

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Fisiología

MODULACION POR PROTEINAS G DE LOS CANALES DE POTASIO SENSIBLES A
ATP. CARACTERIZACION CON REGISTROS A NIVEL DE UN SOLO CANAL DE
TRES SUBTIPOS DEL CANAL DE POTASIO DE LA RECTIFICACION TARDIA Y
DEL CANAL TIPO "A".

TESIS

Para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICA

Presenta

MARIO VAZQUEZ GARCIA

Director de Tesis:

Dr. David E. García Díaz

Lugar donde se realizó:

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM

MEXICO, D. F., 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

26025

19
2ej



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

INTRODUCCION	1
BIOFISICA CLASICA DEL AXON GIGANTE DE CALAMAR ..	3
CANALES DE POTASIO	8
- Canales de Potasio de la Rectificación Tardía	11
- Canales de Potasio de la rectificación tardía en el músculo esquelético	13
- Selectividad y bloqueo de los canales de potasio de la rectificación tardía ...	17
- Canales de Potasio Tipo A	20
- Canales de Potasio de la Rectificación Entrante	21
- Canales de Potasio Activados por Calcio	23
- Canales de Potasio Modulados por Mensajeros Químicos y Nucleótidos	25
- Canales de Potasio Sensibles a ATP	30
ANTECEDENTES	32
Canales Iónicos y su Regulación por Proteínas G	37
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
HIPOTESIS	46

METODO	48
PREPARACION BIOLOGICA	48
METODO ELECTROFISIOLOGICO	52
- Elaboración de las pipetas "patch"	56
- Formación de los sellos de alta resistencia	58
- Soluciones de registro	60
- Captura y análisis de los datos	62
RESULTADOS	67
CARACTERIZACION DE UN CANAL SELECTIVO A POTASIO: REGISTRO A NIVEL DE UN SOLO CANAL	67
- Efecto del tetraetilamonio (TEA)	76
- Efecto intracelular del fluoruro sobre los canales de K ⁺	80
- Efecto del GTO sobre los canales de K ⁺ ...	91
- Efecto del GDP	94
Caracterización del canal de K ⁺ sensible a ATP	100
Caracterización de canales de K ⁺ de la rectificación tardía	107
- Canales sin inactivación tipo N	108
- Canales con inactivación tipo N	121
- Canales de baja amplitud	128

Canales de K ⁺ similares al canal tipo A	131
DISCUSION	157
MODULACION DEL CANAL DE K ⁺ SENSIBLE A ATP	
POR UNA PROTEINA G	158
- Efecto del ATP sobre los canales de K ⁺ ...	158
- Modulación de los canales de K ⁺ sensibles	
a ATP por proteínas G	162
CANALES DE K ⁺ DE LA RECTIFICACION TARDIA	169
CANALES DE POTASIO SIMILARES AL TIPO A	178
BIBLIOGRAFIA	184

RESUMEN

El método de "patch clamp" en la configuración de "inside-out" fue empleado para registrar corrientes unitarias de canales de K^+ en vesículas de membrana del músculo esquelético de rana. Se realizaron registros de corrientes a nivel unitario del canal de K^+ sensible a ATP. La conductancia unitaria fue de 19.3 pS en $[K^+]_o$ de 2.5 mM y de 56.5 pS en $[K^+]_o$ de 120 mM. La presencia de F^- interno produjo una disminución en la probabilidad de apertura sin cambios significativos en la conductancia unitaria. Las constantes de tiempo de apertura no se modificaron por efecto del F^- interno. La aplicación de GTP γ S produjo efectos similares a los producidos por el F^- y el GDP β S previno tanto los efectos del F^- como del GTP γ S.

Presentamos evidencias de la existencia de tres tipos de canales de K^+ , probablemente, de la rectificación tardía. En parches de membrana donde se pudo registrar eventos de un solo tipo de canal, fue posible encontrar canales con conductancias de 21, 13 y 7 pS. El canal más frecuentemente encontrado fue el de 21 pS. Este canal no presentó inactivación tipo N; en parches que contenían varios canales, las corrientes promediadas obtenidas de estos parches que contenían varios canales tuvieron un curso temporal de activación similar al de las corrientes de K^+ de la rectificación tardía registradas de fibras musculares o del axon gigante de calamar.

Por otra parte, el método del "patch-clamp" también fue utilizado para examinar el comportamiento cinético de los canales de K^+ tipo "A" que generan las corrientes de K^+ salientes y transitorias descritas previamente en el músculo esquelético. Los canales fueron activados por pulsos despolarizantes. La relación corriente-voltaje fue lineal sobre el rango de -20 a +40 mV. La conductancia unitaria fue de aproximadamente de 18 pS en $[K^+]_o$ de 2.5 mM. Las corrientes presentaron evidencias de un proceso similar a la inactivación lenta de los canales de K^+ Shaker y de la

rectificación tardía. En parches multicanales, el análisis binomial fue consistente con un comportamiento independiente de los canales. Las corrientes promediadas obtenidas de estos parches multicanales tienen un comportamiento similar a la corriente macroscópica tipo "A" registrada de músculo y neuronas de la *Drosophila* y de neuronas de mollusco y de mamífero. La velocidad de activación fue voltaje dependiente. La constante de activación fue ajustada a una cinética de n^4 . La inactivación tuvo un curso temporal exponencial con una constante de tiempo voltaje independiente. El tiempo promedio de apertura y la probabilidad de apertura incrementaron con las despolarizaciones. Los histogramas de la latencia a la primera apertura revelan la presencia de más de dos estados cerrados dependientes del voltaje y los histogramas de tiempos cerrados pueden ser ajustados a la suma de tres exponenciales. Estos canales de K^+ tipo "A" transitan en por lo menos tres estados cerrados, dos estados abiertos y dos estados inactivados.

SUMMARY

The patch-clamp method in the inside-out configuration was employed to examine the single-channel K^+ currents in excised patches from vesicles derived from frog skeletal muscle. Single-channel recordings of ATP-dependent K^+ channels were performed. The single-channel conductance was about 19.3 pS in $[K^+]_o = 2.5$ mM and about 56.5 pS in $[K^+]_o = 120$ mM. The single-channel activity was greatly reduced in the presence of internal F^- . This reduction was due to a decrease in the open probability without major changes in the single-channel conductance. No differences were observed in the time constants of the open time histograms of the currents. The addition of GTP γ S produced similar effects to those of F^- and GDP β S prevented the effects of both F^- and GTP γ S.

We present evidences for the existence of three distinct types of K^+ channels activities, probably belonging to the delayed rectifier K^+ channel group. In patches where single events could be recorded, it was possible to find channels with conductances of 21, 13 and 7 pS. The channel most frequently encountered was the 21-pS channel. This channel did not show the N-type inactivation; in patches that contained several channels, averaged currents obtained from these multichannel patches had a time course of activation similar to that of macroscopic delayed rectifier K^+ currents recorded from skeletal muscle or from the squid giant axons.

On the other hand, the patch-clamp technique was also used to examine the voltage-dependent gating mechanism of A-type K^+ channels, which generate the transient outward K^+ currents described previously in skeletal muscle. Channel were activated by depolarizing pulses. Single-channel current-voltage relationship was linear between -20 and +40 mV. Single-channel conductance was approximately 18 ps in $[K^+]_o = 2.5$ mM. Evidences were found for non-random grouping, suggesting a slow process similar to slow inactivation from Shaker K^+ channel and delayed rectifier K^+

channels. In multichannel patches, binomial analysis was consistent with an independent behavior of the channels. Ensemble average currents obtained from multichannel patches had kinetics similar to the macroscopic I_A recorded from muscle and neurons of *Drosophila* and molluscan and mammalian neurons. The rate of activation was voltage dependent, the time constants were fitted to n^4 kinetics. The rate of inactivation had an exponential time course with a voltage-independent time constant. The mean open time and the probability of a channel being open increased with depolarization. The histograms of latency to first opening revealed the presence of more than two voltage-dependent closed states. The closed-time histograms could be fitted by the sum of three exponentials. These results suggest that A-type K^+ channels involve at least three closed states, two open states, and two inactivated states.

INTRODUCCION

En las membranas celulares de músculo y axón, las corrientes iónicas responsables de la generación de potenciales de acción fluyen a través de estructuras macromoleculares localizados en el espesor de la membrana plasmática llamadas canales iónicos. No obstante que el concepto de canal iónico surgió de estudios electrofisiológicos de las corrientes iónicas a través de las membranas especializadas del axón y del músculo, en la actualidad, se sabe que estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en todos los seres vivos, apareciendo en membranas de procaricitos, protozoarios, células vegetales, así como también en muchos tipos de células animales no excitables. Además, de ser la base del impulso eléctrico propagado en las células excitables, los canales iónicos participan importantemente en los procesos de secreción hormonal (Petersen y Findlay, 1987; Petersen y Gallacher, 1988), transducción sensorial (Hudspeth, 1989; McNaughton, 1990; Buck y

Axel, 1991), transporte transepitelial (McCann y Welsh, 1990), activación contráctil (Fabiato, 1985; Nábauer y col., 1989; Niggli y Lederer, 1990), etc. Ellos reciben su nombre de acuerdo al ion que contribuye fundamentalmente al flujo iónico a través del canal en condiciones fisiológicas. Así, existen canales de sodio, canales de potasio, canales de calcio, etc. Debido a la importancia de los canales iónicos como uno de los efectores finales en los procesos biológicos de comunicación inter e intracelular, es de interés considerable el papel que desempeñan los canales iónicos en estos procesos. Existen evidencias, que serán discutidas posteriormente, de que estos canales iónicos pueden ser modulados por acción directa o indirecta por hormonas y neurotransmisores (primeros mensajeros), por ejemplo, la acción directa ocurre cuando el canal iónico es parte integral del receptor, como en el receptor a acetilcolina (Ach); en la acción indirecta la molécula receptora no esta unida directamente al canal iónico, pero actúa vía una proteína G, la cual ejerce su efecto directamente sobre el canal, o bien, la proteína G activa una enzima que genera un segundo mensajero tal como el monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) el cual modifica el estado del canal. La presente tesis trata acerca de la modulación de los canales de potasio sensibles al trifosfato de adenosina (ATP) del músculo esquelético de la rana por proteínas

G, sin que para ello se necesite de la participación de segundos mensajeros.

BIOFISICA CLASICA DEL AXON GIGANTE DE CALAMAR

El análisis cuantitativo de las corrientes iónicas a través de las membranas de las células excitables inició con los experimentos en el axón gigante de calamar. Cole (1949) y Marmont (1949) desarrollaron el método de fijación del voltaje y posteriormente Hodgkin, Huxley y Katz (1949, 1952) lo perfeccionaron. Lo esencial del método es que el efecto de retroalimentación positivo de la conductancia a sodio sobre el potencial de membrana es eliminado al pasar una corriente a través de la membrana del axón de tal forma que el potencial de membrana se mantiene constante a cualquier valor de potencial deseado. El uso de esta técnica por Hodgkin y Huxley (1952a-d) los llevo a una análisis cuantitativo de los eventos que ocurrían durante el potencial de acción. El flujo de corriente a través de la membrana del axón consiste de dos componentes, una corriente capacitiva (el cambio en la densidad de

cargas en las superficies interna y externa de la membrana) y una corriente iónica (el paso de iones a través de la membrana). Las corrientes registradas mostraron tres componentes. Primero, debido al comportamiento eléctrico de la membrana como capacitor, existe una breve corriente saliente: la corriente capacitiva. Después aparece una corriente entrante que dura aproximadamente 1 ms, y finalmente la corriente se hace saliente y se mantiene a un nivel estable mientras dura la fijación. El método de sustitución iónica los llevo a la conclusión que la corriente entrante, rápida y transitoria era llevada por iones de sodio y que la corriente saliente fue llevada por iones de potasio. La corriente llevada por potasio fue llamada de la rectificación tardía debido a que su activación sucedía con cierta latencia o retardo y su relación corriente-voltaje fue no lineal (corrientes salientes de gran amplitud pero corrientes entrantes de poca amplitud o ausentes). Además identificaron otro componente de la corriente iónica, a la que llamaron corriente de fuga, de bases iónicas indeterminadas, relativamente independiente del voltaje y de baja amplitud.

Hodgkin y Huxley (1952d) desarrollaron un sistema de ecuaciones empíricas para describir los cambios de conductancias y sus dependencias respecto al voltaje y al tiempo. La conductancia a potasio (g_K) es dada por

$$g_K = \bar{g}_K n^4 \quad (1)$$

donde \bar{g}_K es una constante igual al valor máximo de g_K . La idea de esta ecuación fue que los iones de potasio pueden atravesar la membrana cuando 4 partículas cargadas e independientes se movían a cierta región de la membrana bajo la influencia del campo eléctrico, la cantidad n representa la probabilidad de que esas partículas se encuentren en la posición correcta. La variación de la cantidad n respecto al tiempo esta determinada por la ecuación

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n (1-n) - \beta_n n \quad (2)$$

en la cual α_n y β_n son las constantes de velocidad que, a 6°C, varían con el voltaje de acuerdo a la ecuación empírica

$$\alpha_n = \frac{0.01 (V+10)}{\exp[(V+10)/10] - 1}$$

y

$$\beta_n = 0.125 \exp(V/80).$$

Una forma alternativa de escribir la ecuación que describe la

variación de n respecto al tiempo es

$$\frac{dn}{dt} = (n_{\infty} - n) / \tau_n \quad (3)$$

donde n_{∞} (el valor de n en el estado estacionario a un voltaje dado) se obtiene por

$$n_{\infty} = \alpha_n / (\alpha_n + \beta_n) \quad (4)$$

y τ_n es una constante de tiempo dada por

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n} \quad (5)$$

La descripción de la conductancia a sodio fue descrita bajo los mismos principios, y es obtenida por la ecuación

$$g_{Na} = \overline{g_{Na}} m^3 h, \quad (6)$$

donde $\overline{g_{Na}}$ es una constante igual al valor máximo de g_{Na} . Esta ecuación esta basada en la idea de que el canal de sodio se puede abrir por el movimiento de tres partículas, cada una con una probabilidad m de estar en la posición correcta, e inactivadas por un evento de probabilidad $(1 - h)$. m es dado por la ecuación

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m (1-m) - \beta_m m \quad (7)$$

donde a 6°C,

$$\alpha_m = \frac{0.1(v+25)}{\exp[(v+25)/10]-1}$$

y

$$\beta_m = 4 \exp(v/18).$$

h es dada por la ecuación

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h (1-h) - \beta_h h \quad (8)$$

donde a 6°C

$$\alpha_h = 0.07 \exp(v/20)$$

y

$$\beta_h = \frac{1}{\exp[(v+30)/10]-1}$$

Las ecuaciones 7 y 8 pueden ser escritas alternativamente como

$$\frac{dm}{dt} = (m_{\infty} - m) / \tau_m$$

y

$$\frac{dh}{dt} = (h_{\infty} - h) / \tau_h$$

con m_{∞} , τ_m , h_{∞} y τ_h dadas por ecuaciones similares a 4 y 5.

Cuando estas ecuaciones fueron resueltas, Hodgkin y Huxley (1952d) describieron con una seguridad considerable el fenómeno clásico de la excitabilidad del axón de calamar. Ellos demostraron que su modelo podía predecir apropiadamente el potencial de acción, los flujos iónicos, y otras propiedades eléctricas del axón.

CANALES DE POTASIO

Una corriente de potasio (K^+) fue parte de la descripción original del mecanismo del potencial de acción en el axón gigante de calamar por Hodgkin y Huxley (1952). Esta corriente mostro ser la responsable de la fase de repolarización del potencial de

acción. Estudios posteriores en el nodo de Ranvier del axón de la rana mostraron un mecanismo similar para la generación del potencial de acción, con una corriente de K^+ responsable también de la repolarización (Frankenhauser y Huxley, 1964). Las corrientes de K^+ se han encontrado en todas las células que presentan potenciales de acción mediados por sodio (Na^+), calcio (Ca^{2+}), o por Na^+ y Ca^{2+} . Es claro también que, a diferencia de las corrientes de Na^+ , las corrientes de K^+ varían ampliamente en sus propiedades cinéticas, dependencia al voltaje, farmacológicas, en su comportamiento a nivel unitario y en otras propiedades (Hille, 1992; Rudy, 1988). Con frecuencia varios tipos de corrientes de K^+ son encontrados en la misma célula, demostrando que su diversidad no se debe estrictamente a la diferencia entre los tipos celulares. Más aun, corrientes de K^+ similares pueden encontrarse en diferentes células. La posibilidad de estudiar canales a nivel unitario, y separar cada una de las diferentes corrientes de K^+ por sus propiedades cinéticas, genéticas, etc., sugiere que la gama de corrientes de K^+ resulta de la presencia de diferentes clases de canales de K^+ (Hille, 1992; Rudy, 1988).

En los últimos años se ha incrementado el interés por estudiar los canales de K^+ debido al papel funcional que tienen tanto en células excitables como no excitables. En las células excitables,

por ejemplo en neuronas y músculos, todas las corrientes de K^+ son fundamentalmente inhibitorias, generando corrientes salientes que contrarrestan las corrientes entrantes llevadas por Na^+ y/o Ca^{2+} , las cuales producen señales despolarizantes. Como resultado de esto, los canales de K^+ tienen un papel importante en la regulación de la excitabilidad. Por otra parte, son blancos de la acción de muchas drogas, toxinas, neurotransmisores y segundos mensajeros.

La función de los canales de K^+ esta relacionada con la estabilización eléctrica de la membrana celular. Ellos mantienen el potencial de reposo, son responsables de la repolarización del potencial de acción, intervienen en la hiperpolarización, y en general disminuyen la excitabilidad de las células cuando ellos están abiertos. Los diferentes canales de K^+ son distinguidos y clasificados principalmente por sus propiedades cinéticas, y en segundo término por sus características farmacológicas o de selectividad iónica (Hille, 1992). Los canales de K^+ se pueden clasificar en cuatro grupos principales: canales activados por el voltaje (rectificación tardía, tipo "A"), activado por Ca^{2+} , de la rectificación entrante y canales de K^+ modulados por mensajeros químicos y nucleótidos (Rudy, 1988).

Canales de Potasio de la Rectificación Tardía

El canal de K^+ de la rectificación tardía es el responsable de la fase de repolarización del potencial de acción en una gran variedad de células excitables. Dos grandes criterios son usados para clasificar algunos canales de K^+ como de la rectificación tardía. El primero es que las corrientes macroscópicas que fluyen a través de estos canales sea similar en su comportamiento cinético y dependencia al voltaje a las corrientes descritas por Hodgkin y Huxley (1952). El segundo criterio es de exclusión: corrientes de K^+ dependientes del voltaje suficientemente distintas de las tipo "A" y que no sean activadas por un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Rudy, 1988). Corrientes del rectificador tardío similares a las descritas por Hodgkin y Huxley se han encontrado en nervios mielínicos (Dubois 1983; Dubois y Bergman, 1977; Frankenhaeuser, 1965), en axones de calamar (Binstock y Goldman, 1969; Chandler y Meves, 1965; Shrager, 1974), en neuronas de moluscos (Adams y col., 1980) en músculo esquelético (Adrian y col., 1970a y 1970b; Stanfield, 1970; Beam y Donaldson, 1983;), en músculo cardíaco (McAllister y Noble, 1966; Noble y Tsien, 1968). Estudios recientes han mostrado la existencia de más de un canal de K^+ de la rectificación tardía; en el nodo de

Ranvier, se ha establecido que existen por lo menos tres tipos de corrientes de K^+ , que corresponderían a tres tipos de canales independientes, debido a que son bloqueados selectivamente (Dubois, 1981 y 1983). Con el registro de corrientes a nivel unitario, en el nodo de Ranvier, se han distinguido tres diferentes corrientes de K^+ (Jonas y col., 1989), los cuales probablemente correspondan a los tres componentes descritos en las corrientes macroscópicas por Dubois en 1981 y 1983. En el axón gigante de calamar, existen tres tipos de canales, que se distinguen por sus diferentes conductancias y probabilidades de apertura (Llano, Webb y Bezanilla, 1988).

Estos hallazgos muestran que una aparente corriente macroscópica homogénea puede contener más de un componente. En el músculo esquelético de rana se han descrito dos componentes en las corrientes macroscópicas (rápido y lento), identificados en la corriente que se produce al corte del pulso de fijación de voltaje (corriente de cola) (Adrian y col., 1970b).

En el axón de calamar, el bloque incompleto de las corrientes de K^+ por 4-aminopiridina (4-AP), puede resultar en parte, de la presencia de más de un canal (Meves y Picon, 1977).

La tabla 1 muestra las variaciones encontradas en los diferentes canales de la rectificación tardía. A pesar de que es

imposible decir que es lo que determina las diferencias entre estas corrientes, o cuantos subtipos de canales ellas representan, se pueden distinguir varias diferencias (ver tabla 1).

Canales de Potasio de la rectificación tardía en el músculo esquelético. En el músculo esquelético de la rana y del mamífero, los cambios de las conductancias de Na^+ y K^+ son los responsables del potencial de acción (Adrian y col, 1970a y 1970b; Adrian y Marshall, 1976; Beam y Donaldson 1983a; Duval y Léoty, 1978). Dada la importancia de los canales de K^+ , un éxito de estos trabajos fue obtener una descripción completa de dichos canales en términos de las ecuaciones de Hodgkin y Huxley (1952), y comparar los resultados de sus análisis con los obtenidos en el axón gigante de calamar. Cuando la membrana fue despolarizada las corrientes salientes de K^+ se desarrollaron con un incremento sigmoidal, en una forma muy similar a como sucede en el axón. Una gran diferencia entre el músculo esquelético y el axón de calamar es que la corriente de la rectificación tardía en el músculo esquelético se inactiva durante un pulso de fijación de duración prolongada (Adrian y col., 1970a; Stanfield, 1970, Beam y Donaldson, 1983a; Duval y Léoty, 1978). La inactivación en el estado estacionario se desarrolla con un curso temporal exponencial, similar a las

corrientes de sodio, sin embargo su dependencia al voltaje es menor (Adrian y col., 1970a y 1970b; Argibay y Hutter, 1973). La inactivación es mucho más rápida a temperatura ambiente (19-20°C) que a bajas temperaturas (2-6°C) (Adrian y col., 1970a; Stanfield, 1970).

En un amplio rango de temperaturas, el curso temporal de la cinética de activación de los canales de K^+ en el músculo esquelético de mamífero, difiere cualitativamente de la cinética de n^4 y el decaimiento de la corriente que se produce al corte del pulso de fijación también difiere de dicha cinética, las corrientes medidas en temperaturas cercanas a la fisiológica ($> 25^\circ\text{C}$) son bien descritas por un cinética de n^4 , a temperaturas intermedias (-15-25°C) las corrientes son bien descritas por la cinética de n^4 solo si un término de retardo es incluido, en frío ($<15^\circ\text{C}$) las corrientes no pueden ser ajustadas por esta cinética (Beam y Donaldson, 1983a).

