



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" I Z T A C A L A "**

**SIMULACION POR COMPUTADORA DE LAS CORRIENTES
IONICAS Y DE COMPUERTA DE LOS CANALES DE SODIO
EN BASE A LOS MODELOS DE HODGKIN Y HUXLEY
Y DE ARMSTRONG Y BEZANILLA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

ARTURO PONCE BALDERAS



TLALNEPANTLA, MEXICO

OCTUBRE, 1987

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES :

Por su cariño sincero y generoso, que siempre han
mostrado para mí, y para mis hermanos. En este
trabajo sea una muestra de lo que cosecharán de sus
hijos

A MIS HERMANOS :

A PEDRO :

En, siendo mi hermano mayor, me ha mostrado con
su ejemplo el camino a seguir, y que me ha dado
su apoyo total y desinteresado en los momentos
dificiles.

A ZEPHICIA, LIZI, JUDITH Y CONCHITA.

A quienes sé crecer a mi lado. Espero que esto
siera como un estímulo para que ellas también se
esfuerzen : Para que sigamos creciendo juntas.

A LA VIDA :

Por su CARINO y por su PACIENCIA

A MIS DIVOS :

Jorge, Marcelo, Rocío, etc.

A MIS MESTRAS :

C O N T E N I D O

	Página
1.0 INTRODUCCION	1
1.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS CANALES IONICOS	4
1.2 LAS CORRIENTES DE COMPUERTA	7
1.3 ASPECTOS TEORICOS DE LA CINETICA DE LOS CANALES	9
1.2 LOS CANALES DE SODIO	17
1.2.1 ESTRUCTURA DEL CANAL DE SODIO	18
1.2.2 CARACTERISTICAS CINETICAS DE LOS CANALES DE SODIO	20
1.2.2.1 Activacion	
1.2.2.2 Inactivación	
1.2.3 LA DEPENDENCIA ENTRE LA ACTIVACION Y LA INACTIVACION	23
1.4 MODELOS DE CANALES DE SODIO	
1.4.1 El modelo de HODGKIN y HUXLEY	25
1.4.2 El modelo multicompartimental de H-H	28
1.4.3 El modelo de ARMSTRONG y BEZANILLA	32
2.0 OBJETIVOS	35
3.0 MATERIAL Y METODOS	36

3.1 MATERIAL (Sistema de Computación)	
3.2 METODOS NUMERICOS	
4.0 RESULTADOS	4 6
Modelo de Hodgkin y Huxley	
4.1 SIMULACION DE LA CONDUCTANCIA AL SODIO	4 6
4.2 SIMULACION DE LAS CORRIENTES DE SODIO	5 0
4.3 SIMULACION DE LAS CORRIENTES DE COMPUERTA	5 5
Modelo de Armstrong y Bezanilla	
4.4 SIMULACION DE LA CONDUCTANCIA AL SODIO	5 7
4.5 CARACTERISTICAS FENOMENOLOGICAS DEL MODELO DE ARMSTRONG Y BEZANILLA	6 4
4.6 CARACTERISTICAS DE LAS CORRIENTES DE COMPUERTA PREDICHAS POR EL MODELO DE ARMSTRONG Y BEZANILLA	6 5
5.0 DISCUSION	7 5
6.0 CONCLUSIONES	7 8
7.0 BIBLIOGRAFIA	8 0

INTRODUCCION

La membrana citoplasmática es una estructura común a todas las células, sean estas bacterias, hongos o células de organismos multicelulares. La primera función que le fue atribuida fue la de delimitar el "espacio vivo del no vivo" en una célula, aunque esa primitiva visión ha sido reemplazada gradualmente. Actualmente se sabe, a raíz de las evidencias experimentales, que la membrana es una estructura celular compleja y altamente especializada, donde tienen lugar algunos de los procesos más importantes desarrollados por las células vivas.

La membrana está compuesta principalmente por una bicapa lipídica, que constituye la matriz en la cual se encuentran parcial o totalmente embebidas las proteínas, las cuales además de proporcionar consistencia tienen funciones propias: algunas, como receptores hormonales, participan en la comunicación intracelular o intercelular; otras son enzimas catalizadoras de algunos procesos metabólicos, y utilizan a la membrana como sitio de acción; y otras, de mayor importancia para la homeostasis de la célula, mantienen regulado el ambiente intracelular, controlando selectivamente el paso de algunas especies moleculares y restringiendo el de otras, así como

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

la rapidez con la que estas pueden pasar.

Se han descrito varios tipos de entidades moleculares que participan en la regulación del medio intracelular: las "bombas", que permiten el paso de especies moleculares, principalmente iónicas, en contra de un potencial electroquímico; los transportadores, que permiten el paso de una molécula cuando ésta ha formado un complejo con una estructura componente del transportador, pero a favor de un potencial electroquímico; y los canales iónicos, que permiten selectivamente el paso de iones a favor de un potencial electroquímico (Katz B.,1966).

De particular interés es el estudio de los canales iónicos, dado que estos, además de tener un papel regulatorio, constituyen el medio con el que la evolución ha desarrollado un sistema de comunicación intercelular muy rápido y de bajo costo energético, utilizando para ello el potencial eléctrico que se forma a través de la membrana como resultado de la diferencia de concentraciones iónicas entre el medio intracelular y el exterior de la célula. El potencial de acción es un cambio temporal de voltaje propio de las células excitables, que se propaga a lo largo de la superficie de la célula como resultado del flujo de iones a través de estos canales.

Los primeros canales que se estudiaron son los canales de sodio y los de potasio. (Hodgkin A.L. and A.F. Huxley,1952a-d), sin

embargo, en la última década, a raíz de la implementación de técnicas electrofisiológicas más sofisticadas como el "patch clamp" o el análisis de ruido, ha sido posible descubrir nuevos canales. Entre los más importantes se encuentran el canal de calcio, el canal de potasio activado por calcio, el canal de potasio de la rectificación anómala, el canal de cloro y el canal de calcio activado por calcio. Estos canales están actualmente siendo estudiados, tanto en sus propiedades cinéticas y estructurales como en el papel que juegan dentro del funcionamiento de las células en las que se encuentran, así como en su modulación, es decir, la manera que estos canales interactúan con otros componentes moleculares de la célula (Ruff, 1986)

A pesar de que en la última década se han logrado notables progresos en la caracterización y purificación de algunos canales iónicos, esta información es incompleta, puesto que se desconoce a ciencia cierta su estructura y su mecanismo de operación, y se tiene evidencia indirecta de su funcionamiento, a través de la medición por técnicas electrofisiológicas de la corriente producida por el flujo de iones a través de ellos. Basándose en el curso temporal de las corrientes ha sido posible distinguir características fenomenológicas, y del uso de modelos matemáticos explicativos se ha podido inferir posibles subestructuras y mecanismos de operación de algunos canales. Entre estos se encuentra el canal de sodio, el

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

cual es particularmente interesante por el papel que juega en la generación del potencial de acción en membranas excitables y a que es un canal presente en la mayoría de las células, tanto excitables como no excitables.

En este trabajo se pretende hacer una revisión de los modelos matemáticos que han sido propuestos para explicar el curso temporal de las corrientes de sodio, y posteriormente, en base a la información que actualmente se tiene de su estructura, actualizar los modelos y verificar si sus predicciones son congruentes con las características adscritas experimentalmente.

A continuación se presenta una revisión de los conceptos generales de los canales iónicos y de los aspectos teóricos en los que se basan los modelos planteados, posteriormente una revisión de la información que se tiene de los canales de sodio y finalmente de dos de los modelos que hasta ahora se han realizado para el canal del sodio.

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS CANALES IONICOS

Actualmente es ampliamente aceptado que los canales iónicos son

estructuras moleculares, compuestas por una o varias subunidades de naturaleza proteica, aunque no es descartada la participación que los lípidos y los glicósidos puedan tener en la estructura final y funcionamiento de la molécula (Ulbrich W.1974). Operacionalmente es posible proponer un modelo hipotético, general, de las estructuras fundamentales que componen un canal, estas son:

1.-Un poro acuoso.- La naturaleza lipídica de la membrana que separa el citoplasma del exterior de la célula permite preferentemente el paso de moléculas de tipo no polar o hidrofóbicas, las cuales son liposolubles ; mientras que las moléculas polares o hidrosolubles se encuentran restringidas por tener un bajo coeficiente de partición agua/lípido. Los canales iónicos permiten el paso de moléculas hidrosolubles a través de un poro, formado por proteínas que se encuentran embebidas en la bicapa lipídica de la membrana y que son lipofílicas en su cara externa e hidrofílicas en su cara interna.

2.-Un filtro de selectividad.- Los canales iónicos tienen la propiedad de discriminar entre aniones y cationes principalmente, además de discriminar entre aniones o entre cationes. Esta selectividad no es absoluta, por ejemplo: los canales de sodio permiten preferentemente el paso del sodio, pero los iones potasio también pueden pasar, aunque en una menor proporción (aproximadamente 1:2). Fundamentalmente se puede pensar en el filtro de selectividad

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

como una estrechez del poro acuoso, por ejemplo, dado que el catión más grande que puede atravesar un canal de sodio es de 3 a 5 Angstroms, es probable que estas sean las dimensiones del filtro de selectividad (Hille B.,1971). Por otro lado, la capacidad que tiene el filtro de selectividad de discriminar entre aniones y cationes es explicable por la presencia de grupos polares sobre la superficie interna del poro, sean estos aniones cuando se trata de un canal catiónico o visceversa. De acuerdo a Armstrong (1961) estas cargas pueden ser grupos (COO-), correspondientes al esqueleto de una estructura alfa-hélice cuando se trata de un canal catiónico.

3.- Una compuerta.- El paso de iones a través de los canales no es permanente, sino que esta regulada por una compuerta que puede estar abierta o cerrada a un tiempo dado. En algunos casos existen varias compuertas, las cuales deben estar abiertas simultáneamente para que el canal pueda permitir el paso de iones. Otro tipo de canales presentan varios estados abiertos (Hammill D.P. and B. Sackmann,1961,Neher E. and C.F. Stevens,1977, Miller C.1962), lo que podría indicar que tienen varias compuertas, cada una de las cuales puede abrir un poro distinto. Algunos canales presentan además compuertas que se encargan de inactivar el canal, de manera que este no pueda conducir el paso de iones, aun cuando sus compuertas esten abiertas. La inactivación es de particular interés en los canales de sodio, dado que juega un papel fundamental en la fase de caída y en el periodo refractario del potencial de acción. Es interesante

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

además por que con ella la cinética de los canales adquiere una dependencia del tiempo, además de la dependencia al voltaje o a agentes químicos.

4.-Un sensor.- Aunque los canales iónicos son efectivamente capaces de regular el paso de iones a través de la membrana, su operación sería inútil para un organismo si este no pudiera controlar el estado del canal, ya sea, abierto, cerrado o inactivado. Esto se logra a través de un sensor, presente en la estructura del canal, y que es capaz de aumentar o disminuir la probabilidad de que el canal se encuentre en uno u otro estado. Existen básicamente dos tipos de sensores: aquellos que son dependientes del voltaje y los que son dependientes de moléculas presentes en el medio, ya sea intra o extracelular.

La figura 1 muestra un modelo estructural, general, que reúne cada una de las características anteriormente mencionadas.

LAS CORRIENTES DE COMPUERTA

Una forma razonable de explicar la dependencia al voltaje de los canales iónicos es la presencia de cargas o momentos dipolares en las

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

compuertas que de alguna manera puedan "sentir" el voltaje a través de la membrana, estas cargas podrían sufrir un desplazamiento

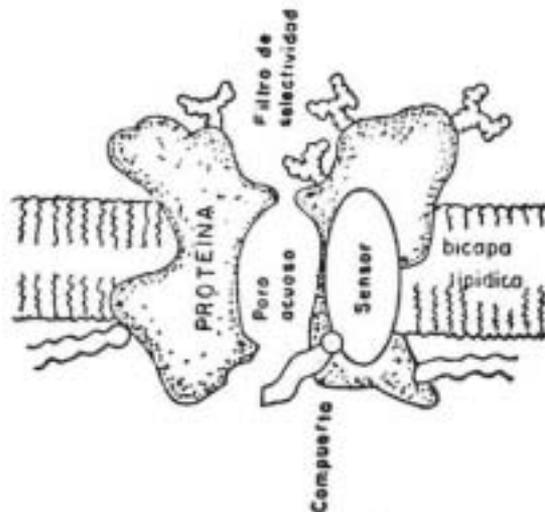


Fig. 1.-Esquema hipotético general de un canal iónico. (Hille, 1984)

e inducir en el canal un cambio conformacional que pudiera eventualmente abrirlo. El componente vectorial transmembranal de este desplazamiento produciría una corriente capacitiva, la cual

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

debería anteceder en el tiempo a la aparición de la corriente iónica. Esta hipótesis fue primero contemplada por Hodgkin y Huxley (1952b) quienes, sin embargo, no tenían en su tiempo las facilidades técnicas para poder resolver las corrientes de compuerta, dado que su sistema de fijación de voltaje era demasiado lento, y la corriente de compuerta se confundía con las corrientes capacitivas lineales, debidas a las propiedades dieléctricas de la membrana.

La demostración experimental de las corrientes de compuerta fue realizada finalmente en 1973 por Armstrong y Bezanilla (Armstrong C.M. and F. Bezanilla, 1973), quienes además de poseer un sistema de fijación de voltaje más rápido, restaron con una computadora "en línea" las corrientes capacitivas lineales y observaron una corriente residual no lineal, cuya área bajo la curva, equivalente a la carga, satura para valores de despolarización muy grandes y efectivamente antecede a la aparición de las corrientes iónicas. El estudio de las corrientes de compuerta proporciona información adicional, que no es revelada por las corrientes iónicas, de ahí la importancia que tienen al ser consideradas para la construcción de un modelo cinético.

ASPECTOS TEORICOS DE LA CINETICA DE LOS CANALES

Partiendo de la base que los canales iónicos se comportan

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

Ohmicamente dentro del rango de voltaje fisiológico, la corriente debida a un ión (I_{ion}), es una variable proporcional a la conductancia de la membrana a ese ión (G_{ion}), escalada por la fuerza de empuje (driving force) ($V_m - V_{ion}$), donde V_m es el potencial transmembranal y V_{ion} es el potencial de equilibrio del ión. Así:

$$I_{ion} = G_{ion} * (V_m - V_{ion}) \quad (1)$$

A su vez, la conductancia, que se registra a un tiempo dado depende del número de canales que se encuentran abiertos en ese momento, multiplicado por la conductancia de un canal, suponiendo que todos los canales tienen el mismo nivel de conductancia. Así, la conductancia a un tiempo dado $g_{ion}(t)$ se describe de la siguiente manera :

$$g_{ion}(t) = G_{ion} * P_a(t) \quad (2)$$

Donde G_{ion} es la conductancia máxima y $P_a(t)$ es la proporción de canales abiertos en ese tiempo.

Por otro lado, la proporción de canales abiertos $P_a(t)$ se relaciona con la proporción de canales que están en estado, ya sea

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

cerrado o inactivado mediante la ecuación de Boltzmann, de la siguiente manera :

$$P_a/P_c = \exp[(w + zeE)/kT] \quad (3)$$

Donde w es el trabajo requerido para pasar de un estado abierto a uno cerrado cuando E , el potencial de membrana es igual a cero, k es la constante de Boltzmann, z el número de cargas positivas en la compuerta, e es el valor absoluto de la carga electrónica y T es la temperatura absoluta.

Si :

$$P_a + P_c = 1 \quad (4)$$

La ecuación (3) se transforma en :

$$P_a = 1 / [1 + \exp(-(w + zeE)/kT)] \quad (5)$$

Esta ecuación describe la proporción de canales abiertos EN EL ESTADO ESTACIONARIO. Nótese que en la ecuación no está involucrada la variable tiempo. No obstante, la proporción de canales abiertos es una estimación de la probabilidad de que un canal cerrado se abra

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

en un momento dado, en el estado estacionario (Colquhoun D. and A.G. Hawkes, 1982).

