



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

**DINÁMICA DE LA EXPRESIÓN DE POROS TRANSMEMBRANALES Y SUS
MECANISMOS DE ACCIÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS (FÍSICA)

PRESENTA:

KARLA SUSANA RÉCAMIER MÉNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. IVÁN ORTEGA BLAKE

INSTITUTO DE CIENCIAS FÍSICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ARMANDO ANTILLÓN DÍAZ

INSTITUTO DE CIENCIAS FÍSICAS

DR. PUNIT PARMANANDA ARORA

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY BOMBAY

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO 2018



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.

Índice

Prólogo.....	1
Capítulo 1. Motivación.....	2
Capítulo 2. Introducción.....	4
2.1. Membrana celular.....	5
2.2. Modelos relevantes.....	9
2.2.1. Modelo de Hodgkin y Huxley.....	11
2.2.2. Modelo de Fitzhugh Nagumo.....	17
2.2.3. Modelo de Hindmarsh Rose.....	18
2.3. Neher y Sakmann: la técnica de "patch-clamp".....	19
2.4. Características de la Amfotericina B.....	22
2.5. Antibióticos peptídicos.....	28
2.6. Características biofísicas de la membrana.....	30
2.7. Resonadores nanomecánicos.....	34
2.8. Dinámica de la expresión de canales.....	38
2.9. Objetivos.....	41
Capítulo 3. Materiales y Métodos.....	42
3.1. Preparación de soluciones.....	42
3.2. Preparación de suspensión liposomal.....	43
3.3. Incorporación de AmB.....	43
3.4. Fabricación de micropipetas.....	44
3.5. Técnica de "bubble number".....	44

3.6. Formación de bicapas lipídicas con la técnica "tip-dip".....	45
Capítulo 4. Resultados.....	48
4.1. Conductancia como función de la frecuencia.....	48
4.2. Ocupancia como función de la frecuencia.....	58
4.3. Oxidación de la membrana.....	61
4.4. Consideraciones importantes de los experimentos.....	64
Capítulo 5. Discusión.....	67
Capítulo 6. Conclusiones.....	70
Capítulo 7. Perspectivas.....	71
Apéndice 1. Protocolos de adquisición.....	73
Apéndice 2. Programas de análisis.....	77
Artículo publicado.....	90
Bibliografía.....	94

Prólogo

En este trabajo consideramos la posibilidad de que la formación de poros en las membranas lipídicas tenga un componente determinista subyacente. Es decir, que en lugar de que la apertura y cierre de los canales sea un proceso azaroso exista un orden en su dinámica autónoma. Para verificar esta hipótesis se realizaron experimentos bajo condiciones potencio-dinámicas, es decir, se aplicaron trenes de pulsos cuadrados de diferentes frecuencias a membranas de POPC y 30% mol colesterol en presencia de 35 μM de Anfotericina B (AmB). Primeramente, se construyeron los protocolos de adquisición necesarios para dicho estudio. Se realizaron pruebas y se determinó el rango de amplitud de voltaje y frecuencia de pulsos a estudiar. De modo que una vez formada la bicapa lipídica, se aplicó un potencial de 100 mV, se confirmó que la membrana era estable y la presencia de canales de AmB. Posteriormente, se realizaron distintos registros de la actividad aplicando un potencial de paso cuadrado de 90 a 100 mV a distintas frecuencias (0.05-2 Hz). Finalmente, con una serie de programas desarrollados en nuestro laboratorio, se procesaron los registros para restar la corriente de pérdida y la corriente capacitiva. Los resultados obtenidos muestran un aumento de la actividad de los canales de AmB a frecuencias bajas seguido de un decremento monotónico a frecuencias altas, lo cual se aprecia tanto para la conductancia eléctrica como para la ocupancia, es decir el tiempo de apertura, de los canales. El hecho de encontrar un perfil de resonancia en este sistema es prueba de la existencia de elementos deterministas en la dinámica de los canales de AmB. Más aún, la AmB forma poros muy sencillos que solamente perforan la membrana, por lo que podría tratarse de una característica general de la físico-química de los canales.

Capítulo 1. Motivación

Los fenómenos de resonancia, es decir, aquellos que presentan un aumento de la respuesta del sistema cuando la frecuencia de la perturbación coincide con su frecuencia característica, son propios de sistemas mecánicos. Pero también han sido estudiados en otro tipo de sistemas como son los sistemas electroquímicos. Se ha observado, tanto de forma experimental como en cálculos numéricos, la aparición de resonancias en respuesta a una perturbación externa. Asimismo, se han observado patrones de disparos específicos según el forzamiento externo. Estos sistemas incluyen celdas electroquímicas controladas bajo ciertas condiciones, cuyas reacciones químicas son las que provocan cambios en la corriente y manifiestan entonces una resonancia como respuesta. Asimismo se han observado resonancias en sistemas biológicos [Hudspeth, 1985].

El fenómeno de resonancia eléctrica, se ha observado en células del sistema nervioso y juega un papel importante en la sensación táctil y visual. Desde los trabajos de Hodgkin y Huxley [Hodgkin, 1952] en axones gigantes de calamar se han realizado numerosos estudios sobre la conducción eléctrica. Los canales involucrados en estos procesos son principalmente los canales de Na^+ y K^+ que son proteínas complejas. Estos canales iónicos realizan procesos electromecánicos complicados en las células para llevar a cabo la transmisión del impulso nervioso. Para poder avanzar en el entendimiento de dichos procesos, se utilizan también canales más sencillos en lugar de estudiar un sistema compuesto de células y proteínas complejas.

La Amfotericina B (AmB) es una molécula producida por la bacteria *Streptomyces nodosus* que actúa como agente antifúngico, lo opuesto a la penicilina que es un antibiótico producido por hongos. La AmB es un antifúngico poderoso utilizado en el tratamiento de infecciones sistémicas, pero su alta toxicidad lo hace una medida de último recurso [Hartsel, 1996]. Sin embargo en la actualidad, estos antibióticos han retomado importancia debido al surgimiento de enfermedades oportunistas

que se presentan cuando el sistema inmune se encuentra comprometido; como puede ser después de tratamientos de quimioterapia o incluso enfermedades autoinmunes.

Por otro lado, la AmB ha sido también una gran herramienta para el estudio de transporte a través de membranas. Se trata de un poro sencillo y pequeño (aproximadamente 33\AA de longitud) que presenta dependencia de voltaje. Sin embargo, los pasos involucrados en la absorción, inmersión, difusión y formación de los poros no se comprenden del todo aún. Por esto su mecanismo de acción es muy discutido y se han propuesto distintos modelos. El modelo más aceptado de su funcionamiento es que los monómeros de AmB se acomodan dentro de la membrana, dando lugar a un canal en forma de barril que permite el paso de iones de un lado al otro de la membrana. En trabajo previo realizado en el Laboratorio de Biofísica del ICF [Récamier, 2010], se mostró que la dependencia de voltaje de los canales de AmB se encuentra sobre su expresión, es decir, a voltajes de mayor magnitud se tienen más canales abiertos presentes. La apertura y cierre de estos canales es aparentemente estocástica, pero resulta interesante estudiar la dinámica interna de los mismos.

De tal modo, en este trabajo se busca caracterizar la expresión funcional de los canales de AmB como función de la frecuencia de aplicación de un tren de pulsos utilizando la técnica de canal unitario, para buscar un fenómeno de resonancia. El objetivo principal entonces es analizar el comportamiento experimental y tratar de contribuir a tener una imagen molecular del funcionamiento de la AmB.

Capítulo 2. Introducción

La gran complejidad de los sistemas biológicos ha dado lugar a que su estudio requiera de diferentes ramas de la Ciencia, incluida la Física. Este esfuerzo conjunto en el área de la Biología Celular, es muy manifiesto en el estudio del transporte a través de membranas. Se sabe que la membrana biológica actúa como una barrera separando el medio celular interno del externo y que se trata de una estructura selectivamente permeable que cuenta con mecanismos de transporte como son el paso de iones a través de canales.

La excitación y señalización eléctrica en el sistema nervioso requiere el movimiento de iones a través de los canales iónicos de Na^+ y K^+ principalmente. Las propiedades de estos canales incluyen dependencia de voltaje, selectividad y mecanismo de compuerta, que conduce a la apertura y cierre del poro. El poro abierto permite a un ion particular fluir pasivamente a través de sus gradientes de actividad electroquímica a una tasa mayor de 10^6 iones por segundo. Se considera esta tasa alta una característica distintiva de canales iónicos comparada con otros mecanismos de transporte complejos como las bombas de Na^+ y K^+ o los acarreadores [Hille, 2001].

Los antibióticos poliénicos pueden ser una herramienta útil en el estudio de procesos transmembranales, ya que éstos son canales sencillos cuyos mecanismos de acción no se comprenden del todo pero que presentan dependencia de tiempo y voltaje. Además pueden utilizarse membranas modelo en lugar de células para facilitar su estudio.

2.1. Membrana celular

El interior de una célula biológica contiene una solución con gran cantidad de moléculas que la célula debe preservar y por tanto debe estar aislada de su entorno y regular sus contenidos, este fenómeno se llama homeostasis, y la barrera que permite esto es la membrana celular plasmática. Los principales componentes de la membrana son lípidos, proteínas y carbohidratos. Los lípidos que forman la membrana son moléculas anfifílicas que tienen 2 partes con naturalezas opuestas: una es hidrofílica y la otra hidrofóbica. Cuando tales moléculas se encuentran en agua prefieren la superficie agua-aire, donde las cabezas hidrofílicas y las colas hidrofóbicas se encuentran dentro y fuera del agua respectivamente. En efecto, para una cantidad pequeña de moléculas anfifílicas prácticamente todas se encuentran en la interfase. Cuando la concentración de moléculas anfifílicas aumenta, las moléculas añadidas ya no se dirigen preferencialmente a la superficie sino se van a la fase acuosa de la solución. Entonces en una cierta concentración (la concentración micelar crítica CMC), las moléculas se organizan como pequeños agregados (micelas) que tienen forma globular, con las colas comprimidas en el interior y las cabezas cubriendo la superficie. Al incrementar la concentración de moléculas anfifílicas pueden aparecer fases ordenadas, como estados lamelares. Estas fases se clasifican comúnmente con el nombre de cristales líquidos [Gelbart, 1994].

Entre los constituyentes lipídicos más comunes se encuentran los fosfolípidos y los esteroides. Los fosfolípidos se dividen en 2 clases principales dependiendo si contienen glicerol o esfingosina. Los esteroides como el colesterol y ergosterol se encuentran en gran abundancia en las células de mamíferos y hongos respectivamente. Los fosfolípidos forman una bicapa con sus regiones polares, representadas por el fosfato y los radicales unidos a él, orientadas hacia el medio acuoso a ambos lados de la membrana. La región no polar de los fosfolípidos, dada por las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos, se encuentra en el interior de la bicapa. Debido a esta estructura, la membrana es una barrera física

que impide la difusión libre de algunas sustancias. A la temperatura fisiológica el estado fluido de la membrana permite que sus componentes puedan moverse en un plano lateral. La fluidez de la bicapa lipídica depende del grado de insaturación de los ácidos grasos y de la presencia de los esteroides. Los ácidos grasos insaturados hacen que la membrana sea más fluida porque en los sitios de los dobles enlaces el ácido graso se desvía de su conformación recta [Ávila, 1986].

Se han definido dos tipos de proteínas según la forma en que están asociadas a la bicapa. Las proteínas integrales se insertan dentro de la bicapa e interaccionan con las regiones hidrófobas de los lípidos. Las periféricas o extrínsecas están asociadas a la membrana por uniones iónicas [Ávila, 1986]. Todas las proteínas están constituidas por aminoácidos polares y no polares, pero debido a su conformación tridimensional los aminoácidos polares pueden estar expuestos o quedar en el interior de la proteína. Las proteínas integrales tienen una concentración mayor de aminoácidos no polares en la región que atraviesa la bicapa. La conformación tridimensional de esta región suele ser de alfa hélice, con los aminoácidos no polares en contacto con las partes hidrófobas de los lípidos y los polares en el interior de la hélice.

El uso de sistemas modelo ha representado una simplificación de los problemas a tratar. De forma que es posible estudiar, por ejemplo, translocadores iónicos tales como péptidos y antibióticos, utilizando una membrana modelo en lugar de trabajar con una célula completa. Se han usado vesículas de lípidos, bicapas soportadas, micelas y otros sistemas que modelan una membrana celular. Estas membranas modelo se pueden preparar de manera reproducible y permiten determinar una composición lipídica deseada, lo que no es posible en una membrana biológica. De tal modo se pueden estudiar los efectos de distintos lípidos de una forma conveniente.

En la figura 2.1 se muestra un esquema simplificado de una membrana celular. En cambio, en la figura 2.2 se muestra una simulación a partir de dinámica molecular

de una membrana de POPC con 5, 20 y 50% mol colesterol. Esta es una imagen más realista de los componentes de la membrana. Es decir, una membrana es una estructura muy compleja cuyos componentes interactúan de formas diversas como explicaremos más adelante.

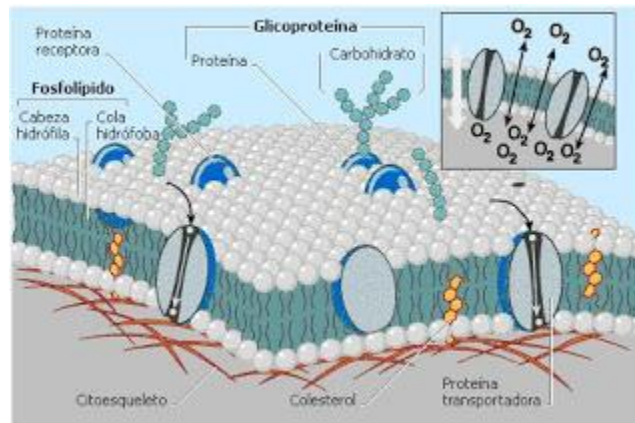


Figura 2.1

Esquema simplificado de la membrana celular

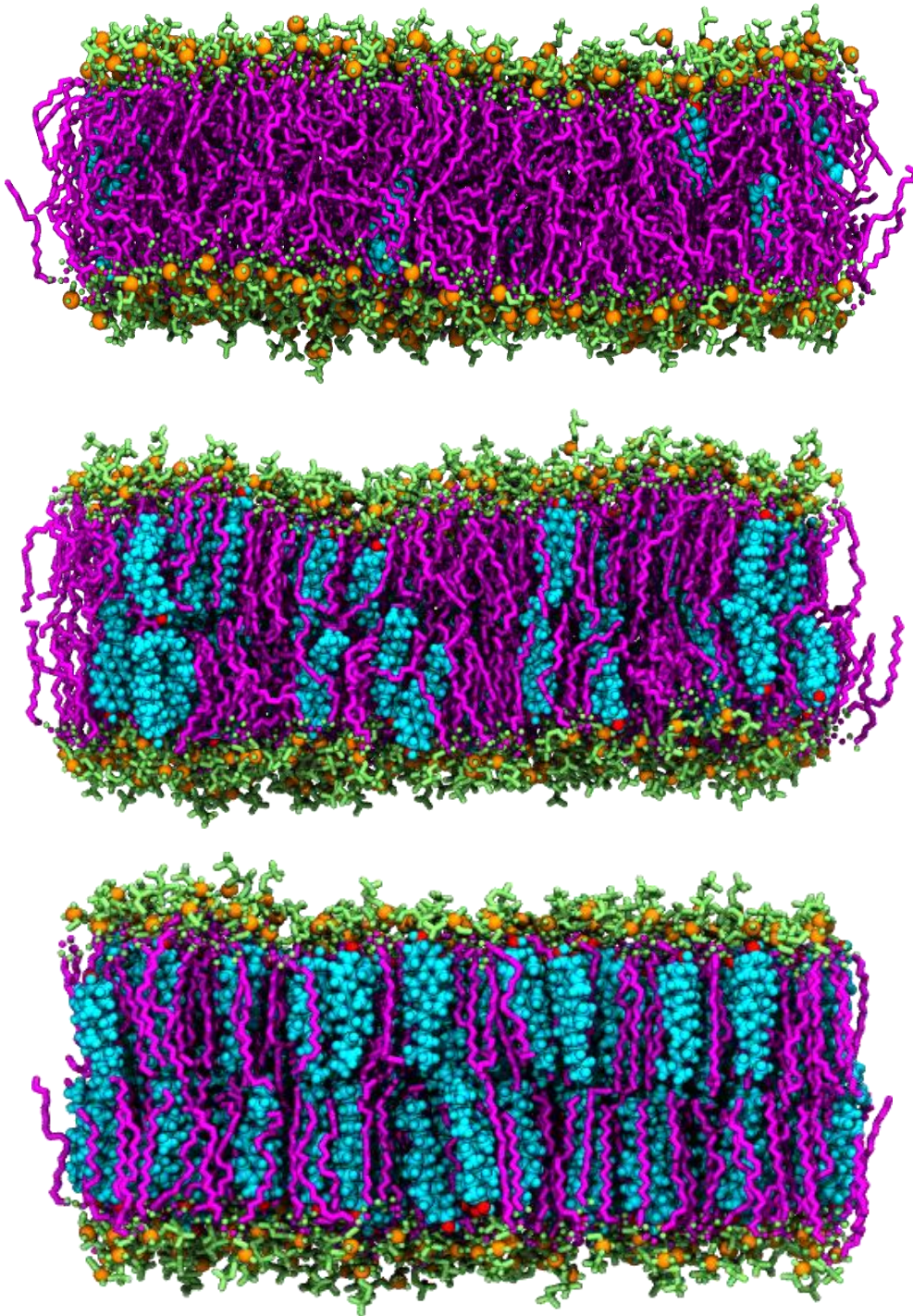


Figura 2.2

Simulación mediante dinámica molecular de una membrana de POPC con: 5, 20 y 50% mol colesterol. Se pueden apreciar las cabezas polares de los lípidos, así como las colas hidrofóbicas y el colesterol intercalado. Código de colores: morado: POPC, azul: colesterol, naranja: fosfato, verde: nitrógeno, rojo: oxígeno. [Favela, 2017]

2.2. Modelos relevantes

Uno de los mayores avances en biofísica de membranas fue el entendimiento de que los cambios en las permeabilidades iónicas son el origen de la conducción nerviosa y la transmisión sináptica, y consecuencia de la apertura y cierre de estructuras individuales de poros en la membrana. Otro avance fue el descubrimiento de que estas estructuras de poros son proteínas transmembranales que crean un camino hidrofílico a través de la membrana lipídica. El desarrollo histórico que dio origen a estos descubrimientos está descrito en el libro "Ion Channels of Excitable Membranes" de Bertil Hille [Hille, 2001]. A continuación una breve reseña histórica utilizando también el trabajo de J.C. Behrends [Behrends, 2012].

La propiedad más importante de los canales iónicos como vías para el movimiento de carga a través de las membranas es que son poros a través de los cuales los iones se mueven como lo hacen en agua, es decir, por electrodifusión. La electrodifusión de iones fue introducida en fisiología en 1902 por Bernstein que la propuso como una explicación general de bioelectricidad y además dio la primera evidencia de la validez de tal modelo como el fenómeno eléctrico básico medible en músculo y nervio. Sin embargo, se necesitaron varios antecedentes para hacer esta conjetura. Arrhenius en 1887 estableció que los cationes y aniones de las sales se disocian espontáneamente en agua. Kohlraush mostró en 1876 que eran independientemente móviles en solución acuosa. Y Nernst (1888 y 1889) y Planck (1890) explicaron como el potencial eléctrico o diferencia de potencial es generado por difusión en la interfase de 2 compartimentos electrolíticos, dado que los cationes y aniones tienen diferentes movibilidades en la zona de frontera. La teoría de Hermann (1879) explicaba la polarización de fibras debido a una corriente aplicada y dio la idea de que los nervios individuales o las fibras musculares están rodeados por un interfaz polarizable que podía asumir el rol de una membrana selectivamente permeable. Ludwig (1858) y Fick (1855) por su parte discutieron la difusión a través de poros con tamaños que admitían sólo unas cuantas moléculas

de agua. Luego Bernstein (1912) propuso correctamente que las células involucradas en la conducción del impulso nervioso y la contracción muscular están rodeadas por una membrana selectivamente permeable a iones de potasio en reposo y que durante la excitación la permeabilidad de la membrana a otros iones se incrementa. Su hipótesis de membrana explicaba el potencial de reposo del nervio y del músculo como un potencial de difusión causado por la tendencia de iones cargados positivamente de difundirse de su alta concentración en el citoplasma a su baja concentración en la solución extracelular, mientras que los otros iones se quedaban atrás. Después, Hodgkin y Huxley (1952) estudiaron el flujo de corriente eléctrica que se transmite a lo largo de la superficie de la membrana de un axón gigante de calamar. A partir de los resultados construyeron una descripción matemática que muestra la conducción y la excitabilidad celular en términos cuantitativos.

Se han propuesto muchos modelos para estudiar el comportamiento de las neuronas en el sistema nervioso. Las ecuaciones de los modelos describen la dinámica del potencial de membrana y la acción conjunta de las conductancias que regulan los flujos de iones a través de la membrana.

El modelo de Hodgkin y Huxley es considerado el modelo biofísico más completo describiendo el comportamiento dinámico en términos de ecuaciones diferenciales. Posteriormente Fitzhugh y Nagumo propusieron un modelo simplificado del modelo de Hodgkin y Huxley describiendo un número menor de variables y con no linealidades simplificadas. Mientras que Hindmarsh y Rose propusieron un modelo dinámico simplificado capaz de describir el comportamiento en ráfagas. Enseguida daremos una descripción de estos modelos.

2.2.1. Modelo de Hodgkin y Huxley

Hodgkin y Huxley [Hodgkin, 1952] consideran que el comportamiento eléctrico de la membrana puede representarse por el circuito de la figura 2.3. La corriente puede pasar a través de la membrana ya sea cargando la capacitancia asociada a la membrana o por el movimiento de iones a través de resistencias en paralelo con dicha capacitancia.

$$I = C_M \frac{dV}{dt} + I_i \quad (2.2.1)$$

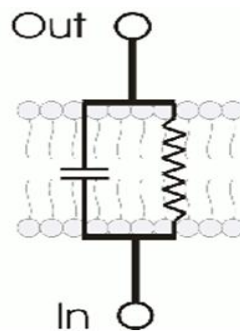


Figura 2.3

Circuitos RC superpuestos sobre una membrana. La membrana se asocia con una capacitancia y los canales con resistencias.

En el caso de la célula nerviosa se puede considerar que la corriente iónica está dividida en componentes dados por los iones de sodio y de potasio (I_{Na} y I_K) y una pequeña corriente de "fuga" (I_l) formada por iones de cloro y otros iones.

$$I_i = I_{Na} + I_K + I_l \quad (2.2.2)$$

Cada componente de la corriente iónica está determinada por una fuerza que puede ser convenientemente medida como una diferencia de potencial eléctrico y un coeficiente de permeabilidad g que tiene las dimensiones de una conductancia. Por lo tanto, la corriente de sodio I_{Na} es igual a la conductancia del sodio multiplicada por la diferencia entre el potencial de la membrana y el potencial de equilibrio para el ion de sodio. Las mismas ecuaciones aplican para I_K y I_l .

$$I_{Na} = g_{Na}(V - V_{Na}) \quad (2.2.3)$$

$$I_K = g_K(V - V_K) \quad (2.2.4)$$

$$I_l = g_l(V - V_l) \quad (2.2.5)$$

Conductancia de Potasio g_k

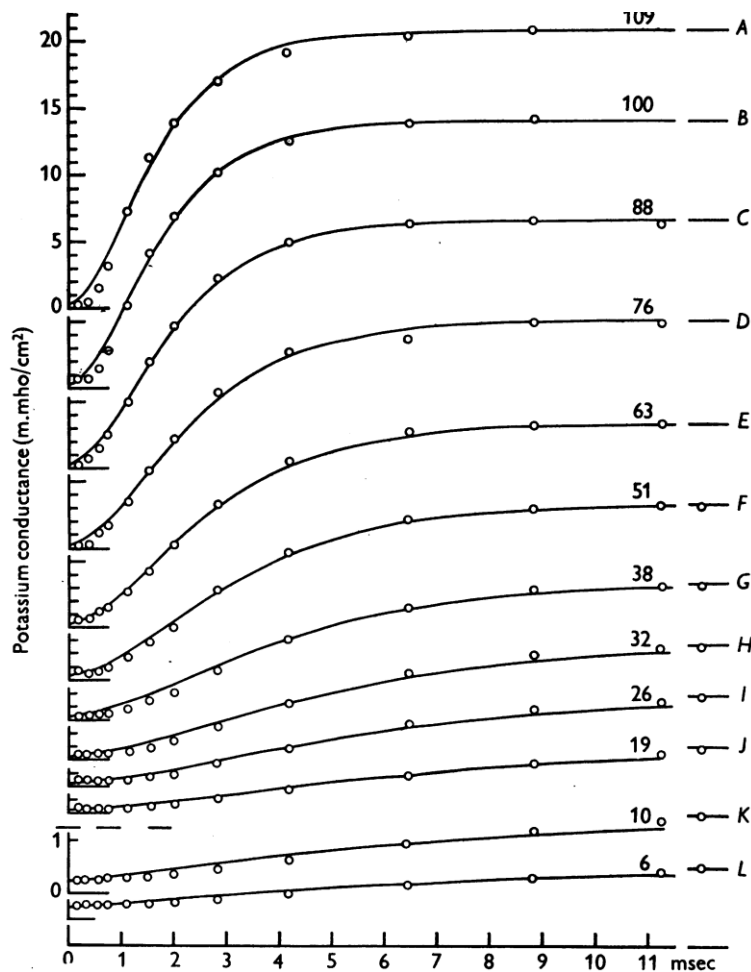


Figura 2.4

Cambios en la conductancia de potasio asociados a diferentes voltajes obtenidos por Hodgkin y Huxley. Los círculos son resultados experimentales, las curvas el ajuste dado por el sistema de ecuaciones desarrollado por Hodgkin y Huxley. Los números sobre las curvas son los voltajes de despolarización en cada caso. [Hodgkin, 1952]

La figura 2.4 muestra resultados experimentales obtenidos por Hodgkin y Huxley de los cambios en la conductancia de los canales de potasio al variar el voltaje. La forma de estas curvas muestra que la apertura de canales de K^+ depende del potencial de membrana. Entonces, a partir de estos resultados proponen que la apertura de un canal de potasio está controlada por varias "partículas" independientes unidas a la membrana. Suponen que hay 4 partículas idénticas, cada una con una probabilidad n de estar en la posición correcta para formar un canal abierto. La probabilidad de que las 4 partículas estén colocadas correctamente es n^4 . Dado que la apertura de los canales depende del potencial, las partículas hipotéticas se asumen con una carga eléctrica que hace su distribución en la membrana dependiente de voltaje. Suponen además que cada partícula se mueve entre sus posiciones permitida y no permitida con una cinética de primer orden, tal que cuando el potencial de membrana cambia, la distribución de partículas descrita por la probabilidad n se relaja exponencialmente a un nuevo valor. Entonces

$$I_K = n^4 g_K (V - V_K) \quad (2.2.6)$$

Los cambios dependientes de voltaje y tiempo de n están dados por una reacción de primer orden



donde las partículas de compuerta hacen transiciones entre las formas permitidas y no permitidas con tasas dependientes de voltaje α_n y β_n . Si el valor inicial de n es conocido los valores subsecuentes se pueden calcular resolviendo