Las corrientes del canal de K^+ de la rectificación tardía del anfibio y del mamífero muestran dos componentes, que de acuerdo a su comportamiento cinético se les clasificó como rápido y lento. Ambos componentes tienen una relación instantánea corriente-voltaje, lineal; en el músculo de rana el componente rápido tiene un potencial de equilibrio más positivo respecto al potencial de

Tabla 1. Canales de la Rectificación Tardía

PREPARACION BIOLÓGICA	ACTIVACION		VELOCIDAD DE INACTIVACION (s)	OTRAS CARACTERISTICAS
	"umbral" (mV)	cinética (ms)		
Axón gigante de calamar (Almers y col., 1980; Bezanilla, 1985; Hodgkin y Huxley, 1952)	- -70	1-6 (8-10°C)		Incremento sigmoidal de I. n^2 , $x = 4$
Músculo esquelético de rana 3°C (Adrian y col., 1970; Standen y col., 1985; Stanfield, 1970)				
(a) Rápido (80%)	> -70	5-50	1-2	Rápido: incremento sigmoidal, $x = 4$
(b) Lento (20%)		> 1-2 s	1-2	
Nodo de Ranvier del ciático de rana (Dubois, 1981 y 1983; Jonas, 1989)				
(a) I_{K1} - 55% en fibras motoras y 52% en fibras sensoriales	> -80	0.5-5 (12°C)	- 45 (12°C, 0 mV)	Incremento sigmoidal de I en F1 y F2
(b) I_{K2} - 27% en motoras y 52% en sensoriales	> -40	0.5-5 (12°C)	- 2 (12°C, 0 mV)	
(c) I_{K3} - 18% en fibras motoras y sensoriales	- -80	20-100 (12°C)	>80	Incremento exponencial de I_s
Neuronas simpáticas de rata (Belluzzi y col., 1985; Galvan y col., 1984)	> -40	10-20 (25°C)	5 (25°C, 26 mV)	Incremento sigmoidal

reposito, sin embargo, en el músculo de mamífero el componente rápido es más negativo que el potencial de reposo (Adrian y col., 1970b; Stanfield, 1970; Duval y Léoty, 1978; Rudy, 1988). Sin embargo, en

el músculo omohioideo de la rata, la corriente que genera el componente lento, a potenciales hiperpolarizantes, es llevada a través del canal de K^+ de la rectificación entrante (Beam y Donaldson, 1983a y 1983b). Duval y Léoty (1980a y 1980b) muestran evidencias de que los músculos lentos presentan ambos componentes (rápido y lento), mientras que en los músculos rápidos sólo participa el componente rápido.

En estudios a nivel de canales únicos, en vesículas formadas del sarcolema del músculo esquelético de la rana, las corrientes del rectificador tardío muestran una conductancia unitaria de 15 picosiemens (pS) a una concentración extracelular similar a la fisiológica; el promedio de corrientes unitarias generados por pulso a intervalos breves muestran un proceso lento de disminución de la corriente promedio, que puede deberse probablemente a un fenómeno de inactivación, similar al observado en el registro de la corrientes poblacionales o macroscópicas (Standen y col., 1984 y 1985). Los canales de K^+ registrados a nivel unitario tienen períodos de intensa actividad, los cuales son seguidos de intervalos en los que el canal presenta una completa inactividad (Standen y col., 1985; Edry-Schiller y col., 1991).

Selectividad y bloque de los canales de potasio de la rectificación tardía. La secuencia de selectividad para los canales de K^+ de la rectificación tardía en diferentes tejidos, es esencialmente la misma, y sólo el talio (Tl^+), K^+ , ion amonio (NH_4^+) y rubidio (Rb^+) son permeantes en estos canales (Bezanilla y Armstrong, 1972; Hille, 1973; Hagiwara y Takahashi, 1974; Latorre y Miller, 1983; Standen y Stanfield, 1980). Armstrong y Bezanilla (1972) y Hille (1973) postularon la existencia de un filtro de selectividad localizado en el interior del canal. El filtro de selectividad es visto como una parte estrecha en el conducto del canal, capaz de deshidratar total o parcialmente e interactuar íntimamente con el ion permeante. El diámetro mínimo del poro fue definido arbitrariamente, ajustando la forma de un pentágono formado por cinco átomos de oxígeno a una magnitud de 0.3 a 0.33 nanómetro (nm) (Hille, 1973 y 1992). De esta forma, todos los iones mayores que NH_4^+ (diámetro = 0.3 nm) son impermeables a través del canal. El NH_4^+ tiene una permeación mucho más fácil de lo que se esperaría en este modelo (Hille, 1973). Por ello se propuso que el NH_4^+ hace puentes de hidrógeno con el canal y acorta su distancia del centro del átomo de nitrógeno al centro del átomo de oxígeno a 0.28 nm. Los iones de Na^+ y litio (Li^+), a pesar de ser más pequeños que el ion K^+ , no pueden pasar a través del canal de K^+ , dado que los oxígenos

que forman parte del filtro de selectividad del poro no pueden aproximarse lo suficientemente cerca para reemplazar el agua de hidratación (Hille, 1973 y 1992). El modelo, por ello, trabaja por exclusión de los iones impermeantes más que por afinidad selectiva de los iones más permeantes.

El Cs^+ , Na^+ y Li^+ bloquean fuertemente los canales de K^+ , cuando son agregados al medio interno. Si un ion puede bloquear, se puede deber a que entre al canal, pero no puede atravesar el filtro de selectividad. El Cs^+ es el bloqueador más potente de los tres cationes monovalentes y la secuencia de bloqueo es $\text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ (Hille, 1992). El bloqueo es dependiente del voltaje; la relación instantánea corriente-voltaje (I-V) normalmente lineal del rectificador tardío es transformada por el bloqueador hacia una relación instantánea I-V no lineal. Aún, con Cs^+ o Na^+ , la relación instantánea I-V desarrolla una pendiente negativa con grandes despolarizaciones (Bezanilla y Armstrong, 1972). El Cs^+ puede bloquear las corrientes entrantes pero no las corrientes salientes cuando se agrega por el lado externo, y el efecto inverso se observa cuando se agrega por el lado interno. Una forma de explicar el bloqueo dependiente del voltaje es suponiendo la existencia de varios sitios que unen a los iones de Cs^+ (Hille y Schwarz, 1978).

El rectificador tardío también es bloqueado por los iones de

tetraetilamonio (TEA⁺) y sus análogos. El TEA⁺ bloque los canales de K⁺ cuando se aplica ya sea por el lado intra o extracelular (Adrian y col., 1970b; Armstrong, 1969 y 1971; Armstrong y Hille, 1972; Stanfield, 1970 y 1983). El efecto del TEA⁺ fue estudiado por Armstrong (1971) y se pueden resumir de la siguiente manera: a) Los iones de amonio cuaternario (AC) aplicados por el lado intracelular bloquean al canal solo cuando el canal está abierto. b) La potencia bloqueadora incrementa conforme la cadena de hidrocarburos incrementa, como si los sitios de afinidad tuvieran una región hidrofóbica. c) Para compuestos más grandes que el TEA⁺, el bloque sufre un cierto retardo en su curso temporal, causando una aparente inactivación de las corrientes de K⁺. La velocidad de bloque se incrementa si se aumenta la concentración de AC. d) La reacción de desbloqueo puede ser acelerada si la concentración extracelular de K⁺ se incrementa, como si los iones de K⁺ que vienen desde el lado externo fueran capaces de "limpiar" el canal bloqueado, empujando al bloqueador hacia el medio interno. Esta observación implica que el sitio de afinidad para AC esté en el interior del canal. e) Los iones de AC pueden ser atrapados adentro del canal si las compuertas son rápidamente cerradas por grandes pulsos hiperpolarizantes.

Armstrong (1971) concluyó de estos experimentos que el canal

tiene una boca por el lado intracelular de aproximadamente 0.8 x 0.8 nm en donde se puede acomodar el TEA⁺ y otros iones de AC. El K⁺ y el TEA⁺ hidratados tiene el mismo diámetro y pueden entrar al canal a través de la boca intracelular, entonces el conducto disminuye su diámetro a nivel del filtro de selectividad y sólo el K⁺ puede atravesarlo si es parcialmente deshidratado.

Los canales de K⁺ de la rectificación tardía también son bloqueados por el ion bario (Ba²⁺) (Armstrong y Taylor, 1980; Hagiwara y Kidokoro, 1971). El bloque por Ba²⁺ es extraordinariamente simple. El Ba²⁺ y el K⁺ tienen una relación de simple competencia; si el canal está ocupado por K⁺, entonces el Ba²⁺ no puede entrar, y viceversa (Armstrong y Taylor, 1980; Eaton y Brodwick, 1980). En otras palabras, el canal solo puede ser ocupado por un ion Ba⁺ (Hille y Schwartz, 1979).

Canales de Potasio Tipo "A"

Una corriente de K⁺ relativamente rápida y transitoria que se activa con voltajes despolarizantes desde potenciales de membrana hiperpolarizantes fue descrita inicialmente en neuronas de moluscos

(Connors y Stevens, 1971; Hagiwara y col., 1961), y llamada corriente "A" (I_A). Las I_A tienen una activación más rápida que las corrientes de K^+ de la rectificación tardía, y presentan una inactivación también más rápida (Rudy, 1988). La hiperpolarización que sigue a un potencial de acción remueve la inactivación de los canales tipo "A", los cuales se abren transitoriamente, como resultado de esto, el potencial de membrana se mueve hacia el umbral del potencial de acción. Así, los canales tipo "A" sirven como un regulador en el intervalo entre potenciales de acción sucesivos (Connor, 1978, Rudy, 1988, Llinás, 1988).

Canales de Potasio de la Rectificación Entrante

Katz (1949) encontró que, en solución isotónica de sulfato de potasio, la conductancia del músculo esquelético de rana fue mucho mayor para las corrientes entrantes que para las salientes. Esta propiedad fue llamada 'rectificación anómala' debido a que la rectificación fue en dirección opuesta a la predicha por la teoría del campo constante (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949). La rectificación fue también en dirección opuesta a las corrientes del rectificador tardío encontradas en los axones de calamar (Hodgkin

y col., 1949) y en las fibras musculares (Jenerick, 1959). El término más descriptivo y actual, rectificación entrante será usado en adelante. Posteriormente diversos investigadores han identificado las corrientes de la rectificación entrante en el músculo esquelético (Adrian y Freygang, 1962; Adrian y col., 1970b; Beam y Donaldson, 1983b; Duval y Léoty, 1978; Hestrin, 1981; Ohmori y col., 1981; Van Heukelom, 1991; Standen y Stanfiel, 1978 y 1979). Las corrientes de la rectificación entrante con propiedades similares se han encontrado en otras células, como en los ovocitos de la estrella de mar (Hagiwara y y Takahashi, 1977; Hagiwara y Yoshii, 1979), en ovocitos de tunicate (Fukushima, 1982; Ohomori, 1978), en fibras de Purkinje del corazón (Hutter y Noble, 1960; Ibarra y col., 1991; McAllister y Noble, 1966; Noble y Tsien, 1968), en neuronas de invertebrados (Kandel y Tauc, 1966), en neuronas de mamífero (Nelson y Frank, 1967; Stanfiel y col., 1985), etc.

Esta propiedad de rectificación tiene un papel importante en el mantenimiento de la meseta del potencial de acción del músculo cardíaco, así como su rápida repolarización y en determinar el potencial de reposo (Ibarra y col., 1991; Noble, 1979). La rectificación depende de la concentración extracelular de K^+ y ocurre cerca del potencial de equilibrio del K^+ (Matsuda, 1988;

Vandenberg, 1987). La propiedad de rectificación entrante es probablemente el resultado de un bloqueo por iones de magnesio (Mg^{2+}) intracelulares, el Mg^{2+} citoplásmico bloquea las corrientes salientes sin afectar las corrientes entrantes (Pennefather y col., 1992; Matsuda, 1988; Vandenberg, 1987).

Canales de Potasio Activados por Calcio

Muchas células musculares y nerviosas poseen canales de K^+ activados por concentraciones micromolares de Ca^{2+} intracelular (Latorre y col., 1989; McManus y Magleby, 1991; Meech, 1974; Peyer y col., 1982). Los canales son altamente selectivos a K^+ y tienen una conductancia (100 a 350 pS) 10 a 20 veces mayor que la de los canales de K^+ descritos por Hodgkin y Huxley (Blatz y Magleby, 1984; Pallota y col 1981; Yellen, 1984). La frecuencia con la cual se abren estos canales y el tiempo promedio de apertura son controlados de una manera reversible por las $[Ca^{2+}]$ en el lado intracelular de la membrana, y son modulados por el potencial de membrana en presencia de Ca^{2+} (Barrett y col., 1982; Pallota y col., 1981; McManus y Magleby, 1991). Dada su alta conductancia, se han clasificado como grandes canales (BK, B del inglés "big") o maxi-

canales, sin embargo se han encontrado canales de K^+ activados por Ca^{2+} de bajas conductancias (SK, S del inglés "small") y otros de conductancias intermedias con diferentes propiedades (Romey y Lazdunzky, 1984; Blatz y Magleby, 1986). Los canales presentan períodos de intensa actividad seguido de períodos silentes, un comportamiento que se describió como actividad de salvas o de explosiones. Los canales de K^+ activados por Ca^{2+} juegan un papel fundamental en el metabolismo celular. Son importantes en la regulación de la frecuencia de disparo neuronal (Hotson y Prince, 1980; Storm, 1987; Yarom y col., 1985), en células secretorias su activación da como resultado el cierre de canales de calcio activados por el voltaje, de esta forma proporciona un mecanismo de retroalimentación negativa para la entrada de Ca^{2+} (Bourque y col., 1985).

La cinética de estos canales depende de la cinética compleja del influjo de Ca^{2+} a la célula, de la difusión y amortiguamiento del Ca^{2+} , de la expulsión y captación por organelos intracelulares, de la interacción del Ca^{2+} con el canal, y de las transiciones dependientes del voltaje (Hille, 1992). En el músculo esquelético el canal puede unir tres o más iones de Ca^{2+} para entrar a un estado de completa actividad, lo que sugiere que para que el canal se abra debe de transitar por lo menos a través de cinco estados cerrados,

además, el canal puede abrirse con un número diferente de Ca^{+2} unido(s) a él, por lo que el canal puede tener tres o cuatro estados abiertos (McManus y Magleby, 1988 y 1991).

Canales de Potasio Modulados por Mensajeros Químicos y Nucleótidos

La división de funciones entre las células de un organismo multicelular requiere que cada población celular sea capaz de influir sobre la función de otra población celular y a su vez responda a los requerimientos de otras poblaciones. Gran parte de esta coordinación se obtiene mediante señales químicas. Sin embargo, la llegada de una señal nunca invade la privacidad de la célula. Distribuidas sobre la superficie externa de la membrana celular se encuentran cierto tipo de moléculas llamadas receptores, las cuales detectan la llegada de un mensajero y activan una vía de información que finalmente regula un proceso celular como la secreción, el crecimiento o la contracción. En muchas formas de comunicación celular, los mensajeros químicos transmiten la información de una célula a otra y, en muchos casos hacen un relevo sobre una clase de moléculas llamadas proteínas G, para dirigir el flujo de la señal desde el receptor al resto de la célula. Las

proteínas G son proteínas integrales de membrana que se localizan en la cara citoplásmica de la membrana celular, y son llamadas así debido a su capacidad de unir nucleótidos de guanina. Estas proteínas actúan sobre otras moléculas llamadas efectoras, con frecuencia el efector es una enzima que cataliza la formación de un segundo mensajero activo a partir de una molécula precursora inactiva. El segundo mensajero puede difundir a través del citoplasma y llevar la información más allá de la membrana celular. (Gilman, 1970 y 1987; Roos y Gilman, 1980)

Diversos neurotransmisores y hormonas (mensajeros químicos) modifican la excitabilidad celular, modulando la función de los canales de K^+ . La regulación de los canales de K^+ por mensajeros químicos (MQ) es diferente de la acción de acetilcolina (Ach) sobre el receptor nicotínico en la placa neuromuscular, aquí, el canal iónico es parte integral de la macromolécula receptora, por lo que un término apropiado es el de receptor-canal (Fig. 1a). La apertura del receptor-canal es iniciado por la interacción de las moléculas de Ach con el receptor-canal (Colquhoun y Sakmann, 1985; Del Castillo y Katz, 1957; Neher y Sakmann, 1992). Por otra parte, los canales iónicos pueden coexistir como moléculas independientes de los receptores y los efectos sobre los canales de K^+ son mediados vía segundos mensajeros (tal como se ha descrito previamente), los

cuales son activados como resultado de una interacción del MQ y el receptor (Fig. 1b).

Los MQ modulan los canales de K^+ en diferentes tipos celulares, por ejemplo, en las células de secreción exocrinas y endocrinas (Petersen y Findaly, 1987), en neuronas (Nicoll, 1988), etc. La medición directa de las corrientes iónicas en células intactas, ha demostrado que si se agregan los agentes estimulantes por la cara extracelular de la membrana, éstos influyen en la actividad de los canales iónicos, a pesar de que los MQ no tienen acceso a la cara citoplásmica de la membrana, lo que sugiere fuertemente que su acción es mediada por segundos mensajeros (Neher, 1988). En el caso de la activación hormonal de las células del acino pancreático, el Ca^{2+} es el segundo mensajero y el canal de K^+ que se activa por Ca^{2+} tiene una gran conductancia unitaria, su probabilidad de apertura depende del voltaje y es bloqueado por tetraetilamonio (Petersen y Maruyama, 1984; Suzuki y col., 1985).

La modulación β -adrenérgica de canales de K^+ también se ha estudiado en el músculo cardíaco. Así, Tsien, Giles y Greengard (1972) describieron que en las células de Purkinje las corrientes iónicas que fluyen a través del canal de la rectificación tardía se incrementa por agonistas β -adrenérgicos y que este efecto es mediado por el AMPc (Cachelin y col., 1983; Brum y col., 1984;

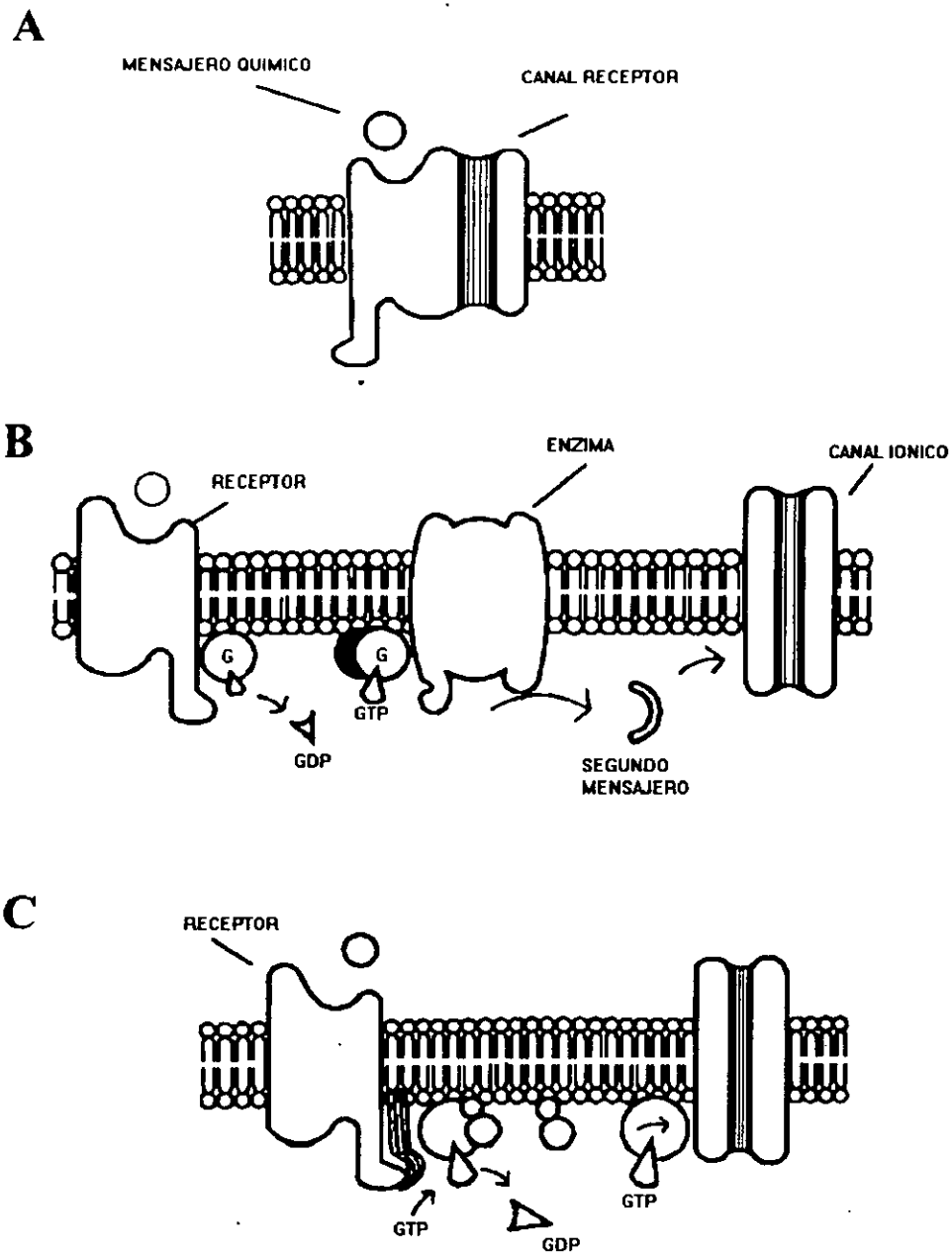


Fig. 1. Mecanismos de modulación de los canales iónicos. (A) En algunos canales el estímulo ejerce su efecto directamente sobre el canal iónico para modificar su actividad, como en caso del receptor a Ach. (B) La cascada clásica del segundo mensajero. En otros canales el receptor es un molécula físicamente separada que se comunica con el canal a través de un segundo mensajero difusible, esta comunicación la hacen a través de una proteína G. (C) Modulación de canales iónicos por proteínas G. Este tipo de regulación es una vía de información limitada a la membrana celular, para ello participan sólo tres moléculas: receptor, proteína G y canal iónico. La proteína G interactúa directamente con el canal y no requiere de la participación de segundos mensajeros.

Walsh y col, 1989). Posteriormente se describió que las catecolaminas hiperpolarizan a las células de Purkinje y que lo hacen en condiciones en que no se esperaría ninguna contribución importante de la bomba de Na/K (Gadsby, 1983). Los canales de K⁺ de la rectificación tardía en células del sistema inmune (linfocitos B), también son modulados por segundos mensajeros (AMPC), produciendo un rápido decremento de la conductancia a K⁺ y un incremento de las velocidades de activación y de inactivación (Choquet y col., 1987).

Otro tipo de canal de K⁺ que es modulado, es el que genera la llamada corriente "S" en neuronas de moluscos. La fosforilación de canales iónicos por la subunidad catalítica (SC) de la proteína cinasa dependiente de AMPC es un paso necesario en el proceso que lleva a la activación de los canales de K⁺ en diversos tipos celulares, tales como los canales de K⁺ activados por serotonina (S) en neuronas de *Aplysia* (Adams y Levitan, 1982; Klein y col., 1982) y los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ en neuronas de caracol (Ewald y col., 1985; Peyer y col., 1982). Por otra parte también existen evidencias de que la SC cierra canales de K⁺ sensibles a serotonina (Shuster y col., 1985). La sustancia P despolariza neuronas mediante la reducción de la corriente de K⁺ de la rectificación entrante (Stanfield y col., 1985).

