

S. 147045

INTRODUCCIÓN

A LA

FÍSICA BIOLÓGICA

2

Leopoldo García-Colín Scherer
Leonardo Dagdug
Michel Picquart
Edgar Vázquez
Coordinadores



COORDINACIÓN DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA



EL COLEGIO NACIONAL
México, 2010

QH505
I57

Introducción a la física biológica / Leopoldo García-Colín Scherer, Leonardo Dagdug, Michel Picquart, Edgar Vázquez, coordinadores -- México : El Colegio Nacional, 2010

3 v.

ISBN: 978-607-7630-77-7

I. Biofísica. I. García-Colín Scherer, Leopoldo. ed. II. Dagdug, Leonardo, ed. III. Picquart, Michel, ed. IV. Vázquez, Edgar, ed.

QH505
I5.97
V.2

W 281806

Coordinación Editorial: Rosa Campos de la Rosa

Primera edición: 2010

D. R. © 2010. EL COLEGIO NACIONAL
Luis González Obregón núm. 23, Centro Histórico
C. P. 06020, México, D. F.
Teléfonos 57 89 43 30, 57 02 18 78; Fax 57 02 17 79

ISBN: 978-607-7630-77-7

Impreso y hecho en México
Printed and made in Mexico

Correo electrónico: colnal@mail.internet.com.mx
Página: <http://www.colegionacional.org.mx>



COORDINACIÓN DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

CONTENIDO

Prólogo	ix
CAPÍTULO 10	
Motores Moleculares	
<i>José Luis Mateos</i>	373
CAPÍTULO 11	
El control del volumen: una propiedad básica de la célula	
<i>Herminia Pasantes</i>	403
CAPÍTULO 12	
Estructura y función de lípidos bioactivos	
<i>Luz M. López Marín, Ma. Teresa Peña Rangel, Juan R. Riesgo Escovar</i>	453
CAPÍTULO 13	
El origen de las biomembranas	
<i>Jaime Mas Oliva</i>	499
CAPÍTULO 14	
Difusión en sistemas biológicos	
<i>Leonardo Dagdug, Marco Vinicio Vázquez</i>	533
CAPÍTULO 15	
Estructura-función de canales de potasio y sodio activados por voltaje	
<i>Froylán Gómez-Lagunas</i>	641
CAPÍTULO 16	
Técnicas experimentales para el estudio de los canales iónicos en membranas biológicas	
<i>Rafael Godínez Fernández, Roberto Ávila Pozos</i>	683

(LFH-07/03/2015)

PRÓLOGO

Ahora que se ha empezado a estudiar con seriedad a la naturaleza nos damos cuenta de la amplitud de las preguntas, de la distancia a recoger para tratar de contestarlas. El gran peligro para la humanidad no es el desarrollo del conocimiento, es la ignorancia.

François Jacob

Probablemente la primera evidencia que se tiene de la relación entre la física y la biología inició con los experimentos del italiano Luigi Galvani cuando, en 1780, ideó y construyó una máquina electrostática formada por dos placas de metales y fluidos extraídos de una rana. Más adelante él y su ayudante Giovanni Aldini demostraron que, aplicando una pequeña corriente eléctrica a la médula espinal de una rana descerebrada, se producían contracciones musculares en los miembros de la misma. Estas descargas podían lograr que las ancas, incluso separadas del cuerpo, se contrajeran de la misma forma que cuando el animal estaba vivo. A partir de ese momento, los sistemas biológicos se han estudiado con mucho interés desde el punto de vista físico.

A mediados del siglo XIX surgieron dos grandes teorías sobre la evolución de los sistemas naturales en el tiempo. Por una parte la teoría cinética de los gases (creada por Ludwig Boltzmann) contempla una naturaleza en constante degradación hacia la muerte, en forma de desorden.

Esta visión de la evolución de los sistemas naturales, inspirada por la segunda ley de la termodinámica, contrasta considerablemente con la segunda teoría basada en el paradigma asociado con los sistemas biológicos, crecientemente complejos, especializados y organizados a lo largo del tiempo, como lo describe Charles Darwin.

Además la fenomenología de muchos sistemas naturales muestra que existen estructuras coherentes fuera del equilibrio termodinámico como las células de convección, las reacciones químicas autocatalíticas y la vida misma. Los sistemas vivos exhiben un alejamiento del desorden y en equilibrio, lo que se traduce en estructuras altamente organizadas que utilizan grandes cantidades de energía para mantenerse.

Boltzmann reconoció la contradicción aparente entre la muerte térmica del universo y la existencia de sistemas vivos que crecen, adquieren complejidad y evolucionan. Postuló que el gradiente de energía solar impulsa la vida y todos sus procesos (Boltzmann, L., *The second law of thermodynamics*, 1886, reimpresso en *Ludwig Boltzmann, theoretical physics and philosophical problems*, B. McGuinness y D. Reidel, editores, Nueva York, 1974).

Las ideas de Boltzmann y posteriormente las de Max Delbrück, fueron las principales fuentes intelectuales de motivación de *¿Qué es la vida?*, el libro de Erwin Schrödinger en el que intentó agrupar los procesos fundamentales de la biología, la física y la química. Schrödinger observó que ciertos sistemas, en particular los vivos, parecían desafiar la segunda ley de la termodinámica clásica. Sin embargo, reconoció que los sistemas vivos no son cajas cerradas adiabáticas, sino sistemas abiertos capaces de interactuar por medio de materia y energía con su entorno. También recalcó que un organismo se mantiene vivo en su estado altamente organizado a base

de importar energía externa de alta calidad y degradarla para sostener su compleja estructura y organización. Este trabajo se convirtió en uno de los libros más influyentes en la historia de la ciencia y jugó un papel primordial entre los fundadores de la biología molecular. *¿Qué es la vida?* hizo época no porque ofreciese un enfoque útil para la comprensión del fenómeno en sí, sino porque inspiró nuevas líneas de pensamiento, entre ellas la física biológica.

La creación de la biología molecular es atribuida a físicos que formaron vías experimentales radicalmente nuevas. Nació de decisiones individuales tomadas por un pequeño número de científicos entre el final de los años treinta y principios de los cincuenta del siglo XX. Los campos de trabajo de estos investigadores eran muy diversos: biología, física, medicina, microbiología, química, cristalografía, etcétera. En el centro del estudio del mundo viviente se encontraban las preguntas planteadas por la genética; podríamos decir que inventaron una nueva biología. La historia de la biología molecular puede servir de modelo para entender cómo se estructura una investigación original, independientemente de las aplicaciones eventuales que de ella se desprendan.

Primero fue Max Delbrück, físico teórico de la escuela de Gotinga quien, inspirado por el principio de complementariedad de Niels Bohr, decidió investigar los detalles moleculares de la herencia. Posteriormente Linus Pauling, físico de la escuela de Arnold Sommerfeld, persiguió una comprensión más profunda de la naturaleza de las proteínas, enfocándose en elucidar los ejecutores microscópicos de las células vivas o las moléculas del fenotipo. En este proceso descubrió elementos estructurales esenciales, tendiendo así un puente entre la química y la biología, idea que influyó en Francis Crick

y James Watson para llevarlos a descubrir la estructura de doble hélice del ADN en 1953 y, como consecuencia Crick, dedujo el modo en el que la información genética podía almacenarse y transferirse de generación en generación, enunciando el denominado "dogma central de la biología molecular": ADN \rightarrow ARN \rightarrow proteína, que hoy es incluido en los flujos de la información genética de los seres vivos.

En esa misma década Max Perutz, quien se encontraba trabajando en el Laboratorio Cavendish bajo la dirección de Lawrence Bragg aplicando la técnica de difracción de rayos X a una proteína, encontró la estructura de la hemoglobina, todo un reto experimental para la época. De esta forma y muchos años después de haber iniciado su proeza explicó por primera vez, junto con John Kendrew, el diseño detallado de una máquina biomolecular. Es importante mencionar que tanto Kendrew y Perutz como Watson y Crick recibieron el Premio Nobel en el mismo año (aunque en áreas diferentes) por dilucidar las moléculas del fenotipo y genotipo, respectivamente.

En la actualidad tenemos un amplio conocimiento del diseño molecular de las células, incluyendo los detalles de los procesos moleculares que se encuentran en la base de las funciones celulares o del metabolismo. Por una parte, tenemos idea de las repercusiones que producen tanto las perturbaciones, como las averías de tales funciones, lo que se expresa en los más diversos síndromes clínicos; y por otra, el modo en que algunos organismos como virus, bacterias, protozoarios y hongos parásitos modifican el ciclo vital de otros organismos. De hecho, hemos podido ir aún más lejos en el entendimiento de la regularización de estos procesos vitales, hasta el punto de alterar permanentemente su programa genético y construir clones, híbridos, transgénicos, etcétera.

Uno de los ejemplos más claros del éxito de la fusión entre la física y la bioquímica lo proporciona la industria farmacéutica moderna en la que se explota el conocimiento detallado de la biología molecular y de los procesos de difusión, en sistemas confinados para el diseño y liberación controlada de drogas.

En los últimos veinte años en México la física biológica ha tomado un auge de dimensiones impredecibles. Es debido al gran interés en el estudio de esta disciplina de vanguardia que se consideró necesaria la edición de un libro de texto en español. La tarea se simplificó al existir investigadores de altísimo nivel dispuestos a contribuir con su conocimiento para realizarlo. Afortunadamente estos elementos se conjuntaron adecuadamente en tiempo y forma para dar lugar a esta obra.

El contenido de los tres tomos que la comprenden pretende abarcar un amplio espectro de los temas de física biológica que se desarrollan en diversas instituciones de nuestro país. Los temas van desde la termodinámica de sistemas biológicos hasta la evolución, pasando por las máquinas moleculares, el análisis no lineal de series de tiempo, la cristalografía, el código genético, la estructura y función del ADN y de las proteínas. También se incluye información sobre las interacciones entre las biomoléculas, la difusión, etcétera. Los coordinadores estamos seguros que este texto será de gran utilidad para cualquier lector interesado en alguna de sus ramas o de la biofísica en general. Esperamos que estos tres tomos contribuyan a consolidar los cimientos del desarrollo de las biociencias en México. La variedad y profundidad de los capítulos constituyen una clara muestra del grado de experiencia de los investigadores participantes en los diversos temas y son la justificación de su publicación.

Los coordinadores y autores participantes en este proyecto agradecen profundamente a Aline y Cristina Ortiz-Herrera su ayuda en la formación, redacción, edición, dibujo y diseño, tanto del texto, como de las ilustraciones de esta obra. Asimismo expresamos nuestro agradecimiento a El Colegio Nacional por el apoyo brindado para hacer posible su publicación.

LOS COORDINADORES

México, D. E., Mayo de 2010

Capítulo 10 MOTORES MOLECULARES

JOSÉ LUIS MATEOS*
*Departamento de Sistemas Complejos
Instituto de Física, UNAM*

1. INTRODUCCIÓN

Existe actualmente un gran interés de parte de muchos físicos en estudiar diversos tipos de sistemas biológicos. Naturalmente, el estudio de estos sistemas representa un enorme reto, ya que se trata de los sistemas más complejos que puede uno encontrar en la naturaleza. Esta reciente incursión de los físicos en el estudio de los sistemas biológicos complejos involucra muchas facetas (como se puede apreciar en este libro) que incluyen temas como la termodinámica fuera de equilibrio, el origen de la vida, el ADN, las proteínas, la morfogénesis, el cerebro y las redes complejas.

En este capítulo empezaré con una descripción del llamado movimiento browniano y la difusión, para después introducir modelos de motores brownianos y, finalmente, discutir los motores moleculares que encontramos a nivel celular.

* mateos@fisica.unam.mx

2. MOVIMIENTO BROWNIANO Y DIFUSIÓN

Probablemente la primera descripción cualitativamente correcta del movimiento browniano la podemos encontrar en el poema *De Rerum Natura* (Sobre la naturaleza de las cosas) del filósofo y poeta romano Titus Lucretius Carus alrededor del año 60 a.C. Ahí podemos encontrar un pasaje en el cual se describe, con asombroso detalle para la época, cómo una partícula de polvo realiza un movimiento azaroso y sin cesar debido a las colisiones de los átomos en el aire. Mucho tiempo después, en 1785, el fisiólogo holandés Jan Ingen-Housz observó el movimiento irregular de partículas de carbón en la superficie de alcohol con ayuda de un microscopio. Pero no es hasta 1827 cuando el célebre botánico escocés Robert Brown lleva a cabo un estudio sistemático del ahora llamado movimiento browniano. Brown estaba intrigado por el movimiento azaroso y permanente que encontró al observar diminutos granos de polen con ayuda del microscopio. Inicialmente atribuyó este movimiento al hecho de que se trataba de partículas vivas, sin embargo, más adelante, experimentó con otros materiales, como vidrio finamente molido, ceniza volcánica, meteoritos e inclusive con trozos muy finos de piedra extraída de la esfinge egipcia. En todos los casos encontró un movimiento errático e incesante y concluyó, correctamente, que se trataba de un fenómeno estrictamente físico.

La primera persona en dar una descripción matemática del movimiento browniano fue el matemático danés Thorvald N. Thiele en 1880. Un poco después, en forma independiente, uno de los pioneros de las matemáticas financieras, el francés Louis Bachelier, presentó, como parte de su tesis doctoral de 1900 *La teoría de la especulación*, un análisis estocástico de las fluctuaciones en la bolsa de

valores de París. Sin embargo, la primera explicación teórica, desde el punto de vista físico, del movimiento browniano la dio Albert Einstein en 1905 y simultáneamente el físico polaco Marian Smoluchowski. El trabajo de Einstein es extremadamente importante ya que puso fin a una disputa entre los físicos de la época sobre la existencia real de los átomos. Einstein describió el fenómeno como un proceso estocástico inducido por el incesante bombardeo de los átomos o moléculas sobre una partícula mesoscópica, es decir una partícula muy pequeña para ser vista sin ayuda de un microscopio, pero mucho mayor que las moléculas que componen el fluido en donde está inmersa.

En la figura 1 se ilustra un ejemplo de la dinámica de una partícula browniana en dos dimensiones. Se trata en realidad no de una trayectoria continua sino de un proceso estocástico en el cual se determina la posición de la partícula en diferentes intervalos de tiempo y posteriormente se unen los puntos con líneas rectas continuas.

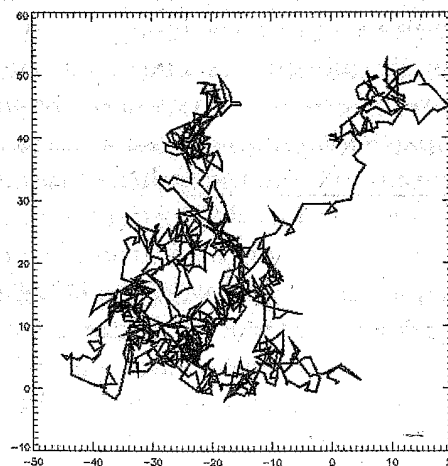


Figura 1. Dinámica típica de una partícula browniana en dos dimensiones.

Esto implica que si entre dos puntos unidos por una recta tomamos un intervalo de tiempo menor para ubicar la posición de la partícula, obtendríamos ahora no una recta sino una trayectoria browniana a otra escala. Esto quiere decir que el movimiento browniano describe un objeto fractal en donde al cambiar la escala se reproduce (estadísticamente) al objeto completo.

En la descripción de Einstein de 1905 se deriva la llamada ecuación de difusión, que describe la manera en que un conjunto de partículas brownianas se difunden en un fluido debido a las fluctuaciones inducidas por las colisiones moleculares en el mismo. Imaginemos, por ejemplo, una gota de tinta en un vaso de agua. Inicialmente todas las partículas se encuentran concentradas en una pequeña región en la superficie, pero al paso del tiempo la gota se va difundiendo en el agua, es decir, algunas partículas permanecen en la vecindad de la región inicial, pero otras se van alejando gradualmente. Después de mucho tiempo, la tinta, que inicialmente se encontraba localizada en una región pequeña, ahora ocupa la totalidad del volumen en el vaso de agua.

La ecuación de difusión es una ecuación diferencial parcial que al resolverla me indica la probabilidad de encontrar a una partícula en una posición dada en un cierto instante de tiempo, o bien, me indica la variación temporal y espacial del número de partículas por unidad de volumen. En esta ecuación se introduce el coeficiente de difusión D , que está relacionado con la temperatura del fluido por la relación $D = kT/m\gamma$, donde m es la masa de la partícula, T es la temperatura, k es la constante de Boltzmann y γ es el coeficiente de fricción efectivo del fluido. Esta ecuación relaciona las fluctuaciones térmicas con la disipación en el fluido y es el primer ejemplo de lo que se conoce como una relación de fluctuación-disipación.

Para el caso de una partícula esférica de radio en un fluido a temperatura y con viscosidad, la relación se puede escribir como $D = RT/6\pi\eta aN$, donde R es la constante de los gases y N el número de Avogadro. Ésta es la célebre relación de Stokes-Einstein. Conocemos la constante de los gases y el radio de la partícula y, además, podemos medir la temperatura y la viscosidad del fluido. Si pudiéramos determinar el coeficiente de difusión D , podríamos entonces calcular el número de Avogadro N . Ésta es precisamente la propuesta en el artículo original de Einstein de 1905. El coeficiente de difusión se puede determinar a partir de otro resultado central en el mismo artículo de Einstein, el cual establece que, asintóticamente, el desplazamiento cuadrático medio es proporcional al tiempo y la constante de proporcionalidad es igual al doble del coeficiente de difusión, esto es, $\langle x^2 \rangle = 2Dt$. Einstein concluye su artículo, que llegó a la revista *Annalen der Physik* el 11 de mayo de 1905, diciendo que sería deseable que algún investigador midiera el coeficiente de difusión usando este resultado. Esto es precisamente lo que hizo el gran físico francés Jean Perrin unos años después, obteniendo el coeficiente de difusión y, siguiendo la sugerencia de Einstein, obtuvo un valor muy preciso para el número de Avogadro. Éste es un resultado sorprendente: prepare un conjunto de esferitas flotando en agua, use un microscopio y su reloj, y encuentra el número de moléculas en un mol [1].

Una descripción más simple del movimiento browniano la dio el físico francés Paul Langevin en 1908 usando la segunda ley de Newton para una partícula en un fluido. La llamada ecuación de Langevin [2], en una dimensión es

$$m\ddot{x} = -m\gamma\dot{x} + m\gamma\sqrt{2D}\xi(t),$$

en donde m es la masa de la partícula browniana, x es su posición (los puntos indican derivadas respecto al tiempo), γ es el coeficiente de fricción y D es el coeficiente de difusión. Esta ecuación nos dice que la masa multiplicada por la aceleración es igual a la fuerza ejercida sobre la partícula debido a la presencia del medio fluido. Esta fuerza se separa en dos contribuciones: la primera es una fuerza de fricción efectiva y proporcional a la velocidad; la segunda toma en cuenta las fluctuaciones térmicas del fluido y se modela con un proceso estocástico (ruido térmico) dado por $\xi(t)$. Usualmente se modela este ruido térmico como un proceso gaussiano no correlacionado (ruido blanco) de promedio nulo y varianza finita proporcional a D . Se le conoce como ruido blanco ya que su espectro contiene todas las frecuencias. En la figura 2 se ilustra un ejemplo de ruido blanco gaussiano como función del tiempo.

Más adelante generalizaremos de varias formas la ecuación de Langevin para modelar a los motores moleculares, llamados también motores brownianos.

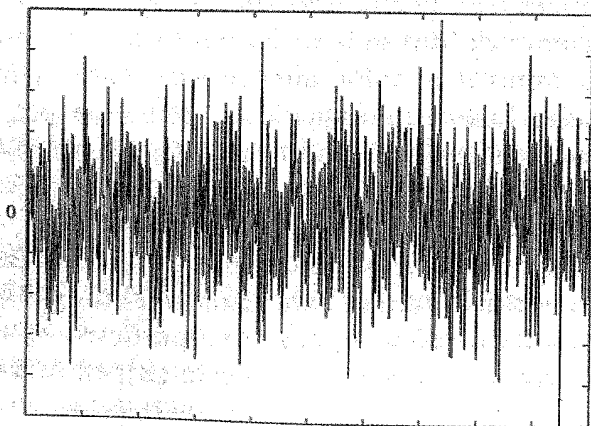


Figura 2. Una realización de ruido blanco gaussiano como función del tiempo.

La ecuación de Langevin es una ecuación diferencial estocástica y, por lo tanto, no podemos obtener una solución $x(t)$ en forma determinista, sino únicamente cantidades estadísticas, como el promedio o la varianza de la posición o su correlación a diferentes tiempos. En particular se obtiene que la distancia promedio que recorre una partícula browniana, sujeta a un ruido blanco gaussiano, es cero; es decir, $\langle x(t) \rangle = 0$. Aquí, los paréntesis cuadrados indican un promedio sobre un conjunto de partículas (promedio de ensemble). Esto indica que aun cuando existen multitud de fuerzas actuando sobre la partícula browniana, el resultado neto es que el transporte de partículas es nulo. Es decir, la partícula se mueve a la derecha, luego a la izquierda y así continuamente en forma estocástica, dando como resultado un desplazamiento total nulo. La velocidad, o bien la corriente de partículas, definida asintóticamente como $v = \langle x(t) \rangle / t$ es cero. Sin embargo, a pesar de que la corriente es nula, un conjunto de partículas se difunde, como en el ejemplo de la gota de tinta en un vaso de agua que discutimos con anterioridad. Esta difusión está caracterizada por la varianza σ^2 del proceso. En este caso, asintóticamente tenemos que $\langle \sigma^2 \rangle = 2Dt$, es decir, la anchura de la distribución gaussiana aumenta linealmente con el tiempo, pero permanece centrada en el origen. Por lo tanto, podemos tener difusión pero la corriente de partículas es cero.

Obviamente podemos obtener una corriente diferente de cero si aplicamos una fuerza constante en una dirección, lo cual introduce un término de arrastre en la ecuación de difusión. La pregunta fundamental es: ¿podemos tener una corriente diferente de cero, aun cuando el promedio de las fuerzas que actúan es cero?

3. MOTORES BROWNIANOS

Retomemos la pregunta anterior. Podemos formularla de la siguiente manera: ¿es posible generar una corriente de partículas diferente de cero en un sistema en equilibrio termodinámico con fluctuaciones de promedio cero? La respuesta es **no**, ya que estaríamos violando la segunda ley de la termodinámica al estar obteniendo una máquina de movimiento perpetuo del segundo tipo, es decir, estaríamos generando trabajo a partir de fluctuaciones en equilibrio.

Sin embargo, si el sistema se encuentra fuera de equilibrio, ciertamente podemos obtener, en forma no trivial, transporte de partículas, aun cuando el promedio de todas las fuerzas que actúan sobre ellas sea cero. Al estar fuera de equilibrio ya no estaríamos violando la segunda ley de la termodinámica, sin embargo necesitamos un ingrediente adicional: romper alguna simetría en el sistema.

Podríamos romper la simetría ante inversiones en el tiempo, por ejemplo, con ayuda de un término de disipación que tiene como resultado que la ecuación de movimiento del sistema sea diferente ante inversiones temporales, es decir, al invertir el sentido del tiempo. Otro ejemplo, que es más relevante para las aplicaciones a motores moleculares, y que describiremos con más detalle, consiste en romper la simetría espacial.

Imaginemos que queremos construir un dispositivo para generar trabajo a partir de las fluctuaciones térmicas en el aire. Tal dispositivo podría ser el que se ilustra en la figura 3. Este mecanismo fue introducido por el gran físico americano Richard Feynman [3] y se le conoce como *Feynman ratchet*. Tenemos dos cajas llenas de aire a la misma temperatura, es decir, las dos temperaturas que se ilustran en la figura son iguales: $T_1 = T_2$. En esta circuns-

tancia nos encontramos en equilibrio térmico, por ejemplo, podríamos pensar que todo el dispositivo, incluyendo ambas cajas, se encuentra en contacto con un baño térmico a temperatura constante. Veamos si podemos generar trabajo usando las fluctuaciones térmicas en estas condiciones. En una de las cajas colocamos unas aspas y en la otra caja una rueda dentada asimétrica, y las conectamos con una barra que permite que el sistema acoplado de las aspas y la rueda dentada pueda girar libremente en ambos sentidos. La caja con la rueda dentada tiene además un dispositivo con un resorte para detener el giro de la rueda. Los dientes en la rueda dentada son asimétricos ya que las pendientes en cada lado del diente son diferentes. Esto hace que la rueda dentada sea asimétrica y, por lo tanto, es más fácil hacerla girar en un sentido que en el sentido opuesto. Lo mismo ocurre en una matraca o en un mecanismo de relojería antigua.

Claramente, este dispositivo no puede girar por sí mismo usando las fluctuaciones térmicas en el aire dentro de las cajas, ya que se trata de un objeto macroscópico y por lo tanto los choques moleculares no perturban en absoluto al sistema aspas-rueda. Sin embargo, podríamos ir reduciendo el tamaño de este ingenioso aparato hasta

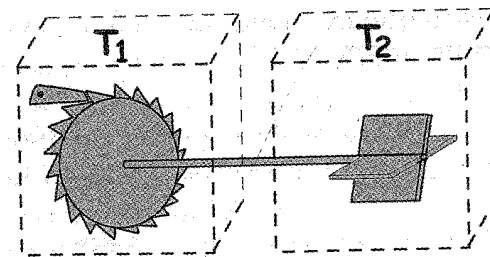


Figura 3. Dispositivo, ideado por Feynman, para generar trabajo usando fluctuaciones térmicas. El sistema tiene que estar fuera de equilibrio, es decir, la temperatura en las dos cajas tiene que ser diferente.

una escala mesoscópica y entrar así al régimen browniano. En este caso el dispositivo sería del tamaño de una partícula browniana, con dimensiones del orden de micrones. En estas condiciones, las pequeñas aspas sentirían los choques moleculares individuales y harían que las aspas, junto con la rueda dentada, giraran en un sentido y en otro en forma azarosa. Pero, ya que la rueda gira más fácilmente en un sentido que en el sentido opuesto, este dispositivo podría girar en un sentido dado y podría usarse para levantar un diminuto objeto en contra de la fuerza de gravedad, haciendo entonces trabajo. El argumento resulta convincente, sin embargo, si se pudiera hacer esto, estaríamos violando la segunda ley de la termodinámica y habríamos construido una máquina de movimiento perpetuo, o lo que se conoce como un demonio de Maxwell (ese mítico demonio microscópico que puede rectificar fluctuaciones moleculares). Sería grandioso, ya que resolveríamos todos los problemas energéticos de la humanidad y podríamos mover todo tipo de objetos usando simplemente aire o agua a temperatura ambiente.

Ya que esto no es posible, debe haber alguna falacia en el argumento. Efectivamente, como lo aclara el propio Feynman, un análisis más detallado del dispositivo de la figura 3 muestra que el objeto que detiene la rueda dentada también fluctuaría, al igual que las aspas, permitiendo que la rueda gire en ambos sentidos con la misma probabilidad. El resultado neto es que no podemos generar en forma sistemática trabajo o movimiento unidireccional. Esto muestra que nuestro intento de construir una máquina de movimiento perpetuo es fallido, como era de esperarse.

Sin embargo, si el sistema está fuera de equilibrio podríamos reconsiderar la utilidad del dispositivo de

Feynman. Por ejemplo, si la temperatura en cada una de las dos cajas es ahora diferente, $T_1 < T_2$, puedo mantener al sistema fuera de equilibrio, y en este caso puedo lograr que las aspas fluctúen más que la rueda dentada, dando como resultado un giro sistemático en un sentido y generar así trabajo. Ya que el sistema está fuera de equilibrio no estaríamos violando la segunda ley de la termodinámica. Resumiendo, hemos logrado generar transporte (no trivial) a partir de fluctuaciones térmicas de promedio cero en un sistema fuera de equilibrio.

El mecanismo de Feynman, ilustrado en la figura 3, es en realidad bastante complicado. Sin embargo, podemos pensar en modelos simplificados de dicho sistema que contengan los ingredientes esenciales: fluctuaciones térmicas, asimetría, no-equilibrio y fuerzas de promedio cero. Estos sistemas se pueden modelar usando la ecuación de Langevin, que describimos anteriormente, para el caso de una partícula en una dimensión, sujeta a fluctuaciones térmicas (modeladas con un ruido blanco gaussiano), en presencia de fuerzas externas de promedio cero y sujeta a una fuerza derivada de un potencial periódico y asimétrico. La ecuación correspondiente es:

$$m\ddot{x} = -m\gamma\dot{x} - \partial_x V(x) + F(t) + m\gamma\sqrt{2D}\xi(t),$$

donde $V(x)$ es un potencial periódico, de periodo L y asimétrico, es decir, $V(x) = V(-x)$ y $V(x) = V(x + L)$. Esta función se conoce como potencial tipo ratchet. El lado derecho de esta ecuación involucra cuatro fuerzas: la disipación, la fuerza debida al potencial ratchet $\partial_x V(x)$, dada por la derivada espacial del potencial, una fuerza externa no térmica de promedio temporal cero $F(t)$ y una fuerza que toma en cuenta las fluctuaciones térmicas, dada por un ruido blanco gaussiano de promedio cero $m\gamma\sqrt{2D}\xi(t)$.

Esta última fuerza es la misma que analizamos con anterioridad en la discusión del movimiento browniano. Lo que modela entonces esta ecuación es una partícula browniana en un potencial periódico y sujeta a una fuerza externa que lleva al sistema fuera del equilibrio. En ausencia de la fuerza $F(t)$ tendríamos una partícula browniana en un potencial periódico en equilibrio y, por lo tanto, la corriente de partículas sería cero. Sin embargo, la presencia de esta fuerza hace que ahora estemos fuera del equilibrio y podemos tener una corriente finita de partículas, a pesar de que se trata de una fuerza de promedio temporal cero.

Esta fuerza puede ser simplemente una fuerza armónica, como $F(t) = A \sin(\omega t)$, que obviamente es de promedio temporal cero. El efecto de esta fuerza es inclinar el potencial ratchet periódico con una pendiente que varía

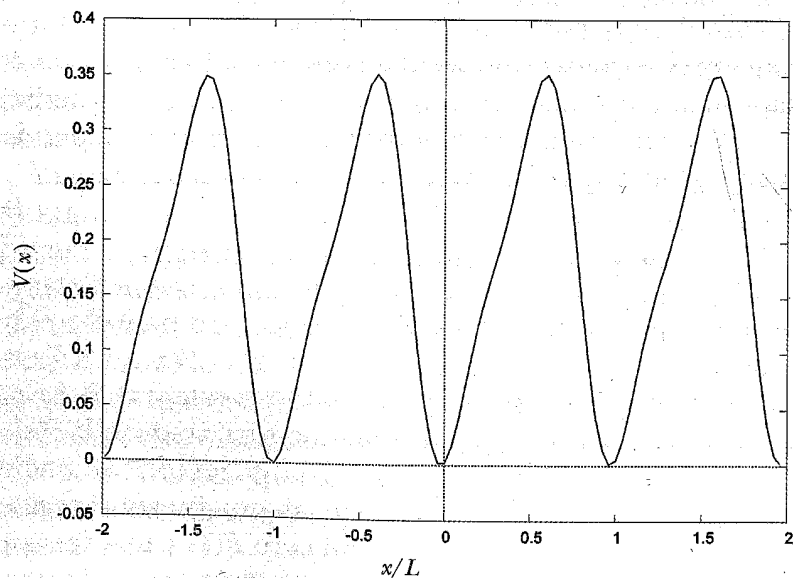


Figura 4. Potencial periódico asimétrico para el modelo de un motor browniano.

en el tiempo, algo así como un sube y baja. En la figura 4 se ilustra un ejemplo de un potencial periódico asimétrico, tipo *ratchet* [4].

La dinámica de un conjunto de partículas en este potencial ratchet oscilante es tal que, a pesar de que las fuerzas que actúan son de promedio cero, se puede generar una corriente positiva de partículas. Esto ocurre ya que, cuando el potencial está inclinado a la derecha, la pendiente en el potencial deja de tener un mínimo y el flujo de partículas hacia la derecha es permitido; sin embargo, cuando el mismo potencial se inclina hacia la izquierda, persiste un mínimo en el potencial ya que la pendiente izquierda de éste es mayor. Como resultado se tiene una rectificación del movimiento en cada oscilación y se genera así una corriente de partículas hacia la derecha. Por otro lado, el efecto del ruido térmico puede ayudar a superar las barreras de potencial incrementando aún más la corriente.

El estudio de estos modelos, llamados ratchets o motores brownianos, ha despertado un enorme interés recientemente y ha dado lugar a una enorme diversidad de variantes, así como aplicaciones a diferentes campos de la física. Actualmente existen muchos modelos de motores moleculares o brownianos: una partícula en potenciales en una o más dimensiones, con diferentes tipos de fuerzas externas (deterministas o estocásticas); sistemas con diferentes tipos de ruido térmico (blanco o correlacionado); sistemas con muchas partículas acopladas; partículas con inercia o en el régimen sobre amortiguado; partículas en el régimen cuántico, etc. Además de estos modelos ha surgido toda una serie de experimentos en el laboratorio que le han dado un gran impulso a este campo. Dependiendo del tipo de sistemas, los motores brownianos se estudian con experimentos en microfluídica, arreglos

de uniones Josephson, medios granulares, proteínas motoras, pinzas ópticas y otros campos. Por lo tanto se trata de un campo muy activo y altamente interdisciplinario, que recientemente ha dado lugar a una gran cantidad de artículos en la literatura, así como artículos de revisión [5-7].

En la siguiente sección estudiaremos los motores moleculares en biología y estableceremos la conexión entre estos motores biológicos y los motores brownianos.

4. MOTORES MOLECULARES

Recientemente hemos sido testigos de un gran avance en el estudio de las llamadas proteínas motoras, o motores moleculares. Estos motores son proteínas que transportan diversas sustancias y vesículas dentro de las células eucariontes y que llevan a cabo muchos tipos de funciones en el organismo. Como ejemplos de proteínas motoras podemos citar a un tipo de miosinas, que son responsables del movimiento de los músculos, o a las cinesinas, que se encargan de transportar sustancias dentro de las células y que se desplazan a lo largo del citoesqueleto [8]. Un motor molecular que ha despertado el interés de algunos físicos es un tipo de cinesina que tiene una estructura con dos porciones, que simula una especie de caminante a escala de nanómetros, y que alterna las dos porciones dando como resultado una caminata a lo largo de los microtúbulos que forman parte del citoesqueleto. La cinesina utiliza como fuente de energía la hidrólisis de ATP y, como todo sistema biológico, se encuentra fuera del equilibrio termodinámico. Aun cuando el estudio de los motores moleculares ha tenido un avance sorprendente, no es claro el mecanismo mediante el cual la cine-

sina logra moverse preferentemente en una dirección, ya que las fuerzas que actúan sobre la proteína no tienen una dirección particular, sino que se trata de fuerzas fluctuantes de promedio cero. Es por esta razón que los físicos están interesados en este tipo de proteínas.

Los motores moleculares representan un desafío para la física, ya que se mueven en forma unidireccional a pesar de estar sujetos a fuerzas de promedio cero. Con la finalidad de entender estos motores moleculares, los físicos han estado estudiando modelos de motores brownianos, como los descritos anteriormente, los cuales tienen características comunes: generan transporte en presencia de fuerzas de promedio cero y en presencia de fluctuaciones térmicas.

En el interior de las células eucariontes, es decir, células más evolucionadas que las bacterias, tenemos un núcleo celular y una red de filamentos formada por polímeros que asemejan una red de avenidas dentro de una ciudad. Esta red, llamada el citoesqueleto, está compuesta por tres tipos de filamentos: filamentos de actina, con un diámetro del orden de 6 nm, formados por agregación de una proteína llamada actina y que transportan proteínas motoras como las miosinas; filamentos intermedios con diámetros alrededor de 10 nm, y por microtúbulos que transportan otro tipo de proteínas motoras como las cinesinas [8]. Los microtúbulos tienen un diámetro del orden de 20 nm y están formados por proteínas llamadas tubulinas. Los filamentos de actina y los microtúbulos, a pesar de tener diámetros del orden de decenas de nanómetros, pueden crecer a longitudes del orden de decenas de micrones, es decir tres órdenes de magnitud más largos que anchos y por lo tanto se trata de estructuras esencialmente unidimensionales. En la figura 5 se muestran los filamentos de actina y los micro-

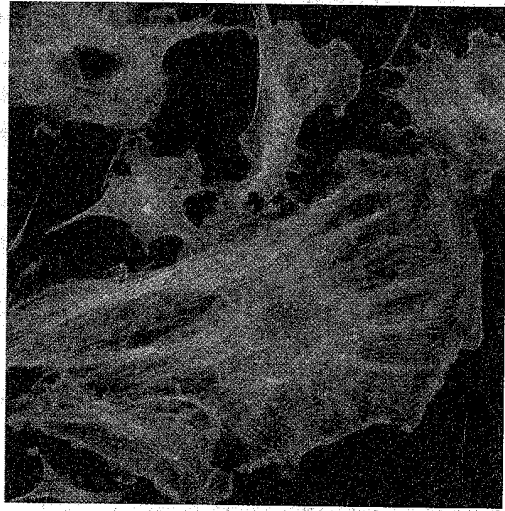


Figura 5. El citoesqueleto en una célula eucarionte. Los filamentos de actina se muestran en rojo, los microtúbulos en verde y el núcleo en azul.

túbulos en el interior de la célula. En lo que sigue me concentraré en una descripción más detallada de los microtúbulos y de las proteínas motoras llamadas cinesinas que se transportan sobre éstos.

Los microtúbulos están formados por dímeros compuestos por α -tubulinas y β -tubulinas que se agregan formando una estructura helicoidal, como se aprecia en la figura 6. Debido a la asimetría de los dímeros, los microtúbulos son estructuras polares, periódicas y asimétricas con una periodicidad del orden de 8 nm. El diámetro interno es de 18 nm y el externo de 25 nm. La longitud puede variar considerablemente y varía en el tiempo debido a procesos de agregación de los dímeros de tubulina que lo componen. Es decir, al agregarse dímeros en un extremo la longitud del microtúbulo aumenta, y naturalmente disminuye su longitud durante el proceso de desagregación. Su longitud puede ser del orden de micrones

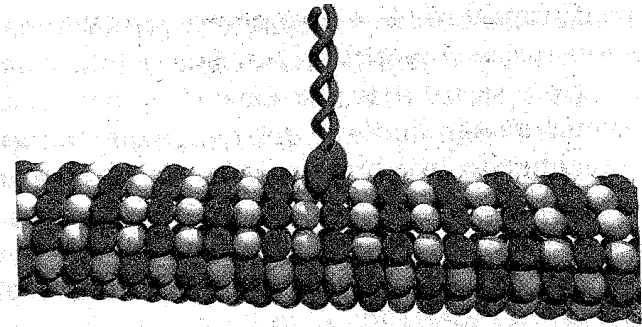


Figura 6. Dibujo esquemático de un microtúbulo formado por agregación de dímeros de α -tubulina (rojo) y β -tubulina (blanco). Desplazándose vemos un dibujo de una cinesina con sus dos porciones (pies).

para el caso de microtúbulos involucrados en la división celular, o del orden de 100 micrones en los axones de las neuronas, y hasta 1 mm en los microtúbulos en la cola de los espermatozoides [8].

A lo largo de los microtúbulos se mueve un tipo de proteínas motoras llamadas cinesinas, como la que se ilustra en la figura 6. Existen varios tipos de cinesinas pero la más común tiene una estructura que asemeja a un caminante a escala de nanómetros. Consiste en dos porciones que se alternan dando lugar a una caminata a lo largo del microtúbulo, de la misma manera que un caminante alterna sus pies al caminar. Estas cinesinas tienen velocidades típicas del orden de 1800 nm/s *in vivo* y de 840 nm/s *in vitro* [8], aunque estos valores pueden variar dependiendo de la temperatura y de la concentración de ATP. Los pasos son de 8 nm y por lo tanto una cinesina convencional *in vivo* realiza cientos de pasos por segundo. Las cinesinas tienen como función, por ejemplo, el transporte axonal a lo largo del axón de las neuronas, el transporte de vesículas y mitocondrias dentro de la célula, y la meiosis y mitosis durante la división celular. En algunos casos,

como en el transporte de mitocondrias, para llevar a cabo su función varias cinesinas tienen que actuar colectivamente, ya que se trata de proteínas muy pequeñas (de unas decenas de nanómetros) que tienen que transportar estructuras mucho más grandes como las mitocondrias. La energía que usan las cinesinas, al igual que el resto de las proteínas motoras se obtiene a partir del ATP. Actualmente se sabe que una cinesina consume una molécula de ATP por cada paso de 8 nm y que ejercen fuerzas del orden de piconewtons [9], las cuales se miden con una gran precisión usando pinzas ópticas. En la figura 7 se muestra esquemáticamente el dispositivo experimental usado por Steven Block en la Universidad de Stanford, que permite medir desplazamientos, velocidades y fuerzas. Se fija al microtúbulo y se sujeta con pinzas ópticas de luz laser a una esfera de vidrio que, a su vez, está conectada a la cinesina. La proteína motora cinesina (gris) está sujeta a una esfera de vidrio (azul) y se mueve

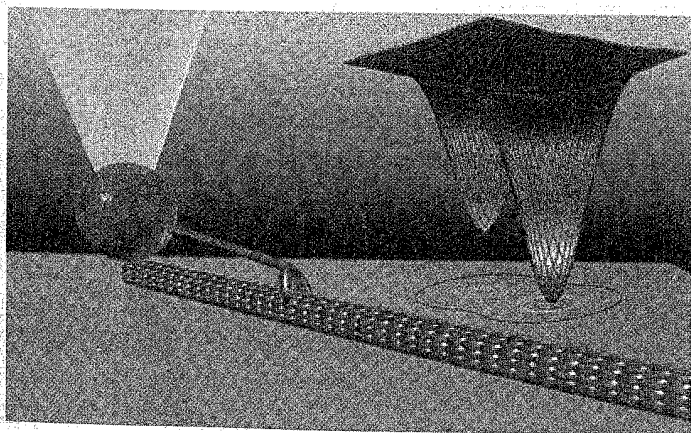


Figura. 7. Dibujo esquemático del experimento de Steven Block para medir la dinámica de la cinesina con ayuda de una trampa óptica. Adaptada de <http://www.stanford.edu/group/blocklab/kinesin.html>

a lo largo del microtúbulo (rojo). Usando una trampa óptica (rosa) es posible medir la fuerza que ejerce la cinesina. A la derecha se ilustran las barreras de energía que tiene que vencer la cinesina para completar un solo paso. La cinesina, en forma natural tiende a desplazarse a lo largo del microtúbulo, pero al estar sujeta por la trampa óptica no puede moverse, sin embargo continúa ejerciendo una fuerza que puede medirse usando el desplazamiento de la esfera de vidrio a partir del centro de la trampa óptica, ya que dicha trampa sujeta a la esfera como si fuera un resorte lineal. De esta forma se determina que la fuerza que ejerce la cinesina es 6.5 piconewtons [9].

Gracias a los resultados que se han obtenido recientemente con experimentos muy finos, actualmente sabemos muchos detalles de la caminata de la cinesina. Particularmente difícil ha sido determinar con precisión qué tipo de caminata realiza esta proteína. La razón es que sus dimensiones son muy pequeñas, del orden de 70 nm y da pasos de 8 nm; por lo tanto es muy complicado tener la resolución experimental para determinar qué tipo de caminata está llevando a cabo. Básicamente existen dos tipos de caminata: *pies alternantes*, en donde los dos pies se alternan, como en la caminata normal de los humanos, y *tipo gusano*, en donde los pies se juntan y se separan, pero nunca se alterna el orden. En los experimentos con trampas ópticas, se mide el desplazamiento del centro de masa de la esfera de vidrio ligada a la cinesina; esta esfera tiene dimensiones del orden de micrones y la resolución es muy buena. Pero la cinesina, con pasos en la escala de nanómetros es muy difícil de resolver, sin embargo, recientemente, se ha determinado que el tipo de caminata es con pies alternantes. Cabe mencionar que existen otras proteínas motoras, que también tienen dos

“pies” y que caminan sobre filamentos de actina alternando los pies: estas son la miosina V y la miosina VI.

5. MODELO DE CINESINA USANDO MOTORES BROWNIANOS

En esta sección discutiremos un modelo inspirado en el transporte de la cinesina sobre microtúbulos, que toma en cuenta los dos tipos de caminata: pies alternantes y tipo gusano. Algunos otros autores también han propuesto modelos de cinesina, pero no consideran el caso en el cual los pies de la cinesina pueden alternarse. El modelo propuesto puede servir también para modelar otras proteínas motoras con dos pies, como la miosina V y miosina VI.

El modelo consiste en dos partículas, que simulan los dos pies de la cinesina, acopladas a través de un potencial no lineal biestable y sujetas a fluctuaciones estocásticas estadísticamente independientes, que simulan las fluctuaciones térmicas. Estas fluctuaciones simulan el hecho de que la cinesina se encuentra en un medio a temperatura finita en el interior de la célula. El sistema de dos partículas acopladas está sujeto a una fuerza externa dada por un potencial periódico asimétrico en una dimensión (potencial ratchet) que simula al microtúbulo, el cual es periódico, asimétrico y esencialmente unidimensional, como se puede ver en la figura 6. Adicionalmente, introducimos fuerzas externas dependientes del tiempo a fin de tener al sistema fuera de equilibrio termodinámico, que simulan el arribo de ATP a la cinesina para proporcionarle energía [10-14].

La dinámica del caminante estará dada por dos ecuaciones estocásticas de Langevin acopladas, como las que describimos anteriormente, pero en el régimen sobre-

amortiguado, ya que en el caso de la cinesina los términos inerciales son despreciables [8]. Las ecuaciones son:

$$m\gamma \dot{x} = -\partial_x V(x) - \partial_x V_b(x-y) + m\gamma\sqrt{2D}\xi_1(t) + \eta(t)$$

y

$$m\gamma \dot{y} = -\partial_y V(y) - \partial_y V_b(x-y) + m\gamma\sqrt{2D}\xi_2(t) + \eta(t)$$

donde x, y representan las posiciones de las dos partículas, los puntos representan derivadas con respecto al tiempo, m es la masa de cada partícula, γ es el coeficiente de fricción, $V(x)$ es el potencial ratchet, y $V_b(x-y)$ es el potencial de acoplamiento entre las dos partículas. Las derivadas de estos potenciales dan las fuerzas debidas al ratchet y al acoplamiento, respectivamente. El parámetro D es el coeficiente de difusión, $\xi_1(t)$ y $\xi_2(t)$ son términos de ruido blanco gaussiano, estadísticamente independientes, que actúan sobre cada partícula y que simulan las fluctuaciones térmicas. Finalmente, $\eta(t)$ representa a la fuerza externa dependiente del tiempo que actúa sobre ambas partículas.

El potencial ratchet está dado por

$$V(x) = V_1 - V_R \left[\sin\left(\frac{2\pi(x-x_0)}{L}\right) - \frac{1}{4} \sin\left(\frac{4\pi(x-x_0)}{L}\right) \right]$$

en donde L es el período del potencial, y las demás constantes V_1, V_R y x_0 son tales que los mínimos del potencial están centrados en los valores enteros de x/L [4]. Este potencial se ilustra en la figura 4.

El potencial que acopla a las dos partículas se puede escribir como

$$V_b(x-y) = V_b - V_b \left[\frac{(x-y)^4}{l^4} - 2 \frac{(x-y)^2}{l^2} \right]$$

El parámetro V_b es la amplitud del potencial biestable y representa la intensidad del acoplamiento entre las dos partículas, y $2l$ es la distancia entre los dos mínimos del potencial.

En la figura 8, se ilustra esquemáticamente el modelo. Tenemos dos partículas, indicadas en verde y rojo, que corresponden a los dos pies de la cinesina. El acoplamiento entre las partículas está dado por una fuerza (resorte) no lineal de tipo cúbico, cuyo potencial biestable se ilustra a la derecha de la figura. En ausencia del potencial ratchet, este caminante tiene dos configuracio-

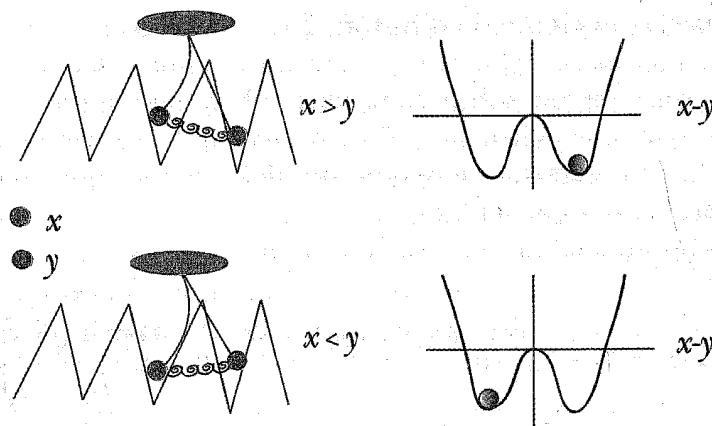


Figura. 8. Dibujo esquemático del modelo de la cinesina. Las dos partículas (verde y roja) están acopladas con un resorte no lineal cuya fuerza se obtiene a partir del potencial biestable indicado a la derecha. La configuración de arriba, en donde la partícula verde está delante de la roja corresponde a una configuración de equilibrio en el mínimo de la derecha en el potencial. La otra configuración de equilibrio se indica abajo y corresponde a la situación en donde la partícula roja está delante de la verde.

nes de equilibrio: en la primera configuración la partícula verde está delante de la roja, como se ilustra en la parte superior de la figura, y corresponde al mínimo de la derecha en el potencial biestable; en la segunda configuración, la partícula roja está delante de la verde y corresponde al mínimo izquierdo del potencial.

Si ahora ponemos a este caminante sobre el potencial ratchet, entonces puede surgir una tercera configuración de equilibrio en la cual las dos partículas están juntas. Esto se debe a que el potencial ratchet tiende a juntar a ambas en los mínimos. Si no existe ninguna otra fuerza, el caminante simplemente reposará en alguna de estas tres configuraciones.

Ya que la cinesina se encuentra a temperatura ambiente, existen fuerzas térmicas fluctuantes que inducen un movimiento browniano sobre ésta. Este ruido térmico, que normalmente es despreciable a escala macroscópica, se vuelve muy importante a la escala de nanómetros, que es la escala de la cinesina y de todas las proteínas motoras. No sólo es importante, sino que en muchos casos es indispensable para generar movimiento. Es por esta razón que a estas proteínas se pueden modelar con ayuda de los motores brownianos.

Pongamos ahora al caminante de nuestro modelo en contacto con las fuerzas fluctuantes que dan lugar asociadas al ruido térmico, además de la fuerza del ratchet. En este caso, el caminante empezará a moverse en forma errática alrededor de uno de los mínimos del ratchet. Si incrementamos la intensidad del ruido térmico, podrá inclusive superar los máximos de potencial en el ratchet y pasar al siguiente mínimo. De esta forma tendremos a un caminante haciendo una caminata errática sobre el ratchet, pero que en promedio no llega a ningún lado, es decir, a veces camina hacia la derecha y luego hacia la

izquierda, en una caminata aleatoria. Al brincar de un sitio al otro, el caminante inclusive puede alternar el orden de sus pies, es decir, la partícula verde delante de la roja o viceversa. En este caso, que corresponde a una situación de equilibrio termodinámico, la velocidad promedio del caminante será cero, a pesar de estar sujeto a fuerzas externas. Así, el problema se reduce a dos partículas brownianas acopladas en presencia de un potencial periódico asimétrico y, como sabemos, la velocidad promedio o corriente es estrictamente cero ya que se trata de un sistema en equilibrio.

Finalmente, aplicamos al caminante adicionalmente una fuerza externa dependiente del tiempo $\eta(t)$ como se indica en las ecuaciones de Langevin. Esta fuerza hace que el sistema se encuentre ahora fuera de equilibrio y se pueda generar una corriente. La fuerza $\eta(t)$ puede ser periódica y determinista o bien puede ser una fuerza aleatoria. En el caso de los ratchets lo que interesa es aplicar fuerzas dependientes del tiempo de promedio temporal cero y generar, aun en este caso, una corriente. Por lo tanto, el efecto ratchet es un efecto no trivial ya que se logra generar una corriente a partir de fuerzas de promedio nulo, rompiendo alguna simetría del sistema. En este caso la simetría rota es la simetría de reflexión en el ratchet, es decir $V(x) \neq V(-x)$.

En la figura 9, se ilustra una trayectoria típica para el modelo de cinesina propuesto. La trayectoria verde corresponde a la partícula verde y la trayectoria roja para la partícula del mismo color. Se puede apreciar que el caminante avanza en pasos discretos dados por los mínimos en el potencial ratchet. Las fluctuaciones se deben a la presencia de ruido térmico. Se puede apreciar que en algunos casos el orden de las partículas se alterna, lo cual corresponde a un caminante (cinesina) dando un paso.

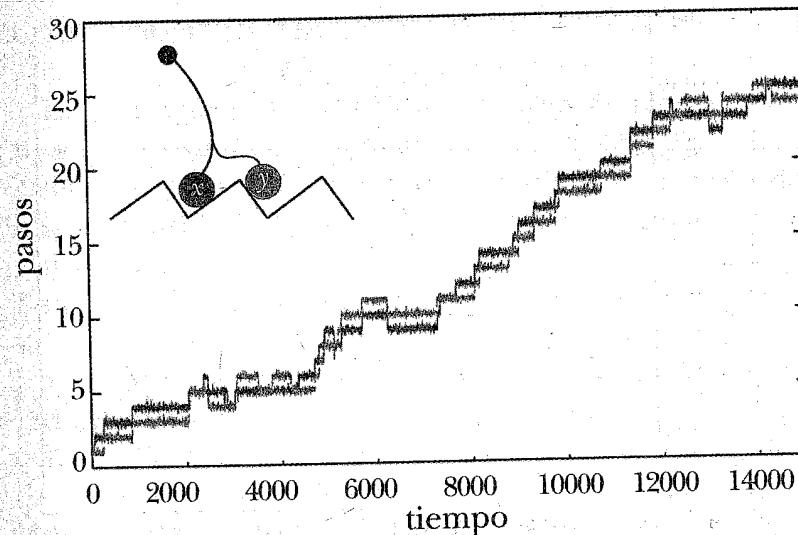


Figura 9. Trayectoria típica para el caminante browniano en un ratchet en presencia de una fuerza externa periódica. El centro de masa avanza en pasos discretos dados por la periodicidad del potencial ratchet con ayuda del ruido térmico, y en algunos casos el orden de las partículas se alterna.

En este sistema, tenemos tres escalas de energía: la barrera de potencial del ratchet, la barrera del potencial biestable y la energía térmica. Dependiendo de cuál de estas tres energías domina tendremos diferentes tipos de caminata. Por ejemplo, cuando la barrera del potencial biestable es mucho mayor que las otras dos, entonces será muy difícil dar un paso, ya que este paso del caminante corresponde a pasar de un mínimo al otro en el potencial biestable. Por el contrario, si esta barrera es muy pequeña, entonces será más fácil dar pasos alternando los pies. Como mencionamos anteriormente, en el caso de la cinesina se pueden presentar dos tipos de caminata: pies alternantes y tipo gusano. En este modelo podemos obtener ambas, dependiendo de los parámetros que se escojan.

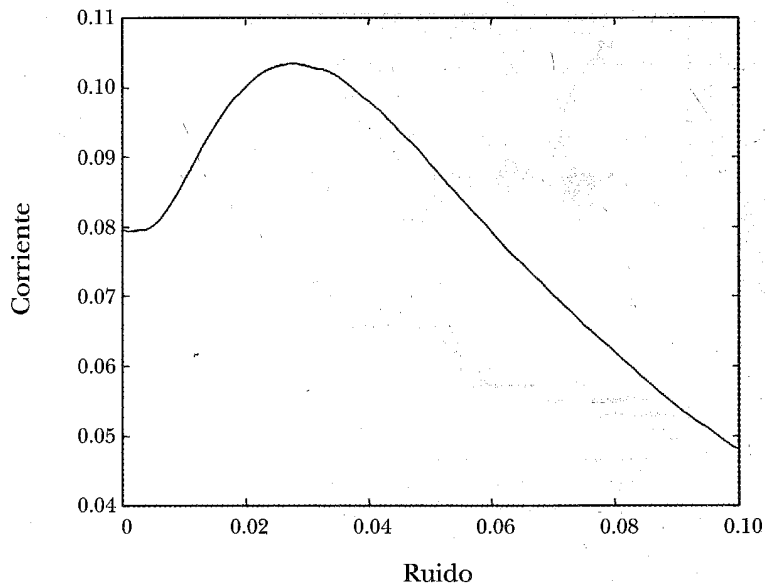


Figura 10. La corriente del caminante como función de la intensidad del ruido térmico.

La cantidad más importante a calcular es la corriente o velocidad promedio del caminante. Se resuelven numéricamente las ecuaciones de Langevin y se calcula esta cantidad como función de los diferentes parámetros del modelo. Para el caso de una fuerza externa periódica, en la figura 10 mostramos la corriente como función del ruido térmico. Se puede observar que aun sin ruido tenemos una corriente finita, sin embargo, al aumentar la intensidad del ruido la corriente crece hasta llegar a un máximo para un ruido óptimo. Si aumentamos aún más el ruido, la corriente comienza a disminuir. Es decir, el ruido en este sistema no lineal ayuda a la generación de una corriente. Por esta razón, al efecto ratchet también se le conoce como transporte inducido por ruido.

6. REFLEXIONES FINALES

En este trabajo hemos abordado uno de tantos ejemplos que existen en la actualidad acerca de la fructífera interacción entre la física y la biología. Un ejemplo de esto es la física de las proteínas motoras, las cuales realizan un número enorme de funciones en el organismo. En particular nos centramos en la descripción de la cinesina, que es una proteína motora que se transporta dentro de las células, usando como medio de transporte la red de microtúbulos que forman parte del citoesqueleto celular. Realizan funciones vitales como el transporte de vesículas en los axones de las neuronas, la separación de los cromosomas durante la división celular y la movilidad de las colas de los espermatozoides, por mencionar algunos. Estas cinesinas son motores a una escala de nanómetros que utilizan como combustible la energía almacenada en la molécula ATP. Con tamaños del orden de decenas de nanómetros, tienen una estructura que asemeja a un caminante con dos pies, los cuales se alternan con pasos de 8 nm sobre los microtúbulos, dando cientos de pasos por segundo en condiciones normales. Éste es un ejemplo claro de que la naturaleza se nos ha adelantado muchos millones de años en el desarrollo de la nanotecnología. Lo que nos queda por hacer es tratar de imitar estos nanomotores y, para ello, necesitamos primero entender la física detrás de estas proteínas. Debido a su reducida escala, las fluctuaciones térmicas juegan un papel central, y para entender la eficiencia de estos motores necesitamos revisar nuestros conceptos de termodinámica, diseñados para explicar motores a una escala macroscópica, y que no se aplican necesariamente a la escala de nanómetros.

En los inicios de este siglo XXI estamos presenciando por primera vez que las barreras existentes entre las disciplinas científicas se están desdibujando. En particular están surgiendo en forma natural colaboraciones muy importantes entre físicos y biólogos con el ánimo de complementar sus áreas de experiencia para atacar algunos de los problemas más complejos que existen. Estoy pensando en problemas como la genómica y la proteómica, en donde además del detalle a nivel de biología molecular y celular, es necesario entender lingüística, teoría de la información, redes complejas, etcétera. Aquí es en donde los físicos pueden trabajar de la mano con sus colegas de las ciencias de la vida. Otro ejemplo es precisamente la física de las proteínas motoras, en donde existen experimentos muy detallados que comienzan a revelar las propiedades físicas de esta nanotecnología natural.

Uno de los sistemas complejos por excelencia es el cerebro humano y aún estamos lejos de entenderlo. Recientemente muchos físicos se han aventurado en el estudio de las neurociencias, desde la física de los canales iónicos en la sinapsis o la propagación de señales en neuronas individuales, hasta el enorme reto de entender las redes neuronales y su sincronización. En otra escala tenemos problemas como la ecología de poblaciones que requieren de una gran sofisticación matemática para dar una descripción más adecuada de estos sistemas complejos. En todos estos ejemplos, los físicos dedicados a la física estadística, la dinámica no lineal y la teoría del caos tienen mucho que decir. Desde mi punto de vista el escenario es alentador, ya que, por primera ocasión, pienso que los físicos ya nos estamos dando cuenta de que para contribuir realmente en la solución de estos grandes problemas tenemos no sólo que aplicar lo que sabemos sino que necesitamos sentarnos con nuestros colegas los biólogos y aprender su lenguaje.

REFERENCIAS

1. A. Pais, 'Subtle is the Lord'... *The science and life of Albert Einstein*, Oxford University Press, Oxford (1982).
2. D. S. Lemons, *An Introduction to stochastic processes in physics*, The John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland (2002).
3. R. Feynman, R. Leighton, M. Sands, *The Feynman lectures on physics*, vol. 1, capítulo 46, Addison-Wesley (1963).
4. J. L. Mateos, *Phys. Rev. Lett.* **84**, 258 (2000).
5. R. D. Astumian, P. Hänggi, *Physics Today* **55**, núm. 11, 33 (2002).
6. P. Reimann, *Phys. Rep.* **361**, 57 (2002).
7. P. Hänggi, F. Marchesoni, F. Nori, *Ann. Physik (Leipzig)* **14**, 51 (2005).
8. J. Howard, *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*, Sinauer Associated, Inc., Sunderland, Massachusetts (2001).
9. K. Visscher, M. J. Schnitzer, S. M. Block, *Nature* **400**, 184 (1999).
10. J. L. Mateos, La física de los motores moleculares, en *La física biológica en México: Temas selectos*, L. García-Colín, L. Dagdug, P. Miramontes, A. Rojo, Coordinadores., El Colegio Nacional, México D. F. (2006).
11. J. L. Mateos, A. Neiman, F. Moss, en *Unsolved Problems of Noise and Fluctuations UPON 2002*, S. M. Bezrukov, Editor, *AIP Conference Proceedings* **665**, 569 (2003).
12. J. L. Mateos, A. Neiman, F. Moss, J. A. Freund, L. Schimansky-Geier, I. M. Sokolov, en *Noise in Complex Systems and Stochastic Dynamics*, L. Schimansky-Geier, D. Abbot, A. Neiman, C. Van den Broeck, editores, *Proc. of SPIE* **5114**, 20 (2003).
13. J. L. Mateos, *Fluct. Noise Lett.* **4**, L161 (2004).
14. J. L. Mateos, *Physica A* **351**, 79 (2005).

CAPÍTULO 11
EL CONTROL DEL VOLUMEN:
UNA PROPIEDAD BÁSICA DE LA CÉLULA

HERMINIA PASANTES*
División de Neurociencias,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

1. INTRODUCCIÓN

Un hecho muy temprano y crucial en la evolución de la vida se dio cuando un conjunto de moléculas no difusibles se rodeó de una bicapa lipídica semipermeable, estableciendo así un ambiente discreto y separado del entorno. Este avance espectacular tuvo que acompañarse del desarrollo de mecanismos tendientes a contrarrestar la diferencia en la presión osmótica generada en esa circunstancia. Otro paso gigantesco en la evolución se dio cuando se crearon los mecanismos necesarios para mantener un sistema de osmolaridad extracelular estable, independiente del entorno marino. El éxito de este desarrollo evolutivo permitió a las especies la conquista del medio terrestre. Así, los diversos sistemas renales aseguran fluctuaciones mínimas en los líquidos corporales de los animales terrestres, a través de mecanismos coordinados con secreción hormonal, funcionamiento cardíaco y transmisión neuronal. En este capítulo, dirigido a los aspectos biofísicos del control del volumen celular, no se

* hpasante@ifc.unam.mx

detalla la función renal, para la cual se refiere al lector a las secciones correspondientes en textos de fisiología. A pesar del estricto papel regulador de los sistemas renales, es muy interesante el hecho de que la gran mayoría de las células animales conservaron como rasgo fundamental a través de la evolución, la capacidad de responder a los cambios en volumen mediante mecanismos adaptativos que les permiten recuperar su volumen original. La persistencia de esta función reguladora del volumen, desde organismos primitivos hasta las células más complejas y especializadas del hombre, indica la importancia homeostática de mantener un volumen constante. Los mecanismos de regulación del volumen son en general, similares en las células que no están normalmente expuestas a un desequilibrio osmótico y en las de aquellas especies que normalmente experimentan cambios en la osmolaridad externa, como son los animales eurihalinos, o en células de tejidos en los que los cambios en la osmolaridad externa son inherentes a su función, como es el caso de las células del túbulo colector renal o del intestino. Se trata, entonces, de una función bien preservada a través de todas las ramas filogenéticas en la evolución.

Si bien la constancia en el volumen total de una célula es la condición fisiológica, no se excluye el que ocurran variaciones microscópicas en el volumen, a causa de la generación de gradientes osmóticos, locales y transitorios, restringidos a microrregiones celulares. Estos cambios, si bien pequeños, pueden alterar la citoarquitectura y dificultar el perfecto ensamble de moléculas que constituyen cadenas de señalización, de importancia clave para la función celular. Igualmente, los microcambios de volumen pueden causar una variación en los niveles de moléculas solubles que participan como señales, por lo que deben ser corregidos. Las funciones normales de la célula generan

estos gradientes en múltiples situaciones, entre las cuales se citan la entrada de nutrimentos y la salida de productos de desecho. Otros procesos metabólicos como la síntesis o degradación de macromoléculas o funciones celulares como la proliferación, la migración, la secreción, generan también desequilibrios osmóticos a nivel microscópico. Los gradientes iónicos y el transporte de neurotransmisores que ocurren durante la función sináptica son también ejemplo de situaciones fisiológicas que originan cambios locales en la osmolaridad de microambientes intracelulares.

2. PRESIÓN OSMÓTICA Y FLUJOS DE AGUA

Las células animales tienen una proporción muy alta de agua, por lo que su volumen está directamente relacionado con los movimientos de agua que ocurren a través de la membrana celular. La membrana de las células animales está constituida por una proporción muy elevada (50%) de lípidos, principalmente de tres tipos: los fosfolípidos o fosfoglicéridos, que son los que están presentes en mayor cantidad, los glucolípidos y los esteroides como el colesterol. Los fosfolípidos y los glucolípidos son moléculas anfipáticas, lo que significa que tienen un extremo polar, soluble en agua y un segmento hidrofóbico, insoluble en agua. La organización de la membrana es la de una bicapa, con los extremos polares, o "cabezas" de los fosfolípidos, orientados hacia las fases acuosas del medio extracelular y del citoplasma y los segmentos hidrofóbicos alineados en el interior de la bicapa (figura 1). Los segmentos hidrofóbicos o "colas" de los fosfolípidos mantienen su alineación y la estructura de la bicapa

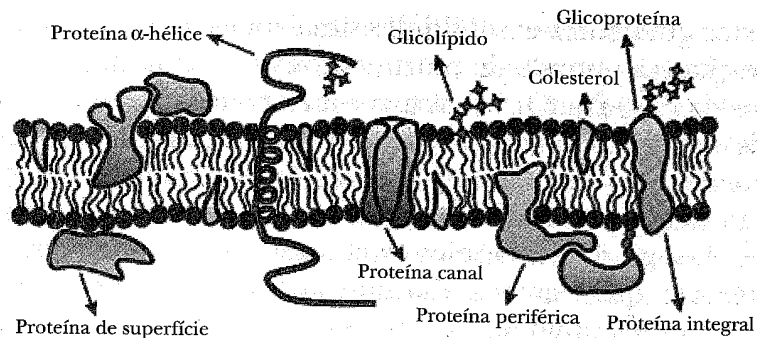


Figura 1. Esquema de la estructura básica de la membrana en las células animales.

mediante fuerzas de van der Waals. Los esteroides tienen una estructura distinta, ya que su extremo polar es muy pequeño, por lo que son extremadamente hidrofóbicos. Los esteroides se insertan entre los segmentos hidrofóbicos de los fosfolípidos, incrementando así el ambiente hidrofóbico de la bicapa. La bicapa lipídica de la membrana es un sistema dinámico, en el que los lípidos se mueven lateralmente y rotan sobre su eje vertical, confiriendo a la bicapa un cierto grado de fluidez. El grado de fluidez de la membrana va a depender de su composición, en particular de la proporción en la que se encuentren los esteroides. La membrana será más fluida en tanto contenga niveles más bajos de colesterol, ya que esta molécula se inserta entre los segmentos hidrofóbicos de los componentes lipídicos de la membrana, restringiendo sus movimientos. La bicapa lipídica es asimétrica mostrando diferencias en la distribución de los fosfolípidos y los glucolípidos en la monocapa externa y en la monocapa interna. Hay variaciones también entre los distintos tipos celulares.

Insertas en la bicapa lipídica, la membrana celular contiene un gran número de moléculas proteicas de distinto

tipo, a través de las cuales se establece un intercambio muy activo entre el medio extracelular y el interior de la célula (figura 1). La bicapa lipídica funciona esencialmente como armazón, barrera y sostén de las proteínas membranales, que son las que establecen la comunicación de la célula con el medio externo. Las proteínas son igualmente moléculas anfipáticas, con regiones hidrofílicas que se conectan con los medios acuosos extracelular e intracelular, y una región hidrofóbica, mediante la cual establecen contactos mediante uniones covalentes, con la región hidrofóbica de la bicapa lipídica, lo que permite su inserción en la membrana. Algunas proteínas atraviesan por completo la bicapa lipídica y otras la penetran sólo parcialmente (figura 1).

2.1. Flujos de agua

Las membranas de las células animales son en general, muy permeables al agua. Los flujos de agua a través de la membrana celular ocurren en parte por el proceso conocido como difusión simple. El paso del agua a través de la sección hidrofóbica de la membrana restringe su difusión, pero su movilidad se puede acelerar enormemente cuando intervienen proteínas membranales que forman canales específicos, a través de los cuales el agua pasa con muy pocas restricciones. Estas moléculas son las acuaporinas, de las que se tratará más adelante.

El movimiento del agua a través de la bicapa lipídica ocurre mediante el fenómeno conocido como difusión simple o pasiva. Este proceso es a través del cual las moléculas se mueven de una región de alta concentración a una de baja concentración. En la difusión simple no hay cambio en energía libre, ya que ocurre en forma espontánea mediante la energía cinética de las

concentrada, a una de mayor concentración, corresponde a la presión osmótica.

El comportamiento termodinámico de las moléculas de agua en solución es similar al de las moléculas de los gases. La ecuación que define el comportamiento de éstos es la ecuación de van't Hoff:

$$PV = nRT$$

en donde: P = presión, n = equivalentes molares del soluto, V = volumen en L, T = temperatura absoluta y R = constante de los gases

En el caso de la presión osmótica, P se reemplaza por π y la ecuación de van't Hoff se expresa como:

$$\pi = n/V RT$$

y como n/V es igual a la concentración molar del soluto c , se tiene que

$$\pi = c RT$$

es decir, la presión osmótica está en función de la concentración de la solución.

En relación con la concentración de las soluciones y la presión osmótica hay que hacer las siguientes consideraciones. La presión osmótica es una de las propiedades coligativas de las soluciones* y básicamente depende del número de partículas por unidad de volumen y no de la masa de las partículas. Esto se debe a que cada partícula ejerce, independientemente de su masa, la misma cantidad de presión. Esta característica determina que la concentración de partículas osmóticamente activas,

*Las propiedades coligativas de una solución son aquellas determinadas por un número de partículas de un soluto, sin importar su naturaleza química. Estas propiedades incluyen el punto de congelación, el punto de ebullición, la presión de vapor y la presión osmótica.

denominadas osmolitos, se defina como osmolar y no simplemente como molar. Una solución molar es la que contiene el peso molecular en gramos por litro de agua, en cambio, una solución osmolar toma en cuenta el número de partículas en las que puede disociarse una molécula, ya que cada una de ellas va a ejercer presión por sí misma. Un osmol entonces, corresponde al peso molecular expresado en gramos (mol) de un soluto (osmolito) no disociado, como la glucosa. Si el soluto se disocia en dos iones o en tres iones, como el caso del NaCl o el CaCl₂, un mol corresponde a 2 o a 3 osmolos, porque el número de partículas disociadas, osmóticamente activas es dos o tres veces mayor que en el caso del soluto no disociado.

En consecuencia, para el cálculo de la presión osmótica hay que introducir otro elemento: i , que es el número de iones disociables en la solución. Esto es válido para soluciones diluidas como las que se consideran idealmente en la ecuación de van't Hoff, pero en casos de soluciones más concentradas, como son las presentes en condiciones fisiológicas, tiene que considerarse además, un factor de desviación del comportamiento ideal conocido como coeficiente osmótico Φ . El valor del coeficiente osmótico Φ para los algunos iones y moléculas de interés fisiológico se muestra en la tabla 1.

Considerando el número de iones disociables en la solución y el coeficiente osmótico, es posible corregir el valor de la presión osmótica, tanto en función del número de partículas disociables como de las interacciones soluto-soluto, soluto-solvente y solvente-solvente.

Consecuentemente, la presión osmótica de una solución se puede redefinir por una adecuación de la ecuación de van't Hoff:

$$\pi = RT(\Phi ic)$$

Tabla 1

VALOR DEL COEFICIENTE OSMÓTICO Φ DE ALGUNOS SOLUTOS DE INTERÉS FISIOLÓGICO

Molécula	i	Peso molecular	Φ
NaCl	2	58.5	0.93
KCl	2	74.6	0.92
NaHCO ₃	2	84.0	0.96
KH ₂ PO ₄	2	136.0	0.87
CaCl ₂	3	111.0	0.86
MgCl ₂	3	95.2	0.89
MgSO ₄	2	120.0	0.58
Glucosa	1	180.0	1.01
Sacarosa	1	342.0	1.02
Maltosa	1	342.0	1.01
Lactosa	1	342.0	1.01

en donde: π = presión osmótica, R = constante de los gases, T = temperatura en grados absolutos, Φ = coeficiente osmótico, i = número de iones dissociables en la solución y c = concentración molar de la solución en molas/litro.

El término Φ indica la concentración osmótica efectiva de una solución. Esta corrección es necesaria en el caso de los solutos ionizables de importancia fisiológica tales como el NaCl y el KCl, cuyas concentraciones cercanas a 150 mM hacen que la presión osmótica efectiva que ejercen estas soluciones sea menor (0.93 y 0.92, respectivamente) del ideal de 1, establecido por la ecuación de van't Hoff. Para los solutos orgánicos con frecuencia el valor es mayor a 1, por ejemplo para la glucosa es de 1.02 y para las soluciones proteicas esta desviación es mucho mayor (tabla 1).

2.3. Flujo osmótico

Como se indicó al inicio de esta sección, el desplazamiento del agua entre dos compartimientos separados por una membrana semipermeable (permeable al agua más no a los solutos) depende del gradiente de potencial químico del agua, que es inversamente proporcional a la concentración de solutos y está en función de la presión osmótica. El flujo osmótico del agua se define por la ecuación:

$$J = L(\Delta P - \Delta \pi)$$

en donde: J = flujo osmótico, L = conductividad hidráulica de la membrana expresada en $\text{cm}^{-1}/\text{s}/\text{atm}^{-1}$, ΔP = diferencia en la presión hidrostática y $\Delta \pi$ = diferencia en la presión osmótica a cada lado de la membrana.

Esta ecuación es válida para una membrana permeable solamente al agua, pero debe modificarse incorporando el término correspondiente a la permeabilidad de los solutos, llamado coeficiente de reflexión σ con lo que la entrada neta de agua a través de una membrana permeable al agua y con permeabilidad limitada a diferentes solutos queda definida como sigue:

$$J = \sigma L(\Delta \pi)$$

El coeficiente de reflexión σ es igual a 1 cuando la membrana es totalmente impermeable a un soluto y 0 cuando es totalmente permeable. Las membranas biológicas en general, tienen una permeabilidad muy alta al agua, y la conductividad hidráulica de las membranas celulares no es notablemente distinta, por lo que en la mayor parte de las células se considera que el flujo de agua osmótica está definido de manera directa por la diferencia de presión osmótica, con lo que el agua se

desplazará del compartimiento con menor concentración de solutos hacia el de mayor concentración de solutos.

Considerando el modelo de dos compartimientos (figura 3), una solución isosmótica es aquella que tiene la misma osmolaridad en dos compartimientos separados por una membrana semipermeable. Una solución hiposmótica es la que tiene menor concentración de solutos en uno de los dos compartimientos y una solución hiperosmótica es la que tiene una mayor concentración de solutos. Estas diferencias determinarán la dirección del flujo osmótico de agua, que ocurrirá hasta que se haya alcanzado el equilibrio osmótico en los dos compartimientos. Esta consideración es válida para el caso de que uno de los dos compartimientos sea el interior de una célula, es decir, el compartimiento en el que están disueltas las moléculas osmóticamente activas. Sin embargo, existen

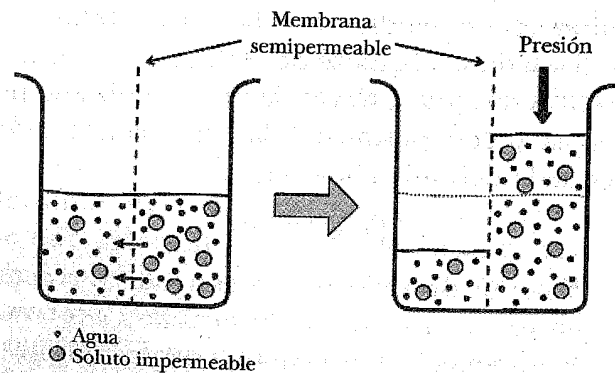


Figura 3. Esquema del fenómeno osmótico que ocurre entre dos compartimientos separados por una membrana permeable al agua pero impermeable a los solutos. El agua se desplazará siguiendo su gradiente de potencial químico, cuyo valor es inversamente proporcional a la concentración de solutos. La presión que debe ejercerse para detener este flujo de agua corresponde a la presión osmótica.

diferencias muy importantes entre las células animales en cuanto a la osmolaridad de los compartimientos intracelulares y extracelulares. La osmolaridad del compartimiento intracelular, o citoplasma, puede ser radicalmente distinta según el entorno en el que se encuentre la célula. Estas diferencias son muy claras entre las especies marinas y las terrestres. En las especies marinas, los fluidos extracelulares tienen una composición que se parece mucho a la del agua de mar (figura 4) y por ello, en el interior de sus células y tejidos tuvo que llevarse a cabo una adaptación en la composición de osmolitos para mantener la misma osmolaridad que la del compartimiento extracelular. Esto se consiguió básicamente acumulando en la célula una gran cantidad de osmolitos orgánicos, tales como urea, creatinina, aminoácidos, fosforilcolina y otras moléculas que no existen en los fluidos extracelulares (figura 4), con lo que se pudo alcanzar una osmolaridad cercana a la del agua de mar, es decir, alrededor de 1000 mosmol/litro. En las especies terrestres, independientes ya del entorno marino en virtud del

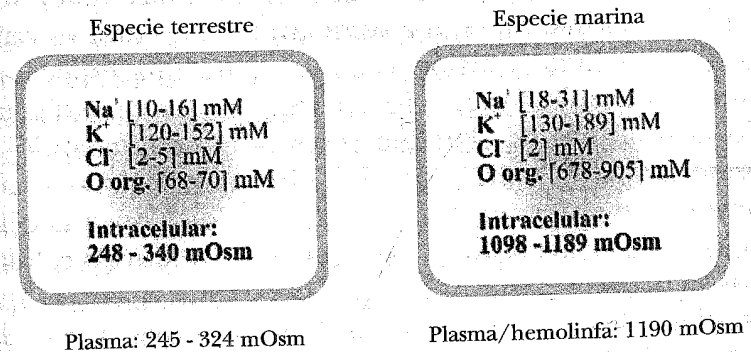


Figura 4. Las soluciones que son isotónicas para algunos tipos celulares, pueden tener muy distinta osmolaridad. Una solución isotónica para las células de especies marinas tiene una osmolaridad cerca de tres veces superior a la que es isotónica para células de especies terrestres.

desarrollo de sistemas como el renal, la osmolaridad de los fluidos extracelulares es cercana a las 290 mosmolas/litro y ésta es también la osmolaridad del citoplasma. En la mayoría de las células de estas especies, la concentración intracelular de osmolitos orgánicos no es tan alta como en las especies marinas y la osmolaridad se mantiene en gran parte por los iones Na^+ , K^+ y Cl^- . Para tomar en cuenta esta situación se ha establecido una referencia osmótica, para la que se acuñó el término de tonicidad de las soluciones. La osmolaridad se define como la concentración de solutos de una solución y es por ende, un concepto absoluto. En cambio, se dice que una solución es isotónica cuando se refiere al equilibrio osmótico existente entre las células de una determinada especie y los fluidos que las rodean. Así, una solución de aproximadamente 290 mosmolas, que es isotónica para las células de una especie terrestre, será marcadamente hipotónica para una especie marina, en la que la osmolaridad de los líquidos extracelulares es de casi 1000 mosmolas.

Igualmente, la solución que es isotónica para una especie marina, tiene una osmolaridad más de tres veces mayor que una solución isotónica para una especie terrestre. Las soluciones anisotónicas son las que se desvían de la isotonicidad. Pueden ser hipotónicas, cuando su osmolaridad es menor que la del interior celular y va a producirse entonces una entrada neta de agua a la célula, con el consiguiente incremento en el volumen celular. Las soluciones hipertónicas por el contrario, son las que contienen una concentración de solutos mayor a la del interior celular y por ende, la dirección del flujo neto de agua es hacia fuera de la célula, con lo que ésta disminuye su volumen. Una solución será isotónica cuando su osmolaridad es la requerida para encontrarse en

equilibrio osmótico con el compartimiento intracelular. Estos aspectos generales sobre presión osmótica pueden ampliarse en los capítulos correspondientes de textos de fisiología [1],[2],[3],[4].

2.4. Transporte del agua a través de acuaporinas

La permeabilidad al agua es una propiedad general de las membranas de las células animales, por lo que durante mucho tiempo se pensó que era transportada únicamente a través de la bicapa lipídica, que es una característica común a todas las membranas (figura 5). Sin embargo, desde hace varias décadas se habían reunido evidencias que apuntaban hacia un mecanismo adicional para el transporte de agua a través de la membrana, mediado por moléculas proteicas [5]. Fue hasta mucho tiempo después que se pudo aislar y caracterizar el primero de estos componentes moleculares, que resultaron ser poros o canales para el transporte específico del agua. Se les dio el nombre de acuaporinas.

Las acuaporinas juegan un papel crítico en el desplazamiento del agua durante los cambios en osmolaridad a los que las células están expuestas. La función de las acuaporinas es extremadamente eficiente, llegando a transportar hasta tres mil millones de moléculas de agua por segundo. Las acuaporinas forman canales que son notablemente selectivos, excluyendo el paso de iones de todo tipo y sólo algunos subtipos de acuaporinas permiten el paso de moléculas pequeñas como la urea y el glicerol. El desplazamiento del agua a través de estos canales es bidireccional y la dirección del flujo es determinada por el gradiente electroquímico del agua. La familia de las acuaporinas en las células de mamíferos consta hasta la fecha de once subtipos, designados en una serie secuencial de

AQP0 a AQP10. Las AQP3, AQP7 y AQP9 son también permeables al glicerol [6]. El subtipo mejor caracterizado es la AQP1, que fue la primera en ser aislada de la membrana de eritrocitos humanos. El estudio cristalográfico de la AQP1 muestra que se trata de una proteína monomérica, es decir, con una sola unidad (figura 5) y que para formar el canal de paso del agua se organiza en forma de tetrámeros, es decir, de cuatro monómeros idénticos. Esta organización permite la formación de un poro, cuyo diámetro es de 2 nanómetros de largo y 0.3 nanómetros de ancho (figura 5). Esta dimensión limita el paso de la mayoría de las moléculas presentes en los fluidos biológicos, excepto los iones, que por su tamaño, podrían permear a través del poro de las acuaporinas. La restricción para la permeabilidad iónica se consigue en parte mediante la presencia de una barrera formada por un aminoácido con carga positiva, la arginina, la cual está situada en una posición estratégica dentro del poro.

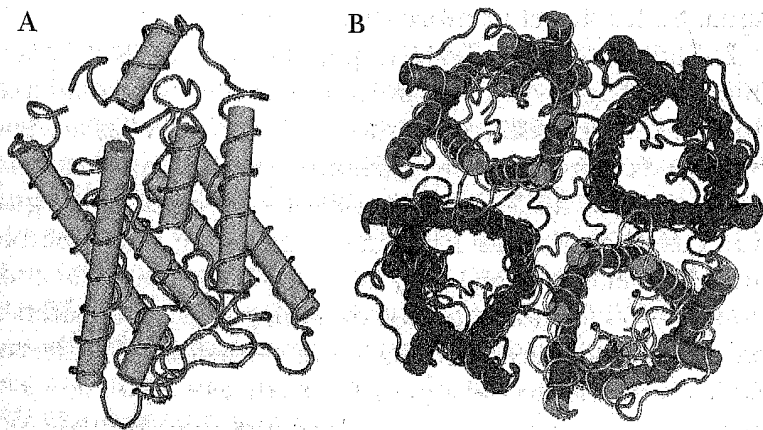


Figura 5. Estructura monomérica de una acuaporina A. Los monómeros se organizan en tetrámeros B, formando un poro que permite el paso del agua y su organización en forma de tetrámeros.

Esta estructura está conservada en todos los subtipos de acuaporinas. Existen también fuerzas electrostáticas que dificultan el paso de los iones, y a la vez determinan la orientación de las moléculas de agua, las que de esta forma, ingresan al poro de manera ordenada, permitiendo una difusión muy rápida.

La importancia fisiológica de los distintos subtipos de acuaporinas se ha establecido en diversos tejidos y órganos. Entre los mejor conocidos se cuenta el sistema renal, en el que diversos subtipos de acuaporinas tienen un papel determinante en la reabsorción del agua. Las acuaporinas tienen también una función crítica en el intercambio de fluido en los capilares, en el humor acuoso y en la producción del líquido cefalorraquídeo. El cristalino, la córnea, el músculo esquelético, los epitelios glandulares e intestinales, son otros tejidos en los que las acuaporinas desempeñan un papel muy importante en la regulación de los fluidos celulares [6]. Asimismo, las acuaporinas parecen ser el medio a través del cual ocurre en buena parte el movimiento del agua osmótica durante los cambios en el volumen celular. Una alteración en el funcionamiento de las acuaporinas en estos órganos y tejidos las vincula con patologías como el edema pulmonar, el edema cerebral o el glaucoma.

3. VARIACIONES EN EL VOLUMEN CELULAR

Las células animales tienen un volumen definido genéticamente, que puede sin embargo, modificarse cuando hay un desequilibrio que altera la condición isotónica en la que se encuentran normalmente. En las especies terrestres en las que, como antes se mencionó, han evolucionado sistemas complejos y muy eficientes para mantener la

osmolaridad de los líquidos extracelulares, las células se encuentran normalmente en condiciones isotónicas. Éstas pueden alterarse, sin embargo, en situaciones patológicas. En algunas de ellas se producen variaciones en la osmolaridad externa, haciendo que el medio extracelular sea anisomótico, y por ende se desvíe de la condición isotónica normal. El cambio puede ser debido a una reducción o a un incremento en la osmolaridad con lo que el entorno será hipotónico o hipertónico, respectivamente. En esas condiciones, debido a los movimientos de agua generados por el cambio en la presión osmótica, la célula mostrará un incremento en el volumen en la condición hipotónica y un decremento en la hipertónica. Estos cambios pueden ocurrir en condiciones fisiológicas o a consecuencia de una serie de patologías [7].

3.1. Cambios de volumen en condiciones anisomóticas

La osmolaridad del plasma puede modificarse en el contexto de diversas patologías, que pueden llevar a un incremento o a un decremento en la osmolaridad. El Na^+ es el elemento más abundante en el plasma de los animales terrestres y por ende, una disminución en su concentración, o hiponatremia, irá aparejada en general, a un decremento en la osmolaridad plasmática, alterando la isotonicidad. La disminución de Na^+ en el plasma o hiponatremia, puede generarse ya sea cuando hay una retención de agua en el plasma, que disminuye la concentración de electrolitos, o cuando se reducen específicamente los niveles de Na^+ sérico. La retención de agua ocurre por insuficiencia renal o insuficiencia cardíaca, así como por una secreción inadecuada de la hormona anti-diurética. Un exceso de agua en el plasma y la consi-

guiente dilución del Na^+ plasmático pueden ocurrir también debido a una ingesta excesiva y rápida de agua, que sobrepase la capacidad renal, tal como ocurre en algunos cuadros psicóticos.

La otra condición que genera hiponatremia es el decremento en el Na^+ sérico, generalmente debido a una pérdida excesiva de Na^+ , ya sea por vía renal o por otras vías. Se presenta cuando hay una deficiencia en mineralocorticoides, durante episodios de diarrea o vómito severos o de quemaduras extensas, así como durante pruebas de resistencia física extrema [8,9]. El síndrome nefrótico, una severa disfunción renal, lleva también a hiponatremia. El síndrome nefrótico se presenta en el contexto de una variedad de enfermedades primarias y sistémicas, tales como diabetes, lupus eritematoso, y en ciertas neoplasias. En los ancianos, así como en las mujeres durante el embarazo, se detecta una hiponatremia crónica moderada. A menudo se provoca un incremento en el volumen celular, o edema, por la selección inadecuada de fluidos administrados en las unidades quirúrgicas, ya sea pre- o postoperatorios, de graves consecuencias, sobre todo en el cerebro [10].

Hay que señalar que la hiponatremia lleva a un incremento en el volumen celular sólo cuando se acompaña de una disminución en la osmolaridad del plasma, lo que no siempre ocurre, ya que hay condiciones de hiponatremia con osmolaridad plasmática normal o aun con hiperosmolaridad. En estas condiciones la patología lleva al decremento en el volumen celular.

Las células pueden estar también expuestas a un incremento en la osmolaridad del medio extracelular. Esto ocurre de manera fisiológica como es el caso en la médula renal, cuando en función de los mecanismos de concentración de la orina, hay un notable incremento en los

niveles intersticiales de Na^+ , Cl^- y urea. Esta condición podría afectar no sólo a las células renales sino también, en forma temporal, a las células sanguíneas que transitan temporalmente por el área. Los cambios en el volumen celular que ocurren en condiciones anisomóticas no son permanentes ya que, como se verá con detalle más adelante, las células son capaces de iniciar mecanismos activos de recuperación del volumen.

3.2. Cambios de volumen en condiciones isomóticas

Los cambios en el volumen celular pueden ocurrir también en condiciones isomóticas, es decir, cuando no ha habido una variación en la osmolaridad del medio externo. Esto puede presentarse en condiciones fisiológicas o en el curso de un gran número de patologías, durante las cuales los fluidos extracelulares dejan de ser isotónicos al presentarse una condición que conlleva la acumulación de solutos intracelulares. Éstos pueden ser iones o moléculas osmóticamente activas (osmolitos) que son capaces de desplazarse a través de la membrana celular por mecanismos activos de transporte o por la apertura de vías difusionales tales como canales iónicos. En condiciones patológicas pueden acumularse en la célula iones como el K^+ y el Cl^- , o moléculas orgánicas como la urea, el lactato o el amonio. Esto hace al medio intracelular hipertónico con respecto al extracelular y el resultado es el desplazamiento de agua al interior de la célula, induciendo un aumento en su volumen. El incremento en volumen se presenta en patologías como isquemia, insuficiencia hepática aguda, así como en hiperglicemia y durante la actividad convulsiva [7][11][12].

El incremento en el volumen celular es un riesgo en cualquier tejido, pero es particularmente grave en el cerebro, en donde la restricción que impone el cráneo a la expansión tisular, trae como consecuencia la ruptura de vasos, y la consecuente muerte celular por anoxia y falta de nutrientes. En condiciones extremas, cuando el incremento en volumen es rápido y muy severo, ocurre el herniamiento del cerebro, que al ejercer presión sobre los núcleos respiratorio y cardíaco del tallo cerebral, genera el riesgo inminente de paro respiratorio y cardíaco.

4. REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR

4.1. Respuesta al incremento en volumen en condiciones hiposmóticas

Cuando hay un decremento en la osmolaridad externa, se tiende a restablecer el equilibrio osmótico entre los compartimientos extracelular e intracelular mediante el desplazamiento del agua de acuerdo a su gradiente de concentración. El agua entra a la célula y rápidamente genera un incremento en el volumen, cuya magnitud está en proporción directa con la dimensión del decremento en la osmolaridad externa (figura 6). Sin embargo, casi inmediatamente se pone en movimiento un mecanismo activo de regulación, que consiste en la expulsión de osmolitos intracelulares, tendiente a restablecer una condición isotónica. Con ello tiene lugar una redistribución del agua, dirigida a restablecer el volumen original (figura 7). Este proceso activo que se conoce como decremento regulador del volumen, procede a pesar de que persistan las condiciones externas de hiposmolaridad [7][13][14][15]. El decremento regulador del volumen ocurre a través de tres etapas básicas. En la primera, la célula percibe el cambio en el volumen. A continuación

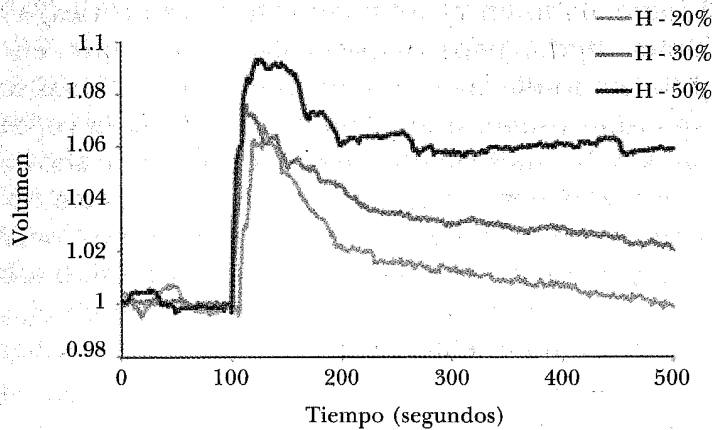


Figura 6. Curso temporal de los cambios en el volumen celular en fibroblastos expuestos a soluciones hipotónicas. Los trazos muestran el incremento inicial en el volumen y la subsecuente recuperación. Volumen estimado por dispersión de la luz en un espectrofotómetro.

se activan una variedad de vías de señalización, tendientes a permitir la adaptación de la célula a la nueva condición [14][15]. Paralelamente, se ponen en marcha los mecanismos de activación de las vías de transporte de los osmólitos del interior de la célula, con cuya salida se generan flujos osmóticos de agua que llevan hacia el equilibrio osmótico y la paulatina recuperación del volumen. La primera etapa, en la cual la célula detecta el cambio en volumen requiere la existencia de un mecanismo sensor, que a la fecha no ha sido identificado. No está claro aún si se trata de un solo mecanismo o si se requiere la acción concertada de distintos mecanismos. Tampoco está claro si se trata de un mecanismo general para todas las células o si los diferentes tipos celulares tienen distintos mecanismos para detectar el cambio en el volumen. Entre los candidatos a funcionar como sensores de volumen se incluyen moléculas de membrana o transmembranales, tales

como las integrinas, o los receptores a factores de crecimiento [13]. Estas moléculas tienen la ventaja de que pueden percibir cambios en el entorno extracelular, como sería un cambio en la osmolaridad, y del lado intracelular están conectadas con una amplia gama de vías de señalización que les permiten llevar el mensaje del cambio a distintos ambientes en el interior de la célula. También se han considerado como posibles sensores de volumen a señales como cambios en la concentración intracelular del calcio, o en la densidad de macromoléculas en el gel citoplasmático. El mecanismo sensor de volumen tiene también un papel clave para guardar memoria

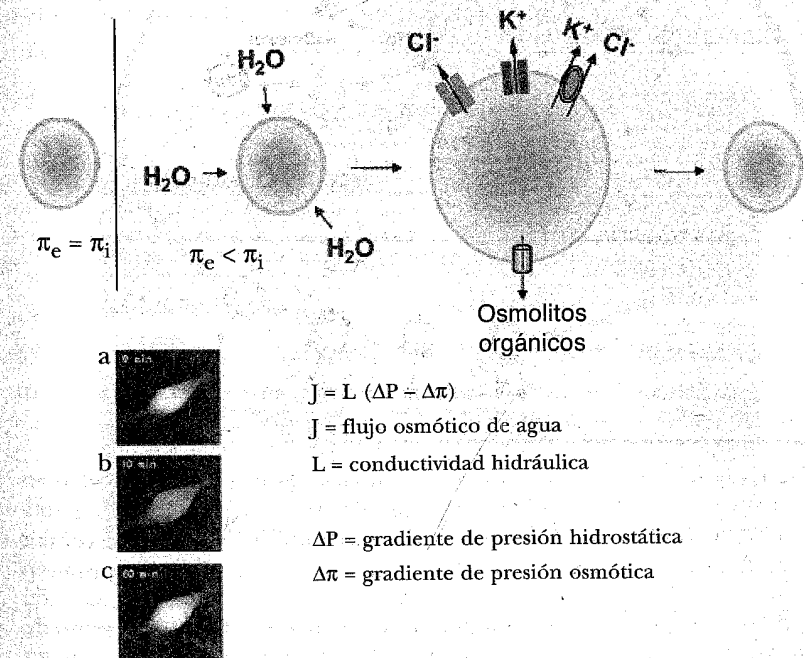


Figura 7. Regulación del volumen en células expuestas a un medio hiposmótico. La sección a,b,c muestra los sucesivos cambios en volumen en una neurona [20].

del volumen original de la célula y desactivar los mecanismos de regulación.

