciones iniciales tuvieron un periodo de 18  $\mu\text{s}$ . Sin embargo, la respuesta del piezo aislado es claramente insuficiente para predecir la respuesta de todo el sistema. Perfusión, oscilación de la interfase y las vibraciones de la pipeta de perfusión introducen una complejidad considerable en la función de transferencia. Esto muestra la necesidad de medir directamente el movimiento de la interfase con el fin de optimizar el movimiento de todo el sistema.

Un método alternativo para obtener pulsos de sub-milisegundos recientemente ha sido propuesto [239]. Este consiste en el acabar el pulso sin volver al flujo en el que inicialmente se colocó la pipeta de registro, sino en alcanzar un tercer flujo sin cambiar la dirección del movimiento. Mediante el uso de tecnología de microfluidos PDMS es posible construir intercambiadores triples que tienen un canal central con una abertura de salida de 10  $\mu\text{m}$  y un ancho del septum de 10  $\mu\text{m}$ . Utilizando un motor paso a paso que alcanza una velocidad de 3 cm/s y una velocidad de flujo de 25 cm/s, y se pudieron obtener pulsos de 400  $\mu\text{s}$  con un tiempo de subida de 100  $\mu\text{s}$ .

Una opción alternativa al uso de cristales piezoeléctricos en flujos paralelos consiste en utilizar válvulas solenoide como el mecanismo de intercambio de soluciones. Este mecanismo se basa en generar una interfase entre dos corrientes de soluciones y posicionar la pipeta de registro muy próxima a dicha interfase. Al apagar una válvula se restringe uno de los jets de solución produciendo un desplazamiento de

la solución restante sobre la pipeta de registro. De esta manera se obtuvieron pulsos de 1.0 ms, con un tiempo de subida de 25  $\mu$ s [220] empleando una velocidad de flujo de 10 cm/s, o velocidades de flujo mucho más altas [228]. La incertidumbre en el momento exacto en que la válvula se activa se puede reducir mediante el método de la señal del pistón [251] (capítulo 1), que permite la determinación de esos retardos.

Los resultados expuestos fueron obtenidos en una interfase de sólo 0,36  $\mu$ m de ancho. Teniendo en cuenta que el movimiento transversal de los flujos es de 16 cm / s, la interfase de movimiento debe cruzar la posición de la pipeta de registro en tan sólo 2  $\mu$ s. El tiempo de crecimiento observado de 8  $\mu$ s necesario para que la concentración cambie de 10 a 90 % fue cuatro veces más lento. Aunque este valor fue obtenido después de corregir la respuesta de frecuencia medida amplificador de patch, todavía podría estar limitado por el ancho de banda de dicho amplificador. En una manera similar, los resultados anteriores sobre un ancho de interfase de 700 nm mostraron un tiempo de subida de 80  $\mu$ s y solo tardó 14  $\mu$ s en cruzar la posición de la pipeta de registro. Además del limitado ancho de banda de las mediciones, estas discrepancias pueden surgir de difusión a través de una capa de líquido sin agitar que se encuentra contra de la punta de la pipeta patch. Sachs examinó estos fenómenos mediante modelos de elementos finitos [238]. Su análisis sugiere que el tiempo de subida dependía de la velocidad de flujo de las corrientes con una relación de ley de potencia. Cuando su modelo se aplica al movimiento de una interfase a una velocidad de flujo de 10 cm/s y 100 cm/s, los tiempos de subida previstos son 25 y 1,0  $\mu$ s, respectivamente. Hasta donde sabemos sólo un conjunto de resultados pudo alcanzar este máximo rendimiento [220]. Del resto de los datos disponibles en la actualidad, los mejores son cuatro veces más lentos que la predicción de este modelo. Además de cálculos más precisos, un mayor ancho de banda de las mediciones del intercambio y las mediciones reales de las velocidades en las proximidades de la pipeta patch, son claramente necesarias para comprender estas discrepancias.

## **Pulsos ultra-cortos son una poderosa herramienta experimental**

Los pulsos muy cortos reportados aquí serían una poderosa herramienta para el estudio experimental de los eventos moleculares que ocurren entre la unión del agonista y la apertura del canal. Pulsos de 200 microsegundos en receptores P2X2 de rata mostraron un tiempo de retraso entre la aplicación del agonista y la apertura del canal [204]. Esta demora fue indicativa de la presencia de un estado intermedio entre el totalmente consolidado estado cerrado y el estado abierto. Este estado es análogo a un estado de pre-apertura apodado el estado “flip” en el receptor de glicina [215, 252] y los receptores de acetilcolina [253], y fue sugerido por análisis cinético de registros de canales únicos. Sería posible, en principio, utilizar pulsos de 25  $\mu$ s para la detección de la presencia del estado flip incluso en receptores activados por ligando más rápido tales como los receptores nicotínico ACh o receptores AMPA [254, 255]

Además, estos pulsos podrían ser útiles para imitar la sinapsis química en el sistema nervioso [256], donde el mecanismo de liberación vesicular produce un pulso muy breve de neurotransmisor que conduce a una concentración muy alta transitoria en la post-sinapsis [257]. Más del 50% del neurotransmisor que llega al receptor lo hace en 20-50 microsegundos por lo tanto, para entender adecuadamente la respuesta de los receptores sinápticos es necesario medir la respuesta a los pulsos de esta duración [256, 258, 259]. Los efectos de potencial, compuestos terapéuticos o mutaciones en canales activados por ligando causantes de enfermedades corrientes puede ser oscurecida si las condiciones sinápticas se aproximan con aplicaciones de neurotransmisores más largos, en particular para canales iónicos que se activan rápido. El uso de pulsos de agonistas muy cortos podría ayudar a manifestar otras sutiles diferencias o efectos.

# Capítulo 3

# *”Barrido en frecuencias y optimización de la velocidad”*

## **INTRODUCCIÓN.**

Los canales iónicos presentan diferencias fundamentales en sus características biofísicas que determinan su funcionamiento. Estas diferencias, en esencia, son atribuibles a la composición molecular particular de cada canal. Ya sea la capacidad para unir moléculas que provoquen o modulen su activación [260-264], los tiempos de activación, el tiempo en que permanecen o no activados y efectos tales como la desactivación o la inactivación, son puntos clave a identificar para comprender y modelar el funcionamiento de cada canal iónico [260].

La generación de pulsos ultra-rápidos, descrita en el capítulo anterior, es un poderoso avance, que permitirá el estudio cinético de canales que se activan extremadamente rápido [265], tales como los receptores AMPA de glutamato [233, 234] o los receptores de acetilcolina nAChR [90, 91, 240-243]. Por otra parte, canales iónicos dependientes de ligando que se activan más lentamente requieren aplicaciones más prolongadas de la molécula de agonista, por ejemplo los canales

GABA<sub>A</sub> tardan en abrirse 0.15 - 0.55 ms [266], los receptores de glicina GlyR 0.45 ms [252], los receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub> 0.9 ms [149] y los canales GABA<sub>C</sub> 120 – 180 ms [267]. Del mismo modo, el estudio de la modulación de la actividad de los canales requieren la aplicación del agente modulador durante tiempos distintos [268-270]. Asimismo, fenómenos como la facilitación o la recuperación luego de la desensitización requieren para su estudio de la generación de pulsos pareados en vez de pulsos únicos.

Por todos estos motivos se planteó el objetivo de diseñar un método que permita la identificación de las características cinéticas de cualquier canal iónico, empleando el mismo sistema de perfusión que se utilizó para obtener pulsos ultra-rápidos. El primer paso fue obtener pulsos de intercambio de solución más largos que los obtenidos con el sistema de pulsos ultra-rápidos para poder analizar la cinética de canales que se activan lento. Un segundo desafío fue la creación de pulsos repetidos de una duración determinada y separados por intervalos constantes o variables de forma de imitar cualquier tipo de liberación sináptica de un neurotransmisor [245, 259, 271]. El tercer paso fue directamente la creación de pulsos totalmente aleatorios, en cuanto a sus duraciones y al ancho del intervalo que los separa. De esta forma, al realizar aplicaciones de distintas duraciones del ligando, se podrían determinar las características cinéticas del canal en cuestión. Además, esta tecnología podría emplearse en el estudio de las interacciones entre fármacos y canales activados por ligandos y/o por voltaje [272]; en el estudio de patológicas [273-276], como también en el desarrollo de drogas.

Durante los capítulos anteriores se describió cuáles fueron las estrategias usadas para crear el setup experimental y cómo se obtuvieron los pulsos ultra-rápidos de intercambio de soluciones. Además se mostró el estudio realizado sobre las variables que hubo que controlar para obtener dichos pulsos. La aproximación experimental para corregir las vibraciones del sistema se basó en medir un desplazamiento muy pequeño de la interfase ante un voltaje comando formado por un único pulso. La transformada de Fourier de un pulso de una duración determinada está compuesta de todas las frecuencias menores a las que corresponde a la duración del pulso. De este modo, al medir el movimiento de la

interfase ante una estimulación pulsada del piezoeléctrico, se logran estimular de una única vez todas las frecuencias de interés para generar el mismo. Esta estrategia no permite alcanzar una buena resolución para frecuencias bajas donde la estabilidad mecánica de la interfase limita la resolución alcanzada.

En este capítulo se describe la estrategia experimental utilizada para obtener pulsos duración arbitraria. Se registró el potencial de juntura de la interfase entre las soluciones para cada frecuencia individual con la resolución deseada y en base a esto, se reconstruyó la función de transferencia, la cual permite deducir el comando necesario para lograr el movimiento deseado.

Como se discutió anteriormente, la activación de los canales mecanosensibles, que censan la tensión en la membrana celular [250, 277], puede ser estudiada realizando pulsos de presión sobre el patch [265]. En este caso, en lugar de realizar intercambios entre soluciones con distinta concentración de agonista, pueden realizarse intercambios de soluciones a distintas velocidades, que se traducen en intercambios de presión sobre el patch. Por tal motivo, en la última sección de este capítulo se describe la calibración de las velocidades de los flujos.

## **RESULTADOS Y METODOLOGIA**

### **Estabilización del sistema y escaneo de las frecuencias**

Para generar una función de transferencia a partir de la que se pueda obtener cualquier ancho de pulso fue necesario lograr una mayor estabilidad del sistema, ya que como en el caso de los pulsos ultra-rápidos los registros de las vibraciones del sistema se hacen midiendo las oscilaciones de la interfase. En lugar de aplicar un único pulso como generador del movimiento se aplican ondas sinusoidales de frecuencia creciente. Uno de los factores identificados como generador de inestabilidad de la interfase fue la arquitectura de la pipeta de aplicación. Tanto en el caso de los pulsos ultra-rápidos como en experimentos preliminares de barrido de

frecuencia la pipeta de aplicación fue estirada a partir de un tubo theta tabicado de modo que sus paredes exteriores tuviesen un ángulo de 15-20°(figura 2.1). El perfil de velocidades de un líquido que fluye por una tubería de sección transversal circular es máximo en el centro de la sección circular y se hace mínima en contacto con las paredes de la tubería. La sección transversal de cada compartimento de la pipeta de perfusión es semicircular por lo que el punto máximo del perfil de velocidades se haya desplazado del centro del semicírculo hacia el septum de la pipeta. El simple hecho de que las soluciones abandonen la pipeta de perfusión con un ángulo determinado hace que colisionen entre ellas con un perfil de velocidades cambiante a lo largo de la interfase. Por ende pequeñas alteraciones de la velocidad en cada uno de los flujos que abandonan la pipeta conduce a vibraciones de la interfase que no son características del sistema y son poco reproducibles. Este razonamiento es congruente con el hecho de que al disminuir el ángulo de las paredes externas de la pipeta de perfusión (figura 3.1), volviendo a los jets de soluciones casi paralelos, pudo estabilizarse mucho más el sistema.

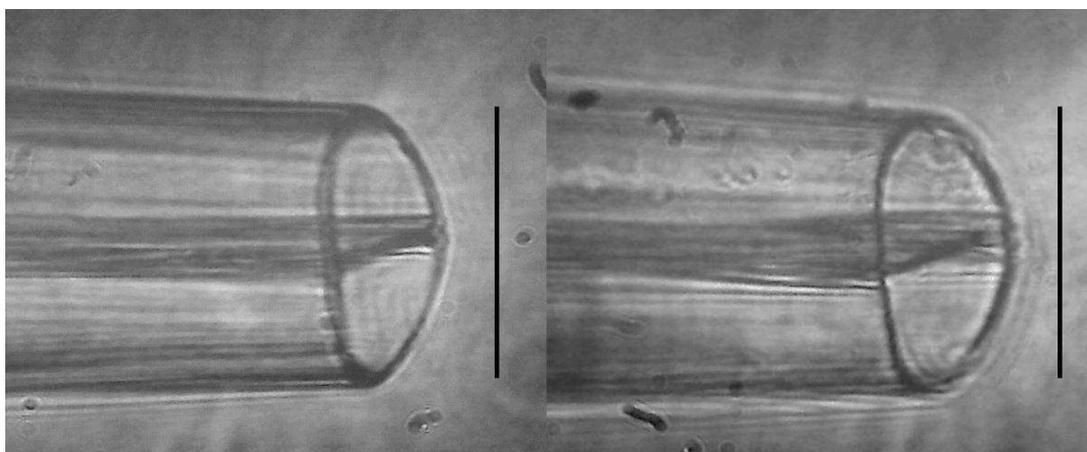


Figura 3.1 Pipetas de perfusión paralelas. Micrografías de la pipeta de perfusión con paredes paralelas antes (izq) y después (der) del tratamiento con HF al 10%. Cada barra vertical representan 100  $\mu\text{m}$ . Aumento total 50 x

La construcción de una función de transferencia para cada una de las frecuencias posibles de movimiento del piezoeléctrico fue realizada con el subprograma **Fscan** (Apéndice A), el cual entrega un voltaje comando al piezo eléctrico con forma de coseno y va incrementando la frecuencia de esta función en una

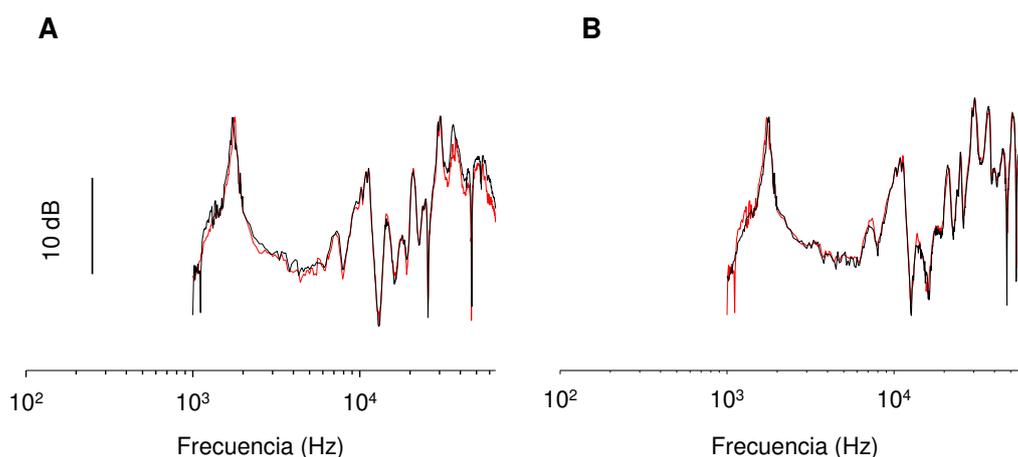
cantidad determinada por el salto de frecuencia, siempre y cuando los datos de registrados en la frecuencia anterior hayan sido considerados como correctos. El rango de frecuencias analizado fue de 1KHz a 65 KHz, con un salto de frecuencias de 100 Hz. Saltos de frecuencia menores también fueron analizados pero las funciones de transferencia no variaron considerablemente como para suponer que, pasajes de frecuencia más cortos, aportan más información de las vibraciones del sistema. Dentro del rango de análisis de frecuencias, el tiempo de registro para cada una de dichas frecuencias fue 0.3 ms, generando 300 ciclos para el movimiento del piezo en 1 KHz que fueron incrementándose a razón de 30 ciclos por salto de frecuencia, hasta llegar a 19500 ciclos para 65 KHz. En cada uno de los saltos de frecuencia el valor de los registros fue promediado y fue aceptado si estaba dentro de los límites prefijados de posicionamiento, o sea, entre el 40-60% de la interfase. Un límite adicional a la amplitud entregada al piezo eléctrico para evitar una saturación en la respuesta medida (*Apéndice A*),

Inicialmente las frecuencias menores a 1KHz fueron descartadas ya que solo reflejaron la inestabilidad mecánica de la interfase y la adquisición de los datos se tornaba extremadamente engorroso, dado que para adquirir como mínimo 300 ciclos debe subdividirse el rango de frecuencias e incrementar el tiempo de registro, llegando a 3 s, 30 s y 300 s de registro para los rangos de 1000 - 100 Hz, de 100 - 10Hz y de 10 - 1 Hz, respectivamente. Así se obtuvo un valor del espectro de poder para cada una de las frecuencias de interés. Una modificación que se introdujo posteriormente en el sistema de registro contribuyó a la adquisición de las frecuencias menores a 1 KHz (*Apéndice A*). Cuando se llegó a la frecuencia final la función fue salvada y se la utilizó para calcular los distintos voltajes comandos. Por último, empleando generadores de pulsos, para cada uno de los casos analizados, se obtuvo el movimiento deseado para emplear el algoritmo "Black Box" y se obtuvo la función de transferencia para generar el movimiento del piezoeléctrico.

Dado que para poder definir el valor que toma el espectro de poder para ciertas frecuencias es necesario variar la amplitud del voltaje entregado al piezoeléctrico, la primera caracterización que se realizó fue obtener el espectro de poder para voltajes fijos, quitando la restricción de la amplitud entregada al piezo,

pero no los del posicionamiento en la región lineal de la interfase. La *figura 3.2 A* muestra precisamente esta situación, donde se obtuvo el espectro de poder a 10 mv y a 20 mv. La superposición de ambos espectros mostro que no hay diferencias atribuibles al aumento en la amplitud del voltaje entregado al piezo.

Como lo comentado en el Capítulo anterior, el espectro de poder que se obtuvo para optimizar el movimiento del piezo, no sólo depende de las vibraciones del piezo, sino también de las vibraciones de todos los componentes del sistema, por lo que es natural pensar que si se desarma y luego se rearma el dispositivo experimental con exactamente los mismos elementos, podrían aparecer diferencias que se reflejen en el espectro de poder.

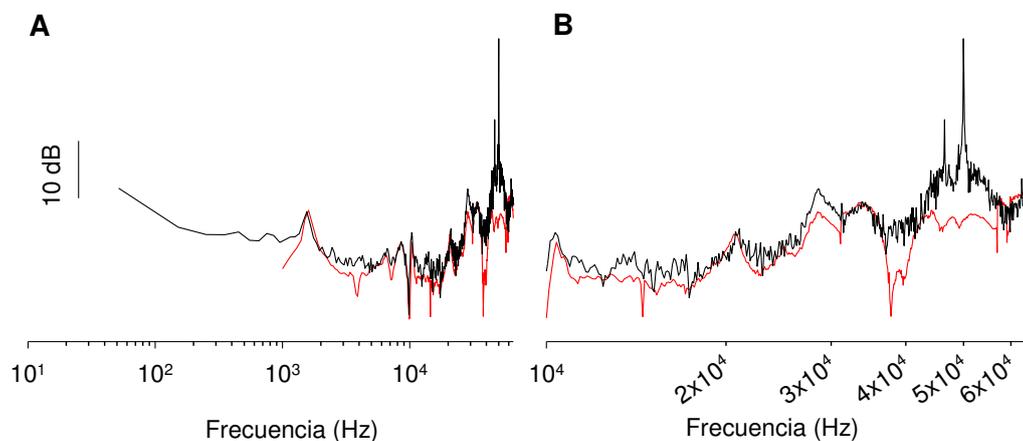


**Figura 3.2. Efecto del voltaje de excitación del piezo y de la repetitividad sobre el espectro de poder.** Espectros obtenidos con el escaneo de frecuencias (*Fscan*). A) Variación del voltaje de excitación de 10 mV (rojo) a 20 mV (negro). B) Variación del voltaje de excitación con el dispositivo rearmado de 20 mV (rojo) a 40 mV (negro). Ambos gráficos están expresados en decibeles.

Por tal motivo se desarmó y rearmó el dispositivo experimental y se volvió a obtener el espectro de poder en las mismas condiciones que antes, es decir en ausencia de los límites para la amplitud, empleado un voltaje fijo de 20 mV (*figura 3.2 B*).

Al igual que antes, también se utilizó un segundo voltaje fijo, aunque esta vez fue de 40 mV. Se encontró que ambas curvas se superpusieron notablemente mostrando nuevamente que no hubo efectos dependientes del voltaje que se aplica al piezoeléctrico. Además se observó una gran similitud entre los espectros después que el dispositivo experimental fue rearmado. Esto muestra la relativa robustez del método y de la adquisición de los datos.

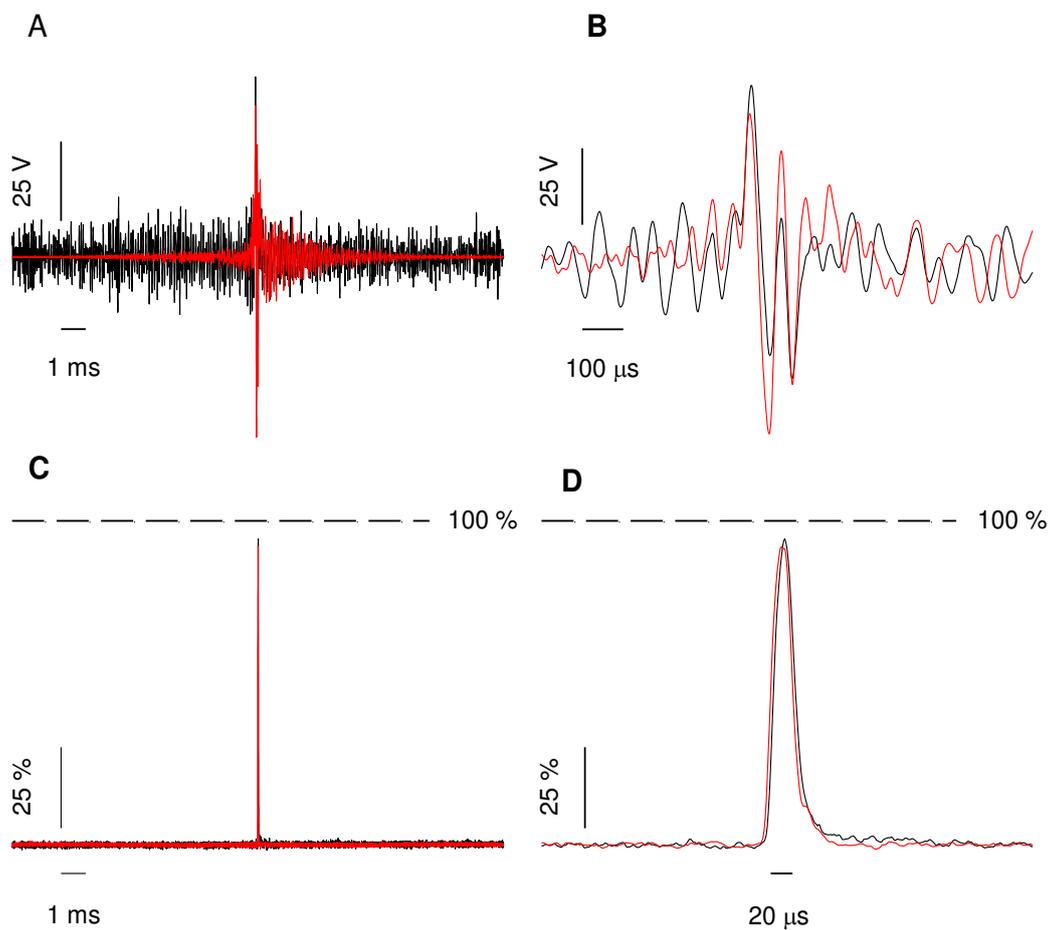
A partir de estos resultados se hizo notorio que, por un lado era imprescindible saber si este método podía reportar pulsos ultra-rápidos como lo hace el método de los pulsos individuales. Por otra parte, dado que el espectro de poder obtenido luego del rearmado del dispositivo experimental mostró leves diferencias con la medición del espectro original, se investigó en qué medida podría ser empleada la primera medición del espectro para obtener pulsos en distintos experimentos, ante un eventual desarmado del dispositivo.



**Figura 3.3 Comparación de los espectros de poder obtenidos por los métodos del pulso y por el del escaneo de frecuencias.** A) En negro se muestra la función de transferencia obtenida por el método del pulso como se explicó en el capítulo anterior. En rojo se muestra la función de transferencia para el método del escaneo de frecuencias. En ambos casos las funciones están expresadas como decibeles de la amplitud. B) Ampliación de la figura A en la región de 40 – 65 KHz.

Para resolver la primera inquietud se compararon los espectros obtenidos por ambos métodos en mediciones consecutivas bajo las mismas condiciones y con la misma pipeta de perfusión (*figura 3.3*). Al realizar esta comparación se vio que se superponen casi en su totalidad, pero la función obtenida por el método del pulso único mostró un artefacto a la frecuencia correspondiente al pulso (pico a 50KHz), como se comentó en el capítulo anterior. La gran similitud entre los espectros sugiere que este método permitirá obtener pulsos ultra cortos también.

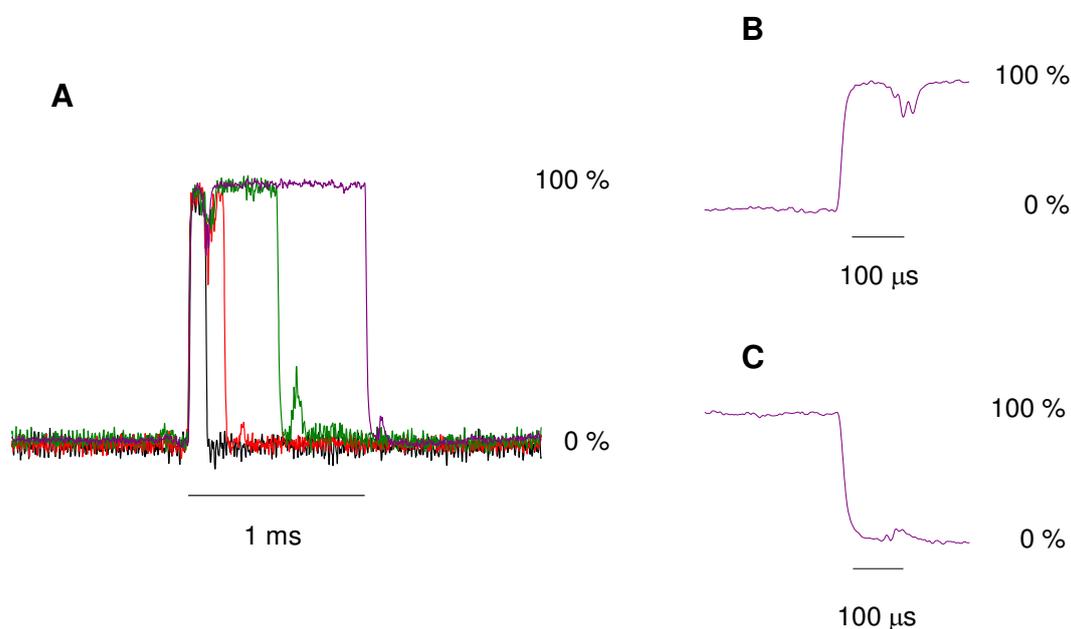
La *figura 3.4* muestra los voltajes comandos y los pulsos ultra-cortos obtenidos por ambos métodos.



**Figura 3.4. Comparación del método de los pulsos únicos y el escaneo de frecuencias.** Se muestran en negro el voltaje comando y el pulso obtenido con el método de pulsos únicos y en rojo se ve el voltaje comando y el pulso obtenido por el escaneo de frecuencias. A) Voltajes comando. C) pulsos ultra-rápidos, promedio de 100 mediciones descontada la línea de base. No se observan repeticiones. B y C) Escalas expandidas de A y B.

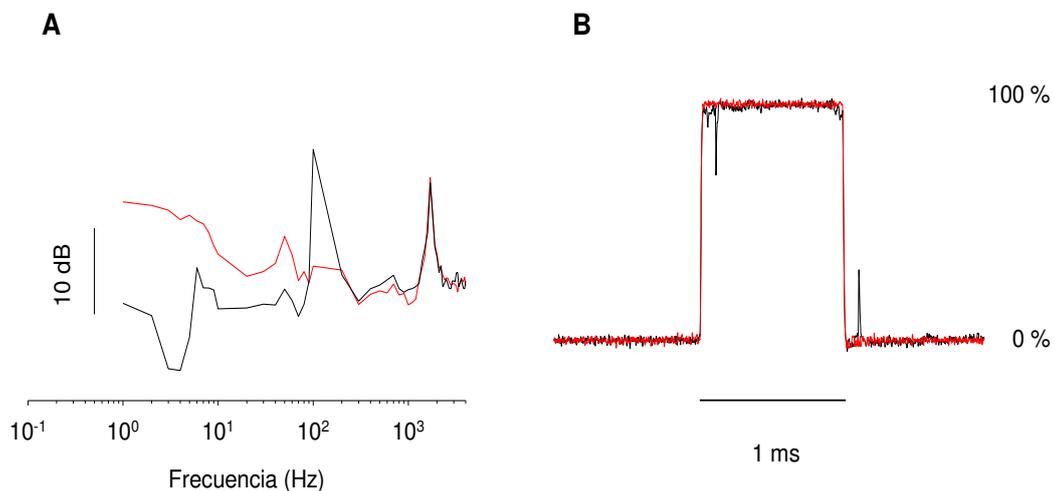
Empleando el algoritmo Black Box que se describe en materiales y métodos, utilizando como movimiento deseado un pulso cuadrado de 20  $\mu\text{s}$ , se logró recuperar un pulso único de  $24 \pm 1.1 \mu\text{s}$  con una amplitud de  $93 \pm 2.01 /$ . Estos resultados son similares a los obtenidos con el método de los pulsos individuales (*Capítulo 2*). En este caso el tiempo de subida fue de  $14 \pm 1.3 \mu\text{s}$ . Empleando el método del escaneo de frecuencias se logró obtener un pulso muy similar al pulso obtenido por el método de los pulsos únicos, es decir, un pulso sin repeticiones, con una amplitud de  $91 \pm 1.37 /$ , con un ancho medio de  $26 \pm 1.7 \mu\text{s}$ . y un tiempo de subida de  $15 \pm 1.1 \mu\text{s}$ .