Las fibras simpáticas del sistema nerviosos autónomo terminan sobre neuronas del plexo submucoso dentro de la pared intestinal. La noradrenalina liberada de estas fibras actúa sobre los receptores α_2 -adrenérgicos de las neuronas, lo que lleva a una hiperpolarización de la membrana celular debido a la apertura de canales de K^+ (Mihara y col., 1985; Tatsumi y col., 1990). Otro ejemplo es la modulación de una corriente tipo "A" por noradrenalina, actuando a través del receptor α_1 sobre neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe dorsal (Aghajanian, 1985).

Hasta hace algunos años, la modulación de los canales iónicos a través de segundos mensajeros, se pensaba que era la única forma de modulación de los canales iónicos. Sin embargo, se ha descrito un nuevo mecanismo de modulación de los canales iónicos en diversos tipos celulares: modulación de canales iónicos directamente por proteínas G, sin que para ello intervengan segundos mensajeros (Fig. 1C). La modulación de los canales iónicos por proteínas G será detallada en la sección de antecedentes.

Canales de potasio sensibles a ATP

Los canales de K^+ cuya actividad puede ser regulada por el

trifosfato de adenosina (ATP) fueron descritos inicialmente en el músculo cardíaco por Noma (1983) y en células β del páncreas por Cook y Hales (1984). Estos canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) están abiertos en ausencia de ATP, el 50% de los canales se encuentran cerrados cuando la concentración de ATP es de 15 a 100 μM , y casi todos están cerrados a concentraciones de 1 mM (Cook y Hales, 1984; Lederer y Nichols, 1989; Trube y col., 1986). Los canales de K_{ATP} se han encontrado también en el músculo esquelético (Spruce y col., 1987) y neuronas (Ashford y col., 1988). En contraste con los canales de K^+ activados por Ca^{2+} , la probabilidad de apertura de los canales de K_{ATP} es virtualmente insensible a los cambios del potencial de membrana (Findlay y col., 1985; Hille, 1992). Las drogas hipoglucemiantes del tipo de las sulfonilureas (tolbutamida y glibenclamida) disminuyen la probabilidad de apertura de los canales K_{ATP} en las células β -pancreáticas y en músculo esquelético de rana (Petersen y Findlay, 1987; Standen y col., 1992; Trube y col., 1986). El papel funcional de este canal está íntimamente relacionado a la función celular, por ejemplo, en las células β del páncreas ellos son esenciales en la regulación de la secreción de insulina. La liberación de insulina normalmente se lleva a cabo por un proceso que depende del flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula durante el potencial de acción, cuando los

niveles de glucosa sanguínea son elevados; la secreción de insulina cesa cuando los niveles de glucosa disminuyen, debido a la actividad de los canales K_{ATP} , que hiperpolarizan a las células β -pancreáticas (Cook y Hales, 1984; Ashcroft y col., 1984; Petersen y Findlay, 1987; Rorsman y Trube, 1985). En el músculo cardíaco, se ha sugerido que juegan cierto papel durante la isquemia (Heidbuchel y col., 1990), y en el músculo esquelético durante el ejercicio (Spruce y col., 1987; Standen y col., 1992).

ANTECEDENTES

Como se ha mencionado, los mensajeros químicos son usados para transmitir información de una célula a otra, y en muchos casos, las proteínas G, que acoplan a los receptores a diferentes efectores, juegan un papel crítico en la respuesta. Todas las respuestas pueden incluir algunos cambios en las propiedades eléctricas de la célula y de los canales iónicos de los cuales esas propiedades eléctricas son derivadas. Hasta aquí, tales cambios se pensaba que estaban mediados por segundos mensajeros difusibles en el

citoplasma, sin embargo, es claro que las proteínas G también acoplan receptores a canales iónicos sin la participación de mensajeros difusibles en el citoplasma, una vía de transmisión de información que está limitada a la membrana celular. En la regulación de los canales iónicos, las proteínas G pueden ser indispensables en la apertura de los canales, o bien, ellas pueden ejercer un efecto modulador si se asocia con algún otro estímulo como el potencial de membrana.

Las proteínas G son proteínas integrales de membrana que se encuentran en la superficie interna de la membrana celular y son llamadas así, debidos a su capacidad de ligar nucleótidos de guanina. Estan formadas de tres cadenas protéicas o subunidades, llamadas, de la más grande a la más pequeña, alfa (α), beta (β) y gama (γ). La subunidad α difiere en cada proteína G aislada hasta el momento (Bockaert y col., 1987; Gilman, 1987). Las subunidades β y γ no son necesariamente únicas; diferentes cadenas α pueden estar unidas al mismo par de subunidades beta-gama o a diferentes pares. Algunos investigadores han identificado cinco distintas subunidades β , y más de diez subunidades γ , sugiriendo que más de 1000 combinaciones de α , β y γ pueden ser posibles (Simon y col., 1991).

En el estado de reposo las tres subunidades forman un

complejo, y el difosfato de guanosina (GDP) está unido a la subunidad α . Después de que un primer mensajero llega a un receptor, el receptor, a través de un cambio conformacional, se une a la proteína G. Esta interacción favorece que la subunidad α libere el GDP, entonces el trifosfato de guanosina (GTP), ocupa el sitio dejado por el GDP, entonces modifica la estructura de la subunidad α , y de esta forma la activa (Bourne y col., 1990 y 1991; Simon y col., 1991).

Una vez activada, la subunidad α se disocia de las subunidades β - γ y difunde a lo largo de la superficie interna de la membrana celular hasta que se une con un efector, que en general es una enzima (Bourne y col., 1990). Después de algunos segundos, la subunidad α hidroliza al GTP para formar GDP, pasando de esta forma a su estado inactivado. Una vez inactivada la subunidad α , esta se disocia del efector y entonces se reasocia con las subunidades β y γ (Bourne y col., 1990; Simon y col., 1991). Así, la proteína G funciona como un activador y temporizador, determinando cuando y por cuanto tiempo la vía de información estará en estado activado o desactivado (Bourne y col., 1990). La subunidad α activada puede interactuar con las proteínas efectoras y la señal de información se amplificará. Tales efectores incluyen canales iónicos y enzimas, estos últimos generan a los segundos mensajeros. Los segundos

mensajeros, tales como el AMPc o trifosfato de inositol, producen sorprendentes cambios intracelulares como fosforilación de proteínas, transcripción genética, reorganización del citoesqueleto, secreción y cambios en el potencial de membrana (Bourne y col., 1990 y 1991; Simon y col., 1991).

Las proteínas G pueden ser activadas independientemente del receptor mediante la inclusión de análogos no hidrolizables del GTP (GTP γ S) o por fluoruro (F⁻) y aluminio (Al³⁺). Los efectos del F⁻ se han observado sobre la actividad de efectores enzimáticos de las proteínas G, tales como adenilato ciclasa, fosfolipasa C y la fosfodiesterasa del GMPc (Bigay y col., 1987; Blackmore y col., 1985; Downs, Jr. y col., 1980; Hatta y col., 1986; Graff y col., 1987; Ross y Gilman, 1980; Waldo y col., 1991; Yamazaki y col., 1987). Rall y Sutherland (1958) fueron los primeros en dar evidencias que el F⁻ modificaba la actividad de adenilato ciclasa, sin embargo, este es un efecto indirecto o secundario, el substrato del F⁻ es la proteína G misma (Bigay y col., 1987; Howlett y col., 1979). Efectos similares del F⁻ sobre las proteínas G se han observado en otros sistemas: en la transducina de los fotorreceptores, hormonas que inhiben a la adenilato ciclasa mediante una proteína Gi y sobre la estimulación hormonal de la fosfolipasa C (Gilman, 1987; Katada y col., 1984; Sitaramayya y

col., 1986). El F^- actúa sobre la subunidad α de la proteína G, la cual tiene el sitio de unión para el nucleótido de guanina (Northup y col., 1983). La sensibilidad del F^- depende del tipo de nucleótido o del análogo unido a la subunidad α , por ejemplo, la proteína G con un GDP unido a la subunidad α es activable por F^- , pero no una proteína G con GMP o GDP β S (Eckstein y col., 1979). Sternweis y Gilman (1982) demostraron que la activación de la proteína G por F^- requiere de la presencia de Al^{3+} en cantidades micromolares. Existen claras evidencias que el AlF_4^- activa cantidades estequiométricas de transducina en el rango micromolar, además, se ha observado que esta activación requiere de la presencia de GDP en el sitio del nucleótido de la subunidad α (Bigay y col., 1985 y 1987). Dada la analogía estructural entre el AlF_4^- y el grupo fosfato, se sugirió que el AlF_4^- funciona como un análogo de fosfato de alta afinidad, el cual se puede unir al GDP en la posición γ del sitio del nucleótido de la subunidad α y mimetiza al γ -fosfato, de esta forma modifica la estructura conformacional de la proteína G, llevándola a su estado activado, normalmente observado con el GTP o sus análogos (Bigay y col., 1987).

Canales Iónicos y su Regulación por Proteínas G

La importancia de las proteínas G en la biología celular continúa incrementándose, mediante la expansión del conocimiento acerca de la función celular en los mecanismos de transducción que son mediados por estas proteínas G. En esta sección trataremos del mecanismo más recientemente descrito: El efecto directo de las proteínas G sobre los canales iónicos.

El nuevo mecanismo de regulación de los canales iónicos a través de un efecto directo de las proteínas G fue mostrado estudiando las acciones que ejerce el nervio vago sobre el corazón. La acetilcolina (Ach) liberada del nervio vago modula la frecuencia y fuerza de contracción del corazón (Kunze, 1972). La respuesta se debe a que las moléculas de Ach liberadas por las neuronas parasimpáticas en el corazón se unen a los receptores muscarinicos y activan un canal de K^+ que enlentece el marcapaso del corazón e hiperpolariza las células musculares atriales (Osterrieder y col., 1981; Sakmann y col., 1983). El canal activado es un canal de K^+ de la rectificación entrante activado por Ach (K_{Ach}). Las corrientes de K^+ que fluyen a través del K_{Ach} registradas a nivel de un sólo canal, a pesar de no ser completamente diferentes, son altamente específicas en su activación por Ach de por lo menos seis

diferentes canales de K^+ (Brown y Birnbaumer, 1988; Sakmann y col., 1983). La Ach activa las corrientes en la célula entera ($I_{K_{Ach}}$), después de aproximadamente 100 ms (Osterrieder y col., 1981) y un retardo de esta magnitud hacía suponer que en el mecanismo de transducción participaban segundos mensajeros difusibles. Sin embargo, ninguno de los mensajeros solubles, tales como el AMPc, GMPc o Ca^{2+} , pudieron reproducir los efectos de Ach (Soejima y Noma, 1984; Trautwien y col., 1982). Un evento que llamo la atención, cuando los canales de K_{Ach} se registraban a nivel unitario en la configuración de "cell-attached", fue que cuando Ach se encontraba en la solución de la pipeta de registro, pero no en la solución del baño, activaba los canales de K_{Ach} (Soejima y Noma, 1984). Se sugirió entonces que una proteína G pudiera estar participando en este mecanismo, debido a que el GTP fue esencial para la activación de la $I_{K_{Ach}}$ de la célula entera, por otra parte, la toxina pertussi, una toxina que inhibe el acople entre el receptor y la proteína G, previno la activación de estas corrientes (Pfaffinger y col., 1985). Asimismo, la perfusión intracelular con un análogo no hidrolizables del GTP, el GMP-P(NH)P, mantuvo la respuesta muscarínica, aún después del lavado de Ach (Breitweieser y Szabo, 1985), más aún, el GTP γ S activó las corrientes a nivel unitario, sin la estimulación del receptor muscarínico (Kurachi y col.,

1986a), y el magnesio (Mg^{2+}) fue un cofactor en la respuesta a Ach (Kurachi y col., 1986b).

El mecanismo específico fue mostrado cuando se emplearon proteínas G purificadas de eritrocitos humanos (Codina y col., 1983, 1984a y 1984b). Sólo tuvo efecto la proteína G_i sensible a la toxina pertussi, mientras que la proteína G sensible a la toxina del colera careció de efecto (Brown y Birnbaumer, 1988; Codina y col., 1987; Yatani y col., 1987 y 1988). La subunidad α de la proteína G_i preactivada con GTP γ S fue aplicada a concentraciones picomolares y mimetizó la respuesta muscarínica, mientras que las subunidades $\beta\gamma$ fueron inefectivas a concentraciones nanomolares, así también, el ATP γ S, AMP-P(NH)P y los esteres de forbol fueron inefectivos, por lo que se puede excluir la participación de cinasas proteicas en este mecanismo de transducción (Brown y Birnbaumer, 1988 y 1990). La proteína G_i sensible a la toxina pertussi purificada de eritrocitos humanos (G_K), la subunidad α purificada y preactivada, el GTP γ S y Ach, todos producen activación de los canales de K_{Ach} en la misma forma, es decir, incrementan la frecuencia de apertura del canal, sin cambiar ni su conductancia ni el tiempo promedio de apertura (Codina y col., 1987; Yatani y col., 1987). Con esta serie de resultados se llegó a la conclusión de que la proteína G_i activa directamente al canal de K^+ acoplado al

receptor muscarínico.

La modulación de los canales de K^+ por proteínas G también se ha estudiado en otras células. Así, en las células GH₃, una línea celular de la hipófisis anterior, se ha descrito que un canal de K^+ acoplado al receptor de la hormona de crecimiento es modulado directamente por una proteína G, de una forma muy similar a como sucede para el canal de K^+ acoplado al receptor muscarínico en el corazón, es decir, la subunidad α de la proteína G incrementa la frecuencia de apertura del canal (Codina y col., 1987). En neuronas, una serie de receptores a diferentes neurotransmisores (Ach, serotonina, dopamina, GABA y peptidos opioides) están acoplados a diferentes canales de K^+ , el mecanismo que acopla el receptor con el canal depende de GTP y es inhibido por la toxina pertussi, la proteína G involucrada es la G_o (Brown y Birnbaumer, 1990). En neuronas piramidales de hipocampo de rata, se estableció que cuatro diferentes canales de K^+ modificaron su actividad, cuando la proteína G_o purificada fue aplicada por la cara citoplásmica de la membrana celular, no se observó ningún efecto cuando se aplicaron otras proteínas G, o en presencia de activadores de cinasas (Van Dongen y col., 1988).

Existen evidencias que los canales de Ca^{2+} son modulados directamente por proteínas G. La activación de las proteínas G en

el músculo esquelético puede tener un papel regulador en el mecanismo del acople excitación-contracción a través de la modulación de los canales de Ca^{2+} sensibles a la dihidropiridinas (DHP); el $\text{GTP}\gamma\text{S}$: 1) incrementa la sensibilidad al voltaje de los canales, en términos del movimiento de carga y de la apertura de los canales (García y col, 1990), y 2) produce una fuerte contracción isométrica, la cual es bloqueada por antagonistas de los receptores a DHP (nicardipina y nifedipina), por el $\text{GDP}\beta\text{S}$ y por la toxina pertussi (Mouzou y col., 1992; Somasundaram y col., 1991). Hamilton y col., (1991) mostraron que existe una interacción directa entre los canales de Ca^{2+} sensibles a las DHP y la proteína G_s , para ello, utilizaron la proteína-canal purificada de la membrana del túbulo transverso del músculo esquelético y la subunidad α de la proteína G_s , los elementos purificados fueron estudiados por reconstitución directa en una bícapa de lípidos y los resultados mostraron que la la proteína G incrementa la probabilidad de apertura de los canales sin modificar su conductancia. Los canales de Ca^{2+} del músculo cardíaco sensibles a las DHP también son modulados por proteínas G. El $\text{GTP}\gamma\text{S}$ incrementa la actividad de los canales de Ca^{2+} previamente estimulados con isoproterenol (un agonista de los receptores β -adrenérgicos) o con BAY K 8644 (un agonista de los receptores a las DHP), en

experimentos de reconstitución, el GTP γ S, la proteína G_s y la subunidad α s purificadas, incrementaron la probabilidad de apertura de los canales, dicho incremento se debió a un aumento en la frecuencia de apertura y a que los canales permanecieron más tiempo abiertos (Imoto y col., 1988; Yatani y col., 1987). Una serie de experimentos similares a los descritos para el músculo ha dado evidencias de que los canales de Ca²⁺ en neuronas y en células neurosecretoras son modulados por la proteína G_o, la proteína G más común en el cerebro y para la cual no se ha descrito una función. El efecto inhibitorio del péptido opioide D-alaD-leu-encefalina sobre las corrientes de calcio (I_{Ca}) en un híbrido celular de neuroblastoma-glioma es prevenido por la toxina pertussi y el GDP β S, el efecto inhibitorio es restablecido por la subunidad α de la proteína G_o y el GTP γ S (Hescheler y col., 1987); en neuronas del ganglio de la raíz dorsal el GABA y la noradrenalina disminuyen la amplitud de las I_{Ca} así como la duración de los potenciales de acción, el GTP γ S reproduce estos efectos, la toxina pertussi y el GDP β S bloquean las respuestas provocadas por el GABA, la noradrenalina y el GTP γ S (Holz y col., 1986; López y Brown, 1991; Pollo y col., 1991); la hormona liberadora de la hormona luteinizante y el GTP γ S reducen parcialmente la amplitud de la I_{Ca} y disminuyen la cinética de activación de las corrientes, en

neuronas del sistema nervioso simpático (Elmslie y col., 1990); la activación de receptores muscarínicos y la somatostatina en la células GH₃ producen un efecto inhibitorio sobre los canales de Ca²⁺, este efecto es mediado por dos subtipos de la proteína G_o, G_{o1} y G_{o2} respectivamente (Kleuss y col., 1991); la somatostatina reduce las I_{Ca} dependientes del voltaje y la concentración de Ca²⁺ libre citoplásmico, en una línea celular de la hipófisis (AtT-20/D16-16), igualmente, este efecto se observo en presencia de GTPγS, y la toxina pertussi evitó el efecto de somatostatina y del GTPγS (Lewis y col., 1986).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Será posible que los canales de potasio de la rectificación tardía en el músculo esquelético sean sujetos a un fenómeno de modulación, ya sea directamente a través de una proteína G, o vía segundos mensajeros?.

El antecedente inmediato que dio origen a este problema surge del trabajo de Hille y Campbell (1976), donde describieron el método del triple espacio de vaselina, desarrollado para registros

de corrientes y potenciales de membrana de fibras musculares esqueléticas. En sus experimentos, el compartimiento intracelular de la fibra muscular de *Rana pipiens* fue mantenido con soluciones que contenían F^- como el anión más importante. En los registros de potenciales de acción, la duración de estos, fue usualmente varias veces mayor que los potenciales de acción registrados por Adrian y col. (1970a), con el método de los microelectrodos. Durante los experimentos de fijación del voltaje, observaron que las corrientes de K^+ de la rectificación tardía estaban fuertemente disminuídas o ausentes. En experimentos posteriores, utilizando la misma técnica, Vergara y col. (1978), registraron potenciales de acción de duración y amplitud similares a los reportados por Adrian y col. (1970a), así mismo, cuando registraron las corrientes del rectificador tardío, estas estuvieron presentes y fueron de características similares a las registradas por Adrian y col. (1970a), Stanfield (1970), Beam y Donaldson (1983), etc., cuando en el compartimiento intracelular había aspartato como el anión principal en lugar de F^- .

La interacción del F^- con los canales de K^+ de la rectificación tardía también se ha estudiado en el axón de calamar. Cuando el glutamato de potasio fue sustituido por fluoruro de potasio (KF) en el lado intracelular, las corrientes del rectificador tardío

disminuyeron drásticamente y su activación fue muy lenta a cualquier potencial de membrana, estos efectos se presentan con un curso temporal lento, de 30 a 60 min (Chandler y Meves, 1970; Adams y Oxford, 1983), la recuperación de las corrientes se presenta cuando el F^- es eliminado del interior del axón (Adams y Oxford, 1983).

Con estas evidencias se pueden plantear por los menos dos interrogantes: ¿el sitio de acción del F^- es directamente sobre el canal iónico, de tal forma que esta interacción impida el flujo de K^+ a través de él?, o bien, ¿el F^- activará cierta molécula de tal manera que, esta molécula al ser modificada por el F^- pueda inhibir directa o indirectamente la actividad del canal?.

En una serie de trabajos realizados por diferentes investigadores (ver antecedentes), se ha llegado a la conclusión que el F^- al formar un complejo con el Al^{3+} es capaz de activar a las proteínas G. El AlF_4^- se une al GDP que se encuentra en la subunidad α de la proteína G, lo que permite que la proteína G se disocie en sus subunidades α y $\beta\gamma$ (Bigay y col., 1987), posteriormente la subunidad α activada, ejerce su acción sobre diversos efectores, entre los cuales se pueden encontrar canales iónico o enzimas (Bigay y col., 1987; Pffafinger y col., 1985; Roos y Gilman, 1980). ¿Es entonces la proteína G la responsable de la

inhibición de la corrientes del rectificador tardío en el músculo esquelético?. Un mecanismo probable sería que las proteínas G modificaran la actividad del canal directamente, es decir, sin la participación de segundos mensajeros, tal como se ha reportado para diferentes canales de K^+ en diferentes tejidos (Codina y col., 1987; Breitweieser y Szabo, 1985; Pffafinger y col., 1985; Yatani y col., 1988).

Otro posible mecanismo sería que la inhibición de los canales de la rectificación tardía se deba a una vía mediada por segundos mensajeros difusibles en el citoplasma, de una manera similar a como se ha descrito la modulación de los canales de Ca^{2+} en miocitos cardíacos (Reuter, 1983; Tsien, 1983; Trautwein y Hescheler, 1990)

HIPOTESIS

Las hipótesis de este trabajo de tesis fueron las siguientes:

a) si los canales de K^+ de la rectificación tardía del músculo esquelético son modulados por las proteínas G, sin la participación de segundos mensajeros, entonces al activar a estas proteínas, mediante la aplicación intracelular de GTP o cualquiera de sus

análogos, producirán una disminución o ausencia de las corrientes de K^+ y, b) ya que los efectos del fluoruro de aluminio sobre las proteínas G en una gran variedad de sistemas enzimáticos, se deben básicamente a su analogía estructural con el grupo fosfato (Bigay y col., 1987; Blackmore y col., 1985; Downs, Jr. y col., 1980; Hatta y col., 1986; Mockel y col., 1987; Ross y Gilman, 1980; Waldo y col., 1991; Yamazaki y col., 1987), puede esperarse que al aplicarlo por el lado citoplásmico de la membrana celular, tenga efectos similares a los producidos por GTP o sus análogos sobre las corrientes del rectificador tardío.