El incremento en el volumen celular evocado por condiciones hiposmóticas activa un gran número de vías de señalización que aún no están bien identificadas (figura 8). Debe tomarse en consideración que el cambio en volumen es un fenómeno complejo que implica modificaciones en un gran número de funciones celulares. En

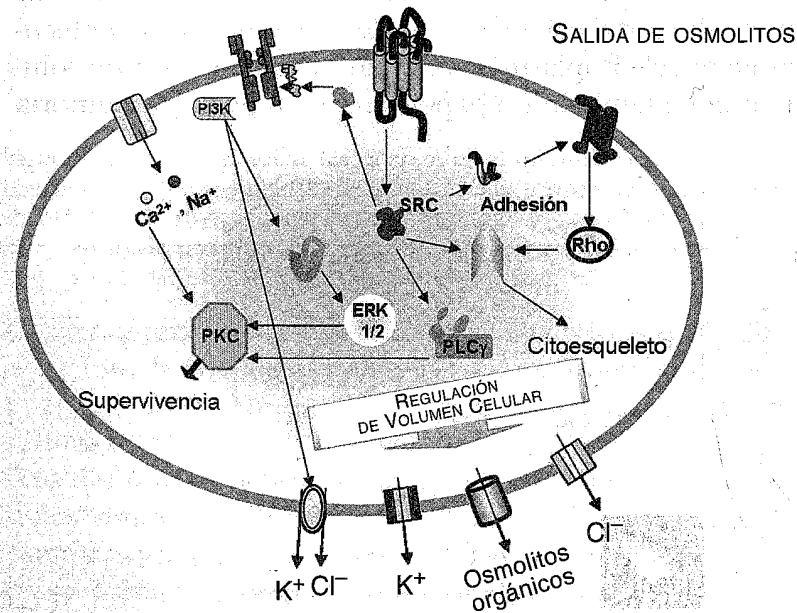


Figura 8. Representación esquemática de las tres etapas que suceden en el proceso de recuperación del volumen en células expuestas a una condición hiposmótica: i) percepción del cambio en el volumen celular y posibles sensores de volumen, ii) señales intracelulares que transmiten la información del sensor(es) a los elementos de adaptación incluyendo adhesión, supervivencia, remodelación del citoesqueleto y activación de las vías de movilización de los osmolitos, iii) mecanismos de salida de los osmolitos que determinan el flujo osmótico del agua y la recuperación del volumen. TR, receptores con actividad de cinasas de tirosina, como los receptores a factores de crecimiento; RAPG, receptores acoplados a proteínas G.

primer lugar, se encienden las señales de alerta que preparan a la célula para responder ante potenciales situaciones de riesgo. Así, el incremento en el volumen activa las llamadas proteínas de estrés, como la p38, y simultáneamente se activan también los elementos de las vías de supervivencia de la célula, como son las de la vía de la AKT, entre otras (figura 8) [13]. El aumento en el volumen celular requiere también modificaciones importantes en las moléculas de adhesión, que son aquellas que mantienen a la célula en contacto con la matriz extracelular y tienen un papel clave en la citoarquitectura y en la comunicación de una célula con otra. Otro elemento clave en la respuesta celular al hinchamiento es la reorganización del citoesqueleto (figura 9) [16]. Este componente que sirve a la célula de sostén y armazón,

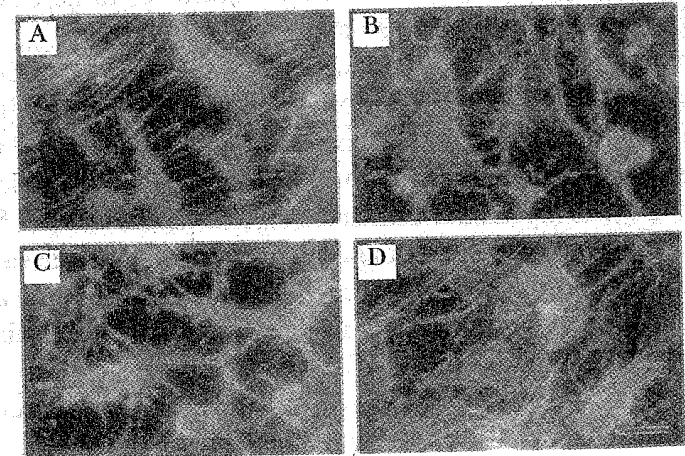


Figura 9. Cambios en el citoesqueleto de actina evocados por el incremento y la recuperación del volumen celular en una condición hiposmótica. La figura ilustra estos cambios en astrocitos: A. Condición isosmótica que muestra las fibras de actina. B. Al aumentar el volumen celular las fibras ya no se advierten y en su lugar se observan focos de adhesión. C. y D. Etapas sucesivas del cambio en la actina a medida que el volumen celular se recupera. Tomado de [18].

debe adaptarse rápidamente para permitir el incremento en el volumen sin rupturas o deformaciones mayores. Tanto las moléculas de adhesión como el citoesqueleto deben recuperar su condición inicial una vez que la célula recupera su volumen. Se trata de un cambio complejo, muy dinámico, que se va ajustando perfectamente en tiempo y magnitud, a las modificaciones en el volumen celular. El Ca^{2+} es una molécula señal de importancia en la regulación del volumen en un gran número de tipos celulares.

Sus niveles intracelulares se incrementan consistentemente en respuesta al aumento en el volumen [17] y cuando alcanzan una concentración elevada, tienen una función potenciadora sobre algunas de los mecanismos de salida de los osmolitos [18]. La fase final del mecanismo de recuperación del volumen celular es la activación de las vías de salida de los osmolitos.

Es mediante la movilización de estos solutos osmóticamente activos del interior de la célula al espacio extracelular, que se logra el desplazamiento del agua y se restaura el equilibrio osmótico con la nueva condición a la que está expuesta la célula (figura 8). Los osmolitos que regulan el volumen celular en las especies terrestres son básicamente de dos tipos: los iones con mayor concentración en los compartimientos intra- y extracelulares como son el Na^+ , el K^+ y el Cl^- y una variedad de moléculas orgánicas pequeñas y de muy variada estructura molecular. Entre los osmolitos más importantes en este grupo se cuentan algunos aminoácidos, como taurina, glutamato, glicina, glutamina y alanina, los polialcoholes como sorbitol y mio-inositol, metilaminas como glicerofosforilcolina y betaína, y otros compuestos como fosfoetanolamina, creatinina, fosfocreatina y N-acetil-aspartato (figura 10).

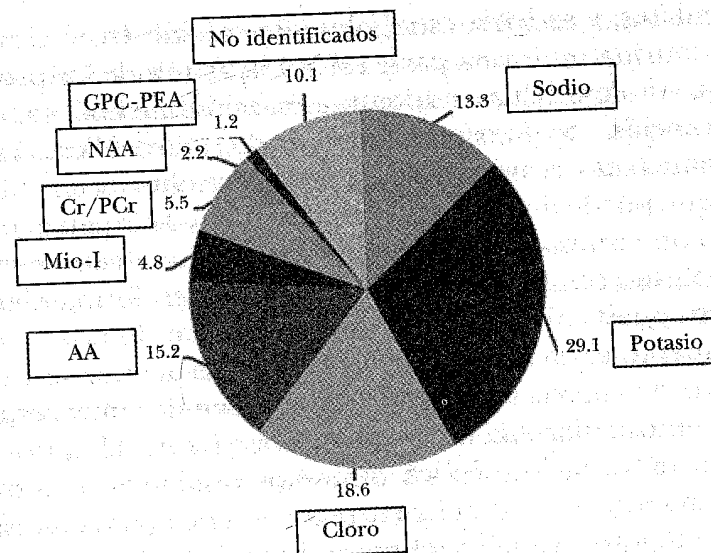


Figura 10. Esquema representativo de la contribución de osmolitos iónicos como el Na^+ , el K^+ y el Cl^- y osmolitos orgánicos como aminoácidos, polialcoholes y aminas a la regulación del volumen en el cerebro. GPC/PEA: glicerofosforilcolina, P-etanolamina, NAA: N-acetil-aspartato, Cr/PCr: creatina/P-creatina, Mio-I: mioinositol, AA: aminoácidos.

La participación de estos osmolitos orgánicos en la función osmorreguladora representa una ventaja sobre las especies iónicas, las cuales, debido a su función en el mantenimiento del potencial de membrana, no pueden alterar su distribución sin traer consecuencias importantes para la célula. Algunos de los osmolitos orgánicos se conocen como osmolitos compatibles, un término que indica que llevan a cabo su función osmorreguladora sin comprometer otras funciones en la célula.

El aminoácido taurina es probablemente el más representativo de estos osmolitos compatibles. La taurina es un aminoácido azufrado, que se encuentra en concentraciones muy elevadas (1-40 mM) en un gran número de tipos

celulares, y se halla esencialmente soluble en el citosol. La taurina no forma parte de la estructura de las proteínas, y no participa en ninguna reacción metabólica, con excepción de la síntesis del ácido taurocólico. Estas propiedades la hacen un perfecto osmolito compatible, ya que puede desplazarse dentro y fuera de la célula o de un compartimiento intracelular a otro, sin afectar el metabolismo celular. La taurina se moviliza en forma rápida en respuesta al aumento en volumen evocado por un decremento en la osmolaridad externa. La activación de la salida de taurina se observa frente a cambios muy pequeños en osmolaridad de 2-3 mosmolas (figura 11) [19].

La movilización de los osmolitos orgánicos, como la taurina o el mio-inositol, ocurre a través de una vía difusional, un poro o canal, o un mecanismo de transporte facilitado, a través del cual se desplazan siguiendo la dirección del gradiente de concentración. En el caso de la taurina,

que es uno de los osmolitos mejor estudiados, para la mayoría de las células animales los niveles de taurina del entorno o del plasma, son siempre menores que los que contienen las células, por lo que una vez que el poro se abra, la taurina se desplazará del interior de la célula hacia el espacio extracelular. Se sabe que este mecanismo se activa en condiciones hiposmóticas, movilizándose a la taurina junto con flujos osmóticos de agua. El incremento en volumen, aun en condiciones isosmóticas, induce asimismo su movilización con fines osmorreguladores. Sin embargo, el mecanismo preciso de activación de este poro, canal o transportador no se ha identificado y se desconoce su identidad molecular. La taurina que salió de la célula en respuesta al incremento en el volumen, es reincorporada al interior celular a través de un mecanismo de transporte activo, que opera con la energía del gradiente de Na^+ . Este transportador, sin embargo, no participa en la movilización de taurina activada por volumen. Varios aminoácidos y otras moléculas orgánicas pequeñas que funcionan como osmolitos se desplazan a través de una vía similar a la de la taurina. Dada la heterogeneidad molecular de los osmolitos orgánicos, es poco probable que se trate de la misma vía de movilización, por lo que podría pensarse en una familia de transportadores, con isoformas para los distintos tipos de osmolitos orgánicos.

La movilización de los iones es, en general, más rápida que la de los osmolitos orgánicos. Sin embargo, no se trata de una respuesta sostenida, ya que, como se mencionó antes, estos iones participan de manera importante en el establecimiento del potencial de membrana, por lo que su concentración intra/extracelular debe restablecerse en lapsos cortos. Es entonces cuando participan de manera más importante los osmolitos orgánicos, en particular los llamados osmolitos compatibles.

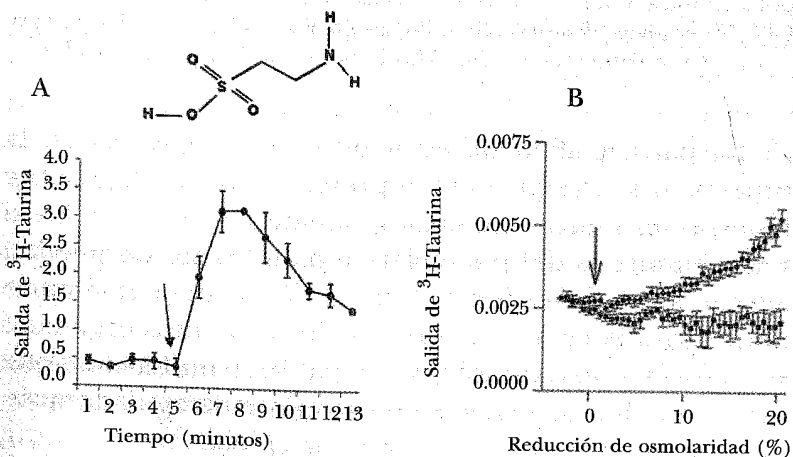


Figura 11. La taurina tiene una función básica como osmolito. A. Se moviliza en forma rápida en respuesta al aumento en volumen evocado por un decremento en la osmolaridad externa. B. La activación de la salida de taurina se observa frente a cambios muy pequeños en osmolaridad de 2-3 mosmolas [19].

Los iones K^+ y Cl^- son movilizados principalmente a través de canales, distintos para cada ion, aunque también pueden estar participando los cotransportadores electroneutros. El canal de Cl^- sensible a volumen (Cl^-_{vol}), a través del cual sale este anión en respuesta al hinchamiento de la célula, es un canal impermeable a los cationes, pero con poca selectividad para los aniones. El Cl^-_{vol} es permeable al Br^- , I^- , Cl^- , F^- , nitrato, tiocianato y sulfato y también permite el paso de aniones muy grandes como el glutamato y el benzoato [20][21]. El estudio cinético de una corriente que se mueve a través de este canal muestra que se trata de una corriente de rectificación saliente y conductancia unitaria media de 20-40 pS. El Cl^-_{vol} se encuentra presente en una gran variedad de tipos celulares y en todos ellos presenta esencialmente las mismas características (figura 12) [21].

A pesar de su distribución ubicua, la identidad molecular del Cl^-_{vol} se desconoce hasta ahora. Se han clonado y caracterizado numerosos tipos de canales de Cl^- , algunos de los cuales se activan por hinchamiento, pero ninguno de ellos tiene las propiedades típicas del Cl^-_{vol} .

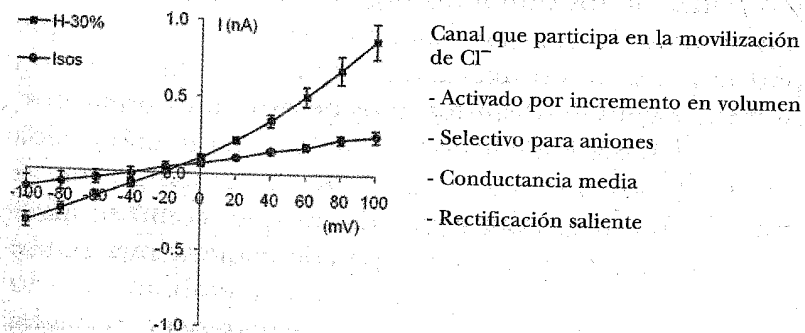


Figura 12. Incremento en la corriente de Cl^- evocada por una condición hiposmótica registrada en fibroblastos. Es una corriente saliente que pasa a través de un canal aniónico que se activa en respuesta al incremento en el volumen celular [21].

En contraste con la similitud del Cl^-_{vol} , en la mayor parte de los tipos celulares, el K^+ que se moviliza en respuesta al incremento en el volumen celular lo hace a través de diversos tipos de canales de K^+ (figura 13) [17][22][23].

En la mayor parte de las células, la condición hiposmótica incrementa los niveles de Ca^{2+} citosólico. En las células epiteliales de distintos tipos, este incremento en el Ca^{2+} activa de inmediato a los canales de K^+ de conductancia grande, conocidos como BK, que son activados por Ca^{2+} . En muchos otros tipos de células no epiteliales, el K^+ se mueve a través de canales activados por voltaje, el cual se modifica por una salida rápida de Cl^- en respuesta al hinchamiento. Esto ocurre en las células nerviosas, tanto neuronas como astrocitos. En algunas líneas celulares se han logrado identificar canales de K^+ que se activan en respuesta al incremento en el volumen o al

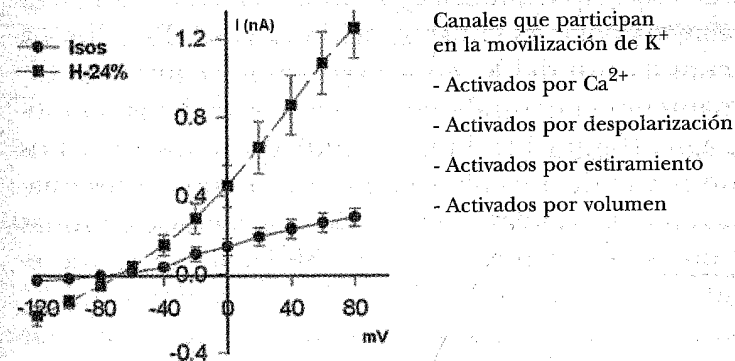


Figura 13. Incremento en la corriente de K^+ evocada por una condición hiposmótica. La corriente de K^+ transita por canales catiónicos que pueden ser distintos según el tipo celular. Los canales de K^+ se pueden activar por el aumento en volumen, pero también por condiciones concurrentes como son un incremento en el Ca^{2+} intracelular, o la despolarización [23].

estiramiento de la membrana. Éstos serían los típicos canales activados por volumen, pero hasta ahora parece que el K^+ se moviliza en respuesta al hinchamiento a través de canales de K^+ que existen en la célula para otras funciones y que se activan en respuesta a fenómenos concurrentes con el hinchamiento, tales como el cambio en el potencial de membrana o el nivel de Ca^{2+} intracelular.

4.1. Regulación del volumen en condiciones isosmóticas

La respuesta celular al incremento en volumen en condiciones isosmóticas se conoce menos que el que tiene lugar en condiciones anisosmóticas. Los modelos más estudiados son los que simulan la isquemia, durante la cual, como se mencionó antes, se establece una redistribución iónica con lo que el K^+ extracelular aumenta de manera muy importante, llegando a alcanzar valores 15 veces mayores que su concentración normal. Esto lleva a una acumulación del K^+ en los astrocitos, seguida de Cl^- para mantener la neutralidad eléctrica, y de flujos osmóticos de agua (figura 14). El K^+ acumulado en los astrocitos se va desplazando a través de uniones comunicantes establecidas entre las células y finalmente va a liberarse en zonas en las que su concentración extracelular no se ha incrementado [24]. Este sistema de amortiguamiento de K^+ por parte de las células gliales protege a las neuronas de una condición lesiva de hiperexcitabilidad y previene su hinchamiento, pero el volumen aumenta en el propio astrocito.

La figura 14 muestra el curso temporal del aumento en el volumen debido a la acumulación de K^+ , que es muy distinto del que se observa en condiciones hiposmóticas. El hinchamiento es muy lento y progresivo y continúa

hasta alcanzar una meseta, sin que se observen indicios de una tendencia a la recuperación del volumen original. No existe entonces un proceso activo de regulación del volumen. Esto puede no ser sorprendente si se considera que una parte muy importante del proceso de recuperación del volumen se lleva a cabo mediante la movilización de K^+ y Cl^- , que en este modelo isosmótico son precisamente, los causales del hinchamiento.

Otra condición en la que hay un incremento en volumen muy importante en los astrocitos es durante la insuficiencia hepática grave, en la que aumentan los niveles plasmáticos de amonio. Este ion se acumula en los astrocitos y en combinación con el glutamato forma glutamina. La concentración elevada de glutamina es en sí, un factor que lleva al incremento en el volumen, pero además, esta situación se complica por el daño mitocondrial que sigue al exceso de glutamina. La mitocondria se permeabiliza a través de la apertura de un poro, llamado poro de transición mitocondrial, a través del cual se liberan factores

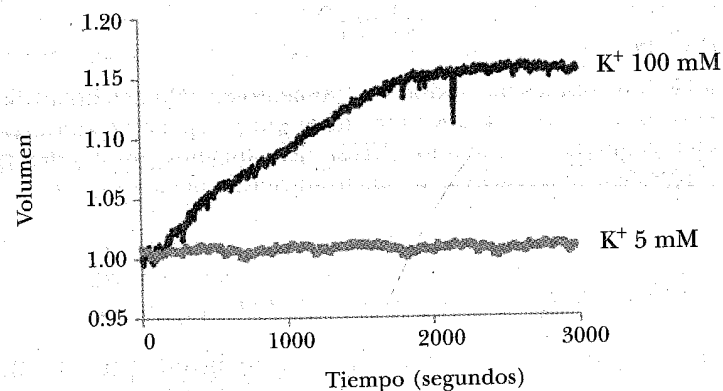


Figura 14. Incremento en el volumen en condiciones isosmóticas inducido por la acumulación de K^+ intracelular en astrocitos, por el mecanismo descrito en la figura 16. No se observa recuperación del volumen.

que afectan la membrana, permitiendo el paso indiscriminado de iones, seguido de flujos de agua, con lo que se establece una cadena de daño autopropagado que conduce al hinchamiento y a la muerte celular (figura 15) [25]. Esta condición clínica fatal, se conoce como encefalopatía hepática y tiene un claro vínculo con el edema cerebral [26].

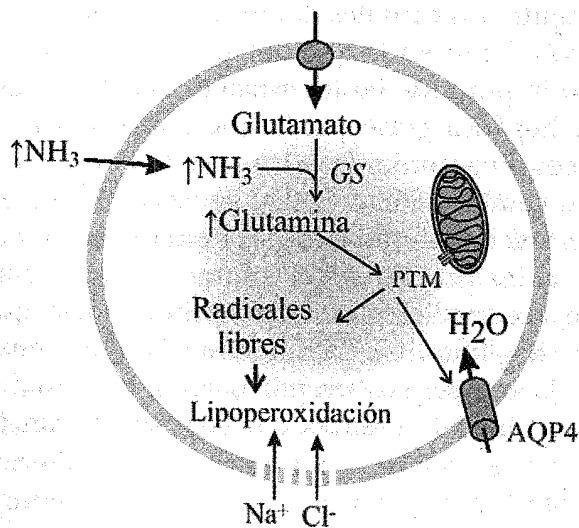


Figura 15. Mecanismos que inducen el aumento en volumen en astrocitos y el edema cerebral característico de la encefalopatía hepática. Los astrocitos acumulan el amoníaco (NH_3) que aumenta sus niveles en el plasma a consecuencia de una insuficiencia hepática grave.

4.2. Adaptación al decremento en el volumen

El decremento en el volumen es, al igual que el hinchamiento, un fenómeno complejo que afecta de manera dramática la homeostasis celular. Esto ocurre en particular, cuando el decremento en el volumen se debe a un cambio en la osmolaridad externa, es decir, en condicio-

nes hiperosmóticas. La complejidad del fenómeno de encogimiento celular hiperosmótico queda de manifiesto en un análisis en el que con una variedad de técnicas, se pudieron detectar más de 200 componentes celulares que se afectan por un incremento en la osmolaridad externa [27]. Los elementos que se modifican por la hiperosmolaridad son de índole muy variada, e incluyen acuaporinas, transportadores, proteínas de estrés, proteínas estructurales, factores de transcripción, receptores a factores de crecimiento, segundos mensajeros y por supuesto, todas las reacciones vinculadas con el cambio en los niveles de osmolitos iónicos y orgánicos. Entre los cambios más conspicuos está el remodelamiento del citoesqueleto de actina, que al igual que en el caso del edema hiposmótico, involucra la puesta en marcha de numerosas vías de señalización. Se detectan también cambios en las moléculas de adhesión, que van a permitir el retraimiento de la célula resultante de la salida del agua, y su ulterior expansión, una vez que el volumen se ha recuperado. Cuando la condición hiperosmótica es aguda y severa, se observan otras alteraciones como son el rompimiento del ADN o la inhibición de su síntesis y la transcripción del ARN, afectando numerosas funciones celulares incluyendo la proliferación celular. La condición hiperosmótica induce despolarización mitocondrial, así como la generación de numerosas especies reactivas de oxígeno, con su secuela de daños a varios niveles de la estructura y la función celular. Estas observaciones apuntan a que el decremento en volumen parece ser, en conjunto, una condición mucho más agresiva para la célula que el incremento debido a la hiposmolaridad. En este caso también, es necesario separar los posibles efectos del cambio en el volumen, de los de los elementos de la hipertonicidad propiamente dicha.

En condiciones experimentales la osmolaridad del medio se obtiene con frecuencia aumentando los niveles de NaCl o de urea, y esto podría *per se*, ser la causa de muchos de los efectos de la hipertonidad. Por ello es necesario comparar estos efectos con los generados cuando el aumento en osmolaridad se logra con osmolitos compatibles como son los polialcoholes como el manitol o el sorbitol. La recuperación del volumen en condiciones hiperosmóticas ocurre mediante la activación de transportadores iónicos, como el transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (NKCC) o de los transportadores de los osmolitos orgánicos dependientes de la energía del gradiente de Na^+ . La respuesta inicial al encogimiento celular es la activación de los transportadores iónicos, lo que incrementa los niveles intracelulares de Na^+ , K^+ y Cl^- y es un componente importante de la respuesta reguladora (figura 16). En una etapa ulterior en el tiempo, la condición hiperosmótica, y/o la reducción en el volumen celular modifican el transporte de los osmolitos orgánicos, generando un incremento en el número de los transportadores.

La confirmación de un incremento en los niveles del ARN mensajero encontrado para algunos de estos transportadores, como los de taurina, betaína y mio-inositol, se interpreta como un incremento en la expresión genética del transportador y consecuentemente, de una mayor síntesis de la molécula transportadora [28]. El mecanismo de esta respuesta involucra factores de transcripción genética. Uno de estos factores es crucial para el incremento regulador del volumen. Se trata del TonEBP cuyas siglas en inglés señalan la función de este factor: *tonicity responsive enhancer osmotic-response element binding protein* [29], el cual interactúa con aquellos genes que contienen una región reguladora con al menos un motivo consenso de ADN que es el blanco del factor transcripcional. Varios

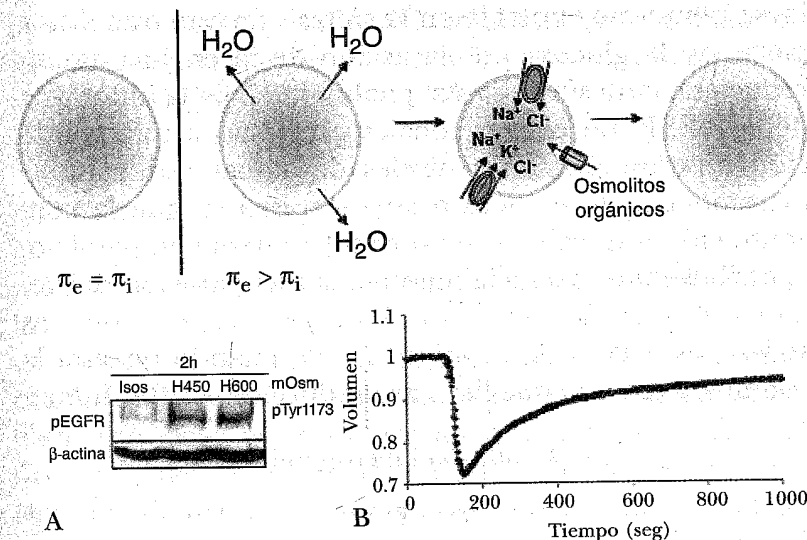


Figura 16. El decremento en volumen evocado por un aumento en la osmolaridad externa es seguido por un proceso de recuperación, mediado por la entrada de iones y de osmolitos orgánicos a través de transportadores. A. La condición hiperosmótica alerta señales de supervivencia como el receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR). B. La recuperación del volumen no es completa a corto plazo, ya que los osmolitos orgánicos requieren de la síntesis del transportador para incrementar su entrada a las células.

de estos genes están involucrados en el incremento en el número de transportadores que permiten la acumulación intracelular de glicina, betaína, mio-inositol, taurina y glicerofosforilcolina, y que representa una proporción importante del mecanismo regulador del volumen. El TonEBP también puede transactivar genes que codifican para proteínas de estrés, así como para algunas isoformas de transportadores de urea y posiblemente de la AQP2 (figura 17).

En el caso particular del sorbitol, la reducción en el volumen celular por hiperosmolaridad desencadena un

incremento muy notable en la síntesis de este osmolito a partir de la glucosa por la acción de la enzima aldosa reductasa, cuya síntesis está igualmente bajo la influencia del TonEBP. En células renales expuestas a una condición hiperosmótica, los niveles de aldosa reductasa se incrementan de manera dramática, con lo que la concentración intracelular del sorbitol aumenta en paralelo, contribuyendo sustancialmente a la recuperación del volumen celular. Se trata, en todos los casos, de respuestas activas, es decir, que se originan aun cuando persista la condición externa que llevó a la reducción en el volumen

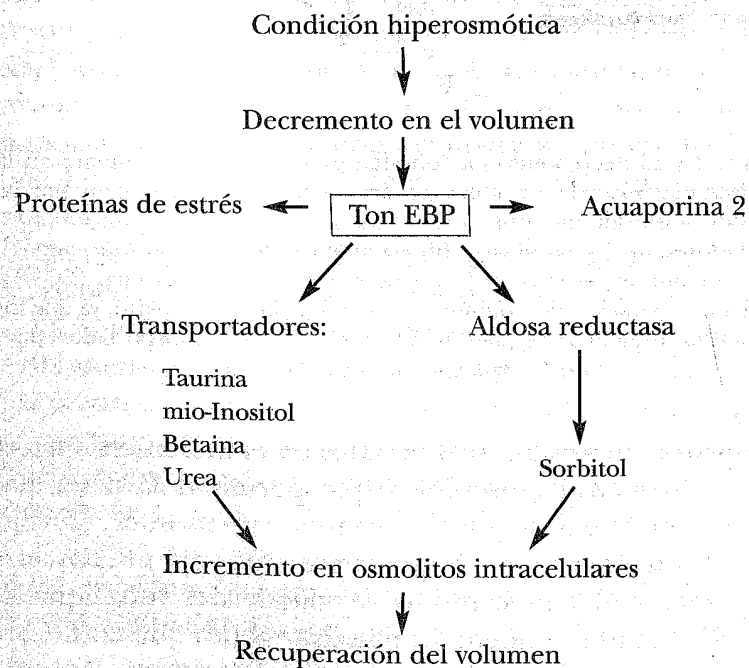


Figura 17. El TonEBP funciona como un factor de transcripción genética que incrementa la síntesis de los transportadores para osmolitos orgánicos, la aldosa reductasa para la síntesis del sorbitol, proteínas de estrés y la acuaporina 2. Todos estos efectos permiten la adaptación celular al cambio en volumen inducido por condiciones hiperosmóticas.

celular. La recuperación del volumen en condiciones hiperosmóticas es más lento que en el caso de una recuperación del incremento en el volumen.

4.3. Volumen y muerte celular

La muerte celular es una función básica de la homeostasis de los organismos. Ocurre como consecuencia de una lesión, o de un entorno agresivo, es decir, en una condición patológica, pero también se presenta como un elemento clave en el desarrollo y remodelación de los órganos y tejidos. Con base en esta etiología se han considerado de manera general, dos tipos de muerte celular: la muerte necrótica, que se caracteriza por ser accidental, no programada y por tanto sin directrices definidas, y la muerte celular programada, que responde a una secuencia de eventos definida intracelularmente, es decir, a un programa, con una regulación precisa y que se desencadena por señales de la propia célula o en ocasiones, por estímulos externos.

La muerte necrótica ocurre en una amplia gama de condiciones lesivas, siendo las más comunes la hipoxia, el traumatismo mecánico, una situación de daño membranar o celular por estrés oxidativo, por fármacos o por agentes infecciosos. Entre las patologías que más comúnmente llevan a la muerte celular necrótica están la isquemia, los traumatismos, la falla hepática fulminante y la insuficiencia renal. La muerte necrótica se acompaña en la mayoría de los casos, de un incremento en el volumen celular (figura 18). Esta condición se genera a través de distintos mecanismos, que pueden ocurrir en forma secuenciada. En el caso de la isquemia, uno de los primeros eventos en esta cadena de reacciones lesivas es

la reducción en la síntesis de ATP por el decremento o la falta total de oxígeno y la consecuente interrupción en el funcionamiento de la ATPasa de Na^+/K^+ . El resultado es una falla en el mantenimiento del potencial de membrana, que a su vez afecta a la fosforilación oxidativa mitocondrial, lo que inicia una cadena autopropagada de daño a la mitocondria y menor generación de ATP. La acumulación de Na^+ intracelular que no es removido por la ATPasa, es seguida por la entrada Cl^- y de flujos osmóticos de agua, iniciando la fase de hinchamiento. El daño a la mitocondria perpetúa esa cadena, pero tiene también otras consecuencias. La mitocondria juega un papel

clave en el mantenimiento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} dentro de una gama compatible con la función y la supervivencia de la célula. Ante una falla en la función mitocondrial, los niveles de calcio suben lo suficiente como para generar la activación de proteasas, fosfolipasas y endonucleasas, lo que lleva a la perturbación de la citoarquitectura y la función celular, causando daño en las proteínas de membrana, el citoesqueleto y la permeabilidad mitocondrial. El desequilibrio en los sistemas de control de los radicales libres de oxígeno culmina la secuencia de procesos lesivos generando una pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana, a través de la cual se acumulan entonces, de manera incontrolada el Na^+ y el Cl^- , generando el incremento en el volumen característico de la muerte necrótica. Hay también libre permeabilidad al Ca^{2+} que, junto con la disfunción mitocondrial antes referida, es parte de la secuencia autopropagada que culmina en una condición letal irreversible.

El incremento en el volumen celular se asocia también a una insuficiencia renal severa lo que lleva a la condición conocida como azotemia, es decir, la elevación de los niveles plasmáticos de un gran número de moléculas que no son eficazmente eliminadas por el riñón dañado. Algunas de ellas, como la urea, son muy permeables a través de la membrana celular y generan un incremento en el volumen. El aumento en el volumen de las células gliales en el cerebro se presenta cuando ante una insuficiencia hepática aguda, se incrementan los niveles séricos de amonio, que se acumula en la glía ante la incapacidad del tejido cerebral de metabolizar esta molécula. El amonio intracelular elevado causa episodios de daño mitocondrial que llevan a la cadena de reacciones lesivas descritas arriba y que pueden llevar a la muerte necrótica, además del riesgo de que, al ocurrir en el cerebro, se

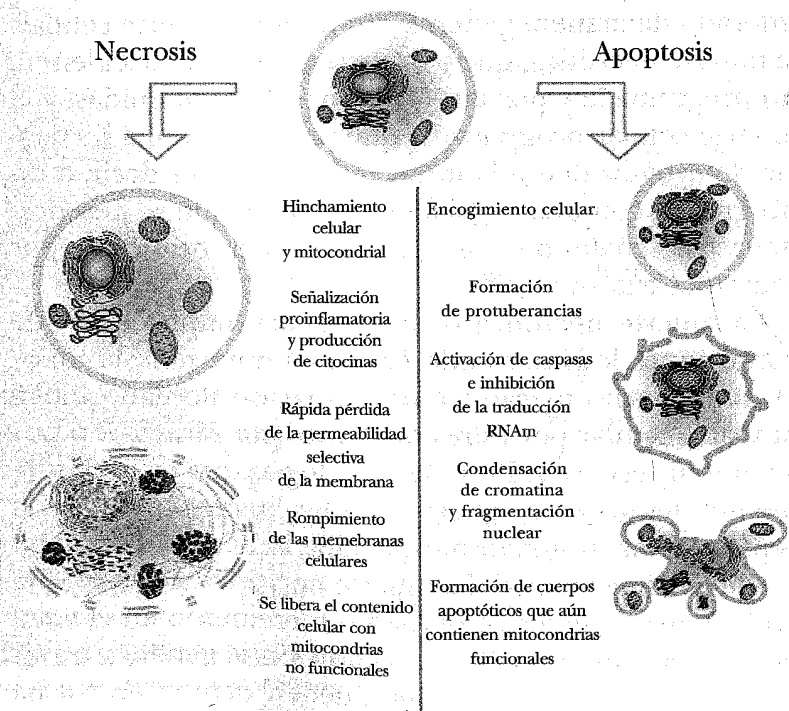


Figura 18. Esquema y descripción de las reacciones generales que caracterizan la muerte celular por necrosis o por apoptosis.

genere un incremento en la presión intracraneal que puede terminar en la muerte del individuo. La muerte necrótica se genera también a consecuencia de un traumatismo severo, en el cual las células sufren daño mecánico en la membrana y acumulan lactato junto con flujos osmóticos de agua generando un incremento en el volumen celular. Cuando el traumatismo es en el cráneo, hay también rompimiento de las estructuras que forman la barrera hematoencefálica, ocasionando un edema vasogénico, que junto con el celular pone en situación de máximo riesgo al individuo. Éstos son algunos ejemplos de muerte necrótica asociada a un incremento en el volumen celular. Un rasgo característico de la muerte necrótica es que los residuos de las células muertas son generadoras de elementos a su vez causantes de la propagación de la muerte a las células vecinas y de fenómenos de tipo inflamatorio.

La muerte por apoptosis es un fenómeno de enorme importancia para el desarrollo y la homeostasis de los organismos. La muerte por apoptosis obedece a un programa bien establecido, con una secuencia definida de acciones que tienen como propósito la eliminación de una célula específica, sin crear condiciones que sean lesivas para las demás, lo que establece una diferencia básica con la muerte necrótica. El término *apoptosis* fue acuñado por Kerr y col. en 1972 y deriva de la expresión griega para la caída de las hojas de los árboles o de los pétalos de la flor.

La apoptosis juega un papel clave en la remodelación de los tejidos y órganos; ocurre en células afectadas por mutaciones o por daño excesivo, sin posibilidades de ser recuperadas. También es crítica para el mantenimiento de un número constante de células en los tejidos que están en proceso de renovación continua, como es el caso de la piel y de la sangre, evitando la sobrepoblación celular.

Durante el desarrollo, la apoptosis se encarga de la eliminación de las células que no han establecido los contactos apropiados para la integración armónica de un órgano, asegurando de esta forma su organización y funcionalidad. Un ejemplo de los más dramáticos es el cerebro, en el cual cerca del 50% de las neuronas mueren por apoptosis antes que se establezca la configuración definitiva de los estratos celulares. La apoptosis es crucial también para el caso de las especies que sufren metamorfosis. En el sistema inmune, la apoptosis juega un papel clave en la eliminación de los linfocitos B y T cuyos receptores a sustancias extrañas resultaron innecesarios.

Cuando el proceso que conduce a la apoptosis se encuentra dañado o es inoperante, la célula dañada puede multiplicarse sin restricción, originando tumores. La apoptosis está vinculada con diversas patologías, incluyendo ciertos tipos de cáncer, alteraciones en el sistema inmune y enfermedades neurodegenerativas. En relación con el tema de este capítulo, es pertinente señalar que uno de los rasgos más característicos de la apoptosis es un decremento en el volumen celular, cuyos mecanismos serán discutidos más adelante. Junto con el encogimiento de la célula se observan cambios morfológicos en la membrana celular, en el citoplasma y en el núcleo. A nivel membranal, se forman evaginaciones que deforman el contorno celular sin llegar a la ruptura de la membrana. En el citoplasma aparece una granulación fina, pero la estructura de los organelos permanece sin cambio. Las alteraciones más notorias se detectan en el núcleo, en el que se observa una condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN. La agregación de los fragmentos nucleares rodeados por el citoplasma granular forma los cuerpos apoptóticos (figuras 18 y 19).

La apoptosis es un fenómeno interactivo y dinámico, que ocurre como resultante de factores proapoptóticos y antiapoptóticos que se expresan en un equilibrio cambiante, acorde con los requerimientos homeostáticos de órganos y tejidos. Entre los mecanismos moleculares mejor estudiados de la apoptosis se encuentra la función de un grupo de proteasas, las llamadas caspasas. Se han descrito hasta el momento 14 distintas caspasas, entre las cuales se encuentran las iniciadoras, que a su vez activan a las propiamente efectoras, que son las que ejercen su acción catalítica sobre las moléculas responsables de los cambios citoplasmáticos, de las evaginaciones membranales y de la fragmentación del ADN. Se han identificado más de 40 sustratos de estas caspasas efectoras. La activación de las caspasas puede venir de factores del medio extracelular o de mecanismos intrínsecos de la célula. Entre los primeros está la activación de los llamados receptores de muerte. Los mejor conocidos hasta ahora son el receptor a Fas y el receptor al factor de necrosis tumoral. Estos receptores son activados por ligandos (moléculas específicas que interactúan con el receptor) provenientes del medio extracelular y esta interacción lleva al reclutamiento de las caspasas iniciadoras y a la subsecuente puesta en marcha del programa de apoptosis. Los factores intrínsecos se activan cuando la célula se enfrenta a condiciones de estrés de distinto origen. En general estos factores actúan a través de la mitocondria, que contiene tanto factores antiapoptóticos como proapoptóticos. Cuando el balance favorece a éstos últimos, se genera el llamado poro de transición mitocondrial a través del cual se liberan factores como el citocromo c, que una vez en el citoplasma induce una ulterior serie de reacciones conducentes a la apoptosis (figura 18) [30].

Como se mencionó antes, un rasgo característico de la apoptosis es el encogimiento de las células (figuras 18 y 19). Este decremento en el volumen es un fenómeno muy temprano en el proceso apoptótico, que ocurre antes de otros procesos característicos tales como la activación de las caspasas y la fragmentación del ADN. Por ello, el decremento en el volumen se ha considerado como parte de las señales inductoras del programa de muerte celular. En sustento a esta posibilidad está por una parte el hecho de que si se previene el decremento de volumen, se interrumpe el proceso de apoptosis, y por

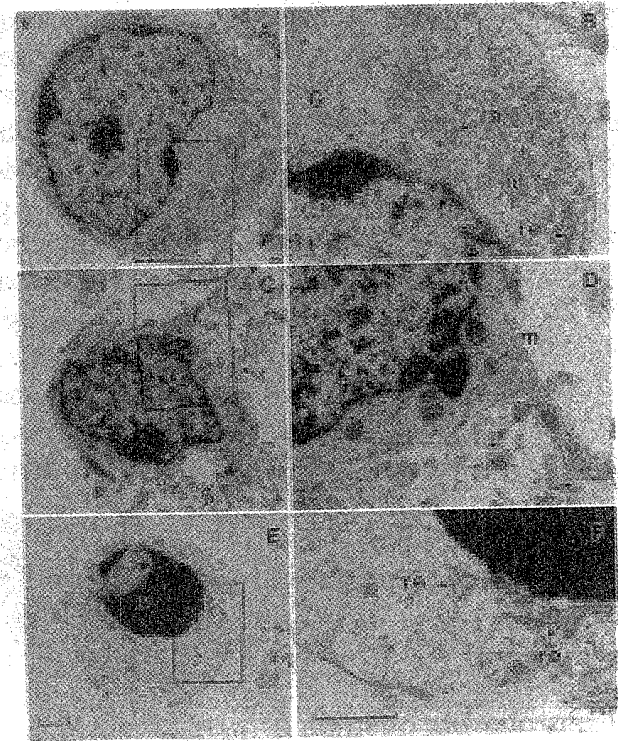


Figura 19. Microfotografía de los cambios asociados a la muerte por apoptosis en neuronas granulares del cerebelo [33].

otra parte el que la reducción del volumen en condiciones hiperosmóticas genera apoptosis [31,32].

La reducción en el volumen celular ocurre a consecuencia de la movilización de K^+ y Na^+ , junto con Cl^- y el consecuente flujo osmótico de agua (figura 20). En relación con los canales de K^+ que se activan durante la apoptosis, una observación interesante es que, al igual que durante la regulación del volumen en respuesta a hiposmolaridad, no se ha encontrado que un solo tipo de canal sea el responsable de la movilización de K^+ , sino que operan distintos tipos de canales dependiendo de las células estudiadas. En algunos tipos celulares participan los canales activados por Ca^{2+} , mientras que en otros lo hacen los dependientes de voltaje o los de la familia de dos poros (TREK) [32]. El movimiento de K^+ se acompaña de una movilización paralela de Cl^- , probablemente a través de un canal. Sin embargo, la especie molecular involucrada no se ha identificado. La taurina y posiblemente otros osmolitos orgánicos, forman parte también de este proceso de reducción del volumen en la apoptosis [33]. Es interesante señalar que los mismos osmolitos que permiten la recuperación del volumen en condiciones hiposmóticas son los responsables del decremento

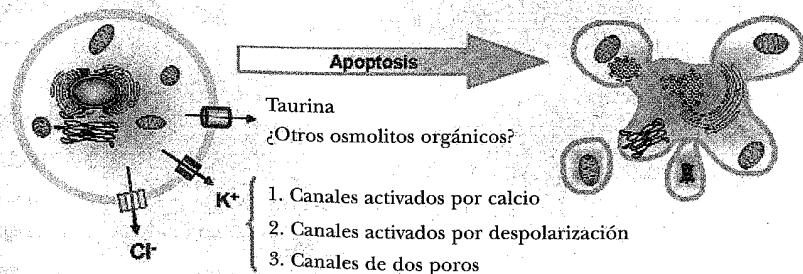


Figura 20. Vías de movilización de osmolitos que intervienen en el encogimiento característico de la muerte por apoptosis.

en volumen apoptótico pero en este caso, activados en condiciones isosmóticas. Este conjunto de hallazgos necesariamente supone la operación de un sensor de volumen capaz de diferenciar entre los dos procesos, y activar las señales correspondientes. Se ha considerado la posibilidad de que el encogimiento celular, en sí mismo, no sea el fenómeno que actúa como señal en la apoptosis, sino que sea el decremento en alguno o varios de los osmolitos, el que ejerza una influencia temprana sobre la cadena de reacciones características de la apoptosis [32]. Esta propuesta, sin embargo, no está definitivamente comprobada. La reducción del volumen celular durante la apoptosis tiene también una contribución de la taurina, cuya movilización ocurre en etapas tempranas de la apoptosis [33]. La vía de salida de la taurina parece ser distinta de la que se activa durante la regulación del volumen en condiciones hiposmóticas, pues el perfil farmacológico es claramente diferente [33]. Hay evidencia de que, en forma semejante a la del K^+ , la taurina podría actuar como el inhibidor natural de alguna de las señales de la apoptosis. En sustento a esta posibilidad, están los resultados que muestran la muerte apoptótica de los fotorreceptores de la retina en ratones en los que el mecanismo encargado de proveer de taurina a la retina, el transportador dependiente de Na^+ , ha sido apagado genéticamente [34]. Recientemente se ha investigado también el mecanismo a través del cual ocurren los flujos osmóticos durante la apoptosis. Las evidencias apuntan hacia las acuaporinas [35], aunque no está claro todavía cual es la contribución de las distintas isoformas en esta función. Estos resultados, en conjunto subrayan la importancia del volumen celular en un fenómeno de enorme trascendencia para la citoarquitectura en órganos y tejidos como es la apoptosis.

AGRADECIMIENTOS

Las investigaciones generadas en el laboratorio de la autora fueron apoyadas por los donativos de DGAPA-UNAM núm. 209507 y de CONACYT núm. 46465. La autora expresa su agradecimiento a sus colaboradores y estudiantes: Gerardo Ramos, Erika Vázquez, Alejandra López, Silvia Cruz y Reyna Hernández por su apoyo en la preparación del material de ilustración y la organización de este capítulo.

REFERENCIAS

1. K. Hernández-Fonseca, L. Massieu, *Transporte transmembranal en biología funcional de los animales*, M. L. Fanjul, M. Hiriart, editoras, Siglo XXI Editores, México (2008).
2. F. J. Alvarez-Leefmans, L. Reuss, *Operación concertada de transporte a través de la membrana plasmática: regulación y mantenimiento del volumen celular en biofísica y fisiología celular*, R. Latorre, J. López-Barneo, F. Bezanilla y R. Llinás, editores, Universidad de Sevilla, España (1996).
3. L. B. Kirschner, *Water and ions en Environmental and metabolic animal physiology*, C. L. Prosser, editor, Wiley-Liss, EUA (1991).
4. L. C. Prosser, *Adaptational biology: molecules to organisms*, Wiley-Interscience, 1986.
5. M. Borgnia, S. Nielsen, A. Engel, P. Agre, Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels, *Annu Rev Biochem.* **68**, 425-458, 1999.
6. AS. Verkman, More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins, *J. Cell. Science* **118**: 3225-3232, 2005.
7. F. Lang, Mechanisms and significance of cell volume regulation, *J. Am. Coll. Nutr.* **5**, 613S-623S, 2007.
8. E. J. Hoorn, R. Zietse, Hyponatremia revisited: translating physiology to practice, *Nephron. Physiol.* **108**, 46-59, 2008.
9. Y. H. Lien, J. I. Shapiro, Hyponatremia: clinical diagnosis and Management, *Am. J. Med.* **120**, 653-658, 2007.
10. P. W. Michael, W. Grocott, M. G. Mythen, T. J. Gan, Perioperative Fluid Management and Clinical Outcomes in Adults, *Anesth. Analg.* **100**, 1093-1106, 2005.
11. H. K. Kimelberg, Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy, *Glia* **50**, 389-397, 2005.
12. H. Pasantes-Morales, R. Franco, Astrocyte cellular swelling: mechanisms and relevance to brain edema en *The role of glia in neurotoxicity*, M. Aschner, L. Costa, editores, CRC Press, EUA (2005).
13. H. Pasantes-Morales, R. A. Lezama, G. Ramos-Mandujano, K. L. Tuz, Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality, *Am. J. Med.* **119**, S4-S11, 2006.
14. F. Wehner, H. Olsen, H. Tinel, E. Kinne-Saffran, R. K. Kinne, Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **148**, 1-80, 2003.
15. E. K. Hoffmann, S. F. Pedersen, Sensors and signal transduction pathways in vertebrate cell volume regulation, *Contrib. Nephrol.* **152**, 54-104, 2006.
16. J. Morán, I. Meza, M. Sabanero, H. Pasantes-Morales, Changes of the actin cytoskeleton during swelling and volume regulatory decrease in cultured astrocytes, *Am. J. Physiol. (Cell Physiology)*, **271** (40), C1901-C1907, 1996.
17. H. Pasantes-Morales, S. Morales-Mulia, Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels, *Nephron.* **86**, 414-427, 2000.
18. E. Vázquez-Juárez, G. Ramos-Mandujano, R. Hernández-Benítez, H. Pasantes-Morales, On the role of G-protein coupled receptors in cell volume regulation, *Cell. Physiol. Biochem.* **21** (1-3), 1-14, 2008.
19. H. Pasantes-Morales, R. Franco, M. E. Torres-Márquez, K. Hernández-Fonseca, A. Ortega, Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms, *Cell. Physiol. Biochem.* **10**, 361-370, 2000.
20. Y. Okada, Cell volume-sensitive chloride channels: phenotypic properties and molecular identity, *Contrib. Nephrol.* **152**, 9-24, 2006.
21. E. Vázquez-Juárez, G. Ramos-Mandujano, R. A. Lezama, S. Cruz-Rangel, L. D. Islas y H. Pasantes-Morales, Thrombin increases hyposmotic taurine efflux and accelerates ICI-swell and RVD in 3T3 fibroblasts by a src-dependent EGFR transactivation, *Pflugers Arch.* **455** (5), 859-72, 2008.

22. F. Wehner, Cell volume-regulated cation channels, *Contrib. Nephrol.* **152**, 25-53, 2006.
23. B. Ordaz, L. Vaca, R. Franco, H. Pasantes-Morales, Volume changes and whole cell membrane currents activated during gradual osmolarity decrease in C6 glioma cells. Contribution of two types of K channels, *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* **286**, C1399-1409, 2004.
24. J. A. Leis, L. K. Bekar, L. K. W. Walz, Potassium homeostasis in the ischemic brain, *Glia* **50**, 407-16, 2005.
25. M. D. Norenberg, A. R. Jayakumar, K. V. Rama Rao, K. S. Panickar, New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling, *Metab. Brain Dis.* **22**, 219-234, 2007.
26. J. Vaquero, R. F. Butterworth, Mechanisms of brain edema in acute liver failure and impact of novel therapeutic interventions, *Neurol. Res.* **29**, 683-690, 2007.
27. M. B. Burg, J. D. Ferraris, Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *J. Biol. Chem.* **283**:7309-7313, 2008.
28. M. B. Burg, J. D. Ferraris, N. I. Dmitrieva, N. I. Cellular response to hyperosmotic stresses, *Physiol. Rev.* **87**, 1441-1474, 2007.
29. U. S. Jeon, A. Kim, M. R. Sheen, H. M. Kwon, How tonicity regulates genes: story of TonEBP transcriptional activator, *Acta Physiol. (Oxford)* **187**, 241-7, 2006.
30. S. Castro-Oregon, L. Covarrubias. Types of cell death: basic mechanisms. En: The neurochemistry of neuronal death, L. Massieu, C. Arias, J. Moran, editors. Research Signpost, pp 1-28, 2007.
31. F. Lang, M. Föller, K. S. Lang, P. A. Lang, M. Ritter, E. Gulbins, A. Vereninov, S. M. Huber, Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death, *Membr. Biol.* **205**, 147-157, 2005.
32. C. D. Bortner, J. A. Cidlowski, Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis, *Arch. Biochem. Biophys.* **462**, 176-188, 2007.
33. J. Morán, X. Hernández-Pech, H. Merchant-Larios, H. Pasantes-Morales, Release of taurine in apoptotic cerebellar granule neurons in culture. *Pflugers Arch.* **439**, 271-277, 2000.
34. B. Heller-Stilb, C. van Roeyen, K. Rascher, H. G. Hartwig, A. Huth, M. W. Seeliger, U. Warskulat, D. Häussinger, Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice, *FASEB J.* **16**, 231-233, 2002.
35. P. Flamenco, L. Galizia, V. Rivarola, J. Fernández, P. Ford, C. Capurro, Role of AQP2 during apoptosis in cortical collecting duct cells, *Biol. Cell.*, 2008.

CAPÍTULO 12 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LÍPIDOS BIOACTIVOS

LUZ M. LÓPEZ MARÍN, MA. TERESA PEÑA RANGEL
y JUAN R. RIESGO ESCOVAR*
Instituto de Neurobiología, UNAM

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los factores cruciales para la formación de las primeras células, hace más de tres mil millones de años, fue, sin duda, la capacidad de formar una barrera frente a su entorno; lo que hoy conocemos como la membrana celular. Sin membranas, y sin los lípidos que las conforman, no existiría ningún organismo viviente. A pesar de su importancia, los lípidos constituyen una clase de biomoléculas muy desatendidas en el estudio de la biología. Reconocidos desde los inicios de la bioquímica por su papel estructural en la formación de membranas, y poco después por su capacidad para almacenar energía, no ha sido sino hasta décadas recientes que los lípidos han emergido como actores estelares de la biología celular, con participación en una gran mayoría de actividades.

Comprender cómo se regula el metabolismo de la principal fuente de reservas energéticas celulares sigue siendo una de las preguntas fundamentales de la biología, crucial para un mejor entendimiento de innumerables patologías, como la diabetes o la obesidad. Sin embargo,

* riesgo@unam.mx

los lípidos son mucho más que esto; son un grupo de moléculas muy diverso, con roles también muy variados, que van más allá de la tradicional relevancia en la bioenergética y en las biomembranas. Modernas y potentes herramientas bioquímicas y biofísicas han revelado roles inesperados y vitales para prácticamente cada una de las familias de lípidos. Entre otros, se ha reconocido la capacidad que tienen de modular, alterando la forma y características de las membranas, la actividad de receptores, transportadores, enzimas y canales iónicos. Numerosos lípidos funcionan como mensajeros autócrinos y parácrinos en la señalización, como en la angiogénesis o en el crecimiento tumoral. Hay lípidos que modifican, mediante su unión a receptores, la transcripción de genes. En suma, la importancia que los lípidos han cobrado en las últimas tres décadas ha dado origen al surgimiento de una nueva área de estudio dedicada enteramente a ellos en la biología: la lipidómica.

En este capítulo presentamos un panorama general de los lípidos. Describimos cómo son y cómo se clasifican. Exponemos su capacidad inherente para formar estructuras delimitantes. Condensamos en una breve descripción su metabolismo y sus actividades biológicas, ilustrando con algunos ejemplos cómo el uso de sistemas modelo ha aportado evidencias irrefutables y claras de la importancia de los lípidos *in vivo*. Finalmente, comentamos de manera concisa algunas metodologías de frontera para el estudio de los lípidos y de la lipidómica.

2. DEFINICIÓN Y GENERALIDADES DE LOS LÍPIDOS

Curiosamente, no existe una definición universalmente aceptada de lo que es un lípido. Muchos autores definen los lípidos como todas aquellas moléculas inso-

lubles en agua. En efecto, la mayoría de los lípidos se caracterizan por ser solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua. Estas propiedades de solubilidad están en buena medida determinadas por el alto contenido en muchos lípidos de largas cadenas hidrocarbonadas, formadas por hidrógeno y carbono. Los átomos de carbono como de hidrógeno tienen una atracción similar por los electrones, por lo que los enlaces formados entre ellos no presentan polarización de cargas eléctricas, dando lugar a moléculas con afinidad por solventes igualmente apolares, que son repelidas por el agua. Sin embargo, la mayor parte de los lípidos no son moléculas completamente apolares, sino estructuras anfipáticas, es decir sustancias con propiedades físicas duales, con un determinado balance hidrofílico-hidrofóbico, aportado por fragmentos solubles en agua y fragmentos solubles en aceites o hidrocarburos (figura 1).

Además, existen moléculas que contienen lípidos en donde una importante proporción está constituida de grupos funcionales polares, y resultan completamente solubles en medios acuosos. Es el caso de varios gangliósidos que contienen largas cadenas de azúcares, o también de proteolípidos, moléculas conformadas por una proteína y uno o varios lípidos, donde muchas veces el principal componente es la cadena peptídica. De allí que una de las posiciones más incluyentes para definir a los lípidos ha sido la de definirlos como "ácidos grasos y sus derivados, y sustancias relacionadas biosintética o funcionalmente con estos compuestos" [1]. En esta categoría, además de los ácidos grasos y lípidos que contienen grupos acilos, quedan incluidos mediadores lipídicos como prostaglandinas, esteroides, ácidos biliares, tocoferoles, así como los gangliósidos, muchos de los cuales son hidrosolubles.

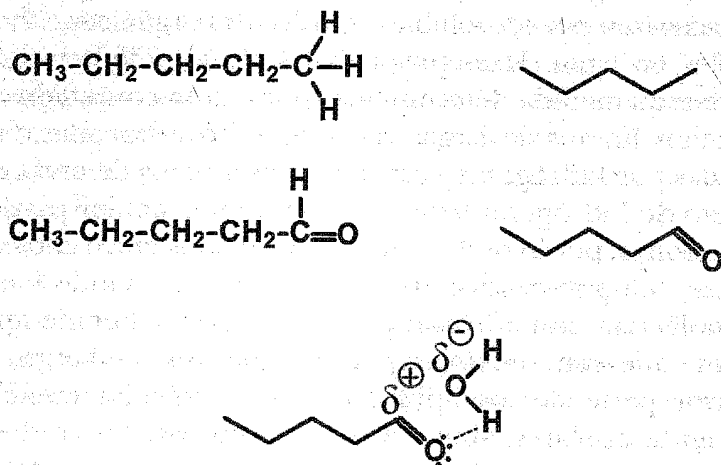


Figura 1. La polaridad en lípidos. Las cadenas hidrocarbonadas de lípidos están constituidas por átomos con similar afinidad por los electrones (carbono e hidrógeno) y son apolares, es decir que carecen de momento bipolar. Sin embargo, la presencia de átomos altamente electronegativos, como oxígeno, nitrógeno o fósforo, les confiere un carácter al menos parcialmente polar y afinidad por el agua al fragmento correspondiente. A la izquierda se muestra un lípido completamente apolar y un lípido con un fragmento polar; a la derecha se muestran estos lípidos en la forma de representación más común en donde cada punto de quiebre representa un átomo de carbono, y cada tramo de la línea un enlace sencillo entre dos átomos de carbono. Enlaces dobles se representan con dos líneas, y triples, de haberlos, con tres líneas. Los enlaces C-H no se dibujan, y se marcan, con su abreviatura, como O para un átomo de oxígeno, la posición de otros átomos en la cadena. En el lípido anfipático se muestran abajo las cargas parciales conferidas por un oxígeno, junto a una molécula de agua, y cómo se forma un puente de hidrógeno entre el lípido y una molécula de agua (línea punteada).

3. CLASIFICACIÓN DE LÍPIDOS

Tomando en cuenta los criterios y comentarios de la sección anterior, y con el afán de sistematizar el conocimiento de los lípidos, recientemente se ha propuesto un nuevo sistema para la clasificación y nomenclatura de todos los lípidos [2]. No solamente el sistema permite categorizar lípidos de diversos orígenes (eucarionte, procarionte, incluyendo *Archaea* o sintéticos), sino que nuevos lípidos pueden ser nominados y clasificados sin ambigüedad. El criterio toma como base las estructuras químicas que presenta cada lípido, con énfasis en los elementos hidrofílicos e hidrofóbicos, siguiendo muy de cerca las reglas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, y de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUPAC e IUBMB, por sus siglas en inglés). El sistema propone ocho grupos de lípidos, cada uno de los cuales se subdivide en clases y subclases. Otro de los acuerdos importantes en esta propuesta ha sido el denominar "radilo" a cualquiera de los sustituyentes grasos de los lípidos, ya sean grupos acilo, alquilo o alqueniolo. Así, en sentido estricto el sistema no rompe con las clasificaciones tradicionales de los lípidos, presentes en la mayoría de los libros de texto, sino más bien las actualiza y expande. En la figura 2 se muestra un ejemplo de cada uno de los ocho grupos, que pueden ser descritos como sigue:

i) Acilos grasos (código: FA, del inglés *fatty acyls*): Son moléculas producto de la elongación de cadenas de grupos acetil-CoA con malonil-CoA o metilmalonil-CoA. Este grupo representa la unidad fundamental de los lípidos, y como tal, es de suma importancia. Se incluyen tanto moléculas lineales, como el ácido palmítico de 16 carbonos, como moléculas con ramificaciones de diferentes

longitudes o que incluyen ciclos u otros grupos funcionales, como las prostaglandinas.

ii) Glicerolípidos (código: GL). Son todos los lípidos que contienen glicerol en su molécula, excepción hecha de los glicerofosfolípidos que, dada su importancia biológica, han sido catalogados en otro grupo. Básicamente, los glicerolípidos son los mono-, di- y tri-*radil*gliceroles, como los triglicéridos, principales sustancias de reserva energética.

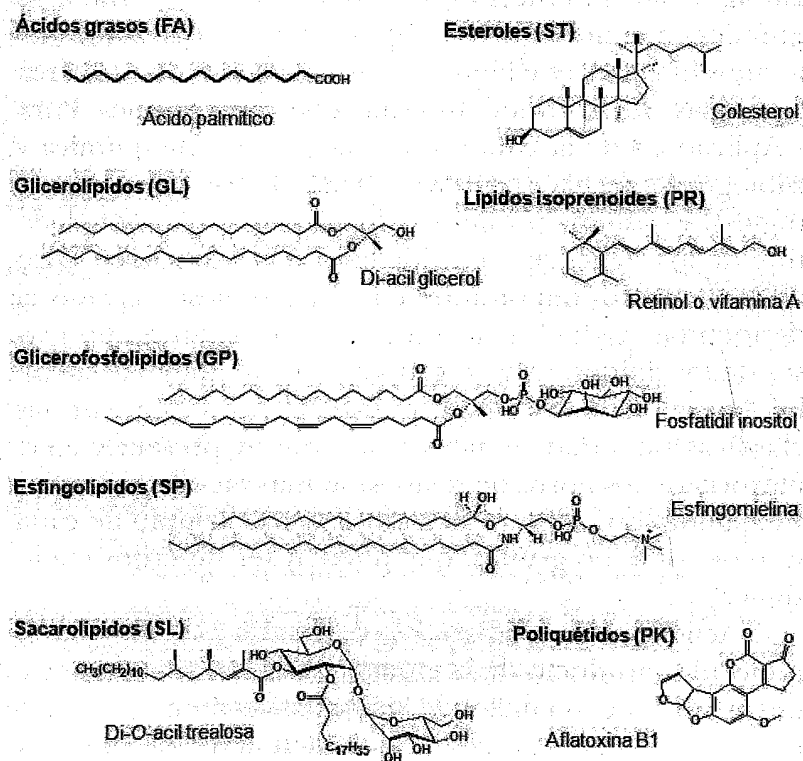


Figura 2. Estructuras representativas de los ocho grupos de lípidos, según la clasificación de mayor uso en la actualidad.

iii) Glicerofosfolípidos (código: GP, del inglés *glycerophospholipids*). Comúnmente llamados fosfolípidos, son los componentes lipídicos básicos de las membranas biológicas, y se encuentran constituidos por una o más moléculas de glicerol con los grupos -OH sustituidos por radilos grasos y una cabeza polar; la cabeza polar es de estructura variable pero siempre con un grupo fosfato (típicamente, en eucariontes esta cabeza polar se encuentra en la posición *sn-3* del glicerol). Es esta cabeza la que da pie a la clasificación de los glicerofosfolípidos en distintas clases, como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina, constituyentes mayoritarios de las membranas biológicas, que contienen serina y etanolamina como fragmentos polares, respectivamente. Algunos glicerofosfolípidos presentan estructuras más complejas, con varias moléculas de glicerol, como las cardiolipinas.

iv) Esfingolípidos (código: SP, del inglés *sphingolipids*). Los esfingolípidos son una clase compleja de compuestos que comparten una estructura esfingoide (así llamada por la dificultad que su caracterización representó), sintetizada *de novo* a partir de serina y un ácido graso de cadena larga. En este grupo se encuentran las ceramidas, que contienen un acilo graso unido mediante enlace amida a la base esfingoide, y lípidos más complejos, como los cerebrósidos y gangliósidos que, además de contener ceramida como estructura básica, incluyen uno o varios azúcares, o los esfingolípidos fosfatados de membrana, como la esfingomielina.

v) Esteroles (código: ST, del inglés *sterols*). Todos los esteroides tienen una estructura básica de cuatro anillos fusionados, y comparten vías biosintéticas. Son característicos de células eucariontes y su esqueleto hidro-

carbonado no es susceptible de degradación microbiana, lo que ha impulsado su uso como biomarcadores paleontológicos [3]. Curiosamente, y a pesar de su similitud estructural, sus roles biológicos son extremadamente diversos, y su clasificación está basada en sus funciones biológicas. La clase más conocida es la conformada por el colesterol y sus derivados, componentes fundamentales de membranas. Otra clase es la de los esteroides, que actúan como hormonas o mensajeros, y se dividen a su vez en subclases de acuerdo con el número de carbonos en su estructura; por ejemplo, la hormona progesterona y los corticoides pertenecen a la subclase C₂₁.

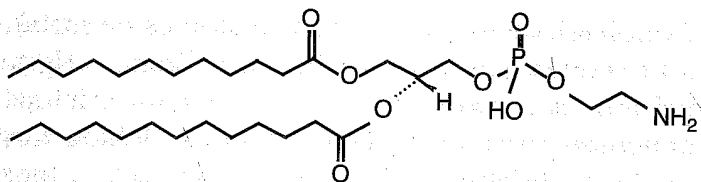
vi) Prenoles (código: PR). Los prenoles se sintetizan generalmente a partir de un precursor de cinco átomos de carbono, el isopentenil bifosfato o el dimetil alil bifosfato, formados en la vía del ácido mevalónico. Dado que se sintetizan mediante la adición de estas unidades de cinco átomos, se han clasificado de acuerdo con el número de unidades que los componen. Dos conocidos ejemplos de estos lípidos son los carotenoides y la vitamina A.

vii) Sacarolípidos (Código: SL). En estos compuestos los ácidos grasos están unidos directamente a los azúcares, de manera similar que al esqueleto de glicerol en glicerolípidos o glicerofosfolípidos. Los sacarolípidos se encuentran en bacterias y plantas, y los más comunes son los precursores de endotoxinas de bacterias Gram-negativas. Es importante notar que se ha evitado utilizar el término glicolípidos para nombrar a este grupo, ya que con este vocablo quedarían englobados lípidos clasificados en otros grupos, como los glicosfingolípidos.

viii) Poliquétidos (código: PK, del inglés *polyketides*). Los poliquétidos se sintetizan a partir de precursores parecidos a los de ácidos grasos, pero generan estructuras

más complejas, de mayor número de átomos de carbono, y en ocasiones con estructuras aromáticas. Algunos poliquétidos son antibióticos, como las tetraciclinas y eritromicinas; otros son potentes venenos. Debido a estas actividades biológicas, la dilucidación de las vías biosintéticas para la producción de poliquétidos ha merecido especial atención en los últimos años.

La clasificación de lípidos aquí descrita ha sido adoptada mediante acuerdos internacionales, los cuales han proveído, además, de una manera unívoca de clasificar a todas las especies lipídicas: el LIPID ID. De manera análoga al sistema internacional de clasificación de las enzimas, a cada especie lipídica se le ha asignado una clave alfanumérica de doce dígitos en donde los dos primeros corresponden al identificador de la base de datos (en este caso LM, por *lipid maps*), los siguientes dos a la clase de lípidos a la que pertenecen, los siguientes dos al grupo, los dos siguientes al subgrupo, y los últimos cuatro dígitos forman el identificador único de la especie lipídica. En algunos casos excepcionales, y debido a la complejidad de algunas estructuras, se usa un cuarto nivel de clasificación entre el nivel de subgrupo y los cuatro dígitos últimos, con lo que la *Lipid ID* se vuelve de 14 dígitos. Esta clasificación está recopilada dentro de bases de datos disponibles vía electrónica (por ejemplo, LIPID MAPS; dirección web: <http://www.lipidmaps.org>), en las cuales se establecen también las relaciones que guardan los lípidos entre sí, incluyendo información de sus vías de síntesis y degradación. En la figura se ilustra la manera de asignar el *Lipid ID*, tomando como ejemplo un glicerofosfolípido.



Lipid ID: LMGP02010008

Figura 3. Asignación de *Lipid ID* para un lípido. Tomando como ejemplo la 1-dodecanoil-2-tridecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, la clave se forma a partir del identificador de la base de datos "LM", las iniciales de la clase de lípidos a la que pertenece (GP para los glicerofosfolípidos), el grupo de glicerofosfolípidos (02 para glicerofosfoetanolaminas), la subclase (01 para diacilglicerofosfoetanolaminas) y el identificador particular del glicerofosfolípido (0008).

4. ROL BIOENERGÉTICO Y METABOLISMO DE LÍPIDOS

4.1. Lípidos de reserva y adiposomas

Para llevar a cabo sus funciones las células requieren de un importante aporte de energía, por lo que el desempeño de muchos procesos depende estrechamente de la disponibilidad de una fuente de abastecimiento energético y de la capacidad de un organismo para almacenar dicha energía; la forma más eficaz de su almacenamiento en una célula es en forma de lípidos, principalmente en forma de triglicéridos. En estas moléculas, los átomos de carbono se encuentran en su estado más reducido, generando durante su oxidación una gran cantidad de energía. Al ser activada la hidrólisis de triglicéridos, se liberan ácidos grasos, los cuales son degradados mediante un proceso llamado β -oxidación; en este proceso se desprenden moléculas de dos átomos de carbono a la vez, hasta llegar a bióxido de carbono y agua, y se genera una cantidad de

energía muy superior que la obtenida con cualquier otro tipo de molécula. En la mayoría de las células, la β -oxidación genera un gradiente de protones, cuya energía es capturada para la producción de ATP en mitocondrias; sin embargo, es interesante notar que en presencia de proteínas desacoplantes, como en mitocondrias de la llamada "grasa parda", el gradiente de protones se pierde y la energía es transformada en calor.

Cuando un organismo ingiere azúcares y ácidos grasos en exceso, éstos son transformados en lípidos neutros, principalmente triglicéridos que permanecen como reserva energética. Los triglicéridos son muy abundantes, pero altamente hidrofóbicos, y no pueden almacenarse en el medio acuoso de una célula sino dentro de organelos llamados adiposomas o cuerpos grasos. Algunas evidencias indican que luego de su síntesis en el retículo endoplásmico, los triglicéridos acumulados se rodean de fosfolípidos, formando así los adiposomas [4]. Estas estructuras almacenan también esteroides acilados, esenciales para la regulación del colesterol libre y para la síntesis de hormonas esteroideas, y contienen además una amplia variedad de proteínas evolutivamente muy conservadas, con importantes roles en lipólisis, lipogénesis, transporte vesicular, motilidad y mecanismos regulatorios. Se sabe, por ejemplo, que en los adiposomas se regula la administración de las reservas, principalmente para el aporte energético, pero también para la producción de lípidos que, al ser liberados por la hidrólisis de triglicéridos o a través de vías metabólicas subsecuentes, actúan como mediadores en procesos de señalización, entre otros.

Por otro lado, se ha demostrado que los adiposomas juegan un papel esencial para la homeostasis de lípidos no solamente en células especializadas en el almacenamiento de grasas, como adipocitos o células esteroideogénicas,

sino en muchos tipos celulares más [4], interviniendo inclusive en la interacción con agentes patógenos [5,6]. Así, la clásica imagen del adiposoma como mera estructura de almacenamiento, o como aislante térmico en tejido subcutáneo de algunas especies, ha dado paso a la percepción de un organelo extremadamente dinámico, con roles cruciales en procesos que van desde la embriogénesis al envejecimiento [7,8].

4.2. Vías metabólicas

Si bien el catabolismo de lípidos es la principal fuente de energía en una célula, su contraparte anabólica, llamada lipogénesis, representa un proceso de alto costo para el organismo. Múltiples enzimas, hormonas, vías de señalización y factores de transcripción se encuentran involucrados en ambos procesos, los cuales se relacionan de manera estrecha con el metabolismo de carbohidratos. En la figura 4 se muestra un esquema que muestra las relaciones generales entre el metabolismo de los principales lípidos. El glicerol, alcohol de 3 átomos de carbono, es transformado durante la glicólisis en fosfo-dihidroxi-acetona. Esta reacción es reversible para dar lugar a la síntesis de lípidos o de azúcares. Mediante la gluconeogénesis se obtiene glucosa-6-fosfato para la síntesis de glucosa. La generación de ácidos grasos *de novo* se inicia en el citosol de las células y, contrariamente a lo que se podría pensar, no utiliza simplemente la reversa de las reacciones de degradación (β -oxidación), sino un complejo de enzimas (el sistema de la sintetasa de ácidos grasos) que emplea moléculas de acil-CoA como precursoras para generar ácidos grasos de diferente número de carbonos, liberando en el proceso moléculas de bióxido de carbono. A partir de ácido palmítico se sintetizan otros

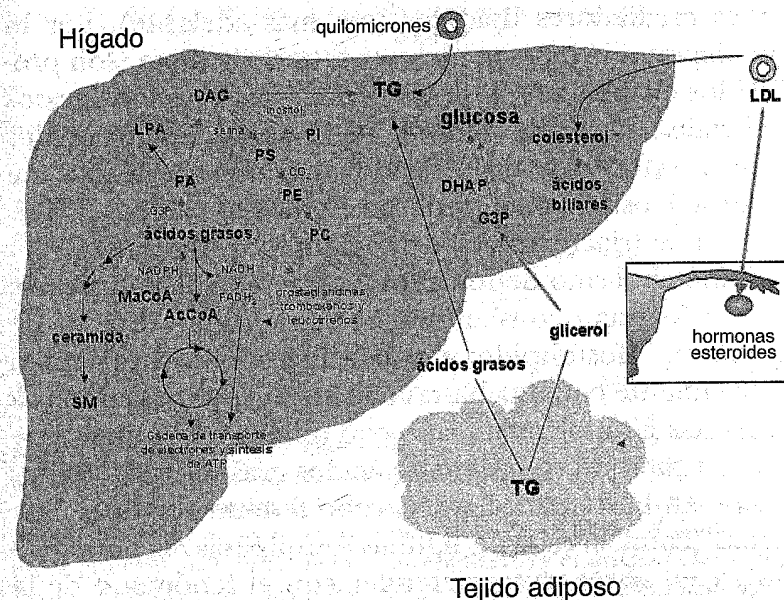


Figura 4. Principales vías metabólicas de lípidos. Se muestran las interrelaciones entre las rutas metabólicas de síntesis y degradación de los principales lípidos y algunos tejidos y órganos participantes. SM=esfingomielina; MaCoA=malonil coenzima A; AcCoA=Acetil coenzima A; PA=ácido fosfatídico; LPA=ácido lisofosfatídico; DAG=diacilglicerol; TG=triacilglicéridos; DHAP=dihidroxi acetona fosfato; G3P=gliceraldehído 3 fosfato; PS=fosfatidilserina; PE=fosfatidiletanolamina; PC=fosfatidilcolina; PI=fosfatidilinositol y LDL=lipoproteínas de baja densidad.

ácidos grasos, y se generan también ácidos grasos insaturados por efecto de las acil-CoA oxidasas.

Algunos ácidos grasos poliinsaturados, como los ácidos linolénico y araquidónico (de 18 y 20 carbonos, respectivamente), no se pueden sintetizar en células animales, incapaces de generar dobles enlaces más allá de la posición del carbono nueve de ácidos grasos. Curiosamente, estos ácidos poliinsaturados son precursores de impor-

tantes mediadores lipídicos (ver más adelante), por lo que tienen que incorporarse a partir de la dieta (son producidos en plantas), y se les conoce como ácidos grasos esenciales. Una vez sintetizados u obtenidos los ácidos grasos, éstos son esterificados en una molécula de glicerol-3-fosfato, para posteriormente dar origen a la formación de triacilglicéridos o fosfolípidos (figura. 4).

El metabolismo de fosfolípidos también es muy activo: las células están constantemente sintetizando lípidos de membrana (fosfolípidos y fosfo-esfingolípidos) y cuentan no solamente con una batería de enzimas para generar *de novo* estas biomoléculas, sino con diferentes enzimas que llevan a cabo un recambio de ácidos grasos de los lípidos *in situ*, en parte para llevar a cabo fenómenos de señalización (como el caso de algunas fosfolipasas A_2 , por ejemplo), y en parte para contender con el fenómeno de la peroxidación de ácidos grasos insaturados en las membranas biológicas. Ya que los ácidos grasos insaturados (con dobles ligaduras entre carbonos) son particularmente sensibles a los efectos deletéreos de reacciones pro-oxidantes, es crítico contar con mecanismos de recambio de los mismos, puesto que sólo así se puede garantizar que las biomembranas conserven sus características. Los fosfolípidos son catabolizados mediante fosfolipasas que se clasifican según el sitio de corte, generando productos entre los que se encuentran mediadores de señalización (figura 5).

Existe otra serie de enzimas que se encarga del metabolismo de esfingolípidos de membranas, dando lugar a biomoléculas como la ceramida-1-fosfato y la esfingosina-1-fosfato, con importantes roles en crecimiento y muerte celular [9].

Por su parte, el catabolismo de esteroides está a cargo de diferentes vías. La hidroxilación, la óxido-reducción

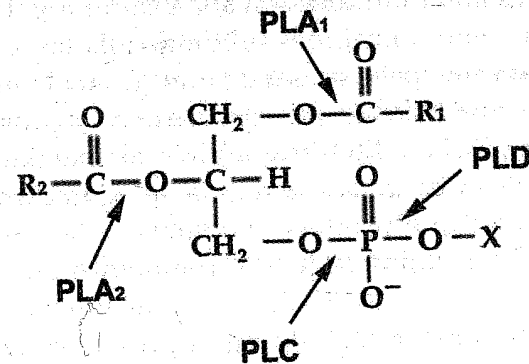


Figura 5. Las principales clases de fosfolipasas. La figura muestra los sitios de corte en un fosfolípido tipo X (X marca el grupo polar; R_1 y R_2 cadenas hidrocarbonadas); PLA_1 son las fosfolipasas tipo 1, que cortan y liberan el ácido graso en la posición *sn*-1; PLA_2 libera el ácido graso en la posición *sn*-2, PLC libera el diacilglicerol y el grupo polar y finalmente, PLD libera un ácido fosfatídico y la cabeza polar del fosfolípido.

y la conjugación con sulfato o glucurónidos son las vías utilizadas por el hígado para modificar esteroides, haciéndolos inactivos, más hidrofílicos y con mayor tendencia a ser transportados y secretados por las células hepáticas, para finalmente ser excretados del cuerpo.

4.3. Alteraciones patológicas del metabolismo de lípidos

Un desbalance de la reserva lipídica acarrea disfunciones que provocan patologías muy diversas, entre las que se cuentan defectos del desarrollo, así como un sinnúmero de síndromes metabólicos, algunos de ellos mortales. Actualmente, varios de los principales flagelos en materia de salud implican alteraciones en el metabolismo de lípidos. Basta mencionar, a guisa de ejemplo, la pandemia de obesidad que afecta al menos a unos 400 millones

de personas en el mundo, atacando tanto a países industrializados como a naciones subdesarrolladas, e incidiendo sobre las principales causas de muerte en el mundo: diabetes, enfermedades cardiovasculares y algunas formas de cáncer [10,11]. En vertebrados, el metabolismo de carbohidratos y de grasas se regula antagónicamente por dos hormonas que produce el páncreas: la insulina y el glucagon. La insulina induce un aumento en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos en el hígado y en el tejido adiposo, mientras que el glucagon promueve la lipólisis. Sin embargo, los elementos que regulan estas funciones son múltiples y complejos, y constantemente se encuentran nuevos factores. También existen casos en los que la alteración de una sola enzima genera por sí sola síndromes mortales; ejemplos son las enfermedades de Tay-Sachs o de Niemann-Pick, relacionadas con defectos en enzimas del catabolismo de esfingolípidos, y la adrenoleucodistrofia, trastorno ocasionado por la acumulación de ácidos grasos de cadena larga en el cerebro, debido a la ausencia de función de un transportador ABC (12).

Los padecimientos más frecuentes relacionados con el metabolismo de lípidos tienen un carácter multifactorial. Por ejemplo, se sabe que unos 150 genes de mamíferos se encuentran regulados por la insulina, principalmente a nivel transcripcional a través de las proteínas de unión a elementos regulatorios de esteroides (SREBPs, por sus siglas en inglés) [11]. Ante la dificultad que este tipo de panorama representa, muchas son las incógnitas sin resolver para la comprensión de estas enfermedades. Una herramienta prometedora es el uso de organismos modelo, en donde una menor complejidad y rapidez en el análisis pueden auxiliar en la dilucidación de elementos críticos dentro de dichos padecimientos.

4.4. Modelos para el estudio del metabolismo de lípidos

Las moléculas que intervienen en enfermedades metabólicas son numerosas e involucran procesos complejos, por lo que el uso de herramientas genéticas resulta muy valioso; por ejemplo, la obtención de organismos mutantes permite esclarecer *in vivo* la relevancia de la pérdida de una función determinada. En la actualidad, la disponibilidad de datos genómicos facilita en gran medida la búsqueda de genes involucrados en el metabolismo de lípidos a partir de organismos modelo. Entre los organismos con genoma secuenciado que han sido utilizados como modelo para el estudio de vías metabólicas de lípidos se encuentran la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, el hongo *Candida albicans*, la bacteria *Escherichia coli*, el ratón *Mus musculus*, e inclusive la planta *Arabidopsis thaliana*. De éstos, la mosca de la fruta y el ratón destacan como excelentes modelos para el estudio de lípidos por ser organismos multicelulares, complejos, de reproducción sexual y con susceptibilidad a enfermedades análogas a las encontradas en humanos. Ambos ofrecen la potencialidad de observar cambios fenotípicos a distintos niveles, desde el orgánico hasta el molecular, empleando una variada gama de herramientas genéticas. El uso de estos organismos ha aportado evidencias claras sobre la importancia de genes y enzimas del metabolismo de lípidos. Por ejemplo, ratones con mutaciones nulas en genes implicados en la regulación de la insulina han ayudado a comprender mejor la resistencia a ésta, así como su relación con la diabetes y el metabolismo lipídico [13].

En nuestro grupo de trabajo utilizamos a la mosca de la fruta como un modelo para esclarecer la importancia

y función de genes, enzimas y productos del metabolismo de lípidos. Además de las evidentes ventajas de ser un organismo modelo genético, mencionadas arriba, por su ciclo de vida corto, pequeña talla, bajo costo, y facilidad de manejo, *Drosophila melanogaster* es actualmente un organismo idóneo para el estudio de procesos fisiológicos, especialmente del metabolismo de lípidos. Su genoma, convenientemente pequeño, contiene una importante homología con el genoma humano: hasta un 75% de los genes que en humano se encuentran asociados con patologías presentan ortólogos en la mosca de la fruta, incluyendo genes involucrados en el metabolismo de lípidos [14]. Uno de los fenómenos que nos ha interesado es la relación entre el metabolismo de lípidos, los genes implicados y la transducción sensorial. Utilizando herramientas genéticas en *Drosophila*, uno de nosotros mostró *in vivo* cómo el catabolismo de fosfolípidos derivados de la acción de la fosfolipasa C conlleva a la formación de segundos mensajeros esenciales para la transducción de estímulos olfatorios y visuales [15].

Sin embargo, no solamente los clásicos segundos mensajeros generados por la fosfolipasa C, diacil-glicerol e inositol-trifosfato, son capaces de intervenir en fenómenos de transducción sensorial. Actualmente caracterizamos cómo productos de la cascada de la fosfolipasa A₂ y de las reacciones inversas correspondientes, es decir de acil-transferasas, actúan también sobre la transmisión de estímulos sensoriales (Gimate-Baños *et al.*, en preparación). *Drosophila* también ha servido para caracterizar los efectos metabólicos y la transducción de señales mediada por la vía de la insulina. De manera interesante, usando moscas con mutaciones en genes de la vía de la insulina, que semejan diabetes tipo II, también llamado modelo de "moscas diabéticas", se ha podido demostrar cómo esta

vía es fundamental no solamente para la regulación de lípidos y carbohidratos en el organismo, sino también para controlar el crecimiento del mismo y de sus órganos y tejidos durante el desarrollo [16, 17]. Continuamos analizando este fenómeno en el laboratorio.

5. LOS LÍPIDOS COMO SOPORTE ESTRUCTURAL DE LA CÉLULA

Algunos lípidos, como aquellos que se acumulan a manera de reserva energética, tienen estructuras altamente hidrofóbicas. Muchos otros son anfipáticos; son precisamente estos últimos los que permiten la formación de distintas estructuras celulares. Si un lípido anfipático es colocado en una solución acuosa, su porción apolar tenderá a minimizar el contacto con las cargas eléctricas parciales del agua, alineándose con las porciones apolares de lípidos cercanos. Por el contrario, los grupos polares de los lípidos buscarán estabilizarse por interacciones iónicas y puentes de hidrógeno entre ellos mismos y con moléculas de agua (ver figura 1). Estos acomodos dan lugar a la formación de una monocapa del lípido en la interfase aire-agua (figura 6). Si la concentración del lípido es tal que las moléculas no pueden quedar integradas en monocapa, se da lugar a la formación de estructuras llamadas micelas, en donde únicamente las porciones polares, hidrofílicas, quedan expuestas en el medio. De la misma manera, esta forma de integrarse hace posible la formación de membranas, estructuras con una doble capa de lípidos, capaz de delimitar una célula o un compartimento celular (figura 6). La membrana confiere un carácter impermeable a las células ante el embate de sustancias polares. Solamente los gases son capaces de atravesar la bicapa de manera libre.

Por otra parte, sustancias altamente hidrofóbicas atraviesan las membranas fácilmente, mientras que la transferencia de iones y metabolitos hidrosolubles (esenciales para la célula y a los que las membranas son impermeables) dependen de proteínas para su traslocación que, integradas en la membrana, permiten un tráfico eficiente y selectivo de la célula con el exterior. Existen proteínas de membrana cuya composición es básicamente hidrofóbica, pero también proteínas con segmentos transmembranales apolares, alternados por fragmentos polares localizados extracelularmente y/o en el citoplasma.

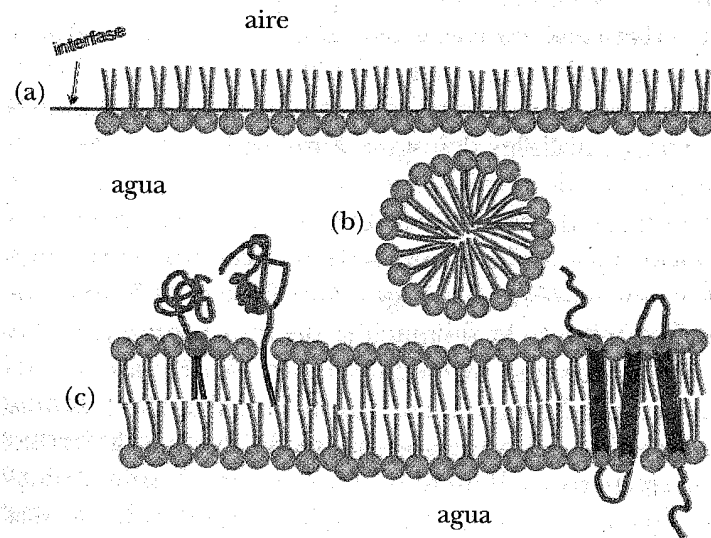


Figura 6. Estructuras formadas por lípidos anfipáticos en medios acuosos. (a) Monocapas, (b) micelas, (c) bicapas lipídicas. En una bicapa lipídica pueden insertarse proteínas altamente hidrofóbicas, así como proteínas que contengan fragmentos lipídicos (ilustrada en rojo y negro en medio), puentes de glicosil fosfatidil inositol (ilustrada en rojo, negro y naranja a la izquierda) o dominios hidrofóbicos localizados de manera transmembranal (ilustrados como cilindros a la derecha).

Los lípidos y las proteínas de membrana no se encuentran distribuidos de manera homogénea ni al azar. Las bicapas son estructuras asimétricas. Algunos lípidos son característicos de la cara citosólica, como la fosfatidilserina, así como hay componentes típicos de la capa externa, como la fosfatidilcolina. Las características de estos lípidos resultan determinantes para las funciones de la célula. Dependiendo de la estructura de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, y de su geometría, las membranas presentan propiedades biofísicas particulares. Por ejemplo, una membrana presenta una mayor o menor fluidez a una temperatura determinada dependiendo de los lípidos que la conforman. Esta característica de fluidez permite la movilidad de componentes lipídicos y proteicos a través de la bicapa. Pero además, lípidos y proteínas pueden concentrarse en zonas delimitadas, caracterizadas por un alto contenido en glicosfingolípidos, con cadenas saturadas, y colesterol.

Cabe mencionar que desde hace más de cuarenta años se tenía ya la noción de que las propiedades biológicas de una membrana dependían fuertemente de su contenido en colesterol, que se integra en la porción hidrofóbica de las membranas [18].

El viejo modelo de membranas llamado de mosaico fluido, en donde los lípidos se movían lateralmente de manera libre y aleatoria [19], dio paso a otro en donde las membranas presentan zonas heterogéneas bien definidas, los microdominios [20]. Los microdominios son zonas organizadas de manera peculiar y temporal en membranas biológicas. En ellos, el alto contenido en colesterol y esfingolípidos confiere un empaquetamiento firme, en donde el acceso queda restringido únicamente a determinadas proteínas. Existen microdominios planos, llamados balsas lipídicas, que delimitan "plataformas" en

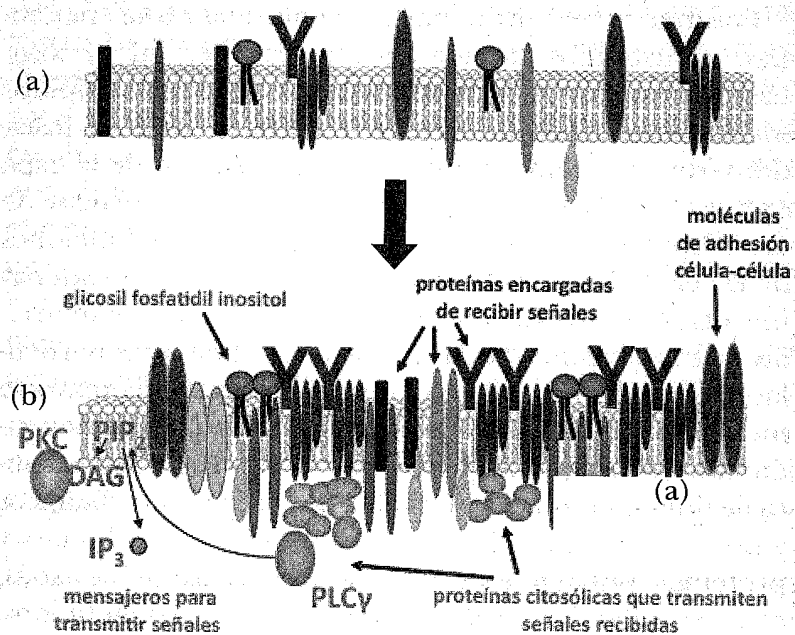


Figura 7. Dominios membranales. La composición de lípidos en una membrana es diferencial y variable, dando lugar a dominios formados temporalmente. Si los lípidos generan una fase desordenada, las proteínas se localizan de manera aleatoria (a), pero en regiones de empaquetamiento lipídico se concentran proteínas, lo cual favorece interacciones (b) PKC, proteína cinasa C; DAG, diacil glicerol; PLC γ , fosfolipasa γ ; PIP₂, fosfatidil inositol bifosfato; IP₃, inositol trifosfato.

donde se congregan proteínas y lípidos necesarios para la transducción de señales, o para la interacción de una célula con otros tipos celulares o con virus y toxinas [21]. Otros microdominios estructurados en forma de invaginaciones, las caveolas, han emergido también como estructuras clave para fenómenos de endocitosis, transci-tosis, señalización celular, o para interacciones de la célula con bacterias, virus o toxinas [23]. En la figura 7 se ilustra cómo la formación de un microdominio membranar

permitiría un óptimo señalamiento celular. La formación de microdominios parece tener un rol importante en la fusión y fisión de membranas, fenómenos esenciales para múltiples procesos celulares, tales como la división celular, la liberación de neurotransmisores o el tráfico vesicular [24].

6. LOS LÍPIDOS, MEDIADORES DE COMUNICACIÓN CELULAR

El papel de los lípidos en el funcionamiento de una célula no se reduce al aporte energético, a la formación de barreras estructurales o a la importante capacidad que tienen de determinar la fluidez o la forma de un microdominio membranar, influyendo en la actividad de proteínas allí presentes. Actualmente se sabe que cada tipo de lípido participa de manera activa en una o múltiples funciones celulares. En los siguientes apartados describiremos funciones en comunicación celular de lípidos de animales, para lo cual los hemos agrupado según su implicación en vías metabólicas compartidas: 1) esteroides, 2) mediadores lipídicos derivados de glicerofosfolípidos y 3) derivados esfingoides. Después, mencionaremos de manera breve cómo los lípidos de procariontes, con características estructurales muy diversas, son también capaces de mediar diversas actividades biológicas.

6.1. Los esteroides

Los esteroides han sido reconocidos desde hace tiempo como mensajeros de comunicación celular. Muchos esteroides son hormonas secretadas por glándulas endócrinas, que viajan en el torrente sanguíneo en verte-

brados, o en la hemolinfa en invertebrados, hasta llegar a su célula blanco. En virtud de su pequeña talla e hidrofobicidad, los esteroides son capaces de atravesar la membrana celular de manera libre. Ya en el interior de la célula, luego de formar complejos ligando-receptor, se translocan al núcleo y regulan la expresión de genes. Entre los múltiples procesos regulados por los esteroides se encuentran el desarrollo y función de órganos reproductores, la conducta sexual, la regulación del metabolismo de azúcares, la inflamación y la respuesta al estrés. Adicionalmente, los esteroides también pueden actuar de manera independiente a la regulación transcripcional (los llamados 'efectos no genómicos'). Esto ocurre en algunos tipos celulares, en donde modulan cascadas de señalización, canales iónicos o receptores acoplados a proteínas G [25]. Algunos ejemplos de hormonas esteroides son los estrógenos, los andrógenos, la progesterona y los corticoides.

6.2. Mediadores derivados de glicerofosfolípidos

A diferencia de las hormonas esteroides, otros lípidos con importantes funciones en comunicación celular no son transportados en el torrente sanguíneo o hemolinfa, sus acciones son más bien locales: parácrinas, autócrinas e intrácrinas. De manera colectiva, estos lípidos de señalización inter e intracelular son llamados mediadores lipídicos y, en combinación con otras moléculas señalizadoras (citosinas, hormonas, neurotransmisores), intervienen en fenómenos de proliferación y diferenciación celular, el funcionamiento de los sistemas reproductor, gastrointestinal y cardiovascular, así como en procesos inflamatorios y en la respuesta inmune [26].

Aunque desde los años cincuenta del siglo pasado el recambio de fosfolípidos de membrana ante estímulos específicos ya había sido observado, el parteaguas que dio lugar a una distinta percepción de lípidos de membrana fue la demostración de que dos productos del catabolismo de fosfolípidos eran sustancias clave en la comunicación celular: en 1980 se demostró que el diacilglicerol (DAG) era un ligando de la proteína cinasa C (PKC), una enzima implicada en la respuesta celular ante agonistas tales como hormonas, neurotransmisores o factores de crecimiento [27]. Poco tiempo después se demostró que el inositol (1,4,5)-trifosfato (IP_3) es un regulador de flujos de calcio [28], fenómeno indispensable para un sinnúmero de funciones celulares. El precursor del IP_3 es el fosfatidil inositol (4,5)-bifosfato (PIP_2), un fosfolípido de membrana. El hallazgo de que también el precursor del PIP_2 , el fosfatidil inositol, junto con otros fosfatidil inositoles, participan directamente en la comunicación celular dio pie al estudio de una de las vías de señalización más importantes en biología, la de los fosfoinosítidos y los inositol fosfatos [29,30]. A partir del fosfatidil inositol, cinasas y fosfatasas dan origen a siete diferentes fosfolípidos fosforilados (los fosfoinosítidos), los cuales son reconocidos por motivos proteicos específicos. Cada fosfoinosítido desempeña múltiples roles, y su disfunción se ha ligado a importantes enfermedades, como cáncer y diabetes. Por ejemplo, el $PI(4,5)P_2$ puede regular entre otras funciones tráfico vesicular, canales iónicos o adhesión celular [30].

También a partir de los fosfoinosítidos se deriva toda una serie de inositoles no lipídicos con gran actividad biológica. Además del ya mencionado inositol(1,4,5)-trifosfato, generado junto con el DAG por la acción de fosfolipasas C sobre el $PI(4,5)P_2$ (ver figura 7), existe

al menos unas sesenta diferentes especies activas de fosfoinositoles [29].

Pero el fosfatidil inositol y su precursor, el ácido fosfatídico, no son los únicos fosfolípidos que dan origen a mediadores lipídicos. El catabolismo de varios fosfolípidos de membrana (glicerofosfolípidos y fosfoesfingolípidos) es una importante fuente de moléculas señalizadoras. Como parte de una biomembrana, los fosfolípidos constituyen sustancias relativamente inertes. Sin embargo, bajo la acción de distintas señales y enzimas, sus estructuras se fragmentan, y sus componentes se transforman a productos muy diversos, en procesos en los que tanto enzimas como radicales libres pueden intervenir (figura 8). Una vez sintetizados, la mayor parte de estos mediadores lipídicos actúan a través de su unión con receptores de siete pasos transmembranales acoplados a proteínas G. Las señales derivadas de esa unión son extremadamente diversas y dependen de la proteína G involucrada, la cual suele variar entre distintas localizaciones (membrana citoplásmica o nuclear) o estirpes celulares [31]. También pueden ser moduladas por la formación de complejos heterólogos entre receptores [32].

