

BIOELECTRICIDAD

Departamento de Ingeniería Electrónica
Universidad Politécnica de Valencia, España

Prof. José M. Ferrero

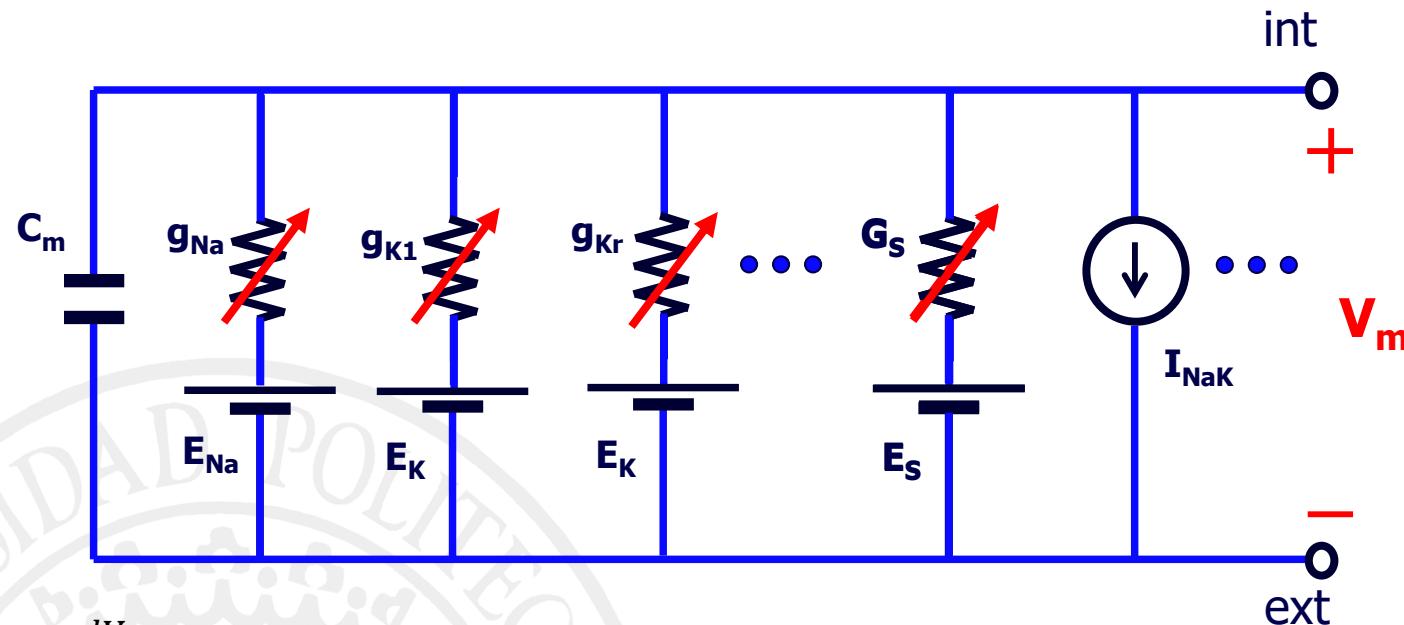
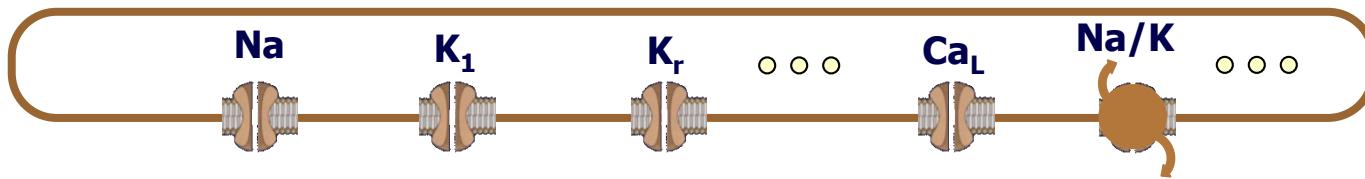


TEMA 4

TÉCNICAS DE REGISTRO DE CORRIENTES IÓNICAS

- 4.1.- Perspectiva histórica
- 4.2.- Corrientes unitarias y corrientes poblacionales
- 4.3.- Mecanismo de “compuerta” en canales iónicos
- 4.4.- La técnica del *voltage-clamp*
 - 4.4.1.- ¿Cómo podemos “bloquear” familias de canales?
 - 4.4.2.- ¿Cómo se fabrican los microelectrodos?
 - 4.4.3.- ¿Cómo es el montaje experimental?
 - 4.4.4.- ¿Qué “aspecto” tiene la instrumentación electrónica?
- 4.5.- El *patch-clamp* como complemento del *voltage-clamp*
 - 4.5.1.- ¿Cómo es el acoplamiento microelectrodo-célula?
 - 4.5.2.- ¿Se pueden medir corrientes unitarias?
 - 4.5.3.- ¿Se puede automatizar el proceso?

En episodios anteriores...



$$\text{medible} \quad C_m \frac{dV_m}{dt} + \sum_f I_{fs} + \sum_{B,I} I_{B,I} + I_{stim} = 0$$

$$I_{sf} = G_{sf}(V_m - E_s) = \underline{G_{sf}} \underline{p_{osf}} (V_m - E_s)$$

? $p_{osf}(V_m, t)$: Fracción de canales abiertos de la familia \approx
 \approx probabilidad de que un canal de la familia esté abierto

Necesitamos entender la dinámica de aperturas y cierres de los canales

Necesitamos medir las corrientes iónicas a través de los canales
 (a diferentes potenciales de membrana)

Estructura del tema

- Perspectiva histórica
- Corrientes unitarias y corrientes poblacionales
- Mecanismo de “compuerta” en canales iónicos
- La técnica del *voltage-clamp*
 - ¿Cómo podemos “bloquear” familias de canales?
 - ¿Cómo se fabrican los microelectrodos?
 - ¿Cómo es el montaje experimental?
 - ¿Qué “aspecto” tiene la instrumentación electrónica?
- El *patch-clamp* como complemento del *voltage-clamp*
 - ¿Cómo es el acoplamiento microelectrodo-célula?
 - ¿Se pueden medir corrientes unitarias?
 - ¿Se puede automatizar el proceso?



Hitos en la Electrofisiología Experimental

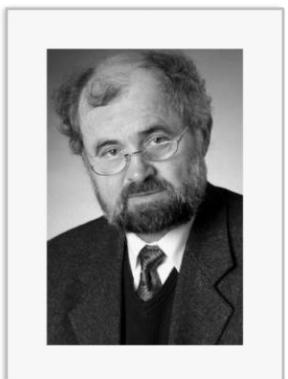
	Hito	Premio Nobel	
1922	Primer registro experimental del potencial de acción	Gasser, Erlanger	1944
1920 - 1940	Teoría básica de la membrana celular	Nernst	1920
		Goldmann, Katz	1970
1940 - 1945	Invención del <i>voltage-clamp</i>		
1945 - 1952	Desarrollo del <i>voltage-clamp</i> e interpretación de los procesos iónicos transmembrana	Hodgkin, Huxley	1963
1960 - 1980	Descubrimiento de nuevas corrientes iónicas		
1980 - 1990	Invención y desarrollo del <i>patch-clamp</i>	Sakmann, Neher	1991
1990 - ¿?	Descubrimiento y caracterización de (muchas) nuevas corrientes iónicas		



Alan Hodgkin & Andrew Huxley

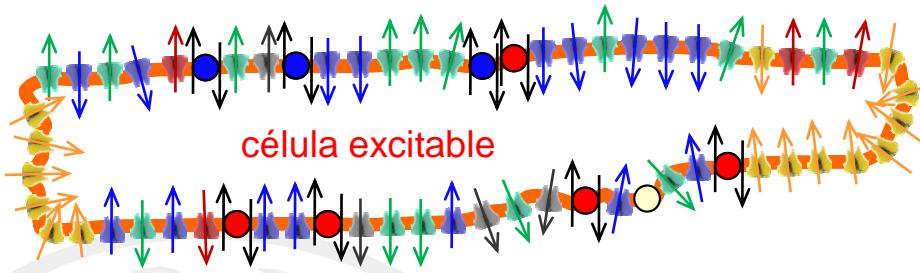
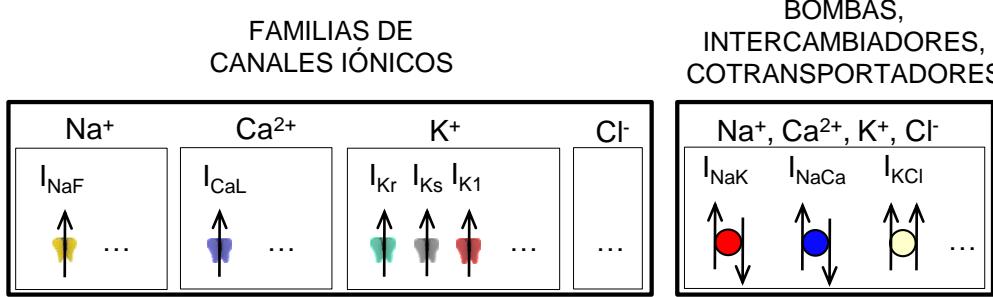


Bert Sakmann

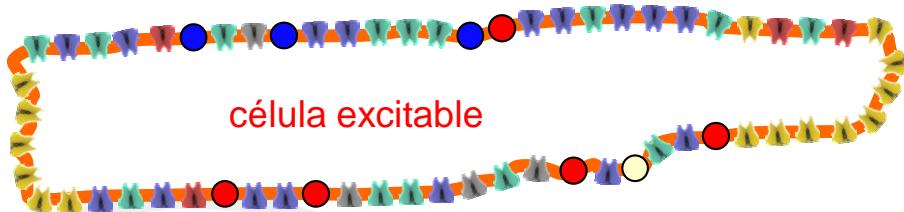
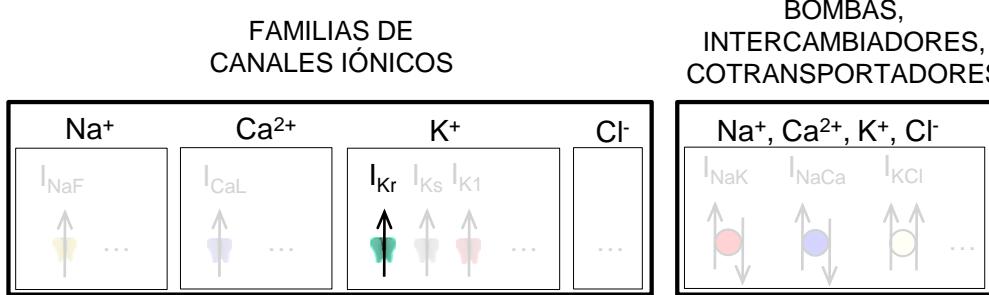


& Erwin Neher

Corrientes iónicas unitarias y poblacionales

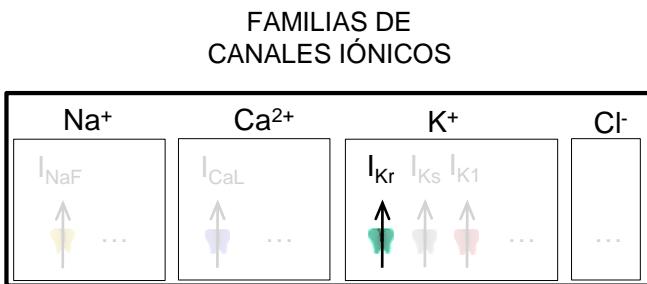


Corrientes iónicas unitarias y poblacionales



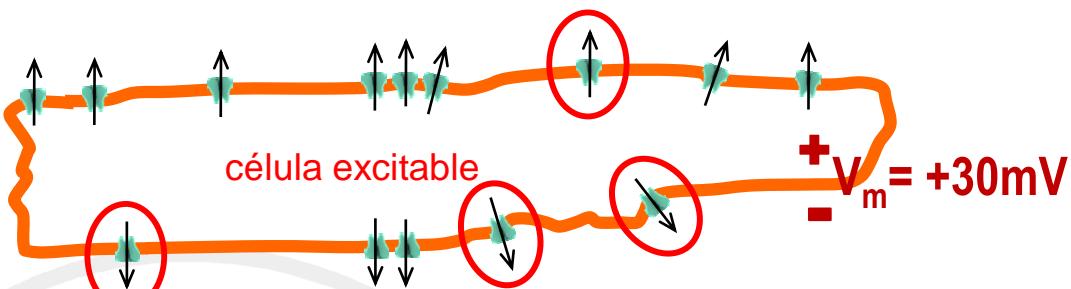
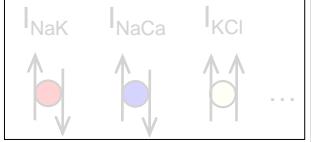
Consideremos una familia/población concreta de canales iónicos
(por ejemplo, I_{Kr})

Corrientes iónicas unitarias y poblacionales



BOMBAS,
INTERCAMBIADORES,
COTRANSPORTADORES

$\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}, \text{K}^+, \text{Cl}^-$



- La apertura y cierre de los canales iónicos es un fenómeno estocástico
- La amplitud de la corriente unitaria depende del potencial de membrana
- La probabilidad de que un canal esté abierto depende del potencial de membrana (entre otros factores)

$$i_s = \gamma_s (V_m - E_s)$$

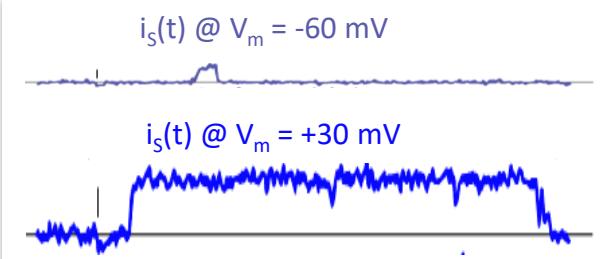
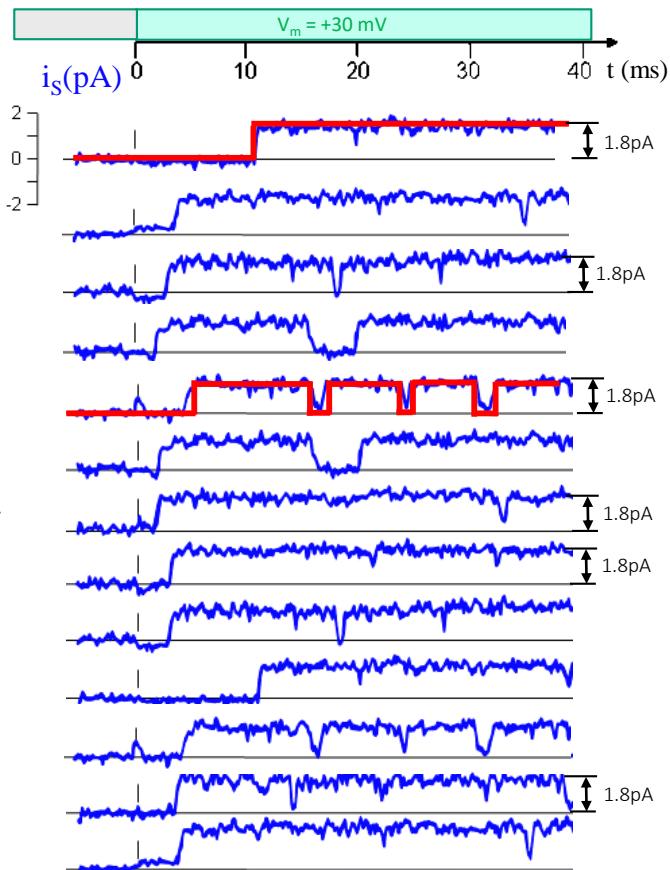
EJEMPLO

$$K^+ \rightarrow E_K = -90 \text{ mV}$$

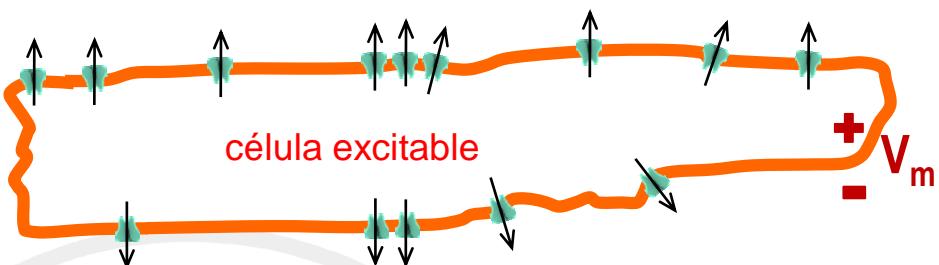
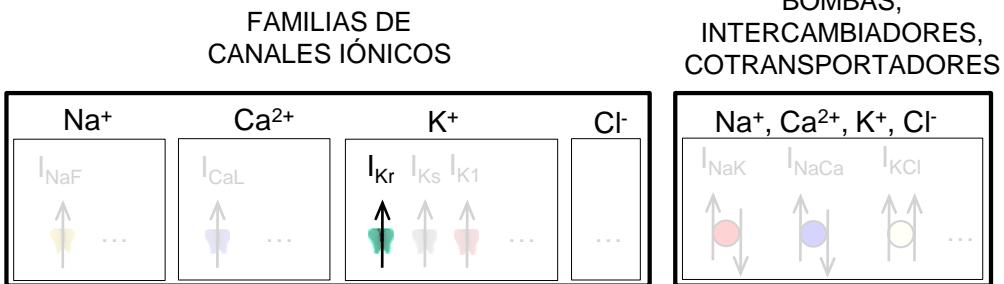
$$V_m = +30 \text{ mV}$$

$$I_{\text{Kr}} = 1.8 \text{ pA}$$

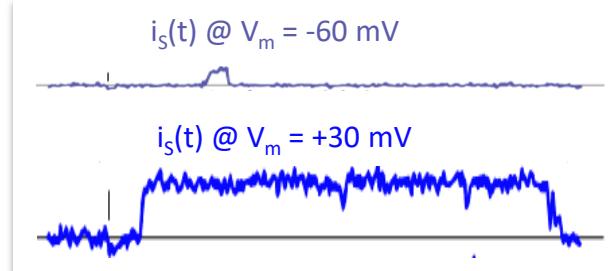
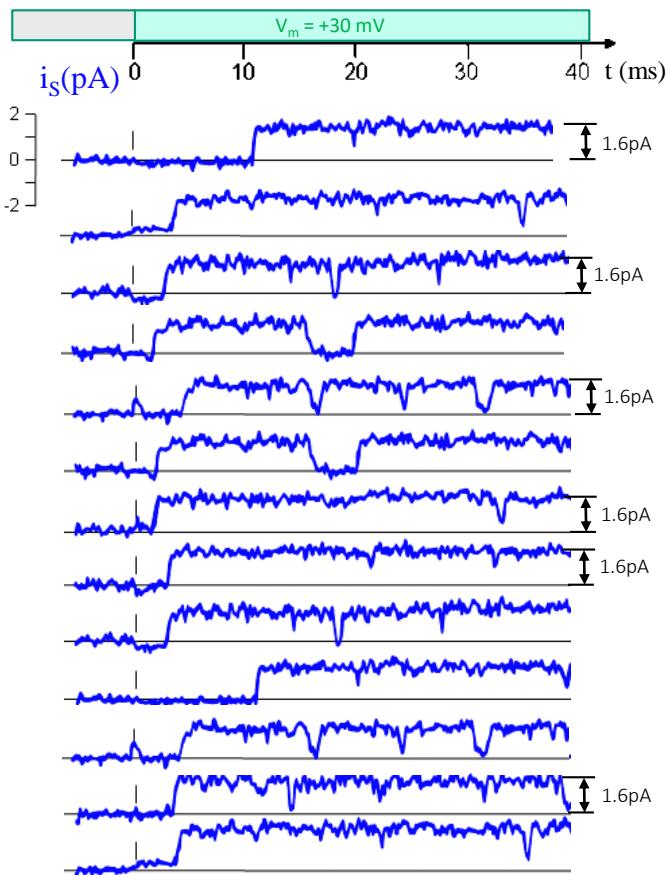
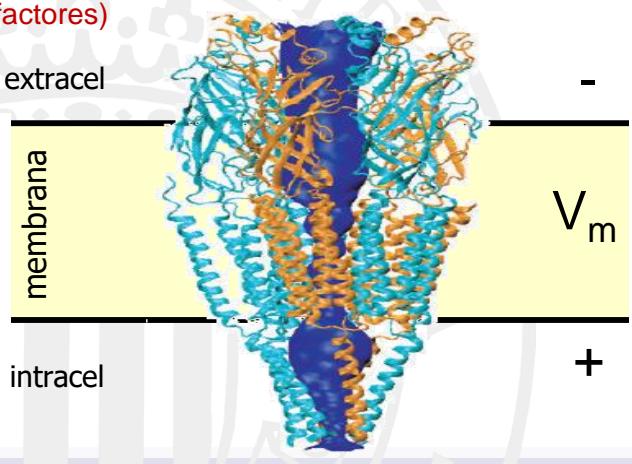
$$\Rightarrow \gamma_{\text{Kr}} = 15 \text{ pS}$$



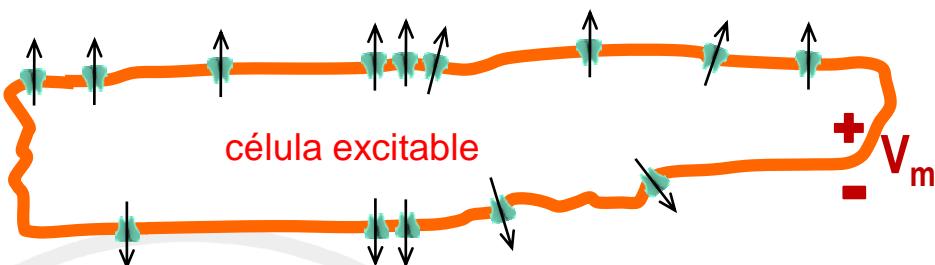
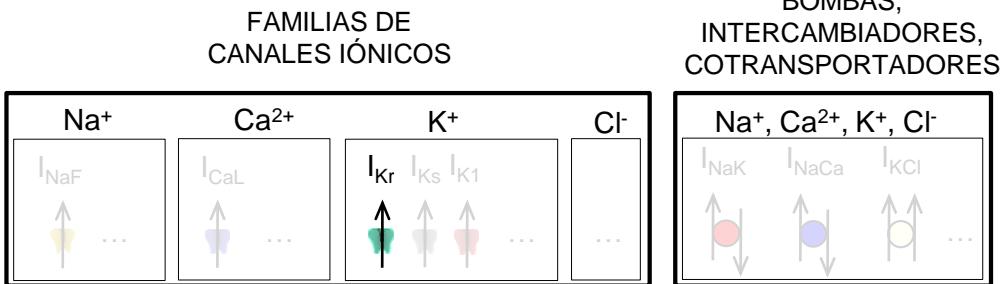
Corrientes iónicas unitarias y poblacionales



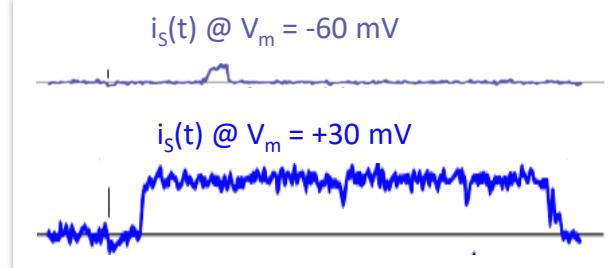
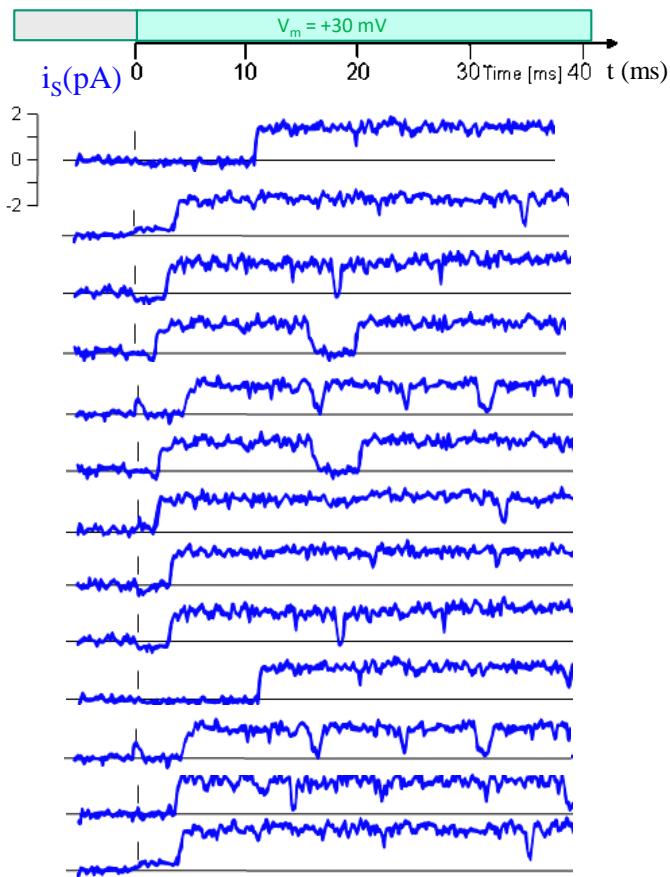
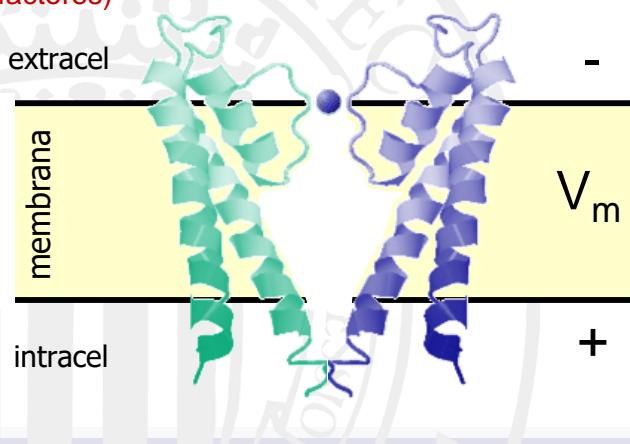
- La apertura y cierre de los canales iónicos es un fenómeno estocástico
- La amplitud de la corriente unitaria depende del potencial de membrana
- La probabilidad de que un canal esté abierto depende del potencial de membrana (entre otros factores)**