Una forma de describir la variación temporal del estado abierto es usando modelos multicompartimentales, que consisten en un sistema de ecuaciones diferenciales acopladas de primer orden (Aidley G.L. 1966). Para ello es necesario hacer las siguientes suposiciones:

1).- Los canales pueden presentar un número N , finito de estados conformacionales, algunos de los cuales son cerrados, otros abiertos y otros inactivados (Lauger P. 1983).

2).- Un canal que se encuentre en un estado conformacional E_i puede pasar a otro estado conformacional E_j , $j \neq i$ con una probabilidad que puede ser puramente aleatoria o dependiente del potencial de membrana. Así, la variación que la proporción de canales en un estado conformacional dado (dE_i) tenga en un intervalo infinitesimal de tiempo se puede describir por una ecuación diferencial de la siguiente manera :

$$dE_i/dt = K_{ji}(E_j) - K_{ij}(E_i) \quad (5)$$

Donde K_{ji} es la constante de rapidez, que describe la

transición del iésimo al j esimo estado conformacional y K_{ij} es la constante de rapidez inversa. Dicha ecuación se representa en la figura 2, que es un diagrama de compartimientos :

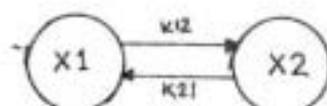


Figura 2.- Diagrama de compartimientos para un sistema de dos ecuaciones diferenciales acopladas

Posteriormente, considerando que el canal que se encuentra en el i-ésimo estado, puede cambiar a cualquiera de los $N-1$ estados restantes, la ecuación (5) se puede generalizar de la siguiente manera :

$$\frac{\partial E_i}{\partial t} = \sum_{j=1, N} (K_{ji} \cdot E_j) - E_i \cdot \sum_{j=1, N} K_{ij} \quad (6)$$

De este modo se puede construir un sistema de ecuaciones

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

diferenciales de primer orden que describan la serie de transiciones que una población de canales puede sufrir al variarse las condiciones del voltaje. Las proporciones de cada estado conformacional varían durante un intervalo de tiempo después de que el voltaje a través de la membrana es cambiado, tendiendo a un estado estacionario. Sin embargo, una vez que este estado estacionario ha sido alcanzado, es independiente de las condiciones con las cuales inicio. Por ejemplo: Si la proporción en el estado estable de canales que se encuentran en el i -ésimo estado, es igual a un número dado P_k a un voltaje (V) :

$$P_i(V) = P_k$$

El mismo valor P_k será alcanzado si en las condiciones iniciales se parte de un valor de voltaje (V_1) o de cualquier otro (V_2). De este modo las proporciones en el estado estable serán constantes independientes del tiempo y funciones directas del voltaje. La figura 3 muestra esquemáticamente esta característica general de cualquier sistema lineal.

En la práctica, la mayoría de los estados conformacionales es indistinguible una de otra. De los datos obtenidos experimentalmente solo se pueden distinguir dos estados : abiertos y no abiertos, aunque en los primeros pueden estar implícitos varios estados abiertos y en los segundos varios estados cerrados y varios estados, ya sea cerrados o cerrados-inactivados o inactivados. Debido a esto

es casi imposible conocer el curso temporal de cada uno de los N estados conformacionales, así como sus proporciones temporales. Mas

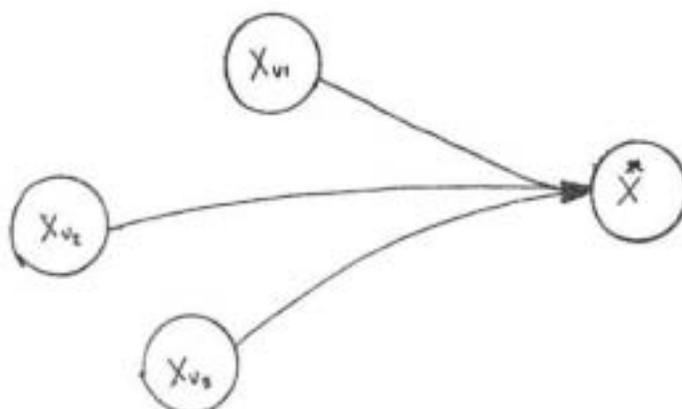


Fig 3.- Diagrama que muestra la convergencia hacia un solo estado estable, independientemente de las condiciones iniciales (véase texto)

difícil aún es determinar la dependencia del voltaje de cada una de las constantes de rapidez que componen el modelo. Siendo este problema más complejo cuanto más estados conformacionales son considerados en el modelo propuesto, dado que son más los parámetros que necesitan ajustarse. De este modo, el estado actual de los modelos se reduce a "forzar" empíricamente un ajuste del modelo propuesto a los datos experimentales variando los parámetros hasta encontrar una mínima diferencia.

PREDICION DE LAS CORRIENTES DE COMPUERTA

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

Adicionalmente se puede obtener información del análisis de las corrientes de compuerta: Partiendo del sistema de ecuaciones diferenciales se pueden predecir las corrientes de compuerta correspondientes considerando que algunas de las transiciones corresponden al movimiento de compuertas, y que este movimiento ocasiona un desplazamiento de cargas cuyo componente transmembranal produce una corriente capacitiva (French R.J. and R. Horn.1983). Dicha corriente es proporcional a la carga de cada partícula e por el número de partículas n_p de cada compuerta. La magnitud de la corriente de compuerta desplazada entre el i -ésimo y el j -ésimo estados conformacionales de un canal iónico depende de la constante de rapidez de la siguiente manera :

$$I_{ij} = d(Q_{ij})/dt \quad (7)$$

Donde Q_{ij} es la carga total desplazada entre el i -ésimo y el j -ésimo estados en un intervalo dt de tiempo. Esta depende del número de canales que sufran la transición (i,j) , y este número a su vez, depende del número de canales totales N , por la probabilidad de la transición $p(i,j)$, por el número de cargas elementales que sean desplazadas en cada transición n_{se} , donde e es la carga elemental de un electrón, así :

$$d[Q_{ij}] = N \cdot n_p \cdot e \cdot d[I_{ij}] / dt \quad (8)$$

Rearreglando (7), (8) y (5) :

$$I_{g(i,j)} = N \cdot n_p \cdot e \cdot (K_{ij} \cdot E_j - K_{ij} \cdot E_j) \quad (9)$$

Posteriormente, la corriente de compuerta es la sumatoria de las corrientes en cada transición :

$$I_g = \sum_{i=1}^N (I_{g(i)}) \quad (10)$$

$i=1, N$

LOS CANALES DE SODIO

Los canales de sodio que primero fueron descritos son sensibles a **TETRODOTOXINA (TTX)**, un potente veneno que produce parálisis, este es extraído de un pez globo del orden **TETRAODONTIFORME**. La TTX bloquea la conducción del potencial de acción en nervio y músculo, como consecuencia de un bloqueo selectivo de la corriente de sodio (Barchi R.L.1982); Asimismo, estos canales son sensibles a **SAXITOXINA (STX)**, otro agente bloqueador de las corrientes de sodio, extraído de dinoflagelados marinos del género **GONYALAUX** (Taylor y Seliger, 1979), efectiva en

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

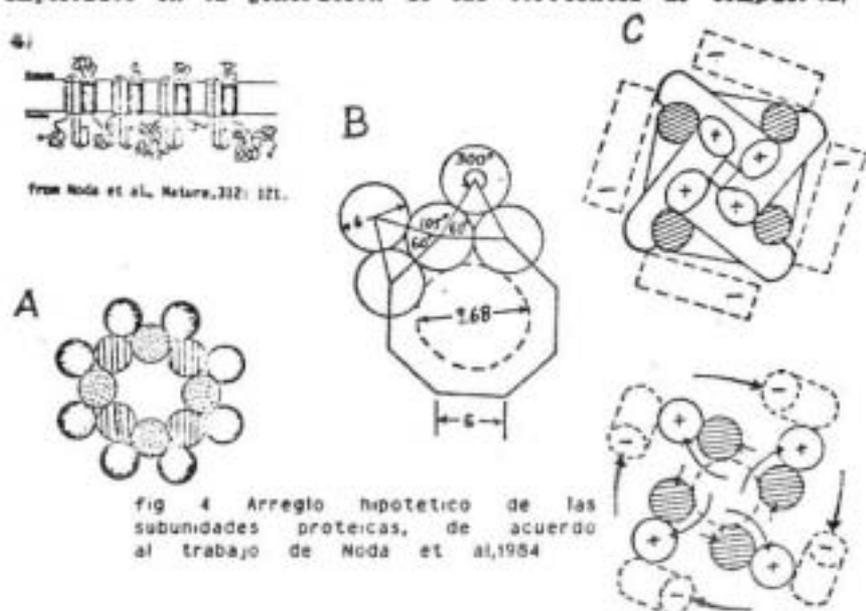
concentraciones nanomolares. Estos canales se han descrito en el axón gigante del calamar y en el músculo esquelético de anfibio (Campbell D.T. and B. Hille.1976)

Posteriormente se han descrito otros dos tipos de canales, el primero de los cuales es resistente a la acción de la TTX y STX. Estos canales se han encontrado en el músculo cardíaco de mamífero (Dudel et al,1967), fibras musculares desnervadas y en el nodo de Ranvier de rana tratadas con TRIMETHYLOXONIUM (Spalding, 1960). Sin embargo, es posible que se trate del mismo tipo de canales que los sensibles a TTX y STX, y que los segundos tengan modificada la estructura del canal que es afin a la TTX o STX.(Armstrong, 1981). El tercer tipo de canal de sodio se ha encontrado en axones gigantes de calamar, a los cuales se ha denominado "canales durmientes" por la cinética tan lenta que presentan y a que no se inactivan con una despolarización prolongada, como los otros canales de sodio (Mattheson, 1982). El resto de este trabajo se enfocará sobre el primer tipo, el de canales sensibles a TTX y STX.

ESTRUCTURA DEL CANAL DE SODIO

Las primeras inferencias acerca de la estructura del canal de sodio fueron hechas por Hodgkin y Huxley(1952b), quienes, basándose en las características de la cinética de las corrientes de sodio, dedujeron que tres partículas podrían estar participando en la

apertura del canal, mientras una sola podría inactivarlo. Posteriormente, Armstrong(1981) supuso la existencia de cuatro a seis estados de activación, acoplados a, al menos un estado de inactivación. Sin embargo, la evidencia más relevante es la hecha por Noda et al (1984), en la cual, haciendo estudios de secuenciación de aminoácidos derivados de segmentos clonados de DNA de canales de sodio de la placa de anguila eléctrica *ELECTROPHORUS ELECTRICUS*, dedujeron la existencia de cuatro subunidades homólogas, simétricas que atraviesan enteramente la membrana y que exhiben un segmento cargado positivamente que mira hacia la superficie interna de la membrana, y un segmento cargado negativamente que mira hacia el exterior de la membrana, ambos segmentos pueden actuar como un sensor y estar implicados en la generación de las corrientes de compuerta, (figura 4)



CARACTERISTICAS CINETICAS DE LOS CANALES DE SODIO

Las características cinéticas de las corrientes generadas por los canales de sodio fueron primeramente estudiadas por Hodgkin y Huxley en el axón gigante del calamar, utilizando para ello la técnica de fijación de voltaje, en condiciones en las cuales se abolía la corriente generada por otros canales iónicos (Hodgkin y Huxley 1952a-d). Ellos encontraron dos procesos fundamentales, la **ACTIVACION** y la **INACTIVACION**. En la figura 5 se muestra una serie de trazos de corrientes de sodio registradas en células excitables de diferentes especies, nótese la similitud de la cinética que estas corrientes tienen, una subida exponencial después de una despolarización, seguida de una caída exponencial. Como se podrá notar, la caída se inicia aún cuando el voltaje al cual se mantiene la membrana no varía, este proceso es conocido como la inactivación, y la subida como la activación.

La inactivación es un proceso más lento que la activación, este es un proceso relativamente independiente del voltaje, y más bien dependiente del tiempo. La inactivación explica la caída de la corriente de sodio para pulsos despolarizantes de mayor duración. En la figura 6 se observa que a pesar de que el potencial de membrana es mantenido en un valor despolarizante, la corriente disminuye después de haber alcanzado un valor máximo (Figura 6a).

Esta caída no sigue un proceso exponencial simple, y se han

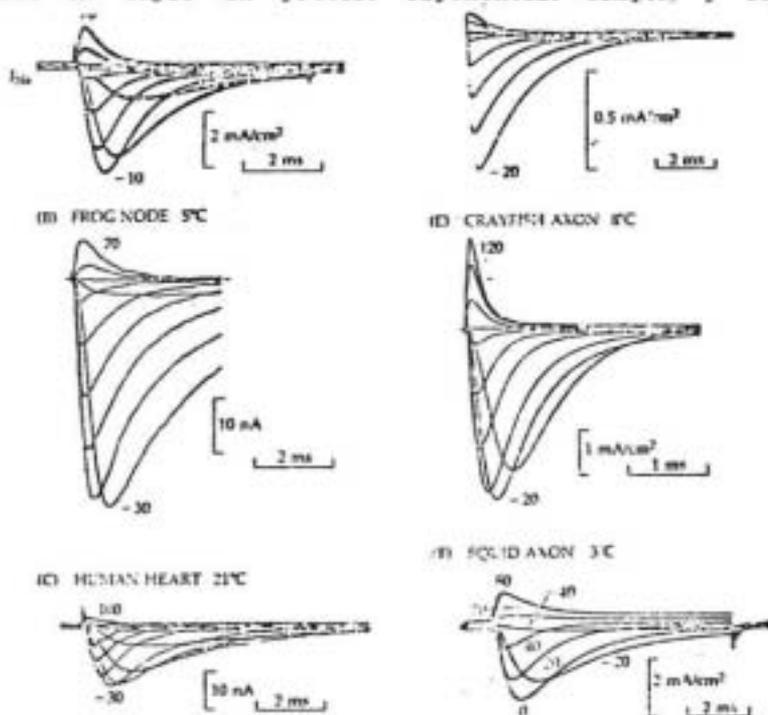


Fig 5.- Familias de corrientes de sodio registradas bajo fijación de voltaje en una variedad de células excitables. De Hille and Campbell, 1976; Hille, 1972; Bustamante y Mc Donald, 1963; Bullock and Schauf, 1979.

encontrado tres constantes de tiempo para la inactivación, las cuales podrían corresponder a tres estados de inactivación diferentes: La activación más rápida es capaz de inactivar los canales en una escala de tiempo de milisegundos, y es la responsable de la caída del potencial de acción y del periodo refractario; La

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

segunda inactivación actúa en una escala de tiempo del orden de décimas de segundo (Brismar,1977), mientras que la tercera lo hace en el orden de minutos (Fox,1976).

Estudios hechos in vitro con musculo de rata han demostrado que más de la mitad de los canales están inactivados en el potencial de reposo debido a las formas de inactivación lenta (Almers, 1984), sugiriendo que estas juegan un papel importante en la regulación de la excitabilidad y la frecuencia con la que los tejidos excitables pueden producir potenciales de acción (Ruff,1986)

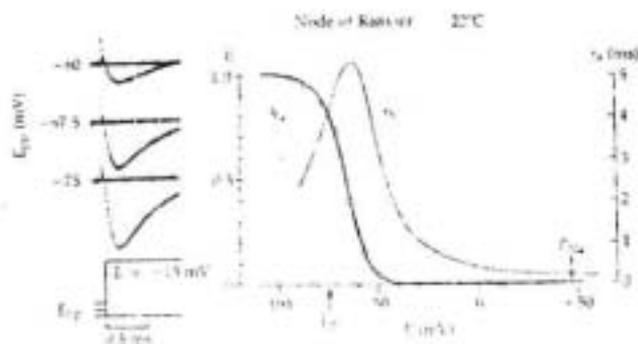


fig 5.- inactivación de la corriente de sodio.(a) Corrientes de sodio en nodo de Ranvier tomados con la tecnica de gap de vaselina los cuales son sometidos a un prepulso de amplitud variable y despues llevados a -15 mv. (b) Grafica

de la amplitud del pico de la corriente contra el potencial del prepulso o curva de h infinito.

