

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ DE ELCHE
AREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



Puesta a punto de la plataforma de *patch clamp* automático IonFlux para realizar cribados de alto rendimiento en Kv1.1

Facultad de Ciencias Experimentales
Grado de Biotecnología

Alicante, 2015

Trabajo de fin de grado presentado por Ana Calduch Arques

Dirigida por el Dr. Antonio Vicente Ferrer Montiel

Resumen

El aumento de las patologías asociadas a canales iónicos durante los últimos años sitúa la investigación en canalopatías en el foco de la actualidad. Desórdenes musculares, cardiacos o enfermedades como la epilepsia se han relacionado con la implicación del canal iónico Kv1.1. La creciente demanda por parte de la industria farmacéutica de nuevas tecnologías con las que afrontar la búsqueda de fármacos frente a estas dianas hace necesario mejorar el rendimiento, disminuir los costes y aumentar la precisión de las técnicas existentes.

En este trabajo de fin de grado el objetivo es poner a punto una técnica de cribados de alto rendimiento mediante IonFlux, una novedosa plataforma de electrofisiología automática. En la puesta a punto realizamos una caracterización electrofisiológica con la línea celular HEK-hBk1, que expresa Kv1.1, mediante *patch clamp* manual. Los resultados obtenidos son similares a los que recoge la bibliografía tanto a nivel biofísico como farmacológico con respecto a las interacciones de este canal con el compuesto inhibitorio 4-Aminopiridina (4-AP). El segundo paso fue la puesta a punto del cultivo para satisfacer los requisitos del sistema. Así, la modificación de la confluencia, los tiempos de uso de complejos enzimáticos, métodos físicos de disgregación y el uso de medios de cultivo que permitiesen su mantenimiento aislado hicieron posible la identificación de unas condiciones óptimas. Bajo estas condiciones se realizaron experimentos con la plataforma IonFlux que dieron como resultado corrientes y respuesta farmacológica similar a la obtenida con *patch clamp* manual.

En conclusión, este trabajo final de grado aúna el uso de una emergente diana terapéutica como son los canales de potasio con la puesta a punto de una de las técnicas más novedosas en el mundo de la farmacología ofreciendo como resultado unas posibles condiciones óptimas para el uso masivo de esta.

Palabras clave:

Cribado, potasio, canales iónicos, electrofisiología, dolor, analgesia.

Abstract

The increase of the pathologies associated with ion channels during the last years places the research about channelopathies in focus. Muscular, cardiac diseases or disorders such as epilepsy have been related with the ion channel Kv1.1. New technologies to discover new drugs against these targets are necessary to improve performance, reduce costs and increase the accuracy of existing techniques.

The objective of this project is to set up a new automated patch clamp to perform high throughput screens using IonFlux, a novel automatically platform based on electrophysiology. We performed an electrophysiological characterization with the cell line HEK-hBk1, expressing Kv1.1 by manually patch clamp. The obtained results are similar to those provided in the literature on both biophysical and pharmacological level with respect to interactions with this channel inhibitory compound 4-Aminopyridine (4-AP). The second step was to set up the cell line culture to achieve the system requirements. Thus, modification of the confluence, times of use of enzyme complexes, physical methods of disaggregation and the use of culture media that would allow their isolation maintenance allow the identification of optimal conditions. Under these conditions the results obtained with IonFlux fit with the ones performed with manually patch clamp.

In conclusion, this research combines the use of an emerging therapeutic target such as potassium channels with the development of one of the latest techniques in the world of pharmacology offering as a result possible optimal conditions for use it.

Key words:

Screening, potassium, ion channel, electrophysiology, pain, analgesia.

Índice

Resumen	2
Introducción	5
Objetivos	13
Antecedentes	14
Materiales y métodos	15
Soluciones	15
Cultivo celular.....	16
Electrofisiología manual. Patch clamp.....	18
Puesta a punto línea celular	19
Electrofisiología automática empleando la plataforma de cribados de alto rendimiento IonFlux ...	19
Resultados.....	24
Caracterización electrofisiológica del canal iónico Kv1.1 mediante <i>patch clamp</i> manual	24
Puesta a punto del cultivo celular y preparación de las células.....	25
Tabla resumen.....	28
Puesta a punto de los cribados de alto rendimiento con el uso del sistema de electrofisiología automático IonFlux.....	28
Discusión	30
Conclusiones y perspectivas futuras	33
Bibliografía	34

Introducción

La IASP (Asociación internacional para el estudio del dolor) define dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable con daño tisular real o potencial, o descrita como la ocasionada por dicha lesión [1]”. En función de su duración, se diferencia entre el dolor agudo y el dolor crónico. Se considera dolor agudo, la consecuencia sensorial inmediata de la activación del sistema nociceptivo, una señal de alarma disparada por los sistemas protectores del organismo [2-6]. El dolor agudo, se debe generalmente al daño tisular somático o visceral, y se desarrolla en un curso temporal que sigue de cerca el proceso de reparación y cicatrización de la lesión causal. Si no hay complicaciones, el dolor agudo desaparece con la lesión que lo originó. Dolor crónico, es aquel dolor que persiste más allá de la lesión que lo originó, y que permanece una vez que dicha lesión desaparece. Generalmente, el dolor crónico es un síntoma de una enfermedad persistente cuya evolución, continua o en brotes, conlleva la presencia de dolor, aun en ausencia de lesión periférica.

El dolor, es un problema de salud de carácter global [7-9], aproximadamente el 27% de la población adulta Europea [10] padece dolor crónico. Hay que resaltar que el dolor agudo no tratado, puede poner en riesgo la salud (p. ej. cicatrización lenta de heridas, alteraciones inmunológicas y problemas respiratorios como la neumonía) y en última instancia, puede provocar dolor crónico [11]. Además, el dolor crónico severo puede tener un impacto negativo en la calidad de vida del individuo: en la vida diaria, calidad del sueño, relaciones interpersonal e incluso en la productividad en el trabajo [7,12]. Por todo esto, el dolor es un tema muy estudiado y de gran relevancia económica

La percepción del dolor consta de un sistema neuronal sensitivo (nociceptores) y unas vías nerviosas aferentes que responden a estímulos nociceptivos tisulares; puede estar influido además por otros factores (p. ej. psicológicos). A nivel molecular, las dianas involucradas en esta afección son muy diversas, y van desde canales iónicos hasta algunos neurotransmisores [13]. Hasta hace poco, las investigaciones apuntaban a que los canales de sodio, de calcio y los de tipo TRP (*transient receptor potential channels*), eran los principales involucrados en la nocicepción, sin embargo estudios recientes han atribuido también una gran importancia a los canales de potasio (K^+) [14].

Los canales de K^+ constituyen el grupo más numeroso, heterogéneo y diverso de canales iónicos presentes en las neuronas [14]. Este tipo de canales, interviene en multitud procesos biológicos a nivel celular (control del volumen celular, inducción de la proliferación, apoptosis, migración e iniciación de muchas vías de señalización) [15] y a nivel del organismo (generar y propagar el impulso nervioso y el potencial cardiaco así como, promover la secreción de insulina).

Los canales de K^+ se pueden clasificar atendiendo a su topología, es decir, al número de poros y de segmentos transmembrana (TM) del canal (denominados S en los canales Kv y M en los canales no activados por voltaje), así como, atendiendo a las diferencias en sus propiedades funcionales y farmacológicas [16].

Según sus propiedades, los canales de K^+ se pueden clasificar en: activados por cambios de voltaje (Kv) y activados por ligando.

Los canales de K^+ están formados por el ensamblaje de 4 subunidades α y/o β que forman el poro del canal y diversas subunidades β , por tanto, pueden ser homo o heterotetrámeros. Se han identificado y clonado más de 80 genes que codifican diversos canales de K^+ humanos (1-4,11). Atendiendo a la tipología hablamos de (Figura 1):

1. Canales formados por 2 segmentos transmembrana (M1 y M2, análogos a los segmentos S5-S6 de los canales Kv) y 1 poro (2TM/1P). A este grupo pertenecen los canales rectificadores internos responsables de las corrientes I_{K1} (Kir2.1-2.4), I_{KACH} (Kir6.1-6.2) e I_{KACH} (Kir3.1, Kir3.4).
2. Canales formados por 4 segmentos transmembrana y 2 poros (4TM/2P) o K_{2P} . Mientras que canales 2TM/1P y 6TM/1P se ensamblan como tetrámeros, los canales 4TM/2P se supone que forman dímeros, a fin de mantener la simetría de 4 subunidades α alrededor del poro.
3. Canales formados por 6 segmentos transmembrana y 1 poro (6TM/1P). A este grupo pertenecen: a) los canales voltaje-dependientes (Kv) de las familias *Shaker* (Kv1.1-1.8), *Shab* (Kv2.1-2.2), *Shal* (Kv3.1-3.4), *Shaw* (Kv4.1-Kv4.3), KCNQ (Kv7.1-7.5) y hERG (Kv10.1-10.2, Kv11.1-11.3, Kv12.1-12.3). Los miembros de las subfamilias Kv5-9 no expresan corrientes por sí mismos, pero pueden regular la actividad de otros canales Kv. b) Los activados por Ca^{2+} de la familia Maxi-K or *Slo* (*Big conductance*: K Ca 1.1, K Ca 4.1-4.2 y K Ca 5.1) y *SK* (*Small conductance*: K Ca 2.1-2.3 y K Ca 3.1).

Los canales tipo *Shaker*, adoptan 3 estados conformacionales: un estado abierto (O), y dos no conductores, cerrado (C) e inactivo (I). Durante la despolarización celular, los canales Kv se activan con una cinética sigmoidal que sugiere deben moverse a través de diversos estados no conductores, primero hacia un estado cerrado desde el cual el canal puede abrirse (C^*) y, posteriormente, de C^* a O. A continuación los canales entran en un estado no conductor I, lo que conduce a una disminución de la corriente. La inactivación del canal, puede realizarse desde el estado abierto ($O > I$) o sin que el canal se abra ($C^* > I$), mientras que la deactivación ($I <> O$)

tiene lugar cuando la membrana se hiperpolariza. Una vez que el canal se encuentra en el estado C, está en condiciones de activarse de nuevo.