Para los glicerofosfolípidos, el proceso catabólico más importante es la cascada iniciada por la fosfolipasa A₂ (PLA₂). Esta enzima rompe la cadena grasa en posición sn-2 de los fosfolípidos, liberando por un lado un ácido grasoso (comúnmente poliinsaturado), y por otro lado un liso-fosfolípido (figura 8). El liso-fosfolípido es un producto con actividad intrínseca como mensajero celular [33], pero además, es precursor de mediadores de otro tipo: los lípidos de tipo factor activador de plaquetas (PAF) o alquil fosfolípidos, los cuales, aunque tienen pocas variaciones estructurales con respecto a los liso-fosfolípidos, son reconocidos por receptores distintos,

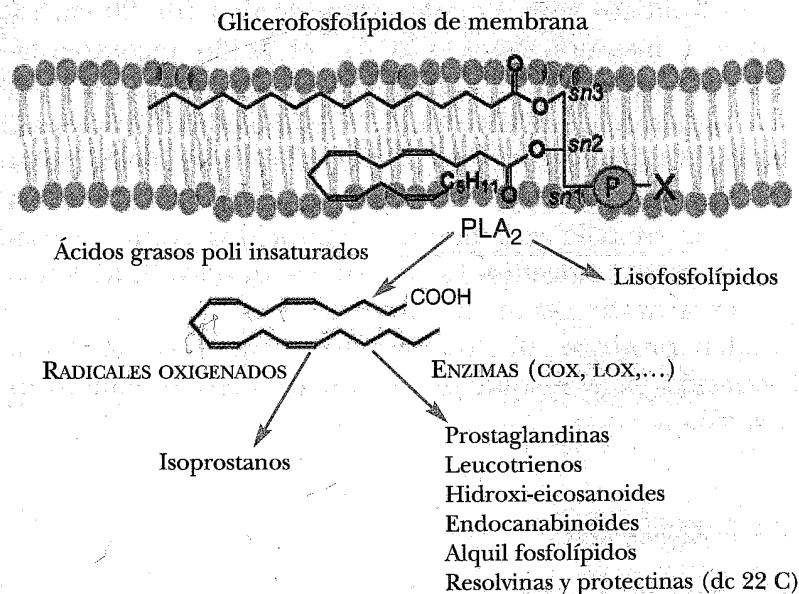


Figura 8. El catabolismo de glicerofosfolípidos genera mediadores lipídicos. Bajo la acción de fosfolipasas A₂ (PLA₂), los fosfolípidos se fragmentan en liso-fosfolípidos y en ácidos grasos insaturados. Cada uno de estos componentes, además de tener actividad propia, puede generar mensajeros celulares con un sinnúmero de efectos, similares u opuestos. Las enzimas involucradas en la síntesis de estos mediadores son ciclooxigenasas (COX), lipooxigenasas (LOX), transacilasas (TA) y fosfodiesterasas (PDE). Otros mediadores se forman por la acción de especies intermediarias reactivas de oxígeno (IRO). La figura muestra únicamente estructuras representativas de cada grupo de mensajeros. X = grupo polar.

dando lugar a fenómenos biológicos muy particulares. Por su parte, el ácido grasoso liberado es susceptible de ser transformado por distintas enzimas (ciclooxigenasas, lipooxigenasas, oxidasas de citocromo P450) o por radicales libres, para dar lugar a una serie de productos oxidados que son mediadores lipídicos. En los vertebrados los ácidos grasos poliinsaturados que dan origen a media-

dores lipídicos son el ácido araquidónico (de 20 carbonos y 4 insaturaciones, C20:4), el ácido eicosapentaenoico (C20:5) y el ácido docosahexaenoico (C22:6) [34]. Prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, lipoxinas, endocannabinoides e isoprostanos son las principales familias derivadas de ácidos grasos insaturados, mismos que por su talla son también conocidos como eicosanoides y docosanoides. Es de notarse que los lípidos formados a partir de un mismo precursor de ácido graso pueden producir efectos totalmente opuestos, como la inducción o la resolución de un proceso inflamatorio [34,26].

6.3. Esfingolípidos

La otra vía catabólica involucrada en la formación de mediadores lipídicos es la de los esfingolípidos. A partir de fosfoesfingolípidos de membrana, como la esfingomielina, una serie de enzimas dan lugar a varios derivados que pueden causar efectos similares o diametralmente opuestos entre ellos (figura 9). La ruptura de esfingomielina, provocada por una esfingomielinasa, genera una molécula de ceramida que, uniéndose a distintos blancos (catepsina D, PKC ζ , fosfatasa), induce fenómenos como diferenciación, apoptosis y bloqueo del ciclo celular [35]. La ceramida —también sintetizada *de novo*, a partir de serina y palmitato— puede ser fosforilada para generar la ceramida-1-fosfato, molécula implicada en fagocitosis y en tráfico vesicular. Bajo la acción de otra enzima, la ceramidasa, la ceramida se rompe para generar esfingosina, la cual en su forma fosforilada, la esfingosina-1-fosfato, induce funciones como proliferación, angiogénesis y protección de muerte apoptótica [35].

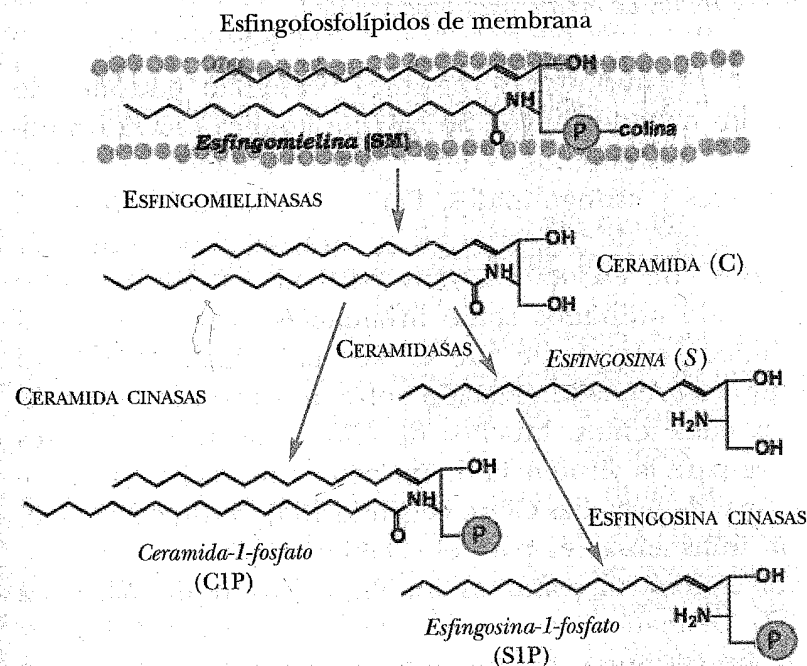


Figura 9. Mediadores lipídicos derivados de esfingolípidos. A partir de esfingofosfolípidos que dan estructura a la membrana y predominan en microdominios, como la esfingomielina de mamíferos, varias enzimas se encargan de producir metabolitos que actúan como mensajeros celulares. Sus acciones son muy diversas (ver texto), y actúan en concentraciones muy bajas.

La esfingosina-1-fosfato es también considerada un lisofosfolípido, y muchas de sus funciones son llevadas a cabo por su unión a los receptores específicos S1P. Se sabe, por ejemplo, que el estrés por calor, por radiación UV y la activación de receptores de muerte inducen la formación de ceramida, y que factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias intervienen en la síntesis de esfingosina-1-fosfato; sin embargo, la regulación de todas estas transformaciones de lípidos esfingoides es aún un enigma [35].

6.4. Lípidos de organismos procariontes

Los organismos procariontes presentan patrones de lípidos muy distintivos. Su barrera lipídica está constituida por fosfolípidos, y en algunos contados casos por esteroides y esfingolípidos. Pero de manera interesante, cada grupo de procariontes se caracteriza por sintetizar lípidos con estructuras muy particulares. Estos lípidos han sido utilizados como invaluable marcadores taxonómicos, además de que se sabe participan de manera muy activa en la interacción entre procariontes y organismos eucariontes. Muchos de ellos constituyen factores clave para la virulencia de un patógeno, como las endotoxinas de bacterias Gram negativas [36]; otros, en cambio, son indispensables para el establecimiento de una relación simbiótica, como los lipooligosacáridos de *Rhizobium* [37]. De manera interesante, el estudio y el uso de lípidos en procariontes ha funcionado, de paso, como una valiosa herramienta para comprender mejor varios procesos celulares en eucariontes, tanto aquellos altamente conservados, como la inmunidad innata [38], como fenómenos exclusivos de algunos vertebrados (incluyendo el humano), como es la respuesta inducida en células T por lípidos anfipáticos, benéfica para el control de infecciones, pero asociada con procesos de alergia y autoinmunidad [39].

6.5. Otros aspectos de las actividades biológicas de los lípidos

Al asociarse con otras biomoléculas, los lípidos realizan otras funciones además de las que tienen de suyo. Es de notarse que muchas proteínas se modifican de manera

covalente (post-traduccionalmente), o no covalente, mediante una unión a motivos lipídicos que son indispensables para sus funciones (26). Distintas clases de lípidos como esteroides, glicerolípidos, fosfolípidos y glicolípidos, pueden unirse a proteínas. Los enlaces covalentes generalmente incluyen funciones amida, éter o éster a aminoácidos como glicina o cisteína [40]. Estas modificaciones son indispensables para el anclaje de proteínas a una membrana, para su localización en la capa interna o externa de la misma, y para su tráfico entre organelos y dominios; muchas veces se requiere del anclaje de más de un lípido para la funcionalidad de la proteína. Por razones de espacio no detallamos aquí los tipos e implicaciones de estas modificaciones, pero a título de ejemplo mencionamos dos casos: el de la proteína Hedgehog, importante morfógeno que es incapaz de señalizar en ausencia de sus motivos lipídicos, un palmitato y un esteroide [41], y el de Ras, una proteína de transducción de señales, cuya localización y capacidad de señalización se encuentran reguladas por su unión covalente a lípidos isoprenoides [40].

Para concluir, cabe resaltar que un aspecto en común entre todos los lípidos bioactivos aquí mencionados es el pobre conocimiento de los mecanismos involucrados en su función. Para muchos de ellos se conocen receptores específicos, pero la información sobre su metabolismo y su regulación es muy escasa. Para otros, los mecanismos son solamente especulativos. Seguramente, el abordaje de las propiedades biofísicas de los lípidos de membrana contribuirá a entender mejor muchas de las funciones reguladas por éstos.

7. MEMBRANAS ARTIFICIALES

Muchos de los conocimientos sobre las características que un determinado lípido confiere a las membranas biológicas han sido obtenidos gracias al uso de membranas modelo. La peculiaridad de los lípidos anfipáticos de formar monocapas o bicapas de manera espontánea ha sido aprovechada para el diseño de membranas artificiales. Así, se han generado membranas con proporciones precisas de lípidos que sirven para explorar la influencia de la composición lipídica sobre diversas propiedades, como la fluidez, permeabilidad o interacción entre componentes.

Las estructuras que forman los lípidos de manera espontánea corresponden a tres tipos: las monocapas, las bicapas, como las biomembranas, y los liposomas. Las monocapas se forman en la interfase aire-agua de un medio acuoso (ver figura 6); si el agua se evapora, queda una membrana monomolecular llamada monocapa de Langmuir, y si la monocapa se transfiere sobre un sustrato sólido se obtienen las películas de Langmuir-Blodgett [42]. Fenómenos como espesor, tensión superficial e interfacial, fuerzas de interacción o transferencia de fármacos pueden ser analizados en monocapas de lípidos.

Las bicapas de lípidos, formadas por diferentes métodos, suelen ser el modelo favorito para experimentos de electrofisiología *in vitro* pues ofrecen muchas ventajas. En estos protocolos se controla tanto el medio debajo de la bicapa, como por encima de ella, además de la composición de la bicapa misma. Insertar proteínas de membrana como canales iónicos, receptores, o enzimas permite controlar de manera efectiva las condiciones experimentales. Así, se puede estudiar el efecto de la composición del medio o de la bicapa misma en el funcionamiento de

las proteínas en estudio; esto ha permitido, entre otras aplicaciones, estudiar el comportamiento de proteínas de endomembranas a las que normalmente no es posible acceder por métodos electrofisiológicos tradicionales [43]. También son un modelo útil, entre otras aplicaciones, para estudiar los efectos de la composición lipídica en el comportamiento de microdominios ricos en esfingolípidos y esteroides, usando microscopía de fluorescencia y este tipo de lípidos acoplados con fluoróforos [44].

Los liposomas resultan del arreglo de lípidos en el seno de un medio acuoso, con la formación de vesículas formadas por bicapas concéntricas de lípidos (liposomas multilaminares). A partir de estas estructuras multilaminares puede darse origen a vesículas de una sola bicapa de lípidos, los liposomas unilaminares, los cuales han sido extensamente utilizados como modelos de membranas. Las metodologías para formar liposomas de una sola bicapa incluyen: la sonicación, la hidratación lenta de mezclas de lípidos, la filtración de vesículas multilaminares a través de tamices de talla específica, y el método de electroformación, en el que un campo eléctrico genera una vibración de los lípidos según las frecuencias correspondientes a su momento bipolar eléctrico [45].

La talla de liposomas unilaminares depende del método de preparación. Por sonicación se obtienen liposomas unilaminares pequeños (SUVs, del inglés *small unilamellar vesicles*), de 15 a 30 nanómetros de diámetro. Otros métodos dan origen a liposomas unilaminares grandes (LUVs, del inglés *large unilamellar vesicles*), con cientos de nanómetros de diámetro, o a vesículas unilaminares gigantes (GUVs, del inglés *giant unilamellar vesicles*) que, con decenas de micras de diámetro, posibilitan la incorporación de mezclas complejas de lípidos y proteínas, además de ser visibles en microscopía de contraste de fases o de fluorescencia [45].

Si bien las membranas artificiales son un abordaje reduccionista para estudiar biomembranas, la información que han generado resulta crucial para entender, entre otros, cómo cada lípido influye en la organización lateral de las mismas. Así, se sabe que los lípidos saturados, como esfingolípidos, y el colesterol generan fases ordenadas, aun a temperaturas en donde la membrana se encuentra en estado líquido (46). Se sabe también que mientras algunos lípidos tienen una geometría cilíndrica, otros son cónicos, y otros más poseen estructuras de cono invertido, promoviendo distintos tipos de curvaturas en la membrana, con implicaciones en fenómenos de reconocimiento enzimático, fisión, fusión y transporte.

En vesículas unilaminares gigantes o GUVs, no solamente se han integrado mezclas complejas (de más de tres componentes), sino también proteínas de membrana, extractos lipídicos naturales e inclusive biomembranas [46]. Las membranas artificiales permiten, también, integrar sondas fluorescentes que, como ya se mencionó, en donde además de lípidos, las proteínas pueden ser marcadas a fin de analizar su localización o su interacción con otros componentes. Entre las metodologías que han sido utilizadas para obtener información estructural y dinámica de membranas modelo, destacan las espectroscopias de fluorescencia e infrarroja, la calorimetría diferencial de barrido, la resonancia magnética nuclear, la difracción de rayos X y las microscopías de fuerza atómica y de fluorescencia [45,46].

Por ejemplo, para detectar heterogeneidades en la distribución de lípidos suelen usarse sondas que sufren un apagamiento de su fluorescencia al estar en contacto con algún lípido en particular; o experimentos de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*, por sus siglas en inglés) en donde una sonda fluoresce sólo al excitarse

con la energía emitida por otro fluorocromo al que se ha excitado previamente presente en otra molécula en estrecha cercanía, y que sirve para analizar la cercanía entre dos moléculas [45]. Las sondas cuya fluorescencia es sensible a la relajación bipolar del medio son utilizadas para visualizar zonas ordenadas y desordenadas de una bicapa, así como cambios en fluidez de las membranas, a veces como función de la temperatura [46]. En síntesis, durante las últimas cuatro décadas se ha generado una gran cantidad de información estudiando membranas modelo, pero muchas incógnitas sobre las bases físicas de la organización de membranas biológicas y, especialmente, de sus implicaciones funcionales permanecen aún sin resolverse.

8. LIPIDÓMICA, EL ESTUDIO SISTEMÁTICO DE LÍPIDOS

8.1. Los inicios de la lipidómica y sus aportaciones

A partir de 1995, la secuenciación de varios genomas dio inicio a estudios más sistemáticos de las funciones celulares, que los expertos han clasificado como genómica, transcriptómica y proteómica. El desarrollo de estas disciplinas, enfocadas al estudio sistemático de productos directamente relacionados con los genes (DNA, RNA y proteínas), abrió brecha para la búsqueda sistematizada de información más integrativa a fin de comprender el metabolismo de la célula. A esta disciplina de estudio, llamada metabolómica, le corresponde la búsqueda de productos sin relación directa con un solo gen, es decir la búsqueda de cambios postraduccionales de proteínas, de carbohidratos, de lípidos y de metabolitos en general. En lo que concierne a lípidos, no es de sorprenderse que

su carácter hidrofóbico y estructuralmente diverso haya generado un rezago importante en su estudio. Una célula eucariota contiene más de 1000 especies distintas de lípidos [24], muchos de ellos dispuestos de manera diferencial en las membranas. A principios de este milenio algunos expertos acuñaron el término "lipidoma" para referirse al conjunto total de lípidos de una célula y "lipidómica", como la rama de la metabolómica encargada de analizar lipidomas [47,48].

Uno de los objetivos fundamentales en estudios de lipidómica es la identificación de las especies moleculares de lípidos bajo condiciones fisiológicas específicas, relacionadas con expresión de enzimas, la regulación de genes, o el estado de la célula. La composición y abundancia de especies moleculares de un lípido resulta fundamental tanto para el desempeño de las actividades biológicas del lípido *per se*, como para determinar el tipo de metabolitos a los que podrá dar origen. Un ejemplo claro de esto resulta del estudio de la composición en ácidos grasos de un fosfolípido determinado. Dependiendo del tipo y la abundancia relativa de cadenas poliinsaturadas en un fosfolípido podrá darse origen a diferentes mediadores. Los estudios de lipidómica representan así un flanco con un alto potencial para la identificación de biomarcadores en diversos procesos fisiológicos o para la detección de blancos estratégicos en el desarrollo de nuevos fármacos o terapias. De especial atención es la identificación de mecanismos bioquímicos característicos de síndromes metabólicos y otros padecimientos relacionados con el metabolismo de lípidos. Por ejemplo, se han identificado lípidos marcadores de estrés oxidativo, auxiliares en la detección y pronóstico de enfermedades crónico-degenerativas [49].

8.2. Herramientas básicas para estudios de lipidómica

Un punto a resaltar de los lípidos es su naturaleza como productos genéticos secundarios. Contrariamente a una proteína sin modificaciones, producto de un gen, la biosíntesis de cualquier lípido requiere de la expresión de múltiples genes, cada uno de ellos codificando alguna de las enzimas involucradas en la vía de síntesis. Así, las estrategias moleculares para el estudio de lípidos han sido escasas, y ha sido gracias al desarrollo de métodos de fraccionamiento sofisticados, principalmente de espectrometría de masas, que se ha podido iniciar el análisis sistemático de lípidos. Si bien los métodos analíticos para el estudio estructural de nuevos lípidos son numerosos, dos son las técnicas básicas para estudios de lipidómica: la cromatografía y la espectrometría de masas [50]. En la figura 10 se ilustra la estrategia general para estudios de lipidómica. El primer paso para estudiar metabolitos grasos consiste en obtener los lípidos a partir de tejidos o de células, generalmente extrayéndolos con solventes orgánicos. La extracción de Folch es el método más común para obtener lípidos; se trata de una extracción líquido-líquido, en donde solventes de diferente polaridad, inmiscibles, son puestos en contacto con la muestra, y los lípidos son generalmente recuperados a partir del solvente más apolar. Otro método para obtener lípidos es la extracción en fase sólida, en donde se utilizan solventes orgánicos para extraer lípidos que han sido depositados en columnas empacadas con materiales que adsorben lípidos, como gel de sílice. Con este último método es también posible separar lípidos de distintas características (polaridad, carga eléctrica). Los lípidos resultantes de esos extractos se encuentran generalmente en una mezcla compleja; sin embargo susceptible de ser analizada

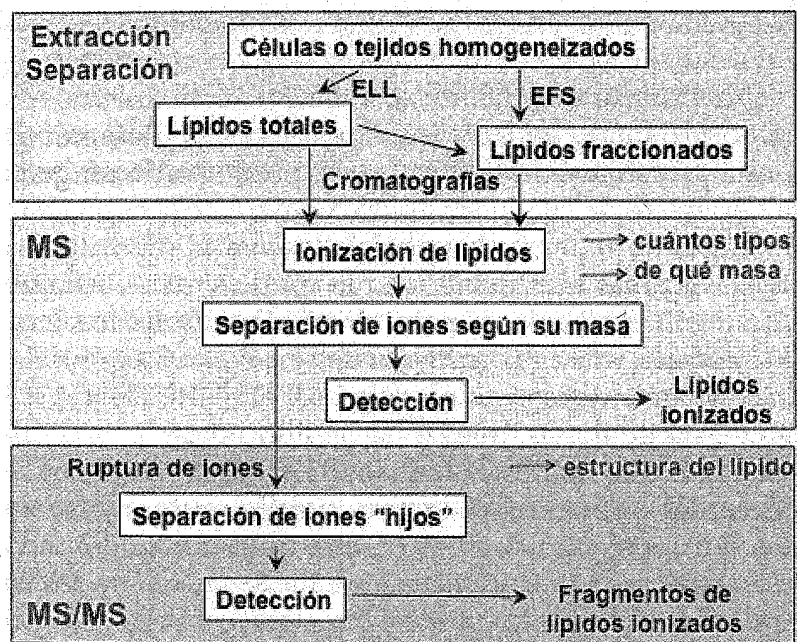


Figura 10. Estrategia general para análisis de lipidómica. El análisis sistemático de lípidos se basa principalmente en dos técnicas: se utilizan los métodos cromatográficos para separar lípidos totales, y se acoplan luego, generalmente a un espectrómetro de masas (MS). Un MS brinda información de la estructura de cada lípido separado, ya sea detectando la masa del mismo (en forma de iones moleculares) o las masas de sus fragmentos (iones "hijos"). A la obtención de iones en dos etapas se le llama MS en tándem (MS/MS). ELL es la extracción líquido-líquido y EFS: extracción en fase sólida.

directamente para definir las especies moleculares presentes, o después de un fraccionamiento.

El fraccionamiento de las muestras se realiza mediante técnicas cromatográficas. En la cromatografía, los lípidos se reparten, según su estructura, entre dos fases. Una de las fases está siempre fija; es la fase estacionaria, y contiene alguna sustancia capaz de retener los lípidos por

interacciones de distintos tipos (fuerza iónica, interacciones de Van der Waals). La otra es la fase móvil, y consiste en un fluido (líquido o gaseoso) que, al pasar por la fase estacionaria, va acarreado los lípidos diferencialmente, según sus características estructurales. Las técnicas cromatográficas más utilizadas en lipidómica son la cromatografía sobre capa fina, la cromatografía líquida y la cromatografía de gases. En la cromatografía en capa fina, la fase estacionaria es una capa de espesor milimétrico, colocada sobre un soporte de vidrio, aluminio o plástico. La fase móvil es un solvente que, por capilaridad, migra sobre la fase estacionaria, generando cromatogramas en donde los lípidos migran con el solvente según su estructura y talla, finalizando en distintas posiciones de la capa. En la cromatografía líquida, la fase estacionaria se encuentra empacada en una columna y la fase móvil pasa a través de la columna, de donde los lípidos son recuperados a tiempos diferentes, según su afinidad entre ambas fases. El mismo principio rige en la cromatografía de gases, salvo que en ésta, la fase móvil es un gas inerte que acarrea analitos que van volatilizándose ante un gradiente creciente de temperatura. La cromatografía líquida en columna incluye la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés), en donde la fase estacionaria se encuentra altamente compactada, por lo que la fase móvil debe ser pasada a alta presión con la ayuda de una bomba. Algunas de estas técnicas pueden requerir someter previamente los lípidos a una transformación química, como es el caso cuando deben ser volatilizados en una cromatografía de gases. La detección de las moléculas se realiza mediante distintas técnicas químicas y espectroscópicas, ya sea sobre muestras de lípidos ya fraccionados, o acoplando la detección a equipos de cromatografía.

La técnica de detección más utilizada para análisis sistemáticos en lipidómica es la espectrometría de masas, la cual es frecuentemente acoplada a equipos de cromatografía líquida o de gases.

Como su nombre lo indica, la espectrometría de masas es un método para medir las masas de moléculas. Esta técnica fue desarrollada a principios del siglo XX para poder analizar los isótopos de un mismo elemento (átomos con un mismo número de protones en el núcleo, pero diferente número de neutrones). La estrategia se basó en que en forma ionizada (con carga eléctrica), una molécula viaja a través de un campo electromagnético con distintas trayectorias, dependiendo de su masa, y es posible seleccionar iones de una determinada masa si se fijan las condiciones de un campo electromagnético. Muchos espectrómetros de masas utilizan esta estrategia y, con un barrido de campo electromagnético, generan información de todas las masas de moléculas presentes en una muestra. El espectrómetro de masas consta de tres partes: cámara para ionización de analitos, separador de iones y analizador de iones seleccionados. En las últimas décadas, métodos novedosos han sido desarrollados no solamente para medir las masas con muy alta sensibilidad, sino también para generar iones a partir de moléculas intactas que son lábiles y que tienen un alto peso molecular [50]. Esta capacidad de ionizar y medir la masa de moléculas mediante distintos métodos, que difieren sustancialmente en la delicadeza o fuerza utilizadas para formar los iones, ha expandido el uso de la espectrometría de masas para el análisis estructural de muchas biomoléculas; moléculas intactas, o inclusive complejos sin unión covalente como proteína-proteína o lípido-proteína. Así mismo, es posible obtener información molecular en dos etapas: a partir de moléculas o complejos

intactos que han sido separados según su masa, y a partir de fragmentos generados con métodos de ionización que provocan la ruptura de los primeros iones; a esta estrategia se le llama espectrometría de masas en tándem, y es muy utilizada para análisis de lipídomas (figura 10). Si las moléculas en aerosol se ionizan por acción de un campo eléctrico (método de ionización por electrospray), es posible aplicar condiciones en la cámara de ionización a fin de seleccionar, a partir de mezclas complejas, únicamente una subclase de lípidos para formar iones. Todas estas estrategias permiten actualmente el análisis de lípidos inclusive a partir de muestras crudas, lo cual ha impulsado el estudio de lipídomas. Es muy probable que en los próximos años, con el desarrollo creciente de métodos capaces de detectar especies moleculares de muy baja abundancia, la lipidómica continúe brindando información clave tanto para una mejor comprensión de procesos celulares como para la práctica clínica. De manera complementaria al estudio químico de los lípidos, y como se ha mencionado en párrafos anteriores, utilizando modelos genéticos y analizando las consecuencias fenotípicas de mutaciones, se ha podido establecer también información crítica sobre las miríadas de funciones que llevan a cabo los compuestos lipídicos.

REFERENCIAS

1. W. W. Christie, *The Lipid Library*, www.lipidlibrary.co.uk
2. E. Fahy, S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill Jr., R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. S. VanNieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, E. A. Dennis, *A comprehensive classification system for lipids*, *J. Lipid Res.* **46**, 839-861 (2005).

3. J. J. Brocks, G. A. Logan, R. Buick, R. E. Summons, *Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes*. *Science* **285**, 1033-1036 (1999).
4. S. Martin, R. G. Parton, *Lipid droplets, a unified view of a dynamic organelle*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 373-378 (2006).
5. G. Barba, F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Z. Scaf, M. J. Chapman, T. Miyamura, C. Bréchet, *Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1200-1205 (1997).
6. H. D'Avila, R. C. Melo, G. G. Pariera, E. Werneck-Barroso, H. C. Castro-Faria-Neto, P. T. Bozza, *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies, intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo*. *J. Immunol.* **176**, 3087-3097 (2006).
7. M. A. Welte, S. Cermelli, J. Griner, A. Viera, Y. Guo, D. H. Kim, J. G. Gindhart, S. P. Gross, *Regulation of lipid-droplet transport by the perilipin homolog LSD2*. *Curr. Biol.* **15**, 1266-1275 (2005).
8. A. Ishigami, Y. Kondo, R. Nanba, T. Ohsawa, S. Handa, S. Kubo, M. Akita, N. Maruyama, *SMP30 deficiency in mice causes an accumulation of neutral lipids and phospholipids in the liver and shortens the life span*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 575-580 (2004).
9. S. Lahiri, A. H. Futerman, *The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids*. *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 2270-2284 (2007).
10. WHO Obesity and Overweight Fact Sheet, núm. 311, septiembre 2006.
11. M. O. Weickert, A. F. H. Pfeifer, *Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism*. *Diabetologia* **49**, 1732-1741 (2006).
12. K. T. Min, S. Benzer, *Preventing neurodegeneration in the Drosophila mutant bubblegum*. *Science* **284**, 1899-1901 (1999).
13. T. Kadowaki, *Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models*. *J. Clin. Invest.* **106**, 459-465 (2000).
14. E. Bier, *Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics*. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 9-23 (2005).
15. J. Riesgo-Escovar, D. Raha, J. R. Carlson, *Requirement for a phospholipase C in odor response, overlap between olfaction and vision in Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2864-2868 (1995).
16. R. Böhni, J. Riesgo-Escovar, S. Oldham, W. Brogiolo, H. Stocker, B. F. Andruss, K. Beckingham, E. Hafen, *Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a Drosophila homolog of vertebrate IRS1-4*. *Cell* **97**, 865-875 (1999).
17. K. D. Baker, C. S. Thummel, *Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in Drosophila*. *Cell Metab.* **6**, 257-266 (2007).
18. J. de Gier, J. G. Mandersloot, L. L. M. van Deenen, *The role of cholesterol in lipid membrane*. *Biochim. Biophys. Acta* **173**, 143-145 (1969).
19. S. J. Singer, G. L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. *Science* **175**, 720-731 (1972).
20. K. Simons, E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. *Nature* **387**, 569-472 (1997).
21. M. A. Alonso, J. Millán, *The role of lipid rafts in signaling and membrane trafficking in T lymphocytes*. *J. Cell Sci.* **114**, 3957-3965 (2001).
22. C. J. Fielding, P. E. Fielding, *Membrane cholesterol and the regulation of signal transduction*. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 65-69 (2004).
23. Z. J. Cheng, R. D. Singh, D. L. Marks, R. E. Pagano, *Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids*. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 101-110 (2006).
24. P. V. Escribá, J. M. González-Ros, F. M. Goñi, P. K. J. Kinnunen, L. Vigh, L. Sánchez-Magraner, A. M. Fernández, X. Busquets, I. Horváth, G. Barceló-Coblijn, *Membranes, a meeting point for lipids, proteins and therapies*. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 829-875 (2008).
25. V. Boonyaratanakornkit, D. P. Edwards, *Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids*. *Semin. Reprod. Med.* **25**, 139-153 (2007).
26. T. Shimizu, *Lipid mediators in health and disease, Enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **49**, 123-150 (2009).
27. A. Kishimoto, Y. Takai, T. Mori, U. Kikkawa, Y. Nishizuk, *Phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover*. *J. Biol. Chem.* **255**, 2273-2276 (1980).
28. H. Streb, R. F. Irvine, M. J. Berridge, I. Schulz, *Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate*. *Nature* **306**, 67-69 (1983).
29. R. F. Irvine, M. J. Schell, *Back in the water, the return of the inositol phosphates*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 327-338 (2001).
30. G. di Paolo, P. de Camilli, *Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics*. *Nature* **443**, 651-657 (2006).
31. A. M. Marrache, F. Gobeil Jr., T. Zhu, S. Chemtob, *Intracellular signaling of lipid mediators via cognate nuclear G protein-coupled receptors*. *Endothelium* **12**, 63-72 (2005).

32. D. Marcellino, P. Carriba, F. Malgorzata, A. Borgkvist, M. Frankowska, I. Bellido, S. Tanganelli, C. E. Müller, G. Fisone, C. Lluís, L. F. Agnati, R. Franco, K. Fuxe, *Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis*, *Neuropharmacology* **54**, 815-823 (2008).
33. R. Rivera, J. Chun, *Biological effects of lysophospholipids*, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **160**, 25-46 (2006).
34. C. N. Serhan, *Mediator lipidomics, Prostaglandins. Other Lipid Mediat.* **77**, 4-14 (2005).
35. Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *Principles of bioactive lipid signalling, lessons from sphingolipids*, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 139-150 (2008).
36. M. J. Kuehn, N. C. Kesty, *Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction*, *Genes Dev.* **19**, 2645-2655 (2005).
37. J. E. Cooper, *Early interactions between legumes and rhizobia, disclosing complexity in a molecular dialogue*, *J. Appl. Microbiol.* **103**, 1355-1365 (2007).
38. B. Beutler, E. M. Moresco, *The forward genetic dissection of afferent innate immunity*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **321**, 3-26 (2008).
39. L. Mori, G. de Libero, *Presentation of lipid antigens to T cells*, *Immunol. Lett.* **117**, 1-8 (2008).
40. M. D. Resh, *Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins*, *Subcell. Biochem.* **37**, 217-232 (2006).
41. S. Eaton, *Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway*. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 437-445 (2008).
42. J. A. Zasadzinski, R. Viswanathan, L. Madsen, J. Garnaes, D. K. Schwartz, *Langmuir-Blodgett films*, *Science* **263**, 1726-1733 (1994).
43. T. Ide, T. Ichikawa, *A novel method for artificial lipid-bilayer formation*, *Biosens. Bioelectron.* **21**, 672-677 (2005).
44. D. L. Marks, R. Bittman, R. E. Pagano, *Use of Bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells*, *Histochem. Cell Biol.* **130**, 819-832 (2008).
45. N. Düzgünes, editor. *Liposomes, Part A, Methods in Enzymology*, vol. 367, 311 pp (2003).
46. L. A. Bagatolli, *To see or not to see, lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy*. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1541-1556.
47. J. F. Wilson, *Long-suffering lipids gain respect*, *The Scientist* **17**, 34 (2003).
48. F. Spener, M. Lagarde, A. Gélöën, M. Record, *What is lipidomics?* *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 481-482 (2003).
49. J.-L. Cracowski, O. Ormezzano, *Isoprostanes, emerging biomarkers and potential mediators in cardiovascular diseases*. *Eur. Heart J.* **25**, 1675-1678 (2004).
50. L. Feng, G. D., Prestwich, coordinadores, *Functional Lipidomics*, CRC Taylor & Francis, Boca Ratón, Florida, EUA (2006).

CAPÍTULO 13 EL ORIGEN DE LAS BIOMEMBRANAS

JAIME MAS OLIVA*

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

I. LA EVOLUCIÓN QUÍMICA Y EL ORIGEN DE LA VIDA

Uno de los conceptos fundamentales de la biología moderna es el de la unidad y la diversificación. Todos los organismos vivos que hasta la fecha han sido examinados, presentan cierta unidad y similitud bioquímica. Por ejemplo, la respiración oxidativa llevada a cabo de glucosa a CO_2 y agua con los pasos intermedios de atrapamiento y liberación de energía de una manera biológicamente utilizable, constituye un proceso esencialmente similar en animales, plantas superiores y microorganismos. Por supuesto que la gran diversidad de forma, color, tamaño, etc., representa manifestaciones de diferencias bioquímicas pero que a su vez pueden ser tomadas como variaciones de un tema único. El principio de unidad ha sido sumamente útil en elucidar algunas de las reacciones fundamentales de los sistemas biológicos, lo que ha conducido a que utilizando organismos relativamente simples como los microorganismos se han dilucidado muchas de las reacciones que ocurren en los organismos superiores.

* jmas@ifc.unam.mx

El significado de la unidad y diversidad bioquímica a su vez pueden ser estudiados en términos del origen de la vida y su subsecuente evolución a las formas biológicas que conocemos en nuestros días. Si pensamos que toda forma de vida fue originada de una sola fuente, es de esperarse que éstas muestren muchas características en común. El origen de la vida en la Tierra fue por primera vez seriamente considerada por el bioquímico ruso, Alexandr Ivánovich Oparin, quien en el año de 1922 presentó ante la sociedad botánica de Moscú, las conclusiones de su trabajo. Oparin visualizó la formación de las sustancias orgánicas en la Tierra mucho antes de que la vida apareciera en ésta y sugirió que toda forma viviente había provenido de estos materiales prebióticos. Sus puntos de vista fueron posteriormente discutidos extensivamente y publicados en el ahora libro clásico *El origen de la vida*, en el año de 1924.

La teoría de Oparin fue apoyada por las publicaciones de Haldane, quien sugirió que durante la historia prebiótica de nuestro mundo existió una acumulación de materiales orgánicos hasta que los océanos primitivos llegaron o alcanzaron la consistencia de "sopa diluida". Haldane sugirió que muchos compuestos surgieron de constituyentes más simples como resultado de la irradiación ultravioleta proveniente del Sol. La atmósfera primordial de donde provenían estos materiales más simples se cree estuvo constituida por compuestos de carácter reductor, sin la presencia de oxígeno libre pero conteniendo vapor de agua, sulfuro de hidrógeno, amoníaco y muy probablemente algunos hidrocarburos como el metano. Desde un punto de vista geoquímico otros autores creen que el bióxido de carbono haya sido la fuente más importante de carbono en la atmósfera primordial.

Las probabilidades de que la teoría Oparin-Haldane sean ciertas han sido apoyadas por un gran número de experimentos en donde diferentes mezclas de gases aproximándose a la composición teórica de la atmósfera primordial han sido radiadas con luz ultravioleta simulando a la luz del Sol, descargas eléctricas imitando a los rayos y a elevadas temperaturas. Estos experimentos han demostrado la formación de una vasta colección de compuestos bioquímicos como lo son aminoácidos, purinas y pirimidinas así como formaldehído, el cual bajo ciertas condiciones puede polimerizarse para formar azúcares (figura 1). Trabajos modernos han demostrado la formación de por lo menos 30 diferentes monosacáridos a partir de formaldehído utilizando polimerización catalizada por bases. Esencialmente todas las hexosas, pentosas

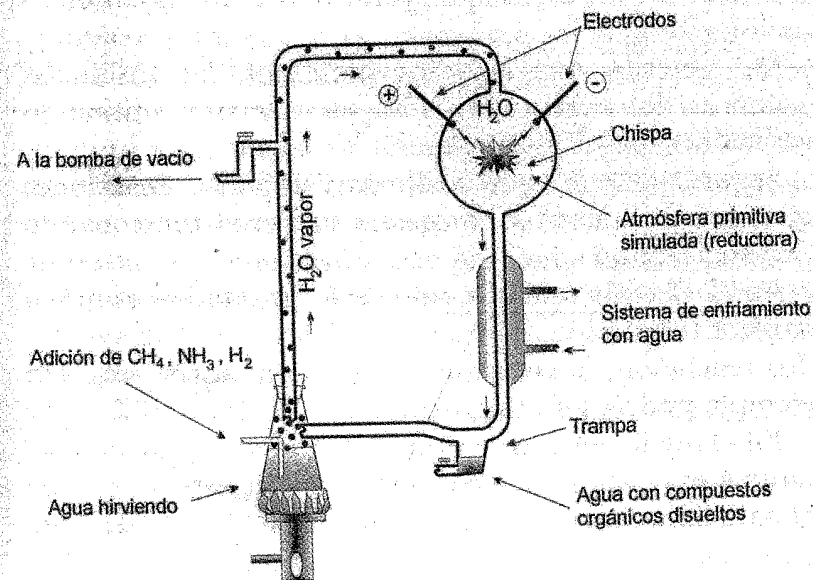


Figura 1.

y triosas han podido ser identificadas de estos experimentos. A pesar de que estos experimentos no son concluyentes en cuanto al surgimiento de la vida en la Tierra, proveen cierta evidencia en favor de la teoría de Oparin-Haldane.

Ahora bien, cuando una colección adecuada de moléculas orgánicas fue producida en los océanos primitivos, ¿cómo se visualiza que se produzca el complejo orden químico necesario en la formación de un sistema viviente? Para empezar a entender este principio, es importante recordar que el intervalo de tiempo entre el período que ya hemos considerado y la aparición de la primera forma reconocible de vida es de 2×10^9 años. De hecho, este concepto es uno de los principales problemas de la teoría de Oparin, en la que en el mismo momento del tiempo, todas las moléculas necesarias para la formación de una célula primitiva viviente hayan interaccionado.

De acuerdo con estudios presentes, las sustancias químicas del océano primitivo se asociaron utilizando reacciones químicas simples.

Seguramente las más exitosas fueron las reacciones que se perpetuaron así mismas y siguieron funcionando por más tiempo.

En el ejemplo anterior, uno de los productos es quien cataliza la reacción. De existir grandes cantidades de los dos reactantes, la reacción se generaría por sí sola. Un ejemplo podría ser el siguiente.

En el medio ambiente primitivo, a medida que el reactante A era utilizado, la concentración de éste se volvería el paso limitante de la reacción al mismo tiempo de competir con otras reacciones que utilizaran el mismo reactante A. Por lo tanto, la reacción más exitosa sería aquella que pudiera utilizar al reactante A más rápidamente.

Si, por ejemplo, una reacción similar a la anterior existiera pero conteniendo una pequeña reacción complementaria que a su vez formara el producto Za, una catálisis más eficiente de la reacción $A \rightarrow B$ se llevaría a cabo; por lo que esta reacción tendería a sobrepasar a la primera reacción discutida (figura 2).

En realidad el concepto mencionado anteriormente, pudiera constituir una aplicación directa de la teoría de Charles Darwin y su principio de la selección natural. Este principio que postula la lenta y continua mutación de los seres vivos eliminando aquellos incapaces de sobrevivir, podría representarse a nivel químico por las reacciones anteriores, donde la aparición del producto Zc que cataliza más eficientemente la reacción $A \rightarrow C$, deja sin posibilidades de funcionamiento al producto A el cual se podría considerar como isómero de Za.

Tomando en cuenta el ejemplo anterior, los sistemas químicos pudieron haber llegado a ser más y más complejos. Ahora bien, a medida que estos sistemas fueron haciéndose más complejos, la difusión de los reactantes empezó a ser un factor limitante de la velocidad de las reacciones. ¿Ya que este problema de difusión pudo haber atentado contra la supervivencia de algún sistema importante, cómo es que este problema fue superado?

Dos posibilidades han sido consideradas, la primera estudiada por Bernal, quien sugiere un proceso de absorción de los componentes de un sistema catalítico a una superficie como lo podría ser una roca de cuarzo.

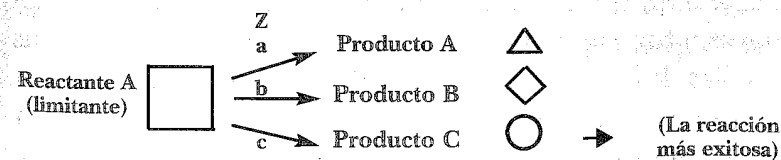


Figura 2.

El desarrollo de una membrana como frontera para limitar la pérdida por difusión, en realidad constituiría una manera más satisfactoria y una mejor solución del problema a largo plazo. Por otro lado, esta posibilidad estaría de acuerdo con el presente conocimiento de los organismos vivos, los cuales con base a un sistema celular cada célula podría ser considerada como un sistema químico encapsulado. En este momento debe hacerse hincapié en que las membranas no previenen la difusión, más bien, su papel es controlarla selectivamente permitiendo a los nutrientes penetrar al sistema membranal y a las sustancias de desecho dejar este sistema sin que estos procesos cambien la composición química del sistema encapsulado.

Una manera de explicar la formación de los primeros sistemas encapsulados en el océano primitivo es extrapolando la observación moderna de que frecuentemente en la superficie de lagos se ha encontrado material orgánico polimerizado formando delgadas cubiertas. Estas delgadas capas de material lipoproteico, por medio de la acción del viento, pueden ser fragmentadas donde cada fragmento potencialmente pudiera encapsularse formando pequeños glóbulos con agua atrapada en su interior. De esta manera, sistemas primitivos aislados pudieron haber sido formados.

En nuestros días, sistemas globulares aislados como antes se mencionó, se han producido y estudiado en detalle. Oparin mismo, preparó este tipo de sistemas capsulares y fue capaz de introducir reacciones bioquímicas sencillas. Por ejemplo, encontró que produciendo cápsulas conteniendo clorofila y agregando ácido ascórbico y rojo de metileno en el medio externo, un sistema fotoquímico óxido-reductor es formado.

De manera sumamente interesante, Oparin encontró que la reacción se llevó a cabo de manera mucho más rápida en el interior de la cápsula que en el exterior.

2. LOS PROCESOS BIOQUÍMICOS OBEDECEN LAS LEYES GENERALES DE LA FISICOQUÍMICA

Las células vivientes sintetizan complicadas moléculas y mantienen en su interior una estructura altamente heterogénea y organizada a la vez que cambiante. Los seres vivos, a diferencia de los sistemas inanimados, tienden a la organización no únicamente intracelular, sino también intercelularmente (colonias, tejidos, órganos). Estos seres subsisten en sistemas ecológicos en los cuales no solamente se interrelacionan diversas especies, sino que modifican y ordenan el medio a las necesidades del sistema. Más bien parece que los hechos anteriores fueran una violación de las leyes de la termodinámica; en realidad, lo que sucede es que hay que concebir a la biosfera no como un sistema cerrado, sino como parte de un sistema mayor donde efectivamente se cumplen los principios de la conservación de la energía y el aumento de la entropía total.

Las investigaciones que continuamente se realizan acerca de la bioquímica, pueden ayudar a comprender cómo es que la energía proveniente del Sol es utilizada por los seres vivos para la síntesis de compuestos orgánicos. Más aún, como las unidades más pequeñas de estos compuestos son modificadas de modo que incluyan enlaces químicos de alto contenido energético, los que al romperse proporcionan la energía necesaria para la síntesis de las macromoléculas.

De las características de los organismos vivos, una de las que llaman la atención de los científicos es la del mantenimiento de un estado estable conocido como homeostasis. Es importante notar que los seres vivos deben obtener del medio materiales y energía, y que a través de una apropiada utilización de los mismos son capaces de mantener su organización y funcionamiento.

Desde el punto de vista de la teoría de sistemas de los seres vivos, éstos se clasifican como *sistemas abiertos*, es decir, sistemas que a pesar de la existencia de una frontera definida con respecto al medio, toman sustancias y energía, transformándolas y creando sustancias nuevamente para ser utilizadas.

Los materiales en los seres vivos cumplen varias funciones: mantienen la estructura del organismo, así como su separación del medio. Éstos son utilizados como fuentes de energía y cumplen un papel fundamental como vehículos de información.

Dentro de la evolución de la materia, la aparición de los fenómenos característicos de la vida se hizo posible gracias a la propiedad de algunas macromoléculas orgánicas de agruparse formando una fase separada del agua que las rodea. En estos sistemas con separación de fase, las sustancias se distribuyen en forma desigual entre el medio y las regiones macromoleculares. De hecho, si en las regiones separadas existe la capacidad de catalizar ciertas reacciones químicas, entonces pueden establecerse flujos de entrada y salida de materiales y/o energía y aun alcanzarse un estado estable si las características del sistema y del medio lo permiten.

Ejemplos de sistemas con separación de fase sencillos de obtener y de manipular son los coacervados, que fueron propuestos por Oparin como modelo de las formas prebióticas de organización de la materia y estudiados inten-

samente a principios del siglo XX por el científico mexicano Alfonso Herrera. La selección natural parece ser la forma en la que la información ha sido adquirida e incrementada en los sistemas vivos, y ha permitido que solamente sistemas capaces de subsistir y reproducirse sobrevivan. La información "útil" se separa así del "ruido" en otra aparente violación de las leyes de la termodinámica y, nuevamente gracias a la formación de sistemas abiertos, en un estado estable dinámico.

3. EL CURSO TEMPORAL DE LOS PROCESOS

La termodinámica clásica puede predecir cuál es la dirección natural de un proceso y cuáles las fuerzas que lo impulsan, pero no cuánto tiempo puede tardar en realizarse. El estudio de la rapidez con la que se realizan los procesos es materia de la cinética. Las características cinéticas de los procesos son de enorme importancia en la biología en los sistemas bióticos, como en muchos sistemas físicos y químicos, es el trabajo realizado por unidad de tiempo, es decir la potencia, lo que realmente cuenta. En ese caso, en lugar de hablar de fuerzas y desplazamientos, se habla de fuerzas y velocidades, o mejor, de diferencias de potencial y flujos. Los sistemas pueden ser entonces concebidos como una "caja" con cierto tipo de potencia como entrada y cierto tipo de potencia como salida, cuya eficiencia es la razón entre la magnitud de la potencia de salida y la potencia de entrada. El cambio en la entropía y en la energía libre se expresará también por unidad de tiempo.

Los sistemas bióticos no se encuentran en equilibrio ni tienden a él. Existe en ellos un flujo continuo de energía y masa. Se podrían tal vez clasificar como estructuras

disipativas, que son aquellas creadas y mantenidas en condiciones de no-equilibrio, gracias a intercambio de energía y/o masa con el exterior; o sea, sistemas que se encuentran en condiciones estables pero alejadas del equilibrio.

Sin duda que aún hay mucho que investigar sobre el origen de las primeras macromoléculas. Para comprenderlo basta pensar que en la actualidad la síntesis de cualquier proteína requiere de instrucciones precisas respecto al orden en el que deben encadenarse en ella los diversos aminoácidos y que estas instrucciones se encuentran contenidas en macromoléculas distintas a las proteínas, que son los llamados ácidos nucleicos, construidos a base de azúcares, bases nitrogenadas y ácido fosfórico. Uno de los grandes problemas de la biología contemporánea, una vez descubierto el sistema de información que conduce al ácido desoxirribonucleico (ADN), al ácido ribonucleico (ARN) y finalmente a las proteínas, es el dilucidar cuáles fueron los pasos evolutivos que le dieron origen, problema que aún está lejos de ser resuelto.

Una característica peculiar de muchas proteínas, es la de ser aceleradores muy poderosos de ciertas reacciones. Claro está que esto es solamente una parte de la explicación del por qué, ciertas reacciones pudieron ocurrir en algunos sistemas anteriores a la existencia de los seres vivos. Dado que una reacción, por más rápidamente que ocurra, solamente progresa hasta el punto de equilibrio (mínimo potencial), la obtención de ciertos productos en cantidades apreciables está condicionada a las condiciones de equilibrio y no a la rapidez de la reacción. De lo anterior, se desprende que deben existir diversos factores favorables para que cierta reacción progrese en un sistema químico, y esto es cierto tanto en la naturaleza como en los laboratorios industriales. Los sistemas con

separación de fases tales como las microesferas o los coacervados, proporcionan entre otras, las siguientes ventajas a la evolución química de la vida:

- a) un microambiente peculiar,
- b) concentración de reactivos,
- c) presencia de catalizadores,
- d) una mayor superficie para el intercambio de energía y materiales,
- e) reposición de reactivos,
- f) eliminación de productos y
- g) la posibilidad de acoplamiento de varias reacciones.

La estabilidad de los sistemas prebióticos pudo verse influida no solamente por su composición y por las condiciones de la fase no-coloidal a su alrededor, sino también por la presencia de otros sistemas separados pero cercanos. Así, el producto de una reacción en un tipo de sistemas podría ser acumulado o modificado por otro, y de ese modo crearse un estado estable dinámico con flujo de materia a través de varios tipos de sistemas, lo cual podría resultar en una mayor estabilidad en todos ellos. La coordinación, cooperación y combinación de sistemas prebióticos pudo ser un mecanismo de evolución.

Por supuesto que los sistemas inestables no se perpetuaron, lo cual fue una forma primitiva de selección natural. Así mismo, las propiedades fisicoquímicas inherentes a los nuevos y más complicados sistemas formados por combinación o cooperación de otros, debieron incluir reacciones que hicieran posible su crecimiento y su posterior subdivisión.

La sorprendente unidad de los procesos bioquímicos básicos de los seres vivos (por ejemplo: transportadores de electrones, código genético y otros), hace pensar que finalmente una variedad restringida de sistemas prebióticos

adquirieron la propiedad de conservar y producir químicamente la información básica para su perpetuación. También, como se desprende de la variedad y evolución de los seres vivos, éstos heredaron la propiedad de que su información genética sea capaz de experimentar incremento, decremento, repetición y otros cambios en los cuales intervienen fenómenos diversos, muchos aún no conocidos.

Una de la peculiaridades de los seres vivos, es la capacidad de ejercer control sobre sus propios procesos, es decir, ejercen cierto comando o dirección activa sobre los mismos.

La intervención de proteínas específicas en muchos de los procesos biológicos hace factible su regulación o control; así, por ejemplo, la absorción de hierro en el intestino (que requiere de ciertos sistemas de proteínas transportadoras), se reduce casi a cero cuando dichos sistemas se saturan, lo cual coincide con la existencia de suficiente cantidad de hierro para las necesidades del metabolismo.

Muchas vías metabólicas (es decir, series de reacciones bioquímicas por las que una sustancia o grupo de sustancias son transformadas), se estimulan o inhiben según la concentración de los sustratos iniciales o de algún producto final o colateral de las mismas. Por ejemplo, una mayor concentración de glucosa en las células musculares o hepáticas, estimula la actividad de las vías metabólicas que utilizan glucosa. Otras veces son sustancias producidas por otras células, que genéricamente se pueden denominar hormonas, las que inducen desde la membrana, cambios en el metabolismo celular. Las hormonas reaccionan con ciertas proteínas de la membrana y que son específicas para una hormona o cierto grupo de hormonas y que se denominan receptores; la especificidad de la reacción del receptor con la hormona, se basa en la forma de la molécula de uno y otra en el sentido más

amplio del término, lo cual implica características geométricas así como fuerzas intermoleculares varias.

Cada célula cuenta con una dotación de material genético y de otros materiales bioquímicos que le permiten realizar y regular sus funciones. Sin embargo, no toda la información implícita en dicha dotación se expresa en un momento dado.

En otras palabras, las células cuentan con "instructivos" y "herramientas" muy variadas, inclusive con la posibilidad de producir los catalizadores y reactivos necesarios para una gran diversidad de procesos, pero la ejecución de ciertas instrucciones y la producción y puesta en uso de determinadas herramientas bioquímicas depende de las condiciones internas y externas en cada momento.

Existen ciertas características más o menos definitivas en el comportamiento de cada célula. Algunas dependen directamente del material genético, por ejemplo, las características de cada especie y aun de variantes de la misma. Otras dependen de qué porciones del "texto" genético son "leídas" en cada célula, de ello depende que existan diferentes células en un mismo organismo y que éstas formen diferentes tejidos y órganos, unas células influyen en otras durante el desarrollo y durante procesos tales como la reparación y cicatrización para lograr la organización de cada órgano y tejido. También, las adaptaciones lentas de cada organismo a su ambiente tienen que ver con la expresión de ciertas partes de la información genética.

Existen determinaciones más momentáneas del comportamiento celular y es con base en la activación o desactivación de las enzimas o catalizadores de determinadas reacciones que forman parte de alguna vía o proceso. El control de la actividad bioquímica es un caso particular y básico que ilustra una características de muchas de las funciones del organismo.

4. EL ORIGEN DE LA MEMBRANA CELULAR

Los cosmólogos en nuestros días nos cuentan que el sistema solar fue formado hace 4.6 billones de años (figura 3). El universo conocido ha existido de entre 8 y 10 millones de años, donde la materia fue condensada en nuestro rincón de la galaxia Vía Láctea a través de ciclos de condensación y expansión de estrellas que estallaron como supernovas. Los físicos atómicos nos señalan que todos los átomos mayores que del carbón fueron inicialmente formados solamente en reacciones que se llevaron a cabo en estrellas que morían. El hierro y el níquel, elementos de los cuales está hecho el centro de la Tierra, fueron hechos solamente en los últimos días previos a la explosión de alguna de estas estrellas. Estos elementos junto con el sílice, el oxígeno, el nitrógeno, el azufre y sus sales fueron condensados solamente cuando nuestro sistema solar fue formado. Los planetas llamados interiores fueron demasiado pequeños para atrapar muchos de los gases ligeros (hidrógeno y helio), ya que la mayoría se perdían por la acción del viento solar. A medida que la tierra solidificó, el núcleo formado por hierro y níquel fue rodeado por una capa de rocas de sílice. En el origen de la Tierra, la atmósfera primitiva estuvo prácticamente formada por metano, bióxido de carbono, amoniaco, hidrógeno, nitrógeno y pequeñas cantidades de agua (figura 4). Al inicio, el oxígeno considerado uno de los elementos más reactivos en la Tierra reaccionó con el hidrógeno para formar pequeñas cantidades de agua, con el carbón formó monóxido de carbono así como bióxido de carbono, con el hierro óxidos de hierro y con el sílice formó silicatos, esto mucho antes de que el planeta se solidificara. En estos orígenes de la Tierra no hubo cantidades de oxígeno suficientes que pudieran contenerse en la

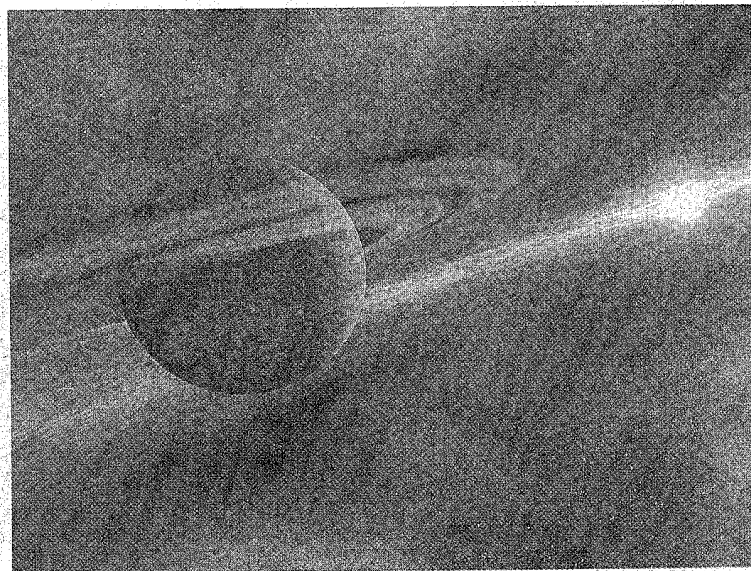


Figura. 3.

atmósfera como un gas libre, por lo tanto, la química en la superficie de la Tierra fue radicalmente diferente de lo que conocemos el día de hoy, por lo que este balance produjo un ambiente reductor más que uno oxidante. La Tierra primitiva se mantuvo con un ambiente reductor por varios billones de años, más aún, se mantuvo en estas condiciones a pesar de la existencia de los primeros organismos fotosintéticos primitivos capaces de extraer átomos de hidrógeno del agua y unirlos covalentemente a compuestos de carbono. Estas reacciones liberaban oxígeno, sin embargo estas reacciones son libremente reversibles y de esta manera el oxígeno en forma de gas era prácticamente utilizado o reutilizado en forma inmediata para reoxidar algunos compuestos reducidos. Ya que estas reacciones son catalizadas por los mismos organismos que producen el gas-oxígeno, se puede considerar

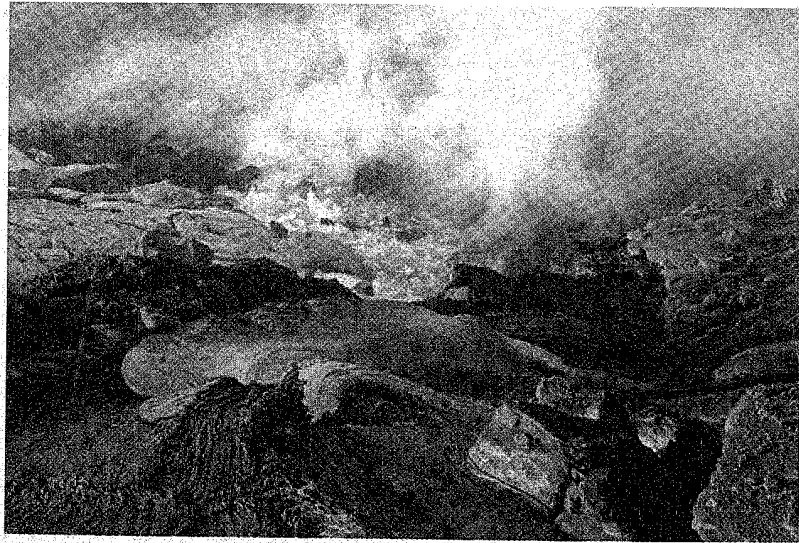


Figura. 4.

que hubo una muy pequeña acumulación de oxígeno libre llevada a cabo por procesos biológicos al inicio de la vida en la Tierra. La acumulación verdadera de oxígeno en la atmósfera en la Tierra dependió en gran medida en consecuencias paralelas a procesos geológicos. Algo de la biomasa que fue acumulada en el fondo de los océanos fue cubierta de sedimento antes de que pudiera ser reoxidada, por lo que la biomasa se mantuvo como una capa de compuestos reducidos del carbón a grandes profundidades en la corteza terrestre. En nuestros días, mucha de esta biomasa de la corteza terrestre en forma de compuestos de carbón reducidos pueden ser recuperados en forma de combustibles fósiles de los pozos petroleros y de las minas de carbón. De esta forma también hubo una gradual acumulación de oxígeno libre en la atmósfera. La presión parcial de oxígeno se incrementó muy lentamente y pudo haber alcanzado el 10% del nivel presente

a lo largo de 500 millones de años. Por los primeros billones de años, la vida en la Tierra tuvo que haber existido en un ambiente reductor poco favorable a la vida sin la presencia significativa de oxígeno libre en la atmósfera.

Experimentos de laboratorio utilizando las condiciones que se piensa prevalecieron poco después de que el agua fuera empezando a acumularse en la superficie de la Tierra, han sido llevados a cabo en varias partes del mundo. De esta manera ha sido demostrado que diferentes fuerzas de energía como lo pueden ser la radiación electromagnética, los rayos eléctricos, la energía geotérmica, etcétera, pueden llevar a cabo reacciones que forman moléculas orgánicas completas a partir de gases simples. De estos estudios se ha llegado a la conclusión de que la formación de muchos monómeros que forman a su vez parte de importantes moléculas biológicas, fue dada tanto por las propiedades químicas como físicas de la Tierra poco después de haber sido formada ésta alrededor del Sol.

En el laboratorio una mezcla de metano, amoníaco, agua e hidrógeno o nitrógeno en presencia de descargas eléctricas resulta en la formación de aldehídos de igual forma que de cianuro de hidrógeno, los cuales a su vez pueden reaccionar entre sí para formar aminonitrilos. Estos aminonitrilos pueden ser irreversiblemente hidratados para generar al aminoácido alanina. Los aminoácidos leucina y alanina son dos de los aminoácidos más importantes encontrados en ese tipo de experimentos utilizando descargas eléctricas (figura 5). A lo largo de algunos días, la mayoría del cianuro de hidrógeno y los aldehídos formados son convertidos en algunos de los aminoácidos más complejos como lo son: la valina, leucina e isoleucina, aspartato, glutamato, serina y treonina. También son producidos pero a concentraciones mucho menores

que estos dos aminoácidos la lisina y alanina. De esta forma mediante reacciones de polimerización tanto los péptidos básicos como las proteínas fueron originalmente formadas. De igual forma mediante reacciones de polimerización de los cianuros se pueden formar el grupo de compuestos conocidos como purinas y pirimidinas. Estos compuestos junto con los azúcares y aminoácidos fungieron como monómeros para generar polímeros biológicamente activos como lo son: el ácido

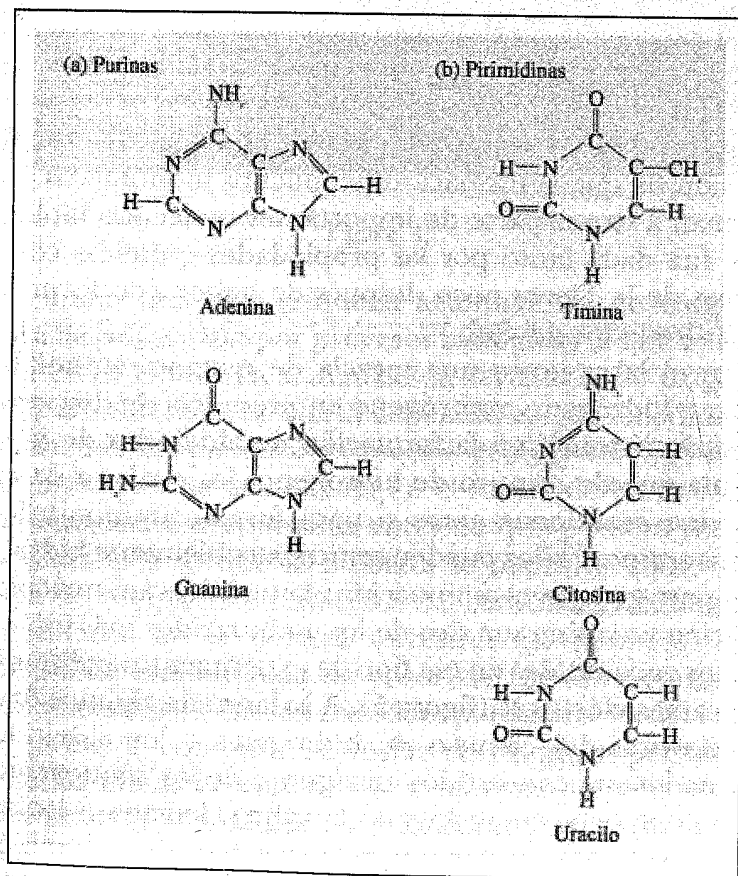


Figura. 5.

desoxirribonucleico y el ácido ribonucleico conocidos como DNA y RNA respectivamente (figuras 6a y 6b). En estos dos polímeros se conoce están sentadas las bases de lo que conocemos como código genético.

Los experimentos de Miller fueron significativos de varias formas. En primer plano, estos compuestos seguramente fueron formados rápidamente y se obtuvieron en muy grandes cantidades. Un seguidor de su trabajo, el bioquímico Philip Averson trabajó con experimentos similares a los de Miller empezando con materiales obtenidos mediante la combinación de diferentes bases. Resultó que a medida que más moléculas de átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno fueron empleadas, una mayor cantidad de los diferentes aminoácidos de los que normalmente se encuentran en las proteínas fueron formados. De igual forma, en lugar de utilizar descargas de

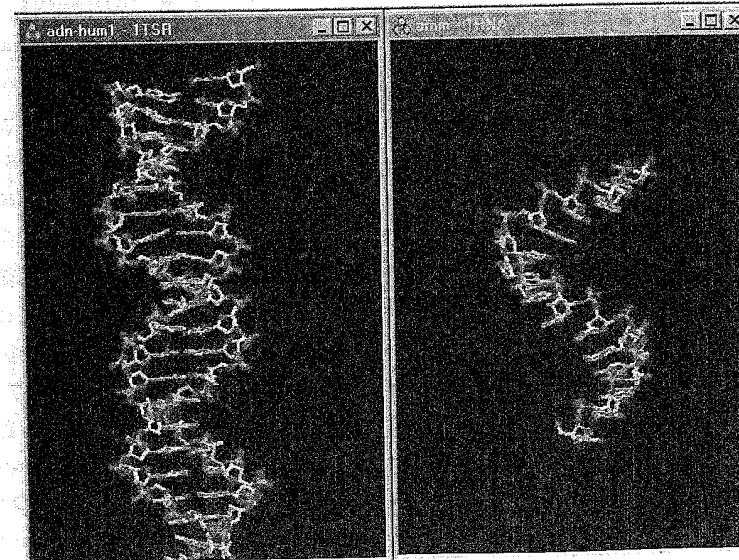


Figura. 6a.

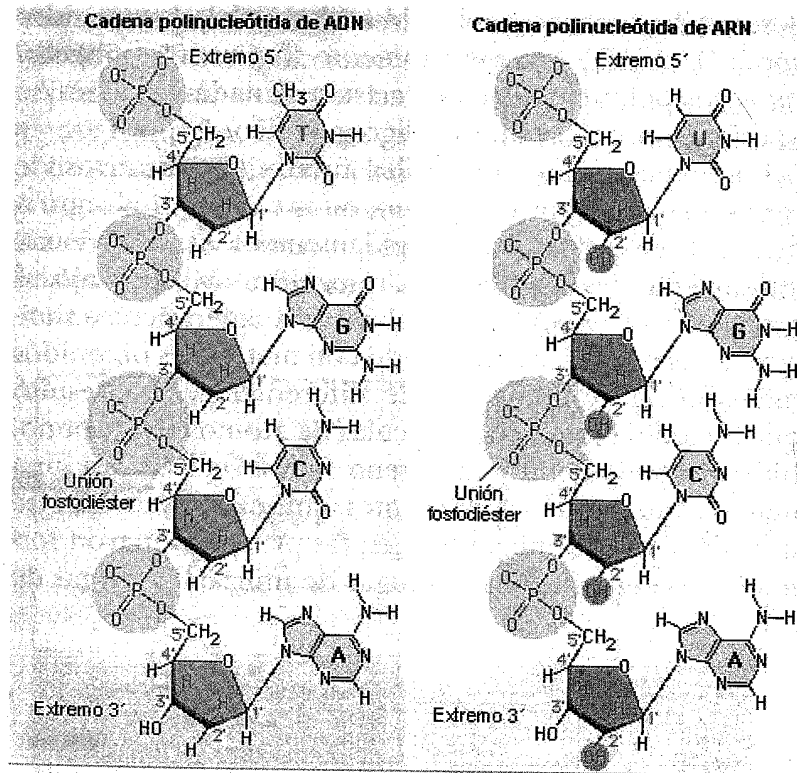


Figura. 6b.

corriente eléctrica para catalizar estas reacciones, utilizó luz ultravioleta obteniendo resultados muy similares.

Se conoce que cualquier compuesto que haya sido formado en un océano sin vida tendería a acumularse y a mantener sus características esenciales, ya que no existían organismos para consumir estos compuestos y transformarlos. El único factor importante tendiente a romper estas moléculas complejas, seguramente fue el nivel energético ultravioleta y radioactivo. Sin embargo, las corrientes en los océanos primitivos muy probablemente pudieron

haber colocado a estos compuestos recién formados a profundidades intermedias en el océano lejos de la radiación ultravioleta de la superficie así como de la radiación radioactiva del fondo. Existen autores que han estimado que probablemente el 1% de estos océanos primitivos pudieron haber estado formados de enormes cantidades de estos compuestos orgánicos primitivos. De esta forma, la cantidad de este material orgánico en los mares se ha calculado pudo estar representado por billones de toneladas. Ciertamente éstas son cantidades importantes para forzar naturalmente la aparición de la vida como la conocemos en esta Tierra. Durante la formación de estos compuestos en los mares primitivos en condiciones mucho más controladas, tuvo que haber sido formada la primera membrana biológica capaz de tener permeabilidad selectiva a diferentes sustancias. Se conoce de los experimentos tanto de Miller, Fred Hoil, Chandra Huicramachinje, así como del bioquímico hispanoamericano Juan Oró que, estudiando cianuro e hidrógeno, la posibilidad de la aparición en estos mares de moléculas fosfolipídicas pudo haber ocurrido de igual forma que otras moléculas complejas. La agitación de estas moléculas en estas condiciones pueden llevar a cabo el primer ensamblaje espontáneo de las membranas. Estas membranas a su vez, llevarían a cabo un paso muy importante hacia adelante en la evolución molecular y la aparición de la vida en la Tierra, al formar lo que podríamos llamar las primeras protocélulas (figura 7). Éstas presentarían una característica verdaderamente importante que fue la de poder separar un ambiente externo muy agresivo en los mares primitivos, de un ambiente interno mucho más controlado propicio para la organización de moléculas complejas como lo serían el ADN y proteínas.

Hasta este momento hemos discutido la posible polimerización de los compuestos que forman a las células, sin embargo no tenemos idea de cómo las primeras gotas de lípidos conteniendo moléculas autocatalíticas fue formada. Una gran variedad de lípidos pueden ser sintetizados a partir del monóxido de carbono e hidrógeno bajo la influencia catalítica de metales simples como son el hierro y el níquel. En forma interesante se conoce que compuestos a base de cianuro pueden condensar al glicerol y al fosfato para generar glicerol fosfato y éste a su vez condensarse con ácidos grasos para formar fosfolípidos. Por lo tanto, tomando en cuenta la simpleza de este tipo de reacciones de condensación, es muy probable que estas moléculas estuvieran presentes en ambientes prebióticos y que pudieran haber iniciado la formación de vesículas primitivas. Tomando en cuenta que las cadenas lipídicas son altamente hidrofóbicas y de que

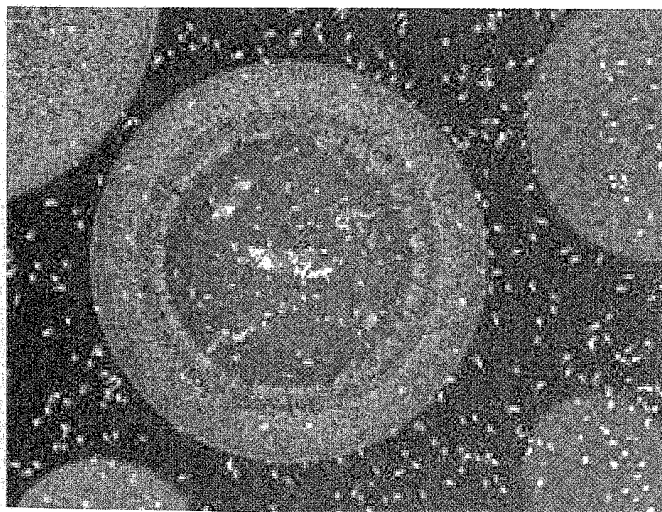


Figura 7.

fácilmente se asocian entre sí con la finalidad de poderse fraccionar en el agua, junto con los grupos fosfato de las cabezas de los fosfolípidos que son fuertemente atraídos por el agua, como fuerzas en conflicto se promueve la formación de la bicapa lipídica (figura 8). De esta manera, los fosfolípidos se acomodan de tal forma que los grupos fosfato están en contacto con el agua y las colas de acilo fuera del contacto con el agua. De esta forma al agitar una mezcla al azar de estas moléculas lipídicas sintetizadas en forma no biológica, junto con polipéptidos en una solución salina se podrán producir esferas de alrededor de 2 micromicras de diámetro, lo que está directamente relacionado con el tamaño que actualmente conocemos de una bacteria. Estas esferas son semipermeables a diferentes compuestos e iones y de forma muy importante pueden incorporar en su estructura algunas moléculas que se añadan a la solución que las rodea. Ahora bien, a pesar de que los ácidos nucleicos pueden ser encapsulados dentro de estas vesículas primitivas mediante un proceso de atrapamiento al azar, los grupos fosfato cargados negativamente en los ácidos nucleicos son casi siempre repelidos por las cargas contenidas en la superficie de estas

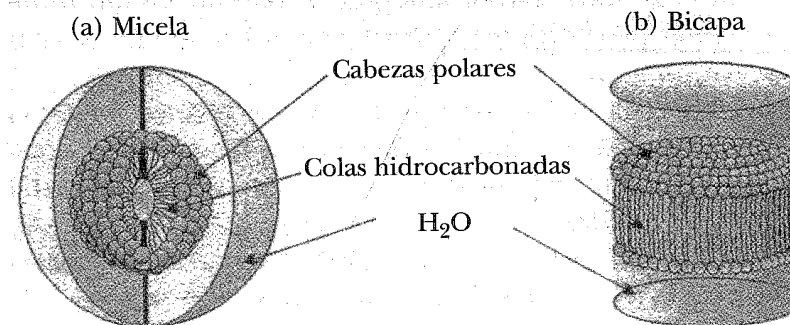


Figura 8.

bicapas. Por otro lado, ácidos nucleicos que a su vez estén condensados con polipéptidos básicos, pueden formar complejos anfipáticos que a su vez pueden actuar como templetas para la formación de la bicapa lipídica. De esta forma, estos ácidos nucleicos pudieron haber sido encapsulados con una eficiencia cien veces mayor que si hubieran estado en forma libre. Por lo tanto, en soluciones diluidas de fosfolípidos, estas vesículas primitivas pudieron haberse formado principalmente alrededor de estos complejos, a su vez formados por proteínas y ácidos nucleicos, generando el tipo de estructuras primitivas o proteosomas que pudieron haber sido los precursores de la célula.

Las células procariontes contienen solamente una membrana simple y no presentan núcleo. En contraste, la mayoría de las células eucariontes que existen en nuestros días contienen muchos organelos cada uno encapsulado dentro de su propia membrana. En nuestros días ha sido prácticamente aceptado que las células eucariontes aparecieron en la Tierra hace 4×10^9 años. Nuestro conocimiento en relación con los procesos evolutivos entre células procariontes y células eucariontes a pesar de ser muy vaga, ha avanzado considerablemente durante los últimos años. Generalmente, se ha considerado que las células procariontes aparecieron antes que las células eucariontes por un periodo dividido de 1.5 eones, aproximadamente el tiempo en que la hidrosfera de la Tierra cambió de una condición reductora a una oxidante, es decir el tiempo en el cual la acumulación del oxígeno en la atmósfera fue determinante (figura 9).

Por mucho tiempo los filósofos han deliberado sobre las características definitivas de los sistemas vivos. La distinción entre sistemas vivos y no vivos que ha sido ampliamente discutida durante la mayor parte del siglo

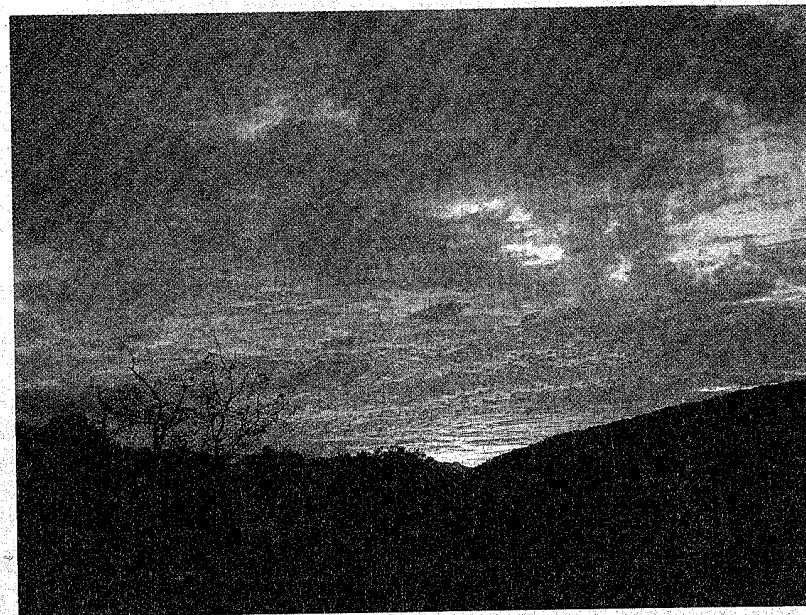


Figura 9.

XX ha perdido mucho de su interés en nuestros días. Una gran cantidad de biólogos consideran que no es posible dibujar una clara línea entre lo que es un organismo viviente y no viviente. El puente entre lo que se considera evidentemente vivo y no vivo incluyen a los virus y a los genes, los cuales en algunos momentos parecen estar vivos y en algunos no estarlo.

En este sentido, un buen número de culturas primitivas desarrollaron el mito de la creación de los primeros seres humanos por dioses o por demonios. Sin embargo, la formación de la vida misma fue raramente pensada como el ser una prerrogativa enteramente divina (figura 10). Aristóteles creyó en la existencia de la generación espontánea, de igual forma que los grandes teólogos de la Edad Media, entre los que figura Tomás de Aquino, así

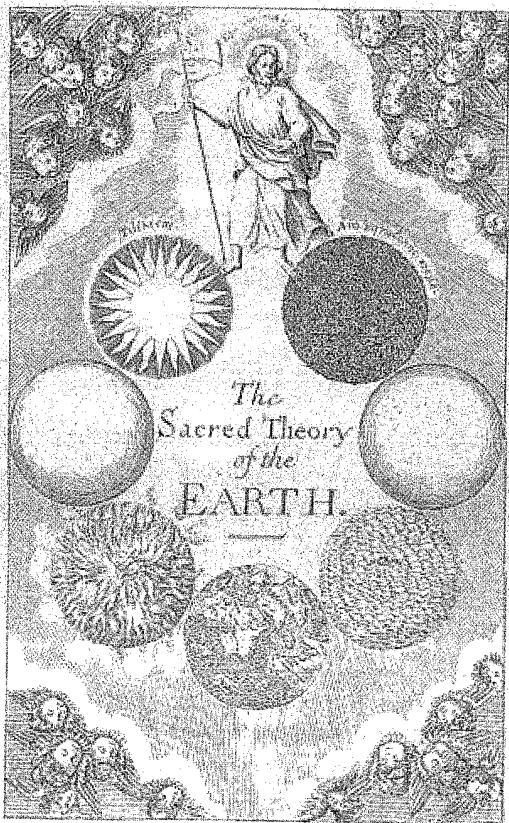


Figura 10.

como otros grandes científicos de la historia como William Harvey e Isaac Newton. El primero que experimentó en la posibilidad de esta generación espontánea fue el médico italiano Francesco Redi, el cual utilizando carne descompuesta estudiaba la formación de gusanos en ese tipo de material. Redi concluyó que estos gusanos crecían de pequeños huevos microscópicos puestos sobre la carne por moscas y que de ninguna manera podían aparecer de la carne descompuesta. Fue otro italiano, el

naturalista Lázaro Spallanzani, quien también empezó a crear serias dudas alrededor del concepto de la generación espontánea. Él fue el primero en hervir medios de cultivo y estudiarlos en comparación con medios de cultivo que no fueron tratados, observando que solamente en los no tratados aparecían gran cantidad de microorganismos. No fue hasta 1862 con la llegada de Pasteur, quien de una vez por todas dejó fuera las posibilidades a la generación espontánea con sus famosos experimentos utilizando matraces de grandes cuellos de cisne (figura 11). Estos matraces conteniendo medios de cultivo estériles, se mantuvieron así por mucho tiempo, demostrando que no existía ningún principio vital en el aire (figura 12). A pesar de que algunos científicos hasta nuestros días todavía encuentran la posibilidad de la teoría de sembrado extraterrestre atractiva, se considera apropiado trabajar con los mecanismos del origen de la Tierra surgidos aquí mismo en nuestro planeta hasta no tener pruebas contundentes de lo contrario. Esta posibilidad tiene que ver directamente con el punto de vista pre-pasteuriano de

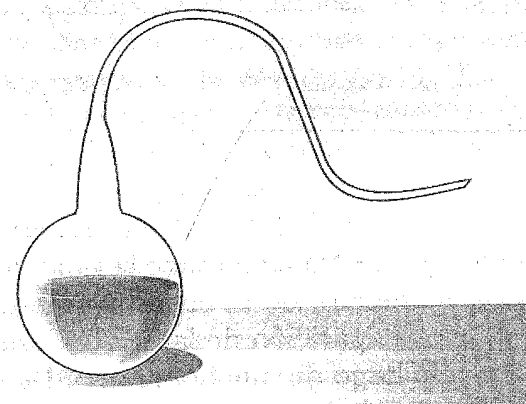


Figura 11.

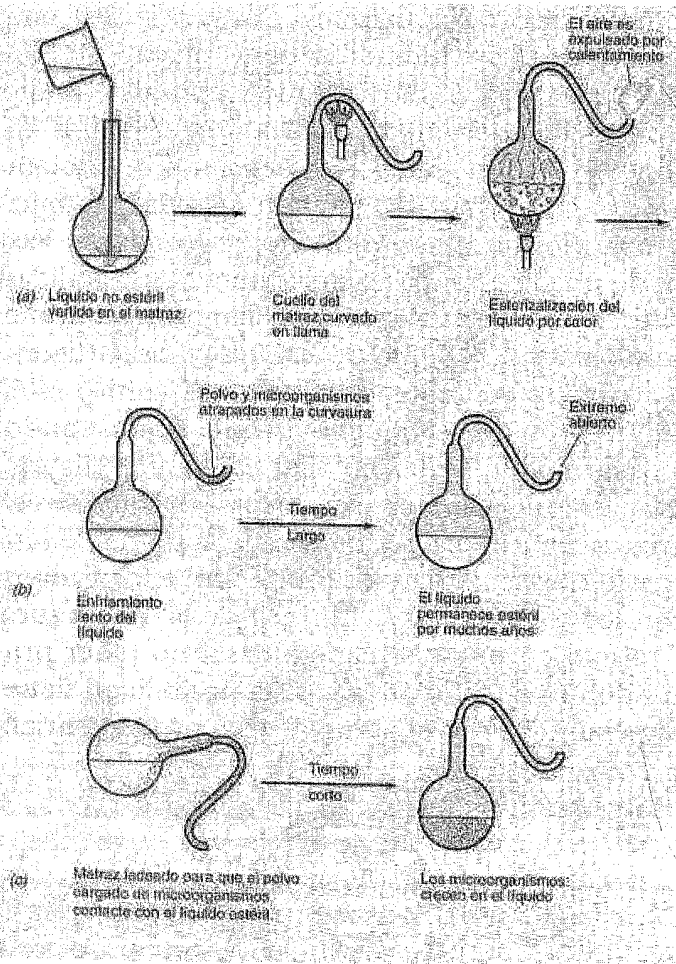


Figura 12.

la generación espontánea, donde la vida tenía que aparecer en un momento, de la nada. El punto de vista moderno es que la aparición de la vida tuvo que haber sido alcanzada a lo largo de mucho tiempo. De esta forma, la visión moderna de una posible generación espontánea, es de que tuvo que haber aparecido en un planeta donde

no existía vida previa. Por lo tanto, estas condiciones en la Tierra solamente se encuentran de entre 3 y 3.5 billones de años atrás. Más aún, de acuerdo con muchos expertos, aparentemente la vida no podría aparecer espontáneamente en las condiciones actuales de la Tierra, en una atmósfera rica en oxígeno.

5. EL OXÍGENO COMO ELEMENTO BÁSICO EN LA EVOLUCIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR

Muchos investigadores están de acuerdo que las células procariontes llegaron a existir hace casi 4×10^9 años. Las células procariontes tienen una sola membrana y no poseen núcleo. Por el contrario, las células eucariontes que existen hoy en día contienen muchos organelos, cada uno encapsulado en su propia membrana. Todo este conjunto tan complejo de organelos constituye un importante sistema de comunicación entre la célula y el medio.

La existencia de esta membrana tan elaborada se puede explicar como una condición necesaria para el gran tamaño de las células eucariontes comparadas con las procariontes. Además, la membrana de las células eucariontes puede ser capaz de intercambiar sustancias con el medio a una tasa comparable a sus necesidades metabólicas.

Es tentador pensar que las células eucariontes tuvieron un desarrollo a partir de una célula procarionte ancestral que sufrió una serie de cambios; progresivas expansiones, desenrollamientos, formaciones de vesículas y diferenciaciones. Hay algunos hechos que soportan esta hipótesis. Existen varias propiedades funcionales de la membrana plasmática de procariontes que están distribuidas sobre

diferentes partes de la membrana plasmática procarionte y eucarionte que están filogenéticamente relacionadas y que pudieran derivar de una membrana ancestral.

La expansión y el desarrollo de la membrana pudieron ser eventos tempranos en la transición procarionte-eucarionte, ya que muchas propiedades de los eucariontes no pudieron ser adquiridos sin estos eventos.

Al menos dos estados en la evolución de las membranas han tenido lugar, el primer estado son membranas que no contienen colesterol como las membranas procariontes y muchos organelos eucariontes. El segundo estado, involucra la evolución de las células eucariontes o al menos de su membrana plasmática en presencia de una atmósfera rica en oxígeno.

La membrana plasmática incluye en su composición lipídica una buena cantidad de colesterol. Considerando la influencia del colesterol en las propiedades físicas de las membranas biológicas se puede decir que el colesterol aumenta el grosor de la fluidez de la bicapa sin un apreciable incremento en la microviscosidad.

A concentraciones suficientemente altas de colesterol, la transición de la fase cristalina gel-líquido es completamente eliminada y el sistema tiene propiedades de un líquido bidimensional en un amplio rango de temperatura. Se ha propuesto que con la aparición del colesterol y los esteroides relacionados en una atmósfera rica en oxígeno y las modificaciones resultantes en las propiedades de la membrana hicieron posible fuerzas evolutivas que llevaron a las propiedades particulares que presentan las células eucariontes hoy en día.

Se sabe muy poco de la relación evolutiva entre las células eucariontes y procariontes, aunque se ha logrado avanzar mucho en los últimos años. Diez años atrás se creía que una célula procarionte hospedera pudo haber

originado la primera célula eucarionte cerca de 1.5×10^9 años. Este es el tiempo que la atmósfera de la Tierra se estaba oxigenando y que el paso procarionte-eucarionte se pudo haber dado por el hecho de que una célula procarionte sin pared ganó la capacidad de endocitar.

Ahora bien, si se piensa en un antecesor común, las diferentes líneas celulares se separaron en un estadio temprano de la evolución celular, ya que las células eucariontes son muy distintas de las eubacterias y de las arqueobacterias, así como lo son las eubacterias de las arqueobacterias. El estudio de la evolución celular ha avanzado en los últimos años por el desarrollo de métodos de análisis cuantitativos de las secuencias de ácidos nucleicos, en particular el análisis de RNA ribosomal, el cual ha dado un cronómetro molecular efectivo de importancia en la escala de la evolución celular y bacteriana.

El entendimiento de la evolución requiere no sólo del conocimiento de los cambios en las características genéticas sino también de las interacciones entre el sistema biológico y su ambiente, las cuales están mediadas por la membrana plasmática. Las diferencias que existen entre la composición de la membrana plasmática de las eubacterias, arqueobacterias y las células eucariontes tienen una importancia evolutiva significativa. La composición fosfolipídica de la membrana de las células eucariontes es similar a la de las eubacterias, pero no a la de las arqueobacterias, lo cual implica una relación evolutiva cercana entre células eucariontes, las eubacterias.

Se sabe que la actividad biológica requiere que las membranas estén en un estado fluido (líquido cristalino). Una bicapa formada exclusivamente de fosfolípidos sufre un proceso de transición de sólido (gel) a fluido (líquido cristalino) debido a la temperatura. Esta fase de transición está acompañada por dos cambios dramáticos:

1) El incremento en la libertad conformacional y flexibilidad de las cadenas acilo, llevando a un decrecimiento en el orden orientacional y en el grosor de la bicapa.

2) Incremento en la difusividad lateral de los lípidos paralelos al plano de la membrana y la difusión rotacional es más rápida.

En el caso de un modelo de membrana de fosfolípidos, hay una fuerte correlación entre el orden orientacional y la microviscosidad. La introducción del colesterol en la bicapa incrementa el orden orientacional, pero no aumenta la microviscosidad.

Muchas actividades biológicas toman lugar a temperaturas moderadas, temperaturas alrededor de 37°C. Como consecuencia de esto, las membranas biológicas operan a estas temperaturas, esto combinado con el requerimiento de fluidez hace que las membranas que no contienen colesterol caigan en un rango de actividad muy estrecho. Por ejemplo, las moléculas lipídicas con cadenas acilo saturadas engrosan la membrana, pero también la llevan a una fase de transición gel-líquido. Así las membranas compuestas por cadenas largas de lípidos podrían estar en una fase de gel a temperatura moderada. Las cadenas cortas de lípidos no forman bicapas estables.

Con base en el conocimiento de la estructura primaria y estudios de difracción se ha demostrado que la posición de las regiones hidrofílicas e hidrofóbicas de las proteínas integrales de la membrana tienden a interaccionar con su contraparte en los lípidos de la membrana. En otros estudios se ha visto que las cadenas acilo en la fase fluida no son afectadas por la presencia de concentraciones fisiológicas de proteína. Estos resultados llevan a la siguientes hipótesis, en las cuales se sugieren algunos aspectos importantes en la evolución de las membranas en las células eucariontes.

Las proteínas integrales operan de una manera óptima en membranas cuyo grosor hidrofóbico es semejante a las regiones hidrofóbicas de la proteína.

Se han hecho varios experimentos con lípidos y proteínas, cuyo grosor hidrofóbico fue aproximadamente igual, para observar la importancia del emparejamiento de las regiones hidrofóbicas de lípidos. Se encontró que la adición de tales proteínas no modifica el grosor de la bicapa confirmando esta hipótesis como factible.

Se ha propuesto que posiblemente con la presencia de grandes cantidades de oxígeno en la atmósfera hace 2.5×10^9 años, el cuello de botella en la evolución de células eucariontes fue removido por la incorporación de esteroides en la membrana plasmática. La exocitosis y endocitosis, las cuales hacen posible a una célula exportar o importar material, pudieron ser fuerzas evolutivas que explican el desarrollo de otras características eucariontes universales.

5.1. Hopanoides como equivalentes estructurales de los esteroides

Los hopanoides poseen una estructura casi plana, rígida y anfifílica similar a la de los esteroides y con dimensiones moleculares semejantes. Esto es compatible con el reemplazamiento mutuo, ya que cuando el protozario *Tetrahymena pyriformis* crece en un medio que contiene esteroides, lo usa para su membrana. Sin embargo cuando al cultivo se le retiran los esteroides, la *Tetrahymena* sintetiza diplopterol y hopanoides como isómeros y tetrahimanol en cantidades considerables a las de los esteroides. El tetrahimanol está localizado en la membrana y se ajusta a la composición lipídica para mantener su propia fluidez. Esto demuestra que los hopanoides juegan un papel simi-

lar al de los esteroides en la *Tetrahymena*, lo que sugiere claramente que, de forma indirecta, esto puede cumplirse también en otros procariontes que contengan hopanoides.

En algunas de las especulaciones hechas sobre la evolución de los esteroides, recientemente se ha sugerido que en la atmósfera prebiótica la evolución química de la vía de los esteroides, si verdaderamente ocurrió, debió de haber llegado a un alto con la molécula de escualeno debido a la carencia del oxígeno molecular, un receptor electrónico obligatorio en las biosíntesis actual de los esteroides donde, una vez que las condiciones aeróbicas se dieron, fue posible la formación del escualeno epóxido.

Capítulo 14 DIFUSIÓN EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

LEONARDO DAGDUG*
y MARCO VINICIO VÁZQUEZ-GONZÁLEZ**
Departamento de Física
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En todos los organismos vivos, desde los más simples unicelulares hasta los más complejos, todos sus constituyentes, átomos, moléculas, organelos y células, se encuentran en continuo movimiento y expuestos a las fluctuaciones térmicas. Para que la vida se dé, es necesario que la célula permanentemente transporte pequeñas partículas de un lado a otro en su interior además de intercambiarlas con su exterior. Este movimiento se lleva a cabo mientras las partículas están inmersas en un fluido principalmente compuesto por agua. Cuando esta migración tiende a uniformizar la concentración en el medio es conocida como difusión. La difusión resulta ser la forma dominante de transporte de material en la escala mesoscópica. En la difusión el movimiento de las partículas se caracteriza por ser continuo e irregular, y es provocado por los choques de las moléculas del fluido con las partículas. Esta difusión en sistemas biológicos se lleva a cabo en geometrías muy complejas.

* dll@xanum.uam.mx ** eriol71@gmail.com

Responder a la pregunta ¿cuál es la concentración de las partículas como función de su posición y el tiempo?, es uno de los retos más grandes de la física y de la matemática, y su enorme importancia radica en que nos ayudaría a entender muchas facetas del funcionamiento celular hasta hoy desconocidas. Un buen ejemplo de esto se encuentra en el desarrollo de fármacos anticancerígenos que deben penetrar selectivamente el tejido de los tumores cancerosos y alcanzar en su interior las dosis terapéuticas indicadas para su máximo efecto. Esta estrategia se adopta debido a la dificultad para conocer en detalle la naturaleza de la circulación en el tejido tumoral.

En este capítulo discutiremos cómo encontrar la solución al problema de la difusión en sistemas simples así como en sistemas confinados en geometrías complejas. Para este último caso introduciremos el método de los propagadores en el que la solución al problema de la difusión se da en función de los parámetros geométricos involucrados, así como de las constantes de difusión de los sistemas investigados. Para el estudio de difusión en sistemas simples mostraremos cómo utilizar la ecuación de Fick. Algunos de los sistemas biológicos que pueden modelarse con esta ecuación son, por ejemplo, la migración de ligandos a receptores, así como el transporte a través de membranas.

Aun cuando nuestros ejemplos estén principalmente enfocados en el estudio de la difusión en sistemas biológicos, los resultados aquí obtenidos son completamente generales.

2. REVISIÓN HISTÓRICA

Desde que en 1828 Robert Brown¹ (1773-1858) publicó sus observaciones de cómo partículas de polen flotando en agua realizan un movimiento incesante, accidentado y en todas direcciones, ha cautivado a un gran número de científicos el poder encontrar los fundamentos del fenómeno y su consiguiente descripción matemática. Después de un trabajo sistemático y metódico Brown observó dos de las principales características del fenómeno: que el movimiento del polen jamás cesaba incluso después de que los granos hubieran sido mantenidos durante un largo periodo de tiempo en un contenedor sellado, y que las partículas totalmente carentes de vida presentaban exactamente el mismo comportamiento. Por tal motivo Brown concluyó categóricamente que el fenómeno nada tenía que ver con la vida. Aunque Robert Brown no fue el primero en observar el fenómeno arriba mencionado,² debido a que fue el primero en estudiarlo profundamente, al movimiento de partículas debido a la agitación térmica del fluido en el que se encuentran inmersas se le conoce como movimiento browniano, y a las partículas se les llama partículas brownianas (figura 1).

¹ Sus resultados fueron reportados en un panfleto con fines de distribución personal con el título *A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August, 1827 on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies*. Es importante aclarar que en este título la palabra molécula se refiere al constituyente más pequeño de los seres vivos.

² El primero en reportar la observación del movimiento browniano fue Jan Ingen-Housz (1730-1799) en un pequeño artículo publicado en 1784 titulado *Remarks on the use of the microscope*. En él describe que observó bajo el microscopio el movimiento errático (posteriormente llamado movimiento browniano) que llevan a cabo pequeños pedazos de carbón en una gota de alcohol.