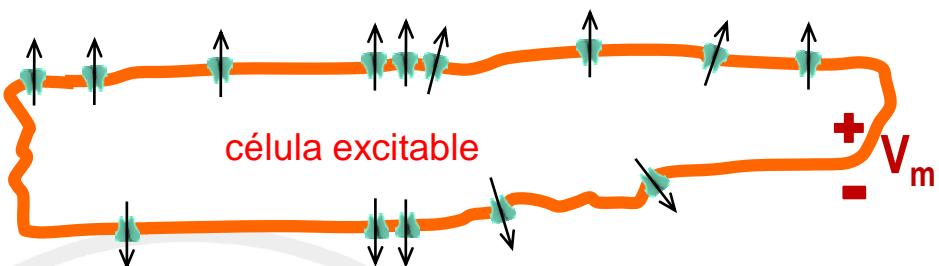
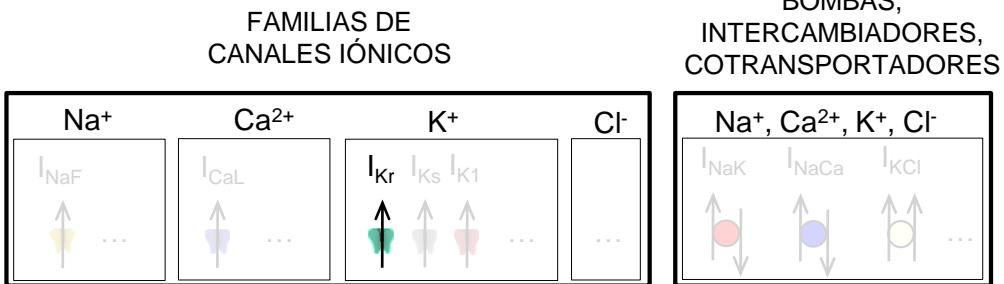
Corrientes iónicas unitarias y poblacionales



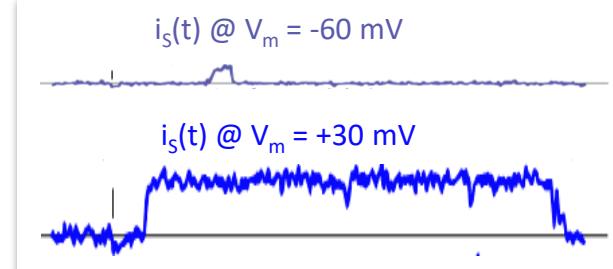
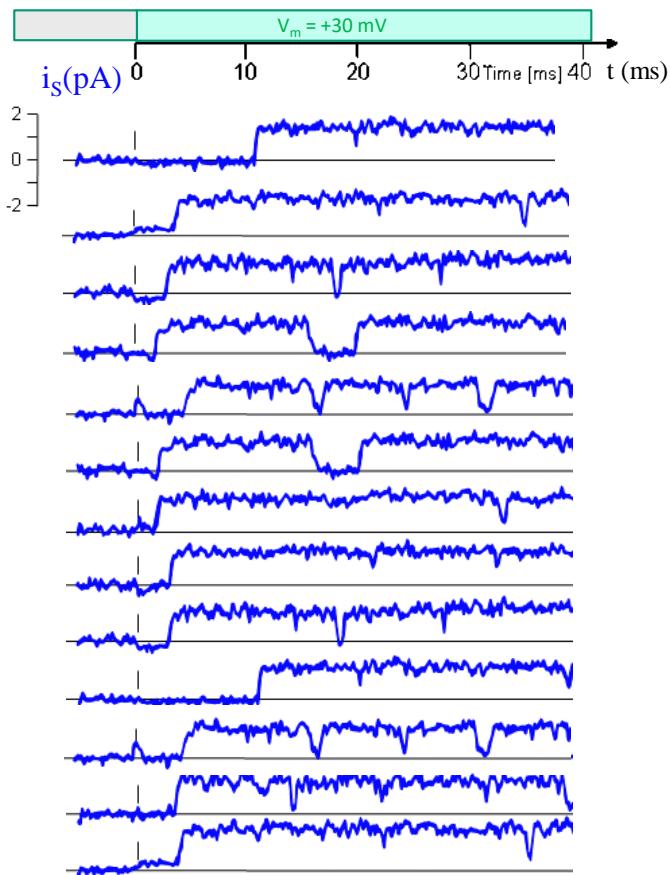
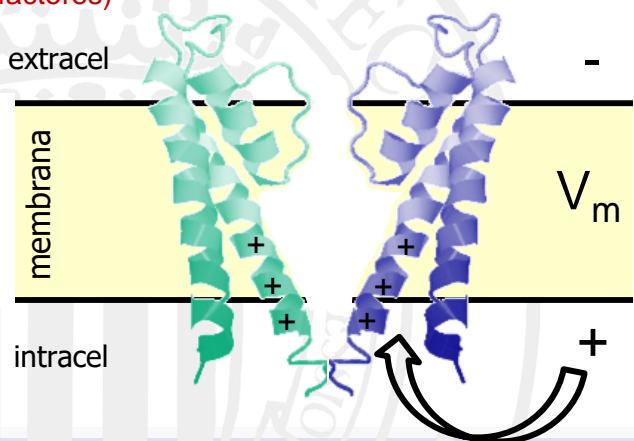
- La apertura y cierre de los canales iónicos es un fenómeno estocástico
- La amplitud de la corriente unitaria depende del potencial de membrana
- La probabilidad de que un canal esté abierto depende del potencial de membrana (entre otros factores)**



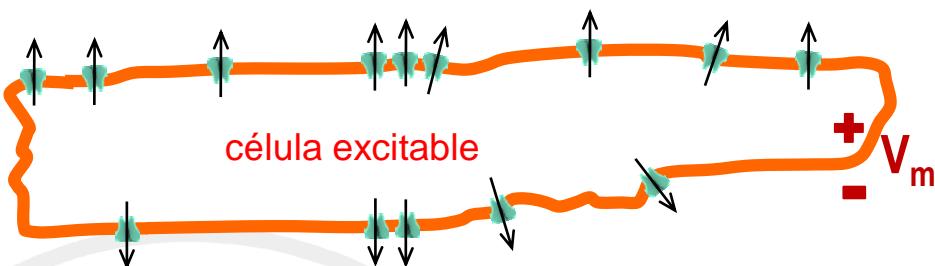
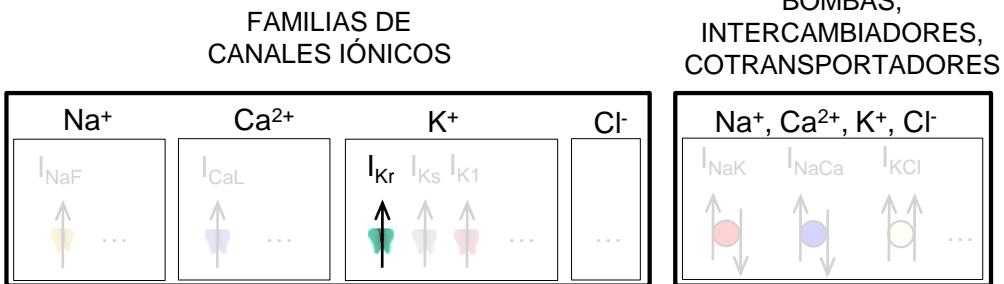
Corrientes iónicas unitarias y poblacionales



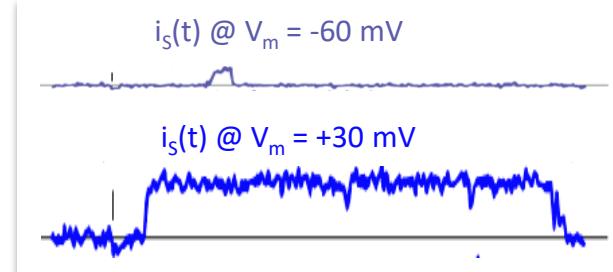
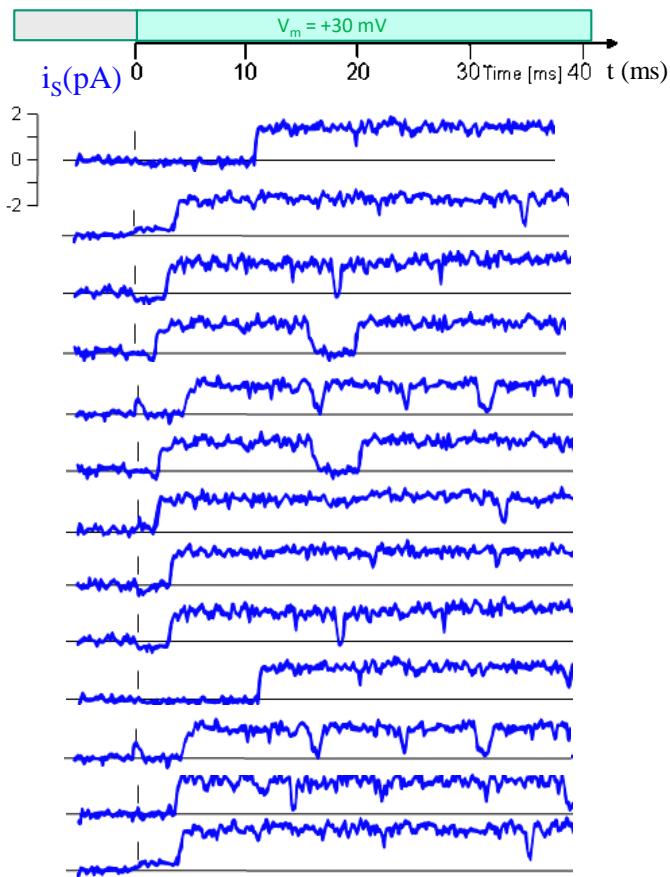
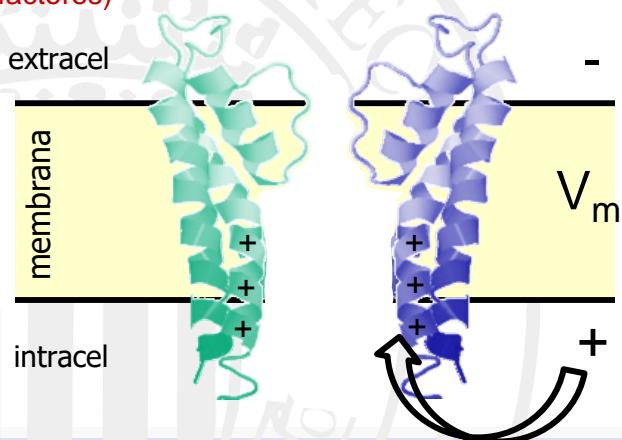
- La apertura y cierre de los canales iónicos es un fenómeno estocástico
- La amplitud de la corriente unitaria depende del potencial de membrana
- La probabilidad de que un canal esté abierto depende del potencial de membrana (entre otros factores)**



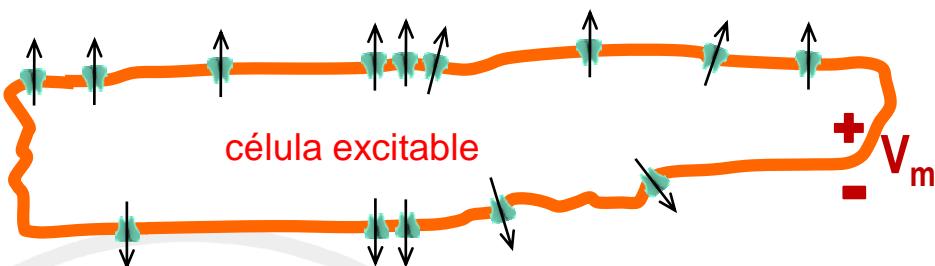
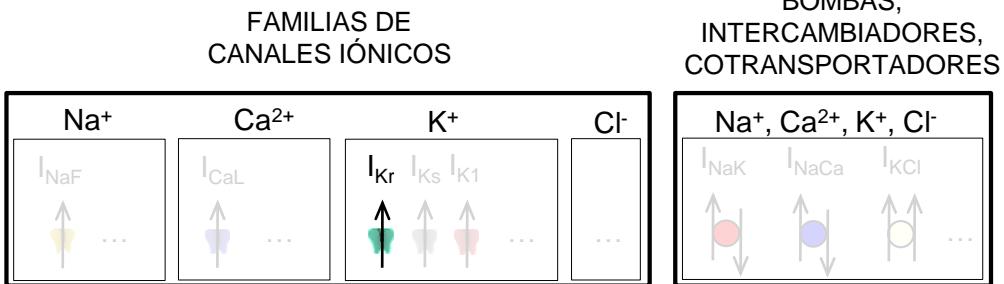
Corrientes iónicas unitarias y poblacionales



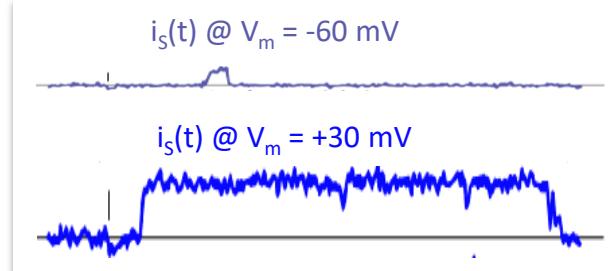
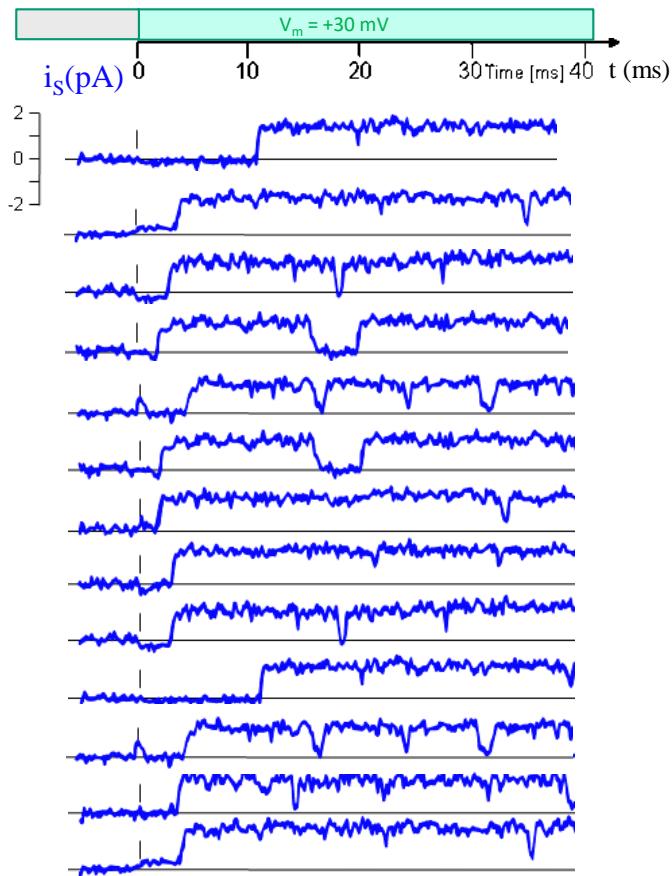
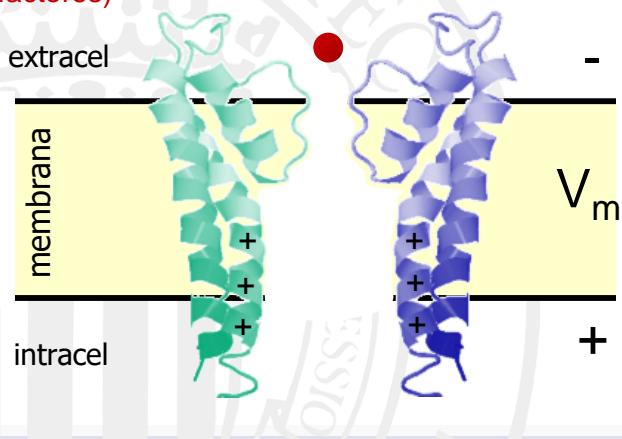
- La apertura y cierre de los canales iónicos es un fenómeno estocástico
- La amplitud de la corriente unitaria depende del potencial de membrana
- La probabilidad de que un canal esté abierto depende del potencial de membrana (entre otros factores)**



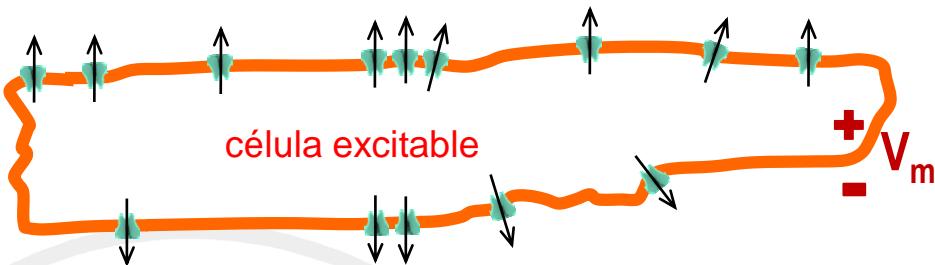
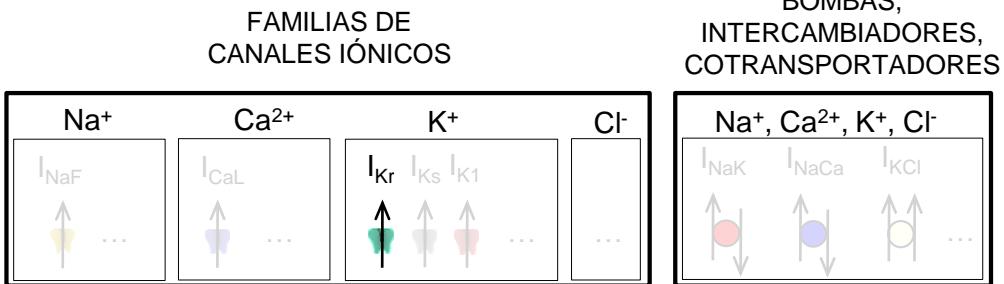
Corrientes iónicas unitarias y poblacionales



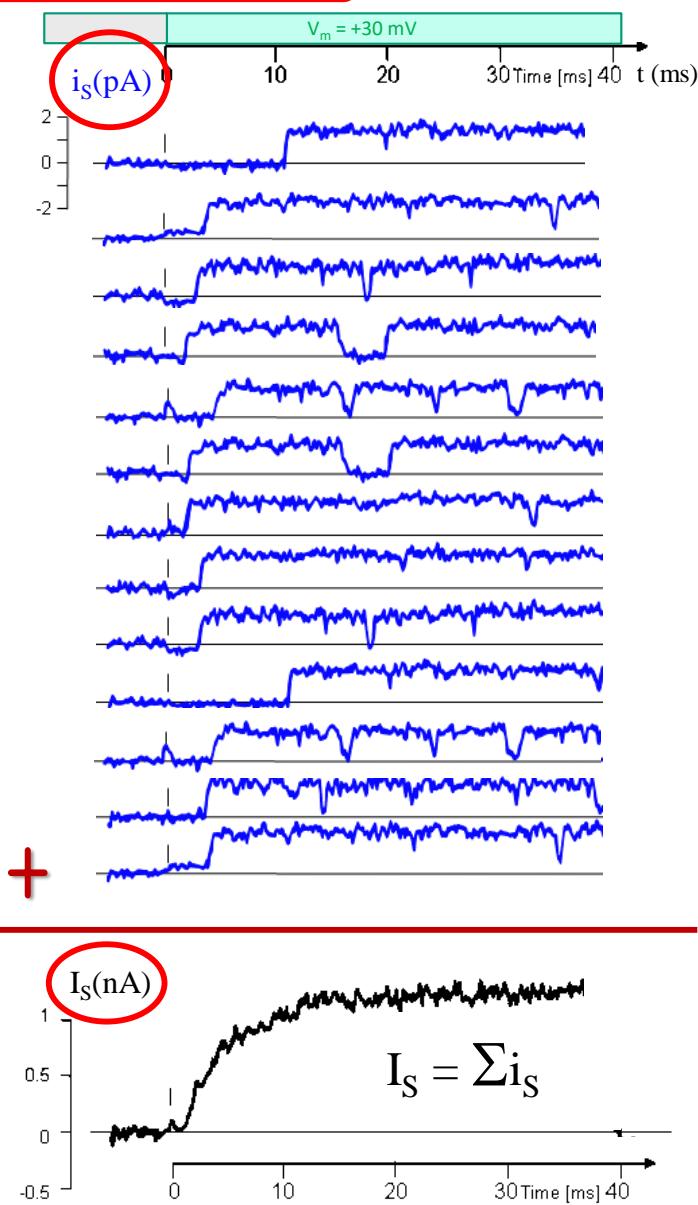
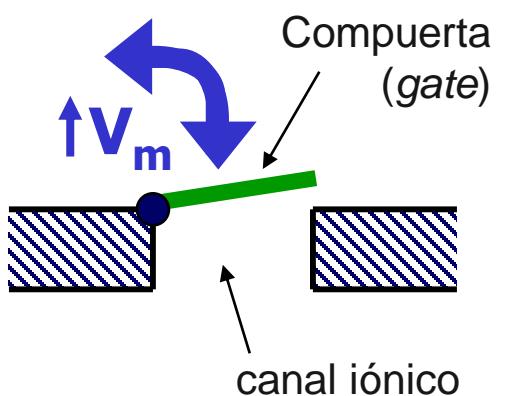
- La apertura y cierre de los canales iónicos es un fenómeno estocástico
- La amplitud de la corriente unitaria depende del potencial de membrana
- La probabilidad de que un canal esté abierto depende del potencial de membrana (entre otros factores)**



Corrientes iónicas unitarias y poblacionales

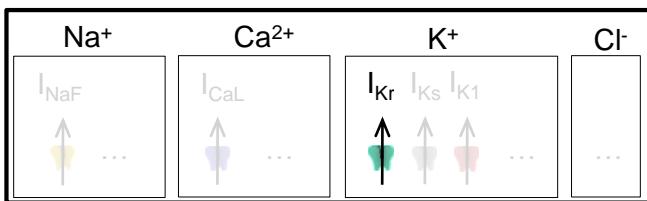


- La apertura y cierre de los canales iónicos es un fenómeno estocástico
- La amplitud de la corriente unitaria depende del potencial de membrana
- La probabilidad de que un canal esté abierto depende del potencial de membrana (entre otros factores)

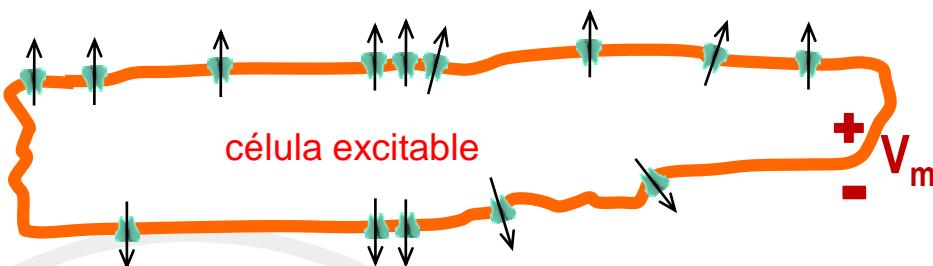
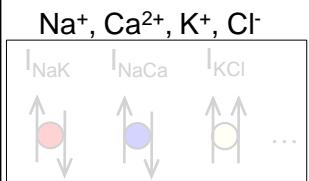


Corrientes iónicas unitarias y poblacionales

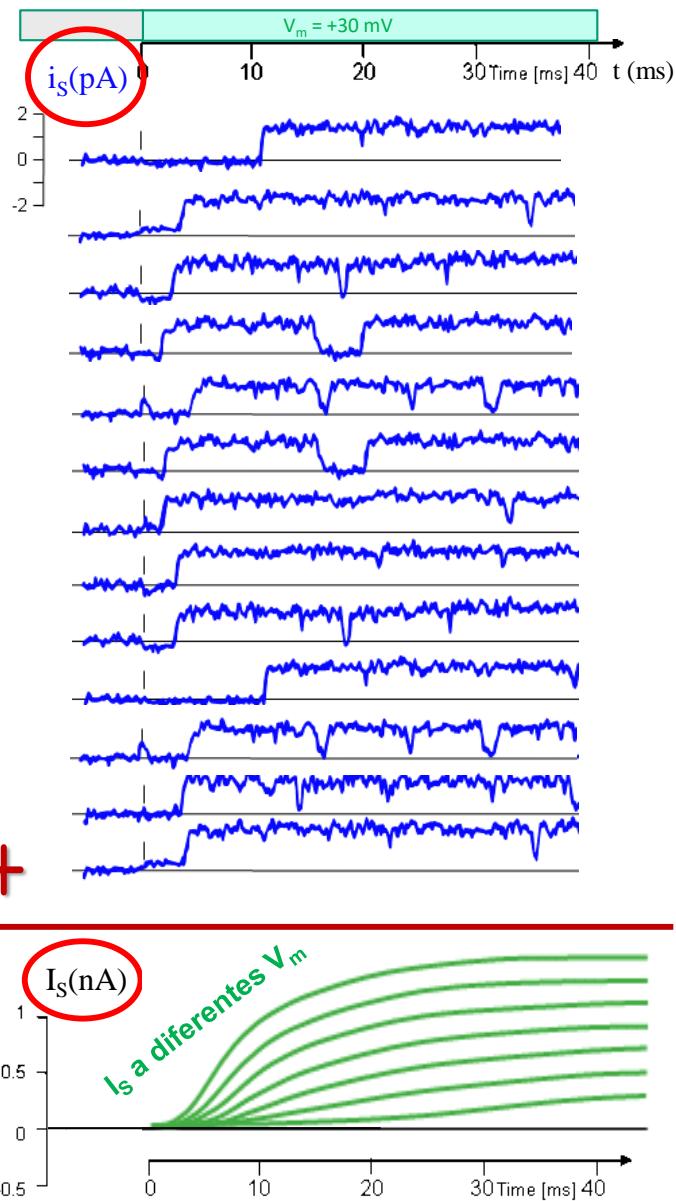
FAMILIAS DE CANALES IÓNICOS



BOMBAS, INTERCAMBIADORES, COTRANSPORTADORES

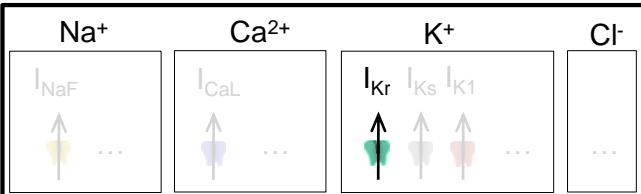


- La apertura y cierre de los canales iónicos es un fenómeno estocástico
- La amplitud de la corriente unitaria depende del potencial de membrana
- La probabilidad de que un canal esté abierto depende del potencial de membrana (entre otros factores)
- La corriente de la familia (población) es la suma de las corrientes unitarias (a través de los canales individuales de la familia)
- La corriente de la familia depende del potencial de membrana