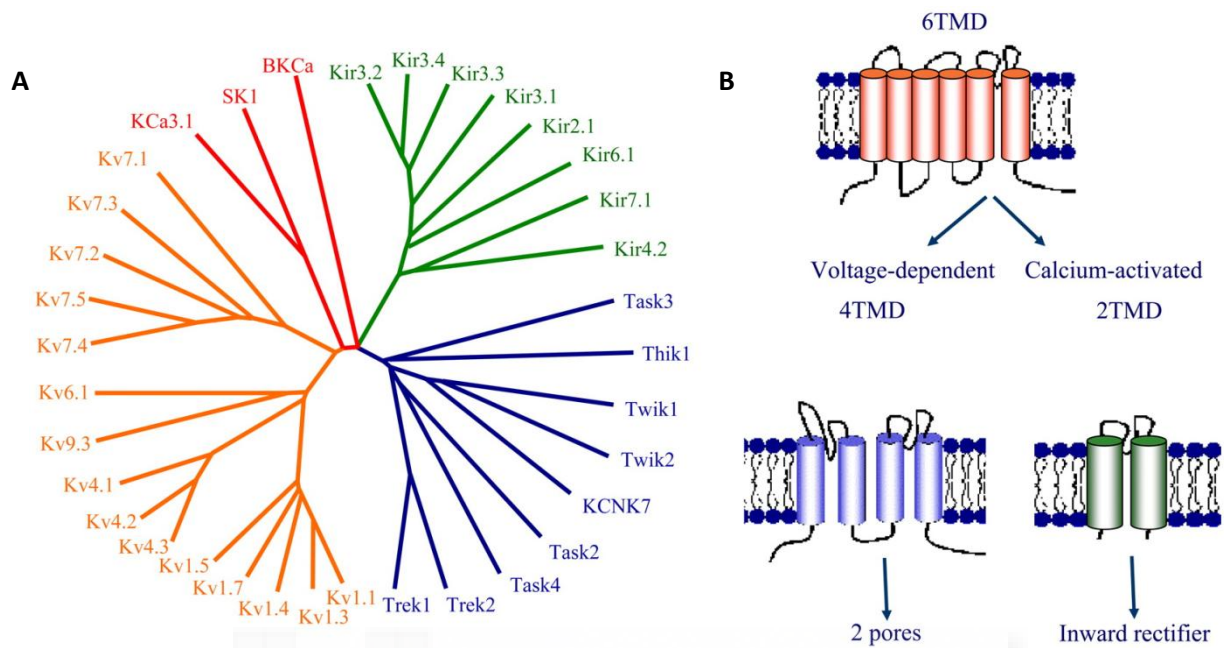


Figura 1. Canales iónicos de potasio del epitelio respiratorio. A) Árbol filogenético que clasifica los diferentes tipos de canales de potasio por colores. Verde: canales rectificadores internos, canales formados por 2 segmentos transmembrana (TMD); azul: canales formados por 4 segmentos transmembrana y 2 poros (4TM/2P) o K_{2P} ; naranja: canales voltaje-dependientes (Kv), canales formados por 6 segmentos transmembrana y 1 poro (6TM/1P); rojo: activados por Ca^{2+} . **B)** Modelos esquemáticos de las diferentes clases de canales de potasio. Imagen extraída de [17].

La inactivación tiene lugar por dos mecanismos, uno rápido o tipo N y otro lento o tipo C, que implican a los extremos correspondientes de la subunidad α que forma el canal (*). La inactivación rápida aparece en canales que generan corrientes transitorias (Kv1.1 y Kv1.4, Kv4.2 y Kv4.3, Kv3.1-3.4 y KCNM) y se explica por un mecanismo de "cadena y pelota" [18]. En este modelo, los primeros 20-22 aminoácidos de cada uno de los 4 extremos N-terminales, formarían una "pelota de inactivación", que se une a través de una cadena de aminoácidos (residuos 23-83) a un receptor cargado negativamente, localizado en la boca intracitoplasmática del canal, que puede ser ocupado tras la apertura del canal, produciendo su rápida inactivación (1-10 ms). La inactivación rápida se anula tras la administración intracelular de TEA y por mutaciones que suprimen los primeros 22 aminoácidos del extremo N-terminal o rompen la secuencia de los segmentos hidrofóbicos S4-S5 y se restaura tras adicionar el péptido eliminado [19].

El método tradicionalmente empleado en el laboratorio para evaluar la actividad del canal iónico *in vitro* es el *patch clamp*. Esta técnica, fue desarrollada a finales de la década de los 70 por Bert Sakmann y Erwin Neher para medir la actividad de los canales [20]. Este método, permite fijar el potencial de membrana de una célula, y registrar las corrientes iónicas que aparecen al aplicar potenciales hiperpolarizantes y despolarizantes. El fundamento de este sistema consiste en formar un sello de alta resistencia entre una micropipeta de vidrio con un microelectrodo en su interior y la membrana de la célula. La micropipeta se llena con la solución interna cuya composición varía dependiendo de la corriente a estudiar. Al poner la pipeta sobre la superficie de la célula, se aplica una presión negativa mediante una ligera succión, de tal forma que, la porción de la membrana localizada en la luz de la pipeta se invagina formando un sello de alta resistencia. Esta técnica manual, permite un elevado nivel de flexibilidad en las configuraciones que se pueden adoptar para obtener el registro, *cell-attached*, *whole-cell*, *inside-out*, y *outside-out* son algunas de ellas. En los estudios electrofisiológicos llevados a cabo en este trabajo, se empleó la configuración *whole-cell*, que mide las corrientes de múltiples canales. Se aplica un pulso a un voltaje determinado y la variación del potencial de membrana es lo que se registra.

Para conseguir la configuración *whole cell*, una vez la membrana se encuentra invaginada, se aplica una succión adicional rompiendo esta porción de la misma (Figura 3). Tras la rotura del parche de membrana entran en contacto la solución interna y el citoplasma celular cambiando inmediatamente la composición de este último. En estas condiciones, se fija el potencial de membrana al deseado y mediante distintos protocolos se registra la corriente. El resultado es el sumatorio de las corrientes de todos los canales presentes en la membrana activables con las condiciones determinadas (también llamada corriente macroscópica).

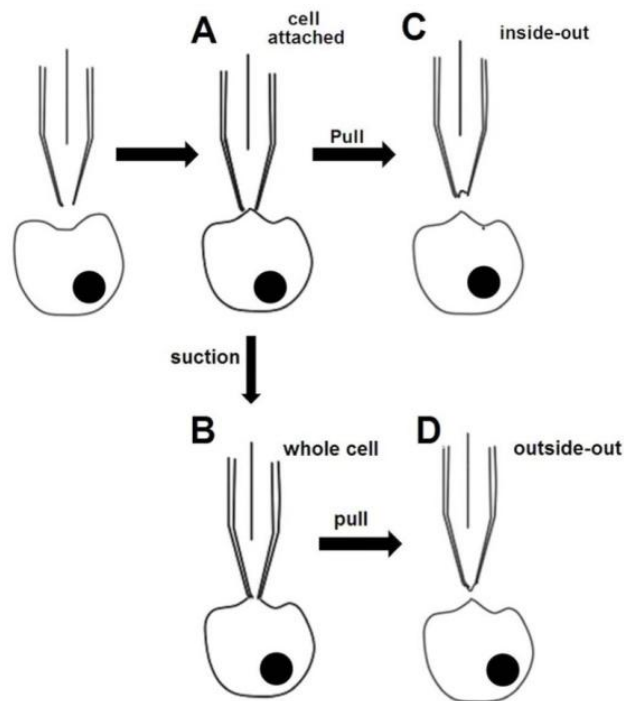


Figura 3. Esquema de la configuración *whole cell* en la técnica de electrofisiología manual *patch clamp*.

El *patch camp* manual, es considerado como el estándar de oro para la investigación de las propiedades de los canales iónicos porque genera registros de alta calidad, pero, el procedimiento es complicado y lento. Por ello, el rendimiento de los cribados realizados es muy bajo y este paso constituye un cuello de botella para la búsqueda de nuevos fármacos [20].

En el proceso de descubrimiento de fármacos, el primer paso crítico es la identificación de un buen cabeza de serie o *lead*. La aplicación de métodos de cribado virtual puede ayudar en las técnicas de *High-throughput screening* con el fin de facilitar y contribuir a la comprensión de los mecanismos bioquímicos de actuación de los fármacos, agilizar y reducir el coste del proceso. Se considera un buen lead a aquellos que producen una inhibición del 50% de la actividad *in vitro* (IC_{50}) a una concentración alrededor de 10 μ M. Una vez identificado dicho *lead*, comienza el proceso de optimización, cuyo objetivo es mejorar su eficacia terapéutica: incremento de su potencia frente a una diana o *target* (normalmente la IC_{50} se rebaja a valores del rango de 1 a 10 nM), selectividad frente a dianas relacionadas, farmacocinética, minimización de su toxicidad y efectos secundarios.

Las técnicas de *High-throughput screening* (HTS) se convirtieron, desde la década de los 90, en la principal fuente de obtención de nuevos leads. Hay que mencionar, además que el HTS requiere quimiotecas de cientos de miles de compuestos y un método de ensayo de actividad.

Un ejemplo de estos novedosos sistemas, es la plataforma de cribados de alto rendimiento basada en electrofisiología automática IonFlux (Figura 4), que combina compuestos, células y tampones en una sola placa de 96 pocillos. Una de las ventajas principales de este equipo, es la gran capacidad que tiene para el análisis masivo de moléculas, pudiendo llegar a testar más de 600 compuestos diferentes al día [21]. El equipo consiste en un “lector” de placas conectado a un PC con un software desde el que se controlan todos los pasos a seguir.



Figura 4. Plataforma de cribados de alto rendimiento IonFlux.

Los pocillos de las placas poseen en el fondo un circuito de canales que los interconecta (Figura 5). Estos pocillos se utilizan para almacenar todo lo necesario durante el experimento, es decir, suspensión de células, solución intracelular y compuestos. El sistema utiliza 20 células selladas por cada canal amplificador para mejorar la consistencia de los datos y el ratio de éxito (Figura 6). Las placas son la parte de productos consumibles del equipo y hay diferentes diseños de las mismas que se ajustan a una gran variedad de aplicaciones para canales iónicos. Estas placas tienen tamaños estándar, lo que las hace perfectamente compatibles con robots o lavadores disponibles en el propio laboratorio.

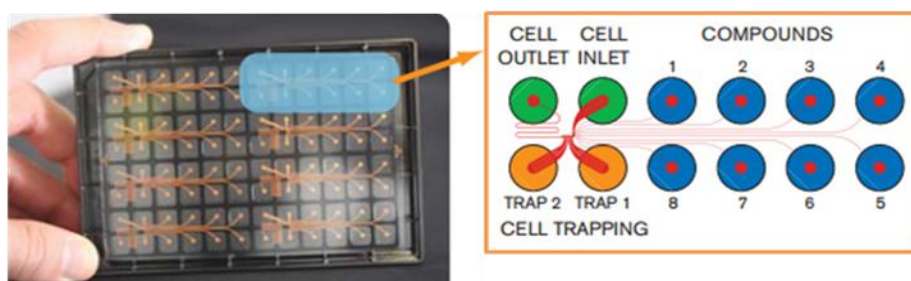


Figura 5. Placa del sistema de cribado de alto rendimiento IonFlux. La red de micro-capilares que hay debajo de las placas del sistema IonFlux forman unos patrones experimentales que se repiten. Cada patrón experimental contiene 12 pocillos en los que cada experimento es llevado a cabo. Dentro de cada patrón, dos de los pocillos son usados para depositar la solución interna de las células, mientras que otros dos pocillos sirven para la entrada y el desecho de las células. Los 8 pocillos restantes son usados para depositar en ellos los compuestos o las diluciones seriadas que se van a testar.

