



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efectos de la polarización eléctrica en la
constante de apertura de un canal iónico
activado por voltaje

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
FÍSICA

PRESENTA:
GUILLERMINA ROCHELLE RAMÍREZ SAN JUAN

DIRECTOR DE TESIS:
DR. LEÓN DAVID ISLAS SUÁREZ



2011



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.

Jurado asignado

| | | |
|------------|---|-----------------------------|
| Presidente | Dr. Antonmaría Minzoni Allesio | IIMAS, UNAM. |
| Vocal | Dr. Victor Manuel Romero Rochín | Instituto de Física, UNAM. |
| Secretario | Dr. León David Islas Suárez | Facultad de Medicina, UNAM. |
| Suplente | Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez | Facultad de Ciencias, UNAM. |
| Suplente | Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir | IFC, UNAM. |

Lugar donde se realizó la tesis:
Laboratorio 2, Torre de Investigación de la Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México.

*A mi familia, Guillermo, Elizabeth, Isaac y David,
por llenar mi vida de amor.*

Agradecimientos

Esta tesis es un esfuerzo conjunto, ya que no me hubiera sido posible terminarla sin el apoyo de muchas personas en distintas formas.

Agradezco en primer lugar a mi familia, a mis papás Elizabeth y Guillermo, quienes siempre me han apoyado incondicionalmente, tanto en mis problemas académicos como en mis dilemas personales. A mis hermanos, Isaac y David, les doy gracias por llenar mi vida de amor, animarme en todo momento y por simplemente ser ellos, los quiero muchísimo.

A mis amigos les doy gracias por haber estado conmigo no sólo en los meses que me llevó la elaboración de esta tesis, sino durante toda mi carrera. En especial a Leos, Santillan y Roberto, gracias por haber cuidado de mi durante toda la carrera y por haber compartido conmigo momentos divertidos y difíciles por igual.

A mis compañeros de laboratorio Andrés, Gisela, Ernesto, Victor e Itzel, les doy gracias por haberme animado y ayudado. Gracias por crear un ambiente agradable todos los días en mi lugar de trabajo. En especial quiero agradecer a Andrés por toda la paciencia que tuvo para enseñarme a hacer un experimento, para resolver todas mis dudas y para discutir conmigo sobre cualquier tema.

Agradezco a mi asesor, el Dr. León Islas por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, a pesar de que poca gente confiaría en una estudiante de física para hacer experimentos de electrofisiología.

Al Dr. Antomaría Minzoni, le doy gracias por las valiosas discusiones de todos los martes. En realidad debería aparecer como co-tutor en esta tesis ya que toda la parte teórica la realicé bajo su supervisión.

A mis profesores de la facultad les agradezco el haberme dado las bases de mi formación científica. En especial quiero agradecer al Dr. Eugenio Ley Koo y al Dr. Victor Romero, por el apoyo que me han brindado dentro y fuera del salón de clases.

Agradezco a mis sinodales por haberse tomado el tiempo de leer y corregir esta tesis.

Índice general

| | |
|---|-----------|
| 1. Introducción | 1 |
| 2. La membrana celular | 3 |
| 2.1. Potencial eléctrico de la membrana celular | 4 |
| 2.2. Capacitancia de la membrana celular | 5 |
| 2.3. Modelo electrónico de un parche de membrana celular | 6 |
| 2.4. Transporte a través de la membrana celular | 7 |
| 3. Canales iónicos sensibles al voltaje | 8 |
| 3.1. Canales de potasio K^+ | 8 |
| 3.1.1. Mecanismo de selectividad de un canal de potasio | 9 |
| 3.1.2. Estructura del sensor de voltaje | 11 |
| 3.2. Mediciones de la actividad de un canal activado por voltaje | 14 |
| 3.2.1. Técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (<i>patch-clamp</i>) | 16 |
| 3.3. Modelo discreto de la apertura de un canal iónico | 21 |
| 3.4. Medición experimental de la cinética de un canal | 24 |
| 4. Movimiento Browniano | 26 |
| 4.1. Movimiento Browniano en ausencia de una fuerza externa | 26 |
| 4.2. Movimiento Browniano en presencia de una fuerza externa (Aproximación de Smoluchowski) | 28 |
| 4.2.1. Tiempo medio de salida | 29 |
| 5. Electroestática en medios dieléctricos | 32 |
| 5.1. Dipolos inducidos | 32 |
| 5.2. Moléculas polares | 33 |
| 5.3. Polarización | 34 |
| 5.4. El campo de desplazamiento eléctrico | 34 |
| 5.5. Dieléctricos lineales | 35 |
| 6. Métodos Experimentales | 36 |
| 6.1. Expresión del canal <i>Shaker IR</i> en ovocitos | 36 |
| 6.2. Soluciones y registros de <i>patch-clamp</i> | 36 |
| 7. Resultados | 40 |
| 7.1. Mediciones experimentales | 40 |
| 7.2. Modelo Teórico | 45 |
| 7.2.1. Modelo para el paisaje energético que representa la activación de un canal | 47 |
| 7.2.2. Cálculo de la constante de velocidad de apertura de la última transición del canal | 51 |
| 8. Conclusiones | 54 |

| | |
|--|-----------|
| A. Representación de listones de la estructura de una proteína | 55 |
| B. Teoría de Probabilidad | 56 |
| B.1. Variables Aleatorias | 56 |
| B.1.1. Variables aleatorias dependientes del tiempo | 58 |
| B.1.2. Clasificación de los procesos estocásticos | 58 |
| B.1.3. Ecuación de Chapman-Kolmogorov | 60 |
| B.2. Ecuación de Langevin | 60 |
| B.3. Ecuación de Fokker-Planck | 61 |
| B.3.1. Soluciones estacionarias de la ecuación de F-P | 62 |
| B.3.2. Coeficientes de arrastre y difusión para un proceso estocástico descrito por la ecuación de Langevin | 63 |
| C. Solución de la ecuación electrostática | 66 |

Resumen

En esta tesis se estudian los efectos de la polarización eléctrica en el mecanismo de apertura del canal iónico activado por voltaje *Shaker IR*. Para ello se realizaron registros de corrientes iónicas macroscópicas del canal, utilizando la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch-clamp*). Los registros se obtuvieron a potenciales de membrana entre 0mV y 260mV. A partir de los registros se determinó la constante de velocidad de apertura de la última transición del canal. Los modelos convencionales sugieren que la constante de apertura del canal depende exponencialmente del potencial de membrana, pero se observan desviaciones de este comportamiento a potenciales mayores a $\approx 140\text{mV}$. Para explicar este comportamiento, se estudiaron los efectos de polarización eléctrica en la proteína, resolviendo la ecuación electrostática correspondiente a este problema (en 1 dimensión); considerando una constante dieléctrica que depende tanto de la magnitud del campo eléctrico como de la coordenada espacial en el canal. La constante de velocidad de apertura de la última transición del canal obtenida con un modelo teórico basado en la teoría de difusión de *Kramers*, considerando los efectos de polarización de la proteína, concuerda con la disminución de la dependencia en el voltaje de la constante de apertura observada experimentalmente. Esto sugiere que el mecanismo responsable del comportamiento independiente del potencial de membrana de la constante de apertura del canal, es la polarización eléctrica. El canal *Shaker IR* ya se ha estudiado con anterioridad, pero se conoce poco acerca de su estructura, y mucha de la información que se tiene proviene de estructuras cristalinas del canal en su estado abierto. El estudio de la polarización en el canal es importante ya que estudiando el perfil de potencial a lo largo de la proteína se puede obtener información acerca de su estructura y función *in vivo*.

Capítulo 1

Introducción

Los canales iónicos sensibles al voltaje son proteínas que se encuentran en las membranas celulares, estos tienen un papel central en diversos procesos celulares tales como la propagación del potencial de acción, la regulación del volumen celular, diferenciación y proliferación, etc. Estas proteínas forman vías de conducción altamente selectivas para el transporte de iones a través de la membrana celular; combinan su alta selectividad junto con una rapidez de transporte de iones de 10^7 a 10^8 iones por segundo. La propiedad más importante de estas moléculas es su habilidad para detectar cambios pequeños en el potencial de la membrana, abriendo con ello un poro para dejar pasar iones. Al proceso de apertura del poro en un canal se le conoce como activación, este proceso es altamente sensible e involucra cambios conformacionales en la proteína.

Estudios estructurales en los canales han revelado poco acerca de su activación; por lo que la mayor parte de nuestro conocimiento del mecanismo que acopla los cambios en el potencial de la membrana con la apertura del poro, proviene de estudios acerca de la función de los canales.

Los canales iónicos se prestan para hacer un detallado análisis cinético ya que durante su actividad producen señales eléctricas perfectamente medibles (corrientes de membrana). Los canales activados por voltaje son particularmente fáciles de estudiar debido a que se le puede imponer un cambio de potencial a una membrana celular usando un circuito electrónico de retroalimentación conocido como *voltage clamp* y se pueden medir las corrientes resultantes de su apertura. Usando esta técnica electrónica se pueden obtener distintos tipos de señales, una de las más usuales son las corrientes iónicas macroscópicas. Al registrar estas corrientes de una membrana que contiene varios canales, se puede obtener un panorama del curso temporal de la actividad del canal, con una resolución temporal de unos cuantos microsegundos. Al registrar estas corrientes se ha observado que hay un aumento gradual en la conductancia de los canales que ocurre en respuesta a un cambio positivo en el potencial de membrana (depolarización). Potenciales de membrana más positivos no solo aumentan la conductancia del estado estacionario, sino que también aumentan la rapidez a la que se alcanza su valor final.

Existen varios modelos cinéticos para la activación de los canales iónicos sensibles al voltaje. El mayor problema de estos modelos no es encontrar un modelo que funcione, sino uno que este delimitado en varias formas por los datos experimentales, para que refleje correctamente el mecanismo de activación de los canales. El enfoque convencional que se ha dado al modelaje de la activación de los canales iónicos esta basado en el uso de diagramas de estado, donde cada estado representa una conformación distinta de la proteína (Modelos de Markov). Este es un modelo muy robusto, con suficiente flexibilidad y parámetros ajustables como para describir casi cualquier cinética. Para los canales sensibles al voltaje, este modelo se reduce a uno con una serie de estados cerrados que van a un estado abierto con transiciones dependientes del voltaje entre cada estado,

$$C_0 \xrightleftharpoons[\beta_1]{\alpha_1} C_1 \xrightleftharpoons[\beta_2]{\alpha_2} C_2 \dots C_{N-2} \xrightleftharpoons[\beta_{N-1}]{\alpha_{N-1}} C_{N-1} \xrightleftharpoons[\beta_N]{\alpha_N} O_N$$

Las constantes de apertura del canal α_i y β_i son tomadas como funciones exponenciales del potencial de membrana, V_m , escalado por las cargas parciales $q_{\alpha i}$ y $q_{\beta i}$, que representan la carga que se mueve en cada transición.

Un problema con este modelo es que muchas veces se requiere un gran número de estados cerrados para explicar el proceso de activación del canal. Esto presenta un problema conceptual importante ya que un número tan grande de conformaciones discretas es poco probable desde un punto de vista físico. Además este tipo de modelos no explica con claridad el origen físico de los cambios conformacionales en el canal.

La mayoría de estos modelos teóricos, con dependencias exponenciales en el voltaje, se ha comparado con datos experimentales obtenidos a potenciales de membrana de hasta $140mV$, dando buenos resultados, pero aún no se sabe hasta que valores del potencial de membrana estos modelos pueden tener validéz. El objetivo de esta tesis es probar que a potenciales mas positivos, de hasta $260mV$, estos modelos ya no predicen correctamente el comportamiento de las constantes de apertura de los canales y proponer un modelo alternativo que reproduzca los registros experimentales pero que al mismo tiempo este apegado a la realidad desde un punto de vista físico.

Para hacer esto se estudió el canal iónico activado por voltaje conocido como *ShakerIR*, expresándolo en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Utilizando la técnica de *patch-clamp*, se obtuvieron registros de corrientes iónicas macroscópicas del canal, en un rango de potenciales de membrana entre 0 y $260mV$. A partir de los registros de corriente iónica macroscópica se obtuvo el valor de la constante de velocidad de apertura de la última transición del canal, observándose que a potenciales de membrana mayores a $\approx 140mV$, esta ya no depende exponencialmente del potencial de membrana.

Para explicar la disminución de la voltaje-dependencia de la constante de velocidad de apertura de la última transición del canal, se estudiaron los efectos de polarización en la proteína. Para ello se resolvió la ecuación electrostática correspondiente al problema, en una dimensión, considerando una constante dieléctrica que depende tanto de la posición en el canal, como de la intensidad del campo eléctrico aplicado a la proteína. Adicionalmente, se utilizó un modelo de basado en la teoría de difusión de *Kramers*, para modelar la activación del canal. La constante de velocidad de apertura de la última transición del canal, obtenida con este modelo, concuerda con las mediciones experimentales en un rango de potenciales de membrana entre 50 y $260mV$. Lo anterior sugiere que los efectos de polarización de la proteína son significativos y que contrariamente a lo que se creía, tienen una influencia en la cinética de apertura del canal.

Capítulo 2

La membrana celular

Las membranas celulares son estructuras de una importancia crítica para la vida ya que cumplen con una serie de funciones indispensables para el funcionamiento de las células. Mantienen una diferencia entre la composición química de la célula y sus alrededores, aislando el contenido celular y definiendo sus fronteras, al mismo tiempo que permiten el paso de nutrientes hacia el interior de la célula y el transporte de productos de desecho al exterior. También tienen propiedades de elásticas que permiten el crecimiento y cambio de forma de las células.

El componente primario de las membranas celulares es una bicapa fosfolipídica que constituye aproximadamente el 50% de su masa. Las moléculas lipídicas que componen la bicapa son anfipáticas, i.e. tienen un extremo hidrofílico (polar), y un extremo hidrofóbico (no polar), esto provee a la membrana de una estructura básica fluida que a su vez funciona como una barrera impermeable al paso de la mayoría de las moléculas solubles en agua. El resto de la membrana está compuesto en su mayoría por proteínas integrales. Las moléculas de proteína median casi todas las demás funciones de la membrana, transportando moléculas específicas a través de ella, catalizando reacciones asociadas a la membrana, etc. [1]

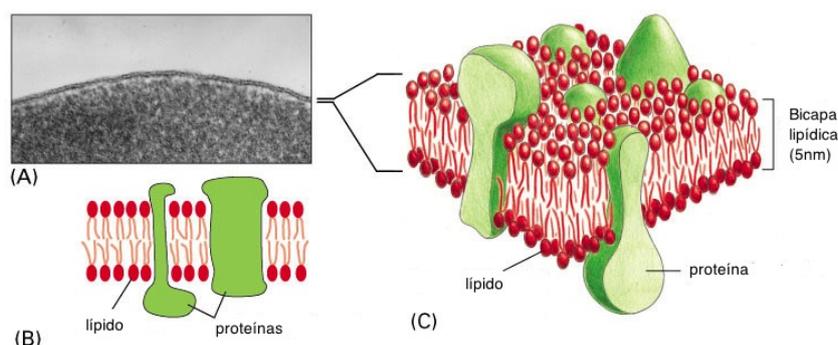


Figura 2.1: **Estructura de la membrana celular.** Debido a la naturaleza anfipática de los lípidos membranales, su conformación energética más favorable en un ambiente acuoso es una bicapa. En esta bicapa se encuentran incrustadas las proteínas de membrana responsables de distintas funciones en la membrana celular. (Figura adaptada de [1] p.584)

2.1. Potencial eléctrico de la membrana celular

Tanto el interior de la célula como su medio externo están compuestos por soluciones de distintas especies de iones a concentraciones diferentes. Debido a que existe una diferencia de carga eléctrica entre el interior y el exterior de la célula, se origina un potencial electroquímico a lo largo de la membrana celular. A este potencial se le conoce como potencial de membrana y por convención se mide con respecto al medio extracelular.[2]

Si se considera que tanto la región extracelular como la intracelular están compuestas por una solución neutra de iones de K^+ y Cl^- a concentraciones c_1 y c_2 respectivamente, al ser la membrana celular impermeable, no habrá flujo de iones entre ambas partes del sistema. En cambio si alguna de las proteínas de membrana se abre ocasionando que la membrana celular se vuelva permeable selectivamente, por ejemplo a iones de K^+ , estos comenzaran a fluir de la región de alta concentración a la región de baja concentración (Ver figura 2.2).

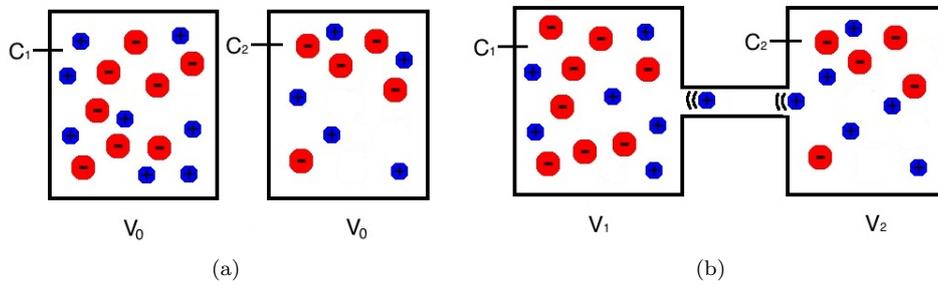


Figura 2.2: **Idealización del sistema compuesto para la membrana celular, el medio intracelular y el extracelular.** (a) La membrana celular se mantiene impermeable, no hay flujo de iones de una región del sistema a la otra. (b) Al volverse la membrana permeable al paso de iones de potasio, comenzará a haber un flujo de iones en la dirección del gradiente de concentración.

Los iones se mueven como respuesta al gradiente de concentración que existe entre ambas regiones del sistema, esta respuesta tiende a maximizar la entropía del sistema. Mientras estos iones fluyen bajo su gradiente de concentración, se crea un desbalance de carga en ambas regiones del sistema, por lo que la energía eléctrica del sistema aumentará. El sistema alcanzará el equilibrio cuando se balanceen estos dos efectos. Este balance ocurrirá a un valor de potencial determinado, que depende de la razón de las concentraciones finales de iones de K^+ . [3]

La probabilidad de encontrar un ión determinado en la región intracelular ó extracelular, al llegar el sistema al equilibrio, se puede calcular utilizando la distribución de Boltzmann si se conocen los potenciales finales de ambos lados de la membrana V_1 y V_2 y sus concentraciones iónicas finales c_1 , c_2 . En los procesos celulares, el cambio en las concentraciones que acompaña a la transferencia de iones a través de la membrana es muchos órdenes de magnitud menor que las concentraciones, por lo que se puede considerar que las concentraciones iónicas en el equilibrio son las mismas que al inicio en ambos lados de la membrana. De acuerdo a la distribución de Boltzmann y considerando que la energía de un ión de carga unitaria e y valencia z es zeV , la probabilidad de que en equilibrio un ión se encuentre en la región 1 ó 2 es:

$$p_{1,2} = \frac{1}{Z} e^{-eV_{1,2}/k_B T} \quad (2.1)$$

Donde 1,2 denotan la región donde se quiere calcular la probabilidad, T es la temperatura, k_B la constante de Boltzmann y Z la función de partición del sistema. La razón de ambas probabilidades es igual a las concentraciones de iones en ambas regiones, se puede utilizar esta proporcionalidad

para escribir la razón de concentraciones como:

$$\frac{c_1}{c_2} = \frac{p_1}{p_2} = \frac{e^{-eV_1/k_B T}}{e^{-eV_2/k_B T}} \quad (2.2)$$

Y tomando el logaritmo de ambas partes de la ecuación anterior, se obtiene:

$$V_2 - V_1 = \frac{k_B T}{e} \ln \frac{c_1}{c_2} \quad (2.3)$$

A la ecuación (2.3) se le conoce como ecuación de Nernst, de acuerdo a esta ecuación la escala de energía térmica corresponde a una diferencia de potencial de $k_B T/e$, si se sustituye el valor de estas cantidades se obtiene que la diferencia de potencial es del orden de 25mV. El hecho de que la diferencia de potencial ente ambos lados de la membrana sea de 10 – 100mV, indica que los efectos térmicos juegan un papel importante ya que la escala de energía térmica y la escala de energía eléctrica son comparables.[2]

Utilizando energía, la célula transporta iones de potasio del exterior al interior de la célula, generando un potencial electroquímico a través de la membrana. La carga positiva excedente del interior de la célula debida a los iones de potasio transportados es balanceada principalmente por la carga negativa en macromoléculas de vital importancia como los ácidos nucleicos y las proteínas. Debido a que la permeabilidad de la membrana por el potasio es mucho mayor que para los demás iones, el potasio se equilibra de acuerdo al potencial de Nernst, generando una diferencia de potencial a través de la membrana. La diferencia de potencial en las membranas celulares varía entre -10 y -95mV, dependiendo del tipo de célula y de las condiciones ambientales.

2.2. Capacitancia de la membrana celular

Al separar el contenido de la célula de sus alrededores, la membrana celular actúa como un aislante entre dos soluciones conductoras. Al ser una brecha dieléctrica delgada entre dos conductores, forma un capacitor eléctrico que puede almacenar una carga eléctrica significativa.

Por lo anterior, la membrana celular puede ser considerada localmente como un capacitor de placas paralelas [4]. Un capacitor con esta geometría tiene una capacitancia dada por:

$$C = \frac{\epsilon \epsilon_0 A}{d} \quad (2.4)$$

donde ϵ_0 es la polarizabilidad eléctrica del vacío $8,85 \times 10^{-12} CV^{-1}m^{-1}$, ϵ es la constante dieléctrica del medio que separa las placas, A y d son el área y el grosor de las placas respectivamente [2]. Se ha observado que la capacitancia específica¹ de la membrana celular es aproximadamente $1\mu F/cm^2$; al sustituir esto en la ecuación (2.4) y suponiendo que la constante dieléctrica de la membrana es $\epsilon = 2,1$, se obtiene que el grosor de la membrana es $d = 23\text{Å}$, por lo que la alta capacitancia de la membrana celular es consecuencia de sus dimensiones moleculares.[2]

La capacitancia, C , es una medida de la cantidad de carga, Q , que se necesita transferir de un conductor a otro para obtener una diferencia de potencial entre ellos de V :

$$C = \frac{Q}{V} \quad (2.5)$$

En un capacitor ideal, el paso de corriente transfiere carga de un conductor a otro de una manera reversible y sin disipación de energía. La tasa de cambio del potencial bajo la acción de una corriente I_C se obtiene al derivar la ecuación (2.5):

$$\frac{dV}{dt} = \frac{I_C}{C} \quad (2.6)$$

¹Capacitancia específica: Capacitancia por $1cm^2$

En general, la capacitancia retarda la respuesta en voltaje a cualquier corriente por un tiempo característico τ que depende del producto RC de la capacitancia y cualquier resistencia efectiva en paralelo. Utilizando la ley de Ohm $I = \frac{V}{R}$ la ecuación (2.6) se puede escribir como:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{I_C}{C} = -\frac{V}{RC} \quad (2.7)$$

La solución a la ecuación anterior, tiene un curso temporal que decae exponencialmente:

$$V = V_0 e^{-\frac{t}{RC}} = V_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.8)$$

donde V_0 es el voltaje inicial, t es el tiempo en segundos.[2]

Para una membrana biológica, al producto $R_M C_M$, de la resistencia de la membrana por su capacitancia, se le conoce como constante temporal de la membrana, τ_M . Puede ser determinado utilizando ecuaciones como (2.8), a partir de mediciones de la evolución temporal de los cambios en el potencial de membrana que ocurren al aplicar pequeños pasos de corriente a través de la membrana. En distintas membranas en reposo, τ_M varía desde $10\mu s$ hasta $1s$, que corresponden a valores en reposo de R_M desde 10 hasta $10^6 \Omega cm^2$. Este rango amplio de resistencias específicas muestra que el número de canales iónicos abiertos en reposo, varía de una manera importante de célula a célula.

2.3. Modelo electrónico de un parche de membrana celular

La bicapa lipídica y las proteínas que se encuentran dentro de ella pueden ser vistas como un circuito eléctrico. En esta idealización, la membrana celular es un conjunto de resistores, baterías y capacitores como se muestra en la figura 2.3.[5]

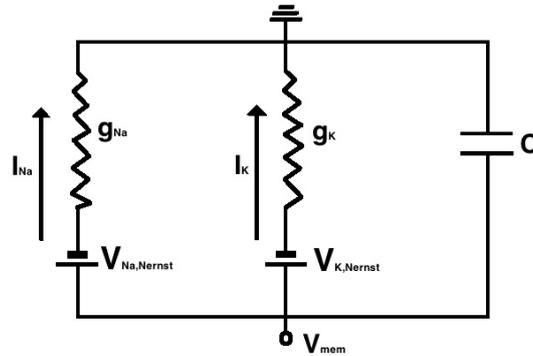


Figura 2.3: **Representación de la membrana como un circuito.** C es la capacitancia de la membrana, los elementos de voltaje son potenciales de Nernst correspondientes a distintos iones y la serie de resistores en paralelo corresponde a distintas proteínas de canal caracterizados por distintas conductancias. El potencial de Nernst toma el papel de una batería en serie con un resistor de conductancia g .

La idealización de la membrana como un resistor y una batería en serie se puede entender utilizando la relación general entre la corriente y un gradiente de potencial químico. Una diferencia en el potencial químico, implica que el sistema aún no se encuentra en equilibrio, por lo que debido a

este gradiente, las partículas comienzan a moverse. La diferencia en el potencial electroquímico entre ambos lados de la membrana, para un tipo de ión específico esta dada por:

$$\Delta\mu = \left(\mu_0 + k_B T \ln \frac{c_{in}}{c_0} + zeV_{in} \right) - \left(\mu_0 + k_B T \ln \frac{c_{out}}{c_0} + zeV_{out} \right) \quad (2.9)$$

esta diferencia da origen a un flujo neto de estos iones a través de la membrana. La corriente iónica I , será proporcional al gradiente de potencial electroquímico, $\Delta\mu$:

$$I = g \left(\frac{k_B T}{ze} \ln \frac{c_{in}}{c_{out}} + V_{in} - V_{out} \right) \quad (2.10)$$

El coeficiente de proporcionalidad es la conductancia, g . Ya que la corriente fluye de un potencial químico alto, a uno bajo, una corriente positiva indica que iones positivos estan fluyendo hacia el exterior de la célula. [3]

Usando la definición del potencial de Nernst, $V_{Nernst} = k_B T / ze \ln(c_{out}/c_{in})$, y la relación, $V_{mem} = V_{in} - V_{out}$, para el potencial de membrana, se puede reescribir la ecuación 2.10 como:

$$I = g (V_{mem} - V_{Nernst}) \quad (2.11)$$

La ecuación anterior es la ley de Ohm, i.e, se obtiene una relación lineal entre la corriente y el voltaje.[2]

2.4. Transporte a través de la membrana celular

Debido a sus características estructurales las membranas celulares permiten la difusión de agua y moléculas no polares; pero para que una célula pueda realizar correctamente todas sus funciones necesita de moléculas polares como los iones, azúcares, aminoácidos y muchos otros metabolitos celulares. Las proteínas de membrana son las responsables del transporte de estos solutos a través de la membrana celular, existen en una gran variedad de formas y tipos ya que cada proteína se encarga del transporte de distintas clases de moléculas [1]. En general estas proteínas se pueden clasificar en dos grupos:

- **Proteínas de transporte:** Las proteínas de transporte unen un soluto para que este sea transportado a través de la membrana. Para realizar su función, estas proteínas tienen que realizar una serie de cambios conformacionales que exponen el sitio de unión del soluto de manera secuencial a ambas paredes de la membrana. Estas proteínas pueden transportar un soluto obedeciendo un gradiente de concentración (transporte pasivo) ó en contra de una gradiente electroquímico (transporte activo), usando energía obtenida por medio de la hidrólisis del ATP u obteniendo energía de un gradiente de concentración de otro soluto.
- **Proteínas de canal:** Las proteínas de canal, no se enlazan al soluto, en su lugar forman poros hidrofílicos que se extienden a lo largo de la membrana; cuando estos poros se abren, permiten el paso de solutos específicos. Estos canales tienen un mecanismo de compuerta, que les permite abrirse y cerrarse de manera regulada. Los canales se abren en respuesta a una perturbación específica en la membrana, esta perturbación puede ser en la forma de un cambio en el potencial de membrana (canales activados por voltaje), la unión de un neurotransmisor (canales activados por ligantes), etc. El transporte de moléculas a través de una proteína de canal, es mucho mas rápido que a través de una proteína transportadora.