Robert Brown (1773-1858).

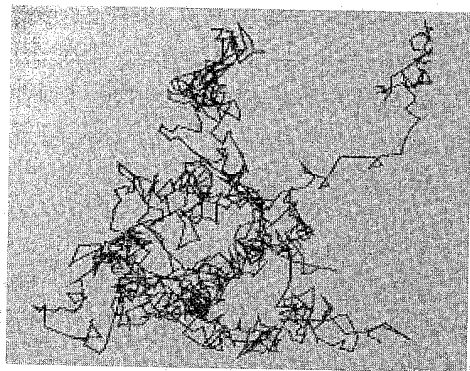


Figura 1. Trayectoria de una partícula browniana en dos dimensiones confinada en un cuadrado observada en un microscopio.

En términos de este lenguaje decimos que el movimiento browniano se debe al choque de las partículas brownianas con los átomos o moléculas que constituyen el fluido. Cuando se tiene un gran número de partículas brownianas en un fluido al sistema se le llama coloide, ejemplos de éstos son: los geles, las espumas y las emulsiones.

En los treinta años posteriores a la publicación del panfleto de Brown, se perdió casi por completo el interés en el problema. No fue sino hasta 1858 que se revivió la discusión cuando Jules Regnault (1797-1863) sugirió a partir de sus experimentos, que el causante del movimiento browniano era la luz incidente en el fluido. Su explicación se centraba en decir que el fluido se evaporaba por el calentamiento de la luz incidente y esta evaporación causaba el movimiento en las partículas brownianas. En la década de 1860, varios investigadores propusieron que el movimiento browniano era causado por las continuas colisiones entre granos de polen y las moléculas de agua agitadas por su movimiento térmico. En particular Giovanni Cantoni (1818-1897) demostró que el fenómeno no se debía a diferencia de temperatura entre diferentes puntos del fluido ya que el fenómeno se presenta también cuando la temperatura del fluido es uniforme. Además observó el fenómeno cuando éste se llevaba a cabo en recipientes grandes, desechando la hipótesis de que se debiera a fuerzas capilares. En 1863 Christian Wiener (1826-1896) dio argumentos contundentes para demostrar que el movimiento de las partículas brownianas no se debía a causas externas, sino que tenía que estar asociado con el movimiento interno en el fluido. En contraparte en los años 1870 Karl Nägeli (1871-1891) y William Ramsay (1852-1916), entre otros, dieron argumentos en contra de estas ideas. Su discusión se centró en que la partícula browniana tiene una masa inmensamente mayor a las moléculas del fluido, motivo por el cual éstos no podrían causar movimiento apreciable en la partícula browniana. Por otro lado es importante recalcar que a finales del siglo XIX un gran número de importantes científicos no aceptaban la hipótesis de la constitución atómica de la materia, entre los que podemos mencionar a Ernst Mach (1838-1916) y Wilhelm Ostwald (1853-1932).

A finales del siglo diecinueve la explicación del movimiento browniano basada en las colisiones entre las moléculas o átomos del fluido con las partículas brownianas parecía para algunos completamente absurda y aparentemente no existía forma alguna de explicar el fenómeno.

La primera persona en utilizar con éxito la teoría cinética³ para estudiar el movimiento browniano fue Marian Ritten von Smolan Smoluchowski (1872-1917), quien logró explicar cualitativa y cuantitativamente el fenómeno, obteniendo resultados comparables con los datos experimentales. Smoluchowski hizo uso de los resultados obtenidos por Maxwell para modelar y explicar las causas del movimiento browniano. Por un lado Maxwell había demostrado que cada partícula en un fluido no tiene la misma velocidad, sino una distribución de velocidades en todas direcciones; por el otro, el número de colisiones que experimenta una partícula browniana es del orden de 10^{20} por segundo y por estos dos motivos es apreciable el efecto neto del movimiento de la partícula browniana. Aunque Smoluchowski obtuvo sus resultados sobre el movimiento browniano en el año de 1900, no fue sino hasta 1906 cuando los publicó, principalmente impulsado por el trabajo de Einstein de 1905. Entre los años de 1913 y 1915 Smoluchowski hizo su segunda gran contribución al movimiento browniano encontrando la ecuación que hoy lleva su nombre, y que describe al fenómeno

³ La teoría cinética de los gases explica el comportamiento y propiedades macroscópicas de los gases a partir de una descripción estadística de los procesos moleculares microscópicos. La teoría cinética fue desarrollada principalmente por Ludwig Boltzmann y James Clerk Maxwell a finales del siglo XIX. En la teoría se consideraba que el gas está compuesto de átomos o moléculas en movimiento aleatorio y que éstos sufren colisiones aleatorias entre ellas y las paredes del recipiente que lo contiene.



Marian Ritten von Smolan Smoluchowski (1872-1917).

en presencia de una fuerza externa. Smoluchowski tuvo además una participación fundamental en la comprobación experimental de su teoría y la de Einstein. Su trabajo se centró principalmente en medir la distribución espacial de las partículas brownianas.

Albert Einstein (1879-1955) en dos artículos publicados en 1905 y 1906 explicó⁴ por primera vez y sin dejar lugar a dudas, las causas y propiedades del movimiento browniano. En su primer artículo su motivación básica fue la de hacer predicciones observables macroscópicas a partir de tomar en cuenta el movimiento térmico molecular del fluido. Este artículo inicia diciendo:

⁴ *On the motion of particles suspended in a resting fluid demanded by the molecular theory of heat* (1905) y *On the theory of Brownian motion* (1906). En su segundo trabajo, Einstein hace un tratamiento sobre el movimiento browniano rotacional de partículas esféricas.

En este artículo se mostrará que, de acuerdo con la teoría cinética molecular del calor, cuerpos de tamaño visible microscópicamente, suspendidos en un líquido, llevan a cabo movimientos debidos a los movimientos térmicos moleculares y de magnitud tal que pueden ser vistos en el microscopio. Es posible que los movimientos que se discutirán aquí sean idénticos con el llamado movimiento molecular browniano.

En dicho estudio modeló el movimiento de las partículas brownianas como un proceso estocástico.⁵ Su gran acierto fue pensar la solución al problema como uno de probabilidades. Esto es, escribir la solución como la probabilidad de encontrar a la partícula browniana en un cierto lugar a un cierto tiempo, haciendo a un lado el dogma de hacer una descripción determinista de la posición de la partícula. En este trabajo Einstein concluyó que el cuadrado de la distancia recorrida (en promedio) por la partícula browniana entre el tiempo que le lleva hacerlo es una constante. Además demostró que el proceso puede ser descrito por la ecuación de difusión.



Albert Einstein (1879-1955).

⁵ La teoría de los procesos estocásticos se centra en el estudio y modelización de sistemas que evolucionan a lo largo del tiempo, o del espacio, de acuerdo a unas leyes no determinísticas, esto es, de carácter aleatorio.

La ecuación de difusión fue obtenida con argumentos heurísticos por primera vez por Adolf Fick (1829-1901) en 1855, que en una dimensión es,

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2.1)$$

donde C representa la concentración (número de partículas por unidad de volumen) de las partículas brownianas y D la constante de difusión.

Es importante destacar que aunque los resultados de Smoluchowski son esencialmente los mismos que obtuvo Einstein, éstos últimos fueron deducidos utilizando un lenguaje más accesible a los interesados sobre el tema, por lo que tuvo un mayor impacto en la comunidad científica. Smoluchowski utilizó argumentos y aproximaciones conocidas para quienes tenían alguna familiaridad con la teoría cinética, como eran el análisis combinatorio y conceptos como el de trayectoria libre media. Su trabajo ofreció una discusión más explícita de sus hipótesis y aproximaciones, e incluyó una revisión cuidadosa de los experimentos relevantes al problema.



Adolf Fick (1829-1901).

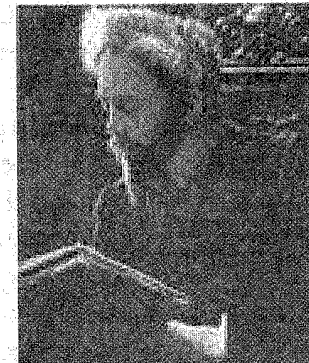
En 1908 Paul Langevin (1872-1946) publicó una descripción macroscópica del movimiento browniano. Para ello escribió la segunda ley de Newton para la partícula browniana. Supuso que la partícula al ser introducida en un fluido experimenta dos fuerzas, una debida al gran número de colisiones con las moléculas del fluido y una fuerza debida a la viscosidad. La primera de ellas la modeló como una fuerza estocástica, mientras la segunda, como es bien sabido, opuesta y proporcional a su velocidad.

Con su teoría Langevin fue capaz de reproducir los resultados teóricos obtenidos para el movimiento browniano por Einstein y Smoluchowski. Así como Smoluchowski escribió que su método era "mejor" que el de Einstein, Langevin empieza su artículo diciendo que es "infinitamente más simple". Tal vez el mérito más grande de Langevin fue escribir el primer ejemplo de una ecuación estocástica; es decir, una ecuación con un término aleatorio y cuya solución es, en cierto sentido, una función estocástica. La complejidad matemática implícita en estas ecuaciones fue analizada y aclarada por el matemático Kiyoshi Itô (1915-2008) quien fue uno de los pioneros en la teoría de la probabilidad, más de cuarenta años después.



Paul Langevin (1872-1946).

En los años de 1908 a 1911 Jean Perrin se dio a la tarea de demostrar experimentalmente que el cuadrado de la distancia recorrida (en promedio) por la partícula browniana entre el tiempo es una constante. Para ello tomó una serie de fotografías a partículas realizando un movimiento browniano cada treinta segundos. Al graficar el cuadrado de la distancia recorrida por la partícula contra el tiempo obtuvo una línea recta. Además, dado que conocía la temperatura y viscosidad del medio, así como las dimensiones de las partículas, calculó de las fórmulas de Einstein el número de Avogadro⁶ obteniendo 6.4×10^{23} . Por sus estudios experimentales sobre el movimiento browniano Perrin recibió el premio Nobel de Física en 1926. El lector interesado en profundizar en la historia del movimiento browniano puede consultar los libros de Robert R. Mazo [1] y de Eliezer Braun [2] y el trabajo de Ramón Peralta-Fabi [3].



Jean Perrin (1870-1942).

⁶ Se define el número de Avogadro como el número de átomos de carbono que hay en 12 gramos de ^{12}C . El valor del número es 6.022×10^{23} . Un mol de cualquier sustancia es la cantidad de la misma que contiene un número de Avogadro de átomos o moléculas.

3. DIFUSIÓN: TEORÍA MICROSCÓPICA

3.1. Características fundamentales de la difusión en una dimensión

En este apartado presentaremos algunas de las principales características de un proceso difusivo. En busca de una mayor claridad en la exposición, estudiaremos primero el caso en una dimensión y posteriormente lo generalizaremos a dos y tres dimensiones.

Comencemos nuestra discusión suponiendo que un conjunto de partículas brownianas se encuentra en el origen de un sistema de coordenadas en $x = 0$ a un tiempo $t = 0$; posteriormente permitamos que las partículas inicien un camino aleatorio siguiendo las reglas:

1) Cada partícula da un paso a la izquierda o derecha de longitud Δx en un tiempo Δt . Por simplicidad supondremos que Δx y Δt son constantes. En la práctica estas cantidades dependerán de las características de las partículas, de la estructura del fluido y de la temperatura absoluta, T .

2) La probabilidad de dar un paso a la derecha es igual que darlo a la izquierda e igual a $1/2$. Este movimiento de la partícula browniana se produce por el choque con las partículas del fluido, las cuales se encuentran en equilibrio, además la partícula browniana no guarda memoria de lo que hizo en el paso anterior.

3) Las partículas brownianas no interactúan entre sí, cada partícula se mueve independientemente de las otras. Esto se cumple sólo a bajas densidades.

Consideremos una colección de N partículas brownianas. Denotemos por $\langle x_i(n) \rangle$ la posición de la i -ésima partícula después de n pasos. De acuerdo con la primera regla la posición de la partícula en el paso n diferirá con

la anterior, $n - 1$ por $\pm \Delta x$, y en general esta diferencia está dada por la siguiente ecuación,

$$x_i(n) = x_i(n-1) \pm \Delta x. \quad (3.1)$$

De acuerdo a las reglas 2) y 3), en promedio la mitad de las partículas después de un tiempo se moverán una distancia $+\Delta x$ y la otra mitad $-\Delta x$. El desplazamiento promedio de las partículas después de n pasos, denotado como $\langle x(n) \rangle$, se puede calcular sumando sobre todas las partículas y dividiendo por el número total de ellas,

$$\langle x(n) \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i(n), \quad (3.2)$$

sustituyendo en esta ecuación la ecuación (3.1), obtenemos que,

$$\langle x(n) \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i(n-1) = \langle x(n-1) \rangle. \quad (3.3)$$

Para obtener este último resultado hay que tomar en cuenta que el promedio del segundo término de la ecuación (3.1) es cero. La ecuación (3.3) establece que el valor promedio de la posición de las partículas no cambia entre pasos sucesivos. Ya que en nuestro problema iniciamos con todas las partículas en el origen, después de n pasos, $\langle x_i(n) \rangle$.

Este resultado nos permite concluir que *las partículas permanecerán distribuidas de manera simétrica respecto al origen a todo tiempo* (véase la figura 2); para entenderlo imaginemos

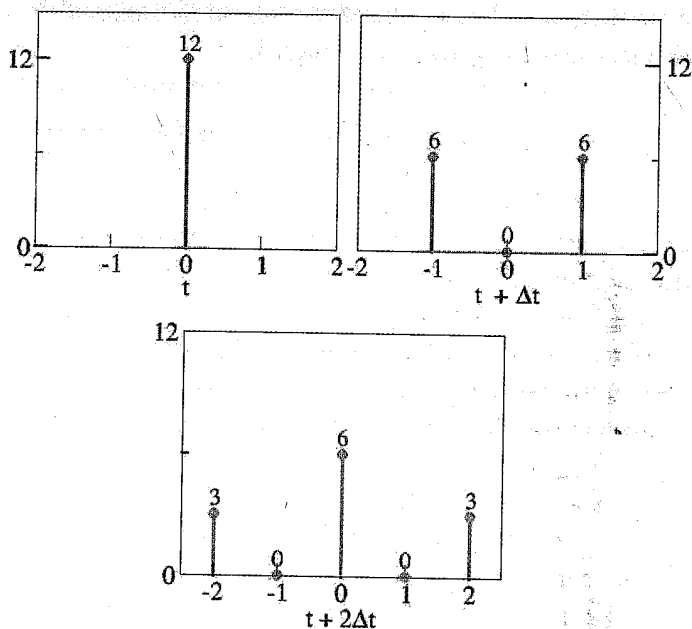


Figura 2. La distribución de partículas es simétrica alrededor de la posición inicial.

que colocamos 12 partículas en el origen, después de un tiempo Δt , en promedio la mitad de las partículas, 6, se encontrarán en $+\Delta x$ y la otra mitad en $-\Delta x$, por lo tanto su desplazamiento promedio será cero. Al tiempo $2\Delta t$, 6 partículas, en promedio, se encontrarán en el origen, 3 en $+2\Delta x$, y 3 en $-2\Delta x$, de modo que una vez más el desplazamiento promedio es cero. Al repetir un gran número de veces este proceso observaremos cómo las partículas se distribuyen siempre, en promedio, de forma simétrica alrededor del origen de coordenadas (punto inicial de la caminata aleatoria). Como consecuencia de esta propiedad el lector notará que debemos buscar una forma más ingeniosa para estimar el desplazamiento promedio de las partículas.

Un modo conveniente de medir el desplazamiento promedio de las partículas consiste en tomar la raíz cuadrada del desplazamiento cuadrático promedio, $\langle x^2(n) \rangle^{1/2}$. Para el cálculo de esta cantidad primero obtenemos el cuadrado de la ecuación (3.1) y lo sustituimos en la definición del promedio, ecuación (3.2),

$$\langle x^2(n) \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i^2(n) = \sum_{i=1}^N [x_i^2(n-1) \pm 2\Delta x x_i(n-1) + \Delta x^2] \left(\frac{1}{N}\right) \quad (3.4)$$

Ya que el promedio del segundo término en el miembro derecho de (3.4) es cero, entonces tenemos que,

$$\langle x^2(n) \rangle = \langle x_i^2(n-1) \rangle + \Delta x^2. \quad (3.5)$$

Sustituyendo $n = 1$ en la ecuación (3.5) encontramos que el promedio del desplazamiento cuadrático medio después de un tiempo Δt es Δx^2 . Para $n = 2$ es igual a $\langle x^2(2) \rangle = \langle x_i^2(1) \rangle + \Delta x^2 = 2\Delta x^2$, y para n desplazamientos

$$\langle x^2(n) \rangle = n\Delta x^2.$$

Ahora, como consecuencia de la regla 1), la partícula ejecuta n pasos en un tiempo $t = n\Delta t$, y ya que $n = t/\Delta t$, explícitamente tenemos que

$$\langle x^2(t) \rangle = (\Delta x^2 / \Delta t)t.$$

Definiendo el coeficiente de difusión como,

$$D = \lim_{\Delta x, \Delta t \rightarrow 0} (\Delta x^2 / 2\Delta t),$$

obtenemos que

$$\langle x^2(t) \rangle = 2Dt. \quad (3.6)$$

De esta última ecuación podemos concluir que el desplazamiento cuadrático promedio se incrementa con el tiempo proporcionalmente a $2D$.

De la ecuación (3.6), podemos observar que a una partícula browniana, recorrer el doble de distancia le toma el cuádruplo de tiempo. Como consecuencia a dicha partícula le toma poco tiempo recorrer distancias cortas, mientras que le lleva tiempos increíblemente largos recorrer distancias mayores. Entonces, de la ecuación (3.6) podemos calcular el tiempo que le toma a una partícula browniana recorrer cierta distancia ya que $t = \langle x^2(t) \rangle / 2D$. Por ejemplo, podemos calcular que una partícula esférica en un fluido, que tiene un coeficiente de difusión de $D \approx 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, recorrerá una distancia de $1 \times 10^{-4} \text{ cm}$ en $t \approx x^2/2D = 5 \times 10^{-4}$ segundos. Mientras que una distancia de un centímetro la recorrerá en un tiempo aproximado de $t \approx x^2/2D = 5 \times 10^4$ segundos, ¡aproximadamente 14 horas!

3.2. Deducción de la ecuación de difusión

Supongamos que tenemos una partícula browniana a la que se restringe su movimiento a una rejilla de una dimensión, y que ésta sólo puede dar un paso a los puntos vecinos. Además supondremos que cumple las reglas 1) y 3) (definidas en la subsección anterior). No es necesario que para nuestro cálculo se cumpla la regla 2) ya que ahora estamos interesados en hacer una descripción más general. Denotemos la probabilidad de que la partícula vaya del punto $j+1$ al j por a , y la de ir del punto $j-1$ al j por b , donde a y b son constantes y $a + b = 1$.

Llamemos $p_n(j)$ a la probabilidad de que la partícula se encuentre en el punto j al n -ésimo paso, entonces esta probabilidad satisface la siguiente ecuación de evolución:

$$p_{n+1}(j) = ap_n(j+1) + bp_n(j-1). \quad (3.7)$$

La ecuación (3.7) nos dice que la partícula llegará al punto j en el paso $n+1$, si y sólo si en el paso anterior la partícula estuvo en $j-1$ o en $j+1$, que son los puntos vecinos inmediatos de j . El primer término del lado derecho de la ecuación (3.7) se construye de la multiplicación de la probabilidad de estar en el punto $j+1$, $p_n(j+1)$, por la probabilidad de moverse a la izquierda, a . Con el mismo razonamiento se construye el segundo término, véase la figura 3.

Ahora, para pasar de la descripción del proceso de la rejilla, al límite continuo, es necesario remplazar las variables discretas n y j por las variables continuas t y x . Para este propósito asumiremos que el tiempo que le toma a la partícula moverse de un punto a otro en la rejilla, y la distancia entre puntos, estarán dados por Δt y Δx respectivamente, además $t = n\Delta t$ y $x = j\Delta x$. Estas últimas relaciones nos permiten escribir la ecuación (3.7) de la siguiente forma:

$$p(j\Delta x, (n+1)\Delta t) = ap((j+1)\Delta x, n\Delta t) + bp((j-1)\Delta x, n\Delta t)$$

$$p(x, t + \Delta t) = ap(x + \Delta x, t) + bp(x - \Delta x, t). \quad (3.8)$$

Para pasar al continuo se requiere que tanto Δx como Δt tiendan a cero. Haciendo un desarrollo en serie de Taylor de cada miembro de la ecuación (3.8) alrededor de cero, tenemos que,

$$p(x, t + \Delta t) \approx p(x, t) + \Delta t \frac{\partial p(x, t)}{\partial t} + \dots \quad (3.9)$$

$$p(x \pm \Delta x, t) \approx p(x, t) \pm \Delta x \frac{\partial p(x, t)}{\partial x} + \frac{1}{2} \Delta x^2 \frac{\partial^2 p(x, t)}{\partial x^2} + \dots \quad (3.10)$$

Al sustituir (3.9) y (3.10) en (3.8) se obtiene

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = (a - b) \frac{\Delta x}{\Delta t} \frac{\partial p(x, t)}{\partial x} + \frac{1}{2} \frac{\Delta x^2}{\Delta t} \frac{\partial^2 p(x, t)}{\partial x^2} + \dots \quad (3.11)$$

Al tomar el límite cuando Δx y Δt tienden a cero, cortando a segundo orden en las derivadas en x , y definiendo

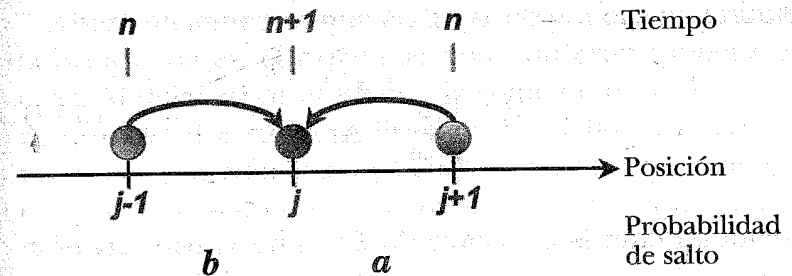
$$D \equiv \lim_{\substack{\Delta x \rightarrow 0 \\ \Delta t \rightarrow 0}} \frac{1}{2} \frac{\Delta x^2}{\Delta t} \quad (3.12)$$

$$v \equiv - \lim_{\substack{\Delta x \rightarrow 0 \\ \Delta t \rightarrow 0}} (a - b) \frac{\Delta x}{\Delta t} \quad (3.13)$$

podemos escribir la ecuación (3.11) en la siguiente forma,

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 p(x, t)}{\partial x^2} - v \frac{\partial p(x, t)}{\partial x}, \quad (3.14)$$

que es la ecuación de difusión con arrastre. El arrastre está cuantificado en el segundo miembro del lado derecho, y es consecuencia de tener una dirección preferencial



$$ap_n(j+1) + bp_n(j-1) = p_{n+1}(j)$$

Figura 3. En el n -ésimo paso una partícula browniana puede ocupar la posición $j-1$ (izquierda) o la posición $j+1$ (derecha) y a continuación efectuar un salto (con probabilidad b o a , respectivamente) para ocupar la posición contigua j (centro), en el siguiente paso ($n+1$).

en el movimiento, $a \neq b$. Como caso particular podemos hacer $a = b$, y de las definiciones (3.13) observamos que el término de arrastre en la ecuación (3.14) desaparece. En este caso se cumple también la regla 2) y la ecuación (3.14) se convierte en la ecuación de difusión de Fick,

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 p(x, t)}{\partial x^2}. \quad (3.15)$$

La solución a esta ecuación nos dice la probabilidad de encontrar a la partícula en cada posición a todo tiempo.

Si suponemos que tenemos una partícula browniana que puede moverse en tres dimensiones siguiendo las mismas reglas descritas que en una dimensión, en coordenadas rectangulares la ecuación (3.15) toma la siguiente forma,

$$\frac{\partial p(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 p(\vec{r}, t)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 p(\vec{r}, t)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 p(\vec{r}, t)}{\partial z^2} \right], \quad (3.16)$$

donde

$$D = \lim_{\substack{\Delta \vec{r} \rightarrow 0 \\ \Delta t \rightarrow 0}} \frac{1}{6} \frac{\Delta \vec{r}^2}{\Delta t} \quad (3.17)$$

Para obtener la ecuación (3.17) es necesario recordar que,

$$\begin{aligned} \langle \Delta r^2 \rangle &= \langle \Delta x^2 \rangle + \langle \Delta y^2 \rangle + \langle \Delta z^2 \rangle \\ &= 2D_x \Delta t + 2D_y \Delta t + 2D_z \Delta t. \end{aligned}$$

De modo que si las constantes de difusión en cualquiera de las direcciones tienen el mismo valor D , $\langle \Delta r^2 \rangle = 6D\Delta t$. Esto sucede cuando la difusión se lleva a cabo en un fluido isotrópico.

Por simplicidad en la notación es conveniente utilizar la definición del operador laplaciano dada como

$$\nabla^2 \equiv \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \quad (3.18)$$

que nos permite finalmente escribir la ecuación de Fick como,

$$\frac{\partial p(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 p(\vec{r}, t). \quad (3.19)$$

La ecuación (3.19) describe la evolución de la probabilidad de encontrar a una partícula en la posición \vec{r} al tiempo t .

Ahora imaginemos que en lugar de poner una partícula browniana en el origen se pone un gran número de ellas. Al dejar pasar el tiempo la solución de la ecuación de difusión describirá la distribución de las partículas en cualquier posición a todo tiempo, esto es, su concentración en \vec{r} al tiempo t . Para obtener esta descripción multiplicamos ambos miembros de la ecuación (3.19) por el número total de partículas

$$p(\vec{r}, t)N = C(\vec{r}, t)$$

y obtenemos finalmente la ecuación de Fick en tres dimensiones para la concentración,

$$\frac{\partial C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 C(\vec{r}, t). \quad (3.20)$$

En el apéndice A se muestran las expresiones de los diferentes operadores diferenciales en coordenadas esféricas y cilíndricas.

4. DIFUSIÓN: TEORÍA MACROSCÓPICA

4.1. Conservación de partículas, flujo, corriente y ecuación de continuidad

La conservación de las partículas es la afirmación de que en la ausencia de reacciones químicas el número total de moléculas de una especie permanece constante. De este hecho se puede cuantificar el flujo de partículas. Para ejemplificarlo consideremos un tubo, de longitud $2L$ dividido por un plano imaginario, véase la figura 4. Supongamos que al tiempo t se tienen N_1 partículas en el

volumen V_1 y N_2 partículas en el volumen V_2 . Posteriormente a un tiempo t' se observan N_1' partículas en el volumen V_1 , y N_2' partículas en el volumen V_2 . Si las cantidades de partículas observadas a tiempos diferentes no es la misma en los volúmenes, entonces podemos concluir que tenemos un flujo de partículas entre ellos. El flujo de partículas se define simplemente como el número de partículas que pasan de V_1 a V_2 , por unidad de tiempo por unidad de área, el flujo mide la pérdida de partículas en cada volumen (es decir, también existe un flujo a la inversa, de V_2 a V_1 , denotado por J_2),

$$J_1 = -\frac{N_1' - N_1}{A(t' - t)} = -\frac{\Delta N_1}{A\Delta t} \quad (4.1)$$

Debido a la conservación de las partículas el lector puede observar que $J_2 = -J_1$.

Por otro lado, al multiplicar la ecuación (4.1) por $\Delta x/\Delta x$ y reagrupando términos encontramos que,

$$J_1 = -\frac{\Delta x \Delta N_1}{\Delta x A \Delta t} = -C(V, t) \frac{\Delta x}{\Delta t} = -vC(V, t) \quad (4.2)$$

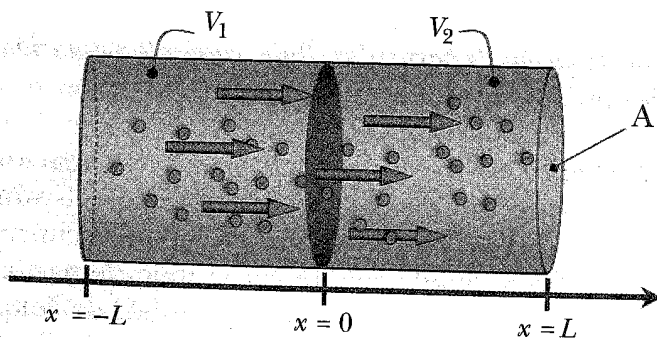


Figura 4. Perspectiva de un tubo cilíndrico dividido por un plano imaginario en el origen.

donde V es la velocidad del flujo. (4.2) nos dice que el flujo se puede encontrar al medir la velocidad de desplazamiento de la concentración.

Para los cálculos subsecuentes es importante recordar que la concentración es el número de partículas por unidad de volumen y su relación con N_i (el número de partículas en el i -ésimo compartimiento) está dada por

$$N_i(t) = \int_{V_i} C(V, t) dV \quad (4.3)$$

donde $i = 1, 2$.

A continuación daremos los pasos conducentes para encontrar la relación entre flujo y concentración. Para lo cual analizaremos el flujo de partículas en un sistema como el de la figura 4. El cambio de partículas en el tiempo por unidad de área, del compartimiento 1 estará dado por,

$$\begin{aligned} \frac{1}{A} \frac{dN_1}{dt} &= \frac{1}{A} \frac{d}{dt} \int_V C(V, t) dV \\ &= \frac{1}{A} \frac{d}{dt} \int_{-L}^0 AC(x, t) dx = \int_{-L}^0 \frac{\partial C(x, t)}{\partial t} dx \end{aligned} \quad (4.4)$$

donde hemos supuesto simetría radial con respecto a las coordenadas y y z . Sustituyendo la ecuación de difusión, ecuación (2.1),

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

en la ecuación (4.4), obtenemos que,

$$\begin{aligned}
J &= -D \int_{-L}^0 \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} dx \\
&= -D \left[\left(\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \right)_{x=0} - \left(\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \right)_{x=-L} \right] \\
&= -D \left(\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (4.5)
\end{aligned}$$

Para pasar de la segunda a la tercera línea en la ecuación (4.5) se ha tomado en cuenta que el flujo a través de la pared en $x = -L$ es cero. La generalización de la ecuación (4.5) en tres dimensiones es,

$$J = -D \nabla C. \quad (4.6)$$

Comúnmente a la ecuación (4.6) se le llama la *primera ley de Fick*, y a la ecuación de difusión, ecuación (3.20), la *segunda ley de Fick*. La ecuación (4.6) muestra que el flujo es proporcional al negativo del cambio de concentración, esto es, el flujo siempre va de la mayor a la menor concentración.

Combinando la ecuación (3.20),

$$\frac{\partial C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 C(\vec{r}, t)$$

con la ecuación (4.6) y recordando que $\nabla \equiv \nabla \cdot \nabla$, obtenemos,

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\nabla \cdot J. \quad (4.7)$$

Esta ecuación diferencial nos dice que el cambio de partículas dentro de un elemento de volumen es igual a la divergencia del flujo, siendo la divergencia de un campo vectorial una cantidad que mide en un punto del espacio el flujo saliente (fuente) o entrante (sumidero), y comúnmente se llama ecuación de conservación. Las diferentes expresiones para la divergencia y el gradiente en coordenadas esféricas y cilíndricas se muestran en el apéndice A.

Una de las definiciones más útiles en el estudio de la difusión es la de corriente $I = AJ$. Su relación con la concentración se puede encontrar de la ecuación (4.6) y es la siguiente,

$$I = -AD \nabla C. \quad (4.8)$$

La utilidad de la ecuación (4.8) radica en que nos dice el número de partículas que cruzan un plano por unidad de tiempo. Como el lector podrá ver, una vez que se obtiene la ecuación de difusión para un sistema dado, es posible calcular el flujo y la corriente.

5. TEOREMA DE FLUCTUACIÓN DISIPACIÓN

Uno de los teoremas más importantes que se tienen en física estadística es el de fluctuación disipación. En el equilibrio los valores de las variables termodinámicas tienen fluctuaciones, la magnitud de estas fluctuaciones se puede relacionar con la velocidad con la que el sistema se acerca al equilibrio. Este teorema es muy general y se aplica a diferentes procesos. Además su importancia radica en que nos permite calcular propiedades de transporte como la constante de difusión y la viscosidad, entre otras.

Para ilustrar esta idea discutiremos el modelo de Langevin para describir el movimiento de una partícula browniana en una dimensión. De acuerdo con la segunda ley de Newton, una partícula de masa m multiplicada por su aceleración, dv/dt es igual a la suma de todas las fuerzas actuando en ella. En el modelo de Langevin se considera que las fuerzas que actúan con la partícula son dos: la debida al arrastre viscoso que es de carácter disipativo y proporcional a la velocidad, la ley de Stokes, ξv ; y una fuerza estocástica $f(t)$ debida a las colisiones del medio con la partícula browniana, que fluctúa rápidamente como función del tiempo. En este esquema cada vez que la partícula es movida por los choques en una dirección la fricción actúa en dirección contraria. De la segunda ley de Newton la ecuación de movimiento para la partícula, o ecuación de Langevin es,

$$m \frac{dv}{dt} = f(t) - \xi v, \quad (5.1)$$

donde ξ es el coeficiente de fricción.

Para continuar con nuestro análisis primero tenemos que discutir el significado de una función de correlación. Esta función nos dice qué tan rápido la partícula olvida su valor inicial. Por ejemplo, $\langle v(0)v(t) \rangle$, la función de correlación de la velocidad nos dice qué tanto al tiempo t , está correlacionada la velocidad con la inicial. Por ejemplo, a tiempos tan cortos en los que la partícula no ha recibido colisiones o sólo unas cuantas, $\langle v(0)v(t) \rangle \approx v(0)^2$, ya que prácticamente su velocidad inicial se mantiene inalterada. Una vez que la partícula sufre suficientes colisiones como para que el promedio entre ellas en ambas direcciones sea igual, la partícula ha olvidado por completo

su velocidad inicial y no tiene ninguna correlación con la velocidad a ese tiempo, por lo tanto $\langle v(0)v(t) \rangle = 0$.

Comencemos a resolver la ecuación de Langevin, multiplicando por x la ecuación (5.1) y promediando sobre un número grande de partículas, con lo que se obtiene,

$$m \left\langle x \frac{d^2 x}{dt^2} \right\rangle = \langle x f(t) \rangle - \left\langle \xi x \frac{dx}{dt} \right\rangle. \quad (5.2)$$

Utilizando la notación \dot{x} para indicar la derivación respecto al tiempo, escribamos (5.2) como,

$$m \langle x \ddot{x} \rangle = \langle x f(t) \rangle - \langle \xi x \dot{x} \rangle \quad (5.3)$$

aparte, usemos la regla de la cadena para obtener la siguiente relación,

$$\frac{d}{dt} \langle x \dot{x} \rangle = \langle x \ddot{x} \rangle + \dot{x}^2 \quad (5.4)$$

de donde se despeja $x \ddot{x}$ para sustituir en (5.3),

$$m \frac{d}{dt} \langle x \dot{x} \rangle - m \langle \dot{x}^2 \rangle = \langle x f(t) \rangle - \langle \xi x \dot{x} \rangle \quad (5.5)$$

como $\langle \dot{x} \rangle = \langle v \rangle$, hagamos $m \langle v^2 \rangle = k_B T$. Además, el término $x \dot{x}$ puede reescribirse como,

$$x \dot{x} = x \frac{dx}{dt} = \frac{1}{2} \frac{dx^2}{dt} \quad (5.6)$$

con lo que (5.5) toma la forma,

$$\frac{m}{2} \frac{d^2}{dt^2} \langle x^2 \rangle - k_B T = \langle x f(t) \rangle - \frac{\xi}{2} \frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle. \quad (5.7)$$

Suponiendo que para toda x el valor de la fuerza estocástica no está correlacionada con la posición, tenemos que $\langle x f(t) \rangle = 0$, con lo que tras un leve reordenamiento,

$$\frac{d^2}{dt^2} \langle x^2 \rangle = \frac{2k_B T}{m} - \frac{\xi}{m} \frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle. \quad (5.8)$$

Integrando con respecto a t (5.8) obtenemos,

$$\frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle = \frac{2k_B T}{m} t - \frac{\xi}{m} \langle x^2 \rangle + A_0. \quad (5.9)$$

Integrando con respecto a t (5.9), y considerando que en $t = 0$, $\langle x^2 \rangle = 0$ y $d\langle x^2 \rangle/dt = 0$, obtenemos,

$$\frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle = \frac{2k_B T}{m} t - \frac{\xi}{m} \langle x^2 \rangle \quad (5.10)$$

que es una ecuación diferencial lineal no homogénea.

Para simplificar la notación durante el desarrollo siguiente, hagamos $y = \langle x^2 \rangle$ y escribamos la ecuación (5.10) como,

$$\frac{dy}{dt} + \frac{\xi}{m} y = \frac{2k_B T}{m} t. \quad (5.11)$$

La solución general a esta ecuación diferencial se compone de dos partes: una solución complementaria y_C , que es la solución al sistema homogéneo complementario de

(5.11), y una solución particular y_P cuya obtención detallaremos un poco más adelante. De este modo, la solución buscada se obtiene de la superposición de ambas partes,

$$y = y_C + y_P. \quad (5.12)$$

El sistema homogéneo complementario de (5.11) tiene la forma,

$$\frac{dy}{dt} + \frac{\xi}{m} y = 0 \quad (5.13)$$

y su solución está dada por,

$$y_C = A_1 e^{-\frac{\xi}{m} t}. \quad (5.14)$$

Para encontrar la solución particular a (5.11), observamos la estructura de la expresión del lado izquierdo (la inhomogeneidad) y notamos que es lineal en el tiempo, por tanto, proponemos que y_P también es una función lineal de t ,

$$y_P = B_1 t + B_2 \quad (5.15)$$

y usemos esta expresión para sustituirla en la ecuación (5.11), con lo que obtenemos,

$$\begin{aligned} \frac{dy_P}{dt} + \frac{\xi}{m} y_P &= \frac{2k_B T}{m} t \\ \frac{d}{dt} (B_1 t + B_2) + \frac{\xi}{m} (B_1 t + B_2) &= \frac{2k_B T}{m} t \end{aligned} \quad (5.16)$$

$$\frac{\xi}{m} B_1 t + \left(B_1 + \frac{\xi}{m} B_2 \right) = \frac{2k_B T}{m} t$$

de donde se sigue,

$$\begin{aligned} \frac{\xi}{m} B_1 &= \frac{2k_B T}{m} \\ B_1 + \frac{\xi}{m} B_2 &= 0 \end{aligned} \quad (5.17)$$

por tanto, la solución particular y_P toma la forma,

$$y_P = \frac{2k_B T}{\xi} t - \frac{2k_B T m}{\xi^2} \quad (5.18)$$

así, la solución buscada, ecuación (5.12), es

$$\langle x^2 \rangle = A e^{-\xi t/m} + \frac{2k_B T}{\xi} t - \frac{2k_B T m}{\xi^2} \quad (5.19)$$

Finalmente, la expresión deseada para $d\langle x^2 \rangle/dt$ está dada por la derivada de (5.19) respecto al tiempo,

$$\frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle = -\frac{\xi}{m} A e^{-\xi t/m} + \frac{2k_B T}{\xi}, \quad (5.20)$$

donde A es una constante de integración. Para tiempos cortos se puede hacer un desarrollo en serie de Taylor de la exponencial, mientras que para tiempos largos (comparados con m/ξ , esto es, $t \gg m/\xi$), (5.20) se reduce a

$$\frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle = \frac{2k_B T}{\xi}. \quad (5.21)$$

Integremos esta expresión de un tiempo inicial $t = t_0$ a $t = t$ y obtengamos la siguiente solución,

$$\langle x^2 \rangle - \langle x_0^2 \rangle = \frac{2k_B T}{\xi} t \quad (5.22)$$

que, como podemos observar, corresponde a una partícula que difunde en el líquido siguiendo un camino aleatorio con una constante de difusión,

$$D = \frac{k_B T}{\xi}. \quad (5.23)$$


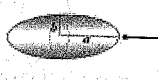
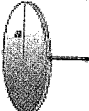
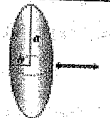
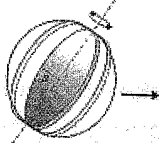
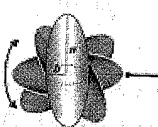
La ecuación (5.23) es útil para determinar el coeficiente ξ si se conoce D . Además, debido a que ξ depende de las dimensiones y forma de la partícula, conocer D proporciona cierta información acerca de la estructura de las partículas. Por ejemplo, para una partícula esférica, $\xi = 6\pi\eta a$ (véase la referencia [3]). Donde η es la viscosidad del disolvente y a el radio de la esfera. Con este resultado podemos notar que el coeficiente de difusión para una partícula esférica está dado por la relación de Stokes-Einstein,

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a}. \quad (5.24)$$

Esta ecuación predice que la constante de difusión es directamente proporcional a la temperatura e inversamente proporcional al radio de la esfera. Como consecuencia, mientras más pequeño sea el radio de la partícula, mayor será su desplazamiento promedio. En la tabla 1 se muestra ξ para partículas con diferentes geometrías.

Tabla 1

COEFICIENTE DE FRICCIÓN PARA PARTÍCULAS CON DIFERENTES GEOMETRÍAS*

 <p>Disco moviéndose de frente</p>	$\xi = 16\eta a$	 <p>Elipsóide moviéndose axialmente</p>	$\xi = \frac{4\pi\eta a}{\ln(2a/b) - 1/2}$
 <p>Disco moviéndose de lado</p>	$\xi = \frac{32}{3}\eta a$	 <p>Elipsóide moviéndose de lado</p>	$\xi = \frac{8\pi\eta a}{\ln(2a/b) + 1/2}$
 <p>Disco moviéndose al azar</p>	$\xi = 12\eta a$	 <p>Elipsóide moviéndose al azar</p>	$\xi = \frac{6\pi\eta a}{\ln(2a/b)}$

* Tomado de la referencia [4].

Ahora calculemos la función de correlación de velocidad de la ecuación de Langevin. Multiplicando ambos lados de la ecuación (5.1) por $v(0)$ y promediando, tenemos que,

$$m \left\langle v(0) \frac{dv(t)}{dt} \right\rangle = \langle v(0)f(t) \rangle - \xi \langle v(0)v(t) \rangle. \quad (5.25)$$

Ya que la fuerza fluctuante no tiene ninguna correlación con la velocidad inicial $\langle v(0)f(t) \rangle = 0$, por otro lado este producto es cero ya que $\langle f(t) \rangle = 0$. Por tal motivo podemos escribir la ecuación (5.25) como,

$$\frac{d}{dt} \langle v(0)v(t) \rangle + \frac{\xi}{m} \langle v(0)v(t) \rangle = 0. \quad (5.26)$$

Integrando (5.26) se obtiene que,

$$\langle v(0)v(t) \rangle = A_1 e^{-\xi t/m} \quad (5.27)$$

donde la constante de integración se puede obtener evaluando (5.27) a $t = 0$. A tiempos cortos $\langle v(0)v(0) \rangle = v(0)^2$, de modo que

$$\langle v(0)v(t) \rangle = v(0)^2 e^{-\xi t/m} \quad (5.28)$$

y ya que $\langle v^2(0)/2 \rangle = k_B T/2$, (5.28) puede ser expresada como,

$$\langle v(0)v(t) \rangle = \frac{k_B T}{m} e^{-\xi t/m}. \quad (5.29)$$

Esta ecuación es el teorema de fluctuación disipación, y muestra que mientras más tiempo pase, menor será la correlación entre velocidades. La ecuación (5.29) es válida sólo para tiempos cortos. Además, por otro lado la integración de la ecuación (5.29) nos proporciona la constante de difusión,

$$\int_0^\infty \langle v(0)v(t) \rangle dt = \frac{k_B T}{m} \int_0^\infty e^{-\xi t/m} dt = \frac{k_B T}{\xi} = D \quad (5.30)$$

ya que $\int_0^\infty e^{-\xi t/m} dt = m/\xi$. En tres dimensiones esta integral, ecuación (5.30), es igual a $3D$, como es de esperar.

El lector puede demostrar que el coeficiente de fricción se puede relacionar con la correlación entre fuerzas multiplicando la ecuación (5.1) por $f(0)$, a saber,

$$\xi = \frac{1}{2k_B T} \int_{-\infty}^{\infty} \langle f(0)f(t) \rangle dt. \quad (5.31)$$

El uso frecuente de la formulación de Langevin se debe a que la imagen física es más transparente y permite aprovechar la intuición y la información experimental para hacer aproximaciones adicionales [3].

6. SOLUCIÓN GENERAL A LA ECUACIÓN DE DIFUSIÓN

Tal vez la forma más simple de resolver la ecuación de difusión sin condiciones de frontera es utilizando transformadas de Fourier. Esta transformada nos permite reducir una ecuación en derivadas parciales a una ecuación diferencial ordinaria que sólo depende del tiempo. La transformada de Fourier de la función $f(\vec{r})$ se define como,

$$\tilde{f}(\omega) = \tilde{F}\{f(\vec{r})\} \equiv \int_{-\infty}^{\infty} f(\vec{r})e^{-i\omega\vec{r}} d\vec{r}. \quad (6.1)$$

Si aplicamos la transformada de Fourier a la ecuación de difusión con arrastre en una dimensión (sólo por simplicidad, sin perder generalidad) obtenemos que

$$\tilde{F}\left\{\frac{\partial c(x,t)}{\partial t}\right\} = \tilde{F}\left\{D\frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial x^2}\right\} + \tilde{F}\left\{v\frac{\partial c(x,t)}{\partial x}\right\}. \quad (6.2)$$

A continuación analizaremos cada una de las transformadas para hacer más claro el proceso. Del término del lado izquierdo, ya que los operadores integral y diferencial conmutan tenemos que,

$$\tilde{F}\left\{\frac{\partial c(x,t)}{\partial t}\right\} = \frac{\partial}{\partial t}(\tilde{F}\{c(x,t)\}) = \frac{\partial}{\partial t}\left(\int_{-\infty}^{\infty} c(x,t)e^{-i\omega x} dx\right),$$

donde la integral es precisamente la definición de la transformada de la función

$$\tilde{F}\left\{\frac{\partial c(x,t)}{\partial t}\right\} = \frac{\partial \tilde{c}(\omega,t)}{\partial t}. \quad (6.3)$$

Ahora encontraremos la transformada de Fourier del segundo término del lado derecho, aplicando la transformación a la primer derivada obtenemos que,

$$\tilde{F}\left\{v\frac{\partial c(x,t)}{\partial x}\right\} = v\int_{-\infty}^{\infty} \frac{\partial c(x,t)}{\partial x} e^{-i\omega x} dx$$

que al integrar por partes se tiene que,

$$\tilde{F}\left\{v\frac{\partial c(x,t)}{\partial x}\right\} = v\left[e^{-i\omega x}c(x,t)\Big|_{-\infty}^{\infty} - \int_{-\infty}^{\infty} i\omega e^{-i\omega x}c(x,t) dx\right];$$

ya que $e^{-i\omega x}c(x,t)|_{-\infty}^{\infty} \rightarrow 0$,

$$\begin{aligned} \tilde{F}\left\{v\frac{\partial c(x,t)}{\partial x}\right\} &= v\int_{-\infty}^{\infty} i\omega e^{-i\omega x}c(x,t)dx \\ &= i\omega v\int_{-\infty}^{\infty} e^{-i\omega x}c(x,t)dx \\ &= i\omega v\tilde{c}(\omega,t). \end{aligned} \quad (6.4)$$

Con el mismo procedimiento que en el caso anterior se encuentra la transformada del primer miembro del lado derecho, a saber,

$$\tilde{F} \left\{ D \frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial x^2} \right\} = -\omega^2 D \tilde{c}(\omega, t). \quad (6.5)$$

Finalmente sustituyendo las expresiones (6.3) a (6.5) en (6.2) obtenemos que la ecuación diferencial original se transforma en

$$\frac{\partial \tilde{c}(\omega, t)}{\partial t} = -(i\omega v - D\omega^2) \tilde{c}(\omega, t). \quad (6.6)$$

Para resolver esta ecuación diferencial podemos proceder de dos maneras. La primera es aplicándole la transformada de Laplace para convertirla en una ecuación algebraica y la segunda es integrando; por simplicidad utilizaremos esta última y para ello separamos variables obteniendo que,

$$\frac{\partial \tilde{c}(\omega, t)}{\tilde{c}(\omega, t)} = (i\omega v - D\omega^2) \partial t.$$

Integrando obtenemos que,

$$\ln \frac{\tilde{c}(\omega, t)}{\tilde{c}_0} = (i\omega v - D\omega^2) t,$$

lo cual podemos reescribir como,

$$\tilde{c}(\omega, t) = \tilde{c}_0 e^{(i\omega v - D\omega^2)t}. \quad (6.7)$$

Para encontrar la solución en el espacio, aplicamos la transformada inversa de Fourier a la ecuación (6.7) definida por

$$f(\vec{r}) \equiv \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{f}(\omega) e^{i\omega \vec{r}} d\omega \quad (6.8)$$

obteniendo que,

$$c(x, t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{c}_0 e^{(i\omega v - D\omega^2)t} e^{i\omega x} d\omega. \quad (6.9)$$

Cuya solución es (véase el apéndice E para obtener sus detalles finales),

$$c(x, t) = \frac{c_0}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-(x-vt)^2/4Dt}. \quad (6.10)$$

La solución para la difusión sin arrastre se obtiene haciendo $vt = 0$. Como puede verse en la figura 5, esta distribución es gaussiana y tiene una desviación cuadrática media $\sigma^2 = 2Dt$ (véase §9.1 y compare (6.10) con la forma analítica de la distribución gaussiana estándar). Cuando el tiempo avanza la distribución se hace más ancha y pierde altura y el ancho se incrementa como $\sqrt{2Dt}$, pero el área bajo la curva permanece constante.

Ahora discutiremos la utilidad de definir la solución a un punto inicial de concentración llamado función de Green. La función de Green de una partícula se define como,

$$c(x, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-x^2/4Dt}. \quad (6.11)$$

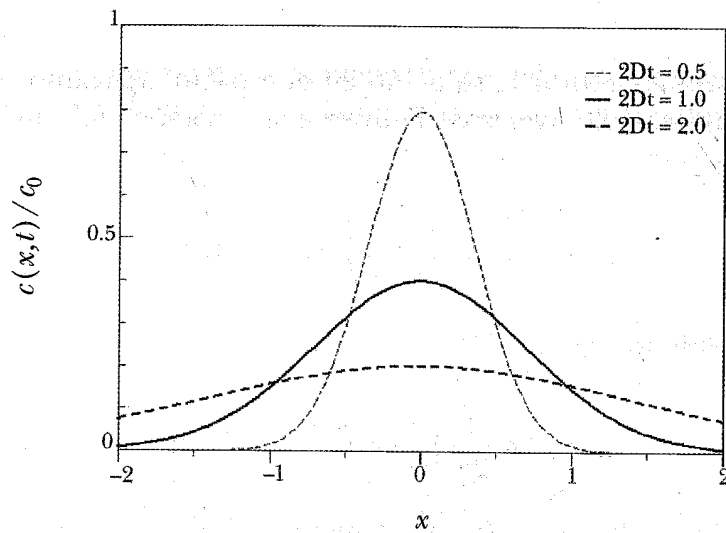


Figura 5. Difusión simple en una dimensión, sin arrastre. Distribución espacial de la concentración para un tiempo fijo.

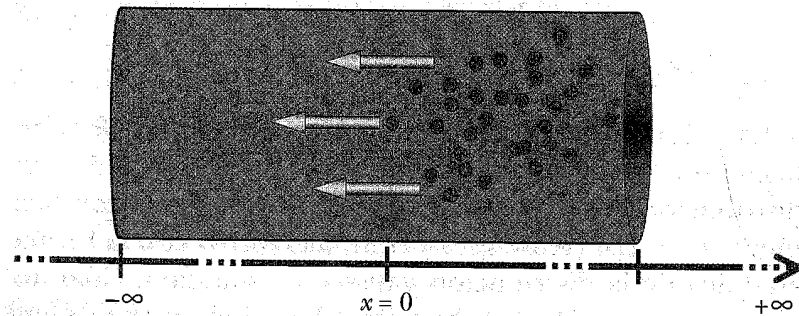


Figura 6. Cilindro de longitud $2L$. Inicialmente todas las partículas de un fluido ocupan el espacio a la derecha del plano de referencia en $x = 0$.

La función de Green describe por tanto la concentración, por ejemplo, de un mol de partículas que inicialmente están en el origen.

Como ejemplo de la aplicación de la función de Green estudiemos la difusión en un cilindro en el que inicial-

mente la mitad de éste se encuentra vacío y la otra mitad lleno de un fluido, véase la figura 6. Asumiremos, además, que el cilindro es lo suficientemente largo como para no preocuparnos de lo que sucede en las fronteras.

En este arreglo tenemos que al inicio $c = c_0$ para $x > 0$ y $c = 0$ para $x < 0$. La solución al problema se da como una superposición de las funciones de Green de cada partícula, asumiendo que cada una de éstas difunde independientemente de las otras, y suponiendo que cada una de ellas, contribuyendo con la concentración inicial, se encuentra centrada en x' entonces,

$$c(x, t) = \frac{c_0}{\sqrt{4\pi Dt}} \int_{x'=0}^{\infty} e^{-(x'-x)^2/4Dt} dx'. \quad (6.12)$$

Esta integral no se puede resolver analíticamente, pero se puede encontrar su similitud con una función especial al hacer un cambio de variable. La función error complementaria se define como,

$$\text{erfc}(x) \equiv \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^{\infty} e^{-y^2} dy. \quad (6.13)$$

Ahora, haciendo el cambio de variable $y = (x' - x)/\sqrt{4Dt}$, la ecuación (6.12) se puede escribir de la siguiente forma (ver figura 7),

$$c(x, t) = \frac{c_0}{\sqrt{\pi}} \int_{-x/\sqrt{4Dt}}^{\infty} e^{-y^2} dy = \frac{c_0}{2} \text{erfc}(-x/\sqrt{4Dt}). \quad (6.14)$$

Es importante recalcar que este método de solución es generalizable a cualquier distribución inicial de concentración así fuera ésta dependiente de la posición.

Se sugiere al lector utilizar el método para resolver la difusión en un canal cilíndrico en el cual se tiene una concentración inicial c_0 para $x > a$ y c_0 para $x < -a$.

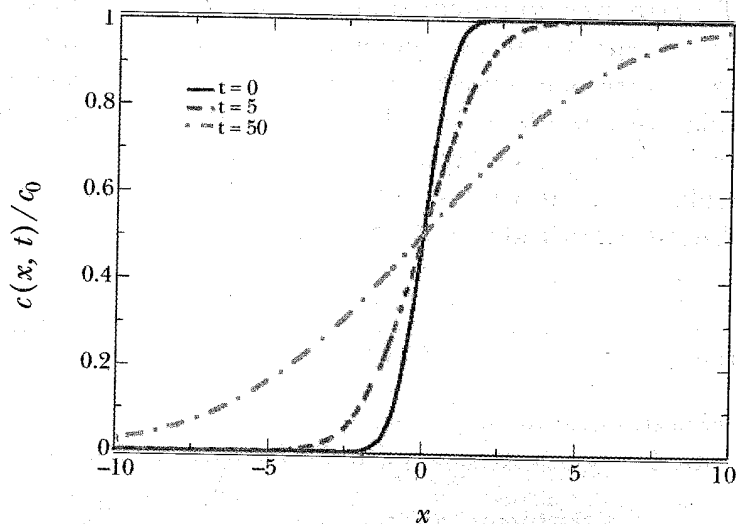


Figura 7. Gráfica de la ecuación (6.14) tomando $D = 1/4$.

7. CONDICIONES DE FRONTERA

Para poder describir la difusión cuando se tiene un sistema de partículas brownianas moviéndose en un sistema confinado, es necesario describir las propiedades de las fronteras. En esta sección discutiremos las expresiones matemáticas cuando estas fronteras son absorbentes, reflejantes, parcialmente absorbentes, o cuando éstas aportan partículas al sistema.

Una frontera absorbente es aquella capaz de remover del sistema cualquier partícula que entre en contacto con

ella; en este caso la concentración de partículas en la frontera a todo tiempo es igual a cero; si \bar{r} es un punto de la misma,

$$C(\bar{r}, t) = 0. \quad (7.1)$$

Una frontera reflejante es aquella en la que, al entrar en contacto con las partículas, éstas sufren un cambio de dirección; debido a esto, a través de ella el flujo de partículas es igual a cero,

$$\frac{\partial C(\bar{r}, t)}{\partial \bar{r}} = 0. \quad (7.2)$$

Una frontera parcialmente absorbente es aquella que únicamente deja pasar un porcentaje de partículas del total que entra en contacto con ella. La constante de proporcionalidad κ nos dice la eficiencia con la cual la frontera deja pasar a las partículas, esta condición se puede escribir como,

$$\frac{\partial C(\bar{r}, t)}{\partial \bar{r}} = \kappa C(\bar{r}, t). \quad (7.3)$$

Las ecuaciones (7.1) y (7.2) se pueden obtener de (7.3) haciendo $\kappa \rightarrow \infty$ y $\kappa = 0$, respectivamente. Ambas son casos particulares de (7.3). Se deja al lector como ejercicio obtener ambas expresiones a partir de la ecuación (7.3).

Finalmente discutiremos qué sucede si en una frontera se tiene una fuente que es capaz de proporcionar partículas al sistema. Este caso se presenta, por ejemplo, cuando se introduce una pastilla efervescente en un líquido (véase el ejemplo de §8.3, más adelante).

Supongamos que la reacción que suministra las partículas al sistema se lleva a cabo con una constante de reacción k , de modo tal que

$$\frac{\partial C(\vec{r}, t)}{\partial t} = kC(\vec{r}, t). \quad (7.4)$$

8. SOLUCIÓN A LA ECUACIÓN DE DIFUSIÓN: ESTADO ESTACIONARIO

En esta sección resolveremos la ecuación de difusión para algunas simetrías simples en estado estacionario. El estado estacionario se observa cuando la concentración no cambia con respecto al tiempo, lo cual implica que $\partial c/\partial t = -\nabla \cdot \vec{J} = 0$ y que la ecuación de difusión se reduce a la ecuación de Laplace, a saber, $\nabla^2 C = 0$. De hecho es importante recalcar que cuando el flujo es igual a cero se define el estado de equilibrio y en tal caso $\nabla C = 0$, lo cual implica que la concentración es constante en el espacio y en el tiempo.

8.1. Difusión a través de una membrana

En los tejidos vivos, las células mantienen un continuo intercambio de materiales entre ellas y con su entorno inmediato: metabolitos (agua, nutrientes varios, iones), diversos subproductos metabólicos, hasta moléculas mensajeras (especies químicas destinadas a desencadenar una respuesta en un tejido específico, como las hormonas). Para llevar a cabo este intercambio, las especies químicas tienen que pasar muchas veces a través de membranas

cuya composición las dota de una permeabilidad altamente selectiva.

Por otra parte, las membranas se utilizan ampliamente en procesos industriales de separación, por ejemplo, los diferentes componentes de un gas pueden ser separados cuando se pasan a través de una membrana polimérica muy delgada; mediante esta técnica se puede separar el O_2 del N_2 , debido a que la membrana le ofrece menor resistencia a una de las especies para difundir a través de ella.

Supongamos que tenemos una membrana de espesor h a través de la cual pasarán las partículas en estudio, las cuales difunden en un medio con constante de difusión D . Supongamos que la concentración del lado izquierdo de la membrana es igual a c_i y a su derecha igual a c_d . Si estas concentraciones no son iguales tendremos un flujo de partículas a través de la membrana. De hecho, si suponemos que la concentración es mayor del lado izquierdo que el derecho tendremos un flujo de izquierda a derecha, véase la figura 8.

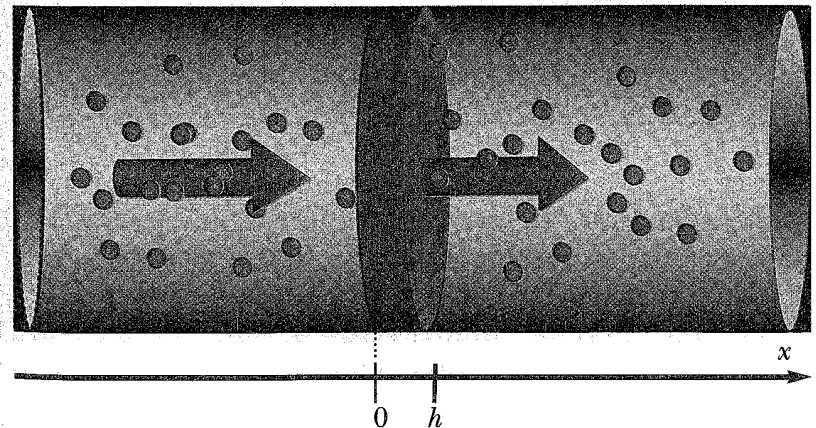


Figura 8. Flujo a través de una membrana.

A continuación daremos los pasos conducentes para encontrar el perfil de concentración $c(x,t)$ de las partículas dentro de la membrana.

Por simplicidad consideraremos simetría radial, de modo que sólo tenemos que estudiar la difusión en una dirección, digamos x . También simplificaremos el estudio al caso de estado estacionario, a saber, $\partial c/\partial t = 0$. Con este par de simplificaciones la ecuación de difusión, ecuación (2.1), se reduce a,

$$\frac{\partial^2 c(x)}{\partial x^2} = 0. \quad (8.1)$$

Integrando esta ecuación se obtiene que,

$$\frac{\partial c(x)}{\partial x} = A_1, \quad (8.2)$$

donde A_1 es una constante de integración a calcular por las condiciones de nuestro problema. Integrando nuevamente encontramos que,

$$c(x) = A_1 x + A_2 \quad (8.3)$$

y A_2 también es una constante de integración. La ecuación (8.3) predice que la concentración dentro de la membrana es lineal en x . Supongamos ahora, para calcular las constantes de integración, que la membrana permite pasar una fracción K de la concentración total que llega a ella. De este modo si situamos $x=0$ al lado izquierdo de la membrana, entonces $c(x=0) = Kc_i$. Sustituyendo esta condición en (8.3) obtenemos que $A_2 = Kc_i$. Dentro de la membrana tenemos que la cantidad de partículas que salen está dada por $c(h) = Kc_d$, que al sustituir en

(8.3) obtenemos $A_1 = K(c_d - c_i)/h$. Introduciendo las dos condiciones en nuestra solución, encontramos finalmente que

$$c(x) = \frac{K(c_d - c_i)}{h} x + Kc_i. \quad (8.4)$$

De (8.4) observamos que la pendiente de la relación lineal está dada por K/h , la cual indica la forma en que está cambiando la concentración dentro de la membrana.

El flujo de partículas a través de la membrana lo calculamos simplemente derivando (8.4) con respecto a x y multiplicando por $-D$, como predice la ecuación (4.6),

$$J = -D \left(\frac{dc}{dx} \right) = D \frac{K(c_i - c_d)}{h}. \quad (8.5)$$

Como podemos ver de esta última expresión el flujo es proporcional a K y disminuye al incrementar h .

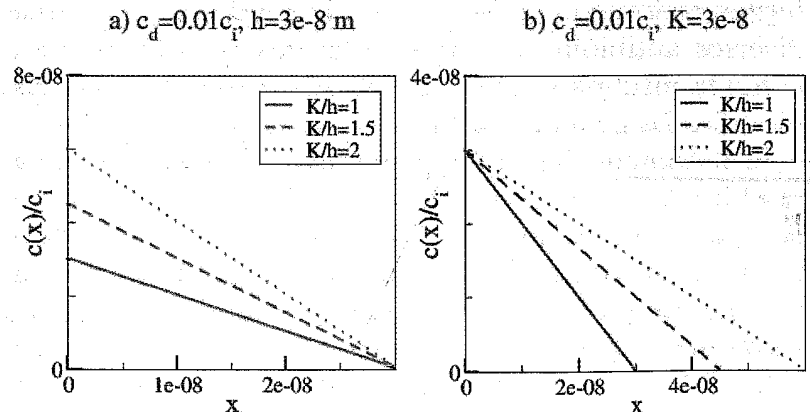


Figura 9. Distribución espacial de la concentración en el interior de una membrana: a) efecto de la variación de K , con h = constante; b) efecto de la variación de h , con K = constante.

La permeabilidad de una membrana se define como el flujo dividido por la diferencia de concentración en las fronteras de la membrana. Para nuestro caso obtenemos que la permeabilidad está dada por KD/h . Finalmente comentaremos que también es común definir la resistencia de la membrana como el inverso de la permeabilidad.

8.2. Difusión hacia una proteína o una micela

La fermentación es un proceso biológico en el cual un sustrato rico en electrones es oxidado por microorganismos (bacterias u hongos) y descompuesto en moléculas más simples, rindiendo energía y otros metabolitos que las células aprovechan. Los subproductos de las fermentaciones pueden ser sustancias de alto valor económico. La industria de los alimentos obtiene de este modo materias primas y aditivos que emplea en la fabricación de cerveza, pan, y una variedad de otros productos. La industria farmacéutica también saca partido de las fermentaciones microbianas, produciendo de esta forma diversos antibióticos y otras sustancias de gran interés, como la insulina humana producida mediante bacterias modificadas genéticamente.

El fenómeno llamado "peletización" consiste en una modificación del crecimiento de los hongos microscópicos que ocurre al cambiar el régimen de agitación durante una fermentación en un medio líquido de laminar a turbulento. En el primero el crecimiento del micelio (el *cuerpo* del hongo) tiende a formar una especie de madeja extendida, mientras que en el régimen turbulento (altas velocidades de agitación) tiende a formar grupos compactos, lentiformes, llamados *pellets*. Este tipo de crecimiento dificulta el transporte de nutrientes y oxígeno

(necesario para la fermentación) desde el medio hasta las células que permanecen ocultas al interior de los *pellets*.

Por simplicidad consideremos que las partículas o ligandos se encuentran en el medio de una micela (una forma de organización adoptada por compuestos anfóteros en disolventes polares, que consiste en una esfera con las partes polares vueltas hacia fuera, dejando en su interior las partes no polares), o proteína esférica. Al momento que las partículas entran en contacto con esta esfera, inmediatamente quedan fuera del sistema, esto es, son absorbidas o transformadas. En este ejemplo calcularemos la concentración y el flujo en estado estacionario de partículas o ligandos en presencia una esfera de radio a con propiedades absorbentes en su superficie (figura 10).

Para simplificar aún más nuestro problema asumiremos que la concentración de las partículas sólo tiene dependencia radial. De este modo podemos escribir la ecuación de difusión en coordenadas esféricas como (véase el apéndice A),

$$\nabla^2 c = \frac{1}{r} \frac{d^2(rc)}{dr^2} = 0. \quad (8.6)$$

Integrando una vez obtenemos que,

$$\frac{d(rc)}{dr} = A_1 \quad (8.7)$$

e integrando nuevamente tenemos,

$$c(r) = A_1 + \frac{A_2}{r}. \quad (8.8)$$

Para poder encontrar los valores de las constantes de integración es necesario tener dos condiciones de frontera.

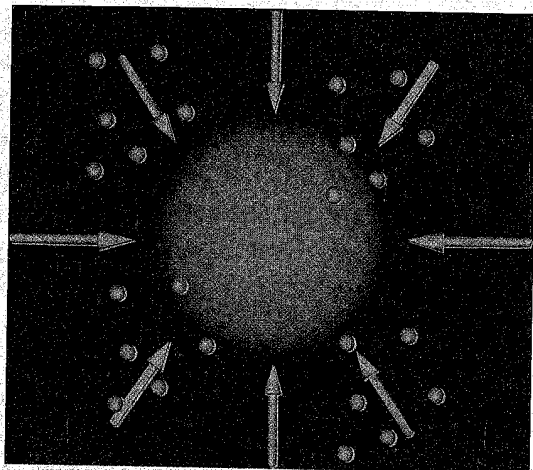


Figura 10. Partículas difundiéndose en un medio con una esfera con propiedades absorbentes en su superficie.

La primera se obtiene de observar que a una distancia muy lejana se debe de tener una concentración constante, a la cual llamaremos c_∞ . La segunda condición se obtiene de las propiedades de la superficie de la esfera, esto es, introducimos la condición absorbente $c(a) = 0$, véase la ecuación (7.1). Con este par de condiciones obtenemos que $A_1 = c_\infty$ y $A_2 = -ac_\infty$. De modo que finalmente tenemos que,

$$c(r) = c_\infty \left(1 - \frac{a}{r}\right). \quad (8.9)$$

De esta solución vemos que la concentración es inversamente proporcional a la distancia (véase la figura 11).

El flujo lo calculamos de la siguiente manera,

$$J = -D \frac{dc}{dr} = -\frac{Dc_\infty a}{r^2}. \quad (8.10)$$

Para obtener el número de colisiones por segundo en la superficie $r = a$, calculamos la corriente. Su expresión está dada por la ecuación (4.8), esto es, se multiplica el flujo por el área de la esfera

$$I(a) = J(a)4\pi a^2 = -4\pi Dc_\infty a. \quad (8.11)$$

El signo menos en la ecuación (8.11) indica que la corriente va en la dirección $-\hat{r}$. Cuando la reacción de las partículas se da tan rápido que prácticamente sucede de modo instantáneo cuando la partícula toca la superficie de la esfera, se dice que la reacción está limitada por la difusión. En estos casos es muy útil asociar una constante a los procesos; por ejemplo, una que nos diga qué tanto volumen se transforma por la reacción en un tiempo dado. Esta constante se define a partir de la corriente, a saber, $I(a) = -k_a c_\infty$. En nuestro ejemplo esa constante está dada por $k_a = 4\pi Da$. Ya que las unidades de D son longitud cuadrada entre tiempo, nuestra constante tiene unidades de volumen entre tiempo, esto es, nos indica la

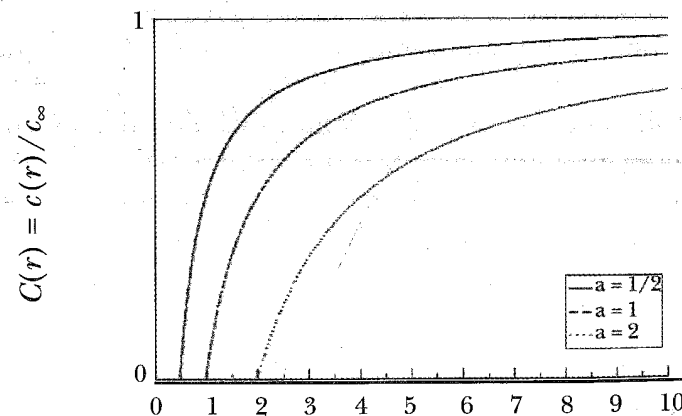


Figura 11. Distribución de la concentración de partículas que difunden hacia una esfera absorbente de radio a .

cantidad de volumen que reacciona con la superficie por unidad de tiempo.

8.3. Difusión acoplada a una reacción química

Imaginemos un medicamento que se suministra a un medio en una tableta (figura 12). Supongamos que el medicamento reacciona en el medio, con constante de difusión D y con una constante de reacción k_r que tiene unidades de inverso de tiempo (esto es, que nos dice la concentración que se transforma en el medio, por unidad de tiempo).

A continuación encontraremos la concentración del medicamento en el medio como función de x colocando el origen de coordenadas en la tableta. Si se incluye el proceso de reacción en la ecuación de difusión, ésta se escribe de la siguiente manera,

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - k_r c. \quad (8.12)$$

El signo menos en el segundo término se debe a que el medicamento reacciona con el medio, transformándose y a consecuencia de ello, disminuyendo su concentración. Por sencillez resolvamos el problema en el estado estacionario $\partial c / \partial t = 0$. Ahora la concentración sólo tiene dependencia espacial, y (8.12) se transforma en,

$$\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - \frac{k_r}{D} c = 0, \quad (8.13)$$

cuya solución general es,

$$c(x) = A_1 e^{-\alpha x} + A_2 e^{\alpha x} \quad (8.14)$$

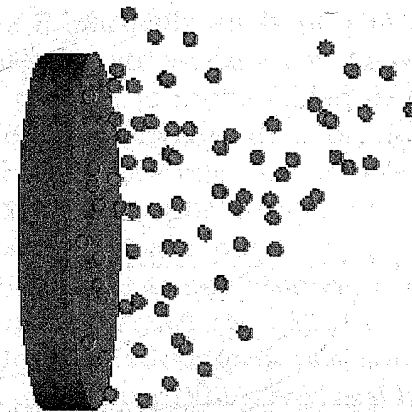


Figura 12. Tableta liberando partículas al medio.

donde $\alpha \equiv \sqrt{k_r / D}$, y A_1 y A_2 son constantes que deberán satisfacer las condiciones de frontera; éstas son, i) a distancias lejanas la concentración debe ser cero, lo cual nos conduce a que $A_2 = 0$; y por otro lado, tenemos ii) una concentración c_0 en $x = 0$. Introduciendo esta última condición en (8.14) obtenemos que $A_1 = c_0$, con lo que finalmente escribimos la solución como,

$$c(x) = c_0 e^{-\alpha x}. \quad (8.15)$$

La ecuación (8.15) nos indica que la concentración decae exponencialmente con la distancia (véase la figura 13). También a partir de esta ecuación podemos calcular el flujo en el origen, y está dado por,

$$J = -D \left(\frac{dc}{dx} \right)_{x=0} = c_0 \alpha D = c_0 \sqrt{k_r D}. \quad (8.16)$$

Este resultado nos indica que el flujo es estacionario y directamente proporcional a las constantes de difusión y de reacción, como era de esperarse.

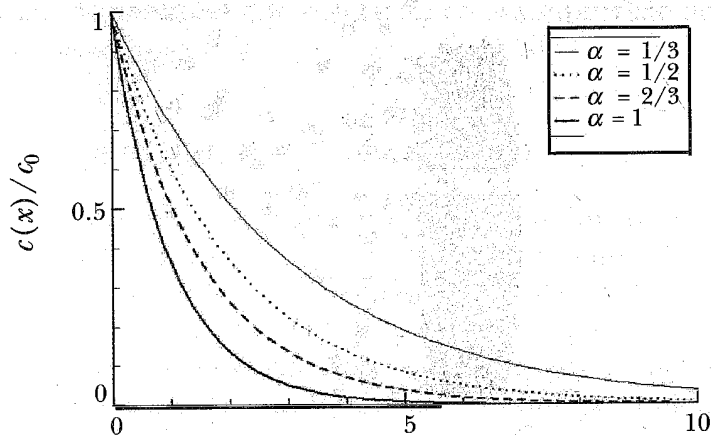


Figura 13. Distribución de la concentración a la distancia x de una tableta que libera partículas al medio, donde sufren una reacción química que las consume. El parámetro $\alpha = k_r^{1/2} D^{-1/2}$ mide el efecto conjunto de la tasa de reacción y la difusión.

9. PROBABILIDAD DE SOBREVIVENCIA Y TIEMPO PROMEDIO DE CAPTURA

Debido a que el desplazamiento promedio de un caminante al azar es igual a cero, pudimos inferir que la posición de las partículas es simétrica con respecto al origen, motivo por el cual también debe cumplirse la ecuación de difusión con la derivada temporal respecto al punto de inicio si es que éste no es cero, sino cualquier punto arbitrario al que denotaremos por x_0 , a saber,

$$\frac{\partial p(x, t | x_0)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 p(x, t | x_0)}{\partial x_0^2}, \quad (9.1)$$

que es la llamada *ecuación hacia atrás* (*backward equation* en inglés), en la que $p(x, t | x_0)$ describe la probabilidad

de encontrar a la partícula en la posición x al tiempo t , dado que inicialmente estaba en x_0 . La ecuación (9.1) se utiliza para calcular la probabilidad de sobrevivencia así como el tiempo promedio de sobrevivencia de una partícula en el medio. En este caso consideramos que el sistema está delimitado por fronteras absorbentes de modo que, al ser alcanzadas por las partículas, éstas son removidas del sistema, ya por absorción, o transformación. Evidentemente la ecuación (9.1) es útil ya que estas dos propiedades dependen de la posición inicial de la partícula. Esto es, mientras más cerca esté la partícula de la pared absorbente menor será su probabilidad de sobrevivencia, por lo que su tiempo promedio de sobrevivencia también disminuye.

Para calcular la probabilidad de sobrevivencia integremos (9.1) con respecto a x en un intervalo que caracteriza la dimensión del sistema, digamos de 0 a L . El lado izquierdo queda de la siguiente forma,

$$\int_0^L \left(\frac{\partial p(x, t | x_0)}{\partial t} \right) dx = \frac{\partial}{\partial t} \left(\int_0^L p(x, t | x_0) dx \right) = \frac{\partial S(t | x_0)}{\partial t} \quad (9.2)$$

donde

$$S(t | x_0) = \int_0^L p(x, t | x_0) dx. \quad (9.3)$$

$S(t | x_0)$ es la probabilidad de sobrevivencia, o bien, la probabilidad de estar en cualquier parte del espacio. El lado derecho de (9.1) lo integramos obteniendo,

$$D \int_0^L \left(\frac{\partial^2 p(x, t | x_0)}{\partial x_0^2} \right) dx = D \frac{\partial^2}{\partial x_0^2} \left(\int_0^L p(x, t | x_0) dx \right) = D \frac{\partial^2 S(t | x_0)}{\partial x_0^2}. \quad (9.4)$$

Introduciendo (9.2) y (9.4) en (9.1) obtenemos la ecuación diferencial que rige la probabilidad de supervivencia,

$$\frac{\partial S(t|x_0)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 S(t|x_0)}{\partial x_0^2}. \quad (9.5)$$

Para obtener la ecuación diferencial que obedece el tiempo promedio de supervivencia integramos la ecuación (9.5) con respecto al tiempo,

$$\int_0^\infty \frac{\partial S(t|x_0)}{\partial t} dt = D \int_0^\infty \left(\frac{\partial^2 S(t|x_0)}{\partial x_0^2} \right) dt \quad (9.6)$$

$$\int_0^\infty dS(t|x_0) = D \frac{\partial^2}{\partial x_0^2} \left(\int_0^\infty S(t|x_0) dt \right).$$

En (9.6) reconocemos que la integral del lado derecho es precisamente el tiempo de supervivencia, la probabilidad de sobrevivir en todo el intervalo de tiempo, por lo que,

$$S(t|x_0)|_0^\infty = D \frac{\partial^2 \langle \tau \rangle}{\partial x_0^2}. \quad (9.7)$$

Para evaluar el lado izquierdo de (9.7) tenemos que conocer los valores que toma $S(t|x_0)$ al tiempo inicial y a tiempos muy largos. En este último caso, la probabilidad de supervivencia es cero ya que la partícula encontrará la frontera absorbente en un tiempo finito. Además por definición la partícula se encuentra en el sistema al tiempo inicial, por lo tanto su probabilidad de sobre-

vivencia a $t = 0$ es igual a 1. Sustituyendo estas condiciones en (9.7) encontramos finalmente que,

$$D \frac{\partial^2 \langle \tau \rangle}{\partial x_0^2} = -1. \quad (9.8)$$

Resolviendo esta ecuación podemos determinar el tiempo medio de supervivencia de una partícula en un sistema. Si generalizamos (9.8) a tres dimensiones, obtenemos una ecuación tipo Poisson para el tiempo promedio de captura, a saber,

$$\nabla^2 \tau(x_0) = -\frac{1}{D}. \quad (9.9)$$

A continuación daremos un ejemplo con el cual se pretende mostrar al lector la utilidad de la ecuación (9.8).

Imaginemos que tenemos una partícula difundiéndose en una dimensión en un sistema de longitud L que tiene un par de puntos absorbentes en $x = 0$ y en $x = L$. Esto significa que el tiempo promedio de supervivencia en este par de puntos es cero. De hecho si queremos conocer el tiempo medio de supervivencia de la partícula tenemos que resolver la ecuación (9.8) sujeta a estas condiciones de frontera. La solución a la ecuación (9.8) se obtiene integrando dos veces con respecto a x_0 y es,

$$\langle \tau(x_0) \rangle = A_1 + A_2 x_0 - \frac{x_0^2}{2D}, \quad (9.10)$$

lo cual puede comprobar el lector al sustituir (9.10) en (9.8). Las condiciones a la frontera que tenemos que imponer para encontrar las constantes de integración en

(9.10) son $\langle \tau(0) \rangle = \langle \tau(L) \rangle = 0$. Con estas condiciones se obtiene $A_1 = 0$ y $A_2 = L/2D$ los que al ser substituidos en (9.11) resultan,

$$\langle \tau(x_0) \rangle = \frac{x_0(L-x_0)}{2D}. \quad (9.11)$$

Esta ecuación nos da el tiempo promedio que tardaría una partícula en salir de un sistema de longitud L con puntos absorbentes en el origen y al final del sistema.

Volvamos sobre el problema anterior, pero ahora suponiendo que las partículas pueden iniciar en cualquier posición, sobre la línea de longitud L , con la misma probabilidad. Para ello promediaremos (9.11) en todo el rango, integrando y dividiendo la integral entre la longitud total,

$$\langle \tau \rangle = \frac{1}{L} \int_0^L \frac{x_0(L-x_0)}{2D} dx_0 = \frac{L^2}{12D}. \quad (9.12)$$

Por último se deja comprobar al lector que si una partícula difunde en una dimensión entre una pared absorbente y una reflejante, el tiempo promedio de sobrevivencia está dado por (figura 14),

$$\langle \tau \rangle = \frac{x_0}{D} \left[L - \frac{x_0}{2} \right]. \quad (9.13)$$

9.1 Determinación empírica del tiempo medio de sobrevivencia

Recordemos algunos de los resultados obtenidos hasta ahora en el estudio de la difusión; en la sección §3 se dedujo la ecuación de difusión a partir de un modelo

microscópico del comportamiento de las partículas que difunden en un medio distinto (movimiento browniano). Más tarde, en la sección §6 se obtuvo una solución general de la ecuación de difusión para la difusión simple, sin arrastre,

$$c(x,t) = \frac{c_0}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}},$$

que podemos identificar con una curva gaussiana,

$$N[\mu, \sigma] = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

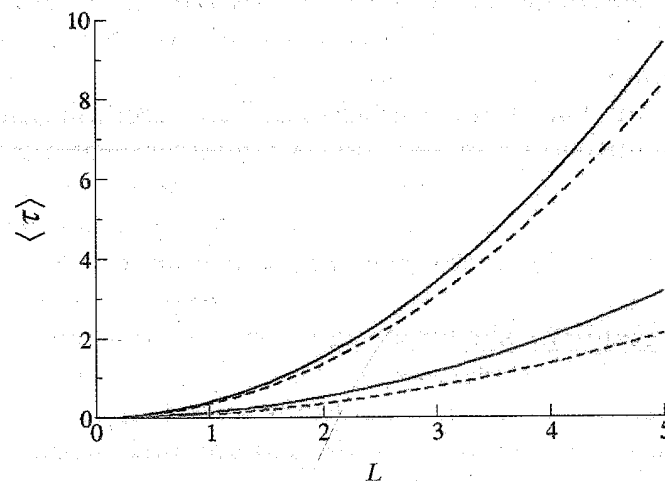


Figura 14. Comparación del tiempo medio de sobrevivencia en función del valor de L , para un sistema con dos puntos absorbentes (líneas rojas), o con un punto absorbente y uno reflejante (líneas azules). Se muestra además el efecto de distribuir el punto de partida en toda la longitud del sistema: $0 < x_0 < L$ (líneas punteadas) respecto a mantenerlo fijo: $x_0 = L/2$ (líneas sólidas).

con media $\mu = 0$ y desviación estándar $\sigma = \sqrt{2Dt}$, resultado que es consistente con la imagen física descrita en §3 para el movimiento de una partícula browniana. En la sección §9, por último, se ha presentado una expresión que relaciona el tiempo medio de sobrevivencia de un caminante aleatorio con la constante de difusión del sistema, ecuación (9.9), proveyéndonos de un medio para calcular coeficientes de difusión de manera empírica para diferentes arreglos de condiciones iniciales y condiciones de frontera (véase la sección §7). Si se realiza la simulación de una caminata aleatoria y determinamos el tiempo de sobrevivencia τ_i de este único caminante, el tiempo medio de sobrevivencia $\langle \tau \rangle$ se obtiene promediando los τ_i para un gran número de trayectorias; y, usando la expresión adecuada, como (9.11) o (9.12), puede obtenerse el valor de D . Los efectos de la geometría, la temperatura, la composición y otros factores que tienen influencia sobre la constante de difusión de un sistema bajo unas condiciones dadas, son asimilados en la simulación numérica de las caminatas aleatorias.

9.2. Simulación numérica de caminatas aleatorias

Una caminata aleatoria está constituida por una sucesión de desplazamientos efectuados por una partícula browniana, también llamada caminante aleatorio, o simplemente caminante. Un desplazamiento individual, respecto de una posición inicial r_0 , ocurre en un intervalo de Δt unidades de tiempo, así la duración total de la caminata es, en función del número n de desplazamientos, o pasos, efectuados: $t = n \Delta t$.

El movimiento de una partícula browniana es extraordinariamente complejo. Para representar adecuada-

mente las características esenciales de este movimiento se requiere de un algoritmo computacional capaz de generar números reales pseudoaleatorios, que sirva al propósito de simular el azaroso vaivén de las posiciones de una partícula browniana en el espacio, ciñéndose a las propiedades esenciales de dicho movimiento (para un repaso de éstas, véase la sección §3). Sujetándose, además, a las condiciones de frontera particulares del problema que pretende modelarse.

La generación de números pseudoaleatorios es el motor básico de la simulación de una dinámica browniana, no obstante, se requieren elementos adicionales para llevar a cabo la simulación, como se detalla enseguida:

- i) La especificación de la geometría del espacio donde se llevará a cabo la caminata (incluyendo las condiciones iniciales).
- ii) La naturaleza de la interacción entre las partículas y las fronteras del sistema (condiciones de frontera).
- iii) Los algoritmos para el cálculo de las diversas cantidades involucradas (como la nueva posición de una partícula que en mitad de su desplazamiento encuentra una pared oblicua a su trayectoria), y
- iv) Los criterios para diversos eventos, como la finalización de una caminata.

Los números aleatorios (de aquí en adelante llamados así, aunque se sabe que no son verdaderamente *aleatorios*) con sesgo uniforme son generados dentro de un intervalo especificado, comúnmente de 0 a 1, de modo que todos los números en el intervalo tienen la misma probabilidad de ser escogidos. Denotemos como RAN a la función generadora de números pseudoaleatorios con sesgo uniforme. Las llamadas sucesivas a la función RAN generan una secuencia de números que dentro de un cierto intervalo (el periodo de repetición) no se repiten.

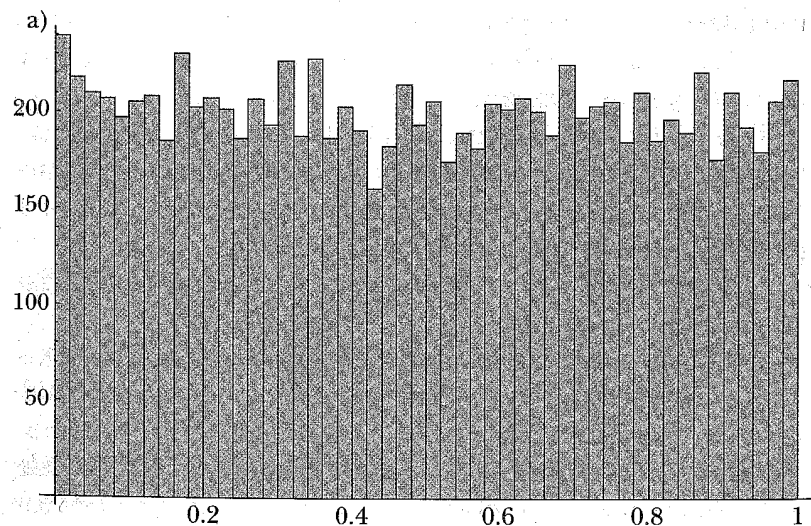
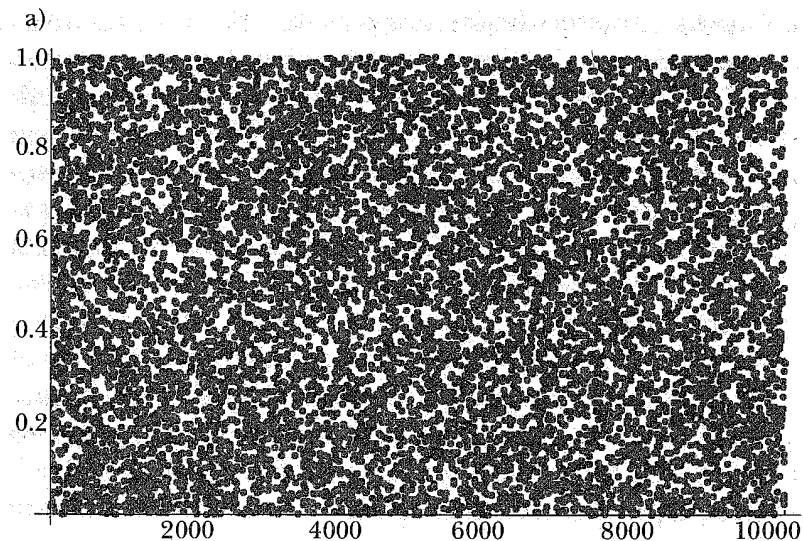


Figura 15. Gráficos que ilustran la salida de un generador de números aleatorios con sesgo uniforme. Arriba (a), la distribución de 5000 números aleatorios, obsérvese cómo ocupan de manera uniforme el intervalo de 0 a 1. Abajo (b), un histograma de frecuencias que agrupa los datos del diagrama (a): la probabilidad de escoger cualquier número del intervalo también es uniforme.

Usualmente RAN toma un argumento: ISEED, un número entero cuyo valor se emplea para inicializar la secuencia, de modo que al invocar RAN(ISEED) con un valor dado de ISEED, se obtiene siempre la misma secuencia de números. En el programa *Mathematica*®, por ejemplo, la función `Random[iseed]` genera secuencias de números aleatorios con sesgo uniforme. Esta función tiene, además otras variantes útiles:

`RandomReal[iseed]` y `RandomInteger[iseed]`.

Estos números son la base a partir de la cual se construye la simulación computacional de procesos estocásticos, para este propósito, sin embargo, es necesario disponer de números aleatorios distribuidos de otras formas. Estas diferentes distribuciones se obtienen efectuando operaciones apropiadas sobre uno o más números con sesgo uniforme. Para este problema se utilizará una distribución normal (gausiana) con media cero y desviación estándar $\sqrt{2D\Delta t}$, o bien $N[0, \sqrt{2D\Delta t}]$ en la notación habitual en probabilidad. En la notación de *Mathematica*®, la secuencia de números aleatorios con la distribución indicada es obtenida mediante llamadas sucesivas a la función:

`RandomReal[NormalDistribution[0, $\sqrt{2D\Delta t}$]]`.

9.3. Cálculo de la posición a cada paso

Las posiciones que va tomando una partícula browniana durante su evolución son aleatorias, sin embargo, se distribuyen de forma gaussiana alrededor de una posición inicial, siendo la amplitud de esa distribución igual a $\sqrt{2D\Delta t}$. Con esta idea en mente, a partir de una posición inicial

$$\vec{r}_0 = x_0 \hat{e}_1 + y_0 \hat{e}_2 + z_0 \hat{e}_3 \quad (9.14)$$

la siguiente posición \mathbf{r}_1 estará dada por

$$\vec{r}_1 = \vec{r}_0 + \vec{r}_{ran}. \quad (9.15)$$

Donde \vec{r}_{ran} es un vector aleatorio cuyas componentes se obtienen al llamar a la función $N[0, \sqrt{2D\Delta t}]$, para cada componente:

$$\vec{r}_{ran} = N[0, \sqrt{2D\Delta t}] \hat{e}_1 + N[0, \sqrt{2D\Delta t}] \hat{e}_2 + N[0, \sqrt{2D\Delta t}] \hat{e}_3. \quad (9.16)$$

Mediante las ecuaciones (9.14) a (9.16) podemos simular la evolución de los desplazamientos de un caminante aleatorio.

9.4. Cálculo de $\langle \tau \rangle$

Veamos un ejemplo en una dimensión: la caminata aleatoria sobre una línea recta de longitud L , con un extremo en el origen de coordenadas $x = 0$, y el otro extremo en $x = L$. Podemos elegir las condiciones de frontera (extremos de la recta) para alguno de los siguientes casos:

- i) Paredes absorbentes en ambos extremos: a. Posición inicial en un punto fijo ($x_0 = \text{cte.}$). b. Posición inicial distribuida aleatoriamente en el intervalo de 0 a L ($x_0 \in (0, L)$)
- ii) una pared reflejante en $x = 0$, y una pared absorbente en $x = L$: a. Posición inicial en un punto fijo ($x_0 = \text{cte.}$); b. Posición inicial distribuida aleatoriamente en el intervalo de 0 a L ($x_0 \in (0, L)$).

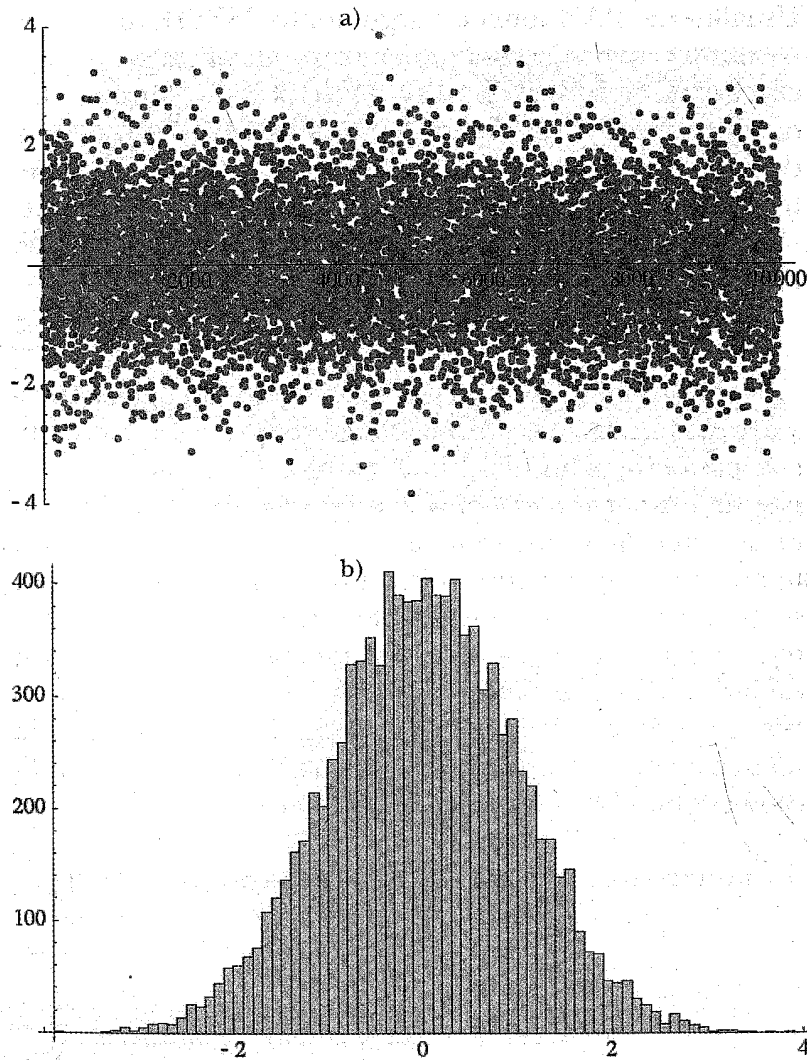


Figura 16. Gráficos que ilustran la salida de un generador de números aleatorios con distribución normal. Arriba (a), la distribución de 5000 números aleatorios, obsérvese cómo se concentran los valores alrededor de 0. Abajo (b), un histograma de frecuencias muestra cómo la probabilidad de escoger cualquier número del intervalo tiene una distribución gaussiana (en el ejemplo $N[0,1]$).

El código mostrado en la tabla 2 es una función escrita en el lenguaje de *Mathematica*©.

Tabla 2
FUNCIÓN DE USUARIO EN *MATHEMATICA*©*

```

rwLine[L_, dt_, nrw_] := Module[{x, tau, step},
SeedRandom[];
tau=0;
Do[
1) x=0.0;
step=0;
Label [begin];
x+=RandomReal[NormalDistribution[0, Sqrt[2*dt]]];
step+=1;
If[x<=0, x=-x];
2) If[x>=L, tau+=step; Goto [end], Goto [begin]];
Label [end],
{j, 1, nrw}]1;
{Longitud->L, Dt->N[dt], Nrww->n nrw,
t->N[(dt*tau)/nrw]}]

```

Para distribuir x_0 uniformemente entre 0 y L sustituya la línea del renglón (1) por:

```

x=RandomReal[NormalDistribution[0, 1]];
If [x<=0, x=-x];
If [x>=L, x=2*L-x];

```

Para cambiar a dos extremos absorbentes (en $x = 0$ y $x = L$) sustituya las líneas del renglón (2) por:

```

If [x>=L | x<=0, tau+=step; Goto [end], Goto [begin]];

```

* Para calcular el tiempo medio de sobrevivencia para un sistema lineal, especificando la longitud L, el tamaño de paso temporal dt y el número de trayectorias nrw, para el caso ii) inciso a), se ha tomado el valor $D=1$ para la constante de difusión.

El uso de *rwLine* es como sigue,

```

rwLine[1.0, 0.001, 1000]

```

y su ejecución genera la salida

```

{Longitud->1, Dt->0.001, Nrww->1000, tau->0.533087}

```

Compárese este resultado ($\langle \tau \rangle = 0.533087$) con el valor teórico obtenido de la ecuación (9.13) (con $D = 1$, $L = 1$ y $x_0 = L/2 = 1/2$, adicionalmente se cambia la línea (1) del código en la tabla 2 por $x=0.5$).

$$L^2 / 2D = 1/2.$$

El valor experimental tiene un error relativo de 6.6% respecto del valor exacto. Las cotas de error aceptables en los experimentos numéricos son menores al 5%. La magnitud del error es influida por la calidad del generador de números aleatorios, la precisión de la computadora utilizada, el número de trayectorias promediadas y el tamaño de paso temporal utilizado. En cada tipo de experimento numérico debe analizarse con detenimiento el peso de cada factor, para hallar la combinación óptima de valores que minimice el error. En nuestro ejemplo, en una PC ordinaria, bastaría utilizar un tamaño de paso temporal de 10^{-4} , y promediar 10^4 trayectorias, para mejorar significativamente la exactitud del resultado.