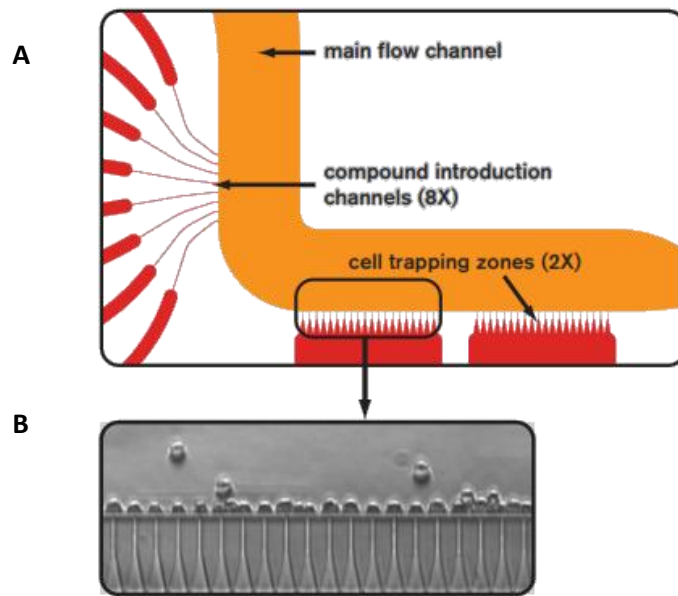


Figura 6. Esquema de la captación de las células. A) Las células depositadas en el pocillo de entrada son empujadas por la presión neumática que ejerce la interfaz a través de un canal hasta las dos zonas de acoplamiento. Allí las células son atrapadas por succión y son expuestas a los 8 compuestos que hay en cada patrón experimental. **B)** Células captadas por las puntas.

El equipo utiliza una interfaz neumática acoplada a los electrodos para ejercer presión sobre los pocillos de las placas y empujar las células y los compuestos hasta las zonas de registro (Figura 7).

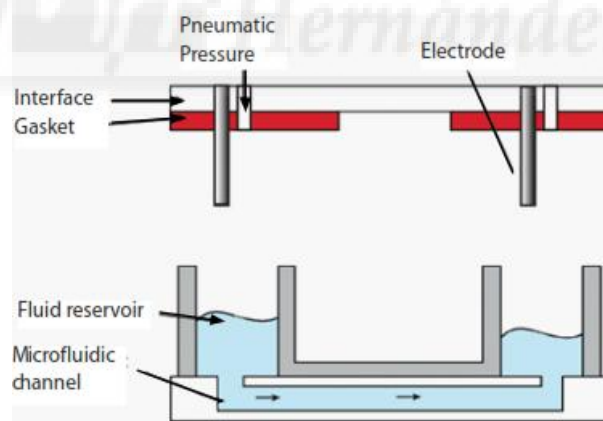


Figura 7. Interfaz neumática del sistema de cribados de alto rendimiento IonFlux.

Este sistema de dispensación de líquidos y células tiene una serie de ventajas que facilitan el manejo de este equipo, como son la perfusión continua de líquido en las zonas de registro, lo que permite el aclarado rápido de los compuestos además de la aplicación uniforme de los compuestos sobre las células. No es necesario tener un dispensador de líquidos y se evitan los pasos de pipeteos para la dispensación de compuestos, de tal manera que el tiempo experimental es menor, sin olvidar

la disminución de las partes móviles del equipo. Además se reducen los gastos en reparaciones y calibraciones.

La tecnología de la red de microcapilares empleada por el sistema IonFlux posibilita el uso de una gran cantidad compuestos y distintas concentraciones para el estudio de canales iónicos regulados por ligando y por voltaje. Además, gracias al módulo de control de temperatura se pueden realizar varios tipos de experimentos en los que la temperatura afecta a la actividad del canal iónico.

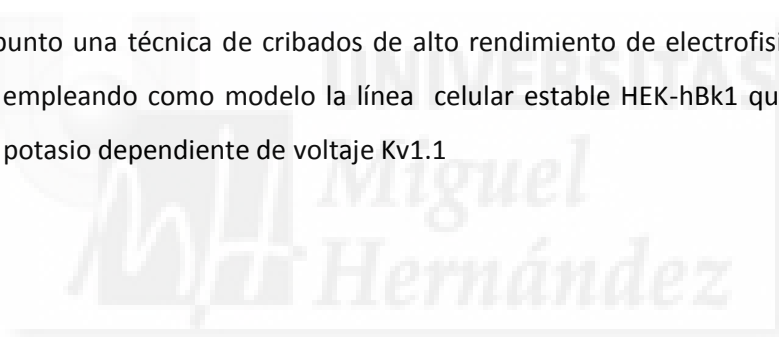
En definitiva, la creciente demanda por parte de la industria farmacéutica de nuevas tecnologías que suplan las carencias de las técnicas electrofisiológicas tradicionales, acelera el avance en el desarrollo de estos novedosos sistemas de cribado automático. Hay que mencionar además, que estas plataformas también tienen una gran aplicabilidad fuera del ámbito industrial, permitiendo a los investigadores obtener datos electrofisiológicos de forma rápida y eliminando el complejo manejo de los sistemas manuales que requiere mucho tiempo. En este trabajo nos centraremos en la puesta a punto de la plataforma de *patch clamp* automático IonFlux para realizar cribados de alto rendimiento en Kv1.1 implicado en algunas patologías de gran relevancia como desórdenes musculares (p. ej. ataxia episódica), desórdenes cardíacos (p. ej. Long QT síndrome), convulsión neonatal benigna, epilepsia, parálisis hipotalámica periódica o esquizofrenia. Evaluaremos y optimizaremos los parámetros que tienen un impacto directo en el porcentaje de éxito del cribado y validaremos los registros obtenidos bajo estas condiciones mediante *patch clamp* manual.

Objetivos

El siguiente nivel de la electrofisiología es el HTS, *High Throughput Screening*, o cribado de alto rendimiento. Éste consiste en testar grandes colecciones de compuestos químicos o productos naturales para identificar moléculas biológicamente activas. El fundamento es el mismo que en el *patch clamp*, es decir, se miden las corrientes generadas por el flujo de iones transmembrana a través de los canales de las células. Posee una precisión ligeramente inferior que la técnica anterior que se compensa por sus excelentes rendimientos así como por disminuir notablemente el tiempo necesario y la complejidad del análisis de los compuestos. Esto hace esta técnica idónea para su empleo tanto en la búsqueda de fármacos a nivel industrial como en investigación básica.

Con todo lo descrito anteriormente podemos definir los objetivos de este trabajo:

1. Caracterización electrofisiológica del canal iónico Kv1.1 mediante *patch clamp* manual.
2. Evaluación y optimización de los parámetros que tienen un impacto directo en el porcentaje de éxito del cribado.
3. Poner a punto una técnica de cribados de alto rendimiento de electrofisiología automática (IonFlux) empleando como modelo la línea celular estable HEK-hBk1 que expresa el canal iónico de potasio dependiente de voltaje Kv1.1



Antecedentes

Con respecto a Kv1.1, se han realizado estudios previos para encontrar moduladores de este canal iónico en el laboratorio. Se comenzó empleando un sistema de detección de cambios del voltaje mediante sondas fluorescentes denominado *FLIPR membrane potential assay*. Este método genera un aumento de la fluorescencia cuando los canales se abren durante la despolarización de la célula por la acción de algún compuesto [22] (Figura 8).

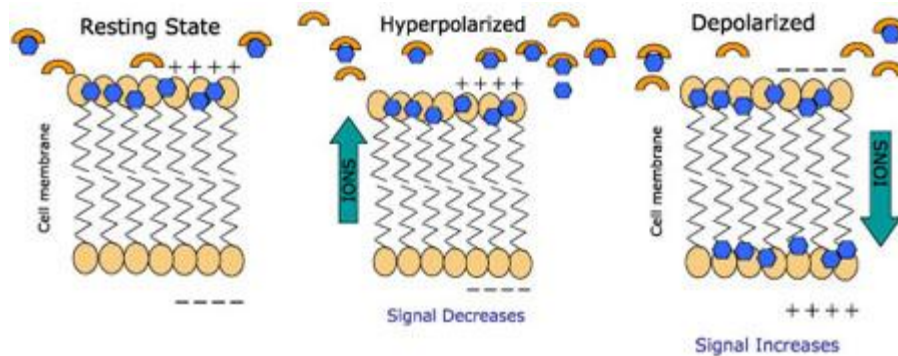


Figura 8. Esquema de los cambios de la fluorescencia por la variación del potencial de membrana empleando *FLIPR membrane potential assay*.

Debido a las dificultades que planteó este sistema y de forma casi paralela, se comenzó a utilizar la técnica de electrofisiología manual *patch clamp*. Mediante el pinzamiento de la membrana celular con una micropipeta y empleando un electrodo se detectan los cambios en el voltaje de la célula pudiendo así identificar compuestos que modulan la actividad del canal.

El siguiente paso debido a la necesidad de una mayor cantidad de registros en el menor tiempo posible, fue emplear una novedosa plataforma de cribados de alto rendimiento basada en electrofisiología automática, el IonFlux. Partiendo de la experiencia obtenida con este mismo sistema del estudio de canales de sodio para el tratamiento del síndrome de Dravet, realizamos la puesta a punto para una línea celular que expresase Kv1.1.

Materiales y métodos

En este apartado se pretende describir y ampliar de forma detallada la metodología específica y los materiales que se han empleado durante el desarrollo del trabajo de fin de grado.

El modelo celular utilizado durante esta investigación ha sido la línea celular HEK-hBk1 que tienen morfología epitelial y proviene de células embrionarias de riñón. Esta línea celular es de uso común en el estudio de canales iónicos, principalmente en estudios electrofisiológicos.

Soluciones

Tampón externo K⁺ (pH 7,4 ajustar con NaOH)

	mM	g/1000ml
NaCl	140	8,18
KCl	4	0,3
CaCl ₂	2	0,3
MgCl ₂	2	0,408
HEPES	10	2,382
Glucosa	5	0,88
Manitol	20	3,644

Tabla 1. Composición ampón externo.

Tampón interno K⁺ (pH 7,2 ajustar con KOH)

	mM	g/250ml
KCl	144	2,681
MgCl ₂	2	0,102
HEPES	10	0,580
EGTA	5	0,475

Tabla 2. Composición tampón interno.

Debemos medir la osmolaridad para comprobar que las concentraciones son correctas. El valor de la osmolaridad de la solución interna debe de estar entre 290-310 osM y la solución externa debe de ser 10 unidades superior.