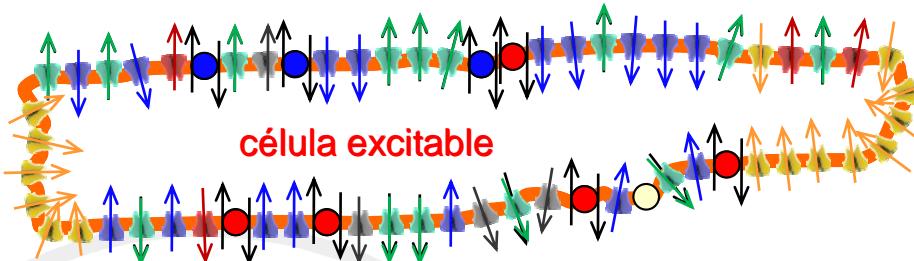
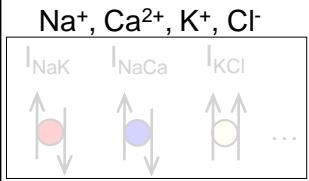


Corrientes iónicas unitarias y poblacionales

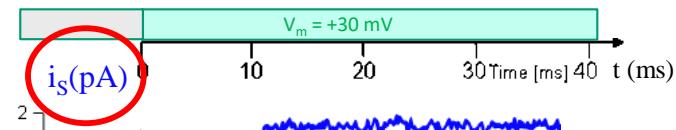
FAMILIAS DE CANALES IÓNICOS



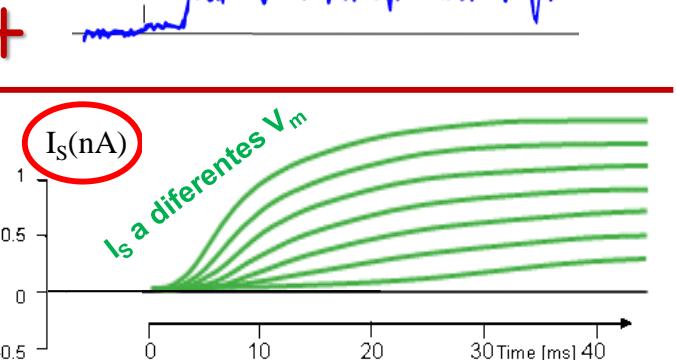
BOMBAS, INTERCAMBIADORES, COTRANSPORTADORES



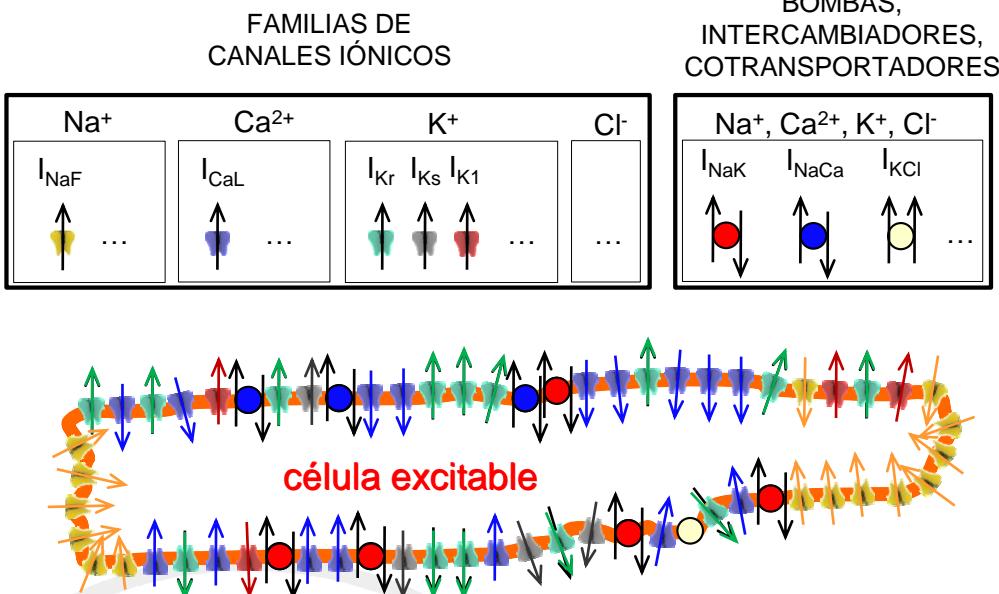
- La apertura y cierre de los canales iónicos es un fenómeno estocástico
- La amplitud de la corriente unitaria depende del potencial de membrana
- La probabilidad de que un canal esté abierto depende del potencial de membrana (entre otros factores)
- La corriente de la familia (población) es la suma de las corrientes unitarias (a través de los canales individuales de la familia)
- La corriente de la familia depende del potencial de membrana



En una situación "real" todas las familias de canales están funcionando a la vez...

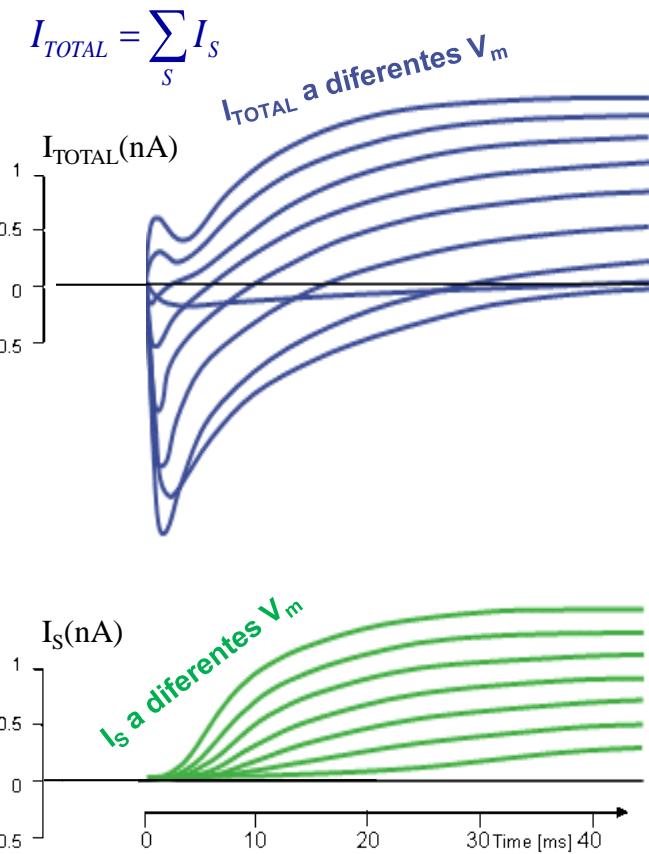


Corrientes iónicas unitarias y poblacionales

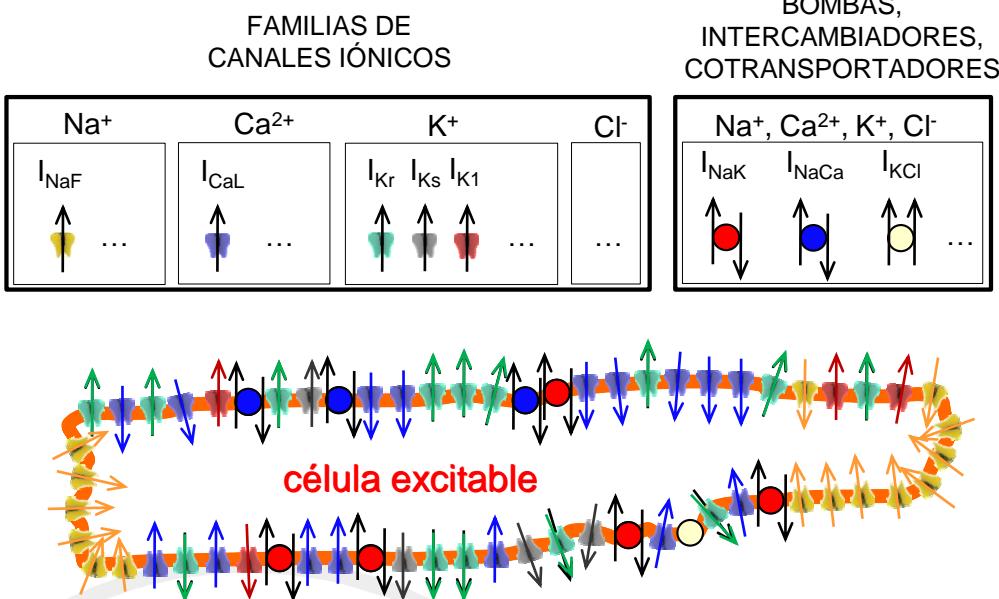


- La apertura y cierre de los canales iónicos es un fenómeno estocástico
- La amplitud de la corriente unitaria depende del potencial de membrana
- La probabilidad de que un canal esté abierto depende del potencial de membrana (entre otros factores)
- La corriente de la familia (población) es la suma de las corrientes unitarias (a través de los canales individuales de la familia)
- La corriente de la familia depende del potencial de membrana

En una situación “real”, todas las familias de canales están funcionando a la vez...

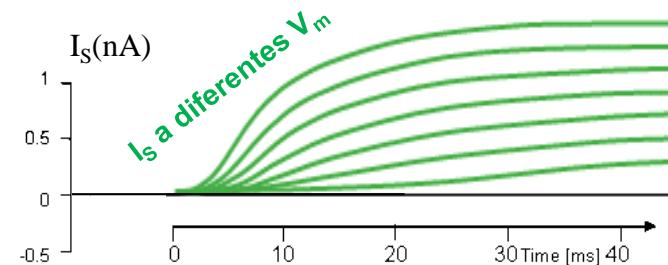
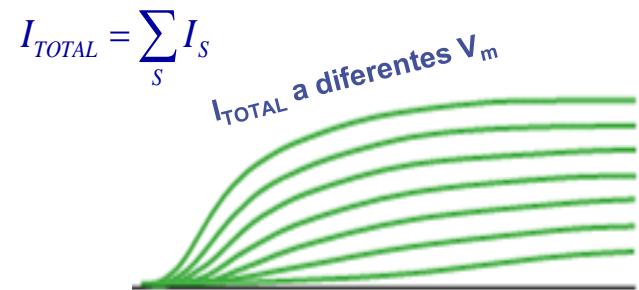


Corrientes iónicas unitarias y poblacionales



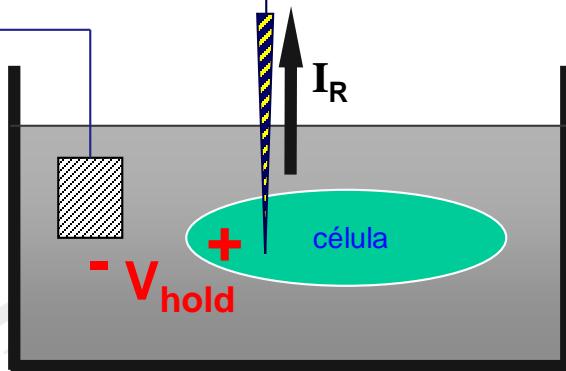
- La apertura y cierre de los canales iónicos es un fenómeno estocástico
- La amplitud de la corriente unitaria depende del potencial de membrana
- La probabilidad de que un canal esté abierto depende del potencial de membrana (entre otros factores)
- La corriente de la familia (población) es la suma de las corrientes unitarias (a través de los canales individuales de la familia)
- La corriente de la familia depende del potencial de membrana

En una situación “real”, todas las familias de canales están funcionando a la vez...

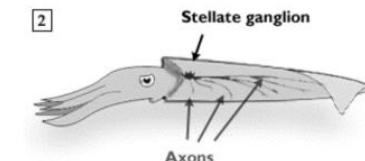
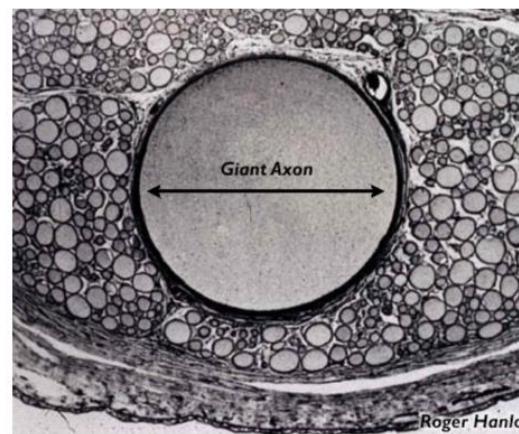


La estrategia para registrar corrientes iónicas: el "Voltage Clamp"

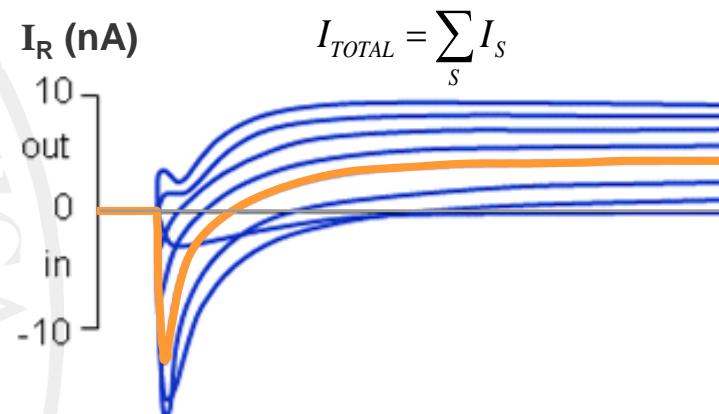
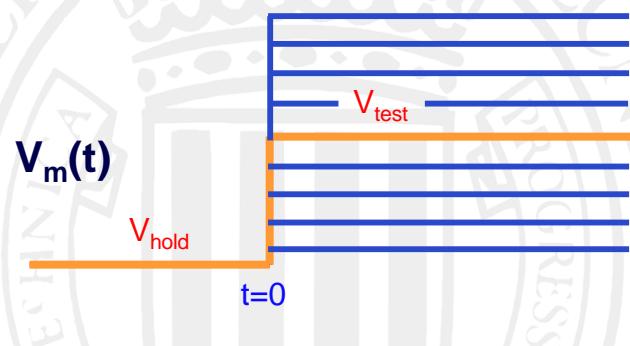
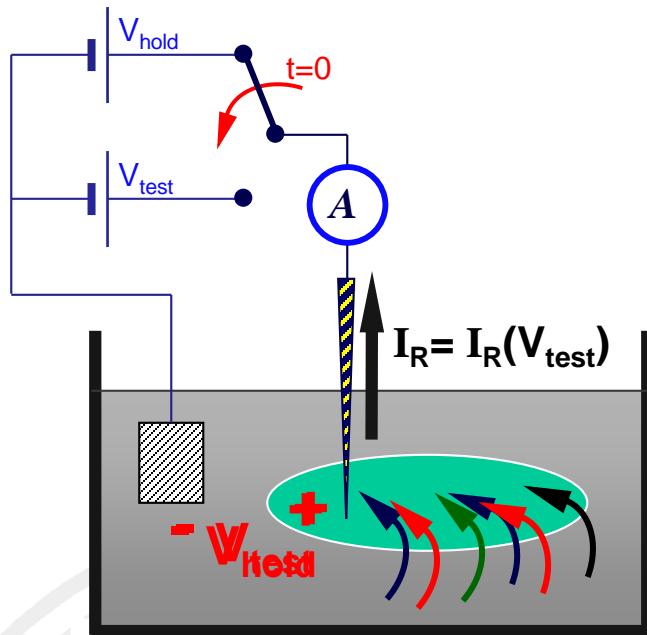
INSTRUMENTACIÓN ELECTRÓNICA



Alan Hodgkin
Andrew Huxley



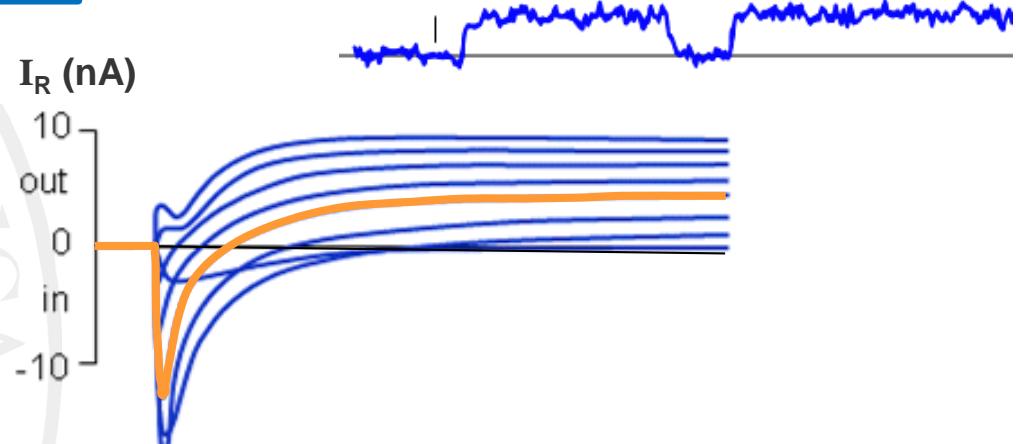
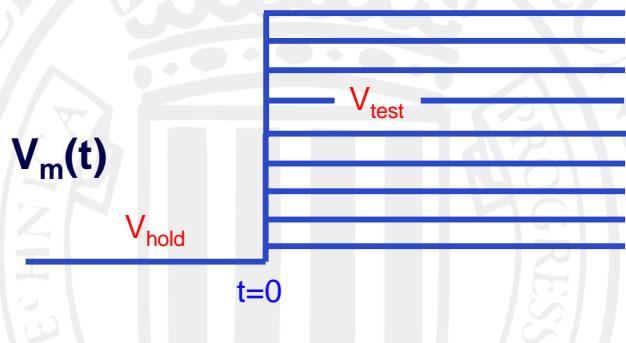
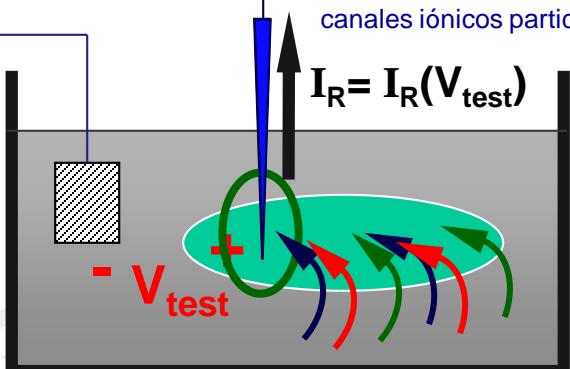
La estrategia para registrar corrientes iónicas: el "Voltage Clamp"



Preguntas...

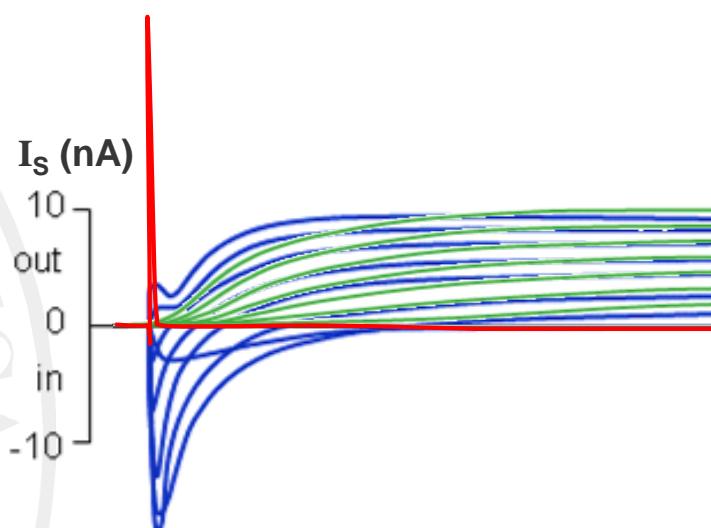
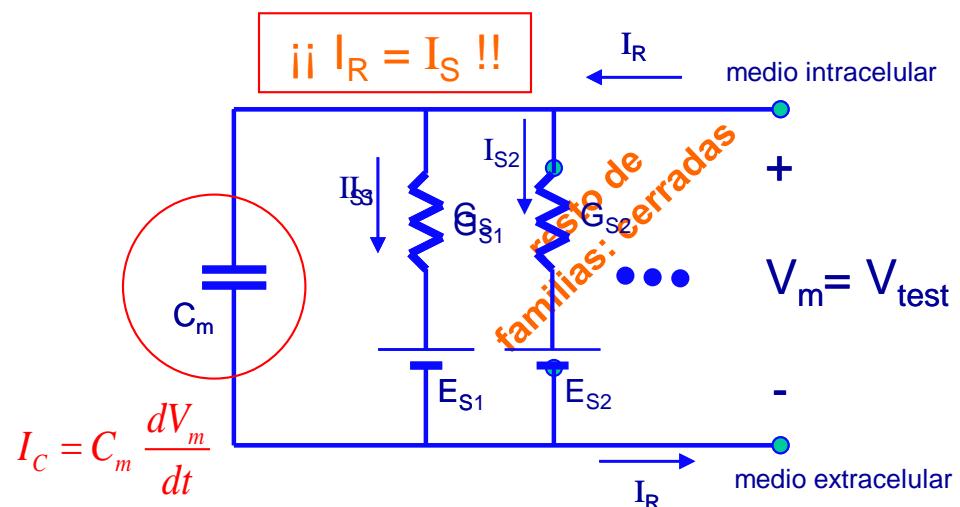
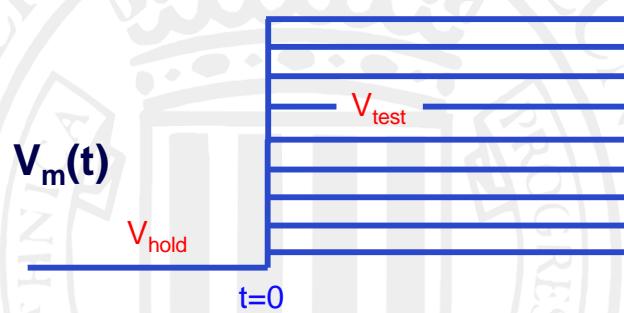
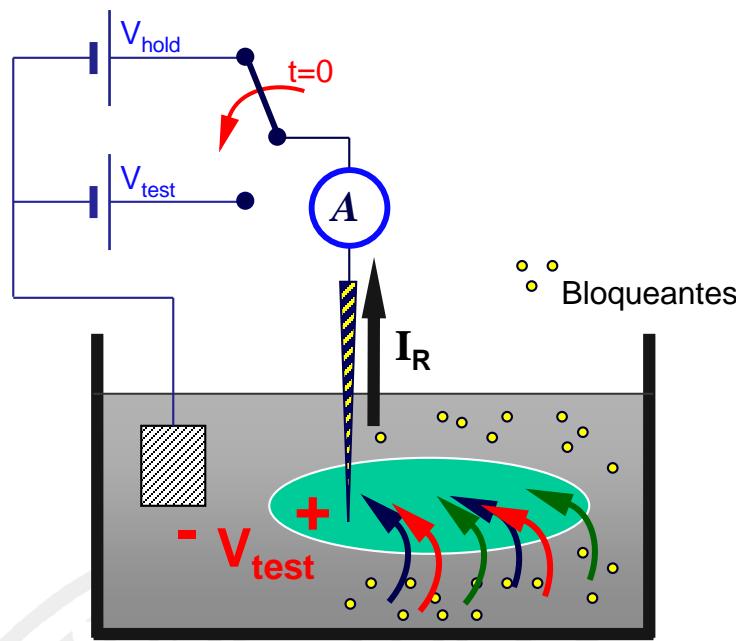
INSTRUMENTACIÓN ELECTRÓNICA

corriente iónica a través de UNA familia de canales iónicos particular

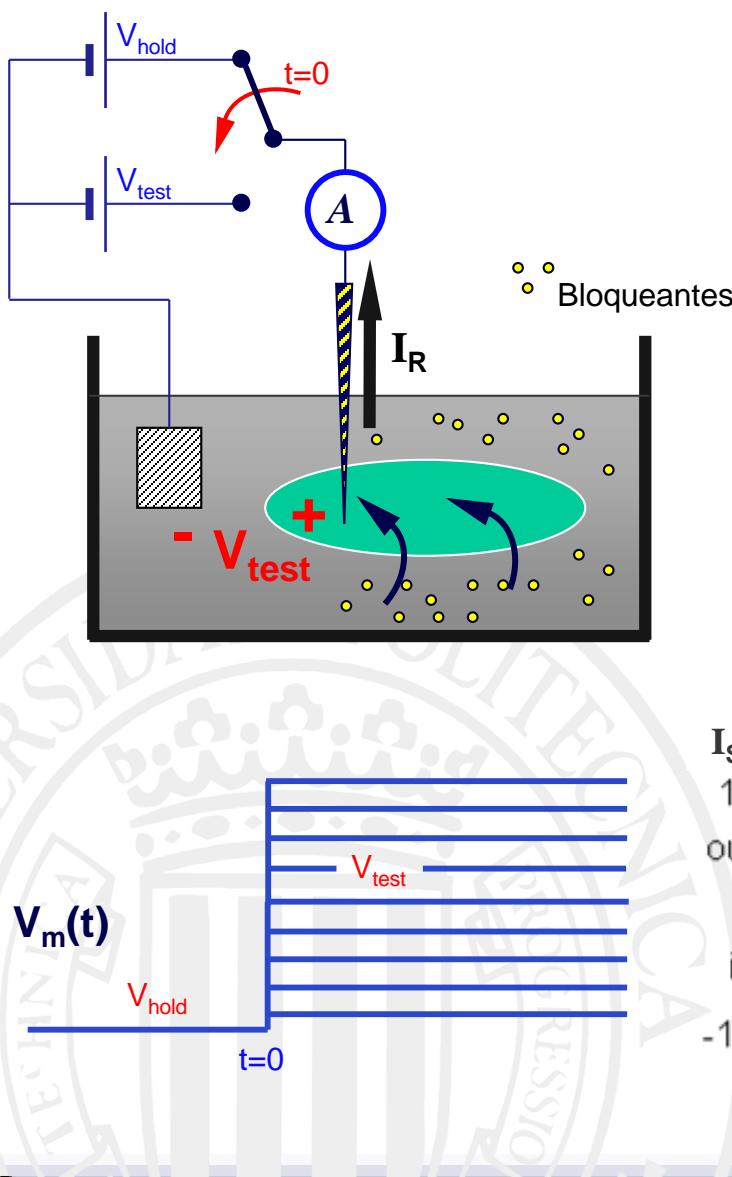


- ¿Cómo podemos “bloquear” familias de canales?
- ¿Cómo se fabrican los microelectrodos?
- ¿Cómo es el montaje experimental?
- ¿Qué “aspecto” tiene la instrumentación electrónica?
- ¿Cómo es el acoplamiento microelectrodo-célula?
- ¿Se pueden medir corrientes unitarias?
- ¿Se puede automatizar el proceso?