Por lo tanto, los objetivos fueron: 1) investigar si las proteínas G tienen un efecto directo sobre los canales de K^+ de la rectificación tardía, y 2) caracterizar dicho efecto sobre las corrientes que fluyen a través de un solo canal. Así, en el presente trabajo se estudia: a) la acción del fluoruro y del GTP γ S sobre las corrientes de K^+ de la rectificación tardía registradas a nivel unitario, y b) la acción del GDP β S sobre efectos producidos por el fluoruro y el GTP γ S.

METODO

PREPARACION BIOLOGICA

Los experimentos se realizaron en vesículas de la membrana plasmática de fibras musculares esqueléticas de rana adulta. Para la obtención de las vesículas se utilizó un procedimiento similar al descrito por Standen y col., en 1984. En el presente trabajo sólo se utilizó colagenasa, mientras que en el procedimiento original se emplea colagenasa y proteasa como tratamiento enzimático.

Las ranas que se emplearon fueron de la especie *Montezumae*, las cuales fueron sacrificadas mediante decapitación y destrucción de la médula espinal. El músculo semitendinoso fue disecado en solución de Ringer (Tabla 2, solución B), y, previo a la exposición

con la enzima, el músculo fue bañado con una solución en la que el Na^+ fue sustituido completamente por K^+ y el Ca^{++} por Mg^{++} (Tabla 2, solución C), la sustitución de la solución de Ringer por la solución de alto-K sin Ca^{++} fue lenta y progresiva. Cuando el músculo fue sumergido en la solución con la alta concentración de K^+ , la membrana celular se despolarizó y el músculo presentó una contractura que duró algunos segundos, para posteriormente tener una relajación completa y permanente (Hodking y Horowicz, 1960a y 1960b; Luttgau, 1963).

Debido a la exclusión total de Na^+ y a la alta concentración de KCl , en la solución extracelular, la membrana presenta una gran permeabilidad al K^+ . Mientras que el músculo presenta esta permeabilidad diferencial al K^+ y no al Na^+ , este es libremente permeable al Cl^- . El Cl^- entra a la célula en una relación casi equivalente al K^+ . El incremento en las concentraciones de K^+ y Cl^- intracelular promueve el flujo de agua hacia el mismo compartimiento, hasta que la osmolaridad es la misma en ambos espacios (intra y extracelular) (Boyle y Conway, 1941).

Al músculo relajado se le aplicó una ligera tensión y se expuso a colagenasa tipo IA, a una concentración de 50 unidades por mililitro (ml), por un período de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente (20 a 25 °C). Cuando gran parte del tejido conectivo que

rodea al músculo ha sido digerido, la colagenasa es eliminada mediante varios lavados con solución de alto-K sin Ca^{2+} (Tabla 2, solución C).

La formación de vesículas sucede durante y después del tratamiento con la enzima, esta inicia como evaginaciones de la membrana que posteriormente se desprenden, formando vesículas esféricas, las cuales carecen de invaginaciones y de inclusiones citoplásmicas, su potencial de membrana es muy cercano a cero milivoltios (Nichol y Hutter, 1996a y 1996b; Standen y col., 1984 y 1985). Escobar y Vergara, en 1993, demostraron que éstas vesículas provienen de la membrana del sistema tubular T. La membrana de las vesículas tiene la misma disposición que la membrana en el músculo, es decir, presenta una doble capa de lípidos con la cara externa expuesta a la solución del baño y la cara interna dirigida hacia el interior de la vesícula (comunicación personal del Dr. Julio Vergara; Nichol y Hutter, 1996a y 1996b). Las vesículas se colocaron en la cámara de registro, la cual contenía solución de alto-K sin Ca^{++} .

La cámara de registro está provista de cuatro compartimientos, denominados 1, 2, 3 y 4 (fig. 2). Cada uno de estos compartimientos fueron construídos con tubos de plástico (tygon) de 1.5 milímetros (mm) de diámetro, conectados en uno de sus extremos a una jeringa

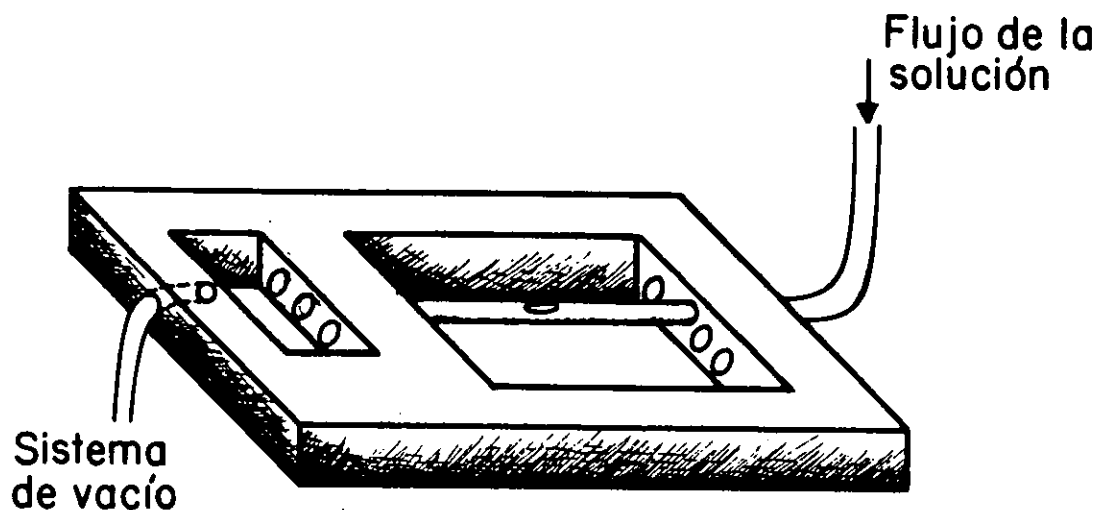


Fig. 2. Un sistema de flujo. El esquema muestra el arreglo de la cámara de registro que permitió la exposición de varias sustancias a la cara citoplásmica de la membrana celular. Un tubo de tygon con un hoyo es conectado de tal forma que la presión y la succión son aplicados en sus extremos. La velocidad del flujo de la solución fue de 1 ml por s.

de 5 ml, y el otro extremo a una fosa recolectora de la solución; los tubos tenían un orificio de 0.5 x 0.5 mm de dimensiones, en

donde se introducía la punta de la pipeta para exponer a la membrana a las diferentes soluciones de prueba durante el registro. El compartimiento 1 siempre contenía la solución de alto-K sin Ca^{++} ; el compartimiento 2 contenía soluciones de KF a diferentes concentraciones (Tabla 2, soluciones D, E, F, G y H); el compartimiento 3 contenía la solución de alto-K sin Ca^{++} más GTPyS o GTPyS y $\text{GDP}\beta\text{S}$; y, el compartimiento 4 contenía las solución de fluoruro (Tabla 2, soluciones, D,E,F,G Y H) más $\text{GDP}\beta\text{S}$.

METODO ELECTROFISIOLÓGICO

El método del "patch-clamp" descrito por Hamill y col. (1981) fue empleado para medir las corrientes que fluyen a través de los canales de K^+ . El principio del método es aislar eléctricamente una pequeña área de membrana del resto de la célula, mediante un sello de alta resistencia entre la membrana celular y una pipeta de vidrio llena de solución salina, y registrar el flujo de corriente en esa microárea de membrana. La resistencia del sello es del orden

de los gigaohmios ($G\Omega$). Si la microárea de membrana que se encuentra dentro de la punta de la pipeta (después de haberse realizado el sello) no es desprendida de la célula, la configuración de registro es la de unida a la célula ("on-cell"). La configuración de registro que se utilizó para la realización de los experimentos en este trabajo de tesis, fue la de "inside-out". Esta variante de registro consiste en desprender la membrana que permanece dentro de la punta de la pipeta del resto de la membrana celular, en nuestro caso de la membrana de la vesícula, lo que permite exponer la cara citoplásmica de la vesícula a la solución del baño, mientras que la cara extracelular es expuesta a la solución de la pipeta.

Es necesario el sello de alta resistencia por dos razones. Primero, mientras mayor sea la resistencia del sello, mayor será el aislamiento eléctrico de la membrana. Segundo, un sello de alta resistencia reduce el ruido del registro y permite una mejor resolución temporal de las corrientes iónicas.

El ruido que proviene del sistema de registro también es disminuído por un sello de alta resistencia. La varianza del ruido a través de una resistencia es relacionada al ruido de Johnson, dada por:

$$\sigma_i^2 = \frac{4kTB}{R} \quad (9)$$

donde k es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta, y B el ancho de banda (el ajuste del filtro pasabajas). En la situación de registro utilizada en el "patch-clamp", el ruido dependerá de todas las vías resistivas desde la entrada del amplificador hasta la tierra. De esta ecuación se observa claramente que, conforme incrementa la resistencia el nivel de ruido disminuye.

Un esquema de las características esenciales del amplificador utilizado en la punta de prueba del sistema de registro ("patch-clamp") se muestra en la figura 3. Básicamente, este amplificador es un transductor corriente-voltaje de alta ganancia, que en su lazo de retroalimentación tiene una resistencia (R_f) de 10 G Ω . El potencial dentro de la pipeta (V_{ref}) puede ser fijado a un nivel estable o, puede ser ajustado de una manera rápida mediante pulsos de voltaje. Una vez que se ha obtenido el sello, y en el amplificador se selecciona el modo de fijación de voltaje, al modificar el V_{ref} , se modificará el potencial de membrana, también llamado potencial de mantenimiento (v_h). Los pulsos de voltaje, generados desde una fuente externa ($V_{comando}$)

pueden cambiar el V_{ref} en una forma relativamente rápida y en "pasos" o "escalones".

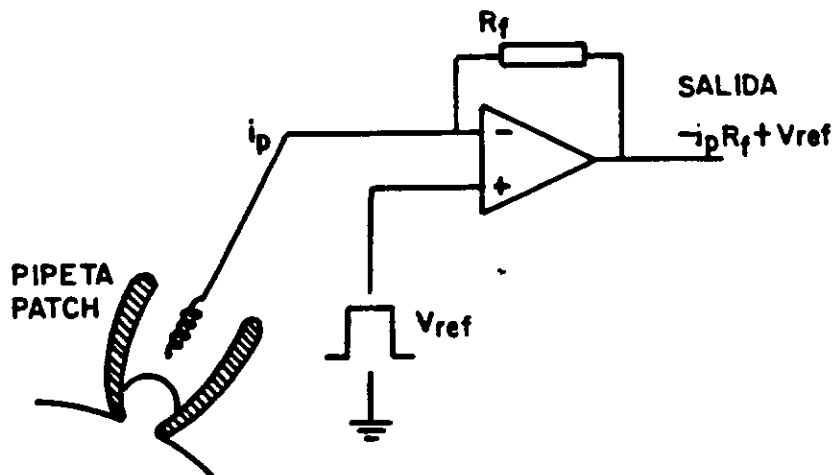


Fig. 3. Diagrama de la punta de prueba del transductor corriente-voltaje. La ganancia (V_o/i_p , mV/pA) es ajustada por la resistencia de retroalimentación R_f ,

$$V_o = - R_f * i_p + V_{ref}$$

V_{ref} está determinado por la suma del potencial de mantenimiento (V_h), del voltaje comando (V_{com}), y es restado desde la salida. El potencial dentro de la pipeta es igual a V_{ref} . [Modificado de Ogden y Stanfield, 1987]

Elaboración de las pipetas "patch"

Dado los sellos de alta resistencia entre la membrana de la vesícula y la pipeta de vidrio, pueden ocurrir algunas interacciones químicas entre ellos, ya que dependiendo del tipo de vidrio con el que se fabrican las pipetas, estos pueden liberar componentes solubles que modifiquen las propiedades cinéticas de los canales iónicos (Cota y Armstrong, 1988). La composición química del vidrio puede, por lo tanto, influir en la capacidad para formar los sellos. Otras consideraciones que se tomaron en cuenta para seleccionar el tipo de vidrio que se utilizó en este trabajo fueron: la facilidad de formar pipetas cuya punta tenga forma y dimensiones apropiadas, factores que influyen en el área de membrana aislada con la pipeta "patch" y, la facilidad con la que el nivel de ruido pueda reducirse.

Por consiguiente, en este trabajo se empleó vidrio duro para la fabricación de las pipetas, las ventajas que tiene sobre el vidrio blando son: a) las propiedades de sellado son mejores (Neher y Sakmann, 1983), b) el mayor espesor de sus paredes generalmente permite un mejor sellado y, el nivel de ruido es menor debido a la menor capacitancia del electrodo (Ogden y Stanfield, 1987).

La figura 4 ilustra el procedimiento utilizado para la

fabricación de las pipetas. Con un estirador vertical convencional, el capilar es estirado dos veces, en la primera tracción se aplicaron 19 amperios (A) de corriente alterna (AC), con lo cual el capilar es estirado aproximadamente 8 mm y su diámetro es reducida a casi 200 micrones (μm). El capilar es entonces recentrado con respecto a la resistencia del estirador y en la segunda tracción, en la que se inyectaron 12 A de AC, el capilar se divide en dos partes, obteniéndose dos pipetas en las que sus diámetros a nivel de la punta fueron de 1 μm aproximadamente.

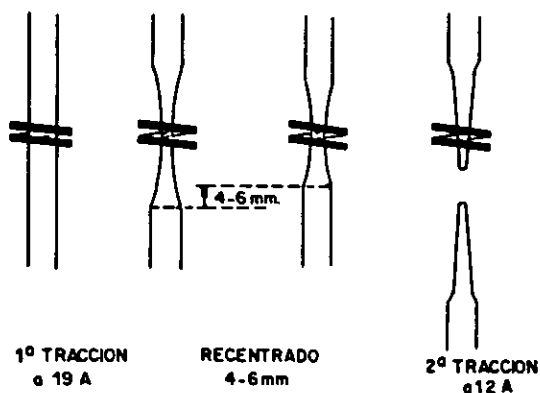


Fig. 4. Estiramiento de la pipeta "patch" en dos fases. [De Ogden y Stanfield, 1987].

Las pipetas fueron cubiertas cerca de su punta con una capa de resina inerte e hidrofóbica (Sylgard), la cual puede ser rápidamente curada con calor. La razón de cubrir la pipeta con Sylgard es reducir la capacitancia pipeta-baño. Gran parte de la capacitancia del electrodo se debe al mínimo espesor de la pared de la pipeta, que se encuentra entre las soluciones del baño y de la

pipeta. Por lo tanto, el recubrimiento con Sylgar incrementa el espesor de la pared de la pipeta y reduce el área de capacitancia, evitando que la solución del baño entre en contacto con la pipeta. Potencialmente, la fuente de ruido de alta frecuencia se produce a partir de una fina capa de solución que sube por la cara externa de la pared de una pipeta no recubierta con Sylgard.

El objetivo de disminuir la capacitancia de la pipeta es, disminuir el nivel de ruido, y disminuir la corriente capacitiva asociada con los pulsos de fijación.

Una vez que las pipetas han pasado por el tratamiento con Sylgar, son finamente pulidas en su punta, aplicando calor con una microforja. El calor es aplicado con una fuente de AC a través de una resistencia de iridio-platino recubierta de vidrio. Después de ser llenadas con solución salina, su resistencia fue de 5 a 10 M Ω .

Formación de los sellos de alta resistencia

Hamill y col. (1981) observaron que los sellos entre la pipeta y la membrana celular con resistencias de 10 a 100 G Ω se obtienen, cuando se toma la precaución de mantener limpia la punta de la

pipeta . Las precauciones principales son: (a) el uso de soluciones filtradas, tanto la del baño como la de la pipeta, (b) utilizar una pipeta nueva para cada sello, y (c) aplicar presión positiva siempre que la pipeta atraviese una interface aire-agua y mantener la presión hasta que la punta de la pipeta haga contacto con la membrana celular. La corriente se ajustó a cero modificando manualmente el V_{ref} con el control V_{null} o mediante el modo de búsqueda ("search") del amplificador. El contacto con la membrana de la vesícula es indicado por un incremento en la resistencia de la pipeta. Los sellos en el rango de los $G\Omega$ (gigasellos), fueron formados aplicando una ligera succión (presión negativa), hasta que el sello en el rango de los $G\Omega$ se ha formado. Una vez obtenido el gigasello, la membrana que queda libre dentro de la punta de la pipeta es desprendida del resto de la membrana de la vesícula, al levantar rápidamente la pipeta. Con esta maniobra obtuvimos la configuración de registro de "inside-out", en donde la cara citoplásmica es expuesta a la solución del baño y, la superficie externa de la membrana es expuesta a la solución de la pipeta. En algunos casos al levantar la pipeta, para entrar a la configuración de "inside-out", se formaba una microesfera de membrana en la punta de la pipeta. Mediante la exposición de la microesfera a una

interface aire/agua, se conseguía romperla y entrar a la configuración de "inside-out".

La razón de emplear esta configuración de registro fue que, nos permitió estudiar la modulación de los canales de K^+ , aplicando directamente las diferentes sustancias a la cara citoplásmica de la membrana de la vesícula.

Soluciones de registro

La tabla 2 muestra la composición de las soluciones de registro. Las soluciones fueron diseñadas para registrar las corrientes de K^+ de la rectificación tardía. Así, las soluciones que se emplearon en el baño contuvieron ATP para bloquear los canales de potasio sensibles a ATP; cero Ca^{++} y etilen glicol-bis (β -aminoetileter) N, N, N', N'-ácido tetraacético (EGTA), como quelante de Ca^{++} , para evitar la activación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{++} ; los aniones utilizados fueron el Cl^- y el F^- , la concentración total de los aniones intracelulares siempre fue igual a 122 mM. Cuando la solución extracelular contenía Na^+ , se agregó tetrodotoxina (TTX) para bloquear los canales de sodio.

Tabla 2. Composición de las soluciones (mM)

	Na ⁺	K ⁺	F ⁻	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	TEA ⁺	Cl ⁻	EGTA	ATP
SOLUCIONES DE LA PIPETA									
A	-	120	-	2	-	-	122	-	-
B	117.5	2.5	-	2	-	-	122	-	-
SOLUCIONES DEL BAÑO									
C	-	120	-	-	2	-	122	5	2
D	-	120	120	-	2	-	2	5	2
E	-	120	60	-	2	-	62	5	2
F	-	120	30	-	2	-	92	5	2
G	-	120	15	-	2	-	107	5	2
H	-	120	7.5	-	2	-	114.5	5	2
I	30	90	-	-	2	-	122	5	2
J	-	90	-	-	2	30	122	5	2

pH = 7.2 (HEPES)

La solución B contenía además tetrodotoxina (6 μ M)

La solución C, dependiendo de la situación experimental, contenía además GTP γ S (100 o 500 mM)

o GTP γ S (100 mM) + GDP β S (500 mM).

La solución G, dependiendo de la situación experimental, contenía además GDP β S (500 mM)

Todos los experimentos en estado estacionario fueron realizados a 14-15 °C; los experimentos con pulsos fueron hechos a temperatura ambiente, excepto cuando se registraron los canales de K⁺ sensibles a ATP.

Captura y análisis de los datos.

Los objetivos del análisis son medir a) la (s) amplitud (es) de la (s) corriente (s) que fluye (n) a través de un sólo canal, b) la duración de los períodos de cierre y de apertura, y c) el orden en el que ocurren los eventos. Las amplitudes son frecuentemente (aunque no siempre) muy cercanas a una constante de una apertura a la siguiente. Sin embargo, debido a que se observa una sola molécula, la duración de los eventos, y el orden en el que ocurren, son variables aleatorias; la información contenida en ellos se desprende de las mediciones de sus distribuciones.

1. Objetivos del análisis. Normalmente los datos pueden ser bien representados como una serie de transiciones rectangulares entre estados discretos de conductancia. El objetivo inmediato del análisis es obtener una versión idealizada del registro experimental que sea muy similar, tan cercano como sea posible, a lo que se debería de observar si el experimento estuviera libre de ruido y de artefactos. El resultado será una serie de intervalos de tiempo, cada uno asociado con la amplitud de la corriente durante ese intervalo, en el orden en el cual están sucediendo los eventos. Los períodos de cierre y de apertura no necesariamente son alternantes; aperturas sucesivas pueden ocurrir si hay estados de

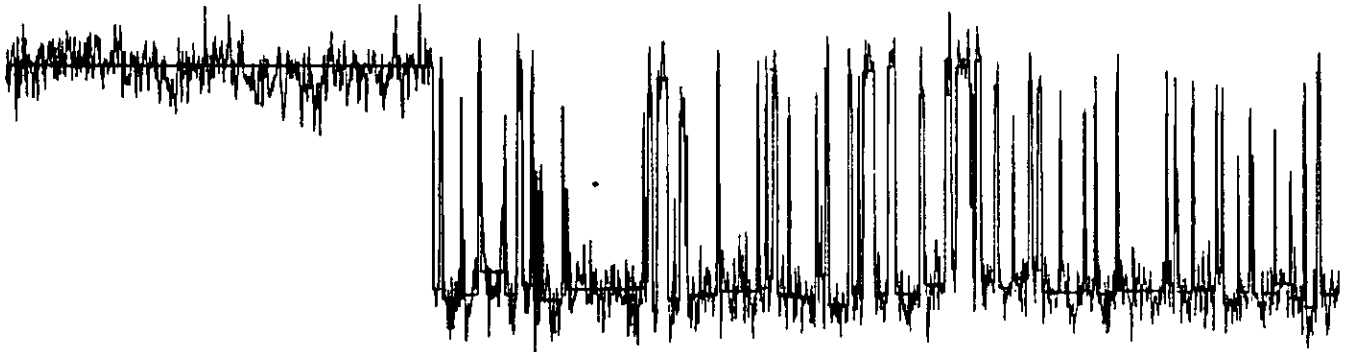
subconductancias, o si más de un canal se abre simultáneamente. Los registros en los que dos o más canales se abren simultáneamente son útiles para estudiar la independencia de la apertura de los canales, sin embargo, esos registros no serán útiles para medir la distribución de los tiempos de cierre o de apertura.

2. Captura y análisis de los datos. La señal analógica fue amplificada a 0.1-0.2 V/pA y posteriormente filtrada a 2 kHz por un filtro pasabajos de 8 polos (Bessel). Los registros de las corrientes iónicas fueron digitalizadas a una velocidad de muestreo de 100 μ s por punto, con la ayuda de un convertidor A/D y D/A (Labmaster TM-100) controlado por una microcomputadora personal AT (Gateway 2000 386-33 Mhz), y posteriormente escritos en el disco duro de la microcomputadora. Para los experimentos en estado estacionario se utilizó un sistema de videograbación (el cual cuenta con un procesador digital de 16 bits de resolución) donde los registros fueron grabados, para después ser capturados en la computadora y almacenados en el disco duro. En los registros en donde se aplicaron pulsos de voltaje, los pulsos fueron generados con la ayuda de la microcomputadora y a través del convertidor A/D entraron al amplificador de "patch clamp". Las corrientes de fuga y capacitiva fueron restadas analógicamente y digitalmente. La resta

digital se realizó promediando registros en los que no había corrientes iónicas, posteriormente este promedio se restó a cada uno de los registros en los que si existió la presencia de corrientes. En la captura y análisis utilizamos el paquete de software pClamp; para la resta digital utilizamos un programa desarrollado por el Lic. en Matemáticas Arturo Aldana Becerra; y para el ajuste de las corrientes promediadas, así como la presentación gráfica de los datos el programa de Sigmaplot.