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1 - n) - \beta_n n \quad (2.2.8)$$

Conductancia de Sodio g_{Na}

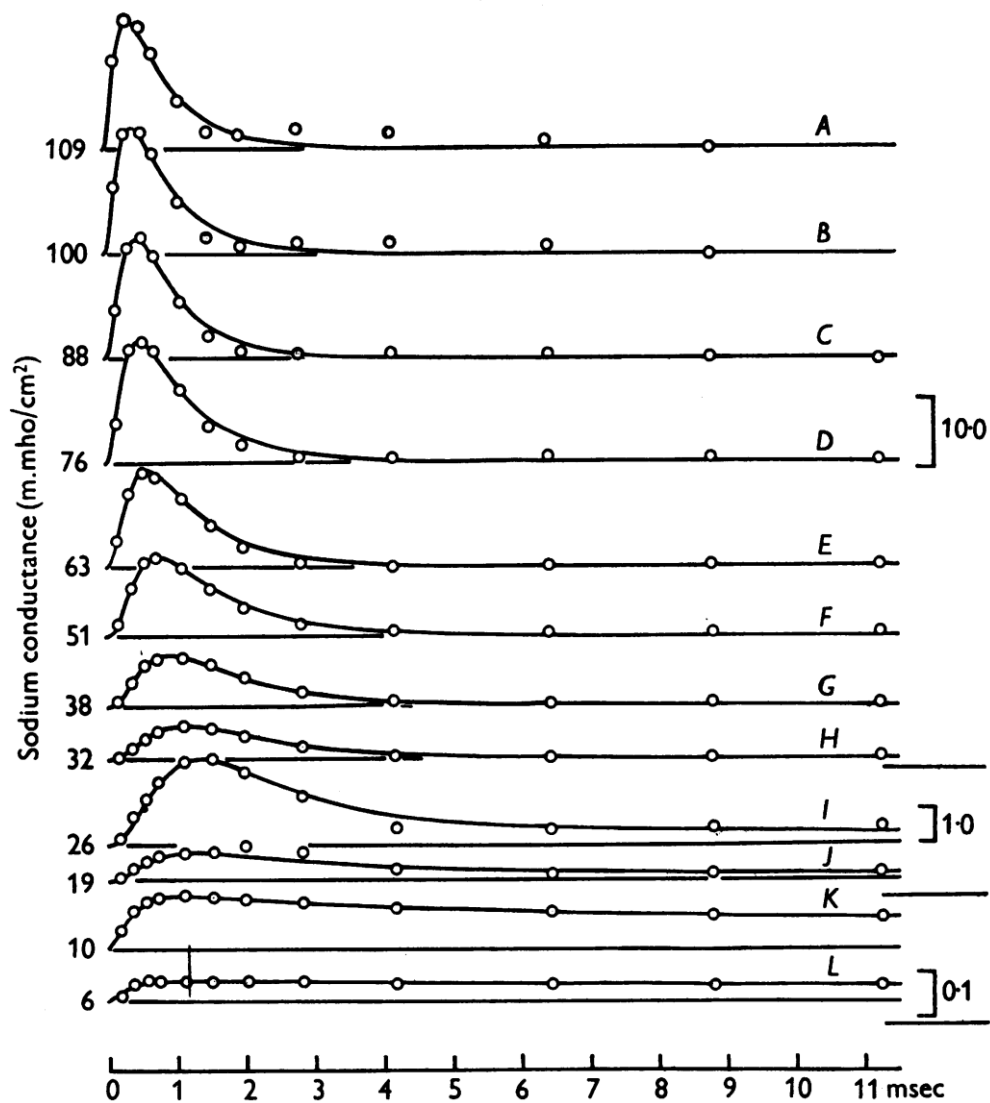


Figura 2.5

Cambios en la conductancia de sodio asociados a diferentes voltajes obtenidos por Hodgkin y Huxley. Los círculos son resultados experimentales, las curvas el ajuste dado por el sistema de ecuaciones desarrollado por Hodgkin y Huxley. Los números junto a las curvas son los voltajes de despolarización en cada caso. [Hodgkin, 1952]

De manera similar, en la figura 2.5 se muestran ahora resultados experimentales obtenidos por Hodgkin y Huxley de los cambios en la conductancia de los canales de sodio al variar el voltaje. La forma de estas curvas muestra también que la apertura de canales de Na^+ depende del potencial de membrana. Sin embargo, hay 2 procesos de compuerta opuestos, activación e inactivación, por lo que se tienen que proponer 2 tipos de partículas de compuerta m y h , con probabilidades m y h respectivamente. Tres partículas m para controlar activación y una h para inactivación. De la misma manera, las 4 partículas de compuerta hipotéticas hacen transiciones independientes de primer orden entre posiciones permitidas y no permitidas para controlar el canal de sodio. Entonces la probabilidad de todas las partículas en una posición permitida es m^3h .

$$I_{\text{Na}} = m^3 h g_{\text{Na}} (V - V_{\text{Na}}) \quad (2.2.9)$$

m y h también pasan por transiciones de primer orden entre las formas permitidas y no permitidas



cuyas tasas satisfacen las ecuaciones diferenciales

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m (1 - m) - \beta_m m \quad (2.2.12)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h (1 - h) - \beta_h h \quad (2.2.13)$$

Para resumir, el modelo de Hodgkin y Huxley para el axón gigante de calamar describe la corriente iónica a través de la membrana en términos de tres componentes.

$$I_i = n^4 g_K (V - V_K) + m^3 h g_{\text{Na}} (V - V_{\text{Na}}) + g_l (V - V_l) \quad (2.2.14)$$

El modelo de Hodgkin y Huxley describe también potenciales de acción, como se muestra en la figura 2.6. Después de que las corrientes de circuito locales empiezan a despolarizar la membrana, los canales de sodio se activan rápidamente y la despolarización se vuelve regenerativa, pero aún antes del pico del potencial de acción empieza la inactivación y la permeabilidad del sodio cae. Al mismo tiempo la fuerte despolarización activa lentamente los canales de potasio que junto con los de fuga produce la corriente hacia afuera necesaria para repolarizar la membrana. El paso del tiempo de la repolarización depende de la tasa de inactivación de los canales de sodio y de la tasa de activación de los canales de potasio, si alguna es más lenta en el modelo, el potencial de acción se prolonga. Por un cierto periodo de tiempo después del potencial de acción, la membrana modelo permanece refractaria a reestimulación mientras los canales de sodio se recuperan de su inactivación y la conductancia de potasio disminuye.

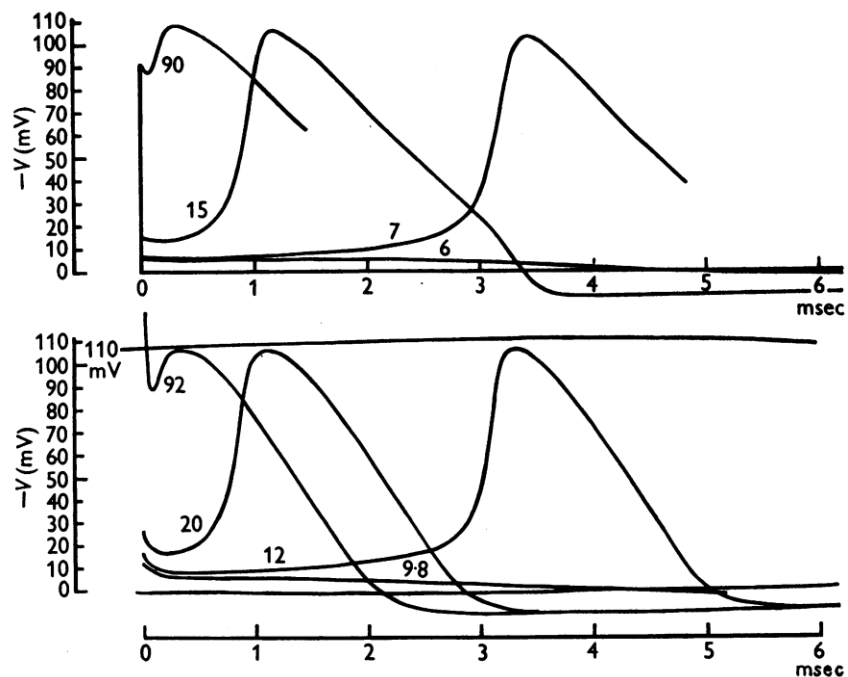


Figura 2.6

Potenciales de acción obtenidos por Hodgkin y Huxley. Traza superior potenciales calculados con el sistema de ecuaciones desarrollado por Hodgkin y Huxley, traza inferior resultados experimentales. Los números sobre las curvas son los voltajes de despolarización en cada caso. [Hodgkin, 1952]

De tal forma, Hodgkin y Huxley encuentran un sistema de ecuaciones diferenciales que reproduce el potencial de acción y la conducción de estímulos habiendo sido parametrizados con datos experimentales.

Originalmente Hodgkin y Huxley pensaban que: "la dependencia de g_{Na} y g_K con el potencial de membrana sugiere que los cambios en conductancia surgen del efecto del campo eléctrico en la distribución u orientación de moléculas con carga o momento dipolar". Actualmente ya se ha determinado la estructura molecular de las proteínas responsables de esta conductancia diferenciada entre sodio y potasio, inclusive se ha determinado la estructura cristalográfica de estas proteínas [Shi, 2006]. Si bien esta determinación ha permitido avanzar en el entendimiento de la selectividad de los canales, la dependencia de estos canales con respecto al voltaje y al tiempo sigue siendo una pregunta abierta, aunque se sabe que lo que altera el voltaje es la probabilidad de apertura y por lo tanto el número de canales abiertos a cierto potencial de un total de canales presentes.

El descubrimiento de esta dependencia de voltaje sobre la apertura y cierre de los canales fue por medio de la técnica de canal unitario desarrollada por Neher y Sakmann que veremos en la siguiente sección.

2.2.2. Modelo de Fitzhugh Nagumo

Es una simplificación del modelo de Hodgkin y Huxley que refleja las características básicas del sistema nervioso. Consta de 2 ecuaciones diferenciales acopladas y está basado en la ecuación de un oscilador de Van der Pool [Fitzhugh, 1961]. Las soluciones no se ajustan a muchos osciladores físicos, pero la intención es representar propiedades cualitativas de una gran variedad de osciladores de relajación, eligiendo la forma algebraica más sencilla posible. Se usa para representar una gran variedad de sistemas no-lineales que pueden presentar un estado estable y fenómenos umbral, así como oscilaciones estables. Las ecuaciones del sistema dinámico son:

$$\frac{dv}{dt} = v - \frac{v^3}{3} - w + I_{ext} \quad (2.2.15)$$

$$\tau \frac{dw}{dt} = v + a - bw \quad (2.2.16)$$

Donde v es el potencial de membrana disminuido en el tiempo por una variable de recuperación lenta w .

2.2.3. Modelo de Hindmarsh Rose

Se trata de una generalización de las ecuaciones de Fitzhugh Nagumo o una simplificación más rica del modelo de Hodgkin y Huxley. Una de las simplificaciones es quitar la dependencia de voltaje a las constantes de tiempo. La diferencia principal entre este modelo y el de Fitzhugh Nagumo es incrementar la fase de recuperación entre potenciales de acción sucesivos [Hindmarsh, 1982]. El modelo se describe de la siguiente manera:

$$\frac{dx}{dt} = y + \phi(x) - z + I \quad (2.2.17)$$

$$\frac{dy}{dt} = \psi(x) - y \quad (2.2.18)$$

$$\frac{dz}{dt} = r[s(x - x_R) - z] \quad (2.2.19)$$

donde

$$\phi(x) = ax^2 - bx^3 \quad (2.2.20)$$

$$\psi(x) = c - dx^2 \quad (2.2.21)$$

$x(t)$ es el potencial de membrana en unidades adimensionales

$y(t)$ representa el transporte de potasio y sodio a través de canales iónicos rápidos y es llamada la variable de disparos

$z(t)$ representa el transporte de otros iones a través de canales iónicos lentos y es llamada la variable de ráfagas

2.3. Neher y Sakmann: la técnica de "patch-clamp"

Un desarrollo experimental que ha contribuido mucho al entendimiento de las propiedades de los canales transmembranales es la técnica de canal unitario desarrollada por Neher y Sakmann [Penner, 1995]. De manera general, esta técnica consiste en aislar un parche de membrana en una micropipeta de vidrio, fijar el voltaje a través de la membrana y medir la corriente que pasa a través de los canales que se encuentran en ella. Uno de los principales resultados de esta técnica es haber mostrado que estos canales unitarios tienen una cinética de apertura y cierre variable pero una conductancia constante. Es decir, la suposición original de Hodgkin y Huxley no es válida, ya que la dependencia de voltaje que se muestra en las figuras 2.4 y 2.5 no viene dada por un cambio en la conductancia del canal molecular. Sakmann y Trube [Sakmann, 1984] mostraron que las dependencias en tiempo y voltaje son consecuencia de cambios en la cinética de apertura y cierre a lo largo de un pulso de voltaje aplicado. De tal forma nuestro objetivo es avanzar en el entendimiento de la dinámica subyacente de la apertura y cierre de los canales y así comenzar a comprender los mecanismos moleculares involucrados. En la figura 2.7 se muestra un ejemplo de un registro de "patch-clamp" donde se tienen trazas de corriente contra tiempo para un voltaje dado. En la figura se muestra la apertura y cierre de canales de Nystatina, donde se puede apreciar la expresión de canales con diferentes tiempos de apertura y diferentes niveles de conductancia.

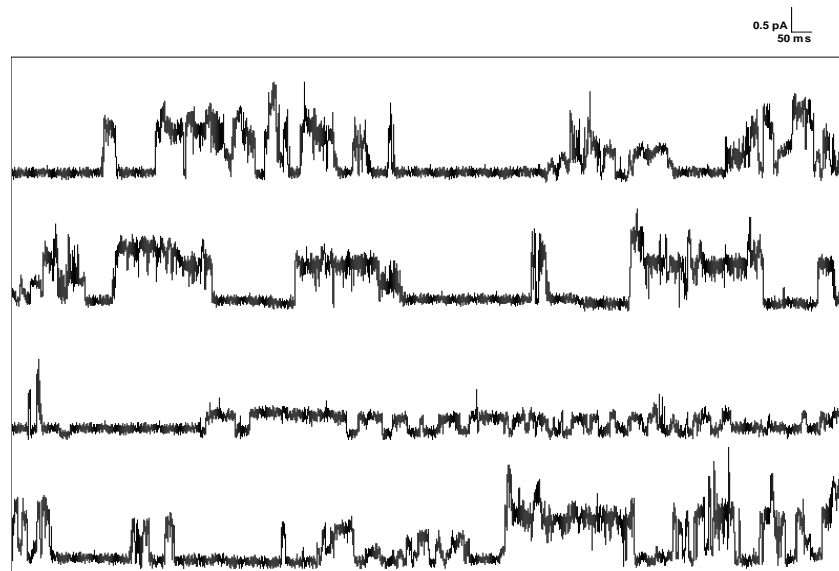


Figura 2.7

Ejemplo de un registro de "patch-clamp" donde se observa la apertura y cierre de canales de Nystatina. En cada traza se tiene corriente vs tiempo a un voltaje fijo. [Récamier, 2007]

Como se mencionó anteriormente, la técnica de "patch-clamp" se refiere a medidas fijando el voltaje ("voltage-clamp") o fijando la corriente ("current-clamp") a través de una membrana. Esta técnica electrofisiológica permite registrar las corrientes macroscópicas ("whole-cell") o las corrientes microscópicas de un sólo canal (canal unitario) que fluyen a través de las membranas biológicas por medio de canales iónicos. La técnica permite controlar y manipular experimentalmente el voltaje ("voltage-clamp") de los parches de membrana o de la célula completa permitiendo así el estudio de la dependencia del voltaje de los canales iónicos. De modo que los principales objetivos de las investigaciones de "patch-clamp" son canales iónicos contenidos en la membrana, incluyendo canales iónicos dependientes de voltaje (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^-), canales activados por un receptor (activados por neurotransmisores, hormonas) y canales activados por segundos mensajeros [Hille, 2001].

Los mecanismos de compuerta o la presencia de ciertos tipos celulares de muchos de estos canales se han descubierto como consecuencia de esta técnica. Las corrientes que fluyen a través de los canales iónicos (del orden de pA) en un parche de membrana, se miden conectando un electrómetro de muy alta impedancia. Para poder medir estas corrientes iónicas se requiere de una técnica de registro de muy bajo ruido, en el caso de los canales de AmB y Nys debe estar en el orden de 0.2 pA, ya que las conductancias de estos canales son más pequeñas (~5pS) que las de los canales proteicos (~70 pS). La resistencia entre la pipeta y la membrana es crítica para determinar el ruido eléctrico que habrá de eliminarse del registro de corriente. La resistencia del sello debe ser del orden de GΩ (gigasello).

En este trabajo utilizamos la técnica de "patch-clamp" para estudiar los canales de AmB, un antibiótico que ahora describimos.

2.4. Características de la Amfotericina B

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1929 se han incorporado a la práctica clínica antimicrobianos naturales con actividad frente a bacterias, hongos, parásitos y virus. Los mecanismos por los que éstos inhiben el crecimiento o causan la muerte de las bacterias son muy variados. La pared celular (estructura presente en la mayoría de las bacterias y ausente en células eucariotas) puede verse afectada en la síntesis o en el transporte de sus precursores o en su organización estructural. Existen antimicrobianos que afectan a la membrana citoplasmática. También la síntesis proteica puede bloquearse porque se afectan fases de este proceso. Asimismo el metabolismo de los ácidos nucleicos puede verse afectado y algunos compuestos afectan directamente al ADN o bloquean las vías metabólicas de la bacteria. Algunos compuestos no inhiben o matan a las bacterias pero pueden bloquear sus mecanismos de resistencia [Calvo, 2009].

Como se mencionó anteriormente, la membrana citoplasmática es vital para todas las células, ya que interviene activamente en los procesos de difusión y transporte activo y de esta forma controla la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, y provocan la salida o la entrada de iones que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal. Los antimicrobianos que actúan en la membrana se comportan como antibióticos generales afectando bacterias, hongos, protozoarios y por tanto pueden tener alta toxicidad sobre las células humanas. A este grupo pertenecen las polimixinas, los lipopéptidos, los antibióticos poliénicos (activos frente a hongos) y los acarreadores y formadores de poros.

Los acarreadores son antibióticos polipeptídicos cíclicos como la Valinomicina o las Tirocidinas A y B. Estos compuestos tienen una estructura circular, hidrofóbica en el exterior e hidrofílica o polar en el interior. Los acarreadores incorporan cationes monovalentes en su interior y cruzan la bicapa lipídica. Los antibióticos formadores de poros incluyen las Gramicidinas. La Gramicidina D contiene pequeñas cadenas

lineales de aminoácidos (polipéptidos acíclicos) con un mecanismo de acción distinto. El dímero de Gramicidina atraviesa la membrana y constituye un poro que permite el paso selectivo de iones y moléculas según su tamaño y características (figura 2.8).

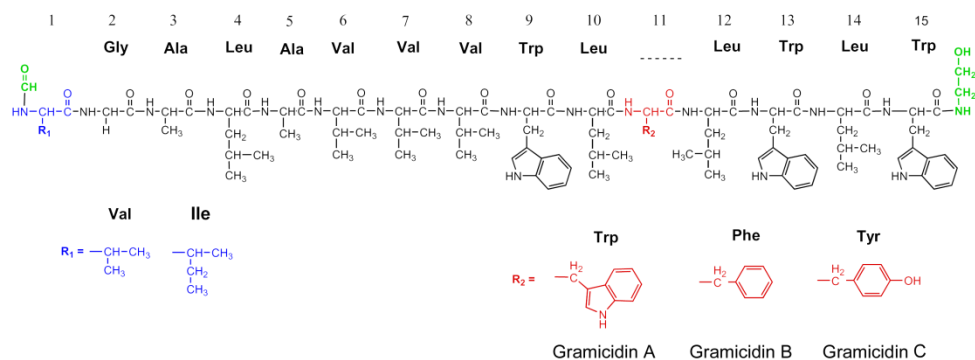


Figura 2.8

Estructura molecular de la Gramicidina mostrando la estructura lineal y las variantes de Gramicidina. [Chemik]

Los antibióticos poliénicos son producidos por varias cepas de bacterias del género *Streptomyces*. Estos antibióticos son muy poco solubles en agua y sufren autooxidación en presencia de luz. En cuanto a su reactividad química pueden ser ácidos, básicos, anfóteros y neutros o zwitteriónicos. Según el número de dobles enlaces presentes, los poliénos pueden clasificarse en tri-, tetra-, penta-, hexa- y heptaenos. Son agentes antifúngicos destacando la Amfotericina B (AmB), la Nystatina (Nys) y la Candicidina. La AmB es la droga de elección en el caso de infecciones sistémicas agudas, mientras que la Nys se emplea en infecciones cutáneas principalmente.

La AmB, el poliéno más conocido, es una molécula anfotérica, los grupos hidroxilo alineados a lo largo de un lado de la molécula constituyen su región hidrofílica, mientras que el sistema de dobles enlaces del otro lado constituye su región hidrofóbica. Cuenta con un grupo micosamínico polar y un residuo carboxílico

localizados en uno de los extremos de la molécula, y un grupo hidroxilo rodeado por 3 grupos metilo en el otro extremo (figura 2.9).

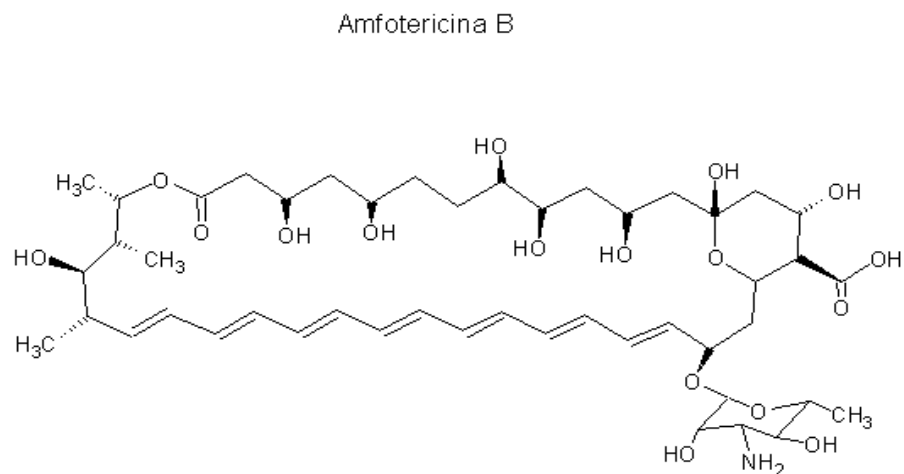


Figura 2.9

Estructura molecular de la AmB mostrando los grupos hidroxilo alineados a lo largo de un lado de la molécula, el sistema de dobles enlaces del otro lado y el grupo micosamínico polar en uno de los extremos.

El modelo más aceptado de la acción biológica de la AmB está directamente relacionado con la habilidad de la droga de formar poros hidrofílicos en la membrana que permiten el paso de iones y moléculas pequeñas, lo que eventualmente origina la muerte celular [Kaminski, 2014]. El modelo más antiguo y más estudiado es el propuesto por Finkelstein y Holz (1973). De acuerdo a este modelo, las moléculas de AmB se agregan en una estructura en forma de barril, donde cada molécula del polieno es un plano con una protuberancia que representa el azúcar amino (figura 2.10). El interior del poro es polar, el exterior no polar y los huecos en el exterior del poro entre cada par de moléculas de AmB o de Nys pueden acomodar una molécula de esteroles [Finkelstein, 1973].

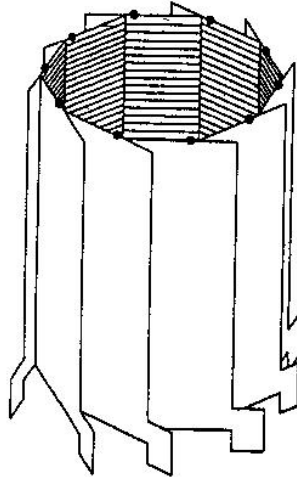


Figura 2.10

Modelo clásico del poro de AmB o de Nys. Cada molécula de AmB o Nys es un plano con una protuberancia y un punto negro. Lo sombreado es la cara hidroxílica de la cadena anfipática, la protuberancia representa el azúcar amino y el punto negro el grupo hidroxilo en el extremo no polar de la molécula. Los huecos en el exterior del poro entre cada par de moléculas de AmB o Nys pueden acomodar una molécula de esterol. [Finkelstein, 1973]

Se ha considerado que la toxicidad selectiva de la AmB por los hongos resulta de su capacidad de unirse más fuertemente al ergosterol, el esterol principal en las membranas de hongos, que al colesterol, el esterol principal en células de mamíferos. Sin embargo, los mecanismos moleculares detallados de la interacción de la AmB con la membrana, así como la formación de una estructura de poro transmembranal no son comprendidos del todo aún, suscitando así un interés en el modelo molecular del funcionamiento de estos poliénos desde hace más de 50 años.

A pesar de que el modelo clásico del canal de AmB (y de Nys) considera los esteroides como parte integral del mismo, se han observado (desde los trabajos de HsuChen en 1973) canales con selectividad catiónica y canales con selectividad aniónica en membranas sin esterol. Trabajos realizados en nuestro laboratorio [Cotero, 1998], [Venegas, 2003] demuestran que los canales de AmB en

membranas sin esterol, son los mismos que en presencia de éste. De manera similar [Récamier, 2010], se realizó una caracterización detallada de canales de Nystatina tanto en membranas con colesterol como en membranas con ergosterol. Más aún, dichos canales presentan conductancias muy similares en ambos tipos de membranas, lo que sugiere que tienen la misma estructura supramolecular. Sin embargo, se observó además un mecanismo de acción diferente para concentraciones bajas de Nys que consiste de rupturas locales de la membrana y que aparentemente es exclusivo de membranas con ergosterol. Este mecanismo conocido como "carpeting" se refiere a que el polieno se absorbe en la superficie y se forman pequeñas carpetas que afectan a la membrana de manera local. También se realizó un estudio de la dependencia de la conductancia promedio de los canales como función del potencial aplicado. Los resultados mostraron que potenciales de mayor magnitud inducen un aumento en la actividad de los canales. Esto indica que la estructura supramolecular puede ser estabilizada por un potencial en un rango entre 100 y 150 mV, probablemente dando una orientación favorable a los monómeros.

Este tipo de evidencias ponen en duda el papel que juegan los esteroides en la formación del canal, de forma que se han propuesto modelos alternativos en los cuales los esteroides no son parte integral del canal, sino que al modificar las propiedades estructurales de la membrana, modifican la presencia del poliéno en ésta.