¿Cómo podemos "bloquear" familias de canales?

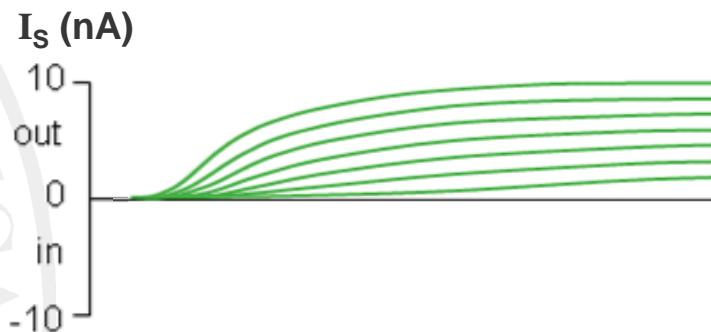


¿Cómo podemos “bloquear” familias de canales?

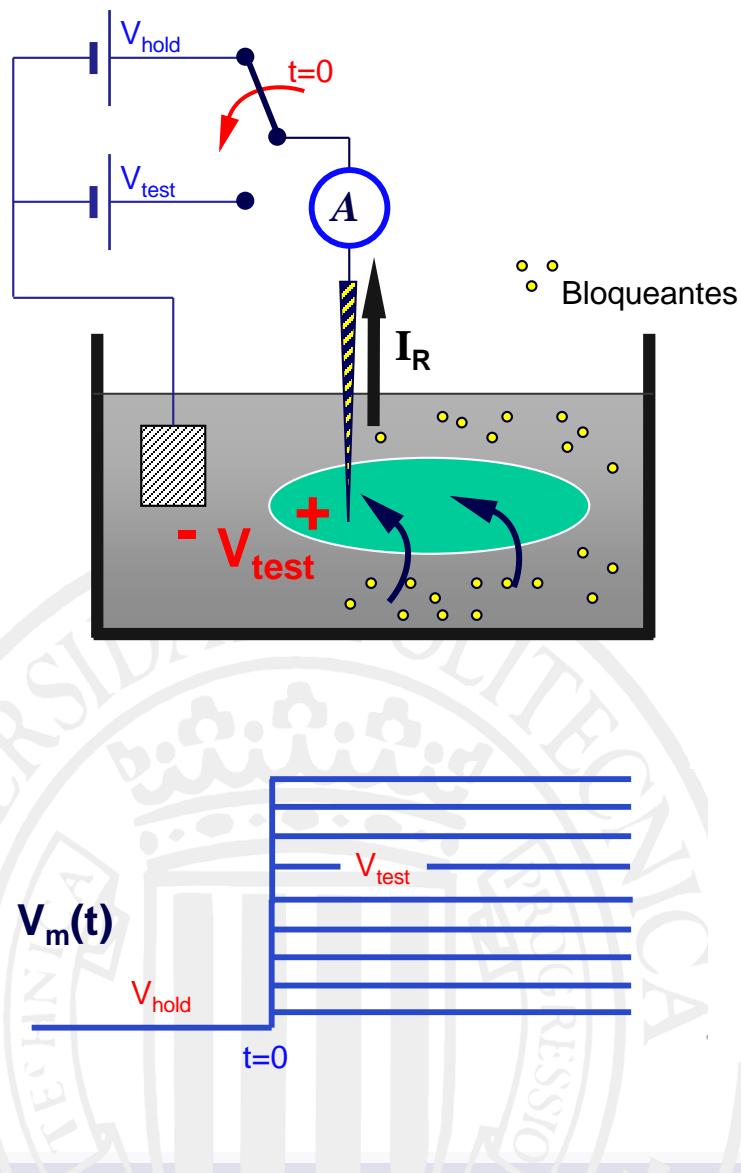


EJEMPLOS DE AGENTES BLOQUEANTES

- TTX (Tetrodotoxina) → bloquea I_{NaF}
- TEA (Tetraetilamonio) → bloquea varios canales de K^+
- Dofetilide: bloquea I_{Kr}
- HMR 1556: bloquea I_{Ks}
- Nisoldipina, Cd^{2+} → bloquean I_{CaL}
- Oubaína → bloquea la bomba Na^+/K^+

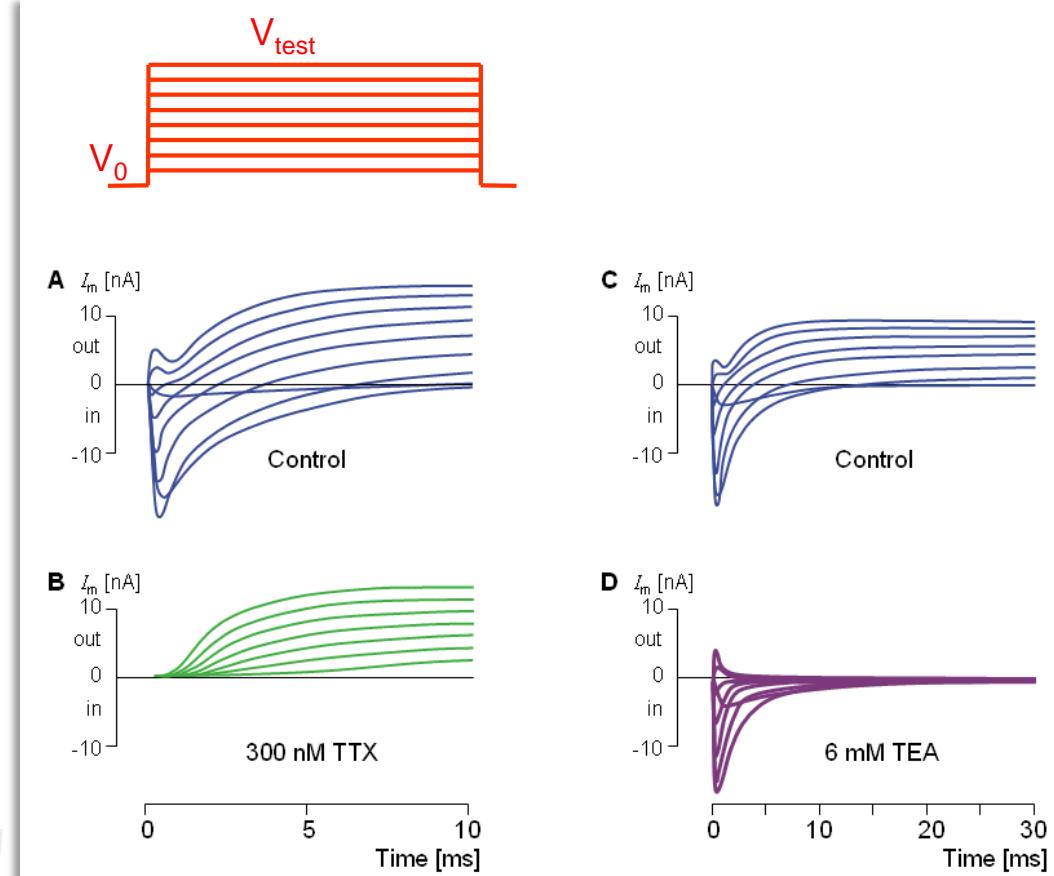


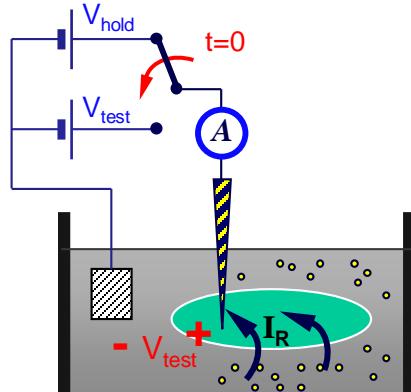
¿Cómo podemos "bloquear" familias de canales?



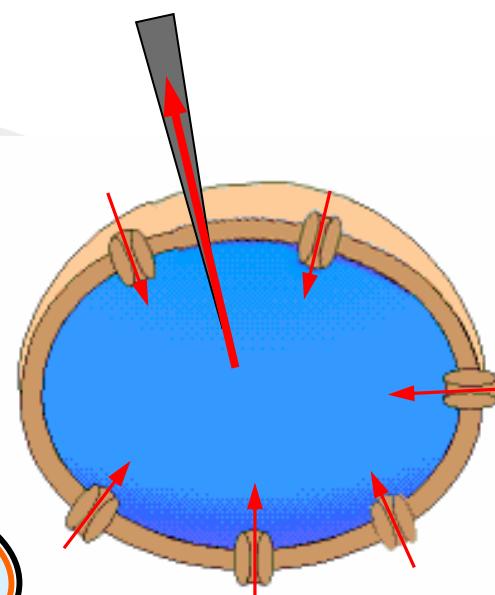
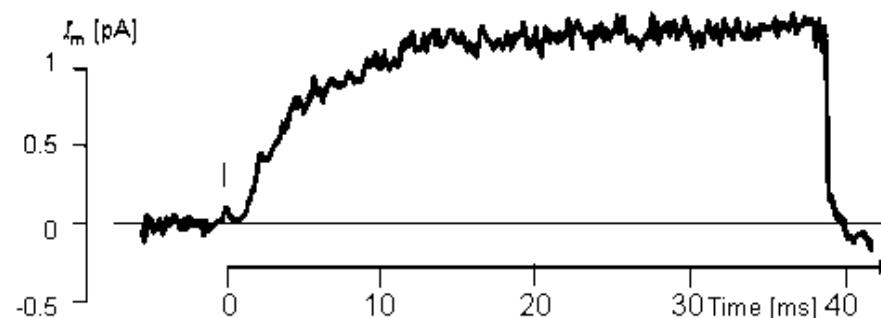
EJEMPLOS DE AGENTES BLOQUEANTES

- TTX (Tetrodotoxina) → bloquea I_{NaF}
- TEA (Tetraetilamonio) → bloquea varios canales de K^+





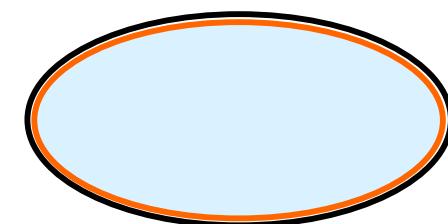
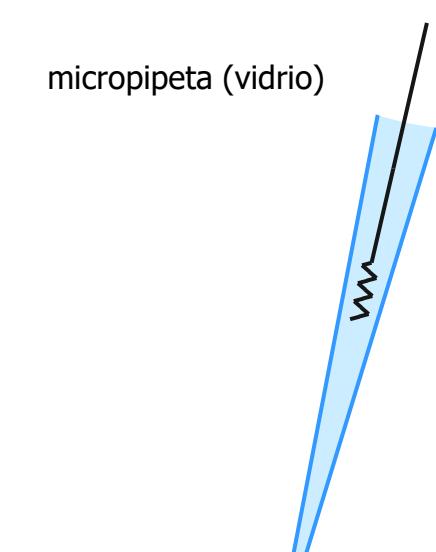
Microelectrodos vs micropipetas

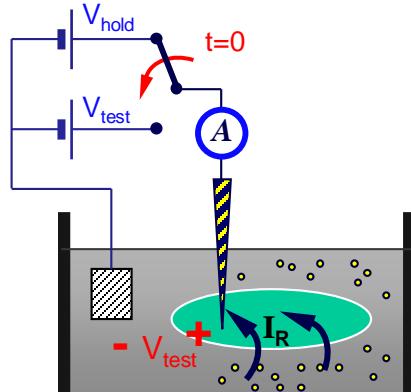


"Voltage clamp" con microelectrodo metálico



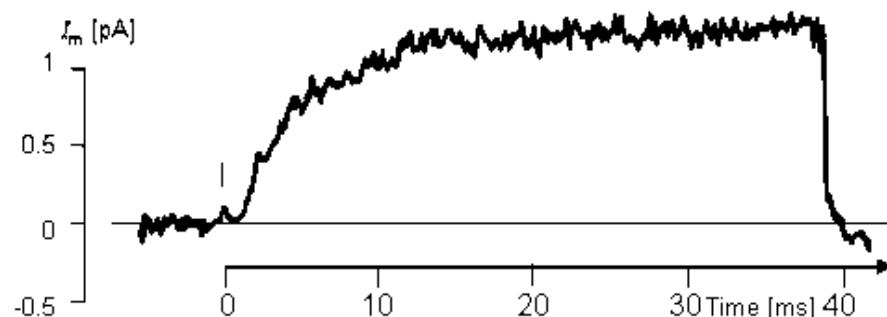
micropipeta (vidrio)



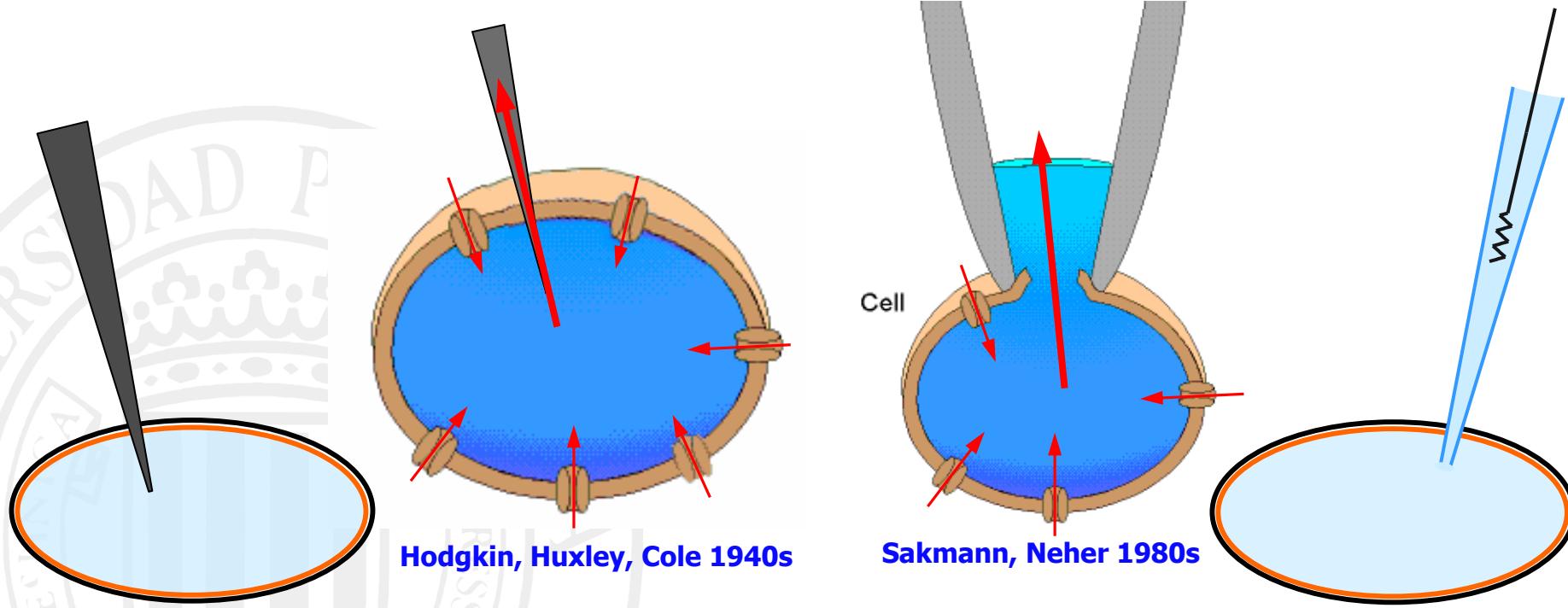


microelectrodo (metálico)

Microelectrodos vs micropipetas

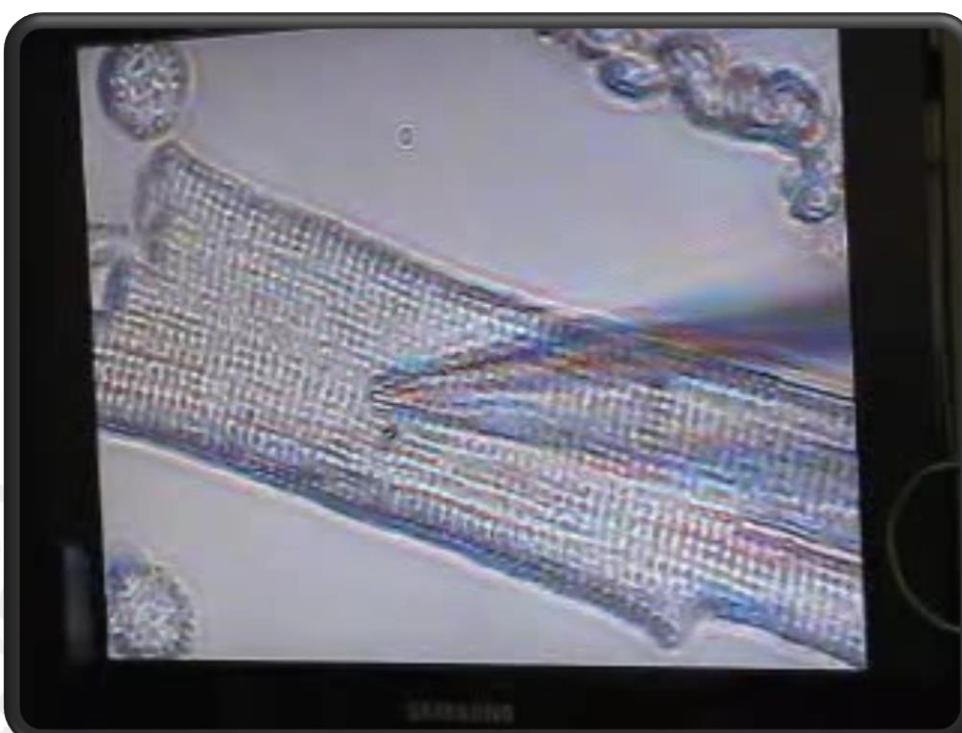


micropipeta (vidrio)



"Voltage clamp" con microelectrodo metálico

Microelectrodos vs micropipetas

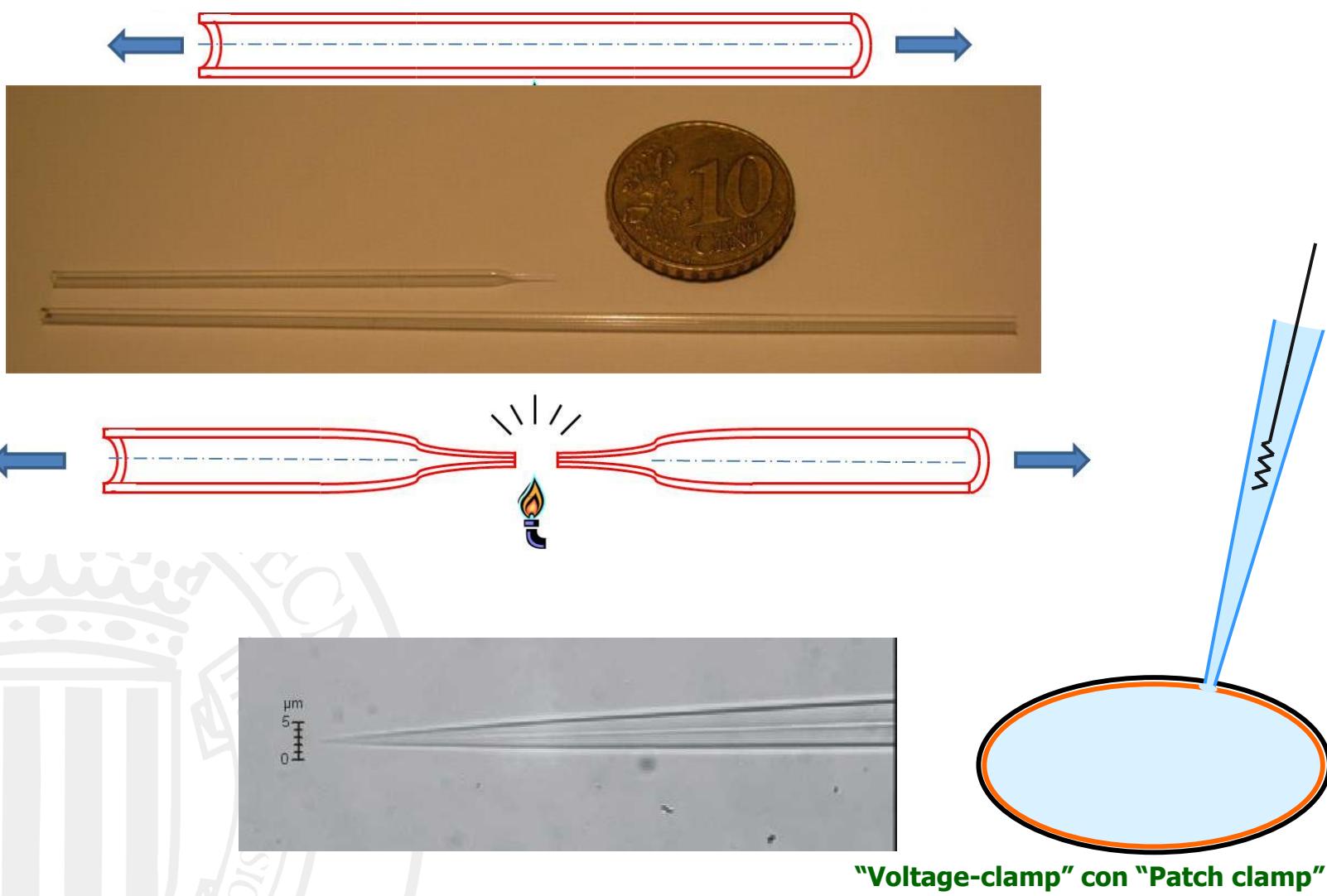


Sakmann, Neher 1980s

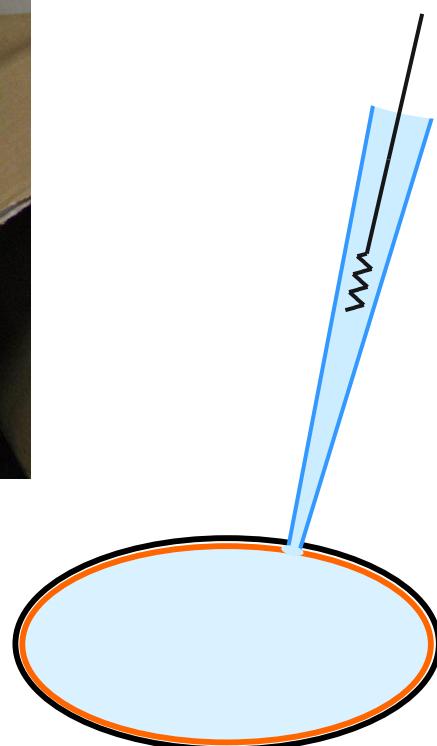
"Voltage-clamp" con "Patch clamp"



¿Cómo se fabrican las micropipetas?

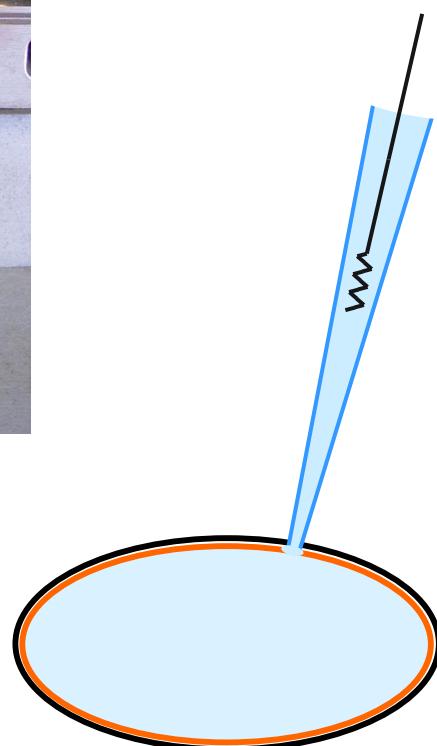
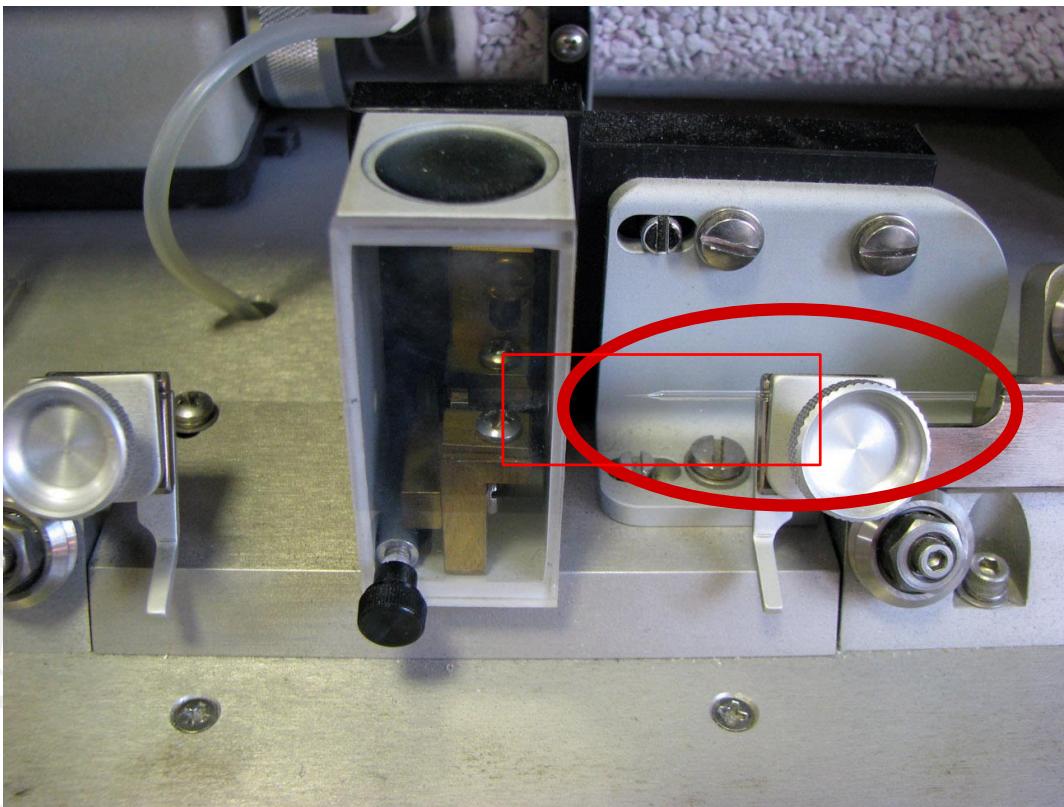


¿Cómo se fabrican las micropipetas?