La distribución de los valores de las corrientes digitalizadas pueden ser graficadas como histogramas. Las amplitudes, tiempos de cierre y de apertura de las corrientes fueron analizadas mediante histogramas. Para medir las transiciones de un nivel de corriente a otro, se ajustaron líneas horizontales sobre los niveles de corriente (fig. 5), de esta manera se detectó el cambio de niveles, así como la duración de los eventos de cierre y de apertura. Un punto importante es mantener las líneas en las posiciones correctas, lo que se consiguió ajustando manualmente la posición de las líneas sobre los niveles de corriente. Para considerar un evento como de apertura o de cierre, se utilizó el método de cruzar el umbral, que consiste en atravesar el 50% de un nivel de conductancia a otro. Con este método se obtiene una estimación de la duración para cada período en que el canal está abierto o

cerrado.



"E"	"NI" "ms"	"D" "ms"	"N"	"A" "pA"	"D.S" "pA"	"B" "pA"	Notas
1	0	0.800	0	-1.074	0.367	-3.271	" "
1	0.800	0	1	-0.049	0.367	-3.271	"S"
1	0.800	175.300	0	-0.629	0.415	-3.320	" "
1	176.100	0.100	1	0.830	0.415	-3.320	"S"
8	176.200	1261.500	0	-0.626	0.410	-3.369	" "
8	1438.401	0.100	1	1.660	0.410	-3.369	"S"
8	1438.500	0	0	0.732	0.410	-4.053	"S"
8	1438.500	0.100	1	0.732	0.410	-4.053	"S"
8	1438.600	1.200	0	0.062	0.432	-4.053	" "
8	1439.801	3.000	1	1.394	0.334	-4.053	" "
8	1442.801	0.100	0	0.635	0.334	-4.053	"S"
8	1442.901	1.100	1	1.558	0.311	-4.053	" "
8	1444.000	0.100	0	0.635	0.311	-4.053	"S"
8	1444.100	0.500	1	1.392	0.266	-4.053	" "
8	1444.600	0.100	0	0.635	0.266	-4.053	"S"
8	1444.700	1.400	1	1.330	0.411	-4.053	" "
8	1446.100	0.700	0	-0.090	0.306	-4.053	" "
8	1446.801	1.500	1	1.308	0.392	-4.053	" "
8	1448.301	0.100	0	0.635	0.392	-4.053	"S"
8	1448.401	0.900	1	1.324	0.318	-4.053	" "
8	1449.301	0.100	0	0.635	0.318	-4.053	"S"
8	1449.401	0.300	1	1.465	0.691	-4.053	" "
8	1449.700	0.100	0	0.635	0.691	-4.053	"S"
8	1449.801	1.300	1	1.347	0.511	-4.053	" "
8	1451.100	0.100	0	0.635	0.511	-4.053	"S"
8	1451.200	1.000	1	1.270	0.322	-4.053	" "

"E": Episodio "NI": Nivel inicial "D": Duración
 "N": Nivel "A": Amplitud "D.S.": Desviación estándar
 "B": Línea basal

Fig. 5. Mediciones de los intervalos entre las transiciones. Registro de canales de potasio, a nivel de un sólo canal, a un potencial de mantenimiento de -80 mV. Dos líneas horizontales marcan -de arriba hacia abajo- los niveles de cerrado y de abierto de los canales respectivamente. El tiempo al cual ocurre la transición de un estado a otro fue estimado utilizando el método del umbral al 50%. Las columnas, abajo del registro, muestran la relación entre el tiempo de permanencia en uno u otro estado y la amplitud de estos. Los datos se obtuvieron con la subrutina "lista de eventos" del paquete de programas de pClamp (Axon Instrument). Ver pág. 65.

Dado que las aperturas de los canales son eventos aleatorios, las amplitudes varían de un evento a otro alrededor de un promedio, por lo que las amplitudes se estimaron promediando los puntos en el nivel de cierre, y los puntos en el nivel de apertura. Las amplitudes así encontradas, se graficaron como histogramas y, dada su distribución, se ajustaron a una función Gaussiana (fig. 6).

Los tiempos de aperturas y cierres de los canales se definieron como una excursión del 50% de la diferencia entre la línea basal y el nivel de apertura. Los histogramas de tiempos de apertura y de cierre fueron ajustados a funciones exponenciales. Todos los ajustes fueron hechos con el método no lineal de los mínimos cuadrados. Los valores numéricos son expresados como el promedio \pm error estándar.

RESULTADOS

CARACTERIZACION DE UN CANAL SELECTIVO A POTASIO: REGISTRO A NIVEL DE UN SOLO CANAL

Las corrientes unitarias registradas de canales selectivos a Cl^- son ilustradas en la figura 6, en este experimento las soluciones de la pipeta (solución A, Tabla 2) y del baño (solución C, Tabla 2) contenía 120 mM de KCl. Los canales fueron activados a diferentes potenciales de mantenimiento. Las corrientes cambian rápidamente desde la línea de base a los diferentes niveles de apertura, las cuales son entrantes en este caso. Los canales son selectivos a Cl^- , pues la corriente es igual a cero pA cuando el potencial de membrana es de cero mV a la misma concentración de cloruros a ambos lados de la membrana. Estas corrientes no se presentaron cuando los cloruros, a ambos lados de la membrana, fueron reemplazados completamente por el anión impermeable ácido

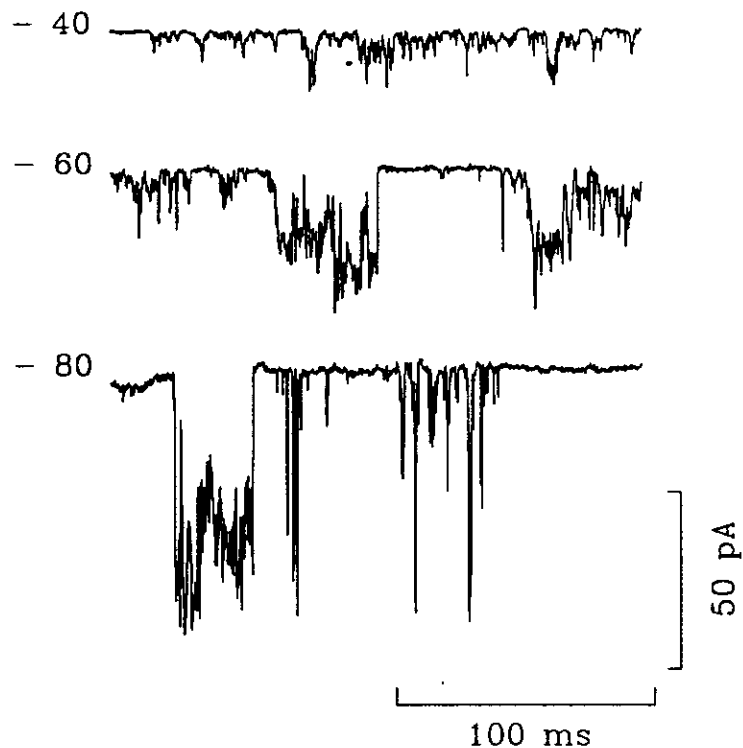


Fig. 6. Corrientes unitarias registradas de un parche de membrana de una vesícula del sarcolema de músculo esquelético de rana, en la configuración de "inside-out". Los canales fueron selectivos a Cl^- presentando cinéticas rápidas y lenta. Los potenciales de membrana (a la izquierda de cada trazo) señalan el estado cerrado de los canales, así que las corrientes entrantes son gráficas hacia abajo. Los registros presentan más de 7 niveles de conductancias.

metanosulfónico. Por alguna razón, que no exploramos, la estabilidad de lo sellos fue considerablemente menor cuando los registros fueron realizados en presencia del ácido metanosulfónico.

La duración del sello fue de apenas algunos segundos en aproximadamente el 93% de los experimentos que se realizaron en presencia de este anión, por lo que todos los registros que conforman esta tesis fueron realizados en presencia de cloruros a ambos lados de la membrana. Dadas las condiciones iónicas, cuando las membranas contenían canales de K^+ y de Cl^- , las corrientes iónicas de K^+ y de Cl^- se registraron simultáneamente. Sin embargo, sólo estudiamos aquellos registros en los que únicamente existieron corrientes de K^+ .

La figura 7 muestra segmentos de registros (200 ms) de corrientes iónicas a nivel unitario de una microárea de membrana fijada a diferentes potenciales de mantenimiento. En esta serie de experimentos, los registros fueron realizados en el estado estacionario durante por lo menos un minuto en cada potencial de membrana explorado. Las corrientes fueron medidas en presencia de concentraciones simétricas de KCl (120 mM) (a menos que se indiquen otras concentraciones de KCl) y en la solución del baño había 2 mM de ATP- Na_2 y cero Ca^{++} . Las corrientes presentan transiciones casi instantáneas desde el estado cerrado al nivel de apertura, las cuales son salientes a potenciales de membrana positivos y entrantes a potenciales negativos. La membrana contenía por lo menos dos canales del mismo tipo, identificados por los dos niveles

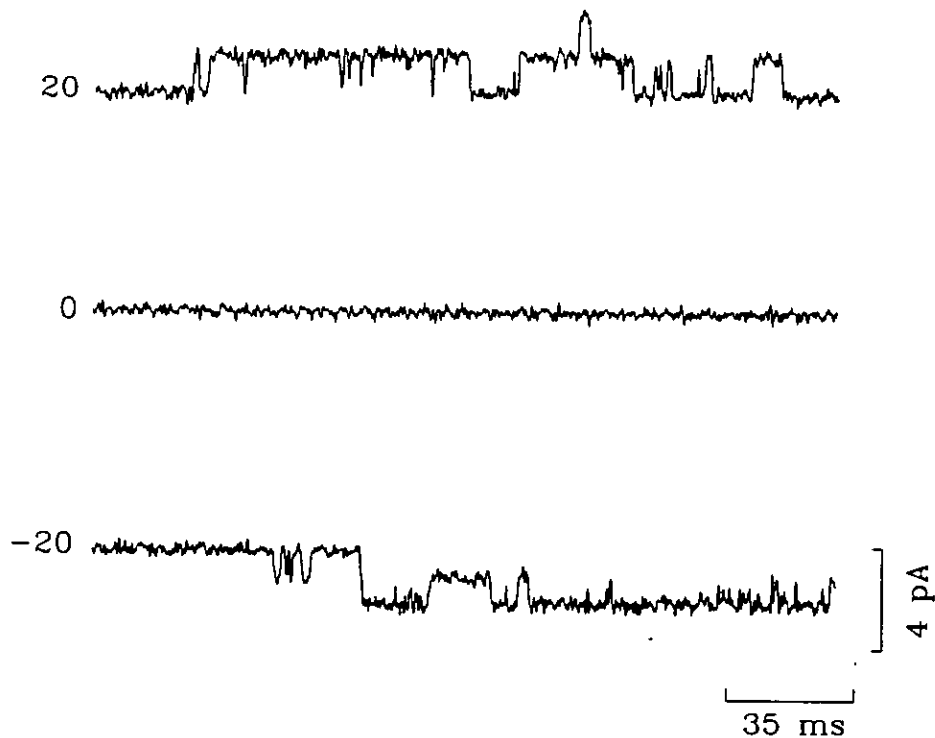


Fig. 7. Corrientes unitarias registradas de canales selectivos a K^+ . Los registros fueron hechos usando soluciones simétricas de KCl. Los potenciales de membrana (a la izquierda de cada trazo) indican el estado cerrado de los canales, de tal forma que las corrientes salientes son gráficas hacia arriba y las corrientes entrantes son gráficas hacia abajo. El número máximo de aperturas simultáneas observadas en este parche fueron 2. Los registros fueron realizados exponiendo la cara citoplásmica de la membrana a una solución con 2 mM de ATP. Los datos fueron almacenados con un sistema de videograbación, filtrados a 2 kHz y digitalizados a 10 kHz. La resistencia del sello = 40 $G\Omega$.

de apertura (el segundo nivel es múltiplo del primero). El

potencial de inversión se encontró a cero mV, igual al potencial de equilibrio del K^+ (E_K), lo cual concuerda con que el canal es selectivo a K^+ . La conductancia cuerd a +20 mV fue de 51 pS. No obstante, ya que el potencial de inversión del Cl^- también es de cero mV, existe la posibilidad de que estas corrientes sean llevadas por Cl^- y no por K^+ . Para identificar la naturaleza de estas corrientes, en otros experimentos, utilizamos soluciones asimétricas de K^+ , mientras que los Cl^- fueron mantenidos a la misma concentración a ambos lados de la membrana. Bajo estas condiciones iónicas (la solución de la pipeta contenía 2.5 mM de K^+ y 6 μ M de TTX para bloquear los canales de Na^+ ; 120 mM de K^+ en la solución del baño), las corrientes iónicas registradas siempre fueron salientes a potenciales de -80 a +80 mV (Fig. 8). A potenciales por debajo de -80 mV nunca se registro la actividad de los canales. Ya que no es posible medir directamente el potencial de inversión en esta solución con baja concentración de K^+ , el potencial de inversión extrapolado fue de -92 mV, muy similar al E_K (Fig. 10), lo cual apoya fuertemente que estas corrientes son de K^+ . En la figura 8, también se puede apreciar que existen corrientes salientes a cero mV, lo que es de esperarse de canales selectivos a K^+ y no de canales selectivos a Cl^- . Otro argumento que utilizamos

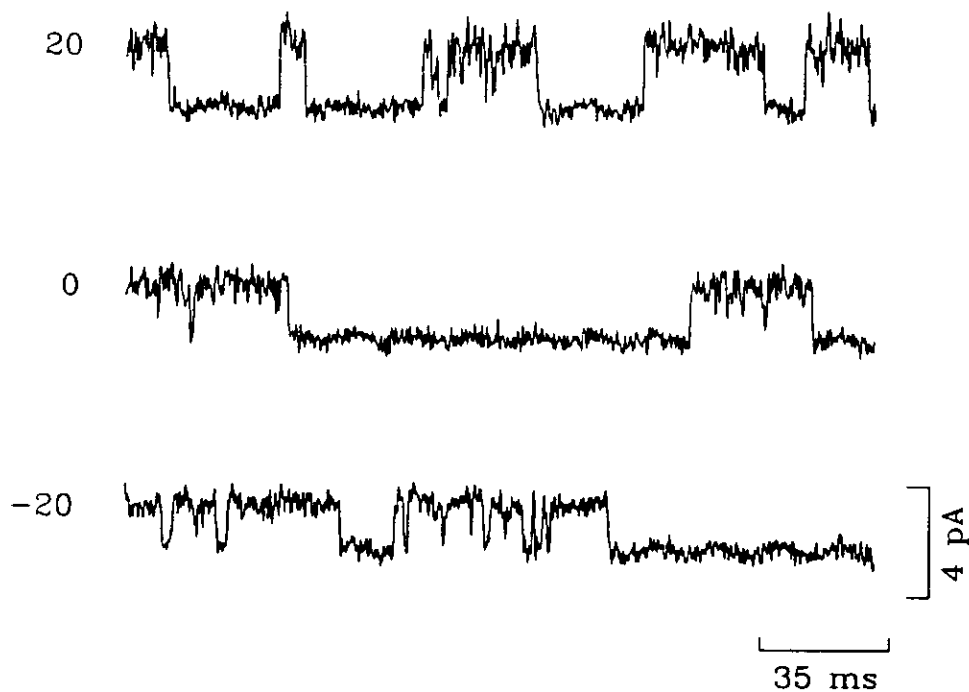


Fig. 8. Corrientes unitarias de canales de K^+ registradas a diferentes potenciales de membrana. Cada trazo representa un segmento de registro continuo, los cuales fueron hechos en presencia de 2.5 mM y 120 mM de KCl en las soluciones de la pipeta y del baño respectivamente. Todas las corrientes son salientes. Filtro a 2 kHz, velocidad de muestreo 10 kHz. Resistencia del sello = 80 G Ω .

para identificar que estas corrientes fluyen a través de canales de K^+ , es que las conductancias fueron a +40 mV de 18 y de 60

picosiemens (pS) en soluciones simétricas y asimétricas respectivamente, muy semejantes a lo que se ha reportado para el canal de K^+ de la rectificación tardía en el músculo esquelético, bajo condiciones iónicas similares (Standen y col., 1985). Por otro lado, los canales que identificamos como de Cl^- , a +40 mV, tienen conductancias que varían en un amplio margen, desde 17 a 250 pS y probablemente existen 5 o más niveles de conductancia para un sólo canal (Blatz y Magleby, 1989).

La figura 9 muestra un histograma de las amplitudes de 3000 eventos a un potencial de membrana de +40 mV, el registro se realizó en soluciones isotónicas de KCl. Claramente se observa un pico centrado aproximadamente a 2.5 pA. El histograma fue ajustado a una distribución Gaussiana (línea continua). La corriente unitaria estimada del ajuste fue de 2.39 pA con una desviación estándar de 0.43 pA. De esta forma se obtuvieron las amplitudes de las corrientes a diferentes potenciales de membrana. Con el valor obtenido del ajuste de las amplitudes se construyeron las relaciones corriente-voltaje a dos diferentes concentraciones de K^+ , que se muestran en la figura 10. La amplitud de la corriente fue disminuyendo conforme el potencial de la membrana se fue aproximando al E_K , resulta obvio entonces que, tanto el potencial de inversión como la conductancia cambiaron conforme se modificó la

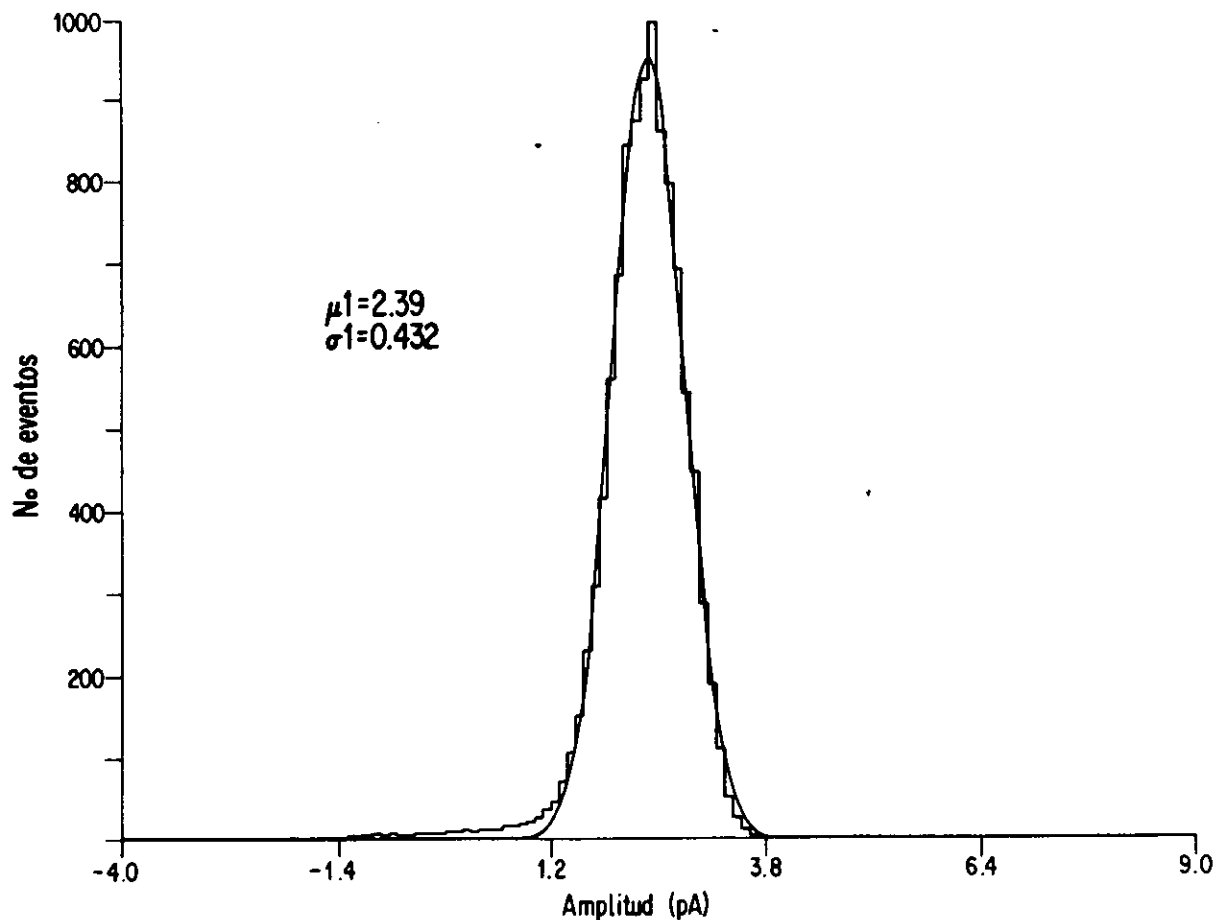


Fig. 9. Histograma de las amplitudes de la corriente de un registro en el estado estacionario a un potencial de membrana de +40 mV. Del mismo parche que la fig. 7. La duración total del registro fue de 2 min. La línea continúa es una distribución Gaussiana ajustada por el método no lineal de los mínimos cuadrados. Los parámetros (promedio, desviación estándar) fueron: 2.39, 0.432 pA.

concentración extracelular de K^+ . La conductancia pendiente obtenida mediante una regresión lineal, en soluciones asimétricas (círculos llenos) es de 19.3 pS y en soluciones simétricas (círculos vacíos) es de 56.5 pS. Es importante señalar que ambas

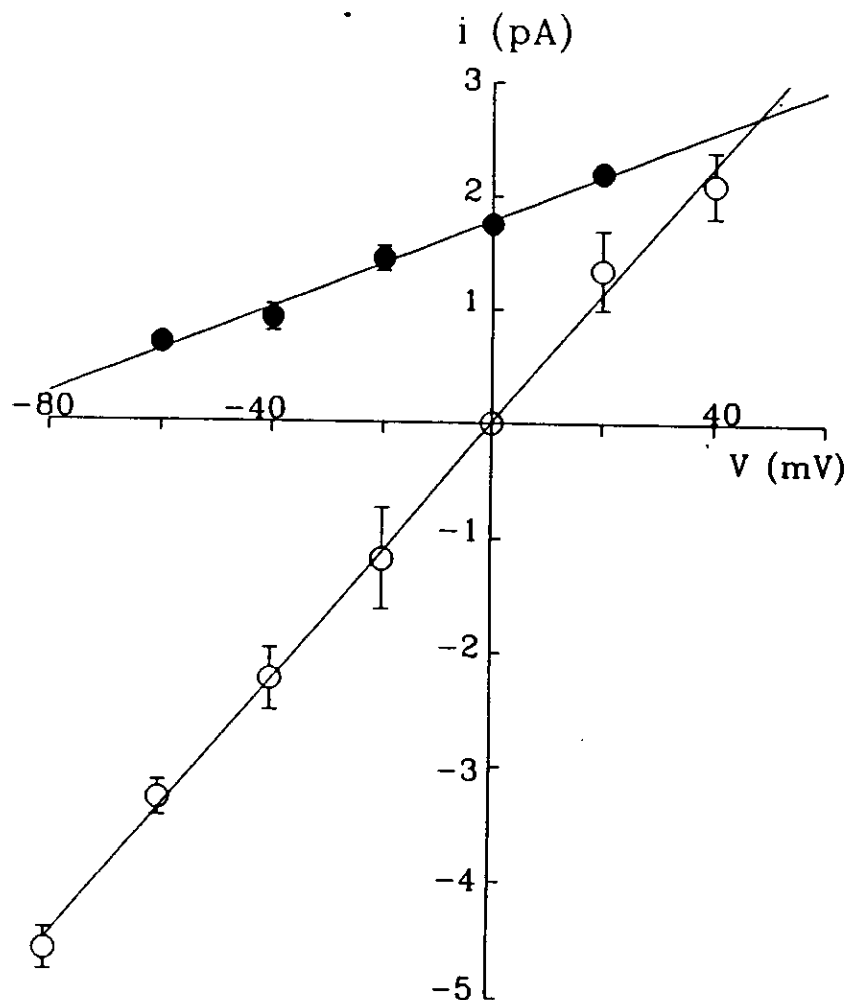


Fig. 10. Relación corriente-voltaje del promedio de la amplitud de la corriente unitaria. Cada símbolo representa el promedio \pm E.S. de 4-7 experimentos. (●) , 2.5 mM y (○) , 120 mM de K⁺ en la solución de la pipeta. La línea recta tiene una pendiente de 56.5 (●) pS y 19.3 pS (○). La ausencia de la barra del error indica que el error estándar fue dos veces más pequeño que el tamaño del símbolo.

curvas presentan un comportamiento lineal, lo cual es diferente a la caracterización del rectificador tardío a nivel unitario en el músculo esquelético de la rana (Standen y col., 1984).