Obviamente dado que los polienos son aplicados clínicamente, se tiene también como objetivo el desarrollo de derivados de este antibiótico con una toxicidad menor. En particular, en nuestro laboratorio se desarrolló un derivado de AmB con una selectividad mayor. Se ha propuesto que este derivado tiene el mismo modo de acción que la AmB, i.e., la formación de poros en la membrana celular [Antillón, 2016]. Los resultados preclínicos muestran que el derivado es igual de efectivo que

la AmB pero 7 veces menos tóxico que ésta por vía intraperitoneal y 10 veces menos por vía intravenosa [Ortega, 2017].

Si bien hay mucha información sobre los polienos desde el punto de vista clínico, existen opiniones encontradas en cuanto a su mecanismo de acción y dinámica. Por otro lado, existe mucha información para el caso de los péptidos, moléculas de unos cuantos aminoácidos que tienen una función antimicrobiana y son desarrollados de forma natural por muchos microorganismos, como la Gramicidina mencionada anteriormente. Aunque se trata de moléculas muy diferentes, los péptidos son pequeños canales antibióticos y la amplia información disponible nos puede ayudar a entender el funcionamiento de los polienos.

2.5. Antibióticos peptídicos

Existen muchos factores que determinan cómo interactúan los péptidos anfipáticos con la membrana lipídica. La orientación del péptido en la membrana determina qué partes del péptido están expuestas al interior hidrofóbico o a la interfase polar lípido/agua. Asimismo, la oligomerización se requiere para muchas actividades como la formación de poros. A menudo, los péptidos se clasifican de acuerdo al modo característico de interacción con la bicapa, pero parece que pueden adoptar diferentes alineaciones o estados oligoméricos en respuesta a cambios en su entorno. Se han observado cambios en la orientación de los péptidos o en su estado oligomérico como función de la temperatura, composición lipídica o pH.

Probablemente la mayor influencia en el estado de un péptido está dada por la razón péptido-lípido (P/L), i.e., la concentración del péptido en la membrana. A concentraciones bajas los péptidos anfipáticos forman alfa hélices y se encuentran parcialmente inmersos en la membrana alineándose a la interfase no-polar/polar. Si la concentración pasa un umbral crítico, los péptidos vecinos pueden jugar un rol en determinar una orientación favorable; ya que a concentraciones altas los péptidos interactúan no sólo con la bicapa sino entre ellos mismos [Grage, 2010].

Tanto la fase lipídica como las propiedades intrínsecas de los lípidos ejercen una influencia importante en el estado de los péptidos. Tales aspectos fisicoquímicos se refieren al grosor hidrofóbico, el grado de insaturación de las cadenas, el tipo y carga de las cabezas polares y la curvatura instantánea de la bicapa. Además, el comportamiento de un péptido en la membrana involucra diferentes interacciones: interacciones con los lípidos circundantes, interacciones péptido-péptido y finalmente deben tomarse en cuenta las interacciones lípido-lípido. Primeramente existe la interacción electrostática entre las cabezas polares de los lípidos y las porciones cargadas del péptido sobre la superficie de la membrana. Posteriormente las interacciones hidrofóbicas juegan un rol importante una vez que el péptido está parcialmente inmerso en el interior hidrofóbico de la membrana. Para una

inserción más profunda se deben considerar las propiedades elásticas de la membrana como la curvatura espontánea de ésta y la conformación espacial del péptido [Grage, 2010].

2.6. Características biofísicas de la membrana

Las membranas lipídicas están sujetas a transiciones conformacionales y dinámicas que van desde movimientos individuales de lípidos, hasta ondulaciones de parches del tamaño de micrómetros dentro de la membrana (ver figura 2.2). Estas fluctuaciones colectivas inducidas térmicamente son controladas por las propiedades elásticas y viscosas de las membranas. Se sabe que las fluctuaciones de curvatura están caracterizadas por el módulo de doblado (“bending modulus” en inglés) de las membranas y que el movimiento es amortiguado por la viscosidad del solvente. Por otro lado, las fluctuaciones colectivas de espesor están caracterizadas por el módulo de compresibilidad de área de la bicapa, que es amortiguado por las viscosidades de la membrana y el solvente [Nagao, 2017]. Se ha mostrado que al alterar el grosor de membranas modelo se ve afectada la actividad biológica de varias proteínas. En uno de los trabajos de Kelley y colaboradores [Kelley, 2017a] utilizan dispersión de neutrones para estudiar los efectos en estructura y dinámica al incorporar los péptidos antimicrobianos Gramicidina y Alameticina en membranas modelo. Sus resultados muestran un aumento en la fluctuación del espesor en bicapas con baja concentración de Gramicidina, que fue amortiguada al aumentar la concentración del péptido. Sin embargo, no se observa un aumento en la dinámica en bicapas con Alameticina, lo que sugiere que la dinámica no sólo depende de la concentración del péptido, sino de su orientación en la membrana. Asimismo, usando también técnicas de dispersión de neutrones, estudian vesículas unilamelares grandes compuestas de distintas mezclas binarias de lípidos con una discrepancia de 4 carbonos en la longitud de la cola (DMPC 14:0 C y DSPC 18:0 C) [Kelley, 2017b]. Los resultados muestran que las bicapas mixtas son más dinámicas que sus análogos de un sólo componente. Las bicapas mixtas tienen un módulo de doblado menor y una fluctuación de espesor mayor que las bicapas de DMPC o DSPC puras.

Además la membrana está lejos de ser una matriz homogénea e inerte. Es un cristal líquido y por lo tanto presenta una riqueza de fases: líquido ordenado,

líquido desordenado y gel. Los modelos actuales están sesgados hasta cierto punto por la propuesta de Simons y van Meer [Simons, 1988] y luego desarrollada por Simons e Ikonen [Simons, 1997] de la existencia de ciertos dominios de menor escala en las membranas celulares vivas, llamados balsas (rafts en inglés). Estos autores proponen que la heterogeneidad en la composición lipídica puede jugar un rol en la modulación de propiedades físicas relevantes en membranas naturales. Asimismo, se considera que el colesterol y los esfingolípidos están enriquecidos en estas balsas, lo que lleva a una estructura local de la membrana que ayuda a segregar proteínas [Rheinstädter, 2013]. Se cree también por ejemplo, que las balsas juegan un rol en el ordenamiento membrana-proteína y en la formación de complejos de señalización [Lingwood, 2010]. Sin embargo, desde que se propusieron las balsas ha sido un problema primero probar su existencia en membranas celulares y luego caracterizarlas en términos de su distribución de tamaños y tiempos de vida. En la actualidad no existe un consenso claro y al surgir nuevas técnicas experimentales con mejor resolución en espacio y tiempo, se encuentran estructuras cada vez más pequeñas con tiempos de vida cada vez más cortos [Jacobson, 2007]. De modo que una balsa puede ser desde un pequeño y transiente cúmulo de moléculas, a un agregado con un mayor tiempo de vida, hasta un dominio de gran magnitud que asemeja una fase termodinámica [Mouritsen, 2015].

En trabajo realizado en nuestro laboratorio [González-Damián, 2010], se estudiaron los efectos de las fracciones molares de colesterol y ergosterol (0-50%) y la variación de temperatura en la actividad de los poros de Nystatina. En ambos casos el máximo en la actividad ocurre en la fase donde coexisten líquido ordenado y líquido desordenado (lo+ld). Para ergosterol se tiene un máximo local en 30°C y 30% mol de esterol. Para colesterol el máximo ocurre a 25°C y 30% mol de esterol. La acción está favorecida en la región de la interfase, lo que puede referirse a fronteras de dominios. Estos resultados muestran que la estructura de la membrana es un factor determinante para la expresión de los canales.

Por otra parte, la naturaleza dinámica de los lípidos sugiere que las interacciones proteína-lípido no necesitan ser únicamente estructurales, debe considerarse también el comportamiento temporal. El gran rango de escalas temporales y de longitud permite a pequeños grupos funcionales de lípidos realizar distintos roles. En el trabajo de Stevenson [Stevenson, 2017] utilizan espectroscopia de infrarrojo para medir la función de correlación temporal para fluctuaciones del campo eléctrico local en la membrana. Las fluctuaciones son >10 MV/cm. Al añadir Gramicidina la dinámica se hace 4 veces más lenta, pero no decrece su magnitud. Además, los experimentos de variaciones de temperatura a través de la transición de fase gel-fluido muestran que hay cambios estructurales significativos en el lípido en una escala de 100 ns y cuando se agrega Gramicidina a la muestra se observa que el equilibrio monómero-dímero de la proteína se adapta a cambios estructurales en el lípido casi instantáneamente.

Algo importante para interpretar nuestros resultados además de las propiedades estructurales de la membrana, son las propiedades eléctricas. Como se mencionó previamente, las bicapas lipídicas están compuestas de lípidos, esteroides y proteínas que se organizan en una matriz estructural heterogénea que controla elementos críticos de función biológica. La membrana tiene una distribución de cargas particular donde la mayoría de las interacciones de todas estas moléculas son electrostáticas (fuerzas de Van der Waals). El campo electrostático total que atraviesa la bicapa lipídica puede separarse en 3 componentes: campo transmembranal, campo de superficie y campo dipolar. En general, el potencial dipolar se manifiesta entre el interior hidrofóbico de la membrana y las primeras capas de agua adyacentes a las cabezas polares de los lípidos. Para un fosfolípido típico como la fosfatidilcolina está alrededor de 280 mV en bicapas, donde la región hidrofóbica es positiva relativa a la fase acuosa [Brockman, 1994]. En uno de los trabajos del grupo de L.J. Webb [Hu, 2011] sintetizan péptidos alfa hélices que contienen un aminoácido no-natural en 4 posiciones a lo largo de la hélice. Los cambios en la energía de absorción vibracional de la sonda de nitrilo en cada

posición a lo largo de la alfa hélice, se usan para determinar cambios en el campo electrostático local de la sonda. Sus resultados muestran que el campo dipolar electrostático cambia rápidamente en la superficie de la membrana y más lentamente en el interior dieléctrico. Posteriormente, investigaron el efecto del colesterol y un derivado de éste (6-ketocholesterol) sobre la electrostática de la membrana y proponen que el campo eléctrico de la membrana está afectado por la polaridad de las moléculas de esteroles, la reorientación del dipolo del fosfolípido debido al esteroles y el impacto del esteroles en los puentes de hidrógeno con el agua superficial [Shrestha, 2017]. Ahora estudian cómo se altera el campo dipolar de una bicapa de fosfolípidos pura, al utilizar una proteína transmembranal como la Gramicidina. También estudian cómo se afecta el transporte a través del canal de Gramicidina, así como su propia estructura, por medio de perturbaciones del campo electrostático al intercalar esteroides en la bicapa lipídica [Anderson, 2017].

Bajo ciertas condiciones de estrés externo, como la tensión lateral o la influencia de un campo eléctrico, las membranas lipídicas pueden formar poros transversales en la membrana. La formación de poros empieza probablemente con la aparición de un defecto hidrofóbico en la membrana, con cambios graduales de orientación de lípidos de la posición vertical en la bicapa intacta a horizontal en el poro hidrofílico [Akimov, 2017b]. Existen trabajos de membranas lipídicas sometidas al estrés externo de voltajes de gran magnitud ([Akimov, 2017a], [Akimov, 2017b], [Melikov, 2001]) cuyos resultados muestran que estos voltajes inducen la aparición de cambios en la conductancia de la membrana y se les ha llamado poros lipídicos. La magnitud de los voltajes necesarios para este tipo de eventos es del orden de 150-550 mV.

Estos trabajos son evidencia de la influencia de la composición y fase lipídica en las propiedades biofísicas de la bicapa, así como las propiedades eléctricas de ésta y resaltan el complejo papel entre la estructura y la dinámica en membranas lipídicas.

2.7. Resonadores nanomecánicos

Un resonador es aquella estructura que oscila con una frecuencia característica y que en presencia de una fuerza externa oscilatoria con una frecuencia cercana a su frecuencia característica entra en resonancia, es decir, oscila con una amplitud mayor. Los resonadores nanomecánicos [Schmid, 2016] son estructuras mecánicas continuas tales como rayos, placas, sensores y sistemas de transporte molecular [Arash, 2015]. En un sistema vibracional real la energía siempre se disipa por amortiguamiento viscoso, transmisión acústica, pérdidas de superficie, disipación interna, etc. Mientras el resonador se encuentre en el régimen lineal, lo cual ocurre normalmente para amplitudes vibracionales pequeñas, la dinámica de la resonancia puede simplificarse con la del oscilador armónico lineal. Con un elemento de amortiguamiento lineal y una fuerza externa periódica la ecuación diferencial de segundo orden del sistema es

$$m \frac{d^2z}{dt^2} + c \frac{dz}{dt} + kz = F(t) \quad (2.7.1)$$

donde m es la masa total, k la constante del resorte, c el coeficiente de la fuerza de amortiguamiento y $F(t)$ la fuerza externa.

En el caso de oscilaciones libres tenemos

$$\frac{d^2z}{dt^2} + \frac{k}{m}z = 0 \quad (2.7.2)$$

$$z(t) = z_0 \cos(\omega t) \quad (2.7.3)$$

donde

$$\omega^2 = \frac{k}{m} \quad (2.7.4)$$

Para el caso con amortiguamiento tenemos

$$\frac{d^2z}{dt^2} + 2n \frac{dz}{dt} + \omega^2 z = 0 \quad (2.7.5)$$

con el coeficiente de amortiguamiento

$$n = \frac{c}{2m} \quad (2.7.6)$$

Proponiendo la solución $z = z_0 e^{\gamma t}$ se debe satisfacer

$$\gamma_{1,2} = -n \pm \sqrt{n^2 - \omega^2} \quad (2.7.7)$$

Para $n \geq \omega$, γ es real y la solución es un decaimiento exponencial. Para el caso $n > \omega$ se tiene un oscilador sobreamortiguado y para el caso $n = \omega$ amortiguamiento crítico.

Para $n < \omega$, γ es imaginaria y es el caso del oscilador subamortiguado.

$$\gamma_{1,2} = -n \pm i\sqrt{\omega^2 - n^2} \quad (2.7.8)$$

De modo que la solución queda de la siguiente forma

$$z(t) = z_0 e^{-nt} \cos(\sqrt{\omega^2 - n^2}t) \quad (2.7.9)$$

Esta ecuación indica que el sistema tiene una oscilación que decae exponencialmente con el tiempo, como se muestra en la figura 2.11.

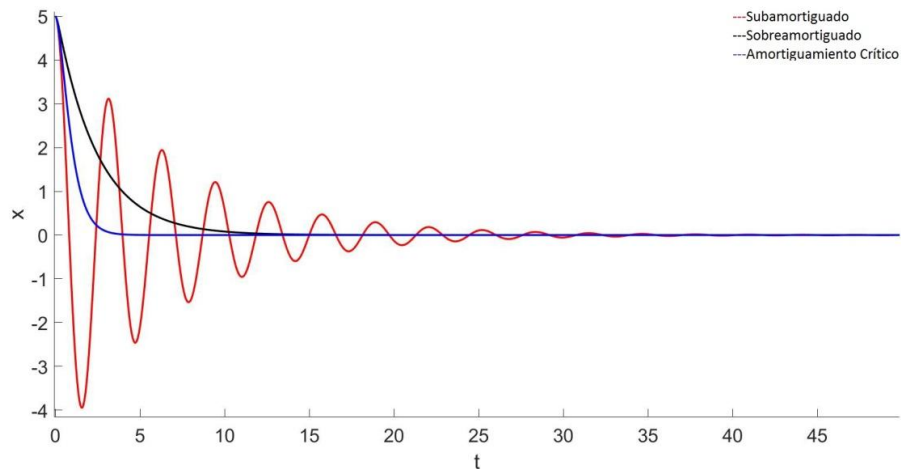


Figura 2.11

Serie de tiempo para oscilador armónico subamortiguado, sobreamortiguado y con amortiguamiento crítico. [Parmananda, 2017]

Para el caso del oscilador amortiguado y forzado tenemos la siguiente ecuación

$$m \frac{d^2z}{dt^2} + c \frac{dz}{dt} + kz = F_0 \cos(\Omega t) \quad (2.7.10)$$

con la solución de la forma

$$z(t) = \frac{F_0/m}{\sqrt{(\omega^2 - \Omega^2)^2 + 4n^2\Omega^2}} \cos(\Omega t + \varphi) \quad (2.7.11)$$

donde

$$\varphi = \tan^{-1} \frac{2n\Omega}{\Omega^2 - \omega^2} \quad (2.7.12)$$

El fenómeno de resonancia ocurre cuando la frecuencia de la perturbación se aproxima a la frecuencia característica del sistema y entonces la amplitud de la oscilación alcanza un máximo. La figura 2.12 muestra un ejemplo de cómo cambia el perfil de resonancia como función de la frecuencia de perturbación para distintos coeficientes de amortiguamiento.

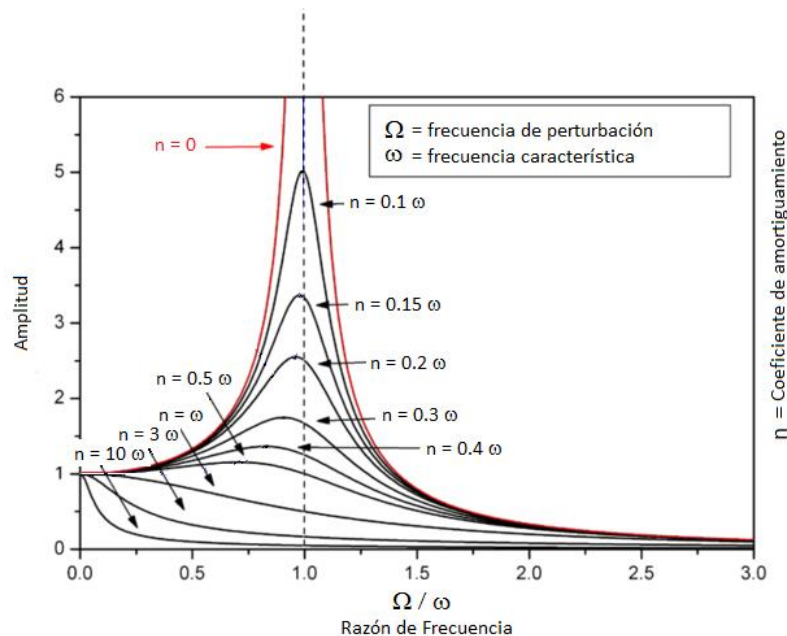


Figura 2.12

Curvas de resonancia como función de la frecuencia de perturbación para distintos coeficientes de amortiguamiento. [Magnus]

Tal como los circuitos eléctricos, las neuronas pueden presentar resonancia y por lo tanto tener una preferencia en las frecuencias de perturbación. Las neuronas resonantes producen respuestas amplificadas cuando son perturbadas con señales cercanas a su frecuencia de resonancia y dan respuestas pequeñas en otras frecuencias. Funcionalmente, tales resonancias restringen a las neuronas a responder con mayor intensidad a señales con frecuencias biológicamente importantes como las asociadas a ritmos cerebrales [Ge, 2016]. Se propone que la interacción de varios canales en las neuronas (K^+ , Na^+ , Cl^-) es lo que determina las características de este comportamiento complejo. Pero existe la posibilidad de que un sólo canal manifieste este tipo de fenómeno, que es precisamente el objeto de estudio de este trabajo. Avanzar en el entendimiento de los principios básicos involucrados en el surgimiento de la resonancia permitiría una clasificación de estos mecanismos.

2.8. Dinámica de la expresión de canales

Existen sistemas celulares con canales que pueden llegar a presentar comportamientos eléctricos muy complejos como puede ser la sincronización ([Hughes, 2008], [Fridlyand, 2010]) y uno de los más comunes es la resonancia, que como mencionamos, es la capacidad de sistemas celulares de mostrar una mayor respuesta a cierta frecuencia. En particular, en sistemas nerviosos las oscilaciones con una mayor amplitud a frecuencias específicas juegan un rol importante. Este comportamiento es debido a la respuesta de canales iónicos, específicamente a aquellos dependientes de voltaje involucrados en neurofisiología [Ge, 2016]. En el sistema nervioso la resonancia influye principalmente en el comportamiento subumbral de las neuronas excitables y genera o mantiene las ondas cerebrales oscilatorias en mamíferos, que están en el rango aproximado de 2 a 12 Hz. Una forma de explorar las propiedades de la resonancia eléctrica es aplicar perturbaciones, como son variaciones en el potencial de membrana.

También se ha mostrado que otro tipo de resonancia, la resonancia estocástica (SR por sus siglas en inglés), ocurre en sistemas biológicos y juega un papel importante en la recepción sensorial de los organismos ([Collins, 1997], [Flores, 2016]). Ésta consiste en la adición de ruido a una señal para aumentar la respuesta del sistema, lo cual se aprecia en un incremento de la razón señal-ruido para valores moderados de intensidad de ruido. La resonancia estocástica se ha observado en sistemas sencillos como son los canales de Alameticina, un antibiótico peptídico producido por el hongo *Trichoderma viridae* [Bezrukov, 1997]. Blick y sus colaboradores [Blick, 2005] extendieron estos resultados y consideraron membranas de diferentes tamaños. A partir de los resultados concluyeron que la resonancia estocástica proviene de la interacción colectiva de canales iónicos dentro de los parches de membrana de al menos 75 micrómetros. Cabe destacar que a pesar de que los canales de Alameticina son muy simples, comparados con aquellos involucrados en neurofisiología, la resonancia estocástica aparece. Esto

sugiere que la dependencia de voltaje es una propiedad crucial para observar este fenómeno.

Aunque las interacciones de los sistemas biológicos son muy complejas, se ha destacado que para entender este fenómeno se requiere la formulación de modelos [Ge, 2016] y experimentos que involucren sistemas más sencillos y proveer así una vía para alcanzar dicho objetivo. De tal modo, sería interesante observar si aparecen resonancias similares en otros canales simples dependientes de voltaje. Más aún es importante determinar si tales resonancias pueden ocurrir en membranas más pequeñas que las propuestas por Blick et. al. [Blick, 2005], dado que muchas células suelen ser menores a 75 micrómetros.

Tal como usamos la respuesta de los péptidos para tratar de entender a los polienos, utilizamos también resultados de sistemas electroquímicos que responden a perturbaciones deterministas externas, así como a perturbaciones estocásticas, y exhiben distintos comportamientos. Estos fenómenos han sido estudiados por ejemplo, en sistemas químicos no-lineales de forma numérica y experimental [Parmananda, 2001], [Chigwada, 2006]. En este caso existen marcapasos capaces de inducir formación espontánea de patrones en un estado estacionario. En particular, haciendo escaneos de amplitud y frecuencia se han encontrado dominios donde la resonancia no-lineal disminuye el umbral del parámetro del sistema con forzamiento, logrando el patrón de disparos. Esto implica que existe una frecuencia óptima para la cual los disparos pueden ser generados con un mínimo esfuerzo. En otros experimentos [Cruz, 2007] se observan fenómenos como el control de una señal aperiódica, caracterizada por tener una amplitud casi constante e intervalos irregulares entre los picos. Primero, estos trenes de picos aperiódicos se convierten en secuencias de picos regulares al someterlas a un forzamiento periódico. Después, logran sincronizar 2 de estas series de tiempo de picos irregulares para un acoplamiento bidireccional apropiado. Finalmente, logran replicabilidad de estos perfiles de picos irregulares al someterlos a un estímulo estocástico externo. Asimismo, en otro trabajo de

Parmananda y colaboradores [Escalera Santos, 2004] se muestran los efectos de resonancias inducidas con ruido: resonancia coherente y resonancia estocástica periódica en celdas electroquímicas. En el primer caso al tener una señal con un nivel óptimo de ruido se observa una regularidad máxima en la secuencia de picos generada. En el segundo caso se tiene una señal periódica subumbral que no genera una respuesta en la corriente hasta que se le agrega ruido. Entonces para un nivel óptimo de ruido se observa una máxima fidelidad o correspondencia de la respuesta con dicha señal periódica.

2.9. Objetivos

En este trabajo queremos definir si existe un componente determinista en la expresión funcional de los canales de AmB, un proceso aparentemente estocástico. Para esto buscamos encontrar un fenómeno de resonancia determinista experimentalmente. De tal forma, se caracteriza la actividad de los canales de AmB en nano parches de membrana de POPC y colesterol sujetos a trenes de pulsos de diferentes frecuencias, para buscar la aparición de una resonancia eléctrica. En el futuro, planeamos caracterizar la actividad de los canales bajo distintas condiciones potencio-dinámicas para mejorar la visión de los mecanismos que rigen la formación de los poros en las membranas lipídicas.

La aplicación de los métodos utilizados por Parmananda y colaboradores entre otros, para el caso de sistemas electroquímicos, provee una nueva línea de estudio para nuestro sistema de canales de AmB en parches de membrana. Es importante hacer notar que esto representa un método novedoso para tratar de avanzar en el entendimiento del comportamiento de los canales, en particular en el modelo molecular de la acción de los polienos.

Además, dada la importancia de los fenómenos de resonancia en sistemas biológicos complejos como las neuronas, que involucran la interacción de varios canales, comprender los principios básicos involucrados en el surgimiento de la resonancia permitiría una clasificación de estos mecanismos.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

El POPC disuelto en cloroformo de Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al) y el colesterol en polvo de Sigma-Aldrich (Toluca, México) se almacenan a -20°C . La AmB también de Sigma-Aldrich (Toluca, México) se almacena a 4°C y se usa sin más purificación. El dimetil sulfóxido (DMSO, grado de síntesis) y el polidimetilsiloxano (PDMS 1 cSt) son de Sigma-Aldrich (Toluca, México). El Sylgard[®] base y agente de curado son de Dow Corning Corporation (Midland, Mi). El cloruro de potasio (KCl, grado ACS) y cloruro de calcio (CaCl_2 , grado ACS) son de Merck (Naucalpan, México). Todos los solventes orgánicos son grado ACS de J.T. Baker (Xalostoc, México).

3.1. Preparación de las soluciones

Solución madre de 1-Palmitoil, 2-Oleoil-sn-Glicero 3-Fosfocolina (POPC) (25 mg/ml)

Pesar 25 mg de POPC y agregarles 1 ml de cloroformo. Agitar con ayuda de un Vortex-genie de Scientific Industries[®] hasta disolver el POPC. Posteriormente guardar la solución en viales pequeños y mantenerlos a -20°C .

Solución madre de colesterol (10 mg/ml)

Pesar 10 mg de colesterol y agregarles 1 ml de cloroformo. Agitar con ayuda de un Vortex-genie de Scientific Industries[®] hasta disolver el colesterol. Posteriormente guardar la solución en viales pequeños y mantenerlos a -20°C .

3.2. Preparación de la suspensión liposomal (4 mg/ml de POPC y 30% mol colesterol)

Para 1 ml agregar a un matraz de fondo redondo de 5 ml de capacidad con junta 14/20

160 μ l de la solución madre de POPC (25 mg/ml en cloroformo)

y 87 μ l de la solución madre de colesterol (10 mg/ml en cloroformo)

Evaporar el cloroformo en el rotavapor (B-177, Buchi Labortechnik®, Flawil, Suiza)

1 h a 400 mBar, 40°C y posteriormente 1 h 30 min a 72 mBar, 40°C.

Este procedimiento provoca que se sedimenten los lípidos en la pared del recipiente de manera uniforme y por capas.

Agregar a dicho sedimento 1 ml de solución electrolítica

2 M KCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM Hepes a pH 8

Esto provoca que los lípidos se hidraten y formen liposomas. A continuación, se coloca la suspensión en un baño ultrasónico de Cole-Parmer®, en presencia de una atmósfera de nitrógeno, durante 25 min para obtener vesículas unilamelares.