Empleando el mismo espectro obtenido con el escaneo de frecuencias y utilizando pulsos cuadrados de 0.1 a 100 ms, como movimiento deseado, se lograron obtener pulsos de esas duraciones. Los tiempos de subida variaron entre 10 y 15  $\mu\text{s}$  (*figura 3.5 A*).



**Figura 3.5. Pulsos de distinta duración obtenidos por escaneo de frecuencias.** A) muestra pulsos de uno (negro), dos (rojo), cinco (verde) y diez milisegundos (violeta).se ven las repeticiones indeseadas. B y C) escalas expandidas del tiempo de subida y el tiempo de bajada.

Un detalle particular es que los pulsos presentaron artefactos simétricos a ambos lados, sugiriendo que el sistema, la forma de medición y la manipulación para encontrar la función de transferencia no amortiguaron totalmente las oscilaciones. Estas repeticiones fueron siempre a los 100  $\mu$ s de comenzado y terminado el pulso (*figura 3.5 B y C*). Por tal motivo se midieron las frecuencias menores a 1 KHz. Este procedimiento fue sumamente engorroso y tuvo que dividirse el rango de frecuencias para asegurar un mínimo de 300 ciclos por frecuencia, para lo que se aumentó el tiempo de registro a medida que se disminuyó la frecuencia del voltaje comando. Así, los valores encontrados para cada frecuencia fueron sumamente variables y provocaron una distorsión muy grande de la función de transferencia (*figura 3.6 A trazo negro*). El origen de esta distorsión se encuentra en la deriva en la posición de la interfase, la cual empieza a ser importante cuando el tiempo de medición supera los centenares de milisegundos. En pos de solucionar este problema se modificó el programa de adquisición de datos para que en vez de cambiar el tiempo



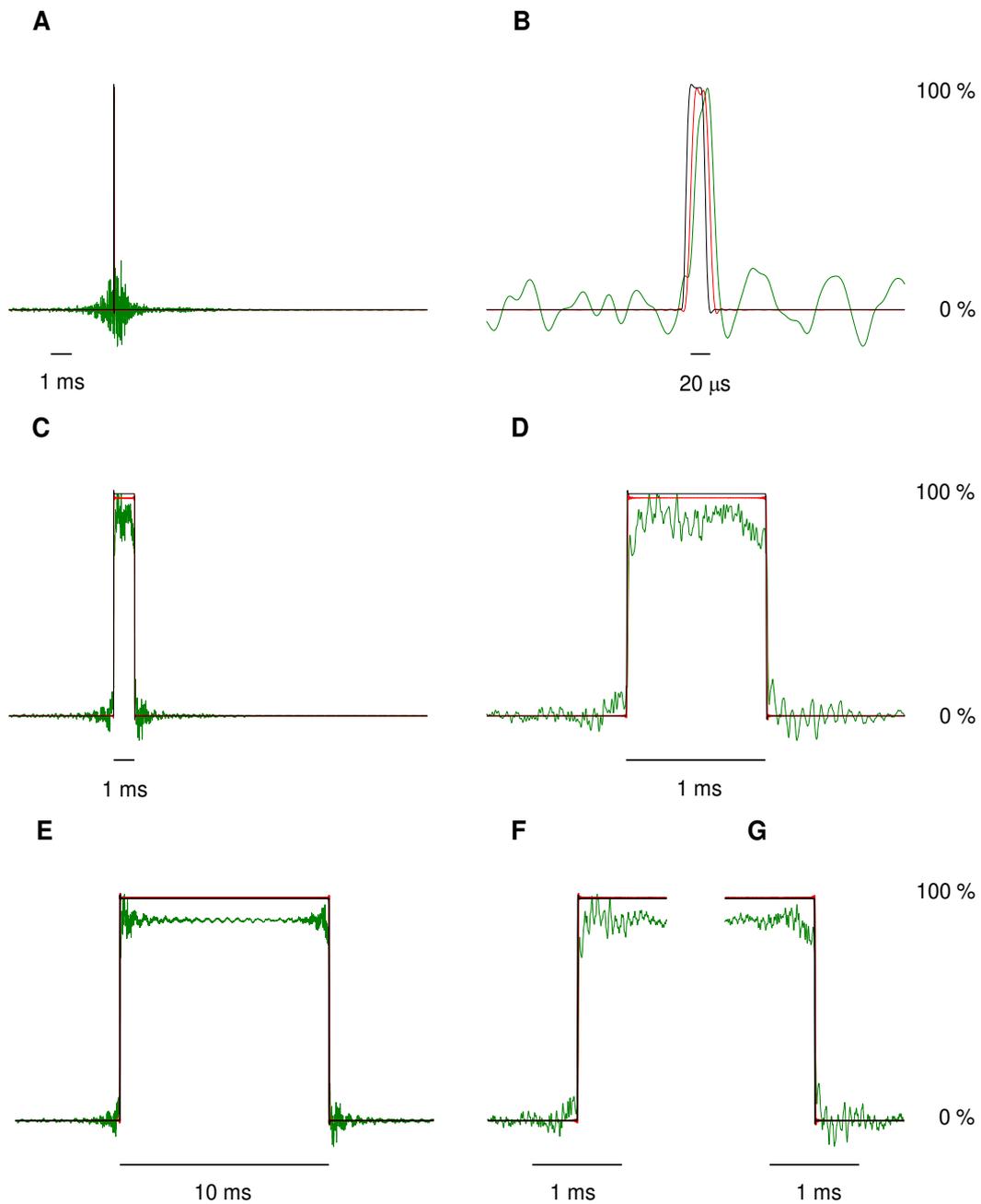
**Figura 3.6 Adquisición del espectro de poder para frecuencias bajas y pulsos para distintos rangos de frecuencias en el escaneo.** Se muestran los espectros obtenidos por los dos modos y los pulsos obtenidos con cada espectro. A) Valores del espectro para los frecuencias de 1 a 1000 Hz, tomados variando el tiempo de adquisición (negro) o con el tiempo de adquisición constante (rojo). B) Pulso de 1 ms obtenido a partir del espectro de 1 a 65 KHz (negro), o con el espectro de 1Hz a 65 KHz (rojo), tomando las frecuencias bajas

manteniendo el tiempo de adquisición constante. Cada pulso es la media de 100 repeticiones descontada la línea de base.

de registro para lograr una cantidad mínima de ciclos se repita el mismo intervalo relativamente corto de medición (300ms) tantas veces sea necesario para alcanzar la cantidad de ciclos deseados (*Apéndice A*). De esta forma, al tener un mayor control sobre la adquisición de datos de frecuencias de 1 a 1000 Hz (*figura 3.6 A trazo rojo*), se logró eliminar las repeticiones indeseadas. La *figura 5.3 B* muestra esta corrección para un pulso ejemplo de un 1 ms, pero esta corrección funcionó para todos los pulsos mayores a 100  $\mu$ s.

Para responder cuál es el grado de aplicación del espectro obtenido ante un eventual desarmado del sistema se realizó una simulación de los pulsos esperados a partir de los escaneos de frecuencias tomados a 20 mV de la *figura 3.2 A y B*. Para realizar dicha simulación se empleó el programa *OptVoutScanComp* (*Apéndice B*). Empleando el escaneo de frecuencias de la *figura 3.2 A* y un pulso cuadrado, de distinta duración para cada simulación, obtenido con el generador de pulsos simples (*Apéndice B*). Al aplicar el algoritmo de optimización se obtuvo la función de transferencia y se calculó el primer pulso esperado. Utilizando la misma función de transferencia que se calculó anteriormente y reemplazando el escaneo de frecuencias original por el escaneo de frecuencias de la *figura 3.2 B* se calculó el segundo pulso esperado. De esta manera las leves diferencias observadas en los escaneos de frecuencias obtenidos al rearmar el dispositivo de perfusión, generaron diferencias en los pulsos esperados. La *figura 3.7* muestra los pulsos empleados como movimiento deseado (negro) y los pulsos simulados obtenidos en primera instancia (rojo) y luego del rearmado del sistema (verde). La simulación para un pulso de 20  $\mu$ s (*figura 3.7 A y B*) recupero pulsos con una amplitud de 96% previo al desarme y posterior al rearmado del dispositivo, aunque en segunda instancia mostró oscilaciones indeseadas de pequeña amplitud. Para evaluar la evolución temporal de las oscilaciones, se simularon pulsos de mayor longitud. Cuando el pulso simulado duró 1 ms (*figura 3.7 C y D*) la amplitud alcanzada fue de 97% en primera instancia y del 85% luego del rearmado del sistema de perfusión. En este caso las

oscilaciones duraron aproximadamente 0.5 ms, aunque su amplitud no fue mayor al 10%. Un comportamiento similar fue encontrado al aumentar la duración del pulso a 10 ms (figura 3.7 E - G).



**Figura 3.7. Comparación de pulsos simulados.** Se muestran los pulsos simulados a partir del movimiento deseado (negro) y los escaneos de frecuencia de la figura 3.1 A (rojo) y B (verde). Los tres paneles corresponden a los pulsos ultrarápidos de 20  $\mu$ s (A), a los pulsos de 1 ms (C) y a los pulsos de 10 ms (E); mientras

que las figuras B y D son escalas expandidas de A y C. F-G corresponden al comienzo y al final del pulso de 10 ms.

Contrariamente a la intuición, estas simulaciones mostraron que a partir del espectro original, ante un eventual rearmado del sistema de perfusión pueden obtenerse confiablemente pulsos ultra-cortos, ya que estos dependen de la cancelación de vibraciones de alta frecuencia. Los pulsos de mayor duración mostraron menor amplitud que puede traducirse en una menor concentración de agonista aplicada sobre el patch. Teniendo en cuenta esta salvedad, los pulsos largos obtenidos a partir del espectro original, pueden ser aplicados cuando se realicen experimentos a concentración saturante de agonista o si se corrige la concentración de agonista efectiva por la diferencia de amplitud.

### **Generando pulsos aleatorios.**

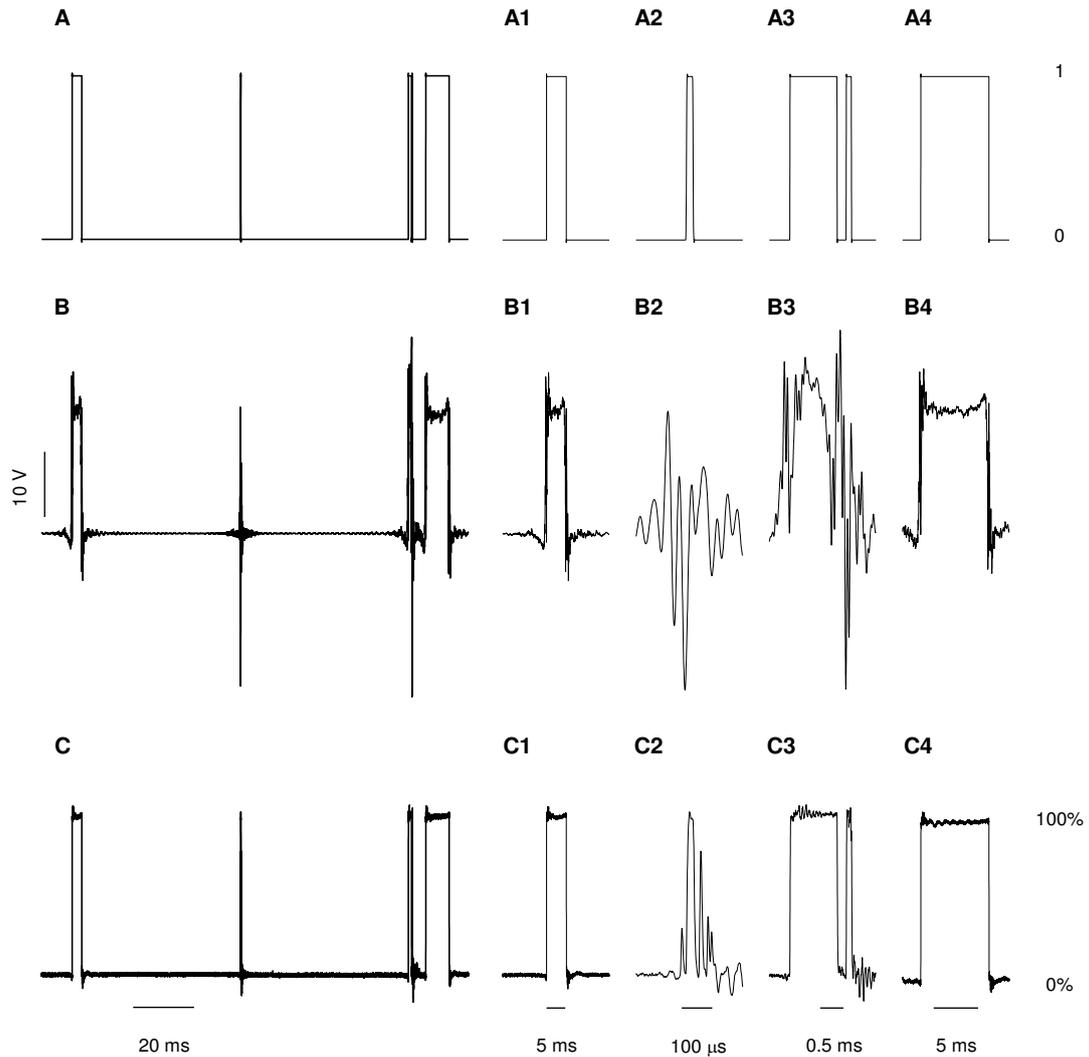
El siguiente desafío fue tratar de obtener aplicaciones aleatorias. Esencialmente la aproximación práctica fue la misma que en el caso anterior en el que se registró el barrido de frecuencias de la interfase entre las soluciones 100 y 10% de NaCl a mitad de altura del plano transversal a la dirección de los flujos y que separa a ambas pipetas una distancia de aproximadamente  $25 \mu\text{m}$  ( $0.5 R$ ). A diferencia del caso anterior donde se usaba un pulso cuadrado de una determinada duración como movimiento deseado en el algoritmo Black-Box, esta vez se utilizó un generador de pulsos aleatorios. Este método permite fijar el intervalo de medición, el ancho del pulso y el tiempo al que aparecerá el primer pulso y genera puntos aleatorios dentro del intervalo de medición, a partir del primer pulso y le aplica el ancho del pulso a cada uno de esos puntos. Mediante este procedimiento se obtiene el movimiento deseado para incluir en el algoritmo y calcular la función de transferencia. En este caso la duración de los pulsos es igual para todos los pulsos dentro de esta función, pero varía el intervalo entre los pulsos. Un problema fundamental de este método de generación de pulsos aleatorios es que muchas veces suelen superponerse dos o más pulsos creando pulsos de mayor duración.

Para evitar que esto ocurra fue necesario definir un intervalo mínimo entre pulsos. Este parámetro debe fijarse teniendo en cuenta el verdadero ancho del pulso para evitar inconvenientes durante la aplicación de soluciones.

Otro aspecto fundamental de este procedimiento es que la amplitud del comando que se le aplica al piezo eléctrico para realizar un desplazamiento depende de la duración de ese movimiento. Así, mientras mayor sea duración del pulso mayor será la amplitud del voltaje comando que deberá entregarse al piezo.

El siguiente paso fue tratar de conseguir pulsos totalmente aleatorios, es decir no solamente en el intervalo que separa a los pulsos sino también en la duración del pulso. El generador de pulsos totalmente aleatorios es similar al descrito anteriormente. Además de contar con generador de puntos aleatorios donde insertará el pulso, cuenta con otro generador de puntos donde finalizara el pulso, en otras palabras por cada punto que genere donde insertar el comienzo de un pulso genera uno donde finaliza el pulso (*Apéndice B*). De esta manera se logran pulsos variables tanto en duración como en intervalos entre pulsos.

El principal problema de esta técnica es que no todos los pulsos deben tener la misma amplitud porque como se mencionó en los párrafos anteriores la amplitud



**Figura 3.8. Pulsos totalmente aleatorios.** El panel superior muestra la secuencia de pulsos totalmente aleatorios. El panel medio representa el comando optimizado para obtener los de intercambio de soluciones que se muestran en el panel inferior. Los cinco pulsos que se muestran en mayor escala tienen duraciones de 3.21 ms ( $A_1$ ); 51  $\mu$ s ( $B_1$ ); 1ms y 121  $\mu$ s ( $3.3 C_1$ ) y por último 7.28 ms, respectivamente.

del comando entregado al piezoeléctrico depende de la duración del movimiento que se desee realizar. Por tal motivo y dado que el generador de pulsos aleatorios genera pulsos normalizados (*figura 3.8 A*), fue necesario modificar el algoritmo para obtener una función de transferencia que pese la amplitud por el tiempo de duración, de manera que sea factible comandar al piezo con una sola amplitud y que la amplitud final que se entrega al piezoeléctrico este modulada por la función de transferencia (*figura 3.8 B*). Los resultados obtenidos para una secuencia de pulsos

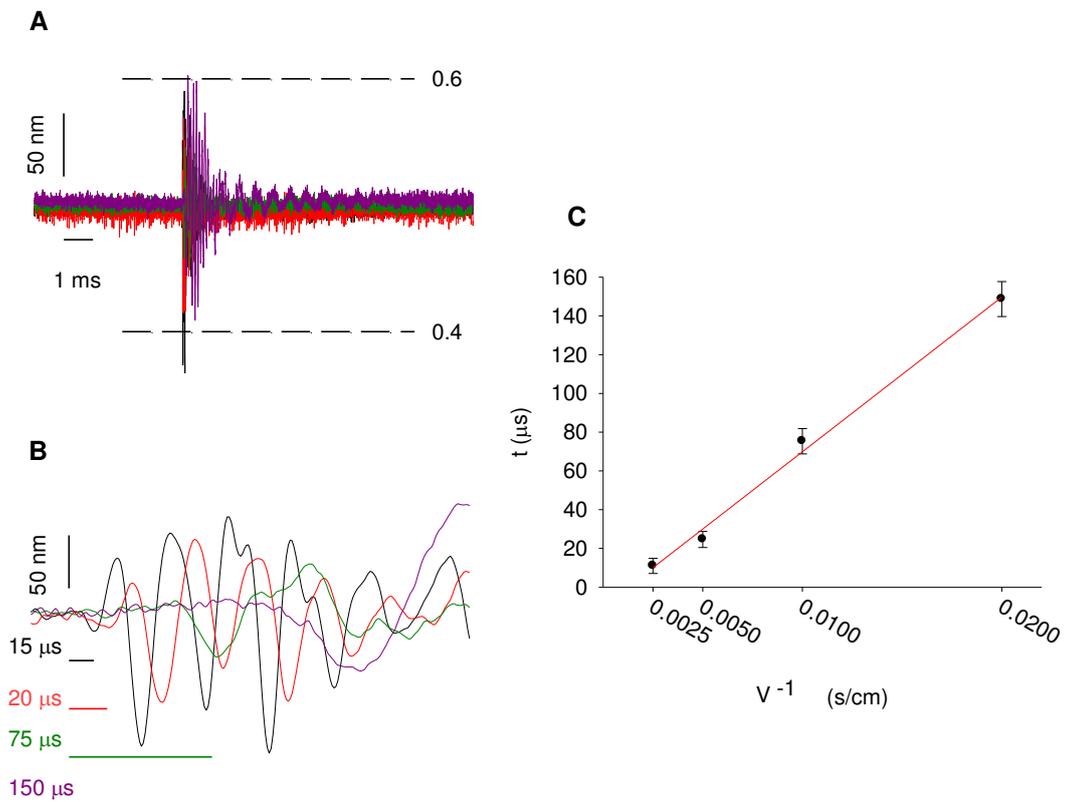
totalmente aleatorios se pueden observar en la *figura 3.8 C*. Esta secuencia pequeña muestra cinco pulsos totalmente aleatorios y resume todas las particularidades expuestas hasta aquí. El primer pulso que muestra esta figura tiene un ancho de 3.21 ms (*figura 3.8 A<sub>1</sub>*); el segundo pulso tiene una duración de 51  $\mu$ s (*figura 3.8 B<sub>1</sub>*); el siguiente dura 1 ms, mientras que el pequeño que está a su lado dura 121  $\mu$ s (*figura 3.8 C<sub>1</sub>*) y por último el quinto pulso dura 7.28 ms (*figura 3.8 D<sub>1</sub>*). En el caso de la función de transferencia empleada para producir los intercambios de soluciones es interesante notar que, como lo mencionado anteriormente, la amplitud varía con la duración del pulso.

El panel inferior de la *figura 3.8* representa los intercambios de soluciones generados con la secuencia de puntos aleatorios. Es interesante notar que los intercambios mayores a 100  $\mu$ s pueden ser resueltos claramente, mientras que los menores presentan varias repeticiones, mostrando que el método aún debe ser mejorado. Cabe señalar que estos resultados fueron obtenidos usando una pipeta de paredes en ángulo, en lugar de las más estables pipetas de paredes paralelas.

### **Efecto de la velocidad de los jets de solución**

En el capítulo anterior se comentó como se realizaron todas las optimizaciones para encontrar pulsos ultra-rápidos y se discutió la posibilidad de bajar la velocidad de los flujos dado que la interfase no aumentaba demasiado de tamaño si el septum de la pipeta de perfusión era lo suficientemente delgado (aproximadamente 3  $\mu$ m). Al comienzo de este capítulo se comentó que los pulsos aleatorios fueron obtenidos con una pipeta de perfusión de paredes paralelas porque la interfase que se formó con esta pipeta resultó mucho más estable que la formada con la pipeta de aplicación con paredes en ángulo, por lo que se simplificó la obtención de pulsos de mayor duración y no se vio afectada la posibilidad de obtener pulsos ultra-cortos. En esta sección se analiza cual es el límite hasta el que puede disminuirse la velocidad y al mismo tiempo obtener pulsos ultra-rápidos, empleando pipetas de perfusión de paredes paralelas con septum de 3  $\mu$ m. Se optó por realizar este análisis con el

método de obtención de pulsos únicos para poder estimar la velocidad de propagación del pulso. El sistema de medición fue el mismo que el comentado en el capítulo anterior, es decir que se posicionaron las pipetas de perfusión y de registro separadas por 25  $\mu\text{m}$  aproximadamente y se realizó el registro en el centro del plano perpendicular al desplazamiento de las soluciones. Se utilizó un pulso cuadrado de 20  $\mu\text{s}$  como voltaje comando y movimiento deseado. Se registró el potencial de juntura entre las soluciones al 10/ y al 100/ empleando como solución del baño una solución del 55/ como en el caso de los pulsos aleatorios. La velocidad de cada una de las soluciones fue seleccionada modificando la presión de nitrógeno que propulsa los émbolos encargados de inyectar las soluciones en el sistema. Nuevamente se empleó el algoritmo “Black Box” para generar los voltajes comando que permitieron obtener los pulsos. El procedimiento se repitió para cada una de las velocidades seleccionadas y se obtuvo un voltaje comando para cada una de ellas. Por último, se probó si cada uno de los voltajes comandos a la velocidad de las soluciones correspondientes podía dar pulsos ultra-rápidos. La figura 3.9 A muestra la corriente registrada en la región lineal de la interfase (0.4-0.6), en respuesta a un voltaje comando cuadrado de 20  $\mu\text{s}$  de duración y 50 mV de amplitud y la relación lineal entre las velocidades y el tiempo de retardo del movimiento (*figura 3.9 C*). Es interesante notar que la amplitud del movimiento fue cada vez menor a medida que aumentó el ancho de la interfase dado que se mantuvo constante la amplitud del pulso que los originó (*figura 3.9 A y B*). Para realizar el análisis del retardo del movimiento con la velocidad del flujo se tomó un punto fijo y se midió el tiempo hasta la primera oscilación (*figura 3.9 B, barras de color*) Contrariamente a lo comentado en el capítulo anterior, se logró obtener pulsos ultra-rápidos con la primera optimización, debido a la estabilidad de la interfase, tal cual sucedió con la obtención de pulsos al emplear el método del escaneo de frecuencias. Los pulsos ultra-rápidos obtenidos con la primera optimización por la aplicación de un voltaje comando de 10 V, variaron la amplitud, el ancho y el tiempo de subida, conforme con la disminución de la velocidad de las soluciones (*figura 3.10*).



**Figura 3.9. Efecto de la disminución de la velocidad del flujo.** Las velocidades de los flujos fueron de 400 cm/s (negro), 200 cm/s (rojo), 100 cm/s (verde) y 50 cm/s (violeta). A) Corriente registrada en la región lineal de la interfase (40-60%), expresada como movimiento de la interfase en respuesta a un pulso cuadrado de 20  $\mu$ s y 50 mV de amplitud. B) Escala expandida de A mostrando los retardos para las distintas velocidades. C) ajuste lineal entre el retardo y la inversa de la velocidad del flujo. Pendiente 797.6 y ordenada -9.855. Cada punto es la media  $\pm$  SD de cinco mediciones.

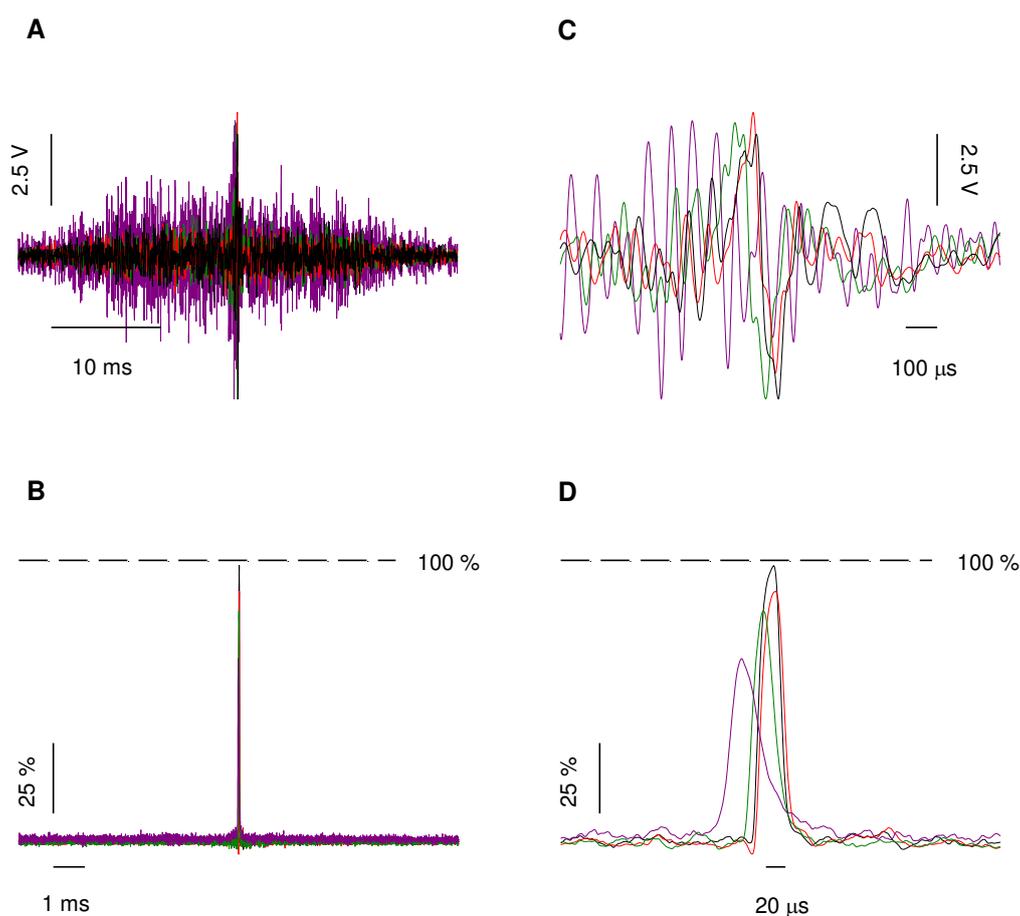
Estas variaciones no pudieron ser compensadas al aumentar el voltaje del pulso comando. La disminución de la velocidad de los flujos, en particular a 50 cm/s, retornó un voltaje comando con muchas más oscilaciones que los voltajes comando obtenidos a mayor velocidad (*figura 3.10 A*). El hecho de que el gradiente de concentraciones entre ambas soluciones sea cada vez más ancho, producto del aumento del ancho de la interfase por disminución de la velocidad de los flujos, hace que muchas de las oscilaciones no sean correctamente amortiguadas por el algoritmo. Esto, sumado al hecho de que el retardo en el movimiento es mayor a media que aumenta el ancho del gradiente de concentraciones (*figura 3.10*), permite

suponer que a medida que la velocidad de los flujos disminuye menor es la probabilidad de obtener pulsos ultra-rápidos y sin repeticiones. Esto es ejemplificado en la *figura 3.10 B y D*, donde se muestran los pulsos obtenidos en respuesta al voltaje comando. Dichos pulsos resultaron no tener repeticiones pero su amplitud como su localización temporal fue variando. La *tabla 3.1* (primera optimización) muestra los valores de amplitud, ancho medio y tiempo de subida, para cada uno de estos pulsos. Teniendo en cuenta que en el capítulo anterior se mostró que los pulsos ultra-rápidos se obtuvieron con una segunda optimización, fue natural pensar que una nueva optimización podría mejorar el rendimiento cuando la velocidad fuese menor a 200 cm/s. Para corroborar que los efectos observados fueron debidos a la disminución de la velocidad de los flujos y no una falta de optimización, se registró nuevamente el movimiento de la interfase para todas las velocidades empleadas anteriormente, utilizando el voltaje comando calculado en la primera optimización y se realizó una nueva optimización. Los resultados de esta nueva optimización se muestran en la *figura 3.10* y los valores de cada parámetro se encuentran en la *tabla 3.1* (segunda optimización).