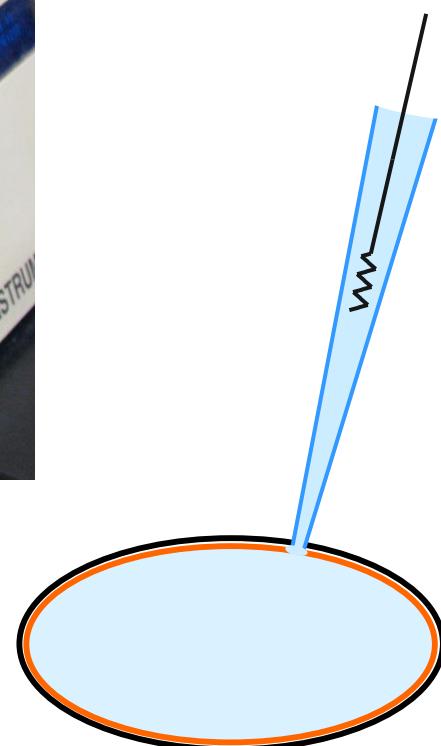
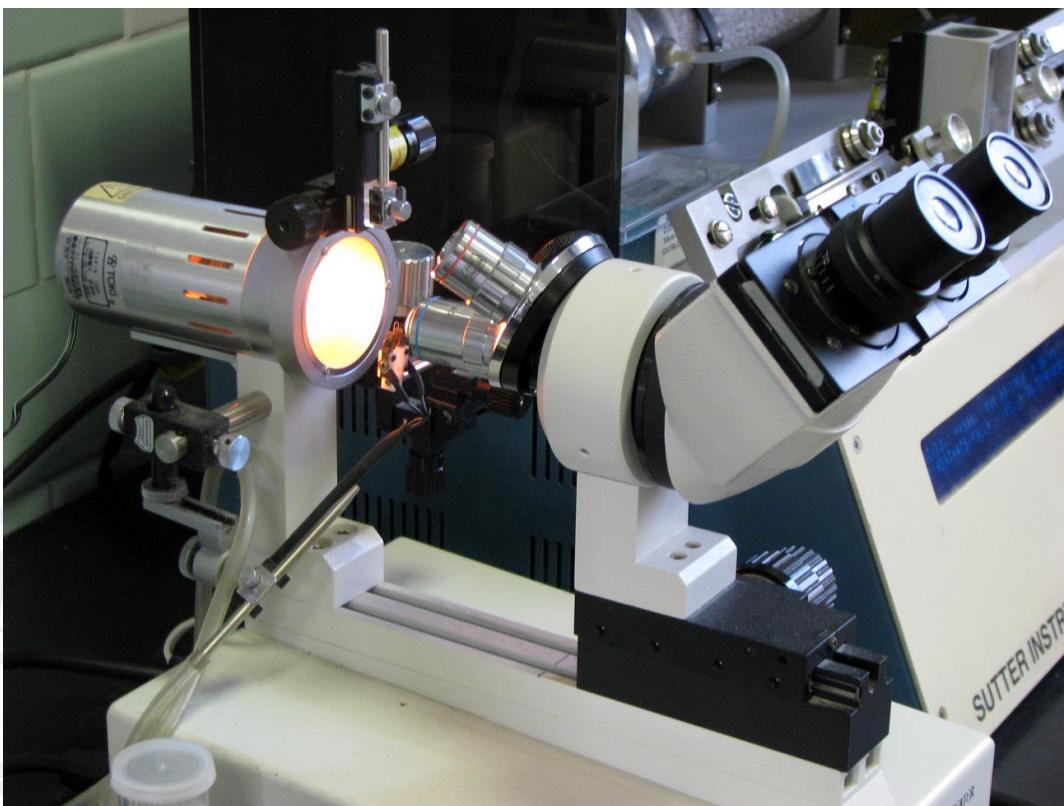
"Voltage-clamp" con "Patch clamp"

¿Cómo se fabrican las micropipetas?



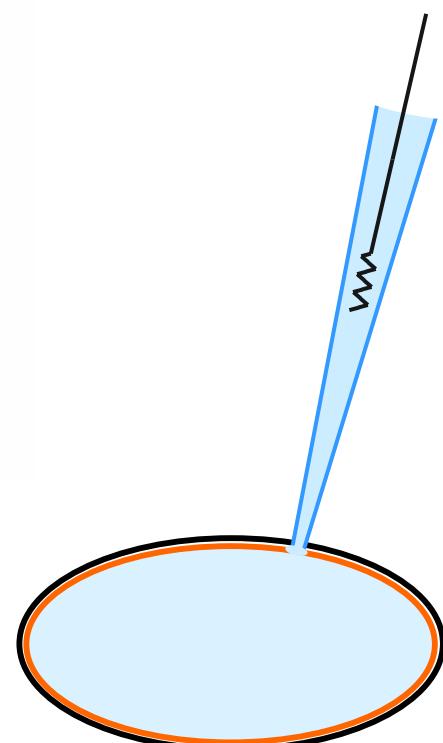
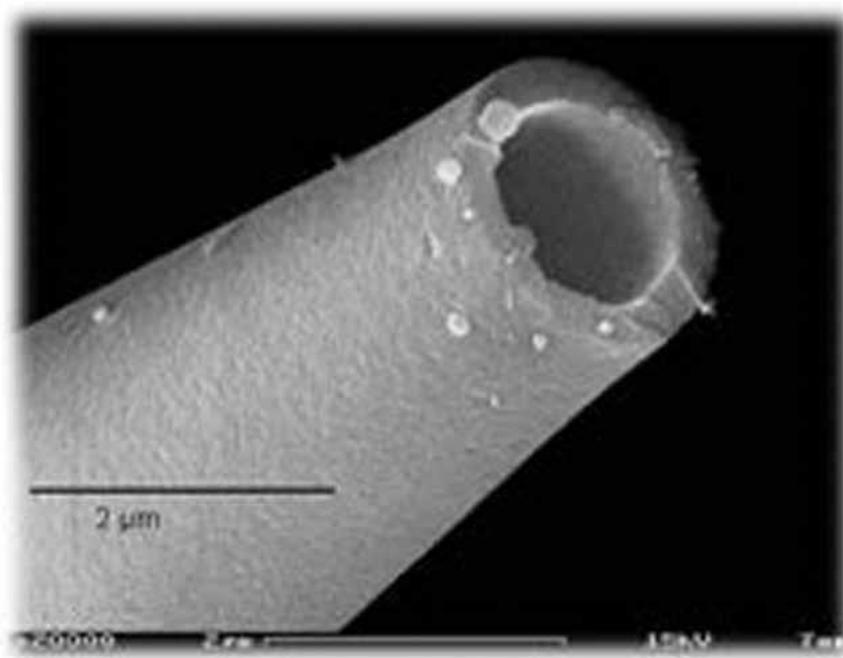
"Voltage-clamp" con "Patch clamp"

¿Cómo se fabrican las micropipetas?



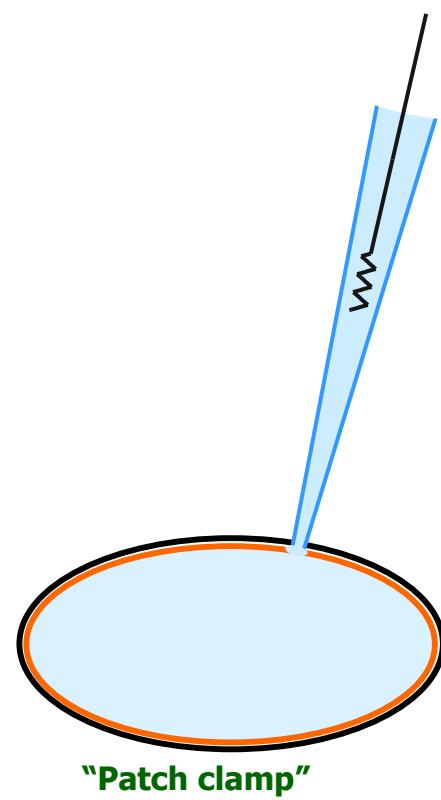
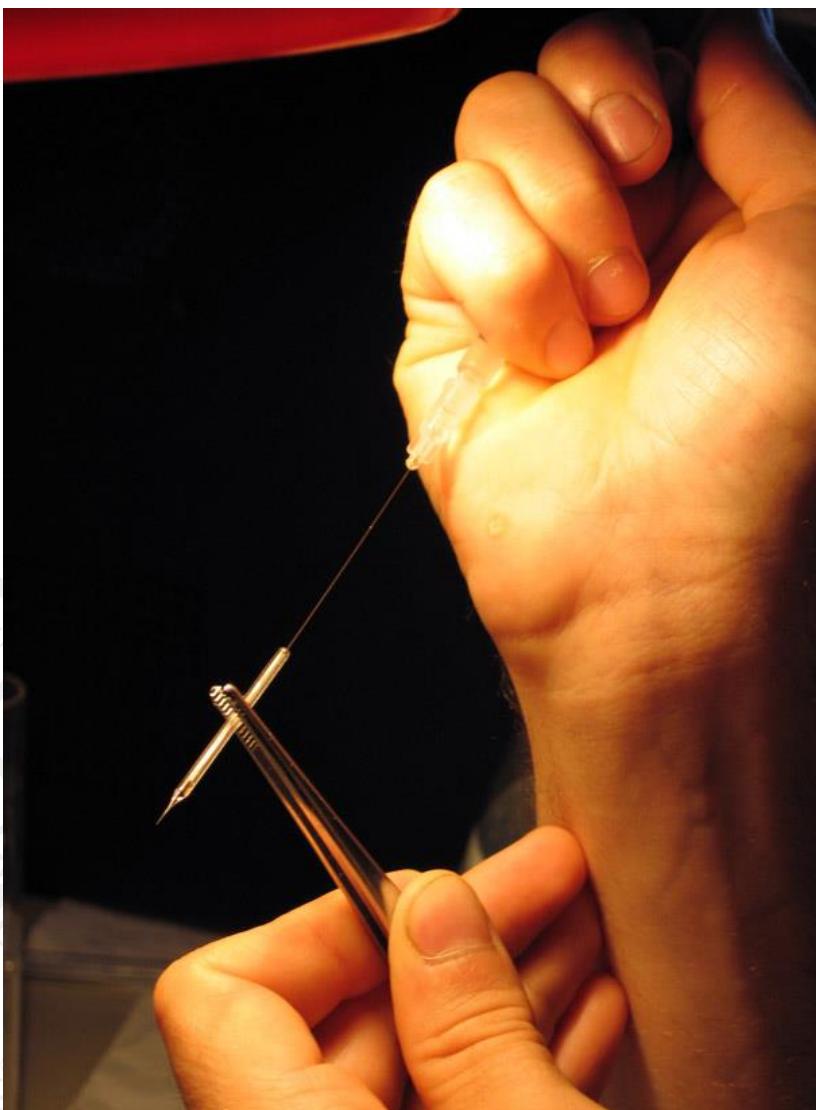
"Voltage-clamp" con "Patch clamp"

¿Cómo se fabrican las micropipetas?



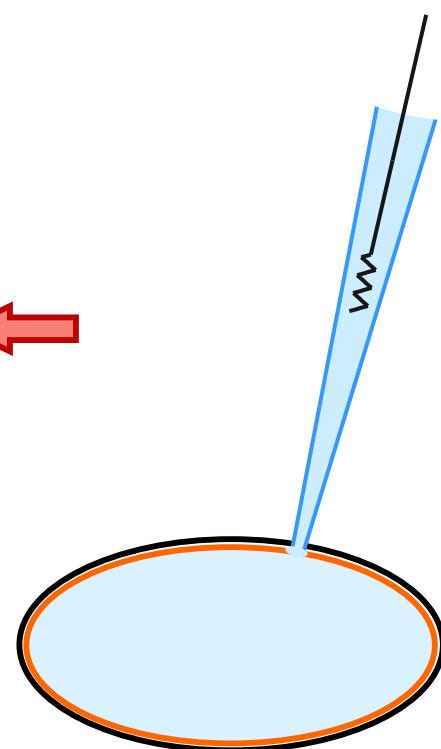
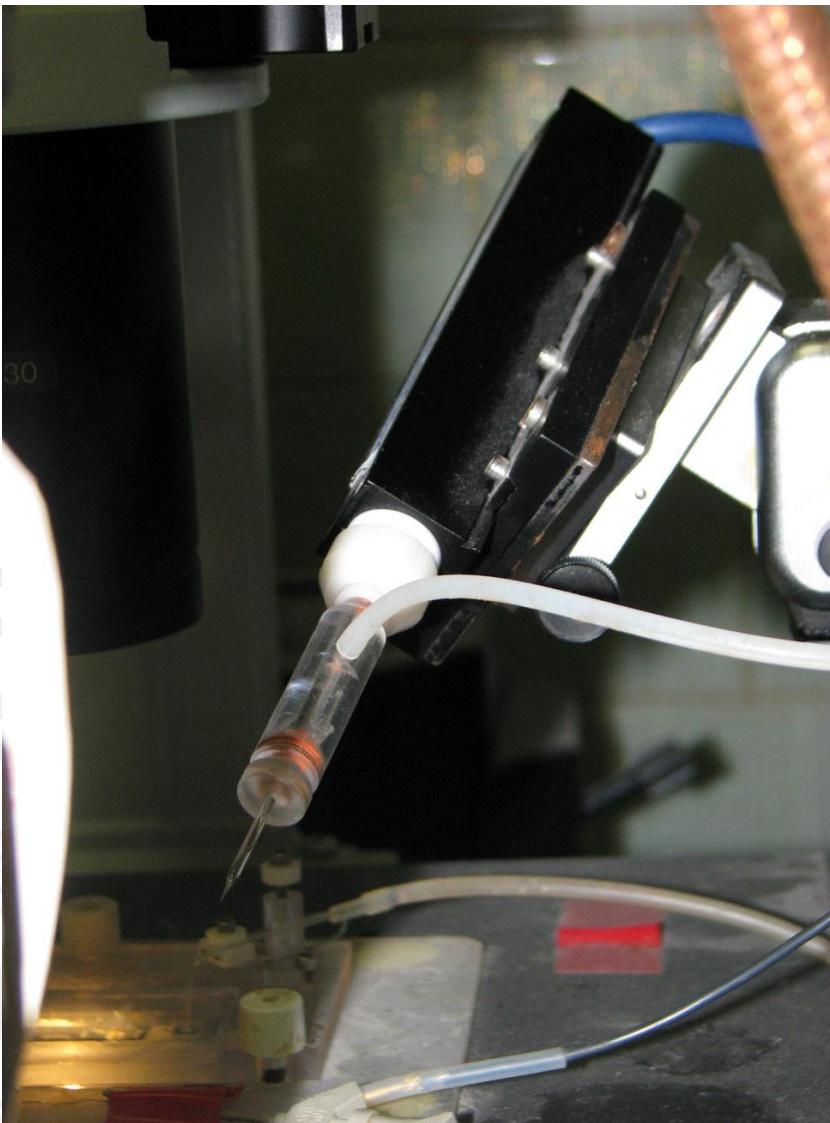
"Voltage-clamp" con "Patch clamp"

Trabajando con células pequeñas: micropipetas



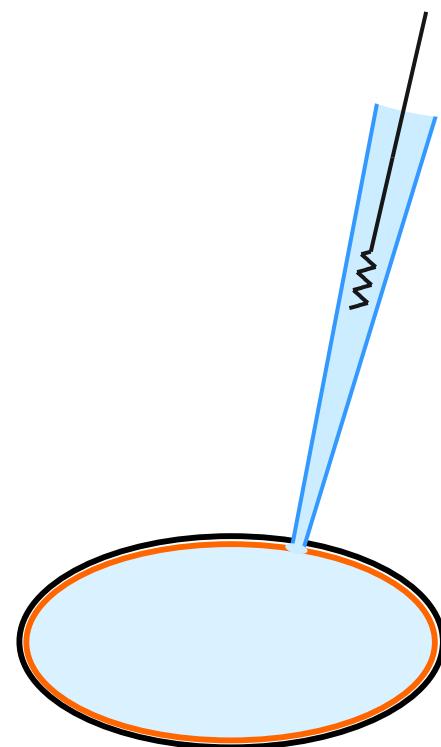
"Patch clamp"

El montaje experimental

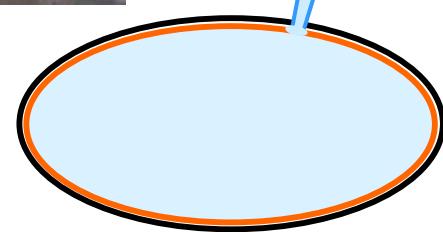
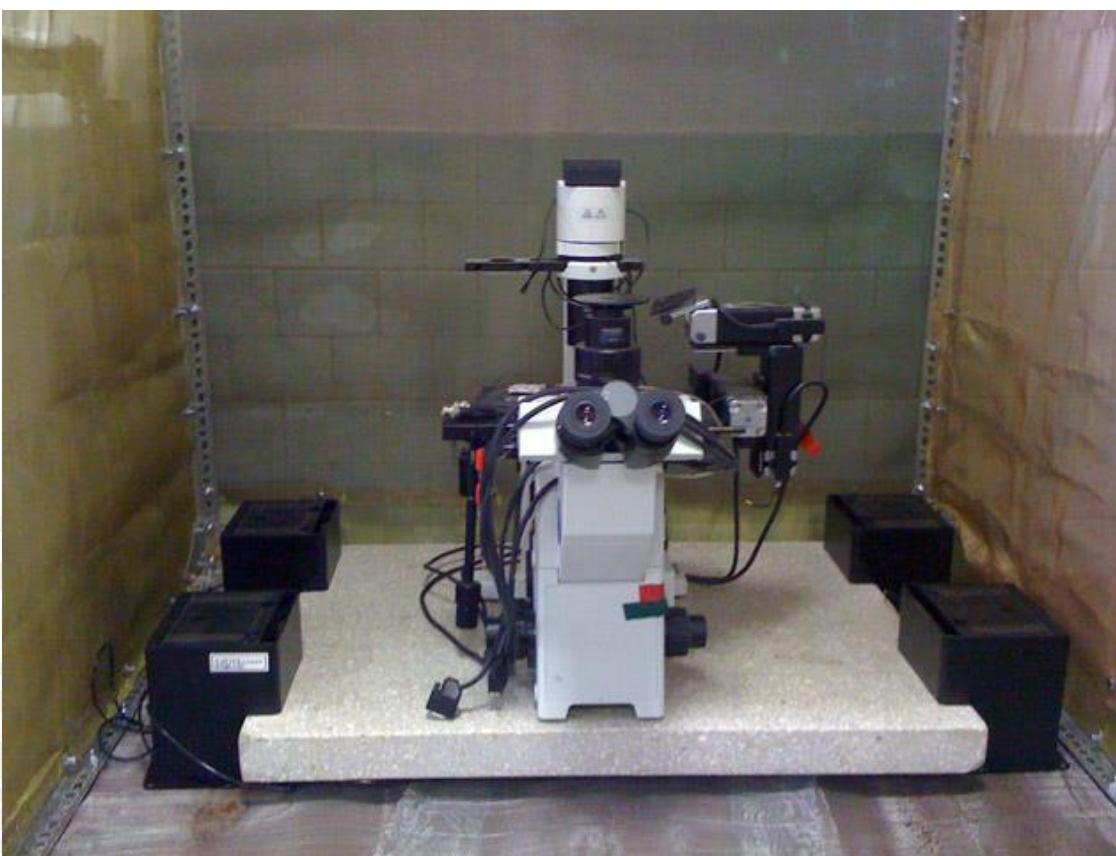


"Patch clamp"

El montaje experimental



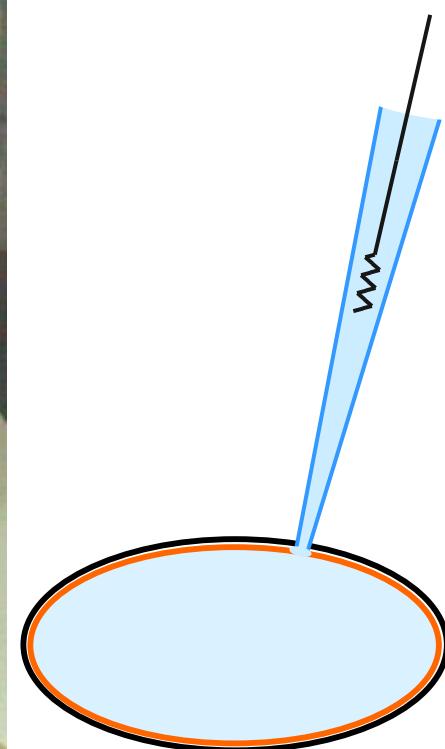
El montaje experimental



"Patch clamp"

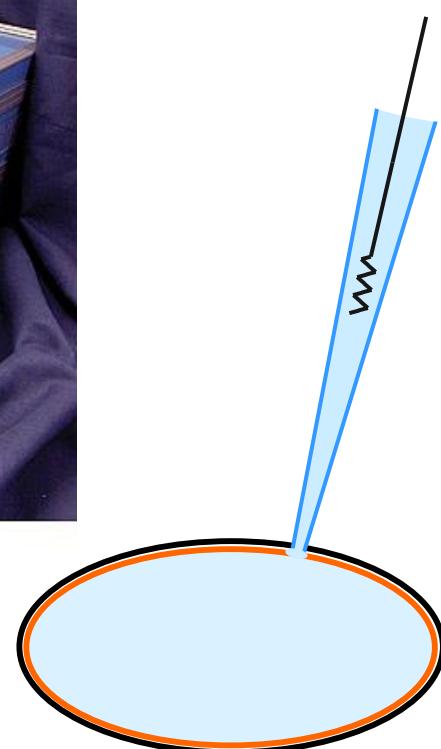


El montaje experimental



"Patch clamp"

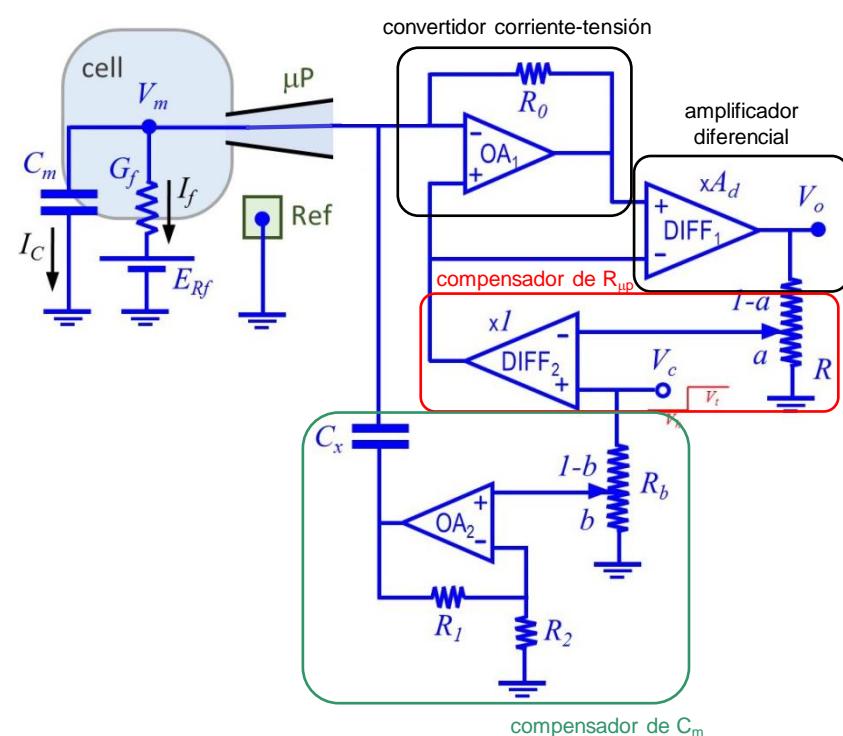
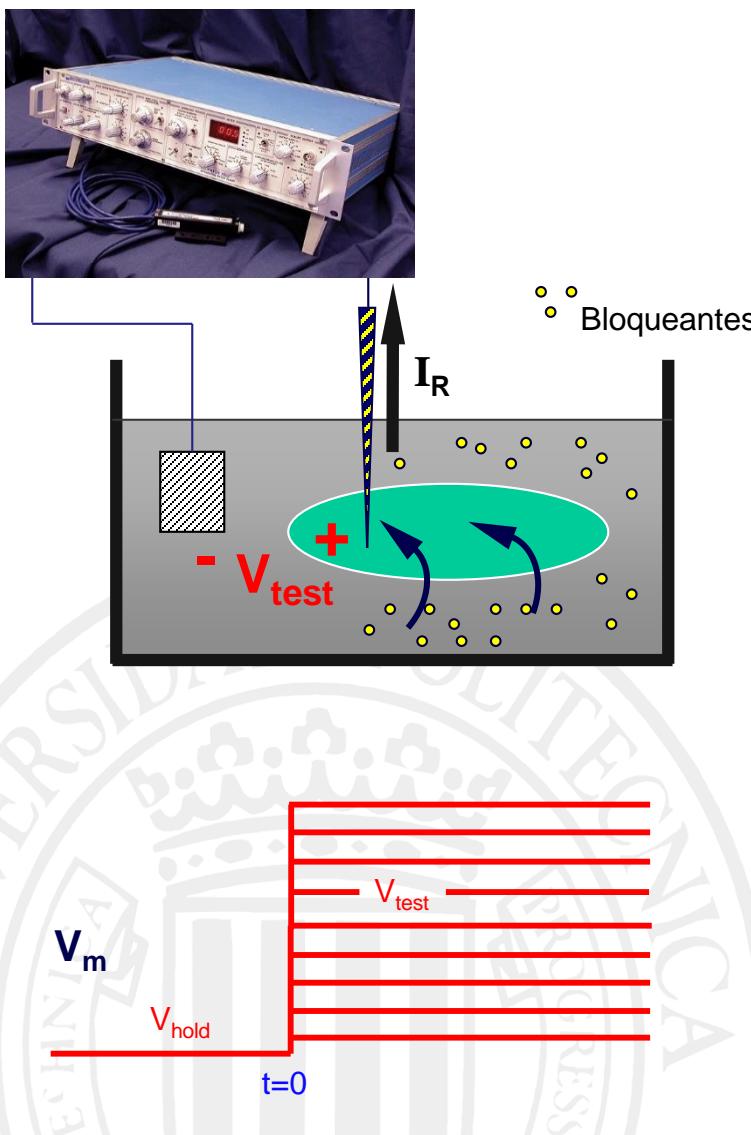
El montaje experimental