3.3. Incorporación de AmB

Solución madre de AmB (10 mM)

Pesar 4.6 mg de AmB y agregar 0.5 ml de DMSO. Disolver la AmB con ayuda de un Vortex-genie de Scientific Industries®.

En nuestros experimentos la concentración utilizada es 35 μ M. Un parámetro más importante es la fracción molar AmB/lípido. La razón AmB/lípido usada en el experimento es 4.65×10^{-3} . La fracción máxima de DMSO es 1% vol/vol para evitar que la presencia del solvente induzca aperturas en la membrana.

Cuando está lista la suspensión liposomal, se le agregan 3.5 μ l de la solución madre de AmB y para tener una suspensión homogénea se coloca la suspensión en un baño ultrasónico de Cole-Parmer® en presencia de una atmósfera de nitrógeno durante 10 minutos aproximadamente.

3.4. Fabricación de micropipetas

Se utilizan capilares de vidrio de borosilicato con filamento (diámetro externo 1 mm; diámetro interno 0.58 mm) de World Precision Instruments® (Sarasota, FL) para obtener micropipetas utilizando la microforja Modelo P-2000 marca Sutter Instrument Co® (Parámetros de la microforja: Heat = 350 Fil = 4 Vel = 40 Del = 200 Pull = 200). A continuación se hidrofobizan las micropipetas. Esto es: se sumerge todo el cáliz de las pipetas durante 5 minutos en una solución de polidimetilsiloxano (PDMS) y posteriormente se colocan en una plancha a 130°C durante 10 minutos. Dicho procedimiento otorga un recubrimiento del polímero sobre la punta volviéndola hidrofóbica, lo cual evita corrientes de fuga, así como el flujo de iones a través de las paredes del vidrio. Posteriormente las micropipetas se llenan con la solución electrolítica usada en la preparación de la suspensión liposomal y se usan en los siguientes 20 minutos.

3.5. Técnica de “bubble number”

Para medir el diámetro de las pipetas se utilizó la técnica de “bubble number” [Bowman, 1999]. Ésta consiste en aplicar una presión de nitrógeno sobre las puntas inmersas en etanol y con ayuda de un manómetro determinar la presión a la cual comienza el burbujeo. De acuerdo con la ley de Laplace, el burbujeo ocurre cuando el radio de curvatura de la interfase aire-fluido alcanza un mínimo en la pipeta, que se asume en la punta de ésta

$$LD = \frac{4\sigma}{P_{umbral}} \quad (3.5.1)$$

donde P_{umbral} es la presión requerida para provocar que surjan burbujas de la punta, σ es la tensión superficial de la interfase aire-fluido y LD es el diámetro Laplaciano calculado. La ecuación 3.5.1 asume una geometría esférica en la punta de la pipeta. Se utilizan fluidos como etanol o metanol con tensiones superficiales pequeñas comparadas con la del agua, para que las presiones umbrales de las pipetas estén en el rango de la capacidad del manómetro. La temperatura ambiente debe medirse también porque la tensión superficial de estos fluidos es una función de la temperatura. Para temperaturas entre 20 y 50°C la tensión superficial del etanol está dada por

$$\sigma(\text{dinas/cm}) = -0.08729 * T(^{\circ}\text{C}) + 24.81 \quad (3.5.2)$$

En el laboratorio utilizamos primeramente un manómetro de Dwyer® (Michigan City, In) y posteriormente un controlador multifuncional más preciso el DMF1000 de World Precision Instruments® (Sarasota, Fl). Dada la resolución del manómetro, obtuvimos que los diámetros de las puntas de “tip-dip” están en un rango menor a 400 nm.

3.6. Formación de bicapas lipídicas con la técnica de “tip-dip”

Se utiliza el dispositivo experimental de la figura 3.1. Para reducir los efectos del ruido eléctrico y mecánico se utiliza una Jaula de Faraday y una mesa antivibratoria. La técnica de “patch-clamp” utilizada en este trabajo es la de “tip-dip” [Suárez-Islas, 1983], [Hanke, 1984]. Se coloca la suspensión liposomal en un vial a 25°C. Se utiliza un controlador de temperatura TC2Bip de Cell MicroControls® (Norfolk, VA). En la superficie de la suspensión liposomal se forma una monocapa de Langmuir. Es decir, una monocapa de lípidos en la cual, dado su carácter anfifílico, la cabeza hidrofílica permanece en contacto con el agua mientras las colas hidrofóbicas se ubican en la interfase agua-aire. A continuación, se sumerge la punta de la micropipeta en esta monocapa y gracias a la habilidad de autoensamblaje de los lípidos se forma una bicapa en dicha punta (figura 3.2). Las mediciones eléctricas se registran con un amplificador Axopatch 200B de

Molecular Devices® (Union City, CA) en modo "voltage-clamp", un filtro de 2 kHz y máxima ganancia. El sello de la bicapa y la resistencia de la pipeta se miden aplicando un potencial cuadrado de 5 mV. La señal se digitaliza con una Digidata 1440 A de Molecular Devices® y se almacena y visualiza en una computadora de escritorio con el software PClamp 10 también de Molecular Devices®. La tasa de adquisición de datos es cada 100 μ s. Una vez que se forma un nano-parche y se observa un gigasello estable (50 G Ω o más) se aplica un potencial continuo de 100 mV. Para poder aplicar y registrar los pulsos excitatorios es necesario construir diversos protocolos de adquisición en PClamp 10. Esto implica que para cada frecuencia, se construye un protocolo con el modo de adquisición "episodic stimulation" donde se define la duración del registro, el tipo de perturbación a utilizar, la amplitud de los pasos de voltaje en mV y su respectiva duración en ms. De tal forma, con este dispositivo y los protocolos correspondientes, se determina experimentalmente la dependencia de la actividad de los canales de AmB como función de la amplitud del voltaje de excitación y la frecuencia de un tren de pulsos excitatorios.

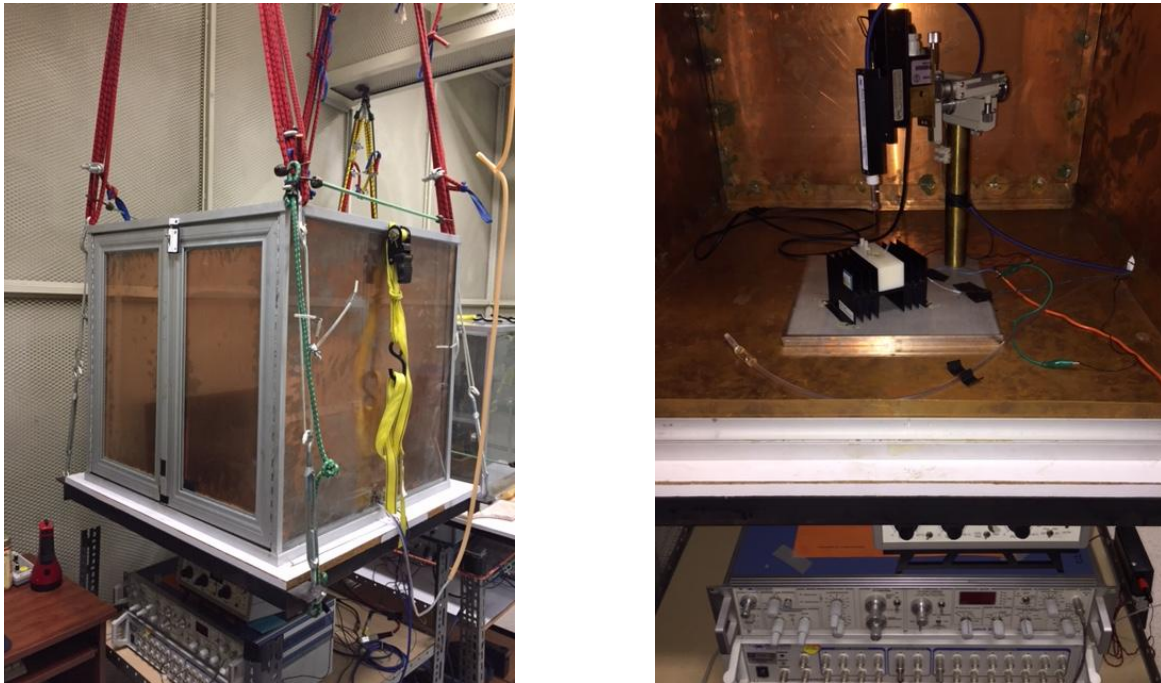


Figura 3.1

Dispositivo experimental. Se muestra la jaula de cobre, el amplificador Axopatch, la tarjeta de adquisición y el controlador de temperatura referidos en el texto.

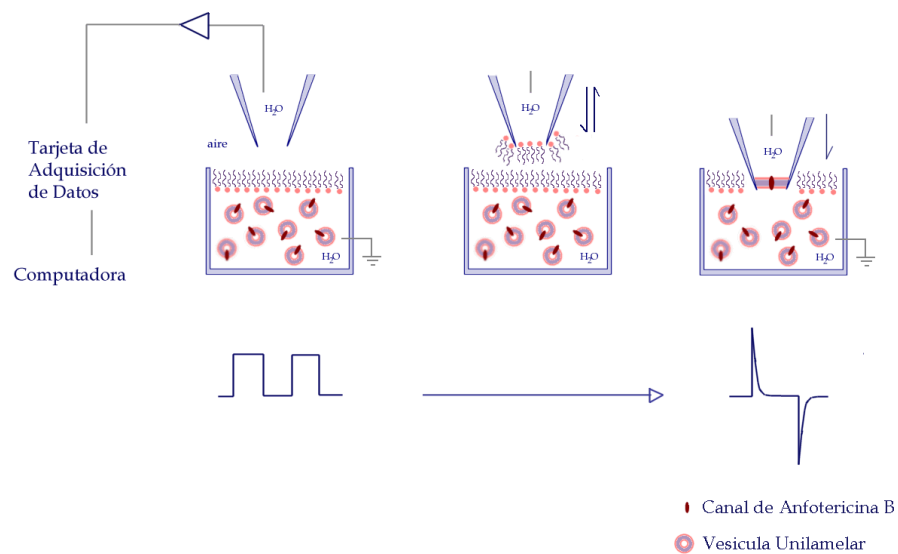


Figura 3.2

Esquema simplificado que muestra la formación de una bicapa en la punta de una micropipeta utilizando la técnica de "tip-dip". Se muestran las vesículas unilamelares y la AmB en la suspensión, así como la monocapa en la interfase agua-aire. Al momento de que la punta entra en contacto con la interfase, los lípidos se acomodan dando lugar a una bicapa en dicha punta.

Capítulo 4. Resultados

4.1. Conductancia como función de la frecuencia

Como se mencionó anteriormente, nos interesa buscar una resonancia determinista en el fenómeno de expresión de los canales de AmB como una forma de avanzar en el entendimiento de la dinámica de la expresión de los canales, el área menos comprendida en la descripción fisicoquímica de múltiples fenómenos biológicos en el que estos están involucrados, como la excitación celular. Para esto, se realizaron pruebas y se aplicaron perturbaciones de diferentes amplitudes de voltaje y diferentes frecuencias para determinar el rango en que ocurre el fenómeno. A continuación, se realizaron distintos registros de la actividad aplicando un potencial de paso cuadrado en un amplio rango de frecuencias: 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50 Hz. Debido a que nosotros trabajamos con pulsos que van de 0 a 100mV, podemos esperar que los cambios en conductancia observados en nuestro sistema sean debidos principalmente a los canales de AmB y no a poros lipídicos, como se mencionó en la sección 2.6. Para verificar este hecho y tener un control, se realizaron experimentos con membranas de POPC y 30% mol colesterol sin AmB y se les sometió a los pulsos de diferentes frecuencias. Los resultados mostraron que cuando se tiene una membrana con un sello estable (sin aperturas o rompimientos al aplicar el voltaje continuo), no existen cambios en la conductancia al someterla a los pasos de voltaje a las diferentes frecuencias estudiadas. Es decir, la membrana conserva la estabilidad del sello y no existen descargas significativas o aperturas del sello que se confundan con canales. Por el contrario, cuando la membrana tiene un sello inestable y/o existen aperturas, al aplicar los pasos de voltaje se incrementa el número de éstas hasta que eventualmente la membrana termina por romperse. Tal como era de esperarse, este hecho se hace evidente y actúa en menor tiempo para el caso de frecuencias altas. De tal forma, es necesario que la membrana tenga un sello estable para tener resultados confiables de la actividad de los canales de AmB.

El hecho de someter a la membrana a pasos de distintas frecuencias implica que se tiene una descarga capacitiva con cada pulso aplicado, lo que complica el análisis del registro. Por lo tanto, fue necesario desarrollar una serie de programas en nuestro laboratorio para restar la corriente capacitiva, así como la corriente de pérdida. En la figura 4.1 se muestra un ejemplo de una traza de canales de AmB a un potencial constante y en la figura 4.2 un ejemplo de la evolución de los registros cuando se les somete a un potencial de paso cuadrado a cierta frecuencia. En la figura 4.2: A) se muestra un ejemplo de la serie de tiempo original donde se aprecian los distintos pasos de voltaje de 0 a 100 mV a 1 Hz, B) se tienen solamente los pasos con 100 mV, es decir, se elimina la parte correspondiente a 0 mV (apagado) y se tiene entonces un registro con la mitad de puntos del registro original, C) se ajusta la línea basal, D) se muestra la traza corregida una vez que se resta la corriente capacitiva para cada pulso.

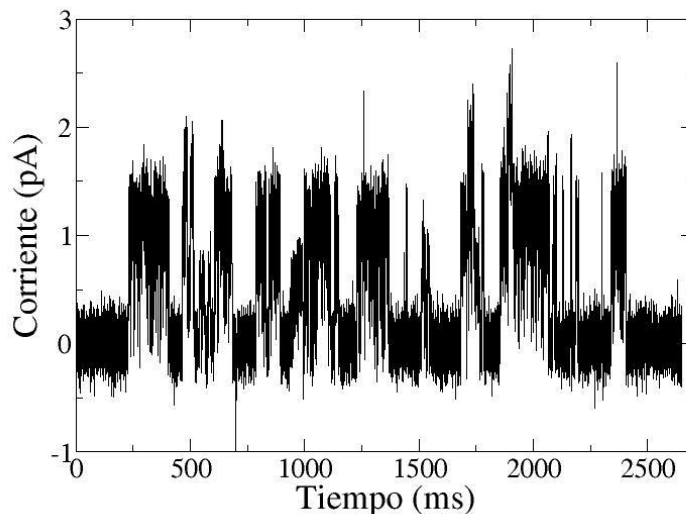


Figura 4.1

Ejemplo de una traza de canales de AmB en una membrana de POPC con 30% mol colesterol, [AmB]=35 μ M a 100 mV

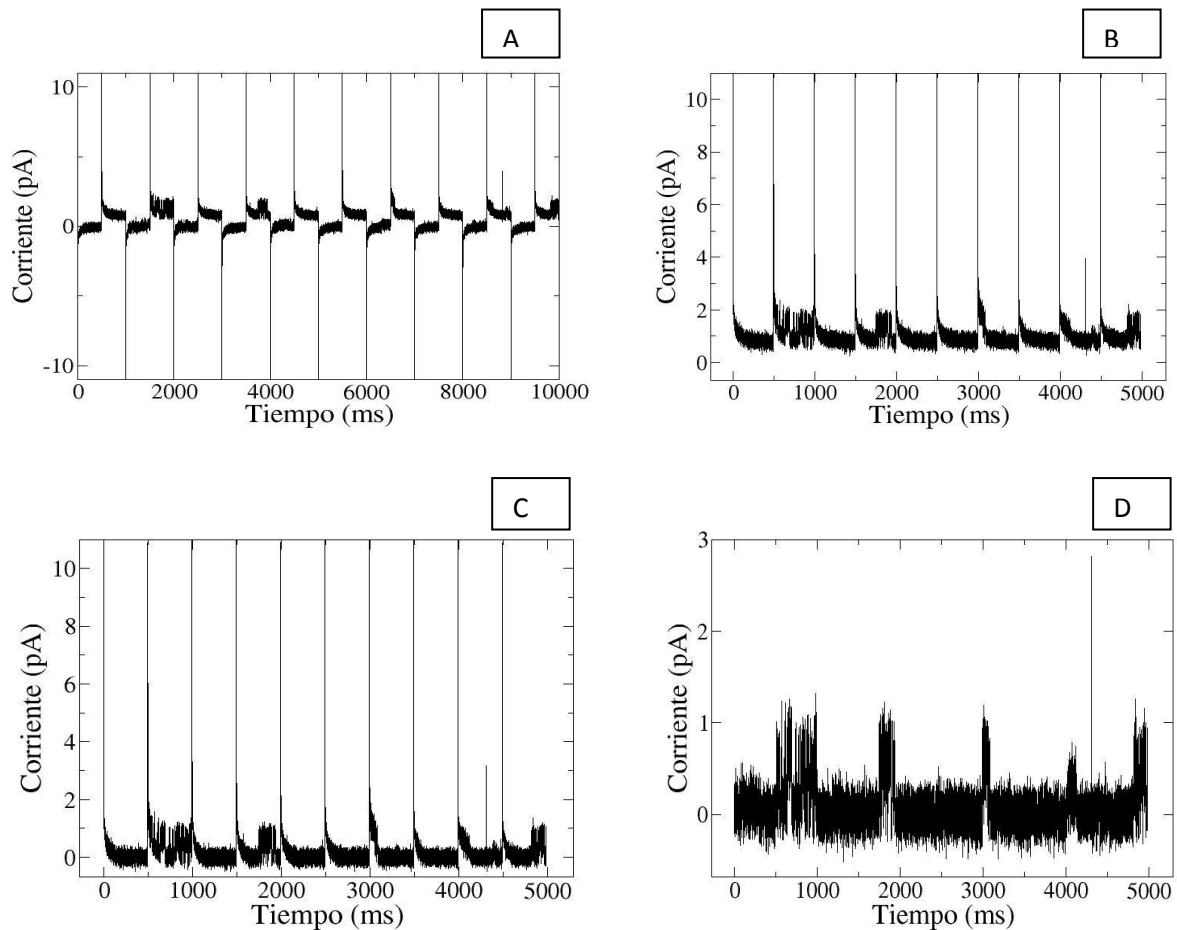


Figura 4.2

Evolución del análisis de los registros. A) Serie de tiempo original donde se aprecian los distintos pasos de voltaje de 0 a 100 mV a 1 Hz. B) Pasos con 100 mV; se elimina la parte de 0 mV. C) Ajuste de la línea basal; D) Traza corregida una vez que se resta la corriente capacitiva para cada pulso.

Una vez terminada la corrección se pudo determinar la dependencia de la actividad como función de la frecuencia. A frecuencias altas 10 y 50 Hz la actividad fue casi nula y a 0.1 Hz fue baja. Se observó también un comportamiento con un máximo en la región de 0.5 a 5 Hz. En estas primeras observaciones, se encontró que existe una frecuencia característica en el fenómeno de expresión de los canales de AmB.

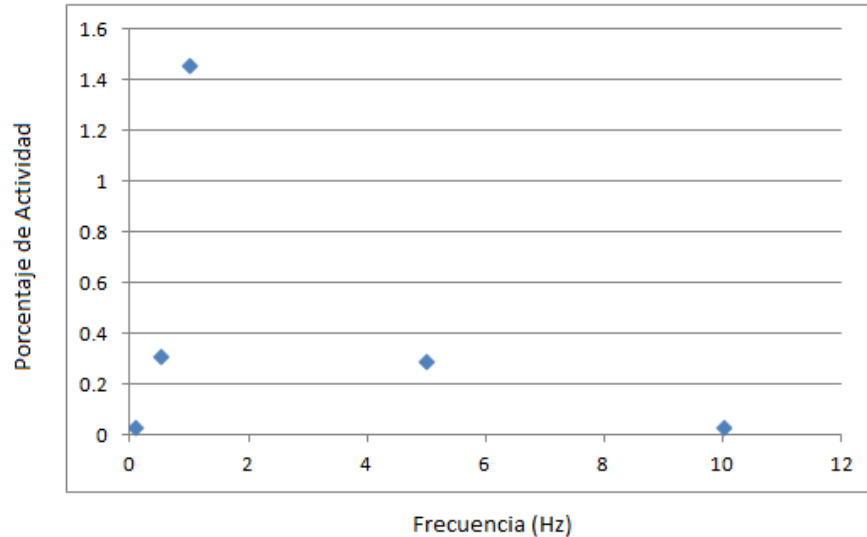


Figura 4.3

Primeras observaciones de la actividad de los canales de AmB como función de la frecuencia en membranas de POPC con 30% mol colesterol, $[AmB]=35 \mu M$. Se muestra el porcentaje de actividad total de los canales comparado con el estado estacionario de los registros.

La actividad es casi nula a frecuencias altas, pues los cambios rápidos de voltaje no permiten una estabilización adecuada de la membrana. Por lo tanto, se restringió el rango de frecuencias a estudiar. Además, para tener una mayor estabilidad de la membrana se utilizaron pasos de voltaje de 90 a 100 mV.

Con el objetivo de registrar la actividad de los canales de AmB a distintas frecuencias pero en distintos tiempos de transcurrido el experimento, se realizaron barridos de bajas a altas frecuencias, viceversa y barridos de frecuencias salteadas. Los resultados mostraron que la membrana no tiene la misma actividad a tiempos largos. De modo que se construyó un protocolo experimental que permitiera controlar esta variable. El protocolo P10 consiste en:

- Formar la membrana
- Minuto 0-4: membrana a 0 mV para que se estabilice

- Minuto 4-7: membrana con un potencial continuo de 100mV para garantizar la estabilidad del sello y la presencia de canales de AmB
- Minuto 7-10: registro de la membrana con un potencial continuo de 100mV
- Minuto 10-13: registro de la membrana con la aplicación de una función escalón de 0 a -10mV sobre el potencial continuo de 100 mV y diferentes frecuencias (0.05 Hz - 2 Hz)

Por lo tanto, el protocolo P10 establece que la membrana se estabilice durante 10 minutos antes de aplicar la función escalón. Este protocolo permite obtener resultados más robustos pues para cada membrana se utiliza una frecuencia diferente, logrando así una mayor estadística.

La actividad de los canales de AmB está determinada por medio de la conductancia promedio de éstos y se calcula utilizando la siguiente expresión:

$$\langle G \rangle = \frac{\sum i_i}{t_{exp} V_{ap}} \quad (4.1.1)$$

donde i_i es el valor de la corriente en cada punto, V_{ap} es el voltaje aplicado y t_{exp} es la duración en tiempo del registro analizado.

En particular, en este tipo de experimento existe una gran variación en la respuesta de diferentes parches de membrana. El rango de los diámetros de las puntas se encuentra entre 50 y 400 nm (puntas de "tip-dip" menores a 400 nm, valor estimado que se obtiene con el límite de la técnica de "bubble number"). Además, la membrana puede formarse a diferentes alturas del cáliz de la punta, es decir, a distintas distancias de la apertura de ésta. Esto puede originar diferencias en el área del parche de membrana y el sello de la misma, lo que llevaría a que el número de canales presentes sea diferente a la misma concentración y por lo tanto a una expresión bastante distinta. De modo que para el análisis de los resultados se considera la actividad relativa en una membrana aplicando el voltaje continuo y la actividad correspondiente para la misma membrana a una cierta frecuencia.

Llamaremos a estas frecuencias: frecuencias de perturbación, ya que consideramos que el potencial continuo de 100 mV es perturbado por el tren de pulsos. Un requerimiento adicional es que la actividad presente en la membrana antes de aplicar la perturbación (minuto 7-10) sea estable, para que el efecto con la perturbación (minuto 10-13) se observe de manera adecuada. Entonces definimos la Razón de Conductancia como la que corresponde a la aplicación de la frecuencia de perturbación dividida por el valor correspondiente al voltaje continuo.

$$\text{Razón de Conductancia} = \frac{\langle G \rangle_{\text{frec perturbación}}}{\langle G \rangle_{\text{voltaje continuo}}} \quad (4.1.2)$$

De tal forma, al utilizar el protocolo P10 junto con las consideraciones para el análisis de los resultados se encontró el siguiente perfil.

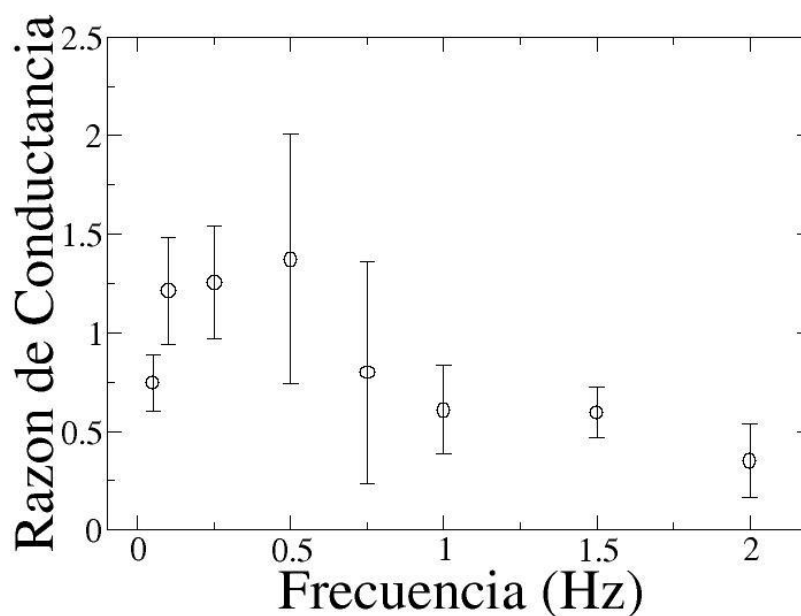


Figura 4.4

Razón de la conductancia promedio vs frecuencia de perturbación (Hz) cuando se aplica una función escalón de 0 a -10 mV sobre el potencial continuo de 100 mV en membranas de POPC con 30% mol colesterol, [AmB]=35 μ M. Número de experimentos: 0.05 Hz [4], 0.1 Hz [4], 0.25 Hz [4], 0.5 Hz [5], 0.75 Hz [7], 1 Hz [4], 1.5 Hz [3], 2 Hz [5].

A partir de los resultados de la figura 4.4 se observa que existe un incremento en la actividad de los canales de AmB a frecuencias bajas con un máximo en 0.5 Hz y un decremento de aproximadamente la mitad de la actividad para 2 Hz. Esta caída en la actividad nos llama la atención, pues aún si no existe un aumento en la actividad de los canales para frecuencias altas, en tal caso debería mantenerse la misma actividad que con un potencial continuo. Por lo tanto, para determinar si a pesar de utilizar el protocolo P10 persiste una dependencia de la actividad con el tiempo, se realizaron los experimentos a un voltaje continuo (100 mV) durante los 13 minutos de experimento y se analizó la actividad relativa entre los segmentos correspondientes al minuto 7-10 y minuto 10-13.

$$\text{Razón de Conductancia}_{\text{voltaje continuo}} = \frac{\langle G \rangle_{\text{min}10-13}}{\langle G \rangle_{\text{min}7-10}} = 0.45 \quad (4.1.3)$$

Los resultados muestran que efectivamente la actividad presente en la membrana decrece con el paso del tiempo en un factor de aproximadamente 0.45. De modo que existe un error sistemático que fue compensado con este factor de corrección empírico.