Primer Optimización				Segunda Optimización		
Flujo (cm/s)	Amplitud (%)	Duración media ( $\mu$ s)	Tiempo de subida ( $\mu$ s)	Amplitud (%)	Duración media ( $\mu$ s)	Tiempo de subida ( $\mu$ s)
50	63.69 $\pm$ 2.48	34.5 $\pm$ 3.6	18,8 $\pm$ 2.3	19.66 $\pm$ 1.34	32.3 $\pm$ 3.1	18.4 $\pm$ 2.7
100	81.48 $\pm$ 2.02	25. 5 $\pm$ 2.2	12.3 $\pm$ 1.6	82.93 $\pm$ 3.04	24.1 $\pm$ 2.4	12.9 $\pm$ 1.8
200	88.18 $\pm$ 2.17	24.8 $\pm$ 1.7	12.9 $\pm$ 1.7	92.12 $\pm$ 3.71	26. 1 $\pm$ 2.3	13.5 $\pm$ 1.1
400	97.01 $\pm$ 0.49	24.3 $\pm$ 1.3	13.3 $\pm$ 1,1	92.68 $\pm$ 4.29	26.8 $\pm$ 1.5	13.1 $\pm$ 0.4

**Tabla 3.1 Optimizaciones para distintas velocidades.** Se muestran la amplitud del pulso, la duración tomada a mitad de altura y el tiempo de subida tomado entre el 10 -90/ de la amplitud del pico, obtenidos con la primera y para la segunda optimización del movimiento, en función a la velocidad de los flujos.

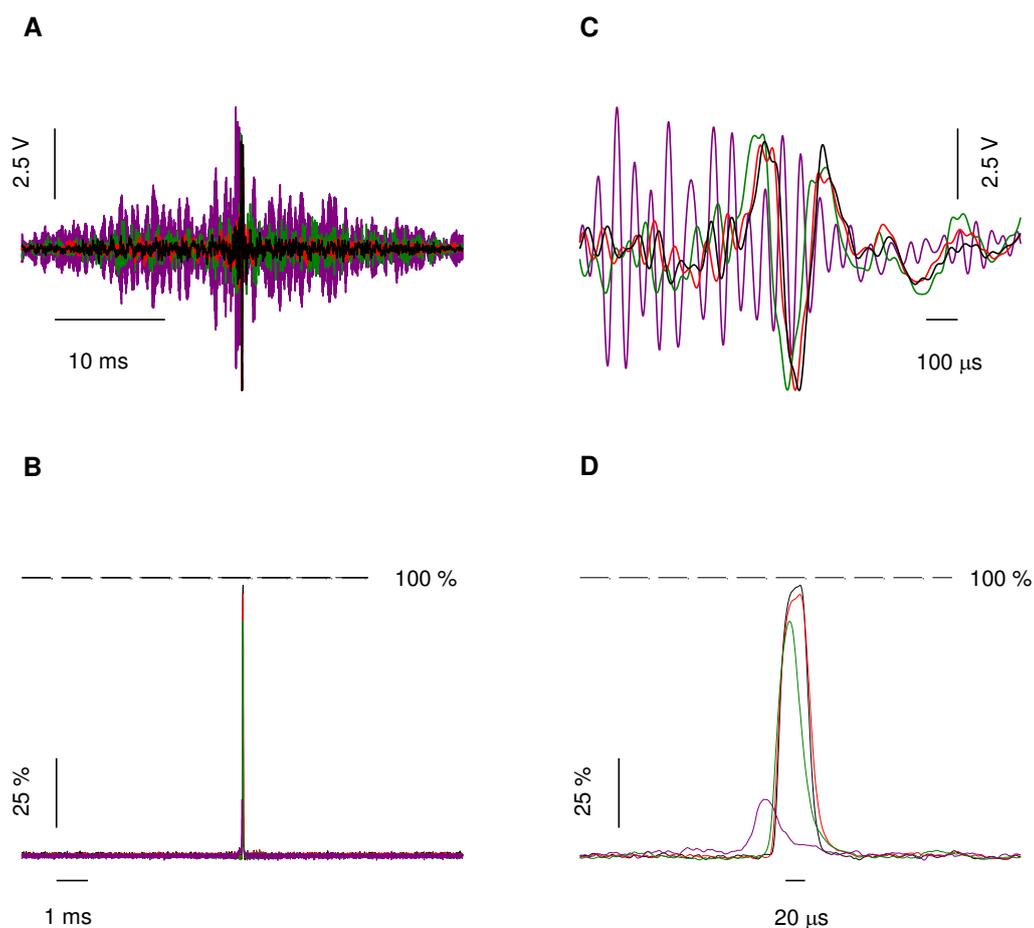
Esencialmente una nueva optimización no produce mejoras sustanciales tanto en la amplitud como en el tiempo de subida como en el ancho medio de cada pulso para las velocidades de 400 a 100 cm/s (*figura 3.11*). En el caso particular de los pulsos obtenidos a 50 cm/s, la nueva optimización no solo que no mejoro el rendimiento anterior, si no que esta vez se obtuvieron pulsos de amplitud 3 veces menores. Al igual que en la primera optimización estos defectos no pudieron ser corregidos ni por un aumento del voltaje entregado al piezo ni por un reposicionamiento de las pipetas. Con respecto al tiempo de subida y al ancho medio no varió entre las optimizaciones, aunque independientemente de la optimización, ambas parámetros fueron mayores a los obtenidos a velocidades mayores (*tabla 3.1*).



**Figura 3.10. Primera optimización para distintas velocidades.** Las velocidades de los flujos fueron de 400 cm/s (negro), 200 cm/s (rojo), 100 cm/s (verde) y 50 cm/s (violeta). A) se muestra los voltajes comandos obtenidos para cada una de las velocidades de los flujos. B)

Pulsos ultra-rápidos obtenidos con los voltajes comando expresados como porcentaje del cruce del gradiente de concentraciones. C y D) escalas expandidas de A y B.

En conjunto, estos resultados muestran que se pueden obtener confiablemente pulsos ultra-rápidos empleando velocidades de 200 cm/s, con amplitudes de aproximadamente 90% de intercambio de soluciones y con anchos medios de aproximadamente 25  $\mu$ s. A pesar de que los valores de tiempo de subida y ancho medio de los pulsos obtenidos a 100 cm/s son comparables a los obtenidos a velocidades mayores, su amplitud fue considerablemente menor (80 / aproximadamente). Por tal motivo se estableció como límite en la velocidad de 200 cm/s.



**Figura 3.11. Segunda optimización.** Las velocidades de los flujos fueron de 400 cm/s (negro), 200 cm/s (rojo), 100 cm/s (verde) y 50 cm/s (violeta). A) voltajes

comandos para cada una de las velocidades. B) pulsos ultra-rápidos obtenidos con los voltajes comandos a cada velocidad, expresados como porcentaje de cruce de la interfase. C) escala expandida de A donde las oscilaciones son similares a las de la primera optimización. D) escala expandida de B. La amplitud de los pulsos es similar a la de la primera optimización salvo para el pulso obtenido a 50 cm/s, donde la amplitud es notoriamente menor.

## DISCUSIÓN.

Durante el desarrollo de este capítulo se expusieron procedimientos para obtener pulsos aleatorios empleando el escaneo de frecuencias como método para enriquecer en frecuencias bajas los registros de la interfase entre las soluciones. De esta manera se pudieron obtener pulsos ultra-rápidos y pulsos de aplicación de soluciones más largos. En la construcción de este método fue esencial la arquitectura de la pipeta de aplicación. Anteriormente se discutió como afectaba el ancho del septum de la pipeta de aplicación a la interfase entre las soluciones. Como se mostró en el *Capítulo 2* un septum de más ancho produce contaminación de la interfase con la solución del baño a velocidades relativamente bajas, mientras que si se disminuye su espesor con HF al 10% se puede aumentar la velocidad sin observar la contaminación con la solución del baño y se extiende el rango de condiciones en los que se puede trabajar para obtener pulsos ultra-rápidos. En este capítulo se describió un cambio fundamental en la arquitectura de la pipeta de perfusión. Esta vez las pipetas de perfusión fueron estiradas de manera que sus paredes fuesen paralelas y no en un ángulo de 15° como en el *Capítulo 2*. Esta decisión se basó en que el perfil de velocidades en una sección transversal a la dirección de propagación de los fluidos sigue una distribución normal, con la máxima velocidad hacia el interior y velocidades menores hacia la periferia. Por ende, si dos fluidos con estas características colisionan con un ángulo entre sí, puede esperarse que formen una interfase inestable y dificulten la medición de sus vibraciones. Por el contrario, si dos flujos colisionan entre sí con un ángulo muy pequeño, como el que les proporciona la

pipeta de perfusión con paredes paralelas, se producirá una interfase mucho más estable y pueden registrarse por periodos más largos las vibraciones de la interfase

El método de escaneo de frecuencias fue concebido con el procedimiento inverso al método de los pulsos individuales. En vez de registrar las vibraciones de la interfase producto de un movimiento y descomponerlas en cada una de las frecuencias que las componen, se registró las vibraciones para cada una de las frecuencias seleccionadas y se obtuvo la función de transferencia para el movimiento deseado. La mayor estabilidad de la interfase contribuyó al aumento en la repetitividad de los resultados por lo que los espectros de poder para el dispositivo una vez que se rearmó todo el sistema de perfusión resultó muy similar al espectro original y los pulsos que se obtuvieron a partir de cada uno de ellos fueron prácticamente indistinguibles. Las correcciones realizadas sobre el sistema de adquisición de datos permitieron aumentar la robustez del método.

Quizás la mayor estabilidad del sistema, producto del cambio en la construcción de la pipeta de perfusión, permite equiparar el método de los pulsos aleatorios con el de los pulsos individuales, ya que en esencia ambos son iguales. Los experimentos que se muestran en la última sección de este capítulo estuvieron destinados a responder esta pregunta. Por tal motivo y empleando el generador de pulsos aleatorios se construyó un voltaje comando inicial y se lo aplico junto con el método de los pulsos individuales para obtener pulsos de mayor duración que los ultra-cortos. De esta manera se demostró que ambos métodos pueden ser aplicados por igual para construir pulsos de cualquier duración y separados por cualquier intervalo de tiempo.

Dado que los registros de la interfase dependen de varios factores como las vibraciones del piezoeléctrico y la de los demás elementos del sistema de perfusión fue importante determinar la reproducibilidad del método, es decir si una función de transferencia puede ser empleada en distintas ocasiones (días experimentales), en los que se reposicionan las pipetas o es necesario medir un nuevo espectro cada vez. Bajo este criterio se puede emplear la medición de un pulso particular como

control de la estabilidad del sistema, de forma que si no se reproducen los resultados previos, convendrá realizar el escaneo de frecuencias nuevamente.

Los pulsos aleatorios son una herramienta potencialmente fascinante dado que abren la puerta a realizar análisis cinéticos con mayor rapidez donde eventualmente se puede obtener toda la información cinéticas en muy pocos pasos. Además mediante estos análisis se pueden identificar mecanismos de acción de una batería de fármacos con relativa facilidad.

# *Capítulo 4*

# *“Simulaciones y método macroscópico recursivo.”*

## **INTRODUCCIÓN**

Los canales iónicos son proteínas de la membrana celular que acoplan su funcionamiento a factores externos como por ejemplo la concentración de un agonista y/o el voltaje de la membrana celular [75]. La modelización del comportamiento de canales iónicos se utiliza para describir su funcionamiento. Los parámetros obtenidos a partir de los registros de la corriente de los canales se pueden optimizar bajo un modelo determinado, empleando la función de la máxima verosimilitud, definida como la probabilidad de obtener los datos experimentales en función del valor de los parámetros dado un modelo cinético determinado. La estimación de la máxima verosimilitud utiliza métodos de optimización multivariada para encontrar los parámetros para los cuales la verosimilitud es máxima. Para los registros de canal único la función de verosimilitud puede ser estimada por el algoritmo recursivo de cadenas de Markov ocultas [278]. Para las corrientes macroscópicas la función de

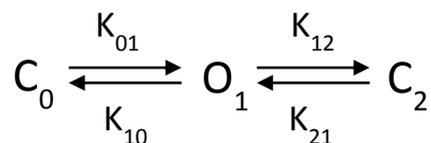
verosimilitud puede construirse empleando el método microscópico recursivo (MicroR) [279] que extiende el cálculo de canales únicos a muchos canales. Este método es aunque exacto, el más caro computacionalmente ya que su costo escala como dos veces el número de estados elevado a la cantidad de canales. Por otra parte puede obtenerse una función de verosimilitud simplificada empleando la aproximación macroscópica no recursiva (MacroNR) [246], que aproxima la distribución de estados a una distribución continua y considerando cada muestra independiente de las demás. Solo hace uso de la varianza de las fluctuaciones aleatorias de los datos, pero no tiene en cuenta la correlación temporal de dichas fluctuaciones. Otra aproximación es el ajuste de la covarianza, que ajusta la magnitud de la corriente registrada y la correlación entre los diferentes puntos temporales. Este último método escala su costo computacional con el cuadrado del número de muestras y es limitado en el número de puntos que puede emplear por lo que no puede analizar un conjunto entero de datos. El algoritmo macroscópico recursivo (MacroR) [223] es un método que aproxima la función de verosimilitud de un set entero de datos y que tiene en cuenta la correlación temporal de los datos. MacroDR es una modificación de Macro R, que tiene en cuenta el hecho de que las mediciones de corrientes de membrana no son instantáneas sino promedios temporales.

## **METODOLOGÍA Y RESULTADOS**

### **MacroR vs MacroDR**

El método macroscópico recursivo (MacroR) combina una exactitud cercana al método microscópico recursivo y un costo computacional algo mayor a la simplificación macroscópica no recursiva, por lo que es el método indicado para el cálculo de la verosimilitud de los parámetros de un modelo. MacroDR es una modificación de MacroR, que subdivide el tiempo del registro en pequeños intervalos de tiempo, analiza en cada intervalo la probabilidad que tiene un canal de cambiar de estado y con eso calcula la conductancia promedio y la varianza

de la conductancia promedio. De este modo permite analizar registros que son promedios temporales y no registros instantáneos de corriente. Para determinar cuáles son las condiciones en las que MacroDR puede realizar un buen ajuste a los datos experimentales, se consideró un modelo sencillo donde se postuló que los canales tienen tres posibles estados (figura 4.1). Un estado cerrado que luego de la unión del agonista con una constante cinética  $K_{12}$ , cambia su conformación a un estado permisivo, en el que aumenta su conductancia y luego pasa a un estado inactivado con una constante cinética  $K_{23}$ . Además de las constantes cinéticas, el modelo empleado tiene en cuenta la cantidad de canales presentes en el patch, que fue de 100; 1000 o 10000 dependiendo el caso, y el ruido de medición a una frecuencia de 1 KHz. El experimento diseñado para realizar el ajuste de los datos y la comparación de MacroR con MacroDR consistió en un salto de concentración de agonista de 0 a 1 M con una duración de 40 ms y una frecuencia de muestreo de 0.5; 5 o 50 KHz. Los ajustes de los datos fueron realizados tanto con MacroR como con MacroDR y se varió la cantidad de intervalos en los que se dividió el registro en 1; 10 o 100 pasos.



**Figura 4.1. Esquema del modelo cinético (modelo 1).** Modelo de tres estados donde el primer estado corresponde al canal cerrado, el segundo corresponde al canal permisivo y el tercero corresponde al canal inactivado. Las constantes cinéticas fueron tomadas de la publicación original de MacroR *“Estimation of ion channel kinetics from fluctuations of macroscopic currents”* L. Moffatt [223].

La *tabla 4.1* muestra los resultados obtenidos en la comparación de los dos métodos variando el número de canales en cada simulación. Cada valor es la media de las optimizaciones de 30000 simulaciones, manteniendo constante la división del intervalo de registro en 10 pasos y la frecuencia de muestreo en 50 KHz (para una mejor descripción del algoritmo ver materiales y métodos). Los

cálculos fueron corridos en dos nodos, uno con 10 núcleos correspondiente al Center for the Study of Complex Systems de la *University of Michigan* y otro con 40 núcleos correspondientes al *Instituto de Química, Física, Medio Ambiente y Energía de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires*. Las constantes ajustadas fueron comparadas usando un análisis de varianza de una vía y un test de comparación múltiple de Dunnett, que permite analizar la significancia de cada valor obtenido con respecto al inicial. La optimización de los parámetros empleando MacroR, con un modelo que tiene 100 canales, reprodujo aceptablemente los datos iniciales de los parámetros. A medida que se incrementó el número de canales MacroR perdió poder de optimización. Por el contrario el aumento en la cantidad de canales incrementó el poder de optimización de MacroDR, tal es así que con 10000 canales solo la  $K_{01}$  mostro una pequeña diferencia con el valor inicial. Independientemente de la cantidad de canales, tanto MacroR como MacroDR mostraron que el valor de la verosimilitud calculado fue similar al esperado, confirmando que el cálculo fue correctamente realizado.

Dado que el resultado de la aplicación del algoritmo de optimización puede variar según la información del sistema y esta a su vez varía con la cantidad de canales y la frecuencia de adquisición, el siguiente paso fue variar la frecuencia de muestreo, manteniendo constante la cantidad de pasos de la optimización y el número de canales del modelo (*tabla 4.2*). Como las diferencias en el ajuste a favor de MacroDR se incrementan con el aumento del número de canales, se eligió mantener constante esta cantidad en 1000 canales. En este caso en particular se fijó la duración de cada sub-step en 20  $\mu$ s para evitar desfasajes correspondientes al cambio en la frecuencia de adquisición. De este análisis surgió una diferencia fundamental en el funcionamiento de los dos algoritmos, dado que MacroR considera que durante el intervalo de medición el estado del canal no cambió, al disminuir la frecuencia de adquisición, la pérdida de información es sustancial y hace que el algoritmo no pueda optimizar los valores de los parámetros. Por otra parte, los valores optimizados con una frecuencia de muestreo de 50 KHz fueron notablemente coincidentes con los

encontrados para el análisis del número de canales (*tabla 4.1*), a pesar de que en este caso el tiempo del sub-step fue fijado mientras en el caso anterior no. Este fenómeno es atribuible a que el algoritmo calcula la duración del sub-step como la inversa de la frecuencia de muestreo, por lo tanto en ambos casos el ancho del sub-step es el mismo. Al igual que en el análisis anterior el logaritmo de la verosimilitud coincidió con el logaritmo de la verosimilitud esperada, corroborando que el cálculo fue bien realizado. A diferencia de MacroR, MacroDR permite realizar un buen ajuste de los datos aun en frecuencias tan pequeñas como 500 Hz. Un incremento en la variabilidad de los ajustes fue observado con la disminución de la frecuencia.

Variables	Cond. Inicial	MacroR		
		100 canales	1000 canales	10000 canales
CU (pA)	1	0.9737 ± 0.0126	0.8741 ± 0.0098 *	1.208 ± 0.009 *
K <sub>01</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	500	504.49 ± 6.67	518.59 ± 4.50 **	668.60 ± 1.52**
K <sub>10</sub> (s <sup>-1</sup> )	200	206.75 ± 3.23 *	194.78 ± 2.49*	74.41 ± 1.03**
K <sub>12</sub> (s <sup>-1</sup> )	100	100.83 ± 1.97	97.76 ± 1.28	72.85 ± 0.21**
K <sub>21</sub> (s <sup>-1</sup> )	50	50.90 ± 0.64	50.79 ± 0.32	49.26 ± 0.05
N canales	--	102.96 ± 2.26	1115.87 ± 20.74 **	6285.47 ± 62.77 **
DS 1KHz	1	4.31e-3 ± 3.47e-6	3.81e-3 ± 1.28e-5	13.82e-3 ± 2.05e-5
Log-V	--	3430092 ± 1145	4460149 ± 1273	6599831 ± 992
Log-V*	--	3430098 ± 1152	4460149 ± 1273	6599829 ± 994

Variables	Cond. Inicial	MacroDR		
		100 canales	1000 canales	10000 canales
CU (pA)	1	0.9684 ± 0.012	0.9775 ± 0.010	1.0161 ± 0.0078
K <sub>01</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	500	521.34 ± 7.98 **	514.05 ± 4.66 **	510.92 ± 2.16 *
K <sub>10</sub> (s <sup>-1</sup> )	200	210.92 ± 3.47**	207.67 ± 2.48*	196.89 ± 1.76
K <sub>12</sub> (s <sup>-1</sup> )	100	99.78 ± 2.07	99.96 ± 1.36	98.46 ± 0.46
K <sub>21</sub> (s <sup>-1</sup> )	50	52.73 ± 0.74	52.24 ± 0.32	50.68 ± 0.06
N canales	--	102.78 ± 2.33	1020.16 ± 18.66	9699.28 ± 115.73
DS 1KHz	1	4.46e-3 ± 302e-5	4.48e-3 ± 7.20e-6	4.61e-3 ± 1.63e-5
Log-V	--	3429635 ± 1119	4426846 ± 828	6234085 ± 766
Log-V*	--	3429635 ± 1117	4426868 ± 836	6234118 ± 768

**Tabla 4.1 MacroR vs. MacroDR, variación del número de canales.** Se muestran medias ± DS (n=30000) de todos los parámetros obtenidos por ambas optimizaciones manteniendo constante la frecuencia de muestreo (50 KHz) y la cantidad de pasos (10), donde K<sub>01</sub>, K<sub>10</sub>, K<sub>12</sub> y K<sub>21</sub> representan las constantes cinéticas del modelo de la *figura 4.1*, DS 1KHz es el desvío estándar a 1 KHz. Log-V y Log-V\* son el logaritmo de la verosimilitud y el logaritmo de la verosimilitud esperada respectivamente. \* P<0.05; \*\* P<0.001 calculadas por one-way ANOVA y test de comparación múltiple de Dunnett.

El paso siguiente en la comparación del funcionamiento de los dos métodos fue variar la cantidad de pasos necesarios para realizar el cálculo, manteniendo constantes el número de canales del modelo y la frecuencia de muestreo (*tabla 4.3*). La frecuencia elegida fue 50 KHz, ya que como se mostró anteriormente a frecuencias menores MacroR no puede optimizar los datos. El número de canales elegidos fue de 100. A demás ambas cantidades fueron elegidas para independizar la mejora del funcionamiento de MacroDR por el

aumento en el número de canales y por la disminución de la frecuencia, del posible efecto que tendría variar el número de pasos en el cálculo. A priori el aumento en la cantidad de pasos no debería afectar el funcionamiento de MacroR ya que este no considera la posibilidad de que el estado del canal pueda fluctuar en el intervalo de medición, este efecto si debería notarse en MacroDR ya que este sí considera esta posibilidad.

La *tabla 4.3* muestra que la predicción para MacroR fue correcta, es decir, MacroR resultó insensible al incremento en la en la cantidad de pasos. Por otra parte, el funcionamiento de MacroDR no cumplió la predicción ya que las optimizaciones resultaron independientes de la cantidad de pasospasos en los que se subdividió el intervalo de medición. Contrariamente a lo sucedido con la disminución de la frecuencia de registro (*tabla 4.2*) en la se evidenció un incremento en la variabilidad, la modificación del número de pasospasos no registró cambios en los desvíos estándar.

Variables	Cond. Inicial	MacroR		
		0.5 KHz	5 KHz	50 KHz
CU (pA)	1	--	--	0.8692 ± 0.0068 **
K <sub>01</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	500	--	--	525.74 ± 2.99 **
K <sub>10</sub> (s <sup>-1</sup> )	200	--	--	188.77 ± 1.91 **
K <sub>12</sub> (s <sup>-1</sup> )	100	--	--	96.18 ± 0.82 **
K <sub>21</sub> (s <sup>-1</sup> )	50	--	--	50.61 ± 0.31
N canales	1000	--	--	1106.81 ± 13.89 **
DS 1KHz	1	--	--	4.08e-3 ± 6.46e-6
Log-V	--	--	--	4389803 ± 1184
Log-V*	--	--	--	4389803 ± 1183

Vari ables	Cond. Inicial	MacroDR		
		0.5 KHz	5 KHz	50 KHz
CU (pA)	1	0.9994 ± 0.0242	0.9913 ± 0.0149	0.9783 ± 0.0081
K <sub>01</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	500	500.41 ± 9.51	502.72 ± 5.11	515.52 ± 3.71 **
K <sub>10</sub> (s <sup>-1</sup> )	200	200.26 ± 6.75	202.33 ± 3.15	207.57 ± 2.14 *
K <sub>12</sub> (s <sup>-1</sup> )	100	100.10 ± 2.25	100.51 ± 1.26	99.59 ± 1.01
K <sub>21</sub> (s <sup>-1</sup> )	50	50.11 ± 0.25	50.98 ± 0.21	52.11 ± 0.31 *
N canales	1000	1002.13 ± 41.97	1010.46 ± 24.16	1017.34 ± 14.55
DS 1KHz	1	4.48e-3 ± 9.34e-5	4.46e-3 ± 3.14e-6	4.48e-3 ± 4.23e-6
Log-V	--	70095 ± 89	577589 ± 357	4355066 ± 1300
Log-V*	--	70095 ± 89	577591 ± 358	4355157 ± 1223

**Tabla 4.1 MacroR vs. MacroDR, análisis de la frecuencia de muestreo.** Se muestran medias ± DS (n=30000) de todos los parámetros obtenidos por ambas optimizaciones, manteniendo constantes el número de canales (1000) y la cantidad de pasos (10), donde K<sub>01</sub>, K<sub>10</sub>, K<sub>12</sub> y K<sub>21</sub> representan las constantes cinéticas del modelo de la figura 4.1, DS 1KHz es el desvío estándar a 1 KHz. Log-V y Log-V\* son el logaritmo de la verosimilitud y el logaritmo de la verosimilitud esperada respectivamente. \* P<0.05; \*\* P<0.001 calculadas por one-way ANOVA y test de comparación múltiple de Dunnett.

Salvo en las constantes cinéticas que describen el pasaje del canal del estado cerrado al abierto y del abierto al inactivado se observó una tendencia a mejorar el ajuste con MacroDR, el resto de los parámetros permanecieron relativamente insensibles al incremento en la cantidad de pasos. Nuevamente, el valor calculado del logaritmo de la verosimilitud coincidió con el esperado, corroborando que el cálculo estuvo bien realizado.

Variables	Cond. Inicial	MacroR		
		1 PASO	10 PASOS	!00 PASOS
CU (pA)	1	0.9950 ± 0.0112	0.9755 ± 0.0131	0.9690 ± 0.0088 *
K <sub>01</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	500	517.27 ± 7.16 *	504.55 ± 5.83	501.67 ± 5.82
K <sub>10</sub> (s <sup>-1</sup> )	200	202.08 ± 2.99	206.50 ± 3.46 *	207.32 ± 2.31 **
K <sub>12</sub> (s <sup>-1</sup> )	100	98.61 ± 2.08	100.80 ± 2.08	101.54 ± 1.88
K <sub>21</sub> (s <sup>-1</sup> )	50	50.84 ± 0.72	50.88 ± 0.78	50.99 ± 0.58
N canales	100	98.98 ± 2.02	102.77 ± 2.38	103.89 ± 1.78 *
DS 1KHz	1	4.34e-3 ± 3.07e-6	4.30e-3 ± 3.72e-6	4.30e-3 ± 3.40e-6
Log-V	--	3442981 ± 976	3430618 ± 987	3429588 ± 1021
Log-V*	--	3442981 ± 974	3430624 ± 991	3429576 ± 1011

Variables	Cond. Inicial	MacroDR		
		1 PASO	10 PASOS	!00 PASOS
CU (pA)	1	0.9859 ± 0.0103	0.9710 ± 0.0131	0.9649 ± 0.0085 *
K <sub>01</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	500	534.37 ± 7.71 **	522.48 ± 7.7 **	519.84 ± 6.23 **
K <sub>10</sub> (s <sup>-1</sup> )	200	207.22 ± 2.82 **	210.68 ± 3.53 **	211.41 ± 2.31 **
K <sub>12</sub> (s <sup>-1</sup> )	100	97.73 ± 2.09	99.39 ± 2.36	100.20 ± 1.87
K <sub>21</sub> (s <sup>-1</sup> )	50	52.82 ± 0.7 *	52.67 ± 0.94 *	52.86 ± 0.61 *
N canales	100	99.32 ± 1.94	102.32 ± 2.37	103.41 ± 1.73 *
DS 1KHz	1	4.51e-3 ± 2.86e-06	4.46e-3 ± 3.05e-6	4.47e-3 ± 2.57e-6
Log-V	--	3442287 ± 972	3430143 ± 1164	3429097 ± 961
Log-V*	--	3442311 ± 985	3315798 ± 1180	3429095 ± 962

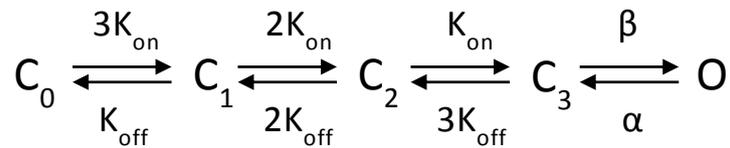
**Tabla 4.3 MacroR vs. MacroDR, análisis de la cantidad de pasos.** Se muestran las medias  $\pm$  DS (n=30000) de todos los parámetros obtenidos por ambas optimizaciones manteniendo constantes la cantidad de canales (100) y la frecuencia de muestreo (50 KHz), donde K01, K10, K12 y K21 representan las constantes cinéticas del modelo de la figura 4.1, DS 1KHz es el desvío estándar a 1 KHz. Log-V y Log-V\* son el logaritmo de la verosimilitud y el logaritmo de la verosimilitud esperada respectivamente. \* P<0.05; \*\* P<0.001 calculadas por one-way ANOVA y test de comparación múltiple de Dunnett.