Cultivo celular

Descongelación y siembra de células

Para descongelar células, pasar las células de N₂ líquido a un recipiente con hielo seco para que el cambio de temperatura no sea tan brusco. Una vez que todo el material y medios estén a 37°C, descongelar las células transfiriéndolas del hielo seco a un baño a la misma temperatura, agitando el criotubo en el agua con la mano hasta su completa descongelación. Rociar etanol abundantemente, transferir las células a un tubo con 10 ml medio completo, centrifugar 5 min a 700 rpm (con una centrífuga de mesa a temperatura ambiente, RT), descartar sobrenadante, resuspender células en 5 ml de medio DMEM-F12 (Gibco 21331-020) suplementado con FBS (suero de ternera) al 10% (Gibco 10500-064) y P/S/G (penicilina/estreptomicina/glutamina) al 1% (Gibco 10378-016) (Gibco 10131-019) que se almacenará a 4°C en oscuridad, y transferir a una botella T-25. Se debe retirar el medio de congelación porque esta suplementado con di-metil-sulfóxido (DMSO) un agente crioprotector que es bastante tóxico por lo que hay que minimizar el tiempo que las células pasan a temperatura ambiente en presencia de este compuesto. Por último colocarlo en el incubador con 80% humedad y 5% CO₂.

Cambios de medio. Mantenimiento.

Las células se cultivan en una incubadora con CO₂ al 5% a 37 °C y una humedad relativa de aproximadamente 80%. Como recipiente de crecimiento se emplean botellas de 25 cm² de área (T-25) (Corning) y posteriormente las células se pasan cuando alcanzan un 90-100% de confluencia a botellas de mayor tamaño para amplificar la cantidad de células. Esta línea celular al igual que la mayoría duplica su número cada 24-48 horas, cuando las condiciones de crecimiento son adecuadas. De esta manera, se empobrece el medio al consumirse los nutrientes y acumularse productos de deshecho en éste. de las células por ello, se cambia el medio cada 2-3 días. Es fácil observar cómo el pH del medio tiende a acidificarse más rápidamente (se torna naranja-amarillento) cuando la densidad es elevada, al aumentar los productos de desecho liberados. Emplearemos medio de cultivo DMEM-F12 (Gibco 21331-020) suplementado con FBS (suero de ternera) al 10% (Gibco 10500-064), P/S/G (penicilina/estreptomicina/glutamina) al 1% (Gibco 10378-016) y geneticina al 1,5% (Gibco 10131-019) que se almacenará a 4°C en oscuridad.

Dilución de la densidad (pase) de células

La línea celular empleada, HEK-hBk1 como multitud de tipos celulares crece adherida a la superficie de la botella y sufre parada en su crecimiento a densidades elevadas, impuesta por el proceso de inhibición por contacto. Una peculiaridad de esta línea celular es que crecen formando

agregados y no se expanden cubriendo la superficie inferior del recipiente en su totalidad. Cuando se alcanza una confluencia del 100% se descartan parte de las células reduciendo la densidad y cambiándolas de botella. Se emplea 0,25% tripsina-EDTA (Gibco 25200-056), enzima de tipo proteasa para levantarlas, ya que digiere aquéllas proteínas celulares implicadas en la adhesión celular al soporte y el EDTA elimina cationes divalentes presentes en el medio. Para que la tripsinización sea efectiva, y para contribuir a debilitar la adherencia de las células al soporte, aparte de tripsina, hay que asegurarse de eliminar el suero del medio (que contiene inhibidor de tripsina). Se retirara el medio y se lava con PBS una vez antes de añadir la tripsina. En este caso obviaremos este paso ya que esta línea celular tiene tendencia a formar agregados y las células se despegan con facilidad del soporte. Se aplicará 1 ml de la enzima por cada 5 ml de medio y se incubará a 37°C. Una vez hemos comprobado que la tripsinización ha sido efectiva observando si las células están disgregadas con el microscopio óptico, neutralizamos con la misma cantidad de medio correspondiente a ese tipo de botella y trasferimos el volumen correspondiente a otra que ya contiene medio de cultivo (Tabla 3 y Figura 9).

Inoculo (en ml) y volúmenes (en ml) al realizar un pase de células			
Botellas (flasks)	Siembra (ml)	Volumen (ml)	
		Medio	Tripsina/EDTA
T-25	0,1	5	1
T-75	1	10	2
T-175	1,25-1,5	20	4

Tabla 3. Inoculo (en ml) y volúmenes (en ml) al realizar un pase de células.

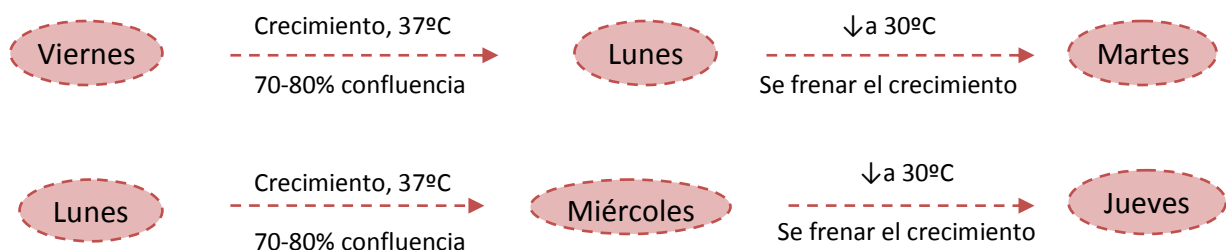


Figura 9. Esquema cultivo celular.

Electrofisiología manual. Patch clamp

El sistema convencional que consiste en electrofisiología manual, usa microelectrodos que se ponen en contacto con la superficie celular para generar una estrecha interacción, un sello de 1 giga-ohm ($G\Omega$) de resistencia entre la membrana celular y el microelectodo. La corriente que fluye a través de la membrana celular puede ser medida directamente controlando el voltaje aplicado sobre la misma.

Una peculiaridad de este canal, es la ausencia de activadores conocidos, por lo que emplearemos voltaje para abrir el canal y compuesto inhibitorio ampliamente descrito como es la 4-Aminopiridina (4-AP). Este compuesto, es un inhibidor no selectivo de los canales de potasio dependientes de voltaje con un amplio rango de afinidades (desde micromolar hasta milimolar) y ejerce su acción desde el lado intracelular del canal (referencia). Se ha demostrado, que la administración de 4-AP es efectiva en el tratamiento sintomático de daños en la espina dorsal (referencia) y en enfermedades que implican desmielinización como es la esclerosis múltiple (MS) (referencia). La eficacia terapéutica de la 4AP, se cree que deriva de su habilidad de inhibir los canales de potasio voltaje dependiente de las neuronas, dando lugar a un incremento de la conducción neuronal. Desafortunadamente, este mismo mecanismo se cree que induce convulsiones, el mayor efecto secundario derivado del tratamiento con 4-AP.

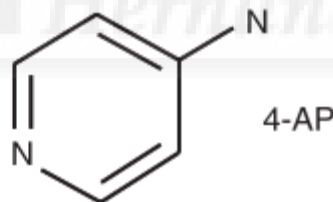


Figura 10. Formula molecular de la 4-Aminopiridina (4-AP), inhibidor no selectivo de los canales de potasio dependientes de voltaje.

Preparación del cultivo celular para electrofisiología manual

Las células fueron despegadas del recipiente de crecimiento mediante la aplicación de tripsina y se depositaron en placas de 6 pocillos. Los tampones usados son a los que se ha hecho referencia anteriormente.

Protocolo de voltaje empleado

Se aplicó un protocolo despolarizante de pulsos cuadrados de 200 ms de duración que fueron desde -100 mV A +70 mV en incrementos de 10 mV.

Puesta a punto línea celular

Recuento de células

Ya que la tripsinización y la disgregación mecánica puede conllevar algo de muerte celular es necesario determinar el número de células vivas y muertas, la manera más sencilla es empleando una cámara de Neubauer (Figura 11) conjuntamente con un colorante vital como es el Azul de Tripano (*Trypan Blue*) (Life technologies 15250-061) [23]. Realizo una dilución 1:1 y se contaron bajo el microscopio óptico.

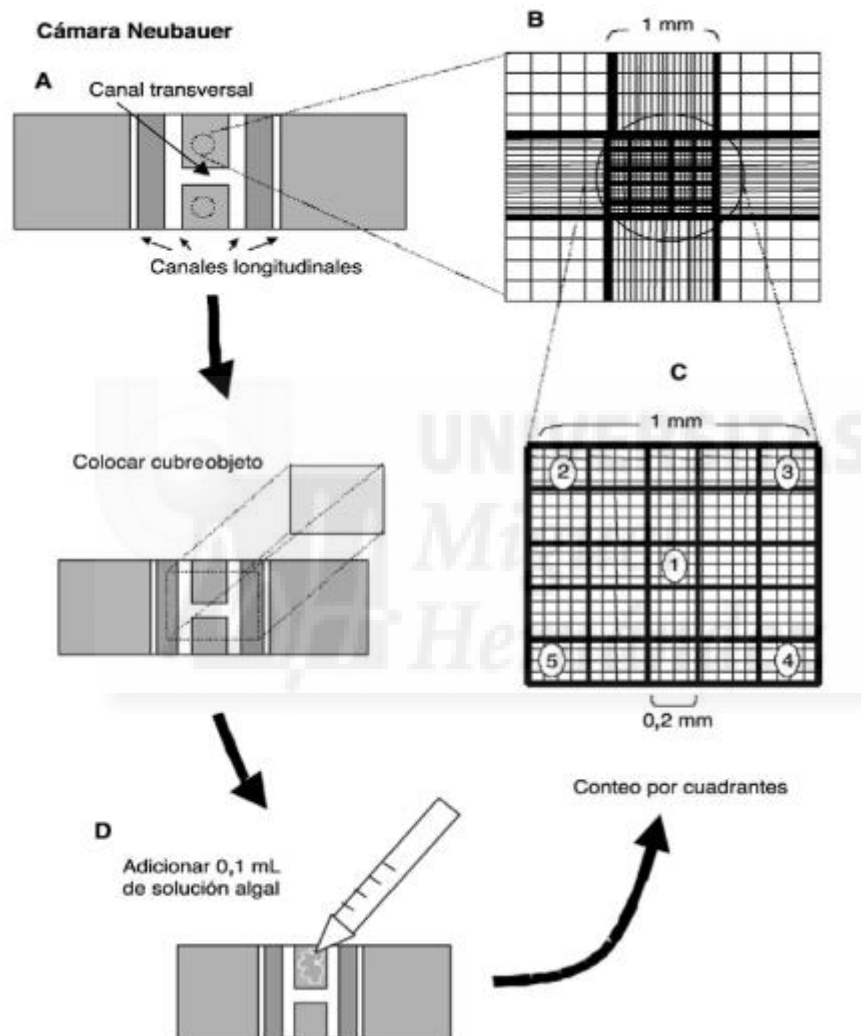


Figura 11. Cámara de Neubauer para el recuento de células.

Electrofisiología automática empleando la plataforma de cribados de alto rendimiento IonFlux

Una vez las células están listas y las placas en el lector, éstas son selladas introduciéndose los electrodos en los pocillos apropiados. El instrumento utiliza presión neumática que controla el flujo de fluidos, *cell trapping* y la formación de *whole cell*.