Capítulo 3

Canales iónicos sensibles al voltaje

Los canales iónicos sensibles al voltaje son una clase específica de proteínas de canal cuyo mecanismo de activación son los cambios en el potencial de membrana. Estas proteínas tienen regiones con aminoácidos cargados que detectan cambios en el potencial de membrana al interactuar con el campo eléctrico transmembranal. Una vez detectado un cambio en el potencial de membrana, inicia una serie de cambios conformacionales en la proteína que da lugar a la apertura del poro del canal.

Los canales iónicos forman vías de conducción que pueden ser altamente selectivas para el transporte de iones a través de la membrana celular, además de combinar su alta selectividad con una velocidad de transporte de iones, de 10^7 a 10^8 iones por segundo. Están ampliamente distribuidos en diferentes sistemas celulares, jugando un papel central en diversos procesos celulares tales como la propagación del potencial de acción, la regulación del volumen celular, diferenciación y proliferación, etc.

Muchos canales conducen sólo un tipo de ión con alta selectividad. El potencial electroquímico para cada ión en la membrana plasmática de la célula definirá la polaridad de la corriente que se genere al activarse canales iónicos específicos para un ión dado. Por ejemplo, la apertura de canales de sodio y calcio en una neurona tienen como consecuencia la generación de corrientes entrantes de ambos iones, lo que despolariza la célula. Por otro lado, la apertura de canales de potasio permite la salida de iones K^+ hacia el espacio extracelular, lo que repolariza la membrana y contribuye al control de la excitabilidad celular.

Estudios estructurales en los canales han revelado poco acerca de su mecanismo de activación; por lo que la mayor parte de nuestro conocimiento del mecanismo que acopla los cambios en el potencial de la membrana con la apertura del poro proviene de estudios acerca relacionados con la función de los canales.

3.1. Canales de potasio K^+

Los canales de K^+ son miembros de la familia de canales activados por voltaje. Existe un gran número de canales de potasio, debido a que son codificados por al menos 22 genes diferentes en los mamíferos. A pesar de su variedad, todos mantienen grandes similitudes en su estructura y funcionamiento [6]. Uno de los canales que se han utilizado como modelo para el estudio de los canales sensibles al voltaje es el canal *Shaker*, originalmente clonado de *Drosophila melanogaster*. Se tiene una descripción amplia de las propiedades biofísicas de este canal, por esta razón se utilizó en esta tesis como modelo de estudio.

Los canales de potasio son estructuras homotetraméricas¹, cada subunidad contribuye a la formación de un poro y contiene su propio sensor de voltaje. La subunidad estándar de un canal de potasio contiene 6 segmentos transmembranales (S1-S6) (figura 3.1). Los segmentos S5-S6 constituyen la región del poro de un canal, mientras que el conjunto de los segmentos S1-S4 forma la región del sensor de voltaje. Estudios estructurales y funcionales indican que el segmento S4 se encuentra siempre junto con los otros 3 segmentos transmembranales (S1-S3). El segmento S4 contiene varios residuos de Arg y Lys.[6]

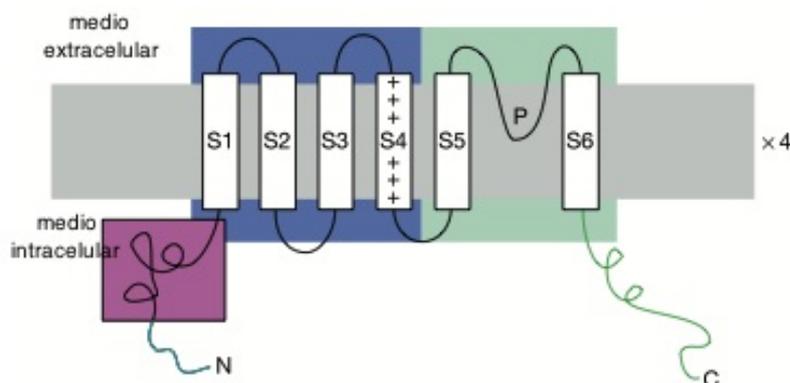


Figura 3.1: **Segmentos de la subunidad estándar de un canal de potasio.** El sensor de voltaje del canal se encuentra en la región que comprende los segmentos del S1 al S4, siendo el segmento de mayor importancia el S4 por su gran número de cargas positivas. El filtro de selectividad del canal (región del poro) está formado por un bucle entre las regiones S5 y S6. (Figura adaptada de [6])

Para que la región del sensor de voltaje S1-S4 detecte un cambio en el potencial de membrana, debe sufrir un cambio conformacional. Este cambio conformacional involucra el movimiento, relativo al campo eléctrico de la membrana celular, de 3 a 3.5 cargas elementales en los sensores de voltaje de cada subunidad. Este movimiento de cargas relativo al campo puede ser detectado eléctricamente como una corriente capacitiva no lineal, que se conoce como corriente de compuerta. Los residuos de Arg en el segmento S4 son los responsables de la mayor parte de esta corriente, ya que se ha mostrado que el S4 se mueve hacia afuera en los canales activados por la despolarización de la membrana.[7]

3.1.1. Mecanismo de selectividad de un canal de potasio

El canal de potasio bacteriano *KcsA* es el prototipo para estudiar la región de un canal responsable de la formación del poro (segmentos S5-S6). Este canal tiene solamente dos hélices transmembranales, una hélice exterior homóloga al segmento S5 y una hélice interior homóloga al segmento S6 (Ver figura 3.2).[6]

La región del poro del canal (S5-S6) tiene características específicas que aseguran el transporte de iones a través del canal de una manera rápida y altamente selectiva. Para poder transportar eficientemente iones de potasio, es necesario que estos se mantengan estables dentro del poro del canal. Debido a que los iones de potasio tienen una fuerte interacción con el agua, estos requieren de asistencia para cruzar la membrana celular. En los alrededores de un ión de K^+ , las moléculas de agua se reorientan con su lado negativo apuntando hacia el ión.

¹Un homotetrámero es un complejo de proteína formado por 4 subunidades idénticas asociadas sin estar unidas por un enlace covalente.

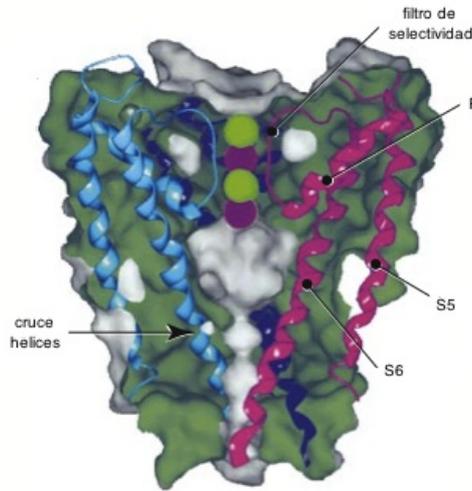


Figura 3.2: **Representación esquemática del canal de potasio KcsA en su estado cerrado.** El interior de la proteína se muestra de color verde y su estructura secundaria se muestra en forma de listones³ para 3 de las 4 subunidades que conforman el canal. La superficie expuesta al agua se muestra en color gris. El filtro de selectividad del canal se encuentra en la parte superior. Las 4 esferas que se observan marcan los 4 sitios de unión del ión de K^+ ; estos típicamente se encuentran ocupados por iones de K^+ y moléculas de agua alternadamente. Las 4 hélices interiores se cruzan en la parte inferior para constriñir el canal en el estado cerrado e impedir el flujo de iones. Entre el filtro de selectividad y cruce de estas 4 hélices hay una cavidad llena de agua. (Figura adaptada de [6])

Una opción para estabilizar a un ión de K^+ dentro del poro de un canal sería utilizar una carga negativa para atraerlo. El problema de este mecanismo es que el ión de K^+ podría sentirse demasiado atraído por la carga negativa, impidiendo que saliera fuera del poro. En lugar de este mecanismo, los canales de potasio tienen cuatro características estructurales que les permiten mantener a los iones de K^+ tan estables como en el agua, para garantizar su tránsito eficiente a través del canal.

Primero, los canales utilizan agua para mantener estables a los iones de K^+ . En lugar de mantener un poro angosto de dimensiones atómicas a lo largo de todo el canal, una parte del canal es ancha y contiene una cantidad considerable de agua (ver figura 3.3).

Segundo, los canales de potasio estabilizan los iones y logran su alta selectividad utilizando la influencia electrostática de los dipolos en las hélices que se encuentran entre los segmentos S5 y S6 que constituyen el dominio del poro del canal. Cada α -hélice tiene un momento dipolar. Los extremos negativos de los dipolos de las hélices apuntan hacia el centro del vestíbulo intracelular de un canal de K^+ , se ha propuesto que estos dipolos producen una estabilización preferencial de cationes cerca de la entrada angosta del filtro de selectividad.

Una tercera característica de los canales de K^+ que le permite su alta selectividad y rápida permeación de iones es una serie de cajas de oxígeno polar. Mientras un ión de potasio se difunde a través del agua, este está rodeado por una caja de oxígenos polares de las moléculas de agua. El agua es extremadamente flexible y puede acomodarse formando una caja de distinto tamaño y configuración dependiendo del tamaño de los iones que rodea. El filtro de selectividad de un canal de potasio imita la estructura que el agua forma alrededor de un ión de K^+ . Cada ión de K^+ dentro del filtro de selectividad del canal está rodeado de dos grupos de 4 átomos de oxígeno

provenientes de los carbonilos de la cadena principal de la proteína. La alta selectividad para iones de potasio con respecto a, por ejemplo, iones de sodio proviene de un balance de fuerzas entre la repulsión electrostática entre los oxígenos parcialmente negativos y la atracción entre los oxígenos y el ión. Dado que el sodio es más pequeño que el potasio, la distancia entre los carbonilos cuando hay sodio en el filtro de selectividad es menor, por lo que la repulsión electrostática entre oxígenos es grande, ocasionando que la unión del sodio al filtro no sea muy estable.[6]

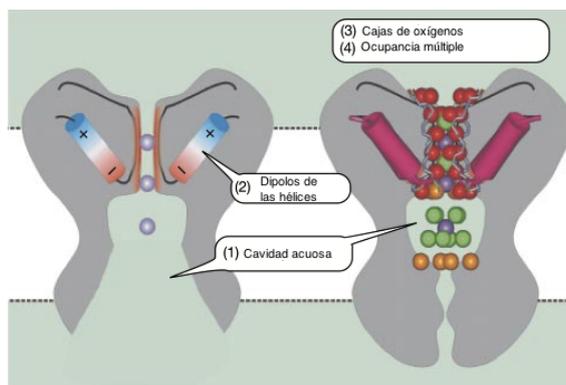


Figura 3.3: **Características estructurales importantes para la permación de iones en un canal de K^+ .** Sección transversal de un canal de K^+ en su estado abierto, basada en la estructura cristalina del canal MthK (izquierda). En el diagrama se puede apreciar el vestíbulo intracelular y los dipolos correspondientes a las hélices que se encuentran entre los segmentos S5 y S6, denominadas hélices del poro. El diagrama de la derecha es una vista basada en la estructura cristalina del canal KcsA, muestra que el acceso a la cavidad de agua es muy angosto y posiblemente se encuentre cerrado. Se puede apreciar un ión de K^+ atrapado (esfera morada) por 5 moléculas de agua (esferas verdes). (Figura adaptada de [6])

Finalmente, una característica bien conocida de los canales de K^+ es que los iones deben pasar a través de un solo canal que contiene simultáneamente a varios iones. La repulsión electrostática entre los iones de K^+ desestabiliza a estos iones en el poro, permitiendo que otras interacciones favorables se encarguen de la selectividad de los iones sin producir enlaces muy fuertes que impedirían la permeación rápida.

Las características estructurales y funcionales de los canales de potasio están perfectamente adaptadas para que cumplan su función. Resuelven el problema electrostático estabilizando los iones, usando agua y dipolos de las hélices y del filtro para contrarrestar el ambiente dieléctrico desfavorable de la membrana.

3.1.2. Estructura del sensor de voltaje

Para comprender el mecanismo de activación de un canal, se necesita conocer en detalle la estructura y funcionamiento del sensor de voltaje. En la actualidad existen cuatro estructuras resueltas por medio de rayos X de la región del sensor de voltaje (S1-S4) de un canal de potasio.

Las primeras dos estructuras reportadas, fueron del canal KvAP, un canal de potasio arqueobacteriano, tanto del canal completo como de la región del sensor de voltaje aislada (S1-S4). Con base en estas estructuras se han podido determinar algunas características estructurales de la región del sensor de voltaje [8]. Primero, se observó que la región S1-S4 se compone de 5 hélices: las hélices S1, S2, S4 forman hélices largas ininterrumpidas mientras que la hélice S3 está formada por 2 hélices más cortas denominadas S3a y S3b. Al conjunto de las hélices S3a, S3b y S4 se le

denomina paleta del sensor de voltaje (región morada figura 3.4). La paleta del sensor de voltaje contiene a los residuos de Arg más importantes del S4. Estas estructuras no lograron proporcionar información acerca de la orientación del sensor de voltaje, ya que en un caso sólo se cristalizó la región del sensor de voltaje y en el caso de la estructura del canal completo, la región del sensor de voltaje se encontraba distorsionada.

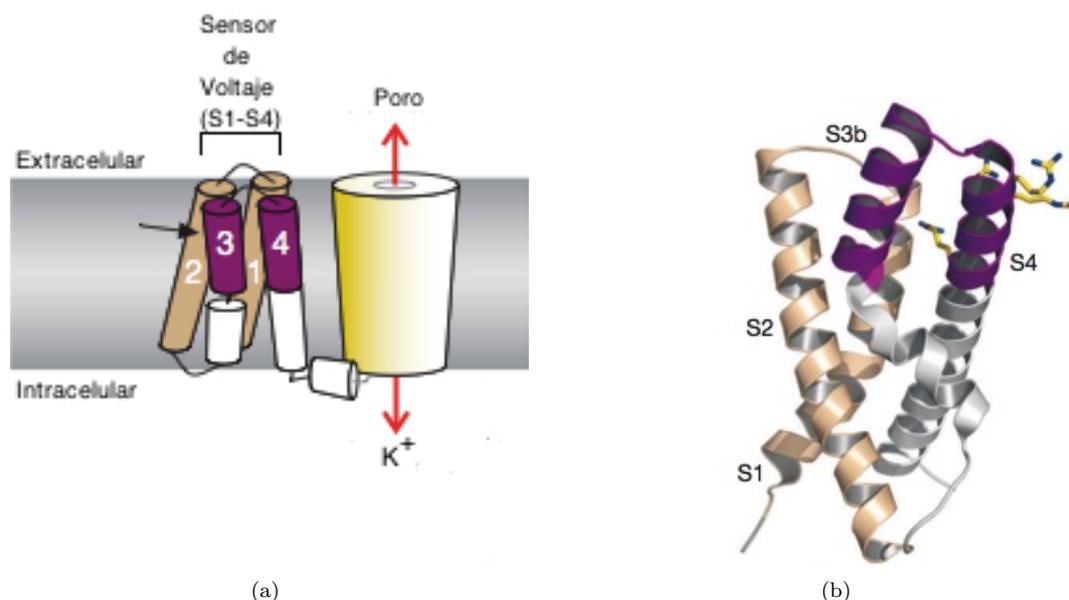


Figura 3.4: **Estructura tridimensional de la región del sensor de Voltaje (S1-S4)**(a)Representación esquemática de la región del sensor de voltaje en un canal de potasio. La región en morado corresponde a la paleta del sensor. (b) Representación de listones de la estructura de rayos X del sensor de voltaje del canal KvAp (Protein Data Bank: 1ORS), la región en morado es nuevamente la paleta del sensor de voltaje. Se muestran caricaturas de las cadenas laterales de los residuos cargados del S4. (Figura adaptada de [7])

La estructura del canal de potasio eucariótico Kv1.2 fue la primera en proporcionar una perspectiva clara de la región del sensor de voltaje (S1-S4) en un canal completo [9]. En esta estructura también se observa que los segmentos S3a y S4 se asocian por medio del segmento S3b y que las hélices del S1-S4 toman orientaciones transmembranales, además parecen estar unidas holgadamente a la región del poro del canal [9].

La estructura más reciente de un canal de potasio es la de la quimera del Kv1.2 con la paleta del sensor de voltaje del canal Kv2.1[10]. Esta estructura es la imagen más clara que se tiene hasta el momento de la región del sensor de voltaje dentro de un canal completo. Los segmentos S1 y S4 se encuentran posicionados adyacentes al poro, mientras que el S2 y el S3a están posicionados periféricamente. En los mapas de la estructura de la quimera entre Kv1.2 y Kv2.1 también se pueden apreciar las densidades de electrones de varias moléculas de lípido, esto revela que los lípidos están en cercana interacción con la proteína. Los lípidos (moléculas mostradas en color verde en la figura 3.5)están presentes entre la región del sensor de voltaje (S1-S4), la región del poro, entre los sensores de voltaje de distintas subunidades y aún intercalados entre las hélices.

Si se superpone la información que se obtiene a partir de las cuatro estructuras conocidas de un canal de potasio, se obtienen algunas características esenciales de la región del sensor de voltaje. Primero, la estructura básica del sensor de voltaje se conserva de los canales de las arqueobacterias a los canales de los mamíferos. Existen algunas diferencias en la hélice S3, pero la topología

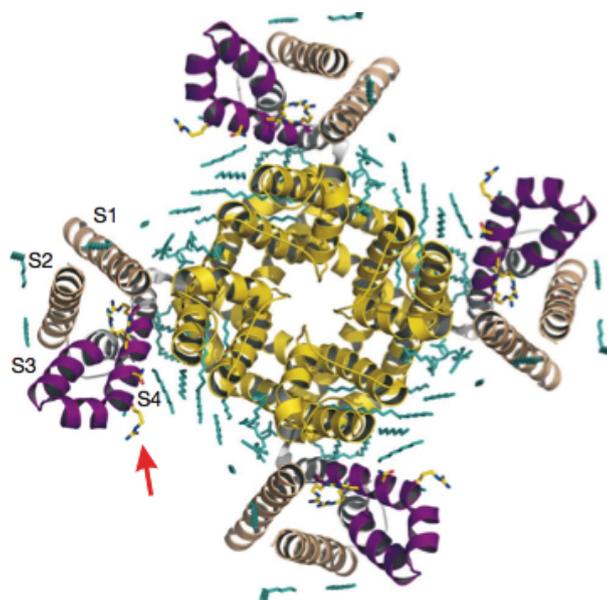


Figura 3.5: **Representación de listones de la estructura de la quimera entre Kv1.2 y Kv2.1.** La paleta del sensor de voltaje se muestra en color morado, la región del poro del canal en color amarillo y los lípidos en color verde. Únicamente se muestran las cadenas laterales de los residuos básicos del segmento S4. La flecha roja identifica los residuos exteriores de Arg que se proyectan hacia la membrana lipídica. (Protein Data Bank:2R9R)

general de los segmentos S1-S4 es notablemente similar. Adicionalmente a esto, ambas estructuras revelan una amplia red de interacciones electrostáticas entre los residuos básicos del S4 y los residuos ácidos en los segmentos S1,S2,S3; incluso en varios casos los residuos cargados de estos segmentos están tan juntos que se podría pensar que se superponen (Figura 3.6). En la conformación activada de la quimera entre en Kv1.2 y el Kv2.1 hay dos puntos de acumulación de residuos ácidos: una agrupación externa de residuos Glu de los segmentos S1 y S2, y un grupo de residuos ácidos interno formado por los residuos Glu en el S2 y Asp en el S3a. La agrupación externa de residuos se encuentra dentro de una cavidad expuesta al ambiente acuoso externo (Flecha verde en la figura 3.6), mientras que la agrupación interna de residuos ácidos en su mayoría se encuentra sepultada en el interior de la proteína. Esto confirma lo que se había supuesto con anterioridad con base en estudios mutagénicos del canal Shaker Kv, que los residuos ácidos en los segmentos S3 y S2 forman una red estabilizadora junto con el quinto residuo básico del segmento S4 cuando el sensor de voltaje se encuentra en un estado activado. Otra característica estructural evidente en la comparación es que los residuos Arg más externos no interactúan con los residuos ácidos, más bien se proyectan fuera de la región del sensor de voltaje hacia la membrana lipídica que rodea al canal (Flecha roja figura 3.6) [7].

Todas las estructuras que se tienen de un canal de potasio, fueron resueltas en ausencia de un campo eléctrico, i.e. a 0 mV, de estudios funcionales se sabe que a este potencial los sensores de voltaje de ambos canales se encuentran en su conformación activada, por lo que todas las estructuras conocidas de un canal activado por voltaje son de su estado abierto.

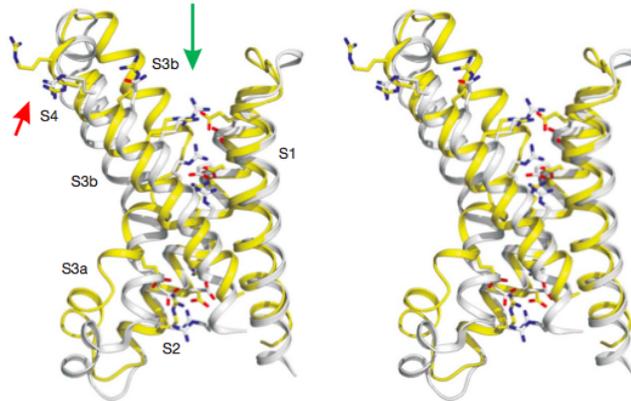


Figura 3.6: **Aminoácidos con carga en la región del sensor de voltaje (S1-S4).** Estructuras de listones de la región del sensor de voltaje del canal KvAP (amarillo) y la quimera de los canales Kv 1.2 y Kv 2.1 (blanco) vistas de lado. Únicamente se muestran las cadenas laterales de los residuos básicos. La flecha verde identifica la cavidad acuosa dentro de la región del sensor de voltaje que está en contacto con la solución externa. La flecha roja identifica las regiones exteriores de los residuos de Arg del segmento S4 que se proyectan hacia la membrana lipídica. (Protein Data Bank:1ORS para el KvAP y 2R9R para la quimera de Kv1.2 y Kv2.1) (Figura adaptada de [7])

3.2. Mediciones de la actividad de un canal activado por voltaje

Los canales iónicos se han prestado para su detallado análisis cinético ya que producen señales eléctricas de fácil medición durante su actividad. Los canales activados por voltaje son particularmente fáciles de estudiar ya que se pueden imponer cambios en el potencial de membrana, usando un circuito electrónico de retroalimentación conocido como clamp de voltaje (*voltage-clamp*) (figura 3.7) y se pueden medir las corrientes iónicas resultantes.

El método de fijación de voltaje (*voltage-clamp*) es la técnica más empleada en el estudio de los canales iónicos. Este método consiste en fijar externamente el potencial de la membrana celular y medir la corriente que se genera como respuesta al potencial de membrana. Adicionalmente a esto se deben utilizar condiciones que permitan reducir las corrientes capacitivas de la membrana y la propagación de corrientes de circuitos locales, para asegurar que la corriente observada es una medición directa del movimiento de iones a través de un área conocida de membrana, a un potencial uniforme y conocido. [11]

Para mantener el potencial de membrana constante, se podría conectar una batería ideal a través de la membrana celular. La corriente fluiría de la batería para contrarrestar exactamente cualquier corriente que fluya a través de la membrana celular, manteniendo así el potencial de la membrana constante. Desafortunadamente el circuito debe ser un poco más complicado ya que el flujo de corriente hacia afuera de los electrodos produce caídas de potencial locales impredecibles en el electrodo y en las soluciones que lo rodean, por lo que sólo los electrodos se mantendrían a un potencial constante y no el área de membrana estudiada. En su lugar, la mayoría de los circuitos de fijación de voltaje que se utilizan, miden el potencial cerca del final de la membrana y por medio de electrodos adicionales suministran la corriente adicional necesaria para mantener el potencial de membrana constante a pesar de que su permeabilidad cambie. Ya que los cambios en la permeabilidad iónica de la membrana ocurren rápidamente, se debe utilizar un amplificador de retroalimentación con una buena respuesta a frecuencias altas para reajustar la corriente frecuentemente. [11]

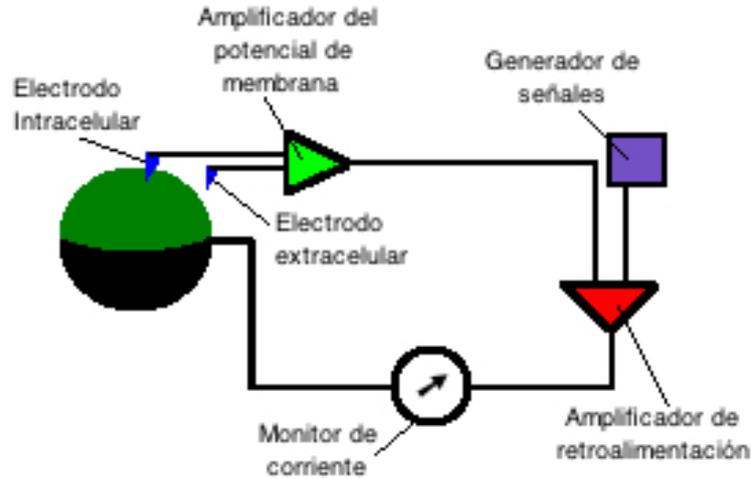


Figura 3.7: **Circuito básico de *voltage-clamp***. El potencial de membrana se mide por medio un electrodo intracelular y otro extracelular; los electrodos se conectan a un amplificador que mide el potencial de membrana V_m y alimenta esta señal al amplificador de retroalimentación; este amplificador recibe a su vez una señal de entrada del generador de señales V_h , que determina el potencial de mantenimiento. La función del amplificador de retroalimentación es determinar la diferencia $V_h - V_m$, magnificarla y enviar este resultado al electrodo de corriente. Cada vez que la célula se desvía del potencial de mantenimiento, el amplificador operacional genera una señal de error, que es igual a $V_h - V_m$. El monitor de corriente envía corriente a la célula para reducir la señal de error del amplificador a cero, produciendo así una corriente igual y opuesta a la corriente iónica. Esta señal puede ser medida, para obtener una reproducción precisa de la corriente que fluye a través de la membrana.

La figura 3.8 muestra algunos arreglos simplificados para fijar el voltaje en una membrana celular.

En un experimento estandar de *voltage-clamp*, el potencial de la membrana puede elevarse de un valor inicial cercano al potencial de reposo ($\approx -90mV$), conocido como potencial de mantenimiento, a cualquier valor de potencial y después regresarse al valor del potencial de mantenimiento.

Si la membrana fuera tan simple como el circuito equivalente mostrado en la figura 2.3, la corriente total de la membrana I_M sería igual a la suma de dos términos: la corriente I_i debida a los iones que cruzan la membrana a través de los canales y la corriente I_C debida a los iones que suben a través de la membrana para cargar o descargar su capacitancia eléctrica [12].

$$I_M = I_i + I_C = I_i + C_M \frac{dE}{dt} \quad (3.1)$$

Para realizar mediciones de la corriente iónica I_i , es conveniente aplicar cambios abruptos en el potencial de membrana E_M , estos cambios tienen la ventaja de que el cambio en el potencial de membrana dE_M/dt es cero (excepto al momento de la transición de un valor a otro). Entonces si el cambio de potencial de membrana es muy rápido, la corriente capacitiva I_C deja de fluir en el momento en que se completa el cambio en el potencial de membrana y a partir de ese momento, la corriente registrada en un experimento de *voltage-clamp*, corresponde únicamente a la corriente iónica I_i que fluye a través del canal. La mayor parte de la información que se tiene hoy en día acerca de los canales iónicos, proviene de estudios de la corriente iónica I_i . [12]

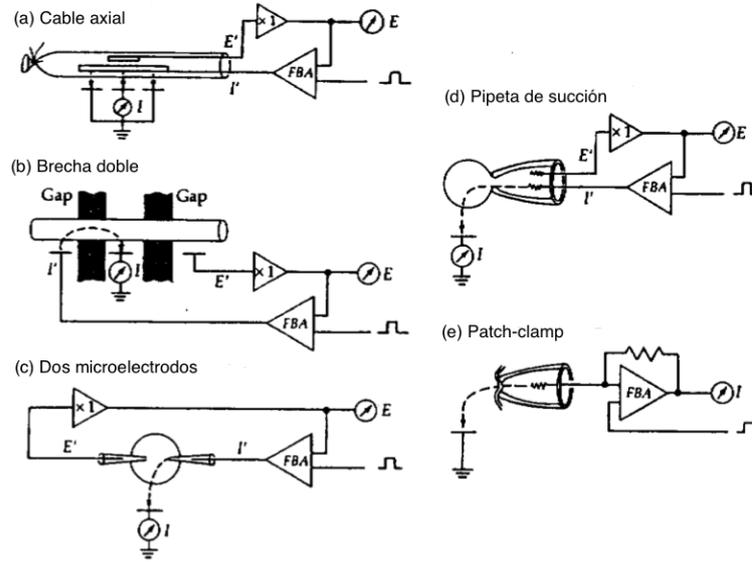


Figura 3.8: **Métodos de fijación de voltaje.** La mayoría de los métodos de *voltage-clamp* utilizan dos microelectrodos intracelulares, un electrodo para medir el potencial E' y uno para aplicar corriente I' . El electrodo de voltaje se conecta a un circuito de alta impedancia ($\times 1$), la salida de este circuito se registra en E y se compara con los pulsos de voltaje aplicado externamente, en el amplificador de retroalimentación (FBA). La diferencia amplificada de estas señales se aplica como una corriente (líneas punteadas) a través de la membrana por medio de I' , y hacia el electrodo del baño, donde puede ser registrada (I). (Figura adaptada de [2])

3.2.1. Técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch-clamp*)

La técnica de *patch clamp* permite detectar la corriente que fluye a través de uno o varios canales en la membrana de una célula. El objetivo de esta técnica es aislar eléctricamente un parche de membrana para registrar la corriente que fluye a través del parche. A diferencia de los experimentos de *voltage-clamp* convencionales, el patch-clamp utiliza un sólo electrodo para registrar las corrientes.