## Simulaciones

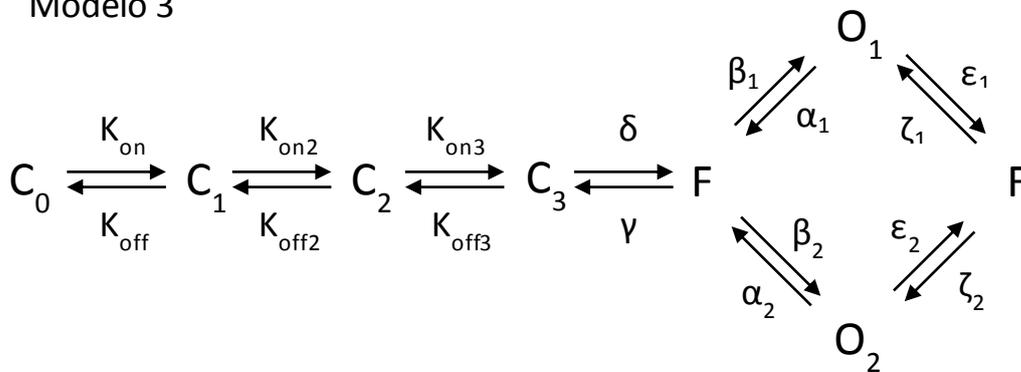
En la sección anterior se realizó el análisis de las condiciones en las que MacroDR puede ser aplicado con respecto a MacroR. En esta sección se muestra cómo se puede utilizar MacroDR para ajustar modelos experimentales a partir de los resultados obtenidos y como pueden predecirse un set de experimentos para corroborar un modelo determinado empleando en todos los casos una frecuencia de adquisición de datos de 10KHz, 1000 canales y 10 Pasos. Tanto MacroR como MacroDR tienen que ser alimentados con experimentos y con modelos para realizar la optimización de los parámetros. En el caso de contar con los registros de las corrientes de los canales y con un modelo determinado el resultado de la optimización será el ajuste de los resultados experimentales al modelo planteado a priori. Por otra parte, en el caso de no contar con registros experimentales, puede emplearse a MacroDR en forma predictiva ya que el programa permite programar protocolos experimentales, simular los resultados y empleando un modelo a priori optimizar los parámetros del mismo. De esta manera se puede analizar de forma muy sencilla cual es el set de experimentos que permitiría encontrar una combinación de resultados para resolver un modelo determinado. En este marco y con el objetivo de establecer la potencialidad de MacroDR para resolver modelos más complejos con relevancia fisiológica se decidió emplear cuatro modelos de complejidad creciente con distintos protocolos experimentales. El *modelo1* es el que se muestra en la *figura 4.1* mientras que los *modelos 2, 3 y 4* (*figura 4.2*) fueron planteados para el canal P2X<sub>2</sub> por L. Moffatt y R. Hume y por D. Papke y C. Grosman [204, 280] para el mismo canal. El *modelo 2* considera que cada uno de los tres sitios de unión, dispuestos cada uno en la región en la que contactan dos subunidades vecinas,

tiene la misma probabilidad de unir una molécula del agonista (ATP) y que una vez que la tercera molécula se une al sitio de unión ocurre el gating del canal.

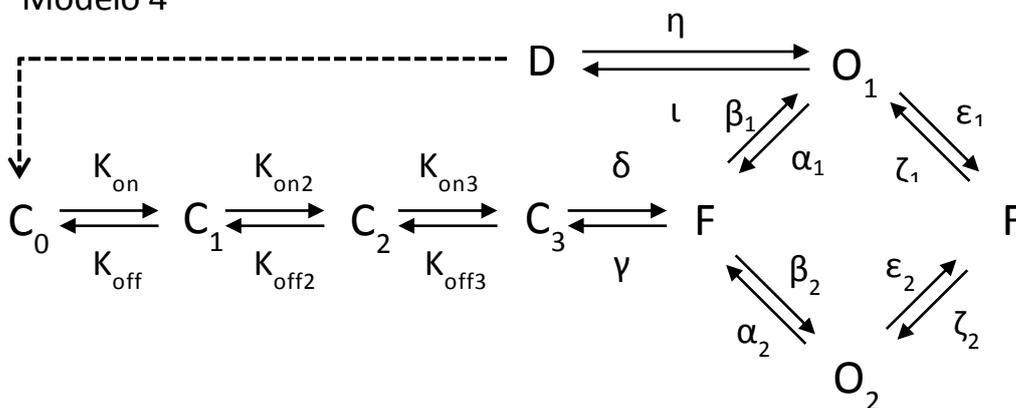
### Modelo 2



### Modelo 3



### Modelo 4



**Figura 4.2. Modelos del comportamiento de P2X2 (modelos 2-4).** Los modelos 2 y 3 fueron extraídos de “Responses of rat P2X2 receptors to ultra-short pulses of ATP provide insights into ATP unión and channel gating” [204] donde cada uno de los estados C corresponden al canal cerrado y al unión de cada uno de los agonistas con sus respectivas constantes cinéticas, F es el estado flip y O son los estados abiertos de distinta estabilidad. El modelo 4 fue tomado de “Desensitization of neurotransmitter-gated ion channels during high-frequency stimulation: a comparative study of Cys-loop, AMPA and purinergic receptors” [280] donde el estado D corresponde al estado desensitizado.

Este modelo puede ser descrito con solo 7 parámetros (constantes cinéticas, conductancia unitaria, número de canales y el ruido a 1 KHz.), dado que las constantes cinéticas que describen la unión de la segunda y la tercer molécula de agonista a los sitios de unión son proporcionales a la que describe la unión inicial por tener todos los sitios receptores la misma probabilidad de unión. Similarmente las constantes de disociación de la segunda y tercer molécula de ATP son proporcionales a la primer constante de disociación. A pesar de la equidad en la capacidad de unir moléculas de agonista por parte de cada uno de los sitios receptores del canal, MacroDR considera para realizar el cálculo de la matriz de transición de estados que cada constante es independiente y por ende también ajusta sus valores retornando un total de 11 parámetros para el *modelo 2*.

Por otra parte la complejidad del *modelo 3* es mucho mayor y explica mucho mejor los resultados obtenidos con pulsos de ATP de 200  $\mu$ s [204], contemplando que la probabilidad de unión de cada molécula de ATP a cada uno de los tres sitios de unión del canal es diferente.

Este modelo también incluye un estado de energía intermedia llamado "*Flip State*" (F), entre el estado cerrado pero totalmente unido ( $C_3$ ) y el abierto (O), que puede explicar el retardo en la apertura del canal. Además se contempla la existencia de dos estados abiertos de distinta estabilidad ( $O_1 - O_2$ ). Todas estas modificaciones en el modelo hacen que el número de parámetros necesarios para describirlo sea 19.

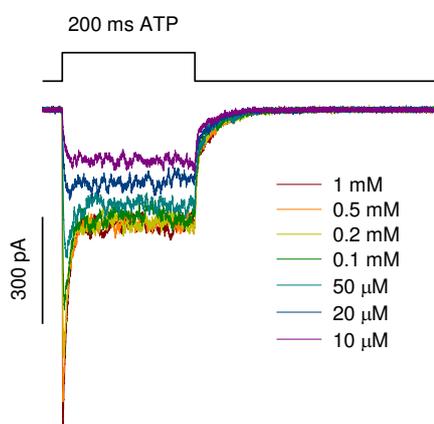
El *modelo 4* es muy similar al *modelo 3* aunque incluye la desensitización del canal (D) una vez que este se ha abierto. Dado que este modelo posee dos estados abiertos de distinta estabilidad se consideró que el estado que sufre desensitización es el más estable ( $O_1$ ). Además por mayor simpleza y menor costo computacional se supuso que solo existe un estado desensitizado. La cantidad de parámetros para describir el modelo es 21 y al igual que en los modelos anteriores estos contemplan las constantes cinéticas, el número de canales, la conductancia unitaria y el ruido de medición a 1 KHz. Los modelos que

tienen un ciclo que conectan varios estados, como es el caso del *modelo 3* y del *modelo 4*, quedan definidos por un número de parámetros menor al necesario ya que para cumplir con el principio de reversibilidad microscópica una de las constantes cinéticas que determinan la transición de alguno de los estados del ciclo debe ser definida en base al resto de las constantes pertenecientes a las transiciones entre los estados que integran dicho ciclo. Por tal motivo fue conveniente definir a la constante de la transición de menor peso del ciclo y con la matriz de transición de estados definida de este modo, ajustar los valores para las constantes más relevantes (para más detalles ver materiales y métodos).

Con el fin de encontrar cual sería el protocolo experimental más sencillo que permita ajustar los resultados a un modelo particular se realizaron simulaciones de cada uno de los cuatro modelos descritos anteriormente bajo distintos protocolos experimentales. En cualquiera de los casos se consideraron como válidos aquellos resultados que ajusten los valores originales de los parámetros con un coeficiente de variación aproximado del 10%. Teniendo en cuenta que el coeficiente de variación disminuye aproximadamente un orden de magnitud con la raíz del número de réplicas se optó por realizar cada una de las simulaciones y ajustes para 1; 10 ó 100 réplicas

La *figura 4.3* muestra la corriente simulada bajo el *modelo 1* para un patch con 1000 receptores P2X<sub>2</sub> expuestos a un pulso único de ATP de 200 ms de duración, con tiempo de subida de 15  $\mu$ s y concentración variable. La simpleza del modelo permitió con una única réplica de una aplicación de ATP 1mM encontrar un punto que maximizó la verosimilitud (*tabla 4.4*), donde todos los valores de los parámetros estuvieron contemplados por el error y los coeficientes de variación fueron menores al 10%. Por tratarse de un protocolo experimental simple y de una única réplica los resultados obtenidos podrían estar sesgados, por lo que se incrementó la complejidad del modelo experimental y se realizaron aplicaciones simples de tres y siete concentraciones distintas (1; 0.1; 0.01 mM y 1; 0.5; 0.2; 0.1; 0.05; 0.02; 0.01 mM respectivamente), cada una separadas por un segundo (*tabla 4.4, 3 C y 7 C*). De esta manera la optimización de los parámetros del modelo siguió contando con

una única replica pero el patch fue expuesto a tres o a siete aplicaciones de 200 ms. del agonista en diferentes concentraciones.



**Figura 4.3 Simulación del modelo 1.** A) Muestra el protocolo experimental empleado para la simulación de la respuesta de canales bajo el modelo1. El experimento consiste en un pulso único de agonista con una duración de 200 ms y una concentración de 1 mM. B) Simulación de la respuesta de 1000 canales

		Modelo 1		
Variables	Cond. Inicial	1 C	3 C.	7 C
C. U. (pA)	1	1.021 ± 8.65%	0.997 ± 4.52%	1.004 ± 2.77%
$K_{01}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	5	5.019 ± 4.73%	4.969 ± 2.91%	5.145 ± 1.93%
$K_{10}$ ( $s^{-1}$ )	200	209.271 ± 5.31%	196.075 ± 2.76%	203.169 ± 1.84%
$K_{12}$ ( $s^{-1}$ )	100	88.404 ± 6.71%	100.862 ± 4.79%	102.929 ± 2.98%
$K_{21}$ ( $s^{-1}$ )	50	45.903 ± 6.36%	51.495 ± 4.44%	51.945 ± 2.71%
N canales	1000	971.192 ± 9.43%	988.484 ± 5.11%	988.685 ± 3.14%
DS 1KHz ( $10^{-3}$ )	30	30.75 ± 2.17%	31.65 ± 1.21%	31.36 ± 0.82%

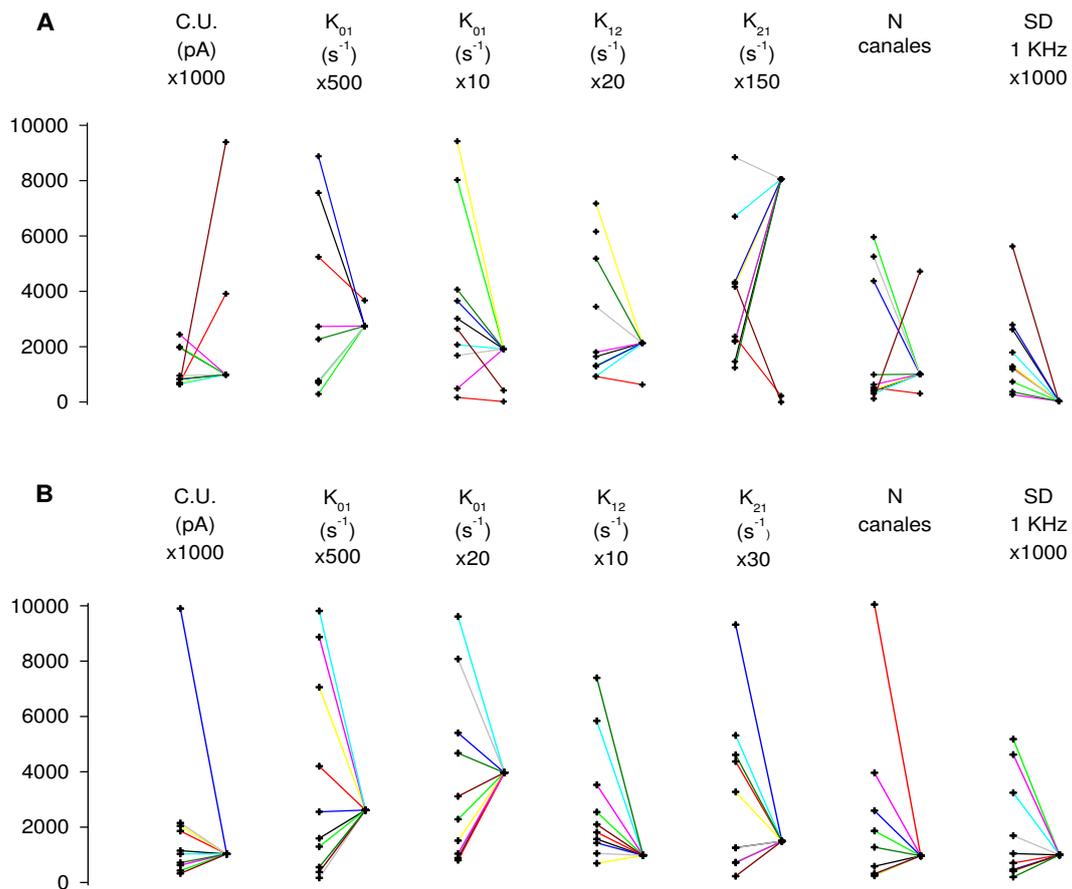
**Tabla 4.4 Ajuste de los parámetros para el modelo 1.** Se muestra la media de los parámetros ± el coeficiente de variación para tres protocolos de aplicaciones únicas del agonista a un patch conteniendo 1000 canales P2X<sub>2</sub>. El primer protocolo corresponde a

una única aplicación de 1 mM; el segundo protocolo es una única aplicación de tres concentraciones distintas de ATP (1; 0.1; 0.01 mM), separadas cada una por más de un segundo mientras que el tercer protocolo corresponde a aplicaciones únicas de siete concentraciones del ligando (1; 0.5; 0.2; 0.1; 0.05; 0.02 y 0.01 mM). C.U. es la conductancia unitaria, DS 1KHz ( $10^{-3}$ ) es el desvío estándar para registros a un KHz y las K son las constantes cinéticas del modelo. Las diferencias entre el valor del parámetro y los ajustes para cada protocolo se analizaron con Z-test,  $p > 0.05$ .

El incremento de la información llevo a un mejor ajuste en los valores de los parámetros y como era de esperar, también provocó una disminución en el valor del coeficiente de variación, el cual se redujo entre 1.5 – 2 veces para el protocolo de tres aplicaciones y entre 2.5 y 3.5 veces para el protocolo de siete aplicaciones, aunque en ambos casos las diferencia con el valores iniciales de los parámetros no resultaron significativas de acuerdo con un Z-test de dos colas.

A demás de incrementar la complejidad del protocolo experimental también se incrementó el número de réplicas de las simulaciones y se optimizó nuevamente el valor de los parámetros. Sorprendentemente los valores de los parámetros no ajustaron correctamente con el incremento de réplicas a pesar de que el coeficiente de variación disminuyó 2 – 3 veces para la simulación de diez réplicas y 10 – 12 veces para la de cien réplicas. Este fenómeno puede explicarse teniendo en cuenta que el coeficiente de variación se obtiene como la curvatura de la función en un entorno cercano al punto que maximiza la verosimilitud y que si el punto no corresponde al verdadero máximo y es más plano que la curvatura del verdadero punto máximo entonces el error disminuirá por el aumento en las réplicas pero las medias de los valores de los parámetros variarán cada vez más con el aumento de las réplicas. Para verificar si el algoritmo encuentra el verdadero punto que maximiza la verosimilitud y que no permanece contenido alrededor de un punto menor, se modificó el algoritmo para comenzar cada optimización desde valores aleatorios y evaluar si convergen al verdadero valor del parámetro. La *figura 4.4* muestra la convergencia para cada uno de los parámetros para 1 y 100 réplicas en un radio de cinco decibeles en torno al valor inicial a ajustar. Cuando la simulación fue de una sola réplica la convergencia de los parámetros fue de un 80% mientras que al aumentar el

número de réplicas a cien la convergencia fue total indicando que el punto encontrado en cada caso es el que maximiza la verosimilitud (-16630.3 y -166574 para diez y cien replicas respectivamente) y que la diferencia en los ajustes de los parámetros dados con el aumento de las réplicas no corresponde a la existencia de otro punto, si no que puede deberse a un exceso en la concentración de agonista empleada o a una frecuencia de muestreo lenta, lo que lleva a que en ambos casos la cantidad de puntos necesaria para ajustar los parámetros sea insuficientes. Los coeficientes de variación de la distribución media de los parámetros a posteriori variaron entre  $1.283 \cdot 10^{-7}$  –  $2.385 \cdot 10^{-6}$  resultando 4 - 5 órdenes de magnitud menores que los coeficientes de variación de los parámetros del punto máximo para la convergencia de una réplica. Por otra parte en el mismo análisis de convergencia realizado para cien replicas, los coeficientes de variación de la distribución media de parámetros a posteriori estuvieron  $9.704 \cdot 10^{-8}$  –  $1.995 \cdot 10^{-6}$ , 5 – 6 órdenes de magnitud menores que los coeficientes de variación de los parámetros del punto máximo. Estos resultados sugieren que hay un único punto que maximice la verosimilitud. En el caso que los coeficientes de variación fuesen del mismo orden podrían existir al menos algún máximo local mientras que si el coeficiente de variación de la distribución media es mayor que el del punto máximo la topología de la superficie multidimensional de los parámetros sería distinta con lo que se intercambiarían constantes y/o los valores ajustados serían muy distintos a los parámetros originales.



**Figura 4.4 Convergencia de los parámetros del modelo 2.** Se muestran las diez optimizaciones para los parámetros del *modelo 2* a partir de valores aleatorios tomados en un radio de 5 decibeles para la simulación de una réplica (A) y la simulación de cien réplicas (B). En cada caso se muestran el nombre, unidades y magnificación de cada parámetro.

Para comenzar a investigar la utilidad de los pulsos ultra-cortos se diseñaron varios protocolos experimentales y se optimizaron los parámetros de los *modelos 2, 3 y 4*. Dado que el *modelo 2* puede ser bien descrito con una única aplicación de cinco concentraciones de ATP por 200 ms y cien réplicas (*tabla 4.5*) se buscó una combinación de aplicaciones que pudiesen disminuir la cantidad de réplicas necesarias para describir los parámetros del modelo. Aplicaciones únicas de la misma duración con siete concentraciones y una o 10 réplicas mostraron coeficientes de variación entre 20 – 60%, similar a lo que se observó para aplicaciones únicas de cinco concentraciones y una o diez réplicas.

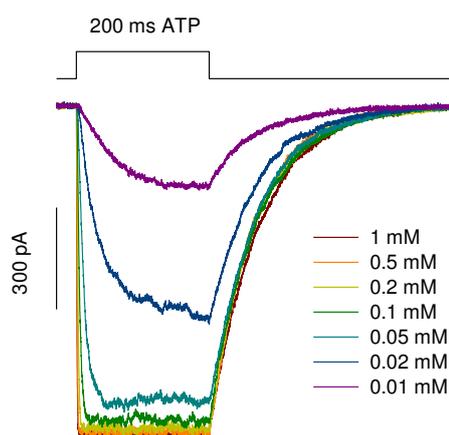
Variables	Cond. Inicial	Modelo 2
		5 C
C. U. (pA)	1	0.995 ± 0.69%
3K <sub>on</sub> (M <sup>1</sup> s <sup>-1</sup> )	18.27	18.296 ± 4.38%
K <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> )	212	211.771 ± 5.7%
2K <sub>on</sub> (M <sup>1</sup> s <sup>-1</sup> )	12.18	12.197 ± 3.9%
2K <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> )	424	422.657 ± 4.15%
K <sub>on</sub> (M <sup>1</sup> s <sup>-1</sup> )	6.09	6.113 ± 1.29%
3K <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> )	636	642.862 ± 1.1%
β (s <sup>-1</sup> )	1681	1680.251 ± 0.55%
α (s <sup>-1</sup> )	53.3	53.045 ± 0.75%
N canales	1000	1004.132 ± 0.71%
DS 1KHz (10 <sup>-3</sup> )	1	31.63 ± 0.05%

**Tabla 4.5 Ajuste de los parámetros del modelo 2.** Se muestra la media de los parámetros ± el coeficiente de variación para el protocolo experimental de cinco aplicaciones únicas del agonista en diferentes concentraciones (1 mM, 0.3 mM, 0.1 mM, 0.03 mM y 0,01mM) sobre un patch conteniendo 1000 canales P2X<sub>2</sub>. C.U. es la conductancia unitaria, DS 1KHz (10<sup>-3</sup>) es el desvío estándar para registros a un KHz con su magnificación y las K son las constantes cinéticas de binding y disociación del modelo multiplicadas por la cantidad de sitios accesibles para agonista ya que todas tienen la misma probabilidad de unión, β y α son las tasas de isomerización entre abierto y cerrado respectivamente... Las diferencias entre el valor del parámetro y los ajustes para cada protocolo se analizaron con Z-test, p > 0.05.

Para protocolos de menor complejidad, es decir aplicaciones individuales de menor cantidad de concentraciones, se observó la inversión en el valor ajustado de las constantes ( $K_{off} = 512.413 \text{ s}^{-1} \pm 40.51/$  y  $2K_{off} = 220.064 \text{ s}^{-1} \pm 22.29/$ , para aplicaciones únicas de 200 ms y tres concentraciones), incluso en varias ocasiones los valores de los parámetros obtenidos por el ajuste fueron muy distintos a los valores originales aunque siempre la suma de las constantes en una dirección se mantuvo próximo al valor de la suma de las constantes

iniciales ( $\sum K_{off} = 1272$ ), marcando que las velocidades para un mismo proceso, unión o disociación, se mantuvieron constantes ( $\sum K_{off} = 1312$  y  $\sum K_{off} = 1328$  para aplicaciones de tres concentraciones de una y diez replicas).

La figura 4.5 ejemplifica la corriente simulada para aplicaciones únicas de 200ms de ATP de siete concentraciones cada una separadas por diez segundos. Tanto estas aplicaciones como las de cinco concentraciones (1 mM, 0.3 mM, 0.1 mM, 0.03 mM y 0,01mM) produjeron un buen ajuste y un coeficiente de variación menor al 10% , siempre que se simularon 100 réplicas. La simulación de cien réplicas de aplicaciones de tres concentraciones también produjo un buen ajuste a los valores de los parámetros aunque en este caso el error supero el límite aceptable variando entre 20 – 40% .



**Figura 4.5. Simulación de las corrientes de P2X<sub>2</sub> para el modelo 2.** Corrientes producidas por la aplicación única de un pulso de 200 ms de ATP en distintas concentraciones sobre un patch conteniendo 1000 receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub>. Bajo este modelo la corriente máxima fue 940 pA.

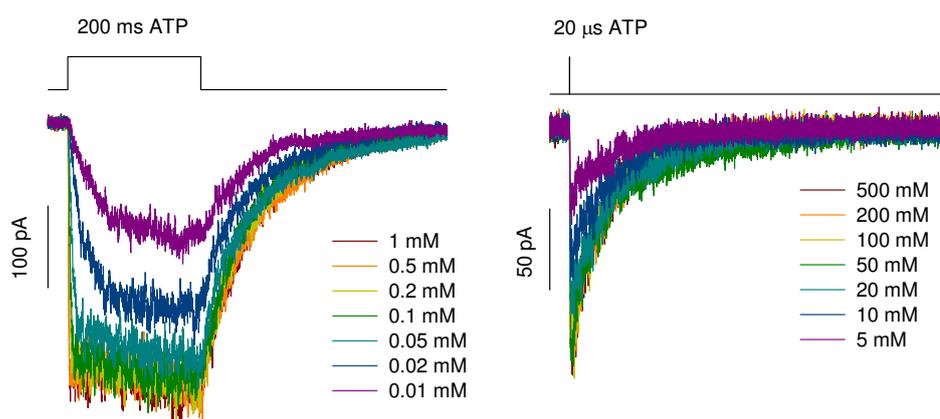
Dado que variar la cantidad de pulsos individuales no compensa la diferencia en el ajuste de los parámetros con respecto a la cantidad de réplicas se optó por aumentar la complejidad del protocolo aún más y analizar el ajuste para un menor número de réplicas. Por tal motivo se emplearon protocolos de pulsos pareados donde la duración del pulso fue de 20 ó 200  $\mu$ s y el intervalo

entre pulsos fue 1; 2; 5; 10; 20; 50 y 100 veces el ancho del pulso. Estos protocolos no reportaron un buen ajuste para las constantes de disociación ( $CV > 100\%$ ), pero si reprodujeron las constantes de cambio conformacional, el número de canales y el ruido de medición a 1 KHz. Por ejemplo para el protocolo de pulsos pareados de 20  $\mu$ s y una réplica  $\beta = 1715.1 \pm 3.56\%$ ,  $\alpha = 57.7606 \pm 9.04\%$ ,  $N_{canales} = 1108.02 \pm 10.78$ ,  $SD\ 1KHz = 0.03136 \pm 0.34\%$ .

Los protocolos experimentales que mejor describieron el modelo fueron en los que se realizó una aplicación única de 200 ms de ATP, seguida por otra aplicación de cota ambas separadas por 1 s para asegurar que ambos pulsos provoque una respuesta desapareada (*figura 4.6*). Cuando la aplicación corta fue de 200  $\mu$ s y se aplicaron cinco concentraciones para cada pulso y diez réplicas (1 mM, 0.3 mM, 0.1 mM, 0.03 mM y 0,01mM para el pulso de 200 ms y 500 mM, 300 mM, 100 mM, 30 mM y 5 mM para pulsos de 200  $\mu$ s) se pudieron recuperar todos los parámetros del modelo menos el número de canales, incluso las constantes cinéticas que no ajustaban su valor con las aplicaciones cortas simples, aunque sus coeficientes de variación oscilaron entre el 15 y el 25% ( $3K_{on} = 18.55 \pm 19.42\%$ ,  $3K_{off} = 322.98 \pm 21.91\%$ ,  $2K_{on} = 13.93 \pm 17.43\%$ ,  $2K_{off} = 381.98 \pm 17.14\%$ ,  $K_{on} = 5.95 \pm 2.35\%$ ,  $3K_{off} = 647.42 \pm 1.36\%$ ). Cuando se aplicaron siete concentraciones a cada pulso y diez repeticiones, como en la *figura 4.6*, el coeficiente de variación disminuyó hasta un 15%. En ambos casos el único parámetro que no ajustó a su valor fue el número de canales ( $943.95 \pm 1.14\%$  y  $1084.22 \pm 0.97\%$  para cinco y siete concentraciones). Cuando la aplicación corta fue de 20  $\mu$ s todos los parámetros del modelo tuvieron un buen ajuste, incluso el número de canales ( $1006.7 \pm 1.12\%$  y  $1001.69 \pm 0.9\%$  para cinco y siete concentraciones). De esta manera, aumentado la complejidad del protocolo experimental se logró disminuir la cantidad de repeticiones necesarias para definir el modelo.

Al aumentar la complejidad del modelo incluyendo un Flip State (*modelo 3*) ningún protocolo experimental de aplicaciones largas logro definir bien todos los parámetros del modelo. Por otra parte los protocolos de pulsos pareados de 20  $\mu$ s generaron un buen ajuste para la mayoría de los parámetros del modelo

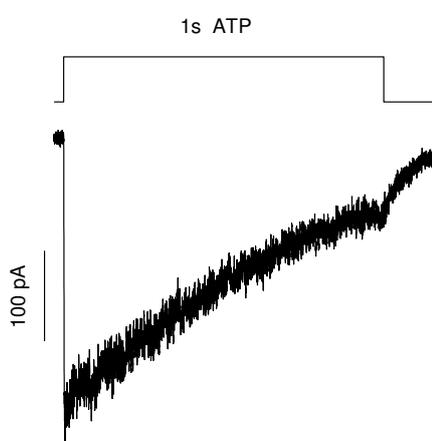
con 10 réplicas, aunque los coeficientes de variación para las constantes de unión de cada uno de los ligandos variaron entre 20 – 30%. La tabla 4.6 muestra los valores ajustados para el *modelo 3* obtenidos al aplicar un protocolo de pulsos dobles de 200 ms y 20  $\mu$ s separados cada uno por un intervalo de 1s (*figura 6.4*). En este caso los pulsos ultra-cortos permitieron recuperar los valores de las constantes más rápidas ( $\delta$ ,  $K_{off3}$ ), con tan solo diez réplicas del protocolo y tres concentraciones. Incluso hasta una repetición del mismo protocolo con siete concentraciones arroja suficiente información como para obtener una idea preliminar del ajuste de los valores de los parámetros ya que sus coeficientes de variación estuvieron por encima del límite tolerable ( $\alpha_2 = 0.2907 \pm 28.44\%$ ,  $\beta_2 = 0.02 \pm 32.52\%$  y  $K_{on1} = 17.41 \pm 72.28\%$  )



**Figura 4.6. Simulación de las corrientes de P2X<sub>2</sub> para el modelo 3.** Corrientes producidas por un protocolo de aplicaciones únicas de pulsos largos y ultra-rápidos intercalados (200 ms – 20  $\mu$ s) de distintas concentraciones de ATP en distintas concentraciones sobre un patch conteniendo 1000 receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub>. La corriente máxima fue 350 pA para los pulsos largos y 156 pA para los ultra-rápidos.