En todos los experimentos, la actividad de los canales se observó casi inmediatamente después de haber realizado el sello. La probabilidad de apertura (P_o) fue prácticamente la misma cuando la membrana registrada permaneció unida a la vesícula (P_o de 0.292 ± 0.04), que cuando fue separada de la misma (P_o de 0.300 ± 0.011), en una serie de cinco experimentos.

Efecto del tetraetilamonio (TEA). Todos los canales de K^+ son bloqueados por el TEA^+ , ya sea que se aplique por el lado intra o extracelular, o bien cuando se aplica por ambos lados. No obstante, la concentración bloqueante varía en diferentes ordenes de magnitud para los diferentes tipos de canales y aún para el mismo tipo, como en el caso de los diferentes subtipos del rectificador tardío (Hille, 1992). La figura 11 muestra varios segmentos del mismo registro a diferentes tiempos y situaciones experimentales, en la que se ilustra el efecto de 10 mM de TEA^+ aplicada por el lado citoplásmico a una microárea de membrana, fijada a un potencial de -80 mV. En esta serie de experimentos, la solución del baño en el

registro control fue modificada de tal forma que contenía 110 mM de KCl y 10 mM de NaCl (los demás constituyentes fueron iguales a la sol. C de la Tabla 2) y cuando se aplicó TEA⁺, el Na⁺ fue sustituido por TEA⁺ a la misma concentración. En este caso, el TEA⁺ disminuyó la Po en el 57.2% a los 5 minutos (Fig. 11B) y a los 10 minutos a 98.5% (Fig. 11C) respecto al registro control (Fig. 11A). El valor promedio de la Po en las condiciones testigo, fue de 0.262 ± 0.02 (n=6); en presencia de TEA⁺ hubo una reducción del 48% a los 5 minutos y de 88% a los 10 minutos. Esta disminución parece cambiar poco con el potencial de membrana, siendo del 42% y del 90% a los 5 y 10 minutos respectivamente a -40 mV (n=4). A esta concentración, el bloqueo es suficientemente lento, de tal manera que las interrupciones de las aperturas son claramente resueltas y las corrientes unitarias no son reducidas en su amplitud, a diferencia del bloqueo reportado por Standen y col. (1985) para el rectificador tardío, ellos observan una disminución en la amplitud de la corriente sin que se modifique la Po.

Estas corrientes pueden estar fluyendo a través de los canales de potasio de la rectificación tardía, los cuales son responsables de la fase de repolarización del potencial de acción en el músculo esquelético (Adrian, Chandler y Hodgkin, 1970a y 1970b; Stanfield,



Fig. 11. Efecto del TEA aplicado por la cara intracelular. (A), segmento de 200 ms de un registro en estado estacionario en ausencia de TEA de un parche que contenía 2 canales. La $[K^+]_i$ fue 110 mM y el potencial de membrana fue -80 mV. Dos niveles de apertura (señalados con puntas de flecha) pueden observarse en este segmento de registro. (B), registro del mismo parche como en A, 5 min. después de que la membrana fue movida hacía una solución que contenía 10 mM de TEA. En este segmento no se observan aperturas simultáneas de dos canales. (C), registro del mismo parche como en A y B, 10 min. después de la exposición a TEA. La P_o medida fue prácticamente de cero. La duración total de registro antes de aplicar el TEA (A) fue de 45 min. y en presencia de TEA (A y B) de 40 min.

1970) por las siguientes razones. Primero, ellos son claramente

canales de potasio, el potencial de inversión de las corrientes varía con la concentración externa de K^+ , tal como se ha reportado por Standen y col. (1984 y 1985). Segundo, la solución del baño contenía ATP y cero calcio, por consiguiente las corrientes generadas a través de los canales sensibles a ATP y activados por calcio fueron descartadas. Tercero, las curvas corriente-voltaje no muestran ninguna rectificación a potenciales despolarizantes a pesar de que en la solución del baño contenía 2 mM de Mg^{++} , por lo tanto no se puede tratar del canal de K^+ de la rectificación entrante. Por estas razones pensamos que las corrientes de K^+ pueden estar fluyendo a través del rectificador tardío. Sin embargo, dado que el rectificador tardío es una canal dependiente del voltaje y que hasta este momento no caracterizamos al canal con la aplicación de pulsos de voltaje, por lo tanto no reconstruimos las corrientes macroscópicas a partir de las corrientes unitarias; que la curva corriente-voltaje fue lineal en las dos concentraciones de K^+ extracelular empleadas; y, que el bloque por TEA⁺ también es diferente respecto a la caracterización del rectificador tardío a nivel unitario (Standen y col., 1984 y 1985), los criterios que utilizamos para suponer que las corrientes fluyen a través del rectificador tardío son puramente de exclusión.

Efecto intracelular del fluoruro sobre los canales de K

El efecto de diferentes concentraciones de F^- , sobre los canales de K^+ , fue estudiado mediante la exposición de la cara citoplásmica de la membrana a una serie de concentraciones de este anión (soluciones D, E, F, G, y H, Tabla 2). La solución de la pipeta siempre contuvo 120 mM de K^+ . La probabilidad de apertura es expresada como la duración promedio de apertura en función del tiempo total del registro, calculada antes y después de la exposición al F^- .

La figura 12 muestra el efecto del F^- medido en el mismo experimento, el potencial de membrana fue de -80 mV. La parte A muestra el registro testigo, la parte B en presencia de 15 mM de F^- y la parte C después del lavado del F^- . En el registro testigo se observan períodos de intensa actividad, seguidos de períodos silentes, así también, se presentan aperturas simultáneas de por lo menos dos canales iónicos de la misma clase. La conductancia cuerda fue de 55.8 pS. En presencia de F^- existe una clara disminución en la actividad de los canales y, en ningún momento se observan dobles aperturas. Este fenómeno se puede deber, por lo menos, a dos posibilidades: a) que el efecto que ejerce el F^- sobre los canales sea una disminución en la frecuencia con la cual se abren los

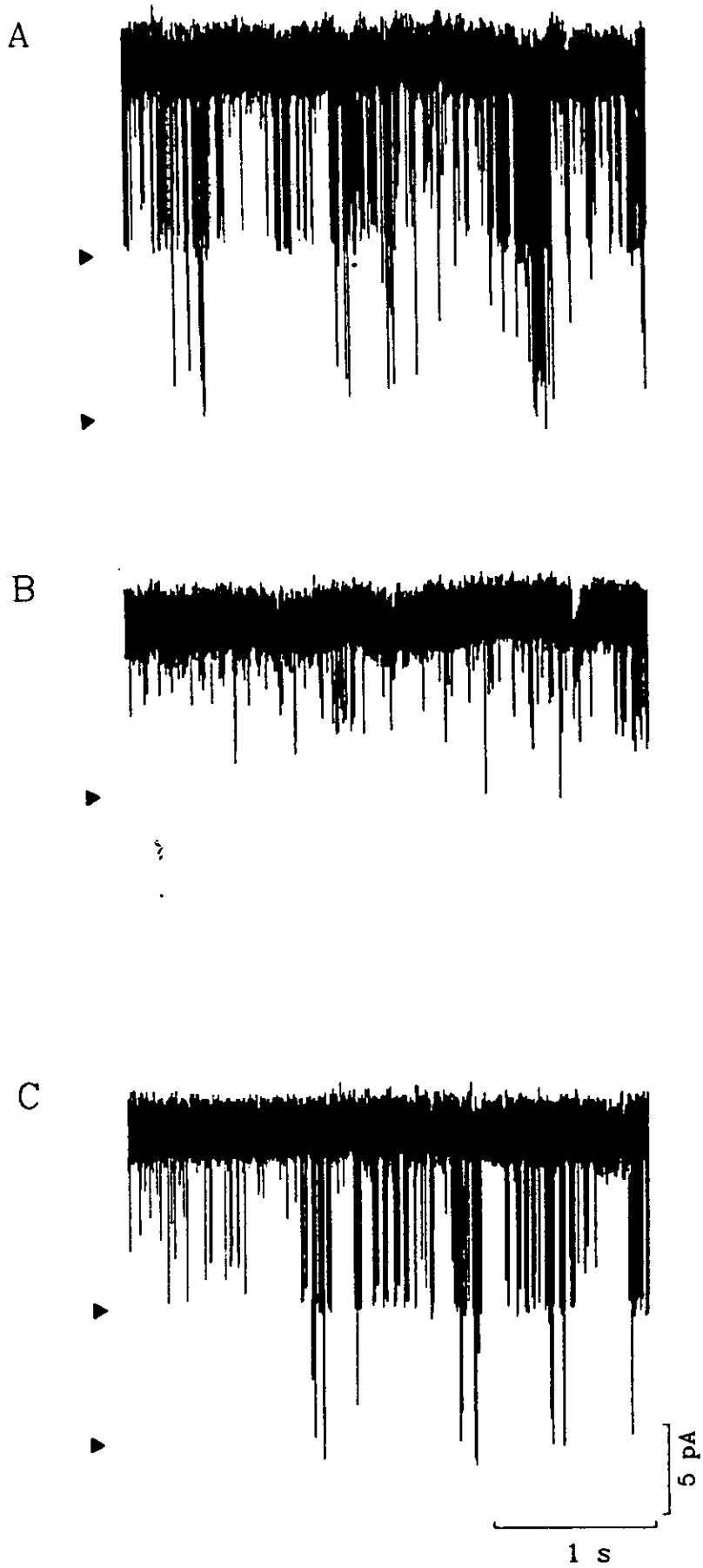


Fig. 12. Efecto del F^- sobre los canales de K^+ . Los registros muestran las corrientes de membrana a un potencial de -80 mV. (A), en soluciones simétricas de KCl. (B), en presencia de 15 mM de F^- en la solución del baño. (C), después del regreso a las condiciones control. Mismo parche de membrana a través de todo el experimento. Ver pág. 81.

canales iónicos y, por tanto, una disminución en la frecuencia con la que se presentan las corrientes iónicas y, b) que el efecto sea un bloqueo del canal de tal forma que disminuya la amplitud de la corriente hasta el punto en que las corrientes no sean distinguibles del ruido de fondo, y de esta manera el efecto sea interpretado como una disminución en la frecuencia de aparición de las corrientes. El efecto es completamente reversible como se ilustra en la Fig. 12 C, observándose nuevamente períodos de gran actividad seguidos de períodos silenciosos.

Para discernir entre los dos posibles efectos del F^- , realizamos los siguiente análisis que se muestran a continuación. El primero consistió en medir la amplitud y duración de los estados de conductancia de los canales, con lo que se pueden observar claramente los niveles de apertura uno y dos (que corresponden a por lo menos dos canales presentes en la membrana), y el nivel cero, que corresponde al estado cerrado de los canales. La figura 13 muestra dos gráficas, del mismo experimento mostrado en la Fig.

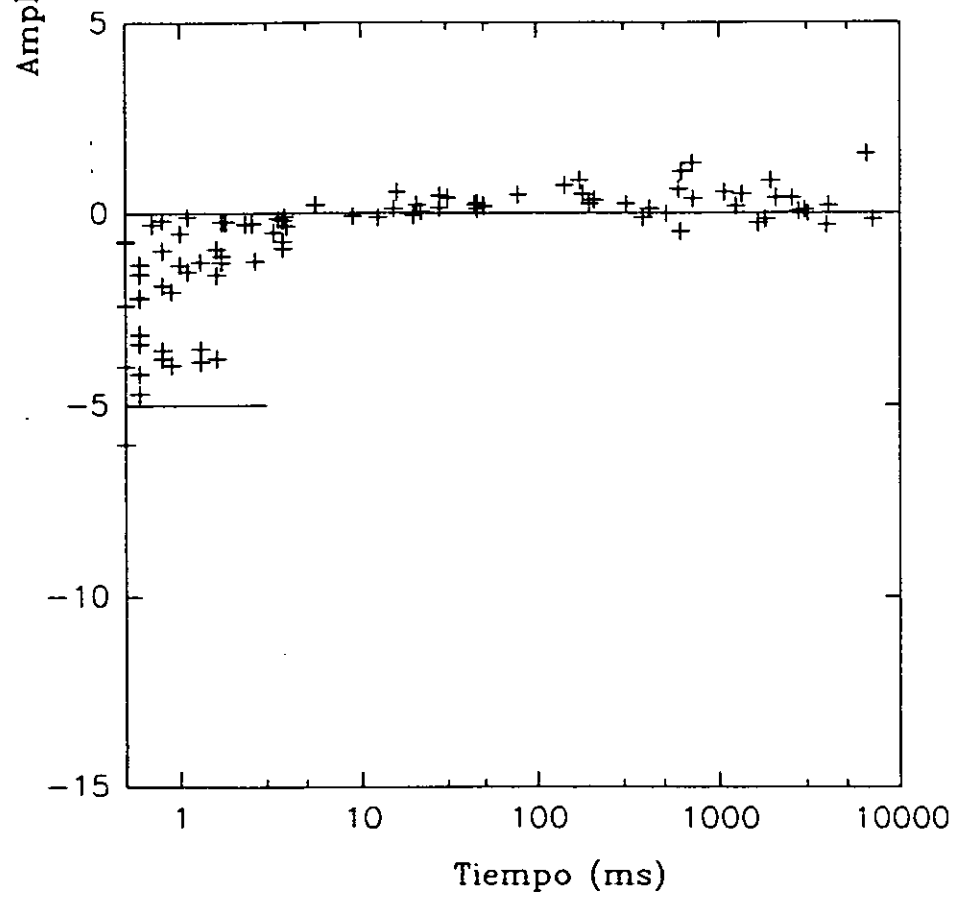
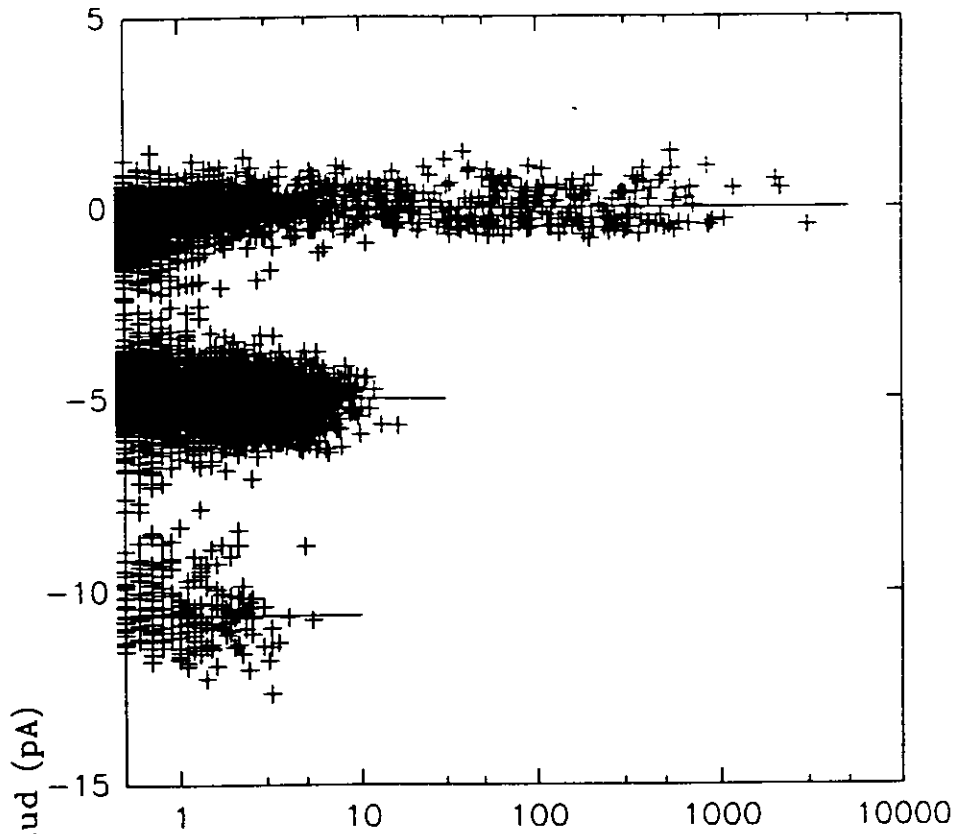


Fig. 13. Gráfica que ilustra las transiciones de los canales del experimento mostrado en la Fig. 12. (A), es el control, se detectaron 13814 durante 62 s. La línea horizontal representa la amplitud promedio en cada nivel de corriente (0 pA, -5.0 pA y -10.6 pA). En (B), se detectaron 216 transiciones en presencia de F^- . Las líneas horizontales fueron tomadas de (A). Ver pág. 83.

12, en escala semilogarítmica. Cada línea horizontal (paralela al eje de las abscisas) representa el valor promedio de la corriente. La Fig. 13A corresponde al control. El estado abierto de los canales (niveles 1 y 2) rara vez excede los 10 ms de duración. Por otra parte, los cierres de los canales (nivel cero) fueron varias veces mayores en su duración y pueden exceder un segundo de duración. La Fig. 13B ilustra la acción del F^- , se puede observar que el número de eventos en el estado abierto disminuye considerablemente, los cierres son más prolongados y relativamente más comunes. Por supuesto, el tiempo total en el estado abierto disminuye notablemente y no se observan dobles aperturas. La amplitud de la corriente presenta un cambio no significativo, esto se ilustra en la parte B, donde el valor de la amplitud promedio de la corriente del registro testigo (Fig. 13A) es regraficado en la parte B para su comparación.

La figura 14 presenta los histogramas de amplitudes en presencia y en ausencia de F^- del mismo experimento, a un potencial

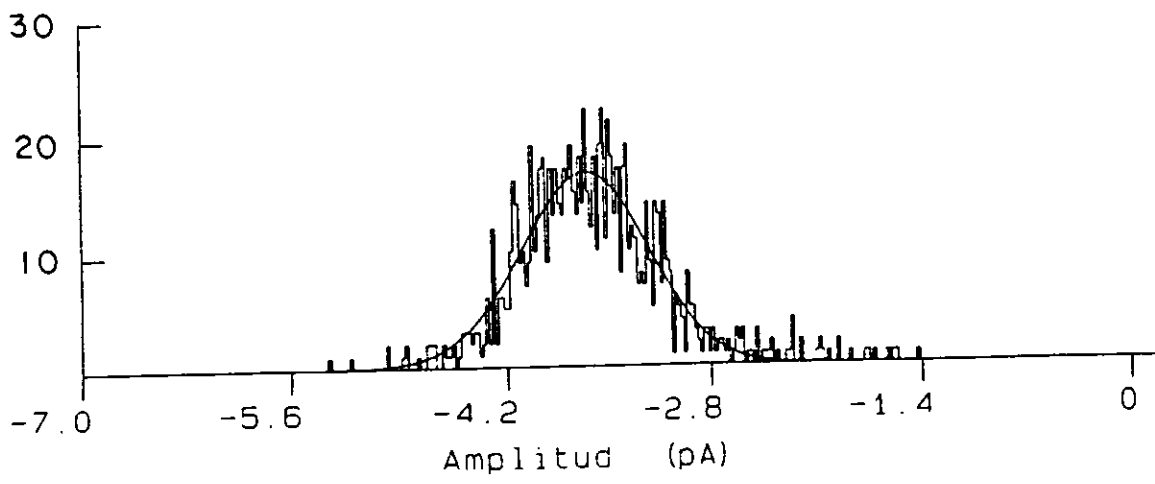
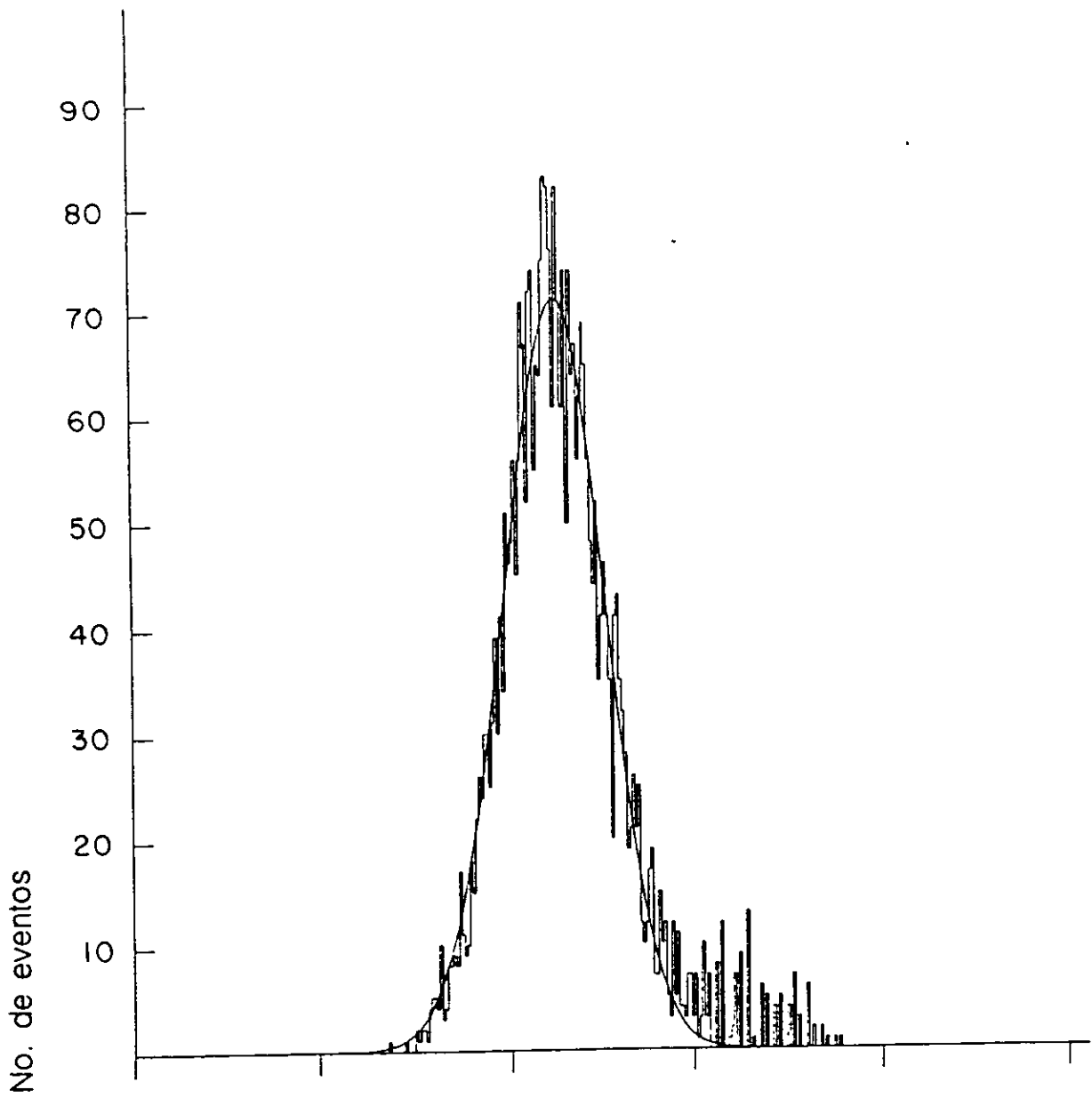


Fig. 14. Histograma de las amplitudes de la corriente del mismo experimento mostrado en la Fig. 12, a un potencial de -70 mV. (A), el histograma fue formado de un registro de 62 s en condiciones isotónicas de KCl (120 mM). La curva es el ajuste a una distribución Gaussiana del primer nivel de apertura. Los parámetros (número de eventos, promedio y desviación estándar) fueron: 3509, -3.669 pA y 0.439 pA. (B), en presencia de 15 mM de F^- en la solución del baño. El tiempo de registro fue de 62 s. La línea continua es el ajuste a una distribución Gaussiana del primer nivel de apertura. Los parámetros fueron: 924, -3.864 pA y 0.378 pA. Ver pág. 85.

de membrana de -70 mV. La línea continua es el mejor ajuste a una distribución Gaussiana. Ya que durante el efecto del F^- nunca se observaron dobles aperturas, en el histograma control sólo se muestra el primer nivel de apertura. La Fig. 14A muestra el histograma de la amplitud de la corriente en condiciones control, el número de eventos es de 3509 y la amplitud del ajuste fue de 3.864 pA con una desviación estándar de 0.378 pA. La Fig. 14B es el histograma de la amplitud de la corriente en presencia de F^- , se observa una clara disminución en el número de eventos, mientras que en el control fue de 3509, aquí es de 924. Sin embargo se puede apreciar que la amplitud de la corriente es 3.669 pA con una desviación estándar de 0.439 pA, prácticamente la misma en ambas situaciones experimentales. Con estos resultados, podemos concluir, que el F^- disminuye la frecuencia de aparición de las corrientes y por lo tanto la probabilidad de apertura de los

canales, sin que modifique la amplitud de la corriente.