Los canales iónicos se pueden estudiar en sistemas de expresión nativos, es decir, en el tipo de células donde normalmente se expresan, o pueden ser clonados y expresados en sistemas de expresión heterólogos, i.e. en tipos celulares donde no se expresan normalmente. La ventaja de los sistemas de expresión heterólogos es que por lo general expresan pocos canales iónicos, lo que permite estudiar el canal de interés sin la contaminación de corrientes debidas a otros canales. Los sistemas más comunes para su expresión son las células HEK293 y los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

Al realizar un experimento de patch-clamp, las células se sumergen en una solución conductora, se presiona contra la membrana una micropipeta de vidrio pulida, previamente llenada con una solución conductora y se aspira ligeramente; formando así un sello en una pequeña región de la membrana con una resistencia mayor a $10\text{ G}\Omega$ (figura 3.9). Es de extrema importancia que la resistencia de los sellos sea alta para aislar efectivamente el parche de membrana celular, disminuyendo el ruido del registro, esto a su vez permite obtener una buena resolución temporal de corrientes, incluyendo las corrientes de canales individuales, cuya amplitud es del orden de 1 pA . [11]

Existen distintas configuraciones de patch-clamp, dependiendo de la forma en que la pipeta forme el sello con la membrana (Figura 3.2.1), estas se utilizan dependiendo de cual sea el propósito del experimento.

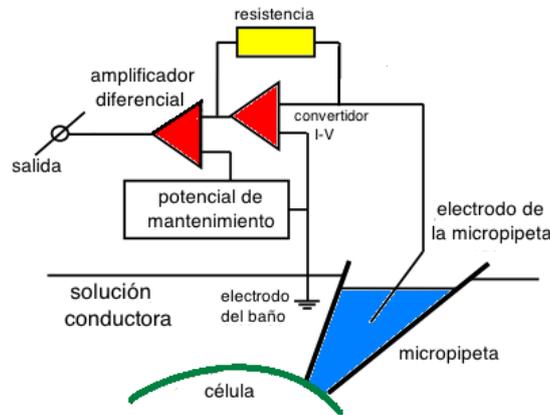


Figura 3.9: **Representación esquemática de un experimento de patch-clamp.** En un experimento de *patch-clamp* se mide el potencial de membrana V_m utilizando un electrodo. V_m es la diferencia de potencial entre el electrodo del baño (tierra) y el electrodo de la pipeta que está en contacto con una solución conductora que está en contacto con la membrana celular. Como en un experimento de *voltage-clamp* tradicional, se calcula la diferencia entre V_m y el potencial aplicado externamente para inyectar la corriente necesaria para igualar ambos potenciales. Sin embargo, en un experimento de *patch-clamp* se utiliza el mismo electrodo para inyectar esta corriente y para medir V_m , aumentando considerablemente la resolución de este experimento en comparación con un *voltage-clamp* de dos electrodos. (Figura adaptada de [5])

Utilizando la técnica de *patch-clamp* se pueden medir 3 tipos distintos de señales de un canal:

- **Corrientes iónicas macroscópicas:** Estas señales de corriente se registran en una membrana que contiene varios canales. Los canales se abren en respuesta al pulso de potencial produciendo una corriente iónica que puede ser registrada con una resolución temporal de unos cuantos microsegundos. Estos registros contienen información del curso temporal de la actividad del canal. La figura 3.11 muestra un registro de corriente iónica macroscópica de un parche de membrana que contiene varios cientos de canales de potasio *Shaker IR*, en este registro se observa un incremento repentino en la conductancia de los canales que ocurre en respuesta a un cambio positivo en el potencial de membrana (depolarización). Los potenciales más positivos no sólo aumentan la conductancia del estado estacionario, sino que también la velocidad con que se alcanza el valor final. [13]
- **Corrientes de compuerta:** Estas corrientes también son ocasionadas por un cambio en el potencial de membrana, pero tienen su origen en los reajustes de carga que acompañan a los cambios conformacionales en la proteína y se deben principalmente al movimiento del sensor de voltaje del canal. Las corrientes de compuerta son entre 3 y 4 órdenes de magnitud más pequeñas que sus correspondientes corrientes iónicas macroscópicas, por lo que son registradas en condiciones donde las corrientes iónicas macroscópicas son bloqueadas. Estas proporcionan información acerca de la velocidad a la que ocurren los cambios conformacionales de la proteína que producen desplazamiento de carga, independientemente de si estos cambios ocasionan que el poro se abra o no. [13]

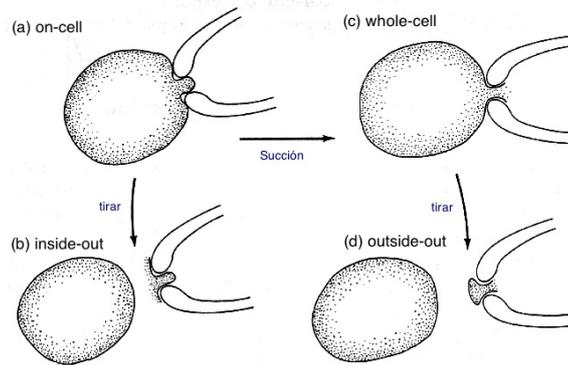


Figura 3.10: **Algunas configuraciones posibles de un experimento de Patch-Clamp.** (a) Configuración *on-cell* o *cell-attached*: En esta configuración, la micropipeta forma un sello en un parche de membrana manteniendo intacta a la célula. Esto permite el registro de corrientes en ese parche de membrana sin perturbar el interior de la célula. (b) Configuración *inside-out*: En esta configuración, después de que se forma el sello en la membrana, se retira cuidadosamente la micropipeta de la membrana, removiendo así el parche de membrana de la célula, exponiendo así la cara interna del parche a la solución externa. (c) Configuración *whole-cell*: Utilizando esta configuración se pueden obtener registros de la corriente que fluye a través de los canales presentes en la membrana de una célula completa. (d) Configuración *outside-out*: Después de que se forma un parche en la configuración de *whole-cell*, se puede retirar la pipeta de la célula permitiendo se forme un parche de membrana en la punta de la pipeta, pero con la cara exterior de la membrana en contacto con la solución externa.

- Registros de canal unitario:** Estos registros proporcionan información acerca del mecanismo responsable de los cambios de conductancia en el canal. Un canal unitario no muestra respuestas graduales a la repolarización, más bien parece cambiar instantáneamente (experimentalmente en menos de $10 \mu s$) entre los estados cerrado y abierto. Estos registros muestran las transiciones entre los estados abierto y cerrado del canal, pero no proveen información directa acerca de los cambios conformacionales que ocurren mientras el canal se encuentra cerrado. La figura 3.13 muestra un registro de canal unitario. [13]

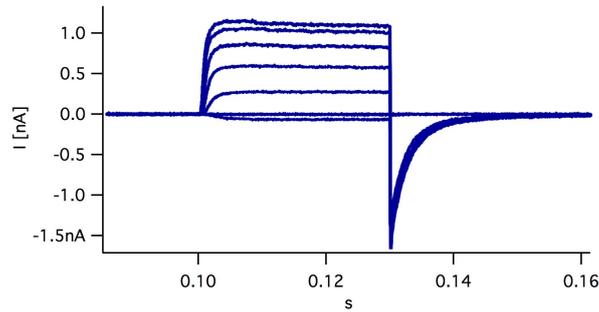


Figura 3.11: **Registro de la corriente iónica del canal *Shaker IR* en un parche de membrana con 892 canales.** Cada trazo representa la corriente iónica macroscópica que fluye a través del parche como respuesta a una despolarización de la membrana. Se mantiene el parche a un potencial de mantenimiento de -90mV por 10ms , posteriormente se le aplica una despolarización. Cada trazo del registro corresponde a un valor distinto de potencial aplicado, este varía entre -50mV a 70mV en incrementos de 20mV , para finalmente regresar al potencial de mantenimiento de -90mV .

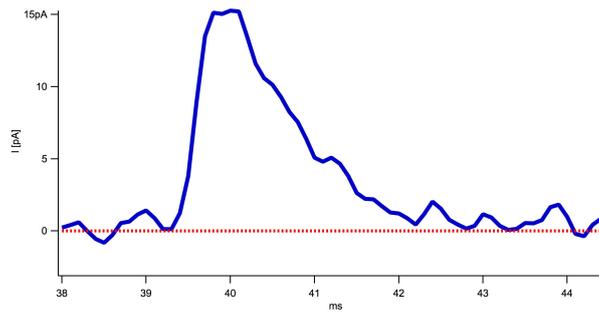


Figura 3.12: **Registro de corrientes de compuerta del canal *Shaker IR*** Inmediatamente después de aplicar un pulso, se observa un pico de corriente en estos registros que corresponde al reacomodo de carga inicial en el canal debido a que inicia su proceso de activación, una vez que el poro se abre, las corrientes de compuerta desaparecen, ya que no hay más reacomodos de carga en el canal. A partir de estos registros se puede calcular la carga que se mueve para que el canal se active, esta es la integral del trazo mostrado. En este canal corresponde a $13e_0$.



Figura 3.13: **Registro de canal unitario.** Registro de la apertura y el cierre de un canal de potasio en los linfocitos-T humanos. Cada incremento en la conductancia del registro corresponde a la apertura del canal. Se puede observar que el canal se abre y cierra de manera aleatoria. (Figura adaptada de [2])

En un experimento de *patch-clamp* es necesario filtrar la señal analógica de corriente antes de ser adquirida digitalmente para reducir el ruido de fondo en los registros. Adicionalmente, el diseño del amplificador de *patch-clamp* pone un límite a su respuesta en frecuencia, tal que la señal de salida pueda ser considerada una versión filtrada de la señal real de corriente de ancho de banda infinito. El filtro de Bessel es el más utilizado en los experimentos de *patch-clamp*, la respuesta característica de este filtro, se encuentra bien aproximada por la respuesta de un filtro Gaussiano. [14]

Un filtro Gaussiano tiene una función de respuesta, $B(f)$, de la forma:

$$B(f) = e^{-kf^2} \quad (3.2)$$

donde el valor de la constante k se escoje tal que se obtenga una atenuación de $3dB$ a la frecuencia de corte, f_c , i.e $|B(f_c)|^2 = 1/2$, resultando que $k = \ln(2)/2f_c^2$. Al sustituir el valor de k en la ecuación 3.2, se obtiene la función de respuesta en términos de la frecuencia de corte, f_c :

$$B(f) = \exp[-0,3466(f/f_c)^2] \quad (3.3)$$

La transformada inversa de la ecuación 3.2 da la respuesta al impulso del filtro. Debido a que la transformada de Fourier de una función Gaussiana es una función Gaussiana, la respuesta al impulso puede ser escrita como una distribución Gaussiana de probabilidad:

$$h(t) = \frac{1}{(2\pi)^{1/2}\sigma_g} \exp\left(\frac{-t^2}{2\sigma_g^2}\right) \quad (3.4)$$

donde la amplitud de la respuesta al impulso esta caracterizada por σ_g , que es una cantidad análoga a la desviación estandar de una distribución de probabilidad. El valor de σ_g debe ser inversamente proporcional a la frecuencia de corte⁴, f_c , y esta dado por:

$$\sigma_g = \frac{(\ln 2)^{1/2}}{2\pi f_c} \quad (3.5)$$

La función de respuesta de impulso puede ser escrita en términos de la frecuencia de corte como:

$$h(t) = 3,011f_c \exp[-(5,336f_c t)^2] \quad (3.6)$$

Mientras que la función de respuesta a un escalón es:

$$\begin{aligned} H(t) &= \frac{1}{2} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{1}{2^{1/2}\sigma_g} t \right) \right] \\ &= \frac{1}{2} \left[1 + \operatorname{erf} (5,336f_c t) \right] \end{aligned} \quad (3.7)$$

En un experimento de *patch-clamp* se utilizan dos filtros, por lo que es de especial interés conocer la frecuencia de respuesta de dos filtros Gaussianos en cascada. La frecuencia de corte efectiva de ambos filtros, f_c , es Gaussiana y esta dada por:

$$\frac{1}{f_c^2} = \frac{1}{f_{c1}^2} + \frac{1}{f_{c2}^2} \quad (3.8)$$

donde f_{c1} y f_{c2} son las frecuencias de cada filtro. Una vez conocida la frecuencia de corte efectiva, se puede estimar el ancho de banda final de un sistema de registro.

Otro parámetro descriptivo de un filtro es su tiempo de subida, T_r . De manera general, el tiempo de subida de un filtro es el tiempo necesario para que la salida de un filtro haga una transición, al aplicar un escalón de potencial a la entrada. Este tiempo corresponde a la mínima longitud de

⁴La frecuencia de corte es un límite en la respuesta en frecuencia de un filtro, a partir de la cual la energía que fluye en el sistema empieza a ser atenuada en vez de pasar por completo.

un pulso a la cual el filtro da una respuesta de amplitud casi completa [14]. Por definición T_r es igual al recíproco de la pendiente en el punto medio de la respuesta $H(t)$ a una entrada de escalón unitaria:

$$T_r = \left[\frac{dH(t)}{dt} \right]_{t=0}^{-1} \quad (3.9)$$

que esta dada por:

$$T_r = (2\pi)^{1/2} \sigma_g = 0,3321/f_c \quad (3.10)$$

muchas veces es conveniente utilizar T_r en lugar de f_c para especificar la cantidad de filtrado de la señal que se obtiene.

3.3. Modelo discreto de la apertura de un canal iónico

El conjunto de cambios conformacionales que dan origen a la apertura de un canal esta regulado por las interacciones entre las cargas del sensor de voltaje y el campo eléctrico transmembranal; por lo que cada cambio conformacional en la proteína se encuentra asociado a un desplazamiento de carga (movimiento del sensor de voltaje) en el canal.

La activación de un canal puede ser modelada como un movimiento de carga entre un número finito de estados discretos separados entre sí por medio de barreras energéticas (Figura 3.14). Las transiciones entre cada estado se consideran reversibles y se caracterizan por medio de constantes de velocidad como en una reacción química. Este tipo de modelo puede ser representado esquemáticamente en un diagrama de estados:



donde α_i ($i = 1, \dots, N$), son las constantes de velocidad asociadas al proceso de activación del canal, mientras que β_i ($i = 1, \dots, N$), son las constantes de velocidad que caracterizan la desactivación del canal. En la figura 3.13 se observa que la apertura ó cierre de un canal es aleatoria, por lo que las constantes de velocidad tienen una interpretación probabilística. Ambas constantes de velocidad representan probabilidades condicionales: α_i es una medida de la probabilidad de que un canal pase al estado i en un intervalo de tiempo Δt (dado que el canal se encontrara en el estado C_{i-1} al inicio de este período), mientras que β_i describe la probabilidad de que el canal pase al estado $i - 1$ (dado que el canal se encontrara en el estado C_i al inicio de este período). Las constantes de apertura sólo dependen de la probabilidad de que el canal se encuentre en el estado inmediato anterior, por lo que la activación del canal se puede describir como un proceso de Markov.

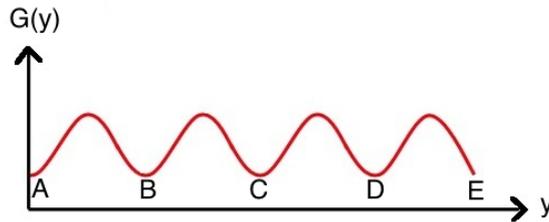


Figura 3.14: Curva de energía de un canal que atraviesa por varias conformaciones discretas. Las letras A,B,C... representan los estados discretos por los que pasa el canal durante su proceso de activación. La coordenada de reacción y indica la posición de una carga de compuerta, cuando esta cubre toda al longitud del canal, este se abre.

Análogamente a la teoría de cinética química, las constantes de velocidad de apertura y cierre del canal se obtienen de la ley de Arrhenius:

$$\alpha_i(V) = \alpha_i(0)e^{\Delta G/kt} \quad (3.11)$$

Donde $\alpha_i(0)$ es la constante de velocidad del canal a 0mV, esta constante depende de la altura de la barrera de energía que separa a ambos estados. [?]

El modelo más simple de un canal considera que el canal sólo puede tener dos estados: cerrado y abierto (Figura 3.15). [13]

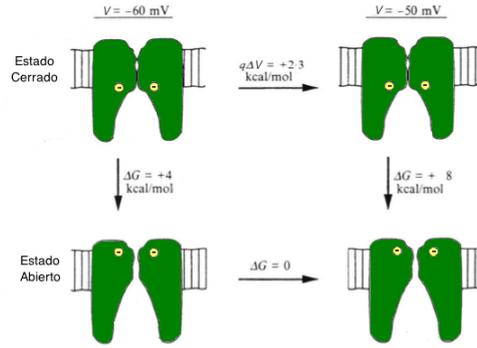


Figura 3.15: **Modelo de un canal iónico con dos estados.** En este modelo se supone que el canal sólo tiene dos estados: cerrado y abierto. El cambio conformacional mueve una carga de magnitud $q = 10e_0$ de la cara intracelular de la proteína donde el potencial $\phi = 0$ a la cara extracelular donde el potencial de membrana es $\phi = V_m$. (Figura adaptada de [13])

En este modelo, el potencial de membrana V_m influncia el equilibrio entre los dos estados del canal, mediante la posición de una carga q asociada al cambio conformacional de la proteína. Cuando el canal se encuentra cerrado, la carga se encuentra cerca de la superficie citoplásmica, donde siente un potencial $\phi = V_m$; mientras que cuando el canal se encuentra en el estado abierto, la carga se encuentra cerca de la superficie extracelular, donde $\phi = 0$. El resultado de esto es que la diferencia en energía libre entre el estado cerrado y el abierto es $\Delta G = G_o - G_c$, esta depende de V_m , de acuerdo a la relación :

$$\Delta G = G^o + qV_m \quad (3.12)$$

donde G^o es la energía libre cuando el potencial de membrana es cero [13]. La perturbación de la diferencia de energía libre para un cambio de potencial de ΔV_m es entonces:

$$\Delta\Delta G = q\Delta V_m \quad (3.13)$$

Para el caso que se muestra en la figura, el valor de q es de 10 cargas elementales. Esto resulta en un cambio de energía libre de $3kcal/mol$ inducido por el cambio en potencial de membrana de $10mV$. La razón de las probabilidades de ocupancia de los estados abierto y cerrado esta determinada por una ecuación análoga a (2.1), donde la diferencia de energía entre los dos estados es en este caso su diferencia de energías libres:

$$\frac{p_o}{p_c} = e^{\frac{-\Delta G}{k_B T}} \quad (3.14)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. De esta razón de probabilidades se puede obtener la expresión para la probabilidad de que el canal de encuentre en el estado abierto (utilizando la propiedad de que $p_o + p_c = 1$):

$$p_o = \frac{1}{1 + e^{(\Delta G/k_B T)}} \quad (3.15)$$

En el ejemplo de la figura 3.15, los valores de ΔG de 4 y $8kcal/mol$ corresponden a probabilidades de apertura de 10^{-3} y 0,05. Entonces, un cambio de $10mV$ en el potencial de membrana resulta en un aumento de 50 veces la probabilidad de apertura del canal.

Si ahora se considera un caso más general donde un canal puede existir en n conformaciones (estados) discretas. La probabilidad en equilibrio de la ocupancia de cualquier estado κ esta dada por la ecuación:

$$p_{\kappa} = \frac{e^{-G_{\kappa}(V)/k_B T}}{\sum_{\lambda=1}^n e^{-G_{\lambda}(V)/k_B T}} \quad (3.16)$$

donde G_{λ} es la energía libre del canal y el parche de membrana que lo rodea, dado que el canal se encuentra en un estado λ . La dependencia de la energía libre en V_m puede ser escrita como:

$$G_{\lambda}(V_m) = G_{\lambda}(o) + Q_{\lambda}V_m + \frac{1}{2}P_{\lambda}V_m^2 \quad (3.17)$$

mas términos de orden mayor en V_m cuya contribución a la energía es mínima, por lo que no se toman en cuenta. La cantidad Q_{λ} tiene dimensiones de carga y se obtiene como la suma pesada sobre todas las cargas q_i en el sistema:

$$Q_{\lambda} = \sum_i q_i \delta_{i\lambda} \quad (3.18)$$

donde $\delta_{i\lambda}$ representa en grado de acoplamiento ente V_m y el potencial local ϕ_i sentido en el estado λ por la i -ésima carga,

$$\delta_{i\lambda} = \left. \frac{\partial \phi_i(\lambda, V_m)}{\partial V_m} \right|_{V_m=0} \quad (3.19)$$

a esta cantidad se le conoce como distancia eléctrica a lo largo de la membrana, ya que esta relacionada con la posición de la carga con respecto a la caída de potencial en la membrana. Por ejemplo, si una carga esta localizada cerca de la superficie extracelular de la membrana en el estado λ , tendrá una $\delta_{i\lambda}$ cercana a uno, ya que por convención el potencial en la solución intracelular es igual a V_m ; mientras que si la carga se localiza cerca de la superficie intracelular, $\delta_{i\lambda}$ será cercana a cero. Q_{λ} es entonces una medida de la carga efectiva total que interactúa con el potencial de membrana. [13]

La cantidad P_{λ} en la ecuación 3.17 tiene dimensiones de capacitancia y representa la polarizabilidad del sistema, al moverse la carga en respuesta a los cambios en V_m . Esta cantidad es empírica y tiene la forma:

$$P_{\lambda} = \sum_i q_i \xi_{i\lambda} \quad (3.20)$$

donde la i -ésima carga en el estado λ esta dada por:

$$\xi_{i\lambda} = \left. \frac{\partial^2 \phi_i(\lambda, V_m)}{\partial V_m^2} \right|_{V_m=0} \quad (3.21)$$

Las constantes de velocidad del canal se pueden calcular sustituyendo la expresión para la energía libre (3.17), despreciando los términos no lineales en V_m , que hasta el momento se piensa que tienen una contribución muy pequeña, a pesar de no ser así, como se demostrará más adelante. Para un canal dependiente en el voltaje, las constantes de velocidad dependen exponencialmente del potencial de membrana V , escalado por las cargas parciales $q_{\alpha i}$, $q_{\beta i}$ que se mueven en cada transición:

$$\begin{aligned} \alpha_i(V) &= \alpha_i(0)e^{q_{\alpha i}V/k_B T} \\ \beta_i(V) &= \beta_i(0)e^{q_{\beta i}V/k_B T} \end{aligned} \quad (3.22)$$

Los modelos de Markov para el mecanismo de apertura de un canal han tenido mucho éxito ya que son modelos muy robustos, con suficiente flexibilidad y parámetros ajustables como para describir casi cualquier cinética. El mayor problema de estos modelos no es encontrar un modelo que funcione, sino uno que este delimitado en varias formas por los datos experimentales, para que refleje correctamente el mecanismo de activación de los canales. Ya que muchas veces se necesita de muchos estados para describir la cinética de un canal, esto presenta un problema conceptual importante ya que un número tan grande de conformaciones discretas es poco probable desde un punto de vista físico.

3.4. Medición experimental de la cinética de un canal

La técnica de *voltage-clamp*, en particular el *patch-clamp*, ha sido la técnica biofísica más utilizada para el estudio de canales iónicos. Esto se debe a que se permite fijar el potencial de membrana y obtener registros del curso temporal de las corrientes de un canal (ver figuras 3.12, 3.11, 3.13).

De acuerdo a lo discutido en la sección 3.3, la apertura de un canal puede ser descrita por medio de una serie de estados discretos que representan cambios conformacionales en la proteína. La cinética de las transiciones entre estados esta descrita por las constantes de velocidad asociadas a cada uno. Para un modelo de Markov, las constantes de velocidad de cada estado son funciones exponenciales de la forma (3.22), donde se toma como diferencia de energía entre dos estados la diferencia de energía libre dada por la expresión (3.17).

Experimentalmente los cambios conformacionales en un canal pueden ser caracterizados por medio del análisis de registros de corrientes de compuerta y corrientes iónicas macroscópicas. En particular, se pueden obtener estimados de las constantes de velocidad de apertura y cierre del canal ajustando funciones exponenciales de la forma (3.22) a registros de corrientes iónicas macroscópicas. [?] [16]

Para poder estimar a que estado del canal corresponde cada constante de velocidad medida en un experimento, se utilizan protocolos de potencial que incorporan prepulsos (ver figura 3.16). La activación de un canal no es instantanea, entonces si se aplica un prepulso de potencial con una duración menor al tiempo requerido para la activación del canal, al final del pulso, el canal se encontrará en un estado intermedio entre el cerrado y el abierto. Los prepulsos tienen la función de activar o desactivar los canales; dependiendo de la duración y la amplitud de los prepulsos al final de cada uno el canal se encontrará en distintas distribuciones de estados. Los registros de corriente, obtenidos utilizando protocolos con prepulsos, reflejan la cinética del canal para distintos subconjuntos de transiciones. [?]

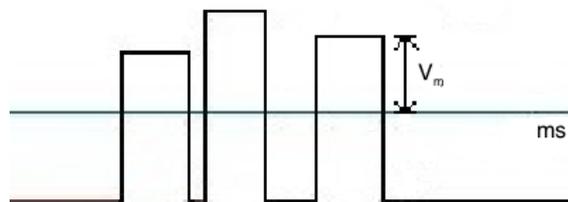


Figura 3.16: **Representación esquemática de un protocolo de potencial compuesto por tres pulsos.** En este protocolo se aplican 3 pulsos de potencial positivo se parados por dos pulsos de potencial negativo. Dependiendo de la duración de los pulsos, el canal se encontrará en distintas distribuciones de estados después de aplicar los primeros dos pulsos de potencial despolarizante.

No se conoce con exactitud el número de estados por lo que atraviesa el canal en su proceso de activación, por ello es difícil aislar una transición intermedia entre el estado abierto y el cerrado. Muchas veces las constantes de velocidad medidas utilizando un protocolo de prepulsos son una mezcla de la cinética de varios estados del canal. A pesar de que experimentalmente es difícil aislar transiciones intermedias en el proceso de apertura del canal, se pueden obtener mediciones confiables de la constante de velocidad de apertura de la última transición del canal, utilizando un protocolo de potencial con una doble despolarización, este procedimiento se explicará en detalle en la sección de resultados (7.1).

Existen otros métodos para aislar las distintas transiciones del canal, estos incorporan técnicas de biología molecular para crear mutantes en las que se puede discriminar más fácilmente entre cada transición del canal, ya que algunas se alentan o se vuelven más rápidas (ver referencia [16]), sin embargo, si lo que se busca es medir las constantes de velocidad de la última transición un protocolo de doble pulso es suficiente. [16]

Capítulo 4

Movimiento Browniano

A pesar de que los modelos de Markov para la activación de un canal han probado ser de gran utilidad, estos poseen la desventaja de ser modelos empíricos, donde el número de estados por los que tiene que pasar el canal para su activación carece de significado físico claro. Adicionalmente, al utilizar un modelo de Markov, por lo general las constantes de velocidad que determinan la cinética del canal son obtenidas utilizando la ley empírica de *Arrhenius*.