El *modelo 4* muestra la inclusión de un estado de desensitización (*figura 4.7*), además del Flip State. Al igual que en el caso anterior todos los protocolos de pulsos largos fallaron para describir las constantes rápidas, entre ellas la del flipping. Al igual que en el *modelo 3* la constante de flipping puede definirse con

un aplicación de siete concentraciones de ATP de 20  $\mu$ s con diez réplicas ( $3723.22 \pm 12.48 / 3681.22 \pm 13.57 /$  para el *modelo 3* y *4* respectivamente). La constante de desensitización también fue recuperada con este protocolo experimental ( $i_1 = 0.055 \pm 0.14.17$ ). Similarmente a lo que ocurrió con el *modelo 3* el protocolo experimental más sencillo que permite recuperar todos los parámetros del *modelo 4* fue la aplicación de pulsos de doble duración de 200 ms y 20  $\mu$ s (*tabla 4.6*)



**Figura 4.7. Simulación de la desensitización de P2X<sub>2</sub> para el modelo 4.** Corrientes producidas por la aplicación de un pulso único de 1 ms con 1 mM de sobre un patch conteniendo 1000 receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub>. La corriente máxima fue 350 pA.

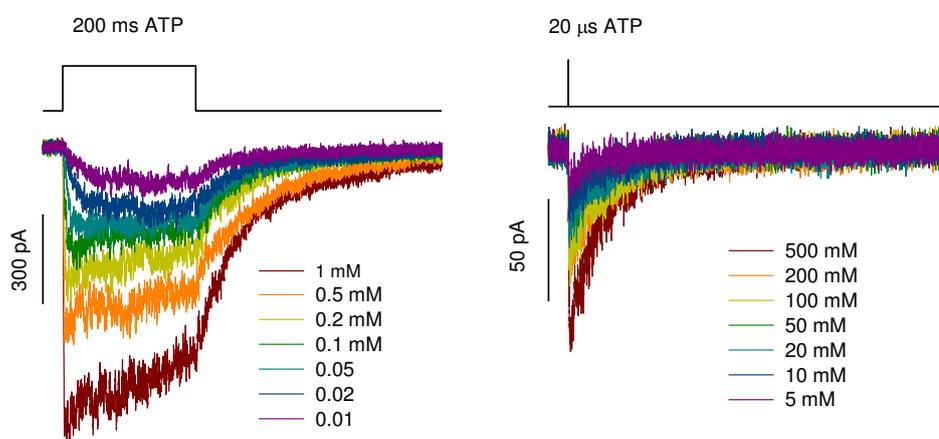
Variables	Cond. Inicial	Modelo 3	Modelo 4
		Pulsos dobles 3 C (200 ms - 20 $\mu$ s)	
C. U. (pA)	1	$0.999 \pm 1.9\%$	$0.973 \pm 1.74\%$
$K_{on1}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	15.98	$16.003 \pm 7.87\%$	$16.687 \pm 9.16\%$
$K_{off1}$ ( $s^{-1}$ )	0.019	$0.019 \pm 4.35\%$	$0.018 \pm 12.99\%$
$K_{on2}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	16.8	$16.323 \pm 4.9\%$	$16.280 \pm 6.01\%$
$K_{off2}$ ( $s^{-1}$ )	380	$380.474 \pm 3.72\%$	$378.370 \pm 5.7\%$

$K_{on3} (M^{-1}s^{-1})$	11.6	$11.611 \pm 3.88\%$	$11.286 \pm 5.48\%$
$K_{off3} (s^{-1})$	6822	$6831.431 \pm 5.17\%$	$7018.820 \pm 8.46\%$
$\delta (s^{-1})$	3718	$3722.844 \pm 2.93\%$	$3948.520 \pm 3.41\%$
$\gamma (s^{-1})$	43.54	$43.569 \pm 2.35\%$	$43.298 \pm 3.03\%$
$\beta_1 (s^{-1})$	540	$540.365 \pm 4.83\%$	$524.969 \pm 4.11\%$
$\beta_2 (s^{-1})$	0.033	$0.033 \pm 6.49\%$	$0.031 \pm 5.02\%$
$\alpha_1 (s^{-1})$	1088	$1089.011 \pm 1.96\%$	$1087.312 \pm 1.84\%$
$\zeta_1 (s^{-1})$	31.16	$31.217 \pm 7.72\%$	$31.611 \pm 9.01\%$
$\alpha_2 (s^{-1})$	0.246	$0.246 \pm 5.55\%$	$0.257 \pm 6.06\%$
$\zeta_2 (s^{-1})$	4.53	$4.531 \pm 3.38\%$	$4.388 \pm 3.53\%$
$\varepsilon_1 (s^{-1})$	79	$79.072 \pm 4.86\%$	$78.951 \pm 5.43\%$
$\eta (s^{-1})$	6	--	$5.763 \pm 5.64\%$
$\iota (s^{-1})$	0.055	--	$0.056 \pm 5.52\%$
N canales	1000	$998.979 \pm 5.95\%$	$1061.436 \pm 6.12\%$
DS 1KHz ( $10^{-3}$ )	1	$31.12 \pm 0.14\%$	$31.67 \pm 0.14\%$

**Tabla 4.6 Ajuste para el modelo 3 y el modelo 4.** Se muestra la media de los parámetros  $\pm$  el coeficiente de variación para el protocolo experimental de tres aplicaciones únicas del agonista de 200 ms y otras tres aplicaciones únicas de 20  $\mu$ s en diferentes concentraciones (1 mM, 0.1 mM y 0,01mM para los pulsos largos y 500 mM, 50 mM y 5 mM para los pulsos cortos) sobre un patch conteniendo 1000 canales P2X<sub>2</sub>. C.U. es la conductancia unitaria, DS 1KHz ( $10^{-3}$ ) es el desvío estándar para registros a un KHz con su magnificación y las K son las constantes cinéticas de binding y disociación del modelo para cada agonista ya que todas tienen distinta probabilidad de unión,  $\beta$  y  $\alpha$  son las tasas de isomerización entre abierto y cerrado respectivamente.  $\eta$  y  $\iota$  son las constantes que describen la desensitización y por último  $\varepsilon$  y  $\zeta$  describen el pasaje del estado cerrado al abierto y viceversa. Las diferencias entre el valor del parámetro y los ajustes para cada protocolo se analizaron con Z-test,  $p > 0.05$ .

La figura 4.8 muestra las corrientes registradas para un protocolo de pulsos largos y pulsos cortos de siete concentraciones, aunque en este caso solo fueron necesarias tres concentraciones en cada pulso para obtener la información suficiente como para definir todos los parámetros del modelo 4 (1

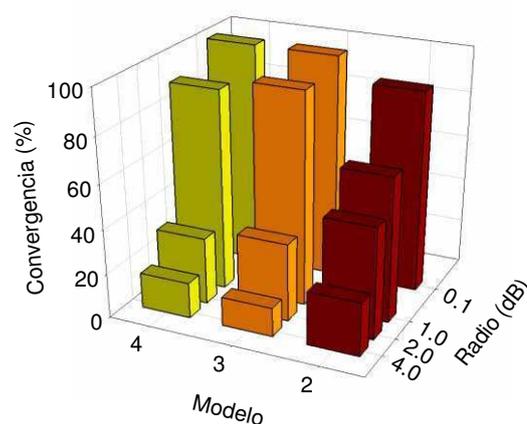
mM, 0.1 mM y 0.01 mM; 500 mM, 50 mM y 5 mM para pulso largo y corto respectivamente).



**Figura 4.8. Simulación de las corrientes de P2X<sub>2</sub> para el modelo 4.** Corrientes producidas por un protocolo de aplicaciones únicas de pulsos largo y ultra-rápidos intercalados (200 ms – 20 μs) de distintas concentraciones de ATP en distintas concentraciones sobre un patch conteniendo 1000 receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub>. La corriente máxima fue 350 pA para los pulsos largos y 156 pA para los ultra-rápidos.

Al analizar la convergencia de los parámetros para los *modelos 2, 3 y 4* se observó que para un radio de 5 decibeles del punto que maximiza la verosimilitud con un dado modelo experimental, la convergencia de los parámetros fue escasa (10%). Dado que este problema podía deberse a la presencia de mínimos locales en la superficie multidimensional de parámetros y que el algoritmo una vez que encontró un mínimo solo puede moverse en torno a este punto, se decidió dividir el radio de la superficie en la que se le permite a los parámetros tomar cualquier valor, en distintos radios y se incrementó el número de “semillas” o combinación inicial de parámetros a medida que se incrementó el radio. Los radios empleados fueron 0.1, 1, 2 y 5 dB y la cantidad de semillas fue 10, 20, 20 y 30 para cada una de estas divisiones. Sorprendentemente todos los experimentos que ajustaron los parámetros para cada modelo, independientemente del radio y la cantidad de semillas, fallaron en converger al valor de la verosimilitud por lo que en todos los casos solo pudo

encontrarse el máximo valor de verosimilitud. El criterio empleado para analizar la convergencia fue que la verosimilitud de cada combinación inicial de parámetros debía distar a 0.1 unidades del valor de la máxima verosimilitud. Este criterio fue muy riguroso. Dado que la verosimilitud parcial de cada muestra es independiente, entonces  $\frac{1}{2}$  de la verosimilitud sigue una distribución de  $\chi^2$  con N grados de libertad, donde la varianza es igual al número de grados de libertad  $var = N$  y el desvío estándar es igual a la raíz de N. Por lo tanto se decidió construir el intervalo de convergencia como la máxima verosimilitud más la raíz de N, donde N es el número de muestras. Así todas aquellas semillas que originen verosimilitudes parciales que entraron en el intervalo fueron tenidas en cuenta. Luego el ajuste de la media de los parámetros para cada una de las semillas que ingresaron en el intervalo fue promediado y se calculó su coeficiente de desviación. Por último se compararon media y coeficiente de variación con las medias y los coeficientes de variación de la semilla que dio la máxima verosimilitud anteriormente. Empleando este nuevo criterio para analizar la convergencia se encontró que la convergencia para los protocolos experimentales que mejor describieron los parámetros de cada modelo fue máxima en torno al radio más chico y que esta fue disminuyendo al aumentar el radio (figura 4.9)



**Figura 4.9. Convergencia para los modelos 2, 3 y 4.** Análisis de convergencia con el criterio de la raíz del número de muestras N, para cada modelo y los distintos radios y números de semillas. Para el radio menor el número de semillas fue 10 mientras que para el mayor radio fue 30 y para los radios intermedios se empezaron 20 semillas.

A medida que el radio de análisis fue aumentando fue disminuyendo la convergencia de los parámetros, incluso las medias de los parámetros tuvieron un coeficiente de variación varias veces mayor al de los parámetros que maximizan la verosimilitud. Esto se debe a que el número de semillas empleadas fue escaso y para disminuir esta variación debería emplearse por lo menos cien veces más semillas que las utilizadas. Lamentablemente aumentar la cantidad de semillas conlleva a que se incremente marcadamente el tiempo del cálculo y en la actualidad MacroDR no puede ejecutarse en paralelo

## DISCUSIÓN

El análisis cinético a partir de registros electrofisiológicos es sencillo cuando el número de canales es uno o es muy grande. En estos casos existen métodos muy poderosos y bien conocidos, en especial para canales únicos. Con el continuo incremento de poder computacional disponible el interés en métodos estadísticos que pueden tratar con un número considerable de canales va en aumento. En este sentido es deseable encontrar un método que maximice la verosimilitud para una pequeña población de canales. El problema principal es formular la verosimilitud de un registro de corrientes macroscópicas. La solución exacta, que dan los algoritmos microscópicos recursivos, es conocida desde que se adaptó la estimación de la máxima verosimilitud para registros de canales únicos, pero es computacionalmente prohibitiva ya que su costo escala como  $2(k-1)^n$ , donde  $n$  es el número de canales y  $K$  es el número de estados. Dada la complejidad del problema se hicieron necesarias aproximaciones eficientes de la verosimilitud. Un primer paso en este sentido fue la creación de un algoritmo que aproxima la verosimilitud de las corrientes macroscópicas. Este algoritmo fue exitoso en recuperar las constantes cinéticas, la conductancia y el número de canales de un modelo cinético simple pero se tuvo que trabajar con una gran cantidad de registros. No obstante este método ignora la toda la información

existente en la correlación temporal de los resultados, por consiguiente no ofrece una estimación confiable del error. Otra aproximación ataca el problema haciendo directamente un ajuste de la matriz de covarianzas de todos los datos medidos. En este sentido una mucho mejor aproximación de la verosimilitud y una estimación mucho más segura del error, pueden ser obtenidas Sin embargo esta aproximación implica calcular la matriz de covarianzas de un set completo de mediciones y esto solo puede ser realizado para un sub-set de las mediciones

Mediante la integración de ambas aproximaciones se postuló el algoritmo MacroR, que aproxima la verosimilitud de corrientes macroscópicas incluyendo la información presente en la correlación temporal de los datos. Este algoritmo es computacionalmente abordable ya que su costo no escala con el número de canales, aunque es computacionalmente más caro que un algoritmo macroscópico no recursivo. En comparación con el algoritmo macroscópico no recursivo, si bien ambos convergen al valor de la verosimilitud obtenido con el algoritmo microscópico recursivo, el algoritmo macroscópico no recursivo necesita por lo menos 10 veces la cantidad de registros que el macroscópico recursivo para asegurar el mismo nivel de error en la estimación.

### **Comparación del método macroscópico recursivo con su modificación.**

MacroR considera a las mediciones como instantáneas, mientras que en el mundo de la electrofisiología las mediciones son siempre el resultado de promedios de tiempos. Esta consideración es un problema fundamental en sí mismo. A nivel de canal único este problema conduce a la falla en el registro de aperturas breves. Por otra parte en el análisis macroscópico, este problema lleva a la desestimación de las fluctuaciones de alta frecuencia. Para la construcción de modelos observacionales que toman en cuenta este fenómeno es necesario incrementar la resolución del modelado cinético. Este problema es especialmente significativo para los registros de canales múltiples ya que las fluctuaciones cinéticas se incrementan con el número de canales

MacroDR es una modificación, próxima a publicarse, del algoritmo macroscópico recursivo diseñada para trabajar con señales promediadas en el tiempo. Para ello subdivide el periodo de medición en distintos intervalos de tiempo y en cada uno de ellos analiza la posibilidad de que ocurra un cambio de estado. En la comparación de ambas variantes del algoritmo MacroDR permite trabajar con un número de canales mucho mayor que los de MacroR y puede ajustar los valores de los parámetros empleando frecuencias de muestro menores a 50 KHz, idealmente 10 KHz ya que a frecuencias mayores disminuye la relación señal ruido, mientras que MacroR permite ajustar los datos óptimamente empleando 100 canales y frecuencias de muestreo de 50 KHz.

#### **Utilidad de los pulsos ultra-rápidos.**

MacroR puede ser usado para ajustar los resultados obtenidos a un modelo determinado o puede ser empleado en forma predictiva para establecer un set de experimentos determinado que permitan corroborar un modelo de la activación del canal planteado a priori. De esta manera mediante la simulación de los experimentos y el posterior ajuste de los parámetros se puede optar fácilmente entre distintos modelos o distintos experimentos a realizar. Empleando MacroDR de modo predictivo se investigó la utilidad de los pulsos ultra-rápidos. Para ello se plantearon varios modelos de complejidad creciente en los que se incluyeron varios estados cerrados, un Flip State, varios estados abiertos y un estado desensitizado dependiendo de cada modelo. Así se demostró que los pulsos ultra-rápidos pueden ser empleados para resolver la constantes más rápidas de cada modelo con la constante del Flip State. Incluso combinando pulsos ultra-rápidos con pulsos largos se puede disminuir la cantidad de réplicas en la simulación (o registros experimentales), necesarias para definir los parámetros de un modelo, 10 veces.

La capacidad de generar pulsos ultra-rápidos a nivel experimental debe ir de la mano con la capacidad de analizar la información obtenida. Por eso al

poder dividir el intervalo de medición en intervalos más pequeños puede analizarse la respuesta a pulsos ultra-rápidos. Tanto la capacidad de innovación en la técnica como la capacidad de análisis de la nueva información obtenida abren la puerta a la interpretación de fenómenos de la activación de los canales iónicos, como la presencia de estados de activación de energía intermedias y/o de estados desensitizados. También se hace necesaria la reinterpretación de los mecanismos de activación ya conocidos.

# *Conclusiones*

En pos del cumplimiento de los objetivos, esta Tesis Doctoral abarco disciplinas y campos tan diversos como la instrumentación biológica, la biofísica de canales iónicos y la simulación computacional. Por lo tanto durante su desarrollo

- I. Se logró desarrollar un método que permite conocer los delays de apertura y cierre de válvulas solenoides a través del monitoreo de la corriente que circula por su bobina. Este método es muy valioso ya que permite sincronizar arreglos de válvulas para minimizar el mezclado de soluciones que fluyen consecutivamente por una misma tubería. En el caso de aplicaciones de soluciones sobre una preparación biológica, reguladas por estas válvulas, se puede conocer el momento exacto de la aplicación, permitiendo estimar mejor los parámetros cinéticos. Aunque el retardo en el funcionamiento de estas válvulas no permite realizar aplicaciones ultra-rápidas (20  $\mu$ s), pueden idearse dispositivos con los que lograr aplicaciones tan cortas como dos veces el tiempo de subida de las válvulas. Incluso aplicaciones más cortas pueden lograrse teniendo en cuenta que quizás la transmisión del impulso no necesita la total apertura de la válvula.
- II. Se desarrolló un método de aplicación de soluciones en el rango de sub-milisegundos que permite atacar el viejo problema biológico de la separación de la afinidad y la eficacia de un agonista sobre un canal iónico activado por ligando.
- III. Siguiendo las simulaciones realizadas por F. Sachs. se estudiaron de forma sistemática las variables que afectan la obtención de pulsos ultra-rápidos, con el fin de volver a esta tecnología novedosa, lo suficientemente robusta. Además se encontró el rango de condiciones donde resulta más sencillo medir, teniendo en cuenta que una vez realizado el patch, el posicionamiento de la pipeta de registro se vuelve extremadamente complicado.

- IV. La arquitectura de la pipeta de aplicación determina el engrosamiento y la estabilidad de la interfase conforme se aumenta la velocidad del fluido o se modifica el ángulo de sus paredes. Estos fenómenos contra-intuitivos fueron investigados y las razones de sus apariciones se pudieron explicar sencillamente.
- V. Se aplicó el tratamiento con HF 10% como un método para eliminar la contaminación de la interfase y ampliar el rango de condiciones de trabajo.
- VI. Pensando en poder atacar cualquier problema sobre la activación de canales (rápidos y/o lentos), el planteo de modelos cinéticos, el testeo de baterías de drogas y por qué no tener un set-up totalmente automatizado, se desarrolló el sistema de escaneo de frecuencias (Fscan) y se obtuvieron pulsos de todas las duraciones y pulsos aleatorios en duración e intervalo inter pulsos.
- VII. Se comparó y caracterizó el rango de funcionamiento de MacroDR, una modificación del algoritmo macroscópico recursivo MacroR, y se pudieron realizar simulaciones de canales iónicos y ajustes de datos para el modelo de Flip State de los receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub>.

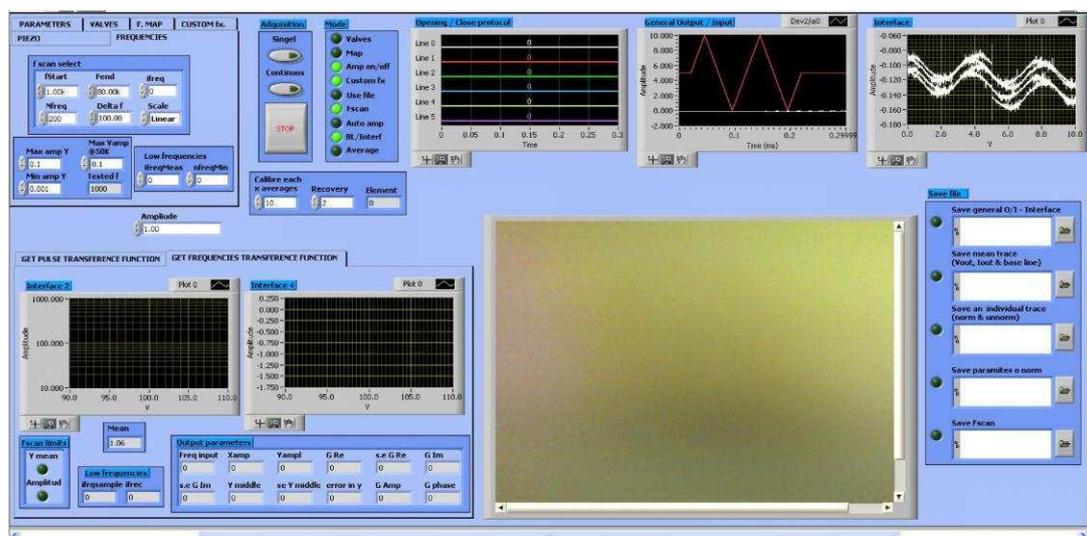
La capacidad de generar aplicaciones ultra-rápidas de agonista de un canal iónico abre la puerta a una reconsideración del modelado cinético entre proteínas receptoras y sus ligandos. Es la posibilidad de hacer extensivo este método al análisis de la unión y el gating de cualquier canal iónico, a través de aplicaciones aleatorias del ligando, lo que conduce junto al modelado con MacroDR, a una disminución en la cantidad de información necesaria para obtener resultados confiables y a un aumento en la cantidad de ligandos a estudiar. No solamente se incluyen en esta posibilidad de estudio a los canales activados por ligando sino también a canales activados por voltaje y al análisis de mutantes de estas dos grandes familias. Pequeñas modificaciones de los sistemas presentados en este trabajo conducirían a ampliar el límite de canales a ser estudiados, por ejemplo a canales mecano-sensibles y/o termo-sensibles.

Por últimos no se puede descartar el desarrollo de un método comercial ya que la posibilidad de estudio que estos métodos combinados presentan puede resultar atractivo para el mercado no solo científico-académico, sino también al mercado farmacéutico para el desarrollo de nuevos fármacos que tengan como blanco canales iónicos.

# Apéndice A

(Labview 8.5)

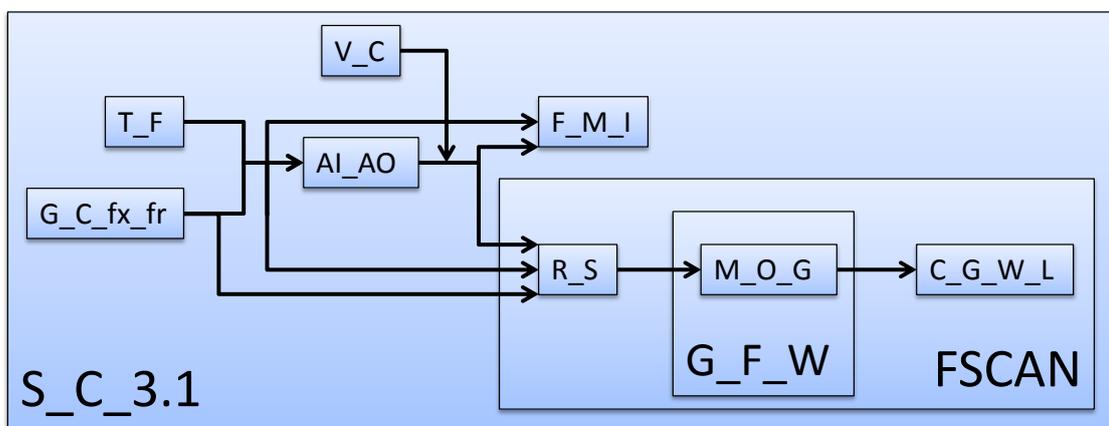
Para realizar los experimentos fue necesario construir un software con una interfase grafica que permita controlar tanto la adquisición de datos como comandar cada una de las partes del set-up. A tal fin se empleó el programa Labview 8.5 que permitió crear dicho programa (*figura A.1*). La metodología utilizada fue la de construir sub-programas que cumplen funciones específicas, coordinados por un programa general que cuenta con la pantalla de visualización. La *figura A.2* muestra un diagrama de flujo donde figuran las relaciones entre los sub programas.



**Figura A.1. "Setup Commander".** Interfase grafica del programa para la adquisición de los datos y el control de cada uno de los elementos del set-up. Los diferentes displays muestran los registros adquiridos mientras que la pantalla central es la cámara adosada al microscopio.

### Setup commander 3.1 (S\_C\_3.1)

Es el programa que contiene a todos los otros programas. Posee los controles para la webcam así como un visor para visualizar el posicionado de las pipetas. Permite seleccionar la información, grafica la evolución de los distintos parámetros y resultados, permite salvar los distintos resultados acorde al experimento que se está realizando.



**Figura A.2. Diagrama de flujo del sistema de adquisición de datos.** El diagrama muestra el flujo de la información a través de cada uno de los bloques operacionales que componen el sistema de adquisición de datos.

### General control, custom function & frequencies (G\_C\_fx\_fr).

Este programa es un generador de funciones que permite generar una función cuadrada, una seno y una coseno. Utiliza como parámetros de entrada la frecuencia ( $f$ ), la duración del pulso ( $t_{pul}$ ), el tiempo al que comienza el pulso ( $t_{on}$ ), la amplitud ( $a$ ), el número de muestras ( $n$ ), el salto de frecuencias ( $df$ ), la frecuencia de inicio ( $f_{start}$ ) y por último el número de frecuencias ( $if$ ).

Para generar la función cuadrada el programa calcula

$$y_i = a * \text{square}(\text{phase}[i]) \quad (1)$$

donde  $y_i$  es la onda cuadrada para  $i = 0, 1, \dots, n-1$ ,  $a$  es la amplitud y  $\text{square}(\text{phase}[i])$  es calculada por la siguiente ecuación:

$$\text{square}(\text{phase}[i]) = \left\{ \begin{array}{l} 1.0 \text{ para } 0 \leq p < \left(\frac{\text{duty}}{100} 360\right) \\ -1.0 \text{ para } \left(\frac{\text{duty}}{100} 360\right) \leq p < 360 \end{array} \right\} \quad (2)$$

$$p = \text{phase}[i] \text{ modulo } 360 \quad (3)$$

$$\text{duty} = t_{pul} * f * 100 \quad (4)$$

$$\text{phase}[i] = \text{phase} + (F * 360 * i) \quad (5)$$

donde  $F$  es la frecuencia normalizada expresada en unidades de ciclos/muestra.

$$\text{phase} = t_{on} * f * 360 \quad (6)$$

Para generar las funciones trigonométricas el programa calcula una ecuación similar a la ecuación 1

$$y_i = a * \sin(\text{phase}[i]) \quad (7)$$

donde  $y_i$  es la función seno para  $i = 0, 1, \dots, n-1$ ,  $a$  es la amplitud y  $\text{phase}[i]$ , al igual que en el caso de la función cuadrada, es calculada por la ecuación 5, aunque en este caso la  $\text{phase} = 0$

En este caso la frecuencia  $f$  es calculada como:

$$f = f_{start} + df * if \quad (8)$$

De esta forma la frecuencia es calculada a partir de un valor determinado de frecuencia de inicio y se incrementa en cada medición en un salto de frecuencia.

El resultado de este procedimiento es el cálculo de una función seno. Esta función seno junto con una coseno, son necesarias para el cálculo de la función de transferencia durante la medición del escaneo de frecuencias (sub-programa F\_S). El cálculo de la función coseno, es similar al del seno solo que esta vez la  $phase = \frac{\pi}{2}$

Una tercera propiedad de este sub programa es que permite cargar una función contenida en el piezo en un 1/. Un archivo de texto, cuya amplitud  $a$  es regulada por el parámetro de entrada de la función cuadrada. Este sub-programa posee además un selector que permite alternar entre cualquiera de las tres funciones posibles y un parámetro de entrada común para las tres funciones posibles que permite realizar un ajuste muy fino en el voltaje entregado al piezo eléctrico por cada una de las funciones, llamado voltaje de sostén o Vholding, que varía el voltaje entregado

### **Tuned function (T\_F).**

Este sub-programa también es un generador de funciones, que permite generar una función totalmente customizada, que se empleará para mapear la interfase entre las soluciones que fluyen de la pipeta de perfusión, posicionar la pipeta de registro próxima a dicha interfase y realizar la calibración del movimiento a través de la interface. La construcción de esta función requiere saber el tiempo en el que termina dicha función ( $t_{end}$ ) definido como la suma del tiempo al que empieza la función ( $t_{on}$ ) más el tiempo de un ciclo ( $t_{cy}$ ) de la función por la cantidad de veces que se repite dicho ciclo ( $n_{cy}$ ).

$$t_{end} = t_{on} + (n_{cy} * t_{cy}) \quad (9)$$

emplea como parámetro de entrada un selector del tipo de señal que permite seleccionar el tipo básico de función (triangular, cuadrada o seno), la duración del ciclo de la función, el número de ciclos, el tiempo al que comienza la función, la duración total, los voltajes máximos y mínimos, la frecuencia de muestreo y el voltaje de sostén. En el caso donde la función elegida para excitar al piezo eléctrico sea triangular esta queda definida por la siguiente ecuación.

$$y = \begin{cases} V_h & \text{si } t_{on} < t < t_{end} \\ \text{abs} \left( \frac{\text{mod}(t + t_0 - t_{on}, t_{cy})}{t_{cy} - 0.5} \right) 2(V_{max} - V_{min}) + V_{min} & \text{si } t_{on} > t < t_{end} \end{cases} \quad (10)$$

donde la función adquiere los valores del voltaje de sostén ( $V_h$ ) para todos aquellos tiempos que no estén comprendidos en el intervalo de tiempo correspondiente a la cantidad de ciclos de la función, de lo contrario la función es triangular por la cantidad de ciclos y centrada en el voltaje de sostén, donde

$$t_0 = \frac{(V_{max} - V_h)}{(V_{max} - V_{min})} * \frac{1}{2} t_{cy} \quad (11)$$

### **Analog input – analog Output (AI\_AO).**

Este es el sistema general que controla los distintos elementos del set-up (salidas analógicas) y que colecta la información registrada de cada operación (entradas analógicas). Si bien la placa de adquisición permite manejar tanto inputs y outputs analógicos también permite controlar canales digitales (entradas o salidas elegidas convenientemente). AI\_AO consta de dos líneas de ejecución; una línea que controla las salidas al sistema y otra que controla la adquisición de datos. Ambas líneas tienen creadores de canales físicos que permiten elegir los canales convenientes para cada medición. Además cada una de las líneas posee un reloj que

se interconectan por dos parámetros: tasa de muestreo, que determina la cantidad de muestras por canal y por segundo y las muestras por canal que especifican el número de muestras a adquirir o generar en cada tarea en particular.