Como se mencionó al principio de la sección, se tienen membranas a las que se les aplican pulsos cuadrados que van de 90 a 100 mV a diferentes frecuencias de perturbación. El perfil de la figura 4.4 se obtiene utilizando la parte correspondiente al segmento de 100 mV del tren de pulsos. De modo que a continuación se realizó el mismo análisis pero considerando el segmento correspondiente a 90 mV para cada uno de los experimentos analizados previamente. En este perfil se observa de igual forma que existe un incremento en la actividad de los canales de AmB a frecuencias bajas con un máximo que se mantiene en 0.5 Hz y para frecuencias altas se observa la misma actividad que con un potencial continuo. Esto nos indica que el fenómeno de resonancia observado es robusto y que para una pequeña diferencia de voltaje se tiene el mismo perfil. En la figura 4.5 se pueden apreciar ambos perfiles.

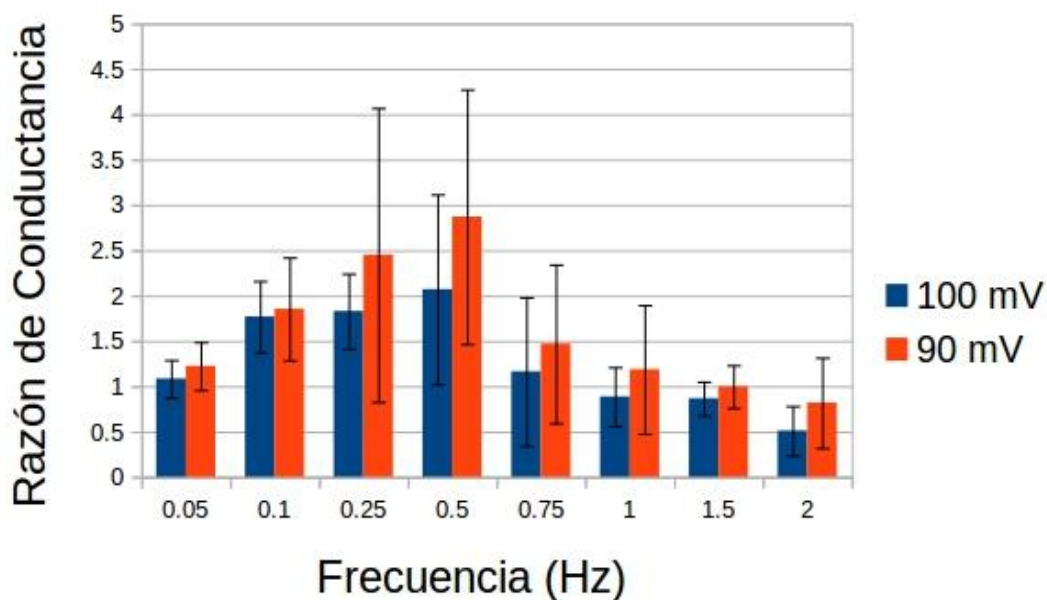


Figura 4.5

Razón de la conductancia promedio vs frecuencia de perturbación (Hz) cuando se aplica una función escalón de 0 a -10 mV sobre el potencial continuo de 100 mV en membranas de POPC con 30% mol colesterol, [AmB]=35 μ M. Se muestran los segmentos de 90 y 100 mV del tren de pulsos. Número de experimentos: 0.05 Hz [4], 0.1 Hz [4], 0.25 Hz [4], 0.5 Hz [5], 0.75 Hz [7], 1 Hz [4], 1.5 Hz [3], 2 Hz [5].

Para tener una mayor certeza de los resultados y obtener un perfil más nítido que mostrara la existencia de una frecuencia característica en la expresión de los canales de AmB, se aumentó el número de experimentos. Además, es necesario verificar que efectivamente tenemos la presencia de canales, y no de corrientes espurias, al aplicar el voltaje continuo antes de aplicar las frecuencias de perturbación. Esto se logra revisando el histograma de eventos correspondiente. Este requerimiento adicional nos llevó a eliminar varios experimentos ya realizados y por lo tanto a realizar nuevos. De tal forma se construyó finalmente el perfil de la figura 4.6.

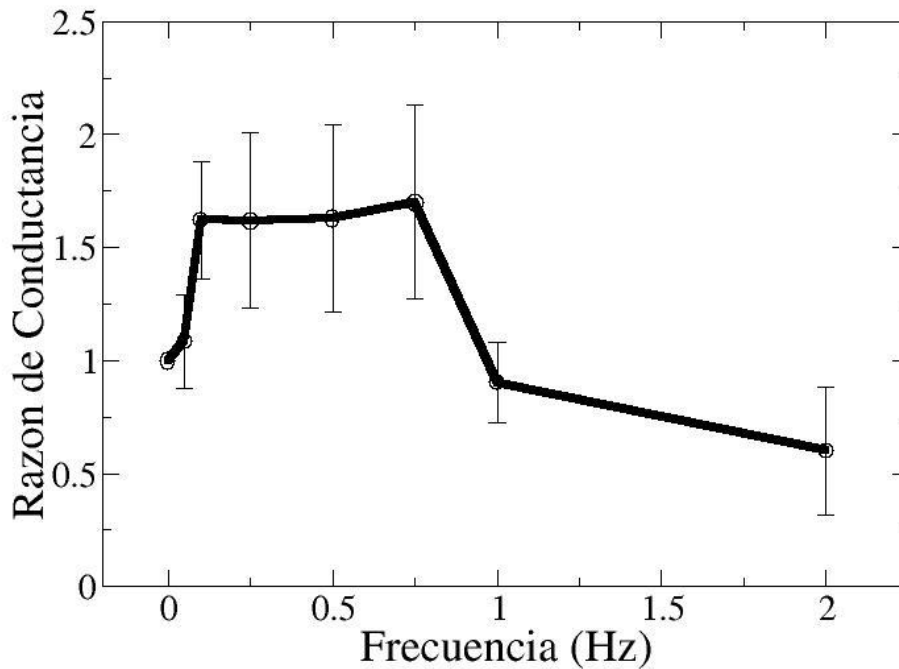


Figura 4.6

Razón de la conductancia promedio vs frecuencia de perturbación (Hz) cuando se aplica una función escalón de 0 a -10 mV sobre el potencial continuo de 100 mV en membranas de POPC con 30% mol colesterol, $[AmB]=35 \mu M$. Número de experimentos: 0.05 Hz [5], 0.1 Hz [5], 0.25 Hz [5], 0.5 Hz [5], 0.75 Hz [7], 1 Hz [5], 2 Hz [7].

Debido a que las frecuencias altas parecen inhibir la actividad se utilizaron las frecuencias 5 y 10 Hz para verificar este hecho. Las Razones de Conductancia obtenidas fueron 0.49 ± 0.19 y 0.27 ± 0.24 respectivamente, confirmando que perturbaciones con frecuencias altas inhiben la actividad de los canales. Este hecho podría indicar que ocurre una fatiga de la membrana a altas frecuencias. Es decir, al someter a la membrana al estrés de ciclos rápidos de cambio de voltaje existe un daño sobre la integridad de la misma, que no permite la adecuada expresión de los canales.

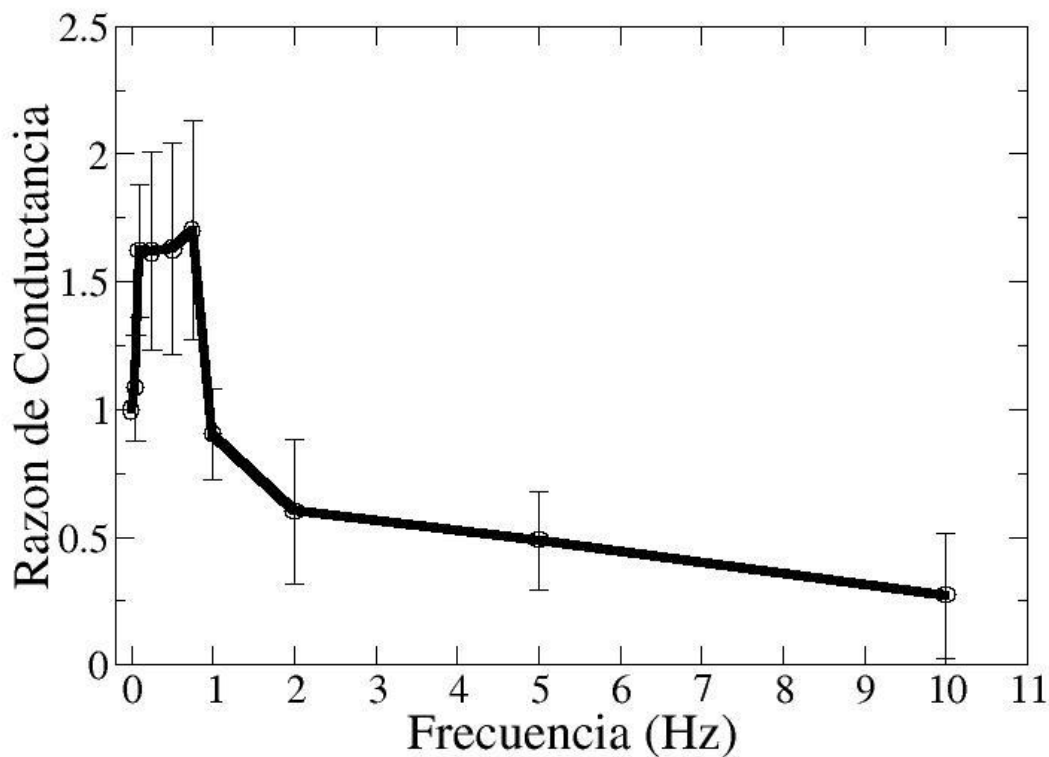


Figura 4.7

Razón de la conductancia promedio vs frecuencia de perturbación (Hz) cuando se aplica una función escalón de 0 a -10 mV sobre el potencial continuo de 100 mV en membranas de POPC con 30% mol colesterol, $[AmB]=35 \mu M$. Número de experimentos: 0.05 Hz [5], 0.1 Hz [5], 0.25 Hz [5], 0.5 Hz [5], 0.75 Hz [7], 1 Hz [5], 2 Hz [7], 5 Hz [5], 10 Hz [5]. Se muestran los mismos datos experimentales que en la figura 4.6 junto con los obtenidos para 5 y 10 Hz.

En las figuras 4.6 y 4.7 se puede observar una lengua de resonancia en la vecindad de 0.5 Hz y que a frecuencias mayores de 1.5 Hz existe una reducción significativa de la actividad. Cabe destacar que la resonancia observada en estos experimentos es determinista, en contraste con las mencionadas en el capítulo 2.8 que son estocásticas.

4.2. Ocupancia como función de la frecuencia

El aumento observado en la Razón de Conductancia como función de la frecuencia puede ser debido a 3 posibilidades:

1. Los canales ya formados pueden tener una mayor expresión. Esto es: aumenta su tiempo de apertura o se expresan más frecuentemente.
2. Aumenta el número de canales presentes.
3. Se forman canales con mayor conductancia.

Cuando realizamos el análisis para la conductancia no observamos una diferencia drástica en los diferentes tipos de canales. Por lo tanto, realizamos otro análisis que consiste en determinar el tiempo de residencia de los estados abierto y cerrado como función de la frecuencia de perturbación. Se considera la suma de todos los puntos con un valor menor que el nivel de ruido como el tiempo de residencia en el estado cerrado; el complemento es la ocupancia. Es decir, no diferenciamos entre distintos tipos de canales y trabajamos con un modelo sencillo que considera únicamente 2 estados: abierto y cerrado.

Tal como para la Razón de Conductancia consideramos ahora la razón de la ocupancia. Es decir, la que corresponde a la aplicación de la frecuencia de perturbación dividida por el valor correspondiente al voltaje continuo.

$$\text{Razón de Ocupancia} = \frac{\langle \text{Ocup} \rangle_{\text{frec perturbación}}}{\langle \text{Ocup} \rangle_{\text{voltaje continuo}}} \quad (4.2.1)$$

Asimismo, se analizó la ocupancia relativa (minuto 7-10 y minuto 10-13) en los experimentos realizados a voltaje continuo y se encontró también un error sistemático que fue compensado con el factor de corrección empírico correspondiente.

$$\text{Razón de Ocupancia}_{\text{voltaje continuo}} = \frac{\langle \text{Ocup} \rangle_{\text{min10-13}}}{\langle \text{Ocup} \rangle_{\text{min7-10}}} = 0.43 \quad (4.2.2)$$

En la figura 4.8 se muestra el perfil encontrado. El perfil de la Razón de Ocupancia vs la frecuencia muestra una curva unimodal con un máximo en la vecindad de 0.5 Hz, tal como la Razón de Conductancia. Además, la ocupancia aumenta el mismo porcentaje (50%) que la Razón de Conductancia, por lo que podemos inferir que el incremento en la actividad de los canales de AmB efectivamente está dado por un aumento en la ocupancia, ya sea por una mayor frecuencia de expresión (mayor número de eventos) o mayor tiempo de apertura (eventos más largos). Debido a la caída en la ocupancia para 2 Hz se realizó el mismo análisis para frecuencias altas que para la Razón de Conductancia. El perfil de la figura 4.9 muestra de igual forma una reducción en la ocupancia para estas frecuencias.

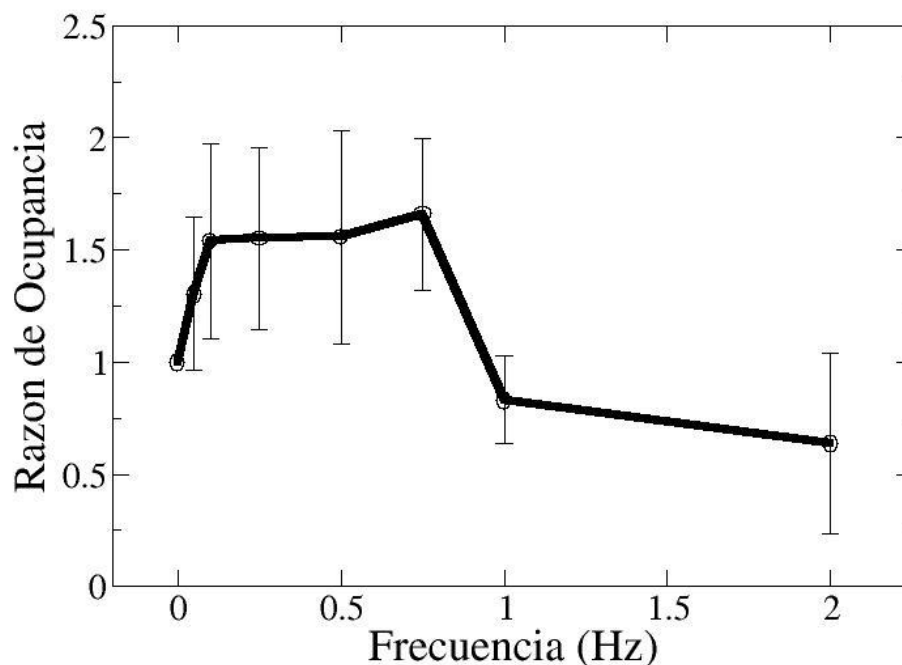


Figura 4.8

Razón de la ocupancia vs frecuencia de perturbación (Hz) cuando se aplica una función escalón de 0 a -10 mV sobre el potencial continuo de 100 mV en membranas de POPC con 30% mol colesterol, [AmB]=35 μ M. Número de experimentos: 0.05 Hz [5], 0.1 Hz [5], 0.25 Hz [5], 0.5 Hz [5], 0.75 Hz [7], 1 Hz [5], 2 Hz [7].

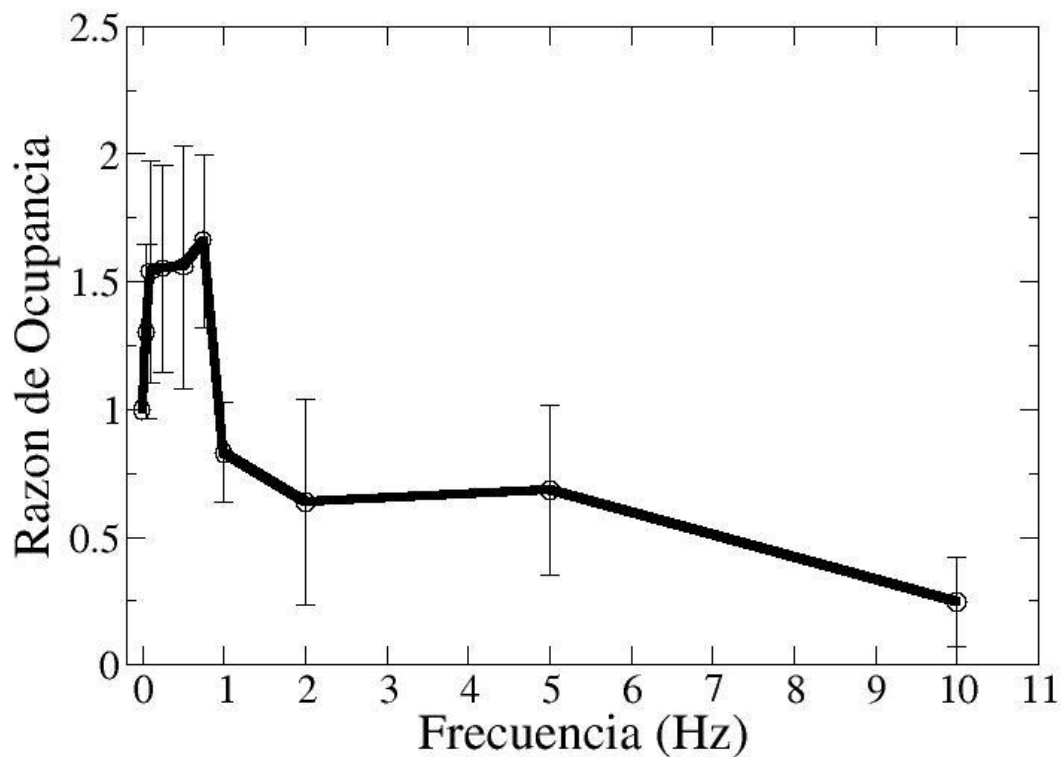


Figura 4.9

Razón de la ocupancia vs frecuencia de perturbación (Hz) cuando se aplica una función escalón de 0 a -10 mV sobre el potencial continuo de 100 mV en membranas de POPC con 30% mol colesterol, $[AmB]=35 \mu M$. Número de experimentos: 0.05 Hz [5], 0.1 Hz [5], 0.25 Hz [5], 0.5 Hz [5], 0.75 Hz [7], 1 Hz [5], 2 Hz [7], 5 Hz [5], 10 Hz [5]. Se muestran los mismos datos experimentales que en la figura 4.8 junto con los obtenidos para 5 y 10 Hz.

4.3. Oxidación de la membrana

Como ya habíamos mencionado, una dificultad adicional crítica fue el decaimiento de la actividad en experimentos realizados a tiempos largos. Resultados obtenidos en el laboratorio indicaron que la oxidación juega un papel crucial a la hora de realizar los experimentos, por lo que se hicieron modificaciones en el protocolo para poder controlar esta variable. Primeramente se realizaron pruebas burbujeando nitrógeno en la solución liposomal con AmB y tapando el vial donde éstos se depositan, es decir, trabajar con una atmósfera inicial de nitrógeno. En dichos experimentos se observó una disminución menor de la actividad con el paso del tiempo. De modo que a continuación, se realizó un experimento que mostrara a detalle el efecto del nitrógeno en la actividad presente en la membrana con el paso del tiempo. Los experimentos se realizaron a un voltaje continuo (100 mV) con un flujo de nitrógeno constante durante 20 minutos y se analizó la actividad presente en la membrana en segmentos de 3 minutos. La atmósfera inerte dio muy buenos resultados, ya que siempre se observa actividad en todas las membranas. Sin embargo, aún en estas condiciones los resultados muestran que persiste una disminución de la actividad con el paso del tiempo como se observa en la figura 4.10. Esto nos indica que la caída en la actividad no está relacionada con la oxidación de la membrana, sino que puede estar relacionada con el área del parche de membrana, por ejemplo. Como se mencionó anteriormente, las puntas de "tip-dip" tienen diámetros menores a 400 nm. Si la membrana es muy pequeña, el equilibrio de la difusión de la AmB puede ser un problema. La AmB se podría ir a otras fases del sistema a un equilibrio distinto, como puede ser la fase lipídica, la monocapa en la superficie o el anulus en el borde de la pipeta.

Por otra parte, membranas de un mayor tamaño y por ende más lípido presente, permitirían tener un mejor equilibrio en esta fase. Es por esto que se realizó el mismo experimento pero con puntas de 1 micrómetro. Se utilizaron diferentes recubrimientos del interior de la pipeta como fueron mezclas de polidimetilsiloxano (PDMS) y Sylgard® (con y sin agente de curado) en distintas razones y probando

distintas temperaturas y tiempos de curado. Nuevamente los experimentos se realizaron a un voltaje continuo (100 mV) con un flujo de nitrógeno constante durante 20 minutos y se analizó la actividad presente en la membrana dividiéndola en segmentos de 3 minutos. Los resultados muestran un comportamiento más constante en la actividad con el paso del tiempo (figura 4.11). Sin embargo, la actividad de AmB es muy reducida para estas puntas, es decir, no aparecen los canales grandes. Además, aún cuando se observa un comportamiento más constante respecto al tiempo, aparece una gran dispersión de los valores sobre las membranas individuales. Asimismo, debido a que se trata de membranas grandes, éstas presentan oscilaciones que asemejan las vibraciones de un tambor, lo que las vuelve inestables e incluso registran frecuencias de ruido externas al experimento. Es por esto que no son una opción viable para realizar nuestros experimentos donde se perturba a la membrana con un tren de pulsos montado sobre un potencial basal a diferentes frecuencias. Sin embargo, debido a que en este tipo de experimento existe una gran variación en la respuesta de diferentes parches de membrana, el poder controlar nuestro sistema modelo permitiría disminuir la variabilidad. Este hecho es el que nos motivó a buscar puntas cuya área podamos controlar.

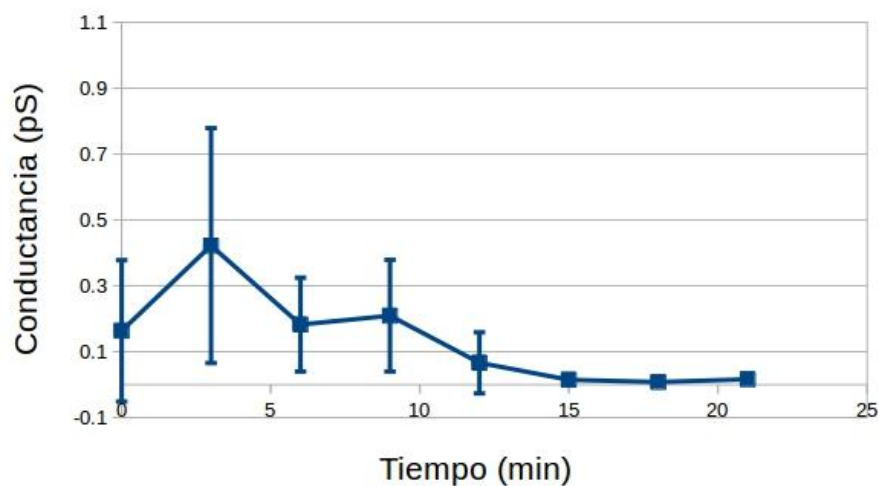


Figura 4.10

Conductancia promedio de los canales de AmB (pS) vs tiempo (min) con flujo de N_2 para puntas de "tip-dip" en membranas de POPC con 30% mol colesterol, $[AmB]=35 \mu M$.
Número de experimentos: 7.

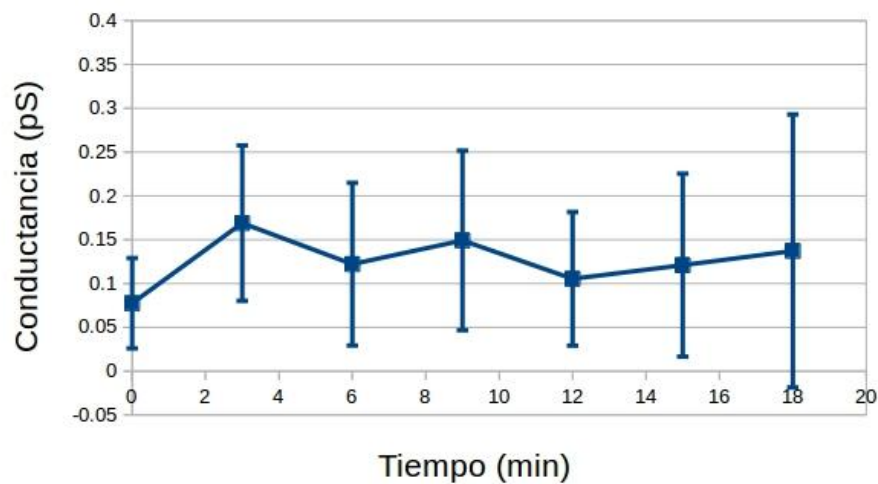


Figura 4.11

Conductancia promedio de los canales de AmB (pS) vs tiempo (min) con flujo de N_2 para puntas de 1 micrómetro en membranas de POPC con 30% mol colesterol, $[AmB]=35 \mu M$.
Número de experimentos: 7.

4.4. Consideraciones importantes de los experimentos

En resumen, se analizó la actividad de los canales de AmB al someter a la membrana a condiciones potencio-dinámicas, es decir, al aplicar trenes de pulsos cuadrados (10 mV) de diferentes frecuencias sobre un potencial de 100 mV. A continuación se describe en detalle el procedimiento experimental con el propósito de dar reproducibilidad clara a los mismos.

Como se describió en el capítulo 3, el experimento requiere la preparación de la suspensión liposomal evaporando el solvente de la solución con el rotavapor. Una vez evaporado el solvente, se agrega la solución electrolítica y se obtienen liposomas. Después de colocar la suspensión en un baño ultrasónico, ésta deber ser translúcida con una ligera tonalidad de azul para garantizar que se tienen vesículas unilamelares. De lo contrario, si se tiene una suspensión de color blanquecino se tiene la presencia de agregados de lípidos o incluso existe la posibilidad de que el solvente no haya sido evaporado en su totalidad, lo cual dificultará posteriormente la formación de las membranas. Debido a que se trata de una pequeña cantidad de lípidos (1 ml), es importante contar con la recirculación de agua a una temperatura de 20°C en el proceso de evaporación para recoger todo el solvente. El tiempo de preparación de la suspensión liposomal y los demás requerimientos para comenzar con el experimento es de alrededor de 5 horas. Sin embargo, una vez que se realiza el experimento se dispone de 1 hora aproximadamente, antes de que los lípidos comiencen a oxidarse y sea necesario reemplazarlos con nueva suspensión. Por esta razón se prepara suficiente suspensión para poder reemplazarla y realizar los experimentos durante 2 horas.