Preparación del equipo de patch clamp automático

Lavar la placa 3 veces con H₂O desionizada a chorro, poner 250µl de H₂O desionizada en todos los pocillos menos en *OUT*. Realizar protocolo *water* para limpiar los canales de la placa y lavar de nuevo 3 veces con H₂O desionizada. Rellenar los pocillos con las soluciones correspondientes (Tabla 4), menos *OUT* y en *IN* poner solución externa. Realizar protocolo *preprime* y colocar las células en los pocillos ya tratadas.

		C1		C2		C3		C4	
P1	OUT	IN	Aminopiridina 0,3µM	Aminopiridina 1µM	Aminopiridina 30µM	Aminopiridina 100µM			
	T1	T2	Aminopiridina 300µM	Aminopiridina 1000µM	Aminopiridina 3000µM	Buffer			
P2	OUT	IN	Aminopiridina 0,3µM	Aminopiridina 1µM	Aminopiridina 30µM	Aminopiridina 100µM			
	T1	T2	Aminopiridina 300µM	Aminopiridina 1000µM	Aminopiridina 3000µM	Buffer			
P3	OUT	IN	Aminopiridina 0,3µM	Aminopiridina 1µM	Aminopiridina 30µM	Aminopiridina 100µM			
	T1	T2	Aminopiridina 300µM	Aminopiridina 1000µM	Aminopiridina 3000µM	Buffer			
P4	OUT	IN	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer			
	T1	T2	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer			

Tabla 4. Patrón de aplicación de las soluciones en la placa del IonFlux.

No fue necesario realizar dosis-respuesta del vehículo, pues la concentración de la disolución patrón de 4-Aminopiridina es muy elevada, 200µM, con lo que la presencia de agua desionizada en la preparación final será despreciable.

Preparación del cultivo celular para electrofisiología automática

Se lava 2 veces con PBS (Gibco 14200-067) (tampón fosfato salino) (1xH₂O desionizada) la botella que contiene las células con las que vamos a trabajar, se añaden 5ml de Detachin (Genlantis, USA) y se deja incubar 30min a 37°C. Centrifugamos a 800g 1 min (centrífuga de mesa. Temperatura ambiente, RT). Se retira el sobrenadante y se resuspende con 10 ml de medio CHO Serum Free (25mM HEPES Ácido 1%, P/S (penicilina/estreptomina) (Gibco 15140-122)). Tras 2h de agitación en T-25, y cuando estén las placas, el equipo y las soluciones listas para realizar el experimento recoger todo el homogenizado de células y pasarlo a un Corning. Centrifugar 1 min a 800g (centrífuga de mesa. Temperatura ambiente, RT), retirar el sobrenadante, resuspender en 3 ml solución externa y

centrifugar de nuevo bajo las mismas condiciones. Repetir dos veces más este paso y tras la última centrifugación resuspender en solución externa, tras contar el número de células, de manera que queden 500000 por pocillo.

Protocolo de voltaje empleado

El protocolo de voltaje empleado fue muy similar al utilizado en *patch clamp* automático se aplicó un pulso cuadrado desde -80 mV a +30 mV en ausencia (basal) y presencia de 10, 30, 100, 300 y 1000 μ M del compuesto. Los compuestos se aplicaron cada 3 segundos con un periodo de lavado del canal con tampón de 30 segundos

Sistema IonFlux

Podemos diferenciar tres pasos básicos en el sistema:

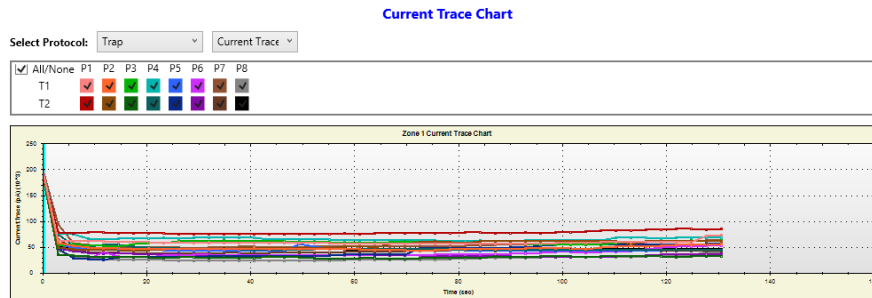
- 1. Las células y los compuestos son añadidos a las placas.** La red de micro-capilares que hay debajo de las placas del sistema IonFlux forman unos patrones experimentales que se repiten. Cada patrón experimental contiene 12 pocillos en los que cada experimento es llevado a cabo. Dentro de cada patrón, dos de los pocillos son usados para depositar la solución interna de las células, mientras que otros dos pocillos sirven para la entrada y el desecho de las células. Los 8 pocillos restantes son usados para depositar en ellos los compuestos o las diluciones seriadas que se van a testar.
- 2. Acoplamiento de las células.** Las células depositadas en el pocillo de entrada son empujadas por la presión neumática que ejerce la interfaz a través de un canal hasta las dos zonas de acoplamiento. Allí las células son atrapadas por succión y son expuestas a los 8 compuestos que hay en cada patrón experimental. Dado que hay dos zonas de acoplamiento, con este equipo se obtienen los datos de cada compuesto siempre por duplicado. Dependiendo del tipo de placa, hay zonas de acoplamiento para un conjunto de 20 células o zonas de acoplamiento para una única célula.
- 3. Registro de la corriente en la zona de acoplamiento.** Los electrodos del sistema están siempre en contacto con las zonas de acoplamiento y la solución interna de las células. Las corrientes generadas por los canales iónicos se miden en cada amplificador y se digitalizan para verlas en el ordenador. El sistema usa un modo de registro continuo para facilitar la adquisición de los datos provenientes de canales iónicos de rápida actuación.

Software IonFlux

El software controla los cuatro pasos necesarios para el experimento: llenado de canales, sello a las células (Figura 12), rotura de membrana (Figura 13), y el protocolo de voltaje/fluidos (Figura 14)

durante la adquisición de datos. Este programa también permite la compensación de parámetros como la capacitancia la membrana, resistencia en serie y las corrientes de fuga. La opción de análisis de datos y exportar resultados vinculado a excel, completan las opciones.

A



B

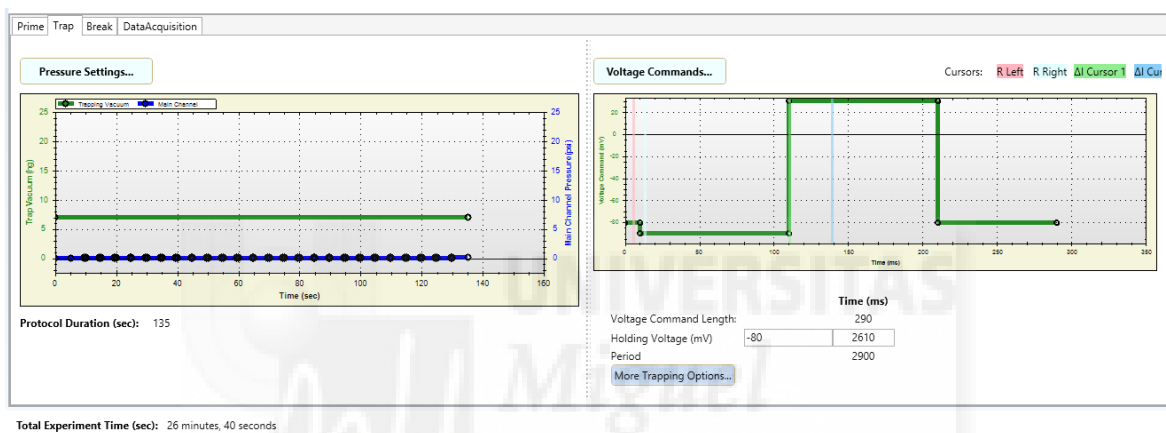
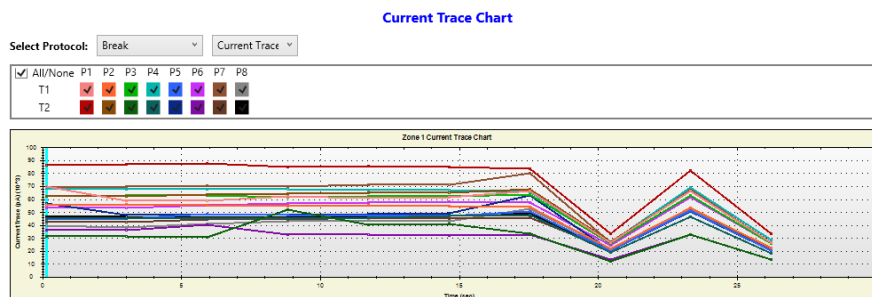
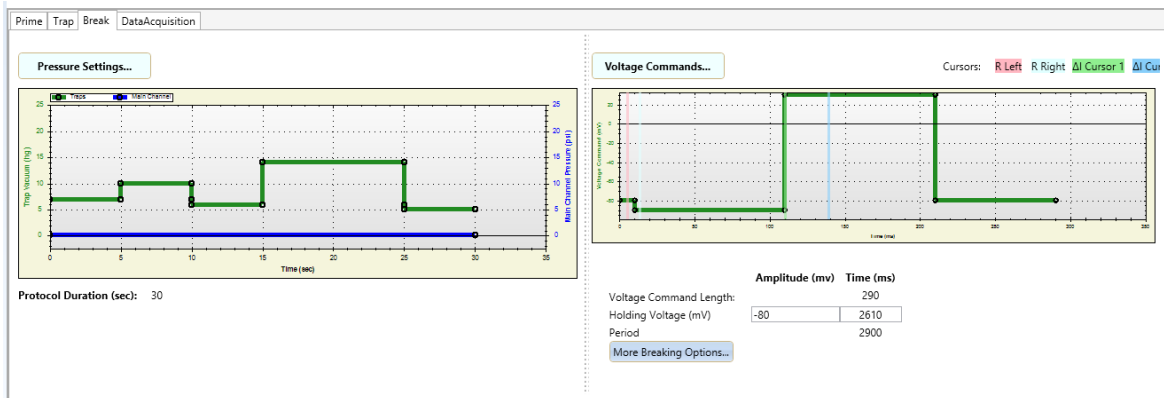


Figura 12. Trap o sello a las células. A) Representación gráfica del sumatorio de la intensidad de corriente registrada en el segundo paso del experimento en el sistema Ion Flux de cribados de alto rendimiento. **B)** Protocolo seguido en el trap o sello a las células.