La línea de outputs analógicos termina por generar una onda para cada una de las tareas asignadas en cada uno de los canales. Por otro lado la línea de inputs analógicos termina con un lector que lee una o más ondas de lo que se está registrando en uno o varios canales.

El sub-programa que permite manejar los canales digitales se emplea para el control de las válvulas solenoides y será descrito aquí dado que estos deben sincronizarse con los canales analógicos para determinadas mediciones.

#### **Valves commander (V\_C).**

Este programa fue diseñado para comandar las válvulas solenoides del sistema de perfusión de soluciones. A diferencia del resto de los programas este comando outputs digitales. Por lo tanto posee un selector de líneas digitales, un reloj que se sincroniza con los relojes de las líneas de inputs y outputs del **AI\_AO** y coordinar tareas.

#### **Function mean interface (F\_M\_I).**

Este sub-programa permite calcular los máximos y los mínimos medios para cada registro usando como variable independiente la función que se aplica como output. Para esto emplea dos parámetros a modo de filtro de la variable independiente ( $V_{maxf}$ ) y ( $V_{minf}$ ), además se definen las variables cíclicas señal máxima output ( $sxO$ ), numero máximo output ( $nxO$ ), señal máxima input ( $sxI$ ) y numero máximo input ( $nxI$ )

$$f(x) = \begin{cases} sxO = sxI + y & X > V_{maxf} \\ nxO = nxI + 1 & \\ sxO = sxI & X \ll V_{maxf} \\ nxO = sxI & \end{cases} \quad (12)$$

Una vez que los valores máximos quedan definidos, la media máxima fue:

$$\overline{Max} = \frac{1}{nxO} \sum sxO \quad (13)$$

Por otra parte también se definieron las variables cíclicas que permiten obtener el la media de los valores mínimos como señal mínimos output ( $snO$ ), numero mínimos output ( $nnO$ ), señal mínimos input ( $snI$ ) y numero mínimos input ( $nnI$ )

$$f(x) = \begin{cases} snO = snI + y & X < V_{minf} \\ nnO = nnI + 1 & \\ snO = snI & X \gg V_{minf} \\ nnO = snI & \end{cases} \quad (14)$$

De esta forma definiendo los valores mínimos la media mínima es:

$$\overline{Min} = \frac{1}{nnO} \sum snO \quad (15)$$

### **Frequency Scanning (Fscan).**

Este sub-programa permite obtener un espectro de poder para un rango de frecuencias determinada. Para tal motivo se aplica al piezo eléctrico una onda sinusoidal de una frecuencia dada ( $f_{start}$ ) durante un tiempo determinado ( $t_{dur}$ ), marcando una determinada cantidad de ciclos Si la cantidad de ciclos resulta escasa puede incrementarse ( $t_{dur}$ ) para obtener una cantidad de ciclos mínimos. Una

modificación posterior mantiene constante ( $t_{dur}$ ) de manera que si se establece el número de ciclos mínimos para lograr un nivel de resolución adecuado, el intervalo de medición tendrá tantos ( $t_{dur}$ ) como sea necesario. Si la medición de la interface está en la región lineal, la medida es aceptada, y todos sus puntos son procesados produciéndose el salto de frecuencia ( $df$ ) y la nueva frecuencia de excitación para el piezo es calculada por la ecuación (8). Entonces nuevamente se aplica una función sinusoidal con la nueva frecuencia y se repite el procedimiento anterior.

Este programa recibe como parámetros de entrada las funciones seno y coseno creadas con **G\_C\_fx\_fr** y un waveform que aporta los datos temporales y la sincronía con el registro proveniente de la entrada de la función seno al sub-programa **AI\_AO**. Además emplea la amplitud máxima de Y ( $a_{Max}Y$ ), la amplitud mínima de Y ( $a_{Min}Y$ ), fijan los límites para la amplitud de la señal medida; la media máxima ( $\overline{Max}$ ) y la media mínima ( $\overline{Min}$ ) provenientes de **F\_M\_I**; el tiempo al que comienza la función con la que se va a excitar al piezo ( $t_{on}$ ); un contador de las frecuencias de excitación ( $Tested_f$ ), los límites de la interfase ( $Max$ ) y ( $Min$ ); la amplitud ( $a$ ); el número de frecuencias ( $if$ ) y por último la máxima amplitud de voltaje que puede dársele al piezo a altas frecuencias ( $maxVamp@50K$ ).

Fscan tiene a su vez varios sub-programas internos que utilizan algunos de estos parámetros y realizan distintitos cálculos que luego serán confinados por el fscan para visualizar salvar y facilitar la toma de decisiones en cuanto a si un registro es válido o no.

### Re – Scale (R\_S).

Este sub-programa del Fscan permite hacer una recalibración de la señal registrada de la interface ( $W$ ) y ( $\overline{Max}$ ) y ( $\overline{Min}$ ).

$$W_2 = \frac{W - \overline{Min}}{\overline{Max} - \overline{Min}} \quad (16)$$

### **G from waveform (G\_F\_W):**

Calcula el espectro de poder tomando de la medición de la interfase recalibrada ( $W_2$ ), la función seno y coseno. De la función seno se obtiene el intervalo entre dos puntos ( $dt$ ) y también los valores de cada punto. Esto último también se aplica al coseno y al  $W_2$  y no se obtiene el  $dt$  para estas por que la base temporal para cada función es la misma. Para cada una de las tres señales se genera un array que cominza en  $t_{on}/dt$ ; y que tiene una longitud definida por:

$$\left(n - \frac{t_{on}}{dt}\right) - \left\{ \left[ \left(n - \frac{t_{on}}{dt}\right) - (Tested_f * dt) \right] * floor \left[ \frac{\left(n - \frac{t_{on}}{dt}\right)}{Tested_f * dt} \right] \right\} \quad (17)$$

donde *floor* es la expresión para el cociente incremental Cada unos de estos arrays es empleado por el siguiente sub programa

### **Measure one G (M\_O\_G):**

Utiliza los arreglos de datos armados con el subprograma anterior para calcular un espectro de poder individual para cada uno de los datos de cada frecuencia. A cada uno de los arreglos para el seno y el coseno les calcula la media y se la resta. Estos dos nuevos arreglos son concatenados en una matriz bidimensional ( $H$ ). Este arreglo se transpone y se encuentran los valores de la curva de  $k$ -dimensiones y el conjunto de los  $k$ -coeficientes del ajuste lineal que describen la curva de  $k$ -dimensión lineal que mejor representa los datos de entrada utilizando la solución de cuadrados mínimos. Se computo la covarianza y se empleó el algoritmo de descomposición LU (lower- upper). Así se obtiene el conjunto de coeficientes de minimizan el *chi* cuadrado con la siguiente ecuación

$$\chi^2 = \sum_{i=0}^{n-1} \left( \frac{y_i - z_i}{\sigma_i} \right)^2 = \sum_{i=0}^{n-1} \left[ \frac{y_i - \sum_{j=0}^{k-1} b_j x_{ij}}{\sigma_i} \right]^2 = |H_0 B - Y_0|^2 \quad (18)$$

Empleando estos coeficientes se obtiene el mejor ajuste para cada frecuencia (en cuanto a la amplitud ( $Y_{amp}$ ) y al punto medio ( $Y_{midd}$ ) del mejor ajuste), también se obtiene una matriz de covarianzas

$$C = (H_0^T H_0)^{-1} \quad (19)$$

a partir de esta matriz se obtienen los errores estándar. Si el valor obtenido no estuvo dentro de los límites preestablecidos, es descartado y se repite el proceso, modificando la amplitud ( $a$ ) para permitir que el valor este dentro del régimen de linealidad. Esta función de control es cumplida por el siguiente sub-programa.

#### **Control G within limits (C\_G\_W\_L).**

Este sub programa juzga si la medida calculada anteriormente puede ser tenida en cuenta o no. Para eso emplea los límites mencionados anteriormente y la amplitud del mejor ajuste ( $Y_{amp}$ ) y el punto medio ( $Y_{midd}$ ), calculado en el paso anterior. Entonces para que la medida este en el rango lineal de la interfase (40-60/ ) si:

$$Min < Y_{midd} < Max \quad (20)$$

mientras que para que la amplitud este en el limite

$$a_{Min} Y < Y_{amp} < a_{Max} Y \quad (21)$$

La amplitud puede ser corregida manualmente para que  $Y_{amp}$  entre en el rango de amplitudes preestablecidas o puede corregirse automáticamente empleando el corrector automático de este sub-programa:

$$newVamp = \min \left\{ \left[ \left[ \min \left( \frac{\sqrt{a_{MaxY} * a_{MinY}}}{Y_{amp}}, \frac{a_{MaxY}}{a_{MinY}} \right) \right] a \right], \left[ \frac{maxVamp@50K}{\max \left( \frac{T_{tested_f}}{5 * 10^4}, 1 \right)} \right] \right\} \quad (22)$$

# Apéndice B

Matlab

El tratamiento de los datos y la generación de pulsos fueron realizados con Matlab R2008a. En este apéndice se muestran las principales rutinas creadas para tratar los datos y generar pulsos moldes que se emplearon para obtener el voltaje comando para lograr el movimiento deseado.

La función OptVout es la encargada de retornar la señal optimizada (Vout) para lograr el movimiento deseado y depende del tiempo (t), el voltaje aplicado (v), la señal del movimiento registrado (y), el movimiento deseado (xout), la frecuencia de adquisición máxima (fmax), la constante de decaimiento de la señal (tau) y la amplificación maxima. OptVout utiliza a la vez otra función (cleany) que suaviza la señal en torno a la respuesta máxima basada en la constante tau. Además en OptVout se asume que la frecuencia de muestreo (fs) es constante. Con todas estas consideraciones se calcula la transformada rápida de Fourier (fft) de v,y,xout (X,Y,V respectivamente), y se realiza el cálculo del algoritmo Black Box (*Capítulo 2*)

```
function Vout=OptVout(t,v,y,xout,fmax,tau,maxAmp)
v=v-mean(v(1:10));
v=v/max(abs(v));
xout=xout-mean(xout(1:10));
xout=xout/max(abs(xout));

y=cleany(t,v,y,tau);
n=length(t);
fs=1/(t(2)-t(1));
f=t2f(t);
fa=abs(f);
Q=t-t;
R=Q;
Q(find(fa<=0.6*fmax))=1;
ifi=find((fa>0.6*fmax)&(fa<fmax));
```

```

Q(ifi)=(fmax-fa(ifi))/0.4/fmax;

R(find(fa>=0.6*fmax))=1;
ifi=find((fa>=0.2*fmax)&(fa<0.6*fmax));
R(ifi)=(fa(ifi)-0.2*fmax)/0.4/fmax;

X=fft(v);
Y=fft(y);
V=fft(xout);

H=X./Y;
C=(Q.^2./(abs(H).^2.*R.^2+Q.^2+1/maxAmp));
Vout=real(iff(V.*H.*C));
Vout=middlewindow(t,xout,Vout,tau,fmax);
Vout=Vout-Vout(1);
Vout=Vout/max(abs(Vout));

```

Para el caso de los pulsos únicos se emplea un pulso cuadrado como molde de una duración determinada y se desea obtener un movimiento pulsado de igual duración por lo que al realizar una sola optimización, ambos coinciden ( $v = xout$ ). En el caso de realizar más optimizaciones para mejorar el movimiento final el movimiento se realiza aplicando la primera optimización como comando por lo que ya no coincide con el movimiento deseado. En este caso hay que generar un pulso como movimiento deseado. Para este caso se empleó la función `buildPulse` que retorna el `xout` deseado. Esta función depende de tiempo ( $t$ ), la duración del pulso ( $dur$ ), el tiempo de inicio del pulso ( $ton$ ) y la frecuencia de corte ( $fc$ ). Así se crea un vector ceros con la longitud de  $t$  y se identificand los puntos que corresponden a la duración del pulso y se les asigna una amplitud relativa de 1.

```

function xout=buildPulse(t,ton,dur,fc)
xout=t-t;
npulses=length(ton);
for i=1:npulses
    if (length(dur)==npulses)
        ifi=find((t>=ton(i))&(t<ton(i)+dur(i)));
    else
        ifi=find((t>=ton(i))&(t<ton(i)+dur(1)));
    end;
    xout(ifi)=1;
end;
xout=filterbessel(t,xout,fc);

```

Otros generadores de pulsos son empleados para construir los distintos tipos de pulsos empleados a lo largo de este trabajo. Por ejemplo la función `buildRandomPulse` se empleó para obtener pulsos aleatorios. Esta función depende nuevamente del tiempo (`t`); del tiempo al que combará el primero de todos los pulsos (`tfirston`); la duración de la estimulación (`durStim`), la que puede ser menor o igual que `t`; la duración mínima del pulso (`durPulMin`); la duración máxima del pulso (`durPulseMax`), la duración mínima y máxima que puede tomar un intervalo entre dos pulsos (`durIntMin` y `durIntMax` respectivamente) y la frecuencia de corte (`fc`). Esta función retorna el movimiento deseado y los tiempos de inicio y fin que serán necesarios emplear en la construcción del comando optimizado para lograr el movimiento deseado. La función `buildRandomPulse` emplea otra función (`buildRandomTonToff`) para calcular la serie de puntos aleatorios de inicio y finalización con los que construye los pulsos. En esencia a cada uno de los puntos aleatorios de inicio y fin le suma `tfirston` y luego emplea otra función, llamada `buildPulseTonToff` para finalmente generar los pulsos aleatorios.

```
function [xout, ton, toff]=buildRandomPulse(t,tfirston,durStim,
durPulseMin,durPulseMax,durIntMin,durIntMax,logscalePulse,logS
caleInt,fc)
```

```
[ton,toff]=buildRandomTonToff(durPulseMin,durPulseMax,durIntMi
n,durIntMax,durStim,logscalePulse,logScaleInt);
ton=ton+tfirston;
toff=toff+tfirston;
xout=buildPulseTonToff(t,ton,toff,fc);
plot(t,xout);
```

la función `buildRandomTonToff` depende de la duración del estímulo y de la duración mínima y máxima que pueden tomar pulsos e intervalos. Como se mencionó anteriormente esta función retorna los vectores `ton` y `toff` que inicialmente son creados como vectores vacíos y que son llenados con igual cantidad de números

aleatoriso a considerando la duración mínima y máxima del pulso. Los intervalos entre cada par de puntos ton y toff también son calculados aleatoriamente teniendo en cuenta las duraciones mínimas y máximas que pueden adquirir de forma tal que un pulso generado por un par de puntos ton toff, no se superponga con otro pulso generado por otro par de puntos. Además todos los puntos deben estar incluidos en la duración del estímulo para no dejar al último pulso trunco.

```
function [ton, toff]=buildRandomTonToff(durPulseMin, durPulseMax,
durIntMin, durIntMax, durStim, logscalePulse, logScaleInt)

ton=[];
toff=[];
tonrun=0;
if (logscalePulse==1)

pulse=durPulseMin*(10^(rand*(log10(durPulseMax/durPulseMin))))
;
else
    pulse=durPulseMin+rand*(durPulseMax-durPulseMin);
end
while tonrun<durStim-pulse-durIntMin
    ton=[ton, tonrun];
    toff=[toff, tonrun+pulse];
    if (logScaleInt==1)

inter=durIntMin*(10^(rand*(log10(durIntMax/durIntMin))));
    else
        inter=durIntMin+rand*(durIntMax-durIntMin);
    end
    tonrun=tonrun+pulse+inter;
    if (logscalePulse==1)

pulse=durPulseMin*(10^(rand*(log10(durPulseMax/durPulseMin))))
;
    else
        pulse=durPulseMin+rand*(durPulseMax-durPulseMin);
    end

end
end
```

La función `buildPulseTonToff` es una expansión de la función `buildPulse` que simplemente toma encuentra en un vector de ceros los puntos correspondientes a cada `ton` `toff` y asigna a todos los puntos intermedios del par el valor de 1.

```
function xout=buildPulseTonToff(t,ton,toff,fc)
xout=t-t;
npulses=length(ton)-1;
for i=1:npulses
    xout((t>=ton(i)) & (t<toff(i)))=1;
end;
xout=filterbessel(t,xout,fc);
```

Por último la función empleada para obtener el comando optimizado a partir de los escaneos de frecuencia es `OptScan`. Esta función es muy similar a `OptVout`, aunque además depende de la función de transferencia real e imaginaria (`GsRe` y `GsIm` respectivamente). Aunque el cálculo parece más complicado que el de `OptVout` continúa aplicando el algoritmo Black Box para encontrar el `Vout`. Además esta función permite estimar el pulso que se conseguiría (`xoutexp`) al aplicar dicho `Vout`

```
function [Vout,xoutexp]=OptScan(t,fs,GsRe,GsIm,xout,fmax)
xout=xout-mean(xout(1:10));
xout=xout/max(abs(xout));

xoutlms=buildPulse(t,max(t)/2,1e-3,fmax);

n=length(t);
f=t2f(t);
fa=abs(f);
Q=t-t;
R=Q;

Q(find(fa<=0.6*fmax))=1;
ifi=find((fa>0.6*fmax) & (fa<fmax));
Q(ifi)=(fmax-fa(ifi))/0.4/fmax;

R(find(fa>=0.6*fmax))=1;
ifi=find((fa>=0.2*fmax) & (fa<0.6*fmax));
R(ifi)=(fa(ifi)-0.2*fmax)/0.4/fmax;
```

```

Q(find(fa<fmax))=1;

R(find(fa>=fmax))=1;

V=fft(xout);
Vlms=fft(xoutlms);
if fmax>fs(end)
    dfs=fmax-fs(end);
else
    dfs=fs(end)-fs(end-1);
end

fsend=[0.1:0.1:1]'*dfs+fs(end);
GsResend=ones(10,1)*GsRe(end);
GsImsend=ones(10,1)*GsIm(end);

fss=[-fsend(end:-1:1);-fs(end:-1:1);0;fs;fsend];
GsRes=[GsResend;GsRe(end:-
1:1);sqrt(GsRe(1)^2+GsIm(1)^2);GsRe;GsResend];
GsIms=[-GsImsend;-GsIm(end:-1:1);0;GsIm;GsImsend];

G=spline(fss,GsRes+sqrt(-1)*GsIms,f);

ifH=find(fa>fmax);

G(ifH)=GsRe(end)+GsIm(end)*sqrt(-1);

H=1./G;
figure(1);
C=Q./(abs(H).^2.*R+Q);
semilogy(f,abs(C));
figure(2);
Vout=real(iff(V.*H.*C));
Voutlms=real(iff(Vlms.*H.*C));
t0=t(find(abs(xout)>0.01,1));
Vout=Vout-mean(Vout(find(t<t0)));

Vout=Vout/max(abs(Voutlms));
plot(t,Vout);

xoutexp=real(iff(fft(Vout)./H));
xoutexp=xoutexp/max(xoutexp);
figure(3)
plot(t,xout,t,xoutexp)

```

Las simulaciones de los pulsos esperados evaluando distintas funciones de transferencia de la *figura 3.7* fueron obtenidas haciendo una modificación de la función anterior que se llamó OptVoutScanComp

```

Function [Vout, xoutexp, xoutexp2]=OptVoutScanComp(t, fs, GsRe, GsIm
, fs1, GsRe1, GsIm1, xout, fmax, tau, maxAmp, save)
[Vout, xoutexp]=OptScan(t, fs, GsRe, GsIm, xout, fmax)
if fmax>fs1(end)
    dfs1=fmax-fs1(end);
else
    dfs1=fs1(end)-fs1(end-1);
end
fsend1=[0.1:0.1:1]'*dfs1+fs1(end);
GsResend1=ones(10,1)*GsRe1(end);
GsImsend1=ones(10,1)*GsIm1(end);
fss1=[-fsend1(end:-1:1);-fs1(end:-1:1);0;fs1;fsend1];
GsRes1=[GsResend1;GsRe1(end:-
1:1);sqrt(GsRe1(1)^2+GsIm1(1)^2);GsRe1;GsResend1];
GsIm1=[-GsImsend1;-GsIm1(end:-1:1);0;GsIm1;GsImsend1];
G1=spline(fss1,GsRes1+sqrt(-1)*GsIm1,f);
ifH=find(fa>fmax);
G1(ifH)=GsRe1(end)+GsIm1(end)*sqrt(-1);
xoutexp2=real(iff(fft(Vout).*G1));
xoutexp2=xoutexp2/max(xoutexp2);
figure(4)
plot(t,xout,t,xoutexp,t,xoutexp2);
figure(5)
semilogy(fa,abs(G1),fa,abs(G));

```

# Apéndice C

MacroR

En el enfoque de Markov para la cinética de un canal iónico [281], el continuo de conformaciones estructurales de los canales iónicos se divide en un número finito  $k$  de estados conformacionales  $s(t) = s_i$   $1 \leq i \leq k$ . Cada estado conformacional pueden tener diferentes propiedades fisicoquímicas donde la más fácil de medir es la conductancia a través del poro. El vector columna  $\boldsymbol{\gamma}$  ( $1 \times k$ ), conteniendo los elementos  $\gamma_i$ , representa la cantidad de corriente que pasa a través de un canal que está actualmente en el estado  $s_i$ . En el esquema cinético más simple, hay dos estados: uno que conduce los iones (abierto) y otro que no lo hace (cerrado). Sistemas más sofisticados consideran múltiples estados cerrados y varios estados abiertos donde la conductancia puede ser la misma o diferente para cada estado.

Los canales son dinámicos y cambian su estado de forma aleatoria. Estos cambios conformacionales son generalmente modelados como un proceso de Markov, el mecanismo estocástico más simple en el que en cada intervalo de tiempo existe una probabilidad constante de que el canal cambie de un estado a otro. Esta probabilidad depende sólo del estado actual del canal, no importa cuánto tiempo ha estado el canal en dicho estado. Por ende es un sistema sin memoria..

La probabilidad de cada una de las posibles transiciones entre los diferentes estados que el canal puede sufrir es descrita por una constante de velocidad diferente

$$q_{ij} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\text{Pr}(s(t + \Delta t) = s_j | s(t) = s_i)}{\Delta t} \quad (1)$$

donde  $q_{ij}$  es la tasa de que el canal cambie del estado  $i$  al estado  $j$ .

Dado que los procesos de Markov son estocásticos, es necesario introducir el uso de las probabilidades para la cinética de canales iónicos.

Se define entonces el vector de probabilidad de estado ( $1 \times k$ ), vector con  $K$  estados, como  $\mathbf{p}(t) = p_1(t); \dots; p_k(t)$  con la probabilidad de estado  $p_i(t) = Pr(s(t) = s_i)$  que denota en un momento determinado la probabilidad de que el canal está en cada uno de los  $k$  estados conformacionales.

En un enfoque frecuentista, pensamos en una población de canales evolucionando estocásticamente a partir de un determinado punto de partida. En este enfoque, el vector de probabilidad de estado indica la probabilidad de que un canal escogido de forma aleatoria de una población infinita de canales esté en un estado dado. Este enfoque es útil para describir un sistema que evoluciona por sí mismo sin perturbaciones del observador. En el enfoque bayesiano, el concepto clave es que el vector de probabilidad de estado no es una propiedad del canal en sí mismo (el canal está en un estado conformacional único en cada tiempo), es una medida de la incertidumbre que el observador tiene acerca del estado del canal. Por lo tanto, no tenemos que hacer referencia a una población hipotética de canales, sino al canal que estamos estudiando y la información que tenemos como observadores del canal. La ventaja de hacer esto (ver más adelante) es que se puede utilizar el concepto de vector de probabilidad de estado en la deducción de la versimilitud recursiva.

La evolución del vector de probabilidad de estado  $\mathbf{p}$  en ausencia de nuevas observaciones es determinada por la ecuación diferencial Kolmogorov

$$\frac{\partial \mathbf{p}(t)}{\partial t} = \mathbf{p}(t) \cdot \mathbf{Q} \quad (2)$$

donde  $\mathbf{Q}$  es una matriz de  $n \times n$ , con los elementos  $q_{ij}$  fuera de la diagonal. Cada elemento  $q_{ii}$  de la diagonal de la matriz es igual a  $q_{ii} = -\sum_{j \neq i} q_{ij}$ , la suma negativa de los elementos fuera de la diagonal de la fila  $i$ -ésima. De esta manera, la suma de cada fila es cero, y por lo tanto la suma de probabilidades se mantiene constante e igual a uno. Cuando no hay una transición directa entre los estados  $i \rightarrow j$ ;  $q_{ij} = 0$ , esta matriz  $\mathbf{Q}$  resume las propiedades cinéticas del canal mismo. Para  $t > 0$ , la solución de la ecuación 2 es dada por la solución de Chapman-Kolmogorov:

$$\mathbf{p}(t) = \mathbf{p}(0) \cdot \exp(\mathbf{Q}t) \quad (3)$$

Esta ecuación permite estimar el vector probabilidad de estado como una función del tiempo, dado el hecho de que ninguna observación más se efectúa más sobre el estado del canal. La exponencial de una matriz puede definirse en términos de una serie de Taylor,

$$\exp(\mathbf{Q}t) = \mathbf{I} + \mathbf{Q}t + \frac{\mathbf{Q}^2}{2!}t^2 + \frac{\mathbf{Q}^3}{3!}t^3 + \dots \quad (4)$$

o por la descomposición de  $\mathbf{Q}$  en su vector de autovalores  $\lambda$  y la matriz de autovectores  $\mathbf{V}$ ,

$$\exp(\mathbf{Q}t) = \exp(\mathbf{V} \cdot \lambda^D t \cdot \mathbf{V}^{-1}) = \mathbf{V} \cdot \exp(\lambda^D t) \quad (5)$$

donde la  $\lambda^D$  notación indica el operador diagonal, que construye una matriz diagonal con el vector  $\lambda$ . La exponencial de una matriz diagonal es igual a la diagonal de la exponencial de cada elemento.

Cuando hay múltiples canales en un patch en condiciones voltage clamp, el comportamiento de cada canal es independiente de los otros. Por lo tanto, el comportamiento promedio de una población de canales está bien descrito por la ecuación 3, frente a los canales de modelado único. Sin embargo, cuando las mediciones repetidas se realizan en una población de canales que son indistinguibles, una correlación de tiempo local aparece y un modelado más sofisticado se necesita para tratar con él. Hay dos enfoques para modelar una población de canales. Por un lado el enfoque microscópico es la descripción exacta discreta del sistema y se supone, de antemano,  $N$  como el número de canales. El estado del sistema se describe mediante el vector de estado microscópico  $\mathbf{n}$ , un vector de números enteros positivos ( $1 \times k$ ) indicando el número de canales que están en cada uno de los estados conformacionales  $k$  (15). La conductancia de cada estado es  $\mathbf{n} \cdot \boldsymbol{\gamma}$ , la suma del número de canales en cada estado ponderada por su conductancia.

Para describir el vector de probabilidad de estado, primero se construye la matriz de ocupación  $\mathbf{N}$ , una matriz ( $M \times k$ ), cuyas filas  $\mathbf{n}_i$  son cada uno de los valores posibles que  $\mathbf{n}$  puede asumir. Asociado con esta matriz está el vector de probabilidad microscópica,  $\mathbf{p}^m$ , un vector ( $1 \times m$ ) que enumera las probabilidades para cada uno de los estados posibles. El producto de la matriz  $\mathbf{p}^m \cdot \mathbf{N}$  da el número medio de canales que están en cada estado.

La evolución del vector  $\mathbf{p}^m$  es descrita de forma homologa a la del vector  $\mathbf{p}$  por la ecuación 2 y también se aplica la solución de Chapman-Kolmogorov. Los elementos de la matriz  $\mathbf{Q}$  son análogos a los descriptos por la ecuación 3.

Por otra parte la descripción macroscópica es una aproximación continua del sistema en la que se describe su estado por el vector de estado macroscópico,  $\mathbf{r} = \mathbf{n}/N$ , un vector ( $1 \times k$ ) de números reales listando la relación de las ocupaciones de cada uno de los estados o proporción de canales en cada uno estado [246]. Para calcular la conductancia del conjunto de canales, se utiliza la expresión  $N\mathbf{r} \cdot \boldsymbol{\gamma}$  la conductancia promedio multiplicado por el número de canales. La distribución de  $\mathbf{r}$  puede ser aproximada por una distribución normal multivariada

El modelado oculto de Markov (HMM) se ocupa de aproximación con el problema de la utilización de la evolución de una señal observable de adivinar el estado de un sistema de Markov no observable [278].

Originalmente desarrollado en 1960 el modelado oculto de Markov (HMM)[282, 283] emplea la evolución de una señal observable para encontrar el estado de un sistema de Markov no observable. Esta aproximación se ha utilizado con éxito para la cinética de los canales individuales en los análisis de la década de 1990 [284, 285], donde la señal observable es la corriente que pasa a través del canal.

HMM distingue [278] cuatro elementos:

- 1) un Markov modelo que describe las reglas de evolución del sistema oculto;
- 2) un modelo de observación que describe la relación entre el estado oculto y la señal observable,
- 3) una secuencia de estados ocultos  $s_t$ , y
- 4) una secuencia de observaciones  $y_t$ .

Un determinado modelo de Markov se define por las probabilidades de transición entre los estados hipotéticos. La propiedad clave que define un proceso como un modelo de Markov es su falta de memoria, es decir, el hecho de que su evolución futura sólo depende de su estado actual:

$$Pr(s_{t+1} = s_j | s_t = s_i) = \lambda(s_i, s_j, \theta) = a_{ij} \quad (6)$$

Es importante diferenciar entre lo que constituye la arquitectura del modelo de Markov,  $\lambda$ , y los parámetros numéricos del modelo,  $\theta$ . La arquitectura del modelo se refiere a la forma en que está construido, es decir, la lista de los estados, las transiciones permitidas entre ellos, y las ecuaciones que se asignan los parámetros del modelo sobre las probabilidades de transición entre estados. Por lo general, la

arquitectura del modelo se asume, mientras que los parámetros se extraen de los datos. Sin embargo, es posible comparar las diferentes arquitecturas en su capacidad para predecir los datos.