LA DEPENDENCIA ENTRE LA ACTIVACION Y LA INACTIVACION

Inicialmente se postuló que la activación y la inactivación son dos procesos independientes entre sí y dependientes cada uno del voltaje y del tiempo (Hodgkin y Huxley 1952b). Posteriormente se han mostrado evidencias que demuestran que los dos procesos están acoplados y que los canales de sodio deben abrirse antes de inactivarse (Bezanilla y Armstrong, 1977). Por otro lado, la razón más fuerte en contra de esta teoría, y en favor de la de procesos independientes se basa en que un modelo de procesos acoplados describe una corriente sin inactivación cuyo valor en el estado estable tiene casi la misma amplitud que el del valor máximo alcanzado por una corriente normal. En experimentos en los cuales se ha perfundido internamente la membrana del axón gigante del calamar con pronasa, una mezcla enzimática que es capaz de remover la inactivación, se ha encontrado que las corrientes iónicas a las cuales se les ha removido la inactivación alcanzan un valor máximo que es mucho mayor que el valor máximo de las corrientes cuando estas tienen inactivación. En la figura 7a se muestran corrientes normales y corrientes perfundidas con pronasa. En la figura 7b se muestra una comparación de corrientes bajo las dos condiciones a un mismo valor de potencial de membrana. Nótese que el valor máximo de las corrientes sin inactivación es mayor que el máximo de las

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

normales. Si la inactivación fuera independiente de la activación, este valor máximo se esperaría que fuera el mismo.

Actualmente existen controversias entre las dos teorías, la de procesos desacoplados contra la de inactivación dependiente de la activación (Horn R.J., Patlak and C. Stevens, 1981), y varios modelos han sido planteados, tanto para la inactivación independiente de la activación (Hoyt R.C., Hodgkin y Huxley 1952d), como para la activación acoplada a la inactivación (Armstrong y Gilly, 1979, Armstrong y Bezanilla, 1977, Oxford, 1981)

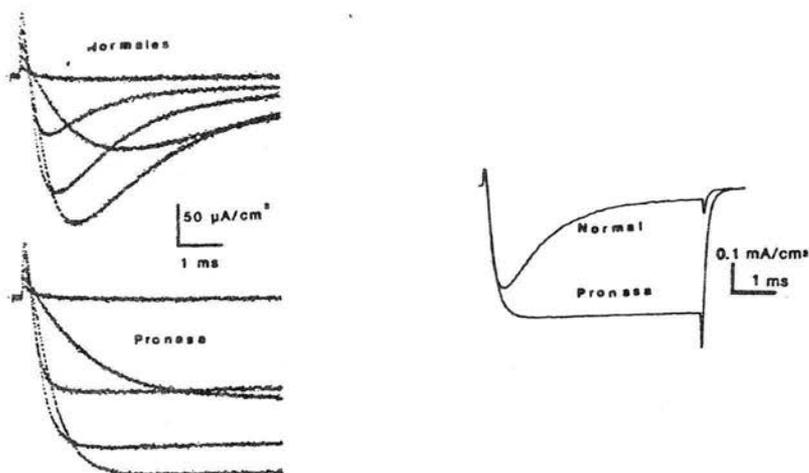


fig 7.-a) Registros de corrientes de sodio normales en axones gigantes de calamar (trazos superiores) y en los cuales se ha removido la inactivación con pronasa (trazos inferiores) Nótese que el valor en el estado estable es mayor que el valor máximo alcanzado con la inactivación presente.b) Trazos sobrepuestos para un mismo axón en las dos condiciones.(De Stimers et al, 1985)

EL MODELO DE HODGKIN Y HUXLEY

Como se puede apreciar en las gráficas de las corrientes de sodio, estas siguen una cinética no lineal, que de manera general es descrita por una ecuación diferencial de segundo orden. Hodgkin y Huxley (Hodgkin A.L. and A.P. Huxley.1952d) resolvieron el problema modelando el proceso como la suma de dos ecuaciones lineales de primer orden, una correspondiente a la activación y otra a la inactivación, como a continuación se detalla :

La primera suposición en que se fundamenta su modelo es que la conductancia que presentan los canales es óhmica, es decir : la relación entre la corriente de sodio máxima y el voltaje es lineal. De acuerdo a esto se puede plantear la siguiente ecuación :

$$i_{Na} = g_{Na}(V_m - V_{Na}) \quad (11)$$

Donde :

i_{Na} es la corriente debida al flujo de iones Na^+ a través de los canales.

g_{Na} es la conductancia de los canales de sodio
 V_m es el potencial de membrana, estimado como la diferencia de potencial del interior con respecto al exterior de la célula

V_{Na} es el potencial de equilibrio para el sodio, descrito por la ecuación de Nernst. Esta ecuación predice el valor del potencial de membrana en el cual no hay flujo neto de iones Na^+ y se describe a continuación :

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

$$V_{na} = (RT/zF) \cdot \log([Na^+]_{ext}/[Na^+]_{int}) \quad (12)$$

Donde R es la constante de equilibrio de los gases, T es la temperatura en grados absolutos, z es la valencia del ion y F es la constante de Faraday (96000 coulombios/voltio). $[Na^+]_{ext}$ es la concentraci3n externa del sodio.

Dado que bajo condiciones de fijaci3n de voltaje V_m es constante, y asi la diferencia $(V_m - V_{na})$ es constante, la conductancia G_{na} debe ser dependiente del tiempo.

$$G_{na} = G_{na}(t)$$

Esta caracteristica fue resuelta postulando, como mencione anteriormente dos procesos independientes, la activaci3n y la inactivaci3n: La activaci3n, que en la terminologia de Hodgkin y Huxley (HH) se conoce como m, es bien explicada por una cinetica exponencial simple, elevada a la tercera potencia (m^3). Esta cinetica exponencial deriva de la siguiente ecuacion diferencial de primer orden :

$$dm/dt = \alpha f(m)(1-m) - \beta m^3 \quad (13)$$

cuya soluci3n implicita es :

$$m(t) = m_{ss} - (m_{ss} - m_0) \cdot \exp(-t/\tau_{aum}) \quad (14)$$

Donde m_{ss} es el valor alcanzado por la activaci3n a tiempo infinito y m_0 al tiempo inicial

La inactivación, por otro lado es descrita por un proceso exponencial simple derivado de la siguiente ecuación :

$$dh/dt = \alpha h(1-h) - \beta h \quad (15)$$

cuya solución es :

$$h(t) = h_{ss} - (h_{ss} - h_0) \exp(-t/\tau_h) \quad (16)$$

Donde h_{ss} es el valor alcanzado por la inactivación a tiempo infinito y h_0 al tiempo inicial.

Los dos procesos, m y h explican la variación de la conductancia de la siguiente manera :

$$g_{Na}(t) = G_{Na(max)} m(t)^3 h(t) \quad (17)$$

Rearreglando (17) con (14) y (16), y considerando como condiciones de límite $m_0=0$ y $h_{ss}=0$, se obtiene :

$$g_{Na}(t) = G_{Na(max)} m_{ss}^3 h_0 [1 - \exp(-t/\tau_m)]^3 \exp(-t/\tau_h) \quad (18)$$

La cual es la solución explícita de la conductancia de sodio en función del tiempo, para un valor de potencial de membrana dado.

La dependencia al voltaje de la conductancia al sodio se encuentra en las constantes de rapidez de las ecuaciones diferenciales para m y h , es decir en las alfas y betas m y h . Dichas ecuaciones fueron deducidas de un ajuste empírico, considerando una relación de tipo Boltzmann entre el voltaje y las constantes de rapidez. Las ecuaciones que describen esta dependencia se dan a continuación :

$$\alpha f_{\alpha m} = (0.1) * (v+25) / (\exp((v+25)/10) - 1)$$

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

```
betam=(4.0)*exp(v/18)
alfah=0.07*exp(v/20)
betah=1.0/(exp((v*30)/10)+1)
```

En su trabajo original, los valores considerados por Hodgkin y Huxley para el voltaje tienen un valor de cero cuando el potencial de membrana está en el reposo, y creciente hacia valores negativos. Actualmente se considera el potencial de membrana como la diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la membrana, y una despolarización se considera positiva. Por lo tanto es necesario hacer una corrección entre las dos terminologías, que se logra mediante la siguiente relación :

$$V_m = -V_{hh} - v_r$$

Donde V_m es el potencial de membrana, V_{hh} es el potencial de membrana de acuerdo a la convención de Hodgkin y Huxley y V_r es el potencial de reposo de la célula, aproximadamente -70 mV.

MODELO MULTICOMPARTIMENTAL DE HODGKIN Y HUXLEY

Hodgkin y Huxley encontraron que el, al elevar el componente m de la ACTIVACION se lograba el mejor ajuste a los datos experimentales, una interpretación mecanística de este ajuste fue dada considerando que existen tres compuertas de activación por cada canal de sodio (Hodgkin y Huxley, 1952d), estas compuertas deben

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

estar abiertas simultáneamente para que el canal pueda conducir iones de sodio. De este modo el canal puede asumir cuatro posibles conformaciones distinguibles cinéticamente: A0, A1, A2 y A3. Donde el estado A0 corresponde a 0 compuertas abiertas, A1 a una compuerta abierta y así sucesivamente.

Por otro lado, la inactivación se puede representar por una compuerta, la cual si esta cerrada convierte al canal en inactivado.

Esta compuerta puede abrirse o cerrarse independientemente del estado de activación en que se encuentre el canal. Esto implica que existen ocho estados posibles :

A0,A1,A2,A3	Canales	no	inactivados
I0,I1,I2,I3	Canales		inactivados

Los estados I0,I1,I2,I3 representan aquellos canales en los cuales la partícula de inactivación esta cerrada, de manera que aunque las tres partículas m estuvieran cerradas, el canal no podría conducir

Se puede ver entonces que de estos ocho estados el unico estado abierto es el A3, que corresponde a las tres compuertas abiertas y no inactivación.

Para finalizar el modelo compartamental se puede suponer que las tres compuertas de activación son indistinguibles, es decir tienen la

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

misma probabilidad de apertura una y otra. Si esto es cierto, la probabilidad de la transición A0-A1 será equivalente a tres veces la probabilidad de que una sola compuerta se abra, mientras que la probabilidad de la transición A1-A2 será del doble y el de la transición A2-A3 será igual al de que una sola compuerta se abra durante un intervalo de tiempo dado. Posteriormente, si este intervalo es muy chico, se pueden desprestigiar las probabilidades de que en ese tiempo ocurran transiciones dobles, como A0-A2, y se considera entonces que el esquema es lineal, como se representa en la figura 8

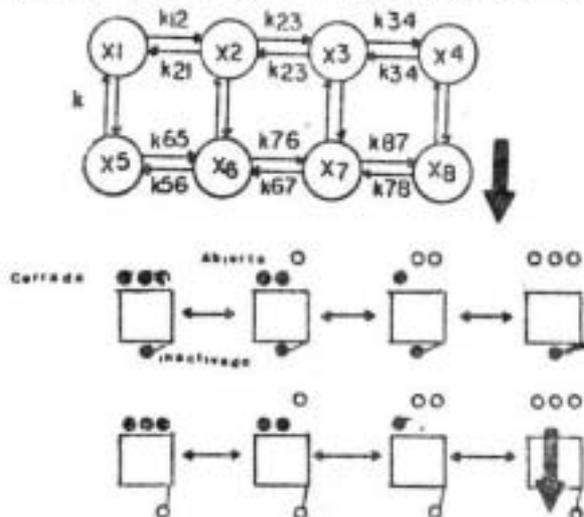


Fig 8.- (a) Diagrama de compartimentos de modelo de Hodgkin y Huxley. Los estados X_1, \dots, X_4 representan los estados inactivados, mientras los estados X_5, \dots, X_8 representan los estados no inactivados, de estos, solo el estado X_8 puede permitir el paso de iones y se señala con una flecha (b) Interpretación mecánica de los procesos en el modelo de Hodgkin y Huxley. Los círculos en la parte superior denotan las partículas de activación, y la inferior la de inactivación

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

En base a las suposiciones consideradas anteriormente se pueden hacer las siguientes relaciones :

$K01 = 3\alpha$	(1hh)
$K12 = 2\alpha$	(2hh)
$K23 = \alpha$	(3hh)
$K90 = \beta$	(4hh)
$K21 = 2\beta$	(5hh)
$K32 = 3\beta$	(6hh)

mientras para la inactivación :

$Ka = \alpha$	(7hh)
$Kb = \beta$	(8hh)

El sistema de ecuaciones diferenciales que describe el modelo multicompartmental de Hodgkin y Huxley es el siguiente :

$d(X_1)/dt = K21x_2 + K41x_4 - x_1(K12+K26)$	(9hh)
$d(X_2)/dt = K12x_1 + K32x_3 + K62x_6 - x_2(K21+K23+K26)$	(10hh)
$d(X_3)/dt = K23x_2 + K43x_4 + K73x_7 - x_3(K32+K34+K37)$	(11hh)
$d(X_4)/dt = K34x_3 + K84x_8 - x_4(K43+K48)$	(12hh)
$d(X_5)/dt = K15x_1 + K65x_6 - x_5(K51+K56)$	(13hh)
$d(X_6)/dt = K56x_5 + K76x_7 + K26x_2 - x_6(K65+K67+K62)$	(14hh)
$d(X_7)/dt = K37x_3 + K67x_6 + K87x_8 - x_7(K73+K76+K78)$	(15hh)
$d(X_8)/dt = K48x_4 + K78x_7 - x_8(K84+K87)$	(16hh)

Cabe hacer notar que se hizo un cambio de terminología por conveniencia : El estado x_1 corresponde a cero compuertas abiertas ; el estado x_4 corresponde a 3 compuertas abiertas ; las variables x_5 a x_8 representan los estados inactivados.

EL MODELO DE ARMSTRONG Y BEZANILLA

El siguiente modelo fue propuesto por Armstrong y Bezanilla para explicar algunos aspectos relacionados con la cinetica de los canales de sodio y los cuales no son predecibles por el modelo de Hodgkin y Huxley. Entre estos aspectos se encuentra la cinética de las corrientes de compuerta, cuya caída parece seguir un proceso exponencial que no es ajustable a una sola constante de tiempo sino a dos, siendo una rápida y una lenta. Esto hace suponer la presencia de dos procesos de activación, con dos constantes de rapidez diferentes. Posteriormente, el hecho de que se registre una corriente de compuerta al cesar una despolarización prolongada y regresar al potencial de mantenimiento, indica que hay una movilización de compuertas cuando los canales se encuentran inactivados, siendo la carga total desplazada equivalente a un tercio de la carga total.