Un factor crítico al realizar el experimento es que aparezca un nivel de ruido en la membrana de una magnitud mayor a la que permitiría la detección adecuada de canales. Para reducir este efecto, se debe evitar un problema mecánico con las tierras eléctricas del dispositivo experimental. Así como una inestabilidad eléctrica de la batería que alimenta al controlador de temperatura. Hemos notado que al

tener un sólo punto de tierra y evitar corrientes parásitas debidas a la formación de rizos en los cables de conexión, se reduce el efecto de ruido. Asimismo, para formar el parche de membrana es necesario introducir la punta de la micropipeta en la suspensión liposomal, pero se deben evitar múltiples inmersiones de la punta y/o una inmersión demasiado profunda, ya que la punta se contamina.

Una dificultad importante y que fue la motivación para probar puntas diferentes, es el porcentaje de éxito de las puntas utilizadas, es decir, aquellas en las que se forman membranas que logran tener un buen sello con la pipeta ($>50 \text{ G}\Omega$). En el caso de las puntas de "tip-dip" es de aproximadamente 40%. En nuestros experimentos se quiere determinar el efecto de la perturbación relativo al voltaje continuo, por lo tanto es necesario tener una gran actividad de canales. Debido a esto se realiza el experimento a una concentración alta de AmB (razón AmB/Lípido= 4.65×10^{-3}). Sin embargo, la presencia de AmB dificulta a su vez la formación de un sello estable. Ya que al ser poco soluble en agua se requiere la presencia de DMSO, un solvente orgánico, por lo que se debe tomar en cuenta entonces no sobrepasar la fracción máxima de DMSO de 1% vol/vol.

Una vez formada la membrana, la actividad del canal puede confundirse en ocasiones con señales externas (del medio ambiente) o producidas en el equipo de registro, que aparecen en el electrómetro como si fuesen debidas a canales. Otra fuente de corrientes espurias son aperturas del sello que hace la membrana con la pipeta, que pueden inclusive terminar rompiendo la membrana. De tal forma, una buena membrana es aquella que cuenta con un sello estable, bajo ruido, ausencia de señales externas y presencia de canales.

Por otra parte, como se mencionó en el capítulo 3, la aplicación de los pulsos requirió el diseño de los protocolos de adquisición correspondientes, así como las modificaciones pertinentes de cada uno al ir afinando el protocolo experimental (Apéndice 1). Es importante notar que los canales son una traza ruidosa, por lo que su análisis requiere una idealización de los experimentos. Esta idealización

presenta un gran problema pues una sobreidealización puede falsificar resultados. Por esta razón, se debe encontrar un balance adecuado entre la sobreidealización y una idealización deficiente. En nuestro caso, el análisis de los registros requirió un entrenamiento en la plataforma Fortran de los programas desarrollados en el laboratorio, al igual que realizar modificaciones sobre los mismos dependiendo del tipo de análisis requerido (Apéndice 2). De manera general, en todos los casos se requiere eliminar la descarga capacitiva de cada pulso, ajustar la línea basal y realizar una idealización de la traza para determinar la corriente promedio en cada registro. Por lo tanto, el tiempo empleado para el análisis de cada registro depende en gran medida de la estabilidad de cada membrana.

Una vez realizado el análisis es necesario descartar las membranas que no tengan suficiente actividad de canales, es decir, las que tengan una conductancia promedio menor a 1 pS. También, como se mencionó anteriormente, es necesario eliminar aquellas membranas cuya actividad no permanezca relativamente constante durante los 3 minutos de la aplicación del voltaje continuo de 100 mV. Ya que de lo contrario no podremos determinar el efecto de las frecuencias de perturbación. Asimismo es necesario verificar que efectivamente tenemos la presencia de canales, y no de corrientes espurias, al aplicar el voltaje continuo antes de aplicar las frecuencias de perturbación, revisando el histograma de eventos correspondiente. Entonces las consideraciones mencionadas otorgan resultados con una mayor validez estadística y permiten una mayor certeza del fenómeno.

Capítulo 5. Discusión

En la sección de Resultados se mostró que existe una frecuencia característica en la expresión de los canales de AmB. La presencia de esta frecuencia de resonancia indica la existencia de un componente determinista en la actividad de los canales. Más aún, parece que el sistema se comporta como un oscilador subamortiguado, pues se obtuvieron curvas semejantes a las curvas de resonancia correspondientes en la figura 2.12. Esto implica que existe una frecuencia característica de la dinámica autónoma. Cuando se perturba al sistema con una frecuencia en la vecindad de esta frecuencia característica, se observa una respuesta manifestada por un incremento del 50% en la actividad de los canales. Este hecho se observa tanto para la Razón de Conductancia, como para la Razón de Ocupancia. Finalmente, el sistema muestra un decremento monotónico de la actividad en frecuencias mayores a 1.5 Hz, lo que parece un filtro pasa-bajo.

Con el objetivo de caracterizar el fenómeno de resonancia, se han realizado experimentos con una perturbación de mayor magnitud: una función escalón que va de 0 a 100 mV. Los resultados preliminares muestran que se obtiene un perfil de resonancia similar al del pulso de 90 a 100 mV, con un máximo en la región de 0.5 Hz. Pero con la marcada diferencia de que el aumento en la Razón de Conductancia en lugar de ser del 50% es del 300%, es decir, el aumento en la magnitud de la perturbación produce un efecto amplificado de la respuesta.

Es de esperarse que la molécula de AmB responda al campo eléctrico dado que tiene un momento dipolar de aproximadamente 30 D. Por otro lado, la escala de tiempo de la resonancia, en el orden de segundos, no es consistente con un movimiento de la molécula en la solución acuosa o en la interfase lípido/agua. De modo que podemos esperar que el movimiento referido de oscilador subamortiguado involucre la orientación de la molécula en la fase lipídica. Se ha estimado que el proceso de inserción de los péptidos antimicrobianos está en el rango de milisegundos [Schuler, 2016] y es por tanto demasiado rápido para la

escala detectada. Algo similar ocurre para la escala de tiempo de difusión de la AmB [Czub, 2006] dado que los canales aparecen en un nano-parche. Por lo tanto, la escala de tiempo de la resonancia indica que el fenómeno involucrado está relacionado con la formación de los poros. Se han reportado escalas de tiempo para la formación de poros de péptidos antimicrobianos en un rango de milisegundos a segundos [Li, 2017].

Es importante notar que en trabajo realizado en el laboratorio con canales formados por A21 (un derivado de la AmB desarrollado en nuestro laboratorio) se ha mostrado que un canal abierto provoca la apertura de otro canal [Singla, 2017]. La apertura de este canal puede ser inmediata (apertura simultánea) o después de un cierto tiempo. La distribución de estos tiempos no es azarosa, tiene un patrón particular, lo que indica que la apertura de los canales está sincronizada.

Asimismo la observación de que los canales de AmB tengan una dinámica interna determinista podría tener implicaciones importantes, ya que se trata de poros sencillos consistentes de varios monómeros de la molécula, no como los canales de K^+ y Na^+ que son proteínas complejas. Esto sugiere que podría tratarse de un efecto general en fenómenos transmembranales, en lugar de una característica física de un péptido particular o de canales poliénicos.

Además, dado que la resonancia eléctrica es una propiedad común e importante en las células involucradas en muchas funciones fisiológicas, como son las funciones cognitivas y las sensaciones táctil y visual, existe la necesidad de un modelo cinético adecuado de canales dependientes de voltaje donde la resonancia eléctrica se pueda ligar a las propiedades biofísicas del canal, dando lugar a posibles apreciaciones mecanísticas. Como se mencionó anteriormente, nuestro sistema consiste de un nano-parche de membrana en lugar de una célula y de poros de AmB en lugar de un canal proteico. Entonces se trata de un modelo mucho más sencillo y por lo tanto se podría esperar que la mecánica sea más fácil de entender. Sin embargo, aún en este sistema ha sido difícil entender los

mecanismos detrás de la dinámica. Por otra parte, lo que sí sabemos es que dado que la escala de tiempo detectada en la resonancia se refiere a un proceso lento, la estructura de la membrana podría ser un factor determinante. Además, dada la escala de tiempo de segundos podría ser que los canales formen toros y no poros, lo que abre posibilidades de que ocurran diferentes mecanismos moleculares.

En este trabajo proponemos entonces un enfoque diferente para tratar este sistema que se ha estudiado a potencial constante y ahora lo estudiamos a potencial dinámico. Este nuevo enfoque puede ser explotado para caracterizar la resonancia en otros sistemas, como pueden ser diferentes composiciones lipídicas por ejemplo. Esto debido a que la expresión de los canales está determinada en gran parte por propiedades de la membrana. Por lo tanto, esta es una metodología novedosa para tratar de entender los mecanismos de acción de los canales de AmB en base a una dinámica determinista.

Capítulo 6. Conclusiones

El hecho de encontrar un perfil de resonancia en este sistema es prueba de la existencia de elementos deterministas en la dinámica de los canales de AmB. La escala de tiempo de la resonancia del orden de segundos indica que el fenómeno involucrado está relacionado con la formación de los poros.

Dado que buscamos caracterizar la dinámica de apertura y cierre de los canales, la técnica de "tip-dip" es adecuada. Sin embargo, existe una gran variación en la respuesta de diferentes parches de membrana, por lo que es importante controlar nuestro sistema modelo para disminuir la variabilidad.

En este trabajo proponemos un nuevo enfoque para tratar este sistema que se ha estudiado a potencial constante y ahora lo estudiamos a potencial dinámico.

Capítulo 7. Perspectivas

Existen múltiples opciones para caracterizar y entender así el origen de la resonancia. Surgen dudas, pero se trata de una nueva forma para entender el fenómeno de expresión de los canales. En este trabajo se encontró el fenómeno de resonancia determinista en la expresión de los canales de AmB para membranas de POPC con 30% mol colesterol. Como se mencionó anteriormente sería interesante caracterizar la resonancia en otros sistemas, como pueden ser diferentes composiciones lipídicas o temperaturas logrando tener distintas fases.

Queda por descubrirse si estos canales responden a una perturbación estocástica. Pensamos que la resonancia estocástica periódica (señal periódica subumbral que en presencia de un nivel óptimo de ruido genera una respuesta) sería la primera opción para buscar este fenómeno, ya que en este caso la señal periódica es un componente determinista dominante y la contribución del ruido sería mínima. Para realizar este experimento se necesita que la señal subumbral sea más lenta que la dinámica autónoma del sistema, para permitir que el sistema regrese a su estado basal y así poder apreciar la respuesta inducida. Al mismo tiempo se necesita que el ruido tenga una amplitud y una frecuencia suficientemente grande para inducir una respuesta, pero sin enmascarar la dinámica normal de los canales. Para cumplir este propósito se podrían utilizar membranas con una composición diferente para garantizar la aparición de canales más grandes, así como con un tiempo de apertura mayor.

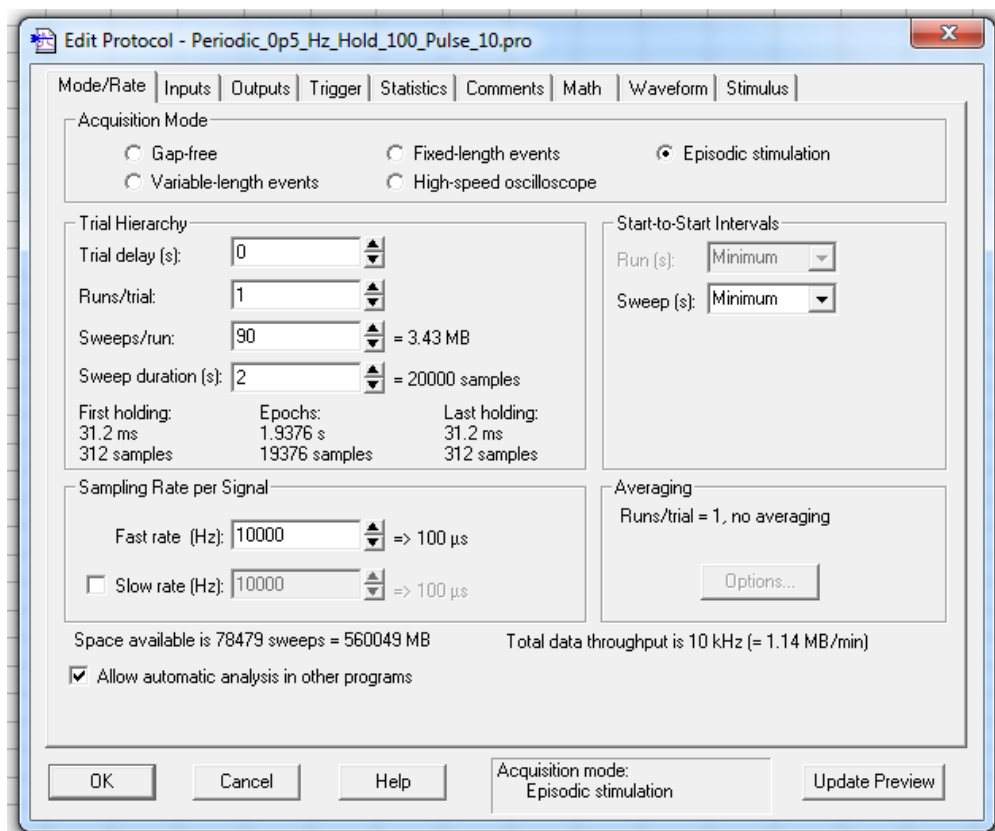
Otra opción sería buscar replicabilidad en la aparición de los canales de un experimento a otro al introducir una señal de ruido. En este caso se tiene una señal de ruido correlacionado, es decir, se mantiene por un tiempo dado un valor de ruido determinado (ruido rosa). Se realizan experimentos donde se registra la actividad de los canales para diferentes membranas y se les aplica a todas la misma señal de ruido en el mismo instante dado. Al analizar la actividad en presencia de ruido para las diferentes membranas se podría apreciar una

replicabilidad en la aparición de los canales. Como una primera observación, se podría prender y apagar el ruido en ciertos intervalos de tiempo para una misma membrana y comparar los segmentos correspondientes a la aplicación de ruido en busca de una replicabilidad.

De tal modo, someter a nuestro sistema a este tipo de perturbaciones potencio-dinámicas podría darnos información sobre su dinámica interna, logrando así avanzar en el entendimiento de sus mecanismos de acción.

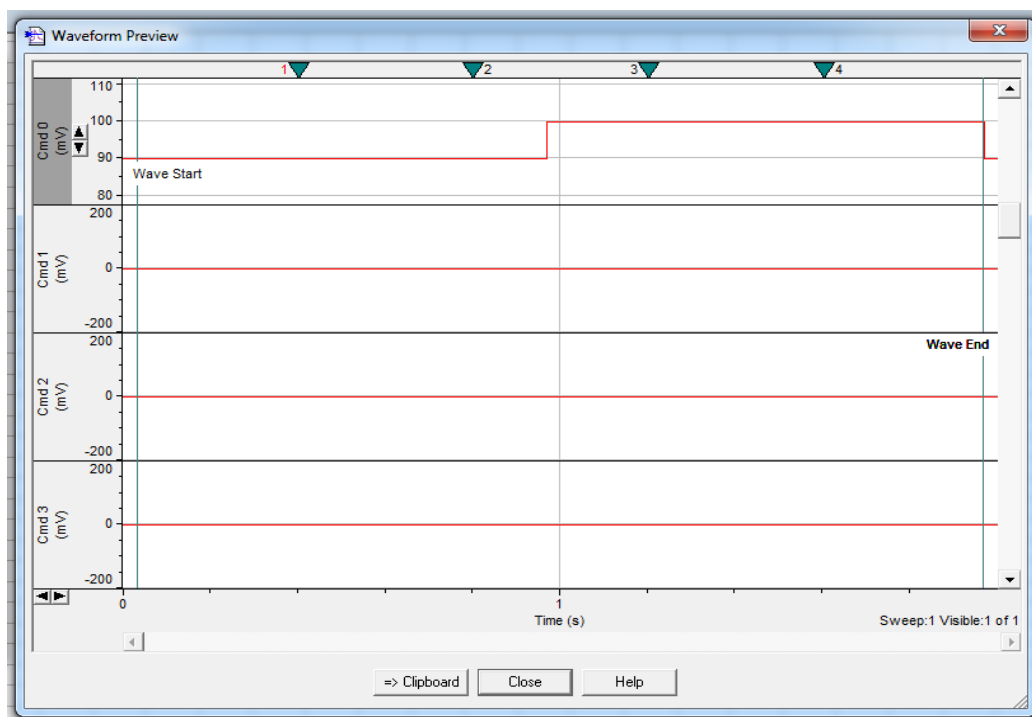
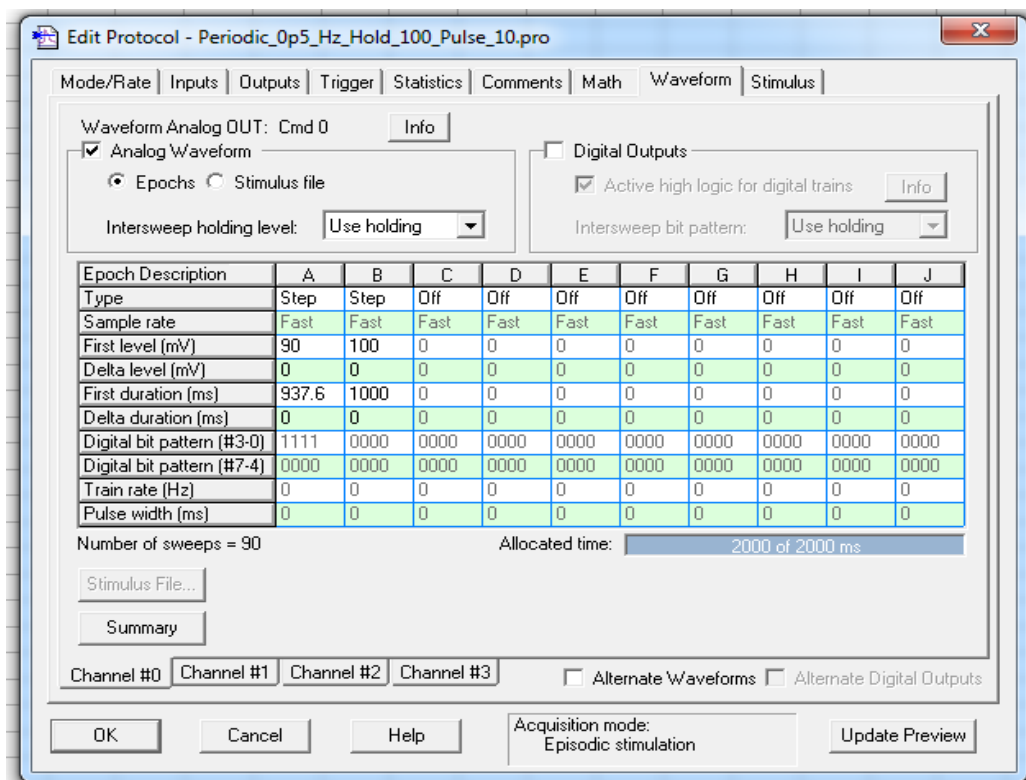
Apéndice 1. Protocolos de adquisición

En esta sección presentamos los protocolos de adquisición diseñados para la aplicación de los trenes de pulsos de diferentes frecuencias. Dichos protocolos se construyen utilizando el software PClamp 10 de Molecular Devices®. Como se mencionó en el capítulo 3, para cada frecuencia se construye un protocolo con el modo de adquisición “episodic stimulation” donde se define la duración del registro, el tipo de perturbación a utilizar, la amplitud de los pasos de voltaje en mV y su respectiva duración en ms. A continuación se muestran imágenes de la ventana de edición para estos protocolos. A modo de ejemplo se muestran los protocolos para 0.5 y 1 Hz.



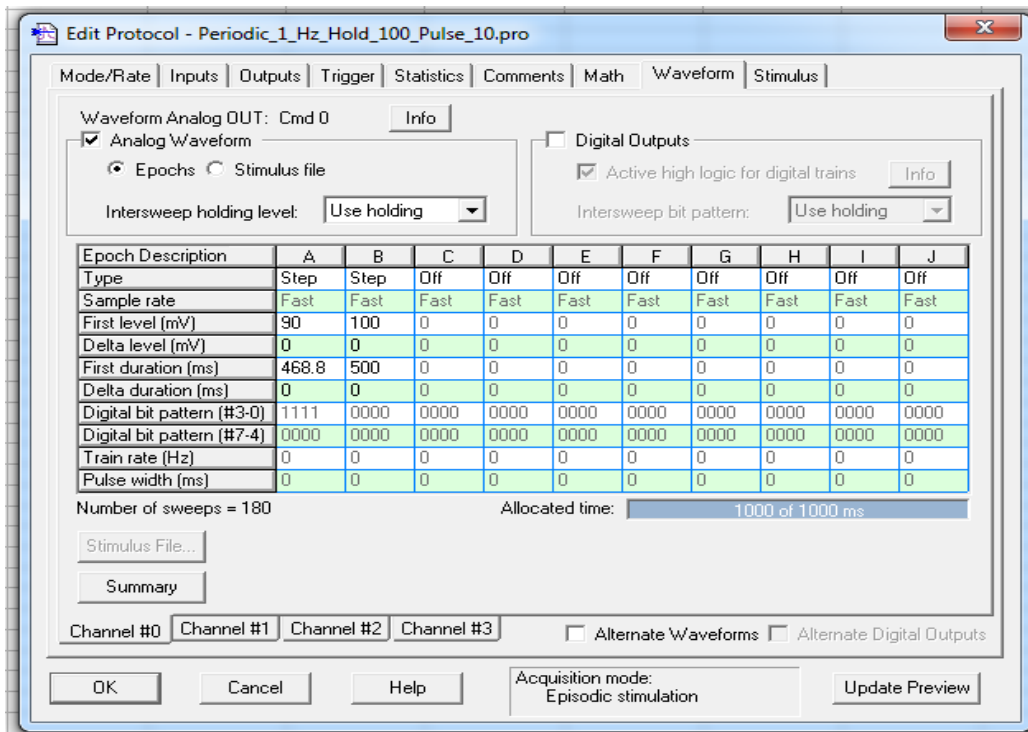
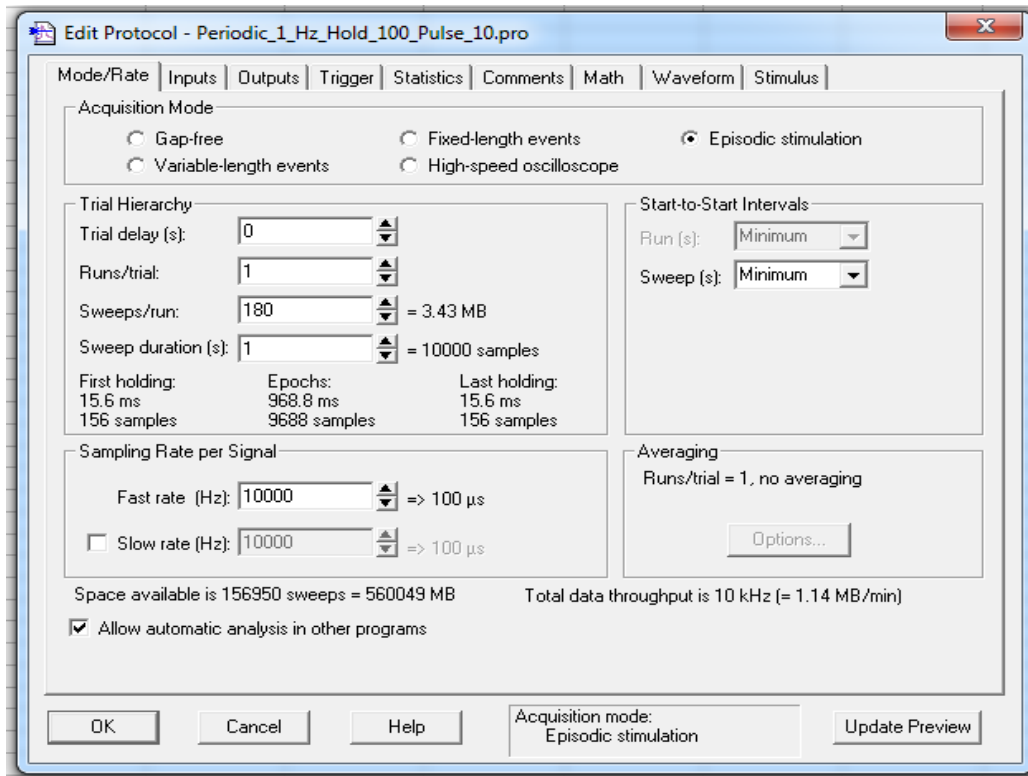
A1.1

Protocolo de adquisición en PClamp 10 para una función escalón de 90-100 mV a 0.5 Hz



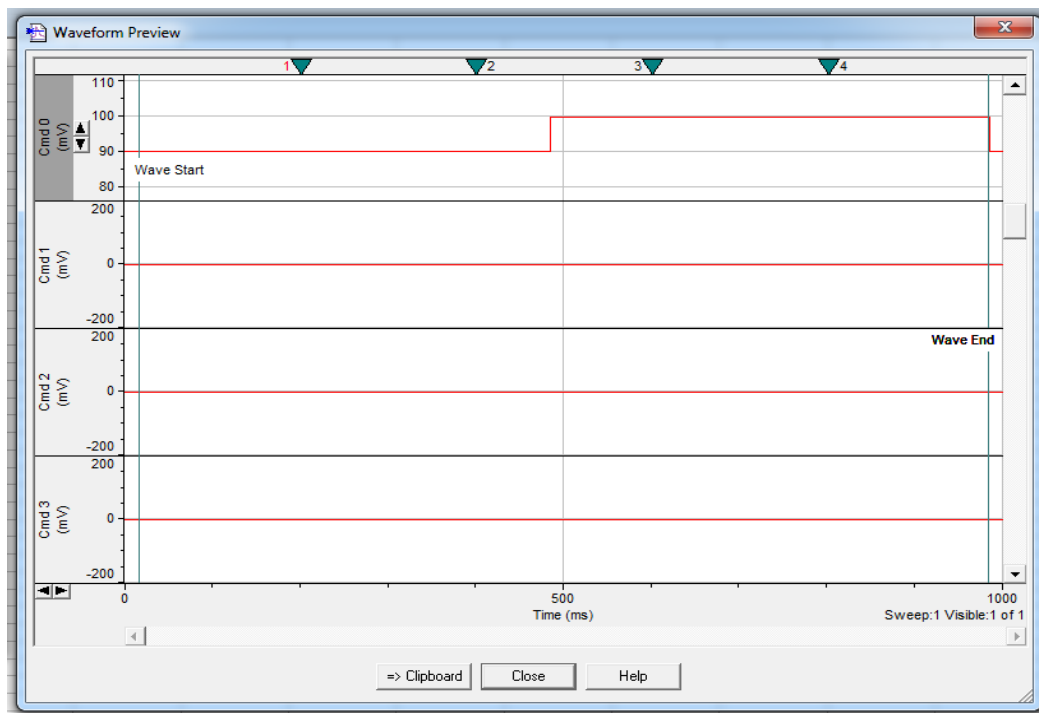
A1.2

Protocolo de adquisición en PClamp 10 para una función escalón de 90-100 mV a 0.5 Hz



A1.3

Protocolo de adquisición en PClamp 10 para una función escalón de 90-100 mV a 1 Hz



A1.4

Protocolo de adquisición en PClamp 10 para una función escalón de 90-100 mV a 1 Hz

Apéndice 2. Programas de análisis

En esta sección presentamos los programas utilizados para el análisis de los registros:

- Programa sweeps: Junta cada sweep del registro en una sola traza continua de corriente vs número de datos. Además separa las secciones correspondientes al voltaje de 100 mV, eliminando las de 90 mV, dando lugar a un registro con la mitad del número de puntos de la traza original.
- Programa descarga capacitiva: Realiza un promedio de la traza completa y lo resta a ésta, eliminando entonces la descarga capacitiva en cada pulso.
- Programa idealiza: Realiza una idealización de la traza reduciendo el nivel de ruido presente en la misma.
- Programa base10: Realiza un ajuste de la línea basal y obtiene la corriente y la conductancia promedio en cada minuto del registro.
- Programa prendido: Considera la suma de todos los puntos con un valor menor que el nivel de ruido como el tiempo de residencia en el estado cerrado, separándolo del complemento que es la ocupancia.