De una manera similar, la arquitectura del modelo observacional,  $\kappa$ , se refiere a las ecuaciones que relacionan los parámetros observacionales,  $\epsilon$ , con la probabilidad de observar un valor dado de una señal dada en un estado específico del sistema:

$$Pr(y_t = y | s_t = s_i) = \kappa(y, s_i, \epsilon) \quad (7)$$

Dos estimaciones de interés usual en HMM son

1. La función de verosimilitud es la probabilidad de que el modelo  $\Lambda$  (abreviatura de  $\lambda$  y  $\kappa$ ) con los parámetros  $\Theta$  ( $\theta$  y  $\epsilon$ ) podría producir la señal  $y$ :

$$\ell(\Theta) = P(y_1 \cdots y_t | \Theta, \Lambda) \quad (8)$$

Esta probabilidad es independiente de la evolución real del sistema. Las probabilidades se suman a lo largo de todas las evoluciones posibles.

2. La estimación de la máxima verosimilitud de parámetros  $\Theta$ , dado el modelo  $\Lambda$ :

$$\Theta^{MLE} = \underset{\Theta}{arg \max} P(y_1 \cdots y_t | \Theta, \Lambda) \quad (9)$$

Este es el valor de los parámetros que produce la máxima verosimilitud.

Para obtener la verosimilitud de observar la señal  $y$  dado un modelo  $\Lambda$ , se utiliza el modelo observacional  $\kappa$ , para determinar la relación entre la señal

observada, el estado del sistema y el modelo de Markov  $\lambda$  para determinar la probabilidad de secuencias de estados. Una manera conceptualmente simple para determinar la verosimilitud de un proceso de Markov, es la suma sobre todas las posibles secuencias de estados [278], del producto de la probabilidad de obtener la señal dada una secuencia de estados por la probabilidad de obtener esa secuencia particular de estados. Este procedimiento no es práctico, dado el número exponencialmente creciente de las posibles secuencias de estados. Un mejor enfoque se aprovecha del hecho de que los procesos de Markov son sin memoria mediante el uso de un algoritmo recursivo [278].

La inicialización del algoritmo es proporcionada por una estimación a priori del vector de probabilidad de estado sobre la base de consideraciones de equilibrio:

$$\alpha_0(s_i) = Pr(s_0 = s_i, \theta) \quad (10)$$

El valor  $i$ -ésimo se define como

$$\alpha_t(s_i) = Pr(y_1 \cdots y_t, s_0 = s_i | \theta) \quad (11)$$

la inducción se realiza

$$\alpha_{t+1}(s_j) = Pr(y_{t+1} | s_{t+1} = s_j, \varepsilon^2) \times \sum_i Pr(s_{t+1} = s_j | s_t = s_i | \theta) \alpha_t(s_i) \quad (12)$$

y la terminación es la suma

$$\ell(\theta, y_1, \dots, y_T) = Pr(y_1, \dots, y_T | \theta) \sum_i \alpha_T(s_i) \quad (13)$$

Utilizando las ecuaciones. 10 y 11 y suponiendo que el ruido gaussiano, el paso de inducción es

$$\alpha_{t+1}(s_j) = N(y_{t+1} - \gamma_j \varepsilon^2) \times \sum_i \alpha_{ij} \alpha_{t+1}(s_i) \quad (14)$$

donde N indica la función de densidad de probabilidad normal y  $\alpha_{ij}$  son los elementos de

$$A = \exp(Q\Delta t) \quad (15)$$

El algoritmo puede ser descrito en términos bayesianos. La formulación también se extiende a un conjunto continuo de estados. La probabilidad de que la medición conjunta  $y_1 \dots y_T$  puede descomponerse como el producto de las probabilidades incrementales debidos a cada medición  $y_t$ :

$$\ell_T = \ell(\theta | y_1 \dots y_T) = \prod_{t=1}^T \ell'_t \quad (16)$$

$$\ell'_t = Pr(y_t | y_1 \dots y_{t-1}, \theta) \quad (17)$$

Se define el vector de probabilidad a priori como la información que el observador tiene acerca del sistema antes de cada medición por la ecuación

En un espacio continuo, la función de probabilidad a priori se define como

$$p_t^*(\mathbf{r}) = Pr(s_t = \mathbf{r} | y_1 \cdots y_{t-1}, \Theta) \quad (18)$$

donde  $\mathbf{r}$  es el vector de estado macroscópico. Después de realizar la medición, se puede calcular la verosimilitud de que esta medición particular multiplicando la probabilidad condicional de la medición por el vector de probabilidad a priori

$$\ell'_t = \sum_i^k Pr(y_t | s_t = s_j, \varepsilon^2) \cdot p_t^*(s_i) \quad (19)$$

Utilizando la aproximación continua, se multiplica por la función de probabilidad a priori e integrando sobre todo el espacio de probabilidad estado

$$\ell'_t = \int Pr(y_t | s_t = \mathbf{r}, \varepsilon^2) \cdot p_t^*(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (20)$$

El vector de probabilidad posteriori es la información que el observador tiene acerca del estado del sistema actualizado después de la medición  $y_t$  fue realizada

$$p_t(s_i) = Pr(s_t = s_i | y_1 \cdots y_t, \Theta) = \frac{Pr(y_t | s_t = s_j, \varepsilon^2)}{\ell'_t} \cdot p_t^*(s_i) \quad (21)$$

La función de probabilidad a posteriori es

$$p_t(\mathbf{r}) = Pr(s_t = \mathbf{r} | y_1 \dots y_t, \boldsymbol{\theta}) = \frac{Pr(y_t | s_t = \mathbf{r}, \varepsilon^2)}{\ell'_t} \cdot p_t^*(\mathbf{r}) \quad (22)$$

Empleando la transición de Markov para encontrar el estado del sistema en  $t + \Delta t$  tiempo. Para el caso discreto,

$$p_{t+\Delta t}^*(s_j) = \sum_i^k Pr(s_{t+\Delta t} = s_j | s_t = s_i, \boldsymbol{\theta}) p_t(s_i) \quad (23)$$

Si se utiliza la aproximación continua, se integra sobre el espacio entero probabilidad de estado:

$$p_{t+\Delta t}^*(\mathbf{u}) = \int Pr(s_{t+\Delta t} = \mathbf{u} | s_t = \mathbf{r}, \boldsymbol{\theta}) p_t(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (24)$$

De esta manera, la formulación bayesiana del algoritmo ofrece tres variables significativas: la probabilidad parcial, la probabilidad a priori, y la probabilidad a posteriori. La probabilidad parcial indica la probabilidad de cada medición en particular condicional a la anterior. Las probabilidades a priori y a posteriori indican lo que se sabe acerca de la función de probabilidad estado justo antes de y después de cada medición. Probabilidades parciales son estadísticamente independientes de la construcción, una propiedad estadística muy deseable que se puede utilizar para múltiples propósitos. Uno de ellos es encontrar una estimación de la matriz de información de Fisher.

La función de verosimilitud de preparaciones multicanales puede obtenerse con el algoritmo macroscópico recursivo. Para esto la distribución inicial de los estados se obtiene a partir de las condiciones de equilibrio, es decir, cuando

$$Pr(\mathbf{r}, 0) = N\left(\mathbf{r} - \boldsymbol{\mu}_0^*, \frac{1}{N} \boldsymbol{\Sigma}_0^*\right) \quad (25)$$

$$\boldsymbol{\mu}_0^* = \mathbf{u}_{1 \times k} \cdot (\mathbf{Q} + \mathbf{U}_{k \times k})^{-1} \quad (26)$$

$$\boldsymbol{\Sigma}_0^* = \boldsymbol{\mu}_0^{*D} - \boldsymbol{\mu}_0^{*T} \cdot \boldsymbol{\mu}_0^* \quad (27)$$

La verosimilitud incremental se obtiene mediante la integración del producto del prior y la probabilidad de medición

$$\ell'_t = \int N(y_t - N\mathbf{r}_t \cdot \boldsymbol{\gamma}, \varepsilon^2) N\left(\mathbf{r}_t - \boldsymbol{\mu}_t^*, \frac{1}{N} \boldsymbol{\Sigma}_t^*\right) d\mathbf{r} \quad (28)$$

donde  $s$  indica que la integral se realiza sobre todos los estados posibles de  $\mathbf{r}$ . El resultado de esta integral es

$$\ell'_t = N(y_t - y_t^*, \boldsymbol{\sigma}^2) \quad (29)$$

$$y_t^* = N\boldsymbol{\mu}_t^* \cdot \boldsymbol{\gamma} \quad (30)$$

$$\boldsymbol{\sigma}_t^2 = \varepsilon^2 + N\boldsymbol{\gamma}^T \cdot \boldsymbol{\Sigma}_t^* \cdot \boldsymbol{\gamma} \quad (31)$$

Cada posterior se obtiene mediante la normalización del producto de la anterior y la probabilidad de medición

$$p_t(\mathbf{r}) = \frac{N(y_t - N\mathbf{r}_t \cdot \boldsymbol{\gamma}, \boldsymbol{\varepsilon}^2)}{\ell'_t} N\left(\mathbf{r}_t - \boldsymbol{\mu}_t^*, \frac{1}{N}\boldsymbol{\Sigma}_t^*\right) \quad (32)$$

El resultado de este producto es

$$p_t(\mathbf{r}) = N\left(\mathbf{r}_t - \boldsymbol{\mu}_t, \frac{1}{N}\boldsymbol{\Sigma}_t\right) \quad (33)$$

Donde

$$\boldsymbol{\mu}_t = \boldsymbol{\mu}_t^* + \frac{(y_t - y_t^*)}{\sigma_t^2} \cdot \boldsymbol{\gamma}^\top \cdot \boldsymbol{\Sigma}_t^* \quad (34)$$

$$\boldsymbol{\Sigma}_t = \boldsymbol{\Sigma}_t^* - \frac{N}{\sigma_t^2} \boldsymbol{\Sigma}_t^* \cdot \boldsymbol{\gamma} \cdot \boldsymbol{\gamma}^\top \cdot \boldsymbol{\Sigma}_t^* \quad (35)$$

Sea  $\mathbf{A} = \exp(\mathbf{Q}\Delta t)$ , a partir del modelo de Markov, sabemos que

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}_{t+\Delta t} | y_1 \cdots y_t) = \boldsymbol{\mu}_t \cdot \mathbf{A} \quad (36)$$

y de la distribución multinomial

$$var(\mathbf{r}_{t+\Delta t} | y_1 \cdots y_t, \mathbf{r}_t) = \frac{((\mathbf{r}_t \cdot \mathbf{A})^D - \mathbf{A}^\top \cdot \mathbf{r}_t^D \cdot \mathbf{A})}{N} \quad (37)$$

Luego de conocidos los resultados en expectativa condicional, podemos calcular la probabilidad previa a t1Dt tiempo

$$\boldsymbol{\mu}_{t+\Delta t}^* = \mathbf{E}(\mathbf{r}_{t+\Delta t} | y_1 \cdots y_t) = \mathbf{E}\{\mathbf{E}(\mathbf{r}_{t+\Delta t} | y_1 \cdots y_t, \mathbf{r}_t)\} = \mathbf{E}(\mathbf{r}_t \cdot \mathbf{A}) \quad (38)$$

Por ejemplo

$$\boldsymbol{\mu}_{t+\Delta t}^* = \boldsymbol{\mu}_t \cdot \mathbf{A} \quad (39)$$

y

$$\begin{aligned} \text{var}(\mathbf{r}_{t+\Delta t} | y_1 \cdots y_t) &= \boldsymbol{\Sigma}_{t+\Delta t}^* / N \\ &= \mathbf{E}\{\text{var}(\mathbf{r}_{t+\Delta t} | y_1 \cdots y_t, \mathbf{r}_t)\} + \text{var}\{\mathbf{E}(\mathbf{r}_{t+\Delta t} | y_1 \cdots y_t, \mathbf{r}_t)\} \quad (40) \\ &= \mathbf{E}\left\{\frac{((\mathbf{r}_t \cdot \mathbf{A})^D - \mathbf{A}^T \cdot \mathbf{r}_t^D \cdot \mathbf{A})}{N | y_1 \cdots y_t}\right\} + \text{var}\{\mathbf{r}_t \cdot \mathbf{A} | y_1 \cdots y_t\} \\ &= ((\boldsymbol{\mu}_t \cdot \mathbf{A})^D - \mathbf{A}^T \cdot \boldsymbol{\mu}_t^D \cdot \mathbf{A}) / N + \mathbf{A}^T \cdot (\boldsymbol{\Sigma}_t / N) \cdot \mathbf{A} \end{aligned}$$

Por ejemplo

$$\boldsymbol{\Sigma}_{t+\Delta t}^* = (\boldsymbol{\mu}_t \cdot \mathbf{A})^D - \mathbf{A}^T \cdot \boldsymbol{\mu}_t^D \cdot \mathbf{A} + \mathbf{A}^T \cdot \boldsymbol{\Sigma}_t \cdot \mathbf{A} \quad (41)$$

La estimación de máxima verosimilitud es un método para el ajuste de parámetros que se puede utilizar si se tiene un modelo que proporciona la probabilidad de que un conjunto dado de parámetros cinéticos y observaciones. Se

encuentra el conjunto de parámetros que maximiza la probabilidad de obtener los resultados. Sin embargo, en vez de maximizar la probabilidad, lo que se hace generalmente es minimizar el negativo del logaritmo de la verosimilitud (LL):

$$\Theta^{MLE} = \arg \min_{\Theta} (-LL) = \arg \min_{\Theta} \left( -\log(\ell(A, y_1 \cdots y_t)) \right) \quad (42)$$

Para encontrar el punto en que el negativo de LL es mínimo, se utiliza un algoritmo de quasi-Newton. La idea de estos métodos es que la función de log-verosimilitud se aproxima bien cerca de su máximo en una serie de Taylor de segundo orden

$$-LL(\theta) \sim -LL(\theta_0) + G(\theta_0)^T \cdot (\theta - \theta_0) + \frac{1}{2} \cdot (\theta - \theta_0)^T \cdot H(\theta_0) \cdot (\theta - \theta_0) \quad (43)$$

donde G y H son el vector gradiente de primeras derivadas y la matriz hessiana de segundas derivadas de la negativa de la relación log-verosimilitud para el vector de parámetros. La diferencia con el punto óptimo y el óptimo log de verosimilitud se aproxima por

$$\theta^* - \theta_0 \sim H(\theta_0)^{-1} \cdot G(\theta_0) \quad (44)$$

$$LL^* - LL_0 \sim \frac{1}{2} \cdot G(\theta_0)^T \cdot H(\theta_0)^{-1} \cdot G(\theta_0) \quad (45)$$

$$\ell(\theta) \sim C \cdot \exp\left(\frac{1}{2} \left( (\theta - \theta^*)^T \cdot H \cdot (\theta - \theta^*) \right)\right) \quad (46)$$

donde C es una constante. Por lo tanto la matriz hessiana estima la matriz de covarianza de los parámetros de ajuste. Otra forma de estimar la matriz de

covarianza es utilizar la matriz de información de Fisher (FIM), la varianza de la pendiente de la función de log-verosimilitud. La FIM se puede obtener a partir de la pendiente del logaritmo de la probabilidad parcial de cada muestra  $LL'_i$ .

$$FIM = E(\nabla LL^T \cdot \nabla LL) = \sum_i^{nmuestras} (\nabla LL'_i{}^T \cdot \nabla LL'_i) \quad (47)$$

# Referencias

1. Hermann, L., *Beiträge zur Physiologie und Physik des Nerven*. . Arch. ges. Physiol. , 1905. . **109**: : p. 95-144.
2. Hermann, L., *Zur Theorie der Erregungsleitung und der elektrischen Erregung*. . Pflügers Arch. ges. Physiol. , 1899. . **75**: : p. 574-590.
3. Hermann, L., in *Handbuch der Physiologie*. Vol. 2., L. Hermann, Editor 1879 Leipzig: Vogel
4. Bernstein, J., *Über den zeitlichen Verlauf der negativen Schwankung der Nervenstroms*. Pflügers Arch 1868. **1**: p. 173–207.
5. Bernstein, J., *Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme*. . Pflüger's Arch. ges. Physiol. , 1902. . **92**: : p. 521-562.
6. Höber, R., *The permeability of red blood corpuscles to organic anions*. . J. Cell. Comp. Physiol. , 1936. **7**: : p. 367-391.
7. Höber, R., *Ein zweites Verfahren die Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen*. . Pflügers Arch. ges. Physiol., 1912. . **148**: : p. 189-221.
8. Höber, R., in *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*. , W. Engelmann, Editor 1902, Leipzig, .
9. Hodgkin, A.L. and B. Katz, *The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid*. J Physiol, 1949. **108**(1): p. 37-77.
10. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *Action potentials recorded from inside a nerve fiber* Nature, Lond., 1939. . **144** p. 710-711.
11. Curtis, H.J. and K.S. Cole, *Membrane resting and action potentials from the squid giant axon*. . J. cell. comp. Physiol. , 1942. **19** p. 135-144.
12. Curtis, H.J. and K.S. Cole, *Membrane action potentials from the squid giant axon* J. cell. comp. Physiol 1940. **15** p. 147-157.
13. Overton, E., *Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. II. Mittheilung. Ueber die Unentbehrlichkeit von Natrium- (oder Litium-) Ionen für den Contractionsact des Muskels*. . Pflüger's Arch. ges. Physiol., 1902 **92** p. 346-386.
14. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *Resting and action potentials in single nerve fibres*. J Physiol, 1945. **104**(2): p. 176-95.
15. Katz, B., *The effect of electrolyte deficiency on the rate of conduction in a single nerve fibre*. J Physiol, 1947. **106**(4): p. 411-7.
16. Webb, D.A. and J.Z. Young, *Electrolyte content and action potential of the giant nerve fibres of loligo*. J Physiol, 1940. **98**(3): p. 299-313.
17. Marmont, G., *Studies on the axon membrane; a new method*. J Cell Physiol, 1949. **34**(3): p. 351-82.
18. Wiener, N., *Cybernetics; or, Control and communication in the animal and the machine*. Actualités scientifiques et industrielles, 10531948, Paris, Cambridge, Mass.: Hermann; Technology Press. 194 p.

19. Bartlett, J.H., *Transient anode phenomena*. Trans. Electrochem. Soc. , 1945. **87**: p. 521-545.
20. Goldman, D.E., *Potential, Impedance, and Rectification in Membranes*. J Gen Physiol, 1943. **27**(1): p. 37-60.
21. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. J Physiol, 1952. **117**(4): p. 500-44.
22. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 497-506.
23. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 473-96.
24. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 449-72.
25. Hodgkin, A.L., A.F. Huxley, and B. Katz, *Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 424-48.
26. Narahashi, T., J.W. Moore, and W.R. Scott, *Tetrodotoxin Blockage of Sodium Conductance Increase in Lobster Giant Axons*. J Gen Physiol, 1964. **47**: p. 965-74.
27. Hille, B., *Pharmacological modifications of the sodium channels of frog nerve*. J Gen Physiol, 1968. **51**(2): p. 199-219.
28. Hille, B., *The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion*. J Gen Physiol, 1967. **50**(5): p. 1287-302.
29. Hille, B., *Common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves*. Nature, 1966. **210**(5042): p. 1220-2.
30. Nakamura, Y., S. Nakajima, and H. Grundfest, *The action of tetrodotoxin on electrogenic components of squid giant axons*. J Gen Physiol, 1965. **48**(6): p. 975-96.
31. Moore, J.W. and T. Narahashi, *Tetrodotoxin's highly selective blockage of an ionic channel*. Fed Proc, 1967. **26**(6): p. 1655-63.
32. Moore, J.W., et al., *Tetrodotoxin: comments on effects on squid axons*. Science, 1967. **157**(3785): p. 220-1.
33. Nakamura, Y., S. Nakajima, and H. Grundfest, *Analysis of Spike Electrogenesis and Depolarizing K Inactivation in Electroplaques of Electrophorus electricus, L.* J Gen Physiol, 1965. **49**(2): p. 321-49.
34. Narahashi, T., H.G. Haas, and E.F. Therrien, *Saxitoxin and tetrodotoxin: comparison of nerve blocking mechanism*. Science, 1967. **157**(3795): p. 1441-2.
35. Hagiwara, S. and N. Saito, *Voltage-current relations in nerve cell membrane of Onchidium verruculatum*. J Physiol, 1959. **148**: p. 161-79.
36. Armstrong, C.M. and L. Binstock, *Anomalous Rectification in the Squid Giant Axon Injected with Tetraethylammonium Chloride*. J Gen Physiol, 1965. **48**: p. 859-72.
37. Ritchie, J.M., R.B. Rogart, and G.R. Strichartz, *A new method for labelling saxitoxin and its binding to non-myelinated fibres of the rabbit vagus, lobster walking leg, and garfish olfactory nerves*. J Physiol, 1976. **261**(2): p. 477-94.
38. Armstrong, C.M., *Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injection in squid axons*. J Gen Physiol, 1969. **54**(5): p. 553-75.
39. Armstrong, C.M., *Time course of TEA(+)-induced anomalous rectification in squid giant axons*. J Gen Physiol, 1966. **50**(2): p. 491-503.
40. Hille, B., *Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations*. J Gen Physiol, 1973. **61**(6): p. 669-86.
41. Hille, B., *The permeability of the sodium channel to metal cations in myelinated nerve*. J Gen Physiol, 1972. **59**(6): p. 637-58.

42. Armstrong, C.M. and B. Hille, *The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier*. J Gen Physiol, 1972. **59**(4): p. 388-400.
43. Hille, B., *Ionic permeability changes in active axon membranes*. Arch Intern Med, 1972. **129**(2): p. 293-8.
44. Hille, B., *The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve*. J Gen Physiol, 1971. **58**(6): p. 599-619.
45. Hille, B., *The hydration of sodium ions crossing the nerve membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(2): p. 280-2.
46. Bezanilla, F. and C.M. Armstrong, *Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons*. J Gen Physiol, 1972. **60**(5): p. 588-608.
47. Stanfield, P.R., *Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1983. **97**: p. 1-67.
48. Stanfield, P.R., *The effect of the tetraethylammonium ion on the delayed currents of frog skeletal muscle*. J Physiol, 1970. **209**(1): p. 209-29.
49. Nakajima, S., S. Iwasaki, and K. Obata, *Delayed rectification and anomalous rectification in frog's skeletal muscle membrane*. J Gen Physiol, 1962. **46**: p. 97-115.
50. Ehrenstein, G. and D.L. Gilbert, *Slow changes of potassium permeability in the squid giant axon*. Biophys J, 1966. **6**(5): p. 553-66.
51. Adrian, R.H., W.K. Chandler, and A.L. Hodgkin, *Voltage clamp experiments in striated muscle fibres*. J Physiol, 1970. **208**(3): p. 607-44.
52. Roper, J. and J.R. Schwarz, *Heterogeneous distribution of fast and slow potassium channels in myelinated rat nerve fibres*. J Physiol, 1989. **416**: p. 93-110.
53. Pappone, P.A., *Voltage-clamp experiments in normal and denervated mammalian skeletal muscle fibres*. J Physiol, 1980. **306**: p. 377-410.
54. Barres, B.A., L.L. Chun, and D.P. Corey, *Glial and neuronal forms of the voltage-dependent sodium channel: characteristics and cell-type distribution*. Neuron, 1989. **2**(4): p. 1375-88.
55. Llinas, R.R., *The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function*. Science, 1988. **242**(4886): p. 1654-64.
56. Crill, W.E., *Persistent sodium current in mammalian central neurons*. Annu Rev Physiol, 1996. **58**: p. 349-62.
57. Neher, E. and B. Sakmann, *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*. Nature, 1976. **260**(5554): p. 799-802.
58. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflugers Arch, 1981. **391**(2): p. 85-100.
59. Sakmann, B. and E. Neher, *Single-channel recording* 1995, New York: Plenum Press. xxii, 700 p.
60. Milkman, R., *An Escherichia coli homologue of eukaryotic potassium channel proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3510-4.
61. Schrepf, H., et al., *A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from Streptomyces lividans*. Embo Journal, 1995. **14**(21): p. 5170-8.
62. Derst, C. and A. Karschin, *Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K<sup>+</sup> channels*. J Exp Biol, 1998. **201**(Pt 20): p. 2791-9.
63. Doyle, D.A., et al., *The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity*. Science, 1998. **280**(5360): p. 69-77.
64. Bixby, K.A., et al., *Zn<sup>2+</sup>-binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K<sup>+</sup> channels*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(1): p. 38-43.

65. Gulbis, J.M., et al., *Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels*. Science, 2000. **289**(5476): p. 123-7.
66. Gulbis, J.M., S. Mann, and R. MacKinnon, *Structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel beta subunit*. Cell, 1999. **97**(7): p. 943-52.
67. Weill, C.L., M.G. McNamee, and A. Karlin, *Affinity-labeling of purified acetylcholine receptor from *Torpedo californica**. Biochem Biophys Res Commun, 1974. **61**(3): p. 997-1003.
68. Raftery, M.A., et al., *Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits*. Science, 1980. **208**(4451): p. 1454-6.
69. Noda, M., et al., *Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding alpha-subunit precursor of muscle acetylcholine receptor*. Nature, 1983. **305**(5937): p. 818-23.
70. Noda, M., et al., *Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits*. Nature, 1983. **302**(5908): p. 528-32.
71. Montal, M., *Ion channel reconstitution*, C. Miller, Editor 1986, Plenum Press: New York.
72. Mishina, M., et al., *Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs*. Nature, 1984. **307**(5952): p. 604-8.
73. Kistler, J., et al., *Structure and function of an acetylcholine receptor*. Biophys J, 1982. **37**(1): p. 371-83.
74. Brisson, A. and P.N. Unwin, *Quaternary structure of the acetylcholine receptor*. Nature, 1985. **315**(6019): p. 474-7.
75. Hille, B., *Ion channels of excitable membranes* 2001, Sunderland, Mass.: Sinauer. xviii, 814 p., [8] p. of plates.
76. Magleby, K.L. and C.F. Stevens, *A quantitative description of end-plate currents*. J Physiol, 1972. **223**(1): p. 173-97.
77. Sanchez, J.A., et al., *Slow permeation of organic cations in acetylcholine receptor channels*. J Gen Physiol, 1986. **87**(6): p. 985-1001.
78. Anderson, C.R. and C.F. Stevens, *Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end-plate current fluctuations at frog neuromuscular junction*. J Physiol, 1973. **235**(3): p. 655-91.
79. Lester, H.A. and J.M. Nerbonne, *Physiological and pharmacological manipulations with light flashes*. Annu Rev Biophys Bioeng, 1982. **11**: p. 151-75.
80. Gurney, A.M. and H.A. Lester, *Light-flash physiology with synthetic photosensitive compounds*. Physiol Rev, 1987. **67**(2): p. 583-617.
81. Fatt, P. and B. Katz, *An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode*. J Physiol, 1951. **115**(3): p. 320-70.
82. Magleby, K.L. and C.F. Stevens, *The effect of voltage on the time course of end-plate currents*. J Physiol, 1972. **223**(1): p. 151-71.
83. Del Castillo, J. and B. Katz, *Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **146**(924): p. 369-81.
84. Eigen, M. and G.G. Hammes, *Elementary Steps in Enzyme Reactions (as Studied by Relaxation Spectrometry)*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1963. **25**: p. 1-38.
85. Chock, P.B., *Relaxation methods and enzymology*. Biochimie, 1971. **53**(2): p. 161-72.
86. Katz, B. and R. Miledi, *Membrane noise produced by acetylcholine*. Nature, 1970. **226**(5249): p. 962-3.
87. Katz, B. and R. Miledi, *Further observations on acetylcholine noise*. Nat New Biol, 1971. **232**(30): p. 124-6.
88. Stevens, C.F., *Inferences about membrane properties from electrical noise measurements*. Biophys J, 1972. **12**(8): p. 1028-47.

89. Lingle, C.J., D. Maconochie, and J.H. Steinbach, *Activation of skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors*. *J Membr Biol*, 1992. **126**(3): p. 195-217.
90. Colquhoun, D. and B. Sakmann, *Fluctuations in the microsecond time range of the current through single acetylcholine receptor ion channels*. *Nature*, 1981. **294**(5840): p. 464-6.
91. Colquhoun, D. and B. Sakmann, *Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate*. *J Physiol*, 1985. **369**: p. 501-57.
92. Lester, H.A., J.P. Changeux, and R.E. Sheridan, *Conductance increases produced by bath application of cholinergic agonists to Electrophorus electroplaques*. *J Gen Physiol*, 1975. **65**(6): p. 797-816.
93. Adams, P.R., *An analysis of the dose-response curve at voltage-clamped frog-endplates*. *Pflugers Arch*, 1975. **360**(2): p. 145-53.
94. Dreyer, F., K. Peper, and R. Sterz, *Determination of dose-response curves by quantitative ionophoresis at the frog neuromuscular junction*. *J Physiol*, 1978. **281**: p. 395-419.
95. Cull-Candy, S.G., R. Miledi, and I. Parker, *Single glutamate-activated channels recorded from locust muscle fibres with perfused patch-clamp electrodes*. *J Physiol*, 1981. **321**: p. 195-210.
96. Cull-Candy, S.G. and I. Parker, *Rapid kinetics of single glutamate-receptor channels*. *Nature*, 1982. **295**(5848): p. 410-2.
97. Ohno, K., et al., *Congenital myasthenic syndrome caused by decreased agonist binding affinity due to a mutation in the acetylcholine receptor epsilon subunit*. *Neuron*, 1996. **17**(1): p. 157-70.
98. Katz, B. and S. Thesleff, *A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate*. *J Physiol*, 1957. **138**(1): p. 63-80.
99. Feltz, A. and A. Trautmann, *Desensitization at the frog neuromuscular junction: a biphasic process*. *J Physiol*, 1982. **322**: p. 257-72.
100. Sakmann, B., J. Patlak, and E. Neher, *Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist*. *Nature*, 1980. **286**(5768): p. 71-3.
101. Auerbach, A. and G. Akk, *Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two-gate mechanism*. *J Gen Physiol*, 1998. **112**(2): p. 181-97.
102. Grosman, C. and A. Auerbach, *Kinetic, mechanistic, and structural aspects of unliganded gating of acetylcholine receptor channels: a single-channel study of second transmembrane segment 12' mutants*. *J Gen Physiol*, 2000. **115**(5): p. 621-35.
103. Takeuchi, A. and N. Takeuchi, *On the permeability of end-plate membrane during the action of transmitter*. *J Physiol*, 1960. **154**: p. 52-67.
104. Takeuchi, N., *Effects of calcium on the conductance change of the end-plate membrane during the action of transmitter*. *J Physiol*, 1963. **167**: p. 141-55.
105. Takeuchi, N., *Some properties of conductance changes at the end-plate membrane during the action of acetylcholine*. *J Physiol*, 1963. **167**: p. 128-40.
106. Bouzat, C., *New insights into the structural bases of activation of Cys-loop receptors*. *J Physiol Paris*, 2012. **106**(1-2): p. 23-33.
107. Harel, M., et al., *The binding site of acetylcholine receptor as visualized in the X-Ray structure of a complex between alpha-bungarotoxin and a mimotope peptide*. *Neuron*, 2001. **32**(2): p. 265-75.
108. Brejc, K., et al., *Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors*. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 269-76.
109. Smit, A.B., et al., *A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission*. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 261-8.