A

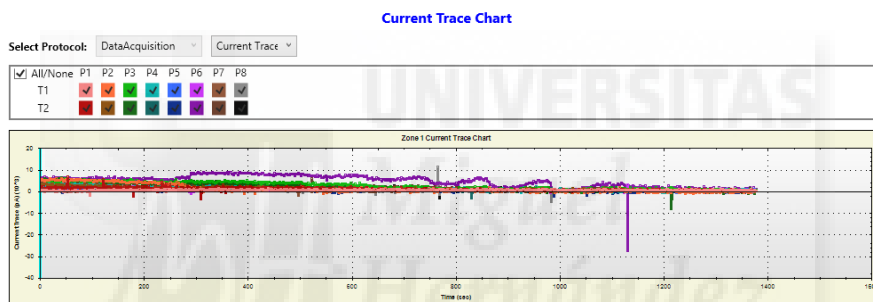




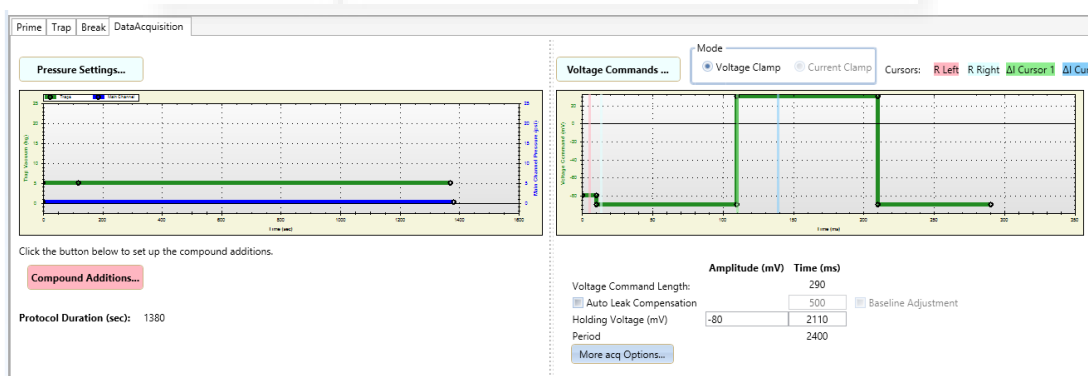
Total Experiment Time (sec): 26 minutes, 40 seconds

Figura 13B. Break o rotura de membrana. A) Representación gráfica del sumatorio de la intensidad de corriente registrada en el tercer paso del experimento en el sistema Ion Flux de cribados de alto rendimiento. B) Protocolo seguido en el break o rotura de membrana.

A



B



Total Experiment Time (sec): 26 minutes, 40 seconds

Figura 14C. Data acquisition o protocolo de voltaje/fluidos. A Representación gráfica del sumatorio de la intensidad de corriente registrada en el cuarto y último paso del experimento en el sistema Ion Flux de cribados de alto rendimiento. B Protocolo seguido durante el protocolo de voltaje/fluidos o data acquisition.

Resultados

Caracterización electrofisiológica del canal iónico Kv1.1 mediante *patch clamp* manual

Previamente a la puesta a punto del equipo de electrofisiología automático para los cribados de alto rendimiento realizamos una caracterización electrofisiológica mediante *patch clamp* manual para validar el modelo. El estudio se realizó sobre nuestro canal iónico de interés, Kv1.1 expresado en la línea celular HEK, empleando la técnica *patch clamp* en su configuración *whole cell*.

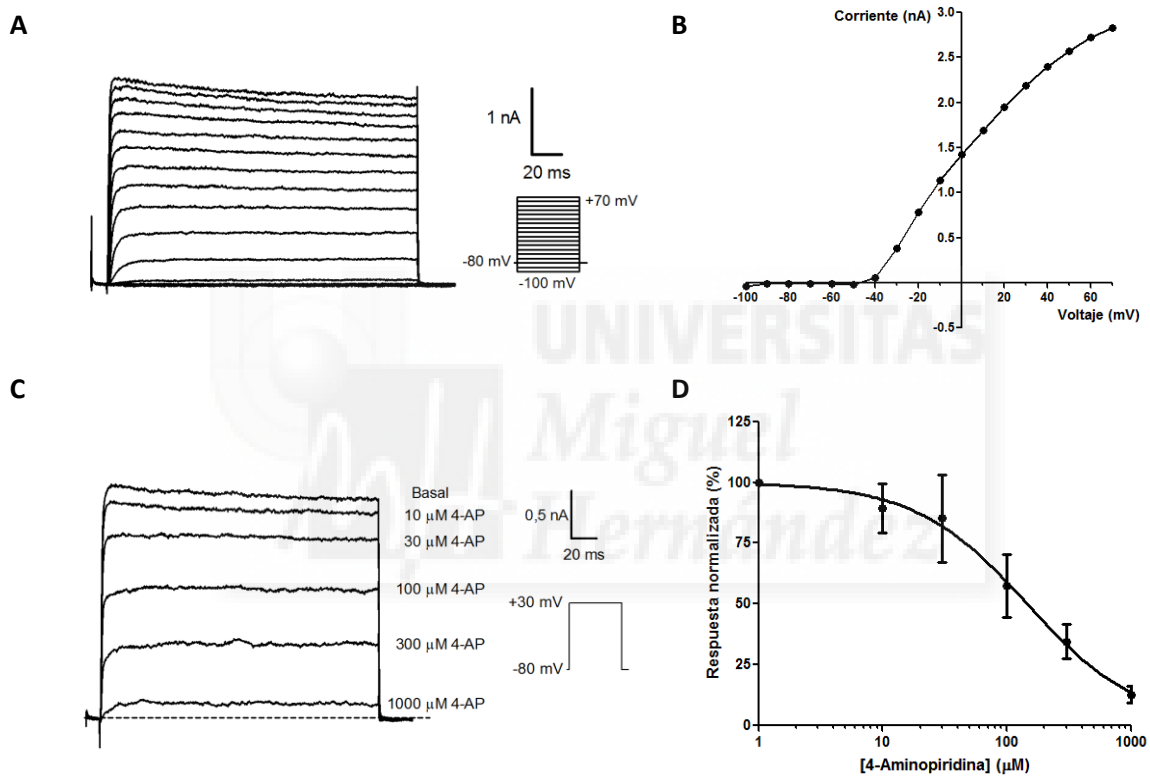


Figura 15. Caracterización electrofisiológica del canal iónico Kv1.1 mediante *patch clamp* manual. **A)** Registro representativo de corrientes iónicas evocadas por voltaje en Kv1.1. Se aplicó un protocolo de pulsos cuadrados de 200 ms desde -100 mV a +70 mV en incrementos de 10 mV ($V_h = -80$ mV). **B)** Relación entre corriente y voltaje (I-V) de la actividad de Kv1.1. **C)** Efecto de la 4-Aminopiridina a 10, 30, 100, 300 y 1000 μ M sobre Kv1.1. Se empleó un protocolo despolarizante desde -80 mV a +30 mV durante 200 ms ($V_h = -80$ mV). **D)** Curva dosis-respuesta de la actividad inhibitoria de la 4-Aminopiridina a +30 mV. Los datos se dan como media \pm SEM n=4.

En la figura 15A se muestra la respuesta del canal iónico al ser estimulado con diferentes voltajes, para ello, se aplicó un protocolo despolarizante de pulsos cuadrados de 200 ms de duración que fueron desde -100 mV a +70 mV en incrementos de 10 mV. Utilizando los datos obtenidos en el anterior registro, en la figura 15B se representó la curva I-V que hace referencia a la relación de

intensidad de corriente del canal con respecto al voltaje aplicado. Los valores fueron obtenidos una vez alcanzado al estado estacionario. A continuación evaluamos la actividad de un bloqueador ampliamente estudiado como es la 4-Aminopiridina (4-AP). Para ello, se aplicó un pulso cuadrado desde -80 mV a +30 mV en ausencia (basal) y presencia de 10, 30, 100, 300 y 1000 μM del compuesto. En la figura 15C se muestra un registro representativo de la actividad bloqueadora del antagonista. El análisis de la curva dosis-respuesta obtenida para la 4-AP dio como resultado un valor de $IC_{50} = 146\mu\text{M}$ con un intervalo de confianza del 95% entre $85,53\mu\text{M}$ - $249,3\mu\text{M}$ y un factor de Hill (n_H) de -0,961 tal y como se muestra en la figura 15D. El conjunto de datos obtenidos muestra una correcta expresión de la proteína, así como unas características biofísicas adecuadas.

Puesta a punto del cultivo celular y preparación de las células

El siguiente paso hacia el uso del sistema de electrofisiología automático fue la puesta a punto de los cultivos celulares y la preparación previa a la realización de los experimentos. El uso de canales microfluidicos por parte del sistema, los cuales requieren de células bien aisladas unas de otras, ha hecho que este sea generalmente el paso crítico y que más tiempo requiera en la puesta a punto de los ensayos. De acuerdo a esto, decidimos estudiar los parámetros determinantes en el cultivo celular y el tratamiento previo al cribado para aumentar las probabilidades de éxito el experimento. Algunos de los requisitos indispensables para que las corrientes de los canales iónicos puedan ser estudiadas en esta plataforma de cribado de alto rendimiento son: el número de células, el óptimo estado de la membrana celular y tener células aisladas evitando la formación de agregados.

Una confluencia intermedia favorece el crecimiento aislado de las células

Está descrito que para el correcto funcionamiento del equipo es necesario tener un número de células comprendido entre 700.000 y 500.000. Para ello, se cultivaron en botellas (flasks) de 25, 75 y 175 cm^2 de superficie con el objetivo de optimizar su crecimiento en monocapa, de tal manera que el número de células fuese suficiente y se encontrasen lo más aisladas posibles unas de otras. En la Figura 14 se muestran distintas confluencias de la línea celular con la que se ha trabajado, HEK-hBk1, siendo 70-80% la confluencia idónea para realizar cribados de alto rendimiento con esta plataforma. Esta confluencia se obtuvo con el uso de botellas de 175cm^2 ya que fue la que mejor resultado dio como se muestra en la Tabla 5.

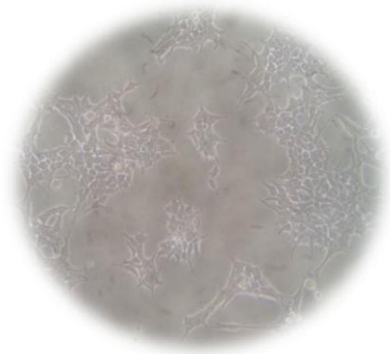
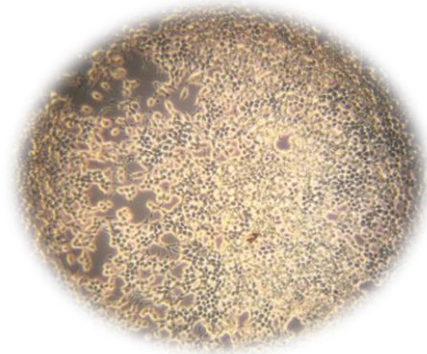
A**B**

Figura 14. Células de la línea HEK-hBk1 a diferentes confluencias. A) Células HEK al 75% de confluencia (confluencia idónea para realizar cribados con esta plataforma). **B)** Células HEK al 100% de confluencia.