En esta tesis se utiliza un modelo para la activación de un canal basado en la teoría de difusión de *Kramers* para reacciones químicas (ver referencia [21]), similar al propuesto por *Sigg et al* en [17]. Este modelo tiene la ventaja de proporcionar una descripción más realista, desde un punto de vista físico, del mecanismo de apertura de un canal ya que considera explícitamente cada una de las fuerzas que determinan la cinética de apertura del canal.

En este modelo se propone que la cinética de activación del canal, es equivalente al movimiento Browniano de una partícula de compuerta que se difunde en una dimensión pasando por un conjunto de barreras de potencial, donde cada barrera energética representa la energía que la partícula de compuerta tiene que vencer para pasar al siguiente estado en la ruta de activación del canal. El tiempo medio de salida de la partícula de compuerta de cada barrera de energía, describe la rapidez con que ocurren los cambios conformacionales en el canal. [17]

4.1. Movimiento Browniano en ausencia de una fuerza externa

Para poder caracterizar de una manera clásica la difusión de una partícula de masa m inmersa en un fluido es necesario describir en detalle todas sus interacciones con las moléculas de fluido que la rodean. El movimiento de la partícula y las moléculas que la rodean, estará descrito por un conjunto de ecuaciones de movimiento de Newton:

$$m_i \frac{d^2}{dt^2} r_i = - \frac{\partial}{\partial r_i} V(r_1, \dots, r_N) \quad (4.1)$$

donde r_i describe la posición de cada átomo ó de la partícula en todos los instantes instante de tiempo. Para resolver este problema de manera exacta, se debe encontrar la solución del sistema de ecuaciones de movimiento acopladas 4.1 para todas las moléculas en el fluido y para la partícula en difusión. Debido al gran número de moléculas en el fluido, en general no se puede resolver este sistema de ecuaciones acopladas. Además, como no se conocen los valores iniciales de las velocidades y posiciones de todas las moléculas en el fluido, no se puede calcular de manera exacta el movimiento de una partícula pequeña inmersa en dicho fluido. [?]

Debido a que la difusión es un proceso en el que pocos grados de libertad de la molécula son

relevantes, se puede formular una ecuación del tipo 4.1, pero considerando solamente los campos de fuerza efectivos que afectan el movimiento de una partícula.[?]

Una partícula pequeña de masa m inmersa en un fluido se encuentra sujeta a una fuerza de fricción, F_c , proveniente de sus interacciones hidrodinámicas con las moléculas que la rodean. La expresión más simple para F_c esta dada por la ley de Stokes $F_c = -\alpha v$.

Además de la fuerza de fricción, al escribir la ecuación de movimiento de la partícula en difusión, es necesario considerar que la velocidad de la partícula es afectada por sus choques con las demás moléculas en el fluido. Esto se logra introduciendo una fuerza que fluctua aleatoriamente $F_f(t)$ que modifica el movimiento de la partícula. [?]

Entonces, la fuerza total que actúa sobre una partícula en difusión, $F(t)$, esta compuesta por una fuerza de amortiguamiento continua $F_c(t)$, dada por la ley de Stokes, y una fuerza estocástica $F_f(t)$, cuyas propiedades sólo pueden ser descritas en promedio.

$$F(t) = F_c(t) + F_f(t) = -\alpha v(t) + F_f(t) \quad (4.2)$$

De acuerdo a lo anterior, la ecuación de movimiento correspondiente a una partícula en difusión en ausencia de una fuerza externa es:

$$\dot{v} + \gamma v = \Gamma(t) \quad (4.3)$$

donde se ha introducido la fuerza estocástica por unidad de masa $\Gamma(t) = F_f(t)/m$ y la constante de fricción viscosa por unidad de masa $\gamma = \alpha/m = 1/\tau$. La ecuación (4.3) es la ecuación de Langevin para el movimiento Browniano en una dimensión en ausencia de una fuerza externa. A la fuerza $\Gamma(t)$ se le conoce como fuerza de Langevin, y tiene las siguientes propiedades:

$$\begin{aligned} \langle \Gamma(t) \rangle &= q\delta(t - t') \\ \langle \Gamma(t)\Gamma(t') \rangle &= 0 \quad \text{para } |t-t'| \geq \tau_0 \end{aligned} \quad (4.4)$$

En la ecuación anterior q es una constante que corresponde a la magnitud de la fuerza de Langevin, la función delta aparece debido a que de otra manera la energía de la pequeña partícula no sería finita y estaría en desacuerdo con el teorema de equipartición de la energía. Si se multiplican dos fuerzas de Langevin a tiempos distintos, se asume que el valor promedio para diferencias de tiempo $t - t'$ mas largas que τ_0 (la duración de una colision entre la partícula Browniana y una molécula del fluido que la rodea) es cero. Esta suposición es razonable ya que las colisiones de distintas moléculas del fluido con la partícula Browniana, son aproximadamente independientes. [19]

Para la condición inicial $v(0) = v_0$, la solución de la ecuación de movimiento (4.3) es:

$$v(t) = v_0 e^{-\gamma t} + \int_0^t e^{-\gamma(t-t')} \Gamma(t') dt' \quad (4.5)$$

Y utilizando las propiedades de la fuerza de Langevin (4.4), se obtiene que la siguiente función de correlación para la velocidad de la partícula:

$$\begin{aligned} \langle v(t_1)v(t_2) \rangle &= v_0^2 e^{-\gamma(t_1+t_2)} + \int_0^{t_1} \int_0^{t_2} e^{-\gamma(t_1+t_2-t'_1-t'_2)} q\delta(t'_1 - t'_2) dt'_1 dt'_2 \\ &= v_0^2 e^{-\gamma(t_1+t_2)} + \frac{q}{2\gamma} (e^{-\gamma|t_1-t_2|} - e^{-\gamma(t_1+t_2)}) \end{aligned} \quad (4.6)$$

En el límite donde t_1 y t_2 son muy grandes (i.e. $\gamma t_1 \gg 1, \gamma t_2 \gg 1$), la función de correlación para la velocidad es independiente de la velocidad inicial v_0 y sólo depende de la diferencia de tiempos $t_1 - t_2$:

$$\langle v(t_1)v(t_2) \rangle = \frac{q}{2\gamma} e^{-\gamma|t_1-t_2|} \quad (4.7)$$

Entonces en el estado estacionario, la energía promedio de una partícula en movimiento Browniano es:

$$\langle E \rangle = \frac{1}{2}m\langle [v(t)]^2 \rangle = \frac{1}{2}m\frac{q}{2\gamma} \quad (4.8)$$

La constante q se determina de tal manera que la energía promedio de la partícula este dada por el teorema de equipartición $\langle E \rangle = \frac{1}{2}k_B T$, para que esto suceda q debe ser:

$$q = 2\gamma k_B T / m \quad (4.9)$$

Experimentalmente es difícil medir la velocidad promedio de una partícula Browniana (ecuación (4.7)), sin embargo es relativamente sencillo medir el valor medio de su desplazamiento. Si se asume que la partícula comienza a moverse al tiempo $t = 0$ en el punto $x = x_0$ con velocidad $v = v_0$, el valor promedio al cuadrado de su desplazamiento al tiempo t , esta dado por:

$$\begin{aligned} \langle (x(t) - x_0)^2 \rangle &= \left\langle \left[\int_0^t v(t_1) dt_1 \right]^2 \right\rangle = \left\langle \int_0^t v(t_1) dt_1 \int_0^t v(t_2) dt_2 \right\rangle \\ &= \int_0^t \int_0^t \langle v(t_1)v(t_2) \rangle dt_1 dt_2 \end{aligned} \quad (4.10)$$

Al sustituir el valor de la función de correlación (ecuación (4.7)) en la expresión anterior se obtiene:

$$\langle (x(t) - x_0)^2 \rangle = v_0^2 \int_0^t \int_0^t e^{-\gamma(t_1+t_2)} dt_1 dt_2 + \frac{q}{2\gamma} \int_0^t \int_0^t e^{-\gamma|t_1+t_2|} - e^{-\gamma(t_1+t_2)} dt_1 dt_2 \quad (4.11)$$

El valor de las integrales en la ecuación anterior es:

$$\begin{aligned} \int_0^t \int_0^t e^{-\gamma(t_1+t_2)} dt_1 dt_2 &= \left(\frac{1 - e^{-\gamma t}}{\gamma} \right)^2 \\ \int_0^t \int_0^t e^{-\gamma|t_1+t_2|} dt_1 dt_2 &= 2 \int_0^t dt_1 \int_0^t e^{-\gamma(t_1-t_2)} dt_2 = \frac{2}{\gamma} t - \frac{2}{\gamma^2} (1 - e^{-\gamma t}) \end{aligned} \quad (4.12)$$

Finalmente se obtiene que el valor del desplazamiento medio al cuadrado de la partícula es:

$$\langle (x(t) - x_0)^2 \rangle = \left(v_0^2 - \frac{q}{2\gamma} \right) \frac{(1 - e^{-\gamma t})^2}{\gamma^2} + \frac{q}{\gamma^2} t - \frac{q}{\gamma^3} (1 - e^{-\gamma t}) \quad (4.13)$$

Si en lugar de tener una velocidad inicial determinada v_0 , se tiene como velocidad inicial la distribución de velocidades para el estado estacionario (ecuación (4.7)), el promedio del cuadrado de la velocidad será $\langle v_0 \rangle^2 = q/(2\gamma)$. Esto dará como resultado que el primer término de la ecuación (4.13) desaparezca. En ambos casos, para valores grandes de t ($\gamma t \gg 1$), el valor promedio del desplazamiento al cuadrado de la partícula Browniana es:

$$\langle (x(t) - x_0)^2 \rangle = 2Dt \quad (4.14)$$

donde:

$$D = \frac{q}{2\gamma^2} = \frac{kT}{m\gamma} \quad (4.15)$$

es el coeficiente de difusión obtenido por Einstein. [19]

4.2. Movimiento Browniano en presencia de una fuerza externa (Aproximación de Smoluchowski)

Una partícula Browniana sumergida en un fluido y sujeta a la influencia de una fuerza externa, $F(x) = F_e(x)/m$ puede ser descrita por la ecuación de Langevin similar a la ecuación (4.3):

$$\ddot{x} = -\gamma\dot{x} - \phi'(x) + \Gamma(t) \quad (4.16)$$

donde $\Gamma(t)$ es la fuerza de Langevin por unidad de masa, γ es la constante de fricción viscosa por unidad de masa y $\phi'(x)$ es el campo de potencial correspondiente a $F(x)$.

Si se conoce la ecuación de Langevin correspondiente a un sistema, se puede escribir de manera inmediata la ecuación de Fokker-Planck (F-P) que describe la probabilidad de encontrar a la partícula en una posición determinada en un instante de tiempo fijo (ver apéndice B). Los coeficientes de arrastre y difusión de dicha ecuación, pueden ser determinados a partir de la ecuación de Langevin (4.16), utilizando las expresiones (B.67) [19]. Para el caso de una partícula Browniana bajo la acción de un potencial externo, $\phi(x)$, (ecuación (4.16)) estos coeficientes son:

$$\begin{aligned} D_v^{(1)} &= -\gamma v - \phi'(x); & D_{vv}^{(2)} &= \gamma k_B T / m \\ D_x^{(1)} &= v; & D_{xx}^{(2)} &= D_{xv}^{(2)} = 0 \end{aligned} \quad (4.17)$$

Dando una ecuación de F-P de la forma:

$$\frac{\partial W(x, v, t)}{\partial t} = \left\{ -\frac{\partial}{\partial x} v + \frac{\partial}{\partial v} [\gamma v + \phi'(x)] + \frac{\gamma k_B T}{m} \frac{\partial^2}{\partial v^2} \right\} W(x, v, t) \quad (4.18)$$

Como en la sección anterior, es razonable suponer que la fuerza de fricción tiene un efecto mucho mayor en el movimiento de la partícula que la inercia. Entonces, para constantes de fricción γ suficientemente grandes, se puede despreciar el término inercial en la ecuación (4.16). En este límite la ecuación de Langevin para el sistema es:

$$\dot{x} = -\phi'(x)/(m\gamma) + \Gamma(t)/\gamma \quad (4.19)$$

y su ecuación de F-P correspondiente es:

$$\frac{\partial W}{\partial t} = \frac{1}{m\gamma} \left[\frac{\partial}{\partial x} \phi'(x) + k_B T \frac{\partial^2}{\partial x^2} \right] W \quad (4.20)$$

A la ecuación (4.20) se le conoce como ecuación de Smoluchowski. [20]

4.2.1. Tiempo medio de salida

En esta sección se considera una partícula Browniana bajo la acción de un potencial externo $\phi(x)$ (ecuaciones 4.16, 4.18, 4.20), atrapada en un pozo de potencial como el que se muestra en la figura 4.1. [21] [22]

Se supone que este sistema tiene dos estados estables, a y b . Ya que la partícula se encuentra bajo la acción de una fuerza estocástica, cada uno de los estados tendrá un tiempo de vida finito. Más específicamente, una partícula que se encuentra en el estado a , fluctuará alrededor de ese estado y cruzará la barrera de potencial que separa a a y b en un tiempo finito τ , a este tiempo se le conoce como tiempo medio de salida. La probabilidad por unidad de tiempo de que la partícula cruce la barrera de potencial en el tiempo τ es:

$$\alpha = \frac{1}{2\langle\tau\rangle} \quad (4.21)$$

Lo que se busca ahora es calcular τ para obtener la probabilidad por unidad de tiempo, de que la partícula salte la barrera.

De acuerdo a la ecuación se puede definir una ecuación de continuidad para la corriente de probabilidad S como:

$$S(x, t) = \left[D^{(1)}(x, t) - \frac{\partial}{\partial x} D^{(2)}(x, t) \right] W(x, t) \quad (4.22)$$

Esta corriente de probabilidad describe el flujo de la función de densidad de probabilidad $W(x, t)$. La función de densidad de probabilidad asociada al movimiento Browniano describe la probabilidad

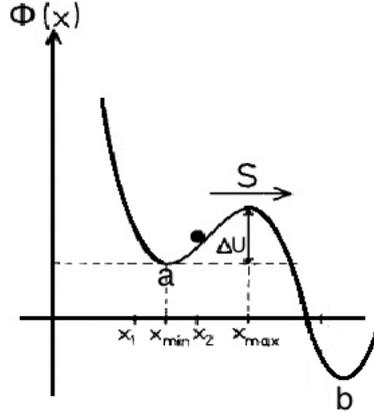


Figura 4.1: **Partícula Browniana atrapada en un pozo de potencial.** ΔU representa la altura de la barrera energética. La partícula tiene dos estados estables estáticos, a y b ($v = 0$, $\phi'(x) = 0$). En el mínimo de la barrera de potencial, x_{min} , la partícula se encuentra en un estado estable estático, no obstante se mueve alrededor de x_{min} debido a las fluctuaciones térmicas del sistema.

de encontrar una partícula en una posición determinada en un tiempo dado. Entonces para este caso, la expresión para la corriente de probabilidad es:

$$-De^{-U(x)/D} \frac{\partial}{\partial x} [e^{U(x)/D} W(x, t)] = S \quad (4.23)$$

Utilizando la ecuación (4.23) se puede calcular la tasa de escape, α , de partículas que se encuentran en un pozo de potencial profundo cerca de $x = x_{min}$ (Ver figura 4.1) [20]. Al integrar la ecuación 4.23 entre x_{min} y A se obtiene:

$$D[e^{U(x_{min})/D} W(x_{min}, t) - e^{U(A)/D} W(A, t)] = S \int_{x_{min}}^A e^{U(x)/D} dx; \quad (4.24)$$

Si la barrera de potencial es alta, la función de distribución cerca de x_{min} estará dada por la función de distribución del estado estacionario:

$$W(x, t) = W(x_{min}, t) e^{[U(x) - U(x_{min})]/D} \quad (4.25)$$

La probabilidad, p , de encontrar la partícula cerca de x_{min} es:

$$p = \int_{x_1}^{x_2} W(x, t) dx = W(x_{min}, t) e^{U(x_{min})/D} \int_{x_1}^{x_2} e^{-U(x)/D} dx \quad (4.26)$$

Ya que para valores pequeños de D , la densidad de probabilidad (4.25) se vuelve muy pequeña para valores distintos de x_{min} , los valores de x_1 y x_2 no necesitan especificarse. Por definición, la probabilidad de encontrar una partícula cerca de x_1 multiplicada por α es igual a la corriente de probabilidad S . Entonces, combinando las ecuaciones (4.26) y (4.23), se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{1}{r} \equiv \frac{p}{S} = \frac{1}{D} \int_{x_1}^{x_2} e^{-U(x)/D} dx \int_{x_{min}}^A e^{U(x)/D} dx \quad (4.27)$$

En la ecuación 4.27, la contribución principal a la primera integral proviene de la región alrededor de x_{min} , mientras que la contribución principal de la segunda integral proviene de la región

alrededor de x_{max} . Entonces se desarrolla $U(x)$ para la primera y segunda integral de acuerdo a:

$$\begin{aligned}
 U(x) &\approx U(x_{min}) + \frac{1}{2}U''(x_{min})(x - x_{min})^2 \\
 U(x) &\approx U(x_{min}) - \frac{1}{2}|U''(x_{min})|(x - x_{max})^2
 \end{aligned}
 \tag{4.28}$$

Luego se pueden tender los límites de integración de ambas integrales a $\pm\infty$ obteniéndose se así las constantes de velocidad de Kramers:

$$\alpha = \frac{1}{2\pi} \sqrt{U''(x_{min})|U''(x_{max})|} e^{-[U(x_{max})-U(x_{min})]/D}
 \tag{4.29}$$

Capítulo 5

Electrostática en medios dieléctricos

Como ya se explicó en el capítulo 1, la activación de un canal es el resultado directo de los cambios en el potencial de membrana V_m . A primera aproximación se puede considerar que al aplicar un potencial eléctrico en la membrana celular, este producirá un campo eléctrico uniforme en toda la membrana, específicamente a lo largo de las proteínas de canal. Sin embargo, en la sección 3.1 se estableció que los canales se componen de distintos aminoácidos cargados, en particular, la región del canal responsable de detectar los cambios en V_m , contiene varias cargas. Un modelo con más detalle de las interacciones de la proteína con el potencial de membrana, debe considerar su polarización eléctrica. Por esta razón es importante conocer el comportamiento cuantitativo del campo eléctrico en un medio material.

El comportamiento del campo eléctrico en un medio se puede estudiar de manera simplificada considerando dos tipos de materiales: conductores y aislantes ó dieléctricos. Los conductores son materiales que contienen cargas móviles, por lo que tienen una baja resistencia al flujo de corriente eléctrica. En contraste, los dieléctricos tienen una alta resistencia al flujo de corriente, esto se debe a que todas las cargas del material están unidas a átomos o moléculas, y sólo pueden desplazarse dentro de estos. Los desplazamientos son microscópicos por lo que individualmente no tienen efecto alguno en el reacomodo de la carga en el material, pero sus efectos acumulados producen el comportamiento macroscópico que se observa en los dieléctricos. Debido a su estructura y composición se puede considerar que un canal iónico se encuentra compuesto de un material dieléctrico, en las siguientes secciones se discutirá acerca de este comportamiento de este tipo de materiales.

5.1. Dipolos inducidos

Los átomos son entidades eléctricamente neutras, pero bajo la influencia de un campo eléctrico las regiones cargadas del átomo (el núcleo y la nube de electrones) se desplazan. El campo eléctrico ejerce una fuerza que ocasiona que el núcleo se mueva en la misma dirección del campo eléctrico, mientras que la nube de electrones se mueve en dirección opuesta. Si el campo eléctrico es lo suficientemente fuerte, puede separar el átomo, ionizándolo; pero con campos de menor intensidad se establece un equilibrio rápidamente, ya que las fuerzas que tratan de separar al átomo se balancean por medio de la atracción del núcleo y los electrones. El resultado final es que las cargas positiva y negativa quedan desplazadas en una dirección opuestas, dejando al átomo polarizado. El átomo adquiere un momento dipolar $\mathbf{p} = q\mathbf{d}$ que apunta en la dirección del campo eléctrico \mathbf{E} y es proporcional a la separación \mathbf{d} , de las cargas positiva y la negativa. El momento dipolar inducido es proporcional al campo (siempre que el campo no sea muy fuerte):

$$\mathbf{p} = \alpha\mathbf{E} \tag{5.1}$$

A la constante de proporcionalidad α se le conoce como polarizabilidad atómica y su valor depende de la estructura específica de cada átomo.

Calcular el momento dipolar de una molécula \mathbf{p} , no es tan simple como en un átomo, ya que frecuentemente tienen una polarización no uniforme que depende de la dirección en que se aplique el campo eléctrico externo. Por lo anterior es importante especificar el ángulo del campo eléctrico con respecto al eje de la molécula, para poder calcular \mathbf{p} en todas las direcciones de la molécula:

$$\mathbf{p} = \alpha_{\perp} \mathbf{E}_{\perp} + \alpha_{\parallel} \mathbf{E}_{\parallel} \quad (5.2)$$

El caso anterior considera una molécula relativamente simple con un eje de simetría, pero en el caso de una molécula completamente asimétrica, la ecuación 5.2 se convierte en:

$$\begin{aligned} p_x &= \alpha_{xx} E_x + \alpha_{xy} E_y + \alpha_{xz} E_z \\ p_y &= \alpha_{yx} E_x + \alpha_{yy} E_y + \alpha_{yz} E_z \\ p_z &= \alpha_{zx} E_x + \alpha_{zy} E_y + \alpha_{zz} E_z \end{aligned} \quad (5.3)$$

El conjunto de las constantes α_{ij} constituye el tensor de polarizabilidad de la molécula, su valor depende de la orientación de los ejes del sistema de referencia que se escoja, pero siempre es posible escoger ejes principales tales que los componentes fuera de la diagonal desaparezcan, caracterizando la polarizabilidad sólo por tres constantes $\alpha_{xx}, \alpha_{yy}, \alpha_{zz}$.

5.2. Moléculas polares

En la sección anterior se consideró el comportamiento de moléculas que se polarizan en presencia de un campo eléctrico, pero también existen moléculas con momentos dipolares permanentes, a estas últimas se les conoce como moléculas polares.

Al introducir una molécula polar en un campo eléctrico uniforme, esta siente una fuerza en su extremo positivo $\mathbf{F}_+ = q\mathbf{E}$ que balancea a la fuerza que siente en su extremo negativo $\mathbf{F}_- = -q\mathbf{E}$, a pesar de que las fuerzas se cancelan el campo eléctrico inducirá una torca en la molécula:

$$\begin{aligned} \mathbf{N} &= (\mathbf{r}_+ \times \mathbf{F}_+) + (\mathbf{r}_- \times \mathbf{F}_-) \\ &= [(\mathbf{d}/2) \times (q\mathbf{E})] + [(-\mathbf{d}/2) \times (-q\mathbf{E})] = q\mathbf{d} \times \mathbf{E} \end{aligned} \quad (5.4)$$

De manera general un dipolo $\mathbf{p} = q\mathbf{d}$ siente una torca en presencia de un campo eléctrico uniforme \mathbf{E} dada por:

$$\mathbf{N} = \mathbf{p} \times \mathbf{E} \quad (5.5)$$

La ecuación 5.5 describe la torca que siente un dipolo de longitud infinitesimal alrededor de su centro, pero si se quiere calcular la torca alrededor de cualquier otro punto en la molécula, se tiene que emplear la ecuación:

$$\mathbf{N} = (\mathbf{p} \times \mathbf{E}) + (\mathbf{r} \times \mathbf{F}) \quad (5.6)$$

Si el campo eléctrico no es uniforme además de una torca, el campo eléctrico ejercerá una fuerza neta sobre el dipolo, dada por:

$$\mathbf{F} = \mathbf{F}_+ + \mathbf{F}_- = q(\mathbf{E}_+ - \mathbf{E}_-) = q(\Delta\mathbf{E}) \quad (5.7)$$

donde $\Delta\mathbf{E}$ representa la diferencia entre el campo eléctrico de las partes positiva y negativa de la molécula. Asumiendo que el dipolo es corto, podemos aproximar el cambio en E_x como:

$$\Delta E_x \equiv (\nabla E_x) \cdot \mathbf{d}$$

en general:

$$\Delta\mathbf{E} \equiv (\mathbf{d} \cdot \nabla)\mathbf{E}$$

por lo que finalmente la fuerza que siente la molécula debido al campo eléctrico no uniforme esta dada por:

$$\mathbf{F} = (\mathbf{p} \cdot \nabla)\mathbf{E} \quad (5.8)$$

5.3. Polarización

Al aplicar un campo eléctrico externo a un material dieléctrico, este induce un momento dipolar o una torca en las moléculas ó átomos que componen el material, ocasionando que este se polarice. La polarización es una medida de que tan polarizado se encuentra un material:

$$\mathbf{P} \equiv \text{momento dipolar por unidad de volumen} \quad (5.9)$$

Debido a que un campo eléctrico aplicado a un material dieléctrico le induce una carga en forma de dipolos, es necesario conocer el campo eléctrico generado por esta distribución de cargas inducidas. Para esto se puede calcular el campo eléctrico debido a un sólo dipolo y utilizar el principio de superposición, formulando todo en términos de potencial eléctrico V , para facilitar los cálculos. El potencial eléctrico de un dipolo \mathbf{p} es:

$$V(\mathbf{r}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{\hat{\mathbf{r}} \cdot \mathbf{p}}{r^2} \quad (5.10)$$

donde r es el vector que va desde el dipolo hasta el punto donde se esta evaluando el potencial. Es necesario integrar sobre todos los momentos dipolares contenidos en el dieléctrico para obtener el potencial debido a la polarización:

$$V(\mathbf{r}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \int_V \frac{\hat{\mathbf{r}} \cdot \mathbf{P}(\mathbf{r}')}{r^2} d\tau' \quad (5.11)$$

al escribir la ecuación anterior se considera que $\mathbf{p} = \mathbf{P}d\tau'$ es el momento dipolar por unidad de volumen $d\tau'$. Utilizando la identidad $\nabla' \left(\frac{1}{r} \right) = \frac{\hat{\mathbf{r}}}{r^2}$, se puede reescribir la ecuación 5.11 como:

$$V = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \int_V \mathbf{P} \cdot \nabla' \left(\frac{1}{r} \right) d\tau' \quad (5.12)$$

al integrar por partes la ecuación anterior se obtiene:

$$V = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \oint_S \frac{1}{r} \mathbf{P} \cdot d\mathbf{a}' - \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \int_V \frac{1}{r} (\nabla' \cdot \mathbf{P}) d\tau' \quad (5.13)$$

a partir de esta ecuación se puede definir una densidad de carga superficial $\sigma_b \equiv \mathbf{P} \cdot \hat{\mathbf{n}}$, (donde $\hat{\mathbf{n}}$ es el vector normal unitario), y una densidad de carga volumétrica $\rho_b \equiv -\nabla' \cdot \mathbf{P}$. Utilizando estas definiciones la ecuación 5.13 se puede reescribir como:

$$V = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \oint_S \frac{\sigma_b}{r} d\mathbf{a}' - \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \int_V \frac{\rho_b}{r} d\tau' \quad (5.14)$$

Esto quiere decir que el campo eléctrico producido por un objeto polarizado es el mismo que el campo producido por una densidad volumétrica de carga de polarización ρ_b y una densidad superficial de carga de polarización σ_b .

5.4. El campo de desplazamiento eléctrico

Para poder calcular en campo eléctrico total en un material dieléctrico, se debe considerar la carga total del material, i.e la suma de las cargas de polarización más las cargas libres:

$$\rho = \rho_b + \rho_f \quad (5.15)$$

Una vez obtenida la carga total en el material, el campo eléctrico se puede obtener utilizando la ley de Gauss:

$$\epsilon_0 \nabla \cdot \mathbf{E} = \rho = \rho_b + \rho_f = -\nabla \cdot \mathbf{P} + \rho_f \quad (5.16)$$

Es conveniente combinar los términos de divergencia de la ecuación 5.16 y obtener así:

$$\nabla \cdot (\epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}) = \rho_f \quad (5.17)$$

a la expresión en paréntesis $\epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}$ se le conoce como campo de desplazamiento eléctrico \mathbf{D} , en términos de este campo, la ley de Gauss se escribe como:

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho_f \quad (5.18)$$

ó en su forma integral:

$$\oint \mathbf{D} \cdot d\mathbf{a} = Q_{f_{enc}}$$

donde $Q_{f_{enc}}$ denota la carga libre total que se encuentra dentro del volumen del dieléctrico.