El modelo de Armstrong y Bezanilla propone por lo tanto seis estados de activación acoplados linealmente, los cinco primeros, con la misma constante de rapidez tanto para la activación como para la desactivación. El último paso de transición es modelado con una constante de rapidez mas lenta que los anteriores, esto para poder explicar la segunda constante de tiempo en la caída de las corrientes

de compuerta producidas por la activación. Por otro lado, para la inactivación propone dos estados, el primero de los cuales esta acoplado al estado de apertura, mientras el segundo esta acoplado al primer estado de inactivación y al estado de activacion lenta (figura 9)

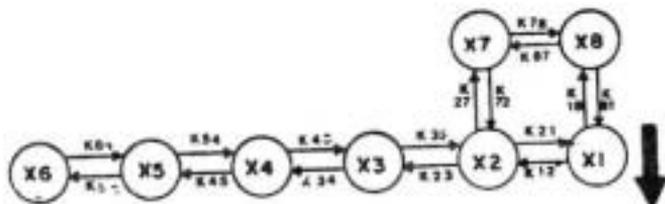


Fig 9.- Diagrama de compartimentos del modelo de Armstrong y Bezanilla. Los estados X6,...,X1, representan las transiciones sucesivas que debe tener un canal hasta llegar al estado abierto X1, los estados X8 y X7 son estados inactivados, como se observa, un canal debe abrirse antes de poder inactivarse

El sistema de ecuaciones diferenciales que describen este modelo es entonces el siguiente :

$$\begin{aligned}
 \frac{d(X1)}{dt} &= k21x2 - x1k12 & (1 \text{ A B}) \\
 \frac{d(X2)}{dt} &= k32x3+k12x1 - x2*(k23+k21) & (2 \text{ A B}) \\
 \frac{d(X3)}{dt} &= k43x4+k23x2 - x3*(k34+k32) & (3 \text{ A B}) \\
 \frac{d(X4)}{dt} &= k54x5+k34x3 - x4*(k43+k45) & (4 \text{ A B}) \\
 \frac{d(X5)}{dt} &= k45x4+k54x6+k85x8 - x5*(k56+k54+k58) & (5 \text{ A B}) \\
 \frac{d(X6)}{dt} &= k56x5+k76x7 - x6*(k65+k67) & (6 \text{ A B}) \\
 \frac{d(X7)}{dt} &= k67x6+k87x8 - x7*(k76+k78) & (7 \text{ A B}) \\
 \frac{d(X8)}{dt} &= k78x7+k58x5 - x8*(k85+k87) & (8 \text{ A B})
 \end{aligned}$$

En este caso, las constantes de rapidez no son supuestas estar

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

relacionadas linealmente con las constantes de rapidez usadas para el modelo de Hodgkin y Huxley, sin embargo se propone una relación con el voltaje mediante una expresión derivada de la ecuación de Boltzmann, dicha relación es la siguiente :

$$K_i = K_{ij}/K_j = \exp[Q_i(V_m - V_i)/25] \quad (9A8)$$

Esta es una restricción que indica que la constante de equilibrio del *i*-ésimo paso (K_i), la cual es equivalente, por la ley de acción de masas a la relación de las constantes de rapidez, debe depender del voltaje con una constante de rapidez de aproximadamente 6 meV por cada milivolt de cambio de potencial de membrana, el cual fue calculado para la activación por Hodgkin y Huxley (1952d). V_i es el potencial de membrana al cual $K_{ij}=K_{ji}$ y por lo tanto no hay incremento neto entre el *i*-ésimo y el *j*-ésimo compartimiento, estos valores se pueden deducir de la curva de carga-voltaje (Q-V), en el punto medio de la gráfica, que corresponde aproximadamente a -30mv (vease figura 10). Para la inactivación, debido a que no se supone dependencia del voltaje, se ajusta empíricamente una vez que se ha determinado la activación por un método de aproximaciones sucesivas.

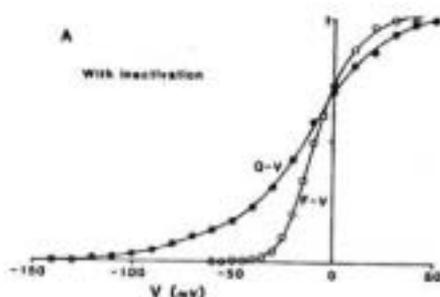


Fig 10.- Relacion de Q-V o carga desplazada en funcion del voltaje. La carga se estima como el area bajo la curva de las corrientes de compuerta generadas a un voltaje dado.

OBJETIVOS

1.- Construir un programa de computadora capaz de resolver por métodos numéricos el modelo multicompartimental de ocho estados de Hodgkin y Huxley y comparar su resolución con la del modelo m,h

2.- Resolver las características de las corrientes de compuerta predichas por el modelo de Hodgkin y Huxley.

4.- Construir un programa capaz de resolver por métodos numéricos el modelo de Armstrong y Bezanilla y estudiar sus características fenomenológicas y rango de sensibilidad paramétrica, en la predicción de la conductancia al sodio y las corrientes de compuerta.

MATERIAL Y METODOS

SISTEMA DE COMPUTACION

Para realizar las simulaciones se utilizó una computadora **IBM AT**, con 640 Kilobytes de capacidad instalada de **RAM**. Como parte adicional de Hardware, la computadora estaba equipada con un procesador numérico 8087, el cual es capaz de acelerar los cálculos numéricos del microprocesador. Los programas fueron realizados en lenguaje **BASIC** utilizando el programa compilador **QUICKBASIC** de MicroSoft Inc. Las gráficas se obtuvieron a partir de comandos de **QUICKBASIC** directamente en la pantalla, y cuando se requería una impresión se graficaron en una impresora de matriz de puntos **EPSON**. La impresión fue controlada por el sistema operativo **MS-DOS** a través del programa residente **GRAPHICS**, que se instala en la memoria de acceso aleatorio antes de acceder a **BASICA**. De este modo la impresión es "transparente" y con una resolución de 512 X 216 puntos.

METODOS NUMERICOS

Dado un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias como las de los modelos anteriormente expuestos, del tipo:

$$F_i(t) = F_i'(t, Y_1(t), Y_2(t), Y_3(t), \dots, Y_N(t))$$

El cálculo de $Y_i(t + \Delta t)$ puede ser resuelto con el uso de métodos numéricos (Malcom H.A. and G.E. Forythe, 1977), cuyo fin es el de la resolución por pasos de las ecuaciones diferenciales, que de otro modo tendría que realizarse con métodos analíticos como la integración (Hamming R.W., 1973). Existen diversos métodos de integración numérica, entre los más conocidos se encuentran el método de Euler, los métodos de Runge-Kutta de segundo y cuarto orden, el método de predictor-corrector de Adams (McCracken D.D. and Dorn W.S., 1964, Moore J.W. and F. Ramon, 1974). Las simulaciones realizadas en este trabajo se hicieron utilizando los métodos de Euler y de Runge-Kutta de cuarto orden, debido a que este método presenta ventajas sobre el de Euler en cuanto a la precisión de sus predicciones y a que no diverge cuando se usan valores grandes de Δt . Además este método presenta ventajas sobre el predictor-corrector de Adams debido a la mayor rapidez de los cálculos en la computadora (Moore J.W. and F. Ramon, 1974).

El método de Euler proporciona una primera aproximación a la resolución de la integral. Dadas $Y_1, Y_2, Y_3, \dots, Y_N$, en condiciones iniciales, el método calcula los valores a los tiempos $t + \Delta t$, $t + 2\Delta t$, etc. del siguiente modo :

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

$$Y_i(t+\text{deltat})=Y_i'(t)\cdot\text{deltat} + Y_i(t)$$

La aproximación es mas exacta cuanto mas pequeño es el incremento de tiempo delta t. Este método sin embargo presenta el inconveniente de que su solución diverge para valores grandes de deltat .

El método de Runge-Kutta de cuarto orden consiste en calcular el valor de la variable Y al tiempo t+h en base al método de Euler y posteriormente reevaluar el valor de Y y de su derivada en $X(t) + 1/2\cdot h$ (donde h es el incremento de tiempo)

Así, el valor de Y al tiempo t+h es :

$$Y(t+h) = Y(t) + h/ 6\cdot(k1+2\cdot k2+2\cdot k3+k4)$$

Donde :

$$\begin{aligned} k1 &= f(Xm, Ym) \\ k2 &= f(Xm + 1/2\cdot h, Ym+1/2\cdot h\cdot k1) \\ k3 &= f(Xm + 1/2\cdot h, Ym+1/2\cdot h\cdot k2) \\ k4 &= f(Xm + h, Ym + h\cdot k3) \end{aligned}$$

Con este método es posible simular las variaciones con el tiempo en cada uno de los compartimientos de los modelos con el uso de procedimientos de computación. Transcribiendo los métodos de integración numérica a un programa de computadora capaz de resolverlos a intervalos de tiempo controlables.

Aunque en todos los modelos planteados anteriormente es solo un estado el que representa la cinética del estado abierto, es necesario

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

resolver todos los estados restantes, dado que el valor a un tiempo dado de cada estado depende de los valores de los otros estados

CONSTRUCCION DE LOS PROGRAMAS DE SIMULACION

Debido a que el compilador de BASIC que se utilizó para la construcción de los programas es de tipo estructurado, fue posible realizar módulos o subrutinas que hacen una tarea específica cuando son accedidos por el programa principal a continuación se describen las características de esas subrutinas

Subrutina format : Accesa el modo grafico de la computadora e instala un limite superior e inferior a la pantalla para el eje de las ordenadas y las abscisas. Por ejemplo, para el calculo de las conductancias el valor maximo esperado es de uno, debido a la restricción puesta en los estados; sin embargo para las corrientes se esperan valores del orden de -1000 a +1000 . La escala se especifica por la variable ny:

```
cb
@L:28
h=80
sum=100
ny=1500
screen 2
radius=(asum@/3),-(ny+ny/3)-(asum@,ar/2+ny/4)
line(20,-0,ny)
line(20,-0,ny/2)
line(0,0)-(asum@,0)
width
```

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

```

for var = 0 to var
  loc( (var*asomdt/arat,0)-(var*asomdt/arat,-at/50)
  if var = 0 then 1
  loc(0,(var*arat/arat)-(-(asomdt/80),(var*arat/arat)
  loc(0,-(var*arat/arat)-(-(asomdt/80),-(var*arat/arat)
next
return

```

Subrutina alfas : Define las constantes de rapidez del modelo de Hodgkin y Huxley dado un voltaje. nótese el cambio de convención en la definición del voltaje

```

vb = vb + 10
alfab = ln(vb+25)/(exp((vb+25)/10)-1)
betab = exp(vb/10)
alfah = 0.1 * exp(vb/20)
betah = 1/(exp((vb+30)/10)+1)
return

```

Subrutina taus : Calcula los valores de taum,tauh, y m y h infinito , estos valores son necesarios para la solución explicita del modelo de Hodgkin y Huxley

```

taum = 1/(alfab+betab)
tauh = 1/(alfah+betah)
m = alfab/taum
h = alfab/betah
return

```

Subrutina incon : Define las condiciones iniciales para el modelo de 6 estados

```

c1 = 34000
c2 = 5.75E-02
c3 = 3.2945E-01
c4 = 5.9905E-05
c5 = 506383
c6 = 6.9267E-02
c7 = 4.7458E-01
c8 = 8.8404E-05
return

```

Faltan páginas

N° 41-42

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

```

f11:=c2/(a1+ab1(a2-c2)/(b1+ba2))
f22:=ab2(a2+c2)/(b2+c2/(a1+ba2))
gab:=c2/a2

```

rtas

Subrutina inityb : Define condiciones iniciales del modelo de armstrong y bezanilla

```

a1:=1
a2:=0
ab1:=0
ab2:=0
c1:=0
c2:=0

```

rtas

Subrutina ratessyb : Define constantes de rapidez para el modelo de Armstrong y Bezanilla dado el voltaje de membrana y alfa x y alfa i

```

r1:=100/w
r2:=25/w
l1:=e
l2:=e
h1:=a1/exp((l1*(e-r1)/Z))
h2:=a2/exp((l2*(e-r2)/Z))
a:=0.7/w
b:=55/7.39e6

```

rtas

Subrutina euleryb:Calcula nuevos valores de modelo de armstrong y bezanilla por el método de euler

```

a1:=a1+dt*f11
a2:=a2+dt*f22
ab1:=ab1+dt*f11
ab2:=ab2+dt*f22
c1:=c1+dt*f11
c2:=c2+dt*f22

```

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

de-2-22-68
de-2-22-68

retas

Con estos modulos se pudo hacer los programas que se utilizarian para cada tipo de simulación, como se mostrara posteriormente. Basicamente se construyeron dos programas, uno para simular el modelo de Hodgkin y Huxley, y el otro para simular el modelo de Armstrong y Bezanilla. Estos dos tipos de programas observaron, sin embargo un procedimiento comun, como lo es el de tomar un vector de parametros, tomar el sistema de ecuaciones diferenciales que habian de simular y, durante un tiempo establecido calcular progresivamente los valores para cada estado mediante una subrutina de métodos numericos, para despues graficar el valor del estado conductor en la pantalla. La figura 11 muestra un diagrama de flujo, que describe en forma resumida la arquitectura central de estos programas. Sin embargo, dado que gran parte del interés de este trabajo fue la realización misma de los programas, los detalles se dan en la seccion de resultados.

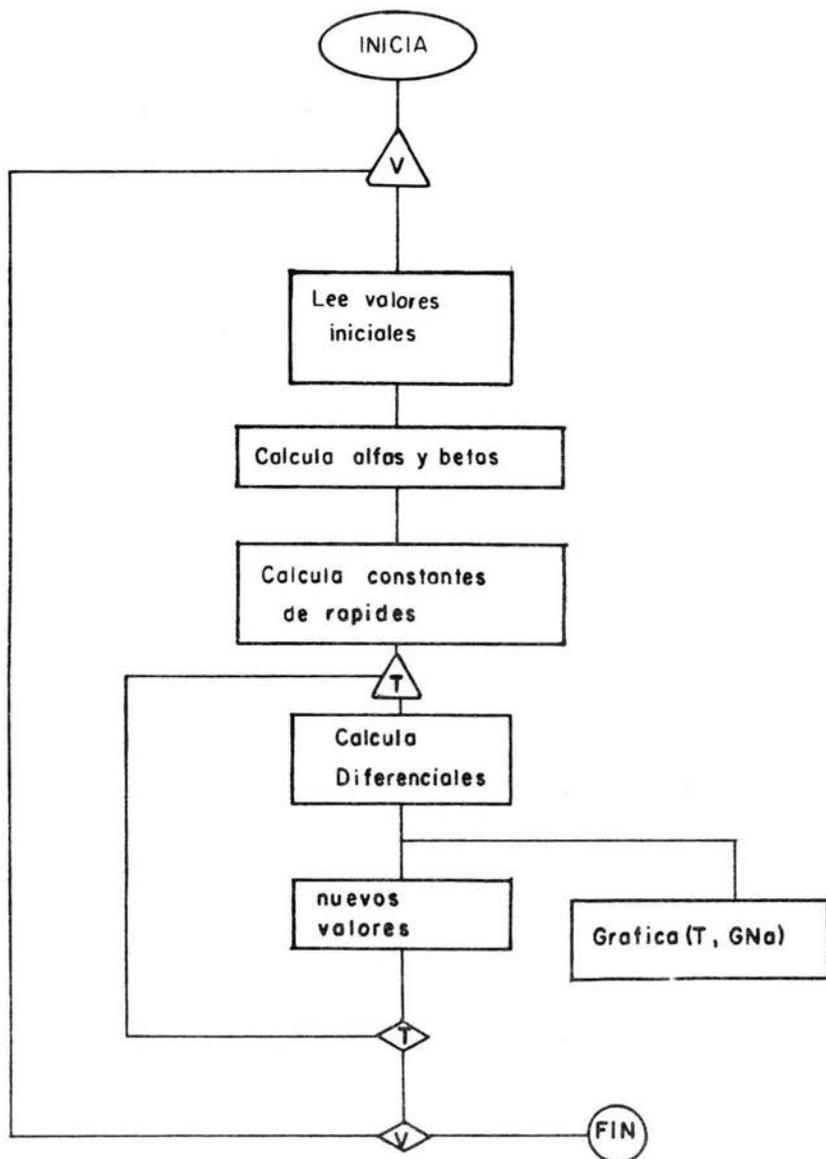


Fig 11.-Diagrama de flujo en el cual se muestra la arquitectura central de los programas desarrollados en el presente trabajo

RESULTADOS

SIMULACION DE LA CONDUCTANCIA AL SODIO POR EL MODELO DE HODGKIN Y HUXLEY

Como se describió anteriormente, existen varias maneras de simular las corrientes de sodio en base al modelo de Hodgkin y Huxley, una de ellas es resolver la solución explícita (Ecuación 16) y calcular el valor de la conductancia en función del tiempo a diferentes tiempos, otro es el de resolver la ecuaciones diferenciales para m y h por algún método numérico y multiplicar las soluciones de los dos procesos y después por la fuerza de empuje. Estos métodos ya han sido ampliamente comprobados y su ajuste a los datos experimentales es indiscutible en el axón gigante del calamar, tras los trabajos de Hodgkin y Huxley, sin embargo, con estos métodos no se pueden estimar las corrientes de compuerta, mientras que con el modelo multicompartimental de ocho estados sí, por lo que nuestro primer interés fue desarrollar un programa que simulara las corrientes de sodio con este último método. Pero había que comprobar que no hubiese diferencia entre las resoluciones dadas por los tres métodos. Así, desarrollamos un programa en el cual se daban simultáneamente las resoluciones por los tres métodos para las mismas condiciones de tiempo de simulación, y potencial de membrana.