Para mostrar con claridad el efecto sobre la probabilidad de apertura, hicimos su estimación utilizando el algoritmo propuesto por Fenwick y col. (1982). Este modelo tiene la ventaja de que se puede calcular la probabilidad de apertura independientemente del número de canales presentes en la membrana registrada y, además, no hace suposiciones de la cinética de los canales. El algoritmo tiene la forma de

$$P_o = \sum \frac{j_j}{IN} \quad (10)$$

donde N es el número de canales abiertos, t_j es el tiempo total en cada nivel j y T es la duración total del registro.

La figura 15 ilustra la P_o en función del tiempo del mismo experimento mostrado en la figura 12. El tiempo total del registro fue de 372.6 segundos (s), sin embargo, la P_o se calculó cada 10.35 s. Los círculos vacíos son los valores control y, de acuerdo con el registro de la Fig. 12, la P_o no fue constante, indicando la presencia de salvas. La P_o fluctuó entre valores muy cercanos a cero y a valores por arriba de 0.2. El F^- provocó una disminución muy rápida en la P_o con una latencia de 2 segundos. El decremento en la P_o de los canales hasta cero, permaneció todo el tiempo que

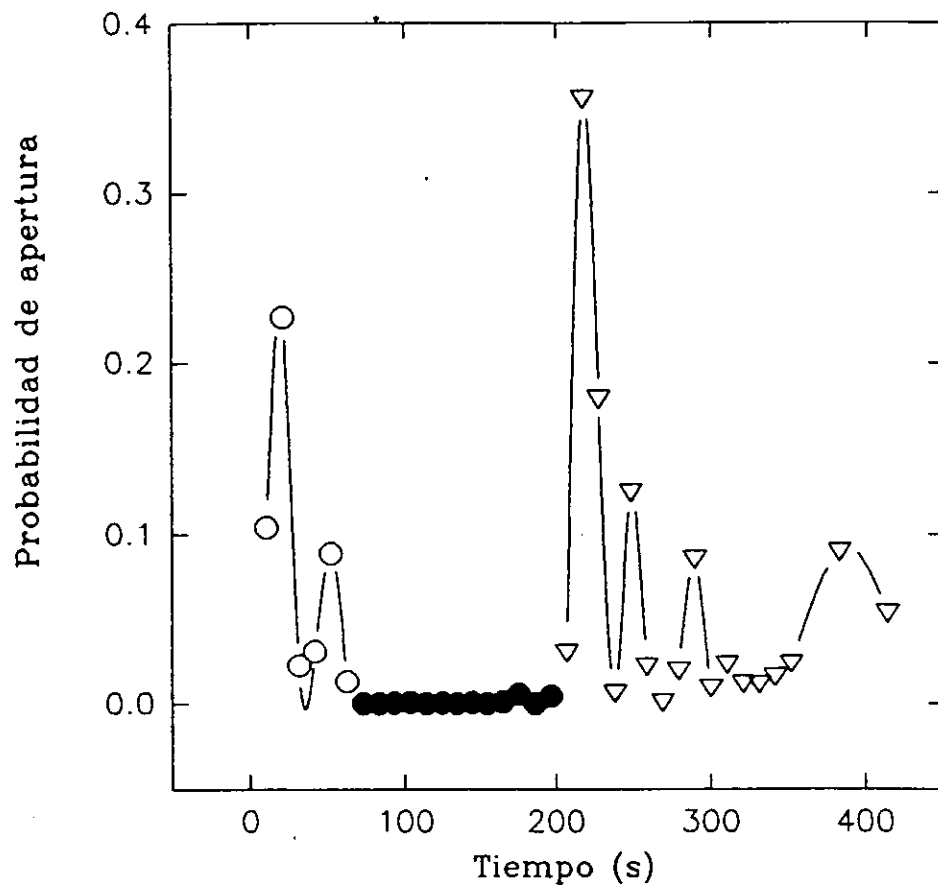


Fig. 15. Efecto del F^- sobre la probabilidad de apertura de los canales de K^+ . (O), es el control, (●) en presencia de F^- y (∇) después de regresar a las condiciones control. Mismo experimento como en las Figs. 12 y 13.

duró la exposición al F^- (círculos llenos). El efecto fue completamente reversible (triángulos) y, nuevamente la actividad de

los canales presentan un comportamiento irregular, con una P_o que varía de aproximadamente cero a valores ligeramente superiores a 0.3.

La estimación de los tiempos de apertura sólo se realizó en un experimento a -80 mV. A este potencial se presentó un sólo nivel de apertura, lo que hace suponer que a este potencial únicamente un canal de K^+ presenta actividad (Colquhoun y Hawkes, 1983). En los otros potenciales de membrana explorados, en el mismo experimento, hubo hasta tres niveles de aperturas simultáneas, por lo tanto existen por lo menos tres canales activos durante estos registros. Esto modifica significativamente la estimación de los tiempos de apertura, por lo que no realizamos su medición a estos potenciales de membrana. Como se ha reportado, los canales de K^+ de la rectificación tardía tienen una cinética compleja, con al menos un estado abierto y tres estados cerrados (Standen y col., 1985).

Nuestros resultados muestran que el tiempo promedio que dura el canal en el estado abierto no se modifica en presencia de F^- , mientras que la duración de las salvas y el número de aperturas dentro de la salva disminuyen notablemente. La figura 16 muestra histogramas de la distribución del tiempo de apertura, medidos en ausencia y en presencia de 15 mM de F^- . Como se muestra, estos histogramas son ajustados a una exponencial simple (línea

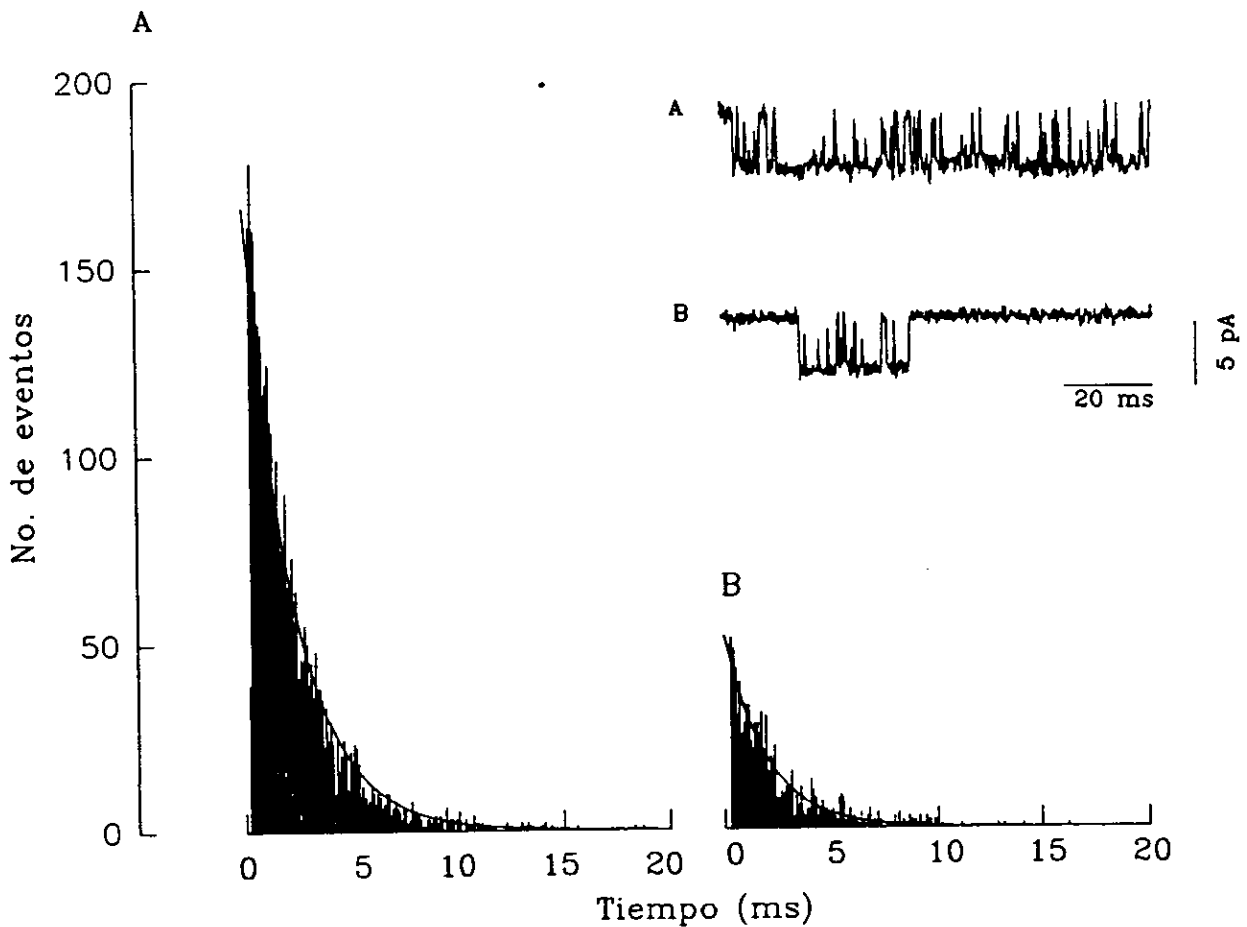


Fig. 16. Efecto del F^- sobre los tiempos de apertura de los canales de K^+ . (A), es la distribución del tiempo de apertura del experimento control en soluciones simétricas de KCl a -70 mV. (B), distribución del tiempo de apertura en presencia de 120 mM de KF en la solución del baño. Las líneas continuas son el mejor ajuste a una exponencial simple. La constante de tiempo fue de 2.26 ms in A y 1.92 ms en B. El inserto muestra un segmento de 200 ms de las corrientes unitarias representativas, A es el control, B en presencia de F^- . Mismo experimento en ambas situaciones experimentales.

continúa), lo que es consistente con la idea de que este canal tiene un sólo estado abierto (Standen y col., 1985). Los parámetros se indican en el pie de figura. La parte A es el control y la parte B en presencia de F^- en la solución del baño. Claramente, el F^- disminuye el número de eventos y no tiene efecto sobre el tiempo promedio de apertura. El inserto ilustra el registro de canales únicos del mismo experimento. Se puede observar que en presencia de F^- , la duración y el número de salvas disminuyen, sin embargo, una vez que el canal se abre, dura (en promedio) un tiempo similar a las aperturas del registro control.

Efecto del GTP sobre los canales de K^+ .

La posibilidad de que la acción del F^- estuviera mediada por proteínas G fue explorada mediante el empleo de un análogo no hidrolizable del GTP. Dado que el F^- al hacer complejo con el Al^{3+} es un análogo del γ -fosfato, es probable que este complejo pueda activar una proteína G. De esta forma, la disminución de la actividad puede deberse a una modulación directa por proteínas G sin la participación de segundos mensajeros difusibles en el citoplasma, tal como sucede para el canal de K^+ activado por ACh

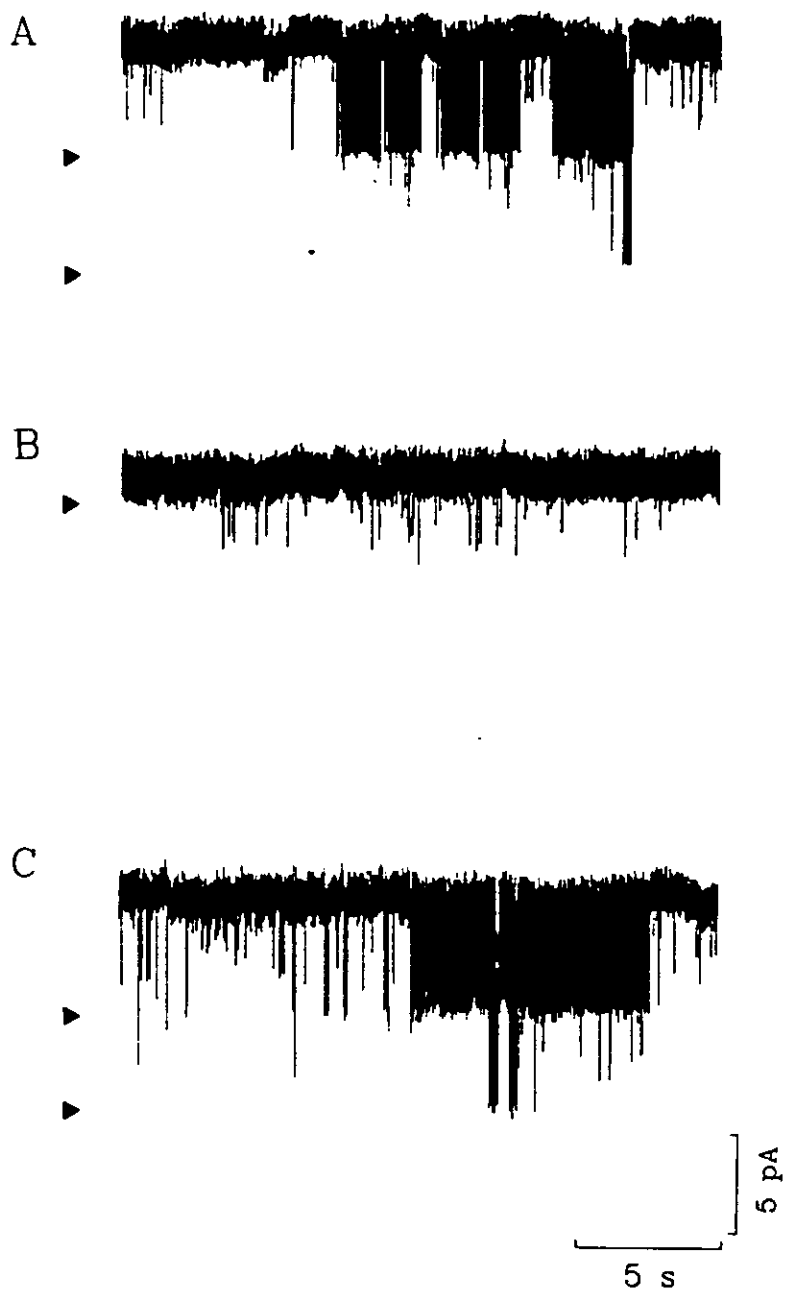


Fig. 17. Efecto del GTP γ S sobre las corrientes unitarias de K⁺. Los registros muestran las corrientes de membrana a -80 mV en soluciones simétricas de KCl. (A), en soluciones control. (B), en presencia de 100 μ M de GTP γ S en la solución del baño. (C), después de regresar a las condiciones control.

(K_{ACh}) (Pfaffinger y col., 1985).

Para poner a prueba esta hipótesis, es decir, que el AlF_3 pueda estar activando una proteína G, utilizamos un análogo específico y no hidrolizable de las proteínas G, el GTP γ S a concentraciones de 500 y 100 μ M. La figura 17 muestra tres segmentos del registro ante diferentes situaciones experimentales, a un potencial de mantenimiento de -80 mV. La Fig. 17A corresponde al registro testigo de las corrientes de K^+ , las cuales presentan las características cinéticas y de conductancia ya descritas. La Fig. 17B en presencia de GTP γ S a la concentración de 100 μ M, aplicado a la cara citoplásmica de la membrana celular, se puede observar una drástica disminución de la actividad de los canales. La Fig. 17C ilustra la recuperación de la actividad de los canales después del lavado del GTP γ S. La amplitud de la corriente no presenta cambios significativos, siendo de 4.61 ± 0.18 y 4.53 ± 0.22 pA en los registros control y en presencia de GTP γ S respectivamente. La P_o calculada con la ecuación 10 del registro control fue de 0.140 y en presencia de GTP γ S de 0.004. Estos resultados dan evidencia de que el efecto del GTP γ S es bastante semejante al que produce el F^- , es decir, provoca una disminución

en la probabilidad de apertura sin que modifique la amplitud de la corriente. Asimismo, el efecto es completamente reversible, presentando una P_o de 0.171 después del lavado del GTP γ S. El efecto del GTP γ S a una concentración de 500 μ M fue prácticamente el mismo que a 100 μ M (ver tabla 3).

Efecto del GDP. A pesar de que el F^- y el GTP γ S ejercen el mismo efecto sobre la actividad de los canales, existe la posibilidad de que actúen sobre vías diferentes. El GTP γ S puede unirse directamente al canal iónico, y así, provocar la disminución de la probabilidad de apertura, tal como lo proponen Lederer y Nichols (1989) para el canal de K^+ sensible a ATP, o bien, que el GTP γ S y el F^- activen una proteína G, y ésta sea la causante del efecto sobre el canal iónico, tal como sucede para el canal de K_{Ach} (Pfaffinger y col., 1985). Para saber si la modulación del canal de K^+ se debe a una u otra vía o a ambas, utilizamos un inhibidor competitivo de las proteínas G, el GDP β S, a una concentración de 500 μ M en la solución del baño en presencia ya sea de F^- o de GTP γ S.

La figura 18 ilustra uno de cinco experimentos en el cual se puso a prueba la hipótesis de que el canal es modulado directamente

por una proteína G, el potencial de membrana fue de -80 mV. La fig. 18A es el registro control, presentando una P_o de 0.335 y una conductancia cuerda de 57 pS. La Fig. 18B en presencia de GTP γ S y GDP β S a una concentración de 100 y 500 μ M respectivamente, la P_o fue de 0.384 y la conductancia cuerda de 57 pS. La Fig. 18C sólo en presencia de GTP γ S, la P_o disminuyó a un valor de 0.012 y la conductancia permaneció prácticamente sin cambios (55 pS). La parte B pone de manifiesto la falta de efecto del GTP γ S cuando el GDP β S está presente en la solución del baño. La parte C muestra el efecto ya caracterizado del GTP γ S cuando el GDP β S es eliminado del baño; nuevamente, aquí fue clara la reducción de la actividad de los canales por el GTP γ S.