5.5. Dieléctricos lineales

De la discusión anterior sabemos que la polarización se origina debido al alineamiento de dipolos con el campo eléctrico externo aplicado. En varios casos, la polarización es proporcional al campo eléctrico externo siempre y cuando no sea muy intenso:

$$\mathbf{P} = \epsilon_0 \chi_e \mathbf{E} \quad (5.19)$$

A la constante de proporcionalidad χ_e se le conoce como susceptibilidad eléctrica del medio, su valor depende de la estructura microscópica de la sustancia en cuestión. A los materiales que obedecen la ecuación 5.19 se les conoce como dieléctricos lineales. En los medios lineales tenemos que:

$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \epsilon_0 \chi_e \mathbf{E} = \epsilon_0 (1 + \chi_e) \mathbf{E} \quad (5.20)$$

por lo que en este caso, \mathbf{D} también es proporcional a \mathbf{E} :

$$\mathbf{D} = \epsilon \mathbf{E} \quad (5.21)$$

donde $\epsilon \equiv \epsilon_0 (1 + \chi_e)$, a esta nueva constante se le conoce como permitividad eléctrica del material. Si se quita el factor de ϵ_0 , a la cantidad adimensional que se obtiene, $\epsilon_r \equiv 1 + \chi_e = \frac{\epsilon}{\epsilon_0}$, se le conoce como permitividad relativa o constante dieléctrica del material. [4]

Capítulo 6

Métodos Experimentales

6.1. Expresión del canal *Shaker IR* en ovocitos

A partir del canal *Shaker IR* (*GENEBANK*: NM_206775.3) clonado en el plásmido¹ *pGEMA*, se obtuvo el ARN mensajero correspondiente utilizando el kit de transcripción *in vitro* T7 *mMESSAGE mMACHINE* (AM13C44, Austin, TX). Para ello el plásmido fue linearizado con la enzima Not I y la transcripción *in-vitro* se realizó siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor. Para su uso, el ARN mensajero fue resuspendido en agua tratada con DEPC quedando a una concentración final de 0.5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* se extrajeron quirúrgicamente, de acuerdo a los descritos por *Goldin* en [23]. Las células foliculares de los ovocitos fueron removidas enzimáticamente por un tratamiento con colagenasa en OR2 (OR2 contiene (mM): 82.5 *NaCl*, 2 *KCl*, 1 *MgCl*₂, 5 HEPES a pH 7.5 *NaOH*) a una concentración de 1.41 mg/mL .

Una vez defoliculados los ovocitos se incubaron a 18 °C en la solución ND96 (ND96 contiene (mM): 96 *NaCl*, 2 *KCl*, 1.8 *CaCl*₂, 1 *MgCl*₂, 5 HEPES, 2.5 piruvato, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina a pH 7.5, *NaOH*.)

De 1-5 hrs después del tratamiento, los ovocitos fueron inyectados con 18nL de ARN mensajero, utilizando un inyector *Nanostepper* (Drumond Scientific Co., Broomall, PA). Los experimentos de *patch-clamp* se efectuaron de 1-3 días después de la inyección.

6.2. Soluciones y registros de *patch-clamp*

Se realizaron registros de corrientes iónicas macroscópicas del canal *Shaker IR* en parches de membrana de ovocitos de rana *Xenopus laevis*, utilizando la técnica de *patch-clamp*.

Las configuraciones utilizadas en todos los experimentos fueron *inside-out* o *cell-attached* (Ver figura 3.2.1).

Las soluciones utilizadas en los registros fueron:

¹Un plásmido es una molécula de ADN circular que se replica y se transcribe de manera independiente al ADN cromosomal. Debido a que son elementos genéticos transferibles pueden utilizarse para clonar, replicar y expresar genes particulares.

| Solución del baño | Solución de la pipeta |
|-------------------|-----------------------|
| 130mM <i>KCl</i> | 60 mM <i>KCl</i> |
| 30 mM HEPES | 30 mM HEPES |
| 10 mM EDTA | 10 mM EDTA |
| | 70 mM NMDG/Asp |

Las micropipetas utilizadas en los experimentos se fabricaron con capilares de vidrio de boro-silicato (Sutter Instrument, Novato, CA) utilizando el *P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller* (Sutter Instrument, Novato, CA). Las pipetas empleadas tenían una resistencia de $1\text{-}3M\Omega$ y fueron cubiertas con cera dental para reducir el componente lineal de las corrientes capacitivas.

Las corrientes iónicas macroscópicas se obtuvieron utilizando un amplificador HEKA EPC-6 (HEKA Elektronik GmbH, Pfalz, Alemania). Los registros se adquirieron a $100kHz$ con el software Patch-master (HEKA Elektronik GmbH, Pfalz, Alemania) y se filtraron a $10kHz$ utilizando un filtro paso-bajo de Bessel. Se utilizó un protocolo² $p/4$ con un potencial de mantenimiento de $-90mV$ para sustraer la corriente de fuga y las corrientes capacitivas.

Para obtener cada registro se le aplicó a la membrana el protocolo de potencial mostrado en la figura 6.1. Este protocolo se compone de 5 pulsos de potencial con las siguientes características:

1. Primero se aplica un pulso de $-90mV$ durante $100ms$, esto asegura que los canales del parche de membrana se encuentren en su estado cerrado.
2. El segundo pulso aplicado consiste en un despolarización de la membrana, i.e. se le aplica un pulso de potencial positivo, con magnitud de $100mV$. La duración de este pulso es de $10ms$ para asegurar que al término de este intervalo los canales del parche se encontrarán en su estado abierto.
3. El tercer pulso de potencial es una repolarización de la membrana, i.e. es un pulso de potencial negativo, con magnitud de $-90mV$. A la duración de este pulso se le conoce como intervalo de repolarización; esta duración varía en cada trazo del registro. En los experimentos realizados la longitud del intervalo de repolarización toma valores entre $5\mu s$ y $989,05\mu s$.
4. El cuarto pulso del protocolo nuevamente es una despolarización de la membrana, la magnitud de esta segunda despolarización se varía en cada registro en un rango de $0 - 260mV$. La duración de este pulso es de $10ms$.
5. Se aplica un último pulso de potencial negativo con magnitud de $-90mV$ y duración de $100ms$, para que los canales del parche de membrana vuelvan a su estado cerrado.

La figura 6.2 muestra dos registros de corriente iónica macroscópica obtenidos aplicando el protocolo de potencial de la figura 6.1 a un parche de membrana en la configuración *inside-out*.

Una vez obtenidos los registros, se analizó cada trazo para obtener el valor de la constante de apertura del canal a distintos potenciales de membrana y distintos intervalos de repolarización. El análisis de cada trazo consistió en ajustar una función exponencial a cada uno de los trazos de corriente en los registros. En el caso de registros obtenidos a potenciales de membrana de hasta $180mV$ (como el mostrado en la figura 6.2 (b)), se ajustó una función exponencial de la forma 3.22 a la parte del trazo de corriente que corresponde al segundo pulso despolarizante, obteniendo así la constante de apertura del canal para ese potencial de membrana e intervalo de repolarización específicos. En el caso de registros obtenidos a potenciales de membrana a partir de $200mV$, se ajustó una suma de funciones exponenciales (cada una de la forma 3.22) a la parte del trazo de corriente que corresponde al segundo pulso despolarizante, tomando como constante de apertura del canal a la función exponencial con exponente mayor (la que describe el componente rápido de

²En un protocolo de sustracción $p/4$, cada pulso de voltaje aplicado (pulso de prueba) es precedido por 4 pulsos de voltaje de leak con amplitud $1/4$ del pulso de prueba (tomado a un potencial en el que no se observan corrientes activadas por potencial). En este protocolo se promedian las $4 \times 1/4$ señales y se sustraen de la señal de corriente de interés, aislando la corriente iónica del canal.

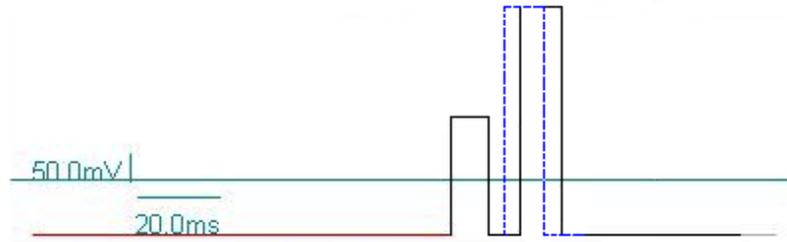


Figura 6.1: **Protocolo de potencial utilizado en los experimentos de *patch-clamp*.** Primero se aplica al parche un pulso de potencial de $-90mV$ durante $10ms$, seguido de una depolarización de $100mV$ con duración de $10ms$. Al término del pulso positivo, se aplica un potencial de $-90mV$ con una duración variable. Después se aplica de un pulso de potencial depolarizante de amplitud variable, en este caso la amplitud es de $260mV$, durante $10ms$. Por último, el parche se regresa a $-90mV$. La figura muestra dos pulsos, con distintos intervalos de repolarización, el trazo punteado muestra un pulso con un intervalo de repolarización más corto.

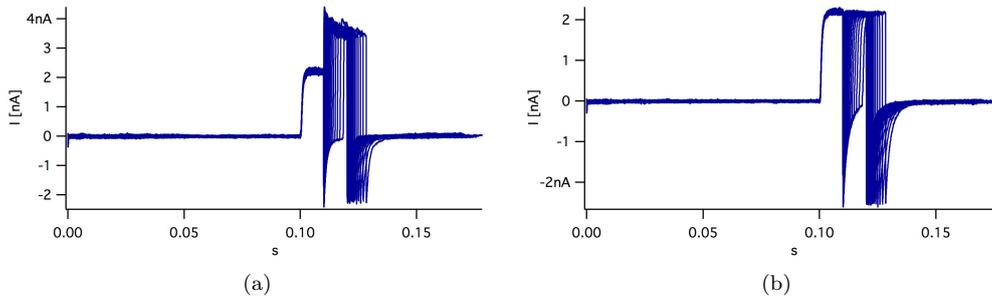


Figura 6.2: **Registros de corrientes iónicas en el canal *Shaker wt* obtenidos utilizando el protocolo de potencial que se muestra en la figura 6.1.** La parte (a) corresponde a un protocolo con una segunda despolarización de magnitud $260mV$, mientras que la parte (b) muestra un registro obtenido a un protocolo donde la segunda despolarización tiene un valor de $100mV$.

la transición).

La figura 6.3 muestra el ajuste exponencial realizado para el análisis de datos en dos trazos tomados de los registros mostrados en la figura 6.2. Al trazo mostrado en la parte (a) se le ajustó la suma de dos funciones exponenciales, mientras que al trazo mostrado en la parte (b) solamente se le ajustó una función exponencial de la forma 3.22. Todo el análisis de datos fue realizado con el software IgorPro (Wavemetrics Inc., Portland, OR).

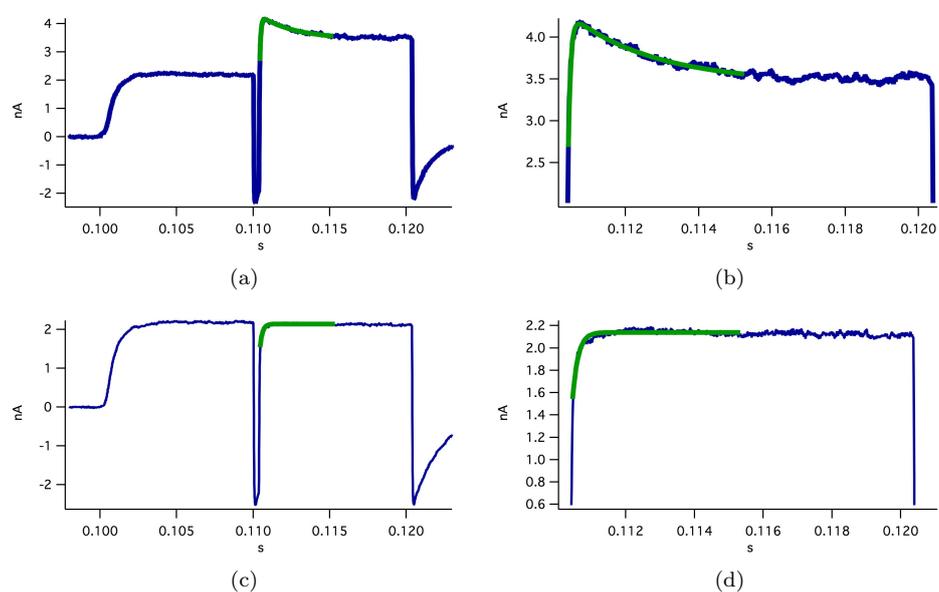


Figura 6.3: **Ajuste exponencial realizado para obtener el valor de la constante de velocidad de apertura del canal *Shaker IR*.** (a) Trazo de corriente obtenido para una segunda depolarización de $260mV$ con un intervalo de repolarización de $37,15\mu s$. (b) Trazo de corriente obtenido para una segunda depolarización de $100mV$ con un intervalo de repolarización de $37,15\mu s$. La función exponencial ajustada a cada trazo se muestra en verde. (c)(d) Vista cercana de la región de ajuste de la función exponencial en el trazo.

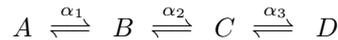
Capítulo 7

Resultados

7.1. Mediciones experimentales

De acuerdo a lo discutido en la sección 3.3, la apertura de un canal puede ser descrita por medio de una serie de estados discretos, que representan estados conformacionales en la proteína. La cinética de la transición entre cada estado es gobernada por la constante de velocidad de cada transición. Debido a que no se conoce con exactitud el número de estados que debe atravesar un canal en su ruta de activación, es difícil determinar en que estado se encontrará el canal después de aplicarle un pulso de potencial. Sin embargo, se pueden tratar de aislar transiciones específicas utilizando los métodos descritos en la sección 3.4. En particular si se utiliza un protocolo de doble-pulso como el mostrado en la figura 6.1, se puede aislar eficazmente la transición entre el último estado cerrado y el estado abierto del canal.

Para ejemplificar como se aísla la última transición del canal, se puede pensar en un parche de membrana al que se le aplica el protocolo de doble-pulso mostrado en la figura 6.1. Si se considera que la ruta de activación de cada uno de los canales del parche esta representada por el diagrama de estados:



donde A representa el estado más cerrado del canal y D representa su estado abierto; B y C corresponden a estados intermedios donde el canal todavía se encuentra cerrado (figura 7.11). En el diagrama sólo se muestran las constantes de velocidad de apertura, ya que son las relevantes en esta tesis.

Al aplicar el primer pulso despolarizante del protocolo mostrado en la figura 6.1, el canal pasará del estado A hasta el estado D (figura 7.11 (a)), i.e. se abrirá por completo. Luego, al aplicar el pulso de potencial negativo, el canal comenzará a cerrarse como respuesta al cambio en V_m , sin embargo, el estado en el que se encuentre el canal después de este pulso, dependerá de la duración del intervalo de repolarización; si el intervalo de repolarización es lo suficientemente corto, al término de este pulso el canal se encontrará en el estado C (figura 7.11 (b)); pero si es más largo el canal podrá regresar hasta el estado B ó incluso cerrarse por completo (estado A). Al aplicar el segundo pulso despolarizante del protocolo, el canal se reabrirá, atravesando solamente los estados faltantes para su activación. Si antes de aplicar el último pulso el canal se encontraban en el estado C , el registro reflejará sólo la cinética de la última transición del canal (figura 7.11 (c)); en cambio antes de su reapertura el canal se encontraba en el estado B ó A , el registro reflejará la cinética de varias transiciones mezcladas.

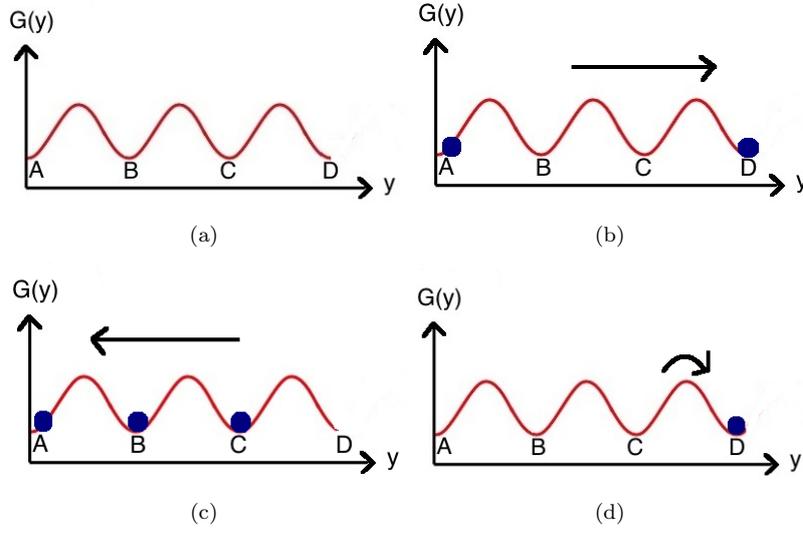


Figura 7.1: **Representación esquemática de las transiciones sufridas por el canal como respuesta a los cambios en V_m .** (a) paisaje energético en la que se difunde la partícula de compuerta. (b) Al aplicar el primer pulso de potencial despolarizante, los canales pasarán de su estado cerrado, A, al abierto, D. (c) Como respuesta a la repolarización de la membrana, el canal comenzará a regresar a su estado inactivado. A intervalos de repolarización más cortos, el canal se mantendrá en estados más cercanos al abierto. (d) Si el intervalo de repolarización es suficientemente corto, la última despolarización de la membrana hará que el canal pase del último estado cerrado al abierto.

Entonces, para medir de manera precisa la constante de velocidad apertura de la última transición del canal, α_3 , es necesario considerar las mediciones que se obtengan del análisis de registros con intervalos de repolarización cortos. Mediciones de α , obtenidas de registros con intervalos de repolarización más largos, no reflejarán la cinética de una sola transición, más bien, serán una mezcla de α_2 y α_3 ó incluso de α_1 , α_2 y α_3 .

Aunque el protocolo de doble-pulso utilizado en los experimentos, tiene intervalos de repolarización con valores entre $5\mu s$ y $989,05\mu s$, no todos estos registros se encuentran dentro de la resolución de un experimento de *patch-clamp*. Si se recuerda, la resolución de un experimento de *patch-clamp* esta limitada por el filtrado de las señales de corriente. Para que un registro se encuentre dentro de la resolución del amplificador, es necesario que su intervalo de repolarización sea mayor que el tiempo de subida del filtro. En este caso los registros de corrientes iónicas macroscópicas se adquirieron a una frecuencia de $100KHz$ y fueron filtrados a $10KHz$, de acuerdo con la ecuación (3.8) esto corresponde a un filtro con una frecuencia de corte efectiva de:

$$\frac{1}{f_c^2} = \frac{1}{(100 * 10^3)^2} + \frac{1}{(10 * 10^3)^2} = \frac{101}{(10 * 10^{10})}$$

$$\Rightarrow f_c = \frac{10^5}{\sqrt{101}s}$$
(7.1)

Una vez obtenida la frecuencia de corte f_c , se puede calcular el tiempo de subida del filtro, T_r , utilizando la ecuación (3.10):

$$T_r = \frac{0,3321}{f_c} = \frac{0,3321 * \sqrt{(101)}}{10^5} = 33,37\mu s$$
(7.2)

Los registros cuyos intervalos de repolarización menores ó iguales a $33,37\mu\text{seg}$ no podrán ser considerados debido a que se encuentran por debajo de la resolución de los filtros en el amplificador.

Utilizando la metodología descrita en la sección 6.2, se registraron las corrientes iónicas macroscópicas del canal *Shaker IR*. Todos los registros se obtuvieron utilizando el protocolo de doble-pulso descrito a detalle en la sección 6.2. La figura 7.2 muestra las corrientes iónicas macroscópicas registradas en un solo parche de membrana en la configuración *inside-out*, usando protocolos con distintos valores del segundo pulso despolarizante, V_m . La escala de las figuras es tal que se muestra con mayor detalle la parte del registro correspondiente al curso temporal de las aperturas del canal. Los registros sólo muestran los trazos obtenidos a intervalos de repolarización de 30.95, 64.19, 113.11 y 276.02 μs .

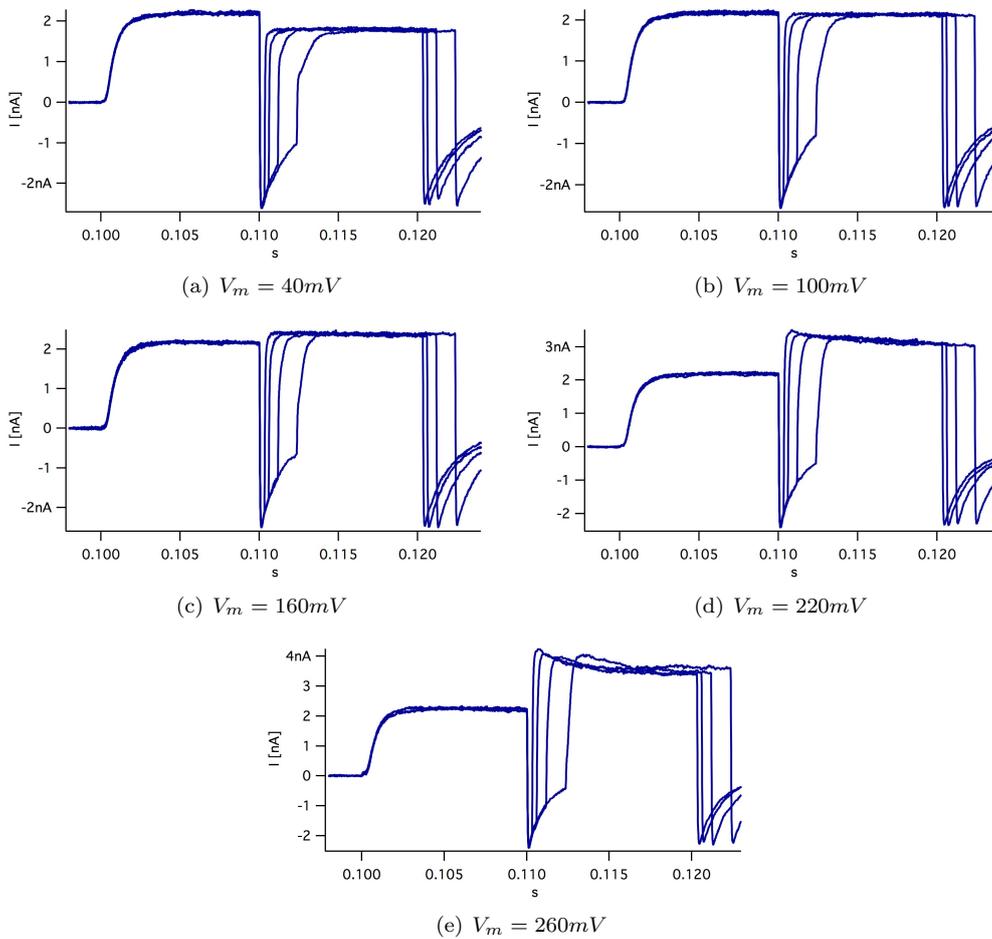


Figura 7.2: **Registros de corriente iónica macroscópica a distintos valores de potencial de membrana.** Todos los registros se obtuvieron con un protocolo de doble-pulso como el mostrado en la figura 6.1, los valores del segundo pulso despolarizante, V_m , varían de un registro a otro.

Los registros se analizaron conforme a lo descrito en la sección 6.2, para obtener los valores de la constante de velocidad de apertura del canal α . La figura 7.3 muestra gráficamente el valor promedio de α , obtenido de registros de 10 parches de membrana, como función del intervalo de repolarización.

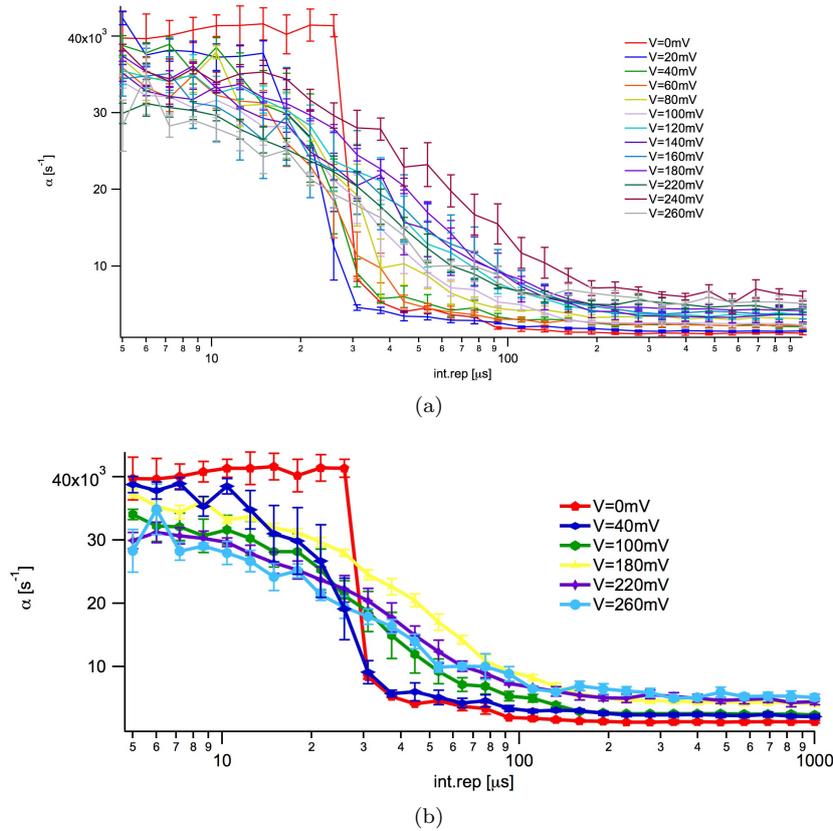


Figura 7.3: Mediciones de la constantes de velocidad de apertura del canal en función del intervalo de repolarización. (a) Promedio de α obtenido de registros con distintos intervalos de repolarización, cada trazo corresponde a un valor de V_m fijo. (b) Algunos trazos representativos de la parte a de la figura. Los trazos corresponden a valores de $V_m = 0, 40, 100, 180, 220, 260mV$

Como se mencionó anteriormente las mediciones de α que corresponden a la última transición del canal, son las que se obtuvieron a intervalos de repolarización más cortos. Las mediciones que cumplen con este criterio y que se encuentran dentro de la resolución del amplificador de *patch-clamp* son las correspondientes a los intervalos de repolarización de 37.15, 44.58 y 53.49 μs .

Ya que se cuenta con mediciones de α a distintos V_m , se puede analizar la voltaje-dependencia de la constante de velocidad de apertura del canal. La figura 7.1 muestra la dependencia de α en V_m para distintos intervalos de repolarización.

En la figura 7.1b se observa que el valor de α medido a intervalos de repolarización de 30.95, 37.15, 44.58 y 53.49 μs varía muy poco, indicando que la constante de velocidad de apertura medida a estos intervalos corresponde a la constante de velocidad que describe la cinética de apertura de la última transición de canal. De estas cuatro mediciones de α , se puede considerar que la más confiable es la que corresponde a un intervalo de repolarización de 37.15 μs , ya que se encuentra dentro de la resolución del experimento y representa un valor intermedio entre α a 30.95 μs y α a 44.58 μs .