El uso de Detachin conjuntamente con la disgregación mecánica disminuye el número de agregados en suspensión

El siguiente paso en la puesta a punto fue la separación de las células de la botella donde estaban creciendo. Para ello se utiliza un complejo enzimático llamado Detachin (Genlantis, USA) que rompe las interacciones entre la célula y el plástico de la botella. Es de resaltar que a diferencia de otros productos como la tripsina, el Detachin daña menos la membrana celular que debe de estar en unas condiciones optimas para medir las corrientes de los canales. Para determinar cuál era el tiempo adecuado de aplicación y como podía afectar al aislamiento de células, se estudió la formación de agregados durante 30 minutos de incubación con este compuesto a 37°C con y sin agitación mecánica mediante una cámara de Neubauer. La Figura 15A muestra como el porcentaje de células formando agregados disminuye con el tiempo de aplicación del Detachin y que además se mejora el rendimiento acompañándolo con un ligero pipeteo de la solución que contiene las células.

Como el tratamiento con este tipo de productos y el pipeteo de las células puede producir muerte celular, se estimó conveniente hacer un recuento de la viabilidad celular. Este se realizó utilizando un colorante vital, el azul de tripano (*Trypan Blue*), que penetra y tiñe las células muertas permitiendo distinguir entre las que están vivas y las que no. En la Figura 15B, observamos como la viabilidad celular no se ve afectada por la agitación mecánica tras la aplicación durante 5 minutos de Detachin, resultado que se mantiene constante tanto a los 15 min. Como a los 30 min.

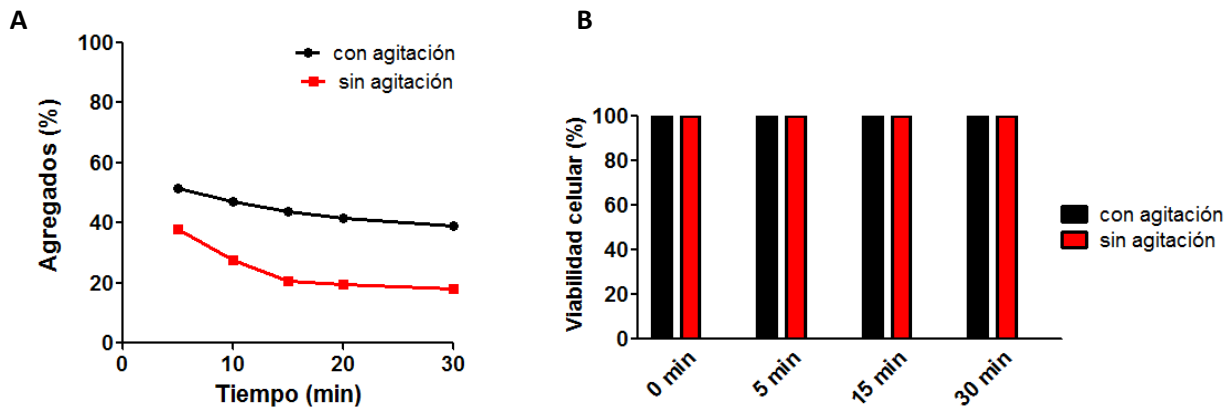


Figura 15. A) Porcentaje de células formando agregados durante la incubación con Detachin. Muestras sometidas a agitación mecánica (pipetear 5 veces) en verde y sin agitación mecánica en rojo. **B)** Porcentaje de viabilidad celular durante la incubación.

La agitación en medio CHO Serum Free ayuda a mantener las células aisladas

Se ha observado que tras el uso de productos como la tripsina o el Detachin, aunque la viabilidad no se reduzca, la membrana celular puede verse afectada. Para mejorar las propiedades físicas de estas, resuspenderse en medio CHO Serum Free puede ayudar y además contribuir a mantener separadas en suspensión a densidades muy altas. De nuevo estudiamos la formación de agregados durante los 120 minutos de incubación en agitación a temperatura ambiente. En la Figura 16A observamos las células en suspensión al inicio de la incubación. Podemos ver en la figura 16B como el porcentaje de formación de agregados se mantiene invariable a lo largo del tiempo de incubación.

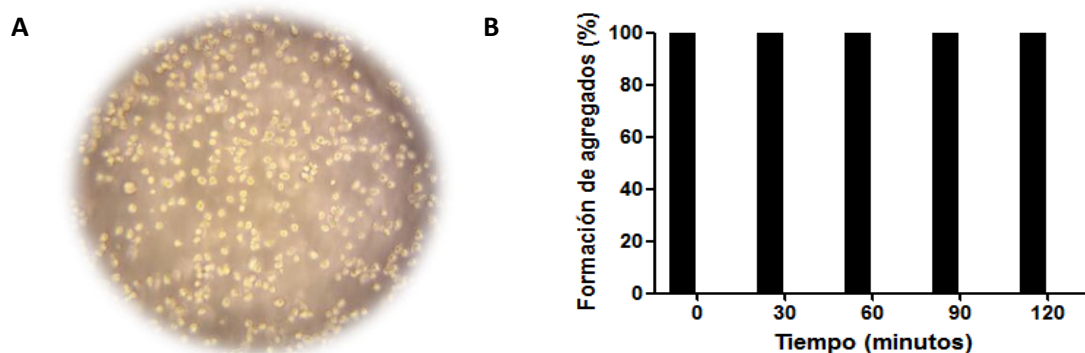


Figura 16. Células HEK-hBk1 en suspensión con medio CHO Serum Free en agitación a temperatura ambiente. A) Células observadas con microscopio óptico al inicio de la incubación. **B)** Porcentaje de células formando agregados.

Tabla resumen

En esta tabla se resumen todas las condiciones modificadas a lo largo de la puesta a punto para conseguir las condiciones óptimas que garanticen un mayor porcentaje de éxito del experimento.

Nº células	Confluencia (%)	Tamaño de la botella	Detachin (min)	Agitación mecánica	CHO Serum Free (min)	% éxito
$1,71 \cdot 10^6$	75	T-75	30	No	120	0/16
$1,27 \cdot 10^6$	70	T-75	30	No	120	0/24
$1,22 \cdot 10^6$	70	T-175	30	No	120	0/16
$1,34 \cdot 10^6$	70	T-175	30	No	150	0/16
$1,19 \cdot 10^6$	70	T-175	30	No	180	0/16
$1,66 \cdot 10^6$	75	T-175	30	No	180	0/16
$1,82 \cdot 10^6$	75	T-175	30	No	150	1/16
$1,5 \cdot 10^5$	60	T-175	30	Si	180	0/16
$1,72 \cdot 10^6$	70	T-175	30	Si	180	0/16
$7,28 \cdot 10^5$	70	T-175	45	No	150	0/16
$1,9 \cdot 10^5$	80	T-175	30	No	120	0/16
$1,72 \cdot 10^6$	80	T-175	30	Si	120	0/16
$7,28 \cdot 10^5$	80	T-175	30	No	120	1/16

Tabla 5. Resumen de las condiciones del cultivo y el tratamiento previo de las células al experimento

Puesta a punto de los cribados de alto rendimiento con el uso del sistema de electrofisiología automático IonFlux

Tras la puesta a punto del cultivo celular procedemos a realizar un estudio similar al llevado a cabo mediante electrofisiología manual para corroborar que las condiciones del cultivo determinadas son óptimas.

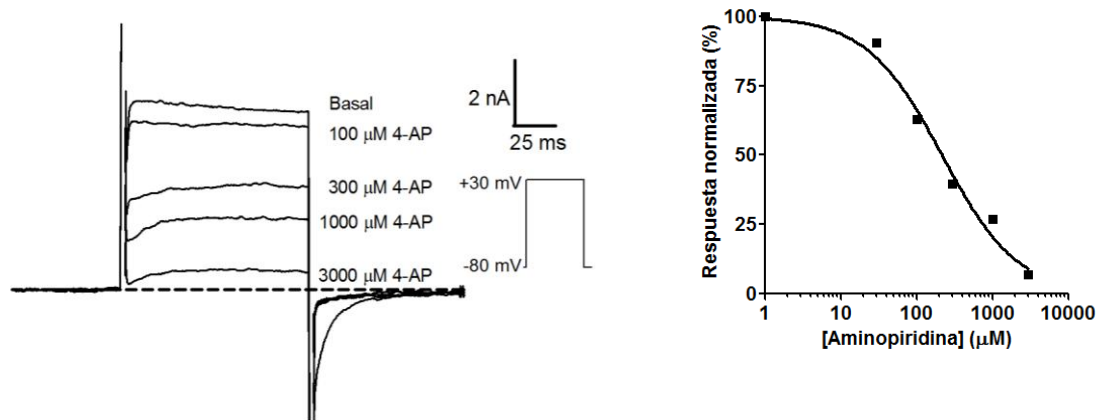


Figura 15. Caracterización electrofisiológica del canal iónico Kv1.1 mediante *patch clamp* automático con la plataforma de cribado de alto rendimiento Ion Flux. A) Efecto de la 4-Aminopiridina a 100, 300, 1000 y 3000 μM sobre Kv1.1. Se empleó un protocolo despolarizante desde -80 mV a +30 mV durante 200 ms ($V_h = -80$ mV). **B)** Curva dosis-respuesta de la actividad inhibitoria de la 4-Aminopiridina a +30 mV.

Al igual que con el *patch clamp* manual evaluamos la actividad de un bloqueador ya descrito del canal como es la 4-Aminopiridina (4-AP). Para ello, se aplicó un pulso cuadrado desde -80 mV a +30 mV en ausencia (basal) y presencia de 10, 30, 100, 300 y 1000 μM del compuesto. Los compuestos se aplicaron cada 3 segundos con un periodo de lavado del canal con tampón de 30 segundos. En la figura 15A se muestra un registro representativo de la actividad bloqueadora del antagonista, que corresponde al sumatorio de las intensidades de corriente de todas las células captadas en el pocillo. El análisis de la curva dosis-respuesta obtenida para la 4-AP dio como resultado un valor de $\text{IC}_{50} = 216,4 \mu\text{M}$ y un factor de Hill (n_H) de -0,876, tal y como se observa en la figura 15B. Los valores fueron obtenidos una vez alcanzado al estado estacionario.

Discusión

Los canales iónicos y en concreto nuestro canal de interés Kv1.1, desempeñan un papel fundamental en la regulación del sistema nervioso central y la fisiología de los nervios y los músculos. Por ello, son los objetivos principales de muchos de los nuevos medicamentos ya que están implicados en numerosas patologías como la ataxia episódica y la epilepsia en el caso de Kv1.1. El método de *patch clamp* es el sistema tradicionalmente empleado para evaluar la actividad del canal iónico *in vitro*. Cuando se implementa en forma manual tiene una baja eficiencia que resulta insuficiente para satisfacer la demanda de nuevos fármacos más efectivos [24]. Se ha avanzado mucho en las últimas décadas con la introducción de varias plataformas, y como resultado se han obtenido un mayor rendimiento, menores costes y una mayor precisión. En este trabajo se describirá el sistema de cribado automático de alto rendimiento IonFlux, basado en el sistema microfluidico que combina compuestos, células y tampones en una sola placa de 96 pocillos. Una de las ventajas principales de este equipo, es la gran capacidad que tiene para el análisis masivo de moléculas, pudiendo llegar a testar más de 600 compuestos diferentes [21].