10. INTRODUCCIÓN A LOS PROCESOS DE DIFUSIÓN EN SISTEMAS CONFINADOS

10.1. Difusión entre dos cubos conectados por un orificio de radio a

En esta sección estudiaremos la difusión entre dos volúmenes conectados por un orificio de radio a , véase la figura 17. Para ello cambiaremos por completo la filosofía utilizada hasta ahora para resolver problemas de difusión. En lugar de preguntarnos por la concentración en cada punto del sistema a cada tiempo, solamente nos preocuparemos por saber cómo cambia la concentración en cada volumen. Esto es similar a tener un problema en el que la partícula puede estar en dos estados, donde cada estado representa la probabilidad de estar en cualquiera de los dos volúmenes. Por simplicidad consideraremos los volúmenes como un par de cubos, aun así nuestro tratamiento es general y puede aplicarse a cualquier tipo de volúmenes conectados.

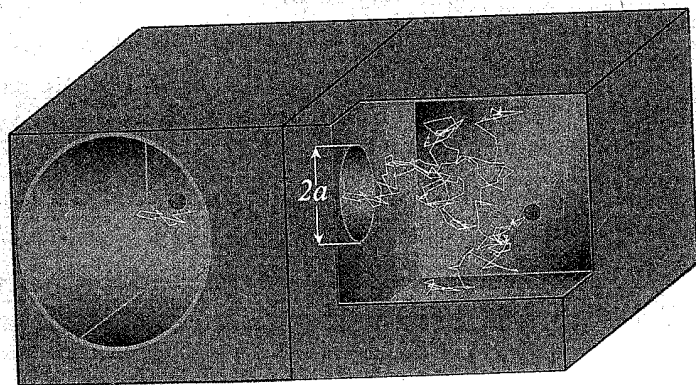


Figura 17. Cubos conectados por ventanas de diámetro $2a$, al de la izquierda lo hemos denotado por 1 y al de la derecha por 2.

Haremos la descripción del proceso mediante el uso de una ecuación de evolución para el número de partículas (véase la sección 3.2). Esto es, escribiremos una ecuación que nos diga cómo cambia en el tiempo el número de partículas en cada volumen. Asumiremos que la transición de un partícula de un volumen al otro sigue una cinética de primer orden, por lo que la constante de equilibrio estará dada por

$$k = 4aD_n / V_n \quad (10.1)$$

como fue demostrado por Hill [10], la deducción de esta expresión se presenta en el Apéndice C. El tiempo promedio para que un ligando llegue por primera vez a la entrada del tubo, está dado por k^{-1} .

El modelo que analizaremos, como se dijo antes, es equivalente a un sistema de dos estados. Esto implica el estudio de una dinámica de transición entre dos estados en el tiempo, los cuales representan el estar en cualquiera de los dos volúmenes. La clave para resolver el problema es tomar al punto de intersección entre los volúmenes como una frontera. Al llegar la partícula a esta frontera tiene un $1/2$ de probabilidad de regresarse al volumen del que proviene, y otro $1/2$ de traslocar al volumen contiguo.

La ecuación de evolución para las partículas en el volumen 1 (el de la izquierda) tendrá dos términos: en uno se toman en cuenta las partículas que salen del recinto al tiempo t ($-1/2 * k_1 N_1(t)$), mientras que en el otro se contabilizan las partículas que entran al mismo tiempo, provenientes del volumen 2 ($+1/2 * k_2 N_2(t)$). De este modo podemos escribir,

$$\frac{dN_1(t)}{dt} = \frac{1}{2} k_2 N_2(t) - \frac{1}{2} k_1 N_1(t). \quad (10.2)$$

El factor 1/2 del primer término de la ecuación (10.2) se explica de la siguiente manera: de las partículas que llegan al orificio que conecta los volúmenes al tiempo t , provenientes del volumen 2 con velocidad $k_2 N_2(t)$, la mitad pasarán al volumen 1, mientras que la otra mitad se regresan al volumen 2. De este modo, el primer término nos dice la cantidad de partículas que pasan del volumen 2 al 1 al tiempo t . Del mismo modo se escribe el segundo término, el cual cuenta el número de partículas por unidad de tiempo que salen del volumen 1 al 2. Al sustituir (10.1) en (10.2) obtenemos que,

$$\frac{dN_1(t)}{dt} = 2aD \left[\frac{N_2(t)}{V_2} - \frac{N_1(t)}{V_1} \right]. \quad (10.3)$$

Es importante además recordar que el principio de conservación de materia exige que los flujos de partículas se hallen en equilibrio, y de este modo, tenemos,

$$dN_1(t) / dt = -dN_2(t) / dt.$$

Sustituyendo la ecuación de conservación del número de partículas, $N_1(t) + N_2(t) = N$ en (10.3), tenemos que,

$$\frac{dN_1(t)}{dt} = 2aD \left[\frac{N}{V_2} - N_1(t) \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2} \right) \right]. \quad (10.4)$$

Efectuando algunas manipulaciones algebraicas, podemos escribir (10.4) de la siguiente manera,

$$\frac{dN_1(t)}{dt} = 2aD \frac{V_1 + V_2}{V_2} \left[\frac{N}{V_1 + V_2} - \frac{N_1(t)}{V_1} \right]. \quad (10.5)$$

Definiendo la concentración en el volumen 1 como $c_1(t) = N_1(t)/V_1$ y la concentración en el equilibrio como $c_{eq} = N/(V_1 + V_2)$, dividamos ambos miembros por V_1 , con el objeto de escribir la ecuación (10.5) como,

$$\frac{dc_1(t)}{dt} = 2aD \frac{V_1 + V_2}{V_1 V_2} [c_{eq} - c_1(t)]. \quad (10.6)$$

Ahora separemos las diferenciales de la ecuación (10.6) e integremos ambos lados, tomando como condición inicial $c_1(t = 0) = c_1(0)$, lo cual nos da finalmente la concentración en el volumen 1 como función del tiempo,

$$c_1(t) = c_{eq} + [c_1(0) - c_{eq}] \exp \left[-2a \frac{V_1 + V_2}{V_1 V_2} Dt \right]. \quad (10.7)$$

De esta última ecuación vemos cómo la concentración decae de forma exponencial y está dada tan sólo por los parámetros geométricos del sistema y de la constante de difusión. También podemos definir la función de relajación del sistema como aquella que nos da el cambio de concentración en el tiempo (normalizada), a saber,

$$R(t) = \frac{c_1(t) - c_{eq}}{c_1(0) - c_{eq}} = \exp \left[-2a \frac{V_1 + V_2}{V_1 V_2} Dt \right]. \quad (10.8)$$

Dicha función es de gran utilidad ya que independientemente de la concentración inicial, ésta siempre inicia en uno y tiende hacia cero. A diferencia de la ecuación (10.7) la cual inicia en la concentración inicial y tiende a la de equilibrio. Finalmente es importante hacer notar que se puede definir un tiempo de relajación dado por ,

$$\tau = \left[2a \frac{V_1 + V_2}{V_1 V_2} D \right]^{-1} \quad (10.9)$$

Este parámetro no dice el tiempo promedio que le tomará al sistema alcanzar el equilibrio.

Se recomienda al lector repetir el ejemplo tomando diferentes constantes de difusión en cada volumen. El resultado es similar al obtenido aquí, con excepción de que en lugar de D se obtiene una constante de difusión efectiva dada por $D_1 D_2 / (D_1 + D_2)$. Se podrá apreciar la similitud del comportamiento de las constantes de difusión con la de las resistencias eléctricas. Las constantes de difusión también se pueden encontrar observando si están en serie o paralelo dependiendo del acomodo de los volúmenes.

10.2. Difusión entre dos esferas conectadas por un orificio de radio a con fronteras absorbentes

Al igual que en el ejemplo anterior haremos la descripción del proceso de difusión mediante el uso de una ecuación de evolución para el número de partículas. En este caso asumiremos que todas las partículas inician su trayectoria desde el punto de unión entre las esferas. También por simplicidad se considerará a los volúmenes como iguales, véase la figura 18.

La ecuación de evolución para las partículas en el volumen 1 (el del lado izquierdo) y el 2, están constituidas por tres términos. En uno se toman en cuenta las partículas que salen del volumen al tiempo t . En este sistema tenemos dos casos, las que al salir pasan a otro volumen y las que salen por completo del sistema. Por otro lado

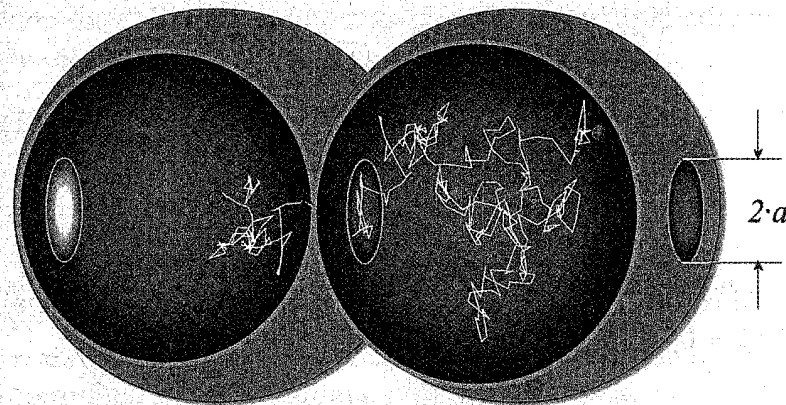


Figura 18. Esferas conectadas por ventanas de diámetro $2a$ con orificios absorbentes del mismo ancho en ambos extremos. Al volumen de la izquierda lo hemos denotado por 1 y al de la derecha por 2.

también se tienen que contabilizar las partículas que entran al volumen al tiempo t provenientes del recinto contiguo. Las ecuaciones que describen la evolución del número de partículas en los dos volúmenes están dadas por,

$$\begin{aligned} \frac{dN_1(t)}{dt} &= \frac{1}{2} k N_2(t) - \frac{1}{2} k N_1(t) - k N_1(t) \\ \frac{dN_2(t)}{dt} &= \frac{1}{2} k N_1(t) - \frac{1}{2} k N_2(t) - k N_2(t) \end{aligned} \quad (10.10)$$

Aquí hemos asumido que $k_1 = k_2$, lo cual implica la igualdad de los volúmenes y de las constantes de difusión. Para resolver este conjunto de ecuaciones primero las sumamos y luego las restamos, con lo cual obtenemos dos nuevas ecuaciones,

$$\frac{d(N_1(t) + N_2(t))}{dt} = -k(N_1(t) + N_2(t)) \quad (10.11)$$

$$\frac{d(N_1(t) - N_2(t))}{dt} = -2k(N_1(t) - N_2(t))$$

Al resolver la primer ecuación con la condición inicial $N_1(t=0) + N_2(t=0) = N(0)$, obtenemos que,

$$N_1(t) + N_2(t) = N(0)e^{-kt} \quad (10.12)$$

De la segunda ecuación en (10.11) e introduciendo la condición de que en un inicio las partículas tienen la misma probabilidad de desplazarse tanto a la derecha como a la izquierda, a saber, $N_1(0) - N_2(0) = 0$, al resolverla obtenemos que $N_1(t) - N_2(t) = 0$, lo cual implica que $N_1(t) = N_2(t)$, como era de esperarse, debido a la simetría del problema. Sustituyendo esta última condición en (10.12) se tiene que,

$$N_n(t) = N_1(t) = N_2(t) = \frac{1}{2}N(0)e^{-kt} \quad (10.13)$$

que al dividirse entre el volumen de una esfera en ambos lados de la ecuación nos da (figura 19),

$$c_n(t) = c_0 e^{-kt} \quad (10.14)$$

Sustituyendo $k = 4aD/V_{esfera} = 3aD/\pi r^3$ en la ecuación anterior llegamos a la descripción del cambio de concentración en el tiempo, y como vemos una vez más, sólo

depende de los parámetros geométricos y de la constante de difusión,

$$c_n(t) = c_0 \exp\left[-\frac{3aD}{\pi r^3} t\right], \quad (10.15)$$

donde r es el radio de las esferas. Una vez más podemos ver que el tiempo de relajación está dado por $\pi r^3/3aD$, el tiempo promedio que toma a las partículas abandonar completamente el sistema.

Se recomienda al lector repetir el ejercicio con constantes de difusión diferentes en cada volumen. También podría considerar un sistema formado por cuatro esferas.

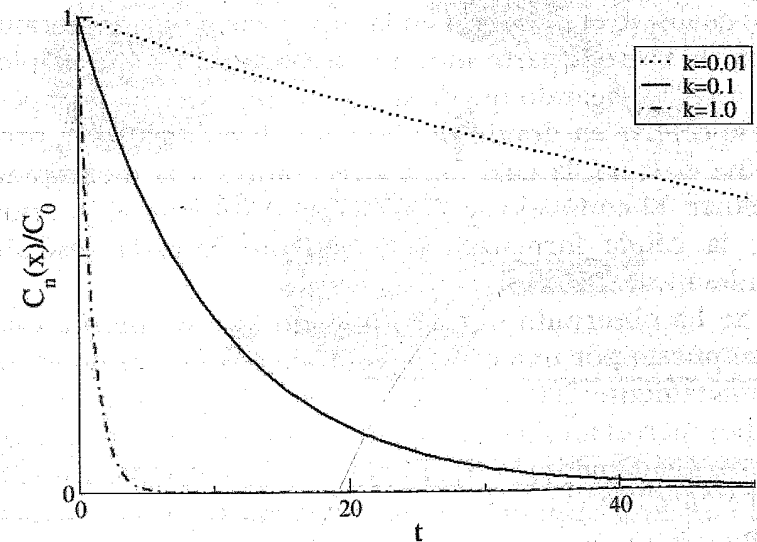


Figura 19. Gráfica de la ecuación (10.14).

11. SOLUCIÓN A LOS PROCESOS DE DIFUSIÓN EN GEOMETRÍAS COMPLEJAS: ENDOCITOSIS

11.1. Introducción

La endocitosis mediada por receptores es un mecanismo general por el cual las células animales introducen a su interior una gran variedad de material extracelular. Estos materiales incluyen hormonas, glucoproteínas, enzimas lisosomales, toxinas, virus y colesterol, entre otros [5,6].

Las principales características de la endocitosis han sido descritas en un gran número de artículos de revisión [7,8]. Un diagrama esquemático del proceso se puede ver en la figura 20, y es como sigue: Todo inicia cuando los ligandos quedan atrapados en sus respectivos receptores, los cuales se encuentran en la superficie de la membrana celular, véase la parte superior de la figura 20. El complejo receptor-ligando queda sujeto en regiones de la superficie celular en donde se observa la presencia de la proteína clatrina, la cual fija los receptores a la membrana celular. El complejo se dirige posteriormente al interior de la célula formando una vesícula llamada vesícula endocítica.

Se ha observado que el complejo que se interna está compuesto por una cámara central (o vesícula) de aproximadamente 200 a 800 nm de diámetro, y uno o más tubos incrustados a ella, de entre 10 a 60 nm de diámetro aproximadamente [7,9]. También se observa que entre el 60 y 70% del volumen total se encuentra en la vesícula. Una vez que el sistema se encuentra dentro de la célula, hay un cambio de pH y esto permite que los ligandos se disocien de sus receptores, quedando libres para iniciar un movimiento browniano dentro del sistema, véase la figura 20 centro.

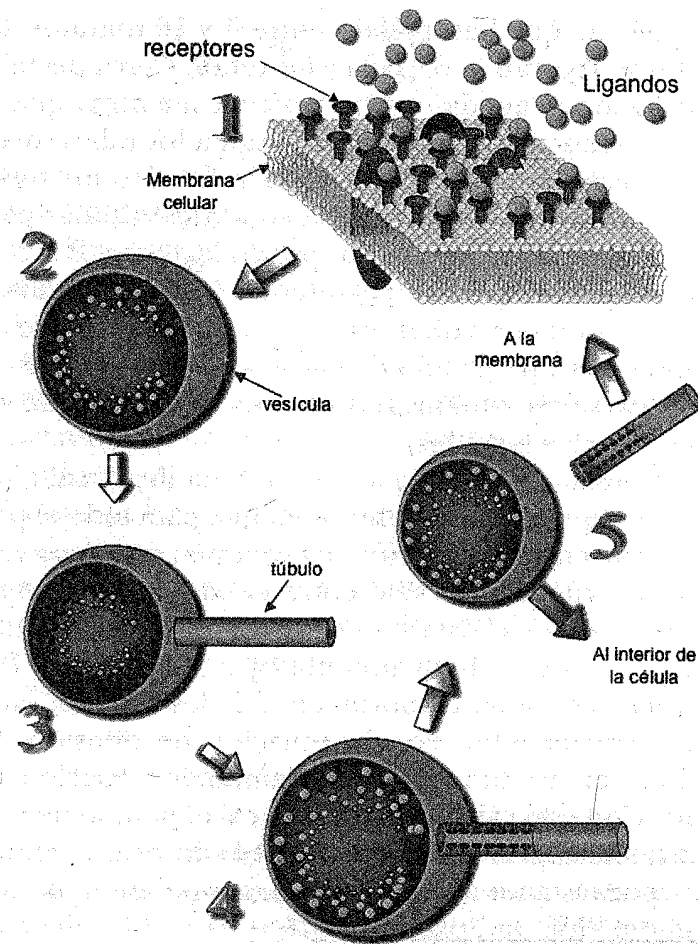


Figura 20. Esquema del proceso de endocitosis mediada por receptores. 1) Los ligandos se unen a los receptores en el exterior de la célula. 2) La membrana se pliega sobre sí misma para invaginar un conjunto de receptores con ligandos. 3) Los ligandos se liberan de los receptores dentro de la vesícula, y una estructura tubular se une a esta última. 4) Los receptores difunden hacia el tubo. 5) El tubo, con la gran mayoría de los receptores, se separa de la vesícula, que contiene los ligandos. El tubo se dirige a la membrana y los receptores vuelven a colocarse en el exterior, listos para recibir nuevos ligandos.

Después de que han pasado entre 5 y 10 minutos, los ligandos se separan la vesícula y los tubos. Cerca del 95% de los ligandos quedan en la vesícula mientras que el mismo porcentaje de receptores se van a los tubos, véase el lado derecho de la figura 20. Finalmente los tubos transportan a los receptores a la superficie celular para que vuelvan a ser utilizados atrapando ligandos. Por otro lado la vesícula se queda en el interior de la célula, la cual utiliza los ligandos en diferentes procesos. La razón de los porcentajes es un ejemplo de eficiencia. Por medio de la endocitosis se reciclan los receptores y se aprovechan eficientemente los ligandos.

Es interesante resaltar que si el sistema llegara al equilibrio antes de los 5 a 10 minutos en que pasa todo el proceso, ya que entre el 60 y 70% del volumen está en la vesícula, esperaríamos que sólo entre el 60 y el 70% de los ligandos permanecieran en ella. Para entender esta discrepancia Linderman y Lauffenburger (en adelante LL) propusieron estudiar el movimiento de los ligandos en el sistema vesícula-tubos con la ecuación de difusión. Su principal objetivo fue estudiar el tiempo de relajación del sistema. Con este cálculo podrían ver si el tiempo de relajación calculado era mayor que el de la duración del proceso, y por lo tanto se explicaría el porqué de la permanencia del 95% de ligandos en la vesícula. LL utilizaron la ecuación de difusión para describir el sistema, pero para ello tuvieron que hacer una gran simplificación, no tomar en cuenta los tubos. En su modelo sustituyeron la vesícula por una esfera y los tubos por un orificio en la superficie de la esfera. Por lo tanto una vez que el ligando llega a este orificio ya no puede regresar a la esfera.

Para la esfera con un orificio perfectamente absorbente se sabe que el tiempo de relajación está dado por la siguiente expresión,

$$\tau_{LL} = \frac{V_{ves}}{4bD_{ves}} \quad (11.1)$$

donde V_{ves} denota el volumen de la vesícula, b el diámetro del orificio y D_{ves} la constante de difusión en la vesícula. Sustituyendo en la ecuación (11.1) los siguientes valores $R = 4 \times 10^{-5}$ cm, $b = 10^{-6}$ cm, $V_{ves} = 0.7V_{total}$ y $D_{ves} = 10^{-7}$ cm²/s, se estima que el tiempo de relajación es de 0.02 segundos. Esto quiere decir que inmediatamente después de que inicia el proceso de endocitosis la concentración de ligandos se equilibra en el sistema. Por lo tanto se esperaría observar entre el 60 y 70% de los ligandos en la vesícula, lo cual, como ya se ha mencionado, no ocurre. Esto puede deberse a la sobresimplificación en que se incurre al no considerar los tubos. Durante el resto de este capítulo nos abocaremos al estudio del sistema tomado íntegramente.

11.2. Modelo y definición de parámetros

En nuestro modelo consideraremos que iniciamos el estudio de la difusión de los ligandos en el sistema vesícula-tubos una vez que ellos se han separado totalmente de sus receptores. Asumimos que todos los ligandos inicialmente están en la vesícula. Además suponemos que todos los ligandos que se encuentran en la vesícula a tiempos posteriores a la terminación del proceso, permanecen en ella. Por otro lado no tenemos que hacer ninguna suposición en la forma de la vesícula y en nuestro planteamiento teórico seremos capaces de incluir cualquier número de tubos; experimentalmente se observan un máximo de 7.

El modelo a analizar está compuesto por una vesícula de volumen V_{ves} , conectada a tubos cilíndricos de radio b y longitud L . Se asume que los ligandos difunden en la vesícula y en los tubos, con constantes de difusión D_{ves} y D_{tub} , respectivamente. Nuestro análisis se concentrará en predecir las fluctuaciones que se observan en el cambio de la concentración de ligandos en la vesícula sin especificar sus posiciones, por lo tanto, nuestro modelo sólo será capaz de describir los cambios de concentración en cada volumen a todo tiempo.

Haremos la descripción cinética del sistema mediante un propagador $G_{ves}(t)$. Este propagador representa la densidad de probabilidad de encontrar a un ligando en la vesícula al tiempo t . La transición de un ligando de la vesícula a la entrada del tubo se asumirá que sigue una cinética de primer orden, por lo que la constante de equilibrio estará dada por

$$k = 4bD_{ves} / V_{ves}, \quad (11.2)$$

como fue demostrado por Hill [10], ver el apéndice C. El tiempo promedio para que un ligando llegue por primera vez a la entrada del tubo, está dado entonces por k^{-1} .

El modelo a ser analizado es equivalente a un sistema de dos estados, lo cual implica el estudio de una dinámica de transición entre dos estados a tiempos aleatorios. Los dos estados representan el estar en la vesícula o en el canal.

Con este modelo de dos estados es posible definir una función de relajación, la cual nos dirá cómo cambian los ligandos en la vesícula, como se mostró en la sección 10,

$$R(t) = \frac{G_{ves}(t) - P_{eq}}{G_{ves}(0) - P_{eq}} \quad (11.3)$$

donde

$$P_{eq} \equiv \lim_{t \rightarrow 0} G_{ves}(t) = \frac{V_{ves}}{V_{ves} + V_{tub}}$$

y representa la concentración de ligandos en el equilibrio. La ecuación (11.3) nos permite calcular el tiempo de relajación promedio de los ligandos en la vesícula ya que,

$$\tau_{ves} = \int_0^{\infty} R(t) dt = \hat{R}(0). \quad (11.4)$$

Las ecuaciones (11.3) y (11.4) nos dan toda la información que requerimos para caracterizar nuestro problema. En la siguiente sección nuestro principal objetivo será encontrar $\hat{G}_{ves}(t)$ para sustituirlo en las ecuaciones (11.3) y (11.4). Como veremos estas ecuaciones quedarán expresadas en términos de parámetros geométricos y constantes de difusión.

11.3. Resultados

Al tiempo t los ligandos pueden estar en cualquiera de los dos volúmenes, la vesícula o el tubo. Suponiendo una cinética de primer orden podemos escribir la ecuación de evolución del propagador $\hat{G}_{ves}(t)$ suponiendo un proceso no markoviano,

$$\frac{dG_{ves}(t)}{dt} = -kG_{ves}(t) + \int_0^t kG_{ves}(t-\tau)\kappa g_{tub}(\tau) d\tau, \quad (11.5)$$

donde k está dada por la ecuación (11.2), $g_{tub}(t)$ es la densidad de probabilidad de encontrar a un ligando en el tubo, y κ es la eficiencia de escape del ligando del

tubo. El primer miembro del lado derecho de la ecuación (11.5) toma en cuenta todos los ligandos que escaparon de la vesícula al tiempo t (figura 21a). El segundo miembro toma en cuenta todos aquellos ligandos que escaparon a un tiempo t y regresan a la vesícula al tiempo τ , véase la (figura 21b). Si se tomaran en cuenta más tubos, el lado derecho de la ecuación (11.5) tendría que multiplicarse por el número de tubos. En nuestros cálculos, por simplicidad, consideramos sólo uno.

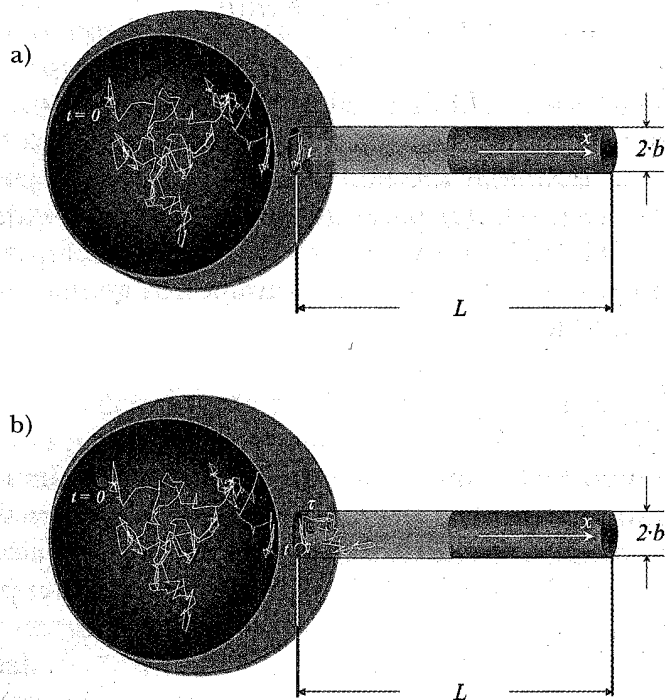


Figura 21. Las líneas quebradas representan alguna de las posibles trayectorias de los ligandos en el sistema; a) t es el tiempo que tarda la partícula en llegar a la entrada del tubo; y b) Luego de haber alcanzado la entrada (al tiempo t), la partícula ingresa al tubo y ejecuta una caminata que la retorna a la entrada, transcurrido el tiempo τ .

La constante κ que aparece en la ecuación de evolución del propagador está dada por [11, 12], véase el apéndice D,

$$\kappa = \frac{4D_{ves}}{\pi b}. \quad (11.6)$$

Debido a las restricciones biológicas que impone el sistema, todos los ligandos inicialmente se encuentran en la vesícula, motivo por el cual la ecuación (11.5) tiene que resolverse bajo la condición $G_{ves}(0) = 1$. Debido a que la ecuación (11.5) contiene convoluciones lineales, es natural introducir transformadas de Laplace para convertirla en una ecuación algebraica,

$$\hat{G}_{ves}(s) = \frac{1}{s + k(1 - \hat{\phi}(s))}, \quad (11.7)$$

donde el acento circunflejo sobre G_{ves} denota la transformada de Laplace⁷. En la ecuación (11.7) hemos introducido la definición $\phi(t) \equiv \kappa g_{tub}(t)$, quien representa el flujo de densidad de probabilidad. Por otro lado es importante señalar que para tener la expresión final de la ecuación (11.7), o sea cerrar la ecuación (11.5), se requiere una relación explícita para $\phi(t)$.

Para encontrar una expresión para $\phi(t)$ es necesario hacer algunas hipótesis, en este caso tomaremos el movimiento de los ligandos dentro del tubo como si fuera uno de difusión. Es claro que esto puede ser diferente y por lo tanto se tendría que resolver el problema según las condiciones impuestas por las propiedades físicas del movi-

$$^7 \hat{f}(s) = \int_0^\infty f(t)e^{-st} dt.$$

miento de los ligandos en el tubo. Si tomamos como hipótesis un movimiento difusivo de los ligandos dentro de los tubos,

$$\hat{\phi}(s) = 1 - \frac{\sigma \tanh \sigma}{\alpha + \sigma \tanh \sigma}, \quad (11.8)$$

donde $\sigma \equiv \sqrt{s/D_{tub}L}$ y $\alpha \equiv \kappa L/D_{tub}$ véase el Apéndice C. Sustituyendo (11.8) en (11.7), encontramos la fracción de ligandos en la vesícula en el espacio de Laplace,

$$\hat{G}_{ves}(s) = \left[s + k \left(1 - \frac{\sigma \tanh \sigma}{\alpha + \sigma \tanh \sigma} \right) \right]^{-1}. \quad (11.9)$$

De la ecuación (11.9) se puede observar que la fracción de ligandos en la vesícula sólo depende de las características geométricas del sistema y de sus constantes de difusión. Con este resultado podemos también calcular la función de relajación,

$$\hat{R}(s) = \frac{\hat{G}_{ves}(s) - P_{eq}/s}{G_{ves}(0) - P_{eq}}. \quad (11.10)$$

Aunque en general encontrar la transformada inversa de Laplace es muy complicado, invertirla numéricamente nos daría una idea de la forma que ésta tendría, véase la figura 22.

Para obtener el tiempo promedio de relajación, es necesario primero hacer un desarrollo en serie de Taylor de $\hat{\phi}(s)$ alrededor de $s = 0$; y, quedándonos con los primeros tres términos, obtenemos que,

$$\hat{R}(0) = \frac{\frac{1}{2} \hat{\phi}''(0)}{\hat{\phi}'(0)[1 + k\hat{\phi}'(0)]}. \quad (11.11)$$

De la ecuación (11.8) obtenemos que,

$$\hat{\phi}'(0) = -L/\kappa \quad (11.12)$$

y

$$\hat{\phi}''(0) = \frac{2L^2}{3\kappa} \left(3 + \frac{\kappa L}{D_{tub}} \right). \quad (11.13)$$

Sustituyendo las ecuaciones (11.12) y (11.13) en la ecuación (11.4) finalmente obtenemos el tiempo promedio de relajación de los ligandos en la vesícula,

$$\tau_{ves} = \left(\frac{V_{tub}}{4bD_{ves}} + \frac{L^2}{3D_{tub}} \right) / \left(1 + \frac{V_{tub}}{V_{ves}} \right). \quad (11.14)$$

depende de parámetros geométricos y las constantes de difusión al igual que la ecuación (11.9).

Para comparar los resultados obtenidos al incluir los tubos con el caso en el que no se incluyen, basta con multiplicar la ecuación (11.2) por la ecuación (11.14) e introducir los parámetros geométricos que se utilizaron en la introducción, sección §10.1. Para hacer la comparación supondremos que la constante de difusión es la misma en el tubo que en la vesícula, debido al desconocimiento del valor experimental. Finalmente, el resultado obtenido es que el tiempo de relajación es 4647 veces mayor. Esto es, mientras que LL obtuvieron un valor para la relajación de 0.02 segundos, nosotros obtenemos un valor de aproximadamente 93 minutos. La principal implicación

es que después de diez minutos el sistema está muy lejos del equilibrio y por lo tanto los ligandos no han tenido tiempo de difundir a los tubos, razón por la cual la gran mayoría se encuentran en la vesícula. Esto deja en evidencia que la suposición de no incluir a los canales es una simplificación que lleva a resultados erróneos. Además no hay que olvidar que nuestros cálculos fueron hechos incluyendo un solo tubo, de otro modo el tiempo de relajación sería aún mayor.

11.4. Simulaciones

Como asumimos un canal en una dimensión en el cálculo de la ecuación (11.8), en esta sección justificaremos tal hipótesis mostrando los resultados obtenidos al hacer una dinámica browniana asumiendo un canal en tres dimensiones. La configuración geométrica se muestra en la figura 22. Está formada por un cubo de volumen unitario (en unidades arbitrarias) al cual se le ha insertado un tubo de longitud unitaria y un diámetro de 0.05. En las simulaciones se utilizaron pasos de $\Delta t = 10^{-6}$ y un total de 20000 trayectorias. Los resultados obtenidos de la simulación se comparan con la transformada inversa de Laplace de la ecuación (11.10), véase la figura 22. Debido a la excelente concordancia entre las dos curvas, podemos concluir que la hipótesis de tomar el tubo en la teoría como uno en una dimensión, está justificado.

12. PERSPECTIVAS

El método de los propagadores nos permite estudiar los procesos de difusión en sistemas con geometrías complejas. Haciendo a un lado la idea de querer saber la

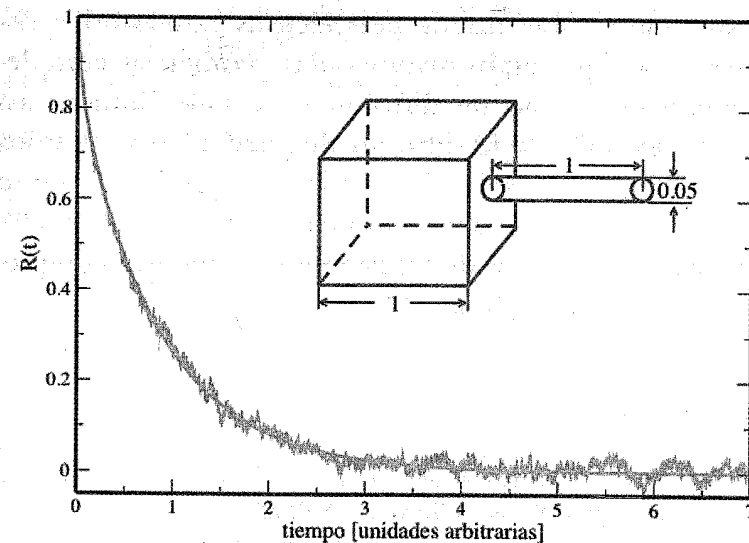


Figura 22. Comparación de los resultados obtenidos por la simulación (línea café) con la inversa de Laplace de la ecuación (11.9) (línea naranja).

concentración en cada punto de nuestro sistema, y sólo tomando en cuenta la concentración por cada uno de los volúmenes implicados, hemos sido capaces de obtener las principales características físicas del sistema. A saber, el tiempo de relajación y la concentración como función del tiempo [14].

En particular, al aplicar nuestro método al estudio de la difusión de ligandos en el sistema vesícula-tubo, encontramos que la diferencia del tiempo de relajación entre incluir al tubo o no es de 4647 veces más. Debido a esto el tiempo que le tomaría al sistema llegar al equilibrio es alrededor de 10 veces mayor que el tiempo observado en el que la totalidad del proceso se lleva a cabo. Esto explica el porqué la mayoría de los ligandos permanece en la vesícula endocítica.

Este modelo abre nuevas perspectivas para estudiar sistemas en los que están involucradas geometrías complejas como el estudio de difusión en canales iónicos así como el estudio de la difusión de partículas a los sitios activos de proteínas [11,14]. Finalmente es importante destacar que se tiene una nueva teoría con la cual se pueden estudiar procesos de difusión en geometrías complejas con aplicaciones biológicas y a la ingeniería.

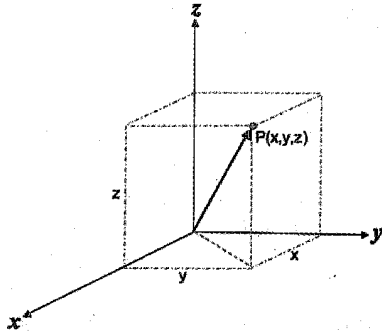
REFERENCIAS

1. R. M. Mazo, *Brownian motion, fluctuations, dynamics, and applications*, Clarendon Press, Oxford, EUA (2002).
2. E. Braun, *Un movimiento en zigzag*, Fondo de Cultura Económica, segunda edición (2001).
3. R. Peralta-Fabi, *Procesos estocásticos y medios granulados*, Séptima Escuela Mexicana de Física Estadística EMFE7, José Inés Jiménez-Aquino, Raúl Rechtman y Victor Romero Rochin, editores (1994).
4. K. A. Dill y S. Bromberg, *Molecular driving forces*, Garland Science, EUA (2003).
5. J. L. Lindermann y D. A. Lauffenburger, *Receptor/ligands sorting along the endocytic pathway*, Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg (1989).
6. H. Sato, Y Sugiyama, A. Tsuji, y I. Horikoshi, *Advanced Drugs Delivery Reviews* **19**, 445 (1996).
7. I. Mellmann, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **12**, 575 (1996).
8. S. Mukherjee, R. N. Ghosh y F. R. Maxfield, *Physiological Review* **77**, 759 (1997).
9. H. J. Gauze, J. W. Slot y A. L. Schwartz, *J. Cell. Biol.* **104**, 1715 (1987).
10. T. H. Hill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4918 (1975).
11. L. Dagdug, A. M. Berezhkovskii, S. M. Bezrukov, y G. H. Weiss, *J. Chem. Phys.* **118**, 2367 (2003).
12. S. M. Bezrukov, A. M. Berezhkovskii, M. A. Pustovoit y A. Szabo, *J. Chem. Phys.* **113**, 8206 (2000).
13. L. Dagdug, A. M. Berezhkovskii, S. Y. Shvartsman y G. H. Weiss, *J. Chem. Phys.* **119**, 12473 (2003).
14. L. Dagdug, A. M. Berezhkovskii y G. H. Weiss, *Phys. Rev. E* **69**, 012902-1 (2004).
15. G. Watson, *A treatise on the Bessel functions*, segunda edición, Cambridge University Press, USA (1944).
16. K. F. Riley, M. P. Hobson y S. J. Bence, *Mathematical methods for physics and engineering*, tercera edición, Cambridge University Press, EUA (2007).

APÉNDICE A

OPERADORES VECTORIALES EN COORDENADAS CARTESIANAS Y CURVILÍNEAS

Coordenadas cartesianas (x, y, z)

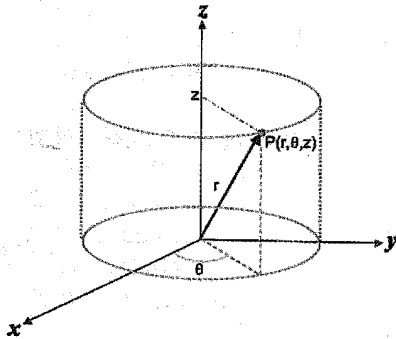


$$\nabla f = \frac{\partial f}{\partial x} \hat{x} + \frac{\partial f}{\partial y} \hat{y} + \frac{\partial f}{\partial z} \hat{z}$$

$$\nabla \cdot \underline{u} = \frac{\partial u_x}{\partial x} + \frac{\partial u_y}{\partial y} + \frac{\partial u_z}{\partial z}$$

$$\nabla^2 f = \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial z^2}$$

Coordenadas cilíndricas (r, θ, z)



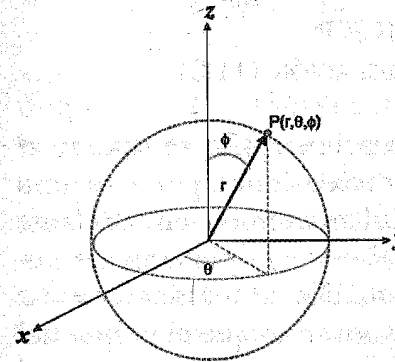
$$\nabla f = \frac{\partial f}{\partial r} \hat{r} + \frac{1}{r} \frac{\partial f}{\partial \theta} \hat{\theta} + \frac{\partial f}{\partial z} \hat{z}$$

$$\nabla \cdot \underline{u} = \frac{1}{r} \frac{\partial (ru_r)}{\partial r} + \frac{1}{r} \frac{\partial u_\theta}{\partial \theta} + \frac{\partial u_z}{\partial z}$$

$$\nabla^2 f = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial f}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 f}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial z^2}$$

$$x = r \cos \theta, \quad y = r \sin \theta, \quad z = z, \quad r = \sqrt{x^2 + y^2}, \quad \theta = \tan^{-1}(y/x).$$

Coordenadas esféricas (r, θ, ϕ)



$$x = r \sin \phi \cos \theta,$$

$$y = r \sin \phi \sin \theta,$$

$$z = r \cos \phi,$$

$$r = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2},$$

$$\theta = \tan^{-1}(y/x),$$

$$\phi = \tan^{-1}(\sqrt{x^2 + y^2} / z).$$

$$\nabla f = \frac{\partial f}{\partial r} \hat{r} + \frac{1}{r} \frac{\partial f}{\partial \theta} \hat{\theta} + \frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial f}{\partial \phi} \hat{\phi}$$

$$\nabla \cdot \underline{u} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial (r^2 u_r)}{\partial r} + \frac{1}{r \cdot \sin \theta} \frac{\partial (\sin \theta \cdot u_\theta)}{\partial \theta} + \frac{1}{r \cdot \sin \theta} \frac{\partial u_\phi}{\partial \phi}$$

$$\nabla^2 f = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial f}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial f}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial^2 f}{\partial \phi^2}$$

APÉNDICE B

OBTENCIÓN DE LA ECUACIÓN (11.8)

Nuestra derivación de la ecuación (11.8) se basa en el reemplazo de un tubo en tres dimensiones, por el de uno en una dimensión (al cual llamaremos en adelante canal). La validez de esta hipótesis está plenamente justificada al comparar los resultados obtenidos con las simulaciones (figura 22). Supondremos que el origen del canal se encuentra en donde está en contacto el canal con las vesículas.

Consideremos un ligando que al tiempo cero entra en el canal. La densidad de probabilidad de encontrar al ligando en x al tiempo t se denotará por $g(x, t | 0)$, cantidad que satisface la ecuación de difusión,

$$\frac{\partial g(x, t | 0)}{\partial t} = D_{tub} \frac{\partial^2 g(x, t | 0)}{\partial x^2}. \quad (B.1)$$

Además $g(x, t | 0)$ tiene que satisfacer las siguientes condiciones a la frontera. En $x = L$ una condición de reflexión,

$$\left. \frac{\partial g(x, t | 0)}{\partial x} \right|_{x=L} = 0, \quad (B.2)$$

lo cual implica que el flujo en ese punto es cero.

Un ligando que llega el punto $x = 0$ puede regresar a la vesícula o difundir por el canal, lo que es equivalente a tener un origen parcialmente absorbente. La condición a la frontera en este punto está dada por,

$$D_{tub} \left. \frac{\partial g(x, t | 0)}{\partial x} \right|_{x=0} = \kappa g(0, t | 0), \quad (B.3)$$

donde $\kappa = 4D_{ves}/(\pi b)$. El lado izquierdo de (B3) representa el flujo de probabilidad de escapar del canal al tiempo t , y es además la densidad de probabilidad para un ligando de permanecer en el tubo.

Para resolver la ecuación (B1) sujeta a las condiciones a la frontera (B2) y (B3), primero escribimos su transformada de Laplace,

$$D_{tub} \frac{d^2 \hat{g}(x, s | 0)}{dx^2} = s \hat{g}(x, s | 0) - \delta(x), \quad (B.4)$$

donde la función delta aparece como consecuencia de las condiciones iniciales, es decir, que la posición del ligando al inicio sea $x = 0$. Debido a que la ecuación (B4) es una ecuación lineal se puede resolver por métodos estándares, y su solución da la ecuación (11.8).

APÉNDICE C

DEDUCCIÓN DE LA CONSTANTE k

La difusión de partículas hacia un disco absorbente de radio a ubicado en un plano, digamos el XY, se describe mediante la ecuación de Fick, ecuación (3.20), de la sección §3,

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C.$$

Resolver este modelo es un primer paso en el modelamiento matemático de sistemas más complicados, como la difusión de moléculas hacia el sitio activo de una enzima. Aunque simple, la solución a este problema brinda resultados sorprendentemente útiles. Comencemos por proponer una pregunta: ¿a qué velocidad llegan las partículas al disco absorbente?

Y ahora acotemos un poco el problema, para simplificar nuestro ejemplo; consideremos el sistema en estado estacionario; esto es, $\partial C/\partial t = 0$,

$$\nabla^2 C = 0 \quad (\text{C.1})$$

y tomemos en cuenta que este problema tiene simetría cilíndrica, por lo que la ecuación de Fick toma la forma (véase el apéndice A para expresar el operador ∇^2 en coordenadas cilíndricas),

$$\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 C}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} = 0. \quad (\text{C.2})$$

En este tipo de sistema, la concentración de partículas suele ser una función de r y z , pero no de θ , esto es que $C = C(r, z)$, por lo que la solución buscada puede tener la forma,

$$C(r, z) = R(r)Z(z). \quad (\text{C.3})$$

Sustituyendo (C.3) en (C.2), obtenemos,

$$\frac{1}{R} \left(\frac{\partial^2 R}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial R}{\partial r} \right) + \frac{1}{Z} \frac{\partial^2 Z}{\partial z^2} = 0, \quad (\text{C.4})$$

lo cual implica que $R(r)$ y $Z(z)$ deben satisfacer independientemente las ecuaciones,

$$\frac{1}{Z} \frac{\partial^2 Z}{\partial z^2} = \gamma^2 \quad (\text{C.5})$$

$$\frac{1}{R} \left(\frac{1}{r} \frac{\partial R}{\partial r} + \frac{\partial^2 R}{\partial r^2} \right) = -\gamma^2 \quad (\text{C.6})$$

donde γ^2 es una constante de separación intrínsecamente positiva (lo cual nos permite asignarle explícitamente el signo).

C.1. Condiciones a la frontera

La solución a la ecuación (C.2), $C = C(r, z)$, debe satisfacer las siguientes condiciones a la frontera (CF), a fin de modelar un disco absorbente que yace en el plano XY:

i) La concentración de partículas en el plano XY es cero para todo punto perteneciente al disco absorbente de radio $r = a$: $C(r, 0)|_{r \leq a} = 0$.

ii) El resto de la superficie del plano fuera del disco, se comporta como una pared reflejante, es decir, el flujo en el plano es cero: $\partial C(r, z)/\partial z|_{z=0, r > a} = 0$.

iii) La concentración de partículas a una altura $z = \infty$ para todo el plano, tiene un valor constante $C(r, \infty)|_{r \geq 0} = C_\infty$ (concentración en el seno del disolvente).

iv) La concentración de partículas a cualquier altura desde el plano, a una distancia $r = \infty$ del centro del disco, tiene un valor constante: $C(\infty, z)|_{z \geq 0} = C_\infty$ (concentración en el seno del disolvente)

C.2. Solución dependiente de la coordenada axial

La ecuación (C.5),

$$\frac{1}{Z} \frac{\partial^2 Z}{\partial z^2} = \gamma^2$$

es una ecuación diferencial ordinaria y separable, cuya solución general es de la forma

$$Z = A_1 e^{\gamma z} + B_1 e^{-\gamma z} \quad (C.7)$$

de acuerdo la CF (iii), la concentración de partículas debe alcanzar un valor finito en el límite $z \rightarrow \infty$. El primer término en la ecuación (C.7) diverge en el límite citado, de lo que se sigue que $A_1 = 0$, así la solución buscada es

$$Z = B_1 e^{-\gamma z}. \quad (C.8)$$

El valor de la constante B_1 aún no se determina, sin embargo, podemos proseguir con la solución radial $R(r)$.

C.3. Solución dependiente de la coordenada radial r

La ecuación (C.6), multiplicada por r^2 y tras una leve reordenación, se escribe como,

$$r^2 \frac{\partial^2 R}{\partial r^2} + r \frac{\partial R}{\partial r} + r^2 \gamma^2 R = 0 \quad (C.9)$$

puede apreciarse que (C.9) es una ecuación diferencial ordinaria (EDO) lineal homogénea de segundo orden. Esta ecuación, además, guarda semejanza con un tipo particular de EDO lineal conocida como *ecuación paramétrica de Bessel*,

$$x^2 y'' + xy' + (\lambda^2 x^2 - \nu^2)y = 0, \quad (C.10)$$

cuya solución general es de la forma,

$$y = c_1 J_\nu(\lambda x) + c_2 Y_\nu(\lambda x), \quad (C.11)$$

donde $J_\nu(\lambda x)$ y $Y_\nu(\lambda x)$, son funciones de Bessel de primera y segunda clase, respectivamente, de orden ν .

Comparando (C.9) y (C.10) hallamos las equivalencias: $x = r$, $\lambda = \gamma$ y $\nu = 0$, con lo cual la solución de la ecuación (C.9) puede escribirse a partir de (C.11) como,

$$R = A_2 J_0(\gamma r) + B_2 Y_0(\gamma r). \quad (C.12)$$

Consideremos el comportamiento de las funciones de Bessel ilustradas en la gráfica de la figura C.1.

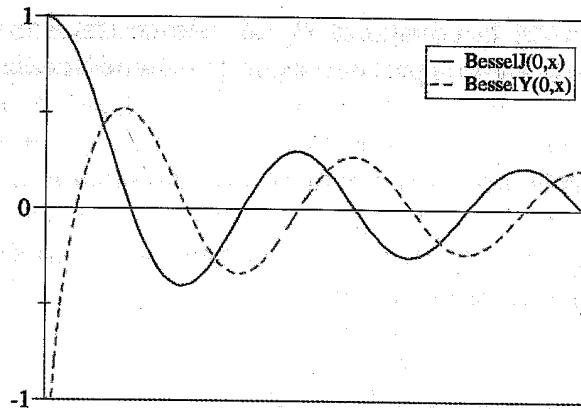


Figura C.1. Comportamiento de las funciones de Bessel, de primera y segunda clase, de orden cero.

A primera vista se nota que la función de Bessel de segunda clase $Y_0(\gamma r)$ ~~diverge~~ ^{converge} en el límite $r \rightarrow 0^+$; ya que la solución buscada $C(r, z)$, debe ser finita en este límite se sigue que $B_2 = 0$, por lo que la solución a (C.9) queda como,

$$R = A_2 J_0(\gamma r). \quad (C.13)$$

C.4. Solución general de la ecuación de difusión en estado estacionario

De acuerdo con (C.3), la solución general a la ecuación de difusión en estado estacionario se escribe, usando los resultados (C.8) y (C.13), en la forma,

$$C(r, z) = B J_0(\gamma r) e^{-\gamma z}, \quad (C.14)$$

donde $B = B_1 A_2$.

Sin embargo, al considerar las condiciones de frontera (i) y (ii), es necesario que la solución (C.14) satisfaga la condición,

$$J_0(\gamma r) = 0, \quad (C.15)$$

lo cual implica que el parámetro γ puede tomar cualesquier valor en el conjunto $\{\gamma_n\}$ de las raíces de (C.15). Por tanto, la superposición continua de estas soluciones, es a su vez una solución de (C.3),

$$C(r, z) = B \int_0^\infty J_0(\gamma r) e^{-\gamma z} f(\gamma) d\gamma, \quad (C.16)$$

donde $f(\gamma)$ es una función arbitraria del parámetro γ . La forma de ésta función, se escoge teniendo en cuenta la forma de algunas de las integrales definidas de Bessel, como las encontradas en la referencia [15].

Tomando

$$f(\gamma) = \frac{\text{sen}(\gamma a)}{\gamma}$$

se tiene,

$$\int_0^\infty J_0(\gamma r) \frac{\text{Sen}(\gamma a)}{\gamma} d\gamma = \begin{cases} \text{ArcSen}\left(\frac{a}{r}\right), & r > a \\ \frac{\pi}{2}, & r \leq a \end{cases}, \quad (C.17)$$

Ahora, considerando (C.17) y las condiciones de frontera (i) y (iii), se sigue que $C(r, z)$ debe tener la forma,

$$C(r, z) = C_\infty - \frac{2C_\infty}{\pi} \int_0^\infty e^{-\gamma z} J_0(\gamma r) \frac{\text{sen}(\gamma a)}{\gamma} d\gamma, \quad (C.18)$$

que es la solución buscada.

C.5. ¿A qué velocidad llegan las partículas al disco absorbente?
la constante de velocidad

Para conocer a qué velocidad alcanzan las partículas el disco absorbente en el plano XY, debemos calcular la tasa de cambio de partículas en la superficie, esto es,

$$\left. \frac{\partial C(r, z)}{\partial z} \right|_{z=0, r \leq a},$$

para lo cual derivamos (C.18)

$$\left. \frac{\partial C(r, z)}{\partial z} \right|_{z=0, r \leq a} = \left(-\frac{2C_\infty}{\pi} \int_0^\infty -\gamma e^{-\gamma z} J_0(\gamma r) \frac{\text{sen}(\gamma a)}{\gamma} d\gamma \right) \Bigg|_{z=0}$$

y llevamos a cabo las integrales resultantes, para obtener la expresión,

$$\left. \frac{\partial C(r, z)}{\partial z} \right|_{z=0, r \leq a} = \frac{2C_\infty}{\pi} \cdot \frac{1}{\sqrt{a^2 - r^2}}. \quad (\text{C.19})$$

El flujo superficial

$$J_{\text{sup}} = -D \left\langle \left. \frac{\partial C}{\partial z} \right|_{z=0} \right\rangle$$

se obtiene integrando (C.19) para todos los puntos (r, θ) pertenecientes al disco de radio a , es decir,

$$J_{\text{sup}} = -D \cdot \left(\frac{2C_\infty}{\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^a \frac{1}{\sqrt{a^2 - r^2}} r dr d\theta \right) = -4DC_\infty a; \quad (\text{C.20})$$

el signo negativo indica que el flujo hacia el disco absorbente va en el sentido de $+z$ hacia $-z$. Si además recordamos que

$$J_{\text{sup}} = \frac{-N}{V} \quad \text{y} \quad C_\infty = \frac{-N}{V},$$

tendremos

$$\frac{1}{\tau} = \frac{4Da}{V}, \quad (\text{C.21})$$

donde τ es el tiempo medio de sobrevivencia de las partículas en el medio (véase §9 para una discusión completa) y su recíproco es la tasa de arribo k (partículas por unidad de tiempo) al disco absorbente, por tanto

$$k = \frac{1}{\tau} = \frac{4Da}{V}. \quad (\text{C.22})$$

APÉNDICE D
OBTENCIÓN DE κ

Para obtener κ pensemos en un sistema formado por un volumen conectado a un canal. En nuestra aproximación consideremos el canal con un radio inmensamente más pequeño que las dimensiones del volumen y que los flujos se encuentran en equilibrio. Iniciemos escribiendo las fracciones de partículas en el volumen y en el canal. Si denotamos al tamaño de nuestro volumen por V_v , y al volumen del canal por V_c , suponiendo que uno es inmensamente más grande que el otro ($V_v \gg V_c$),

$$f_c = \frac{V_c}{V_v + V_c} \approx \frac{V_c}{V_v} \quad (\text{D.1})$$

y

$$f_v = \frac{V_v}{V_v + V_c} \approx 1. \quad (\text{D.2})$$

Las concentraciones a su vez estarán dadas por,

$$c_c = \frac{NV_c}{LV_v} \quad (\text{D.3})$$

y

$$c_v = \frac{N}{V_v}. \quad (\text{D.4})$$

En la primera ecuación hemos dividido entre la longitud del canal L ya que hacemos la aproximación de que el canal es tan pequeño que lo podemos considerar como

en una dimensión, motivo por el cual definimos c_c como una concentración lineal.

Llamaremos I_{out} e I_{in} a las corrientes de salida y entrada del canal. Éstas estarán dadas por,

$$I_{\text{out}} = \kappa c_c = \frac{\kappa NV_c}{LV_v} \quad (\text{D.5})$$

e

$$I_{\text{in}} = kc_v = \frac{4DaN}{V_v}. \quad (\text{D.6})$$

En la ecuación (D.5) hemos utilizado una constante desconocida κ la cual es la que queremos encontrar y que caracteriza el número de partículas que salen del canal hacia el volumen. De las ecuaciones anteriores vemos que los flujos entre los dos sistemas estarán dados por,

$$J_{\text{out}} = I_{\text{out}} / a^2 = \frac{\kappa NV_c}{a^2 LV_v} \quad (\text{D.7})$$

y

$$J_{\text{in}} = I_{\text{in}} / a^2 = kc_v / a^2 = \frac{4DaN}{a^2 V_v}, \quad (\text{D.8})$$

que al igualar nos permite despejar κ ,

$$\kappa = \frac{4DaL}{V_c}. \quad (\text{D.9})$$

Considerando al canal como un cilindro, finalmente obtenemos que,

$$\kappa = \frac{4D}{\pi a}. \quad (\text{D.10})$$

APÉNDICE E

OBTENCIÓN DE LA ECUACIÓN (6.10)

De acuerdo al desarrollo presentado en la sección §6 para obtener la solución general a la ecuación de difusión con arrastre (ecuación (3.14), sección §3), la ecuación (6.9) mostrada aquí de nuevo,

$$c(x, t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{c}_0 e^{(i\omega v - D\omega^2)t} e^{i\omega x} d\omega \quad (\text{E.1})$$

es el resultado de aplicar la transformada inversa de Fourier a la ecuación (6.7).

Sin embargo, para obtener la solución buscada, en la forma de la ecuación (6.10),

$$c(x, t) = \frac{c_0}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-(x-vt)^2/4Dt} \quad (\text{E.2})$$

la integral del lado derecho de (E.1) debe ser evaluada en el plano complejo, mediante el procedimiento que se explica a continuación.

Como primer paso manipulemos las exponenciales en el argumento de la integral en (E.1)

$$e^{(i\omega v - D\omega^2)t} e^{i\omega x} = e^{-(i\omega(x-vt) - D\omega^2)t} \quad (\text{E.3})$$

y completamos el cuadrado del argumento de la exponencial del lado derecho de (E.3)

$$\begin{aligned} -(i\omega(x-vt) - D\omega^2)t &= -Dt \left(\omega^2 + \frac{i\omega}{Dt} (x-vt) \right) \\ &= -Dt \left\{ \omega^2 + 2\omega \left[\frac{i}{2Dt} (x-vt) \right] + \left[\frac{i}{2Dt} (x-vt) \right]^2 - \left[\frac{i}{2Dt} (x-vt) \right]^2 \right\} \end{aligned}$$

donde,

$$-(i\omega(x-vt) - D\omega^2)t = -Dt \left\{ \left[\omega + \frac{i}{2Dt} (x-vt) \right]^2 - \left[\frac{i}{2Dt} (x-vt) \right]^2 \right\} \quad (\text{E.4})$$

Usando el resultado (E.4) en (E.1), tendremos,

$$c(x, t) = \frac{c_0}{2\pi} e^{Dt \left[\frac{i}{2Dt} (x-vt) \right]^2} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-Dt \left[\omega + \frac{i}{2Dt} (x-vt) \right]^2} d\omega$$

o bien,

$$c(x, t) = \frac{c_0}{2\pi} e^{-\frac{(x-vt)^2}{4Dt}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-Dt \left[\omega + \frac{i}{2Dt} (x-vt) \right]^2} d\omega. \quad (\text{E.5})$$

Ahora, definamos un cambio de variable para la nueva integral en (E.5)

$$z = \omega + \frac{i}{2Dt} (x-vt)$$

con lo cual volvemos a escribir (E.5) en la forma,

$$c(x, t) = \frac{c_0}{2\pi} e^{-\frac{(x-vt)^2}{4Dt}} \int_{-\infty + \frac{i}{2Dt}(x-vt)}^{\infty + \frac{i}{2Dt}(x-vt)} e^{-Dtz^2} dz. \quad (\text{E.6})$$

Para evaluar la integral en el lado derecho de (E.6) recurriremos a un útil cálculo de variable compleja: el teorema de Cauchy, que establece que la integral de línea de alguna función de variable compleja $f(z)$ sobre una trayectoria cerrada C se anula, si $f(z)$ es una función analítica de $z = x + iy$ (es decir, que satisface las relaciones de Cauchy-Riemann [16]),

$$\oint_C f(z) dz = 0.$$

Ahora, debemos hallar una trayectoria de integración adecuada para evaluar nuestra integral. Consideremos los límites de la integral en (E.6),

$$z_1 = a + i \frac{(x-vt)}{2Dt} \quad (\text{E.7})$$

$$z_2 = b + i \frac{(x-vt)}{2Dt}$$

donde, más tarde, a y b pueden hacerse tender a $-\infty$ e ∞ , respectivamente, y representémosles en un plano complejo como el de la figura E1. El contorno cerrado más simple que conecta z_1 con z_2 está formado por las líneas $\{C_1, C_2, C_3, C_4\}$,

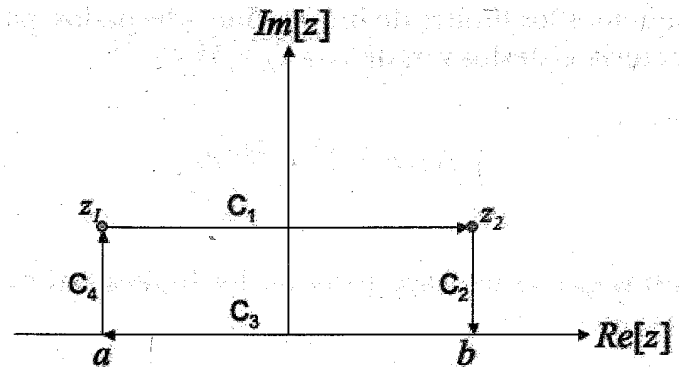


Figura E1. Trayectoria de integración en el plano complejo. Los límites a y b se hacen tender a infinito para coincidir con los límites de la integral en (D.6).

y de aquí, aplicando el teorema de Cauchy, tendríamos,

$$\oint_C f(z) dz = \int_{C_1} f(z) dz + \int_{C_2} f(z) dz + \int_{C_3} f(z) dz + \int_{C_4} f(z) dz = 0,$$

en donde hemos hecho la identificación

$$f(z) = e^{-Dtz^2}.$$

Ahora bien, cuando hacemos $a \rightarrow -\infty$ y $b \rightarrow \infty$, el integrando $f(z)$ decae exponencialmente, por lo que,

$$\int_{C_2} f(z) dz = \int_{C_4} f(z) dz = 0$$

dejándonos con la expresión

$$\int_{C_1} f(z) dz = - \int_{C_3} f(z) dz \quad (\text{E.8})$$

coloquemos los límites de integración adecuados: para la trayectoria C_1 , éstos van de z_1 a z_2 ,

$$\int_{C_1} f(z) dz = \int_{z_1}^{z_2} e^{-Dtz^2} dz, \quad (\text{E.9})$$

mientras que en la trayectoria C_3 , los límites van de ∞ a $-\infty$, así tenemos,

$$\int_{C_3} f(z) dz = \int_{\infty}^{-\infty} e^{-Dtz^2} dz, \quad (\text{E.9})$$

usando las expresiones (E.8) y (E.9) en la ecuación (E.7), se llega a la ecuación,

$$\int_{z_1}^{z_2} e^{-Dtz^2} dz = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-Dtz^2} dz \quad (\text{E.9})$$

y con esto, la ecuación (E.1) queda como,

$$c(x, t) = \frac{c_0}{2\pi} e^{-\frac{(x-vt)^2}{4Dt}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-Dtz^2} dz \quad (\text{E.10})$$

denotemos por I a la integral del lado derecho de (E.10),

$$I = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-Dtz^2} dz. \quad (\text{E.11})$$

Para evaluar (E.11) recurriremos a un truco: elevar al cuadrado la integral I ,

$$I^2 = \left(\int_{-\infty}^{\infty} e^{-Dtx^2} dx \right) \left(\int_{-\infty}^{\infty} e^{-Dty^2} dy \right) \quad (\text{E.12})$$

$$= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-Dt(x^2+y^2)} dx dy$$

y convertir la integral resultante a coordenadas polares,

$$I^2 = \lim_{R \rightarrow \infty} \left(\int_0^{2\pi} \int_0^R e^{-Dtr^2} r dr d\theta \right). \quad (\text{E.13})$$

Usando el cambio de variable $u = -Dtr^2$ con (E.13) llegamos a la expresión,

$$I^2 = \lim_{R \rightarrow \infty} \left(-\frac{2\pi}{2Dt} \int_0^{-DtR^2} e^u du \right) = \lim_{R \rightarrow \infty} \left(-\frac{\pi}{Dt} e^u \Big|_0^{-DtR^2} \right)$$

$$= \lim_{R \rightarrow \infty} \left(-\frac{\pi}{Dt} e^{-DtR^2} + \frac{\pi}{Dt} \right) = \frac{\pi}{Dt}. \quad (\text{E.14})$$

Ahora podemos obtener el valor de I , ecuación (E.11), simplemente tomando la raíz cuadrada de I^2 de la ecuación (E.14),

$$I = \sqrt{I^2} = \sqrt{\frac{\pi}{Dt}} \quad (\text{E.15})$$

con cuyo resultado podemos ahora escribir la solución general a la ecuación de difusión con arrastre (E.1),

$$c(x, t) = \frac{c_0}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{(x-vt)^2}{4Dt}},$$

que es la expresión que buscábamos obtener.

CAPÍTULO 15 ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE CANALES DE POTASIO Y SODIO ACTIVADOS POR VOLTAJE

FROYLÁN GÓMEZ-LAGUNAS*
*Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina, UNAM*

I. INTRODUCCIÓN

El flujo de iones a través de canales fue descrito por primera vez por los investigadores ingleses Alan Hodgkin y Andrew Huxley en su estudio clásico sobre las bases iónicas de los potenciales de acción (PA) (Hodgkin & Huxley, 1959): la secuencia estereotipada, todo o nada, de despolarización-repolarización del potencial de membrana (V_m) que experimentan las células excitables al ser estimuladas de forma apropiada. El estudio de Hodgkin y Huxley (HH) es sin lugar a duda uno de los mejores trabajos de investigación biomédica de todos los tiempos, constituye la base de toda la investigación biofísica posterior sobre canales iónicos y es también uno de los fundamentos de neurofisiología actual.

Utilizando como preparación biológica al axón gigante del calamar *Loligo paeli* y con el empleo de la técnica de fijación de voltaje desarrollada por Cole y Marmont, Hodgkin y Huxley descubrieron que en el axón gigante

* froylangl@yahoo.com

la fase inicial de despolarización del PA se produce por la activación dependiente de voltaje de una corriente iónica entrante rápida y transitoria, que despolariza la membrana, mientras que la fase de repolarización ocurre por la activación más lenta de una corriente saliente sostenida (figura 1). Mediante experimentos de sustitución iónica Hodgkin y Huxley identificaron a la corriente entrante como una corriente transportada por Na^+ (I_{Na}), y consideraron que la corriente saliente debía ser transportada por iones K^+ (I_{K}), según se indica en la figura 1 (Hodgkin & Huxley, 1952).

También establecieron que los flujos de iones responsables del PA presentan una de las características fundamentales del flujo a través de canales, a saber que los flujos iónicos netos van siempre a favor de su gradiente electroquímico, el cual es proporcional a la diferencia $V_m - V_i$, donde V_i es el potencial de equilibrio del ión, de acuerdo con la ley de Ohm:

$$I_{\text{Na}} = G_{\text{Na}} (V_m - V_{\text{Na}}); I_{\text{K}} = G_{\text{K}} (V_m - V_{\text{K}}).$$

Sin embargo consideraron que sus observaciones podían explicarse tanto por un mecanismo de canal como por uno de acarreador (Hodgkin & Huxley, 1952) y no fue si no hasta una década después que Clay Armstrong demostró que el mecanismo responsable del flujo de iones corresponde al que define a los canales iónicos (Armstrong, 1971).

Ya que tanto I_{Na} como I_{K} varían en el tiempo (figura 1), es claro que las conductancias correspondientes G_i son función del tiempo. Hodgkin y Huxley encontraron que tanto G_{Na} como G_{K} también dependen del voltaje

y argumentaron que esta última característica tenía que deberse a la presencia, en las proteínas correspondientes, de cargas eléctricas netas, fijas o inducibles o bien a dipolos cuya orientación cambiara con V_m , permitiendo a los canales abrirse al despolarizarse y cerrarse al repolarizarse la membrana. Esta reorientación o movimiento de carga intramembranal (Q_g), da lugar a las llamadas corrientes de compuerta (o de *gating*, I_g). La I_g correspondiente a los canales de Na^+ fue medida dos décadas después por Armstrong y Bezanilla (Bezanilla & Armstrong, 1977). Al dominio con carga neta Q_g que responde a los cambios de potencial se le llama el "sensor de voltaje".

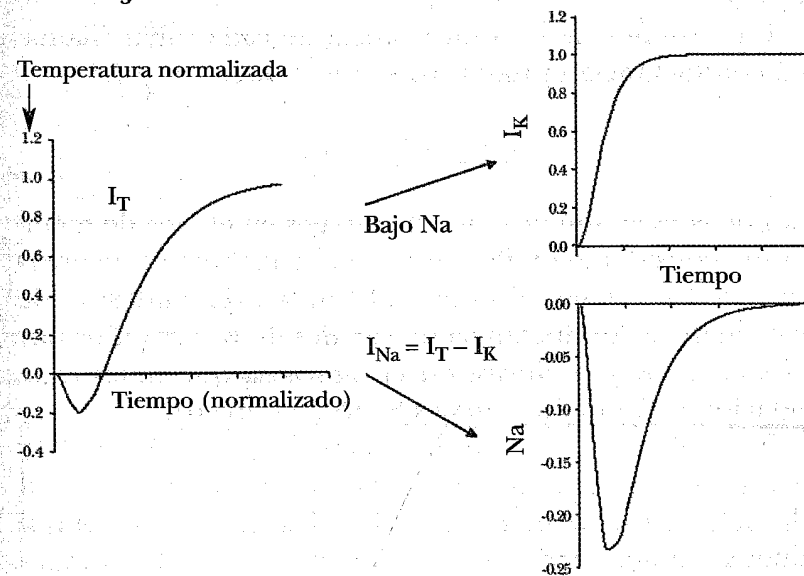


Figura 1. Corrientes de Na^+ y K^+ del axón gigante de calamar. El trazo de la izquierda muestra la suma $I_{\text{Na}} + I_{\text{K}}$ obtenidas con el modelo de Hodgkin y Huxley. En el trazo no está considerada una corriente inespecífica llamada I_l por HH. El trazo superior derecho muestra I_{K} en ausencia de I_{Na} , como se indica. El trazo inferior derecho muestra I_{Na} .

Considerando a un sistema con dos estados posibles (canales abiertos o cerrados) Hodgkin y Huxley describieron la dependencia de G_i con V_m , en estado estacionario, con la ecuación de Boltzmann:

$$G_i(V_m) = G_{i,max} / (1 + \exp[-z_{g,i}eF(V_m - V_{1/2})/RT]),$$

donde $G_{i,max}$ es el valor máximo que toma G_i debido al número finito de canales en la membrana, $V_{1/2}$ es el valor de V_m en que $G_i = 1/2 G_{i,max}$ y $z_{g,i}e$ es la carga efectiva del dominio de la proteína que se desplaza al cambiar V_m . Como G depende de V_m , a los canales que presentan esta característica se les conoce como canales activados por voltaje.

En términos de la conductancia de cada canal (llamada conductancia unitaria, γ_i) se tiene que:

$$G_i = \gamma_i N P_o(V_m),$$

donde N es el número total de canales en el área de membrana considerada y $P_o(V_m)$ es la probabilidad de apertura de los canales al potencial V_m . La dependencia de voltaje de la conductancia de canales de K^+ activados por el voltaje (K_v) se ilustra en la figura 2a que muestra la relación $G(V)$ de los canales Shab (ver abajo).

En la figura 1 se puede apreciar que los canales de K^+ y Na^+ presentan una diferencia cinética importante; así, al despolarizarse la membrana I_K , alcanza una amplitud final sostenida, dada por $G_K(V_m) \times (V_m - V_K)$, en tanto que I_{Na} es transitoria, esto es los canales de Na^+ dejan de conducir, G_{Na} se hace cero rápidamente aun cuando la membrana continúe despolarizada. A este estado no-conductor, no-cerrado, que visitan los canales al despolarizarse la membrana se le denomina *inactivación*.

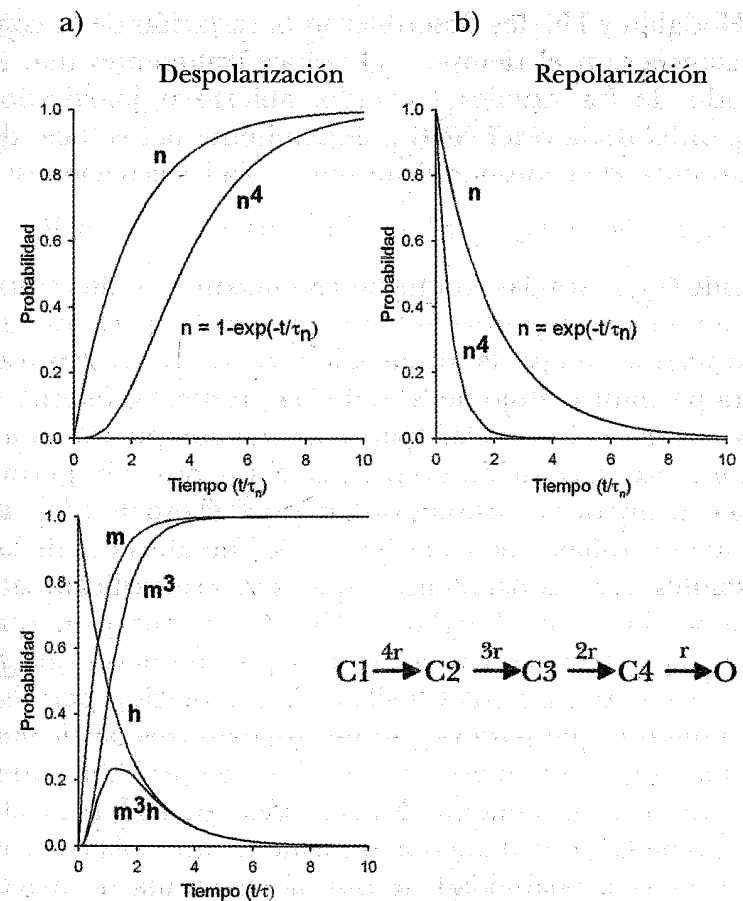


Figura 2. G_K (Shab) en función del voltaje. a) Conductancia relativa ($G(V)/G_{max}$) de los canales de K^+ Shab en función del voltaje, en las soluciones de registro indicadas. En la condición fisiológica Na_e/K_i los puntos experimentales se ajustan con una ecuación de Boltzmann (ver Texto) con $Z = 4.6e$ y $V_{1/2} = -56.3$ mV (tomado de Gómez-Lagunas, 2007). b) Modelo RC de la membrana del axón de calamar de Hodgkin y Huxley. El modelo presenta conductancias independientes, paralelas, para el Na^+ y el K^+ , más una conductancia inespecífica (G_i). G_{Na}^+ y G_K varían con el voltaje (ilustrado en A con G_K de Shab), en tanto que G_i es constante.

Hodgkin y Huxley describieron la variación de la conductancia con el tiempo y el voltaje asumiendo que el estado de los canales (cerrado, abierto o inactivado) dependía de la orientación, dependiente del voltaje, de "partículas de compuerta" de acuerdo a las ecuaciones:

$$G_K(t, V_m) = G_{K,max} n^4; G_{Na}(t, V_m) = G_{Na,max} m^3 h,$$

donde $G_{K,max}$ son las conductancias máximas a cada voltaje, n y m son la probabilidad de que cada "partícula de compuerta" tenga la orientación correcta (permissiva) para permitir el flujo de K^+ o de Na^+ , respectivamente.

Considerando que las "partículas de compuerta" transitan entre su posición no-permissiva a la posición permissiva con cinética de primer orden, y que el estado (dependiente de voltaje) de cada "partícula" no afecta al de las restantes (*i.e.*, considerando que son estocásticamente independientes), Hodgkin y Huxley encontraron que para reproducir la activación de G_K se requería que al menos cuatro partículas tuvieran la orientación permissiva, mientras que para G_{Na} se necesitaban tres partículas, lo que siendo independientes ocurre con probabilidades n^4 o m^3 , respectivamente. En el modelo de HH, la inactivación de G_{Na} está dada por el estado de una sola partícula, h es la probabilidad de que la "partícula de inactivación" tenga la orientación permissiva para el flujo de Na^+ (*i.e.*, de que los canales no estén inactivados) (figura 3).

Nótese que en el modelo de HH los flujos de Na^+ y K^+ son descritos por conductancias separadas para cada ión (figura 2b), las conductancias dependen del voltaje (figura 3b), y se considera que la compuerta (partícula) de inactivación (h) es distinta de la compuerta (dominio) de activación-desactivación (m o n) de los canales. La separación de las conductancias de Na^+ y K^+ se demostró farmacológicamente en los años sesenta del siglo XX,

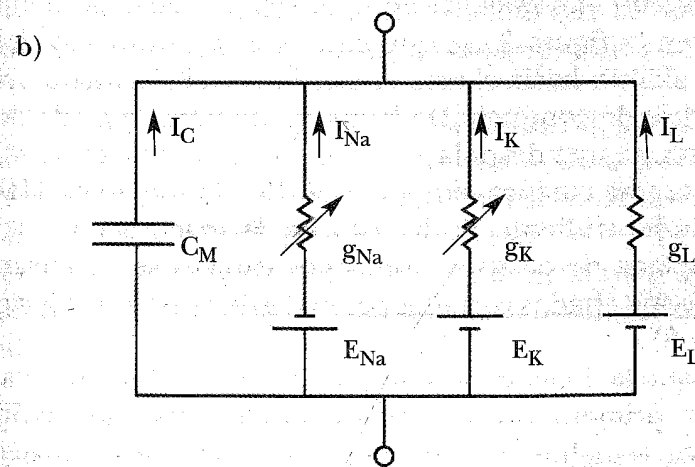
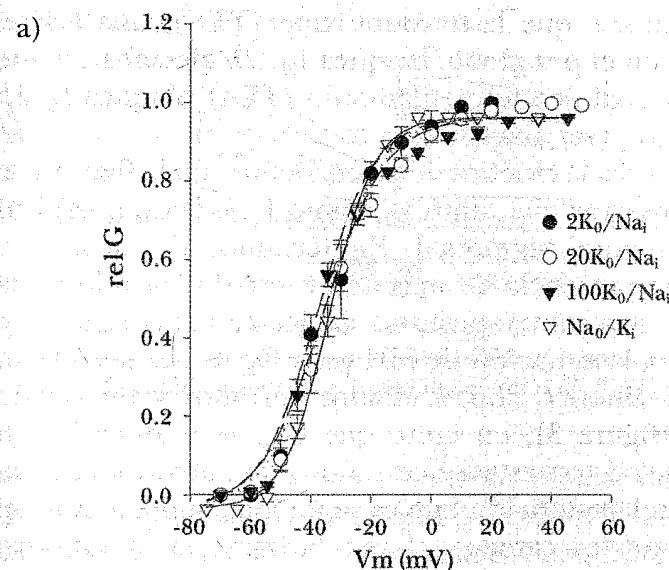


Figura 3. Modelo de Hodgkin y Huxley. La parte superior ilustra el curso temporal del parámetro n (compuerta de activación de G_K) al despolarizarse (izquierda) y al repolarizarse (derecha) la membrana. La parte inferior izquierda ilustra el curso temporal de los parámetros de G_{Na} , m y h al despolarizarse la membrana. En la parte inferior derecha se muestra el esquema cinético en que se traduce la ecuación de HH para G_K .

al encontrarse que la tetrodotoxina (TTX), una toxina presente en el pez globo, bloquea I_{Na} sin afectar I_K , y que el catión orgánico tetraetilamonio (TEA) bloquea I_K sin afectar a I_{Na} (ver abajo).

Volviendo a la cinética de las corrientes, en la figura 1 se puede observar que tanto I_{Na} como I_K se activan con un curso temporal sigmoïdal. En términos cinéticos esto implica la presencia de más de un estado cerrado en la ruta de activación (apertura) de los canales (figura 1). De hecho, la ecuación de HH para G_K se traduce en un esquema cinético con 4 estados cerrados y un estado abierto (figura 3), en tanto que G_{Na} se traduce en un esquema con tres estados cerrados y uno abierto. En contraste con la activación que es sigmoïdal, la desactivación (cierre) de los canales, al repolarizarse la membrana, sigue una cinética exponencial, como se ve por el decaimiento exponencial de n , al repolarizarse la membrana en la figura 3, ya que basta con la transición del estado abierto hacia el primer estado cerrado para que el canal deje de conducir. De la misma manera, la caída de G_{Na} durante una despolarización, esto es su inactivación, presenta una cinética exponencial. En el modelo de HH m es independiente de h , esto es, la inactivación está desacoplada de la activación, y los canales se inactivan tanto desde estados cerrados como desde el estado abierto (figura 3).

Aunque la inactivación de canales iónicos fue observada por primera vez en los canales de Na^+ del axón gigante, actualmente sabemos que todos los canales operados por voltaje presentan alguna forma de inactivación, siempre y cuando su activación (*i.e.*, la despolarización de la membrana) sea lo suficientemente prolongada. Lo anterior puede observarse en la figura 4 que ilustra la diversidad cinética de los canales de K^+ activados

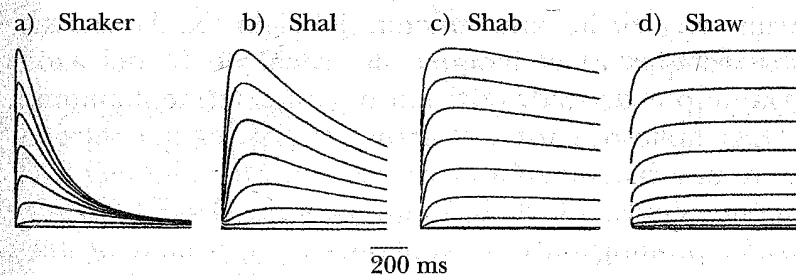


Figura 4. Diversidad cinética de canales de K^+ activados por voltaje. Familia de canales activados por voltaje (K_v) de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (tomado de Wei *et al.*, 1988).

por voltaje. Nótese cómo los llamados canales de Shaker presentan una inactivación rápida, similar a la de G_{Na} del axón gigante, en tanto que los canales Shaw no muestran inactivación en la escala de tiempo mostrada, en cambio Shab y Shal presentan una inactivación que se establece con una velocidad intermedia a las que presentan Shaker y Shaw (Wei *et al.*, 1990).

La inactivación suele clasificarse de forma operacional en rápida, si ocurre en una escala de milisegundos (*e.g.*, la de G_{Na} o la de Shaker), o en lenta si se desarrolla en una escala de tiempo mayor (*e.g.*, la de Shab). Como se verá posteriormente, además de diferir en su cinética también el mecanismo de ambos tipos de inactivación es diferente.

2. INACTIVACIÓN RÁPIDA. MODELO DEL BALL-AND-CHAIN

La inactivación de G_{Na} descrita por Hodgkin y Huxley es rápida (figura 1). El mecanismo básico de esta forma de inactivación se obtuvo mediante la integración de varias observaciones, realizadas por el laboratorio de Clay

Armstrong en los años setenta del siglo XX. Armstrong observó que: a) el bloqueo del canal de K^+ del axón gigante por derivados del ión orgánico tetraetil amonio (TEA) aplicados intracelularmente, hacen que I_K presente una inactivación aparente (*i.e.*, que adquiera una cinética similar a la de I_{Na}) y que, por otro lado, b) la perfusión prolongada del axoplasma con enzimas proteolíticas destruye la inactivación I_{Na} , además de que c) no hay movimiento de carga intramembranal (I_g) asociado a la inactivación de I_{Na} .

Estas observaciones fueron integradas por el laboratorio de Clay Armstrong en un modelo conocido como *ball-and-chain* (Armstrong & Bezanilla, 1977) de acuerdo con el cual la "compuerta" de inactivación consiste de un dominio citoplásmico de la proteína, formado por una porción globular (o "bola" funcional) unida al resto de la proteína mediante un asa flexible o "cadena". De acuerdo al modelo, cuando los canales se abren, al despolarizarse la membrana, la bola se une a una región intracelular del poro bloqueando la conducción de iones. Esto es que: el mecanismo de la inactivación rápida consiste en el bloqueo del poro abierto por un dominio intracelular de la proteína (figura 5).

Una consecuencia de este mecanismo es que la compuerta (dominio) de activación del poro, así como el sensor de voltaje, no pueden retornar a su posición cerrada en tanto la "bola" no se disocia del poro. Este fenómeno observado con corrientes de *gating* (I_g), se conoce como inmovilización de carga (Armstrong & Bezanilla, 1977; Bezanilla *et al.*, 1991).

De acuerdo con el modelo *ball-and-chain*, el primer paso en la recuperación de la inactivación es la disociación de la "bola" del poro abierto. Esto implica que durante el proceso los canales deben conducir iones transi-

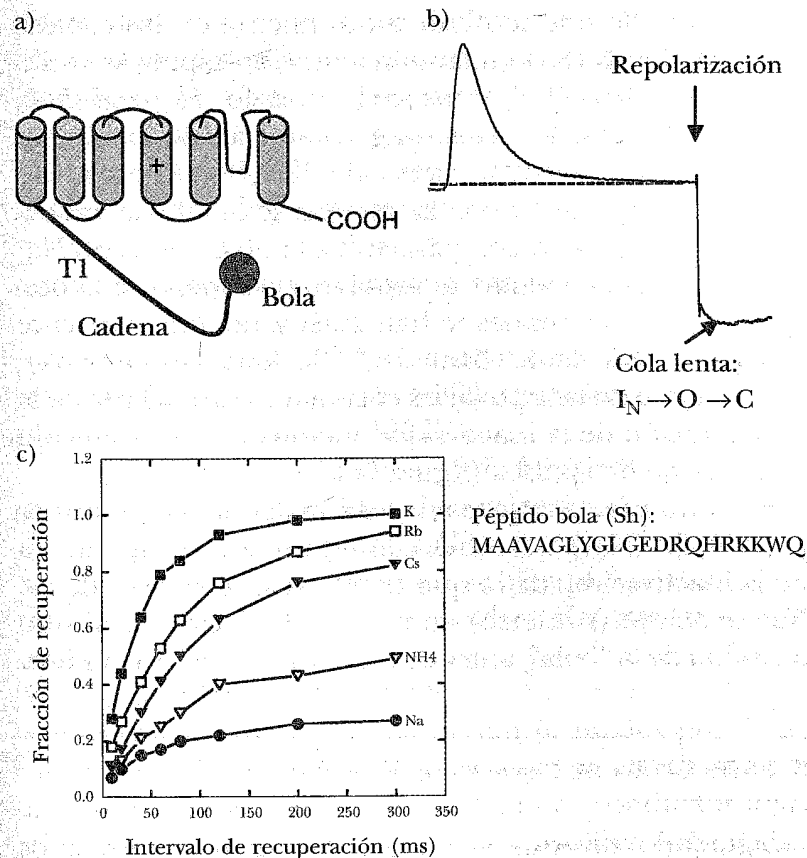


Figura 5. Inactivación rápida ("ball-and-chain") de los canales de K^+ Shaker: a) Modelo topológico de una subunidad αK indicando el dominio N-terminal que funcionalmente actúa como una bola (rojo) unida por una "cadena" flexible al resto de la proteína. C-terminal al dominio de inactivación se indica al dominio T1 (ver texto). b) I_K a través de Shaker producida por una despolarización a +20 mV por 30 ms, con K^+ 100 mM en la solución externa. Note cómo al repolarizarse la membrana, al potencial de reposo de -80 mV, los canales, inactivados durante el pulso despolarizante, conducen K^+ (cola lenta) al salir la bola del poro, como se indica con el diagrama. c) Recuperación de la inactivación medida con un protocolo de dos pulsos en función de la composición de la solución externa, como se indica. Los iones permeantes aceleran la salida de la bola inactivante (c) es tomado de Gómez-Lagunas & Armstrong, 1994).

toriamente, lo que se observa claramente en los canales de K⁺ Shaker B (Sh) en cuya inactivación rápida se verifican todos los elementos del modelo *ball-and-chain* (Gómez-Lagunas & Armstrong, 1994): al elevar la concentración extracelular, tanto de K⁺ ([K^{e+}]) como de otros iones permeantes, la recuperación de la inactivación se acelera en comparación a la observada con Na⁺ (figura 5a) apareciendo, al repolarizar la membrana después de que los canales se han inactivado, una corriente entrante lenta de K⁺ llamada "cola lenta" (figura 5b). La constante de tiempo de las colas lentas es igual a la de la recuperación de la inactivación medida con el protocolo estándar de dos pulsos (figura 5c).

En contraste, la mayoría de los canales de Na⁺ activados por voltaje (Nav) no conducen durante la recuperación de la inactivación, de lo que se infiere que el poro de los Nav se ocluye (se cierra) en una posición externa al sitio de unión de la "bola", antes de la disociación de esta última.

3. ESTRUCTURA DE CANALES DE K⁺ Y NA⁺

Siguiendo diversas estrategias, a partir de los años ochenta del siglo pasado se ha clonado a un gran número de canales de K⁺ y Na⁺. Como se anticipaba por la diversidad de sus características cinéticas y farmacológicas (figura 4), se ha encontrado que los canales de K⁺ presentan una diversidad estructural mucho mayor que los de Na⁺. Más aún, actualmente se sabe que los canales de K⁺ están presentes en prácticamente todos los tipos celulares, mientras que de manera general se puede decir que los Nav se encuentran restringidos a células excitables.

El primer canal de K⁺ que se clonó fue el Shaker, un canal activado por voltaje (figura 4) de la mosca de la

fruta *Drosophila melanogaster* (Pongs *et al.*, 1988). A partir de su clonación Shaker se convirtió en el prototipo de los canales de K⁺. Shaker, y en general los Kv, están formados por una sola subunidad, llamada α (α Kv) de aproximadamente 600 aminoácidos. En eucariontes, estas subunidades provienen de un transcrito que, en algunos casos, presenta múltiples exones (23 en Shaker) cuyo procesamiento alternativo da lugar a canales con propiedades distintas. Así por ejemplo hay 10 isoformas de Shaker cuyas subunidades α presentan una región central común flanqueada por N y C-terminales citoplásmicas variables (Pongs, 1988 y 1992).

Las subunidades α Kv constan de 6 hélices (segmentos) transmembranales (TM), denominados S1 a S6. Los miembros de las distintas familias (ver figuras 4 y 7) presentan ~40% de identidad en su porción central S1-S6, que es la región más conservada; mientras que entre miembros de una misma familia el porcentaje de identidad es de ~75% (Pongs, 1992).

Los canales Kv funcionales están formados por 4 subunidades α Kv las cuales se agregan en la membrana con simetría tetramérica alrededor del poro conductor de K⁺ (MacKinnon, 1991). Por otro lado, los Nav están formados por una sola subunidad formadora de poro α Na que consta de 4 dominios homólogos (DI-DIV), cada uno de los cuales es similar a una subunidad α K presentando 6TMs, según se muestra en la figura 7E (Noda *et al.*, 1984).

Posteriormente, la clonación de canales de K⁺ cuya activación no depende del potencial de membrana mostró la presencia de una gran diversidad estructural en esta familia de proteínas, debido a la existencia de subunidades α K con un número variable de segmentos transmembranales. Así, los canales de K⁺ conocidos presentan

2005; Guda *et al.*, 2006). En la figura 7 al módulo del poro y al módulo de *gating* de los canales de K⁺ se les asignan colores distintos.

4. EL AMINO TERMINAL DE LA SUBUNIDAD α_{KV} . INACTIVACIÓN RÁPIDA (TIPO N) Y AGREGACIÓN DE SUBUNIDADES

Las características de la inactivación rápida condensadas en el modelo *ball-and-chain*, junto con la comparación de la estructura primaria de isoformas de canales Shaker con velocidades de inactivación rápida variables, sugirió que el N-terminal de α_K (o de subunidades auxiliares β) debía contener al dominio responsable de este tipo de inactivación. De esta forma, estudiando el efecto de mutaciones puntuales y deleciones el laboratorio de Richard Aldrich demostró que aproximadamente los primeros 20 aminoácidos del N-terminal conforman el dominio que bloquea el poro (la bola funcional, figura 5), en tanto que, aproximadamente, los siguientes 50 aminoácidos funcionalmente forman una cadena flexible que une a la bola con S1. Confirmando con ello la validez del modelo *ball-and-chain* (Hoshi *et al.*, 1990; Zagotta *et al.*, 1990).

Al ser tetrámeros los canales Kv con inactivación rápida presentan 4 dominios de inactivación *i.e.*, presentan 4 dominios *ball-and-chain* (Gómez-Lagunas & Armstrong, 1995). Estudiando el curso temporal de la inactivación rápida durante su remoción por la enzima proteolítica papaína en los canales Shaker, se demostró que: a) la estequiometría del bloqueo es 1:1; b) los 4 dominios de inactivación tienen un comportamiento estadístico independiente *i.e.*, la probabilidad de que uno de ellos se una al poro no se ve afectada por la presencia de los otros

dominios, de forma que c) el único efecto funcional de la redundancia de dominios es que la inactivación es 4 veces más rápida de lo que sería si sólo hubiese un dominio, ya que además, d) una vez que el poro es bloqueado (inactivado) por alguna de las "bolas", la presencia de los 3 dominios restantes no afecta la estabilidad del estado inactivado. Esto último se ilustra en la figura 6 que muestra que la velocidad de recuperación de la inactivación es la misma, independientemente del número de compuertas de inactivación N que presenten los canales (Gómez-Lagunas & Armstrong, 1995).

A diferencia de los Kvs los canales Nav están formados sólo por una subunidad formadora de poro, por lo que presentan solamente una compuerta de inactivación rápida (un *ball-and-chain*). El dominio de inactivación de los Nav está formado por el asa intracelular que conecta al dominio DIII con DIV (figura 7E), en el que la secuencia conservada de aminoácidos IFM juega un papel similar al de la bola de Shaker (West *et al.*, 1992)

En canales de K⁺ eucariontes, entre S1 y el dominio de inactivación rápida, se encuentra una secuencia de ~100 aminoácidos llamada dominio T1 (indicado en la figura 5a), que determina la agregación de las 4 subunidades α_K que forman un canal funcional, previniendo que subunidades de subfamilias moleculares diferentes (e.g., Shaker y Shab) se ensamblen para formar un canal funcional (Li *et al.*, 1992). T1 tiene además la función de formar la superficie de unión de subunidades auxiliares β que proporcionan inactivación tipo *ball-and-chain* a algunos Kv (Kobertz *et al.*, 2000).

Imágenes cristalográficas muestran que los dominios T1 presentan una estructura globular que, al unirse, forma una especie de bulbo o "góndola" de simetría tetramérica que pareciera colgar del resto de la proteína

en el citoplasma de la célula (Kobertz *et al.*, 2000). De forma inesperada y contra intuitiva, estas imágenes muestran que el eje central del poro queda ocluido por la unión del tetrámero T1, por lo que al parecer tanto los iones como la compuerta N-terminal de inactivación acceden al poro a través de 4 espacios laterales o "ventanas" formadas por las hélices que unen a T1 con S1 (ver figura 12) (Kobertz *et al.*, 2000; Roosind *et al.*, 2004).

5. EL PORO DE LOS CANALES DE K^+ ESTÁ FORMADO POR EL ASA P Y LA PORCIÓN C-TERMINAL DE S6

Los canales de K^+ presentan una gran diversidad, tanto a nivel molecular como en su cinética y mecanismos de gating (figuras 4, 7), pero todos ellos presentan la característica común que los define de ser altamente selectivos al K^+ (radio atómico = 1.23 Å) sobre el más pequeño, y más abundante en el líquido extracelular, ión Na^+ (0.95 Å). Siendo la permeabilidad relativa de estos iones (P_{Na}/P_K), medida en las llamadas condiciones bi-iónicas (Na_e/K_i , donde el subíndice se refiere al lado de la membrana), típicamente menor a 10^{-4} . En contraste con el Na^+ , que es prácticamente impermeable bajo las condiciones arriba señaladas, otros cationes monovalentes, además del K^+ , tienen una permeabilidad significativa a través de canales de K^+ siendo la secuencia de permeabilidades típica: $Tl^+ > K^+ Rb^+ NH_4^+ \gg Cs^+$.

El análisis del efecto de mutaciones puntuales en el bloqueo de los canales Shaker por TEA, y por toxinas del veneno de alacranes (*e.g.*, ver Miller, 1995), identificaron al asa que conecta S5 con S6 como la región formadora del poro, por lo que se le llamó asa P (figura 7). Los estudios de bloqueo por TEA indicaron también que el asa P

debía entrar parcialmente en la membrana, ya que presenta tanto residuos que intervienen sólo en el bloqueo por TEA externo (Sh 449T), como residuos, localizados hacia la parte media del asa P, que intervienen sólo en el bloqueo por TEA interno (*e.g.*, Sh 441T) (MacKinnon & Yellen, 1990; Yellen *et al.*, 1991). Otras observaciones del grupo de Gary Yellen mostraron además que residuos de S6 (como la posición 469 de Shaker) también afectan de forma prominente la afinidad del poro hacia compuestos derivados del TEA, por lo que se infirió que, además del asa P, el C-terminal de S6 debía de contribuir a la formación de la porción intracelular del poro (Choi *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 2001).

La hipótesis de que el asa P debía formar parte del poro recibió sustento definitivo en 1994 con la observación de que esta asa contiene una secuencia conservada de aminoácidos que al ser mutados alteran la selectividad de los canales. A esta secuencia conservada (TXTVGYGD) se le conocía como la secuencia característica de los canales de K^+ (Heginbotham *et al.*, 1994) (figura 8). A nivel estructural la selectividad, previamente mencionada, que define a los canales de K^+ , está dada por la secuencia característica, que forma el llamado filtro de selectividad de los canales de potasio (Heginbotham *et al.*, 1994, Doyle *et al.*, 1998).