A continuación el código de los programas mencionados.

```
program sweeps
implicit none

integer maxdat,nsw,sws
parameter (maxdat = 2000000)
parameter (nsw = 2000)
parameter (sws = 200000)

integer i, j, k, ndat,seg1,seg2,m
real*4 tdat(maxdat), dat(sws,nsw)
character*5 expt
read(5,*) expt, m, seg1,seg2
c expt = etiqueta de experimento, m = numero de sweeps
c seg1 = segmento de apagado que no se lee
c seg2 = segmento posterior que si se lee
OPEN(12,FILE=expt//'tiempo',STATUS='UNKNOWN')
OPEN(13,FILE=expt//'sweeps',STATUS='UNKNOWN')
OPEN(14,FILE=expt//'vaplic',STATUS='UNKNOWN')

i = 1
5 read(5,*,end=10)tdat(i), (dat(i,j), j=1,m)
i = i + 1
go to 5
10 continue
ndat = i - 1
do i=1, ndat
write(12,*) tdat(i)
enddo
do j =1, m
do i = 1, ndat
write(13,*) dat(i,j)
enddo
enddo
rewind 5
do i = 1, seg1
read(5,*) tdat(i)
enddo
do i=1,seg2
read(5,*)tdat(i), (dat(i,j), j=1,m)
enddo
do j =1, m
do i = 1, seg2
write(14,*) dat(i,j)
enddo
enddo

end
```

```

program descarga capacitiva
implicit none
integer maxdat
parameter (maxdat = 7001000)
integer i, j, l, k, kk
integer nsw, semiper
integer ndat, n
real*8 tdat(maxdat), dat(maxdat)
character*15 parametros

read(5,*) semiper
c semiper es el segmento de tiempo que si se toma en cuenta: seg2
i = 1
5 read(5,*,end=10) dat(i)
i = i + 1
go to 5
10 continue
ndat = i - 1
nsw = ndat/semiper

OPEN(10,FILE='sweepromorg',STATUS='UNKNOWN')
OPEN(11,FILE='sweepromcor',STATUS='UNKNOWN')
OPEN(7,FILE='sweepajustesalida',STATUS='UNKNOWN')

c..... promedia sweeps originales
do k = 1, semiper
  tdat(k) = 0.0
enddo
i = 1
do k = 1, nsw
  do kk = 1, semiper
    tdat(kk) = tdat(kk) + dat(i)
    i = i + 1
  enddo
enddo
do k = 1, semiper
  tdat(k) = tdat(k)/nsw
enddo
do i=1, semiper
  write(10,*) tdat(i)
enddo
c::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::

C.....
i = 1
do k = 1, nsw
  do kk = 1, semiper
    dat(i) = dat(i) - tdat(kk)
    if(kk.lt.10) dat(i) = 0.0
    i = i + 1
  enddo
enddo
do i = 1, ndat
write(7,*) dat(i)
enddo
c..... promedia sweeps corregidos
do k = 1, semiper
  tdat(k) = 0.0
enddo
i = 1
do k = 1, nsw
  do kk = 1, semiper
    tdat(kk) = tdat(kk) + dat(i)
    i = i + 1
  enddo

```

```
      enddo
      do k = 1, semiper
        tdat(k) = tdat(k)/nsw
      enddo
      do i=1, semiper
        write(11,*) tdat(i)
      enddo
C.....:
end
```

```
program idealiza
implicit none

integer maxdat
parameter (maxdat = 7001000)

integer i, j, k, ij, kk, ndat, paso, ruido
real*8 tdat(0:maxdat), dat(maxdat)
real*8 sumd, sumi, sigd, sigi, dd, di

i = 1
ruido = 0.2
paso = 5
5 read(5,*,end=10) dat(i)
i = i + 1
go to 5
10 continue
ndat = i - 1
do i = 1, ndat
if (i.lt.ndat-paso) then
sumd = dat(i)
do j = 1, paso
if(abs(dat(i+j)).lt.ruido) then
goto 20
endif
sumd = sumd + dat(i+j)
ij = j + 1
enddo
20 continue
sumd = sumd/(ij)
else
sumd = sumi
endif
if (i.gt.paso) then
sumi = dat(i)
do j = 1, paso
if(abs(dat(i - j)).lt.ruido) then
goto 30
endif
sumi = sumi + dat(i-j)
ij = j + 1
enddo
30 continue
sumi = sumi/(ij)
else
sumi = sumd
endif

dd = abs(dat(i)-sumd)
di = abs(dat(i)-sumi)
if (dd.lt.di) then
tdat(i) = sumd
else
tdat(i) = sumi
endif
enddo
do i = 1, ndat
write(6,*) tdat(i)
enddo
end
```

```

program baseline
implicit none

integer maxdat, ndatdiv, ndatprom, maxprom, maxdiv
integer maxcurr
parameter (maxdat = 15000000)
parameter (ndatprom = 30 )
parameter (maxprom = maxdat/ndatprom)
parameter (maxcurr = maxdat)
real BIG
integer IBIG
parameter (BIG = 1.0E+38)
parameter (IBIG = maxdat)

integer i, j, k, l, kk, jj, ir, ndat, np, mto
integer nd, nn, ii, iprom(maxprom), ibase(maxprom)
integer inail(0:maxprom), nnail
integer teminail(0:maxprom), nodm(10000)
integer tinail(0:maxprom), hlmax, nnodm
real*4 nail(0:maxprom), temnail(0:maxprom)
real*4 tdat(maxdat), dat(maxdat), prom(0:maxprom), base(maxprom)
real*4 odi(maxdat), nruido
real*4 sebase(maxprom), senail(0:maxprom), seprom (0:maxprom)
real*4 hist(0:1000), dizq(1000), dder(1000), adat(maxcurr)
real*4 histo1(0:5000), histo2(0:5000), intgh(-1:5000)
real*4 suma (0:5000), a
real*4 cotainf, cotasup, ruido, min, mmax, bin, ruido_ant
real*4 prom_ant, m, y, dd, sdat, snail
real*4 prom_hist, sum_hist, cpromin(30)
real*4 cprom, potap, tpaso, hmin, hmax, h2max, siltime
real*4 sumalfa, alfaprom, alfa(500), histdbl(500)
character*5 expt
character*20 nodosman

logical reverse
common/histo/ hmin, hmax, bin, h2max, hlmax

nruido = 0.4
reverse = .true.

read(5,*) expt
read(5,*) tpaso, potap
write(6,*) 'expt', expt
write(6,*) 'tpaso, potap'
write(6,*) tpaso, potap
read(5,*) nodosman, nnodm
  do i = 1, nnodm
    read(5,*) nodm(i)
  enddo
c read(5,*) reverse
c write(6,*) 'reverse', reverse
write(6,*) nodosman, nnodm
  do i = 1, nnodm
    write(6,*) nodm(i)
  enddo

OPEN(8, FILE=expt// 'corrbase', STATUS='UNKNOWN')
OPEN(23, FILE=expt// 'histobase', STATUS='UNKNOWN')
c OPEN(12, FILE=expt// 'bases', STATUS='UNKNOWN')
OPEN(7, FILE=expt// 'nodosida', STATUS='UNKNOWN')
OPEN(27, FILE=expt// 'nodosvuelta', STATUS='UNKNOWN')
c OPEN(21, FILE=expt// 'datorig', STATUS='UNKNOWN')
OPEN(9, FILE=expt// 'burst', STATUS='UNKNOWN')
c OPEN(16, FILE=expt// 'histoorig', STATUS='UNKNOWN')
OPEN(26, FILE=expt// 'histocorr', STATUS='UNKNOWN')
c OPEN(29, FILE=expt// 'intghisto', STATUS='UNKNOWN')
OPEN(30, FILE=expt// 'hislogcorr', STATUS='UNKNOWN')

```

```

i = 0
5 read(5,*,end=10) dd
  i = i + 1
  if ( i .gt. maxdat) stop 'demasiados datos'
  dat(i) = dd
  odi(i) = dd
  go to 5
10 continue
ndat = i

400 continue
write(6,*) 'Tiempo efectivo en segundos = ', ndat*tpaso

do i = 0,maxprom
inail(i) = 0
nail(i) = 0
enddo

nd = 0
np = 0
min = BIG
mmax = -BIG

do i = 1, ndat, ndatprom
  np = np + 1
  prom(np) = 0.0
  do k = i, i+ndatprom-1
    prom(np) = prom(np) + dat(k)
  enddo
  iprom(np) = i + ndatprom / 2
  prom(np) = prom(np) / ndatprom
  do k = i, i+ndatprom-1
    seprom(np) = (prom(np) - dat(k))*2 + seprom(np)
  enddo
  seprom(np) = sqrt(seprom(np)/ndatprom)
enddo

do i = 1, np
  base(i) = prom(i)
  sebase(i) = seprom(i)
  ibase(i) = iprom(i)

  if (base(i).lt.min) then
    min = base(i)
  endif
  if (base(i).gt. mmax) then
    mmax = base(i)
  endif
enddo

C.... call histograma (base,np,1000,histo1,histo2)

do i = 1, 1000
hist(i) = histo2(i)/h2max
write(23,*)histo1(i), hist(i)
enddo

C.....
do i = 1, np
c write (12,*) ibase(i), base(i),sebase(i)
enddo
C.....

```

```

i = 3
dizq(i) = (hist(i-3) + hist(i-2) + hist(i-1) + hist(i))/4
dder(i) = (hist(i) + hist(i+1) + hist(i+2) + hist(i+4))/4
c write(6,*) i, dizq(i), dder(i)
c write(6,*) dder(i)-dizq(i)

do while ((dder(i)-dizq(i)) .lt.0.0 .or. hist(i).lt.0.1)
c write(6,*) i, dizq(i), dder(i)
c write(6,*) i, histol(i), hist(i)
c write(6,*) dder(i)-dizq(i)
i = i + 1
dizq(i) = (hist(i-3) + hist(i-2) + hist(i-1) + hist(i))/4
dder(i) = (hist(i) + hist(i+1) + hist(i+2) + hist(i+4))/4

if ( i .gt. 1000 ) stop 'Histograma sin maximos'
enddo
write(6,*) 'valor de nail inicial'
nail(0) = i*bin + hmin

n nail = 0
senail(0) = 0.0
prom(0) = 0.0
prom_ant = 0.0
ruido_ant = 0.0
inail(0) = 1
kk = i
i = 0
do while (abs(base(i)-nail(0)) .gt. sebase(i))
i = i + 1
enddo

j = ibase(i-1)
do k = j, j+ndatprom-1
prom(0) = prom(0) + dat(k)
enddo
prom(0) = prom(0)/ndatprom

do k = j, j+ndatprom-1
senail(0) = (prom(0) -dat(k))**2 + senail(0)
enddo
senail(0) = sqrt(senail(0)/ndatprom)
write(6,*) nail(0)
kk = 1

sum_hist = nail(0)
prom_hist = 0.0
do i = 1, np
ii = nnail - 30 !numero de bases a promediar para determinar tendencia
ii = max(0,ii)
nn = 0
prom_hist = sum_hist/(nnail +1)
prom_ant = 0.0
ruido_ant = 0.0
do j = ii, nnail
prom_ant = prom_ant + nail(j)
nn = nn + 1
ruido_ant = ruido_ant + senail(j)
enddo
prom_ant = prom_ant / nn
ruido_ant = nruido*(ruido_ant / nn)
1 if (abs(base(i)-prom_ant) .lt. ruido_ant .or.
abs(base(i)-prom_hist) .lt. ruido_ant ) then
nnail = nnail + 1
nail(nnail) = base(i)
senail(nnail) = sebase(i)

```



```

        inail(nnail) = ibase(i)
        sum_hist = sum_hist + nail(nnail)
    endif
enddo

min = BIG
mmax = -BIG
do i = 1, nnail
    if (nail(i).lt.min) then
        min = nail(i)
    endif
    if (nail(i).gt. mmax) then
        mmax = nail(i)
    endif
enddo

write(6,*) 'promedio máximo',mmax,' y mínimo',min,' del baseline'

snail = 0.0

```

c.....incluye los nodos manuales

```

if (reverse ) then
do k = 1,nnodm
    l = 0
    do j = 1, nnail
        temnail(j) = inail(j)
        temnail(j) = nail(j)
    enddo
    do i = 1, nnail + 1
        inail(i) = temnail(i-l)
        nail(i) = temnail(i-l)
        if (inail(i).gt. nodm(k)) then
            inail(i) = nodm(k)
            nail(i) = dat(nodm(k))
            nodm(k) = IBIG
            l = 1
        endif
    enddo
    nnail = nnail + 1
enddo
endif

```

C.....

```

do i = 0, nnail
    snail = snail + nail(i)
    if (reverse ) then
        write(7,*) inail(i), nail(i)
    else
        tinail(i) = ndat-inail(i)
        write(27,*) tinail(i), nail(i)
    endif
enddo
write(6,*) 'Valor promedio del baseline'
write(6,*) 'Nail promedio = ', snail / nnail

do i = 0, nnail - 1
    m = ( nail(i+1) - nail(i) ) / ( inail(i+1) - inail(i) )
    do j = inail(i), inail(i+1)-1
        y = m * ( j - inail(i) ) + nail(i)
        dat(j) = dat(j) - y
    enddo
enddo
do j = inail(nnail), ndat
    dat(j) = dat(j) - y

```

```

        enddo

c.. inicia regreso
C.....
    do i = 0, ndat-1
        tdat(i+1) = dat(ndat-i)
    enddo

    do i = 1, ndat
        dat(i) = tdat(i)
    enddo
    if (reverse ) then
        reverse = .false.
    go to 400
    endif
C.....
c.. concluye regreso
    300 sdat = 0.0
C.....
    do i=1,ndat
        write(8,*) dat(i)
    enddo

    k = 1
    mto = 60/tpaso
    kk = ndat/mto
    do i= 1,kk
        adat(i) = 0.0
    enddo
    do j= 1,kk
    do i = k, k+mto -1
        adat(j) = adat(j) + dat(i)
        sdat = sdat + dat(i)
    c     write(8,*) dat(i)
    c     write(21,*) odi(i)
    enddo
    k = k + mto
    enddo
    ir = ndat -i

    do jj = i,ndat
    adat(kk+1) = adat(kk+1) + dat(jj)
    sdat = sdat + dat(jj)
    c     write(8,*) dat(jj)
    c     write(21,*) odi(jj)
    enddo
    do i = 1, kk
        adat(i) = adat(i)/(mto)
        cpromin(i) = adat(i)/potap
        write(6,*) 'corriente promedio en el minuto',i,adat(i),'(pA)'
        write(6,*) 'conductancia promedio en el minuto',
1 i,cpromin(i),'(pS)'
        write(9,*) adat(i)
    enddo
    adat(kk+1) = adat(kk+1)/(ir)
    cpromin(kk+1) = adat(kk+1)/potap
        write(6,*) 'corriente promedio en ultimos', ir*tpaso,
1 'segundos',
1 adat(kk+1),'(pA)'
        write(6,*) 'conductancia promedio en ultimos',ir*tpaso,
1 'segundos',
1 cpromin(kk+1),'(pS)'

    cprom = sdat / ndat
    write(6,100) 'Corriente promedio (pA) = ', cprom
    write(6,100) 'Conductancia promedio (pS) = ', cprom / potap

```

```

100 format(a,f10.6)
C.....

C.....
      call histograma (odi,ndat,300,histo1,histo2)
      do i= 0, 300
c...  histograma del archivo original
c     write (16,750) histo1(i),histo2(i)/ndat
      enddo
C.....

      intgh(-1) = 0.0
      call histograma (dat,ndat,500,histo1,histo2)
      do i= 0, 500
      intgh(i) = 0.0
      intgh(i) = intgh(i -1) + (histo2(i)/ndat)
c...  histograma del archivo corregido normalizado al # de datos
      write (26,*) histo1(i),histo2(i)/ndat
c...  tiempo acumulado en el histograma del archivo corregido
c     write (29,750) histo1(i),intgh(i)
c...  histograma del archivo corregido en escala log/x
      write (30,750) histo1(i),log((histo2(i) + 1)/ndat)
      enddo
C.....

750 format(f10.6,3x,f10.6)
      end
C.....

      subroutine histograma (A, ndat,ncub,histo1,histo2)
      implicit none
      integer i, j, k, kk, ndat, ncub,hlmax
      real *4 suma(0:ncub),bin
      real *4 histo1(0:5000), histo2(0:5000)
      real *4 A(ndat), hmin,hmax,h2max
      common/histo/ hmin,hmax,bin,h2max,hlmax
c     A, arreglo con datos que generan histograma
c     ndat, el numero de datos en este arreglo
c     ncub, el numero de cubetas en el histograma
c     histo1, el arreglo de las cubetas con los valores
c     correspondientes a la variable en 'x'
c     histo2 el numero de eventos en cada cubeta

      real BIG
      parameter (BIG = 1.0E+38)
      kk = 0

      hmin = BIG
      hmax = -BIG
      h2max = -BIG

      do i = 0, ncub
      suma(i) = 0.0
      histo1(i) = 0.0
      histo2(i) = 0.0
      enddo
      do i = 1, ndat
      if (A(i).lt.hmin) then
        hmin = A(i)
      endif
      if (A(i).gt. hmax) then
        hmax = A(i)
      endif
      enddo
      enddo

```

```
bin = (hmax - hmin)/ncub
do i = 1, ndat
  k = int((A(i)- hmin)/bin )
  suma(k) = suma(k) + 1.0
enddo
do i = 0, ncub
  histo1(i) = (hmin + bin*(float(i) - 0.5)) ! en pamp
  histo2(i) = suma(i)
  if (histo2(i).gt. h2max) then
    h2max = histo2(i)
    h1max = i
  endif
enddo

return
end
```

```
program prendido
implicit none
integer maxdat
parameter (maxdat = 7001000)
integer i, j ,k
integer ndat
real*8 dat(maxdat)
real*8 umbral

read(5,*) umbral
c umbral es el umbral de corriente a partir del cual separo ruido y baseline de los canales
i = 1
5 read(5,*,end=10) dat(i)
i = i + 1
go to 5
10 continue
ndat = i - 1

OPEN(12,FILE='actividad',STATUS='UNKNOWN')

c..... separa el archivo en 2 partes arriba y abajo del umbral
i = 1
do k = 1, ndat
if(dat(i).gt.umbral) write (12,*) dat(i)
i = i + 1
enddo
c::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
end
```

Electrical resonance of Amphotericin B channel activity in lipidic membranes

Karla S. Récamier,¹ Iván Ortega-Blake,¹ and P. Parmananda²

¹*Instituto de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 48-3, 62251, Cuernavaca Morelos, Mexico*

²*Department of Physics, Indian Institute of Technology, Bombay, Powai, Mumbai-400 076, India*

(Received 2 March 2017; accepted 8 May 2017; published online 22 May 2017)

In our previous work [J. Membrane Biol. **237**, 31 (2010)], we showed the dependence of the time average conductance of Nystatin channels as a function of the applied potential. Specifically, it was observed that greater potential induced enhanced channel activity. This indicates that the supramolecular structure could be stabilized by a large field, possibly by giving a preferential orientation to the monomers. In the present work, we entertain the notion that the process of pore formation in the lipidic membranes has an underlying deterministic component. To verify this hypothesis, experiments were performed under potentional-dynamic conditions, i.e., a square train of pulses of different frequencies (0.05–2 Hz) were applied to a 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine membrane having 30 mol. % cholesterol and the presence of 35 μM Amphotericin B. An emergence of a resonant frequency, in the present experiments, is tantamount to observing fingerprints of determinism in the activity of these channels in lipidic membranes. *Published by AIP Publishing.* [<http://dx.doi.org/10.1063/1.4983839>]

Detection of determinism in biological processes is of fundamental interest. This would enhance the understanding, prediction, and possible regulation of these processes. In the present work, we report the existence of a deterministic component in the pore formation by polyene molecules. For this purpose, the Amphotericin B channel activity in lipidic membranes was studied under potentional-dynamic conditions. An emergence of a resonant frequency in our experiments indicates that there is a deterministic component to the channel dynamics.

I. INTRODUCTION

Electrical resonance in biological systems is a very relevant phenomenon, in particular in neural systems where oscillations with greater amplitude at specific frequencies have an important role. This behavior is due to the response of ion channels, specifically the voltage-gated ones involved in neurophysiology.¹ It has also been shown that stochastic resonance (SR) (addition of noise to a weak signal to enhance the response of the system) occurs in biological systems and plays an important role in the sensory reception of organisms (see, for example, Refs. 2 and 3). SR has been shown to occur also in very simple channels such as those formed by Alamethicin, a peptide antibiotic produced by the fungus *Trichoderma viridae*.⁴ Blick *et al.*⁵ extended these studies and considered membranes of different sizes concluding that SR comes from the collective interaction of ion channels within membrane patches of at least 75 μm . It should be noted that despite the fact that the Alamethicin channels are very simple, compared to those involved in neurophysiology, the stochastic resonance behavior appears, suggesting that voltage-dependence is the crucial property for observing the SR phenomenon. This opens the possibility of employing simple systems to advance the understanding

of an extremely complex phenomenon. It has been pointed out that understanding of this phenomenon requires the formulation of models,¹ and experiments involving simpler systems could provide a path-way to achieve this goal. It will be interesting to see if analogous resonances appear in simple voltage-dependent channels. Furthermore, it is also important to determine if such resonances can occur in membrane sizes smaller than those proposed by Blick *et al.*⁵ since cell sizes tend to be much smaller. In contrast, there also have been reports of systems that respond to external deterministic perturbations and exhibit resonance like curves. This has been reported, for example, in extended nonlinear chemical systems, both numerically as well as experimentally.^{6,7} In this case, subthreshold pacemakers were capable of inducing spontaneous pattern formation in a spatio-temporal quiescent state. In particular, using frequency and amplitude scans a domain was found where non-linear resonance lowers the parameter threshold for the forced system, resulting in the inception of the spiking behavior. This implies that there is an optimum frequency for which spiking can be generated with minimum effort.

In the present work, we attempt to look for deterministic resonance phenomena experimentally. For this purpose, we use Amphotericin B (AmB) a polyene which is an antibiotic produced by *Streptomyces nodosus*. Polyenes are even smaller than Alamethicin and produce voltage-dependent channels in a variety of lipid membranes.^{8–10} The standard model for the action of polyenes assumes that they induce the loss of K^+ by the formation of pores consisting of several monomers of the molecule in a barrel configuration inserted in the lipid membranes.^{11,12} The molecular mechanisms by which they are absorbed, inserted, diffused and later form a pore are not well known, and are a subject of intense research mainly due to the therapeutic use of polyenes.^{13,14} The supramolecular structure could be stabilized by a large

field giving a preferential orientation to the monomers or facilitate the insertion of the monomers in the membrane matrix. Here, we present results of the activity on AmB channels in 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) and Cholesterol (Chol) membrane nano-patches subjected to trains of pulses of different frequencies that exhibit the emergence of electrical resonance. In future, we also plan to characterize the channel activities recorded under potentional conditions in an effort to gain an insight into the molecular mechanisms governing the pore formation in lipid membranes.

II. MATERIALS AND METHODS

POPC dissolved in chloroform from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and powdered cholesterol from Sigma-Aldrich (Toluca, Mexico) were stored in the dark at -20°C . AmB was purchased from Sigma-Aldrich (Toluca, Mexico), stored at 4°C and used without further purification. Dimethyl sulfoxide (DMSO, synthesis grade) and poly (dimethylsiloxane) (PDMS 1 cSt) were purchased from Sigma-Aldrich (Toluca, Mexico). Potassium chloride (KCl, ACS grade) and Calcium Chloride (CaCl_2 , ACS grade) were purchased from Merck (Naucalpan, Mexico). All organic solvents were of ACS grade and were purchased from J. T. Baker (Xalostoc, Mexico).

A. Small unilamellar vesicle (SUV) preparation

Stock chloroform solutions for both lipids were prepared once a week and stored at 4°C . Chol was mixed with POPC to obtain a mol fraction of 30 mol. %. Solvent was evaporated in a rotative evaporator (B-177; Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland). The suspension was prepared by adding the working solution (2 M KCl, 2 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES [pH 8.0]) to the film deposited in the flask and then treated in an ultrasonic bath to produce dispersion and obtain unilamellar vesicles.¹⁵

B. AmB incorporation

Powdered AmB was stored at 4°C and used without further purification. AmB was dissolved in DMSO (10 mM) and used for one week of experiments. The concentration used was $35\ \mu\text{M}$ for POPC/Chol membranes. A more important parameter is the mol/mol ratio AmB/lipid since given the hydrophobicity of the molecule most of it will be in this phase. The AmB/lipid ratio used in the experiment was 4.65×10^{-3} . The maximal DMSO fraction present was 1% vol/vol. A homogenized suspension was obtained via ultrasonic dispersion in an N_2 -enriched atmosphere after adding the polyene.

C. Micropipette fabrication

Glass capillaries with filament (1.00 mm external diameter and 0.58 mm internal diameter) from World Precision Instruments (Sarasota, FL) were pulled using the P2000 instrument from Sutter (Novato, CA). The borosilicate glass pipettes were coated at the very tip by immersion in PDMS. This hydrophobic surface yields better seals in tip-dip

electrophysiological experiments, and prevents the flow of ions through the thin glass wall of the tip. Micropipettes were then filled with the working solution used in the preparation of SUVs and used within the following 20 min.

D. Solvent-free tip-dip lipid bilayer formation

Aliquots from the SUV preparation were placed in a temperature-controlled chamber preheated to 25°C . A TC2Bip temperature controller from Cell MicroControls (Norfolk, VA) was used. The chamber was isolated from electrical and mechanical noise with a Faraday cage and an antivibration table. The sample was allowed to settle for 10 min, and the lipid bilayer was then formed at the tip of the micropipette following the tip-dip technique.^{16,17}

E. Electrical measurements

Electrical measurements were done with the Axopatch 200B amplifier from Molecular Devices (Union City, CA) set to voltage-clamp mode, 2-kHz low pass filter, and maximal scaling output. The bilayer seal and pipette resistance were measured by applying a square 5-mV step potential. The signal was digitalized using a Digidata 1440 A, stored and visualized in a computer using the software PClamp 10 (both from Molecular Devices). The sampling rate was set to $100\ \mu\text{s}$. Once a membrane nano-patch was formed and a stable giga-seal ($50\ \text{G}\Omega$ or more) was observed a trans-membrane potential of 100 mV was applied. This potential was held for 3 minutes and the presence of AmB channels should appear to continue with the experiment. Subsequently, a square train of pulses from 0 to $-10\ \text{mV}$ over a holding potential of 100 mV and different frequencies (0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50 Hz) were superimposed.