Inicialmente se validó este sistema mediante *patch clamp* manual realizando una caracterización electrofisiológica y farmacológica con un compuesto inhibitorio del canal iónico Kv1.1 ampliamente descrito como es la 4-AP. Teniendo en cuenta los registros obtenidos se corroboró el efecto inhibitorio de este compuesto, tal y como se había probado en estudios anteriores [25]. Tanto la inhibición de las corrientes de salida del canal a diferentes concentraciones de aminopiridina (Figura 11), como el valor de $IC_{50}=146\mu M$ con un intervalo de confianza del 95% entre $85,53\mu M$ - $249,3\mu M$ y del coeficiente de Hill=-0,961 (n_N) son comparables a estudios previos de otros autores [25]. Sin embargo, no se realizaron varias medidas y no se pudo calcular el error asociado, por lo que los registros son representativos.

El siguiente paso fue la puesta a punto del cultivo celular y la preparación previa a los experimentos de cribado. Basándonos en el número de células necesarias para el correcto funcionamiento del equipo (ya descritas en el protocolo proporcionado por los fabricantes), se determinó la confluencia y el tamaño de recipiente óptimo para obtenerlas. Tal y como se muestra en la Tabla 1 los mayores porcentajes de éxito se obtuvieron con confluencias entre el 70-80% con una botella de 175 cm^2 de superficie (para cada placa). Esto es debido a que las células disponen de más espacio para crecer aisladas y el número celular óptimo se alcanza con un menor porcentaje de agregados. A continuación, se separaron las células del recipiente de crecimiento con un tratamiento enzimático y se estudió la formación de agregados en presencia o ausencia de disgregación mecánica. Como se puede observar en la Figura 12A, el número de células aisladas se incrementa con

el tratamiento mecánico y la viabilidad celular se mantiene constante (Figura 12B). A pesar de esto, este tratamiento no se puede aplicar en exceso porque es agresivo y aunque las células no mueran se merma la integridad de su membrana, requisito indispensable para esta técnica. Para contrarrestar los efectos dañinos del tratamiento enzimático se incubó en agitación con medio CHO Serum Free que contribuye también a mantener las células aisladas. Observamos en la Figura 13 cómo el porcentaje de células que se encuentra formando agregados no varía durante las 2 horas de incubación. Esto puede deberse a que las células no son capaces de establecer de nuevo conexiones con el soporte o entre ellas mismas en estas condiciones.

Por último se realizó la puesta a punto del equipo IonFlux. Para ello, se llevó a cabo un estudio similar al realizado con electrofisiología manual para corroborar que las condiciones del cultivo determinadas eran las óptimas. Estos fueron los parámetros determinantes del éxito del experimento, ya que se mantuvo el mismo protocolo de voltaje durante todo el estudio. La razón de esto es la tendencia de la línea celular HEK-hBk1 a crecer formando agregados, dificultando así la captación de las células, lo cual resulta más determinante. Basándonos en los registros obtenidos se confirmó el efecto inhibitorio de la 4-AP sobre el canal iónico Kv1.1, tal y como se había probado mediante electrofisiología manual. Tanto la curva dosis-respuesta (Figura 14) como el valor de $IC_{50}=216\mu M$ y del coeficiente de Hill $=-0,876$ (n_H) son comparables a la caracterización previa realizada (Figura 11). Cabe destacar que no se logró replicar este resultado por la falta de tiempo y la dificultad de la puesta a punto, por lo que los registros son representativos.

Se ha comprobado que los resultados obtenidos en electrofisiología automatizada son equiparables a los de la técnica tradicional manual, tal y como se había demostrado en estudios anteriores de dosis-respuesta con otros compuestos y tipos celulares [26]. Es decir, el mayor rendimiento de la técnica no compromete los resultados obtenidos [21]. Además este novedoso método presenta otra ventaja: la grabación del conjunto y no de una sola célula, lo que significa que una población de 20 células son parches en cada zona de grabación, y sus corrientes se promedian para producir un solo punto de datos. Esto produce una alta tasa de éxito y reduce al mínimo el efecto de la variabilidad de la célula [24].

En conclusión, nos hemos acercado a nuestro objetivo inicial que era la puesta a punto de la línea celular HEK-hBk1 para realizar cribados de alto rendimiento automáticos. Se han optimizado los parámetros del cultivo y del tratamiento previo al experimento en la medida de lo posible, validando los resultados con la técnica tradicional empleada, el *patch clamp* manual. Éste es el método estándar para obtener datos electrofisiológicos en el laboratorio, pero tiene un bajo rendimiento y se requieren mejoras para obtener una mayor productividad con la técnica. Dicho de otra manera, una

vez se haya alcanzado un mayor porcentaje de éxito en los experimentos se dispondrá de un novedoso método de cribado de alto rendimiento basado en electrofisiología que nos permitirá obtener registros de gran calidad en un tiempo mucho menor.



Conclusiones y perspectivas futuras

En conclusión, este trabajo final de grado aúna el uso de los canales de potasio, una emergente diana terapéutica con la puesta a punto de una de las técnicas más novedosas en el mundo de la farmacología ofreciendo como resultado unas posibles condiciones óptimas para el uso masivo de esta. Una vez obtengamos registros con un elevado porcentaje de éxito podremos analizar distintas quimiotecas con el fin de identificar compuestos moduladores del canal.

En el futuro, estos compuestos o la optimización estructural de éstos, se presentan como candidatos con los que realizar análisis posteriores que sean más exactos y específicos. Entre ellos, habría que realizar principalmente ensayos electrofisiológicos y de toxicidad con el fin de determinar su eficacia y seguridad. Las fases preclínicas y clínicas posteriores, nos aclararán si estos compuestos presentan efectos analgésicos con índices terapéuticos superiores o con menos efectos secundarios que los que hay actualmente.



Bibliografía

1. Merskey B. Classification of Chronic Pain. Descriptions os Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms. 2nd ed. Seattle; 1994:1-222.
2. Besson JM, Rivot interneuronos involved in presynaptic controls of suprasinal origin. *J Physiol.* 1973;230;235-254
3. Carr DB, Goudas LC. Acute pain *Lancet* 1999;353;2051-2058
4. Wolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: actiology, symptoms, mechanisms and management. *Lancet*; 1999;353;1959-1964
5. Besson J. The neurobiology of pain. *Lancet* 1999;353:1610-1615
6. Woolf CJ. Pain from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic managemnt. *Ann Intern Med.* 2004;140;441-51
7. Committee on Advancing Pain Research, Care, and Education; Institute of Medicine. *Relieving Pain in America.* Washington, DC, USA: National Academies Press; 2011.
8. Reid KJ, Harker J, Bala MM, et al. Epidemiology of chronic non-cancer pain in Europe: narrative review of prevalence, pain treatments and pain impact. *Curr Med Res Opin.* 2011;27(2):449–462.
9. Tsang A, Von Korff M, Lee S, et al. Common chronic pain conditions in developed and developing countries: gender and age differences and comorbidity with depression-anxiety disorders. *J Pain.*2008;9(10):883–891.
10. Leadley RM, Armstrong N, Lee YC, Allen A, Kleijnen J. Chronic diseases in the European Union: the prevalence and health cost implications of chronic pain. *J Pain Palliat Care Pharmacother.* 2012;26(4):310–325.
11. Ead H. Improving pain management for critically ill and injured patients. *Dynamics.* 2005;16(3):26–31.
12. McCarberg BH, Nicholson BD, Todd KH, Palmer T, Penles L. The impact of pain on quality of life and the unmet needs of pain management: results from pain sufferers and physicians participating in an Internet survey. *Am J Ther.* 2008;15(4):312–320.
13. Vaskar Das. An Introduction to Pain Pathways and Pain “Targets”. Behavioral and Brain Sciences, The University of Texas at Dallas, Richardson, Texas, USA.
14. Christoforos Tsantoulas and Stephen B. McMahon. Opening paths to novel analgesics: The role of potassium channels in chronic pain. Department of Pharmacology, University of Cambridge.
15. Laura Solé Codina. Role of KCNE4 on the voltaje gated potassium channel Kv1.3. Doctoral Tesis.

16. Alexander et al., 2011; Coetzee et al., 1999; Jenkinson et al., 2006; Lüscher y Slesinger 2010; Nerbonne y Kass 2005; Tamargo et al., 2004
17. Olivier Bardou , Nguyen Thu gan Trinh , Emmanuelle Brochiero. Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.
18. Coetzee et al., 1999; Rasmussen et al., 1998
19. Hoshi et al., 1991, Lopez-Barneo et al., 1993; MacKinnon and Yellen, 1990
20. Xiao Yajuan, Liang Xin, and Li Zhiyuan A Comparison of the Performance and Application Differences Between Manual and Automated Patch-Clamp Techniques.
21. C. Ian Spencer, Tanner Nevill, Nianzhen Li, Juha Kammonen, Qin Chen, Juliette Johnson, and Cristian Ionescu-Zanetti. Ion Channel Pharmacology Under Flow: Automation Via Well-Plate Microfluidics. Fluxion Biosciences, Inc., South San Francisco, California.
22. Baxter DF, Kirk M, Garcia AF, Raimondi A, Holmqvist MH, Flint KK, Bojanic D, Distefano PS, Curtis R, Xie Y. A novel membrane potential-sensitive fluorescent dye improves cell-based assays for ion channels.
23. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability.
24. Andrew P. Golden, Tanner Nevill, Nianzhen Li, Xueying Cao, Cristian Ionescu-Zanetti, Qin Chen, Juliette Johnson, Laszlo Urban, Tony Lee, Gul Erdemli, and Mats Holmqvist. IonFlux: A Microfluidic Patch Clamp System Evaluated with Human Ether-a-go-go Related Gene Channel Physiology and Pharmacology. Preclinical Safety Profiling, Center for Proteomic Chemistry, Novartis Institutes for Biomedical Research, Cambridge, Massachusetts.
25. Craig Smith, Sathapana Kongsamut, Hongge Wang. In vitro electrophysiological activity of nerispiridine, a novel 4-aminopyridine derivative. Departments of CNS Research. Drug Safety Evaluation, Sanofi-Aventis Inc., Bridgewater, New Jersey, USA
26. Qin Chen, Peter D. Yim, James M. Cook, Zhi-Jian Wang, Nina Yuan, Steve Smith, Leggy A. Arnold, Juliette Johnson, Cristian Ionescu-Zanetti, and Charles W. Emala. Comparison of Cell Expression Formats for the Characterization of GABA Channels Using a Microfluidic Patch Clamp System. Fluxion Biosciences, South San Francisco, California.