6. INACTIVACIÓN LENTA. PARTICIPACIÓN DE LA PORCIÓN EXTRACELULAR DEL PORO Y DEL FILTRO DE SELECTIVIDAD

Como se mencionó anteriormente, operacionalmente la inactivación se divide en rápida o en lenta, según la escala de tiempo en la que se desarrolla. La inactivación de tipo rápido ha sido previamente presentada (figuras 1, 2, 5, 6). La inactivación lenta se ilustra en la figura 9 que

	1	2	3	4	5	6	7	8
Secuencia característica (Sh):	T	M	T	T	V	G	Y	G
No selectivos	G	-	-	-	A	A	-	A
	-	-	-	-	G	C	-	P
	-	-	-	-	N	P	-	P
	-	-	-	-	Q	Q	-	Q
	-	-	-	-	S	-	-	S

Figura 8. Secuencia característica de los canales de K⁺. La figura indica la Secuencia característica de los canales Shaker (Sh) (residuos numerados 1 a 8) junto con mutaciones que eliminan la discriminación de los canales entre el K⁺ y el Na⁺. Note como las mutaciones que eliminan la selectividad se concentran en los residuos VGYG presentes en todos los canales de K⁺ (adaptada de Heginbotham *et al.*, 1994).

como ejemplo presenta la corriente a través de los canales Shab en respuesta a una despolarización corta (30 ms) en donde no se advierte inactivación (figura 9a), y en respuesta a una despolarización prolongada (7 s), en donde se advierte la caída de G_K en un estado inactivado que por su cinética es de tipo lento (figura 9b).

Un mismo tipo de canal puede presentar inactivación tanto rápida como lenta, en cuyo caso la inactivación lenta es prácticamente enmascarada por la rápida, por lo que para estudiarla es conveniente eliminar esta última. Tal es el caso de los canales Shaker que según se ha visto presentan una inactivación rápida tipo N (o *ball-and-chain*). Al eliminar la inactivación rápida con técnicas de biología molecular, haciendo una deleción de los primeros 46 residuos del N-terminal (Sh IR o Sh Δ4-46; Hoshi *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1991), o bien con enzimas proteolíticas (Gómez-Lagunas & Armstrong, 1995), se hace más evidente la inactivación lenta de los canales, la cual se desarrolla exponencialmente con una constante de tiempo independiente del voltaje de ~1 s, en

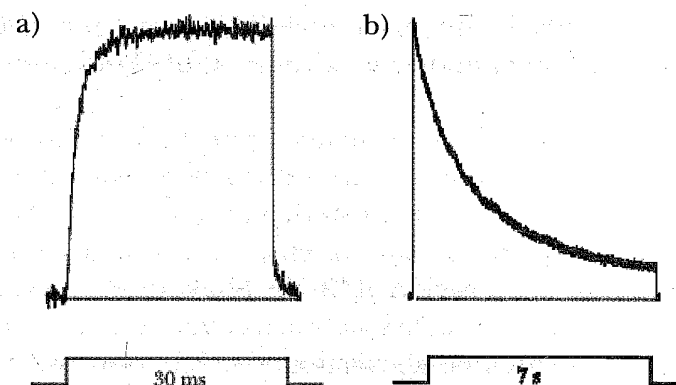


Figura 9. Inactivación lenta de canales de K⁺. a) I_K a través de los canales Shab en respuesta a un pulso despolarizante (+20 mV) corto (30 ms) desde el potencial de reposo de -80 mV. Los canales no se inactivan durante el pulso corto. b) I_K registrada en la misma célula pero en respuesta a una despolarización larga (7 s). Durante la despolarización prolongada I_K decae exponencialmente a un estado inactivado lento (tomado de Gómez-Lagunas, 2007).

concentraciones fisiológicas de K⁺ (López-Barneo *et al.*, 1993).

La de Shaker es la forma de inactivación lenta más estudiada. Esta inactivación se altera por mutaciones en el asa P y en el extremo C-terminal de S6, por lo que también se conoce como tipo C (Hoshi *et al.*, 1991; López-Barneo *et al.*, 1993). La inactivación tipo C se caracteriza por las siguientes propiedades:

1. Su cinética depende marcadamente del residuo presente en la posición 449, ubicado en el vestíbulo externo del poro (Lopez-Barneo *et al.*, 1993). Cabe señalar que, se ha propuesto que los 4 residuos en la posición 449 (treonina en Shaker) conforman también el sitio de unión de TEA externo (Heginbotham y MacKinnon, 1992), aunque recientemente esta propuesta ha sido cuestionada tanto

por resultados de dinámica molecular como por observaciones experimentales (ver Crouzy *et al.*, 2001; Andalib *et al.*, 2004).

2. La inactivación se enlentece por TEA_e (Choi *et al.*, 1991). Se ha propuesto que esto ocurre por un mecanismo de impedimento alostérico al unirse el TEA_e a su sitio de bloqueo, presuntamente conformado por los residuos de la posición 449 de Shaker; sin embargo, como ya se mencionó, la localización del sitio de bloqueo ha sido recientemente cuestionada. La controversia en torno al sitio de bloqueo es relevante ya que: el efecto enlentecedor del TEA_e se considera una de las principales evidencias de que la inactivación tipo C involucra el cierre parcial de la porción externa del poro (Liu *et al.*, 1996). Aunque, por otro lado, en apoyo a la idea del impedimento alostérico de la inactivación, se ha reportado que:

3. Mutaciones que eliminan la distancia eléctrica de bloqueo del TEA_e ($\delta \sim 0.15$ en Shaker), eliminan también su efecto inhibitorio de la inactivación (Molina *et al.*, 1997).

4. La velocidad de la inactivación disminuye al aumentar la concentración de K⁺ externo (López-Barneo *et al.*, 1993), en tanto que la recuperación de la inactivación se acelera (Levy & Deutsch, 1996).

5. La inactivación se acelera por la mutación A463C en S6 de Shaker. Se ha propuesto que ello se debe a una disminución en la afinidad al K⁺ del poro, lo que explicaría la observación de que el canal mutante conduce Na⁺ en ausencia de K⁺ y de que su inactivación sea más rápida que la del Shaker nativo (Ogielska y Aldrich, 1998, 1999).

6. Durante la inactivación lenta, tanto de canales de Na⁺ como de K⁺, la relación Qg vs. Vm se desplaza hacia potenciales hiperpolarizados, lo cual sugiere que el

cambio conformacional del poro, en el estado inactivado, se extiende al sensor de voltaje (Bezanilla *et al.*, 1982; Olcese *et al.*, 1997).

7. LA ESTRUCTURA DEL PORO DE CANALES DE K⁺

El estudio de canales iónicos experimentó un avance radical en 1998 con la publicación de la primera estructura cristalográfica de un canal de K⁺. Haciendo uso de la elevada velocidad de replicación de las bacterias el grupo de Roderick MacKinnon fue capaz de obtener los miligramos de proteína necesarios para determinar la estructura del canal de K⁺ llamado KscA, de la bacteria *Streptomyces lividans* (Doyle *et al.*, 1998; ver también Long *et al.*, 2005), un canal de 2TM, es decir que sólo presenta el módulo del poro (S5-P-S6).

En la estructura del KscA (figura 10) se observa que el canal es en efecto un tetrámero (ver también figuras 11 y 12). Los segmentos S5 y S6, de cada una de las 4 subunidades α , forman hélices transmembranales. El asa P (de ~ 20 residuos) de cada subunidad, surge de S5 como un asa extracelular corta (llamada "torreta"), y entra en la membrana formando una hélice corta (llamada hélice del poro) para finalmente volver a dirigirse hacia el medio extracelular como una cadena extendida. Esta cadena extendida forma (en la estructura tetramérica del canal) el llamado filtro de selectividad (FS), la porción más estrecha del poro (~ 3 Å de diámetro, por ~ 12 Å de largo), la cual contiene a la secuencia característica de los canales de K⁺ (Heginbotham *et al.*, 1994; Doyle *et al.*, 1998).

En la estructura cristalográfica se observa que los carbonilos de cadena principal de los residuos de la secuencia característica apuntan hacia el lumen del poro, coordi-

nando iones K^+ (figura 10). Se observan 4 sitios de unión a K^+ , denominados, en dirección de afuera de la célula hacia adentro, s1 a s4, los cuales, en las condiciones saturantes de K^+ de obtención de cristales, están ocupados dos a dos, en forma alternada, por iones K^+ deshidratados

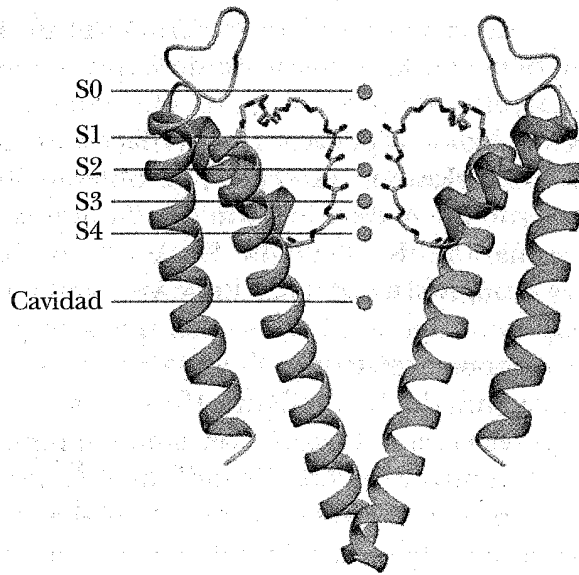


Figura 10. Estructura cristalográfica del canal 2TM KcsA. El canal funcional es un tetrámero. En la imagen aparece una vista lateral de 2 de las 4 subunidades. En azul aparecen las hélices S6, también llamadas hélices internas o M2, en verde las hélices externas S5 o M1, las esferas indican iones K^+ en los sitios de unión (mínimos de energía libre) s0 a s4 (numerados desde el lado externo de la membrana) del filtro de selectividad. Se observa un ion K^+ adicional por debajo del filtro de selectividad (por debajo de s4), en la llamada cavidad central, localizada en la parte media de la bicapa lipídica. En rojo, en el filtro de selectividad, aparecen los oxígenos de los carbonilos de cadena principal de la secuencia característica que coordinan a los iones K^+ . Las asas que salen de S5 están por fuera de la membrana y forman la llamada torreta del vestíbulo del poro, éstas entran a la membrana como una hélice corta (hélice del poro, en marrón) y salen como un asa extendida formando el filtro de selectividad (Doyle *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001).

(i.e., s1 y s3, o s2 y s4), con una molécula de agua entre ellos. En algunos cristales se observa a un ion K^+ , parcialmente coordinado por un sitio (s0) externo al s1 del FS (Zhou *et al.*, 2001).

Inmediatamente después del FS, hacia la mitad de la membrana, hay una cavidad hidrofóbica llamada cavidad central, que por ser suficientemente amplia (~10 Å de diámetro) contiene a un ión K^+ hidratado. Finalmente, se observa que la porción citoplásmica del poro está formada por las hélices S6, las cuales, en el estado cerrado, delimitan la cavidad central, cruzándose en su extremo C-terminal, formando así la llamada compuerta de activación. La naturaleza hidrofóbica de la porción intracelular

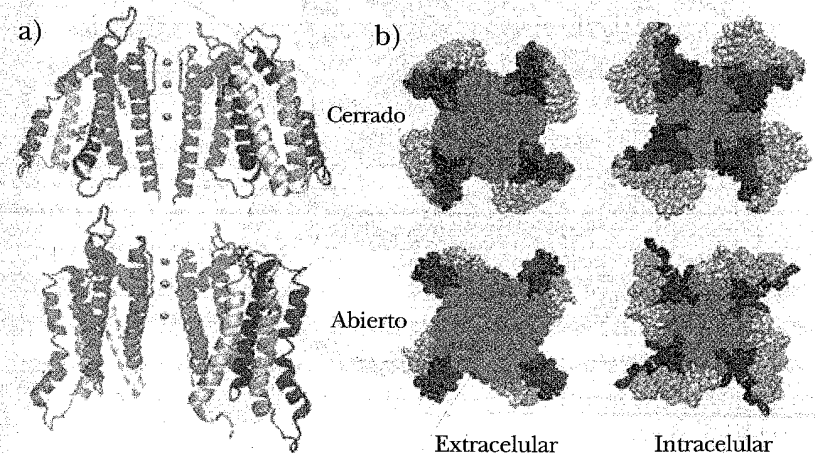


Figura 11. Estructura del canal de K^+ dependiente de voltaje (6TM) Kv1.2. A. Estructura en el estado cerrado. Vista lateral de 2 subunidades. B. Estructura en el estado cerrado, se muestran las 4 subunidades, como se indica. S4, el sensor de voltaje aparece en rojo, en la periferia de la proteína, una cara (la cara con las cadenas laterales de los residuos básicos cargados) hace contacto con residuos ácidos de S2 y S3, los cuales también contribuyen a detectar y transducir los cambios, mientras que la cara opuesta de la hélice hace contacto con el lípido de la membrana. C. Estructura en el estado abierto (tomado de Chanda *et al.*, 2005).

del poro, y la localización citoplásmica de la compuerta de activación fueron anticipadas veinte años antes por Clay Armstrong, basándose únicamente en sus observaciones del bloqueo del poro por derivados del TEA (Armstrong, 1971).

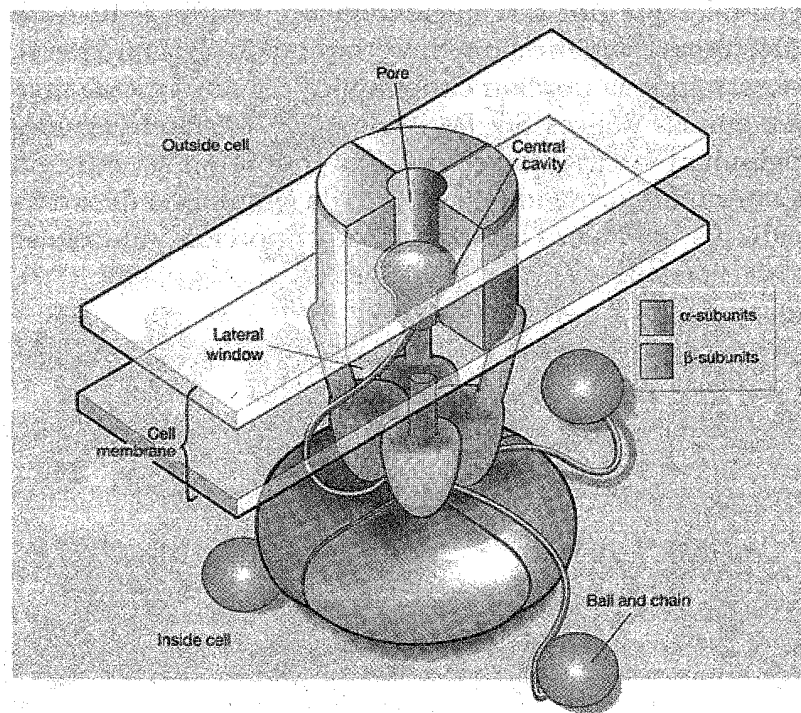


Figura 12. Canal de K^+ activado por voltaje. La ilustración muestra el arreglo en la membrana de un canal de K^+ activado por voltaje. La figura muestra 3 de las 4 subunidades que conforman un canal. El poro se encuentra en el centro de las subunidades α , como se indica. En azul se muestran subunidades β cuyo N-terminal forma el dominio *ball-and-chain* que confiere inactivación rápida al canal. Las subunidades β se encuentran ancladas al dominio T1 y los péptidos bola inactivantes acceden a su sitio de bloqueo en la cavidad central (con estequiometría 1:1) a través de los espacios o "ventanas" laterales (tomado de Aldrich, 2001).

8. EL MECANISMO DE SELECTIVIDAD DE CANALES DE K^+ .

EL MODELO DE SELECTIVIDAD (*SNUG-FIT*) Y OBSERVACIONES FUNCIONALES QUE NO CONCUERDAN CON ÉL

El mecanismo por el cual los canales de K^+ seleccionan al K^+ sobre el más pequeño ión Na^+ ha intrigado a los estudiosos de canales iónicos prácticamente desde la descripción inicial de estas proteínas por Hodgkin y Huxley hasta nuestros días. Como veremos, pese al gran avance que ha significado la disponibilidad de información estructural a nivel atómico, el mecanismo de selectividad sigue siendo objeto de discusión.

Con base en las imágenes cristalográficas del canal KcsA se propuso que la región del poro que selecciona al ión K^+ , el filtro de selectividad (FS), presenta una estructura rígida (*i.e.*, de templado fijo), en la que los oxígenos de los carbonilos de cadena principal de la secuencia característica estarían fijamente posicionados en una geometría tal que les permite remplazar el agua de hidratación de los iones K^+ , pero no la de los más pequeños iones Na^+ (Doyle *et al.*, 1998). En este filtro rígido iones más grandes, como el Cs^+ , serían excluidos por impedimento estérico. Este modelo de selectividad corresponde a un modelo propuesto décadas antes por Clay Armstrong e ilustrado en la figura 13, llamado de "ajuste ceñido" (*snug-fit*), (Armstrong, 1975; Nosokov & Roux, 2006).

Cabe hacer notar que el *snug-fit* es equivalente al modelo de "templado fijo" (o de llave-cerradura) postulado por Fisher en la bioquímica enzimática para explicar el reconocimiento de sustratos por el sitio activo de enzimas (Segel, 1981) (figura 13). Al modelo de Fisher se le ha antepuesto el llamado modelo de ajuste inducido (*induced fit*) de Koshland, o modificaciones del mismo,

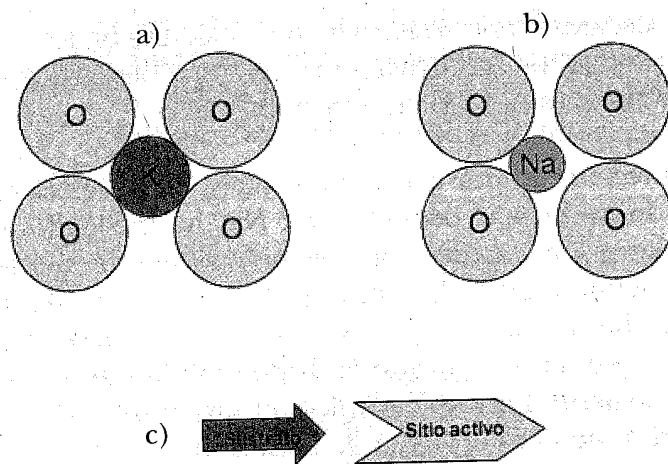


Figura 13. Modelo de ajuste-ceñido (*snug-fit*) de selectividad de canales de K^+ . a) Ilustración del modelo *snug-fit*. El ion K^+ (en rojo, radio iónico de 1.23 Å) aparece coordinado por 4 oxígenos (círculos azules), que corresponderían a una de las dos caras de cada sitio de unión del filtro de selectividad (s1-s4), donde cada K^+ aparece coordinado por 8 oxígenos. b) El Na^+ que es más pequeño (0.95 Å) no puede ser coordinado adecuadamente (i.e., con $\Delta G < 0$) por los oxígenos fijos, por lo que es seleccionado en contra (adaptado de Armstrong, 1975). c) La imagen muestra que el *snug-fit* es equivalente al modelo de templado fijo (llave-cerradura) para la selectividad enzimática de Fisher.

según el cual el sitio activo de una enzima no presenta una estructura rígida (de templado) complementaria a la del sustrato como una cerradura rígida (sitio activo) presenta una estructura complementaria al de la llave (sustrato) sino que, al interactuar con la enzima, es el sustrato mismo el que induce la estructura adecuada del sitio activo (Koshland, 1963).

El concepto de un filtro de selectividad rígido como base del mecanismo de selectividad es con toda seguridad incorrecto. Este concepto se deriva de imágenes estáticas del poro, obtenidas en soluciones saturantes de K^+ . Ahora sabemos que los canales KcsA cristalizados, con los que se

planteó este modelo, están inactivados (i.e., en una conformación no-conductora de la que por lo tanto, no se pueden inferir de forma concluyente, como se ha pretendido hacer, mecanismos de conducción y selectividad (Cordero-Morales *et al.*, 2006)). Aun con las imágenes cristalográficas de canales en que la compuerta de activación está en lo que parece ser su conformación abierta, no se puede inferir, a partir de ellas, de forma concluyente, el mecanismo de permeación, ya que este último es un proceso dinámico en el que los iones que residen en el poro determinan de forma significativa sus propiedades (ver abajo). Finalmente, es importante señalar que es bien conocido que las proteínas son moléculas flexibles y que sus fluctuaciones térmicas a temperatura ambiente (en general, y en particular la del filtro de selectividad de KcsA) exceden la pequeña diferencia que hay entre los radios iónicos del K^+ y del Na^+ , que es de tan sólo 0.38 Å (e.g., ver Allen *et al.*, 2004; Nosokov *et al.*, 2004).

Así, como se mostrará en la siguiente sección, a pesar de la extendida aceptación que tuvo inicialmente, cada vez hay más evidencias de que el modelo de *snug-fit* no concuerda con muchas propiedades funcionales del poro de los canales de K^+ , incluyendo la selectividad misma.

9. EL PAPEL DE LOS IONES K^+ EN LA SELECTIVIDAD Y LA FUNCIONALIDAD (ESTABILIDAD Y GATING) DE LOS CANALES DE K^+

Además de fluir selectivamente a través de canales de K^+ los iones K^+ ejercen un papel modulador crítico, aunque sorprendentemente variable (dada la conservación de su filtro de selectividad), tanto de la selectividad como de la funcionalidad (*gating* y estabilidad) de estas proteínas.

En relación al papel del K^+ como modulador de los cambios conformacionales de los canales de K^+ se sabe que el aumento de la $[K^+]_o$: a) disminuye la velocidad de cierre de los canales (Matteson & Swenson, 1986); b) aumenta la velocidad de recuperación de la inactivación tanto N como C de Shaker (Gómez-Lagunas & Armstrong, 1994; Levi & Deutsch, 1996) (figura 5); y por otro lado, c) disminuye la velocidad de la inactivación lenta de Shaker, aunque en contraste aumenta la de Kv2.1 (López-Barneo *et al.*, 1993; Klemic *et al.*, 1998).

Además de modular el *gating*, el K^+ juega un papel crítico en la estabilidad del poro de los canales de K^+ , el cual se observa más fácilmente, pero no únicamente, al exponer a los canales a soluciones con $0 K^+$ en ambos lados de la membrana (Almers & Armstrong, 1981; Gómez-Lagunas, 1997). Así, los canales Shaker son estables en ausencia de K^+ siempre y cuando se mantengan sin activarse durante su exposición a soluciones con $0 K^+$; pero si los canales se abren entonces, al momento de cerrarse en $0 K^+$, la conductancia se colapsa (figura 14).

Es importante recalcar que el colapso de G_K ocurre durante el cierre de los canales, pues esto demuestra que: a) el efecto del K^+ en la desactivación (ver arriba) no es sólo de tipo cinético y, aún más importante, también demuestra que b) la conformación del filtro de selectividad en el estado cerrado no puede ser la misma que en el estado abierto (como se ha postulado en base a imágenes cristalográficas), ya que en el estado abierto el filtro de selectividad es estable en ausencia de K^+ . Finalmente, señalaremos que el colapso del poro de Shaker es revertido por despolarizaciones muy prolongadas.

A diferencia de Shaker, tanto los canales Shab como el canal de K^+ del axón gigante se colapsan (se colapsa G_K)

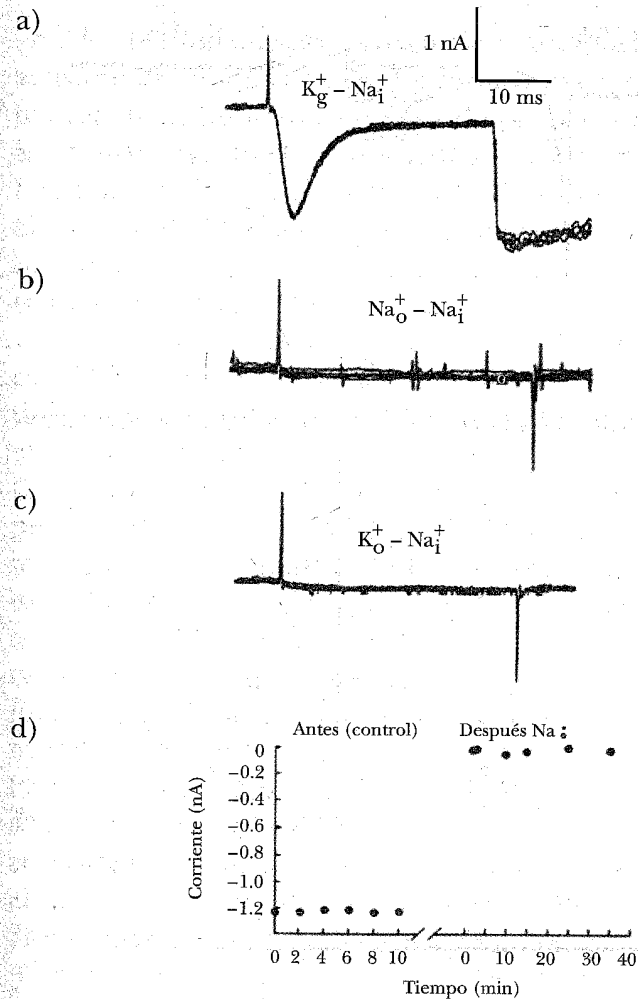


Figura 14. Colapso de la conductancia de los canales Shaker al cerrarse sin K^+ . a) I_K control con K_o/Na_i . I_K es entrante ($I_K < 0$) porque sólo hay K^+ en la solución externa. b) Corrientes producidas al dar 10 pulsos ($+20mV/30ms$) en $0 K^+$ + (Na_o/Na_i). No hay corriente que varíe en el tiempo (como I_K en A). c) I_K al regresar a las soluciones control. Note la caída de G_K que se recupera totalmente sólo al despolarizar la membrana por periodos prolongados (no se muestra), de lo contrario G_K no se recupera esto se ilustra en d) que presenta el curso temporal de I_K antes y después de los pulsos en $0 K^+$ (tomado de Gómez-Lagunas, 1997).

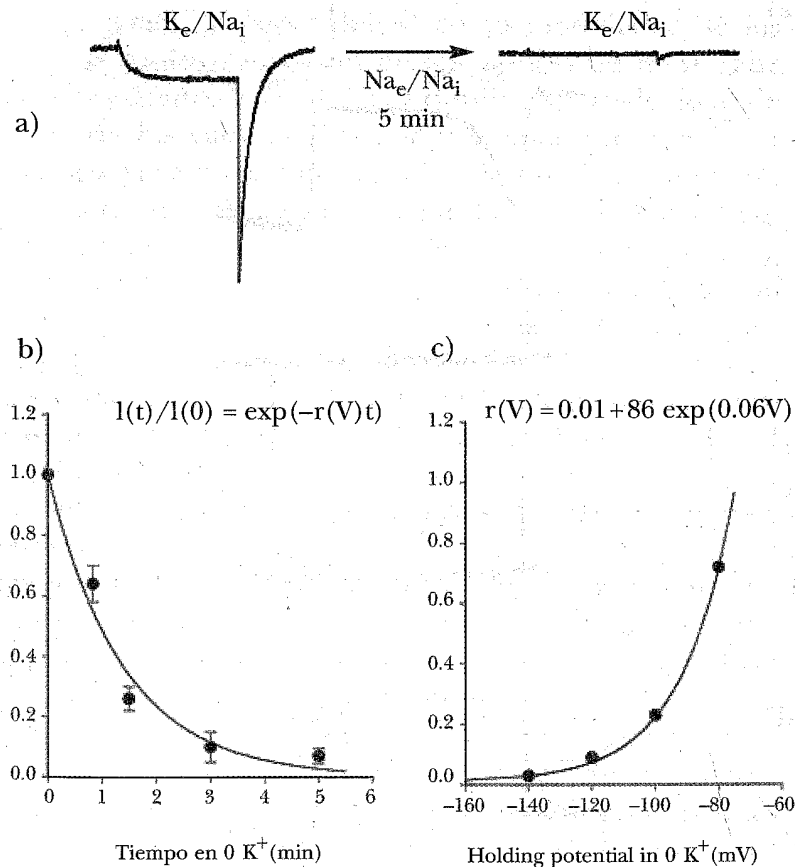


Figura 15. Colapso pasivo de la conductancia de los canales Shab en 0 K^+ . a) I_K en K_e/Na_i antes (panel izquierdo) y después de exponer los canales a soluciones sin K^+ en ambos lados de la membrana durante 5 min (Na_e/Na_i). Note cómo G_K se hace prácticamente 0. A diferencia de G_K de Shaker, la caída de G_K de Shab ocurre en forma pasiva, sin tener que activar y desactivar a los canales en 0 K^+ , con una cinética de primer orden b). Aunque G_K decae de forma espontánea la constante de decaimiento r tiene una fuerte dependencia del voltaje c) (tomado de Gómez-Lagunas, 2007).

en 0 K^+ de forma pasiva, es decir sin tener que abrir y cerrar activamente a los canales. En ambos casos el colapso es irreversible y sigue una cinética de primer orden (Almers & Armstrong, 1981; Ambriz-Rivas *et al.*, 2005; Gómez-Lagunas, 2007). Recientemente se demostró que aunque el colapso de Shab ocurre de forma pasiva, éste depende fuertemente del potencial de membrana (figura 15) (Gómez-Lagunas, 2007).

En contraste con los ejemplos anteriores, y ejemplificando el papel central del K^+ no sólo en la estabilidad sino también en la selectividad (papel que pasa por alto el modelo de filtro rígido *snug-fit*), se sabe que los canales Kv2.1 son estables en 0 K^+ pero pierden su selectividad permitiendo el paso de Na^+ (Zhu & Ikeda, 1993). De forma similar, en Shaker se observa que al disminuir el K^+ interno remplazándolo por Na^+ la relación P_{Na}/P_K aumenta (Gómez-Lagunas, 2001). Lo anterior se observa como un desbloqueo del canal a potenciales cada vez menores, conforme la fracción molar del K^+ (X_K) disminuye (figuras 16 y 17). En resumen, las observaciones hechas (entre otros) con los canales Kv2.1 y Shaker muestran que son los propios iones K^+ los que, al interactuar con el filtro de selectividad, hacen que el poro seleccione al K^+ sobre el Na^+ , y se mantenga estable al cerrarse. Todas estas observaciones experimentales, funcionales, no son consistentes con la noción de un filtro de selectividad rígido.

En contraste con los canales de K^+ , en los canales de Na^+ los iones Na^+ no desempeñan un papel tan marcado ni en la estabilidad ni en la selectividad de éstos. La selectividad en los Nav está dada por la confluencia en el poro de las asas P de cada dominio produciendo la secuencia DEKA del filtro de selectividad (Catterall, 2001).

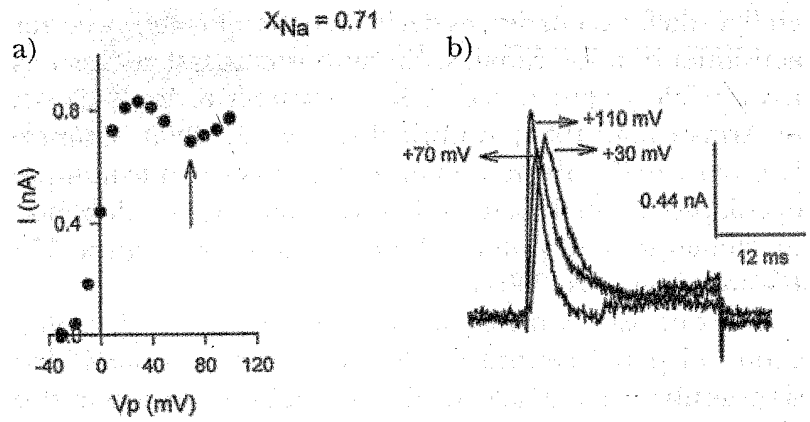


Figura 16. Interacción de iones Na^+ con el poro de Shaker en bajo K^+ . a) Relación corriente-voltaje (I-V) con Na^+ (fracción molar $X_{\text{Na}} = 0.71$) y K^+ en la solución intracelular ($X_{\text{K}} = 1 - X_{\text{Na}}$). I decrece cuando $V \approx +40$ mV debido al bloqueo por Na^+ . La flecha indica el voltaje crítico (V_c) en que el Na^+ remonta la energía de activación requerida para pasar a través del poro, desbloqueándolo. V_c es función de X_{K} (ver siguiente figura). b) Los trazos en la derecha ilustran la I-V (tomado de Gómez-Lagunas, 2001).

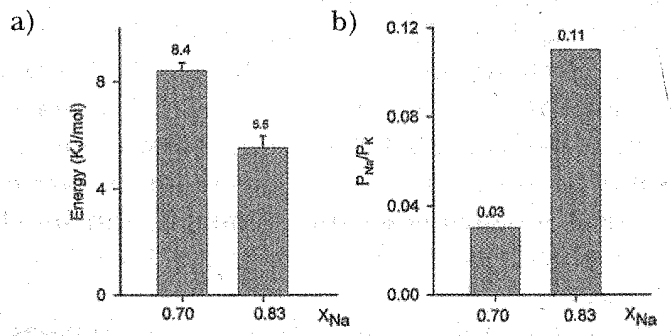


Figura 17. Caída de la selectividad del poro de Shaker al disminuir la $[\text{K}^+]$. a) Magnitud de la barrera de activación que hay que remontar para que el Na^+ pase por el poro (*i.e.*, para eliminar el bloqueo por Na^+ (como en la figura 16)), calculada a partir de la fórmula para el trabajo eléctrico: $E = F_x V_c$, donde F es la constante de Faraday y V_c es el voltaje de desbloqueo (ver figura 16). b) Relación de permeabilidades $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$ evaluada con la ecuación de Maxwell-Boltzmann: $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} = \exp(E/RT)$. Note que $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$ es función de X_{K} (tomado de Gómez-Lagunas, 2001).

10. EL SENSOR DE VOLTAJE Y LA COMPUERTA DE ACTIVACIÓN

De acuerdo con lo anticipado por Hodgkin y Huxley, un dominio de la subunidad α de los canales activados por voltaje presenta carga eléctrica neta. El segmento S4 tiene la propiedad única de presentar carga neta positiva debido a que presenta una secuencia consenso en la que dos aminoácidos neutros x separan a un aminoácido básico (R/K): R-x(2)-R-x(2)-[R/K] (*e.g.*, Bezanilla, 2000, 2005; Guda *et al.*, 2007). Se ha demostrado experimentalmente que en efecto, debido a sus residuos básicos cargados, S4 es el principal componente del sensor de voltaje (Bezanilla, 2000). Más aún, la comparación de la estructura primaria de canales iónicos muestra que la secuencia consenso de S4 constituye la secuencia característica de la superfamilia de canales activados por voltaje (Guda *et al.*, 2007). Aunque, funcionalmente se ha determinado que no todas las cargas de S4 participan en la respuesta al voltaje. Así por ejemplo, en Shaker, sólo las primeras cuatro cargas, yendo del lado externo hacia el citoplasma, contribuyen a la carga de *gating* (Q_g), mientras que las cargas restantes parecen tener solo un papel estructural (Chanda *et al.*, 2005 y referencias ahí citadas).

Como se mencionó antes, a comienzos de los años setenta del siglo pasado Clay Armstrong realizó una serie de observaciones fundacionales al estudiar el mecanismo de bloqueo del canal de K^+ del axon gigante por TEA y derivados de este compuesto. Armstrong (1971) concluyó, entre otras cosas, que: a) la llamada compuerta de activación de los canales (*i.e.*, el dominio responsable de la apertura y cierre del poro) se encontraba situada en el lado citoplásmico de la membrana y que, sorprendentemente, b) la porción intracelular del poro debía ser hidrofóbica. Estas conclusiones seminales fueron confirmadas

veinte años más tarde, cuando se obtuvieron las primeras imágenes cristalográficas del poro de un canal de K⁺ (figura 10).

La compuerta de activación de canales de K⁺ se encuentra formada por la porción C-terminal de los segmentos S6 (también llamados hélices internas o M2). En el estado cerrado, las cuatro hélices S6 de cada canal se encuentran en el citoplasma, cruzándose en su porción C-terminal, formando un haz que previene el flujo de iones en el estado cerrado (*i.e.*, formando la compuerta de activación). En Shaker, el cruce de las hélices se da en el segmento que va aproximadamente de la isoleucina 477 a la aspargina 482, dejando una apertura de ~4 Å en su parte central. Esta apertura es lo suficientemente amplia como para permitir el movimiento de iones K⁺, sin embargo al estar flanqueada por las cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos presenta un ambiente energéticamente desfavorable al paso de iones (Doyle *et al.*, 1998; Hackos *et al.*, 2002; Yellen *et al.*, 2002). Al abrirse esta constricción la cavidad central se vuelve continua con el citoplasma y los iones pueden fluir a través del filtro de selectividad. En esta condición se estima que ~80% de la caída del potencial eléctrico ocurre a través del filtro de selectividad (Jiang *et al.*, 2002).

El mecanismo por el cual el movimiento de S4 se acopla a la apertura y cierre del poro es un proceso que está a discusión, sin embargo mediante la comparación de la estructura cristalográfica de KcsA (probablemente cerrado e inactivado) con la del canal bacteriano activado por Ca⁺⁺ MthK (presumiblemente abierto) se ha propuesto que la apertura del poro se produce por el doblamiento, desplazamiento lateral, del C-terminal de S6, en un punto o zona flexible que actúa como bisagra molecular. Esta bisagra estaría constituida por una glicina

conservada (G99 en KcsA, G83 en MthK), o por la secuencia conservada PVP en Kvs de eucariontes (Long *et al.*, 2005). Sin embargo, cabe señalar que algunos datos funcionales contradicen este modelo de activación, por ejemplo, el rectificador entrante Kir1.1 puede abrirse y cerrarse, en respuesta a cambios de pH, cuando la glicina correspondiente a G99 de KcsA (G148 en Kir1.1) se reemplaza por alanina (Sackin *et al.*, 2006).

Resulta interesante señalar que cuando los canales Shaker se cierran sin K⁺ el movimiento del sensor de voltaje se desacopla de la apertura de la compuerta de activación (Gómez-Lagunas, 1997; Melischuk *et al.*, 1998). Lo anterior es un caso extremo de la interacción entre permeación y cambios conformacionales de los canales de K⁺ cuyo mecanismo y bases estructurales aún no se comprenden bien.

REFERENCIAS

1. Aldrich R., Fifty years of inactivation, *Nature* **411**, 643-644 (2001).
2. Almers W. y Armstrong C. M., Survival of K⁺ permeability and gating currents in squid axons perfused with K⁺-free media. *J. Gen. Physiol.* **75**, 61-78 (1980).
3. Allen, T. W. *et al.*, On the importance of atomic fluctuations, protein flexibility, and solvent in ion permeation. *J. Gen. Physiol.* **124**, 679-690 (2004).
4. Ambriz-Rivas M. *et al.*, K⁺-dependent stability and ion conduction of Shab K⁺ channels, a comparison with Shaker channels. *Pflügers Arch.* **450**, 55-261 (2005).
5. Andalib P. *et al.*, The external TEA binding site and C-type inactivation in voltage gated potassium channels. *Biophys J.* **87**, 3148-3161 (2004).
6. Armstrong C. M., Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channel of giant axons. *J. Gen. Physiol.* **58**, 413-437 (1971).

7. Armstrong C. M., Ionic pores, gates and gating currents, *Q. Rev. Biophys.* **7**, 179-210 (1975).
8. Armstrong C. M. y Bezanilla F., Inactivation of the sodium channel. II gating current experiments, *J. Gen. Physiol.* **70**, 567-590 (1977).
9. Bezanilla F. *et al.*, Distribution and kinetics of membrane dielectric polarization, I. Long term inactivation of gating currents. *J. Gen. Physiol.* **79**, 21-40 (1982).
10. Bezanilla F. *et al.*, Molecular basis of gating charge immobilization in Shaker potassium channels. *Science* **254**, 679-683 (1991).
11. Bezanilla F., The voltage sensor in voltage dependent ion channels, *Physiol. Revs.* **80**, 555-592 (2000).
12. Bezanilla F., The voltage sensor structure in a voltage-gated channel, *Trends. Biochem. Sci.* **30**, 166-168 (2005).
13. Caterall W. A., A 3D view of sodium channels, *Nature* **409**, 988-991 (2001).
14. Chanda B. *et al.*, Gating charge displacement in voltage gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* **436**, 852-856 (2005).
15. Choi K. L. *et al.*, Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ Channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5092-5 (1991).
16. Cordero-Morales, *et al.*, Voltage dependent gating at the KcsA selectivity filter, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 319-322 (2006).
17. Crouzy, S. *et al.*, Extracellular blockade of K⁺ channels by TEA, results from molecular dynamics simulations of the KcsA channel. *J. Gen. Physiol.* **118**, 207-217 (2001).
18. Doyle D. A. *et al.*, The structure of the potassium channel, molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77 (1998).
19. Gómez-Lagunas F. y Armstrong C. M., The relation between ion permeation and recovery from fast inactivation of Shaker B K⁺ channels. *Biophys. J.* **67**, 1806-1815 (1994).
20. Gómez-Lagunas F. y Armstrong C. M., Inactivation in Shaker B K⁺ channels, a test for the number of inactivating particles on each channel, *Biophys. J.* **68**, 89-95 (1995).
21. Gómez-Lagunas F., Shaker B K⁺ conductance in Na⁺ solutions lacking K⁺ ions, a remarkably stable nonconducting state produced by membrane depolarizations, *J. Physiol.* **499**, 3-15 (1997).
22. Gómez-Lagunas F., Na⁺ interaction with the pore of Shaker B K⁺ channels, zero and low K⁺ conditions, *J. Gen. Physiol.* **118**, 639-648 (2001).
23. Gómez-Lagunas F., Stability of the Shaker K⁺ channel conductance in 0 K⁺ solutions, the role of the membrane potential, *Biophys. J.* **93**, 4197-208 (2007).
24. Guda P. *et al.*, Conserved motifs in voltage-sensing and pore-forming modules of voltage-gated ion channels, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **352**, 292-298 (2007).
25. Hackos *et al.*, Scanning the intracellular S6 activation gate in the Shaker K⁺ channel, *J. Gen. Physiol.* **119**, 521-531 (2002).
26. Heginbotham L. y Mackinnon R., The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels, *Neuron.* **8**, 483-491 (1992).
27. Heginbotham L. *et al.*, Mutations in the K⁺ channel signature sequence, *Biophys. J.* **66**, 1061-1067 (1994).
28. Heinemann *et al.*, Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations, *Nature* **356**, 441-443 (1992).
29. Hodgkin A. L. y Huxley A. F., A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol.* **117**, 500-544 (1952).
30. Hoshi T. *et al.*, Biophysical and molecular mechanism of Shaker potassium channel inactivation, *Science* **250**, 533-538 (1990).
31. Hoshi T. *et al.*, Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels, Effects of alterations in the carboxy-terminal region, *Neuron.* **7**, 547-556 (1991).
32. Jiang Y. *et al.*, The open pore conformation of potassium channels, *Nature* **417**, 523-526 (2002).
33. Klemic K. G. *et al.*, Inactivation of Kv2.1 potassium channels, *Biophys. J.* **74**, 1779-1789 (1998).
34. Kobertz W. R. *et al.*, Hanging gondola structure of the T1 domain in a voltage gated K channel, *Biochemistry* **39**, 10347-10352 (2000).
35. Koshland D. E., The role of flexibility in enzyme action, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* **28**, 473-482 (1963).
36. Levy D. I. y Deutsch C., Recovery from C-type inactivation is modulated by extracellular potassium, *Biophys. J.* **70**, 798-805 (1996).
37. Li M. *et al.*, Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel, *Science* **257**, 1225-1230 (1992).
38. Liu, Y., Jurman, M. E. y Yellen G., Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating, *Neuron.* **16**, 859-867 (1996).

39. Long S. B., Campbell E. B. y MacKinnon R., Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel, *Science* **309**, 897-903 (2005).
40. López-Barneo J. *et al.*, Effects of External cations and Mutations in the pore region on C-Type inactivation of Shaker potassium Channels, *Receptors and channels* **1**, 61-71 (1993).
41. MacKinnon R. y Yellen G., Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage activated K⁺ channels, *Science* **250**, 276-279 (1990).
42. MacKinnon R., Determination of subunit stoichiometry of a voltage activated potassium channel, *Nature* **353**, 752-756 (1991).
43. Matteson D. R. y Swenson R. P., External monovalent cations that impede the closing of K channels. *J.Gen.Physiol.* **87**, 795-816 (1986).
44. Melishchuk A *et al.*, Loss of Shaker K channel conductance in 0 K⁺ solutions, role of the voltage sensor, *Biophys. J.* **75**, 1828-1835 (1998).
45. Miller C., The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides, *Neuron*. **15**, 5-10 (1995).
46. Molina A. *et al.*, Pore mutations in Shaker K⁺ channels distinguish between the sites of tetraethylammonium blockade and C-type inactivation, *J. Physiol.* **499**, 361-367 (1997).
47. Noda *et al.*, Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequences, *Nature* **312**, 121-127 (1984).
48. Noskov S. Y. y Roux B., Ion selectivity in potassium channels, *Biophysical Chemistry* **124**, 279-291 (2006).
49. Ogielska E. M. y Aldrich R., A mutation in S6 of Shaker potassium channels decreases the K⁺ affinity of an ion binding site revealing ion-ion interactions in the pore, *J. Gen. Physiol.* **112**, 243-257 (1998).
50. Ogielska E. M. y Aldrich R., Functional consequences of a decreased potassium affinity in a potassium channel pore. Ion interactions and C-type inactivation. *J. Gen. Physiol.* **113**, 347-358 (1999).
51. Olcese R *et al.*, Correlation between charge movement and ionic current during show inactivation in Shaker K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **110**, 579-589 (1997).
52. Pongs *et al.*, Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of Drosophila. *EMBO J.* **7**, 1087-1096 (1988).
53. Pongs O., Molecular biology of voltage-dependent potassium channels, *Physiological Revs.* **72**, S69-S86 (1992).
54. Roosli T. P. *et al.*, Cytoplasmic gatekeepers of K⁺ channel flux, a structural perspective, *Trends Biochem. Sci.* **29**, 39-44 (2004).
55. Sackin H. *et al.*, Role of conserved glycines in pH gating of Kir1.1 (ROMK), *Biophys. J.* **90**, 3582-3589 (2006).
56. Segel I. H., *Enzyme kinetics*, John Wiley & Sons Inc., 945pp (1993).
57. Wei *et al.*, K⁺ current diversity is produced by an extended family conserved in Drosophila and mouse, *Science* **248**, 599-603 (1990).
58. Wei A., Jegla T. y Salkoff L., Eight potassium channel families revealed by the C. elegans genome project, *Neuropharmacology* **35**, 805-829 (1996).
59. West Y. *et al.*, A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺ channel inactivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10910-10914 (1992).
60. Yellen, G. *et al.*, Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel, *Science* **251**, 939-942 (1991).
61. Yellen G., The voltage gated potassium channels and their relatives, *Nature* **419**, 35-42 (2002).
62. Zagotta W. N. *et al.*, Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB, *Science* **250**, 568-571 (1990).
63. Zhu Y. y Ikeda S. R., Anomalous permeation of Na⁺ through a putative K⁺ channel in rat superior cervical ganglion neurons, *J. Physiol.* **468**, 441-461 (1993).
64. Zhou M *et al.*, Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors, *Nature* **411**, 657-661 (2001).
65. Zhou M. *et al.*, Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2 Å resolution, *Nature* **414**, 43-48 (2001).

Capítulo 16 TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LOS CANALES IÓNICOS EN MEMBRANAS BIOLÓGICAS

¹RAFAEL GODÍNEZ FERNÁNDEZ* y ²ROBERTO ÁVILA POZOS**

¹*Departamento de Ingeniería Eléctrica
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*

²*Área Académica de Matemáticas
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*

1. PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LAS CÉLULAS

El avance en el estudio de las propiedades eléctricas de los tejidos excitables tales como el nervioso, muscular, etc., ha estado íntimamente relacionado con el desarrollo de nuevas herramientas de instrumentación y procesamiento de las señales bioeléctricas. Inició con el empleo de electrodos extracelulares; esto es, colocando los electrodos de registro fuera de las células. Con esta técnica se obtuvieron avances importantes sobre la actividad eléctrica asociada a la función de los diferentes tejidos excitables, empleándose incluso algunos de estos resultados con fines de diagnóstico de patologías como es el caso de la electrocardiografía y la electroencefalografía. Por este motivo, la técnica de registro extracelular aún se emplea y es tema de investigación actual.

*gfr@xanum.uam.mx ** ravila@uaeh.edu.mx

Sin embargo, para conocer los mecanismos íntimos por los cuales los tejidos excitables generan su actividad eléctrica, fue indispensable estudiarlos a nivel celular con el empleo de microelectrodos. Inicialmente se desarrolló la técnica de registro intracelular, que consiste en la introducción de un microelectrodo a una célula para medir su potencial de membrana. El siguiente gran avance, fue el diseño de la técnica de fijación del voltaje la cual ha desempeñado un papel vital en el estudio de las propiedades eléctricas de las células excitables, ya que permite estudiar los canales iónicos de la membrana celular que dan origen a la actividad eléctrica.

Con un historial de más de cincuenta años, las técnicas de registro de señales eléctricas a nivel celular aunadas a la técnicas de adquisición y procesamiento de señales, constituyen herramientas fundamentales que han permitido comprender los mecanismos moleculares que dan origen a la actividad eléctrica tanto en tejidos normales, como en aquellos que sufren de algún estado patológico.

Los canales iónicos normalmente se encuentran cerrados impidiendo el paso de iones y se abren al modificar las células su potencial de membrana. Por la dependencia del potencial de membrana para su apertura, se les denomina canales voltaje dependientes. Estos canales han sido objeto de intenso estudio por varias décadas; estudios iniciales realizados por biofísicos mostraron el papel fundamental que desempeñan en el funcionamiento de los tejidos excitables tales como el tejido nervioso, muscular y glandular. Actualmente, el estudio de los canales iónicos es realizado por investigadores de otras disciplinas como son farmacólogos, toxicólogos, biólogos moleculares, neurocientíficos, bioquímicos, etcétera. Prácticamente todos ellos estudian los canales iónicos empleando la técnica de fijación del voltaje (*Patch-clamp*)

para el análisis de los eventos eléctricos a nivel celular y molecular.

En este capítulo se presenta una visión general de las técnicas experimentales y de análisis comúnmente empleadas en el estudio de las señales eléctricas a nivel celular. Asimismo, se da una descripción de los principios del funcionamiento de los sistemas de registro intracelular y de fijación del voltaje. Para la descripción de las técnicas de medición y de análisis de las señales eléctricas de las células se utilizó como ejemplo a las neuronas.

Por ser un tema interdisciplinario es indispensable abordar conceptos de otras disciplinas como la física, bioquímica, ingeniería y la biología. Esperamos que con un poco de esfuerzo el contenido completo del texto sea claro para el lector que pretende conocer la electrofisiología a nivel celular. Sin embargo, si algunas secciones se complican, el lector puede saltarlas y abordar únicamente las secciones de su interés.

2. EL POTENCIAL DE MEMBRANA Y SU GÉNESIS

Antes de iniciar la descripción de las diferentes técnicas de registro a nivel celular, es indispensable repasar algunas características de las membranas biológicas.

Las células presentan una membrana plasmática que aísla el medio intracelular del extracelular; sin embargo, las células necesitan intercambiar materia con su entorno, ya sea para la eliminación de desechos, producto de su metabolismo, o bien, para el ingreso de nutrimentos. Para llevar a cabo esta doble función, la de aislar sus componentes internos y permitir el intercambio selectivo y controlado de materia con su entorno, las membranas celulares presentan componentes estructurales característicos como son: una *bicapa lipídica* y *proteínas*.

La bicapa lipídica impide el paso de sustancias, átomos o moléculas, que presentan una carga eléctrica neta como es el caso de los iones; únicamente las sustancias hidrófobas o liposolubles pueden atravesar la membrana celular. Para el paso de átomos o moléculas con carga neta, algunas proteínas de la membrana celular actúan como *acarreadores* o transportadores pasando iones de un lado al otro de la membrana plasmática; por ejemplo, existen acarreadores para el paso de glucosa, aminoácidos, iones de sodio, iones de potasio, etc. Existe otro grupo de proteínas que permiten el paso de iones como el sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{++}), cloro (Cl^-) y protones (H^+) a los que se denomina *canales iónicos*. Generalmente, los acarreadores requieren de una fuente energética para el movimiento de los iones contra un gradiente electroquímico. Por el contrario, el movimiento de iones a través de los canales iónicos siempre sucede por un proceso de difusión siguiendo el gradiente electroquímico de cada especie iónica.

Las células pueden dividirse, desde el punto de vista eléctrico, como excitables y no excitables. Las células excitables presentan una diferencia de potencial a través de la membrana celular que se conoce con el nombre de *potencial de membrana* (V_m). Al potencial de membrana que exhiben las células excitables cuando no generan actividad eléctrica se le llama *potencial de reposo* (V_r).

Las células excitables, a diferencia de las no excitables, generan actividad eléctrica ante un estímulo adecuado modificando bruscamente su potencial de membrana (a partir del potencial de reposo) en forma de espigas; a estos cambios del potencial de membrana se les denomina *potenciales de acción*.

El potencial de reposo y el potencial de acción son producto de la apertura de diferentes poblaciones de canales iónicos localizados en la membrana celular.

Existe una diversidad de tejidos excitables cuyas células son capaces de generar potenciales de acción como son el tejido nervioso; los tejidos musculares liso, cardíaco y esquelético. El sistema glandular también cuenta con células capaces de generar potenciales de acción como es el caso de las células beta del páncreas que liberan insulina. Cada uno de estos tipos celulares presenta potenciales de acción diferentes y son característicos del tipo celular. La actividad eléctrica en las células excitables induce y regula las respuestas celulares, por ejemplo, en las fibras musculares induce la respuesta contráctil, en las células glandulares promueve la liberación de hormonas. La recepción y procesamiento de la información llevada a cabo por el sistema nervioso así como las respuestas de éste, son posibles gracias a la actividad eléctrica de las neuronas.

Por otro lado, las células no excitables no presentan actividad eléctrica en forma de potenciales de acción; sin embargo, sí presentan un potencial de reposo. En algunos tipos de células no excitables se encontraron canales iónicos semejantes a los observados en las células excitables, el hallazgo fue una sorpresa ya que su presencia no parecía jugar un papel fisiológico (a diferencia de las células excitables). En ese caso se encontraron las células del sistema inmune como los macrófagos, los linfocitos T y los linfocitos B por citar algunos ejemplos. En la actualidad, sabemos que los canales iónicos juegan un papel fundamental en la respuesta inmune, iniciando y modulando la activación linfocitaria.

Para la obtención de los datos descritos, ha sido crítico el diseño de la técnica de instrumentación, que incluye el diseño del amplificador así como el de los microelectrodos que permitieran adquirir las señales eléctricas del interior celular. Debido al tamaño de las células, que en

la mayoría de los casos es de unas cuantas micras, el diseño de la técnica de instrumentación requiere de cuidados especiales que se discutirán a continuación.

3. TÉCNICA DE REGISTRO INTRACELULAR

La técnica de registro intracelular se emplea en la medición del potencial de membrana de las células. Consiste en la inserción de un microelectrodo (o micropipeta) de punta muy fina en el citoplasma de la célula para la obtención de la señal de voltaje.

En la figura 1 se muestra un esquema general de la técnica. El microelectrodo (Mic) se encuentra conectado al amplificador A cuya salida es la señal de voltaje V que mide. La solución fisiológica S_f que baña a la célula C se encuentra conectada a tierra, esto es, a un voltaje cero mV. Cuando se sumerge la punta del microelectrodo a la solución, el voltaje de salida del amplificador será de cero ($V = 0$ mV), como se ilustra al inicio del trazo de la derecha. Sin embargo, cuando avanzamos la punta del microelectrodo hacia la célula y la perforamos al tiempo t_0 , el voltaje a la salida del amplificador es un valor negativo en el rango de los mV. El voltaje medido en la mayoría de las células fluctúa entre -40 y -90 mV. Este voltaje de DC que presentan las células se denomina potencial de reposo (V_r).

La técnica de registro intracelular no sólo permite medir el potencial de membrana, sino además, inyectar corriente a la célula para inducir cambios en el potencial de membrana. La inyección de corriente a las células es importante ya que nos permite conocer algunas de las características eléctricas de las células, como son la resistencia de la membrana, si es una célula excitable que dispara potenciales de acción, etcétera.

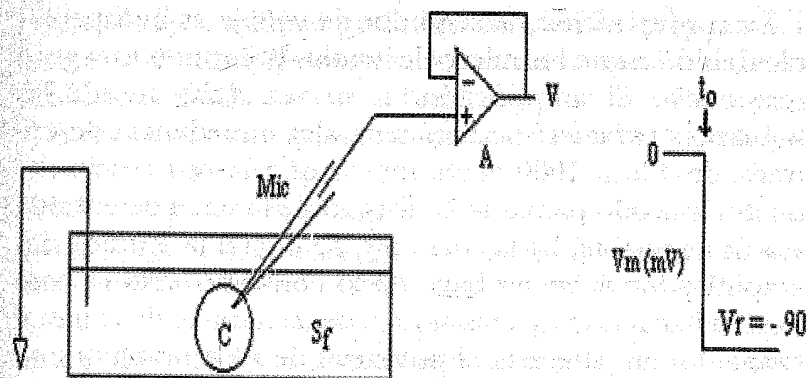


Figura 1. Esquema general de la técnica de registro intracelular. El microelectrodo Mic se introduce en la célula C para medir el potencial de membrana. El microelectrodo contiene una solución de cloruro de potasio para mantener la continuidad eléctrica entre el interior celular y el seguidor de voltaje (A). La solución fisiológica S_f donde se encuentra la célula se mantiene a tierra. A la derecha se muestra el potencial antes de implantar el microelectrodo ($V = 0$ mV) y al penetrar la célula en t_0 (indicado por la flecha), observándose un potencial de DC de $V = -90$ mV, el cual corresponde al potencial de reposo V_r .

3.1. Instrumentación

3.1.1. El seguidor de voltaje

La esencia de esta técnica es la conexión de un microelectrodo a un amplificador de ganancia unitaria que tiene una resistencia de entrada muchos órdenes de magnitud mayor que la resistencia del microelectrodo y la resistencia de entrada de la célula (figura 2). La salida del amplificador sigue el voltaje en la punta del electrodo. El amplificador ideal no presenta corriente de bias que se fuguen hacia la célula alterando su potencial de membrana.

La configuración de seguidor de voltaje es indispensable debido a que los microelectrodos presentan una gran resistencia. El amplificador a su vez debe reunir las siguientes características: a) una alta impedancia de entrada de 100 a 1000 veces mayor que la resistencia del microelectrodo para que la división de la señal de entrada sea despreciable, b) la corriente de fuga a la entrada del amplificador debe ser baja, de lo contrario, ésta es conducida hacia la célula pasando a tierra a través de la membrana, lo que alteraría el potencial de membrana que se pretende medir y c) tiempo de respuesta adecuado.

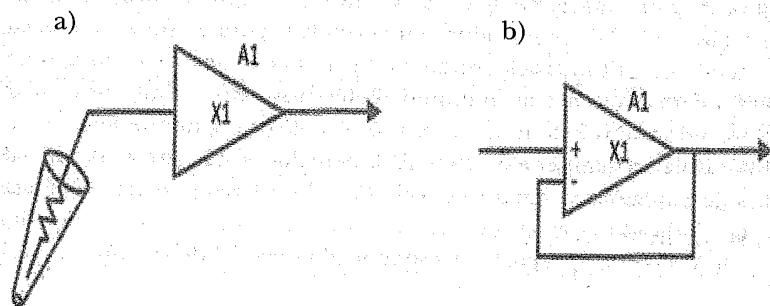


Figura 2. a) El amplificador A1 representa en forma esquemática una etapa de amplificación de ganancia uno. b) El amplificador A1 se dispone de esta manera para lograr una retroalimentación con ganancia unitaria y alta impedancia de entrada.

3.1.2. La etapa de inyección de corriente

Una de las ventajas de la técnica de registro intracelular, es la posibilidad de inyectar corriente a la célula para modificar su potencial de membrana. Existen dos procedimientos de inyección de corriente: en un caso, se utiliza un segundo microelectrodo para aplicar la corriente; en el otro, la corriente se inyecta por el mismo micro-

electrodo que mide el potencial de membrana y por ser éste el método más empleado, se comentarán algunos problemas asociados y su solución.

Si un circuito de inyección de corriente de alta calidad se conecta en el nodo de entrada, toda la corriente inyectada fluye por el microelectrodo hacia el interior de la célula (figura 3). La fuente de corriente puede usarse para inyectar pulsos de corriente que estimulen a la célula o una corriente constante para despolarizar o hiperpolarizar a la célula, o puede inyectar una forma de onda variable que el usuario introduce por la entrada de control de la fuente de corriente.

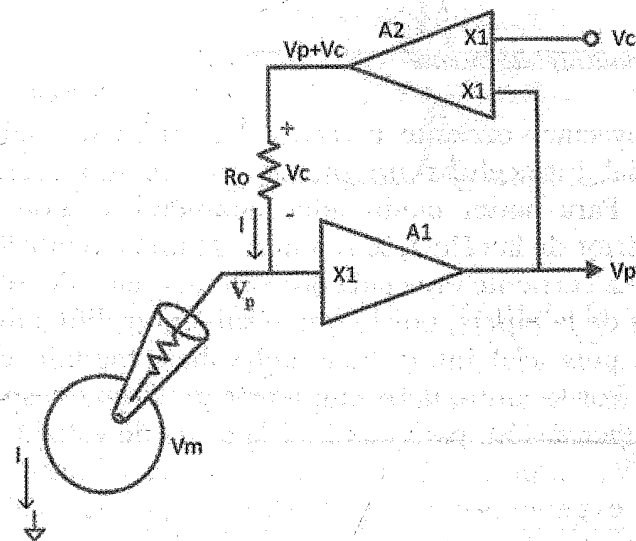


Figura 3. Se puede construir una fuente de corriente al agregar un segundo amplificador. Las entradas al amplificador A2 son el voltaje comando V_c y el voltaje de la pipeta V_p . El voltaje a través del resistor de salida R_o es $V_p + V_c - V_p = V_c$. Entonces la corriente a través de R_o es $i = V_c/R_o$. En el caso ideal, toda esta corriente fluye a través de la pipeta al interior de la célula.

Normalmente a las células se le aplican pulsos comando rectangulares de corriente. Como se emplean amplificadores de alta impedancia de entrada en la configuración de seguidor de voltaje, prácticamente toda la corriente i pasa a la célula a través del microelectrodo siendo despreciable la corriente que se fuga hacia el amplificador. Sin embargo, hay un problema, cuando la corriente i pasa a través del microelectrodo se produce un voltaje V_p que se suma al potencial de membrana V_m . La salida del amplificador AI entonces es la suma $V_m + V_p$, por lo que, para eliminar el potencial V_p se utiliza un diseño conocido como circuito de balance puente.

3.1.3. Balance del puente

Al inyectar corriente a través del microelectrodo el potencial intracelular no puede ser medido correctamente. Para poder medir adecuadamente el potencial del interior de la célula, se requiere de una circuitería especial. La corriente inyectada provoca una caída del voltaje a través de la pipeta, por lo que resulta muy difícil distinguir el potencial intracelular del voltaje medido en la pipeta. Por lo tanto, debe emplearse un circuito especial de compensación, para eliminar la caída de voltaje de la pipeta V_p del potencial registrado. La idea básica de esta técnica es generar una señal que sea proporcional al producto de la corriente y la resistencia de la micropipeta ($V_p = i \cdot R_p$). Entonces, esta señal se resta de la salida del amplificador (figura 4). Esta técnica de sustracción es conocida comúnmente como "balance del puente", porque en los inicios del registro con micropipetas, se usaba un circuito resistivo, conocido como "Puente de Wheatstone", para lograr la sustracción de la caída del voltaje.

En los amplificadores modernos, se emplean circuitos con amplificadores operacionales para generar la sustracción, pero la técnica se sigue llamando "balance del puente".

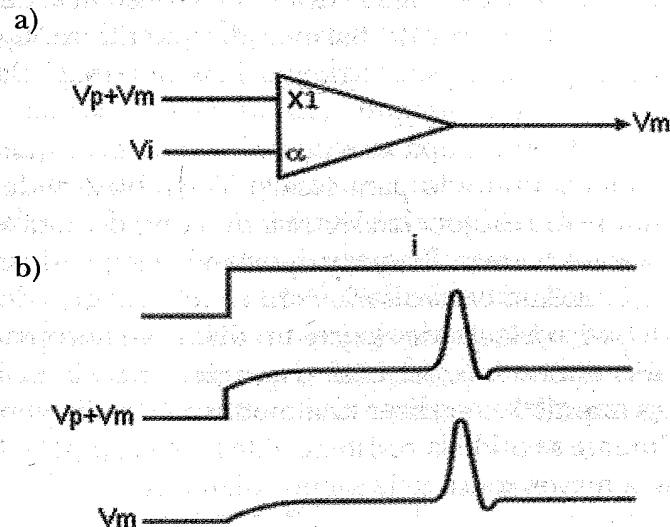


Figura 4. La técnica de balance del puente. Esta técnica es usada para sustraer el potencial de la micropipeta V_p del potencial total registrado para obtener únicamente el potencial de membrana V_m . Una representación esquemática de la técnica se presenta en la parte a) de la figura. Se utiliza un amplificador diferencial para restar un voltaje V_i al voltaje de la membrana V_m y el voltaje de la pipeta V_p . La señal de voltaje V_i es un voltaje escalado del voltaje comando (V_c , figura 3) utilizado para producir la corriente de estimulación i . El voltaje V_i se escala hasta obtener a la salida del amplificado sólo V_m . Los trazos de la parte b) muestran la operación del circuito puente. Si se aplican pulsos de corriente, se presenta un escalón de voltaje en la pipeta, debido a la caída de voltaje lineal en la pipeta; después se presenta el cambio en el potencial debido al voltaje de la membrana. El amplificador del puente remueve ese escalón de voltaje, dejando únicamente la contribución del potencial de la membrana V_m .

Existen diversas maneras de lograr el balance del puente. Una forma utilizada comúnmente es aplicar breves pulsos de corriente a la pipeta, de manera repetida, mientras está sumergida en el baño. Aquí el potencial medido se debe a la caída de voltaje a través de la resistencia de la pipeta (V_p). El control de balance del puente se logra hasta hacer $V_p = 0$. En ese momento el circuito está balanceado.

El diseño de esta etapa se realiza de tal manera que el potenciómetro utilizado para escalar V_i también mide la magnitud de la resistencia eléctrica de la pipeta una vez balanceado el puente. Esto es importante, ya que durante un experimento es necesario conocer el diámetro de la punta del microelectrodo. Existe un diámetro apropiado para cada tipo celular el cual depende de su tamaño. Como es impráctico realizar una medición del diámetro, normalmente se mide la resistencia de la micropipeta. En general, a mayor resistencia menor diámetro.

3.1.4. Monitor de corriente

Los equipos incluyen una salida para monitorear la señal de corriente que se aplica. En algunos amplificadores, la salida del monitor sólo es una versión escalada del voltaje comando V_c (figura 3) utilizado para producir la corriente i . Si la resistencia de la micropipeta no es muy grande y la salida del circuito no excede su rango de operación lineal, esta técnica es exacta. Sin embargo, si la resistencia de la micropipeta es muy grande y el amplificador se satura, la corriente a través de la micropipeta será menor que la esperada. Esta salida para monitorear la corriente no indicará la falla. Una alternativa es medirla al monitorear la caída del voltaje a través de un resistor R_o ,

en serie con la micropipeta (figura 5). Esta caída de voltaje es proporcional a la corriente total I , que fluye a través de R_o .

Otra manera de medir la corriente de la membrana es utilizar un circuito separado conocido como "tierra virtual". En lugar de conectar el electrodo del baño directamente a la tierra, se conecta a la tierra virtual formada en la entrada negativa del amplificador operacional A3 (figura 6). En esta configuración, la entrada inversora del amplificador operacional se conoce como tierra virtual, porque el comportamiento del amplificador operacional mantiene la entrada inversora al mismo potencial que se encuentra en la entrada no inversora. Para lograr este objetivo, el amplificador operacional debe inyectar desde la salida una corriente que pasará a través del resistor de retroalimentación. Esta corriente debe ser igual y de

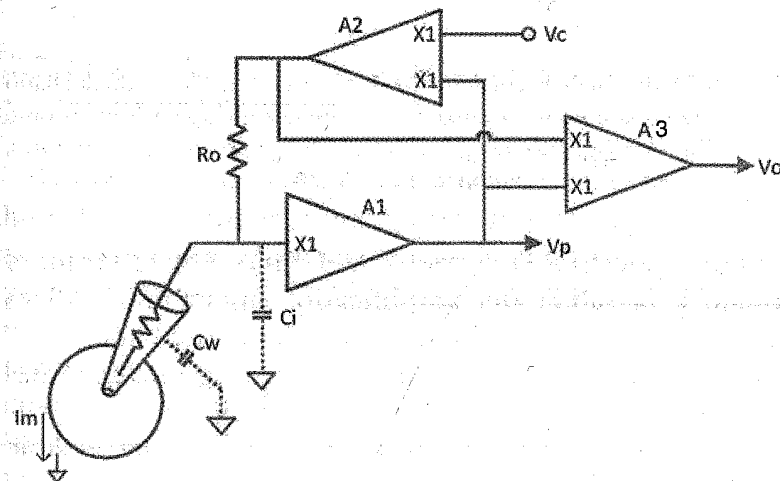


Figura 5. Medición de la corriente en serie. El amplificador A3 mide la diferencia del potencial a través del resistor R_o y la corriente es igual a $I = V_o/R_o$.

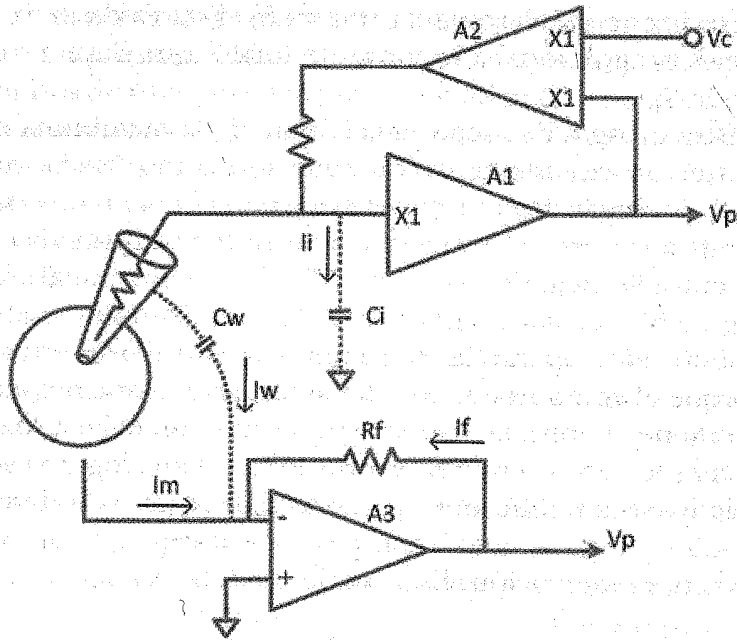


Figura 6. Medición de la corriente en tierra virtual. El electrodo del baño se conecta en la entrada inversora del amplificador operacional. Como $I_R = V_p/R_R$ y la magnitud de I_m es igual a la de I_R pero de signo contrario, entonces $I_m = -V_p/R_f$.

sentido opuesto a la corriente del baño. Por lo tanto, el voltaje a la salida del amplificador operacional A3 es directamente proporcional a la corriente del baño.

Esta técnica de tierra virtual presenta algunos inconvenientes:

1. La carga de entrada a la tierra virtual es muy sensible a la frecuencia de la línea y a otras interferencias.
2. Resulta muy difícil usar dos microelectrodos con dos amplificadores en la misma preparación si uno o ambos usan un circuito de medición de corriente con tierra virtual. Si uno de los amplificadores usa una tierra virtual, el

microelectrodo que mide la corriente tendrá dificultad para identificar la corriente de la membrana, porque el monitor de corriente mide la suma de las corrientes debidas a todas las fuentes. Si los dos microelectrodos están en la configuración de tierra virtual, habrá una gran corriente de DC fluyendo entre los circuitos de tierra virtual, debida a la pequeña diferencia en los voltajes de offset entre los dos circuitos.

3. El amplificador de tierra virtual implica una circuitería adicional que debe ser montada en la sonda.

Sin embargo, la técnica de tierra virtual es usada en ciertas circunstancias, por ejemplo, con amplificadores de fijación de alto voltaje (con dos electrodos), pues en este caso hay dificultades técnicas para que el circuito que mide la corriente en serie opere adecuadamente en altos voltajes.

3.2. Efecto de las capacitancias parásitas en la técnica de registro intracelular

Los potenciales de acción son rápidos en la mayoría de las células ya que tienen una duración de algunos milisegundos; sin embargo, la técnica de registro intracelular presenta algunas desventajas técnicas que impiden observar en detalle los componentes de mayor frecuencia de los potenciales de acción. Esto es debido a la presencia de capacitancias parásitas (figuras 5 y 6) que actúan como un filtro pasa bajas. El diseño de un buen sistema de registro intracelular requiere de un sistema que compense el efecto de estas capacitancias, por lo que se describirá el origen de éstas y posteriormente la solución al problema.

El material con el cual se fabrican los microelectrodos se comporta como un dieléctrico y las soluciones electro-

líticas tanto del interior del microelectrodo (KCl a una concentración de 3 M), como la que baña la célula (solución fisiológica) son conductoras; el resultado conductor-dieléctrico-conductor genera capacitancias parásitas como se aprecian en las figuras 6 y 7. Además, a la entrada de los amplificadores también existe una capacitancia C_a .

Otro problema es la gran resistencia de los microelectrodos (R_{Me} en la figura 7), la cual fluctúa entre los 10 y 100 M Ω , cuando la punta se hace más fina incrementa ya que ofrece una mayor resistencia al flujo de iones K^+

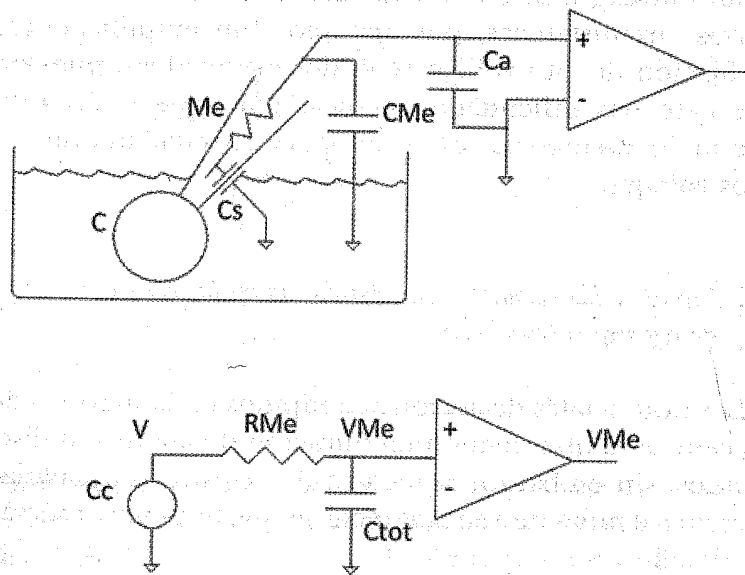


Figura 7. Capacitancias parásitas y resistencia de los microelectrodos utilizados para el registro intracelular (Me = microelectrodo, C_s = capacitancia de la porción sumergida, C_{Me} = capacitancia de la porción fuera de la solución, C_a = capacitancia de entrada del amplificador y C = célula). En el circuito eléctrico equivalente del diagrama inferior se muestran: V = potencial de membrana, R_{Me} = resistencia del microelectrodo, V_{Me} = potencial observado por el instrumento y C_{tot} = capacitancia total equivalente.

y Cl^- que son los responsables de la continuidad eléctrica entre el interior celular y el seguidor de voltaje. Las puntas más finas (de mayor resistencia) se utilizan en células de menor diámetro para evitar lesionarlas al insertar el microelectrodo.

En la misma figura 7, el circuito eléctrico equivalente es un filtro pasa bajas por lo que se obtiene un potencial V_{Me} a la salida del seguidor de voltaje que es diferente al potencial de membrana V cuando se generan señales rápidas como es el caso de los potenciales de acción. La constante de tiempo del circuito equivalente está dada por $\tau = R_{Me} \times C_{tot}$ y el tiempo que transcurre hasta el máximo de la señal de salida es $t_p = 2.2 \times \tau$. Suponiendo que $C_{tot} = 10$ pF y $R_{Me} = 50$ M Ω , entonces $\tau = 0.5$ ms y $t_p > 1$ ms. Para una medición precisa de la señal de entrada, $t_p < t_{max}/5$, donde t_{max} es el tiempo al pico de la señal de entrada. Si no se cumple esta condición, el equipo electrónico distorsionará las señales de los potenciales de acción y de los potenciales sinápticos rápidos, los cuales normalmente presentan un tiempo al pico menor a 5 ms. La diferencia entre V y V_{Me} es mayor cuando se registra en células pequeñas donde la resistencia de los microelectrodos puede ser de unos 100 M Ω .

3.3. Solución a los problemas ocasionados por las capacitancias parásitas

Para disminuir el valor de τ y, a su vez, la diferencia entre el potencial de membrana real V y el voltaje a la salida del seguidor de voltaje V_{Me} para altas frecuencias, se utilizan microelectrodos con una resistencia R_{Me} lo más pequeña posible pero que no dañen la célula. También se disminuyen las capacitancias parásitas de la siguiente manera:

a) disminuyendo C_s al bajar lo más posible el nivel de la solución fisiológica que baña la célula, b) aumentando el espesor de la pared del microelectrodo cubriéndolo con una resina como Sylgard y c) el seguidor de voltaje se coloca lo más cercano posible a la preparación biológica para evitar que aumente la capacitancia parásita que se produce en el cable que une eléctricamente al microelectrodo y al seguidor de voltaje.

Existe una manera complementaria de disminuir los efectos de las capacitancias parásitas sobre las señales de entrada. Consiste en usar un circuito de realimentación conocido como capacitancia negativa como el diagrama de bloques que se muestra en la figura 8, el que está constituido por un amplificador A2 y un capacitor C_f . El amplificador A2 es de ganancia variable y amplifica la señal del seguidor de voltaje V_p por un factor A_p . La salida de A2 se conecta al capacitor C_f y éste a su vez a la entrada del seguidor de voltaje.

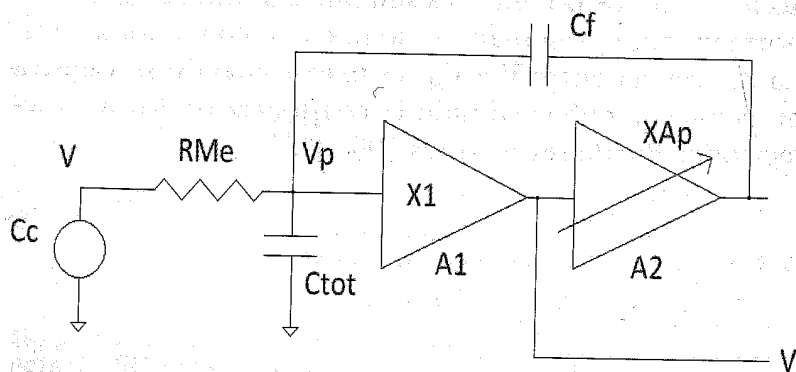


Figura 8. Circuito de compensación de capacitancias parásitas. Diagrama de bloques del circuito de registro intracelular que ilustra el circuito de capacitancia negativa. Éste está formado por el amplificador A2, de ganancia variable A_p y por el capacitor C_f . A1 representa al seguidor de voltaje. V_p indica el potencial medio con el microelectrodo o pipeta.

El potencial a través de C_f es

$$V_p \cdot A_p - V_p = V_p \cdot (A_p - 1). \quad (1)$$

Cuando el potencial de membrana V cambia con el tiempo, V_p varía en la misma forma produciendo una corriente capacitiva en C_f cuya magnitud está dada por la siguiente expresión

$$I_{C_f} = C_f \cdot \left(\frac{\delta V_p}{\delta t} \right) \cdot (A_p - 1). \quad (2)$$

Simultáneamente, se produce una pérdida de corriente capacitiva a tierra a través de la capacitancia parásita C_{tot} , cuya magnitud es

$$I_{C_{tot}} = C_{tot} \cdot \left(\frac{\delta V_p}{\delta t} \right). \quad (3)$$

La compensación se realiza cuando la ganancia del amplificador A2 se ajusta de tal manera que $I_{C_f} = I_{C_{tot}}$ y la corriente $I_{C_{tot}}$ que se fuga a través de C_{tot} se compensa con la corriente C_f . En otras palabras, la ganancia del amplificador A2 se ajusta hasta que se cumple la relación (igualando las ecuaciones 2 y 3)

$$C_f \cdot (A_p - 1) = C_{tot}. \quad (4)$$

La adecuada eliminación de los efectos de las capacitancias parásitas, depende tanto de la compensación

electrónica como de los procedimientos experimentales ya señalados.

3.4. Microelectrodos intracelulares

La interfase entre la célula y el equipo electrónico se lleva a cabo por medio de microelectrodos. Existen microelectrodos de diferentes materiales pero en la actualidad prácticamente sólo se utilizan los de vidrio: micropipetas que posteriormente se llenan con una solución electrolítica. El vidrio utilizado para las micropipetas es de dos tipos: borosilicato y silicato de aluminio. Para la fabricación de las micropipetas se utiliza un estirador o *puller*, el cual es un instrumento que aplica tensión a los extremos de un capilar y en la parte central de éste se aplica calor. La acción simultánea de la tensión y el calor parte en dos al capilar en la porción central creando dos micropipetas de punta muy fina. Existen dos tipos de estiradores: el vertical y el horizontal. En el estirador vertical se coloca el capilar verticalmente sujetado por sus extremos, y sólo se puede controlar el calor y la tensión del extremo inferior del capilar. En el estirador horizontal el capilar se coloca horizontalmente y la tensión se ejerce por ambos extremos del capilar; además se controlan la velocidad y el tiempo de estiramiento, al mismo tiempo que se inyecta aire para un control más fino de la temperatura.

El ajuste de los parámetros de estiramiento en los equipos de tipo vertical es analógico y más complicado. En los de tipo horizontal los parámetros de ajuste son digitales y pueden almacenarse, facilitando la fabricación de una gran diversidad de micropipetas. Es necesario conocer el diámetro de la punta de un microelectrodo de registro

intracelular para determinar qué tan fina es. En la práctica esto es difícil ya que se requiere un microscopio electrónico; en su lugar, se mide la resistencia de los microelectrodos ya que existe una relación inversamente proporcional entre esta variable y el diámetro (a menor diámetro mayor resistencia). La resistencia máxima que puede obtenerse con el estirador vertical fluctúa entre los 40 y 50 M Ω . Las micropipetas con resistencias menores a 50 M Ω no son muy convenientes para las células de diámetro pequeño, ya que sus puntas no son tan finas como las de resistencias mayores y frecuentemente las lesionan. Por tal razón es recomendable utilizar un estirador horizontal, el cual puede producir micropipetas de punta muy fina con resistencias mayores a los 300 M Ω . Cuando se estiran los capilares de silicato de aluminio sus paredes se hacen más delgadas con respecto a su diámetro externo, mientras que los de borosilicato mantienen una relación constante entre el diámetro y el espesor de las paredes. Debido a esto, se utilizan más los capilares de borosilicato cuando se desea obtener micropipetas muy finas y rígidas. Esto último es importante para facilitar la penetración en la célula.

El llenado de los microelectrodos con la solución electrolítica se realiza con una cánula muy fina la cual se introduce en el extremo de mayor diámetro de la micropipeta. La solución se inyecta por presión a través de una jeringa. La cánula no llega hasta la punta de la micropipeta pero la solución llena la punta por capilaridad debido al filamento interno que presentan los capilares. La solución electrolítica que comúnmente se utiliza para llenar los microelectrodos es cloruro de potasio (KCl) a una concentración de 3 M.

3.4.1. Potenciales de unión

Hay otro elemento que debe evitarse cuando se desea medir el potencial de la membrana: los potenciales de unión. Los potenciales de unión ocurren cuando dos conductores distintos están en contacto. Los potenciales de unión más grandes se presentan en las uniones entre líquido y metal, formadas donde el alambre de entrada al amplificador está en contacto con el electrolito en la micropipeta y en la unión líquido-líquido formada por la solución que baña la célula y la punta de la micropipeta. La suma de todos los potenciales de unión puede eliminarse introduciendo un potencial de DC de polaridad contraria. En los experimentos con micropipetas, el potencial de unión puede llegar a ser de unos cientos de milivolts.

El motivo para utilizar KCl es el siguiente: cuando se coloca el microelectrodo en el medio extracelular se produce una interfase entre la solución del microelectrodo y la solución fisiológica que baña la célula. Cuando se inserta el microelectrodo en la célula, se produce otra interfase entre la solución de la micropipeta y el medio intracelular. Estas interfaces generan un potencial de unión cuyo valor está dado por la expresión:

$$V = \left(\frac{u - v}{u + v} \right) \cdot \left(\frac{R \cdot T}{F} \right) \cdot \ln \left(\frac{C_1}{C_2} \right). \quad (5)$$

En esta ecuación u y v representan las movilidades de los cationes y aniones respectivamente, C_1 y C_2 indican las concentraciones de los solutos en ambos lados de la interfase, R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta y F la constante de Faraday. La ecuación indica que cuando las movilidades de los aniones y cationes o las

concentraciones de los solutos son diferentes se produce un potencial de unión. Se utiliza KCl en la solución que llena los microelectrodos debido a que los iones K^+ y Cl^- presentan una movilidad parecida, por lo que $V \approx 0$.

La conexión del microelectrodo con el amplificador crea una interfase metal-líquido que genera potenciales de unión y burbujas cuando se inyecta corriente de estimulación. Las burbujas ejercen efectos indeseables porque producen capacitancias parásitas y los potenciales de unión generan un voltaje de DC que cambia en el tiempo, el cual impide medir adecuadamente el potencial de membrana. Para evitar estos problemas, se requiere de un electrodo reversible y no polarizable, para lo cual se utilizan normalmente electrodos de plata-cloruro de plata (Ag-AgCl). Para su fabricación existen dos métodos: el más utilizado consiste en un alambre de plata al cual se le cubre de una capa de cloruro de plata; el segundo se obtiene al introducir un alambre de plata en polvo de cloruro de plata, posteriormente se aplica presión al polvo para formar una pastilla de cloruro de plata. La figura 9 muestra un esquema de ambos tipos de electrodos.

El electrodo de alambre de plata-pastilla de cloruro de plata presenta una mayor estabilidad a la luz y es el más adecuado cuando se requiere estimular a las células con corriente de gran magnitud.

Para la conexión a tierra de la solución fisiológica que baña la célula se utiliza cualquiera de los dos tipos de electrodos mencionados; además, se usan puentes salinos que contienen KCl a una concentración de 3 M y agar. El uso del puente salino de agar se recomienda cuando la solución fisiológica deberá cambiarse por otras con diferente concentración de Cl^- en el transcurso de un experimento, con lo que se evita que el potencial de unión V se modifique.

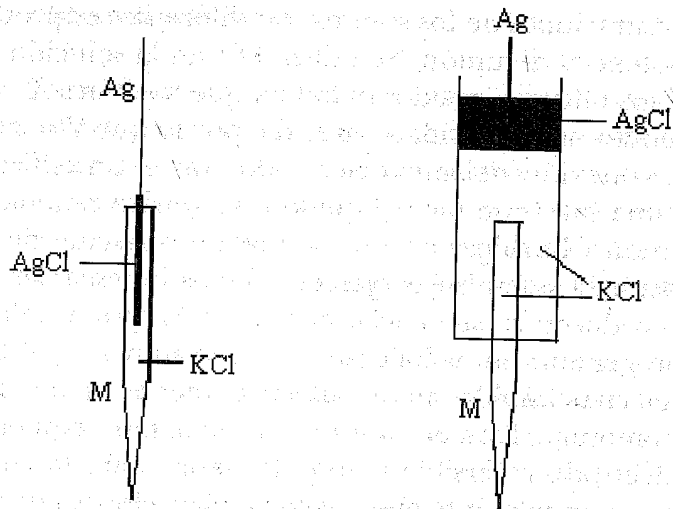


Figura 9. Electrodo de plata-cloruro de plata. A la izquierda: se introduce al microelectrodo M el alambre de plata Ag cubierto de una capa de cloruro de plata (AgCl). A la derecha se muestra un tubo dividido en dos compartimentos por una pastilla de cloruro de plata, la cual hace contacto eléctrico en el extremo superior con el alambre de plata y en el extremo inferior con el microelectrodo a través de una solución de cloruro de potasio (KCl).

4. ORIGEN DEL POTENCIAL DE REPOSO

La técnica de registro intracelular utilizada en el estudio de la actividad eléctrica de las células consiste en la inserción de un microelectrodo o pipeta (cuya punta es muy fina) en el interior celular para la obtención de la señal eléctrica. Al insertar un microelectrodo en la célula se registra una diferencia de potencial denominado *potencial de reposo* (V_r) y es el que se obtiene cuando las células no presentan actividad eléctrica.

El potencial de reposo V_r es ocasionado por la *permeabilidad selectiva* a los iones de K^+ . Los canales de K^+ abiertos a potenciales negativos son los responsables en

diferentes tipos celulares, del comportamiento de las membranas celulares como membranas semipermeables cediendo el paso fundamentalmente a los iones de K^+ a través de la membrana celular.

En algunos tipos celulares la membrana plasmática es permeable únicamente al K^+ y su potencial de reposo V_r es igual al potencial de equilibrio del K^+ (V_k), o sea $V_r \approx V_k$. El potencial de equilibrio V_k para el K^+ puede ser obtenido utilizando la *ecuación de Nernst* (ecuación 6), y por lo tanto del potencial de reposo V_r para una membrana permeable únicamente al K^+ , o sea

$$V_r \approx V_K = \frac{R \cdot T}{Z \cdot F} \cdot \ln \left(\frac{[K^+]_0}{[K^+]_i} \right) \quad (6)$$

En la figura 10 se muestra un esquema de la membrana celular, en donde se representa la bicapa lipídica (BL) y algunas proteínas incrustadas en la membrana celular que actúan como canales iónicos de K^+ .

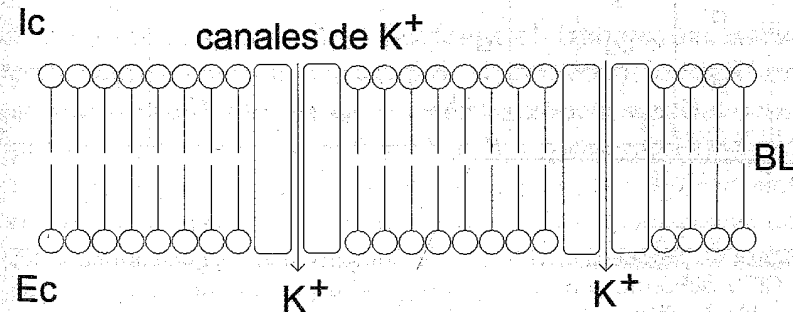


Figura 10. Componentes de la membrana celular relacionados con algunas de sus propiedades eléctricas. Consta de una bicapa lipídica (BL) y proteínas intrínsecas. Se ilustran algunas de éstas que actúan como canales iónicos de K^+ . Las regiones interna y externa de la célula se indican por Ic y Ec respectivamente.

Para ilustrar cómo se produce el potencial de reposo por la presencia de canales abiertos y selectivos al K^+ , podemos recurrir al siguiente experimento.

En la figura 11a se muestran dos compartimientos separados por una membrana impermeable. En ambos compartimientos existe una solución electrolítica con K^+ y Cl^- pero con una concentración mayor en el lado derecho. Si se mide el potencial que hay entre ambos compartimientos su valor será de cero, dado que cada uno de ellos es eléctricamente neutro. En ambos compartimientos las cargas positivas del K^+ son neutralizadas por la presencia de un mismo número de cargas negativas del Cl^- . Por otro lado, si la membrana que divide los compartimientos es semipermeable por la presencia de una población de canales selectivos al K^+ , como se muestra en la

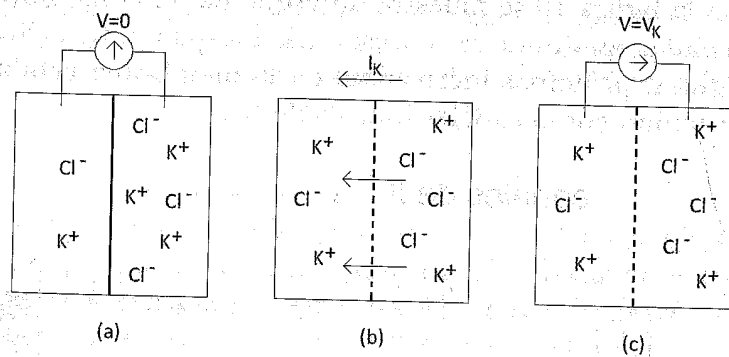


Figura 11. Potencial de difusión. a) Compartimientos que contienen K^+ y Cl^- a diferente concentración separados por una membrana impermeable. La diferencia de potencial entre ambos compartimientos es cero porque hay la misma cantidad de cargas positivas y negativas. b) La membrana contiene canales de K^+ que permiten el paso selectivo de K^+ al compartimiento izquierdo generando una corriente I_k . c) El movimiento de los iones K^+ ha cesado ($I_k = 0$). Ahora, el compartimiento izquierdo contiene un exceso de cargas positivas y el derecho de cargas negativas, lo que origina una diferencia de potencial V_k .

figura 11b, el K^+ pasará del compartimiento derecho al izquierdo por un proceso de difusión debido al gradiente de concentración de K^+ que existe entre ambos compartimientos. Con ello se genera una corriente de K^+ (I_k en la figura 11b).

Debido a la carga del K^+ se produce un exceso de cargas positivas en el compartimiento izquierdo y en el compartimiento derecho un exceso de cargas negativas (figura 11c). El efecto neto es la separación de cargas con la generación de un voltaje o potencial eléctrico V_k , siendo el compartimiento izquierdo positivo y el derecho negativo. La corriente de K^+ cesa por efecto de esta diferencia de potencial que se opone a su difusión. O sea, la diferencia de concentración y el potencial eléctrico generados son gradientes químico y eléctrico que se oponen mutuamente al movimiento neto del K^+ .

Lo anterior se puede expresar en términos del trabajo que realizan dichas fuerzas sobre los iones de K^+ , esto es

$$W_c = W_e \quad (7)$$

En esta ecuación W_c representa el trabajo necesario para transportar una cantidad δ_n de moles de iones K^+ en contra de su gradiente de concentración, o sea, del compartimiento izquierdo al derecho. W_e representa el trabajo requerido para el transporte de una cantidad δ_n de moles de iones K^+ del compartimiento derecho al izquierdo en contra de su gradiente eléctrico. Por otro lado, se sabe que las expresiones para W_c y W_e son

$$W_c = \delta_n \cdot R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{[K^+]_0}{[K^+]_i} \right) \quad (8)$$

$$W_e = \delta_n \cdot Z \cdot F \cdot V_k, \quad (9)$$

donde R , T , $[K^+]_i$ y $[K^+]_o$ representan la constante de los gases, la temperatura absoluta y las concentraciones de K^+ en los compartimientos derecho e izquierdo, respectivamente. A su vez, Z , F y V_k indican la carga del ion, la constante de Faraday y la diferencia de potencial entre los compartimientos 1 y 2, respectivamente. Igualando los trabajos se tiene

$$\delta_n \cdot Z \cdot F \cdot V_k = \delta_n \cdot R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right)$$

despejando V_k resulta la ecuación de Nernst

$$V_k = \left(\frac{R \cdot T}{Z \cdot F} \right) \ln \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right). \quad (10)$$

La ecuación (10) proporciona información sobre el valor del voltaje V_k o *potencial de equilibrio* con el cual cesa la difusión de K^+ de un compartimiento a otro, cuando la membrana que divide los compartimientos es selectivamente permeable a dicho ion. Un razonamiento análogo se realiza para otras especies iónicas y su potencial de equilibrio se evalúa empleando la ecuación de Nernst. Se acostumbra representar el potencial de equilibrio de cada especie iónica como V_x , en donde x representa el símbolo químico del ion. Las membranas celulares tienen un comportamiento análogo al descrito en la figura 11, en donde podemos sustituir los compartimientos izquierdo y derecho por las regiones extracelular e intracelular.

Si la célula en el estado de reposo es permeable únicamente a los iones K^+ , entonces su potencial de reposo será cercano al valor del potencial de equilibrio del K^+ . Podemos simplificar la ecuación de Nernst al sustituir los valores de la constante de los gases R , la constante de Faraday F para un ion de carga +1, a la temperatura de 37°C y reemplazando la función logaritmo natural por la de logaritmo base 10, se obtiene

$$V_k = (62 \text{ mV}) \cdot \log \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right). \quad (11)$$

En esta ecuación $[K^+]_o$ y $[K^+]_i$ representan las concentraciones de K^+ en las regiones externa e interna de la célula respectivamente. Sustituyendo en la ecuación (11) los valores de las concentraciones de K^+ que presentan las células en su interior y en el medio que las rodean se obtiene el siguiente potencial de equilibrio para K^+

$$V_k = (62 \text{ mV}) \cdot \log \left(\frac{5}{140} \right) = -89.7 \text{ mV}.$$

Este valor es muy aproximado al potencial de reposo (V_r) medido experimentalmente en diferentes células, de lo cual se deduce que presentan una gran permeabilidad al K^+ como es el caso de las células gliales que nutren y dan soporte a las neuronas y de las fibras musculares esqueléticas y cardíacas, o sea

$$V_r \approx V_k,$$

por lo que en células que presentan una permeabilidad selectiva a los iones K^+ se tiene

$$V_r = (62 \text{ mV}) \cdot \log \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right). \quad (12)$$

La ecuación (12) predice que el potencial de reposo, V_r , puede ser modificado alterando, por ejemplo, la concentración de K^+ del medio externo ($[K^+]_o$). Experimentalmente se ha observado en una diversidad de células que al incrementar la concentración de K^+ extracelular, el potencial de membrana se hace menos negativo cambiando el potencial de membrana de acuerdo al valor predicho por la ecuación de Nernst, siempre y cuando estos cambios no estimulen la producción de potenciales de acción en las células excitables.

Cada una de las especies iónicas que se encuentran en las regiones intracelular y extracelular presentan un potencial de equilibrio el cual se evalúa con la ecuación de Nernst (ecuación 10), en donde se sustituye al K^+ por la concentración del ion a evaluar. Los potenciales de equilibrio para los iones de Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{++} se indican por V_{Na} , V_K , V_{Cl} y V_{Ca} , respectivamente.