F. Data analysis

Using a series of in house programs, the records were processed to subtract the membrane leakage and straighten the baseline as well as correcting the capacitive currents (Figure 1). The average channel conductance was computed using the following expression:

$$\langle G \rangle = \frac{\sum i_i}{t_{\text{exp}} V_{\text{app}}},$$

where i_i is the value of the current at the sample point, V_{app} corresponds to the applied membrane potential, and t_{exp} is the time duration of the analyzed record. Since the response of different membrane patches can vary considerably from one to the other, due to differences in the membrane area and seal quality, we considered the ratio of average conductance as that corresponding to the application of the trains of pulses divided by the value corresponding to the steady state (Conductance Ratio). Another analysis was to determine the time of residence of the open and closed states. Hence, we considered the addition of all sample points having values lower than the noise level as the time of residence in the closed state; the complement will be the occupancy. Similar to the Conductance Ratio we considered the ratio of occupancy as that corresponding to the application of the trains of

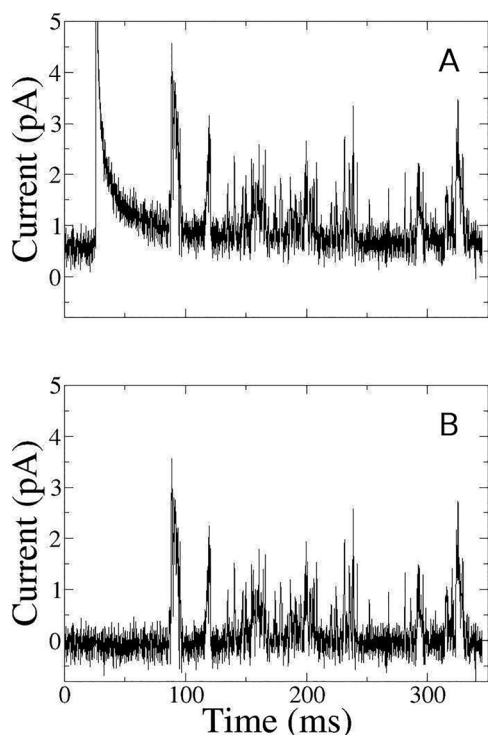


FIG. 1. Current vs. time traces when a square train of pulses from 0 to -10 mV over a holding potential of 100 mV at 1 Hz was applied. (a) Sweep at 100 mV. (b) Trace corrected by subtraction of the membrane capacitive and resistive responses.

pulses divided by the value corresponding to the steady state (Occupancy Ratio).

III. RESULTS

In order to search for the existence of a possible electrical resonance in the activity of AmB channels a large range of frequencies of the train of pulses was explored. The original range of frequencies was from 0.1 to 50 Hz and subsequent to numerous iterations it was fine tuned to an interval between 0.05 Hz to 2 Hz. It was also observed that higher frequencies (>2 Hz) inhibit the activity. To verify this observation, trains of pulses with frequencies of 5 and 10 Hz were employed to record the activity response under controlled conditions; the Conductance Ratios obtained were 0.49 ± 0.19 and 0.27 ± 0.24 , respectively, confirming the fact that superimposed high frequency perturbations indeed inhibit the channel activity. In Figure 2, we present a typical trace showing the AmB channels expressed in the POPC/Chol membrane when the experiments were performed under potio-static conditions, i.e., a continuous 100 mV potential was applied. Subsequent experiments were performed under potio-dynamic conditions in an effort to look for the resonance behavior manifested by the emergence of a unimodal channel activity (quantified using Conductance Ratio) versus frequency curve. To be certain of this behavior, we performed several tests: starting from high frequencies and going to low frequencies, and also in the reverse direction, as well as recording randomly. These preliminary experiments revealed a hidden variable, that being the time elapsed during the experiment; we found that the activity

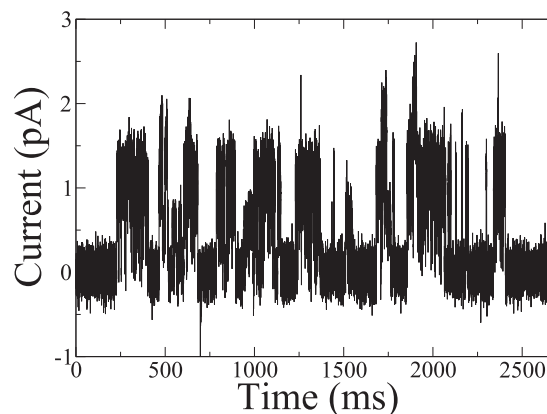


FIG. 2. Example of a trace of AmB channels present in a POPC membrane with 30 mol. % Chol, $[AmB] = 35 \mu M$ when continuous 100 mV were applied.

decays with time. To circumvent this experimental complication, the following protocol was designed. We measured the AmB channel activity through 13 minutes of experiment without the train of pulses in order to determine the average decay in the periods 7–10 and 10–13 min. The ratio found was used to correct the activity observed when the train of pulses was applied in the 10–13 min period.

Figure 3 shows the average Conductance Ratio, defined in the Data Analysis section, vs. the perturbation frequency curve at 100 mV. In the figure, we can see a characteristic resonance tongue in the vicinity of 0.5 Hz, and that at frequencies higher than 1.5 Hz there is a significant reduction. This agrees with the previously mentioned fact involving the inhibition of activity when subjected to high frequencies. To reiterate, the resonance observed in the present work is deterministic, in contrast to the ones observed in experiments^{2–5} mentioned in the introduction, which were stochastic.

The increase in the Conductance Ratio could be due to two possibilities: more channels being present or an expression of channels with greater conductance. In Figure 4 we present the Occupancy Ratio, as defined in the Data Analysis section, vs. the perturbation frequency curve at 100 mV. It also presents a unimodal curve with a maximum in the vicinity of 0.5 Hz, just like the Conductance Ratio curve. Since occupancy increases by the same percentage (50%) as the

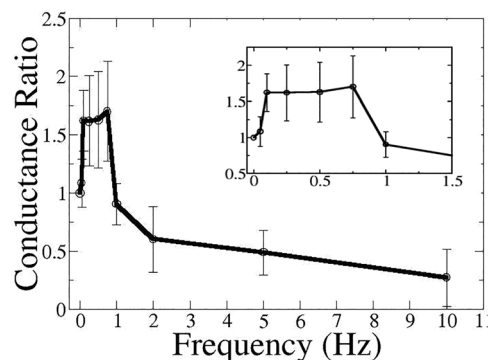


FIG. 3. Ratio of the average conductance vs. the perturbation frequency when a square trains of pulses from 0 to -10 mV over a holding potential of 100 mV were applied to POPC membranes with 30 mol. % Chol, $[AmB] = 35 \mu M$.

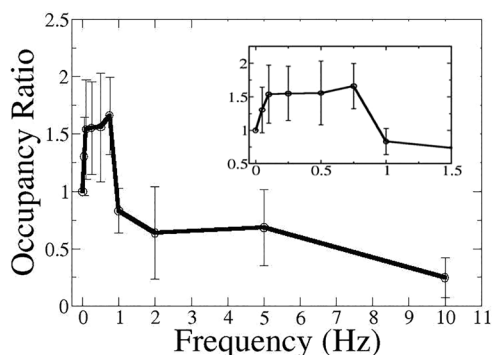


FIG. 4. Ratio of the occupancy vs. the perturbation frequency when a square trains of pulses from 0 to -10 mV over a holding potential of 100 mV were applied to POPC membranes with 30 mol. % Chol, [AmB] = 35 μ M.

Conductance Ratio, the increase in the AmB channel activity is due only to an increase in occupancy.

IV. DISCUSSION

The appearance of a resonant frequency of the AmB channels indicates the existence of an underlying deterministic component in the channel activity. Moreover, it seems that the system behaves like an under-damped oscillator. This implies that there exists a characteristic frequency for the autonomous dynamics. When the system is perturbed with a frequency in the vicinity of this characteristic frequency a response is observed manifested by a 50% increase in the overall AmB channel activity, shown in both the Conductance and the Occupancy Ratios. Finally, the system shows a monotonical decrease of activity at frequencies higher than 1.5 Hz, reminiscent of a typical low pass filter.

It is to be expected that the molecule of AmB would respond to the electric field since it has quite a large dipole moment (~ 30 D). On the other hand, the time scale of the resonance, \sim seconds, is not consistent with a motion of the molecule in aqueous solution or in the lipid/water interphase. So we can expect that the underdamped motion referred to should involve orientation of the molecule in the membrane phase. The insertion process of antimicrobial peptides has been estimated to last of the order of milliseconds¹⁸ and therefore fast for the time scale detected. A similar thing happens with the diffusion time of AmB,¹⁹ since the pores appear in a nano-patch. Hence, the time scale of the resonance indicates that the phenomenon involved is pore formation. Time scales reported for formation of antimicrobial peptides pores go from microseconds to seconds.²⁰

In the present work, we propose a paradigm shift in studying systems that have been traditionally studied potention-statically. We believe that studying such systems potention-dynamically would enable one to extract biologically relevant features such as the frequency-dependent expression of channels.

In addition, the observation that AmB channels which are simple pores consisting of several monomers of the molecule, unlike the well known K^+ and Na^+ channels which are complex proteins, have internal deterministic dynamics could have important implications. It occurs in a non

excitable system, suggesting that it could be a generic effect; a transmembrane phenomenon, rather than a physical characteristic of particular peptidic or polyenic channels.

Finally, given the fact that electrical resonance is a common and significant property of cells involved in many important physiological functions, such as cognitive functions and tactile and visual sensation, there is a need for an adequate kinetic model of voltage-gated channels so that electrical resonance can be linked to the biophysical properties of the channel, providing potential mechanistic insights (see, for example, Ref. 1). To reiterate, our system consists of a membrane nano-patch, versus a whole cell membrane, and AmB pores, instead of a proteinic channel. This is a much simpler contraption and therefore, the underlying mechanisms could be easier to comprehend. It is possible to envisage the scenario wherein the results obtained in the present work could be replicated in other experiments which are more complex to perform but nonetheless have enhanced relevance to natural systems. This could be a first step in trying to unravel long standing questions in neurophysiology.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CONACyT 247031, INT/MEXICO/P-6/2012, DST (India), and DGAPA-PAPIIT-IG100416.

- ¹L. Ge and X. Liu, *Acta Pharmacol. Sin.* **37**, 67 (2016).
- ²J. J. Collins, T. T. Imhoff, and P. Grigg, *Phys. Rev. E* **56**, 923 (1997).
- ³A. Flores, S. Manilla, N. Huidobro, B. de la Torre-Valdovinos, R. Kristeva, I. Mendez-Balbuena, F. Galindo, M. Treviño, and E. Manjarrez, *Neuroscience* **322**, 416 (2016).
- ⁴S. Bezrukov and I. Vodyanoy, *Biophys. J.* **73**, 2456 (1997).
- ⁵R. H. Blick, S. Y. Choi, H. S. Kim, S. Ramachandran, and D. W. van der Weide, *AIP Conf. Proc.* **780**, 567 (2005).
- ⁶P. Parmananda, H. Mahara, T. Amemiya, and T. Yamaguchi, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 238302 (2001).
- ⁷T. R. Chigwada, P. Parmananda, and K. Showalter, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 244101 (2006).
- ⁸B. Cotero, S. Rebolledo-Antúnez, and I. Ortega-Blake, *Biochim. Biophys. Acta* **1375**, 43 (1998).
- ⁹B. Venegas, J. González-Damián, H. Celis, and I. Ortega-Blake, *Biophys. J.* **85**, 2323 (2003).
- ¹⁰K. S. Récamier, A. Hernández-Gómez, J. González-Damián, and I. Ortega-Blake, *J. Membrane Biol.* **237**, 31 (2010).
- ¹¹A. Finkelstein and R. Holz, *Membranes* **2**, 377 (1973).
- ¹²B. De Kruijff and R. A. Demel, *Biochim. Biophys. Acta* **339**, 57 (1974).
- ¹³J. González-Damián and I. Ortega-Blake, *J. Membrane Biol.* **237**, 41 (2010).
- ¹⁴S. Hartsel and J. Bolard, *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 445 (1996).
- ¹⁵M. Paternostre, M. Ollivon, and J. Bolard, *Preparation and Membrane Protein Reconstitution. In Manual on Membrane Lipids* (Springer-Verlag, Berlin, 1996).
- ¹⁶B. A. Suarez-Isla, K. Wan, J. Lindstrom, and M. Montal, *Biochemistry* **22**, 2319 (1983).
- ¹⁷W. Hanke, C. Methfessel, U. Wilmsen, and G. Boheim, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **12**, 329 (1984).
- ¹⁸E. E. Schuler, S. Nagarajan, and R. B. Dyer, "Submillisecond dynamics of mastoparan X insertion into lipid membranes," *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 3365 (2016).
- ¹⁹J. Czub and M. Baginski, "Modulation of amphotericin B membrane interaction by cholesterol and ergosterol a molecular dynamics study," *J. Phys. Chem. B* **110**, 16743–16753 (2006).
- ²⁰J. Li, J.-J. Koh, S. Liu, R. Lakshminarayanan, C. S. Verma, and R. W. Beuerman, "Membrane active antimicrobial peptides: Translating mechanistic insights to design," *Front. Neurosci.* **11**, 73 (2017).

Bibliografía:

Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. **(2017a)** "Pore formation in lipid membrane I: Continuous reversible trajectory from intact bilayer through hydrophobic defect to transversal pore" *Scientific Reports* 7: 12152.

Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. **(2017b)** "Pore formation in lipid membrane II: Energy landscape under external stress" *Scientific Reports* 7: 12509.

Anderson C.M., Webb L.J. **(2017)** "Investigating the Effects of the Membrane Dipole Field on the Structure and Function of a Model Membrane Protein" *Biophysical Journal* 112 Issue 3, 43a.

Antillón A., de Vries A.H., Espinosa-Caballero M., Falcón-González J.M., Flores Romero D., González-Damián J., et. al. **(2016)** "An Amphotericin B Derivative Equally Potent to Amphotericin B and with Increased Safety" *PLoS ONE* 11(9).

Arash B., Jiang J., Rabczuk T. **(2015)** "A review on nanomechanical resonators and their applications in sensors and molecular transportation" *Applied Physics Reviews* 2, 021301.

Ávila E. E. **(1986)** "Biología Celular: Aspectos Fundamentales. *La membrana plasmática.*" Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Primera Edición. 35-38 (Editorial Alhambra Mexicana, S. A., México).

Behrends J.C. **(2012)** "Evolution of the Ion Channel Concept: The Historical Perspective" *Chemical Reviews* 112, 6218-6226.

Bezrukov S., Vodyanoy I. **(1997)** "Signal Transduction Across Alamethicin Ion Channels in the Presence of Noise" *Biophysical Journal* 73, 2456-2464.

Blick R.H., Choi S.Y., Kim H.S., Ramachandran S., van der Weide D.W. **(2005)** "Stochastic Resonance of Artificial Ion Channels inserted in Small Membrane Patches" *AIP Conference Proceedings* 780,567-570.

Bowman C.L., Ruknudin A.M. **(1999)** "Quantifying the Geometry of Micropipets" *Cell Biochemistry and Biophysics* 31, 185-206.

Brockman H. **(1994)** "Dipole potential of lipid membranes" *Chemistry and Physics of Lipids* 73, 57-79.

Calvo J., Martínez-Martínez L. **(2009)** "Mecanismos de acción de los antimicrobianos" *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27(1), 44-52.

Chemik D. commons.wikimedia.org

Chigwada T.R., Parmananda P., Showalter K. **(2006)** "Resonance Pacemakers in Excitable Media" *Physical Review Letters* 96, 244101.

Collins J.J., Imhoff T.T., Grigg P. **(1997)** "Noise-mediated enhancements and decrements in human tactile sensation" *Physical Review E* 56,923-926.

Cotero B., Rebolledo-Antúnez S., Ortega-Blake I. **(1998)** "On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel". *Biochimica et Biophysica Acta* 1375, 43-51.

Cruz J.M., Hernandez-Gomez A., Parmananda P. **(2007)** "Control, synchronization and replicability of aperiodic spike trains" *Physical Review E* 75, 055202(R).

Czub J., Baginski M. **(2006)** "Modulation of Amphotericin B Membrane Interaction by Cholesterol and Ergosterols. A Molecular Dynamics Study" *Journal of Physical Chemistry B* 110, 16743-16753.

De Kruijff B., Demel R.A. **(1974)** "Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma Laidlawii* cells and lecithin liposomes. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes". *Biochimica et Biophysica Acta* 339, 57-70.

Escalera Santos G.J., Rivera M., Parmananda P. **(2004)** "Noise Induced Resonances in an Electrochemical Cell" *AIP Conference Proceedings* 742, 21.

Ermishkin L.N., Kasumov Kh.M., Potzeluyev V.M. **(1976)** "Single ionic channels induced in lipid bilayers by polyene antibiotics amphotericin B and nystatine" *Nature* 262, 698-699.

Faghih R.T., Savla K., Dahleh M.A., Brown E.N. **(2010)** "The Fitzhugh-Nagumo Model: Firing Modes with Time-varying Parameters and Parameter Estimation" 32nd Annual International Conference of the IEEE EMBS 4116-4119.

Favela-Rosales F., Hernández-Cobos J., Carbajal-Tinoco M.D., Ortega-Blake I. **(2017)** "A Molecular Dynamics Study Proposing the Existence of Nanodomains due to Chain Orientation in the POPC-cholesterol System" comunicación personal.

Finkelstein A., Holz R. **(1973)** "Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B" *Membranes* 2, 377-408.

Fitzhugh R. **(1961)** "Impulses and physiological states in theoretical models of nerve membrane" *Biophysical Journal* 1, 445-466.

Flores A., Manilla S., Huidobro N., de la Torre-Valdovinos B., Kristeva R., Mendez-Balbuena I., Galindo F., Treviño M., Manjarrez E. **(2016)** "Stochastic resonance in the synaptic transmission between hair cells and vestibular primary afferents in development" *Neuroscience* 322, 416-429.

Fridlyand L.E., Tamarina N., Philipson L.H. **(2010)** "Bursting and calcium oscillations in pancreatic beta-cells: specific pacemakers for specific mechanisms" *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299, E517-32.

Ge L., Liu X. **(2016)** "Electrical resonance with voltage-gated ion channels: perspectives from biophysical mechanisms and neural electrophysiology" *Acta Pharmacologica Sinica* 37, 67-74.

Gelbart W.M., Ben-Shaul A., Roux D. **(1994)** "Micelles, Membranes, Microemulsions, and Monolayers" (Editorial Springer-Verlag, Nueva York, EU).

González-Damián J., Ortega-Blake I. **(2010)** "Effect of Membrane Structure on the Action of Polyenes II: Nystatin Activity along the Phase Diagram of Ergosterol- and Cholesterol- Containing POPC Membranes" *Journal of Membrane Biology* 237, 41–49.

Grage S.L., Afonin S., Ulrich A. S. **(2010)** "Antimicrobial Peptides Methods and Protocols: *Dynamic Transitions of Membrane-Active Peptides*" Editado por A. Giuliani, A. C. Rinaldi. 177-203 (Springer).

Gunstone F. D., Harwood J. L., Padley F.B. **(1994)** "The Lipid Handbook" 2a edición. (Editorial Chapman and Hall, Reino Unido).

Hanke W., Methfessel C., Wilmsen U., Boheim G. **(1984)** "Ion channel reconstitution into lipid bilayer membranes on glass patch pipettes" *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 12, 329-339.

Hartsel S., Bolard J. **(1996)** "Amphotericin B: new life for an old drug" *Trends in Pharmacological Sciences* 17, 445-449.

Hille B. **(2001)** "Ion Channels of Excitable Membranes" Tercera Edición. (Editorial Sinauer, Sunderland MA, EU).

Hindmarsh J.L., Rose R.M. **(1982)** "A model of the nerve impulse using two first-order differential equations" *Nature* 296, 162-164.

Hodgkin A.L., Huxley A.F. **(1952)** "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve" *Journal of Physiology* 117, 500-544.

Hu W., Webb L.J. **(2011)** "Direct Measurement of the Membrane Dipole Field in Bicelles Using Vibrational Stark Effect Spectroscopy" *The Journal of Physical Chemistry Letters* 2, 1925-1930.

Hudspeth A.J. **(1985)** "The Cellular Basis of Hearing: The Biophysics of Hair Cells" *Science* 230, 4727, 745-752.

Hughes S.W., Errington A., Lorincz M. L., Kékesi K. A., Juhász G., Orbán G., Cope D. W., Crunelli V. **(2008)** "Novel modes of rhythmic burst firing at cognitively-relevant frequencies in thalamocortical neurons" *Brain Research* 1235, 12-20.

Izhikevich E.M. **(2004)** "Which Model to Use for Cortical Spiking Neurons" *IEEE Transactions on Neural Networks* 15, 1063-1070.

Jacobson K., Mouritsen O.G., Anderson R.G. **(2007)** "Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics" *Nat. Cell Biol.* 9, 7-14.

Kelley E., Woodka A., Butler P., Nagao M. **(2017a)** "The Synergistic Effects of Lipids and Peptides on Membrane Dynamics" *Biophysical Journal* 112 Issue 3, 381a.

Kelley E., Ashkar R., Bradbury R., Butler P., Nagao M. **(2017b)** "The Interplay of Structure and Dynamics in Mixed Lipid Bilayers" *Biophysical Journal* 112 Issue 3, 308a.

Kaminski D. M. **(2014)** "Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments" *Eur Biophys J.* 43, 453-467.

Li J., Koh J-J., Liu S., Lakshminarayanan R., Verma C.S., Beuerman R.W. **(2017)** "Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design" *Frontiers in Neuroscience* 11:73.

Lingwood D., Simons K. **(2010)** "Lipid rafts as a membrane-organizing principle" *Science* 327, 46-50.

Manske M. Master HD. English Wikipedia

Melikov K.C., Frolov V.A., Shcherbakov A., Samsonov A.V., Chizmadzhev Y.A., Chernomordik L.V. **(2001)** "Voltage-Induced Nonconductive Pre-Pores and Metastable Single Pores in Unmodified Planar Lipid Bilayer" *Biophysical Journal* 80(4), 1829-1836.

Mouritsen O.G., Bagatolli L.A. **(2015)** "Lipid domains in model membranes: a brief historical perspective" *Essays Biochemistry* 57, 1-19.

Nagao M., Kelley E., Ashkar R., Bradbury R., Butler P. **(2017)** "Interdependence between Collective Thermal Fluctuations and Elastic and Viscous Properties in Model Lipid Bilayers" *Biophysical Journal* 112 Issue 3, 76a.

Ortega-Blake I. **(2017)** Comunicación personal.

Parmananda P., Mahara H., Amemiya T., Yamaguchi T. **(2001)** "Resonance Induced Pacemakers: A New Class of Organizing Centers for Wave Propagation in Excitable Media" *Physical Review Letters* 87, 238302.

Parmananda P. **(2017)** "Nonlinear Dynamics" PH-542 Part-I.

Paternostre M., Ollivon M., Bolard J. **(1996)** "Liposomes: Preparation and membrane protein reconstitution" *Manual on membrane lipids* (Springer-Verlag, Berlin).

Penner R. **(1995)** "Single-Channel Recording". 2a Edición. Editado por Bert Sakmann y Erwin Neher. 3-28 (Plenum Press, Nueva York, EU).

Récamier K.S. **(2007)** Tesis de Licenciatura. "Caracterización de los canales de Nystatina y su modelo molecular de acción" Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Récamier K.S., Hernández-Gómez A., González-Damián J., Ortega-Blake I. **(2010)** "Effect of Membrane Structure on the Action of Polyenes: I. Nystatin Action in Cholesterol- and Ergosterol-Containing Membranes" *Journal of Membrane Biology* 237, 31–40.

Rheinstädter M.C., Mouritsen O.G. **(2013)** "Small-scale structure in fluid cholesterol-lipid bilayers" *Curr. Opin. Colloid Int. Sci.* 18, 440-447.

Rose R.M., Hindmarsh J.L. **(1989)** "The assembly of ionic currents in a thalamic neuron. I The three-dimensional model" *Proc. R. Soc. Lond. B* 237, 267-288.

Safronov B.V., Kampe K., Vogel W. **(1993)** "Single voltage-dependent potassium channels in rat peripheral nerve membrane" *Journal of Physiology* 460, 675-691.

Sakmann B., Trube G. **(1984)** "Voltage-dependent inactivation of inward-rectifying single-channel currents in the guinea-pig heart cell membrane" *Journal of Physiology* 347, 659-683.

Schmid S., Villanueva L.G., Roukes M.L. **(2016)** "Fundamentals of Nanomechanical Resonators" 29-35 (Editorial Springer, Suiza).

Schuler E.E., Nagarajan S., Dyer R.B. **(2016)** "Submillisecond Dynamics of Mastoparan X Insertion into Lipid Membranes" *Journal of Physical Chemistry Letters* 7, 3365-3370.

Shi N., Ye S., Alam A., Chen L., Jiang Y. **(2006)** "Atomic structure of Na⁺ and K⁺ conducting channel" *Nature* 440.

Shrestha R., Anderson C., Cardenas A.E., Elber R., Webb L.J. **(2017)** "Direct Measurement of the Effect of Cholesterol and 6-Ketocholestanol on the Membrane Dipole Electric Field Using Vibrational Stark Effect Spectroscopy Coupled with

Molecular Dynamics Simulations" The Journal of Physical Chemistry B 121, 3424-3436.

Simons K., van Meer G. **(1988)** "Lipid sorting in epithelial cells" Biochemistry 27, 6197-6202.

Simons K., Ikonen E. **(1997)** "Functional rafts in cell membranes" Nature 387, 569-572.

Singla T., Ortega-Blake I. **(2017)** Comunicación personal.

Stevenson P., Tokmakoff A. **(2017)** "Multiscale Dynamics of Lipid Membranes from Femtoseconds to Milliseconds: Insights from Time-Resolved Infrared Spectroscopy" Biophysical Journal 112 Issue 3, 220a.

Suárez-Islas B.A., Wan K., Lindstron J., Montal M. **(1983)** "Single-channel recordings from purified acetylcholine receptors reconstituted in bilayers formed at the tip of patch pipets". Biochemistry 22, 2319-2323.

Venegas B., González-Damián J., Celis H., Ortega-Blake I. **(2003)** "Amphotericin B Channels in the Bacterial Membrane: Role of Sterol and Temperature". Biophysical Journal 85, 2323-2332.

Zagotta W.N., Brainard M.S., Aldrich R.W. **(1988)** "Single-Channel Analysis of Four Distinct Classes of Potassium Channels in Drosophila Muscle" The Journal of Neuroscience 8(12): 4765-4769.

Zhou Y., Morais-Cabral J.H., Kaufman A., MacKinnon R. **(2001)** "Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution" Nature 414.