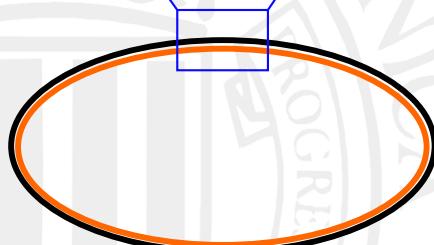
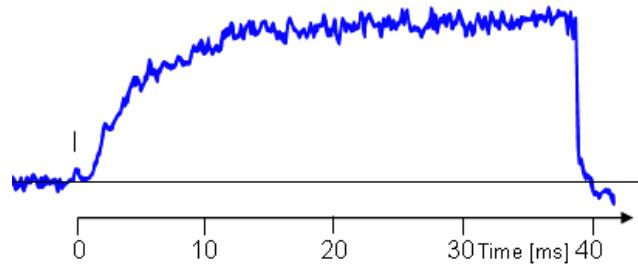
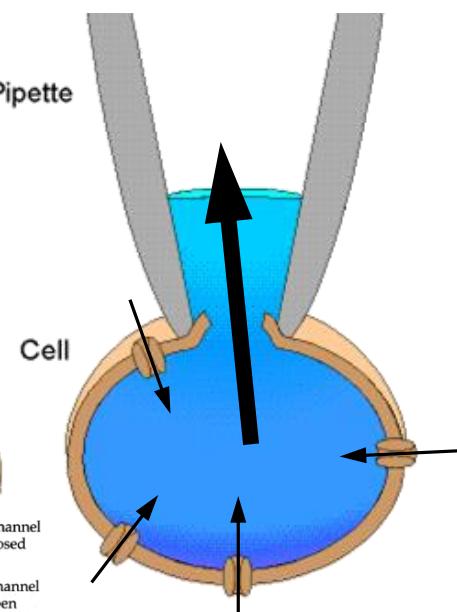
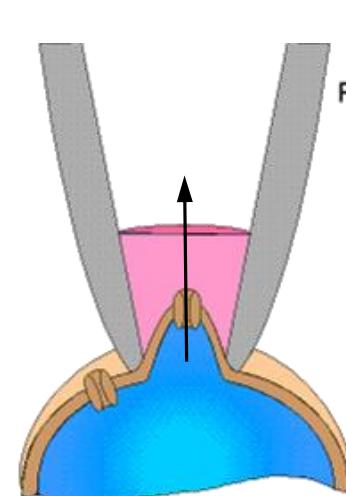
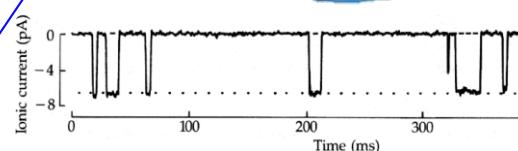
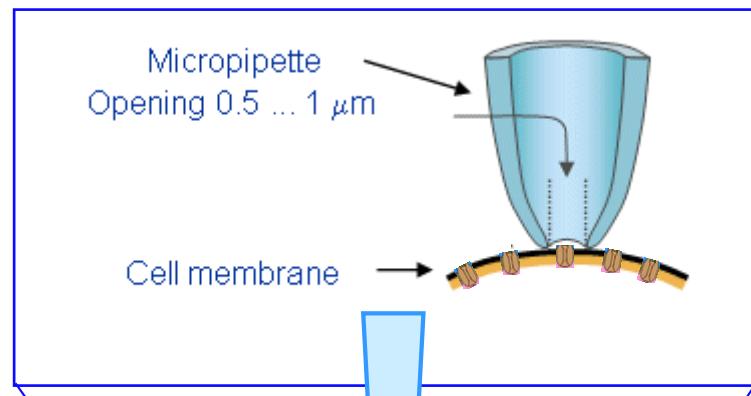
"Patch clamp"



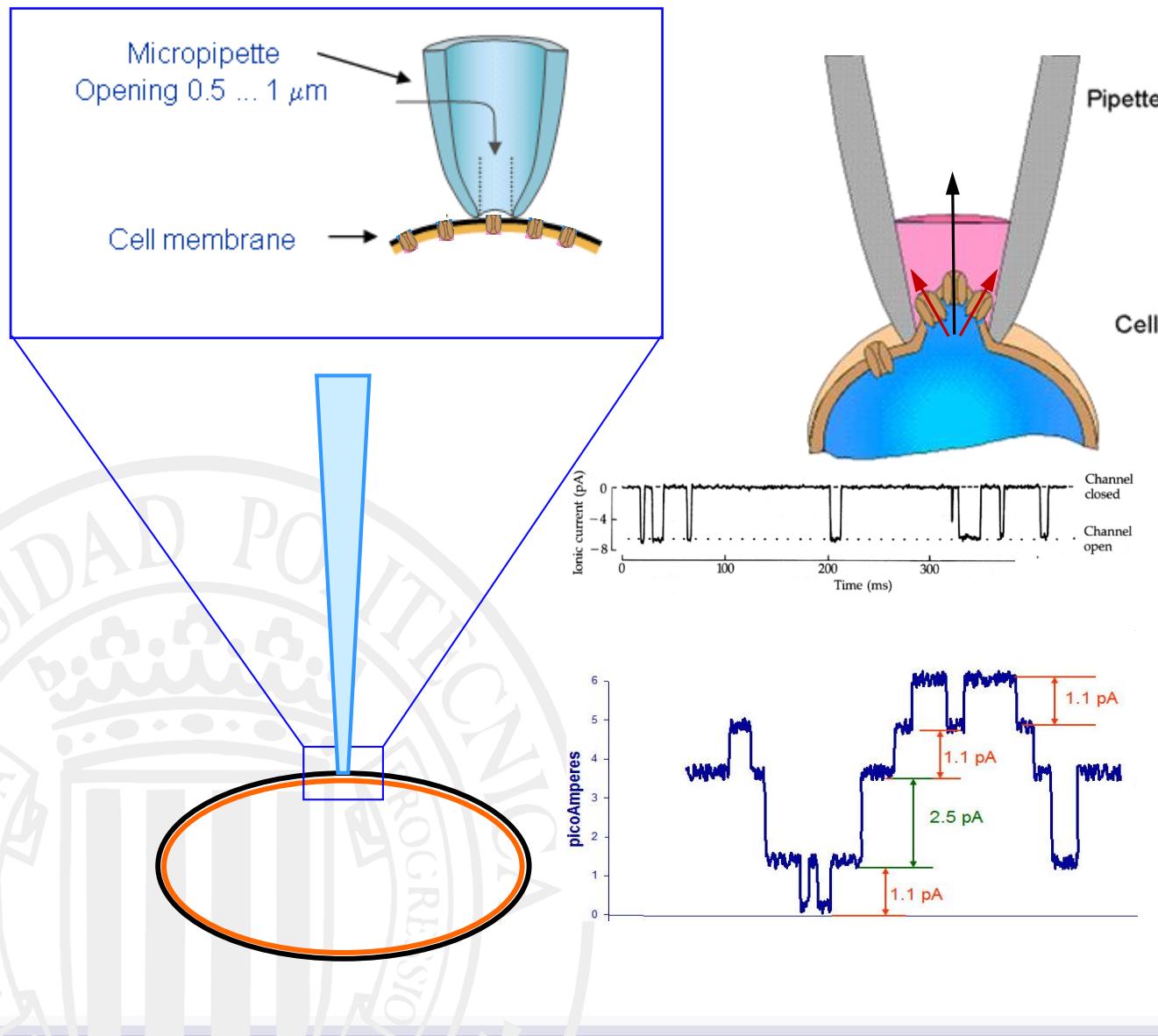
La instrumentación electrónica



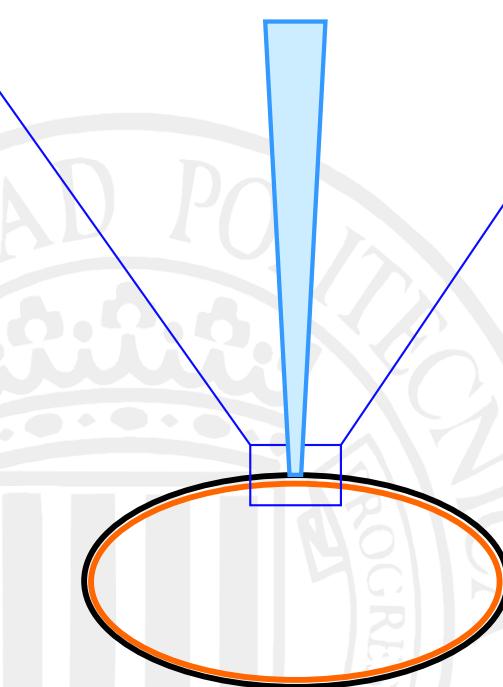
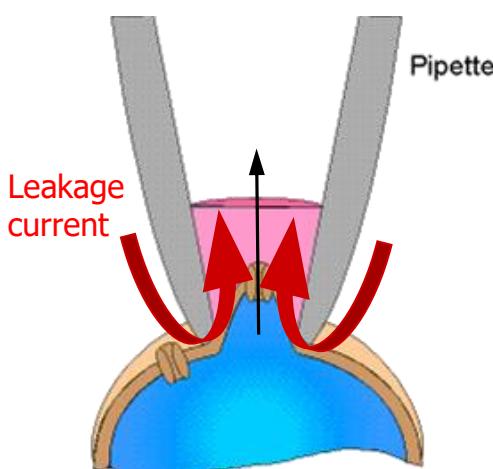
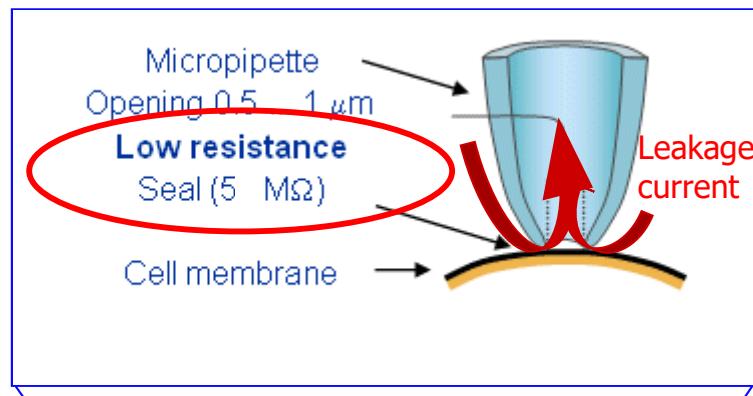
¿Cómo es el acoplamiento microelectrodo-célula en el patch-clamp? ¿Se pueden medir corrientes unitarias?



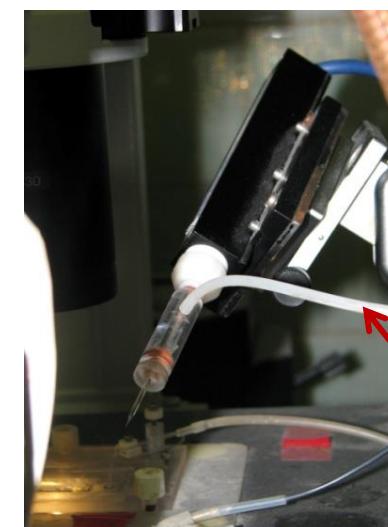
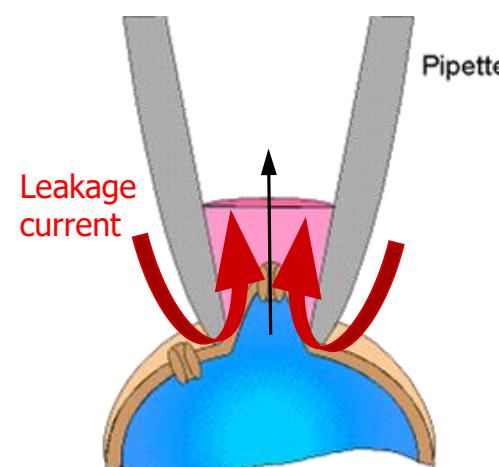
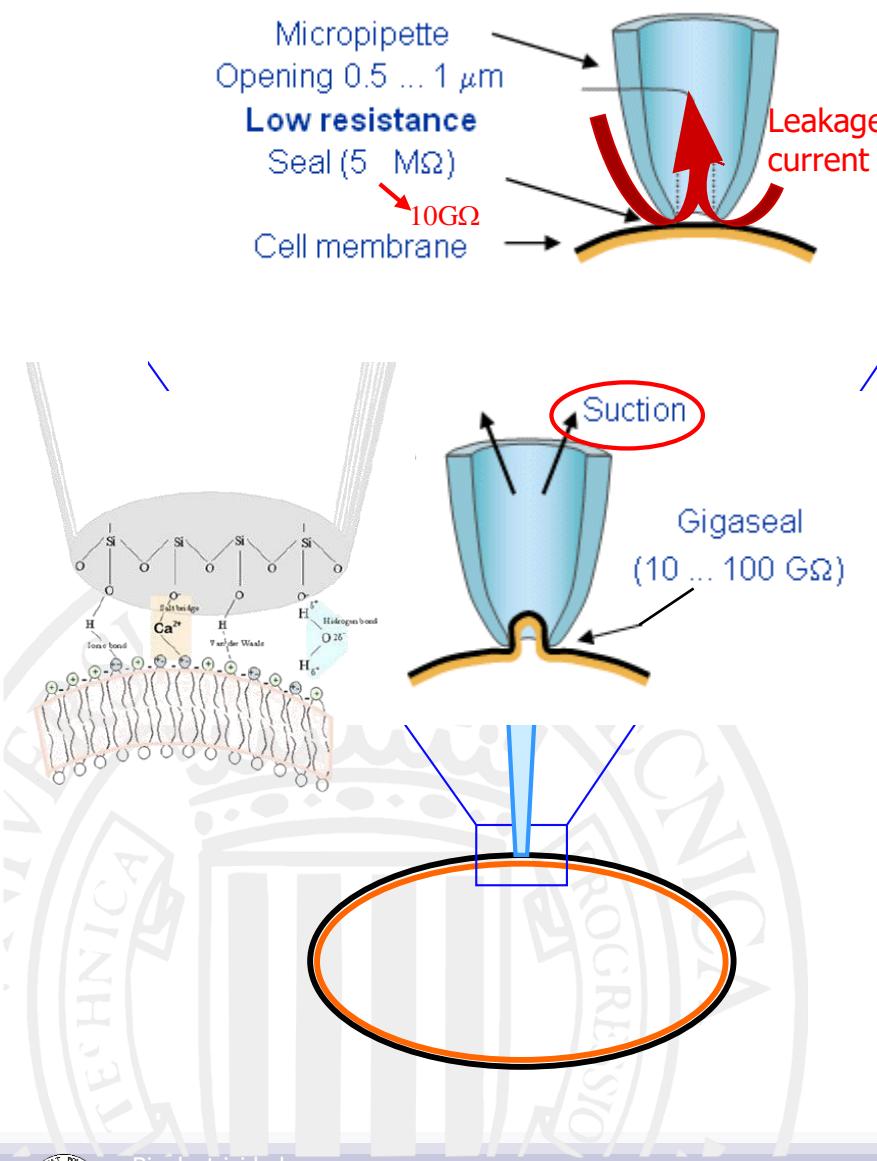
"Patch Clamp" en los años 90...



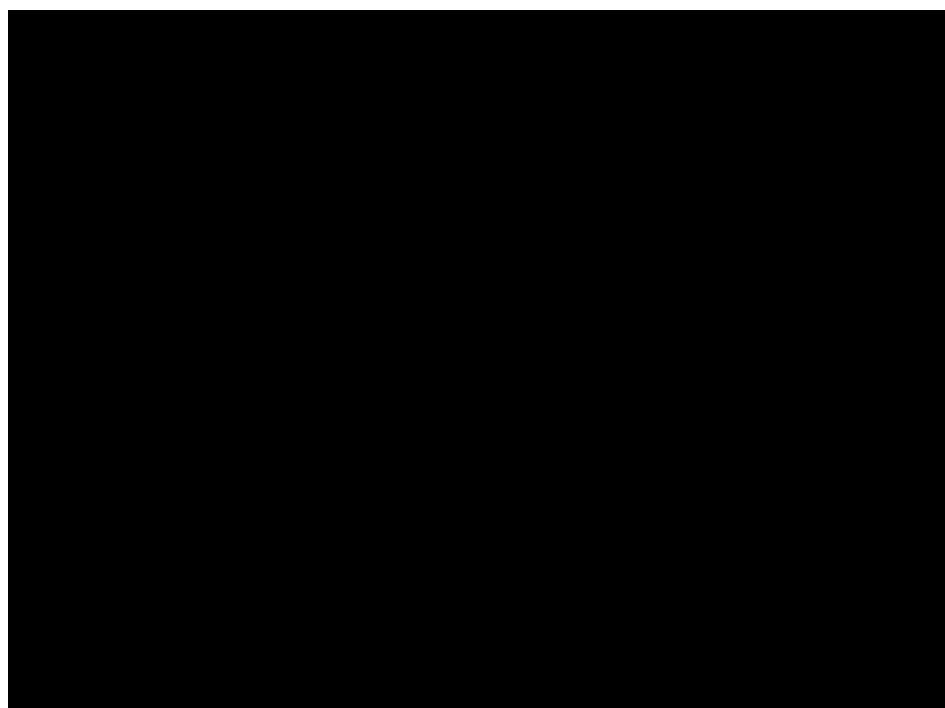
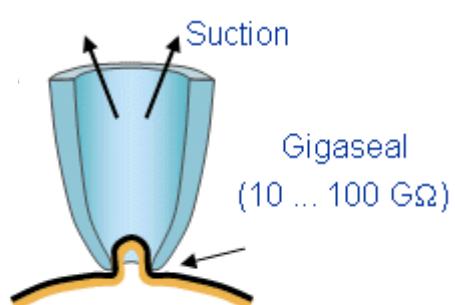
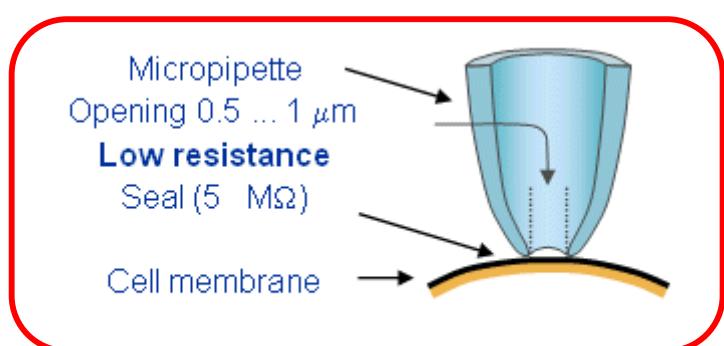
Registro de Corrientes Iónicas: "Patch Clamp"



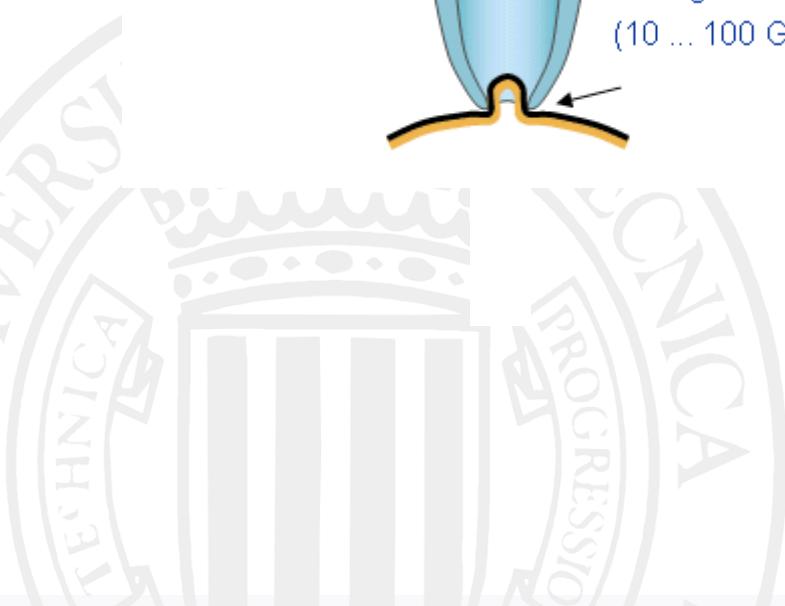
Registro de Corrientes Iónicas: "Patch Clamp"



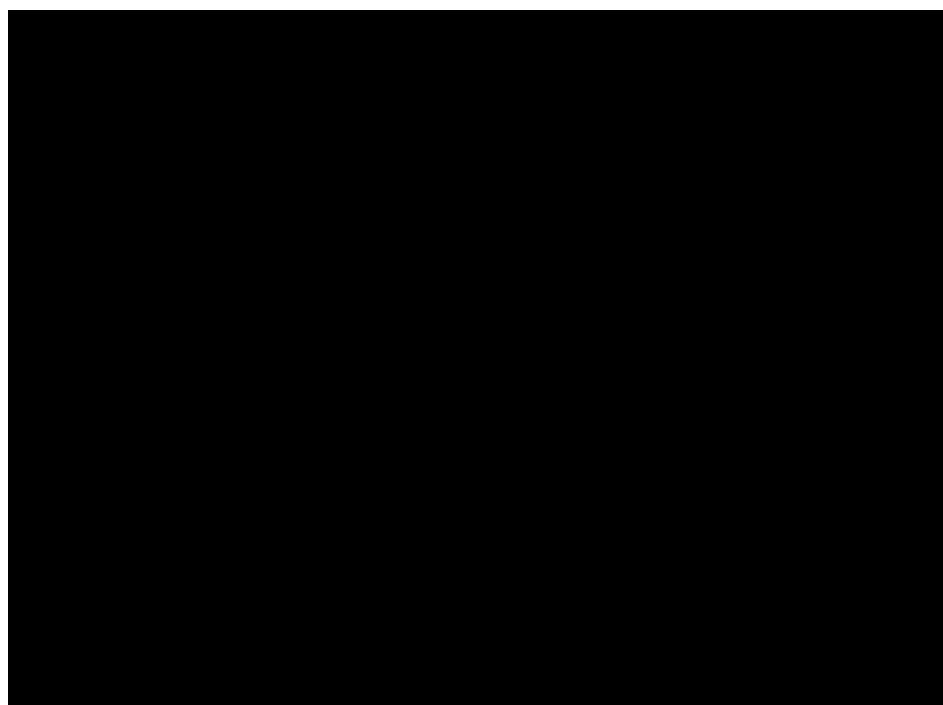
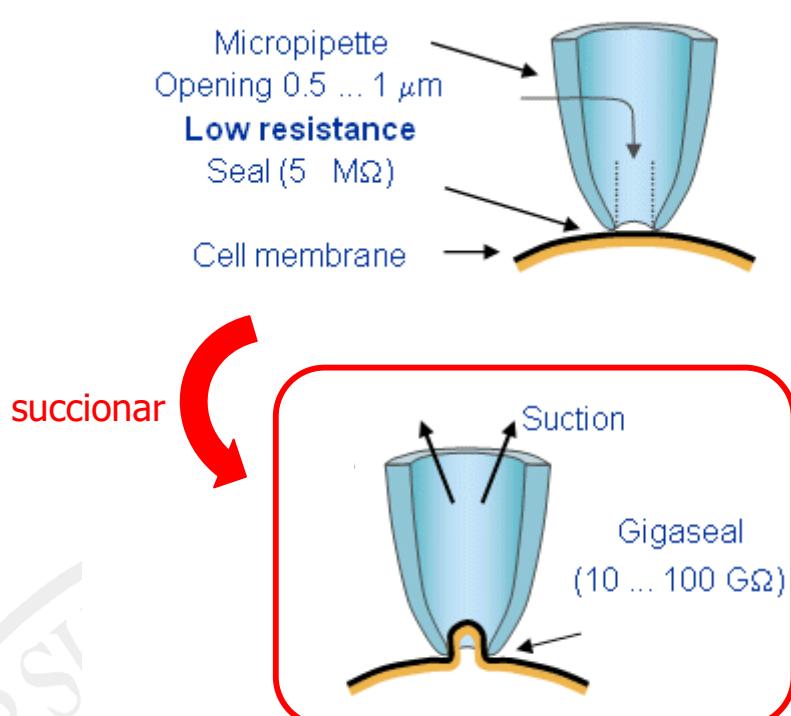
Registro de Corrientes Iónicas: "Patch Clamp"



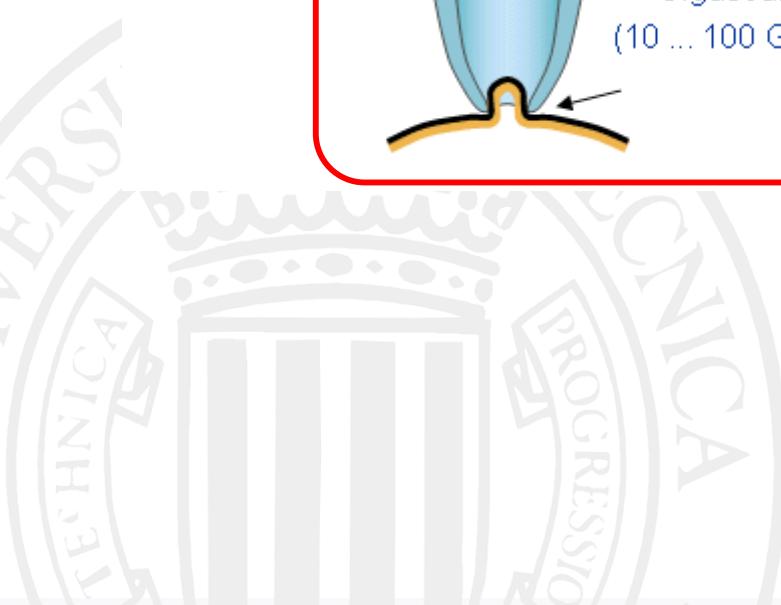
Preparación del gigasello (aproximación)



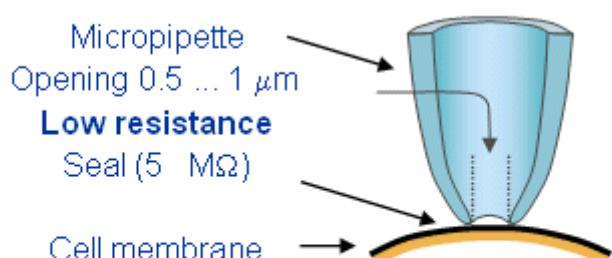
Registro de Corrientes Iónicas: "Patch Clamp"



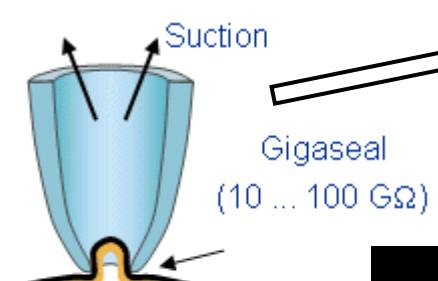
Formación del gigasello (succión)