Los valores de las concentraciones de los iones en las regiones intracelular y extracelular en una célula de mamífero típica se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1
CONCENTRACIONES IÓNICAS NORMALES EN LOS MEDIOS
INTRACELULAR Y EXTRACELULAR DE MAMÍFERO

	Región intracelular (mM)	Región extracelular (mM)
K^+	140	5
Na^+	5-15	145
Cl^-	4	110
Ca^{++}	$1-2 (\times 10^{-4})$	2.5-5

Como se puede apreciar, la concentración de Na^+ es mayor en la región extracelular y la del K^+ es superior en la región intracelular. Asimismo, la concentración de Ca^{++} intracelular es menor en cuatro órdenes de magnitud con respecto a la región extracelular. Esta distribución asimétrica de las diferentes especies iónicas es de importancia fundamental para el desarrollo adecuado de las propiedades eléctricas que presentan las células excitables y no excitables; además, las células normalmente tienen una concentración de Ca^{++} muy baja ya que su incremento desencadena una diversidad de respuestas celulares.

Tomando los valores de las concentraciones de los diferentes tipos de iones de la tabla anterior y sustituyéndolos en la ecuación 10 se pueden obtener los potenciales de equilibrio para el resto de los iones. En la tabla 2 se muestran los valores

Tabla 2
POTENCIALES DE EQUILIBRIO PARA LAS DIFERENTES ESPECIES DE
IONES EVALUADOS EN LA ECUACIÓN DE NERNST

Ion	Potencial de equilibrio
K^+	$V_K = -90 \text{ mV}$
Na^+	$V_{Na} = +61 \text{ mV}$
Ca^{++}	$V_{Ca} = +136 \text{ mV}$
Cl^-	$V_{Cl} = -89 \text{ mV}$

En la ecuación 10, el K^+ se sustituye por las concentraciones de Na^+ , Ca^{++} y Cl^- indicadas en la tabla 1.

Por otro lado, la aplicación de la ecuación de Nernst a una membrana celular permeable únicamente a K^+ no explica la presencia de los diferentes valores de potenciales

de reposo medidos en diferentes tipos celulares, ya que en todos los casos debería ser cercano a V_k . Esto es debido a que la mayoría de las células presentan una permeabilidad a otras especies iónicas (aunque en menor proporción a la del K^+). La ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz que toma en cuenta la permeabilidad simultánea a K^+ y a los iones Na^+ y Cl^- es la siguiente

$$V_r = (62 \text{ mV}) \cdot 10^g \frac{P_k \cdot [K^+]_0 + P_{Na} \cdot [Na^+]_0 + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_i}{P_k \cdot [K^+]_i + P_{Na} \cdot [Na^+]_i + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_0} \quad (13)$$

En esta expresión P_K , P_{Na} y P_{Cl} son la permeabilidad a K^+ , Na^+ y Cl^- , respectivamente. La ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz predice los valores del potencial de reposo en células que son permeables a diferentes especies iónicas y se reduce a la ecuación de Nernst para el caso de una membrana permeable únicamente a K^+ , ya que en este caso P_{Na} y P_{Cl} son nulos. Por otro lado, V_r sigue siendo negativo por predominar la permeabilidad al K^+ pero se aleja del potencial de equilibrio del K^+ por presentar una permeabilidad al Na^+ y Cl^- .

De acuerdo al análisis anterior, si la célula cambiara la permeabilidad de su membrana a otra especie iónica induciría a la vez un cambio en su potencial de membrana. Por ejemplo, si incrementa la permeabilidad al Na^+ y ésta es muy grande con respecto al resto de las especies iónicas, entonces P_K y P_{Cl} son aproximadamente igual a cero en la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz y ésta se transforma en la ecuación de Nernst. Además, el potencial de membrana cambia de un valor negativo a uno positivo cercano a $V_{Na} = 61.1 \text{ mV}$ de acuerdo a la ecuación

de Nernst para las concentraciones de Na^+ que normalmente existen en el interior y exterior de las células. Por el contrario, si el potencial de reposo es de, por ejemplo, -50 mV , un gran incremento en la permeabilidad a Cl^- cambiaría el potencial de reposo a un valor más negativo cercano a $V_{Cl} = -89 \text{ mV}$. Las membranas celulares controlan la permeabilidad a las diferentes especies iónicas controlando a su vez la apertura o cierre de los canales iónicos selectivos a una especie iónica y de esta manera modifican su potencial de membrana.

Por otro lado, la concentración de Na^+ es mayor en la región extracelular y la de K^+ es superior en la región intracelular. Esta distribución asimétrica de los diferentes iones es de importancia vital para el adecuado desarrollo de la actividad eléctrica en las células excitables.

Las membranas celulares no son barreras perfectas para impedir la difusión de iones diferentes del K^+ durante el potencial de reposo; existiendo una permeabilidad menor a otros iones, como ya se mencionó. Los iones que se fugan, como es el caso del Na^+ , tienden a disminuir la concentración intracelular del K^+ y aumentar la del Na^+ . Sin embargo, la actividad de la bomba de Na^+/K^+ , regenera los gradientes de concentración de ambos iones.

Mencionamos como ejemplos de células con una gran permeabilidad al K^+ a las células musculares esqueléticas y cardíacas, por lo cual presentan un potencial de reposo de -90 mV aproximadamente (ecuación (12)). Por otro lado, el potencial de reposo en las neuronas es más variable debido a la permeabilidad que existe a otros iones como es el caso del Na^+ y el Cl^- . El potencial de reposo fluctúa entre -90 y -40 mV en la mayoría de los casos. En las células la mayor permeabilidad continúa siendo para el K^+ , pero existe una permeabilidad controlada a otros iones. Como se mencionó, en este caso el potencial de

reposo se evalúa con la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz, en lugar de la ecuación de Nernst.

5. PROPIEDADES ELÉCTRICAS PASIVAS DE LAS MEMBRANAS CELULARES

Se comentó antes que la técnica de registro intracelular permite no sólo medir el potencial de membrana, sino también, inyectar corriente a la célula. La aplicación de pulsos rectangulares de corriente con el registro simultáneo del cambio en el potencial ha sido importante para el conocimiento de las propiedades eléctricas pasivas o lineales de las células excitables y no excitables. Las propiedades pasivas son importantes en las células excitables ya que tiene efectos sobre las propiedades no lineales como se verá más adelante.

Las propiedades eléctricas pasivas dependen de la morfología celular. Dos tipos de aproximaciones geométricas se han empleado para el análisis eléctrico de las células: la esférica y la cilíndrica. Para una gran diversidad de células, la aproximación esférica resulta razonable. Para células musculares esqueléticas, axones, dendritas, etc., la aproximación cilíndrica es la más apropiada. En la siguiente sección se describe el análisis teórico y experimental para cada una de estas morfologías celulares.

5.1. Propiedades pasivas en células esféricas

En la figura 12 se muestran los cambios en el potencial de membrana de una célula esférica al aplicar pulsos rectangulares de corriente con la técnica de registro intracelular. Los cambios en el potencial de membrana subumbrales

(aquellos que no desencadenan potenciales de acción) son graduales y proporcionales a la magnitud del estímulo, por lo que a mayor inyección de corriente mayor es el cambio en el potencial de membrana. Además, la polaridad del cambio en el potencial de membrana es igual a la del estímulo.

Si se inyecta corriente negativa, el potencial de membrana V_m se hace más negativo (hiperpolariza), si la corriente aplicada es positiva el potencial de membrana se torna menos negativo (despolariza). Los trazos de los cambios en el potencial de membrana tanto al inicio como al final de la aplicación de los pulsos rectangulares de corriente, presentan un curso temporal exponencial con una constante de tiempo τ_m . Este tipo de respuesta es

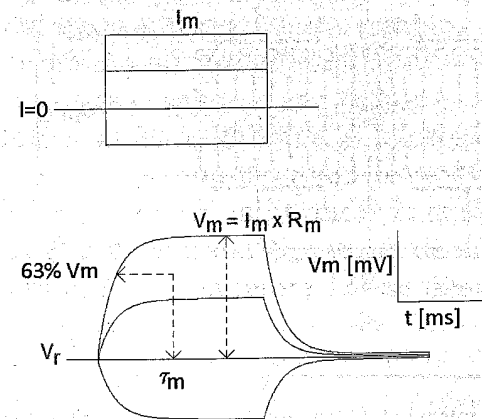


Figura 12. Forma de onda del potencial de membrana en una célula esférica por la inyección de un pulso rectangular de corriente. Arriba se indica la polaridad y duración de los pulsos que se aplican a una célula esférica con la técnica de registro intracelular. El primero es negativo, el segundo es cero y los dos últimos son positivos. La respuesta de la célula esférica es una variación exponencial del potencial, que en estado estable es $V_m = I_m \times R_m$. La constante de tiempo τ_m es el tiempo al cual V_m alcanza el 63% de su valor máximo.

ocasionado por las propiedades lineales o pasivas de las membranas celulares y la comparten las células excitables y las no excitables.

Las propiedades pasivas de las membranas pueden ser descritas mediante modelos eléctricos. La figura 13b muestra un circuito RC en paralelo que reproduce el comportamiento eléctrico de las membranas celulares de células esféricas.

El hecho de que un circuito RC en paralelo pueda reproducir las propiedades eléctricas pasivas de las membranas celulares esféricas, indica que la membrana celu-

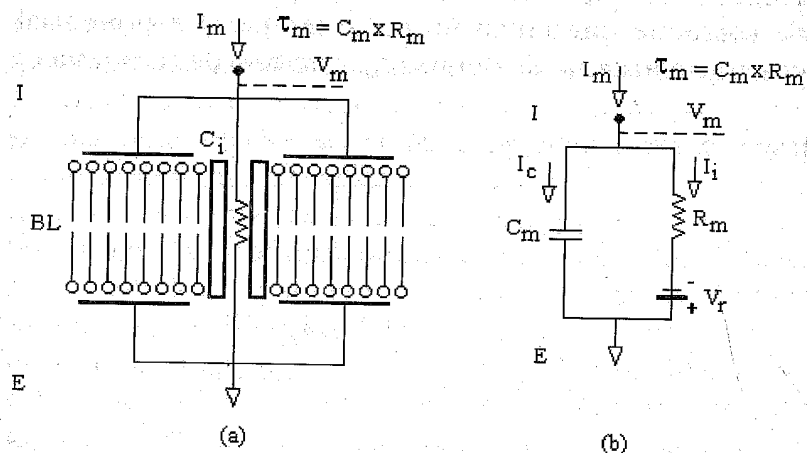


Figura 13. Modelo eléctrico de las propiedades pasivas de las membranas celulares. a) Componentes estructurales de la membrana. El comportamiento capacitivo está dado por la bicapa lipídica BL y el resistivo por los canales de la membrana C_i . El potencial de reposo corresponde a un voltaje V_r . b) Circuito equivalente compuesto por la resistencia en serie con la fuente V_r conectados en paralelo con el capacitor. Cuando se aplica una corriente I_m ésta se divide en dos, una capacitiva I_c y otra iónica I_i . La corriente I_m ocasiona que V_r se modifique a V_m en forma exponencial con una constante de tiempo $\tau_m = C_m \times R_m$. La región extracelular se indica por E y la intracelular por I.

lar contiene elementos de comportamiento eléctrico análogos a dicho circuito. En la figura 13a se representan las estructuras de la membrana que se comportan como un capacitor y una resistencia en paralelo. Los medios intracelular (I) y extracelular (E) debido a su contenido electrolítico se comportan como las placas conductoras de un capacitor, en tanto que la bicapa lipídica BL que se encuentra entre ambos medios electrolíticos, se comporta como el dieléctrico del capacitor. Los canales iónicos C_i constituyen la parte resistiva en paralelo que se aprecia en la figura 13a, estos canales se encuentran siempre abiertos y no son voltaje dependientes.

Al aplicar una corriente I_m al circuito se induce un cambio en el voltaje V_m con una variación exponencial. El parámetro τ_m , denominado constante de tiempo de la membrana, es el que caracteriza a los cambios en el potencial de membrana con un curso temporal exponencial. Cuando mayor es el valor de τ_m , mayor es el tiempo que tarda el potencial de membrana en alcanzar el estado estable.

El valor de τ_m se obtiene al multiplicar la magnitud de la capacitancia de la membrana C_m por el de la resistencia de la membrana R_m . De la figura 13b se tiene

$$\tau_m = C_m \cdot R_m. \quad (14)$$

En esta figura el potencial de reposo se representa por V_r , a partir del cual se llevan a cabo los cambios en el voltaje producidos por la inyección de corriente I_m . La figura 12 muestra el tipo de trazos de V_m obtenidos al aplicar los pulsos rectangulares de corriente I_m .

La función que describe la variación de V_m es

$$V_m = I_m \cdot R_m \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_m}\right) \right), \quad (15)$$

en la que τ_m es el tiempo al cual V_m ha alcanzado el 63% de su valor final (figura 12). Cuando el pulso de corriente termina, el cambio en V_m está descrito por

$$V_m = I_m \cdot R_m \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_m}\right). \quad (16)$$

En este caso τ_m representa el tiempo al cual V_m ha decaído un 37% respecto del valor que presentaba justo antes de terminar el pulso de corriente.

Las propiedades pasivas descritas corresponden a una célula de tipo esférico isopotencial (figura 12), o sea, con el mismo potencial en todo su interior. Este análisis es útil para la descripción de las propiedades pasivas de una diversidad de tipos celulares que se asemejan a una esfera. Sin embargo, como se comentó, las dendritas, el axón y las fibras musculares tienen forma aproximadamente cilíndrica y en estos casos se utiliza el análisis teórico que se denomina teoría del cable conductor. A continuación se describe cómo se relaciona este análisis con los datos experimentales obtenidos con la técnica de registro intracelular.

5.2. Propiedades pasivas en células cilíndricas

Las propiedades eléctricas pasivas de las células con morfología cilíndrica se describirán tomando como ejemplo a las neuronas.

En la figura 14 se ilustran las estructuras principales que componen una neurona típica, la cual consta de un soma que contiene al núcleo (n, figura 14); del soma emergen ramas conocidas como dendritas y el segmento ini-

cial el cual se continúa con el axón. En el extremo del axón se encuentra la terminal sináptica que contiene vesículas rellenas de neurotransmisor. Es en las dendritas donde las neuronas reciben señales de otras neuronas las cuales se propagan hacia el soma en donde se suman. Si el estímulo es adecuado, en el segmento inicial se produce un potencial de acción (pa en la figura 14) que se propaga hasta la terminal sináptica liberando el neurotransmisor para estimular a otras neuronas.

Cuando son estimuladas por otras neuronas, en las dendritas de una neurona se producen cambios en el potencial denominados potenciales postsinápticos. Estos potenciales postsinápticos se propagan a lo largo de las dendritas hacia el soma donde se suman. Si la suma de potenciales postsinápticos alcanza un potencial de membrana umbral en el segmento inicial, se dispara un potencial de acción que será conducido a través del axón hasta la

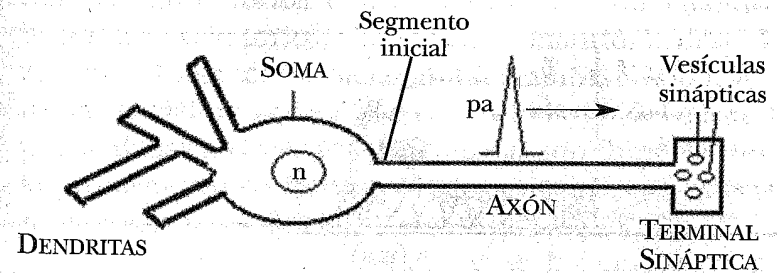


Figura 14. Elementos principales comunes a los diferentes tipos de neuronas. La propagación de las señales eléctricas en las dendritas es pasiva o lineal. En el axón la propagación de la señal es no lineal en forma de potenciales de acción. El potencial de acción en la terminal sináptica induce la liberación del neurotransmisor que contienen las vesículas sinápticas. Las neuronas reciben señales de otras neuronas a través de las dendritas y se comunican con otras a través de la liberación de neurotransmisor inducida por los potenciales de acción (pa).

siguiente terminal sináptica. En la figura 15 se muestran las sumas de potenciales postsinápticos en el soma. En un caso, la suma de potenciales es subumbral; en el otro, la suma alcanza el potencial umbral generándose un potencial de acción. Del ejemplo anterior, cabe la siguiente pregunta: ¿de que parámetros eléctricos depende que algunos potenciales postsinápticos sean más eficaces para la inducción de potenciales de acción? Para responder a esta pregunta es indispensable realizar un análisis teórico el cual se fundamenta en la teoría del cable conductor.

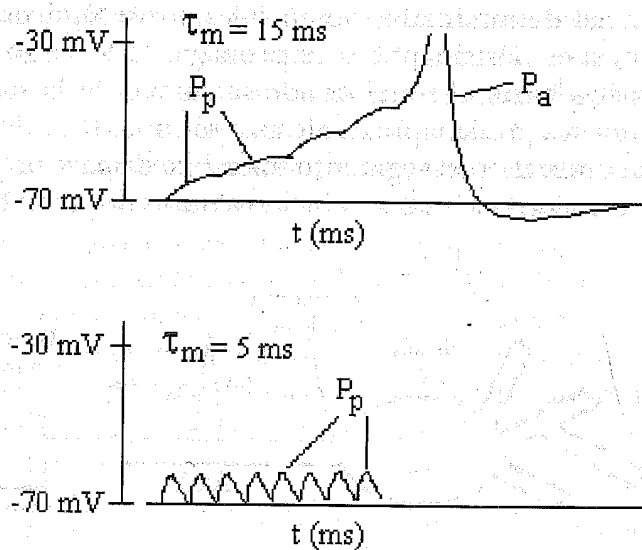


Figura 15. Efecto de la constante de tiempo τ_m sobre los potenciales postsinápticos. En la figura superior el valor de $\tau_m = 15 \text{ ms}$ permite que se sumen los potenciales postsinápticos P_p en el soma y en el segmento inicial hasta alcanzar el umbral de disparo del potencial de acción P_a . En la figura inferior, con $\tau_m = 5 \text{ ms}$, no se presenta la suma temporal de los potenciales postsinápticos. El potencial de acción P_a se muestra parcialmente.

5.3. Teoría del cable conductor

La teoría del cable conductor se ha empleado en el estudio de las neuronas para el análisis de las dendritas y el axón, ya que son segmentos de membrana con morfología aproximadamente cilíndrica que tienen un comportamiento eléctrico similar a un cable conductor.

Las dendritas han sido objeto de intensa investigación ya que son fundamentales en la transmisión de información de una neurona a otra. Las neuronas reciben miles de entradas sinápticas a través de las dendritas donde se generan potenciales postsinápticos excitatorios o inhibitorios que se propagan en dirección al soma y segmento inicial.

En el soma y segmento inicial es donde se integran, o suman algebraicamente, los potenciales postsinápticos excitatorios y los potenciales postsinápticos inhibitorios causando en esta zona una hiperpolarización si predominan los inhibitorios o una despolarización cuando lo hacen los excitatorios. Como ya se comentó, la despolarización del segmento inicial al valor umbral desencadena un potencial de acción que viaja a lo largo del axón. Las propiedades pasivas de las dendritas son importantes en la propagación de los potenciales postsinápticos hacia el soma y segmento inicial.

La teoría del cable conductor se ha empleado para explicar el comportamiento eléctrico pasivo a nivel de las dendritas y el axón. En la dendrita, un dato importante que la teoría del cable proporciona, es la manera en que cambia el voltaje a lo largo de su eje longitudinal cuando se inyecta corriente en un punto de ella por la actividad sináptica. En este caso, también se encuentra una constante de tiempo de la membrana, como la mencionada en el párrafo anterior para el caso de una célula esférica;

pero además se tiene una variable nueva, la *constante de longitud* o *de espacio* de la membrana. A diferencia de lo que sucede en una célula esférica, en una cilíndrica el potencial no es el mismo en toda la región intracelular cuando se modifica por la inyección de corriente. El cambio de voltaje disminuye a medida que se mide a mayor distancia (longitudinalmente o axialmente) del sitio de inyección de corriente. La constante de espacio es una medida que indica el grado en que disminuye el voltaje con la distancia axial.

5.3.1. Planteamiento de la ecuación del cable conductor

Las propiedades del cable eléctrico fueron estudiadas inicialmente por Lord Kelvin (1855) al examinar las propiedades eléctricas de los cables telegráficos trasatlánticos, estudio con el que desarrolló la teoría del cable, que posteriormente utilizaron los biofísicos para explicar la conducta eléctrica pasiva de las células con morfología cilíndrica. El cable presenta un sitio central metálico que es conductor, rodeado por un aislante, sumergido en un medio electrolítico que también es conductor. La dendrita, el axón y la fibra muscular esquelética exhiben un espacio conductor central (proporcionado por el medio intracelular) rodeado por una membrana celular, la cual se comporta como un aislante; asimismo, se encuentran inmersos en un medio electrolítico conductor correspondiente al medio extracelular.

La figura 16 ilustra el modelo eléctrico de un segmento de axón, dendrita, o fibra muscular en el que se pueden apreciar los circuitos RC en paralelo conectados en el interior celular (I) por el medio intracelular el cual presenta una resistencia interna R_i (por unidad de

longitud); en la región extracelular (E) la resistencia es despreciable, por lo cual no se incluye. La resistencia de la membrana se representa por R_m y la capacitancia de la membrana por C_m ; V_r indica el potencial de reposo y V_0 el potencial en el punto $X = 0$; la corriente de membrana, la inyectada en el sitio $X = 0$ y la interna o axial se indican por I_m , I_p e I_i respectivamente. Las unidades de R_i son ohm/cm y las de R_m ohm cm. Se supone que la resistencia interna por unidad de longitud R_i es constante y que la resistencia total en el intervalo ΔX se incrementa proporcionalmente con la distancia longitudinal ΔX ; además, R_m es constante a lo largo del cilindro.

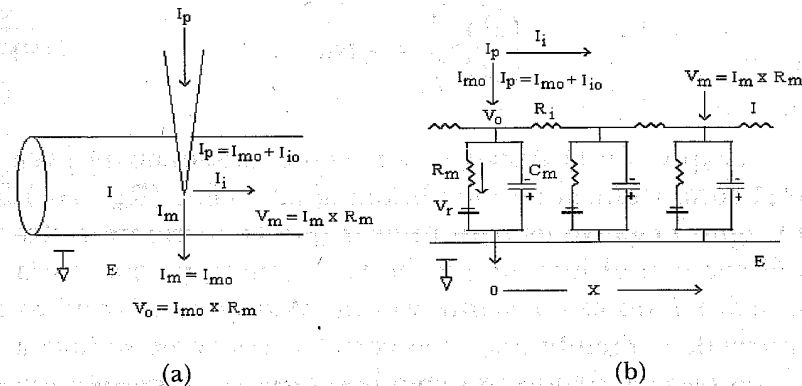


Figura 16 a) Procedimiento experimental de inserción de un microelectrodo y de la inyección de pulsos de corriente. b) Circuito equivalente que representa las propiedades eléctricas pasivas de un axón, dendrita o segmento de fibra muscular (sin tomar en cuenta la superficie del sistema tubular T). Los circuitos RC son iguales y se encuentran en paralelo. Las regiones intracelular y extracelular se indican por I y E, respectivamente, y la resistencia del medio intracelular por R_i . En $X = 0$ se inyecta la corriente I_p , la que cuando alcanza el estado estable se divide en dos: una que fluye a lo largo del interior celular I_i y otra que pasa al exterior a través de la membrana celular I_m . La corriente I_{m0} en X_0 produce el potencial de membrana V_0 . El potencial V_m en el punto X está dado por $V_m = I_m R_m$. La corriente I_i e I_m disminuyen con la distancia.

En la figura 16 se observa que, de acuerdo con la ley de Ohm, cuando existe una corriente I_i en el cilindro se produce una diferencia de potencial ΔV_i en el segmento longitudinal ΔX , la que es de magnitud

$$\Delta V_i = -R_{\text{total}} \cdot I_i, \quad (17)$$

expresión en la que

$$R_{\text{total}} = R_i \cdot \Delta X; \quad (18)$$

sustituyendo la ecuación (18) en la (17) resulta

$$\left(\frac{\partial V_i}{\partial X} \right)_x = -R_i I_i. \quad (19)$$

La expresión (19) sólo es válida en estado estable y para una conductancia de membrana igual a cero ($R_m \rightarrow \infty$). El signo negativo es para indicar que la corriente I_i disminuye con el incremento de la distancia, ya que en la práctica I_i no es constante ya que, dado que la conductancia de la membrana no es cero y la corriente se fuga a través de ella, dando origen a la corriente de membrana I_m . A su vez, I_m tampoco es constante, cambia con la distancia X ya que I_i disminuye con la distancia. Por lo anterior se tiene que tomar una longitud infinitesimal, ∂X , a través de la cual existe una diferencia de voltaje ∂V . Por lo tanto, la ecuación (19) queda

$$\left(\frac{\partial V_i}{\partial X} \right)_x = -R_i \cdot (I_i)_x \quad (20)$$

el subíndice X indica que $\partial V_i / \partial X$ e I_i deben tomarse en el mismo punto X .

Como el cilindro celular está inmerso en un gran volumen electrolítico conductor, la resistencia en el medio extracelular es aproximadamente cero y, como se encuentra a tierra (figura 16), el voltaje externo es despreciable. Por tanto el voltaje V_m a través de la membrana está dado por V_i , lo que implica que se puede eliminar el subíndice X y expresar el voltaje de membrana como $V_m = V_i = V$, sin que haya confusión.

Cuando se aplica I_p , la corriente I_i cambia con la distancia X por la fuga que existe por la membrana (la corriente I_m). En otras palabras, la magnitud del cambio en la corriente I_i con la distancia es igual a I_m . Por lo anterior, para un segmento infinitesimal se tiene

$$\frac{\partial I_i}{\partial X} = -I_m. \quad (21)$$

Diferenciando la ecuación (20) se tiene

$$\frac{\partial^2 V}{\partial X^2} = -R_i \cdot \frac{\partial I_i}{\partial X}. \quad (22)$$

Sustituyendo la ecuación (21) en la (22) resulta

$$\frac{1}{R_i} \cdot \frac{\partial^2 V}{\partial X^2} = I_m. \quad (23)$$

En la figura 16 se observa que la membrana se modela con circuitos RC en paralelo, por lo que el cambio en el potencial de membrana en el punto X ocasionará una corriente I_m con un componente capacitivo I_c y otro resistivo V/R_m

$$I_m = I_c + \frac{V}{R_m} \quad (24)$$

o bien

$$I_m = C_m \cdot \frac{\partial V}{\partial t} + \frac{V}{R_m} \quad (25)$$

Igualando las ecuaciones (23) y (25) se obtiene la ecuación diferencial general de la teoría del cable, en la que C_m y R_m son la capacitancia y la resistencia de membrana de longitud unitaria.

$$\frac{1}{R_i} \cdot \frac{\partial^2 V}{\partial X^2} = C_m \cdot \frac{\partial V}{\partial t} + \frac{V}{R_m} \quad (26)$$

En algunas ocasiones es conveniente expresar la ecuación (26) en términos de r_m , r_i y c_m definidos por las siguientes ecuaciones, en las que a es el radio del cable

$$R_m = \frac{r_m}{2 \cdot \pi \cdot a} \quad (27)$$

$$R_i = \frac{r_i}{\pi \cdot a^2} \quad (28)$$

$$C_m = c_m \cdot 2 \cdot \pi \cdot a \quad (29)$$

Sustituyendo las ecuaciones (27), (28) y (29) en (26) tenemos

$$\frac{a}{2 \cdot r_i} \cdot \frac{\partial^2 V}{\partial X^2} = c_m \cdot \frac{\partial V}{\partial t} + \frac{V}{r_m} \quad (30)$$

Por otro lado, si se multiplica la ecuación (26) por R_m y se define $\lambda^2 = R_m/R_i$ y $\tau_m = R_m C_m$, en las que τ_m es la constante de tiempo de la membrana y λ la constante de espacio, la ecuación queda

$$\lambda^2 \cdot \frac{\partial^2 V}{\partial X^2} = \tau_m \cdot \frac{\partial V}{\partial t} + V \quad (31)$$

Como λ depende de la relación entre las resistencias R_m y R_i , esta constante determina la proporción de corriente interna que se propaga a lo largo del cilindro. Por ejemplo, si se supone que la resistencia de la membrana es constante, para una λ elevada, la R_i es pequeña y la I_m que se fuga es despreciable. Por el contrario, si λ es pequeña, la R_i es mayor y hay más fuga de corriente por la membrana. En la práctica, se puede considerar que la resistencia de la membrana por unidad de superficie es aproximadamente constante y la resistencia interna R_i es variable dependiendo del diámetro del cilindro. En una dendrita, por ejemplo, la resistencia de la membrana es aproximadamente constante a lo largo de su superficie y el valor de λ estaría determinado por R_i que es afectado por el diámetro y/o la longitud de la dendrita: a medida que se incrementa su diámetro la R_i es menor y λ aumenta; a medida que incrementa su longitud la R_i es mayor y λ disminuye.

Por lo anterior, la variación en la R_i de las dendritas tiene un gran efecto sobre las propiedades eléctricas de las neuronas. Se comentó que los potenciales postsinápticos se suman en el soma y segmento inicial. La eficacia de los potenciales postsinápticos depende del grado de decaimiento del potencial sináptico desde la entrada sináptica hasta el soma y segmento inicial. Para observar

cómo afecta el diámetro y la longitud de las dendritas el decaimiento de los potenciales postsinápticos, supongamos que una entrada sináptica (en $X = 0$) inyecta una corriente I_s en la dendrita, una porción de esa corriente sale de la dendrita a través de la membrana de la dendrita produciendo la corriente I_{m0} la cual genera un cambio en el potencial de membrana (potencial postsináptico); la fracción restante de corriente I_{i0} se dirige a la región vecina ($X = 1$) en donde nuevamente se produce la corriente de membrana I_{m1} y la otra axial I_{i1} y así sucesivamente hasta llegar al segmento inicial ($X = n$). Las relaciones entre las corrientes es tal que $I_{m0} > I_{m1}$, $I_{i0} > I_{i1}$, ..., $I_{mn-1} > I_{mn}$, $I_{in-1} > I_{in}$ por conservación de la carga (figura 17). En el segmento inicial la corriente I_{in} se divide en la corriente de membrana I_{mn+1} y la otra axial I_{in+1} ; la magnitud de la corriente I_{mn+1} es importante ya que es la que ocasionará el cambio de voltaje $\Delta V = I_{mn+1} R_m$ en el segmento inicial que si es de suficiente magnitud producirá un potencial de acción en el segmento inicial de la neurona. Por lo que a la pregunta ¿qué tanto decae el potencial postsináptico?, se puede responder, de acuerdo a la disminución de I_s hasta I_{mn+1} . Cuando la corriente sináptica I_s disminuye bruscamente con la distancia I_{mn+1} será pequeña y el ΔV también lo será; por el contrario, si I_s decae poco con la distancia I_{mn+1} será de mayor magnitud y ΔV también. El grado de decaimiento de la corriente sináptica depende de R_i para una R_m constante y, a su vez, R_i depende del diámetro y la longitud de la dendrita como ya se comentó. En conclusión, las entradas sinápticas son menos eficaces en dendritas de diámetro más pequeño (R_i mayor) o longitud mayor (R_i mayor) ya que producen una I_{mn+1} pequeña con cambios en el voltaje ΔV en el segmento inicial de magnitud insuficiente para disparar un potencial de acción (si se

trata de potenciales postsinápticos excitatorios); por el contrario, las entradas sinápticas más cercanas al soma (con menor longitud de la dendrita, R_i menor) o en las dendritas con diámetro mayor (R_i menor), los potenciales postsinápticos excitatorios serán más eficaces en ocasionar un cambio en el potencial de membrana en el segmento inicial para desencadenar en la neurona un potencial de acción. El parámetro λ nos indica, por lo tanto, la eficacia con que se propagan los potenciales postsinápticos.

Se comentó que las células excitables pueden generar potenciales de acción los cuales se deben, como se verá después, a las propiedades no lineales de ellas ya que la corriente de membrana I_m cambia con el voltaje y con el tiempo. La ecuación (30) describe el comportamiento eléctrico pasivo o lineal por lo que tiene que modificarse para incluir una corriente I_m dependiente del voltaje y del tiempo

$$\frac{a}{2 \cdot r_i} \cdot \frac{\partial^2 V}{\partial X^2} = c_m \cdot \frac{\partial V}{\partial t} + I_m(V, t). \quad (32)$$

La expresión anterior es válida para una célula de morfología cilíndrica (o un segmento de ella) y da cuenta de sus propiedades lineales y no lineales (que generan los potenciales de acción).

5.3.2. Solución a la ecuación del cable conductor

Como estamos interesados en esta sección en resolver la ecuación diferencial que da cuenta de las propiedades lineales o pasivas emplearemos la ecuación (30). Inicialmente introducimos las variables adimensionales x y T

$$x = \frac{X}{\lambda} \quad (33)$$

$$T = \frac{t}{\tau_m} \quad (34)$$

Con estos cambios, la ecuación (31) queda

$$\frac{\partial^2 V}{\partial X^2} - \frac{\partial V}{\partial t} - V = 0. \quad (35)$$

Sea \bar{V} la transformada de Laplace de V como una función de T donde

$$\frac{d\bar{V}}{dT} = s \cdot \bar{V} - V(0, x). \quad (36)$$

El objetivo de aplicar la transformación es eliminar una de las variables (T en este caso) para dejar la ecuación en términos de x , por lo cual la derivada ahora es total en lugar de parcial. El valor de $V(0, x)$ da los valores iniciales de \bar{V} para toda x cuando $T = 0$. En un cable inicialmente en reposo $V(0, x) = 0$. Bajo estas condiciones empleando las ecuaciones (35) y (36) se tiene

$$\frac{d^2 \bar{V}}{dx^2} - (s+1) \cdot \bar{V} = 0. \quad (37)$$

La solución general de la ecuación (37) es

$$\bar{V} = \bar{A} \cdot \exp(-x \cdot \sqrt{s+1}) + \bar{B} \cdot \exp(x \cdot \sqrt{s+1}). \quad (38)$$

En la ecuación (38) \bar{A} y \bar{B} son constantes o funciones de la variable compleja s . Para obtener sus valores se

requieren condiciones de frontera. A-continuación se muestra la solución de esta ecuación para algunas condiciones de frontera de interés fisiológico.

5.3.3. Respuesta de un cable infinito a la aplicación de un pulso escalón de corriente

Este es un caso importante ya que representa una condición experimental típica, en donde se aplica un pulso de corriente prolongado y se mide el potencial de membrana a diferentes distancias del sitio de inyección de corriente. El cable infinito es una condición aproximada cuando el diámetro a es muy pequeño con respecto a su longitud. Se muestra la solución detallada para ilustrar el método, el que también puede aplicarse a otras condiciones de frontera.

Las condiciones de frontera tienen que cumplir con lo siguiente:

- $V \rightarrow 0$ cuando $x \rightarrow \infty$, ya que $I_i \rightarrow 0$ e $I_m \rightarrow 0$.
- Se aplica un escalón de corriente I_p en el interior del cilindro en $x = 0$ para el tiempo $T \geq 0$.

La condición a) requiere que $\bar{B} = 0$ en la ecuación (38) por lo que

$$\bar{V} = A \cdot \exp(-x \cdot \sqrt{s+1}). \quad (39)$$

Previamente se ha encontrado que (ecuación (20), pero incluyendo los cambios de variable con la ecuación (33))

$$I_i = -\left(\frac{1}{R_i \cdot \lambda}\right) \frac{\partial V}{\partial x}, \quad (40)$$

por lo que

$$\bar{I}_i = - \left(\frac{1}{R_i \cdot \lambda} \right) \frac{\partial \bar{V}}{\partial x}, \quad (41)$$

donde \bar{I}_i es la transformada de Laplace de I_i . Derivando la ecuación (39) con respecto a x se tiene

$$\frac{d\bar{V}}{dx} = -\bar{A} \cdot \sqrt{s+1} \cdot \exp(-x \cdot \sqrt{s+1}) \quad (42)$$

y sustituyendo este resultado en la ecuación (41) resulta

$$\bar{I}_i = \left(\frac{\bar{A} \cdot \sqrt{s+1}}{R_i \cdot \lambda} \right) \cdot \exp(-x \cdot \sqrt{s+1}). \quad (43)$$

En $x=0$, $I_i = I/2$, ya que la corriente se divide a la mitad en cada lado del cable infinito. Por tanto la ecuación (43) queda

$$\bar{I}_i = \frac{2 \cdot \bar{A} \cdot \sqrt{s+1}}{R_i \cdot \lambda}, \quad (44)$$

por lo que

$$\bar{A} = \frac{\bar{I}_i \cdot R_i \cdot \lambda}{2 \cdot \sqrt{s+1}}. \quad (45)$$

Como I es un pulso escalón función de T , entonces $I = I_p / s$. Sustituyendo en la ecuación (45)

$$\bar{A} = \frac{I_p \cdot R_i \cdot \lambda}{2 \cdot s \cdot \sqrt{s+1}} \quad (46)$$

y sustituyendo la ecuación (46) en la ecuación (39)

$$\bar{V} = \frac{I_p \cdot R_i \cdot \lambda}{2 \cdot s \cdot \sqrt{s+1}} \cdot \exp(-x \cdot \sqrt{s+1}). \quad (47)$$

Ahora se tiene que descomponer la ecuación (47) en fracciones parciales tales que su transformada sea conocida. Se tiene que

$$\frac{2}{s \cdot \sqrt{s+1}} = \frac{1}{s+1-\sqrt{s+1}} - \frac{1}{s+1+\sqrt{s+1}}, \quad (47)$$

con lo que la ecuación (47) queda

$$\bar{V} = \frac{R_i \cdot I_p \cdot \lambda}{4} \cdot \left(\frac{\exp(-x \cdot \sqrt{s+1})}{s+1-\sqrt{s+1}} - \frac{\exp(-x \cdot \sqrt{s+1})}{s+1+\sqrt{s+1}} \right). \quad (48)$$

Por otro lado, consultando las tablas de transformadas resulta

$$\frac{\exp(-a \cdot \sqrt{s})}{s+b \cdot \sqrt{s}} \leftrightarrow \exp(b^2 \cdot T + a \cdot b) \cdot \operatorname{erfc} \left(\frac{a}{2 \cdot \sqrt{T}} + b \cdot \sqrt{T} \right).$$

En este último resultado $\operatorname{erfc}(y)$ es la función complementaria de la función error definida $\operatorname{erfc}(y) = 1 - \operatorname{erf}(y)$. Comparando las dos últimas ecuaciones se observa que $a = x$, $b = \pm 1$, y se tiene $s+1$ en lugar de s , por lo cual la solución para V tiene que estar multiplicada por $\exp(-T)$. Haciendo la sustitución queda finalmente

$$V = \frac{R_i I_p \lambda}{4} \cdot \left(\begin{array}{l} \exp(-x) \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{T}} - \sqrt{T}\right) - \\ \exp(x) \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{T}} + \sqrt{T}\right) \end{array} \right) \quad (49)$$

A continuación se analizará el cambio de V con respecto a X en el estado estable, o sea, cuando V no es función del tiempo.

5.3.4. Solución en el estado estable

El estado estable se alcanza con $T \rightarrow \infty$ y entonces $\operatorname{erfc}(T) \rightarrow 0$ y $\operatorname{erfc}(-T) \rightarrow 2$. Sustituyendo estos valores en la ecuación (49) y recordando que $x = X/\lambda$ se tiene la solución para el estado estable

$$V = \frac{R_i \cdot I_p \cdot \lambda}{2} \cdot \exp\left(-\frac{X}{\lambda}\right) \quad (50)$$

La ecuación (50) indica que el potencial disminuye exponencialmente a cero con la distancia. En un cable semi infinito la caída del potencial con respecto a la distancia es similar sin la división por 2 (figura 19). En un experimento real, se grafican los datos experimentales o mediciones del voltaje V contra la distancia X. Como la disminución de V es exponencial se emplea una escala semi-logarítmica obteniendo una recta con pendiente negativa, cuyo valor es $m = -1/\lambda$. Los valores de λ que se encuentran en las dendritas fluctúan entre 0.1 y 1 mm. Del valor de la pendiente se puede obtener la relación R_m/R_i . Como la constante de espacio λ está dada por

$$\lambda = \sqrt{\frac{R_m}{R_i}} = \sqrt{\frac{a \cdot r_m}{2 \cdot r_i}} \quad (51)$$

ecuación en la que r_m y r_i son constantes y a es el radio, resulta que λ es proporcional a \sqrt{a} .

Otro dato que se obtiene experimentalmente es la *resistencia de entrada* definida por

$$R_{\text{ent}} = \frac{V(X=0, t=\infty)}{I_p} \quad (52)$$

Haciendo $X = 0$ en la ecuación (50) y sustituyendo el resultado en la ecuación (52) resulta

$$R_{\text{ent}} = \frac{\sqrt{R_m \cdot R_i}}{2} = \frac{\sqrt{r_m \cdot r_i}}{\sqrt{(2 \cdot \pi \cdot a)^3}} \quad (53)$$

La resistencia de cada mitad del cilindro infinito es $\sqrt{R_m \times R_i}$, por tanto, con la resistencia de entrada y la constante de espacio puede calcularse los valores de R_m y R_i .

Por otro lado, la resistencia de entrada es inversamente proporcional a $\sqrt{a^3}$, resultado importante cuando se estudian teóricamente las ramas dendríticas. La resistencia de entrada se evalúa colocando el microelectrodo que mide el potencial de membrana lo más cercano posible al microelectrodo de inyección de corriente I_p .

5.3.5. Variación del potencial de membrana con el tiempo en un cilindro infinito

La forma del cambio en el potencial de membrana se determina experimentalmente cuando se inyecta un pulso

rectangular de corriente y se mide el potencial en el tiempo en un punto fijo X. Si se mide dicho potencial en $X = 0$, la ecuación (49) con $T = t/\tau_m$ queda como sigue:

$$V = \frac{R_i \cdot I_p \cdot \lambda}{2} \cdot \operatorname{erf}\left(\sqrt{\frac{t}{\tau_m}}\right). \quad (54)$$

Cuando $t = \tau_m$ la función $\operatorname{erf}(1) = 0.84$, por lo cual V aumenta un 84% de su valor en estado estable. Por tanto, el cambio en el potencial es más rápido en una célula cilíndrica que en una esférica. Como $\tau_m = R_m \cdot C_m$, con la medición de la constante de tiempo puede obtenerse C_m ya que R_m se obtuvo en estado estable. En un cable semi infinito el curso temporal del cambio en el potencial de membrana en un punto fijo X, es similar a la ecuación para un cable infinito multiplicado por 2.

Resumiendo, los datos anteriores indican que, cuando se aplica un pulso de corriente de gran duración en algún sitio de una célula cilíndrica, se produce un cambio en el potencial de membrana al inicio del pulso con una constante de tiempo τ_m con un curso temporal más rápido que el exponencial. Además, para un tiempo $t \gg \tau_m$, el voltaje se encuentra en estado estable y no se producen corrientes capacitivas (ya que éstas sólo se generan cuando el voltaje cambia en el tiempo). Dado que $I_c = 0$, toda la corriente es iónica y la carga fluye por la resistencia interna R_i y por la resistencia de la membrana R_m . Como R_i es la resistencia por unidad de longitud, la resistencia en el punto X será $R_x = R_i \cdot X$ y a medida que se incrementa la distancia X el valor de R_x aumenta, aunque R_m es constante a lo largo del cilindro. Por ser la corriente de magnitud mayor en los sitios de resistencia menor, la fracción de corriente inyectada disminuye

a medida que X aumenta, ya que R_x también lo hace (figura 17). Por el principio de conservación de la carga, la corriente interna I_i que disminuye a lo largo del eje longitudinal, lo hace a expensas de las pérdidas del cilindro de acuerdo a R_m produciendo una corriente I_m que también disminuye con la distancia.

Por otro lado, el cambio en el potencial de membrana es igual a $V_m = R_m \times I_m$, pero al disminuir I_m con la distancia X, V_m también disminuye (figura 17) ya que R_m es aproximadamente constante a lo largo de la célula cilíndrica.

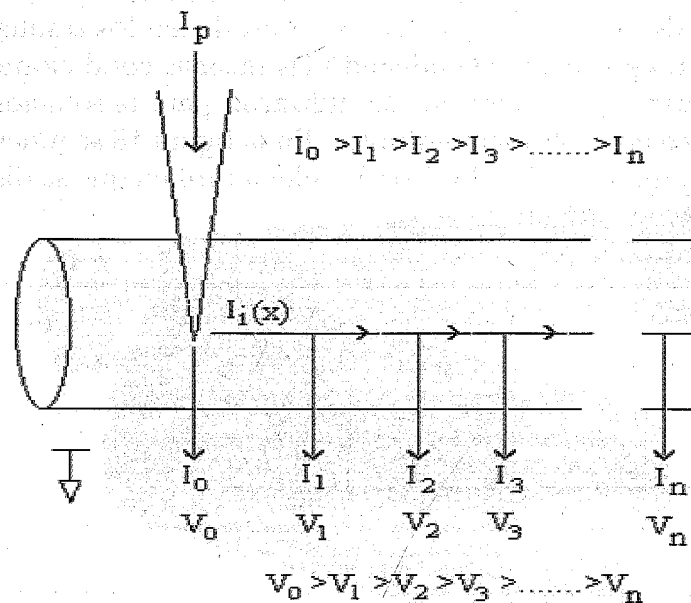


Figura 17. Disminución de la corriente y el voltaje con la distancia. Segmento de una célula cilíndrica a la cual se inyecta corriente I_p con un microelectrodo. I_p genera una corriente interna I_i y otra I_m que atraviesa la membrana, ambas disminuyen longitudinalmente. I_1, I_2, I_3, I_n representan valores decrecientes de I_m cuando incrementa la distancia. El cambio en el potencial de membrana también disminuye al alejarse del punto X_0 , por lo que $V_0 > V_1 > V_2 > V_3 > \dots > V_n$.

5.3.6. Solución a la ecuación diferencial del cable conductor mediante métodos numéricos por elemento finito

Una limitación al análisis anterior, es la aproximación cilíndrica de la morfología celular. Cuando esto no se cumple a lo largo de la célula, la estrategia es dividir en varios cilindros la longitud total a analizar. Este método puede ser bastante laborioso y las expresiones numéricas que se obtienen pueden ser poco manejables para el neurocientífico a menos que se hagan grandes simplificaciones. Una alternativa es la solución de las ecuaciones diferenciales por elemento finito. A manera de ejemplo del poder de este tipo de análisis, se reproducen los resultados con esta técnica empleando las mismas condiciones iniciales y de frontera que se utilizaron para la solución analítica en cables semi-infinitos. En la figura 18 se muestra un segmento de cilindro y los elementos en que se discretiza su volumen.

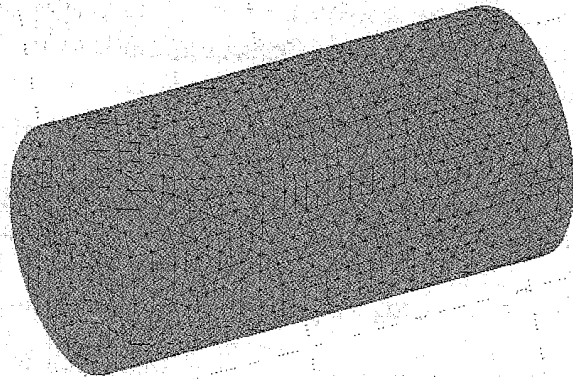


Figura 18. Segmento de cilindro semi-infinito que ilustra la discretización por elemento finito. Los elementos de la superficie tienen los parámetros eléctricos de la membrana celular r_m y c_m . Los elementos interiores presentan los parámetros de la resistencia interna r_i .

En la figura 19a se muestra la imagen del cambio en el potencial de membrana del estado estable cuando se inyecta corriente en el extremo izquierdo. El código de colores indica la magnitud del potencial de membrana.

En la figura 19b se muestra la gráfica de la caída del potencial con respecto a la distancia. En la gráfica se aprecia que el potencial decae de manera exponencial con la distancia; además, apreciamos que el resultado analítico (trazo en azul) es prácticamente idéntico al obtenido empleando métodos numéricos (trazo en negro).

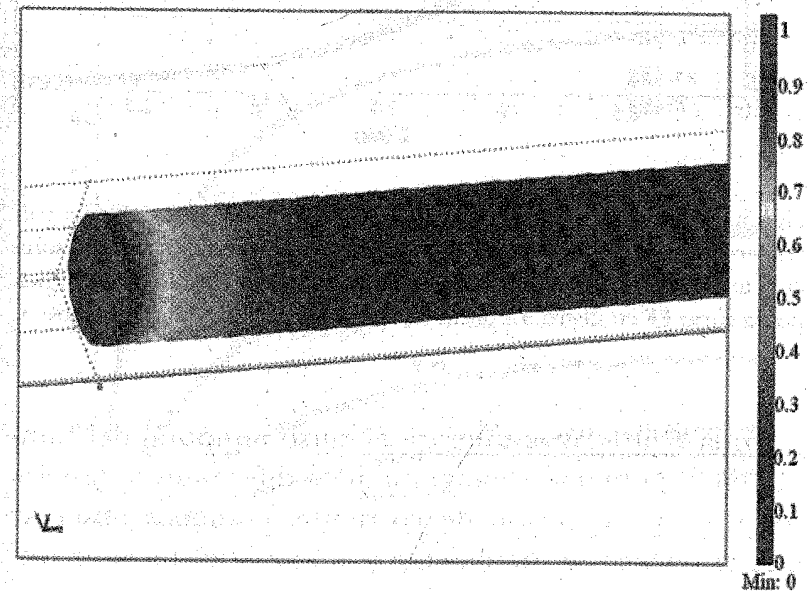


Figura 19a. Cambio en el potencial de membrana de un cable en el estado estable. En a) segmento de cilindro de un cable semi infinito. La relación diámetro/longitud del cilindro es muy pequeña. Los colores indican la caída del potencial con respecto al sitio de inyección de corriente (tapa izquierda).

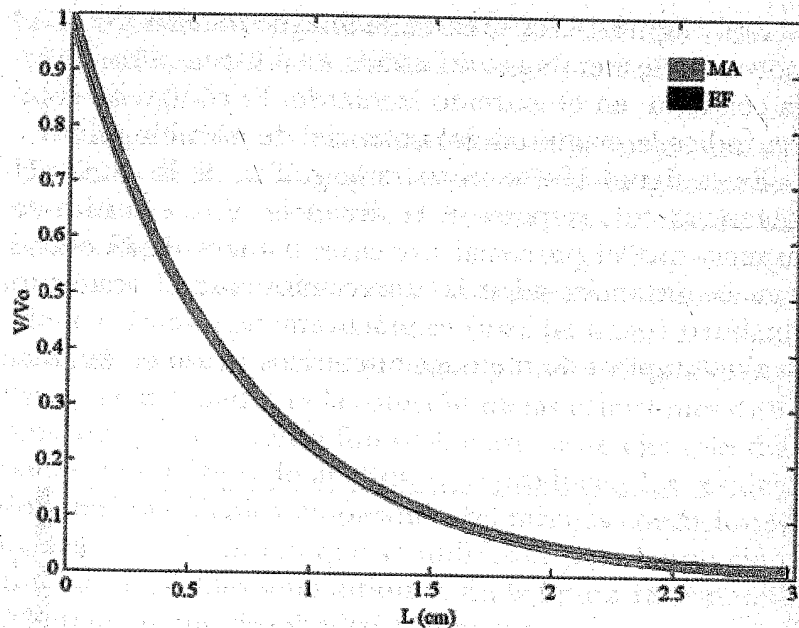


Figura 19b. Gráfica de la disminución del potencial de membrana con respecto a la distancia de inyección de corriente. Curva MA en azul solución analítica con $\lambda = 0.23$ cm. La solución por elemento finito se indica por la curva EF en negro. La distancia x está normalizada con respecto a λ .

En la figura 20 se muestra el curso temporal del cambio en el potencial de membrana a diferentes distancias del sitio de inyección de corriente; podemos observar que el retardo se incrementa y la amplitud máxima disminuye con respecto a la distancia.

Nuevamente observamos que las soluciones analítica y por métodos numéricos son similares.

5.3.7. Velocidad de propagación del impulso nervioso

Como ya se mencionó, otra característica importante de las propiedades del cable es su influencia en la velocidad de propagación del potencial de acción. El potencial de acción no se presenta de manera simultánea en toda la longitud del axón o fibra muscular, sino que inicia en el segmento inicial para el caso del axón y en la región adyacente a la placa neuromuscular para el caso de la fibra muscular, para posteriormente propagarse en toda la extensión de ambos tipos celulares. En el caso de las

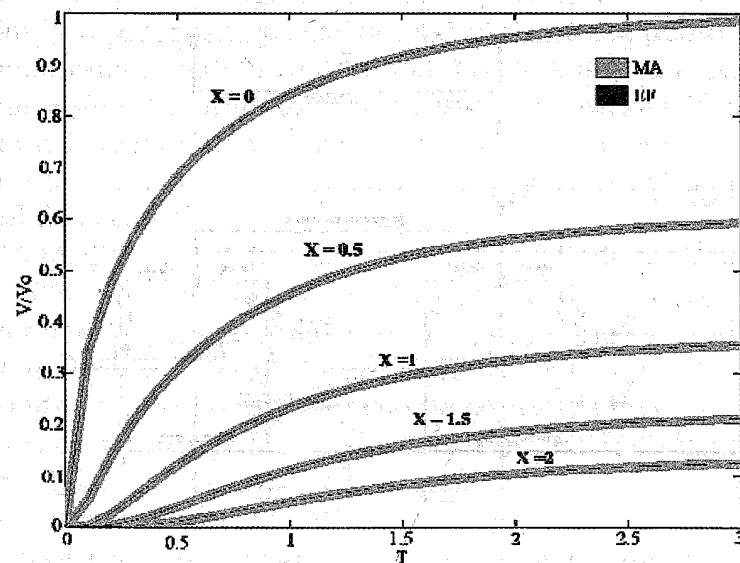


Figura 20. Propagación en forma y magnitud en respuesta a un escalón de corriente. Las curvas son soluciones registradas a distintos puntos de medición a lo largo del cable semi infinito. El valor de x está normalizado con respecto a λ ($X = x/\lambda$). Asimismo, t está normalizado con respecto a τ ($T = t/\tau_m$). Curva azul solución analítica, curva negra solución por elemento finito.

neuronas, la velocidad de propagación es la que determina la velocidad de conducción nerviosa.

En la figura 21 se ilustra la forma en que se propaga el potencial de acción. Dos capacitores de un segmento de membrana celular se encuentran al mismo potencial de reposo V_r (figura 21a). Sin embargo, cuando el potencial

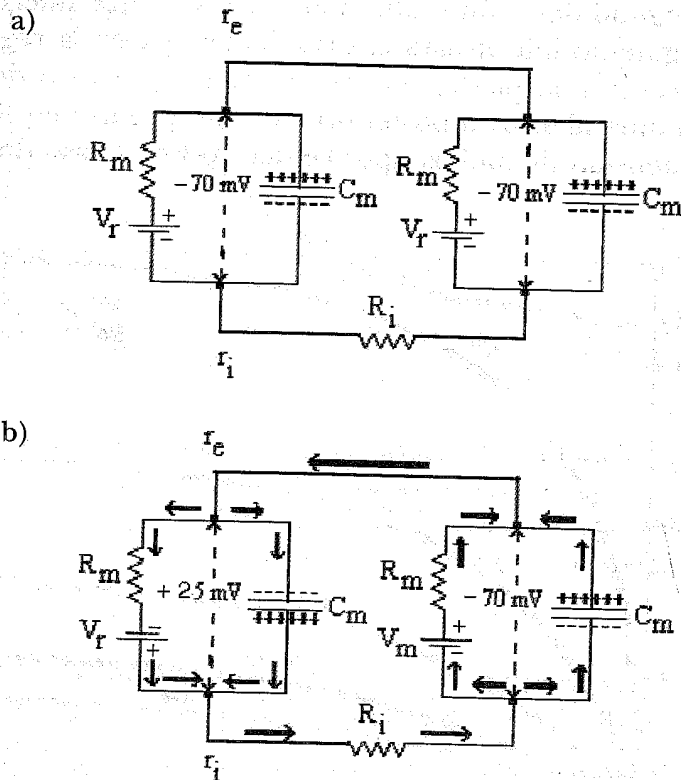


Figura 21. Propiedades pasivas y propagación del potencial de acción. a) Circuito equivalente de un segmento de célula cilíndrica antes y b) después de sufrir una despolarización por la propagación de un potencial de acción. Las flechas indican la dirección de la corriente. R_m = resistencia de la membrana, R_i = resistencia interna, V_r = potencial de reposo y V_m = potencial de membrana ocasionado por la propagación del potencial de acción. Las regiones extracelular e intracelular se indican mediante r_e y r_i , respectivamente.

de acción llega al primer capacitor (extremo izquierdo de la figura 21b) produce una despolarización invirtiendo la carga del capacitor, quedando positiva en su lado interno y negativa en su lado externo. Bajo estas condiciones, los capacitores no se encuentran al mismo potencial por lo que se genera una corriente interna a través de R_i y otra externa. La corriente positiva interna fluye del capacitor izquierdo hacia el de la derecha provocando que éste a su vez se despolarice hasta un valor umbral que dispara un potencial de acción en esa región. La magnitud de la corriente interna, o sea, la velocidad con que fluyen las cargas positivas del capacitor izquierdo al derecho y la cantidad de carga necesaria para descargar al capacitor, determinan la rapidez con que se despolariza este segmento de membrana hasta el nivel umbral. Por lo tanto, la capacitancia de la membrana C_m y la resistencia interna R_i que limita la magnitud de la corriente interna son los factores que determinan la velocidad de propagación del potencial de acción.

A medida que el diámetro de la célula cilíndrica aumenta, R_i disminuye y la magnitud de la corriente interna se incrementa y es mayor la cantidad de carga por unidad de tiempo que llega a los capacitores adyacentes al sitio donde se produjo un potencial de acción. El incremento en la corriente interna produce una caída más rápida del potencial de membrana hasta el nivel umbral de disparo del potencial de acción en esa región.

El análisis cualitativo anterior lo podemos hacer cuantitativo empleando las ecuaciones de cable. Dado que λ está dada por la ecuación (51) y como $\tau_m = r_m \cdot c_m$ se tiene

$$\frac{2 \cdot \lambda}{\tau_m} = \sqrt{\frac{2 \cdot a}{r_m \cdot r_i \cdot c_m^2}} \quad (55)$$

Por lo cual la velocidad de conducción del potencial es proporcional a la raíz cuadrada del diámetro de la célula cilíndrica. Aunque el potencial de acción en el axón es producido por las propiedades no lineales, las propiedades pasivas determinan la velocidad con que se propaga.

Una estrategia empleada por la naturaleza para incrementar la velocidad de conducción del impulso nervioso fue incrementar el diámetro de los axones. En el calamar, para dar una respuesta de huida lo más rápida posible de sus depredadores, la naturaleza empleó un axón gigante (de allí su ventaja experimental). Sin embargo, incrementar la velocidad del impulso nervioso aumentando su diámetro, presenta desventajas cuando el sistema nervioso se hace más complejo como en el caso del hombre; la estrategia empleada por la naturaleza fue otra como veremos a continuación.

Otra alternativa empleada por la naturaleza para el incremento de la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos, fue el cubrir los axones con capas aislantes o no conductoras, que se alternan con regiones conductoras; a este proceso se le denomina mielinización por ser la mielina el material aislante. Un axón mielinizado presenta una velocidad de conducción mayor que otro del mismo diámetro pero no mielinizado. El axón cubierto de *mielina* se comporta como un aislante eléctrico que no genera potenciales de acción, pero sí en los espacios conductores pequeños denominados *nodos de Ranvier* (figura 22).

En estos nodos la membrana celular contiene los canales iónicos que dan origen al potencial de acción por lo que éste se regenera en cada uno de ellos. El potencial de acción no se propaga por toda la superficie de la membrana del axón (como en las fibras no mielinizadas) sino saltando de nodo a nodo, produciendo un tipo de propagación conocida como *conducción saltatoria*.

La conducción saltatoria es un mecanismo que permite incrementar la velocidad de conducción del impulso nervioso de una manera más eficaz que por incremento del diámetro, los axones de gran diámetro conducen a menor velocidad que los axones mielinizado con menor diámetro.

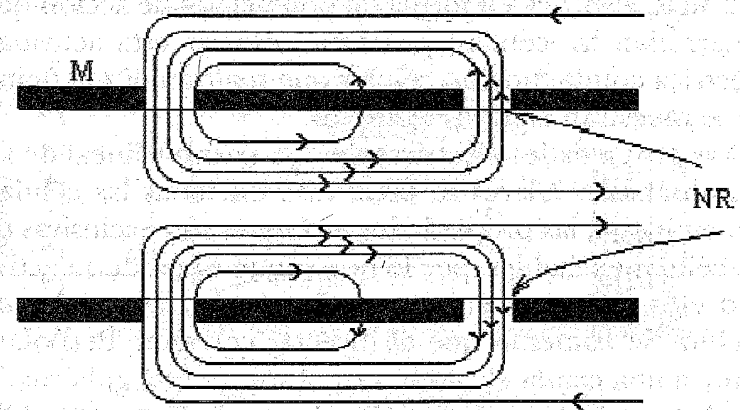


Figura 22. Axón mielinizado que muestra la conducción saltatoria del potencial de acción. La densidad de corriente se representa por las líneas de flujo. La magnitud de la corriente es mucho mayor en los nodos de Ranvier NR que en las regiones cubiertas por mielina M. Por ello, la carga fluye de nodo a nodo regenerándose el potencial de acción en esos sitios.

6. PROPIEDADES NO LINEALES DE LAS MEMBRANAS CELULARES: EL POTENCIAL DE ACCIÓN

6.1. Las células excitables

Desde el punto de vista eléctrico, las células se dividen en excitables y no excitables. Los tejidos excitables como

los músculos liso, cardiaco y esquelético, el tejido nervioso, el sistema glandular, etc., presentan células excitables capaces de generar cambios bruscos en su potencial de membrana, denominados *potenciales de acción*. Las células presentan potenciales de acción diferentes y son característicos de cada tipo celular. La técnica de registro intracelular ha permitido estudiar los diferentes patrones de actividad eléctrica en forma de potenciales de acción que desarrollan las células; y además, asociar esta actividad eléctrica con la función celular que realizan. En la figura 23 se muestran algunos ejemplos.

Las propiedades eléctricas de tipo pasivo y lineal de las membranas celulares se presentan en todas las células. Sin embargo, las propiedades *no lineales* son exclusivas de las células excitables, por lo que son la causa de su actividad eléctrica característica en forma de potenciales de acción. Se comentó que al inyectar corriente despolarizante a una célula el cambio en el voltaje está gobernado por las propiedades pasivas pero, cuando la magnitud de la despolarización alcanza un valor umbral, en las células excitables se disparan potenciales de acción regidos por las propiedades no lineales de la membrana celular.

El potencial de acción se genera por la apertura o activación de los canales iónicos de la membrana plasmática. Dado que las propiedades eléctricas de las células excitables están determinadas por la membrana celular, es importante repasar sus componentes relacionados con la actividad eléctrica.

6.2. La membrana celular en las células excitables

La membrana celular está constituida por una bicapa lipídica (figura 24) y proteínas incrustadas. Algunas proteínas,

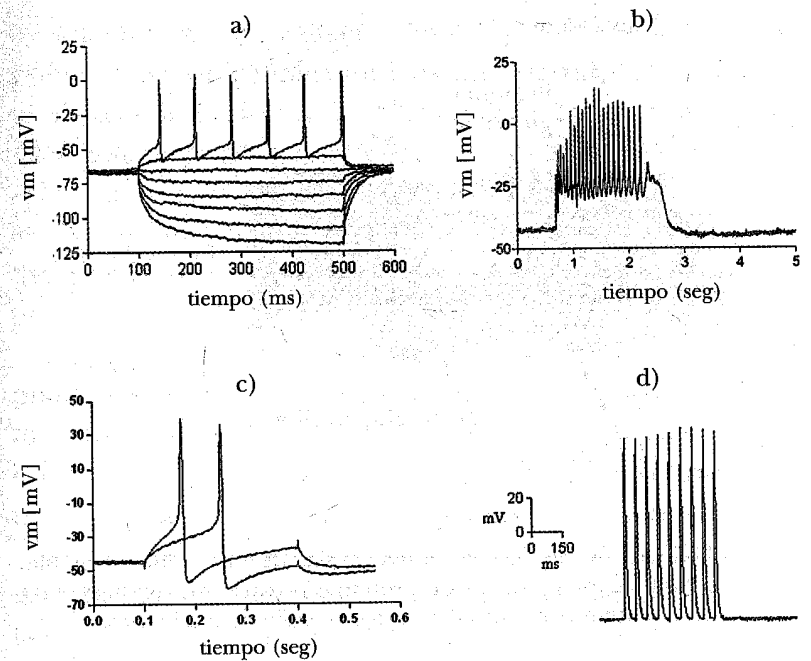


Figura 23. Diferentes patrones de disparo de potenciales de acción en neuronas. En a) y c) las neuronas no presentan actividad eléctrica espontánea, únicamente disparan potenciales de acción cuando se inyecta corriente. En a) la corriente hiperpolarizante torna más negativo el potencial de membrana de acuerdo a las propiedades lineales de la membrana; sin embargo, la corriente despolarizante induce potenciales de acción debido a las propiedades no lineales de la membrana celular. En b) y d) las neuronas presentan actividad eléctrica espontánea en forma de salvas de potenciales de acción (b) y en forma de trenes (d). Los registros se obtuvieron en a) y b) de neuronas de crustáceo, en c) de caracol y en d) de neuronas de hipocampo de mamífero.

como los canales iónicos, atraviesan el espesor de la bicapa lipídica que es una barrera formidable al paso de iones. Para el paso de iones a través de la membrana, las células emplean dos estructuras especializadas, los canales iónicos y los acarreadores. Los canales iónicos son los

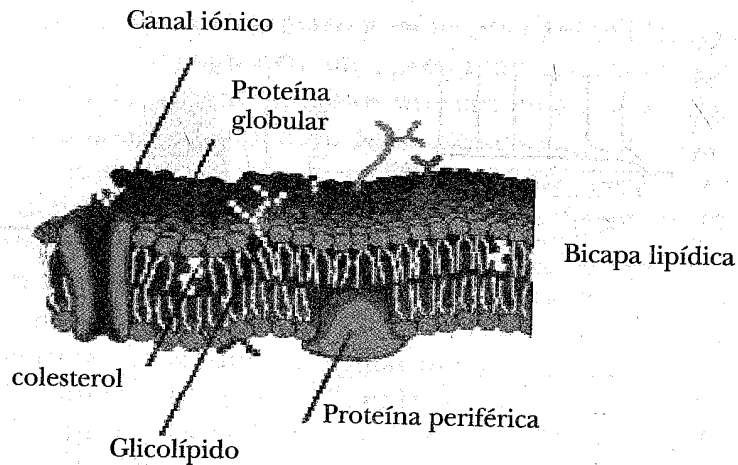


Figura 24. Estructura de la membrana celular de una célula excitable. Consta de una bicapa lipídica y de proteínas intrínsecas, algunas de las cuales actúan como canales iónicos voltaje dependientes.

que confieren las propiedades eléctricas a las células. La participación de los acarreadores, como la bomba de Na^+/K^+ , consiste fundamentalmente en mantener las diferentes concentraciones de iones a través de la membrana celular; aunque su actividad también puede afectar las propiedades eléctricas de las células.

El paso de iones a través de las membranas celulares es regulado por la apertura o cierre de los canales iónicos. El control de la apertura o cierre de las diferentes poblaciones de canales, tiene consecuencias importantes sobre las propiedades eléctricas de las células, dando origen tanto al potencial de reposo V_r (como ya se explicó) como a la actividad eléctrica en forma de potenciales de acción. Las membranas celulares presentan diferentes poblaciones de canales iónicos. Cada población de canales iónicos

es selectiva a una especie iónica, por ejemplo, existen poblaciones de canales iónicos que permiten únicamente el paso de los iones de: Na^+ (*canales de sodio*), K^+ (*canales de potasio*), Ca^{++} (*canales de calcio*) y Cl^- (*canales de cloro*). Además, se han reportado algunas poblaciones de canales que permiten el paso de cationes de manera no selectiva por lo cual se les denomina canales catiónicos inespecíficos.

Los iones difunden a través de la membrana únicamente cuando los canales se encuentran en estado abierto dando origen a corrientes iónicas transmembranales. Los mecanismos generales que emplean las células para controlar la apertura de los canales iónicos son:

a) Apertura de los canales iónicos por el potencial de membrana; en este caso, el potencial de membrana afecta el estado del canal aumentando la probabilidad de que el canal pase del estado cerrado al estado abierto. Por su sensibilidad al voltaje de la membrana a este grupo de canales se les conoce como *canales dependientes del voltaje*.

b) Apertura de los canales iónicos por la unión de una molécula o un ión específico; en este caso, la unión específica de un ión o molécula a la proteína de membrana que funge como canal iónico incrementa la probabilidad de apertura del canal. A este grupo de canales se les conoce como *dependientes de ligando*.

Aunque la técnica de registro intracelular es importante para el conocimiento del comportamiento eléctrico que desarrollan las células excitable durante su función, es indispensable la técnica de fijación del voltaje para conocer los mecanismos moleculares de los cuales se valen las células para generar su actividad eléctrica.

6.3. Canales iónicos voltaje dependientes y su papel en la génesis del potencial de acción

Los canales iónicos que dan origen al potencial de acción, fueron descritos inicialmente por Hodgkin y Huxley en 1952 utilizando la técnica electrofisiológica de fijación del voltaje. Esta técnica permite controlar el potencial de membrana manteniendo su magnitud y polaridad en valores seleccionados por el usuario. El tiempo que se mantiene fijo el potencial de membrana es variable y lo selecciona el usuario de acuerdo al tipo de corrientes iónicas que se desee estudiar.

7. LA TÉCNICA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE

Básicamente consiste en lo siguiente: se polariza la célula con un voltaje de DC negativo (V_h), más negativo que el potencial de reposo V_r que normalmente presenta la célula, con el fin de garantizar que prácticamente todos los canales voltaje dependientes se encuentren cerrados. Posteriormente se aplican pulsos rectangulares de voltaje (V_{com} , figura 25) o pulsos comando, manteniendo el potencial de membrana V_m fijo por el tiempo t que

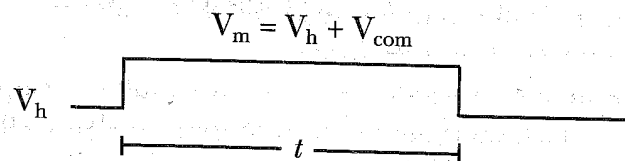


Figura 25. Polarización y aplicación de pulsos de fijación de voltaje. Inicialmente se polariza la célula con un voltaje de DC negativo (V_h). Posteriormente se aplican pulsos positivos rectangulares V_{com} de t ms de duración. El pulso comando V_{com} cambia el potencial de membrana V_m durante el tiempo t a un valor $V_m = V_h + V_{com}$.

el usuario selecciona, para activar la apertura de los canales iónicos localizados en la membrana celular y cuya apertura está controlada por V_m .

Al abrirse los canales por el cambio en el potencial de membrana V_m se producen corrientes iónicas (que pueden ser de Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Cl^-) las cuales son cuantificadas por el sistema de fijación del voltaje. En la figura 26 se ilustran algunas corrientes iónicas evocadas en una célula excitable por la aplicación de pulsos de fijación de voltaje (V_{com}) a partir de un voltaje de DC de -60 mV (V_h).

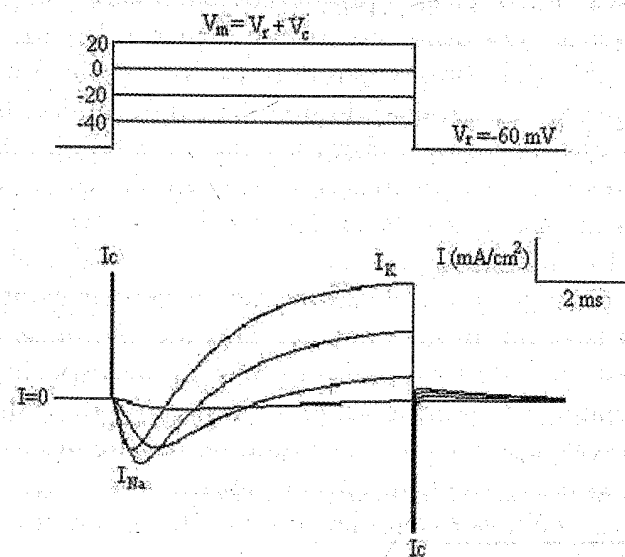


Figura 26. Inducción de corrientes iónicas a través de canales iónicos localizados en la membrana celular. La célula se polariza inicialmente a -60 mV (V_h), posteriormente se aplican 4 pulsos de fijación de voltaje (V_{com}) con incrementos de 20 mV entre cada pulso (figura superior). La figura inferior muestra las corrientes inducidas por la aplicación del protocolo de estimulación de la figura superior. Al inicio y final de V_{com} se producen corrientes capacitivas (I_c); entre las corrientes capacitivas se observan las corrientes iónicas, una de Na^+ negativa (I_{Na}) inicial y una de K^+ (I_K) positiva tardía por la apertura de los canales de Na^+ y K^+ respectivamente, los cuales se abrieron al cambiar el potencial de membrana a $V_m = V_h + V_{com}$.

Convencionalmente, las cargas positivas que entran a la célula se consideran corrientes negativas y las cargas positivas que salen de ella se consideran corrientes positivas. En la figura 26, el Na^+ y el K^+ , ambos con carga positiva, generan las corrientes iónicas I_{Na} e I_{K} de diferente signo; esto es porque el Na^+ entra y el K^+ sale de la célula cuando se abren los canales de Na^+ y K^+ respectivamente.

Las espigas de corriente al inicio y final de los pulsos comando V_{com} son corrientes capacitivas I_c . Como el cambio en V_m induce la apertura de más de una población de canales iónicos existen protocolos para el aislamiento de las corrientes y estudiar una sola población de canales.

El estudio del comportamiento de los canales iónicos, con respecto al potencial de membrana, se realiza modificando este último a diferentes valores y midiendo las corrientes iónicas evocadas por este cambio en el potencial. Hasta principios de la década de los 80's del siglo pasado los diferentes diseños de sistemas de fijación del voltaje sólo permitían el estudio de las células excitables de gran tamaño, motivo por el cual únicamente se realizaban estudios de los canales iónicos en las especies que las poseían, por ejemplo en el axón gigante del calamar, neuronas de aplysia, etc. El estudio de los canales iónicos en células más parecidas a las del ser humano, como es el caso de las células excitables de mamífero, era muy limitado debido a su diámetro pequeño. Fue el diseño del sistema de fijación del voltaje conocido como *Patch-clamp*, el que permitió estudiar los canales iónicos en células pequeñas; en la actualidad la mayoría de los estudios de los canales iónicos se realiza en células de mamíferos y en algunas humanas.

Existen variaciones de la técnica de fijación del voltaje para los diferentes tipos celulares, cuya selección depende principalmente del tamaño de la célula y de su

morfología. En esta sección se detalla la técnica de fijación del voltaje con dos microelectrodos y la de *Patch-clamp*. Estos sistemas permiten la medición de la corriente total generada por una célula a través de su membrana celular ante estímulos adecuados (en el rango de los nanoamperes), así como la medición de la corriente que produce un solo canal iónico (en el rango de los picoamperes). El análisis de las corrientes iónicas obtenidas con esta técnica brinda información sobre la dependencia del voltaje y del tiempo de los mecanismos de apertura y cierre de los canales iónicos.

El estudio del comportamiento de una población de canales iónicos con respecto al potencial de membrana V_m se lleva a cabo realizando mediciones en la corriente iónica, aislada a diferentes potenciales de membrana.

La medición de la corriente iónica total (es decir, la que sucede a través de toda la membrana celular) permite la construcción de curvas corriente-voltaje y curvas conductancia-voltaje y el ajuste de funciones, las cuales describirán el comportamiento de los canales iónicos con respecto al potencial de membrana.

Por otro lado, el ajuste de funciones al curso temporal de activación de las corrientes iónicas, permite obtener ecuaciones que describen la cinética de la corriente iónica. Este conjunto de ecuaciones permite reconstruir el comportamiento de la corriente con respecto al voltaje y el tiempo. Así mismo, la solución de las ecuaciones para el voltaje de membrana V_m , permite simular la actividad eléctrica de las células en forma de potenciales de acción.

A continuación se describirán únicamente dos de las versiones más empleadas: la técnica de fijación del voltaje con dos microelectrodos y la de *Patch-clamp*.

7.1. INSTRUMENTACIÓN

7.1.1. Técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos

Esta técnica consiste en la inserción de dos microelectrodos (similares a los empleados con la técnica de registro intracelular) en la misma célula, uno para medir el potencial de membrana y otro para inyectar corriente a la célula. En la figura 27 se muestra un esquema del sistema de fijación de voltaje.

El sistema consta del amplificador A1 que mide el potencial de membrana V_m por medio de un microelectrodo (M). El valor de V_m se compara con el voltaje al cual se desea mantener la célula (en este caso V_c) y la diferencia es amplificada por A2, el cual genera una corriente que se inyecta a través de un segundo microelectrodo (I_m). El amplificador dejará de inyectar corriente a la célula cuando $V_m = V_c$.

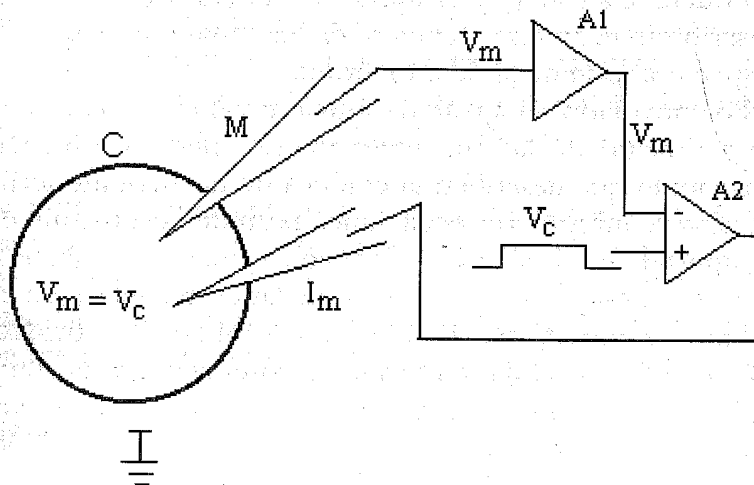


Figura 27. Esquema simplificado de un sistema de fijación de voltaje con dos microelectrodos. M para medir el potencial de membrana e I_m para inyectar corriente a la célula C.

En la figura 28 se ilustra una célula con un potencial de mantenimiento de -70 mV. Se muestra el tipo de trazo de corriente que se obtiene al aplicar un pulso rectangular de fijación de voltaje de magnitud pequeña para que no active o abra los canales voltaje-dependientes. En estas condiciones, únicamente se observan las propiedades lineales o pasivas de la membrana, cuyo comportamiento es similar a un circuito RC. Al inicio del pulso comando positivo V_c se produce una corriente capacitiva cuya pendiente positiva dura el tiempo que tarda la membrana celular en adquirir el valor del pulso comando. Esta corriente es generada por el componente capacitivo de la membrana celular y su valor es $I_c = C_m \cdot (dV/dt)$.

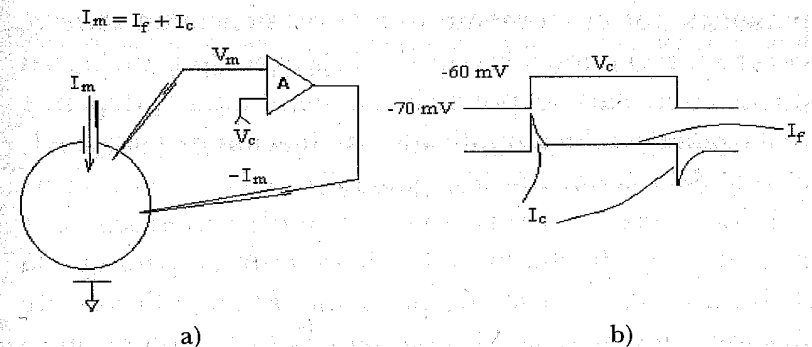


Figura 28. Pulso de fijación de voltaje subumbral. a) El voltaje de la célula se fija con la técnica de dos microelectrodos. Se aplica un pulso comando V_c de 10 mV a partir de -70 mV el cual no abre los canales voltaje-dependientes, se genera una corriente de membrana I_m producto de las propiedades pasivas lineales que consta de una corriente capacitiva I_c y otra resistiva I_r . En b) se muestra el trazo del pulso comando V_c de 10 mV y el trazo de corriente de membrana I_m inducido, en donde se indica el componente capacitivo I_c al inicio y final del pulso V_c y el resistivo o iónico I_r . La despolarización produce una corriente de membrana I_m y el amplificador inyecta la corriente $-I_m$ para mantener fijo el voltaje en -60 mV.

Posteriormente, la corriente capacitiva decrece con una constante de tiempo $\tau_m = C_m \cdot R_m$ y se observa una corriente positiva constante (corriente de fuga I_f) dada por el componente resistivo de la membrana cuyo valor es $I_m = V_c/R_m$. El componente resistivo está dado por la conductancia de los canales que se encuentran abiertos durante el potencial de reposo. Al final del pulso comando nuevamente se genera una corriente capacitiva de pendiente negativa que dura el tiempo que tarda en retornar el potencial de membrana al valor del potencial de mantenimiento, para finalmente decaer con una constante de tiempo τ_m .

En la figura 29 se muestra el circuito equivalente del sistema fijación de voltaje con dos microelectrodos. Si suponemos por el momento que la resistencia en serie R_s es cero (línea punteada con $V_s = 0$) la exactitud con la cual puede controlarse el potencial de membrana V_m depende de la ganancia del amplificador de fijación de voltaje A1, el cual debe tener una alta ganancia.

El potencial de membrana V_m se mide con el seguidor de voltaje A2 de alta impedancia de entrada para que la división de la señal sea despreciable. El amplificador de fijación, de ganancia A1, compara $V_{02} = V_m$ con el pulso comando V_c y pasa la corriente I_m a través de la resistencia de acceso R_a (que puede estar formada por la resistencia del microelectrodo y del citoplasma) para mantener fijo el potencial de membrana V_m al valor del pulso comando V_c . La salida V_{01} del amplificador de fijación A1 está dada por la siguiente expresión

$$V_{01} = e \cdot A = A \cdot (V_c - V_m), \quad (56)$$

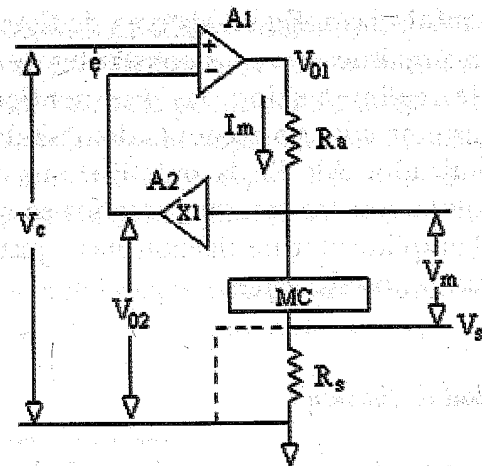


Figura 29. Circuito equivalente del sistema de fijación de voltaje. MC representa la membrana celular, R_a la resistencia de acceso, R_s la resistencia en serie, V_m el potencial de membrana, V_s el potencial por efecto de la resistencia en serie, V_c el potencial comando y e la diferencia entre V_c y V_m . La línea punteada indica $R_s = 0$. I_m es la corriente inyectada por A1.

Cuando pasa una corriente I_m a través de la resistencia de acceso R_a y la membrana (en donde produce el potencial V_m), se tiene

$$V_{01} = I_m \cdot R_a + V_m; \quad (57)$$

igualando las ecuaciones (56) y (57) y arreglando términos se tiene

$$V_m = V_c \cdot \left(\frac{A}{1+A} \right) - \frac{I_m \cdot R_a}{1+A}. \quad (58)$$

En la ecuación (58) puede observarse que cuando A es muy grande, el último término del segundo miembro es despreciable y $V_m \approx V_c$ y los efectos de la resistencia de

acceso R_o se minimizan. En un sistema de fijación de voltaje existen normalmente varias constantes de tiempo en el circuito de realimentación, las que tienden a tornar inestable el sistema cuando aumenta demasiado la ganancia del amplificador A1. En la práctica, una vez que se perfora la célula con los microelectrodos se aumenta la ganancia del amplificador de fijación hasta justo antes de que se produzcan oscilaciones.

7.1.2. Velocidad de fijación

Para separar las corrientes capacitivas de las iónicas, el cambio en el potencial de membrana debe terminar antes de la activación de los canales iónicos.

La velocidad máxima de cambio en el voltaje de la membrana está limitada por la corriente máxima que fluye a través de la membrana y por la capacitancia de la misma

$$\left(\frac{dV_m}{dt} \right)_{\max} = \frac{I_{\max}}{C_m} \quad (59)$$

El fijador de voltaje debe estar capacitado para cambiar el potencial de membrana lo suficientemente rápido para que el transiente de corriente capacitiva ocurra antes del tiempo en el que la corriente iónica es medida. Claramente, esta exigencia debe ser mayor cuando interesa medir corrientes iónicas rápidas. Los sistemas de fijación de voltaje tienen dos, y algunas veces más, constantes de tiempo en su circuito de realimentación y estos sistemas tienden a oscilar conforme se incrementa la ganancia. Los retrasos en el sistema de fijación son ocasionados

por las constantes de tiempo del amplificador de control. Habrá también un retraso en la medición del potencial de membrana causado por la capacitancia a la entrada del seguidor de voltaje y la capacitancia parásita del microelectrodo, cuando éste es usado. Este retardo puede reducirse usando un seguidor de voltaje con compensación de capacitancia.

La ganancia del sistema de control necesita ser grande, para asegurar un buen control del voltaje.

7.1.3. Resistencia en serie

Por otro lado, existe un problema asociado a la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos, el cual es ocasionado por la presencia de la resistencia en serie R_s que existe entre el electrodo que mide el voltaje y el interior celular. En la figura 29 se muestra un modelo eléctrico del efecto de R_s sobre el sistema (esquema sin la línea punteada y $V_s \neq 0$), en el cual se observa que, cuando se inyecta una corriente I_m a la célula, se genera un voltaje $V_s = I_m R_s$. Un buen sistema de fijación de voltaje debe lograr que $V_e \approx V_{02} = V_m$, pero en este circuito $V_m \neq V_c$ ya que ahora $V_c \approx V_{02} = V_m + V_s$, por lo que $V_c - V_s \approx V_m$. En otras palabras, V_m ya no es igual al voltaje comando V_c y el error se incrementa cuando la corriente I_m crece. Para resolver el problema es necesario sumar V_s al pulso comando V_c . El problema para sumar V_s es su variación en el tiempo ya que I_m no es constante. Como I_m sigue el mismo curso temporal de la salida V_{01} de A1, se puede emplear V_{01} con un escalamiento adecuado y sumarse a V_c para obtener $V_c + V_{01\text{escalado}} - V_s \approx V_m$. Ahora V_{01} se escala hasta que $V_{01\text{escalado}} = V_s$ de tal manera que nuevamente obtenemos $V_c \approx V_m$. Sin embargo, el circuito de compensación de la

resistencia en serie R_s que suma $V_{01\text{escalado}}$ a V_c es un circuito de retroalimentación positiva que torna inestable el sistema cuando $V_{01\text{escalado}}$ se aproxima a V_s . En la práctica $V_{01\text{escalado}}$ es aproximado sólo hasta un 90% de V_s , por lo cual V_m es diferente a V_c en un 10% de V_s .

El problema de la resistencia en serie R_s se discutió solamente para el caso particular de la técnica de fijación del voltaje con dos microelectrodos, pero también se presenta en las demás técnicas de fijación de voltaje. La solución en estos casos sigue el mismo principio.

7.2. Amplificador de fijación de voltaje para el registro de canal unitario

La solución de algunos problemas experimentales como de instrumentación, permitió la creación del sistema de fijación de voltaje (*Patch-clamp*). Una parte importante en el diseño de la técnica de *Patch-clamp*, es la gran amplificación de la señal de corriente con el empleo de un convertidor corriente-voltaje el cual fue descrito detalladamente por Sakmann y cols. Sin embargo, como se verá, el convertidor corriente-voltaje debe contener otros elementos importantes que permitan la eliminación de: las corrientes lineales de fuga, la compensación de corrientes capacitivas lineales, los voltajes de DC ocasionados por la interfase metal-solución electrolítica, etcétera; además, debe compensar los efectos de la resistencia en serie para garantizar una adecuada fijación del voltaje.

El sistema de fijación del voltaje consta de dos componentes principales que denominamos sonda y amplificador, como se ilustra en la figura 30.

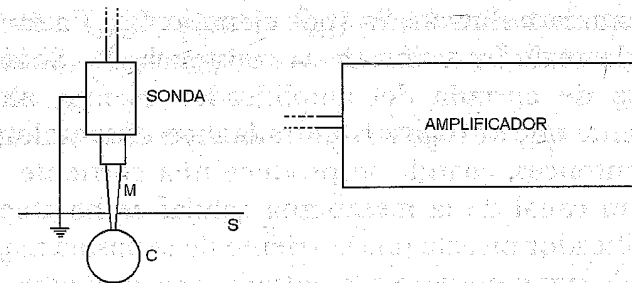


Figura 30. Sistema de fijación del voltaje (*Patch-clamp*). El esquema ilustra la sonda y el amplificador. A la izquierda se muestra la sonda que contiene un holder en su extremo inferior, sitio donde se inserta el microelectrodo. La sonda se monta sobre un micromanipulador para realizar movimientos finos que permitan la inserción del microelectrodo en la célula. La señal amplificada de la sonda se envía al amplificador el cual cuenta con elementos que permiten procesar la señal para una medición apropiada de las corrientes iónicas.

7.2.1. Sonda

La sonda contiene un convertidor de corriente a voltaje cuya configuración básica se muestra en la figura 31. La entrada inversora se mantiene al mismo potencial que

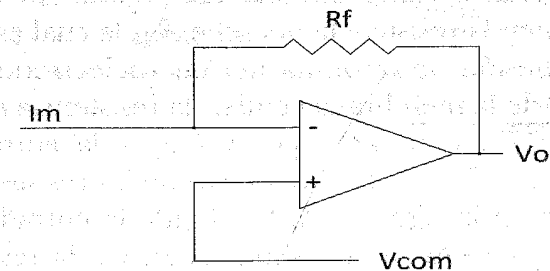


Figura 31. Diagrama en bloque del convertidor corriente-voltaje de la Sonda. R_f indica la resistencia de realimentación cuyos valores fluctúan entre $100\text{ M}\Omega$ y $10\text{ G}\Omega$. I_m indica la señal de corriente que se produce en la membrana celular por la aplicación de un pulso de fijación de voltaje V_{com} .

presenta la no inversora (por ejemplo V_{com}) a través del lazo de realimentación de la resistencia R_f . Si la impedancia de entrada del amplificador es muy alta y la corriente que se fuga a la entrada inversora es despreciable, entonces, cuando se produce una corriente I_m porque un canal de la membrana celular se ha abierto, el amplificador inyecta una corriente de la misma magnitud pero de signo opuesto a la entrada inversora para mantener el potencial V_{com} en ambas entradas. Por lo tanto se tiene

$$V_0 - V_{com} = I_f \cdot R_f = -I_m \cdot R_f. \quad (60)$$

La ecuación anterior indica la relación entre la corriente del canal I_m a medir con el voltaje de salida V_0 del convertidor. Como la magnitud de la corriente es muy pequeña, en el rango de los nanoamperes a picoamperes, es indispensable una gran amplificación de la corriente la cual se obtiene seleccionando valores muy grandes de la resistencia R_f , que oscila entre los 100 M y los 10 G Ω .

Debido a la magnitud de la corriente I_m , la eliminación de las fuentes de ruido es crítica para la obtención de una relación señal a ruido óptima. Las fuentes principales de ruido son: la resistencia del sello R_{se} , la cual esta dada por la adhesión de la punta del microelectrodo con la superficie de la membrana celular; la resistencia de realimentación R_f ; y el ruido por voltaje a la entrada del amplificador (figura 32a). El efecto de las resistencias se representa en la figura 32b. En donde la entrada inversora está conectada a la resistencia R_f y a la resistencia R_{se} .

Estas resistencias producen ruido (ruido Johnson) en el voltaje cuyo valor aproximado se obtiene de la siguiente expresión

$$V_{rms} = \sqrt{4 \cdot k \cdot T \cdot F_C \cdot R}, \quad (61)$$

en donde R representa a R_{se} o R_f , k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y F_c la frecuencia de corte.

Como el ruido en la corriente está dado por

$$I_{rms} = \frac{V_{rms}}{R} \quad (62)$$

entonces de la ecuación (2) tenemos

$$I_{rms} = \sqrt{\frac{4 \cdot k \cdot T \cdot F_C}{R}}. \quad (63)$$

Por lo tanto, el ruido producido por las resistencias R_{se} y R_f decrecen como $1/(R)^{1/2}$. Éste es el motivo por el cual se emplean, además de la amplificación, valores de 10 G Ω en R_f .

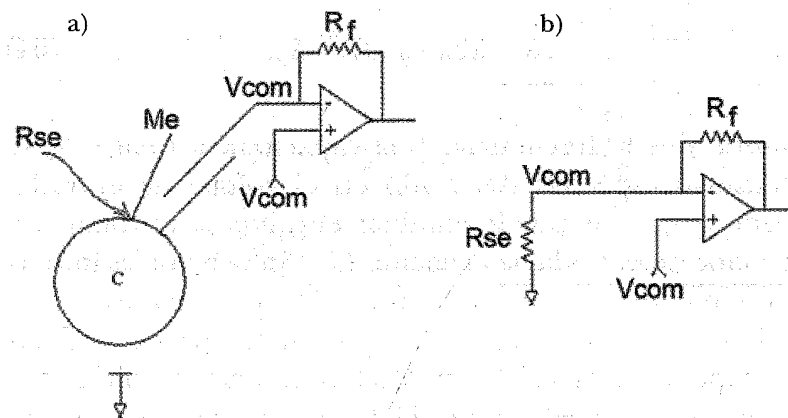


Figura 32. Modelo eléctrico de las fuentes de ruido de origen resistivo en el convertidor de corriente a voltaje. a) Las fuentes de ruido provienen de la resistencia R_f y la que se forma por la unión de la superficie de la punta del microelectrodo con la superficie de la membrana R_{se} . En b) se muestra el circuito eléctrico equivalente. M_e y C indican microelectrodo y célula respectivamente.

Por otro lado, la resistencia del sello R_{se} está dada por la unión de la superficie de la punta del microelectrodo de registro con la superficie de la membrana celular. Es indispensable la obtención de valores de R_{se} entre 5 y 50 $G\Omega$ (por eso se le llama gigasello) para obtener una buena relación señal/ruido. Si no se obtiene el gigasello el ruido predomina sobre la señal cuando ésta es de unos cuantos picoamperes.

El efecto del ruido en el voltaje de entrada del amplificador se origina en el transistor JFET usado en la etapa de entrada para garantizar una alta impedancia de entrada. El ruido en el voltaje de entrada genera una corriente capacitiva a través de las capacitancias parásitas presentes en la etapa de entrada, la cual incrementa con la frecuencia con una densidad espectral de la corriente de entrada dada por

$$S_i = (2\pi \cdot f \cdot C)^2 \cdot S_v, \quad (64)$$

donde f es la frecuencia, C la capacitancia total y S_v la densidad espectral del ruido en el voltaje de entrada. Dado que no se puede eliminar el ruido en el voltaje de la etapa de entrada, la ecuación (64) indica que es importante eliminar o disminuir las capacitancias parásitas.

Las fuentes principales de capacitancias parásitas C_p en la etapa de entrada son (figura 33): a) en el amplificador operacional en las uniones FET y entre la entrada y tierra (C_{pt}); b) entre el aditamento *holder* para conectar el microelectrodo Me con el amplificador y tierra (C_{ph}); c) entre el microelectrodo y tierra, en la porción no sumergida (C_{pns}) y especialmente en la porción sumergida (C_{ps}) en la solución electrolítica Se que contiene a las

células por registrar. Con un buen diseño de amplificador, las recomendaciones experimentales para disminuir las capacitancias parásitas y la obtención de buenos sellos (gigasellos), las contribuciones a la magnitud del ruido de la electrónica, del microelectrodo y de los sellos son aproximadamente iguales.

Es importante que la sonda se encuentre lo más cercano a la fuente de la señal (célula) para evitar el ruido por corrientes capacitivas que se ocasionan con cables largos. Además, debe encontrarse dentro de una caja de Faraday para evitar ruido eléctrico principalmente de las líneas de alimentación (ruido de 60 Hz). El circuito de la sonda se acopla eléctricamente al Amplificador a través de un cable de varios hilos blindado.

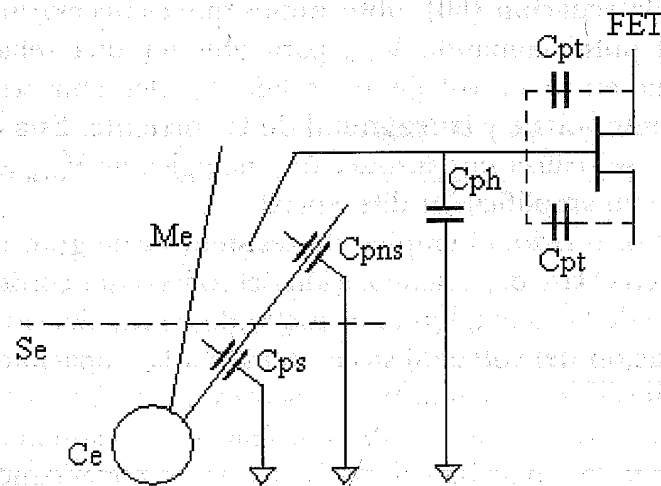


Figura 33. Capacitancias parásitas. La figura ilustra las fuentes de capacitancias parásitas: en las entradas FET del amplificador (C_{pt}), en la porción del microelectrodo Me no sumergido (C_{pns}) y en la porción sumergida (C_{ps}) en la solución electrolítica Se . La célula se indica con C_e .