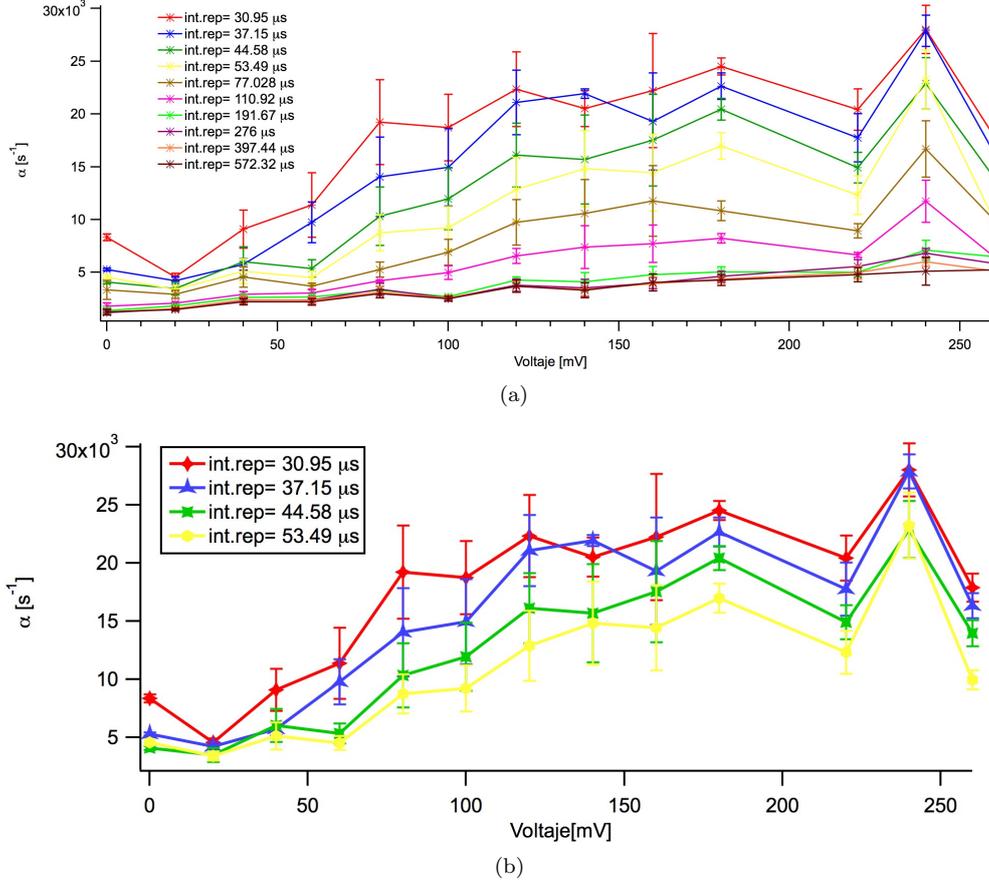


Figura 7.4: **Voltaje-dependencia de la constante de apertura del canal.** (a) Valores α en función de V_m , dependiendo de la duración del intervalo de repolarización, las constantes de velocidad de apertura reflejan de cinética de una o varias transiciones. (b) Valores de la constante de velocidad de apertura del canal para intervalos de repolarización cortos dentro de la resolución del experimento.

La expresión de Arrhenius (ecuación 3.22) utilizada generalmente en los modelos de Markov para calcular las constantes de velocidad de apertura de un canal, predice una dependencia exponencial en el voltaje para la constante de velocidad de apertura del canal (ver sección 3.3). Al ajustar una función exponencial de la forma (3.22) a las mediciones obtenidas de la constante de velocidad de apertura de la última transición del canal (figura 7.1b), se observa que este modelo ya no es suficiente a valores de V_m mayores a $\approx 140 \text{ mV}$. La figura 7.5 muestra el ajuste de una exponencial de la forma

$$\alpha(V_m) = \alpha(0)e^{zV_m/k_B T} \quad (7.3)$$

a las curvas de α mostradas en la figura 7.1b. En la ecuación (7.3), $\alpha(0)$ corresponde a la constante de velocidad de apertura de la última transición del canal a 0 mV , z es un parámetro que representa la cantidad de carga que se mueve en la transición, k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura, que en este caso su valor es de 20°C . En la figura 7.5 se puede observar que el comportamiento de la constante de velocidad de apertura de la última transición del canal, α^* , a potenciales de membrana mayores a $\approx 140 \text{ mV}$ no puede ser descrito en su totalidad por la ecuación de Arrhenius (7.3). Sin embargo, una función exponencial de la forma 7.3 modela correctamente la voltaje-dependencia de α^* a $37,15 \mu\text{s}$ hasta $\approx 140 \text{ mV}$. Ajustando una función de la forma (7.3) a la dependencia en el potencial de membrana de la constante de apertura mostrada en la figura 7.5,

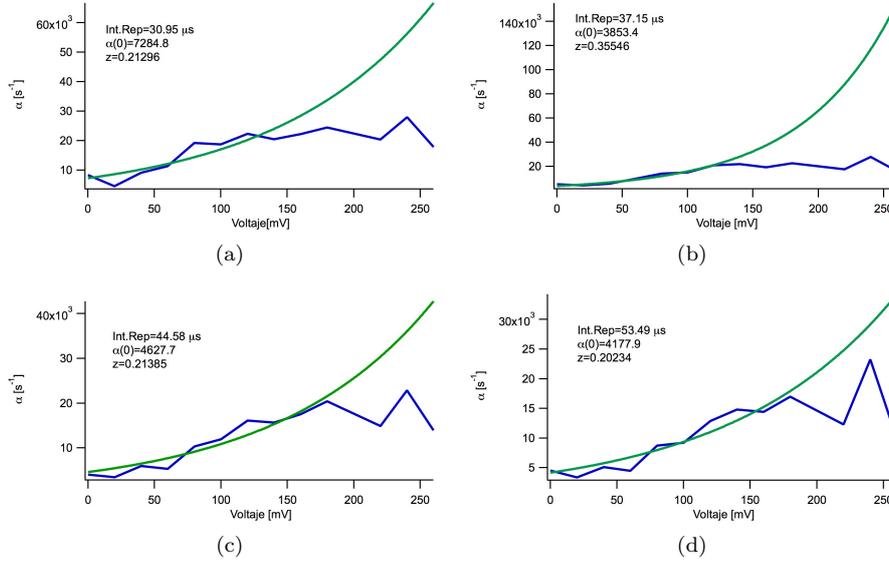


Figura 7.5: Ajuste de una función exponencial de la forma a las curvas de la dependencia en el voltaje de la constante de velocidad de apertura de la última transición del canal

se pueden determinar los valores de la constante de velocidad de apertura de la última transición de canal a $0mV$, $\alpha(0)$, y la carga asociada a la transición z . Estos valores son:

$$\begin{aligned} \alpha(0) &= 3853,4 \\ z &= 0,3554 e_0 \end{aligned} \quad (7.4)$$

Como se ha mencionado anteriormente, usualmente el parámetro z indica la carga que se mueve en la última transición de canal. Sin embargo, z tiene un valor fraccionario, por lo que la interpretación correcta de este parámetro desde el punto de vista físico es pensar que z mide la longitud del desplazamiento de la carga. Entonces si $z = 0,3554$, esto equivale a pensar que una carga elemental e_0 se mueve una longitud equivalente a $\approx \frac{1}{3}$ de la longitud total del canal.

Desde un punto de vista estructural, la apertura de un canal iónico activado por voltaje se encuentra regulada por las interacciones del sensor de voltaje con el potencial de membrana. Experimentalmente no se observa ninguna alteración funcional en el canal como consecuencia de los pulsos extremos de potencial positivo aplicados a la membrana. Si en un experimento se le aplicaba a un parche de membrana inicialmente $260mV$, al aplicarle posteriormente $100mV$, la cinética del canal era normal, indicando que no sucedían cambios estructurales debido a las condiciones extremas a las que se sometió el parche. Lo anterior sugiere que el mecanismo responsable de la disminución en la voltaje-dependencia de α a potenciales altos, es consecuencia de un mecanismo físico.

7.2. Modelo Teórico

Los modelos de Markov discretos para la activación del canal (discutidos en la sección 3.3) han probado ser de gran utilidad para describir la cinética de apertura de un canal activado por voltaje. A pesar de las ventajas que ofrecen, el problema conceptual de estos modelos es que carecen de una explicación clara del origen físico de los cambios conformacionales que forman parte del proceso de apertura de un canal.

Para poder explicar el origen microscópico de los cambios conformacionales en el canal, en esta tesis se propone utilizar un modelo para la apertura de un canal basado en la teoría de difusión de Kramers [21] para reacciones químicas. Este tipo de modelos ha sido aplicado con anterioridad para modelar el mecanismo de activación de un canal [17] con buenos resultados.

La base del modelo utilizado en esta tesis para describir la apertura de un canal, es proponer que su cinética de activación es equivalente al movimiento de una partícula Browniana, que se difunde a través de una curva energética unidimensional. A la partícula Browniana se le denomina partícula de compuerta. Esta partícula tiene una carga asociada y su movimiento está influenciado por la acción de un potencial eléctrico $\phi(y)$. La interacción entre la partícula de compuerta y el potencial eléctrico al que está sujeta, modela la voltaje-dependencia de la apertura del canal.

El movimiento de la partícula de compuerta representa los movimientos que el sensor de voltaje de la proteína debe realizar para que el canal se active. Para describir en qué parte del proceso de activación se encuentra el canal, se utiliza la coordenada de reacción y , que en este caso describe la posición de la partícula de compuerta en el canal. La coordenada y puede tomar cualquier valor en el intervalo $[0, L]$, donde L es la longitud del canal. Si la partícula de compuerta se encuentra en $y = 0$, el canal se encuentra en el estado cerrado; conforme la partícula de compuerta se va moviendo en el canal, este va transitando por una serie de estados intermedios hasta llegar a su estado abierto, que sucede cuando la partícula de compuerta alcanza la posición $y = L$.

El paisaje energético en la que se mueve la partícula está compuesta por una serie de barreras energéticas. Esta serie de barreras modela las fluctuaciones térmicas que hay en el sistema, así como a las interacciones de corto alcance entre las moléculas que componen al canal y la partícula de compuerta que impiden su difusión.

El potencial eléctrico externo al que se encuentra sujeta la partícula de compuerta corresponde al potencial eléctrico de la membrana, $\phi(y)$. La figura 7.6 muestra una caricatura del modelo propuesto en esta tesis para la activación del canal.

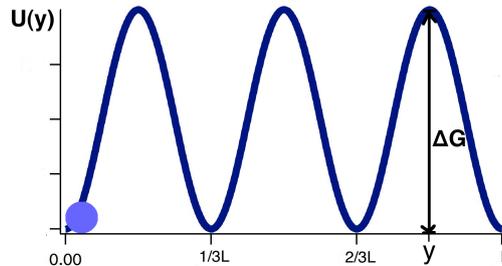


Figura 7.6: **Partícula de compuerta que se difunde a través de un paisaje energético $U(y)$.** Las barreras del paisaje energético tienen una altura ΔG . La energía del sistema está dada por $U(y) = G(y) + z\phi(y)$. Cuando la partícula se encuentra en $y = 0$, el canal se encuentra en su estado cerrado; al llegar la partícula al punto $y = y_0$, el poro del canal se abre.

En los canales iónicos activados por voltaje, las interacciones eléctricas en la proteína regulan su activación. Como se discutió en la sección 3.1, no se conoce a detalle la estructura de los canales de K^+ , pero tanto estudios estructurales como funcionales sugieren que además de contener una cavidad interna llena de agua, la proteína se compone de distintas clases de material polarizable (dieléctrico). Todo lo anterior sugiere que el mecanismo físico responsable de la disminución de la voltaje-dependencia de α es la polarización eléctrica.

En esta sección se busca introducir un modelo que considere la influencia de la polarización eléctrica-

ca de la proteína en su constante de apertura, a potenciales de membrana muy positivos. Este tipo de modelos se ha explorado poco, aunque existen ciertos precedentes, como el modelo propuesto por *Stevens* (Ver referencia [24]), que propone agregar un término no lineal de la forma 3.17 a la barrera de energía que debe vencer el canal para pasar de un estado a otro. A pesar de que la ecuación 3.17 describe correctamente la cinética de la apertura del canal a potenciales de membrana mayores a $\approx 140mV$, posee la desventaja de ser un término determinado empíricamente que no describe el origen de la polarización eléctrica en el canal.

7.2.1. Modelo para el paisaje energético que representa la activación de un canal

Como se discutió en la sección anterior, el paisaje energético que debe atravesar una partícula de compuerta para que se active un canal, $U(y)$, tiene dos componentes. Un término $G(y)$ cuyo origen físico son las interacciones entre las moléculas del canal que se oponen al movimiento de la partícula; y un término energético, $z\Phi(y)$, que es la energía electrostática correspondiente a la interacción de las moléculas del canal (específicamente del sensor de voltaje), con el potencial de membrana. Esto es:

$$U(y) = G(y) - z\Phi(y) \quad (7.5)$$

La forma exacta de $G(y)$ no puede ser determinada por falta de conocimientos detallados de la estructura de la proteína, sin embargo, parece razonable proponer que $G(y)$ sea una función periódica, ya que los canales son estructuras ordenadas compuestas por subunidades idénticas. Por simplicidad, se elige que $G(y)$ sea una función coseno,

$$G(y) = -|A|\cos\left(\frac{6\pi y}{L}\right) \quad (7.6)$$

donde L es la longitud del canal, y la posición de la partícula de compuerta, y $|A|$ la amplitud de la función. La figura 7.7 muestra una gráfica de esta función.

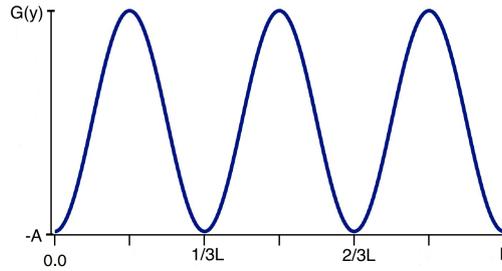


Figura 7.7: **Gráfica de $G(y)$.** Los mínimos de esta función representan estados de equilibrio estable estáticos, i.e en estos puntos la velocidad de la partícula es cero y $G'(y) = 0$.

La función $G(y)$ tiene 4 mínimos, que corresponden a estados de equilibrio estático de la partícula de compuerta. El canal se encontrará en su estado abierto cuando la partícula de compuerta alcance el punto $y_0 = L$, ya que en este punto, la partícula de compuerta habrá vencido la última barrera de energía.

El movimiento de una partícula Browniana bajo la acción de un potencial externo esta descrito por la ecuación de Langevin (4.19). Aunque se encuentre en un estado estable y en ausencia de una fuerza externa, la partícula Browniana fluctuará alrededor del mínimo del paisaje energético como resultado de las propiedades estocásticas de la fuerza de Langevin. Por esta razón, la probabilidad de que la partícula Browniana cruce una barrera del paisaje energético, en ausencia de una

fuerza externa, es distinta de cero. Lo anterior esta en acuerdo con el hecho experimental de que los canales iónicos activados por voltaje se pueden abrir a un potencial de membrana de $0mV$.

De acuerdo a lo discutido en la sección 4.2.1, la probabilidad de que la partícula de compuerta cruce una barrera energética por unidad de tiempo esta determinada por la ecuación 4.29, que en este caso es:

$$\alpha = \frac{1}{2\pi\beta} \sqrt{U'''(y_{min})|U''(y_{max})|} e^{-[U(y_{max})-U(y_{min})]/kT} \quad (7.7)$$

donde $U(y)$ es el paisaje energético descrita por 7.5. Los puntos y_{max} y y_{min} corresponden a los máximos y mínimos de la función $G(y)$ respectivamente.

Que la partícula de compuerta cruce una barrera en el paisaje energético, equivale físicamente a que ocurra un cambio conformacional en la proteína que la lleve de un estado de equilibrio a otro. En particular si se considera el movimiento de la partícula de compuerta al cruzar la última barrera del paisaje energético $G(y)$, este corresponde al cambio conformacional final que lleva a la proteína del estado cerrado al abierto.

La probabilidad, por unidad de tiempo, de que la partícula de compuerta cruce una barrera en el paisaje energético es precisamente la constante de velocidad de la transición entre los estados de equilibrio a ambos lados de la barrera. Entonces, la probabilidad por unidad de tiempo de que la partícula de compuerta cruce la última barrera en el paisaje energético, corresponde a la constante de velocidad de la última transición del canal α^* .

Entonces si se tiene una expresión para la barrera energética del sistema 7.5, se puede calcular el valor de las constantes de velocidad de apertura que describen el proceso de activación de un canal iónico activado por voltaje, utilizando la ecuación 7.7. Específicamente se puede calcular el valor de α correspondiente a la transición entre el estado cerrado y el abierto (última barrera en el paisaje energético).

El término energético correspondiente a las interacciones electrostáticas de la partícula de compuerta con el potencial de membrana, se obtendrá calculando el perfil de potencial eléctrico a lo largo de la proteína. En la siguiente sección se discute a detalle el cálculo de este término y su forma funcional.

Modelo de las interacciones electrostáticas de las moléculas del canal con el potencial de membrana

El término $z\phi(y)$ en la ecuación (7.5) corresponde a la energía electrostática del sistema debida a las interacciones electrostáticas entre la proteína y el potencial de membrana. Para poder calcular este término, es necesario determinar la forma del campo y del potencial eléctrico a lo largo de la proteína.

Al inicio del capítulo 5, se mencionó que como primera aproximación al problema se puede considerar que el campo eléctrico es constante a lo largo de una proteína y que los efectos de polarización eléctrica son mínimos; sin embargo, los resultados experimentales presentados en la sección 7.1 sugieren que a potenciales de membrana superiores a $140mV$, los efectos de polarización comienzan a ser significativos.

Existen pocos modelos para la activación de un canal dependiente del voltaje que consideren la polarización eléctrica de la proteína, como el propuesto por *Stevens* en [24]. En este modelo se le agrega un término no lineal a la energía libre del canal para describir la polarización de la proteína (ecuación 3.17). A pesar de que la ecuación (3.17) describe correctamente la cinética de la apertura del canal observada a potenciales de membrana mayores a $140mV$, posee la desventaja de ser un término determinado empíricamente que no explica con claridad el origen físico de la

polarización eléctrica del canal.

Estudios estructurales y funcionales de los canales activados por voltaje, sugieren que estan compuestos por distintas clases de material polarizable (dieléctrico) y que contienen una cavidad interna llena de agua. En particular, los segmentos que forman el dominio de sensor de voltaje en la proteína, tienen varios dipolos susceptibles de ser polarizados (ver sección 3.1). Por lo anterior, la presencia de un campo eléctrico externo en una proteína, induce una distribución de cargas de polarización en el canal; para calcular el campo eléctrico en la proteína es necesario considerar esta distribución de carga inducida. (capítulo 5)

Si se considera que la proteína esta compuesta por un material dieléctrico lineal, para calcular el campo de desplazamiento eléctrico, D , se debe resolver una ecuación de la forma (5.18). En este caso cualquier posición en la proteína se encuentra especificada por la coordenada y , y como la única fuente de campo eléctrico en la proteína son las cargas de polarización, la ecuación (5.18) para este caso es:

$$\frac{dD}{dy} = 0 \quad (7.8)$$

donde $D = \epsilon E = \epsilon_0 \epsilon_r E$, ϵ_0 es la permitividad del vacío y ϵ_r la constante dieléctrica de la proteína.

Hasta ahora no se tienen mediciones precisas de la constante dieléctrica de un canal iónico activado por voltaje, sin embargo se ha reportado que puede tener valores desde 2 hasta 80 ([26], [25], [27]). Estas discrepancias surgen debido a que un canal iónico activado por voltaje no tiene una composición uniforme; las hélices de los diferentes dominios del canal tienen cadenas laterales con distintas cargas y la cavidad interna del canal esta llena de agua, ocasionando que la constante dieléctrica del canal tenga valores diferentes en cada región de la proteína.

En esta tesis se propone una constante dieléctrica para el canal, cuyo valor depende tanto de la magnitud del campo eléctrico externo E , como de la posición en el canal, y . Ya se han dado argumentos para explicar que el valor de ϵ_r es distinto en diferentes dominios de la proteína, por simplicidad se considera que ϵ_r depende linealmente de y . La observación experimental de que sólo a potenciales de membrana altos se observa el efecto de la polarización eléctrica, sugiere que ϵ_r también debe depender de la magnitud de E . En la literatura se han reportado pocas formas funcionales de la constantes dieléctricas dependientes de E , pero estudios recientes ([28], [29]) sugieren que la dependencia de ϵ_r debe ser cuadrática en E . Tomando en cuenta estas consideraciones se sugiere la siguiente forma funcional para ϵ_r :

$$\epsilon_r = 20(1 - \chi y E^2) \quad (7.9)$$

Con base en los estimados existentes para ϵ_r , la ecuación 7.9 considera que su valor máximo es 20. Sin embargo, el comportamiento de la polarización en la proteína no depende del valor máximo de ϵ_r , ya que al resolver la ecuación electrostática 5.18, este valor sale de la derivada por que es constante.

Sustituyendo la expresión (7.9) para ϵ_r , en la ecuación (7.8), se obtiene:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dy} [20\epsilon_0(1 - \chi y E^2)E] &= 0 \\ \Rightarrow \frac{d}{dy} [(1 - \chi y E^2)E] &= 0 \end{aligned} \quad (7.10)$$

en términos de potencial eléctrico ϕ , la ecuación C.12 es:

$$\frac{d}{dy} \left[\left(1 - \chi y \left(\frac{d\phi}{dy} \right)^2 \right) \left(\frac{-d\phi}{dy} \right) \right] = 0 \quad (7.11)$$

La ecuación (7.11) es una ecuación diferencial no lineal para $\frac{d\phi}{dy}$, donde la expresión para $\frac{d\phi}{dy}$ es una función cúbica. La solución de la ecuación diferencial es analítica si se aproxima la función cúbica en $\frac{d\phi}{dy}$ por una función cuadrática. Las condiciones de frontera utilizadas para resolver 7.11 son:

$$\begin{aligned}\phi(0) &= 0 \\ \phi(L) &= V_m\end{aligned}\tag{7.12}$$

donde L es la longitud del canal y V_m el potencial de membrana¹.

De acuerdo a lo discutido en la sección 3.3, por convención se toma que el potencial en la cara intracelular de un parche es $\phi = V_m$, mientras que en la cara extracelular $\phi = 0$. Como se puede ver en la ecuación 7.12, las condiciones de frontera utilizadas para resolver la ecuación electrostática están al revés. Las condiciones (7.12) se utilizaron en el modelo teórico ya que facilitan los cálculos, sin embargo, son completamente equivalentes a las condiciones tradicionales si se considera que la carga que se mueve en el canal es negativa.

Al resolver² la ecuación 7.11 con las condiciones de frontera 7.12, se obtienen las siguientes expresiones para el campo eléctrico, E , y el potencial eléctrico, ϕ :

$$\begin{aligned}E &= \frac{-V_m}{L} + \frac{3^{1/2}V_m^2\chi^{1/2}}{2L^2}y^{1/2} \\ \phi(y) &= \frac{V_m}{L}y - \frac{V_m^2\chi^{1/2}}{3^{1/2}L^2}y^{3/2}\end{aligned}\tag{7.13}$$

Las figuras 7.8 y 7.9 muestran el campo eléctrico, E , y el potencial eléctrico, ϕ ; para potenciales de membrana, V_m , en un rango de 0 – 260mV. Estos valores se obtuvieron considerando que la longitud de un canal es $L = 3 \times 10^{-9}m$ y su polarizabilidad es $\chi = 225 \times 10^{-10}$. Una vez que se tienen los valores de E , se puede determinar ϵ , la figura 7.10 muestra una gráfica de ϵ para distintos valores de potencial de membrana.

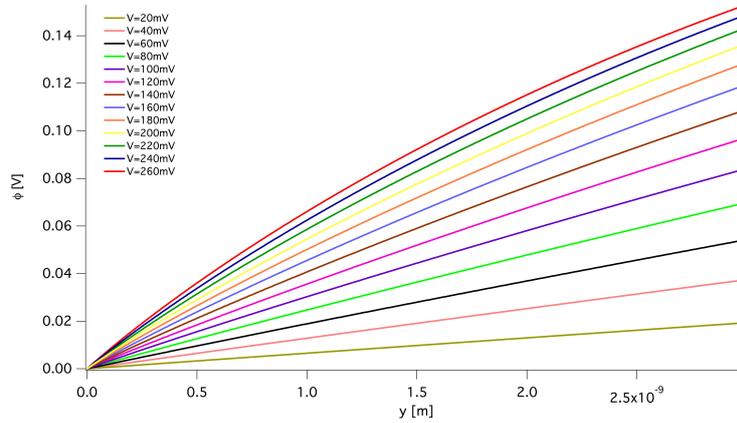


Figura 7.8: Potencial Eléctrico para distintos valores del potencial de membrana

¹El potencial de membrana corresponde al valor del segundo pulso despolarizante en los experimentos

²Los detalles de la solución de esta ecuación se muestran en el apéndice C.

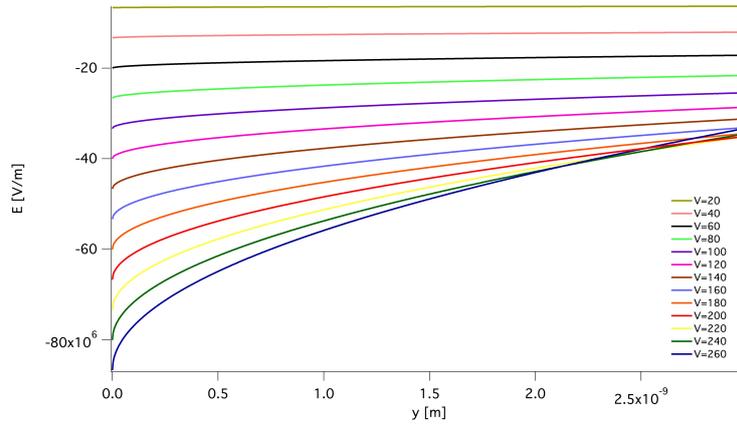


Figura 7.9: Campo Eléctrico para distintos valores del potencial de membrana

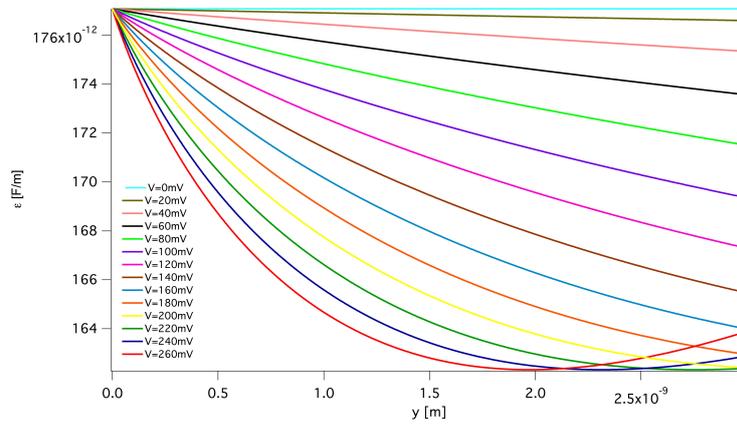


Figura 7.10: Permitividad eléctrica para distintos valores del potencial de membrana

7.2.2. Cálculo de la constante de velocidad de apertura de la última transición del canal

Para poder calcular las constantes de apertura de un canal utilizando la expresión 7.7, es necesario conocer la forma del paisaje energético del sistema. En la sección anterior se discutió la forma de cada uno de los términos de la ecuación 7.5, dando como resultado la siguiente expresión para la energía del sistema:

$$U(y) = -|A|\cos\left(\frac{6\pi y}{L}\right) - \frac{V_m}{L}y + \frac{V_m^2\chi^{1/2}}{3^{1/2}L^2}y^{3/2} \quad (7.14)$$

donde $L = 30 \times 10^{-10}$ es la longitud de canal, $\chi = 225 \times 10^{-10}$ es el valor del parámetro de polarizabilidad considerado en el modelo, $|2A|$ es la amplitud de la barrera de potencial y V_m es el potencial de membrana. La figura 7.11 muestra una representación a escala del paisaje energético dado por la ecuación (7.14) para distintos valores de V_m .

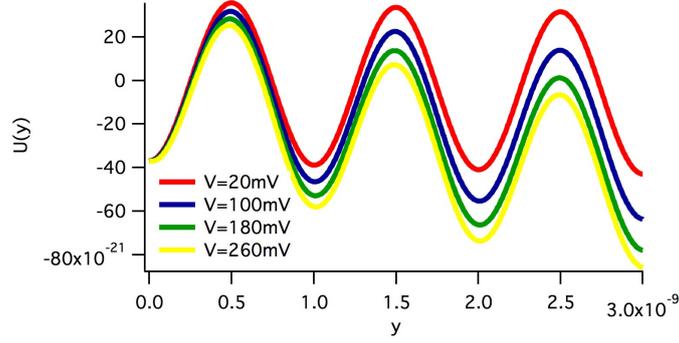


Figura 7.11: Paisaje energético en el que se difunde la partícula de compuerta para distintos valores de V_m . Se puede observar que la inclinación de labarrera de energía $G(y)$, varía dependiendo del valor de V_m , debido a esto, la tasa de escape de las partículas de una barrera en $U(y)$ es distinta para valores distintos de V_m .