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

En el caso del modelo de ocho estados había que conocer las proporciones iniciales de cada estado, para esto se simuló el modelo al potencial de membrana (-65 mv), partiendo de una proporción uniforme de 1/8 en cada estado y de la restricción de que la suma de los ocho estados es en todo momento igual a uno, esto con el fin de estandarizar la variación en la conductancia . Con la suposición de que a tiempo infinito las proporciones alcanzarían un estado estable, la simulación de dejó continuar hasta que la diferencia absoluta entre una y otra iteración fuera menor a $1E-8$. Las proporciones así encontradas se muestran a continuación:

x1=0.3430319
x2=5.751712e-02
x3=3.214685e-03
x4=5.989059e-05
x5=0.5063828
x6=8.490671e-02
x7=4.744418e-03
x8=8.841048e-05

Posteriormente, las proporciones estables alcanzadas se usaron como condiciones iniciales al simular las corrientes de sodio a varios cambios de potencial. El programa de simulación elaborado

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

GNAHH, pregunta inicialmente por el voltaje al cual se requiere la simulación, y despues llama las subrutinas *incondh*, para definir las condiciones iniciales, alfas y rates, para calcular las constantes de rapidez y despues entra a un ciclo iterativo llamando a las subrutinas *gnahh* y *euler* para simular durante 500 veces el nuevo valor de la conductancia. A continuación se muestra el programa principal:

```

+ PROGRAMA PARA SIMULAR LA CONDUCTANCIA AL SODIO EN UNO
+ EL SODIO BATECOMPARTIMENTAL DE UNO Y DOS LITROS
+ -----
      goab format ' formato la pantalla
for re=40 to 50 step 10
      goab wcon ' valores iniciales de los estados

      goab alfas ' calcula alfas , betas , alfa y beta
          ' para el potencial deab

      goab rates ' calcula constantes de rapidez

      for i=1 to nmax step 10
          goab wcon
          rates
          goab gcond
          free(i-6),pt(i-1,0)
      next i

```

del 18

1984 : 303 1984

del 1 de del programa vaca

La figura 12 muestra una serie de conductancias simuladas desde -60mv hasta 150mv con incrementos de 20.1mv, con un tiempo de simulación de .01 milisegundos y un total de 500 simulaciones por voltaje. En los trazos están sobrepuestas las simulaciones utilizando los tres métodos, como se puede notar no existen diferencias significativas entre ellos, además no se obtuvo diferencia para la resolución del modelo de ocho estados cuando se simuló por el método de Runge-Kutta y el de Euler, dado que el método de Euler es más rápido, se utilizó en las posteriores simulaciones de este trabajo, descartando el de Runge-Kutta. En cuanto a las características de las curvas simuladas, nótese que la cinética de activación se hace más rápida a medida que el voltaje se hace más positivo, mientras que la inactivación no muestra cambios apreciables. La conductancia máxima se alcanza a tiempos cada vez más cortos y su incremento es cada vez menor, como lo muestra la figura 13 en la cual se hace una simulación de la conductancia al pico en función del voltaje de membrana. Cabe señalar que esta es la conductancia relativa y el valor máximo esperado es de uno. Para fines comparativos se puede escalar por la conductancia máxima

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

reportada, por ejemplo para el calamar, que es de 120 milisimens/centimetro cuadrado.

La figura 14 muestra la comparación entre una simulación en la cual esta presente la inactivación y otra en la cual la inactivación ha sido removida, (definiendo alfa y beta como cero). Como podrá notarse, el valor máximo alcanzado por la conductancia normal es casi la mitad del valor estacionario de la conductancia sin inactivación. Este efecto ha sido observado experimentalmente y es una de las objeciones al modelo de inactivación dependiente de la activación (véase introducción)

SIMULACION DE LA CORRIENTE DE SODIO POR EL MODELO DE HODGKIN Y HUXLEY

Para la simulación de las corrientes de sodio se hizo el mismo procedimiento que para la conductancia, siendo esta última escalada por la fuerza de empuje, utilizando la subrutina *INANN*, antes se hizo el cambio de definición para el potencial de membrana. La figura 15 muestra una serie de simulaciones de las corrientes de sodio con las mismas características que para la simulación de las conductancias.

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

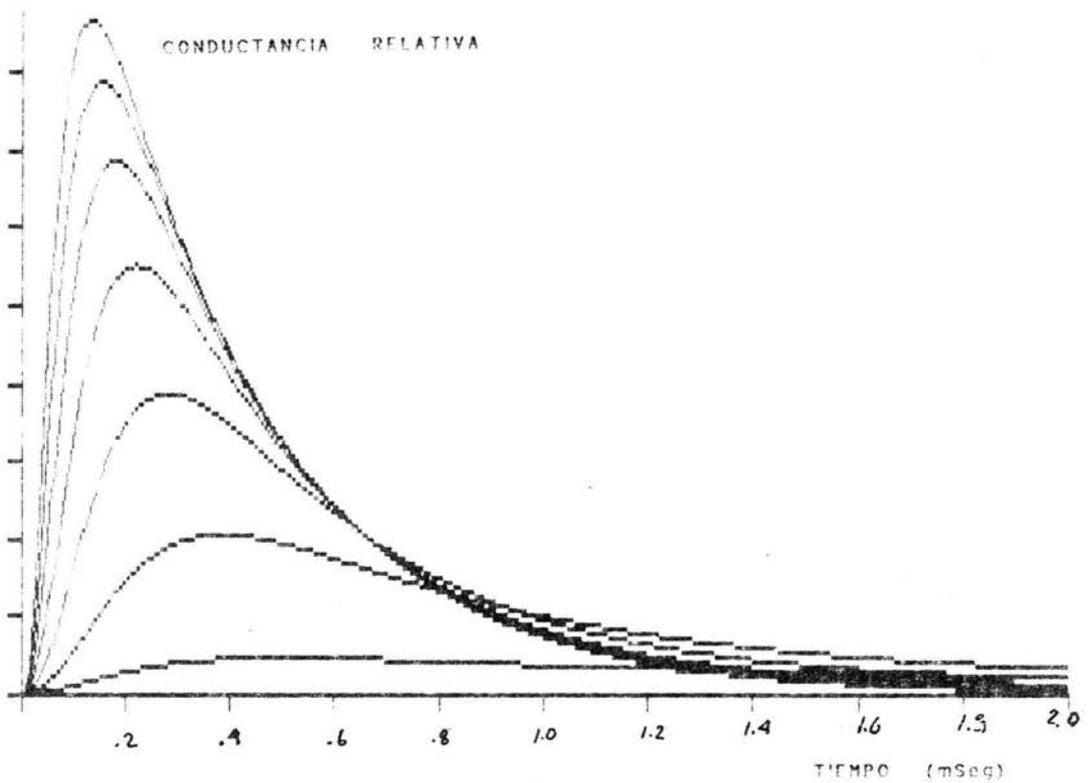


Fig 12.- Simulación de Conductancias relativas al sodio con el modelo de Hodgkin y Huxley, a diferentes potenciales de membrana. Para cada potencial de membrana se simuló la conductancia utilizando la solución explícita, el modelo de m^3h y el modelo de ocho compartimientos. Como se puede notar, no hay diferencia en los cálculos con esos tres métodos.

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

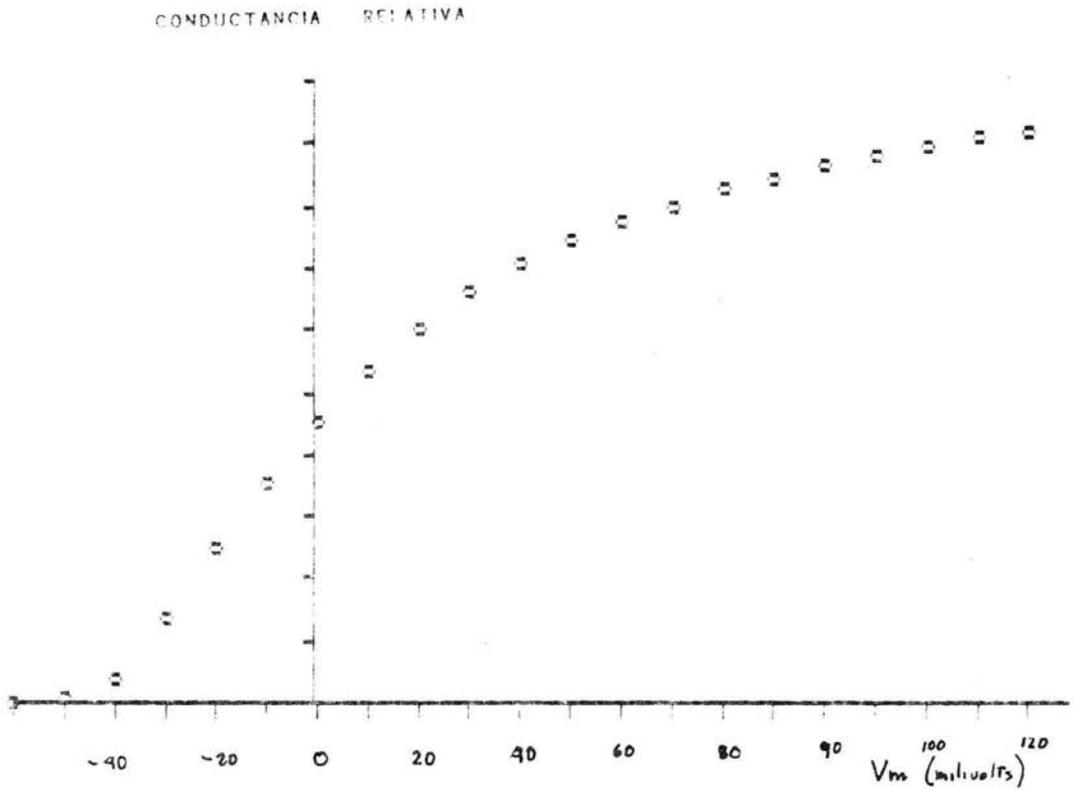


Figura 13.- Simulacion de la conductancia relativa maxima en funcion del potencial de mantenimiento.

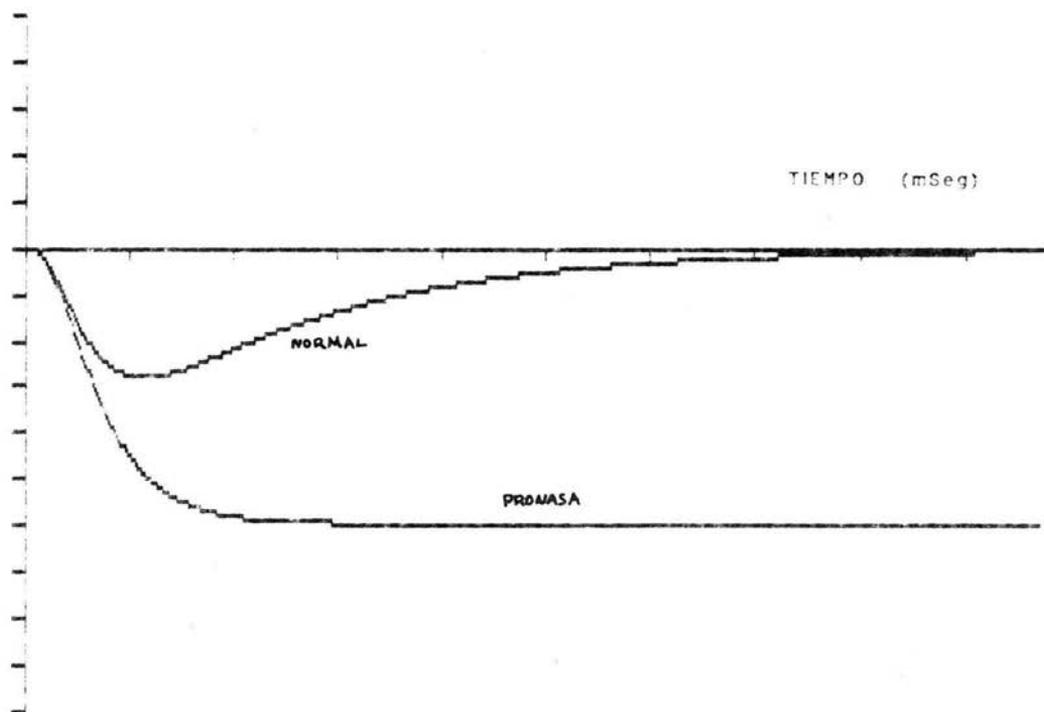


Figura 14.- Simulación de la remoción de la inactivación. El primer trazo muestra una simulación en condiciones normales, es decir con la inactivación, el segundo trazo corresponde a una simulación en la cual se mantuvo constantes los parámetros alfa y beta en cero, lo cual es equivalente a la remoción de la inactivación.

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

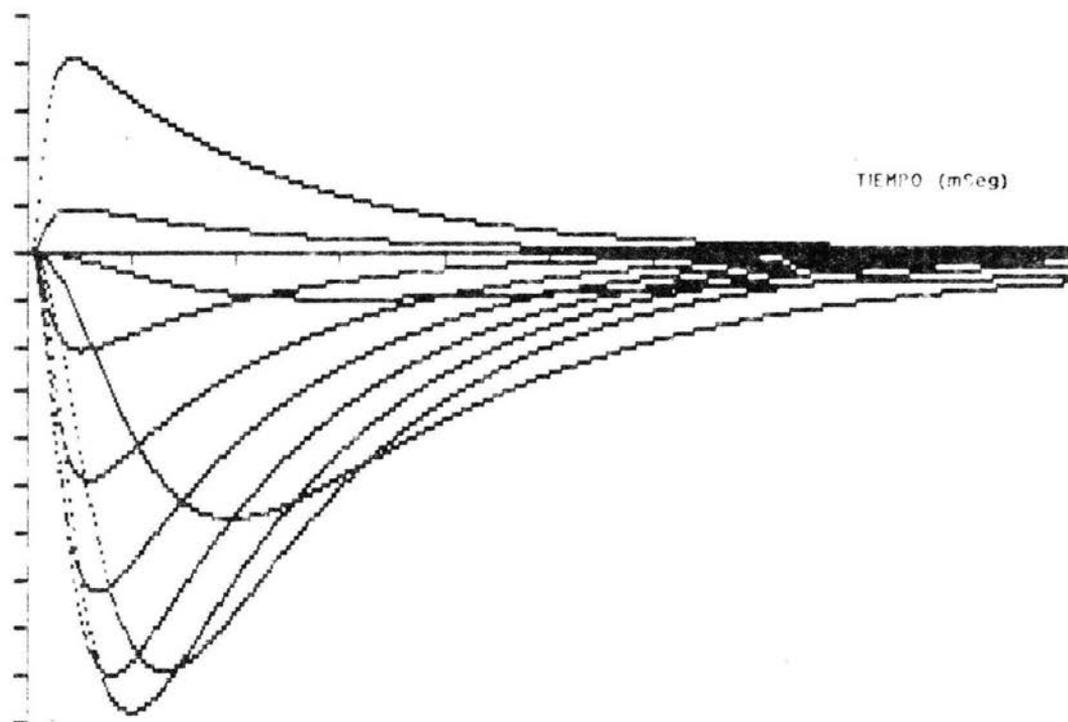


Figura 15 .- Corrientes de sodio simuladas con el modelo multicompartimental de ocho estados de Hodgkin y Huxley.