Registro de Corrientes Iónicas: "Patch Clamp"

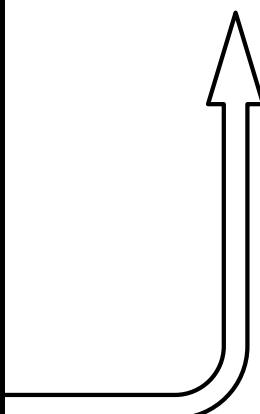
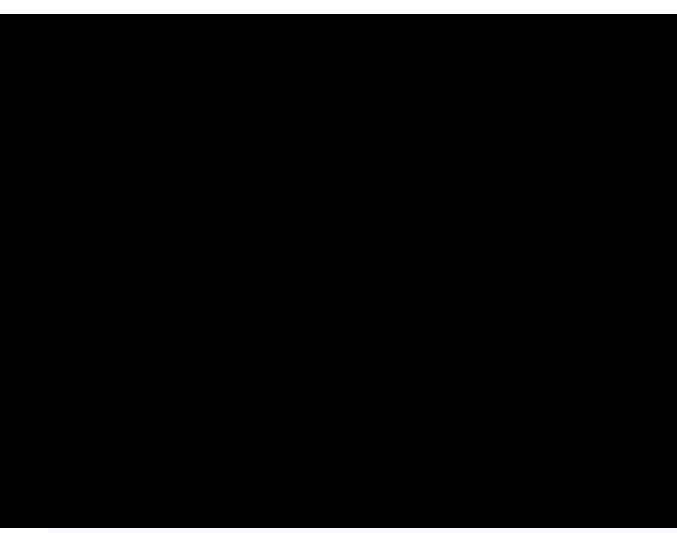
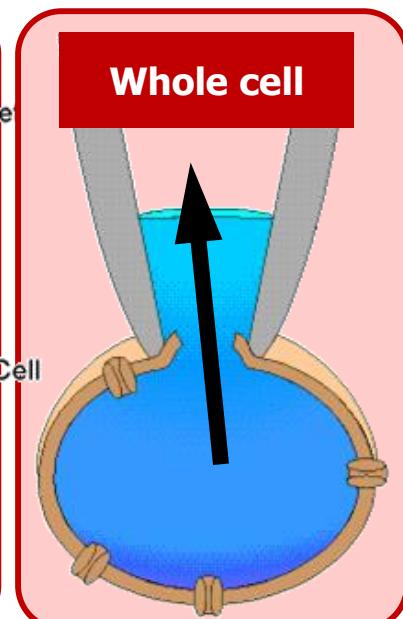
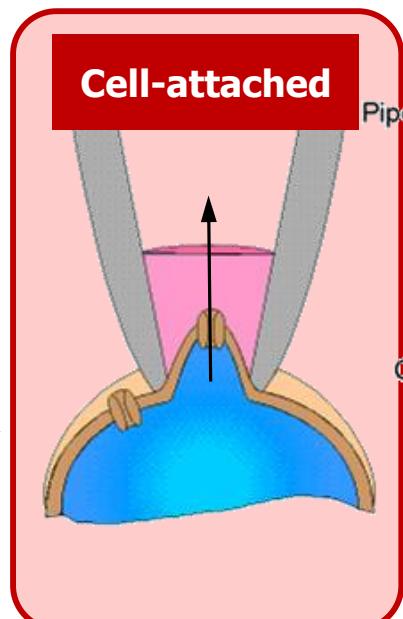
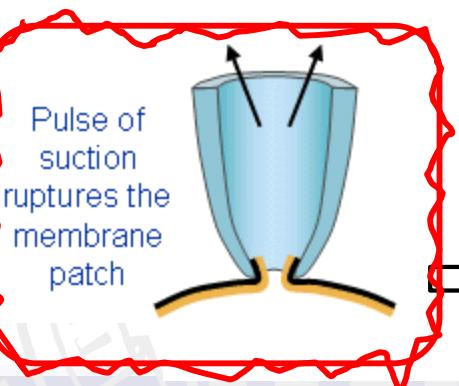


sucionar

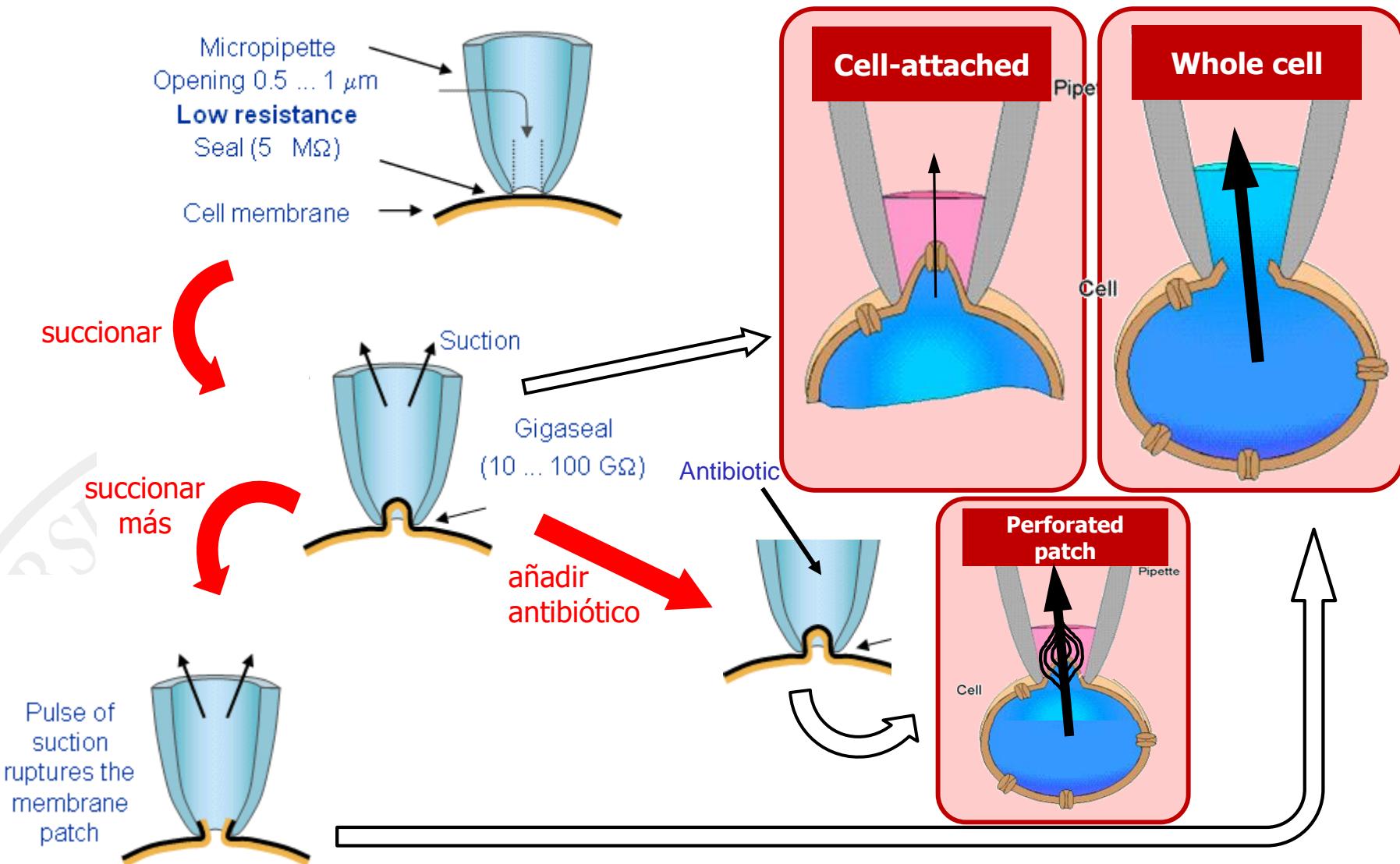


sucionar más

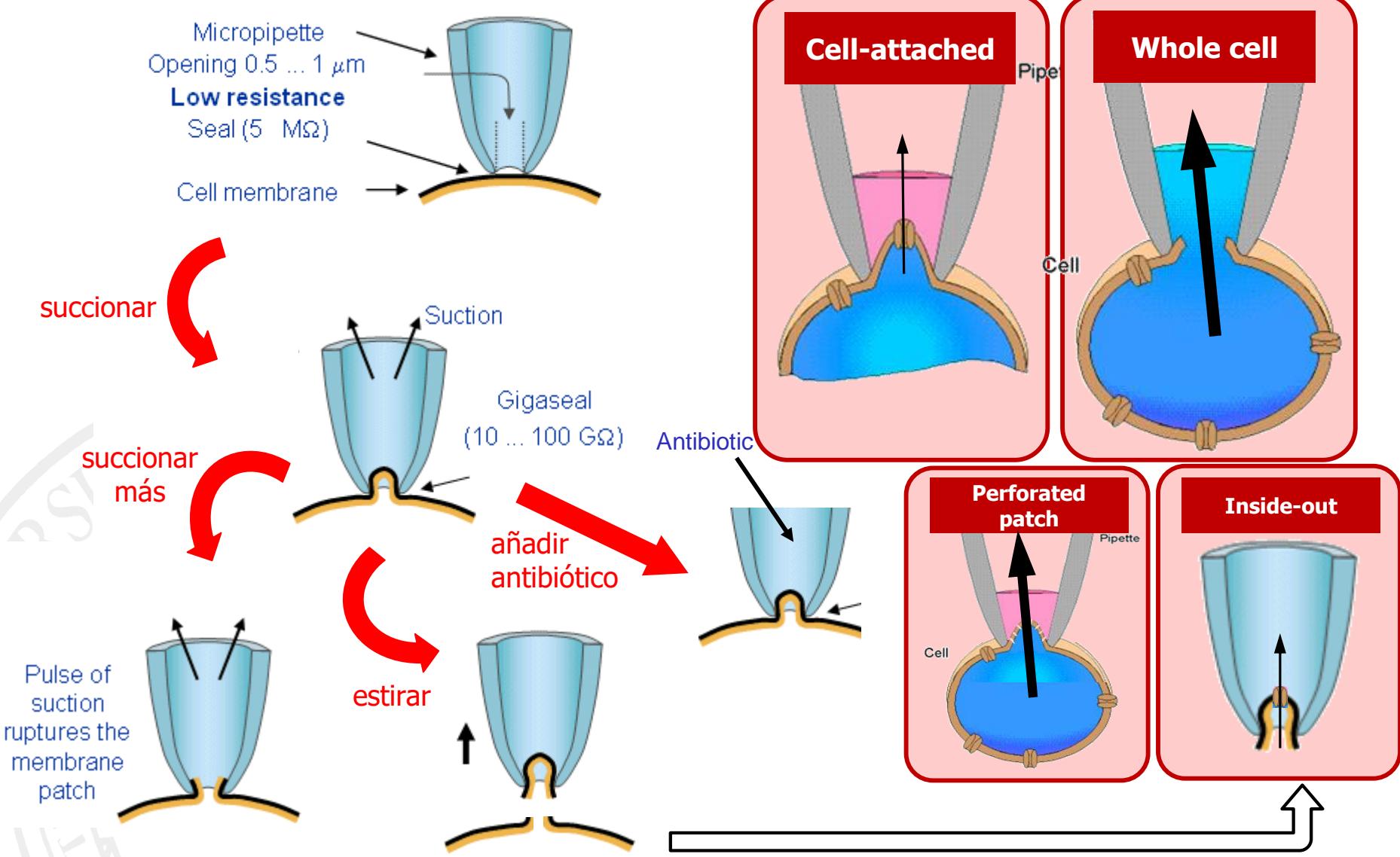
... pero con cuidado ☺



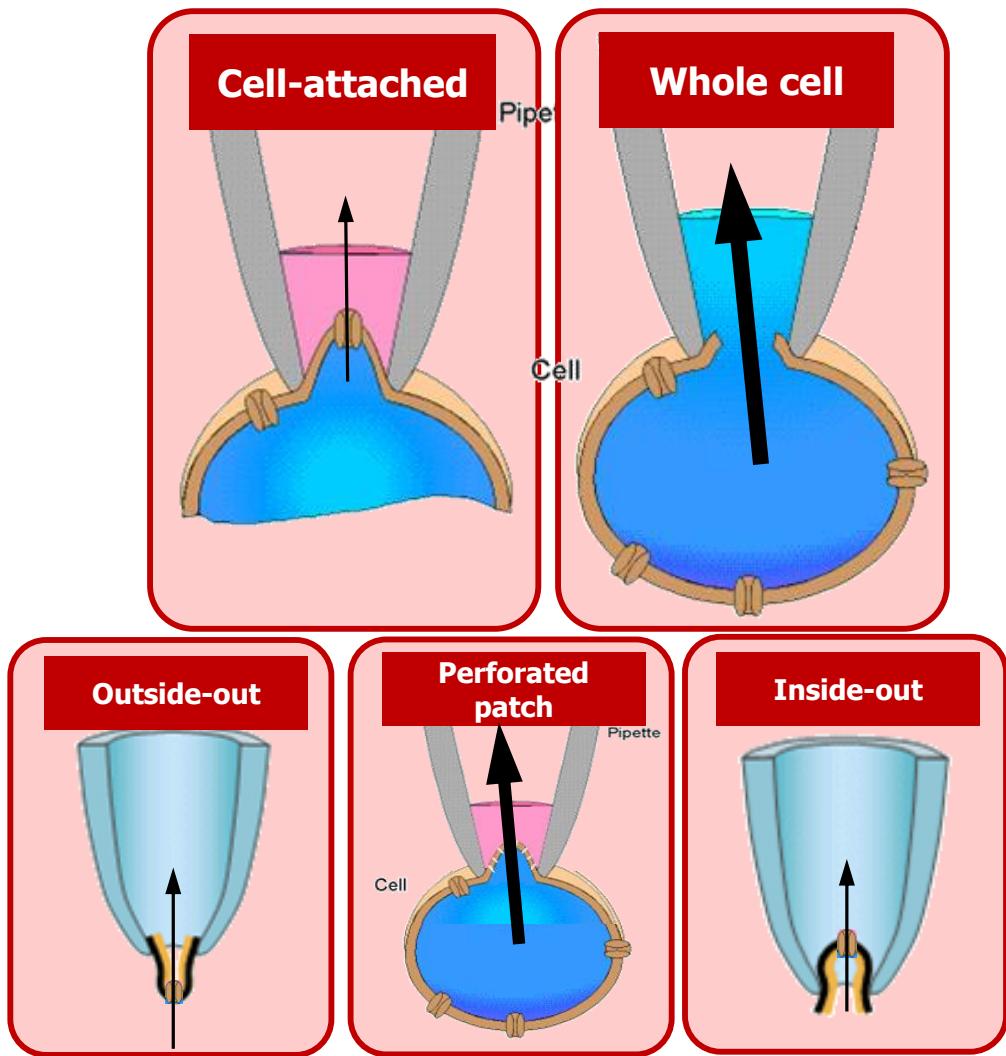
Registro de Corrientes Iónicas: "Patch Clamp"



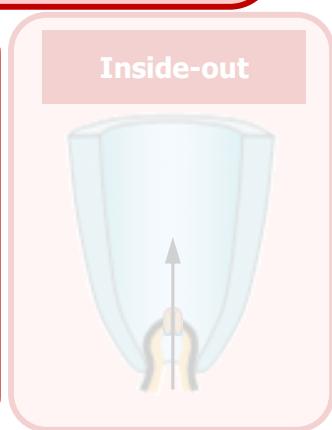
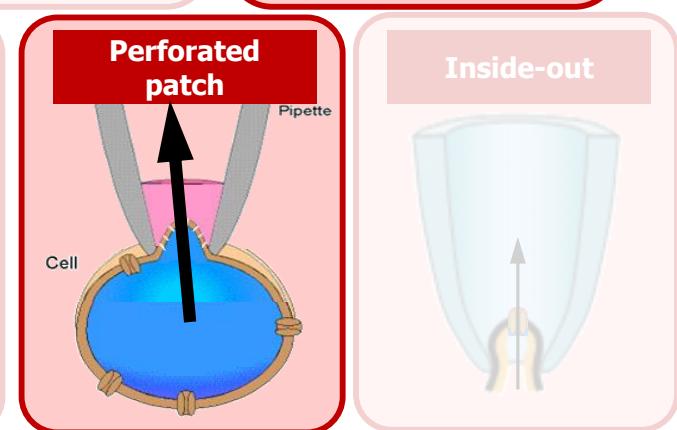
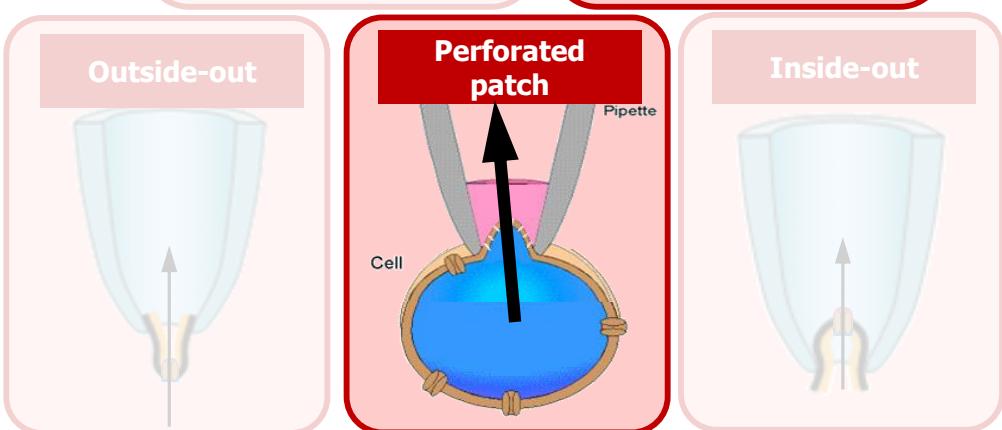
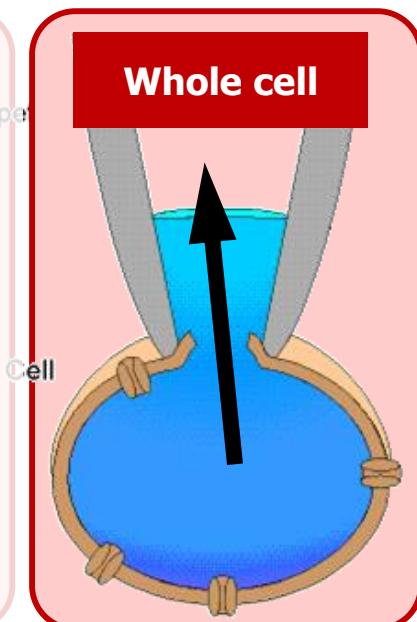
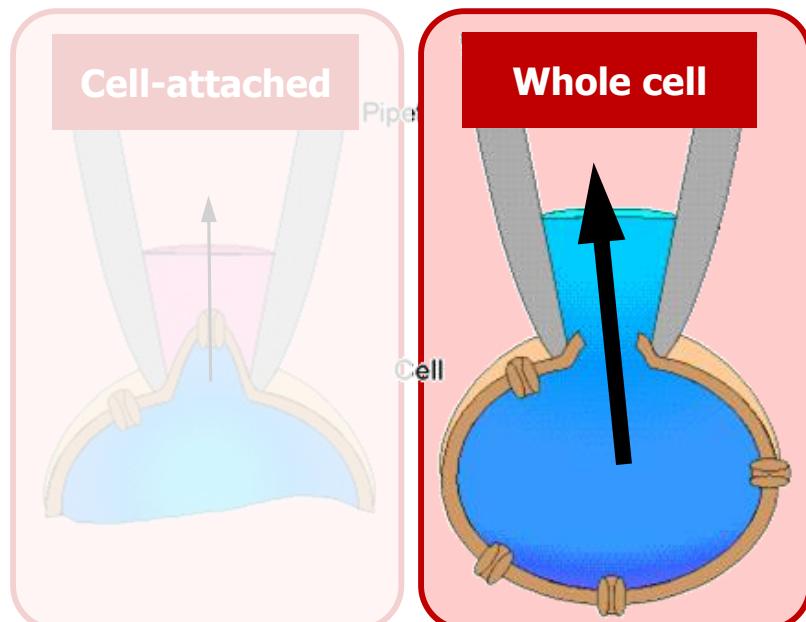
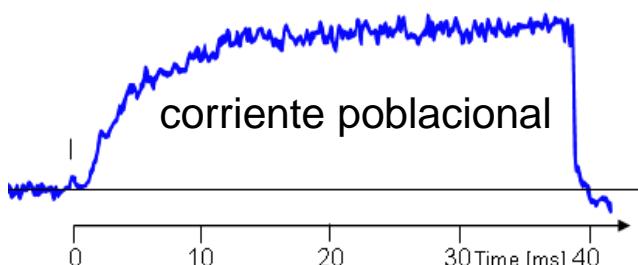
Registro de Corrientes Iónicas: "Patch Clamp"



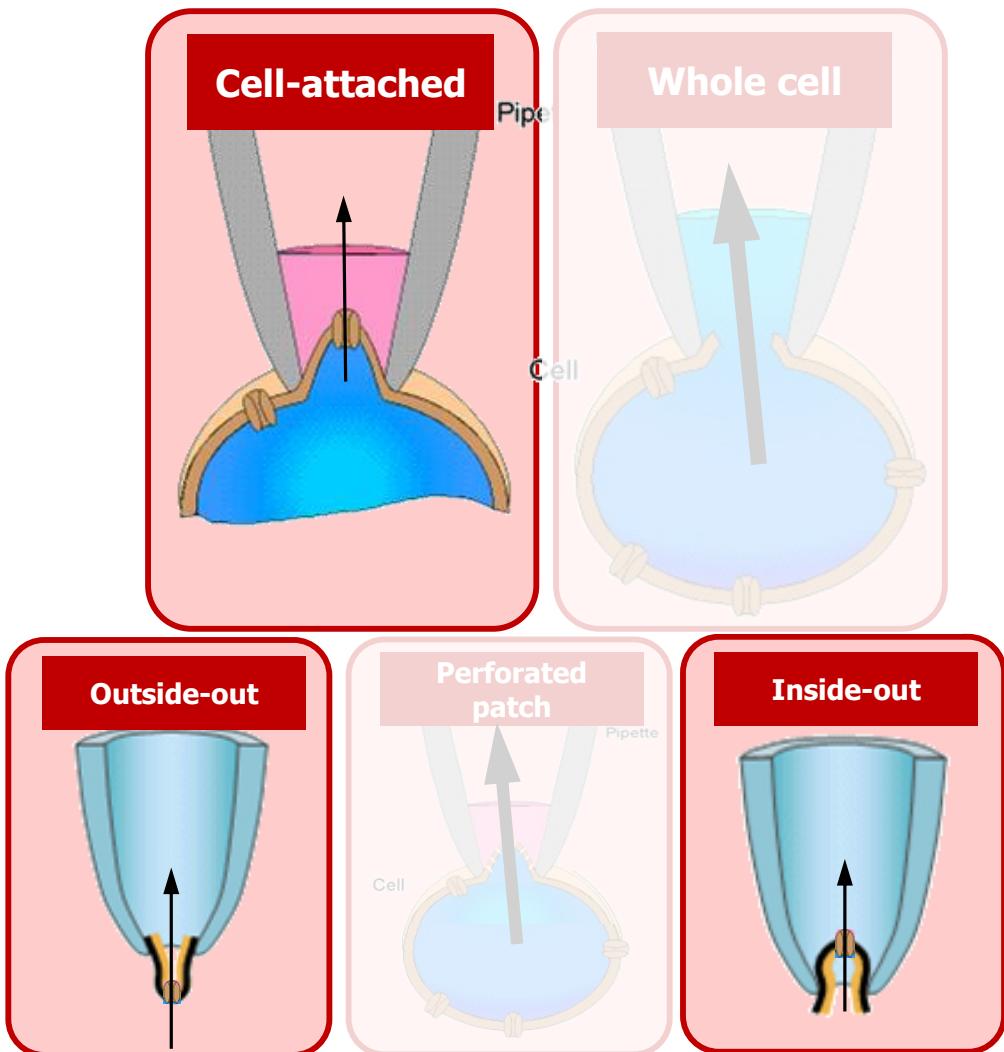
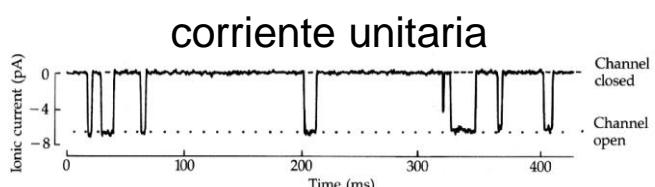
Registro de Corrientes Iónicas: "Patch Clamp"



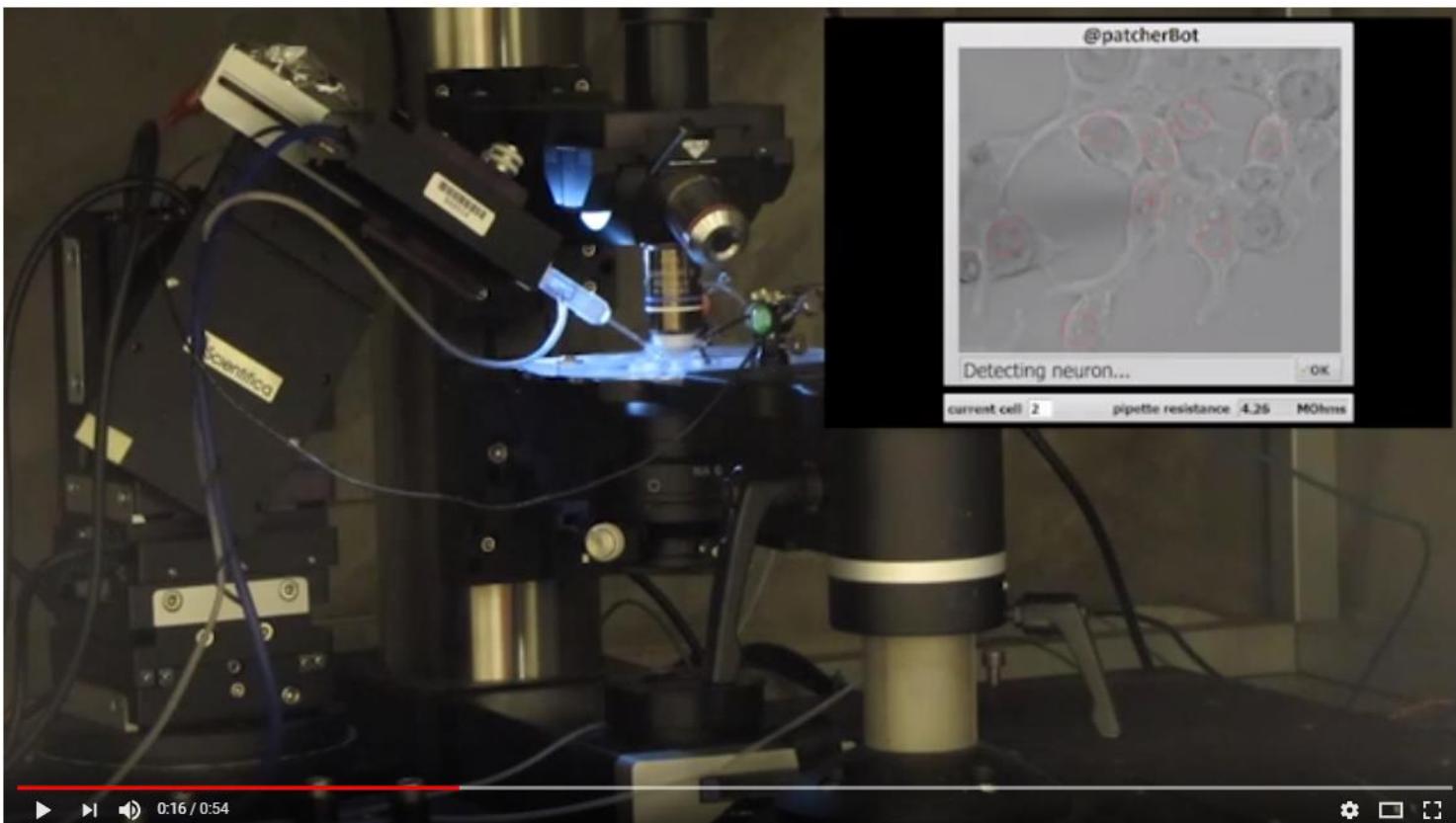
Registro de Corrientes Iónicas: "Patch Clamp"



Registro de Corrientes Iónicas: "Patch Clamp"



Automated Patch Clamp



This video is a demonstration of patch-clamp pipette cleaning technology. This is the first system to perform sequential patch-clamp recordings in cell culture (HEK293 cells) without a human operator using a single pipette.