110. Sine, S.M., *The nicotinic receptor ligand binding domain*. J Neurobiol, 2002. **53**(4): p. 431-46.
111. Miyazawa, A., Y. Fujiyoshi, and N. Unwin, *Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore*. Nature, 2003. **423**(6943): p. 949-55.
112. Unwin, N., *Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution*. J Mol Biol, 2005. **346**(4): p. 967-89.
113. Kelley, S.P., et al., *A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT<sub>3</sub> receptors*. Nature, 2003. **424**(6946): p. 321-4.
114. Peters, J.A., et al., *The 5-hydroxytryptamine type 3 (5-HT<sub>3</sub>) receptor reveals a novel determinant of single-channel conductance*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt3): p. 547-52.
115. Swope, S.L., Z. Qu, and R.L. Huganir, *Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by protein tyrosine kinases*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **757**: p. 197-214.
116. Del Castillo, J., W.C. De Mello, and T. Morales, *Inhibitory action of gamma-aminobutyric acid (GABA) on Ascaris muscle*. Experientia, 1964. **20**(3): p. 141-3.
117. Martin, R.J., *The effect of gamma-aminobutyric acid on the input conductance and membrane potential of Ascaris muscle*. Br J Pharmacol, 1980. **71**(1): p. 99-106.
118. Martin, R.J., *gamma-Aminobutyric acid- and piperazine-activated single-channel currents from Ascaris suum body muscle*. Br J Pharmacol, 1985. **84**(2): p. 445-61.
119. Martin, R.J., et al., *The physiology and pharmacology of neuromuscular transmission in the nematode parasite, Ascaris suum*. Parasitology, 1991. **102 Suppl**: p. S41-58.
120. Holden-Dye, L., et al., *GABA receptors on the somatic muscle cells of the parasitic nematode, Ascaris suum: stereoselectivity indicates similarity to a GABA<sub>A</sub>-type agonist recognition site*. Br J Pharmacol, 1989. **98**(3): p. 841-50.
121. Holden-Dye, L. and R.J. Walker, *Avermectin and avermectin derivatives are antagonists at the 4-aminobutyric acid (GABA) receptor on the somatic muscle cells of Ascaris; is this the site of anthelmintic action?* Parasitology, 1990. **101 Pt 2**: p. 265-71.
122. Martin, R.J., *Electrophysiological effects of piperazine and diethylcarbamazine on Ascaris suum somatic muscle*. Br J Pharmacol, 1982. **77**(2): p. 255-65.
123. Tretter, V., et al., *Stoichiometry and assembly of a recombinant GABA<sub>A</sub> receptor subtype*. J Neurosci, 1997. **17**(8): p. 2728-37.
124. Pfeiffer, F., D. Graham, and H. Betz, *Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord*. J Biol Chem, 1982. **257**(16): p. 9389-93.
125. Meyer, G., et al., *Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit*. Neuron, 1995. **15**(3): p. 563-72.
126. Watkins, J.C. and D.E. Jane, *The glutamate story*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S100-8.
127. Traynelis, S.F., et al., *Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(3): p. 405-96.
128. McKernan, M.G. and P. Shinnick-Gallagher, *Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro*. Nature, 1997. **390**(6660): p. 607-11.
129. Mayer, M.L., *Emerging models of glutamate receptor ion channel structure and function*. Structure, 2011. **19**(10): p. 1370-80.
130. Nowak, L., et al., *Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones*. Nature, 1984. **307**(5950): p. 462-5.
131. Johnson, J.W. and P. Ascher, *Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons*. Nature, 1987. **325**(6104): p. 529-31.
132. Benton, R., et al., *Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in Drosophila*. Cell, 2009. **136**(1): p. 149-62.

133. Abuin, L., et al., *Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors*. *Neuron*, 2011. **69**(1): p. 44-60.
134. Mayer, M.L. and N. Armstrong, *Structure and function of glutamate receptor ion channels*. *Annu Rev Physiol*, 2004. **66**: p. 161-81.
135. Mayer, M.L., *Glutamate receptors at atomic resolution*. *Nature*, 2006. **440**(7083): p. 456-62.
136. Stawski, P., H. Janovjak, and D. Trauner, *Pharmacology of ionotropic glutamate receptors: A structural perspective*. *Bioorg Med Chem*, 2010. **18**(22): p. 7759-72.
137. Das, U., et al., *Domain organization and function in GluK2 subtype kainate receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(18): p. 8463-8.
138. Plested, A.J. and M.L. Mayer, *Structure and mechanism of kainate receptor modulation by anions*. *Neuron*, 2007. **53**(6): p. 829-41.
139. Plested, A.J. and M.L. Mayer, *AMPA receptor ligand binding domain mobility revealed by functional cross linking*. *J Neurosci*, 2009. **29**(38): p. 11912-23.
140. Yamagata, Y., *Prebiotic formation of ADP and ATP from AMP, calcium phosphates and cyanate in aqueous solution*. *Orig Life Evol Biosph*, 1999. **29**(5): p. 511-20.
141. Burnstock, G., *Purinergic nerves*. *Pharmacol Rev*, 1972. **24**(3): p. 509-81.
142. Burnstock, G., et al., *The birth and postnatal development of purinergic signalling*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2010. **199**(2): p. 93-147.
143. Clyne, J.D., L.F. Wang, and R.I. Hume, *Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor*. *J Neurosci*, 2002. **22**(10): p. 3873-80.
144. Ennion, S.J. and R.J. Evans, *Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface*. *Molecular Pharmacology*, 2002. **61**(2): p. 303-11.
145. Boue-Grabot, E., V. Archambault, and P. Seguela, *A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(14): p. 10190-5.
146. Surprenant, A. and R.A. North, *Signaling at purinergic P2X receptors*. *Annu Rev Physiol*, 2009. **71**: p. 333-59.
147. Roberts, J.A., et al., *Molecular properties of P2X receptors*. *Pflugers Arch*, 2006. **452**(5): p. 486-500.
148. Bean, B.P., *ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: concentration dependence and kinetics*. *J Neurosci*, 1990. **10**(1): p. 1-10.
149. Ding, S. and F. Sachs, *Single channel properties of P2X2 purinoceptors*. *J Gen Physiol*, 1999. **113**(5): p. 695-720.
150. Nicke, A., et al., *P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels*. *Embo Journal*, 1998. **17**(11): p. 3016-28.
151. Barrera, N.P., et al., *Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(11): p. 10759-65.
152. Mio, K., et al., *Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **337**(3): p. 998-1005.
153. Young, M.T., et al., *Molecular shape, architecture, and size of P2X4 receptors determined using fluorescence resonance energy transfer and electron microscopy*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(38): p. 26241-51.
154. Kawate, T., et al., *Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state*. *Nature*, 2009. **460**(7255): p. 592-8.
155. Gonzales, E.B., T. Kawate, and E. Gouaux, *Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors*. *Nature*, 2009. **460**(7255): p. 599-604.
156. Jasti, J., et al., *Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH*. *Nature*, 2007. **449**(7160): p. 316-23.

157. Coddou, C., et al., *Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels*. Pharmacol Rev, 2011. **63**(3): p. 641-83.
158. Vinogradova, I., A. Cook, and L. Holden-Dye, *The ionic dependence of voltage-activated inward currents in the pharyngeal muscle of Caenorhabditis elegans*. Invert Neurosci, 2006. **6**(2): p. 57-68.
159. Wilkinson, W.J., et al., *Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor*. Molecular Pharmacology, 2006. **70**(4): p. 1159-63.
160. Boumechache, M., et al., *Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13446-54.
161. Torres, G.E., T.M. Egan, and M.M. Voigt, *Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6653-9.
162. Aschrafi, A., et al., *Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes*. J Mol Biol, 2004. **342**(1): p. 333-43.
163. Wildman, S.S., et al., *Sensitization by extracellular Ca(2+) of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X(1)*. Molecular Pharmacology, 2002. **62**(4): p. 957-66.
164. Bo, X., et al., *Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor*. Molecular Pharmacology, 2003. **63**(6): p. 1407-16.
165. Jiang, L.H., et al., *Subunit arrangement in P2X receptors*. J Neurosci, 2003. **23**(26): p. 8903-10.
166. Cockayne, D.A., et al., *P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP*. J Physiol, 2005. **567**(Pt 2): p. 621-39.
167. Gever, J.R., et al., *Pharmacology of P2X channels*. Pflugers Arch, 2006. **452**(5): p. 513-37.
168. Burnstock, G., *Purinergic signalling and disorders of the central nervous system*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(7): p. 575-90.
169. Burnstock, G. and C. Kennedy, *P2X receptors in health and disease*. Adv Pharmacol, 2011. **61**: p. 333-72.
170. Lalo, U., et al., *P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes*. J Neurosci, 2008. **28**(21): p. 5473-80.
171. Evans, R.J., *Orthosteric and allosteric binding sites of P2X receptors*. Eur Biophys J, 2009. **38**(3): p. 319-27.
172. Evans, R.J., *Structural interpretation of P2X receptor mutagenesis studies on drug action*. Br J Pharmacol, 2010. **161**(5): p. 961-71.
173. Bodnar, M., et al., *Amino acid residues constituting the agonist binding site of the human P2X3 receptor*. J Biol Chem, 2011. **286**(4): p. 2739-49.
174. Fischer, W., et al., *Conserved lysin and arginin residues in the extracellular loop of P2X(3) receptors are involved in agonist binding*. Eur J Pharmacol, 2007. **576**(1-3): p. 7-17.
175. Jiang, L.H., et al., *Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34190-6.
176. Roberts, J.A., et al., *Cysteine substitution mutagenesis and the effects of methanethiosulfonate reagents at P2X2 and P2X4 receptors support a core common mode of ATP action at P2X receptors*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 20126-36.
177. Ennion, S., S. Hagan, and R.J. Evans, *The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29361-7.

178. Roberts, J.A. and R.J. Evans, *ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists.* J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 9043-55.
179. Roberts, J.A. and R.J. Evans, *Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP.* J Neurochem, 2006. **96**(3): p. 843-52.
180. Roberts, J.A., et al., *Contribution of the region Glu181 to Val200 of the extracellular loop of the human P2X1 receptor to agonist binding and gating revealed using cysteine scanning mutagenesis.* J Neurochem, 2009. **109**(4): p. 1042-52.
181. Donnelly-Roberts, D.L., et al., *Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors.* Br J Pharmacol, 2009. **157**(7): p. 1203-14.
182. Hibell, A.D., et al., *Apparent species differences in the kinetic properties of P2X(7) receptors.* Br J Pharmacol, 2000. **130**(1): p. 167-73.
183. Hibell, A.D., et al., *Species- and agonist-dependent differences in the deactivation-kinetics of P2X7 receptors.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2001. **363**(6): p. 639-48.
184. Hibell, A.D., et al., *Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs.* J Pharmacol Exp Ther, 2001. **296**(3): p. 947-57.
185. Marquez-Klaka, B., et al., *Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor.* J Neurosci, 2007. **27**(6): p. 1456-66.
186. Jiang, R., et al., *Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels.* Embo Journal, 2012. **31**(9): p. 2134-2143.
187. Hattori, M. and E. Gouaux, *Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors.* Nature, 2012. **485**(7397): p. 207-12.
188. Egan, T.M., W.R. Haines, and M.M. Voigt, *A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X2 receptors identified by the substituted cysteine accessibility method.* J Neurosci, 1998. **18**(7): p. 2350-9.
189. Zemkova, H., et al., *Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions.* J Neurochem, 2007. **102**(4): p. 1139-50.
190. Samways, D.S., et al., *On the role of the first transmembrane domain in cation permeability and flux of the ATP-gated P2X2 receptor.* J Biol Chem, 2008. **283**(8): p. 5110-7.
191. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors.* Physiol Rev, 2002. **82**(4): p. 1013-67.
192. Rettinger, J. and G. Schmalzing, *Activation and desensitization of the recombinant P2X1 receptor at nanomolar ATP concentrations.* J Gen Physiol, 2003. **121**(5): p. 451-61.
193. Rettinger, J. and G. Schmalzing, *Desensitization masks nanomolar potency of ATP for the P2X1 receptor.* J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 6426-33.
194. Stojilkovic, S.S., et al., *Molecular dissection of purinergic P2X receptor channels.* Ann N Y Acad Sci, 2005. **1048**: p. 116-30.
195. Bavan, S., et al., *The penultimate arginine of the carboxyl terminus determines slow desensitization in a P2X receptor from the cattle tick Boophilus microplus.* Molecular Pharmacology, 2011. **79**(4): p. 776-85.
196. Neelands, T.R., et al., *2', 3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP and A-317491 are competitive antagonists at a slowly desensitizing chimeric human P2X3 receptor.* Br J Pharmacol, 2003. **140**(1): p. 202-10.

197. Zemkova, H., et al., *Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P2X receptors*. J Neurosci, 2004. **24**(31): p. 6968-78.
198. Stephenson, R.P., *A modification of receptor theory*. Br J Pharmacol, 1956. **11**: p. 379-393.
199. Furchgott, R.F., *The use of B-haloalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes*. Advances in Drug Research, 1966. **3**: p. 21-55.
200. Black, J.W. and P. Leff, *Operational models of pharmacological agonism*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1983. **220**(1219): p. 141-62.
201. Venter, D.P., *Efficacy. II. Estimation of a newly defined efficacy related parameter*. Eur J Pharmacol, 1997. **320**(2-3): p. 233-40.
202. Venter, D.P., *Efficacy. I: A new method for estimating relative efficacy of full agonists via a newly defined efficacy related parameter*. Eur J Pharmacol, 1997. **320**(2-3): p. 223-31.
203. Clarke, W.P. and R.A. Bond, *The elusive nature of intrinsic efficacy*. Trends Pharmacol Sci, 1998. **19**(7): p. 270-6.
204. Moffatt, L. and R.I. Hume, *Responses of rat P2X2 receptors to ultrashort pulses of ATP provide insights into ATP binding and channel gating*. J Gen Physiol, 2007. **130**(2): p. 183-201.
205. Colquhoun, D., *Affinity, efficacy and receptor classification: is the classical theory still useful?*, in *Perspectives on hormone receptor classification*, J.W. Black, D.H. Jenkinson, and V.P. Gerskowitch, Editors. 1987, A.R. Liss Inc.: New York, N.Y. p. 103-114.
206. Colquhoun, D., *Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors*. Br J Pharmacol, 1998. **125**(5): p. 924-47.
207. Colquhoun, D. and M. Farrant, *Molecular pharmacology. The binding issue*. Nature, 1993. **366**(6455): p. 510-1.
208. Goodman, L.S., et al., *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. Pharmacological basis of therapeutics 1996, New York: McGraw-Hill, Health Professions Division. xxi, 1905 p., [1] folded leaf of plates.
209. Tomaselli, G.F., et al., *Mutations affecting agonist sensitivity of the nicotinic acetylcholine receptor*. Biophys J, 1991. **60**(3): p. 721-7.
210. Hollenberg, M.D., *Structure-activity relationships for transmembrane signaling: the receptor's turn*. Faseb Journal, 1991. **5**(2): p. 178-86.
211. Kenakin, T.P., *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction* 1997, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. xiii, 491 p.
212. Imoto, K., et al., *Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance*. Nature, 1988. **335**(6191): p. 645-8.
213. Imoto, K., et al., *Location of a delta-subunit region determining ion transport through the acetylcholine receptor channel*. Nature, 1986. **324**(6098): p. 670-4.
214. Colquhoun, D. and B. Sakmann, *From muscle enplate to brain synapses: A short history of synapses and agonist-activated ion channels*. Neuron, 1998. **20**: p. 381 - 387.
215. Burzomato, V., et al., *Single-channel behavior of heteromeric alpha1beta glycine receptors: an attempt to detect a conformational change before the channel opens*. J Neurosci, 2004. **24**(48): p. 10924-40.
216. Horrigan, F.T. and R.W. Aldrich, *Coupling between voltage sensor activation, Ca<sup>2+</sup>(+) binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels (vol 120, pg 267, 2002)*. Journal of General Physiology, 2002. **120**(4): p. 599-599.

217. Langenkamp, A., et al., *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 311-6.
218. Engel, A.K., P. Fries, and W. Singer, *Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(10): p. 704-16.
219. Cannon, R.C. and G. D'Alessandro, *The ion channel inverse problem: neuroinformatics meets biophysics*. PLoS Comput Biol, 2006. **2**(8): p. e91.
220. Liu, Y. and J.P. Dilger, *Opening rate of acetylcholine receptor channels*. Biophys J, 1991. **60**(2): p. 424-32.
221. Dudel, J., et al., *Rapid activation and desensitization by glutamate of excitatory, cation-selective channels in locust muscle*. Neurosci Lett, 1988. **88**(1): p. 33-8.
222. Maconochie, D.J. and D.E. Knight, *A method for making solution changes in the sub-millisecond range at the tip of a patch pipette*. Pflugers Arch, 1989. **414**(5): p. 589-96.
223. Moffatt, L., *Estimation of ion channel kinetics from fluctuations of macroscopic currents*. Biophys J, 2007. **93**(1): p. 74-91.
224. Cannell, M.B. and C.G. Nichols, *Effects of pipette geometry on the time course of solution change in patch clamp experiments*. Biophys J, 1991. **60**(5): p. 1156-63.
225. Pemble, C.M. and B.C. Towe, *A miniature shape memory alloy pinch valve*. Sensors and Actuators a-Physical, 1999. **77**(2): p. 145-148.
226. Brauer, J.R., I.M. Society, and Knovel, *Magnetic actuators and sensors 2006*, [Piscataway, N.J.] : Hoboken, N.J.: IEEE Press ; Wiley.
227. Maconochie, D.J. and J.H. Steinbach, *Block by acetylcholine of mouse muscle nicotinic receptors, stably expressed in fibroblasts*. J Gen Physiol, 1995. **106**(1): p. 113-47.
228. Maconochie, D.J., J.M. Zempel, and J.H. Steinbach, *How quickly can GABAA receptors open?* Neuron, 1994. **12**(1): p. 61-71.
229. Willenbring, D., et al., *Isoflurane alters the structure and dynamics of GLIC*. Biophys J, 2011. **101**(8): p. 1905-12.
230. Sivilotti, L.G., *What single-channel analysis tells us of the activation mechanism of ligand-gated channels: the case of the glycine receptor*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 1): p. 45-58.
231. Colquhoun, D. and L.G. Sivilotti, *Function and structure in glycine receptors and some of their relatives*. Trends Neurosci, 2004. **27**(6): p. 337-44.
232. Gingrich, K.J., P.M. Burkat, and W.A. Roberts, *Pentobarbital produces activation and block of  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  GABAA receptors in rapidly perfused whole cells and membrane patches: divergent results can be explained by pharmacokinetics*. J Gen Physiol, 2009. **133**(2): p. 171-88.
233. Li, H., et al., *Mechanism of glutamate receptor-channel function in rat hippocampal neurons investigated using the laser-pulse photolysis (LaPP) technique*. Biochemistry, 2002. **41**(15): p. 4753-9.
234. Li, G., W. Pei, and L. Niu, *Channel-opening kinetics of GluR2Q(flip) AMPA receptor: a laser-pulse photolysis study*. Biochemistry, 2003. **42**(42): p. 12358-66.
235. Komal, P., G. Evans, and R. Nashmi, *A rapid agonist application system for fast activation of ligand-gated ion channels*. J Neurosci Methods, 2011. **198**(2): p. 246-54.
236. Jonas, P., *Fast application of agonists to isolated membrane patches.*, in *Single-channel recording.*, B. Sakmann and E. Neher, Editors. 1995, Plenum Press: New York. p. 231-243.
237. Hinkle, D.J., M.T. Bianchi, and R.L. Macdonald, *Modifications of a commercial perfusion system for use in ultrafast solution exchange during patch clamp recording*. Biotechniques, 2003. **35**(3): p. 472-4, 476.

238. Sachs, F., *Practical limits on the maximal speed of solution exchange for patch clamp experiments*. *Biophys J*, 1999. **77**(2): p. 682-90.
239. Botzolakakis, E.J., et al., *Achieving synaptically relevant pulses of neurotransmitter using PDMS microfluidics*. *J Neurosci Methods*, 2009. **177**(2): p. 294-302.
240. Matsubara, N., A.P. Billington, and G.P. Hess, *How fast does an acetylcholine receptor channel open? Laser-pulse photolysis of an inactive precursor of carbamoylcholine in the microsecond time region with BC3H1 cells*. *Biochemistry*, 1992. **31**(24): p. 5507-14.
241. Leibowitz, M.D. and V.E. Dionne, *Single-channel acetylcholine receptor kinetics*. *Biophys J*, 1984. **45**(1): p. 153-63.
242. Dionne, V.E. and M.D. Leibowitz, *Acetylcholine receptor kinetics. A description from single-channel currents at snake neuromuscular junctions*. *Biophys J*, 1982. **39**(3): p. 253-61.
243. Chakrapani, S. and A. Auerbach, *A speed limit for conformational change of an allosteric membrane protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(1): p. 87-92.
244. Robert, A. and J.R. Howe, *How AMPA receptor desensitization depends on receptor occupancy*. *J Neurosci*, 2003. **23**(3): p. 847-58.
245. Stilson, S., A. McClellan, and S. Devasia, *High-speed solution switching using piezo-based micropositioning stages*. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2001. **48**(7): p. 806-14.
246. Milescu, L.S., G. Akk, and F. Sachs, *Maximum likelihood estimation of ion channel kinetics from macroscopic currents*. *Biophys J*, 2005. **88**(4): p. 2494-515.
247. Hamill, O.P. and D.W. McBride, *Pressure/patch-clamp methods in Patch-clamp applications and protocols*, A. Boulton, G. Baker, and W. Walz, Editors. 1995, Humana Press: New Jersey. p. 75-88.
248. Gil, Z., K.L. Magleby, and S.D. Silberberg, *Membrane-pipette interactions underlie delayed voltage activation of mechanosensitive channels in Xenopus oocytes*. *Biophys J*, 1999. **76**(6): p. 3118-27.
249. Gil, Z., K.L. Magleby, and S.D. Silberberg, *Two-dimensional kinetic analysis suggests nonsequential gating of mechanosensitive channels in Xenopus oocytes*. *Biophys J*, 2001. **81**(4): p. 2082-99.
250. Haswell, E.S., R. Phillips, and D.C. Rees, *Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it?* *Structure*, 2011. **19**(10): p. 1356-69.
251. Auzmendi, J.A. and L. Moffatt, *Increasing the reliability of solution exchanges by monitoring solenoid valve actuation*. *J Neurosci Methods*, 2010. **185**(2): p. 280-3.
252. Grewer, C., *Investigation of the alpha(1)-glycine receptor channel-opening kinetics in the submillisecond time domain*. *Biophys J*, 1999. **77**(2): p. 727-38.
253. Lape, R., D. Colquhoun, and L.G. Sivilotti, *On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily*. *Nature*, 2008. **454**(7205): p. 722-7.
254. Franke, C., et al., *Activation and desensitization of embryonic-like receptor channels in mouse muscle by acetylcholine concentration steps*. *J Physiol*, 1992. **451**: p. 145-58.
255. Colquhoun, D., P. Jonas, and B. Sakmann, *Action of brief pulses of glutamate on AMPA/kainate receptors in patches from different neurones of rat hippocampal slices*. *J Physiol*, 1992. **458**: p. 261-87.
256. Bartol, T.M., Jr., et al., *Monte Carlo simulation of miniature endplate current generation in the vertebrate neuromuscular junction*. *Biophys J*, 1991. **59**(6): p. 1290-307.
257. Sheng, M. and C.C. Hoogenraad, *The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view*. *Annu Rev Biochem*, 2007. **76**: p. 823-47.
258. Freche, D., et al., *Synapse geometry and receptor dynamics modulate synaptic strength*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e25122.

259. Stiles, J.R., et al., *The temperature sensitivity of miniature endplate currents is mostly governed by channel gating: evidence from optimized recordings and Monte Carlo simulations*. *Biophys J*, 1999. **77**(2): p. 1177-87.
260. Valenzuela, C., et al., *Stereoselective Interactions between Local Anesthetics and Ion Channels*. *Chirality*, 2012. **24**(11): p. 944-50.
261. Delpon, E., et al., *Block of human cardiac Kv1.5 channels by loratadine: voltage-, time- and use-dependent block at concentrations above therapeutic levels*. *Cardiovasc Res*, 1997. **35**(2): p. 341-50.
262. Caballero, R., et al., *Effect of descarboethoxyloratadine, the major metabolite of loratadine, on the human cardiac potassium channel Kv1.5*. *Br J Pharmacol*, 1997. **122**(5): p. 796-8.
263. Valenzuela, C., et al., *Effects of ropivacaine on a potassium channel (hKv1.5) cloned from human ventricle*. *Anesthesiology*, 1997. **86**(3): p. 718-28.
264. Franqueza, L., et al., *Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels*. *Circ Res*, 1997. **81**(6): p. 1053-64.
265. Auzmendi, J., et al., *Achieving maximal speed of solution exchange for patch clamp experiments*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e42275.
266. Jayaraman, V., S. Thiran, and G.P. Hess, *How fast does the gamma-aminobutyric acid receptor channel open? Kinetic investigations in the microsecond time region using a laser-pulse photolysis technique*. *Biochemistry*, 1999. **38**(35): p. 11372-8.
267. Feigenspan, A., H. Wässle, and J. Bormann, *Pharmacology of GABA receptor Cl<sup>-</sup> channels in rat retinal bipolar cells*. *Nature*, 1993. **361**(6408): p. 159-62.
268. Goutman, J.D., A.L. Escobar, and D.J. Calvo, *Analysis of macroscopic ionic currents mediated by GABA $\rho$ 1 receptors during lanthanide modulation predicts novel states controlling channel gating*. *Br J Pharmacol*, 2005. **146**(7): p. 1000-9.
269. Goutman, J.D., P.A. Fuchs, and E. Glowatzki, *Facilitating efferent inhibition of inner hair cells in the cochlea of the neonatal rat*. *J Physiol*, 2005. **566**(Pt 1): p. 49-59.
270. Goutman, J.D., et al., *Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors*. *Eur J Pharmacol*, 2003. **461**(2-3): p. 79-87.
271. Bartoletti, S., B.D. Flury, and D.G. Nel, *Allometric extension*. *Biometrics*, 1999. **55**(4): p. 1210-1214.
272. Decher, N., et al., *Structural basis for competition between drug binding and Kv $\beta$ 1.3 accessory subunit-induced N-type inactivation of Kv1.5 channels*. *Molecular Pharmacology*, 2005. **68**(4): p. 995-1005.
273. Polak, S., et al., *Tox-database.net: a curated resource for data describing chemical triggered in vitro cardiac ion channels inhibition*. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2012. **13**: p. 6.
274. Polak, S., et al., *Slow delayed rectifying potassium current (I(Ks)) - analysis of the in vitro inhibition data and predictive model development*. *J Appl Toxicol*, 2012.
275. Splawski, I., et al., *Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism*. *Cell*, 2004. **119**(1): p. 19-31.
276. Decher, N., et al., *Impaired interaction between the slide helix and the C-terminus of Kir2.1: a novel mechanism of Andersen syndrome*. *Cardiovasc Res*, 2007. **75**(4): p. 748-57.
277. Kobayashi, T. and M. Sokabe, *Sensing substrate rigidity by mechanosensitive ion channels with stress fibers and focal adhesions*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(5): p. 669-76.
278. Rabiner, L.R., *A Tutorial on Hidden Markov-Models and Selected Applications in Speech Recognition*. *Proceedings of the IEEE*, 1989. **77**(2): p. 257-286.
279. Horn, R. and K. Lange, *Estimating Kinetic Constants from Single Channel Data*. *Biophys J*, 1983. **43**(2): p. 207-223.

280. Papke, D., G. Gonzalez-Gutierrez, and C. Grosman, *Desensitization of neurotransmitter-gated ion channels during high-frequency stimulation: a comparative study of Cys-loop, AMPA and purinergic receptors*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 7): p. 1571-85.
281. Colquhoun, D. and A.G. Hawkes, *On the stochastic properties of single ion channels*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1981. **211**(1183): p. 205-35.
282. Baum, L.E. and T. Petrie, *Statistical inference for probabilistic functions of finite state Markov Chains* Ann. Math. Stat. , 1966. **37**: p. 1554-1563.
283. Baum, L.E., et al., *A maximization technique occurring in the statistical analysis of probabilistic functions of Markov chains* Ann. Math. Stat, 1970. **41**: p. 164–171.
284. Becker, J.D., et al., *Analysing ion channels with hidden Markov models*. Pflugers Arch, 1994. **426**(3-4): p. 328-32.
285. Qin, F., A. Auerbach, and F. Sachs, *Hidden Markov modeling for single channel kinetics with filtering and correlated noise*. Biophys J, 2000. **79**(4): p. 1928-44.