7.2.2. Amplificador

En el amplificador se encuentran los controles de estimulación y de ajuste del sistema de fijación del voltaje (figura 30) operados por el usuario para un registro óptimo.

El amplificador realiza la suma del potencial de DC y de los pulsos de fijación de voltaje ($V_h + V_{com}$ en las figuras 25 y 26) que se aplicarán a la sonda. Con el voltaje de DC + V_h se polariza la membrana celular al valor deseado por el usuario. Es posible seleccionar voltajes positivos o negativos. Esto es indispensable ya que las diferentes configuraciones de la técnica de *Patch-clamp* (ver más adelante) emplean voltajes de DC con diferente polaridad.

De la ecuación (60), observamos que es necesario restar el pulso comando V_{com} para obtener una relación directa entre el voltaje de salida V_o del convertidor corriente voltaje y la magnitud de la corriente. Esta operación se realiza por sustracción analógica de V_{com} a través de un amplificador diferencial.

Por otro lado, el empleo de resistencias de gran magnitud en el lazo de realimentación del convertidor corriente-voltaje de la sonda, limita el ancho de banda del sistema de fijación del voltaje. Esto es debido a las capacitancias parásitas que presentan los resistores. En la figura 34 se ilustra el convertidor corriente-voltaje cuya resistencia R_r presenta la capacitancia parásita C_{pr} . Si conectamos la resistencia R_r a la entrada del convertidor y aplicamos un pulso rectangular de voltaje V_{com} , se producirá la corriente rectangular I_p a través de R . Sin embargo, la salida V_o del convertidor no es rectangular como indica la ecuación (1) sino exponencial con una constante de tiempo $\tau = R_r \cdot C_{pr}$, o sea

$$V_o - V_{com} = -i_p \cdot R_r \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right]. \quad (65)$$

Existe un circuito de compensación para corregir la respuesta lenta del convertidor, el cual consiste de un diferenciador para derivar la señal.

El principio de compensación se ilustra en la figura 34, en el trazo superior se tiene la respuesta del convertidor y en el inferior la señal derivada, se puede observar que al sumar los trazos se recupera el curso temporal de la señal de entrada. Las expresiones para ambos trazos son

$$V_o = -i_p \cdot R_r \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] \quad (66)$$

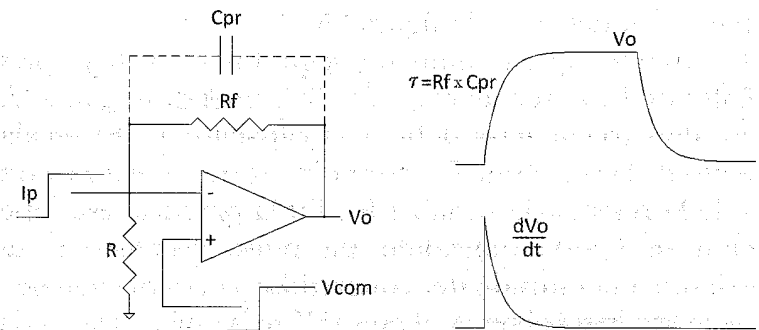


Figura 34. Efecto de la capacitancia parásita del resistor de retroalimentación sobre la salida del convertidor corriente-voltaje. Al aplicar un pulso de voltaje rectangular V_{com} , se induce un pulso de corriente rectangular I_p a través de R . La magnitud y curso temporal de I_p se mide con el convertidor corriente-voltaje, pero la salida V_o no es rectangular como se esperaba, su curso temporal es exponencial con una constante de tiempo $\tau = R_r \cdot C_{pr}$. R_r y C_{pr} indican la resistencia de retroalimentación y capacitancia parásita respectivamente. El trazo inferior de la derecha indica la derivada de V_o con respecto al tiempo.

y

$$\frac{dV_o}{dt} = -\frac{i_p \cdot R_r}{\tau} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (67)$$

Al realizar la suma de V_o y dV_o/dt escalada por t tenemos de las ecuaciones (66) y (67)

$$V_o + \tau \cdot \frac{dV_o}{dt} = -i_p \cdot R_r \quad (68)$$

Este procedimiento de compensación es válido independientemente de la morfología de la señal de entrada. El circuito que realiza la operación indicada en la ecuación (68), o sea, la derivada de la señal con su escalamiento y la suma de la señal de salida del convertidor corriente-voltaje, se muestra en la figura 35.

El circuito opera como un seguidor de voltaje para señales de baja frecuencia, pero incrementa su ganancia para altas frecuencias debido al capacitor C. El escalamiento de la constante de tiempo $\tau = R \cdot C$, se realiza a través de la resistencia variable R_1 . En la práctica, esta operación se realiza aplicando un pulso rectangular de corriente a la entrada del convertidor corriente-voltaje y R_1 se ajusta hasta obtener el pulso V'_o más rápido a la salida.

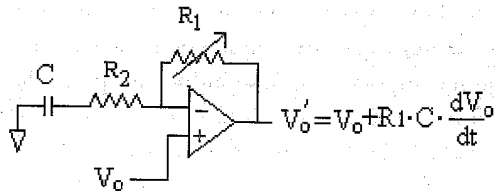


Figura 35. Circuito de compensación de capacitancias parásitas. La salida V_o del convertidor corriente voltaje se acopla al circuito de compensación, el cual suma a V_o la deriva de V_o escalada con R_1 .

Además de las corrientes iónicas no lineales producto de la apertura de los canales voltaje dependientes, también se obtienen corrientes lineales a las cuales se les denomina corrientes de fuga. Las corrientes de fuga I_f (figura 36) son corrientes lineales que se producen a través del sello R_{se} que se forma en la unión del microelectrodo con la superficie de la membrana celular (R_{se} en la figura 36). También se produce una corriente de fuga I_f a través de canales iónicos que se encuentran siempre abiertos y que no dependen del voltaje. Es indispensable la eliminación de estas corrientes lineales para obtener únicamente las corrientes que dependen del voltaje.

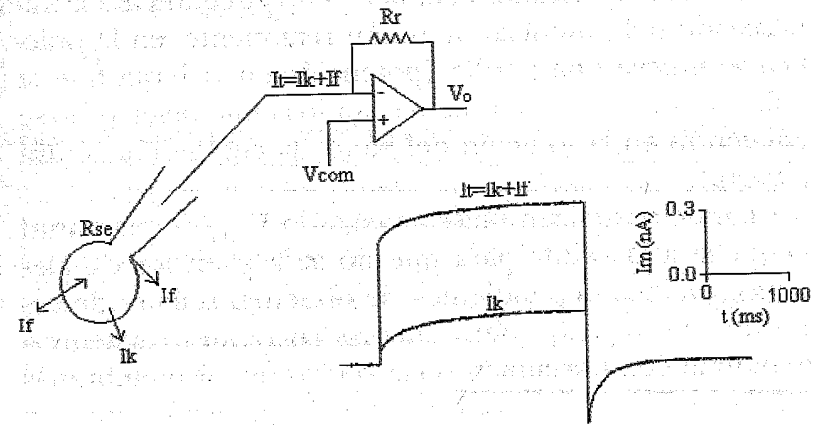


Figura 36. Resta de corrientes lineales. Al aplicar un pulso comando V_{com} se induce una corriente no lineal de K^+ (I_k) y una de fuga lineal (I_f) en la membrana celular. También se genera una corriente de fuga lineal (I_f) en la resistencia R_{se} formada por la unión de las superficies de la membrana celular y la punta del microelectrodo. I_t indica la corriente total (trazo mayor de corriente) a la cual se le resta la corriente de fuga I_f para obtener I_k únicamente (trazo menor de corriente). En las unidades, I_m indica corriente de membrana.

El amplificador cuenta con un sistema analógico para la eliminación de la corriente de fuga como se ilustra en la figura 36. En el ejemplo, la aplicación de un pulso de voltaje a la célula, produce una corriente de K^+ y una de fuga que se suman (trazo superior). Al restar la corriente de fuga, permanece la corriente de K^+ (trazo inferior).

Otro aspecto es el voltaje de DC denominado potencial de unión, producido por la interfase metal/líquido ocasionado por el metal que conecta eléctricamente la entrada del convertidor corriente-voltaje de la sonda con la solución electrolítica del microelectrodo que da la continuidad eléctrica con la célula. El metal en contacto con la solución electrolítica que se emplea es plata clorada, para disminuir el potencial de DC y evitar que cambie en el tiempo. El amplificador cuenta con un circuito para la eliminación del potencial de unión remanente, en la práctica se mueve una perilla (potenciómetro) hasta que la señal de corriente sea de cero cuando el microelectrodo se encuentra en la solución del baño (la cual se encuentra a tierra).

Cuando se aplican pulsos comando V_{com} de magnitud pequeña a la célula para que no se activen los canales iónicos voltaje dependientes, se obtienen señales de corrientes de fuga I_f , pero además corrientes capacitivas debido al comportamiento capacitivo de las membranas celulares. Estas corrientes capacitivas aparecen al inicio y final del pulso rectangular de fijación del voltaje. Pueden ser de gran magnitud y es indispensable su eliminación. En la figura 37 se ilustra el tipo de señal de corriente que se obtiene al aplicar a una célula un pulso comando V_{com} de 10 mV a partir de un potencial de DC (V_h) de -70 mV.

Al inicio del pulso V_{com} , se produce una corriente capacitiva I_c que dura el tiempo que tarda la membrana celular en adquirir el valor del pulso comando V_{com} , esta

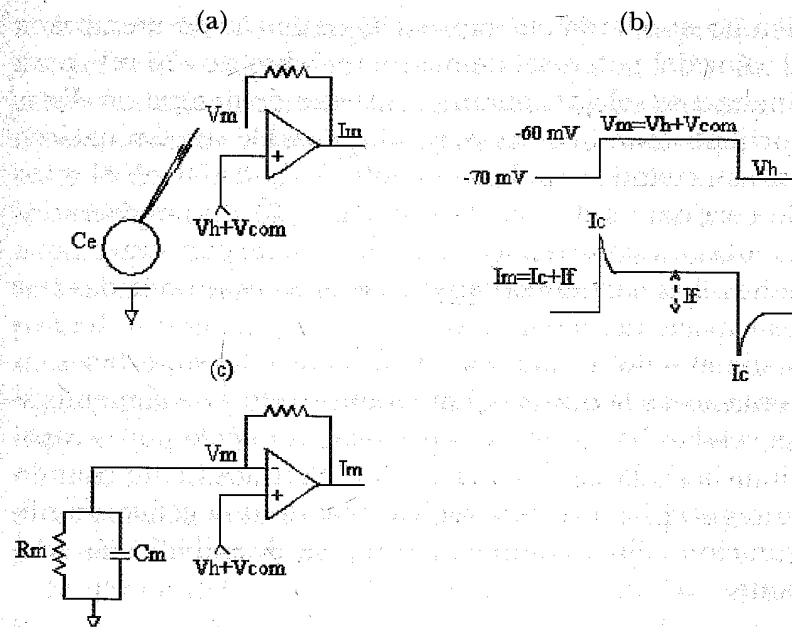


Figura 37. Corrientes de membrana lineales inducidas por un pulso de fijación de voltaje de magnitud pequeña. En (a) se polariza la célula C_e con un voltaje de DC ($V_h = -70$ mV) típico, posteriormente se aplica un pulso comando V_{com} de 10 mV cambiando el potencial de membrana V_m a -60 mV (trazo superior en (b)). V_{com} induce las corrientes membrana I_m lineales tanto capacitiva (I_c) como iónica (I_f) como se observa en el trazo inferior de (b). En (c) se muestra un circuito equivalente que simula las propiedades pasivas de la membrana. Cuando se aplica $V_h + V_{com}$ como en (a), se reproduce la corriente de membrana de (b) mediante la selección adecuada de R_m y C_m .

corriente es ocasionada por el componente capacitivo de la membrana celular y su valor es $I_c = C_m \cdot (dV/dt)$, posteriormente la corriente capacitiva decrece con una constante de tiempo t_m cuyo valor es el producto $C_m \cdot R_m$. La otra corriente que se suma a la capacitiva es la de fuga I_f . Al final del pulso comando V_{com} nuevamente se genera una corriente capacitiva de signo opuesto que dura el

tiempo que tarda en retornar el potencial de membrana al valor del potencial de mantenimiento de -70 mV, para finalmente relajar con una constante de tiempo t_m . Estas corrientes son lineales y es indispensable su eliminación; esto es, cuando se aplique el pulso V_{com} de 10 mV el trazo de corriente debe ser de cero ($I_m = 0$). El amplificador cuenta con un sistema de eliminación de corrientes capacitivas. Las corrientes capacitivas lineales producidas por las capacitancias parásitas se eliminan cuando se ha formado el sello de alta impedancia entre las superficies en contacto de la punta del microelectrodo y de la membrana celular. La corriente capacitiva producida por la capacitancia de la membrana se elimina únicamente cuando se registra la corriente iónica total de una célula (configuración célula completa) como se describirá más adelante.

7.3. Configuraciones de la técnica de Patch-clamp

Existen cuatro configuraciones posibles de registro con la técnica de fijación del voltaje *Patch-clamp*, las cuales son: *Whole cell*, *Inside-out*, *Outside-out* y *Cell-attached*.

7.3.1. Técnica de fijación de voltaje en la variedad de célula completa (*Whole cell*)

En la variedad de célula completa es necesario romper la membrana celular mediante succión en el interior del microelectrodo para tener acceso eléctrico al interior celular. Se emplea el mismo diseño eléctrico que en el caso del registro de canal unitario, pero como la corriente es de magnitud mayor (normalmente nanoamperes), la

resistencia del lazo de realimentación del convertidor de corriente a voltaje es menor (entre 100 y 500 M Ω). En la mayoría de los casos una resistencia R_r de 500 M Ω es suficiente, con una relación corriente/voltaje de 2 nA/V.

La técnica de fijación del voltaje en su variedad de célula completa permite la medición de la corriente macroscópica que se produce por los canales distribuidos en toda la membrana celular. En este caso es necesario compensar las corrientes capacitivas de la membrana y parásitas ocasionadas cuando se aplican los pulsos comando V_{com} (figura 33), ya que éstas se suman a las corrientes iónicas que se desea medir, y por su magnitud, pueden saturar al amplificador cuando las corrientes iónicas se amplifican, además afectan la velocidad en que se fija el potencial de membrana.

El diseño del circuito de compensación de las capacitancias se realiza conectando un capacitor a la entrada del convertidor corriente a voltaje de la sonda (figura 30), al cual se le aplica la señal del pulso comando V_{com} , previamente filtrada por un filtro pasa bajas de constante de tiempo variable. El usuario controla la constante de tiempo y la amplitud de ésta señal operando τ y A en el amplificador (figura 30). El propósito es producir corrientes capacitivas de amplitud y constante de tiempo variable que compensen las corrientes capacitivas de la membrana y parásitas. Una buena compensación elimina prácticamente toda la corriente capacitiva lineal.

Por otro lado, los efectos de la resistencia en serie R_s , también tienen que ser compensados, el procedimiento sigue los principios ya comentados en la técnica de dos microelectrodos.

7.3.1.1. Efecto de la resistencia en serie

Existe un problema asociado a la técnica de fijación del voltaje, el cual es ocasionado por la presencia de la resistencia en serie R_s que existe entre el microelectrodo de registro y la membrana celular (figura 38). En la configuración de célula completa, el microelectrodo no se localiza en la vecindad inmediata a la membrana celular; la continuidad eléctrica entre el microelectrodo y el lado interno de la membrana celular está dada por el citoplasma que presenta una resistencia finita R_s . Su efecto se puede observar de la siguiente manera: si suponemos que R_s es cero (línea punteada con $V_s = 0$, figura 38), entonces $V_{com} = V_m$. Sin embargo, si $R_s \neq 0$, cuando se inyecta una corriente I_m para mantener el potencial de membrana V_m al valor de V_{com} , se genera un voltaje $V_s = I_m \cdot R_s$. Un buen sistema de fijación del voltaje debe lograr que $V_{com} = V_m$, pero en presencia de R_s no es el caso ya que $V_{com} \approx V_m$ y ahora $V_{com} \approx V_s + V_m$ por lo que $V_{com} - V_s \approx V_m$. En otras palabras, V_m ya no es igual al voltaje comando V_{com} y el error se incrementa cuando la corriente I_m aumenta.

Este problema se resuelve al sumar V_s al pulso comando V_{com} . El problema para sumar V_s es su variación en el tiempo ya que I_m no es constante y por lo tanto V_s tampoco. Como I_m sigue el mismo curso temporal de la salida del convertidor corriente voltaje, se emplea su salida (corregida en ancho de banda) para sumarse con un escalamiento adecuado a V_{com} para obtener $V_{com} + V_{escalado} - V_s \approx V_m$. Se escala hasta que $V_{escalado} = V_s$ de tal manera que nuevamente obtengamos $V_{com} \approx V_m$. Sin embargo, el circuito de compensación de R_s es un circuito de retroalimentación positiva que torna inestable el sistema cuando $V_{escalado}$ se aproxima a V_s . En la práctica $V_{escalado}$ se aproxima sólo hasta un 90 % de V_s .

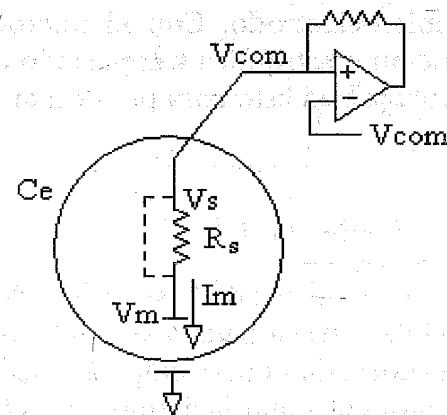


Figura 38. Circuito equivalente de la resistencia en serie. C_e representa la célula, R_s la resistencia en serie, V_m el potencial de membrana, V_s el potencial por efecto de la resistencia en serie, V_{com} el potencial comando. La línea punteada indica $R_s = 0$. I_m es la corriente inyectada por el convertidor corriente-voltaje.

7.3.1.2. Microelectrodos

El valor de las resistencias de los microelectrodos debe seleccionarse de acuerdo al tamaño de las células; las células grandes permiten resistencias de hasta $0.5 \text{ M}\Omega$ y células pequeñas de $7 \text{ M}\Omega$. La punta del microelectrodo debe ser pulida con calor.

Las soluciones electrolíticas del baño y del microelectrodo dependen del tipo celular y debe consultarse la literatura especializada. En las soluciones de los microelectrodos es conveniente que contengan muy baja concentración de Ca^{++} para lo cual se pueden emplear agentes quelantes como el EGTA. La altura de la solución del baño que contiene las células, debe ser lo más baja posible para disminuir la capacitancia parásita de la porción

sumergida del microelectrodo. Con el microelectrodo lleno con la solución electrolítica y conectado al convertidor corriente-voltaje está listo para ponerlo en contacto con la célula.

7.3.1.3. Procedimiento experimental

Se aproxima el microelectrodo hasta colocarlo en la superficie de la célula seleccionada y se aplica una ligera presión negativa (normalmente se emplea una jeringa) al microelectrodo para succionar la membrana celular y obtener un gigasello (figura 39a).

En este momento se mide la corriente que se obtiene por la aplicación de un pulso comando V_{com} de magnitud pequeña (5 mV por ejemplo) para observar si se formó el gigasello. La resistencia debe estar en el orden de los G Ω . Si es un buen sello, se procede a cancelar las corrientes capacitivas empleando las perillas τ y A en la figura 30. Posteriormente se aplica una segunda succión en el microelectrodo para romper la membrana celular (figura 39b). Sabemos que se ha logrado la ruptura de la membrana por la aparición de corrientes transitorias capacitivas ocasionadas por el pulso de 5 mV.

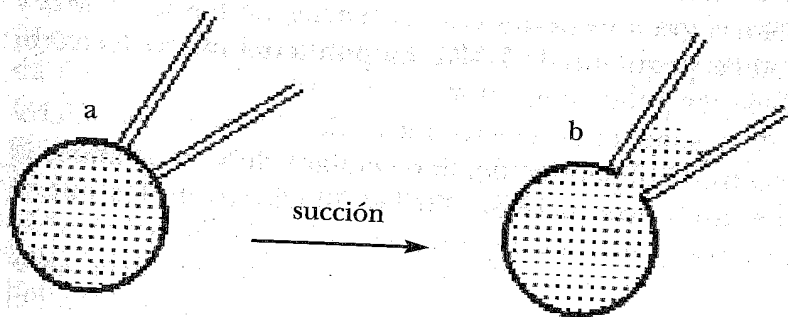


Figura 39. Técnica de ruptura de la membrana celular durante un experimento de *Patch-clamp* en su variedad de célula completa.

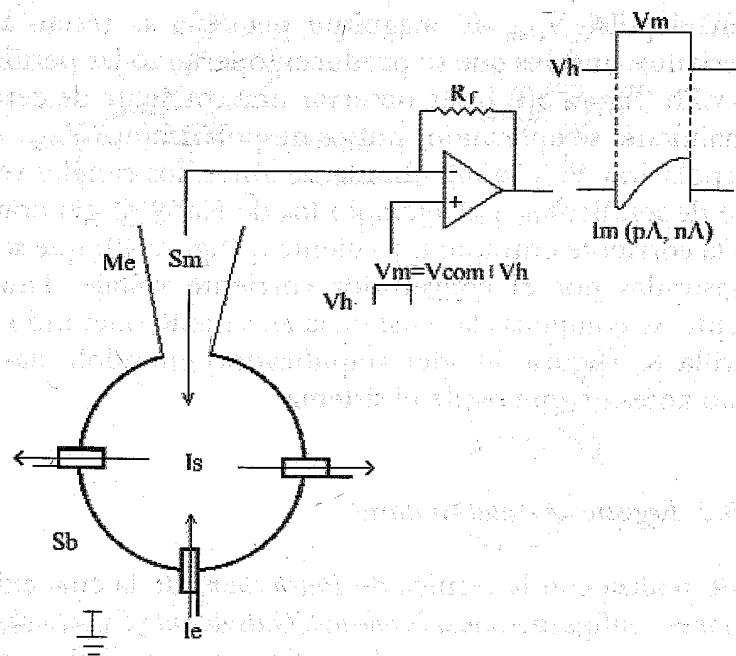


Figura 40. Técnica de fijación de voltaje en su variedad de célula completa. Se rompe la membrana celular para tener continuidad eléctrica entre el microelectrodo Me y el interior de la célula. La técnica permite controlar el medio iónico intracelular con la solución electrolítica del microelectrodo Sm. La célula se polariza aplicando un potencial de DC V_h y se aplican pulsos comando V_{com} , los cuales ocasionan la apertura de los canales iónicos generándose la corriente saliente I_s y la entrante I_e . La corriente macroscópica es del orden de los nanoamperes nA en la mayoría de las células o de varios cientos de picoamperes. El potencial de membrana es $V_m \approx V_{com} + V_h$. $I_m = I_s + I_e$.

Bajo estas condiciones, la solución electrolítica del microelectrodo difunde al interior celular (Sm, figura 40) y además, se tiene continuidad eléctrica entre el interior celular y el convertidor corriente-voltaje.

Después se polariza la célula aplicando un voltaje de DC negativo con la perilla V_h (figura 30) del amplificador.

Con el pulso V_{com} de magnitud pequeña se restan las corrientes lineales que se producen operando las perillas F_p y F_b (figura 30) hasta observar una corriente de cero. Finalmente se aplican los pulsos despolarizantes V_{com} . Al despolarizar V_{com} la membrana, se abren los canales voltaje dependientes, por ejemplo los de Na^+ y K^+ generando la corriente entrante I_e y saliente I_s (figura 40) que son registradas por el convertidor corriente voltaje. Finalmente, se compensa la resistencia en serie R_s operando la perilla R_s (figura 30) del amplificador, girándola hasta justo antes de que oscile el sistema.

7.3.2. Registro de canal unitario

Se realiza con la técnica de *Patch-clamp* de la cual existen tres configuraciones, *Inside-out*, *Outside-out* y *Cell-attached*. En este caso, la resistencia de realimentación R_f del convertidor corriente-voltaje debe ser de $10\text{ G}\Omega$ para una relación corriente/voltaje de 100 pA/V . La resistencia del microelectrodo fluctúa entre 5 y $10\text{ M}\Omega$ aproximadamente una vez que se ha pulido la punta con calor. Además, el cuello del microelectrodo cercano a la punta se cubre con un polímero como el Sylgard (Sigma) para disminuir las capacitancias parásitas.

7.3.3. Configuración *Outside-out*

En la configuración *Outside-out*, se procede de manera similar al descrito en la configuración de célula completa, pero una vez rota la membrana celular se retira el microelectrodo separando un parche de membrana como se muestra en la figura. 41.

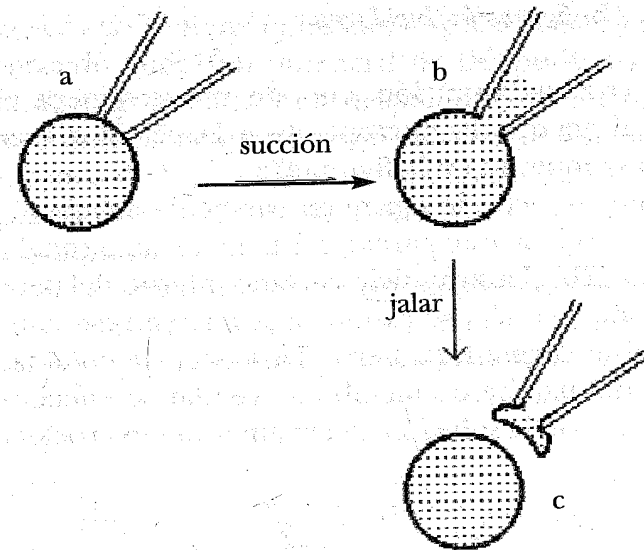


Figura 41. Técnica experimental para obtener la configuración *outside-out* que permite registrar la corriente mediada por un solo canal iónico. En a) formación del gigasello, en b) ruptura de la membrana por succión. En c) se retira el microelectrodo separando un parche de membrana. En esta configuración de registro el lado externo de la membrana está en contacto con la solución del baño.

En este caso, únicamente se registra la corriente mediada por uno o varios canales iónicos. Los lados interno y externo de la membrana celular se conservan igual a la configuración de célula completa; por lo tanto, se polariza el parche con voltaje negativo con la perilla V_h y se despolariza el parche con pulsos comando V_{com} positivos para incrementar la probabilidad de apertura del canal (figura 30).

7.3.4. Configuración *Inside-out*

En esta configuración, nuevamente se obtiene el gigasello al acercar la micropipeta a la célula y succionar como se muestra en la figura 42a.

El microelectrodo separa un parche de membrana celular de la célula, este parche contiene un solo canal iónico (figura 42b). La superficie del lado interno del parche de membrana celular se expone a la solución del baño, por lo cual se encuentra a tierra. La superficie en el lado externo del parche de membrana celular se encuentra en contacto con la solución electrolítica del microelectrodo.

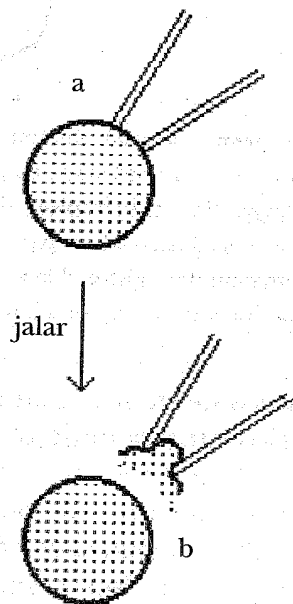


Figura 42. Técnica experimental para obtener la configuración *inside-out* que permite registrar la corriente mediada por un solo canal iónico. En a) formación del gigasello, en b) se retira el microelectrodo separando un parche de membrana. En esta configuración de registro el lado interno de la membrana está en contacto con la solución del baño.

Una vez que se tiene el parche se polariza la membrana aplicando ahora un potencial de DC positivo con la perilla V_h (figura 30). Para despolarizar la membrana celular e inducir la apertura del canal iónico se aplican pulsos comando V_{com} negativos. En esta configuración V_h y V_{com} son de signo opuesto al de la configuración de célula completa.

Cuando se modifica el potencial de membrana V_m hasta un cierto valor umbral por la aplicación del pulso comando V_{com} , aumenta la probabilidad de apertura del

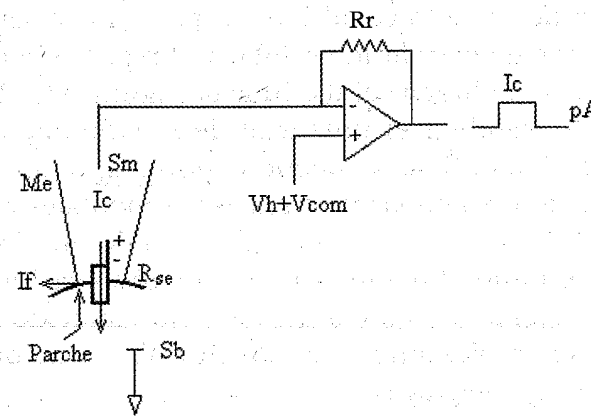


Figura 43. Técnica de fijación del voltaje *patch-clamp* en su variedad de registro de canal unitario *inside-out*. Con la punta del microelectrodo Me sobre la superficie de la célula, se produce una ligera presión negativa en el microelectrodo para fijar mecánicamente un parche de membrana. Posteriormente se retira el microelectrodo arrancando el parche de membrana de la superficie de la célula; el lado externo de dicho parche de membrana queda en contacto con la solución electrolítica del microelectrodo Sm, el lado interno del parche queda en contacto con la solución del baño Sb el cual se encuentra a tierra. Se polariza el parche con un voltaje V_h y se estimula con los pulsos V_{com} ; la despolarización del parche aumenta la probabilidad de apertura del canal generando la corriente unitaria I_c en el rango de los picoamperes. En estos registros es importante obtener resistencias muy altas (gigaohms) entre la superficie de la punta del microelectrodo y el parche (R_{se}) para disminuir la corriente de fuga I_f y mejorar la relación señal/ruido.

canal obteniéndose una corriente unitaria la cual se observa a la salida del convertidor como un pulso rectangular de corriente I_m ; la magnitud de la corriente es de unos cuantos picoamperes (figura 43).

7.3.5. Configuración de *Cell-attached*

Finalmente, en la configuración de *Cell-attached*, se procede de manera similar a los casos anteriores hasta la obtención del gigasello. En este caso, también se registra la corriente de un solo canal iónico, pero no se separa ningún parche de membrana celular y el registro se lleva a cabo con la membrana celular intacta (figura. 44). Aquí no es posible cambiar el potencial de membrana a un valor seleccionado. Sólo se puede conocer aproximadamente empleando algunas técnicas experimentales y por el potencial de membrana promedio medido en el tipo celular en estudio. En este caso, para despolarizar la membrana celular (aunque a un valor no conocido con precisión), se emplea un voltaje de DC (V_h) o un pulso comando (V_{com}) negativos.

8. ANÁLISIS DE LAS CORRIENTES IÓNICAS MACROSCÓPICAS TRANSMEMBRANALES

8.1. Dependencia del voltaje y cinética de las corrientes iónicas

La técnica de *Patch-clamp* en su variedad de célula completa (también con la técnica de fijación del voltaje con dos microelectrodos) permiten medir la corriente iónica que se produce a través de toda la superficie; sin embargo, hay un problema. Como se muestra en la figura 45a,

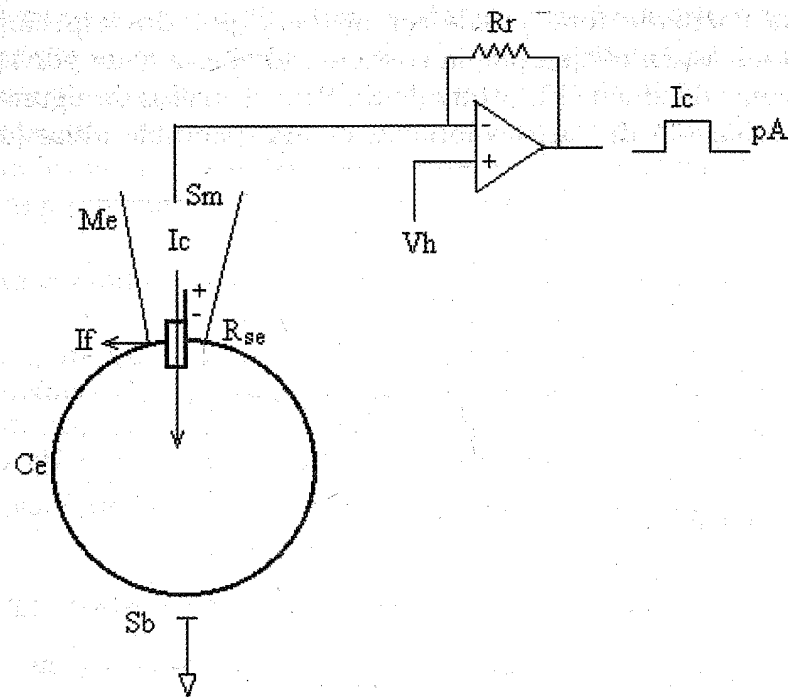


Figura 44. Técnica de fijación del voltaje *Patch-clamp* en su variedad de registro de canal unitario *Cell-attached*. Con el microelectrodo Me sobre la superficie de la célula Ce, se produce presión negativa en el microelectrodo fijando mecánicamente un parche de membrana, el cual se aísla eléctricamente del resto de la membrana celular. Se cambia el potencial del parche aplicando un voltaje de DC V_h , el cual aumenta la probabilidad de apertura del canal generando la corriente unitaria I_c . La magnitud de la corriente está en el rango de los picoamperes. En esta configuración no se puede conocer el potencial que existe a través del canal ya que no hay acceso eléctrico al interior celular; sin embargo, podemos modificar el potencial de membrana del parche aplicando el voltaje V_h . Esta configuración permite estudiar los canales lo más cercano a su estado normal ya que no se afecta el interior celular. El valor de R_{se} debe ser de gigaohmios para disminuir I_f y mejorar la relación señal/ruido. S_m y S_b indican las soluciones electrolíticas en el microelectrodo y en el baño respectivamente.

la corriente total puede ser mediada por dos especies iónicas; en el ejemplo, la corriente total está dada por la suma de una de Na^+ y otra de K^+ . Para el análisis de alguna población de canales iónicos, es indispensable aislar la

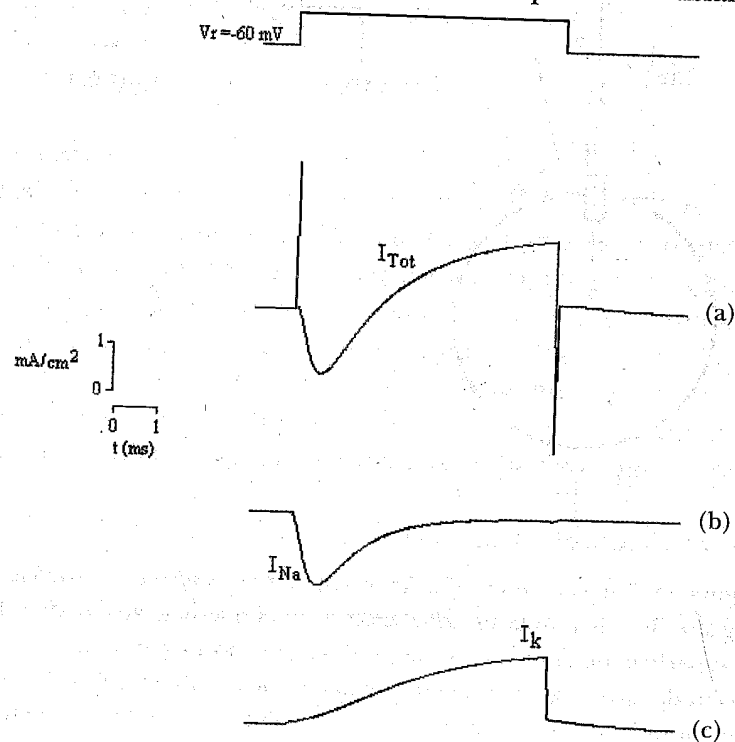


Figura 45. Corrientes de Na^+ y K^+ . En (a) se muestran las corrientes: capacitivas al inicio y final del pulso comando V_{com} , la corriente iónica total (I_{Tot}) inicial negativa es mediada por los iones de Na^+ que disminuye espontáneamente (inactiva), la corriente de K^+ positiva de aparición más tardía no disminuye (no inactiva). En (b) y (c) la separación de corrientes iónicas. En (c) la sustitución del Na^+ por otro catión impermeable o un bloqueador de canales de Na^+ elimina la corriente de Na^+ permaneciendo únicamente la de K^+ . (b) La resta de la corriente de K^+ a la corriente total separa la corriente de Na^+ . El protocolo de estimulación se muestra en el trazo superior.

corriente en estudio eliminando al resto. Para este propósito se sustituye la especie iónica que da origen a la corriente que se desea eliminar, por ejemplo al Na^+ , por otro catión monovalente impermeable; de esta manera, únicamente se producirá la corriente de K^+ (figura 45c). Es posible obtener la corriente de Na^+ al restar la corriente de K^+ de la corriente total (figura 45b). Otra alternativa comúnmente empleada para la eliminación de alguna corriente es la utilización de bloqueadores selectivos para alguna población de canales. Por ejemplo, la tetrodotoxina es un agente farmacológico que elimina la corriente de Na^+ al bloquear los canales de Na^+ . Es vital la disección de las corrientes iónicas para hacer un estudio apropiado de las diferentes poblaciones de canales iónicos.

8.2. Separación por el tiempo de medición

Si los canales iónicos que contribuyen en la composición de la corriente de la membrana tienen una cinética diferente, es posible separar las corrientes individuales al medirlas mediante pulsos de fijación de voltaje de duración adecuada. Por ejemplo, en axón de calamar, la corriente medida después de una despolarización de 10 ms, representará únicamente la contribución de los canales de K^+ , ya que en ese momento, los canales de Na^+ ya se han inactivado. Sin embargo, este método es adecuado sólo en algunos casos.

8.3. Separación por sustitución iónica

Este método puede ser usado para identificar y separar las corrientes en términos de las especies iónicas que generan la corriente total. El ejemplo clásico se encuentra

en los estudios realizados por Hodgkin y Huxley en axón de calamar. Desde un potencial de mantenimiento de -65 mV, se despolariza con un pulso hasta un potencial de -9 mV, y se registra la corriente, primero, en agua de mar y después en solución salina que contiene sólo el 10% de Na^+ de lo que contiene el agua de mar. Se sabe que en el axón predominan dos clases de canales, por lo tanto, en la preparación con 10% de Na^+ , la corriente medida es la que fluye por los canales de K^+ y la corriente que fluye a través de los canales de Na^+ , se puede obtener al restar esta corriente, de la medida en agua de mar. Si se utiliza perfusión intracelular, la sustitución iónica se puede realizar tanto en la solución intracelular como en la extracelular. Esto se puede hacer con la técnica de célula completa o *whole cell*. El método de sustitución iónica no puede ser usado para separar las corrientes que pasan a través de diferentes canales que tienen al mismo ion permeable, por ejemplo, diferentes tipos de canales de K^+ .

8.4. Separación farmacológica

Se sabe que algunas sustancias actúan como bloqueadores de canales iónicos. Tales bloqueadores pueden actuar por dentro o por fuera de la membrana. Algunos bloqueadores, con alta afinidad, actúan en concentraciones nanomolares, mientras que en otros casos se requieren concentraciones micromolares. Algunos bloqueadores son específicos para un tipo de canal, mientras que otros pueden bloquear diversos tipos de canal, generalmente con diferente afinidad. Estos bloqueadores de canales son una importante herramienta para la separación de corrientes y para la identificación de tipos de canales. Las sustancias bloqueadoras se utilizan de dos diferentes formas en la separación de corrientes.

Primera: es posible bloquear todas las corrientes, con excepción de la que resulta de interés. Esto puede involucrar a uno o más bloqueadores, en ocasiones combinándolos con la sustitución iónica.

Segunda: se puede usar un bloqueador específico para el canal de interés. La corriente es registrada en presencia y ausencia del bloqueador y la corriente requerida se obtiene por sustracción.

8.5. Dependencia del voltaje

El análisis de las corrientes iónicas aisladas con respecto al potencial de membrana brinda información sobre la dependencia del voltaje de una población de canales iónicos. Sin embargo, también es frecuente el análisis teórico y experimental de un solo canal iónico cuyos resultados pueden reproducir el comportamiento de toda la población de canales en función del potencial de membrana. En la práctica se emplean ambos tipos de análisis. A continuación se describe la relación que existe entre un solo canal iónico y la población de canales iónicos a la que pertenece.

El canal puede estar en dos estados, abierto que es permisivo y cerrado que es no permisivo. En el estado abierto el canal presenta una conductancia constante, por ejemplo g_{xi} , donde x indica la población de canales x que permiten el paso de los iones x e i indica el i -ésimo canal.

Por lo tanto, por la ley de Ohm, cuando se abre un canal se genera la corriente unitaria (de un solo canal iónico)

$$I_{xi} = g_{xi} \cdot (V_m - V_x) \quad (69)$$

donde V_x indica el potencial de equilibrio del ion x .

Los canales dependientes del voltaje presentan un *voltaje umbral* de activación en el cual incrementan su probabilidad de apertura e inicia la corriente iónica (*activación de la corriente*).

Para un potencial de membrana V_m supraumbral se inducirá una corriente de membrana I_x la cual estará dada por

$$I_x(V_m) = g_x(V_m) \cdot (V_m - V_x). \quad (70)$$

La corriente total de membrana I_x (suma de las corrientes unitarias I_{xi}) es dependiente del potencial de membrana V_m ya que para V_m menor o igual al V_{umbral} , se incrementa la probabilidad de apertura de los canales generando cada uno la corriente dada por la expresión (4).

De las ecuaciones (69) y (70) tenemos

$$\begin{aligned} I_x(V_m) &= \sum_{i=1}^k I_{xi} = \sum_{i=1}^k g_{xi} \cdot (V_m - V_x) = (V_m - V_x) \cdot \sum_{i=1}^k g_{xi} = \\ &= (V_m - V_x) \cdot (k(V_m) \cdot g_{xi}), \end{aligned} \quad (71)$$

o bien

$$I_x(V_m) = k(V_m) \cdot g_{xi} \cdot (V_m - V_x). \quad (72)$$

El valor de k (número de canales abiertos) en la sumatoria de la ecuación (71) es determinado por el potencial de membrana V_m ; además, la primera igualdad se cumple porque I_x es producto de la suma de k corrientes unitarias. La cuarta igualdad se cumple porque g_{xi} es constante. De las ecuaciones (70) y (72) se tiene que

$$g_x(V_m) = k(V_m) \cdot g_{xi}. \quad (73)$$

La ecuación (73) indica que la conductancia de la membrana al ion x cuando se aplica un pulso comando V_c supraumbral es igual a la conductancia unitaria g_{xi} multiplicada por el número k , que es el número de canales abiertos por el pulso comando V_c .

Con la técnica de fijación del voltaje se mantiene fijo transitoriamente el potencial de membrana V_m a un valor seleccionado aplicando el pulso comando V_c , y se mide la corriente de membrana I_x inducida. Las gráficas corriente-voltaje (I_x vs. V_m) nos dan una representación visual y cuantitativa del voltaje umbral al que se activa la corriente de membrana I_x ($g_x \neq 0$ en la ecuación (70)) o el inicio de la apertura de k canales x ($k(V_m) \neq 0$ en la ecuación (72)); asimismo, muestran cómo incrementa la magnitud de la corriente con el voltaje (ecuación (70)) o cómo incrementa el número de canales en estado abierto con el voltaje (ecuación (72)).

En el estudio de los canales dependientes del voltaje es de interés analizar el cambio en el valor de g_x o de k con el voltaje ya que son característicos de cada población de canales iónicos. La construcción de curvas corriente-voltaje es útil para este propósito. Sin embargo, no es suficiente. Suponiendo que se aplica un pulso comando V_c supraumbral de tal manera que g_x o k alcancen su valor máximo, lo cual sucede cuando todos los canales se encuentran en estado abierto, entonces en las curvas corriente-voltaje se esperaría una corriente máxima, pero de las ecuaciones (70) y (72) se observa que la corriente I_x incrementa linealmente con V_m a pesar de que g_x alcanza su valor máximo ($g_x(V_m) = g_{xmax}$, $k(V_m) = k_{max}$), o sea, cuando todos los canales x se encuentren abiertos.

Para evitar este problema y obtener el comportamiento en el valor de $g_x(V_m)$ o $k(V_m)$ con el potencial de membrana V_m se realizan gráficas conductancia-voltaje (g_x vs. V_m). La conductancia $g_x(V_m)$ para cada potencial de membrana V_m se obtiene de la ecuación (70), o sea

$$g_x(V_m) = \frac{I_x(V_m)}{(V_m - V_x)} \quad (74)$$

Con la técnica de fijación de voltaje se mide la corriente de membrana $I_x(V_m)$ a diferentes potenciales de membrana V_m y se evalúa la conductancia $g_x(V_m)$ con la ecuación (74). La morfología de las curvas conductancia-voltaje son de tipo sigmoide existiendo un valor del potencial de membrana (por ejemplo V_m') en donde la conductancia toma el valor constante máximo ($g_x(V_m) = g_{x\max}$ para $V_m \leq V_m'$).

Una vez obtenida la curva conductancia-voltaje, se realiza el mejor ajuste con una función tipo Boltzmann:

$$g_x(V_m) = \frac{g_{x\max}}{\left[1 + \exp\left(\frac{V_m - V_{x1}}{V_{x2}}\right) \right]}, \quad (75)$$

en donde v_{x1} representa el potencial de membrana en el cual se encuentran en estado abierto la mitad del número total de canales de la población x ; v_{x2} es un parámetro de ajuste para el grado de inclinación en la fase de subida de la curva sigmoide, su valor nos indica si el efecto del potencial de membrana sobre la conductancia $g_x(V_m)$ es sobre un intervalo ancho o pequeño del potencial de

membrana. Los valores $g_x(V_m)$, v_{x1} y v_{x2} son característicos de cada población de canales iónicos y, por lo tanto, son datos que diferencian una población de otra.

8.6. Obtención experimental de la dependencia del voltaje de $g_x(V_m)$

En un experimento de este tipo (figura 46a) se procede de la siguiente manera: se polariza la célula a un potencial de membrana negativo (V_r) de tal manera que $g_x \approx 0$. Posteriormente se aplican pulsos rectangulares de fijación de voltaje (V_c) para cambiar V_m a un valor que incremente la conductancia $g_x(V_m)$; se mide la magnitud de la corriente máxima $I_x(V_m)$ que se evoca con cada pulso comando V_c , al final del trazo de corriente, donde la corriente ya no depende del tiempo (figura 46a). Se grafica $I_x(V_m)$ vs. V_m ($V_m = V_r + V_c$) para la obtención de la curva corriente-voltaje (figura 46b).

La curva conductancia-voltaje se obtiene al graficar $g_x(V_m)$ vs. V_m donde $g_x(V_m) = I_x(V_m)/(V_m - V_x)$ e $I_x(V_m)$ es la corriente máxima para cada V_m (figura 46c). La conductancia máxima $g_{x\max}$ se obtiene aplicando despolarizaciones que garanticen el máximo número de canales abiertos de la población de canales x ; esto se puede apreciar en la curva de conductancia. A la curva de $g_x(V_m) - V_m$ se le ajusta la función de Boltzmann cuyos parámetros de ajuste serán característicos de la población de canales x . Con el procedimiento anterior se obtiene la ecuación que describe la dependencia del voltaje de los canales x .

De la ecuación (73), cuando todos los canales se encuentran en estado abierto tenemos

$$g_{x\max} = k_{\max} \cdot g_{xi}, \quad (76)$$

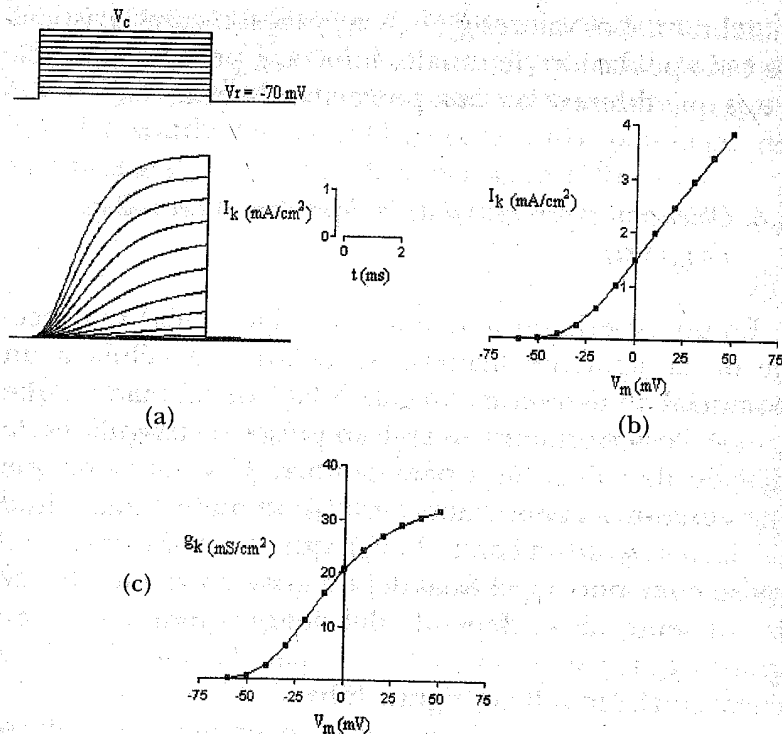


Figura 46. Ejemplo del protocolo experimental y de análisis de las corrientes iónicas. En el ejemplo se muestra la corriente saliente mediada por una población de canales cualquiera (denominada x). En (a) se aplican 12 pulsos de fijación de voltaje con incrementos de 10 mV a partir de un potencial V_r de -70 mV, a medida que incrementa la despolarización de la membrana con los pulsos V_c , I_x incrementa y no inactiva. En (b) se muestra la dependencia del voltaje de I_x a través de la curva corriente-voltaje que se obtiene al graficar I_x máxima, evocada con los pulsos V_c , con respecto al potencial de membrana ($V_m = V_r + V_c$). En (c) se muestra el cambio en la conductancia g_x con respecto a V_m , la dependencia del voltaje de los canales x se obtiene ajustando la función de Boltzmann a la curva de conductancia (línea continua).

donde eliminamos el paréntesis que indica su dependencia del voltaje ya que estos valores son constantes. Dividiendo la conductancia entre la conductancia máxima (normalizando) tenemos

$$\frac{g_x(V_m)}{g_{x\max}} = \frac{k(V_m) \cdot g_{xi}}{k_{\max} \cdot g_{xi}} = \frac{k(V_m)}{k_{\max}} \quad (77)$$

Sustituyendo la relación (77) en la ecuación (75) tenemos

$$\frac{k(V_m)}{k_{\max}} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_m - V_{x1}}{V_{x2}}\right)} \quad (78)$$

En otras palabras, las expresiones (75) y (78) muestran que las gráficas conductancia-voltaje normalizadas, indican la fracción de canales ($k(V_m)/k_{\max}$) que se encuentran en estado abierto a un potencial de membrana V_m .

8.7. Dependencia del tiempo

Las consideraciones anteriores sobre la corriente de membrana $I_x(V_m)$ y la conductancia $g_x(V_m)$, supuso su dependencia del voltaje únicamente; sin embargo, como se ilustra en la figura 26, la magnitud máxima de la corriente de membrana (I_K e I_{Na} en el ejemplo) cuando se cambia el potencial de membrana V_m al aplicar los pulsos comando V_{com} , no es un proceso instantáneo para cada potencial de membrana V_m , sino un proceso dependiente también del tiempo. Por lo anterior, la corriente de membrana mediada por alguna población x de canales dependientes del voltaje, también tiene que expresarse como función del tiempo y la ecuación (70) se modifica como

$$I_x(V_m, t) = g_x(V_m, t) \cdot (V_m - V_x) \quad (79)$$

La expresión (79) determina el comportamiento de la corriente I_x con respecto al potencial de membrana y el tiempo.

Se supone que los canales dependientes del voltaje presentan un sensor del voltaje. El sensor del voltaje formaría parte estructural de la proteína que funge como canal iónico. El sensor del voltaje estaría constituido por una o más "partículas" con carga eléctrica, de tal manera que al cambiar el potencial de membrana, se induciría un cambio en el campo eléctrico transmembranal que afectaría las partículas cargadas. La redistribución de las partículas cargadas por la variación del campo eléctrico, permitiría la transición del canal de un estado cerrado a un estado abierto con paso de iones a través de él. Se suponen dos estados de las partículas del sensor del voltaje: el permisivo y el no permisivo. Cuando el canal se encuentra cerrado o abierto, las partículas del sensor se encuentran en estado no permisivo o permisivo respectivamente.

La dependencia del tiempo de la apertura de los canales iónicos (y por lo tanto de la corriente de membrana) se modela considerando la transición en el tiempo de las partículas del sensor del estado no permisivo al estado permisivo; la transición en el tiempo de las partículas del estado no permisivo al permisivo se modela siguiendo una cinética de primer orden.

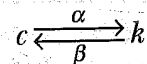
Recordemos de la química que en una reacción con cinética de primer orden sucede lo siguiente:



si la reacción es reversible, en donde γ y γ^{-1} son las constantes de velocidad de la reacción en uno u otro sentido. Si queremos conocer el cambio de B en el tiempo se tiene la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{dB}{dt} = \gamma \cdot A - \gamma^{-1} \cdot B. \quad (80)$$

Podemos suponer algo semejante en las moléculas que fungen como canales iónicos; o sea, que pasan (para un potencial de membrana dado) de un estado cerrado c a uno abierto k con una cinética de primer orden, por lo tanto tenemos



con el cambio en el tiempo de los canales en estado abierto dado por la ecuación

$$\frac{dk}{dt} = \alpha \cdot c - \beta \cdot k. \quad (81)$$

Aquí las constantes de velocidad α y β son constantes en el tiempo únicamente para un potencial de membrana dado, ya que su valor cambia con el potencial de membrana, es decir, son funciones de V_m , por lo que: $\alpha(V_m)$ y $\beta(V_m)$. Por otro lado tenemos la siguiente relación

$$c + k = k_{\max} \quad (82)$$

que indica que la suma de canales en estado cerrado c más los que se encuentran en estado abierto k es igual al total de canales k_{\max} . La expresión (82) sirve para sustituir c en la ecuación (81) quedando

$$\frac{dk}{dt} = \alpha(V_m) \cdot (k_{\max} - k) - \beta(V_m) \cdot k. \quad (83)$$

Si dividimos en ambos lados de la igualdad por el número total de canales k_{\max} y definimos

$$n = \frac{k}{k_{\max}}; \quad (84)$$

como la fracción de canales abiertos, la ecuación (83) queda

$$\frac{dn}{dt} = \alpha(V_m) \cdot (1 - n) - \beta(V_m) \cdot n \quad (85)$$

que nos da el cambio de n en el tiempo a un potencial de membrana V_m determinado. La variable n también puede considerarse como la probabilidad de que el canal se encuentre en estado abierto.

Por sencillez, consideramos el caso en que el sensor de voltaje del canal iónico x consta de una sola partícula, y que n representa la probabilidad de encontrarse la partícula en el estado permisivo. Una forma alternativa de expresar la ecuación (85) es la siguiente

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_{\infty}(V_m) - n}{\tau_n(V_m)}, \quad (86)$$

donde

$$n_{\infty}(V_m) = \frac{\alpha_n(V_m)}{\alpha_n(V_m) + \beta_n(V_m)} \quad (87)$$

$$\tau_n(V_m) = \frac{1}{\alpha_n(V_m) + \beta_n(V_m)}. \quad (88)$$

Por sustitución de las ecuaciones (87) y (88) en (86) obtenemos nuevamente la ecuación (85).

Los valores de $n_{\infty}(V_m)$ y $\tau_n(V_m)$ dependen del potencial de membrana. El valor $n_{\infty}(V_m)$ indica la probabilidad de encontrar el canal abierto al potencial V_m en el estado estable, esto es, cuando ha transcurrido un tiempo suficientemente largo ($t \gg \tau_n$) para que $n_{\infty}(V_m)$ no dependa del tiempo y únicamente dependa del potencial V_m . Como el número total de canales es igual a k_{\max} y $k(V_m)$ representa el número de canales abiertos al potencial V_m , entonces la probabilidad $n_{\infty}(V_m)$ estaría dada por la relación $k(V_m)/k_{\max}$. El valor de $n_{\infty}(V_m)$ puede obtenerse experimentalmente ya que de la ecuación (77)

$$n_{\infty}(V_m) = \frac{k(V_m)}{k_{\max}} = \frac{g_x(V_m)}{g_{\max}}, \quad (89)$$

en donde los valores de k y g_x únicamente dependen de V_m y no del tiempo debido a que son valores de la conductancia o del número de canales abiertos en el estado estable al potencial V_m . Los valores de $g_x(V_m)$ y $g_{\max}(V_m)$ se obtienen de los datos experimentales de la $I_x(V_m)$ del estado estable (ecuación (74)) como ya se comentó.

Por otro lado, la solución de la ecuación diferencial (86) es

$$n(t, V_m) = n_{\infty}(V_m) \cdot \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\hat{\tau}_n(V_m)}\right) \right]. \quad (90)$$

En la expresión anterior observamos que cuando $t \rightarrow \infty$, $n \rightarrow n_{\infty}$. Cuando cambia el potencial de membrana del potencial de reposo V_r (cuando los canales se encuentran cerrados) a un potencial de membrana V_m en que se abren los canales voltaje dependientes, entonces $n(t, V_m)$ cambia en el tiempo desde un valor $n \approx 0$ al inicio del

pulso comando V_{com} , hasta un valor de $n \approx n_{\infty}$ cuando ha transcurrido un tiempo prolongado ($t \gg \tau_n$) del pulso comando V_{com} . El cambio en el valor de n se realiza con un curso temporal exponencial con una constante de tiempo τ_n . La constante de tiempo τ_n y la probabilidad de apertura del canal n_{∞} dependen del potencial de membrana V_m (ecuaciones (88) y (87) respectivamente) y por lo tanto n es función del potencial de membrana y del tiempo ($n(V_m, t)$). Con el auxilio de la ecuación (79) se puede obtener el curso temporal del cambio en la conductancia $g_x(V_m, t)$. Posteriormente se ajusta una función exponencial del tipo indicado en la ecuación (90) a la curva de conductancia, con el mejor ajuste se obtiene el valor de τ_n . Sin embargo, de la ecuación (79) observamos que el curso temporal de la conductancia y la corriente es el mismo ya que el factor $(V_m - V_x)$ es un factor constante cuando se emplea la técnica de fijación del voltaje, por lo cual, en la práctica, la constante de tiempo τ_n se obtiene con el mejor ajuste de una función exponencial al trazo de corriente $I_x(V_m, t)$. La constante de tiempo τ_n es un parámetro característico de cada población de canales iónicos.

Por otro lado, se puede modificar la ecuación (89) para obtener el cambio en el tiempo de la conductancia normalizada; o bien, del cambio en el tiempo de la fracción de canales abiertos. Pero esto sería justamente el cambio en el tiempo de la probabilidad n , o sea

$$n(V_m, t) = \frac{k(V_m, t)}{k_{\text{max}}} = \frac{g_x(V_m, t)}{g_{\text{max}}} \quad (91)$$

Donde se ha eliminado el subíndice ∞ ya que n no es del estado estable; asimismo, se introducen en k y g_x la dependencia del tiempo, por lo cual tenemos que

$$g_x(V_m, t) = g_{\text{max}} \cdot n(V_m, t) \quad (92)$$

Sustituyendo en la ecuación (92) el valor de n dado por la expresión (90) finalmente tenemos

$$g_x(V_m, t) = g_{\text{max}} \cdot n_{\infty}(V_m) \cdot \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_n(V_m)}\right) \right] \quad (93)$$

La ecuación (93) se puede expresar en términos de la conductancia del estado estable al potencial de membrana V_m empleando la ecuación (89)

$$g_x(V_m, t) = g_x(V_m) \cdot \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_n(V_m)}\right) \right] \quad (94)$$

En la expresión (94), la dependencia del voltaje y del tiempo de la conductancia $g_x(V_m, t)$, está dada por la conductancia del estado estable $g_x(V_m)$ al potencial de membrana V_m y la dependencia del tiempo por la función exponencial. Este resultado también se puede interpretar de acuerdo con la ecuación (93), como el cambio en el tiempo de la probabilidad de apertura de los canales o el cambio en el tiempo de la fracción de canales abiertos que ocurre cuando el potencial de membrana cambia al valor V_m . Las ecuaciones (93) y (94) indican que el cambio en la conductancia $g_x(V_m, t)$ sigue un curso temporal exponencial alcanzando el valor de la conductancia del estado estable $g_x(V_m)$ cuando ha transcurrido un tiempo $t \gg \tau_n$. De acuerdo a la ecuación (79), los mismos comentarios son válidos para la corriente $I_x(V_m, t)$.

La ecuación (90) se modifica si el sensor del voltaje del canal iónico consta de más de una partícula, por ejemplo p partículas, entonces, el cambio en el tiempo de la fracción de canales en el estado abierto cuando se aplica un potencial V_m será

$$\frac{k(V_m, t)}{k_{\max}} = n^p(V_m, t). \quad (95)$$

Para la expresión anterior las p partículas se consideran idénticas (una aproximación que ha resultado adecuada en la mayoría de los casos). La ecuación (95) indica la probabilidad en el tiempo de que las p partículas se encuentren en estado permisivo al potencial de membrana V_m , que es igual a la probabilidad de apertura del canal iónico permitiendo el paso de iones. El curso temporal continuará siendo exponencial pero ahora elevado a la potencia p . La ecuación (90) es el caso particular cuando $p=1$, o sea, cuando el sensor del voltaje consta de una sola partícula.

La expresión final para describir la dependencia del voltaje y del tiempo de la corriente iónica mediada por los canales iónicos es, de acuerdo a las ecuaciones (79), (92) y (95)

$$I_x(V_m, t) = g_x(V_m, t) \cdot (V_m - V_x) = g_{\max} \cdot n^p(V_m, t) \cdot (V_m - V_x) \quad (96)$$

o en términos de la conductancia del estado estable

$$I_x(V_m, t) = g_x(V_m) \cdot \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_n(V_m)}\right) \right]^p \cdot (V_m - V_x) \quad (97)$$

o bien

$$I_x(V_m, t) = I_{\infty} \cdot \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_n(V_m)}\right) \right]^p \quad (98)$$

con $I_{\infty} = g_x(V_m) \cdot (V_m - V_x)$ la corriente en el estado estable.

La corriente $I_x(V_m, t)$ es descrita por la ecuación (98) cuando se aplica un pulso rectangular de fijación de voltaje. En un experimento típico con esta técnica, se aplica un pulso comando V_{com} a la célula cambiando su potencial de membrana V_m evocando la apertura de los canales iónicos generándose una corriente iónica I_x . Al curso temporal de la corriente iónica se le ajusta una función como la de la ecuación (98). El mejor ajuste nos brinda los valores de p y τ_n que son característicos de cada población de canales iónicos. Estos datos sirven para identificar a una población de canales iónicos determinada.

En la figura 47 se muestra una familia de curvas de corriente y el ajuste de la función (98).

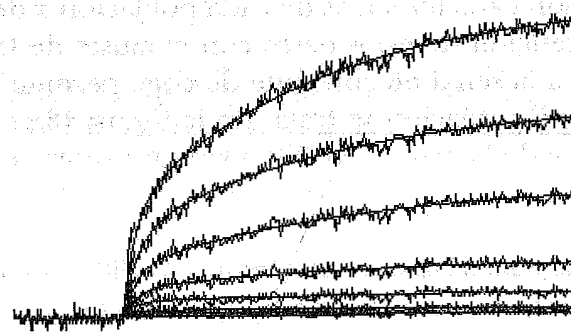


Figura 47. Corriente saliente evocada por la aplicación de pulsos de fijación del voltaje. Sobre los trazos de corriente se superpone la línea continua obtenida por el ajuste de la ecuación (98) a los trazos de corriente.

El ajuste nos da los valores de los parámetros τ_n y p .

8.8. Deactivación de la corriente iónica

Al final del pulso rectangular de fijación del voltaje, cesa el estímulo de voltaje que abre los canales iónicos; sin embargo, el retorno al estado cerrado de los canales iónicos no es instantáneo, el cierre o desactivación presenta un curso temporal exponencial. Por lo cual, se produce una corriente al final del pulso de estimulación V_{com} . Se puede mostrar que la desactivación de la corriente sigue un curso temporal que puede ser descrito por una expresión como la ecuación (99). En otras palabras, la expresión (99) describe la cinética de la corriente iónica al final del pulso de fijación del voltaje. A esta corriente se le denomina *corriente de cola* (I_c) y es producto de la desactivación de los canales

$$I_{xt}(V_m, t) = I_{\infty} \cdot \left[\exp\left(\frac{-t}{\tau_n(V_m)}\right) \right]^p \quad (99)$$

En este caso se considera el tiempo $t = 0$ al final del pulso rectangular de fijación del voltaje. Dado que los valores de p y τ_n son característicos de cada población x de canales, la obtención de estos datos con el ajuste de la ecuación (99) a la señal de corriente de cola, permite identificar de qué población se trata. En la figura 48 se ilustra el ajuste de de la ecuación (99) a las corrientes de cola.

8.9. Inactivación de la corriente iónica

Cuando los canales dependientes del voltaje se abren por un pulso despolarizante de fijación del voltaje se genera una corriente iónica $I_x(V_m, t)$ que, como ya se comentó, puede ser descrita por una expresión como

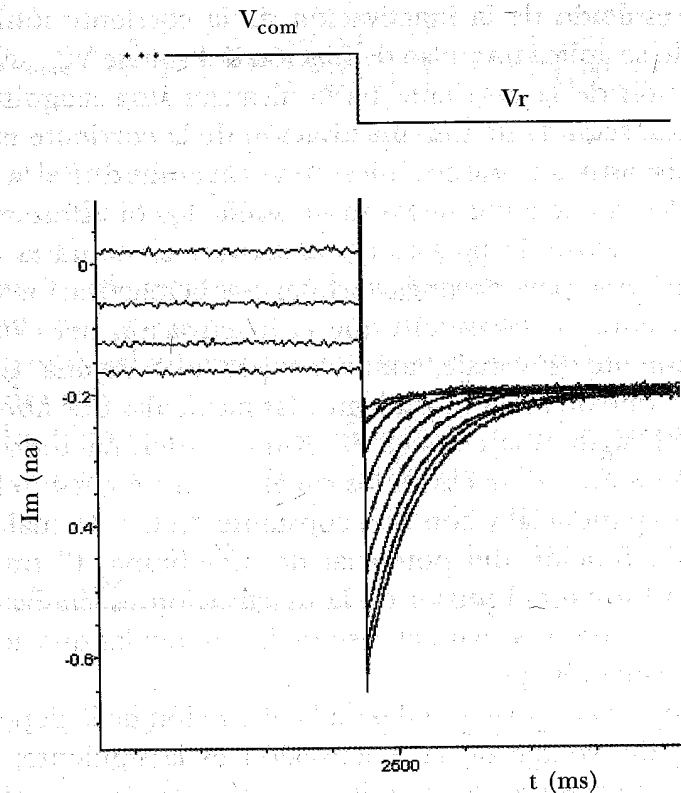


Figura 48. Vista parcial de las corrientes salientes producidas por una serie de pulsos comando V_{com} . Al final de los pulsos V_{com} se producen corrientes de cola a las cuales se les ajustó la ecuación (99). Los trazos de las corrientes de cola se observan más oscuros por la superposición de la curva de ajuste a las señales de corriente.

la ecuación (98). La corriente evocada incrementa con un curso temporal exponencial hasta un valor máximo que permanece constante mientras dure el pulso de fijación del voltaje. Sin embargo, algunos canales presentan *inactivación*, esto es, los canales tienden a cerrarse a pesar de persistir el estímulo del pulso de fijación del voltaje.

El resultado de la inactivación de la corriente iónica cuando se aplica un pulso de fijación del voltaje V_{com} es la activación de la corriente hasta alcanzar una magnitud máxima, seguida de una inactivación de la corriente con una disminución monotónica de su magnitud. En la figura 26, la corriente negativa de sodio I_{Na} (a diferencia de la corriente de potasio I_k) se activa y crece hasta un pico máximo para después declinar por la inactivación de la corriente. Se considera que la inactivación del canal dependiente del voltaje, también es producto de una "partícula", que de manera análoga a las partículas que abren al canal, sigue una cinética de primer orden pasando al estado en que se inactivan los canales con un curso temporal exponencial y con una constante $\tau_h(V_m)$, la cual es también función del potencial de membrana. El tratamiento formal del sensor de la inactivación es similar al que ya se describió para el caso de las partículas que activan al canal iónico.

La técnica experimental para la obtención de la dependencia del voltaje de la inactivación es la siguiente: se aplica un prepulso de magnitud variable (pulso anterior al pulso comando V_{com}) como se ilustra en la figura 49, manteniendo constante V_{com} . Cuando V_{com} se aplica a partir de -90 mV la magnitud de la corriente es mayor que cuando se aplica el prepulso a -50 mV a pesar de ser constante V_{com} . Este resultado se explica por el prepulso despolarizante de -50 mV que inactiva parcialmente a los canales disminuyendo la corriente cuando se aplica V_{com} .

En cuanto a la incorporación de la inactivación a la cinética de la corriente, a la ecuación (98) que describe la corriente iónica $I_x(V_m, t)$, que es una función creciente, se le agrega el término exponencial decreciente que da cuenta del factor de inactivación

$$I_x(V_m, t) = I_\infty^* \cdot \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_n(V_m)}\right) \right]^p \cdot \exp\left(\frac{-t}{\tau_h(V_m)}\right). \quad (100)$$

El subíndice h en la constante τ_h indica la constante de tiempo de la partícula que inactiva al canal. La corriente I_∞^* es ahora la corriente máxima que se obtendría en ausencia de inactivación. La constante τ_h puede ser estimada de los registros de corriente ajustando una función exponencial a la región donde la corriente decrece (ver figura 45b).

De todo lo anterior, se desprende que los parámetros que caracterizan a una población de canales iónicos son:

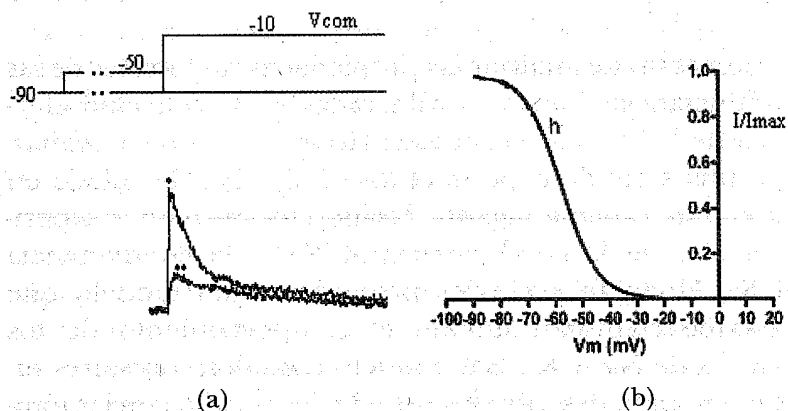


Figura 49. Protocolo de pulsos para la obtención de la curva de inactivación. (a) Previo al pulso comando V_{com} (el cual es constante) se aplica un prepulso de magnitud variable. Cuando V_{com} se aplica a partir de -90 mV se obtiene la corriente indicada por *; cuando V_{com} se aplica a partir de -50 mV la corriente que se obtiene es menor como se indica con **. (b) Al graficar la magnitud al pico de la corriente obtenida con pre-pulsos de diferente magnitud y se normalizan con respecto a la corriente sin prepulso (-90 mV al inicio) se obtiene la curva de inactivación. A esta curva se le ajusta la función de Boltzmann para obtener la dependencia del voltaje de la inactivación.

potencial de membrana V_m de activación, la presencia o ausencia de inactivación, la dependencia del voltaje (ecuación (75), valores de v_{x1} y v_{x2}), conductancia máxima (valor de g_{max}), la cinética de activación (valores de p y $\tau_n(V_m)$, ecuación (98)), la cinética de inactivación (valor de τ_h , factor decreciente en la ecuación (100)) y la cinética de la corriente de cola (ecuación (99)). La técnica de fijación del voltaje permite obtener los parámetros anteriores para caracterizar una determinada corriente iónica o población de canales.

9. INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DEL REGISTRO DE UN SOLO CANAL

Con el fin de analizar las propiedades no lineales de las conductancias iónicas involucradas en la actividad eléctrica de las células excitables, Hodgkin y Huxley realizaron una serie de experimentos de fijación de voltaje en axones de calamar gigante. Usando los resultados experimentales de la conductancia al Na^+ y la conductancia al K^+ , Hodgkin y Huxley propusieron un modelo que describe cuantitativamente el comportamiento de los canales de Na^+ y K^+ . Este modelo considera resistores en paralelo para describir las principales conductancias iónicas en el axón.

Durante muchos años, los modelos de Hodgkin y Huxley han sido utilizados para describir la cinética de las corrientes iónicas. Sin embargo, con el desarrollo de mejores técnicas de registro se han encontrado datos que muestran que esos modelos tienen ciertas limitaciones:

a) El comportamiento unitario de muchos canales iónicos no puede ser descrito utilizando los modelos tradicionales de Hodgkin y Huxley. Ese comportamiento

puede estimarse al extender los modelos de Hodgkin y Huxley hacia modelos que tengan múltiples estados de reposo e inactivación, pero resultan controversiales al no poder reproducir los datos experimentales de registro de un solo canal.

b) Aunque los modelos de Hodgkin y Huxley pueden reproducir las corrientes iónicas, no necesariamente reproducen la cinética de una población de canales.

Los datos experimentales pueden clasificarse en dos tipos:

1. *Datos determinísticos.* Son aquellos que pueden ser descritos mediante una relación matemática explícita, tal que ante una entrada dada, se puede determinar con precisión cuál será la salida.

2. *Datos no determinísticos.* Son aquellos que no pueden ser descritos por una relación matemática explícita, porque cada observación del fenómeno es única, es decir, en una observación se presentará sólo uno de los muchos resultados que pueden ocurrir.

El comportamiento de los canales iónicos es individual, y su estado depende de voltaje o de ligando, por lo que se abren o cierran estocásticamente. Uno no puede predecir cuándo un canal tendrá una transición (estado abierto \rightarrow estado cerrado o estado cerrado \rightarrow estado abierto). Sin embargo, uno puede proporcionar la probabilidad de que ocurra una transición durante cierto periodo de tiempo. Matemáticamente, este tipo de comportamiento es llamado no determinístico, aleatorio o estocástico.

Con el fin de analizar los datos del comportamiento de un solo canal, que son no determinísticos, se han introducido elementos matemáticos que no son familiares para muchos fisiólogos. El análisis estocástico ha sido usado por físicos e ingenieros durante muchos años, y ya ha sido probada su aplicación en neurofisiología.

Los objetivos al aplicar el análisis estocástico a los canales iónicos son, al menos, cuatro:

1. Proporcionar una descripción cuantitativa, probabilística, del comportamiento de un solo canal, que no puede ser formulado por una ecuación determinística del tipo Hodgkin y Huxley.

2. Proporcionar modelos cuantitativos que describan el mecanismo molecular involucrado en el comportamiento del canal, y la cinética de transición de estados en canales individuales.

3. Establecer una relación cuantitativa entre la función de un solo canal y las estructuras moleculares responsables de dicha función.

4. Establecer relaciones cuantitativas entre los parámetros macroscópicos medidos (por ejemplo, corrientes de célula completa) y los parámetros microscópicos (modos de un solo canal), tal que las conductancias iónicas de la célula completa puedan ser explicadas por eventos moleculares.

Los registros de un solo canal han revelado que los canales iónicos individuales en las células excitables, se abren y cierran aleatoriamente, y por lo tanto, el comportamiento de una población de canales en la célula completa debe ser tratado con estadística. En la figura 50 se muestra un registro típico de corriente.

Por esta razón, se utilizan herramientas estadísticas para describir el comportamiento de poblaciones de N canales idénticos, cada uno de los cuales se abre y cierra aleatoriamente. De este análisis se puede obtener información de las propiedades de canales individuales, tales como la conductancia de un solo canal y el número total de canales, a partir de los datos obtenidos de células completas y esto es muy importante, puesto que permite relacionar datos de célula completa con los datos de un solo

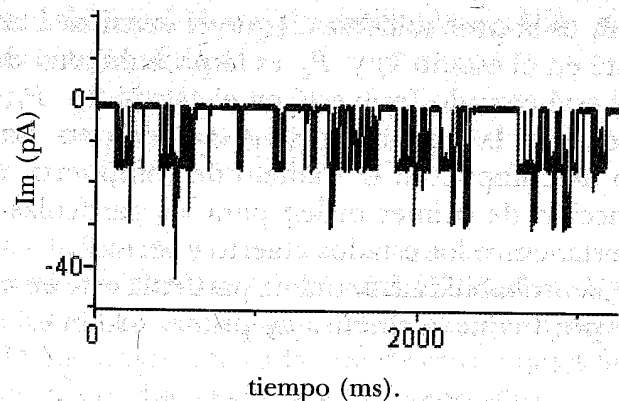
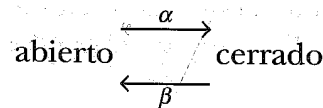


Figura 50. Registro de canal unitario empleando la técnica de *Patch-clamp*. El registro muestra 3 subniveles de la misma amplitud. Al abrirse un canal genera una corriente unitaria de un nivel, la presencia de más de un nivel de la misma magnitud indica el registro de 3 canales en el parche de membrana cuyas corrientes unitarias se suman.

canal. En los casos en los que el registro de un solo canal es difícil, ya sea porque los canales son inaccesibles a la pipeta de registro o porque las conductancias de un solo canal son muy pequeñas, esta herramienta matemática es fundamental para estudiar el comportamiento del canal.

Considere un número N de canales independientes, cada uno de ellos con dos posibles estados (abierto 1 o cerrado 2),



estado	1	2
probabilidad	P_1	P_2

donde P_1 es la probabilidad de que el canal esté abierto (que esté en el estado 1) y P_2 es la probabilidad de que el canal esté cerrado (que esté en el estado 2). $P_1(\infty)$ es equivalente a la conductancia $\gamma(\infty)$ descrita para el modelo de compuerta. El modelo de compuerta asume una reacción de primer orden para las partículas de la compuerta, entre los estados abierto y cerrado.

Sea y la probabilidad de que la partícula esté en estado abierto, por lo que la cinética de primer orden es

$$\frac{dy}{dt} = \alpha(1 - y) - \beta y, \quad (101)$$

que significa cómo está cambiando esta probabilidad con respecto al tiempo.

Para el estado estable, cuando los valores de y ya no presentan cambios (esto es cuando $t \rightarrow \infty$)

$$\frac{dy}{dt} = 0 = \alpha(1 - y_\infty) - \beta y_\infty, \quad (102)$$

donde

$$y_\infty = \frac{\alpha}{\alpha + \beta}. \quad (103)$$

De manera similar, la probabilidad de que el canal esté en estado abierto P_1 o de que esté en estado cerrado P_2 está dada por:

$$P_1(\infty) = \frac{\beta}{\alpha + \beta} \quad ; \quad P_2(\infty) = \frac{\alpha}{\alpha + \beta}.$$

Del análisis matemático de combinaciones, se puede demostrar que la probabilidad de que un número k de

canales, del total de la población N , esté en el estado abierto al tiempo t es:

$$P_1^k = C_k^N [P_1(t)]^k [P_2(t)]^{N-k}, \quad (104)$$

para $k = 0, 1, \dots, N$.

Esto es una distribución binomial, la cual se deriva simplemente de las combinaciones de canales independientes y del hecho de que cada uno de esos canales tiene dos estados de conductancia (abierto y cerrado).

En las células excitables, el número de canales para cierta especie iónica es muy grande, por lo que $N \gg 1$ y entonces, la distribución binomial puede aproximarse a una distribución normal y por lo tanto, la ecuación (104) queda como

$$P_1^k \approx \frac{1}{\sqrt{2\pi NP_1 P_2}} e^{-\frac{(k - NP_1)^2}{2NP_1 P_2}}. \quad (105)$$

Sea $\bar{k} = NP_1$ la media de canales abiertos, $\sigma_N^2 = (k - \bar{k})^2 = NP_1 P_2$ la varianza y $x = k - \bar{k}$.

Por lo tanto, la ecuación (105) queda como

$$P_1^x = \frac{1}{\sigma_n \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma_N^2}}. \quad (106)$$

Mediante las técnicas de fijación de voltaje en células excitables, se pueden controlar las condiciones experimentales para lograr que el número de canales iónicos abiertos sea pequeño. Entonces, cuando P_1 es pequeña ($P_1 \ll 1$) y $k = NP_1 \ll N$, la distribución binomial puede

aproximarse mediante una distribución tipo Poisson, y la ecuación (104) quedará de la forma

$$P_1^k = C_k^N [P_1(t)]^k [P_2(t)]^{N-k} \approx \frac{(k)^k}{k!} e^{-k}. \quad (107)$$

La media μ_I de la corriente iónica a través de k canales abiertos, está dada por $I_1 k$, donde I_1 es la corriente que fluye a través de un canal abierto y, por lo tanto

$$\mu_i = I_1 N P_1. \quad (108)$$

En el estado estable, esto es, cuando $t \rightarrow \infty$,

$$P_1(t) = P_1(\infty) = \frac{\beta}{\alpha + \beta},$$

por lo que la ecuación para la media de la corriente iónica será

$$\mu_i = \frac{I_1 N \beta}{\alpha + \beta} = \frac{\gamma N (V - V_i) \beta}{\alpha + \beta}.$$

Ya que el canal presenta un comportamiento óhmico cuando se abre, donde $I_1(V) = \gamma(V - V_i)$, donde γ es la conductancia de un solo canal, V es el voltaje de membrana al que se abre el canal y V_i es el potencial de equilibrio de la especie iónica i (que puede ser Na^+ , K^+ , Ca^{++}). La varianza de la corriente a través de N canales es

$$\sigma_{I_N}^2 = I_1^2 \sigma_N^2 = I_1^2 N P_1 P_2 = I_1^2 N P_1 (1 - P_1) = I_1 \mu_I - \mu_I^2 / N. \quad (109)$$

Para el caso del estado estable, cuando $t \rightarrow \infty$, la ecuación se transforma en

$$\begin{aligned} \sigma_{I_N}^2 &= I_1^2 N P(\infty)_1 P(\infty)_2 = \frac{I_1^2 N \alpha \beta}{(\alpha + \beta)^2} = \frac{N \gamma^2 (V - V_i) \alpha \beta}{(\alpha + \beta)^2} \\ &= \frac{\mu_I (V - V_i) \alpha}{\alpha + \beta}. \end{aligned}$$

Al derivar la ecuación (109) con respecto de μ_I obtenemos

$$\frac{d(\sigma_{I_N}^2)}{d\mu_I} = I_1 - 2\mu_I / N. \quad (110)$$

La pendiente de $\sigma_{I_N}^2$ para $\mu_I = 0$ es igual a I_1 , y la conductancia de un solo canal es

$$\gamma = \frac{I_1}{V - V_i}.$$

El valor máximo para $\sigma_{I_N}^2$ está dado por

$$\frac{d(\sigma_{I_N}^2)}{d\mu_I} = 0 \quad (111)$$

y a partir de la ecuación (110) obtenemos el valor del número total de canales

$$N = \frac{2\mu_I^m}{I_1}, \quad (112)$$

donde μ_I^m es el valor de μ_I que maximiza a $\sigma_{I_N}^2$.

En 1980, Sigworth aplicó estos resultados para analizar el ruido de las corrientes de Na^+ de célula completa en el nodo de Ranvier. A partir de la ecuación (110) se puede estimar la corriente I_1 a través de un solo canal de Na^+ , por medio de la pendiente de la gráfica de σ^2/μ_I en $\mu_I = 0$. El número de canales de Na^+ que contribuyen a la corriente de célula completa, puede estimarse al medir μ_I^m y usando la ecuación (112).

9. SIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA A PARTIR DE LOS DATOS DE FIJACIÓN DEL VOLTAJE

No quisiéramos concluir el capítulo sin mencionar el papel destacado que han tenido las técnicas de simulación en la biofísica de canales. Los trabajos experimentales pioneros de Hodgkin y Huxley también se acompañaron de simulación de la actividad eléctrica. A la fecha, a pesar de las limitaciones del modelo Hodgkin y Huxley ya descritas, se sigue empleando para reproducir la actividad eléctrica de las células a partir de los datos de fijación del voltaje, aunque con algunas variantes. La estrategia es la siguiente: a partir de los datos de fijación del voltaje, se obtienen ecuaciones que describen la dependencia del voltaje y del tiempo de cada corriente iónica, posteriormente se resuelve la siguiente ecuación diferencial

$$I_m = I_i + C_m \cdot \frac{dV_m}{dt} + I_e, \quad (113)$$

donde I_i , I_e indican las corrientes iónicas y de estimulación (inyectada por el microelectrodo). El segundo sumando indica la corriente capacitiva. Para el caso del axón, la corriente I_i es

$$I_i = I_{Na} + I_k + I_f, \quad (114)$$

donde I_{Na} , I_k e I_f indican la corriente de Na^+ , de K^+ y de fuga respectivamente. Haciendo $I_m = 0$, sustituyendo I_i (ecuación (114)) y despejando la derivada de V_m con respecto al tiempo en la ecuación (113) tenemos

$$\frac{dV_m}{dt} = -\frac{1}{C_m} \cdot (I_{Na} + I_k + I_f + I_e). \quad (115)$$

Ahora sustituimos I_{Na} , I_k e I_f por las ecuaciones que describen su dependencia del voltaje y del tiempo, obtenidas por fijación del voltaje

$$\frac{dV_m}{dt} = -\frac{1}{C_m} \cdot (g_{Kmax} \cdot n^4(V_m, t) \cdot (V_m - V^K) + g_{Na max} \cdot m^3(V_m, t) \cdot h(V_m, t) \cdot (V_m - V_{Na}) + g_f(V_m - V_{Na}) + I_e). \quad (116)$$

Podemos resolver la ecuación diferencial (116) por métodos numéricos para reproducir la actividad eléctrica en forma de potenciales de acción como se muestra en la figura 51.

En la sección 9.1 se da el listado del programa. Se puede teclear directamente creando un archivo m si se emplea el paquete de cómputo Matlab. Si no es el caso, con algunas modificaciones menores en la sintaxis, se puede correr con otros programas. El método numérico empleado fue Runge-Kutta (2° orden).

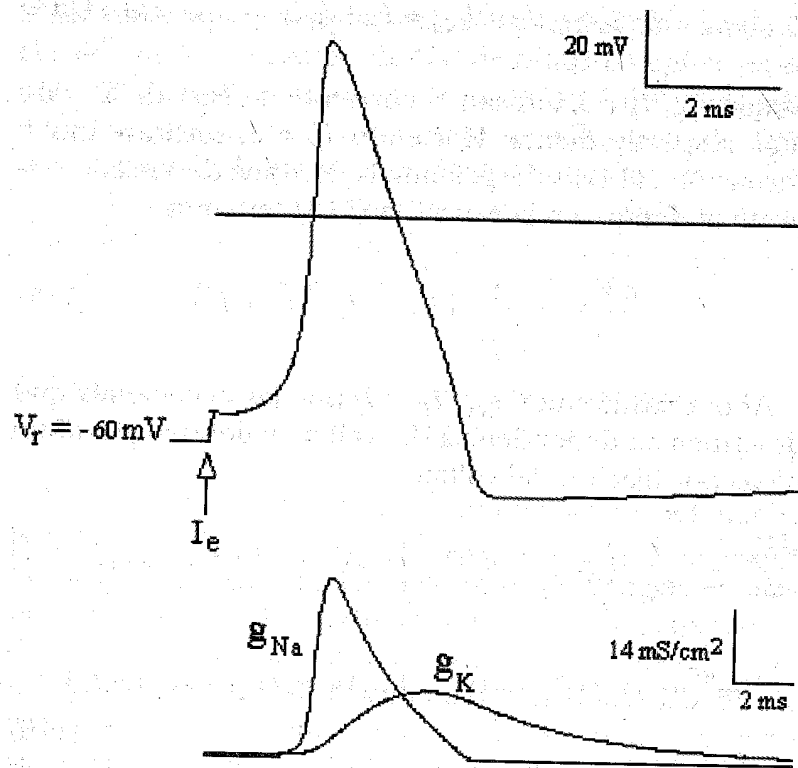


Figura 51. Simulación de la actividad eléctrica del axón. Se emplearon las ecuaciones que describen las corrientes de Na^+ , K^+ y de fuga del axón. Se aplicó una corriente de estimulación I_e que despolarizó hasta alcanzar el voltaje umbral que disparó un potencial de acción. Los trazos inferiores indican el cambio en la conductancia al Na^+ y K^+ durante el potencial de acción. La línea horizontal indica $V_m = 0$. El programa se corrió en un ambiente de Matlab.

9.1. Programa para simular el potencial de acción en el axón

```

clear,clf,hold off
%valores iniciales del programa
t=0;
n=1;
h=0.01;

%Condiciones iniciales de inyección de corriente
Ip=0;
%Capacitancia (uF/cm2)
Cm=1;
%Conductancias Máximas (mS/cm2)
GL=0.3;
GKmax=36;
GNamax=120;

%Valores iniciales de potencial de membrana y de equilibrio
iónico (mV)
VNa=50;
VK=-77;
VL=10.6;
Vr=-65.4;
V=Vr;

%valores iniciales de vectores de tiempo y potencial de
membrana (Tiempo en ms)
Tf(1)=t;
Vmf(1)=V;

% Valores Iniciales de IK (uA/cm2)
AN=0.01*(10-(V-Vr))/(exp((10-(V-Vr))/10)-1);
BN=0.125*exp(-(V-Vr)/80);
N=AN/(AN+BN);
GK=GKmax*N^4;
IK=GK*(V-VK);
IKf(1)=IK;

```

% Valores Iniciales de INa (uA/cm2)

AM=0.1*((25-(V-Vr)))/(exp((25-(V-Vr))/10)-1);

BM=4*exp(-(V-Vr)/18);

AH=0.07*exp(-(V-Vr)/20);

BH=1/(exp((30-(V-Vr))/10)+1);

M=AM/(AM+BM);

H=AH/(AH+BH);

GNa=GNamax*M^3*H;

INa=GNa*(V-VNa);

INaf(1)=INa;

% Cálculo de Valores iniciales de IL (uA/cm2)

IL=GL*(V-Vr-VL);

ILf(1)=IL;

while t<=50 %tiempo total de simulacion

% Pulso Comando (uA/cm2)

if t>=10,Ip=10;end

if t>=30,Ip=0;end

% Cálculo de la Corriente de Fuga (uA/cm2)

IL=GL*(V-Vr-VL);

ILf(n+1)=IL;

% Corriente de Potasio (uA/cm2)

AN=0.01*(10-(V-Vr)))/(exp((10-(V-Vr))/10)-1);

BN=0.125*exp(-(V-Vr)/80);

KN1=h*(AN*(1-N)-BN*N);

KN2=h*(AN*(1-(N+KN1))-BN*(N+KN1));

N=N+(0.5)*(KN1+KN2);

GK=GKmax*N^4;

IK=GK*(V-VK);

IKf(n+1)=IK;

% Corriente de Sodio (uA/cm2)

AM=0.1*((25-(V-Vr)))/(exp((25-(V-Vr))/10)-1);

BM=4*exp(-(V-Vr)/18);

AH=0.07*exp(-(V-Vr)/20);

BH=1/(exp((30-(V-Vr))/10)+1);

KM1=h*(AM*(1-M)-BM*M);

KM2=h*(AM*(1-(M+KM1))-BM*(M+KM1));

M=M+(0.5)*(KM1+KM2);

KH1=h*(AH*(1-H)-BH*H);

KH2=h*(AH*(1-(H+KH1))-BH*(H+KH1));

H=H+(0.5)*(KH1+KH2);

GNa=GNamax*M^3*H;

INa=GNa*(V-VNa);

INaf(n+1)=INa;

% Voltaje y Tiempo

KVm1=h*(Ip-(GNa*(V-VNa)+GK*(V-VK)+GL*(V-Vr-VL)))/Cm;

KVm2=h*(Ip-(GNa*((V+KVm1)-VNa)+GK*((V+KVm1)-VK)+GL*((V+KVm1)-Vr-VL)))/Cm;

V=V+(0.5)*(KVm1+KVm2);

%Vectores de voltaje y tiempo

Vmf(n+1)=V;

Tf(n+1)=t;

IP(n+1)=Ip;

%Incremento de tiempo y del contador

n=n+1;

t=t+h;

% Solución por Runge-Kutta (2º orden)

end

% Suma de Corrientes

Im=ILf+IKf+INaf;

% Graficas

subplot(2,1,2), plot(Tf,Vmf), axis([0,50,-80,50])
xlabel('t(ms)'),ylabel('Vm(mV)'),title('potenciales de acción')

subplot(2,1,1), plot(Tf,IP), axis([0,50,-100,100])
xlabel('t(ms)'),ylabel('I(uA/cm2)'), title('estímulo de corriente')

REFERENCIAS

1. Augustine G. J., Charlton M. P. y Smith S. J., *Calcium entry into voltage-clamped presynaptic terminals of squid*, *J. Physiol.* (Londres) **367**, 143-162 (1985a).
2. Barret J. N., *Motoneuron dendrites, role in synaptic integration*, *Fed. Proc.* **34**, 1398-1407, 1975.
3. Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B. y Siworth F. J., *Improved Patch-Clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*, *Pflugers Archiv.* **391**, 85-100 (1981).
4. Heuser J. E. y Reese T. S., *Structure of the synapse*, en *Handbook of physiology*, vol. 1, Kandel E. R., editor, The Nervous System, American Physiological Society, Bethesda Md., pp. 261-294 (1977).
5. Hille B., *Ionic channels of excitable membranes*, 2ª edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts (1992).
6. Hille B., *Classical biophysics of the squid giant axon*, en *Ion channels of excitable membranes*, Hille B., editor, I. Sunderland M. A., Sinauer, pp. 23-58 (1992).
7. Hodgkin A. L. y Horowicz P., *The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres*, *J. Physiol.* (Londres) **148**, 127-160 (1959).
8. Hodgkin A. L. y Huxley A. F., *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*, *J. Physiol.* (Londres) **117**, 500-544 (1952d).
9. Hodgkin A. L. y Huxley A. F., *Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo*, *J. Physiol.* (Londres) **116**, 449-472 (1952a).
10. Hodgkin A. L. y Huxley A. F., *The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo*, *J. Physiol.* (Londres) **116**, 473-496, (1952b).
11. Hodgkin A. L. y Huxley A. F., *The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo*, *J. Physiol.* (Londres) **116**, 497-506, (1952c).
12. Horowitz P y Hill W., *The art of electronics*, Cambridge University Press (1988).
13. Jack J. J. B., Noble D. y Tsien R. W., *Linear cable theory*, en *Electric current flow in excitable cells*, Jack J. J. B., Noble D. y Tsien R. W., editores, Clarendon Press, Oxford, pp. 25-66 (1975).
14. Johnston D. y Miao-Sin, *Electrical properties of the excitable membrane* en *Foundations of cellular neurophysiology*, Johnston D. y Miao-Sin Wu, editores, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, Londres, Inglaterra, pp. 39-53 (1995).
15. Johnston D. y Miao-Sin Wu, *Functional properties of dendrites*, en *Foundations of cellular neurophysiology*, Johnston D. y Miao-Sin Wu, editores, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, Londres, Inglaterra, pp. 55-120 (1995).
16. Kandel E. R., *Nerve, cells and behavior*, en *Principles of neural science*, Kandel E. R. y Schwartz, J. H., editores, Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, pp. 13-24 (1985).
17. Kandel E. R. y Siegelbaum S., *Principles underlying electrical and chemical synaptic transmission*, en *Principles of neural science*, Kandel E. R. y Schwartz J. H., editores, Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, pp. 89-107 (1985).
18. Koester J., *Functional consequences of passive membrane properties of the neurons*, en *Principles of neural science*, Kandel E. R. y Schwartz J. H., editores, Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, pp. 66-74 (1985).
19. Koester J., *Resting membrane potential and action potential*, en *Principles of neural science*, Kandel E. R. y Schwartz J. H., editores, Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, pp. 49-57 (1985).
20. Levitan Y. B. y Kaczmarek L. K., *An introduction to the cellular structure of neurons and glia*, en *The neuron*, Levitan Y. B. y Kaczmarek L. K., editores, Oxford University Press, Oxford, pp. 3-30 (1991).
21. Lewis R. S. y Cahalan M. D., *Potassium and calcium channels in lymphocytes*, *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 623-653 (1995).
22. Purves R. D., *Microelectrode methods for intracellular recording and iontophoresis*, Academic Press, Londres (1995).

23. Rall W., *Core conductor theory and cable properties of neurons*, en *Handbook of physiology*, vol. 1, *The nervous system*, Kandel E. R., editor, American Physiological Society, Bethesda Md., pp. 39-97 (1977).
24. Rall W., *Time constants and electronic length of membrane cylinders and neurons*, *Biophys. J.* **9**, 1483-1508 (1969).
25. Sakmann B. y Neher E., *Single-channel recording*, Plenum Press, Nueva York (1983).
26. Tuckwell H. C., *Linear cable theory for nerve cylinders and dendritic trees, steady-state solutions*, en *Introduction to theoretical neurobiology*, vol. 1 *Linear cable theory and dendritic structure*, Tuckwell H. C., editor, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 124-178 (1988a).

AÑO DE LOS CENTENARIOS

1810

1910

Este libro se terminó de imprimir y encuadernar el 30 de noviembre de 2010 en los talleres de Editorial Cromocolor, S. A. de C. V., Miravalle 703 Col. Portales, C. P. 03300, México, D. F. La edición consta de 1000 ejemplares. La composición estuvo a cargo de Aline y Cristina Ortiz-Herrera.

Editor: Carlos Francisco Zúñiga