Ahora, para calcular la cinética de la transición entre cada uno de los estados estables de la curva de energía 7.14, se utiliza la expresión 7.7, que para este caso es:

$$\alpha = \frac{1}{2\pi\beta} \sqrt{U''(y_{min})|U''(y_{max})} e^{-[U(y_{max})-U(y_{min})]/kT} \quad (7.15)$$

donde U esta dada por 7.14. Al calcular la segunda derivada de $U(y)$, se observa que los términos de $U''(y)$ dependientes de V_m son muy pequeños en comparación con $|A| \left(\frac{6\pi}{L}\right)^2 \cos\left(\frac{6\pi y}{L}\right)$ por lo que su efecto puede ser despreciado, dando como resultado la siguiente expresión para las constantes de velocidad de las transiciones entre estados estables del canal:

$$\alpha = \frac{18\pi A}{L^2\beta} e^{-\frac{2A}{kT} + \frac{z}{kT}[\phi(y_{max})-\phi(y_{min})]} \quad (7.16)$$

Para poder determinar α se necesita conocer el valor de la constante de fricción viscosa, β . Es bien conocido que para una partícula esférica, β depende del radio de la partícula, r y de la viscosidad, η , del medio donde se mueve:

$$\beta = 6\pi\eta r \quad (7.17)$$

La longitud de un canal iónico activado por voltaje es $L = 3 \times 10^9 m$, por lo que es razonable suponer que el radio de una partícula que se difunde en la proteína es $r = 3 \times 10^{-11} m$, ya que la proteína puede ser vista como un medio acuoso, se le atribuye la viscosidad del agua $\eta = 1,002 \times 10^{-3} \frac{Pa}{s}$, con estas consideraciones el valor β se vuelve:

$$\beta = 6\pi(3,006 \times 10^{-14}) \quad (7.18)$$

La amplitud de la barrera de potencial, $2A$, se escoge tal que el valor de la constante de velocidad dada por la ecuación 7.16 para $\phi(y) = 0$ coincida con el valor medido experimentalmente de α^* a $0mV$. Dando como resultado:

$$|A| = 9,085k_B T \quad (7.19)$$

De acuerdo a lo discutido en la sección 7.1, experimentalmente determinó que en la última transición del canal, se desplaza una carga elemental, e_0 , una distancia de $L/3$, en el caso del modelo experimental se esta considerando que la partícula de compuerta cargada debe desplazarse $L/6$ durante esta última transición, por lo que se considera para el modelo un valor de:

$$z = 2e_0 \quad (7.20)$$

donde e_0 representa el valor de una carga elemental.

Utilizando los parámetros definidos en las ecuaciones (7.20), (7.19) y (7.18), se obtiene que la expresión para la constante de velocidad de transición de la última transición del canal es:

$$\alpha^*(V_m) = 407,746042 \times 10^9 e^{-18,17+14,07101[\phi(y_{max})-\phi(y_{min})]} \quad (7.21)$$

La dependencia de α^* en V_m , esta implícita en el potencial eléctrico $\phi(y)$, ya que este será distinto para distintos valores de V_m . La figura 7.12 muestra los valores de α^* , obtenidos a partir de la expresión 7.21 para distintos valores de V_m . Se puede observar que el modelo teórico predice cualitativamente y cuantitativamente el comportamiento de α^* observado experimentalmente, ya que a valores grandes de potencial de membrana, la dependencia de α^* en V_m deja de ser exponencial.

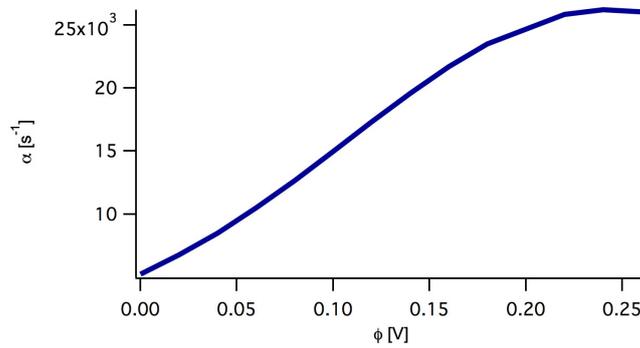


Figura 7.12: **Gráfica de las funciones $g(E)$ y $h(E)$ en la región de interés.** Esta gráfica se obtuvo para $\gamma = 1$, $y = L$, $C = 0$.

La comparación de los valores de α^* (figura 7.1b) medidos, con los predichos por el modelo (figura 7.12) se muestra en la figura 7.13. En esta figura se puede observar que el modelo teórico predice de manera razonable el valor de α^* en un rango de potenciales de membrana entre 50 y 260mV. Se puede inferir que a potenciales de membrana menores a 50mV, los efectos de la polarización eléctrica son mínimos, ya que el modelo teórico no predice correctamente el comportamiento de α^* en esta región.

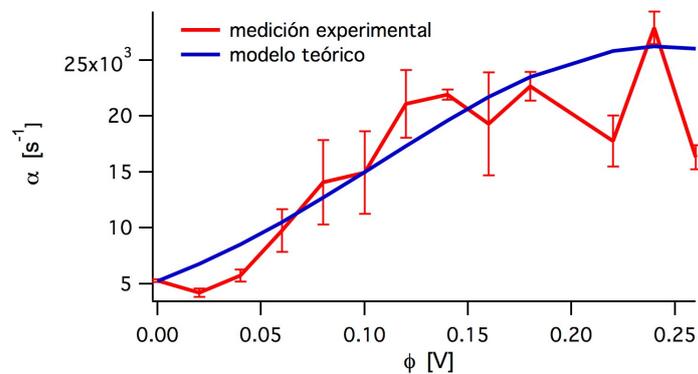


Figura 7.13: **Valores de α^* medidos a un intervalo de repolarización de 37,15μs, para distintos potenciales de membrana, comparados con los valores calculados utilizando la ecuación (7.7).**

Capítulo 8

Conclusiones

En esta tesis se obtuvieron mediciones de la constante de velocidad de apertura de la última transición de un canal iónico dependiente del voltaje; a partir de registros de corrientes iónicas macroscópicas obtenidos utilizando la técnica de *patch-clamp*. Los datos se obtuvieron en un rango de potenciales de membrana entre 0 y $260mV$. Los modelos tradicionales para la activación de un canal, sugieren que la constante de velocidad de apertura de la última transición del canal, α^* , depende exponencialmente en el potencial de membrana, V_m , de acuerdo a la ley de Arrhenius; sin embargo, las mediciones de α^* obtenidas en esta tesis muestran que esto no se cumple para valores de V_m mayores a $\approx 140mV$.

En esta tesis se propone que los efectos de polarización eléctrica de la proteína son los responsables de la disminución de la voltaje-dependencia de α^* a $V_m \gg 1$. Para cuantificar estos efectos se resolvió una ecuación electrostática que permite conocer el valor del campo eléctrico y el potencial eléctrico a lo largo de la proteína. Se consideró que la constante dieléctrica de la proteína depende tanto de la posición en el canal, y , como de la intensidad de campo eléctrico aplicado.

El proceso de activación del canal se modeló utilizando un modelo similar al propuesto por *Kramers* en [21], para reacciones químicas. Este tipo de modelo tiene la ventaja de explicar el origen microscópico de los cambios conformacionales en el canal, ya que considera las interacciones más relevantes del sensor de voltaje con el sistema. En este modelo, el movimiento del sensor de voltaje que produce la activación del canal, se representa por el movimiento de una partícula de compuerta cargada que debe difundirse por un paisaje energético. El paisaje energético en el que se difunde la partícula, está formado por un conjunto de barreras de potencial que representan las interacciones de corto alcance entre la partícula de compuerta y las demás moléculas que constituyen al canal; este conjunto de barreras se ve modificado por la presencia de un potencial externo. Este potencial externo corresponde al potencial eléctrico calculado tomando en cuenta los efectos de la polarización de la proteína.

Los valores de α^* calculados utilizando el modelo teórico planteado, concuerdan cualitativamente y cuantitativamente con las mediciones de α^* obtenidas experimentalmente en un rango de potenciales entre $50mV$ y $260mV$. Lo anterior sugiere que los efectos de polarización de la proteína son significativos y que contrariamente a lo que se creía, tienen una influencia en la cinética de apertura del canal.

Apéndice A

Representación de listones de la estructura de una proteína

Las proteínas son macromoléculas biológicas compuestas por cadenas polipeptídicas¹. Cada aminoácido de la cadena posee una estructura principal y un grupo funcional proyectado lateralmente. En total existen 20 tipos distintos de grupos funcionales, cada uno con distinto tamaño y composición química. Una vez sintetizada, una proteína debe doblarse para ser funcional. Las cadenas laterales de un aminoácido tienen un papel importante en el plegamiento de una proteína, estas crean enlaces de hidrógeno entre los péptidos de la cadena principal, enterrando las cadenas laterales no-polares de la proteína dentro de su estructura y lejos del agua, formando así estructuras secundarias tridimensionales conocidas como α -hélices y hojas- β .

Para representar la estructura tridimensional de una proteína se utilizan caricaturas conocidas como diagramas de listones. Un diagrama de listones se genera interpolando una curva suave alrededor de la cadena principal de polipéptidos de la proteína. Las α -hélices se representan por medio de listones enroscados, mientras que las hojas- β son flechas, las líneas o tubos delgados representan bucles (Figura A.1 (a)). En este tipo de diagramas los listones muestran la organización y orientación general de la cadena principal de péptidos de una proteína, a estos se les pueden agregar detalles de la estructura atómica de la proteína (Figura A.1 (b)) y las cadenas laterales de los aminoácidos (Figura A.1 (c)).

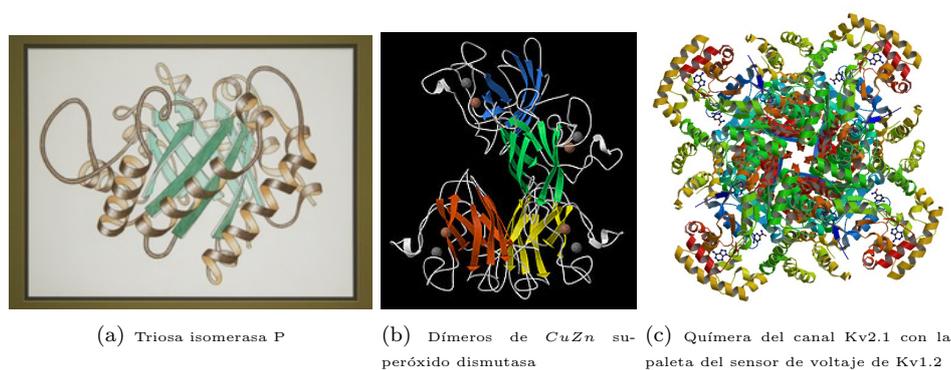


Figura A.1: **Diagramas de listones de distintas proteínas.** (Figuras a, b tomadas de [30]. Figura c tomada del PDB: 3LNM)

¹Un péptido es un polímero corto formado de aminoácidos unidos por medio de enlaces peptídicos.

Apéndice B

Teoría de Probabilidad

B.1. Variables Aleatorias

Al repetir un experimento cuyo resultado es aleatorio en un ensamble compuesto por N sistemas idénticos, se obtiene un conjunto de valores:

$$\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_N \quad (\text{B.1})$$

Para asociarle un número real a cada resultado se utiliza una variable aleatoria. Las variables aleatorias pueden ser discretas, si sólo pueden tomar valores enteros; ó continuas, si pueden tomar un continuo de valores distintos.

Si al realizar el experimento aleatorio en un ensamble, el resultado ξ es menor ó igual a un cierto valor x en M de los N sistemas del ensamble, al número de casos para los cuales $\xi \leq x$ se le conoce como frecuencia relativa M/N . En el límite cuando $N \rightarrow \infty$, la frecuencia relativa se convierte en $P(\xi \leq x)$, que es la probabilidad de que la variable aleatoria adquiera un valor menor ó igual a x . $P(\xi \leq x)$ debe ser una función no decreciente en x con la propiedad de que $P(\xi \leq \infty) = 1$.

Aunque el valor numérico de ξ_1, ξ_2, \dots no se puede predecir, existen cantidades predecibles en un ensamble cuando el número de sistemas que lo componen, N , tiende a infinito. A estas cantidades se les conoce como valores esperados y están definidas como:

$$\langle f(\xi) \rangle = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} [f(\xi_1) + \dots + f(\xi_N)] \quad (\text{B.2})$$

donde $f(\xi)$ es una función arbitraria. Si se considera que la función en B.2 es la función de Heaviside definida por:

$$f(\xi) = \Theta(x - \xi); \quad \Theta(x) = \begin{cases} 1 & x > 0 \\ 1/2 & \text{si } x = 0 \\ 0 & x < 0 \end{cases} \quad (\text{B.3})$$

se obtiene que:

$$\begin{aligned} P(\xi < x) + (1/2)P(\xi = x) &= \langle \Theta(x - \xi) \rangle \\ &= \lim_{N \rightarrow \infty} [\Theta(x - \xi_1) + \dots + \Theta(x - \xi_N)]/N \\ &= \lim_{N \rightarrow \infty} M/N = P(\xi \leq x) \end{aligned} \quad (\text{B.4})$$

A partir de la ecuación (B.4) se puede definir a la función densidad de probabilidad de una variable aleatoria, $W_\xi(x)$, como la derivada de P con respecto a x :

$$W_\xi(x) = \frac{d}{dx} P(\xi \leq x) = \frac{d}{dx} \langle \Theta(x - \xi) \rangle = \left\langle \frac{d}{dx} \Theta(x - \xi) \right\rangle = \langle \delta(x - \xi) \rangle \quad (\text{B.5})$$

Entonces la probabilidad dP , de que la variable aleatoria ξ tome un valor numérico en el intervalo $x \leq \xi \leq x + dx$ será:

$$P(\xi \leq x + dx) - P(\xi \leq x) = \frac{d}{dx}P(\xi \leq x)dx = W_\xi(x)dx \quad (\text{B.6})$$

Para variables aleatorias continuas, $W_\xi(x)$ usualmente es una función suave. Mientras que para variables discretas $W_\xi(x)$, se compone de una suma de funciones delta:

$$W_\xi(x) = \sum_n p_n \delta(x - x_n) \quad (\text{B.7})$$

donde $p_n = P(\xi = x_n)$, es la probabilidad de que la variable aleatoria tome el valor discreto x_n .

Las propiedades estadísticas de una variable aleatoria ξ están completamente determinadas por su función de densidad de probabilidad. Esto se debe a que cualquiera de los valores esperados de un ensamble puede ser determinado integrando W_ξ :

$$\langle f(\xi) \rangle = \left\langle \int f(x) \delta(x - \xi) dx \right\rangle = \int f(x) \langle \delta(x - \xi) \rangle = \int f(x) W_\xi(x) dx \quad (\text{B.8})$$

Probabilidad condicional

Si se considera un conjunto de r variables aleatorias ξ_1, \dots, ξ_r donde las últimas $r - 1$ variables toman un valor fijo $\xi_2 = x_2, \dots, \xi_r = x_r$, se obtiene una cierta densidad de probabilidad para la primera variable aleatoria ξ_1 . A esta densidad de probabilidad se le conoce como probabilidad condicional:

$$P(x_1 | x_2, \dots, x_r) \quad (\text{B.9})$$

Evidentemente la probabilidad $W_r(x_1, \dots, x_r) dx_1 \dots dx_r$ de que las variables aleatorias tomen valores dentro del intervalo $x_i \leq \xi_i \leq x_i + dx_i$ es la probabilidad de que la primera variable ξ_1 se encuentre dentro del intervalo $x_1 \leq \xi_1 \leq x_1 + dx_1$ mientras que las variables restantes adquieran valores $\xi_i = x_i (i = 2, \dots, r)$, multiplicada por la probabilidad $W_{r-1}(x_2, \dots, x_r)$ de que las $r - 1$ variables restantes adquieran valores en el intervalo $x_i \leq \xi_i \leq x_i + dx_i (i = 2, \dots, r)$, i.e.:

$$W_r(x_1, \dots, x_r) = P(x_1 | x_2, \dots, x_r) W_{r-1}(x_2, \dots, x_r) \quad (\text{B.10})$$

Y ya que se puede obtener la densidad de probabilidad de las primeras $i < r$ variables aleatorias integrando sobre las otras variables:

$$W_i(x_1, \dots, x_i) = \int \dots \int W_r(x_1, \dots, x_i, x_{i+1}, \dots, x_r) dx_{i+1} \dots dx_r \quad (\text{B.11})$$

con esto se puede reescribir la ecuación (B.10) como:

$$P(x_1 | x_2, \dots, x_r) = \frac{W_r(x_1, \dots, x_r)}{W_{r-1}(x_2, \dots, x_r)} = \frac{W_r(x_1, \dots, x_r)}{\int W_r(x_1, \dots, x_r) dx_1} \quad (\text{B.12})$$

Para el caso de dos variables aleatorias, a la densidad de probabilidad condicional en términos de W_2 , se le conoce como densidad de probabilidad conjunta:

$$P(x_1 | x_2) = \frac{W_2(x_1, x_2)}{\int W_2(x_1, x_2) dx_1} \quad (\text{B.13})$$

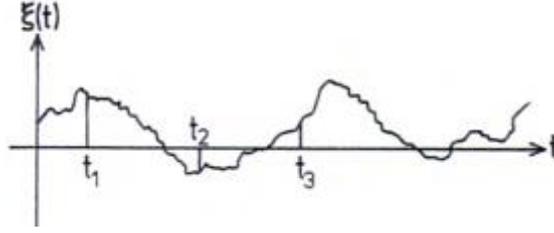


Figura B.1: Variable aleatoria dependiente del tiempo

B.1.1. Variables aleatorias dependientes del tiempo

Existen ciertas variables aleatorias ξ cuyo valor depende del tiempo t , i.e., $\xi = \xi(t)$. Por ejemplo, si se considera un ensamble de sistemas en los cuales se realiza la misma medición en distintos instantes de tiempo, el resultado en cada sistema, estará descrito por la variable aleatoria $\xi(t)$. La figura B.1 muestra un conjunto de valores posibles de ξ para distintos instantes de tiempo.

Ya que el resultado del experimento es aleatorio, no puede predecirse para un solo sistema del ensamble, pero se puede calcular su valor promedio en un instante de tiempo fijo $t = t_1$. Para esto se define una densidad de probabilidad:

$$W_1(x_1, t) = \langle \delta(x_1 - \xi(t_1)) \rangle \quad (\text{B.14})$$

$W_1(x_1, t)dx_1$ es la probabilidad de que la variable aleatoria $\xi(t_1)$ tome un valor en el intervalo $x_1 \leq \xi(t_1) \leq x_1 + dx_1$ en el instante de tiempo t_1 . También se puede calcular la probabilidad de que la variable aleatoria $\xi(t)$ tome un valor $x_1 \leq \xi(t_1) \leq x_1 + dx_1$ al tiempo t_1 , mientras que al tiempo t_2 su valor sea $x_2 \leq \xi(t_2) \leq x_2 + dx_2, \dots$, y al tiempo t_n tome un valor $x_n \leq \xi(t_n) \leq x_n + dx_n$. Esta probabilidad está determinada por la función de densidad de probabilidad:

$$W_n(x_n, t_n; \dots; x_1, t_1) dx_1 \dots dx_n \quad (\text{B.15})$$

haciendo una analogía con la ecuación B.5, W_n está dada por:

$$W_n(x_n, t_n; \dots; x_1, t_1) = \langle \delta(x_1 - \xi(t_1)) \dots \delta(x_n - \xi(t_n)) \rangle \quad (\text{B.16})$$

Una vez determinada la densidad de probabilidad descrita por la ecuación B.16, para cada t_i en el intervalo de tiempo $t_0 \leq t_i \leq t_0 + T$, se conoce por completo la dependencia temporal del proceso descrito por la variable aleatoria $\xi(t)$ en el intervalo $[t_0, t_0 + T]$. Integrando $W_n(x_n, t_n; \dots; x_1, t_1)$ se pueden obtener todos los valores promedio del proceso. Por ejemplo, utilizando la función de distribución, se puede definir una función de correlación $\langle \xi(t)\xi(t') \rangle$ como:

$$\langle \xi(t_2)\xi(t_1) \rangle = \int \int x_2 x_1 W_2(x_2, t_2; x_1, t_1) dx_2 dx_1 \quad (\text{B.17})$$

Al conjunto de valores que puede tomar la variable ξ , se le conoce como proceso estocástico.

B.1.2. Clasificación de los procesos estocásticos

En el caso de las variables aleatorias dependientes de tiempo, la densidad de probabilidad condicional se define como la densidad de probabilidad de la variable aleatoria ξ al tiempo t_n , bajo la condición de que la variable aleatoria al tiempo $t_{n-1} < t_n$ tenga el valor x_{n-1} ; al tiempo $t_{n-2} < t_{n-1}$ tenga el valor x_{n-2}, \dots ; y al tiempo $t_1 < t_2$ tenga el valor x_1 :

$$P(x_n, t_n | x_{n-1}, t_{n-1}; \dots; x_1, t_1) = \langle \delta(x_n - \xi(t_n)) \rangle_{\xi(t_{n-1})=x_{n-1}, \dots, \xi(t_1)=x_1} \quad (\text{B.18})$$

$$t_n > t_{n-1} > \dots > t_1$$

Análogamente a la ecuación (B.12) se puede expresar la densidad de probabilidad condicional en términos de W_n de la siguiente manera:

$$P(x_n, t_n | x_{n-1}, t_{n-1}; \dots; x_1, t_1) = \frac{W_n(x_n, t_n; \dots; x_1, t_1)}{W_{n-1}(x_{n-1}, t_{n-1}; \dots; x_1, t_1)} = \frac{W_n(x_n, t_n; \dots; x_1, t_1)}{\int W_n(x, t_n; \dots; x_1, t_1) dx_n} \quad (\text{B.19})$$

Utilizando la expresión (B.12), se puede escribir la probabilidad condicional (B.19) como:

$$P(x_n, t_n | x_{n-1}, t_{n-1}; \dots; x_1, t_1) = \frac{W_n(x_n, t_n; \dots; x_1, t_1)}{W_{n-1}(x_{n-1}, t_{n-1}; \dots; x_1, t_1)} = \frac{W_n(x_n, t_n; \dots; x_1, t_1)}{\int W_n(x_n, t_n; \dots; x_1, t_1) dx_n} \quad (\text{B.20})$$

Los procesos descritos por la variable aleatoria ξ , se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Procesos aleatorios puros: Un proceso es puramente aleatorio si su densidad de probabilidad condicional P_n ($n \geq 2$ arbitraria) es independiente de los valores $x_i = \xi(t_i)$ ($i < n$) que la variable aleatoria toma en un tiempo anterior $t_i < t_n$

$$P(x_n, t_n | x_{n-1}, t_{n-1}; \dots; x_1, t_1) = P(x_n, t_n). \quad (\text{B.21})$$

Se sigue entonces que

$$W_n(x_n, t_n; \dots; x_1, t_1) = P(x_n, t_n) W_{n-1}(x_{n-1}, t_{n-1}; \dots; x_1, t_1) \quad (\text{B.22})$$

Y si se aplica el mismo argumento ahora para W_{n-1} , etc. se puede factorizar W_n como:

$$W_n(x_n, t_n; \dots; x_1, t_1) = P(x_n, t_n) \dots P(x_1, t_1) \quad (\text{B.23})$$

De acuerdo a la ecuación (B.23), la información completa del proceso esta contenida en $P(x_1, t_1) = W_1(x_1, t_1)$. Para los sistemas físicos donde la variable aleatoria $\xi(t)$ es una función continua del tiempo, la variable aleatoria en dos tiempos arbitrariamente cercanos t_n y $t_{n-\epsilon}$, i.e $\xi(t_n)$ y $\xi(t_n - \epsilon)$, debe tener alguna correlación, por lo que las densidades de probabilidad no se pueden factorizar. Entonces un proceso puramente aleatorio no puede describir un sistema físico donde la variable aleatoria sea una función continua del tiempo.

- Procesos de Markov: Para un proceso de Markov, la densidad de probabilidad condicional depende sólo del valor $\xi(t_{n-1}) = x_{n-1}$ en el tiempo inmediato anterior, pero ya no depende de $\xi(t_{n-2}) = x_{n-2}$ y así sucesivamente:

$$P(x_n, t_n | x_{n-1}, t_{n-1}; \dots; x_1, t_1) = P(x_n, t_n | x_{n-1}, t_{n-1}) \quad (\text{B.24})$$

y de acuerdo a la ecuación (B.20) se obtiene:

$$W_n(x_n, t_n; \dots; x_1, t_1) = P(x_n, t_n | x_{n-1}, t_{n-1}) W_{n-1}(x_{n-1}, t_{n-1}; \dots; x_1, t_1) \quad (\text{B.25})$$

Y utilizando el argumento iterativamente:

$$W_n(x_n, t_n; \dots; x_1, t_1) = P(x_n, t_n | x_{n-1}, t_{n-1}) P(x_{n-1}, t_{n-1} | x_{n-2}, t_{n-2}) \dots P(x_2, t_2 | x_1, t_1) W_1(x_1, t_1) \quad (\text{B.26})$$

Debido a esta relación, a las probabilidades condicionales tambien se les conoce como probabilidades de transición. En particular para $n = 2$, la ecuación B.20, toma la forma:

$$P(x_2, t_2 | x_1, t_1) = \frac{W_2(x_2, t_2; x_1, t_1)}{W_1(x_1, t_1)} = \frac{W_2(x_2, t_2; x_1, t_1)}{\int W_2(x_2, t_2; x_1, t_1) dx_2} \quad (\text{B.27})$$

Entonces para un proceso de Markov, la información completa del proceso esta contenida en $W_2(x_2, t_2; x_1, t_1)$. Mientras que en un proceso puramente aleatorio no hay memoria de los valores de la variable aleatoria en un tiempo pasado, para un proceso de Markov, sólo hay memoria del valor de la variable aleatoria en un tiempo inmediato anterior, en el que

se midió ξ . La diferencia de tiempos $t_2 - t_1$ de la probabilidad condicional $P(x_2, t_2 | x_1, t_1)$ de un proceso de Markov es arbitraria. Si la diferencia entre los tiempos es muy grande, la dependencia de P en x_1 será pequeña, pero si la diferencia temporal es infinitesimalmente pequeña, la probabilidad condicional tendrá el valor x_1 , i.e:

$$\lim_{t_1 \rightarrow t_2} P(x_2, t_2 | x_1, t_1) = \delta(x_1 - x_2) \quad (\text{B.28})$$

- Procesos generales: Se pueden considerar procesos donde la densidad de probabilidad condicional, sólo depende de los valores de la variable aleatoria en los dos últimos instantes de tiempo. En este caso, la información completa del proceso esta contenida en W_3 . Así podemos continuar, para procesos donde la información este contenida en W_4 y así sucesivamente, pero esta clasificación no es apropiada para procesos que no son de Markov. Para procesos no Markovianos, se puede considerar además de $\xi(t) = \xi_1(t)$ más variables aleatorias $\xi_2(t), \dots, \xi_r(t)$. Si se escogen de manera correcta estas variables adicionales, es posible obtener un proceso de Markov para las r variables aleatorias.

B.1.3. Ecuación de Chapman-Kolmogorov

La densidad de probabilidad W_2 se obtiene de W_3 integrando sobre una coordenada. Entonces se tiene que:

$$W_2(x_3, t_3; x_1, t_1) = \int W_3(x_3, t_3; x_2, t_2; x_1, t_1) dx_2 \quad (\text{B.29})$$

Para un proceso de Markov, se puede escribir la ecuación (B.29) de la forma (asumiendo que $t_3 \geq t_2 \geq t_1$):

$$P(x_3, t_3 | x_1, t_1) W_1(x_1, t_1) = \int P(x_3, t_3 | x_2, t_2) P(x_2, t_2 | x_1, t_1) W_1(x_1, t_1) dx_2 \quad (\text{B.30})$$

Ya que $W_1(x_1, t_1)$ es arbitraria, se obtiene la ecuación de Chapman-Kolmogorov:

$$P(x_3, t_3 | x_1, t_1) = \int P(x_3, t_3 | x_2, t_2) P(x_2, t_2 | x_1, t_1) dx_2 \quad (\text{B.31})$$

La ecuación (B.31) puede interpretarse de la siguiente manera. La probabilidad de transición de x_1 al tiempo t_1 a x_3 al tiempo t_3 es la misma que la probabilidad de transición de x_1 al tiempo t_1 , a x_2 al tiempo t_2 multiplicada por la probabilidad de transición de x_2 al tiempo t_2 a x_3 al tiempo t_3 para todas las posibles x_2 .