SIMULACION DE LAS CORRIENTES DE COMPUERTA
POR EL MODELO DE HODGKIN Y HUXLEY

El calculo de las corrientes de compuerta se hizo accedando en cada paso de iteración a la subrutina GATING, que suma las diferenciales en cada paso de transición y considerando 2 cargas elementales por cada compuerta de activación. A la inactivación no de le atribuyo carga. Como la figura 16 muestra, se observa una subida instantánea en la corrientes de compuerta, seguida por una fase de caída que se ajusta a una sola exponencial. Como es de esperarse, la corriente de compuerta en este modelo es acarreada casi enteramente durante la transición $3\alpha_{ifam}$, y por lo tanto el valor máximo de la corriente de compuerta depende agudamente de las condiciones iniciales de simulación, por tal motivo, se utilizó el modelo de ocho estados con las condiciones iniciales calculadas a doble precisión.

A continuación se muestra el programa principal para generar las corrientes de compuerta a través de la subrutina GATING, habiendo previamente simulado el incremento en cada uno de los ocho estados, a través de las subrutinas GNAHHS y EULERS

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

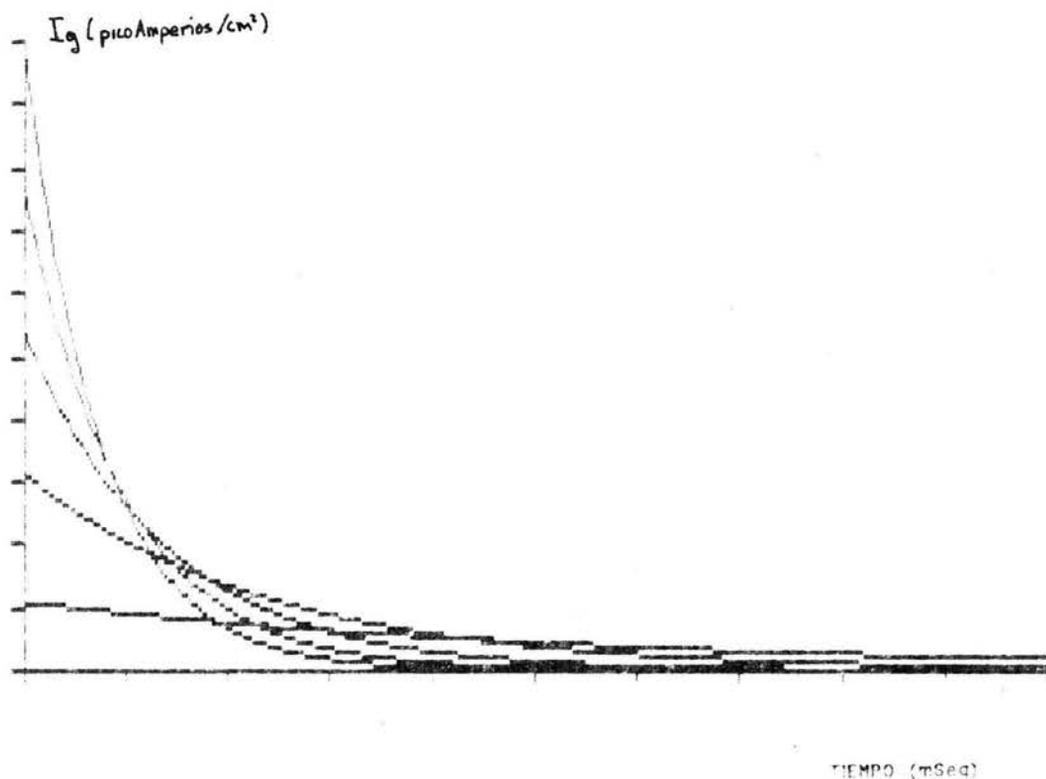


Figura 16.- Simulacion de corrientes de compuerta por el modelo de Hodgkin y Huxley. Nótese la subida instantanea . y la caída con una sola constante de tiempo.

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

- * PROGRAMA PARA SIMULAR LAS CORRIENTES DE CORRIENTE DE LOS CABLES DE
- * SONDO EN BASE AL MODELO MULTICOMPARTIMENTAL DE HODGKIN Y HUXLEY
- * LAS CORRIENTES DE CORRIENTE SON CALCULADAS EN LA TRANSICION

```
gosub format ' formatea la pantalla
for rmi=50 to 150 step 20.1
gosub incoe ' valores iniciales de los estados

gosub alfas ' calcula alfa1 , beta1 , alfa2 y beta2
' para el potencial dado
gosub rates ' calcula constantes de rapidez

for t=0 to tmax step dt
gosub gatinh
gosub gatinh 'calcula corrientes de corriente
next t
next rmi
pasa : goto pasa
end ' fin del programa principal
```

SIMULACION DE LA CONDUCTANCIA AL SODIO POR EL MODELO DE ARMSTRONG Y BEZANILLA

Partiendo de la base que el modelo de HH proporciona un ajuste razonable a las corrientes de sodio, se uso la resolución de este como base para comparar los otros dos modelos . Por lo tanto este programa debia generar un vector para ser guardado en un archivo de datos que despues sea llamado por los otros programas. Es decir, los resultados de la simulación de las conductancias de HH se tomaron como datos experimentales en el ajuste del modelo de Armstrong y Bezanilla

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

Para la resolución del modelo de Armstrong y Bezanilla se contruyó el programa INAAVB, este es un modelo iterativo el cual para cada voltaje lee el vector de datos generado por el programa INAAH y despues pregunta por el valor de las constantes de rapidez que componen al modelo : Alfa1, Alfa2, Alfa5, Beta1, Beta2, Beta5 para el proceso de activacion y Kappa y Lamda para la inactivacion con la restricción anteriormente explicada (Ecuacion 9AB) . El programa principal consiste en un circuito iterativo infinito, en el cual, despues de terminada una simulación, se pueden tomar las opciones de:

- A) actualizar los parámetros de simulación
- B) actualizar los intervalos de simulación
- C) borrar de la pantalla las simulaciones anteriores
- D) simular a un nuevo voltaje.

En la actualización de los parámetros, el programa reporta los parámetros usados en la simulación anterior y aquellos que sufrieron una modificación. Esto con el fin de hacer aproximaciones sucesivas parciales, es decir, observar los efectos de la variación en un solo parámetro sobre la forma de la simulación.

A continuación se enlista el programa INAAVB:

Falta página

N° 60

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

```

    d17=167*cd+17*cd+167*cd-c7*(17*cd)+17*cd
    d5=166*cd+17*cd-c5*(166+167)
    goto cabr3
return

cabr3 :

c1=166*cd
c2=166*cd
c3=166*cd
c4=166*cd
c5=166*cd
c6=166*cd
c7=166*cd
c8=166*cd
return

armstrongcaulic:  *define constantes del modelo de armstrong
    * r decauda

    s00=166*cd+166*cd
    s01=166*cd+166*cd+166*cd+166*cd
    s02=166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd
    s03=166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd
    s04=166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd
    s05=166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd
    s06=166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd
    s07=166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd+166*cd
    goto cabr3
return

ca10 :  * define condiciones iniciales del modelo de armstrong
    * r decauda

    a0=1
    a1=0
    a2=0
    a3=0
    a4=0
    a5=0
    a6=0
    a7=0
    a8=0
return

calculo :  * define constantes de modelo para el modelo
    * de armstrong / decauda
    z=1.0  %=10  coeficientes

```

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

```

r1:=D1a *w
r2:=D1a *w
k1:=E
k2:=
k3:=
k4:=a1/eq(k1*(r1-r2)/Z)
k5:=a2/eq(k2*(r1-r2)/Z)

```

return

```

obtener : 'Calcula los valores de modo de
' amplitud y frecuencia por el metodo de
' auto

```

```

obtener-obtend
obtener-obtend
obtener-obtend
obtener-obtend
obtener-obtend
obtener-obtend
obtener-obtend
obtener-obtend
obtener-obtend

```

return

```

grafic :
for i=1 to num
    grafic-grafic
end
return

```

```

func :
local i) grafic
local j) grafic
local i) grafic 'delta i'grafic * 'grafic
local i)grafic 'num 'grafic * 'grafic
local i) grafic 'amplitud critica 'grafic * 'grafic
if grafic Des Grafic
if grafic Des grafic
if grafic Des grafic

if grafic Des
local i)grafic i grafic r1 r2
grafic-grafic
grafic-grafic
grafic-grafic
grafic-grafic
grafic i)grafic *
end if
grafic-grafic

```

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

relata

CARACTERISTICAS FENOMENOLOGICAS DEL MODELO DE ARMSTRONG Y BEZANILLA.

El modelo de Armstrong y Bezanilla es un modelo empirico, en el cual, no existen funciones que relacionen los valores de las constantes de rapidez con el voltaje, como sucede con el modelo de Hodgkin y Huxley, por lo tanto nuestro interes en este modelo consistió primeramente en determinar que cambios sufre la conductancia simulada cuando de varia el valor de alguno de las constantes de rapidez: alfas, betas, Kappa y lamda.

Las figuras 17 a 22 muestran una serie de familias de simulaciones en las cuales se vario una de las constantes de rapidez, mientras las otras se mantuvieron constantes. Esto con el fin de estudiar la sensibilidad de cada parámetro. Como se puede observar, la inactivación es mas sensible al parámetro lamda, que al parámetro Kappa y el valor alcanzado por la conductancia al tiempo infinito depende de la relación de estas dos ultimas variables. Para la activación, fue necesario variar la proporción de la constante de rapidez alfa5 debido a que el modelo tenia una fase de subida mas tardia que la que predice el modelo de Hodgkin y Huxley. La constante de tiempo de la fase de activación es mas dependiente de la constante

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

alfax que de alfa. El tiempo, como la amplitud del valor máximo alcanzado dependen de los parámetros de activación y de inactivación, por lo que, a diferencia de los procedimientos convencionales de ajuste de corrientes por el modelo de Hodgkin y Huxley, en los que se ajusta primero la activación y después la inactivación, en este caso fue necesario variar simultáneamente ambos para poder lograr el mejor ajuste.

CARACTERISTICAS DE LAS CORRIENTES DE COMPUERTA PREDICHAS POR EL MODELO DE ARMSTRONG Y BEZANILLA.

Para simular las corrientes de compuerta utilizamos las mismas subrutinas que para la conductancia, adicionando una subrutina para calcular las corrientes en cada paso de transición y cancelando la graficación de la conductancia. En este caso realizamos una familia de simulaciones en las que se variaba un parámetro mientras los otros se mantenían constantes. Los parámetros que más sensibilidad mostraron son alfa y alfa. Las figuras 23,24 y 25 muestran los resultados de estas variaciones parciales. Como se puede notar, la rapidez de la relajación y la corriente máxima son muy sensibles a alfa, pero no a alfa, a pesar de que esta repetida en tres pasos de transición sucesivos.

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

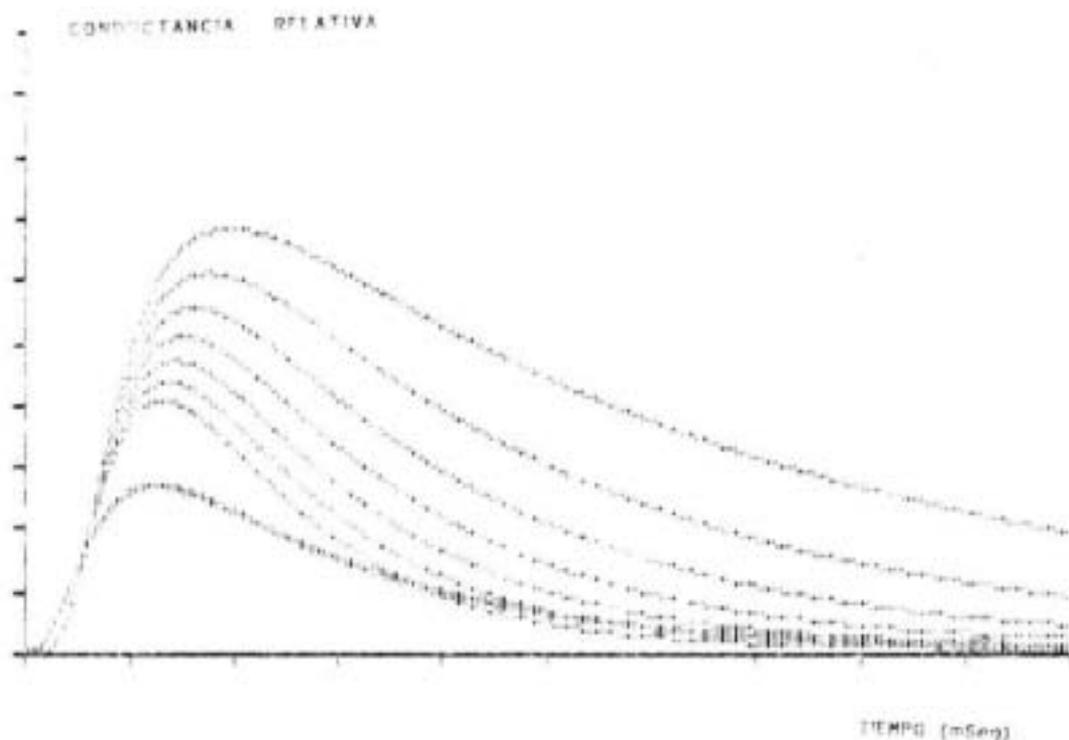


Figura 17.- Familia de curvas de conductancia al sodio en la cual se varió la constante de rapidez λ . Las 7 curvas corresponden a valores para λ de .1 a .6 con incrementos de .10. Los otros valores fueron mantenidos constantes. Cada división en el tiempo representa .2 milisegundos, mientras que en la escala vertical, cada división corresponde a un valor relativo de .3

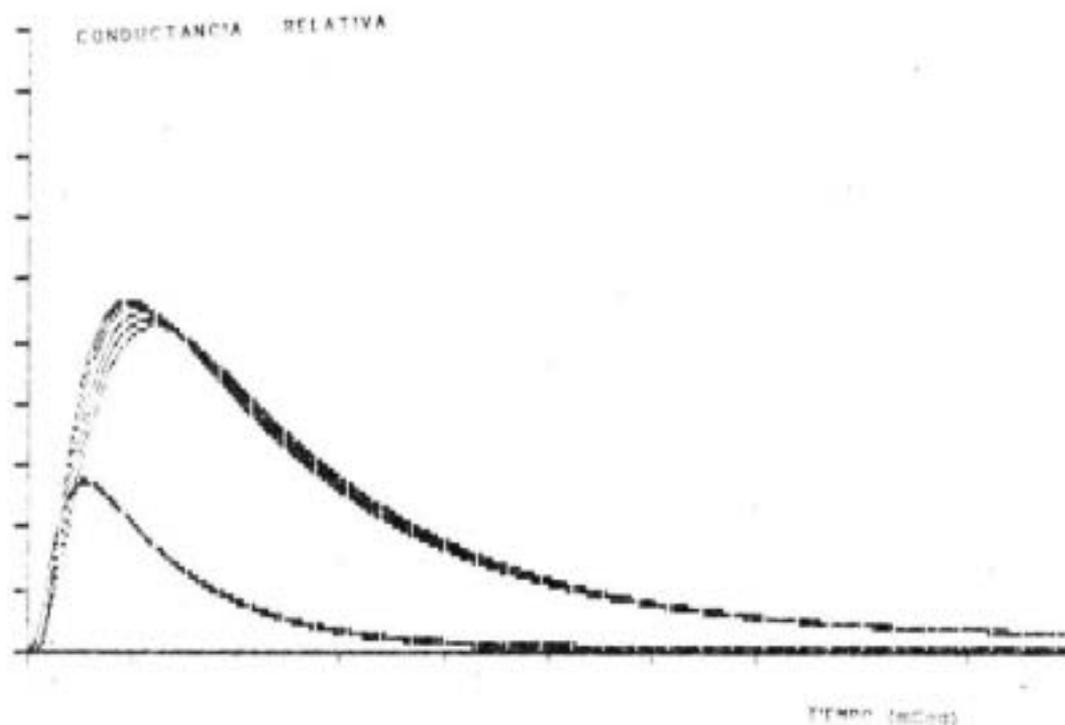


Figura 18.- Familia de curvas de conductancia al sodio en la cual se varió la constante de rapidez beta 5. Las 6 curvas corresponden a valores para beta 5 de 10 a 60 con incrementos de 10. Los otros valores fueron mantenidos constantes. Cada división en el tiempo representa .2 milisegundos, mientras que en la escala vertical, cada división corresponde a un valor relativo de .3