Automated Patch Clamp

Key Features of SyncroPatch 384PE

Electrophysiological Attributes

- High success rate of gigaohm seal formation
- Series resistance compensation
- Leak subtraction
- Multiple protocols per run
- Expandable to 768 wells
- Current clamp upgrade in 2015
- Data format easy to export



Liquid Handling

- Beckman Biomek FX platform
- Additions with 384-head pipettor
- Can assay partial plates
- Additional span-8 feature
- Capability to use multiple internal solutions



Intangibles

- Familiarity with PatchLiner platform
- Beckman service is local

▶ ▶ 🔍 47:40 / 1:12:33

···

Webinar - High Throughput and High Fidelity: Automated Patch Clamp in Screening and Research

42 visualizaciones • 20 mar. 2020

1 like 0 dislike COMPARTE GUARDAR ...

nanjion

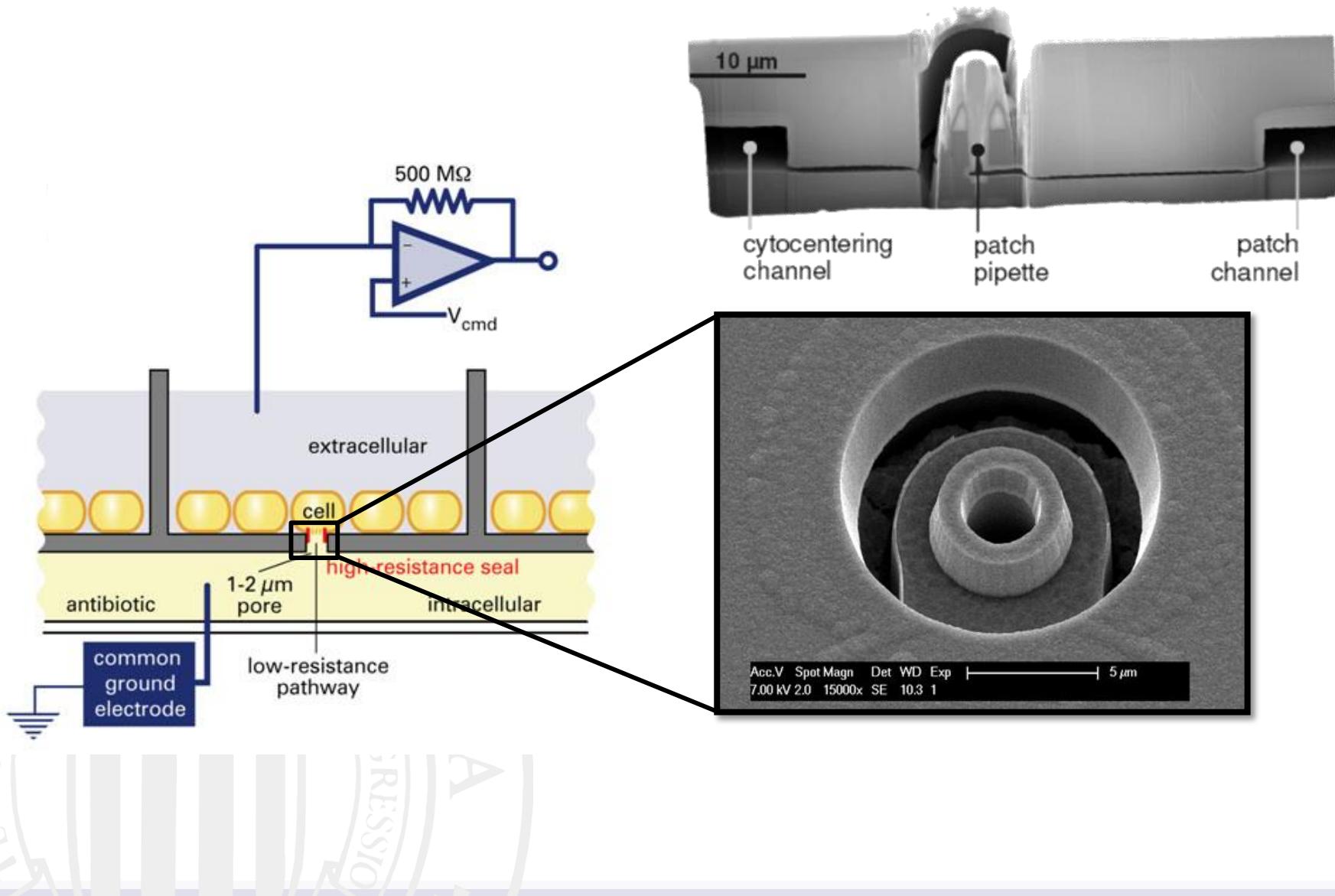
NanionTechnologies
42 suscriptores

SUSCRIBIRSE

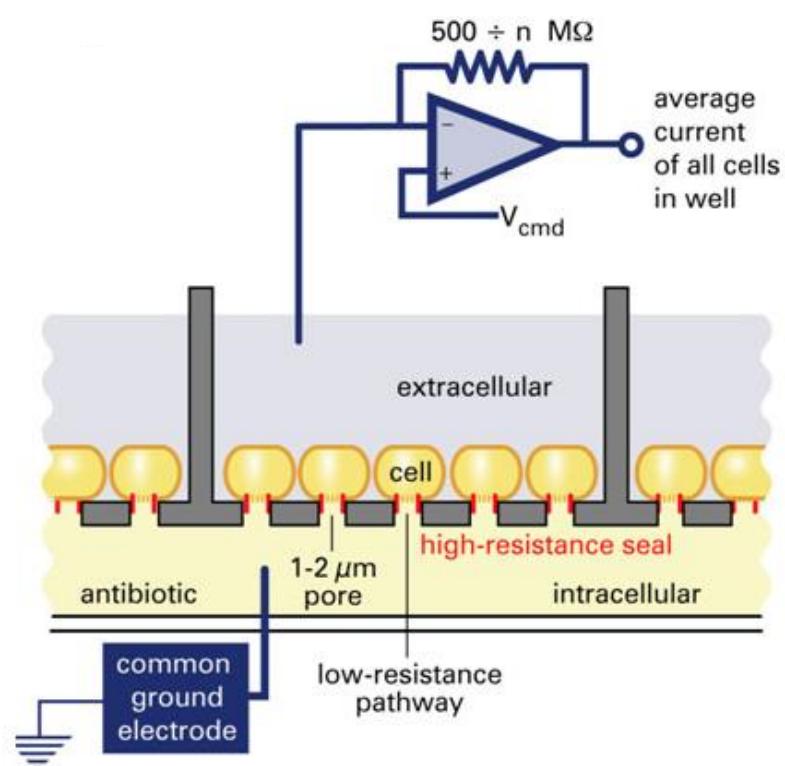
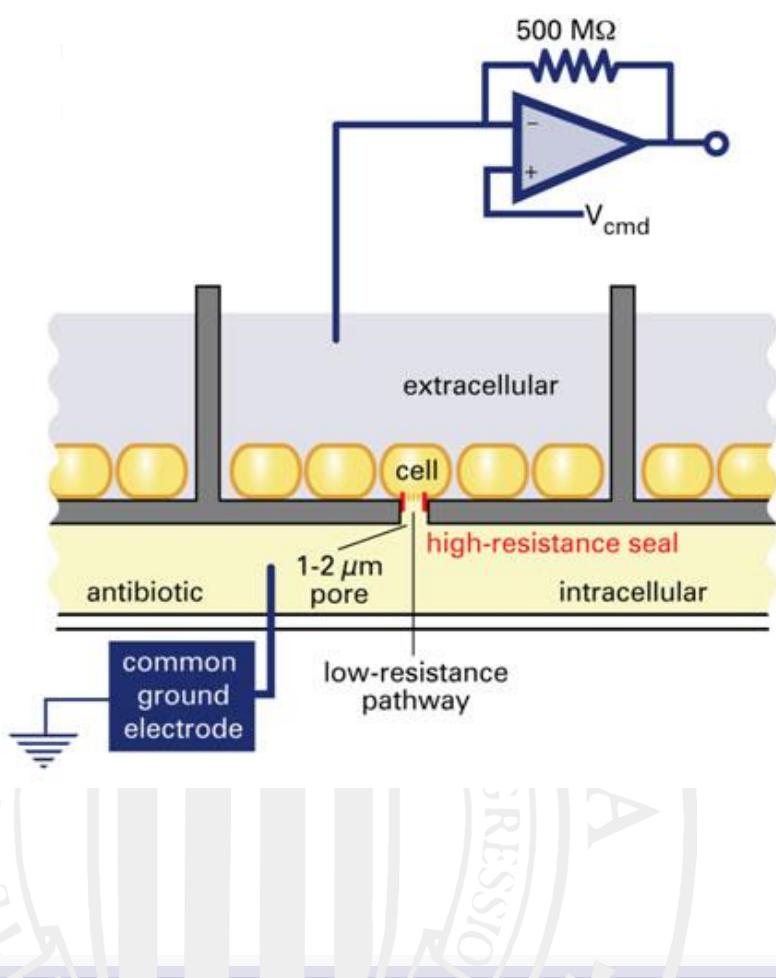
The webinar covers the use of the Patchliner and the SyncroPatch 384/768PE for characterization of ion channels and screening of ion channel active compounds.



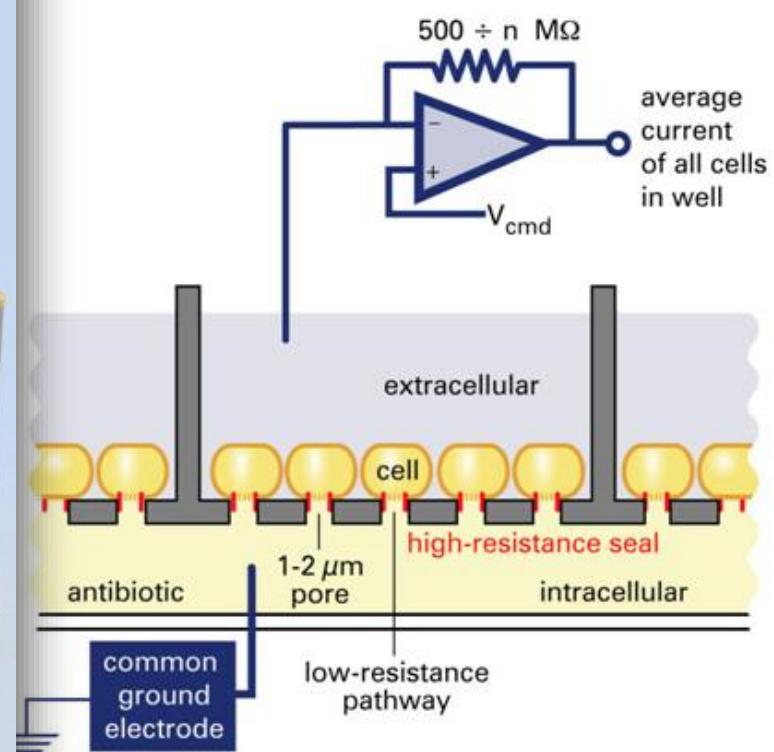
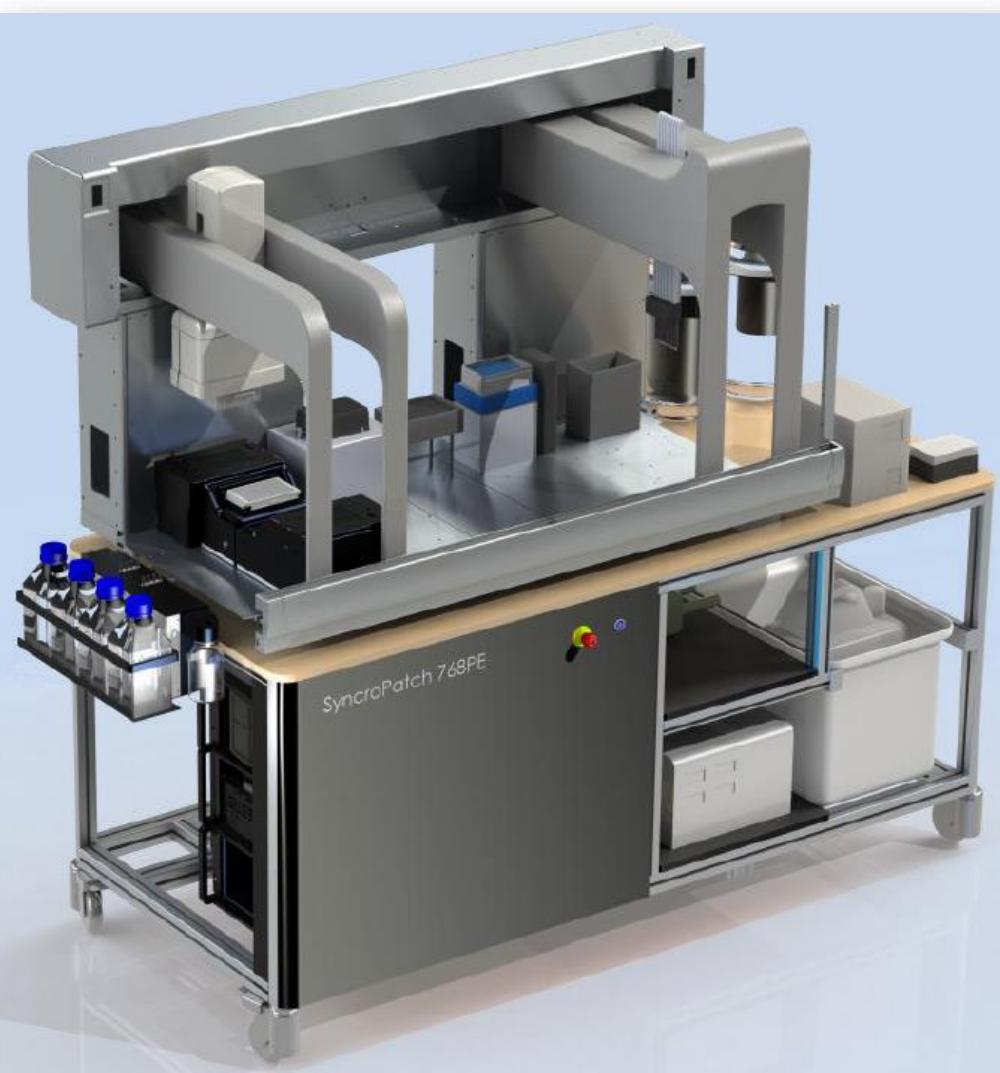
Automated Patch Clamp



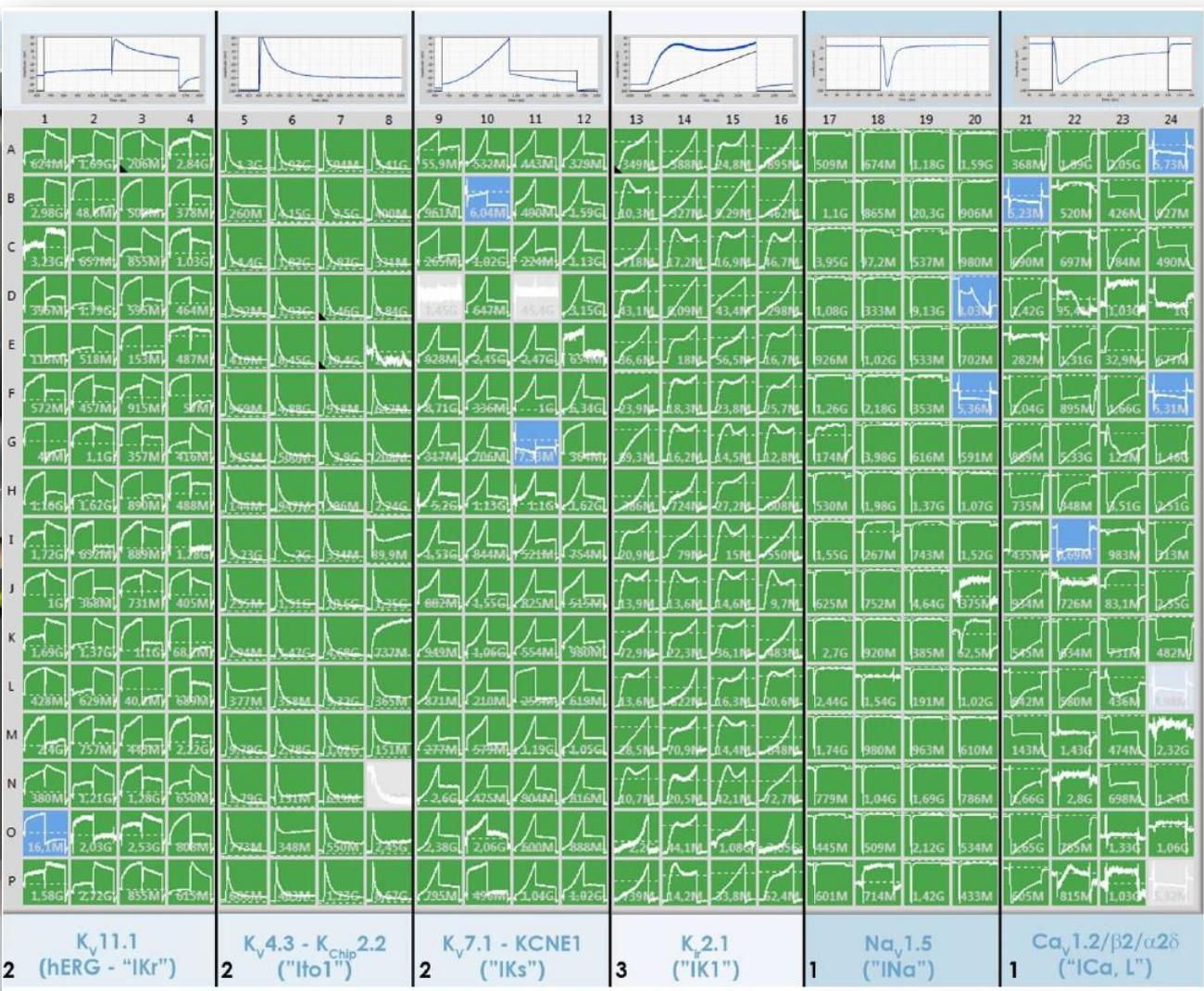
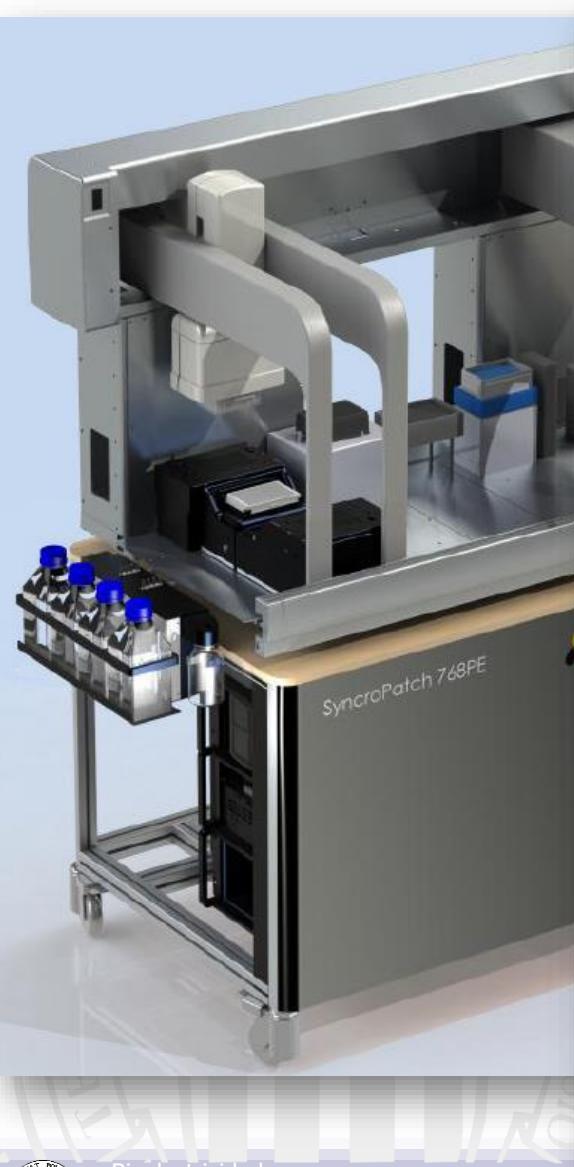
Automated Patch Clamp



Automated Patch Clamp



Automated Patch Clamp



Six different cardiac channels recorded simultaneously on the SyncroPatch 384PE. Shown is a screenshot of the data acquisition and analysis software

TEMA 4.- Técnicas de registro de corrientes iónicas

Conclusiones

- Las diferentes α -hélices y β -hélices que constituyen las proteínas-canal pueden desplazarse y girar en respuesta a cambios en el potencial de membrana porque pueden poseer carga eléctrica. Como resultado de esos movimientos, un canal puede abrirse o cerrarse, y la probabilidad de hacerlo depende por tanto del potencial de membrana. Se dice que un canal tiene “**compuertas**” que se abren o se cierran al variar el potencial de membrana.
- La estrategia del “*voltage-clamp*” (fijación de potencial) permite medir corrientes iónicas a diferentes potenciales; la técnica del “*patch-clamp*” permite implementar esa estrategia.
- Para medir la corriente de una sola familia de canales iónicos, es necesario **inactivar el resto de familias** para que no interfieran en la medida. Esto se consigue mediante diferentes métodos, entre los que destaca la inactivación mediante **agentes químicos** y/o **fármacos**.
- Una vez inactivados los canales iónicos de las familias que no se desean medir, el registro corresponde (idealmente) a la corriente a través de la familia de interés **MÁS la corriente capacitativa**, que es de alto valor y de duración muy breve (< 2 ms).
- La corriente capacitativa puede dificultar la medición de corrientes de activación rápida (por ejemplo, la corriente de sodio).
- De la medición de las corrientes iónicas puede deducirse el comportamiento dinámico de la “**fracción de canales abiertos**” f_s .
- Un **montaje (setup)** experimental de *patch-clamp* incluye un aparato de fabricar micropipetas, otro para pulirlas, una jaula de Faraday, una mesa inercial, unos amortiguadores sobre los que situar la mesa, una placa termostatizada y oxigenada en la que situar las células, un preamplificador, un amplificador/estimulador, un microscopio y una cámara CCD, entre otros.
- Para poder realizar medidas de corrientes iónicas con una relación señal-interferencia aceptable, es necesario formar el **gigasello** antes de realizar la medida.
- La técnica del *patch-clamp* manual requiere mucha precisión en la **succión** y la **tracción**.
- El *patch-clamp* tiene cinco configuraciones posibles:
 - **Whole-cell**: permite medir corrientes poblacionales, eligiendo la concentración extracelular;
 - **Whole-cell perforated-patch**: permite medir corrientes poblacionales sin “dializar” la célula;
 - **Cell-attached**: permite medir corrientes unitarias (a través de un único canal) in-situ (manteniendo la célula intacta) eligiendo la concentración extracelular;
 - **Inside-out**: permite medir corrientes unitarias (a través de un único canal) eligiendo las concentraciones intra y extracelular;
 - **Outside-out**: permite medir corrientes unitarias (a través de un único canal) eligiendo las concentraciones intra y extracelular.
- Muy recientemente, la técnica del *patch-clamp* se ha **automatizado** pero solo para **células con forma globular**.
- La técnica del *patch-clamp*, junto con la estrategia del *voltage-clamp*, revela comportamientos muy distintos en diferentes familias de canales iónicos:
 - En los **canales de sodio**, por ejemplo, la corriente crece, alcanza un pico y después decrece ante un salto de potencial;
 - En algunos **canales de potasio**, por ejemplo, la corriente crece y se estabiliza ante un salto de potencial.



Bibliografía

- Corrientes unitarias y poblacionales
 - Capítulo 4 de [1] (especialmente punto 4.4)
 - Capítulo 4 de [2] (especialmente puntos 4.5 y 4.6)
- El voltage-clamp y el patch-clamp
 - Capítulo 4 de [1] (especialmente punto 4.3 y 4.4)
 - Capítulo 4 de [2] (especialmente puntos 4.2, 4.3 y 4.6)
 - Capítulo 5 de [3] (especialmente punto 5.5)

[1] **Bioelectricity. A quantitative approach.** R Plonsey & R Barr. Ed. Springer, 2007

[2] **Bioelectromagnetism.** J Malmivuo & R Plonsey. Ed. Oxford University Press, 1995

[3] **Bioelectrónica. Señales bioeléctricas.** JM Ferrero, JM Ferrero, J Saiz & A Arnaud. Ed. SP-UPV, 1994