B.2. Ecuación de Langevin

La ecuación de Langevin es una ecuación diferencial que describe la variación en el tiempo de un proceso estocástico. Desde un punto de vista físico, es una ecuación de movimiento Newtoniana, que utiliza campos de fuerza efectivos para describir la evolución temporal de un subconjunto de grados de libertad. Estos grados de libertad típicamente son variables macroscópicas de un sistema que cambian lentamente en comparación a las variables microscópicas del sistema. Las variables microscópicas son las responsables de la naturaleza estocástica de la ecuación de Langevin. Para una variable estocástica ξ , la ecuación general de Langevin tiene la forma:

$$\dot{\xi} = h(\xi, t) + g(\xi, t)\Gamma(t) \quad (\text{B.32})$$

Donde la fuerza de Langevin $\Gamma(t)$ describe la fuerza aleatoria en el sistema por unidad de masa. $\Gamma(t)$ es una variable aleatoria Gaussiana con media cero y función de correlación δ , con la siguiente normalización:

$$\begin{aligned} \langle \Gamma(t) \rangle &= 0 \\ \langle \Gamma(t)\Gamma(t') \rangle &= 2\delta(t - t') \end{aligned} \quad (\text{B.33})$$

B.3. Ecuación de Fokker-Planck

Debido a la naturaleza estocástica de la ecuación de Langevin (B.32), al resolverla no se obtiene información acerca del proceso que describe. En su lugar se deben considerar las propiedades estadísticas del proceso, tales como su densidad de probabilidad, sus valores promedio en un ensemble ó en el tiempo, su función de autocorrelación, etc. En particular, es necesario conocer la evolución temporal de la función de distribución de probabilidad $W(x, t)$ para el proceso $x(t)$, ya que esta función describe la probabilidad de encontrar una partícula en una posición determinada en todos los instantes de tiempo.

Considerando la probabilidad condicional definida por la ecuación (B.18), se sigue que la densidad de probabilidad $W(x, t + \tau)$ en el instante de tiempo $t + \tau$ y la densidad de probabilidad $W(x, t)$ al tiempo t , se relacionan por medio de la ecuación:

$$W(x, t + \tau) = \int P(x, t + \tau | x', t) W(x', t) dx' \quad (\text{B.34})$$

Si se introduce la variable $\Delta = x - x'$, el integrando en la ecuación B.34 puede expandirse en una serie de Taylor:

$$\begin{aligned} P(x, t + \tau | x', t) W(x', t) &= P(x - \Delta + \Delta, t + \tau | x - \Delta, t) W(x - \Delta, t) \\ &= \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n!} \Delta^n \left(\frac{\partial}{\partial x} \right)^n P(x + \Delta, t + \tau | x, t) W(x, t) \end{aligned} \quad (\text{B.35})$$

Sustituyendo la expresión (B.35) en la ecuación (B.34) e integrando sobre Δ se obtiene :

$$W(x, t + \tau) - W(x, t) = \frac{\partial W(x, t)}{\partial t} \tau + O(\tau^2) = \sum_{n=1}^{\infty} \left(-\frac{\partial}{\partial x} \right)^n [M_n(x, t, \tau)/n!] W(x, t) \quad (\text{B.36})$$

donde se supone que se conocen los momentos:

$$M_n(x', t, \tau) = \langle [\xi(t + \tau) - \xi(t)]^n \rangle_{\xi(t)=x'} = \int (x - x')^n P(x, t + \tau | x', t) dx \quad (\text{B.37})$$

Y si se desarrollan los momentos M_n en una serie de Taylor con respecto a τ ($n \geq 1$) se obtiene:

$$M_n(x, t, \tau)/n! = D^{(n)}(x, t) \tau + O(\tau^2) \quad (\text{B.38})$$

El término con τ^0 debe ser cero, ya que para $\tau = 0$, la probabilidad de transición P tiene el valor inicial:

$$P(x, t | x', t) = \delta(x - x') \quad (\text{B.39})$$

esto da origen a momentos (B.37) que son cero. Por lo que sólo se consideran los términos lineales en τ y con esto se obtiene:

$$\frac{\partial W(x, t)}{\partial t} = \sum_{n=1}^{\infty} \left(-\frac{\partial}{\partial x} \right)^n D^{(n)}(x, t) W(x, t) = L_{KM} W \quad (\text{B.40})$$

donde L_{KM} es el operador de Kramers-Moyal, definido por :

$$L_{KM}(x, t) = \sum_{n=1}^{\infty} (-\partial/\partial x)^n D^{(n)}(x, t) \quad (\text{B.41})$$

A la ecuación (B.40) se le conoce como expansión de Kramers-Moyal.

Para un proceso no Markoviano, la probabilidad condicional B.34 depende de los valores de la

variable estocástica $\xi(t')$ a tiempos anteriores $t, < t$. Debido a esto los momentos B.37 y sus coeficientes de expansión $D^{(n)}$ dependen de estos tiempos anteriores. Pero para un proceso de Markov, los coeficientes $D^{(n)}$ no dependen de los valores de $\xi(t')$ en tiempos anteriores. Entonces la ecuación B.40 se convierte en una ecuación diferencial de primer orden para la función de distribución $W(x, t)$, con la codicion inicial $W(x, t_0) t > t_0$ y para condiciones de frontera apropiadas. Por lo que se asume que el proceso descrito por $W(x, t)$ es un proceso de Markov.

La probabilidad de transición $P(x, t|x', t')$ es la función de distribución $W(x, t)$ para la condición inicial especial de que $W(x, t') = \delta(x - x')$. Por lo que la probabilidad de transición también debe obedecer la ecuación (B.40), i.e.:

$$\partial P(x, t|x', t')/\partial t = L_{KM}(x, t)P(x, t|x', t') \quad (\text{B.42})$$

con t reemplazado por t' . donde la condición inicial de P esta dada por B.39.

Si se corta el desarrollo de Kramers-Moyal B.40 hasta el segundo término, se obtiene la ecuación de Fokker-Planck (F-P):

$$\begin{aligned} \frac{\partial W}{\partial t}(x, t) &= L_{FP}W(x, t) , \\ L_{FP} &= -\frac{\partial}{\partial x}D^{(1)}(x, t) + \frac{\partial^2}{\partial x^2}D^{(2)}(x, t). \end{aligned} \quad (\text{B.43})$$

Los coeficientes $D^{(1)}$ y $D^{(2)}$ se obtienen a partir de la ecuación de Langevin y se conocen como coeficientes de arrastre (*drift*) y difusión.

La ecuación (B.43) puede ser reescrita en la forma:

$$\begin{aligned} \frac{\partial W}{\partial t} + \frac{\partial S}{\partial x} &= 0 \quad \text{donde} \\ S(x, t) &= \left[D^{(1)}(x, t) - \frac{\partial}{\partial x}D^{(2)}(x, t) \right] W(x, t) \end{aligned} \quad (\text{B.44})$$

Ya que la ecuación (B.44), es una ecuación de continuidad para la distribuión de probabilidad $W(x, t)$, S debe ser interpretada como una corriente de probabilidad. Para un proceso estacionario, la corriente de probabilidad debe ser constante, con condiciones de frontera naturales, la corriente de probabilidad debe ser cero.

B.3.1. Soluciones estacionarias de la ecuación de F-P

Para soluciones estacionarias, la corriente de probabilidad S descrita en la ecuación (B.44) debe ser constante. Entonces si S es cero para alguna x , esta debe ser cero para toda x . entonces para $S = 0$ se obtiene la ecuación de continuidad:

$$D^{(1)}(x)W_{st}(x) = \frac{D^{(1)}}{D^{(2)}}D^{(2)}(x)W_{st}(x) = \frac{\partial}{\partial x}D^{(2)}(x)W_{st}(t) \quad (\text{B.45})$$

La expresión anterior se puede integrar, obteniendose:

$$W_{st}(x) = \frac{N_0}{D^{(2)}(x)} \exp\left(\int^x \frac{D^{(1)}(x')}{D^{(2)}(x')} dx'\right) = Ne^{-\Phi(x)} \quad (\text{B.46})$$

donde N_0 es la constante de integración, que debe ser escogida tal que W_{st} este normalizada. En la ecuación anterior se introdujo el potencial:

$$\Phi(x) = \ln D^{(2)}(x) - \int^x \frac{D^{(1)}(x')}{D^{(2)}(x')} dx' \quad (\text{B.47})$$

al introducir este potencial, la corriente de probabilidad puede ser escrita de la forma:

$$S(x, t) = -D^{(2)}(x)e^{-\Phi(x)} \frac{\partial}{\partial x} [e^{\Phi(x)} W(x, t)] \quad (\text{B.48})$$

En el estado estacionario, donde S es constante, se tiene para S arbitraria:

$$W_{st}(x) = Ne^{-\Phi(x)} - Se^{-\Phi(x)} \int^x \frac{e^{\Phi(x')}}{D^{(2)}(x')} dx' \quad (\text{B.49})$$

Una de las constantes de integración en la ecuación (B.49) es determinada por la normalización:

$$\int W_{st}(x) = 1 \quad (\text{B.50})$$

La otra constante debe ser determinada de las condiciones de frontera del problema particular.

Para ilustrar la utilidad de la ecuación de F-P, a continuación se calcula la función de distribución estacionaria para un proceso de movimiento Browniano descrito por la ecuación de Langevin 4.3. En este caso los coeficientes de arrastre y difusión en la ecuación de F-P son:

$$D^{(1)} = -\gamma v; \quad D^{(2)} = q/2 = \gamma k_B T/m \quad (\text{B.51})$$

Por lo que la corriente de probabilidad es:

$$S = \left(-\gamma v - \frac{\gamma k_B T}{m} \frac{\partial}{\partial v} \right) W = 0 \quad (\text{B.52})$$

la ecuación (B.52) es una ecuación diferencial para W cuya solución es:

$$W(v) = \sqrt{\frac{m}{2\pi k_B T}} \exp\left(-\frac{mv^2}{2k_B T}\right) \quad (\text{B.53})$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura, v la velocidad de la partícula, m su masa. La normalización utilizada al resolver la ecuación (B.52) es tal que se obtenga como resultado una distribución de velocidades de Maxwell.

B.3.2. Coeficientes de arrastre y difusión para un proceso estocástico descrito por la ecuación de Langevin

Usualmente no se puede obtener una solución general de la ecuación diferencial estocástica B.32, sin embargo se puede formular una ecuación de F-P para calcular la densidad de probabilidad de la variable estocástica. En la ecuación de F-P aparecen los siguientes coeficientes de la expansión de K-M:

$$D^{(n)}(x, t) = \frac{1}{n!} \lim_{\tau \rightarrow 0} \frac{1}{\tau} \langle [\xi(t+\tau) - x]^n \rangle_{\xi(t)=x} \quad (\text{B.54})$$

donde $\xi(t+\tau)$ $\tau > 0$ es una solución de la ecuación (B.32). Esta solución tiene un valor determinado $\xi(t) = x$ al tiempo t . Para obtener el valor de los coeficientes del desarrollo de K-M, se reescribe la ecuación diferencial (B.32) como una ecuación integral:

$$\xi(t+\tau) - x = \int_t^{t+\tau} [h(\xi(t'), t') + g(\xi(t'), t')\Gamma(t')] dt' \quad (\text{B.55})$$

y se supone que h y g pueden ser expandidas de acuerdo a:

$$\begin{aligned} h(\xi(t'), t') &= h(x, t') + h'(x, t')(\xi(t') - x) + \dots \\ g(\xi(t'), t') &= g(x, t') + g'(x, t')(\xi(t') - x) + \dots \end{aligned} \quad (\text{B.56})$$

donde se ha introducido la notación:

$$\begin{aligned} (\partial/\partial\xi(t'))h(\xi(t'), t')|_{\xi(t')=x} &\equiv (\partial/\partial x)h(x, t') \equiv h'(x, t') \\ (\partial/\partial\xi(t'))g(\xi(t'), t')|_{\xi(t')=x} &\equiv (\partial/\partial x)g(x, t') \equiv g'(x, t') \end{aligned} \quad (\text{B.57})$$

Sustituyendo la expresión (B.56) en la ecuación (B.55) se obtiene:

$$\begin{aligned} \xi(t + \tau) - x &= \int_t^{t+\tau} h(x, t')dt' + \int_t^{t+\tau} h'(x, t')(\xi(t') - x)dt' + \dots \\ &+ \int_t^{t+\tau} g(x, t')\Gamma(t')dt' + \int_t^{t+\tau} g'(x, t')(\xi(t') - x)\Gamma(t')dt' + \dots \end{aligned} \quad (\text{B.58})$$

Para $\xi(t') - x$ en el integrando, se itera (B.58), produciendo:

$$\begin{aligned} \xi(t + \tau) - x &= \int_t^{t+\tau} h(x, t')dt' + \int_t^{t+\tau} h'(x, t') \int_t^{t'} h(x, t'')dt'' dt' \\ &+ \int_t^{t+\tau} h'(x, t') \int_t^{t'} g(x, t'')\Gamma(t'')dt'' dt' + \dots \\ &+ \int_t^{t+\tau} g(x, t')\Gamma(t')dt' + \int_t^{t+\tau} g'(x, t') \int_t^{t'} h(x, t'')\Gamma(t'')dt'' dt' \\ &+ \int_t^{t+\tau} g'(x, t') \int_t^{t'} g(x, t'')\Gamma(t'')\Gamma(t')dt'' dt' + \dots \end{aligned} \quad (\text{B.59})$$

Iterando el desarrollo repetidamente, sólo las fuerzas de Langevin y las funciones conocidas $g(x, t)$, $h(x, t)$ y sus derivadas aparecen del lado derecho de la ecuación (B.59). Si ahora se toma el promedio de la ecuación (B.59) y se utilizan las propiedades de $\Gamma(t)$ descritas en (B.33) se obtiene:

$$\begin{aligned} \langle \xi(t + \tau) - x \rangle &= \int_t^{t+\tau} h(x, t')dt' + \int_t^{t+\tau} \int_t^{t'} h'(x, t')h(x, t'')dt'' dt' + \dots \\ &+ \int_t^{t+\tau} g'(x, t') \int_t^{t'} g(x, t'')2\delta(t'' - t')dt'' dt' + \dots \end{aligned} \quad (\text{B.60})$$

Ahora, si se toma la siguiente representación de la función δ en la ecuación (B.60):

$$\delta_\epsilon(t) = \begin{cases} \frac{1}{\epsilon} & \frac{\epsilon}{2} < t < \frac{\epsilon}{2} \\ 0 & \text{si } x = 0 \end{cases} \quad (\text{B.61})$$

Y se toma el límite cuando $\epsilon \rightarrow 0$, se tiene:

$$\begin{aligned} \int_t^{t'} g(x, t'')2\delta(t'' - t')dt'' &= g(x, t') \int_t^{t'} 2\delta(t'' - t')dt'' \\ &= g(x, t') \end{aligned} \quad (\text{B.62})$$

Sustituyendo la expresión anterior en la ecuación (B.60) finalmente se obtiene:

$$\begin{aligned} \langle \xi(t + \tau) - x \rangle &= \int_t^{t+\tau} h(x, t')dt' + \int_t^{t+\tau} \int_t^{t'} h'(x, t')h(x, t'')dt'' dt' + \dots \\ &+ \int_t^{t+\tau} g'(x, t')g(x, t')dt' + \dots \end{aligned} \quad (\text{B.63})$$

Al obtener el límite cuando $\tau \rightarrow 0$ y sustituirlo en la ecuación (B.54), se llega a la expresión final del primer coeficiente de la expansión de K-M:

$$D^{(1)}(x, t) = h(x, t) + g'(x, t)g(x, t) \quad (\text{B.64})$$

Las integrales omitidas en (B.63) no contribuyen en el límite $\tau \rightarrow 0$. Esto se puede ver de la siguiente manera: cada fuerza de Langevin del lado derecho de la ecuación (B.59) se encuentra acompañada de una integral. Los términos de orden menor están escritos en la ecuación (B.59). Los términos de orden superior desaparecen al tomar el límite en la ecuación (B.54). Por ejemplo, las integrales de la forma:

$$\left\langle \int_t^{t+\tau} \dots \Gamma(t_1) \int_t^{t_1} \dots \Gamma(t_2) \int_t^{t_2} \dots \Gamma(t_3) \int_t^{t_3} \dots \Gamma(t_4) dt_1 dt_2 dt_3 dt_4 \right\rangle \quad (\text{B.65})$$

sólo pueden dar una contribución proporcional a τ^2 , que desaparece al tomar el límite en la ecuación (B.54). Las integrales que no contienen a la fuerza de Langevin son proporcionales a τ^n , donde n es el número de integrales. Entonces para el límite en la ecuación B.54 sólo los términos con una de esas integrales sobrevivirán. Usando estos argumentos se obtiene que la expresión para el segundo coeficiente del desarrollo de K-M es:

$$\begin{aligned} D^{(2)}(x, t) &= \frac{1}{2} \lim_{\tau \rightarrow 0} \frac{1}{\tau} \int_t^{t+\tau} \int_t^{t+\tau} g(x, t') g(x, t'') 2\delta(t' - t'') dt' dt'' \\ &= g^2(x, t) \end{aligned} \quad (\text{B.66})$$

Al utilizar estos mismos argumentos para coeficientes de orden superior $D^{(n)}$, se concluye que todos son cero para $n \geq 3$. El resultado final es:

$$\begin{aligned} D^{(1)}(x, t) &= h(x, t) + \frac{\partial g(x, t)}{\partial x} g(x, t) \\ D^{(2)}(x, t) &= g^2(x, t) \\ D^{(n)}(x, t) &= 0 \quad \text{para } n \geq 3 \end{aligned} \quad (\text{B.67})$$

Utilizando las expresiones (B.67) se pueden calcular los coeficientes de la ecuación de F-P.

Apéndice C

Solución de la ecuación electrostática

En esta sección se describe a detalle el procedimiento realizado para resolver la ecuación diferencial (C.6) para el campo eléctrico E y el potencial eléctrico ϕ . La ecuación diferencial a resolver es:

$$\frac{d}{dy}E(1 - \chi y E^2) = 0 \quad (\text{C.1})$$

al integrar la ecuación anterior se obtiene:

$$E(1 - \chi y E^2) = C \quad (\text{C.2})$$

donde C es la constante de integración. La ecuación C.2 se puede reescribir como:

$$\chi y E^3 - E + C \equiv g(E) \quad (\text{C.3})$$

La función $g(E)$ es una ecuación cúbica para el campo eléctrico E , y a la vez una ecuación diferencial no lineal para el potencial eléctrico ϕ . Para poder obtener una solución analítica de dicha ecuación, es necesario aproximar la función cúbica $g(E)$, por una función cuadrática $h(E) \equiv aE^2 + bE + c$, alrededor de un valor máximo. Debido a que se está modelando la polarización a potenciales de membrana grandes (que corresponden a valores grandes del campo eléctrico), es importante que la función $h(E)$ tenga el mismo comportamiento que $g(E)$ alrededor de su máximo E_0 , para que esta suceda, la función $h(E)$ debe cumplir con los siguientes criterios:

$$\begin{aligned} g(E_0) &= h(E_0) \\ g'(E_0) &= h'(E_0) = 0 \end{aligned} \quad (\text{C.4})$$

Adicionalmente, se toma en cuenta la condición $g(0) = h(0)$. Esta condición junto con los criterios C.4, representan un sistema de ecuaciones para a, b, c . Al resolver este sistema se obtiene la forma funcional de $h(E)$:

$$h(E) \equiv -2 \left(\frac{\chi y}{3} \right)^{1/2} E^2 + \frac{4}{3} E - C \quad (\text{C.5})$$

La figura C.1 muestra una gráfica de las funciones $g(E)$ y $h(E)$ para valores de y, χ fijos, la región donde es importante tener una buena aproximación de la ecuación cúbica es el intervalo $[0, L]$, donde L es la longitud de la proteína. Se puede observar que en la región alrededor de E_0 , la función cuadrática es una buena aproximación de la cúbica alrededor del máximo. Calculando las raíces de la ecuación (C.5), se puede obtener una expresión para E :

$$E = \left(\frac{1}{3\chi y} \right)^{1/2} \pm \left(\frac{1}{3\chi y} - \frac{3^{1/2}C}{2(\chi y)^{1/2}} \right)^{1/2} \quad (\text{C.6})$$

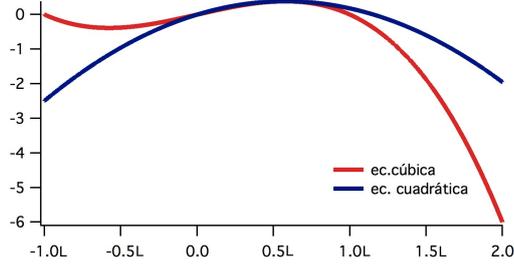


Figura C.1: **Gráfica de las funciones $g(E)$ y $h(E)$ en la región de interés.** Esta gráfica se obtuvo para $\chi = 1$, $y = L$, $C = 0$.

como se busca encontrar una solución de la ecuación C.6 en el intervalo $[0, L]$, se debe tomar la raíz con el segundo término negativo¹, ya que la otra raíz se encuentra fuera del intervalo $[0, L]$. En términos de potencial eléctrico, la ecuación (C.6) se puede escribir como:

$$-\frac{d\phi}{dx} = \left(\frac{1}{3\chi y}\right)^{1/2} - \left(\frac{1}{3\chi y} - \frac{3^{1/2}C}{2(\chi y)^{1/2}}\right) \quad (C.7)$$

La ecuación C.7 se puede integrar fácilmente para así obtener el potencial eléctrico ϕ :

$$\phi(y) = -2\left(\frac{y}{3\chi}\right)^{1/2} - \frac{2^{3/2}}{27\chi C}(2 - 3^{3/2}C\chi^{1/2}y^{1/2})^{3/2} + D \quad (C.8)$$

donde D es la constante de integración. Para determinar C y D se utilizan las condiciones de frontera:

$$\begin{aligned} \phi(0) &= 0 \\ \phi(L) &= V_m \end{aligned} \quad (C.9)$$

donde V_m es el potencial de membrana. De la primera condición en la ecuación C.9 se obtiene que $D = \frac{8}{27\chi C}$, dando como resultado la siguiente expresión para el potencial eléctrico:

$$\phi(y) = -2\left(\frac{y}{3\chi}\right)^{1/2} - \frac{2^{3/2}}{27\chi C}(2 - 3^{3/2}C\chi^{1/2}y^{1/2})^{3/2} + \frac{8}{27\chi C} \quad (C.10)$$

Ahora, si se considera que el efecto de la polarización eléctrica es pequeño i.e $\chi \ll 1$, se puede desarrollar en una serie de Taylor el segundo término de la ecuación C.10, tomando esta aproximación hasta tercer orden, se obtiene la siguiente expresión para el potencial eléctrico:

$$\phi(y) = \frac{-3}{4}Cy - \frac{3^{3/2}C^2\chi^{1/2}y^{3/2}}{16} \quad (C.11)$$

El valor de C se calcula utilizando la segunda condición de frontera dada or la ecuación (C.9), dando como resultado $C = \frac{-4V_m}{3L}$. Sustituyendo este valor en la ecuación C.11 se obtiene la expresión final para el potencial eléctrico ϕ , y al derivarla se obtiene el campo eléctrico E :

$$\begin{aligned} \phi(y) &= \frac{V_m}{L}y - \frac{V_m^2\chi^{1/2}}{3^{1/2}L^2}y^{3/2} \\ E &= \frac{-V_m}{L} + \frac{3^{1/2}V_m^2\chi^{1/2}}{2L^2}y^{1/2} \end{aligned} \quad (C.12)$$

¹Ya que el problema tiene dos raíces, al primera se puede pensar que se trata de un problema de frontera libre, sin embargo un análisis mas cercano revela que la raíz positiva se encuentra fuera del intervalo que corresponde a la longitud del canal.

Bibliografía

- [1] Bruce Alberts et al. (1994), *Molecular Biology of the cell*, 2^a Edición, Garland Science.
- [2] Bertil Hille (1992), *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2^a Edición, Sinauer Associates Inc.
- [3] R. Phillips, J. Kondev, J. Theriot (2009) *Physical Biology of the Cell*, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- [4] David J. Griffiths (1999), *Introduction to Electrodynamics*, 3^a Edición, Prentice Hall, Inc.
- [5] Areles Molleman (2003), *Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology*, pp.5-42 John Wiley and Sons, Ltd.
- [6] Gary Yellen (2002), *The voltage-gated potassium channels and their relatives*, Nature **419**, 35–42
- [7] Kenton J. Swartz (2008), *Sensing voltage across lipid membranes*, Nature **456** , 891–897.
- [8] Jiang, Y. et al (2003), *X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel*, Nature **423**, 33–41.
- [9] Long, S. B, Campbell, E.B & Mackinnon, R (2005), *Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel*, Science **309**, 897–903.
- [10] Long, S. B, Tao X, Campbell, E.B & Mackinnon, R (2007), *Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment*, Nature **450**, 376–382.
- [11] O.P Hamill, A.Marty, E.Neher, B.Sakmann, F.J.Sigworth, *Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches*, European Journal of Physiology **391** (1981), 85–100.
- [12] Ogden, D. and Stanfield, P.R (1994) *Patch Clamp Techniques for single channel and whole cell recording*. In *Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook*, 2nd edition, ed. D. Ogden, pp.53-78, Cambridge: Company of Biologists.
- [13] F. J. Sigworth (1993), *Voltage gating of ion channels*, Quarterly Reviews of Biophysics **27** , 1–40.
- [14] Bert Sakmann and Erwin Neher (1995) *Single-Channel Recording*, 2^a edición, Plenum Press.
- [15] N.E. Schoppa and F.J. Sigworth (1998), *Activation of Shaker Potassium Channels. I. Characterization of Voltage-dependent Transitions*, J. Gen. Physiol. **111**, 271–294.
- [16] N.E. Schoppa and F.J. Sigworth (1998), *Activation of Shaker Potassium Channels. II. Kinetics of the V2 Mutant Channel* , J. Gen. Physiol. **111**, 295–311.
- [17] D. Sigg, H.Qian, F.Bezanilla (1999), *Kramer's Diffusion Theory Applied to Gating Kinetics of Voltage-Dependent Ion Channels*, Biophysical Journal **76** , 782–803.

- [18] K. Schulten, I.Kosztin (2000), *Lectures in theoretical Biophysics*, Notas del curso de biofísica teórica, Departamento de Física, University of Illinois Urbana-Champaign.
- [19] H.Risken (1989) *The Fokker-Planck equation*, 2^a Edición, Springer.
- [20] Zeev Schuss (1980) *Theory and applications of Stochastic Differential Equations*, John Wiley and Sons, Ltd.
- [21] H.A. Kramers (1940), *Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions*, Physica **7** , 284–304.
- [22] B. Matkowsky and Z.Schuss (1982), *Kramers' diffusion problem and diffusion across characteristic boundaries. in Theory and applications of singular perturbations*, Lecture notes in Mathematics, Volume 942, 315-345 Springer.
- [23] A.L. Goldin (1992), *Maintenance of Xenopus Laevis and Oocyte Injection*, Methods Enzymology **207**, 266–279.
- [24] Charles F. Stevens (1978), *Interactions between intrinsic membrane protein and electric field. An approach to studying nerve excitability*, Biophysical Journal **22** , 295–306.
- [25] Jin Aun Ng, Taira Vora, Vikram Krishnamurthy, Shin-Ho Chung (2008), *Estimating the dielectric constant of the channel protein and pore* , Eur. Biophysics J. **37**, 213–222
- [26] Sansom, M.S., G.R. Smith, C.Adcock, and P.C. Biggin (1997), *The dielectric properties of water within model transbilayer pores*, Biophys. J. **73**, 2404–2415
- [27] Sheinerman, F.B., R. Norel, and B. Honing (2000), *Electrostatic aspects of protein-protein interactions*, Curr. Opin. Struct. Biol. **10**, 153–159
- [28] Hwangseo Park and Young Ho Jeon (2007), *Cubic equation governing the outer-region dielectric constant of globular proteins*, Physical Review E **75**, 021916
- [29] Leila Bouledjnib and Salah Sahli (2010), *Investigation Of Pores on Dielectric Constant Value in Low k Materials Using Monte Carlo Method*, M. J. Condensed Matter **12**, 200–203
- [30] http://en.wikipedia.org/wiki/Ribbon_diagram
- [31] A. E. Siegman (1979), *Simplified derivation of the Fokker-Planck equation*, Am. J. Phys. **477** , 545–547.