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

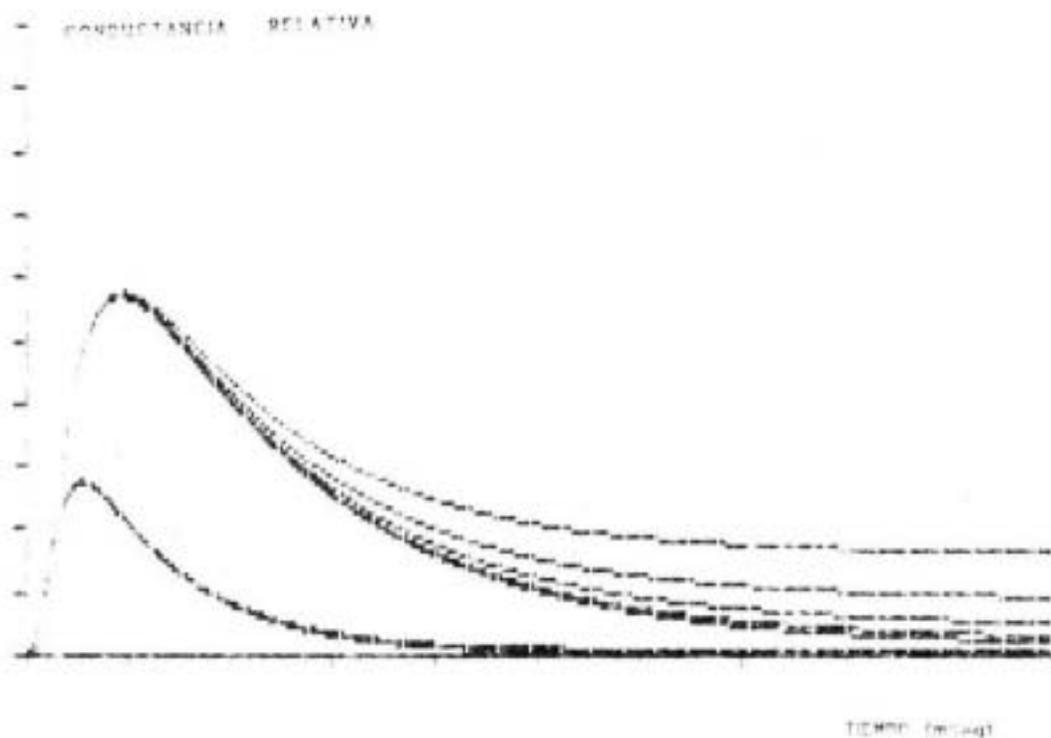


Figura 19.- Familia de curvas de conductancia al sodio en la cual se varía la constante de rapidez kappa. Las 7 curvas corresponden a valores para kappa de .1 a .0075 en pasos sucesivos de 1/2. Los otros valores fueron mantenidos constantes. Cada división en el tiempo representa .2 milisegundos, mientras que en la escala vertical, cada división corresponde a un valor relativo de .3

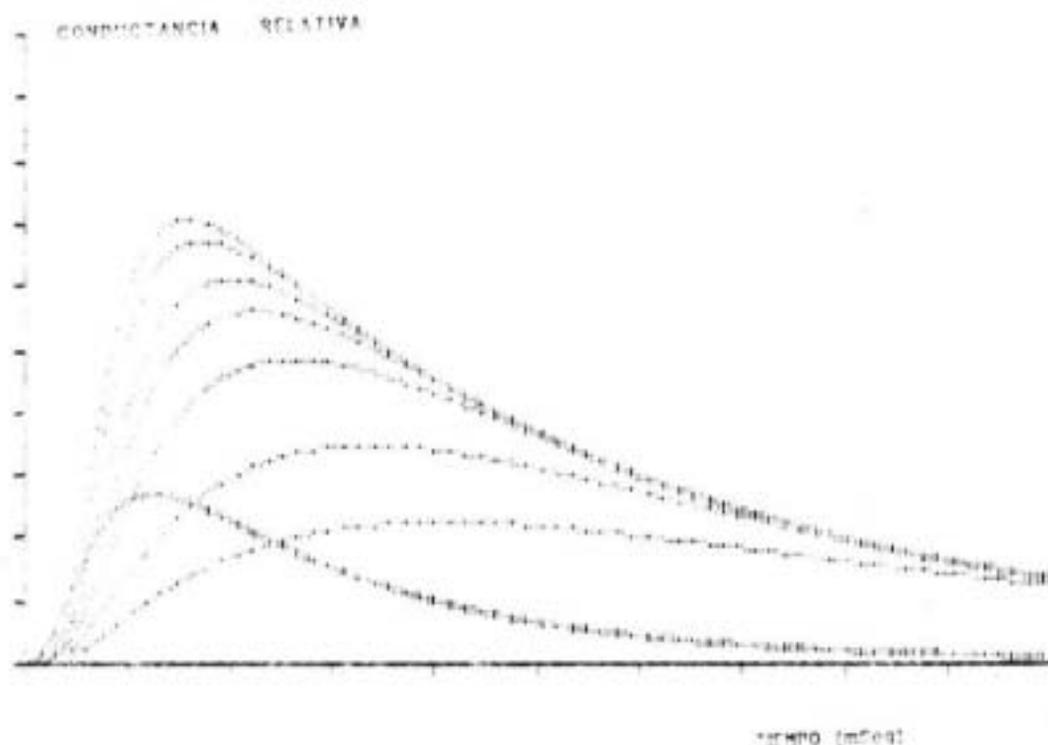


Figura 20.- Familia de curvas de conductancia al sodio en la cual se vario la constante de rapidez alfa. Las 7 curvas corresponden a valores para alfa de 1 a 6 con incrementos de 1. Los otros valores fueron mantenidos constantes. Cada division en el tiempo representa .2 milisegundos, mientras que en la escala vertical, cada division corresponde a un valor relativo de .3

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

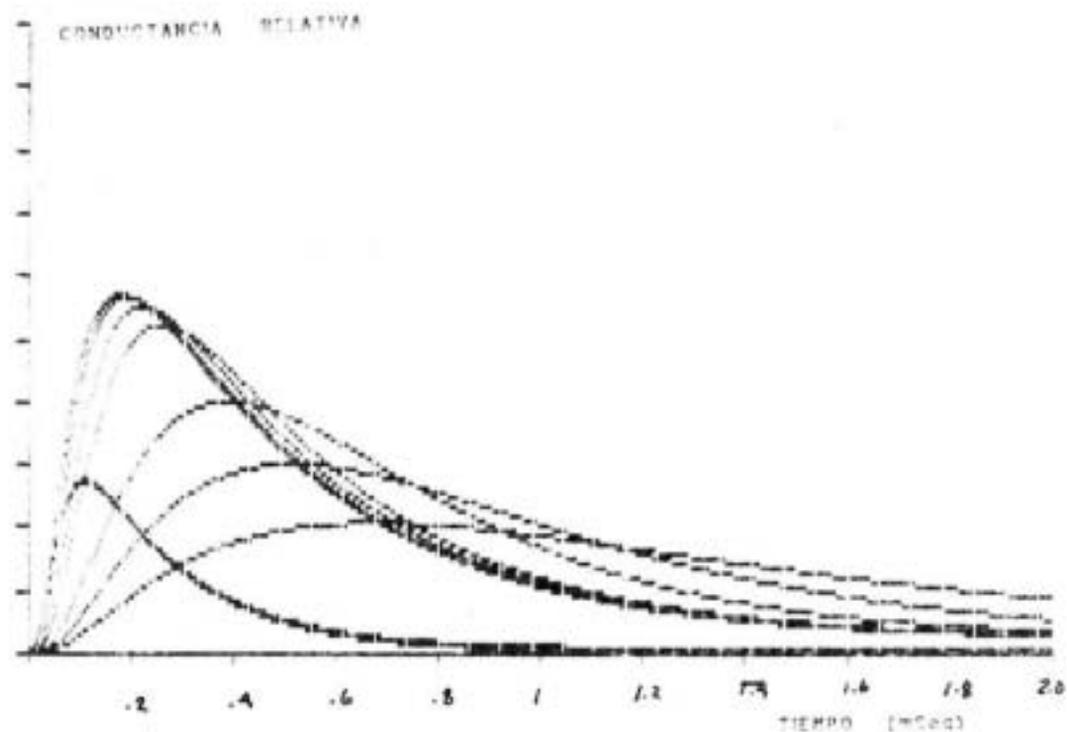


Figura 21.- Familia de curvas de conductancia al sodio en la cual se vario la constante de rapidez α_5 . Las 6 curvas corresponden a valores para λ de 1 a 6 con incrementos de 1. Los otros valores fueron mantenidos constantes. Cada división en el tiempo representa .2 milsegundos, mientras que en la escala vertical, cada división corresponde a un valor relativo de .3

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

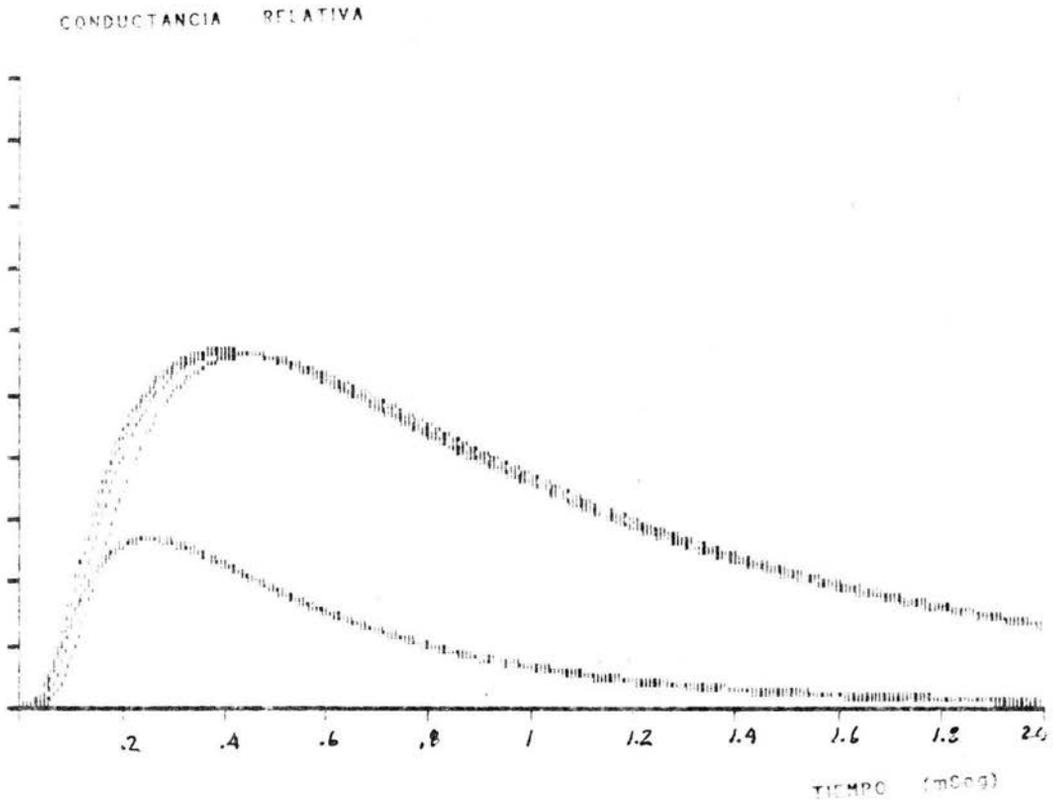


Figura 22.- Familia de curvas de conductancia al sodio en la cual se varió la constante de rapidez alfax. Las 5 curvas corresponden a valores para λ de 10 a 50 con incrementos de 10. Los otros valores fueron mantenidos constantes. Cada división en el tiempo representa .2 milisegundos, mientras que en la escala vertical, cada división corresponde a un valor relativo de .3

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

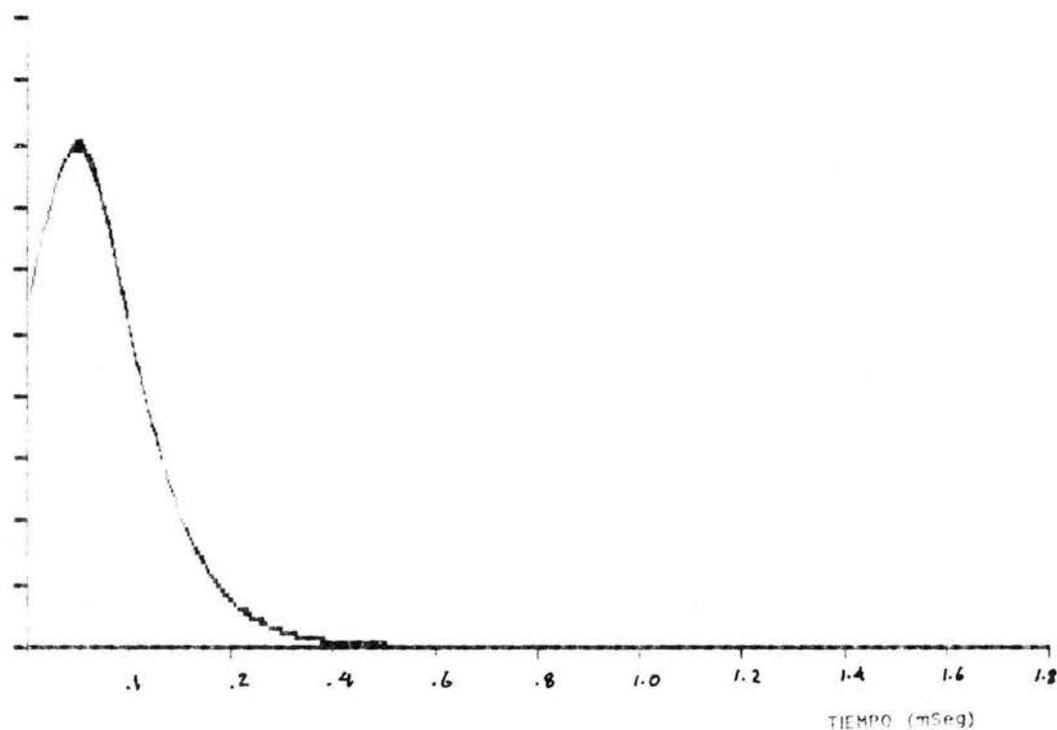


Figura 23.- Simulación de la corriente de compuera producida por un incremento de voltaje de 10 mV, a partir del potencial de reposo (-60 mV). Nbtese la subida tardía y la caída con dos exponenciales. Cada división en las abscisas corresponde a 20 simulaciones, o a .1 milisegundos. En las ordenadas se grafica la corriente por centimetro cuadrado, cada división corresponde a 3 miliamperios/cm²

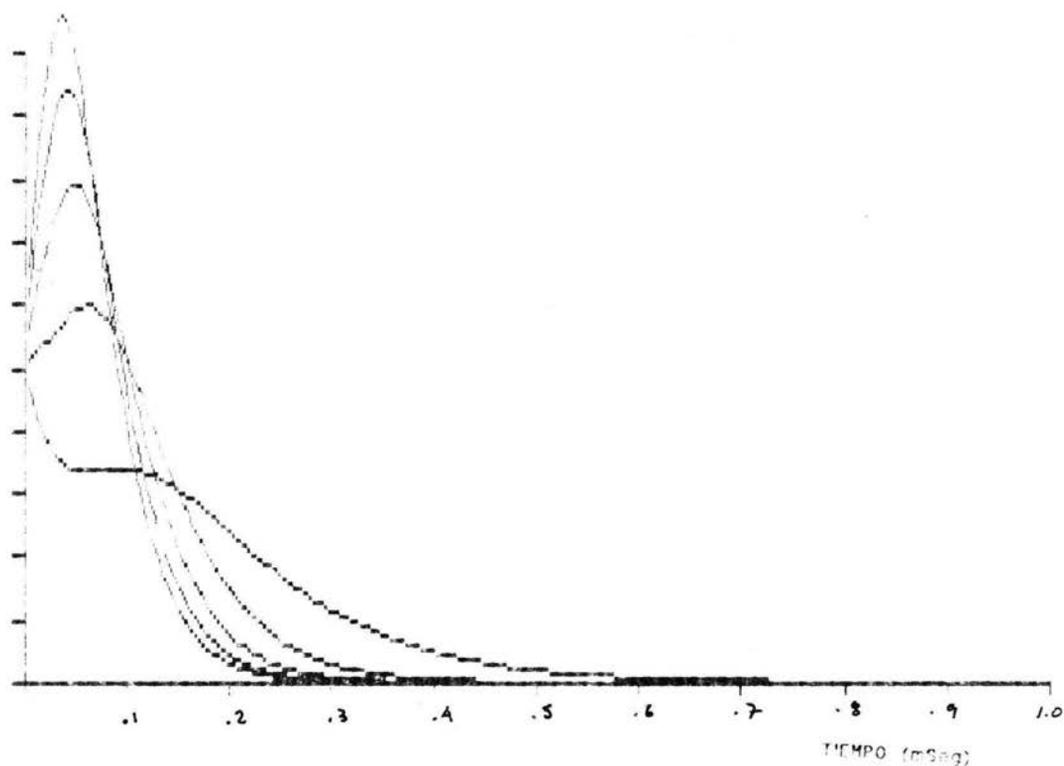


Figura 24.- Familia de simulaciones de corrientes de compuerta, en las cuales se vario parcialmente el parametro *alfa* desde .5 hasta 2.5, con incrementos de 0.5. Los otros valores fueron constantes. Cada division en las abscisas corresponde a 20 simulaciones, o a .1 milisegundos. En las ordenadas se grafica la corriente por centimetro cuadrado, cada division corresponde a 3 miliamperios/cm²

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

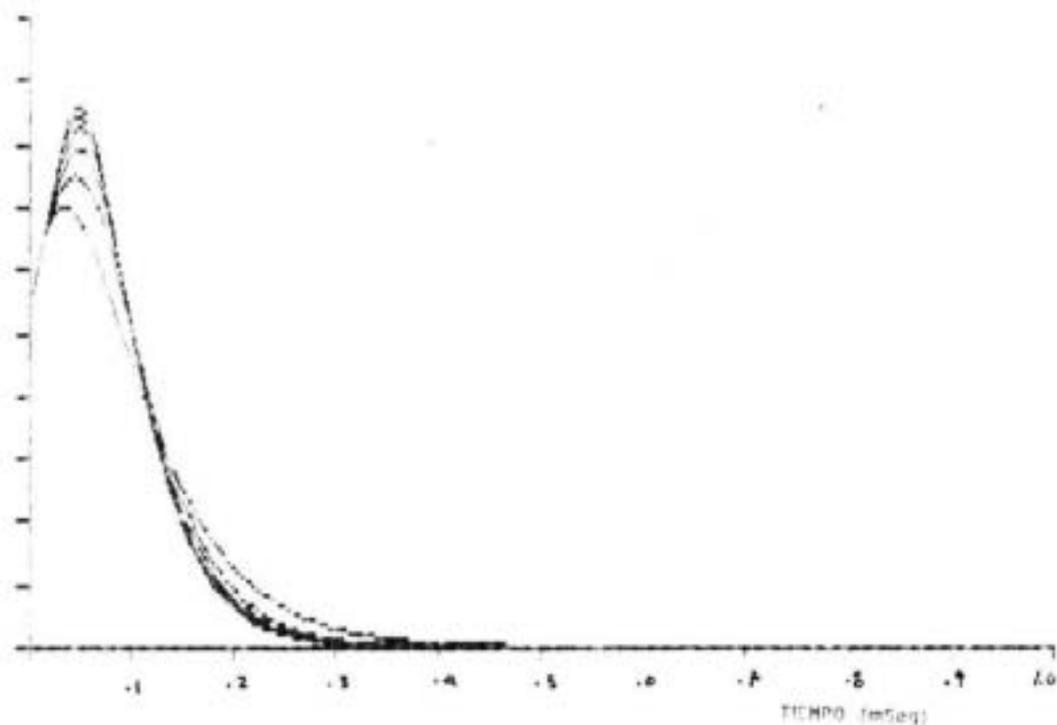


Figura 25.- Familia de simulaciones de corrientes de compuerta, en las cuales se varía parcialmente el parámetro α/β desde 1 hasta 6, con incrementos de 1. Los otros valores fueron constantes. Cada división en las abscisas corresponde a 20 simulaciones, o a .1 milisegundos. En las ordenadas se grafica la corriente por centímetro cuadrado, cada división corresponde a 3 miliamperios/cm².

DISCUSION

En la actualidad, los canales de sodio han sido estudiados en una gran variedad de tejidos excitables, en casi todos ellos se observan las mismas características cinéticas en las corrientes de sodio: Un crecimiento exponencial seguido de una caída también exponencial que es independiente a primera vista del voltaje de la membrana. El primer proceso es conocido como la activación y el segundo como la inactivación. Actualmente existen controversias en cuanto a si los canales de sodio se inactivan solamente después de que se han abierto o si se pueden inactivar sin haberse abierto en ningún momento. Existen evidencias en favor de una y de otra teoría, así como modelos que son basados en suposiciones derivadas de ambas teorías. Los más representativos son, para la teoría de procesos independientes el modelo de Hodgkin y Huxley, y para la teoría de procesos acoplados el modelado de Armstrong y Bezanilla. El interés de este trabajo ha sido, en primer lugar desarrollar programas de computadora mediante los cuales se pudiera simular las corrientes de sodio, como son predichas por uno y otro modelo, a fin de comparar la validez de sus predicciones. El modelo de Hodgkin y Huxley ha sido ya ampliamente estudiado y sus procedimientos resueltos y comprobados, sin embargo, en el presente trabajo hemos utilizado un nuevo método para resolver el mismo modelo, el de ocho estados descritos por un sistema de

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

ecuaciones diferenciales lineales y resueltas por métodos numéricos. La solución no muestra diferencia significativa con los métodos convencionales, y en cambio presenta la ventaja de que se lo puede usar para describir las corrientes de compuerta o para estudiar una variación parcial en alguna de sus constantes de rapidez.

Las corrientes de compuerta predichas por el modelo de Hodgkin y Huxley difieren significativamente de las observadas experimentalmente pues estas últimas suben de manera gradual y exponencial hasta un valor máximo y después decaen exponencialmente hasta cero, mientras el modelo de Hodgkin y Huxley predice una subida instantánea y una caída exponencial. Esto descarta en cierto modo la validez del modelo de Hodgkin y Huxley, aunque esto no implica que la teoría de procesos independientes sea también descartada. El modelo de Armstrong y Bezanilla describe de mejor manera las características de las corrientes de compuerta, aun cuando las condiciones iniciales de simulación son tomadas arbitrariamente. Sin embargo, las condiciones de simulación para lograr un mejor ajuste a las corrientes de compuerta no son las mismas que para las de las corrientes iónicas, por lo tanto, diferentes valores en las constantes de rapidez deben tomarse si se quiere ajustar uno u otro tipo de corriente.

En cuanto a las características fenomenológicas del modelo de Armstrong y Bezanilla, el hecho más significativo es que la rapidez de

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

la subida en la activación no depende grandemente del valor de α , siendo este un valor que representa la transición de 3 de los 6 estados que componen el proceso de activación, así, dos o tres estados podrían ser quitados del modelo sin que se alterara la estructura del modelo. Esto es algo que podría hacerse si se pretende tomar en cuanto los hallazgos que se han hecho en cuanto a la estructura del canal, en el cual se proponen cuatro estados homólogos.

Los programas de computadora desarrollados en el presente trabajo son un poco lentos, debido a que no están optimizados los algoritmos, y el lenguaje QUICKBASIC es un poco lento, no obstante que es un lenguaje compilado y estructurado, se pueden utilizar con fines de docencia, en la demostración de las características de las corrientes iónicas y de compuerta de sodio, o bien como una base para estudiar la acción de agentes farmacológicos sobre las constantes de rapidez del modelo. Mas aún, se pueden utilizar en preparaciones biológicas en las cuales se investigue la corriente de compuerta generada por otros canales iónicos, y en los cuales este presente también conductancia de sodio. Debido a que las corrientes de compuerta no pueden discriminarse como las iónicas. Se puede calcular cuál sería la corriente de compuerta generada y restarla a la corriente de compuerta total, y de ahí obtener la corriente de compuerta de otro canal.

CONCLUSIONES

1.- Se desarrollaron programas para simular dos modelos propuestos para canales de sodio, ambos representativos de las dos teorías de operación de los canales de sodio: El primero, que sostiene que la inactivación de los canales de sodio es independiente de su activación y otro que sostiene que ambos procesos están acoplados.

2.- El modelo de Hodgkin y Huxley se resolvió considerando los ocho estados que podría presentar un canal y resolviendo las ecuaciones diferenciales que describen un modelo multicompartmental por métodos numéricos. Primeramente, se comparó el resultado de la simulación por los métodos convencionales y se observó que no había diferencia significativa. Después se utilizó este método para evaluar las corrientes de compuerta y se observó que el modelo predecía una subida instantánea seguida de una caída exponencial, mientras que las corrientes de compuerta suben exponencialmente, rápidamente aunque no instantáneamente.

3.- El modelo de Armstrong y Bezanilla predice más adecuadamente las corrientes de compuerta, aunque no existe consistencia entre los parámetros que se necesitan para predecir las corrientes iónicas y las

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

de compuerta. Otro hecho significativo es que, a raíz de los estudios de las variaciones parciales en las constantes de rapidez, se concluye que el modelo, de seis estados de activación puede ser reducido a cuatro estados sin que sus características varíen grandemente, así, el modelo puede ser actualizado de manera que se consideren las cuatro subunidades homologas descritas por Noda et al

4.- Finalmente, los modelos desarrollados en el presente trabajo pueden ser utilizados con fines de docencia, o inclusive de investigación; Por ejemplo: si se quiere estimar el efecto de algun fármaco sobre la cinética de las corrientes de sodio, con el fin de ajustar el modelo y observar que parámetro ha sufrido mayor variación.

BIBLIOGRAFIA

- Aidley G.L.1966.Multicompartment models in biological systems. Science Paperbacks . Ed. J.Wiley & Sons.
- Almers W., Stanfield P.R.,Stuhmer W.1984.Slow changes in currents through sodium channels in frog muscle MEMBRANE. J. Physiol (lond) 339:253-271
- Armstrong C.M. and F. Bezanilla.1973. Currents related to the movement of the gating particles of the sodium channels. Nature London 242:459-461
- Armstrong C.M., and W.F. Gilly.1979. Fast and Slow Steps in the Activation of sodium channels. J. Gen. Physiol. 74:691-711.
- Armstrong C.M.,1981. Sodium Channels and Gating Currents. Physiological Rev. 61:644-683
- Barchi R.L.1982. Biochemical studies of the excitable membrane sodium channel. Int. Rev. Neurobiol.23:69-101
- Bezanilla F. And Armstrong C.1977.Kinetic properties and inactivation of the currents of sodium channels in squid axons. Phils. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci. 270:449-458.
- Brisman T.1977.Slow mechanism for sodium permeability inactivation in myelinated nerve fibers of Xenopus laevis.J.Physiol.(lond) 270:283-297
- Campbell D.T. and B. Hille.1976. Kinetic and Pharmacological Properties of the Sodium Channel of frog skeletal muscle. J.Gen. Physiol. 67:309-327.
- Colquhoun D. and A.G. Hawkes.1982. On the stochastic properties of bursts of single ion channel openings and clusters of bursts. Phil. Trans. R. Soc London. B300,1-59.
- Dudel,J.,K.Peper,R. Rudel, and W. Trautwein.1967. The effect of tetrodotoxin on the membrane currents in cardiac muscle (Purkinje fibers) Pflugers Archiv., 295:213-226

TESIS PROFESIONAL DE ARTURO PONCE BALDERAS

Fox J.M.,1976.Ultra-slow inactivation of the ionic currents through the membrane of myelinated nerve.Biochem. Biophys. Acta 426:232-244

French R.J. and R. Horn.1983. Sodium Channel gating models, mimics and modifiers. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 12:319-356.

Hammil D.P. and B. Sackmann.1981. Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. Nature. 294:462-464.

Hille B.,1984. Ionic Channel in Excitable membranes, Sinauer Associates, Sunderland Mass.

Hille B.,1971. The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. J. Gen. Physiol. 58:599-619

Hodgkin A.L. and A.F. Huxley.1952a.Currents carried by sodium and potassium ion through the membrane of the giant axon of Loligo. J.Physiol. 116:449-472.

Hodgkin A.L. and A.F. Huxley.1952b.The components of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol. 116:497-506.

Hodgkin A.L. and A.F. Huxley.1952c.The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol. 116:497-506.

Hodgkin A.L. and A.F. Huxley.1952d. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. 117:500-544.

Horn R.J.,Patlak and C. Stevens.1981.Sodium Channels need not open before they inactivate.Nature.(London) 291:462-467.

Hoyt R.C.The squid giant axon.Mathematical models. Bull. Math. Biophys. 3:399-431.

Katz B.1966.Nerve, impulse and Synapse.McGraw-Hill. Ed.

Lauger P.1983. Conformational transition of ionic single channels: in Single Channel recording. Ed. by Sackmann B. and Neher E.,Ed. Plenum.

SIMULACION POR COMPUTADORA DE CORRIENTES DE SODIO

- Nener E. and C.F. Stevens.1977. Conductance fluctuations and ionic pores in membranes . Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 6:345-381
- Malcom M.A. and G.E. Forsythe. 1977. Computer methods for mathematical computations. Prentice-Hall, Inc.
- Mc Cracken D.1964b.Fortran IV programming. Ed. Mc. Graw-Hill
- Mc. Cracken D.D. and W.S. Dorn.1964a. Numerical methods and Fortran IV programming. New. York. Wiley Ed.
- Matteson D.R., Armstrong C.M.1982: Evidence for a population of sleepy sodium channels in squid axon at low temperature. J. Gen. Physiol. 79:739-758
- Miller C.1982. Open state substructure of single chloride channels from Torpedo electroplax. Phil. Trans. R. Soc. B.(London) in press.
- Moore J.W. and F. Ramon.1974. On numerical integration of the Hodgkin and Huxley equations for a membrane action potential J. Theor. Biol. 45:249-273.
- Noda H., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi H., Nakayama H., Kanoaya Y., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Raftery M.A., Hirose T., Inayama S., Hayashida H., Miyata T., Numa S.: Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312:121-127,1984.
- Oxford Gerry S.,1981. Some Kinetic and Steady state Properties of Sodium Channels after Removal of Inactivation. J. Gen Physiol. 77:1-22
- Ruff R.L.,1986.Ionic Channels: I. The biophysical basis for ion passage and channel gating,Muscle & Nerve 9:675-699
- Spalding,B.C., 1980.Properties of toxin-resistant sodium channels produced by chemical modification in frog-skeletal muscle
- Stimers. J. R.,F. Bezanilla, and R.E. Taylor. 1983. Sodium channel activation in pronase-treated squid axon. Biophys. J. 41:144a (Abstr.)
- Ulbrich W.1974.Ionic channels through the axon membrane. A review. Biophys of structure and mechanism. 1:1-16.