De manera similar, el GDP β S también previno los efectos del F^- . En la figura 19 se presenta uno de cuatro experimento que ejemplifica este resultado. La Fig. 19A corresponde al registro control; la Fig. 19B en presencia de F^- y GDP β S, tal como sucede

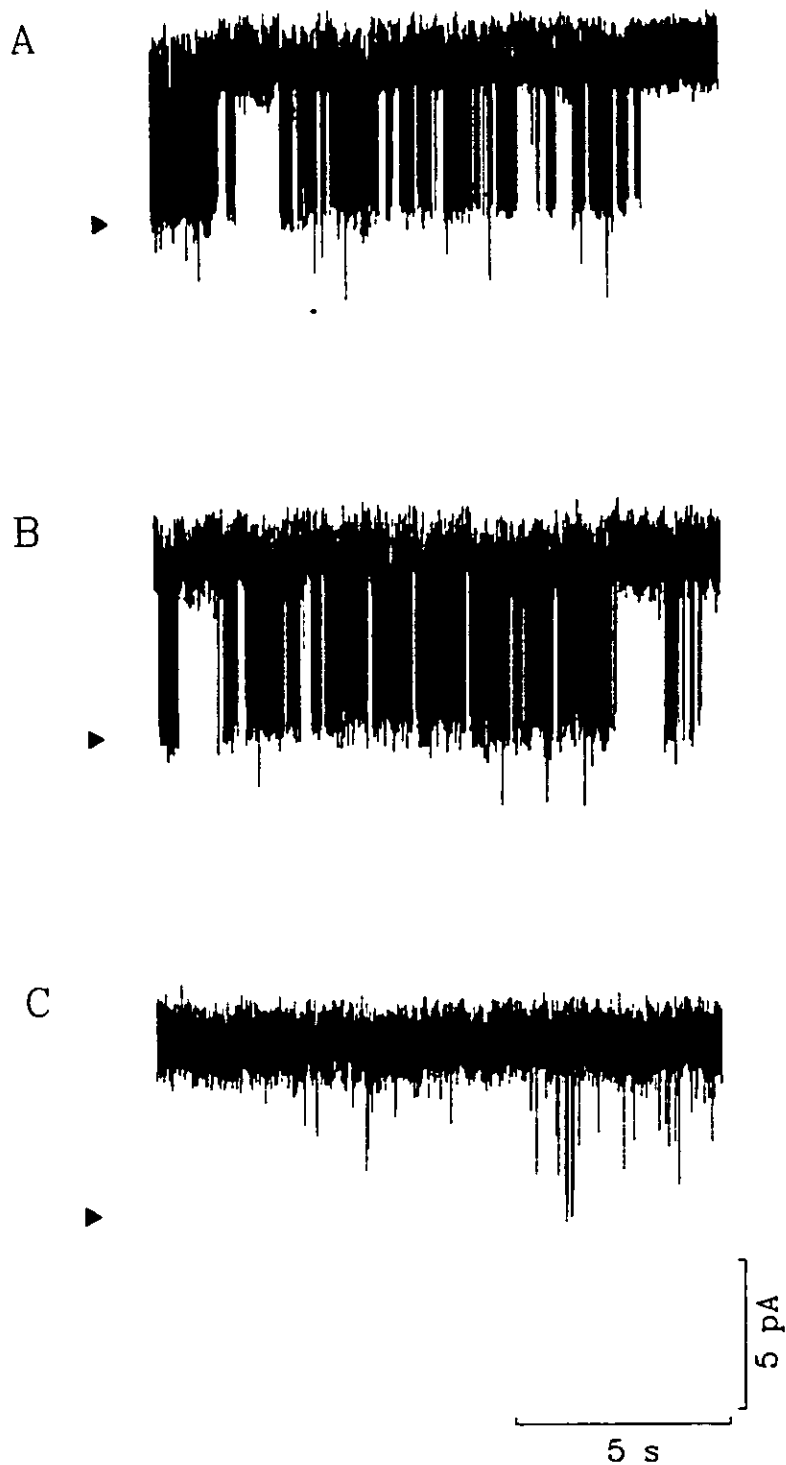


Fig. 18. Efecto del GDPβS sobre los canales de K⁺. Los registros presentan corrientes iónicas a -80 mV en soluciones isotónicas de KCl. (A), en la solución control. (B), en presencia de 100 μM de GTPγS y 500 μM de GDPβS. (C), en presencia de 100 μM de GTPγS.

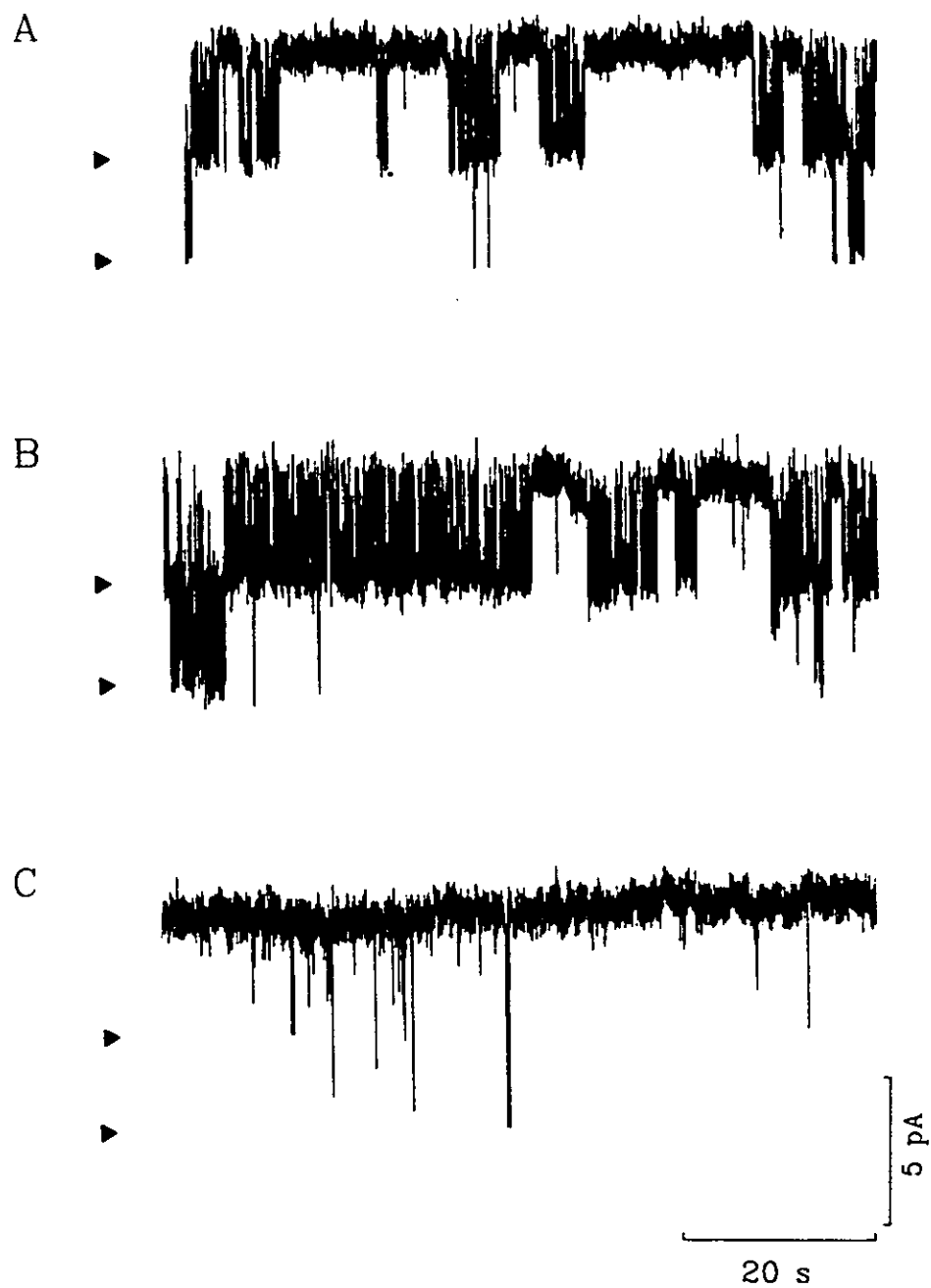


Fig. 19. Efecto del GDP β S y F $^-$ sobre los canales de K $^+$. Los registros fueron a un potencial de -80 mV en soluciones isotónicas de KCl. (A), en la solución control. (B), en presencia de 15 mM de F $^-$ y 500 μ M de GDP β S. (C), en presencia de 15 mM de F $^-$.

cuando compiten GTP γ S y GDP β S, el efecto es nulificado por el inhibidor; la Fig. 19C en presencia de F $^-$, y como era de esperarse el F $^-$ provoco una disminuci3n de la probabilidad de apertura. Estos resultados sugieren fuertemente que los canales son regulados directamente por una prote3na G, tal como sucede para el canal de K $_{Ach}$ (Pfaffinger y col., 1985; Breitweieser y Szabo, 1985).

Tabla 3. Efecto del F $^-$ y GTP γ S sobre la Po.

[F $^-$] _i	Po (control)	Po (F $^-$)	Latencia (s)	n
7.5	0.195 ±0.087	0.128 ±0.087	2.333 ±0.471	3
15.0	0.186	0.0002	2	2
30.0	0.096 "0.031	0.001"0.0004	1.333 ±0.471	4
60.0	0.222	0.014	1.333 ±0.471	2
120.0	0.292 "0.088	0.010 "0.008	2	4
GTP γ S (μ M)				
100	0.109 ±0.024	0.007 ±0.002	2	9
200	0.195	0.010	2	2

La tabla 3 resume los promedios de la probabilidad de apertura de los canales de K $^+$ durante los registros control y en presencia, de diferentes concentraciones, de F $^-$ y GTP γ S. La Po se calcul3 con

la ecuación 10. Todos los experimentos fueron realizados a un potencial de membrana de -80 mV, n es el número de experimentos. Los resultados muestran que tanto el F^- y el GTP γ S disminuyen la P_o a valores cercanos a cero, excepto cuando la concentración de F^- fue de 7.5 mM, sin embargo el efecto también fue significativo ($P > 0.05$).

Todos los experimentos de la tabla 3 muestran que la P_o de los canales de K^+ disminuye a valores cercanos a cero, tanto en presencia de F^- como de GTP γ S aplicados intracelularmente, cuando los registros iniciaron a un potencial de membrana de -80 mV. Dado que a -80 mV la P_o ya había disminuído considerablemente, cuando en los mismos experimentos se invetigó el efecto a otros potenciales, la P_o también había disminuído aproximadamente a cero. La pregunta que surgió entonces fue si este efecto podría ser diferente cuando el registro se iniciará a otros potenciales de membrana diferentes de -80 mV. Para ello, realizamos experimentos a diferentes potenciales de mantenimiento, con una concentración de F^- de 15 mM. La tabla 4 muestra que la P_o disminuye a valores cercanos a cero, y que esta reducción es independiente del potencial de membrana.

Tabla 4. Efecto del F^- sobre la P_o .

Em (mV)	P_o (Control)	P_o (F^-)	n
- 60	0.175 \pm 0.0041	0.002 \pm 0.0003	3
- 40	0.115 \pm 0.013	0.001 \pm 0.001	4
- 20	0.245 \pm 0.055	0.014 \pm 0.0005	3
+ 20	0.198 \pm 0.04	0.002 \pm 0.007	3
+ 40	0.232 \pm 0.08	0.017 \pm 0.001	3
+ 60	0.219 \pm 0.045	0.0003 \pm 0.0001	4
+ 80	0.325 \pm 0.015	0.022 \pm 0.0011	3

Caracterización del canal de K^+ sensible a ATP.

Hasta este momento caracterizamos que el canal de K^+ de la rectificación tardía es modulado directamente por una proteína G, esto es, sin la participación de segundos mensajeros difusibles en el citoplasma. Sin embargo, todos los registros los realizamos en el estado estacionario y, dado que este canal es activado por el voltaje, el punto que faltaba por estudiar era el comportamiento de estos canales durante la aplicación de pulsos de voltaje desde un potencial de mantenimiento. La siguiente serie de experimentos

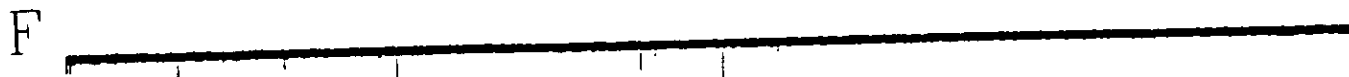
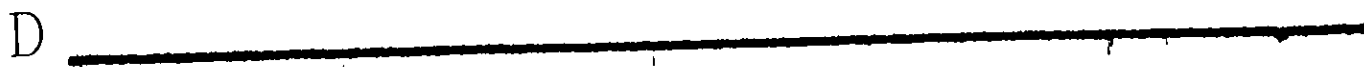
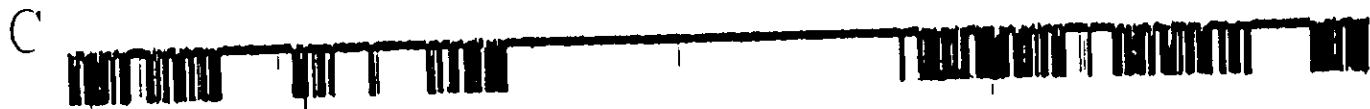
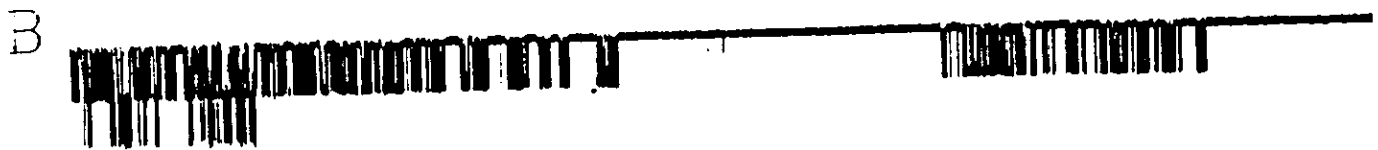
consistió en fijar el potencial de membrana a -100 mV y desde ahí se aplicaron pulsos de voltaje en pasos de 20 mV hasta $+40$ mV. Las condiciones iónicas fueron iguales a la de los registros anteriores.

Los experimentos en soluciones simétricas de KCl mostraron un resultado sorprendente. En ausencia de ATP la actividad de los canales fue similar a la que ya hemos reportado, es decir, una gran actividad seguida de períodos silentes, a todos los voltajes de membrana estudiados. No obstante, cuando la membrana fue expuesta a 2 mM de ATP por su cara interna, la actividad de los canales se redujo a prácticamente cero de P_o a cualquier potencial de membrana. Este resultado lo obtuvimos en 6 experimentos (no se muestran estos resultados), en donde el ATP se obtuvo de tres lotes diferentes. Un punto que podría ser de interés fue que, el lote que utilizamos en los primeros experimentos no tuvimos oportunidad de probarlo en esta nueva serie de experimentos. Es importante remarcar que en todos los experimentos que realizamos en el estado estacionario, tanto para la caracterización del canal, como para estudiar el efecto del F^- y del GTPyS, no existieron diferencias en los registros cuando estos se realizaban en presencia o ausencia de ATP en la solución del baño.

Para saber si este nuevo resultado se debía al planteamiento experimental, es decir, que esto se debiera a la aplicación de pulsos de voltaje, realizamos nuevamente experimentos en el estado estacionario en presencia del "nuevo" ATP (que fue de lotes diferentes al que se uso inicialmente).

Los experimentos se realizaron en soluciones simétricas de KCl (120 mM). La curva corriente voltaje tuvo un comportamiento lineal, similar a la de la figura 10, con una conductancia pendiente de 57.2 pS (n=9). El bloque por TEA interno, fue semejante al mostrado en el experimento de la figura 11, con una reducción de la Po del 49% a los 5 minutos y del 87% a los 10 minutos respecto a los registros control. Por otra parte, la amplitud de la corriente no se modificó. La reducción en la Po en presencia de ATP (2 mM) prácticamente a cero, fue consistente en todos los experimentos, a pesar de los diferentes lotes de ATP utilizados. Las aperturas de los canales se agruparon en salvas en los registros control. Los tiempos de apertura, la duración de las salvas y el número de aperturas por salva, fueron reducidas por el ATP.

Estos resultados apoyan fuertemente que este canal de K⁺ es el sensible a ATP (Lederer y Nichols, 1989; Noma, 1983; Spruce y col., 1987). Además, no hay duda que el canal de K⁺ que identificamos como de la rectificación tardía, en realidad es el sensible a ATP,



2 s

Fig. 20. Corrientes unitarias de canales de K^+ sensibles a ATP registradas en soluciones simétricas de KCl. Filtro 2 kHz; velocidad de muestreo 10 kHz; resistencia del sello 60 $G\Omega$. Todos los trazos son segmentos de registros a un potencial de mantenimiento de -80 mV realizados en el mismo parche de membrana, la duración total en cada situación experimental fue de 62 s. (A), situación control en ausencia de ATP. (B), en presencia de 15 mM de F^- y GDP β S 500 μ M en la solución del baño (sin ATP). (C), después de regresar a las condiciones control. (D), en presencia de 15 mM de F^- en la solución del baño (sin ATP). (E), después de eliminar el F^- de la solución del baño. (F), en presencia de 2 mM de ATP en la solución del baño. (G), después de regresar a las condiciones control. Ver pág. 103.

ya que tiene una alta probabilidad de apertura a -80 mV (voltaje al cual el rectificador tardío está prácticamente cerrado), la relación corriente-voltaje tiene un comportamiento lineal, muy similar al canal de K^+ sensible a ATP (Spruce y col., 1987), y por supuesto fue bloqueado por ATP. Los efectos diferentes que muestra el ATP serán comentadas en la sección de discusión.

Una vez que aclaramos que el canal de K^+ registrado fue el sensible a ATP, el problema a resolver fue conocer si este canal realmente era modulado por una proteína G.

La figura 20 resume uno de cinco experimentos en donde se ilustra el efecto del GDP β S y F^- , F^- , y ATP; los registros se realizaron en condiciones isotónicas de KCl, el potencial de membrana fue de -80 mV. En cada uno de los experimentos se realizaron todas las maniobras ejemplificadas en este experimento.

En la Fig. 20 A, B, C, D y E la solución del baño no contenía ATP. La Fig. 20A muestra el registro en condiciones testigo, la conductancia fue de 56.8 pS y la P_o de 0.386. La Fig. 20B en presencia de F^- (15 mM) más GDP β S (500 μ M), con estas condiciones, la conductancia no sufrió modificaciones y la P_o fue de 0.345. En la parte C, se ilustra el registro después del lavado de F^- más GDP β S, en donde la P_o prácticamente no tuvo modificaciones ($P_o=0.320$). El F^- (15 mM) redujo drásticamente la P_o hasta valores cercanos a cero (Fig. 20D). Cuando el F^- es eliminado de la solución del baño, la actividad de los canales muestran una recuperación de casi el 100%, con respecto a los registros control (Fig. 20E). La Fig. 20F ilustra el efecto de 2 mM de ATP aplicado a la cara intracelular de la membrana, la P_o disminuyó a cero y la actividad de los canales se recuperó completamente después de remover el ATP de la solución del baño (Fig. 20G).

La Fig. 21 presenta la probabilidad de apertura, calculada cada 10.35 s, de un experimento similar al mostrado en la Fig. 20. La círculos vacíos, de derecha a izquierda, representan la P_o del registro control y de los lavados del F^- y GDP β S, del F^- y del ATP respectivamente. Nuevamente el F^- carece de efecto en presencia de GDP β S (círculos negros); sin embargo, el F^- por sí mismo disminuye

la P_o de manera drámatica (triángulos negro). Por otra parte, el efecto del ATP es claramente una disminución de la probabilidad de apertura (cuadros negros), tal como se mostro en la figura 20. La P_o promedio fue de 0.287 ± 0.034 en los registros control, y disminuyó a 0.004 ± 0.0001 ($n=5$) en presencia de F^- .

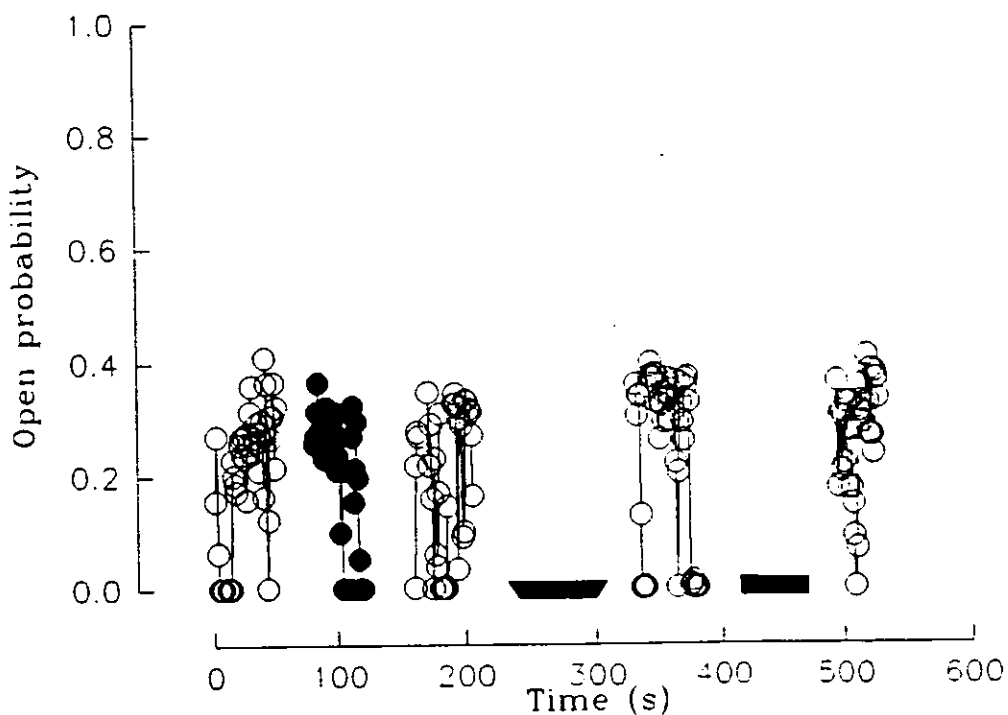


Fig. 21. Efecto del F^- y del $GDP\beta S$ sobre los canales de K^+ sensibles a ATP. (O) situaciones control -en ausencia de ATP en la solución del baño-, (●) en presencia de F^- (15 mM) y del $GDP\beta S$ (500 μM) en la solución del baño, (▼) en presencia de 15 mM de F^- en la solución del baño y (■) en presencia de 2 mM de ATP en la solución del baño.

Si bién esta serie de evidencias nos llevan a la conclusión de que

el canal de K^+ sensible a ATP es modulado por una proteína G, el objetivo principal de este trabajo de tesis fue establecer si el canal de K^+ de la rectificación tardía era susceptible de ser modulado por un mecanismo similar. Así, la siguiente serie de experimentos fue encausada a la caracterización del rectificador tardío y, posteriormente estudiar la posible modulación por proteínas G.

Caracterización de canales de K^+ de la rectificación tardía

Los experimentos para caracterizar al canal de K^+ de la rectificación tardía se realizaron mediante la aplicación de pulsos de voltaje de 100 ms de duración, en pasos de 20 mV hasta +40 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. El registro de las corrientes unitarias dieron evidencia de tres distintos tipos de canales de K^+ de la rectificación tardía. Las soluciones empleadas para el registro de las corrientes iónicas fueron soluciones asimétricas de K^+ , en la pipeta 2.5 mM de K^+ y TTX (6 μ M) para bloquear los canales de Na^+ (solución B, Tabla 2), y en la solución del baño 120 mM de K^+ (solución C, Tabla 2) Las microáreas de membrana en general contenían de 2 a 5 canales activos. La

reconstrucción de las corrientes poblacionales a partir del registro de las corrientes que fluyen a través de un sólo canal tuvieron un curso temporal de activación similar al de las corrientes macroscópicas registradas de fibras musculares o segmentos de fibras musculares (Adrian y col., 1970a y b; Stanfield, 1970; Beam y Donaldson 1983a; Vergara y col., 1978).

Canales sin inactivación tipo N

La figura 22 muestra registros de corrientes unitarias que fluyen a través de canales de K^+ . Los canales fueron activados con pulsos despolarizantes desde un potencial de mantenimiento de -100 mV durante 100 ms. Los canales se abren con latencias muy breves y fluctúan rápidamente entre la línea de base y el nivel de apertura. El histograma de amplitudes punto a punto (Fig. 22B) fue bien ajustado a la suma de dos distribuciones Gaussianas. El valor de la corriente estimada del ajuste fue de 3.01 pA (a +40 mV). La amplitud de las corrientes a diferentes voltajes (de -80 a +40 mV) se obtuvo del valor de los ajustes de los histogramas de amplitudes similares a los de la Fig. 22B. La relación corriente voltaje se realizó con los valores obtenidos de los ajustes de los histogramas de amplitudes de 10 experimentos de diferentes parches de membrana

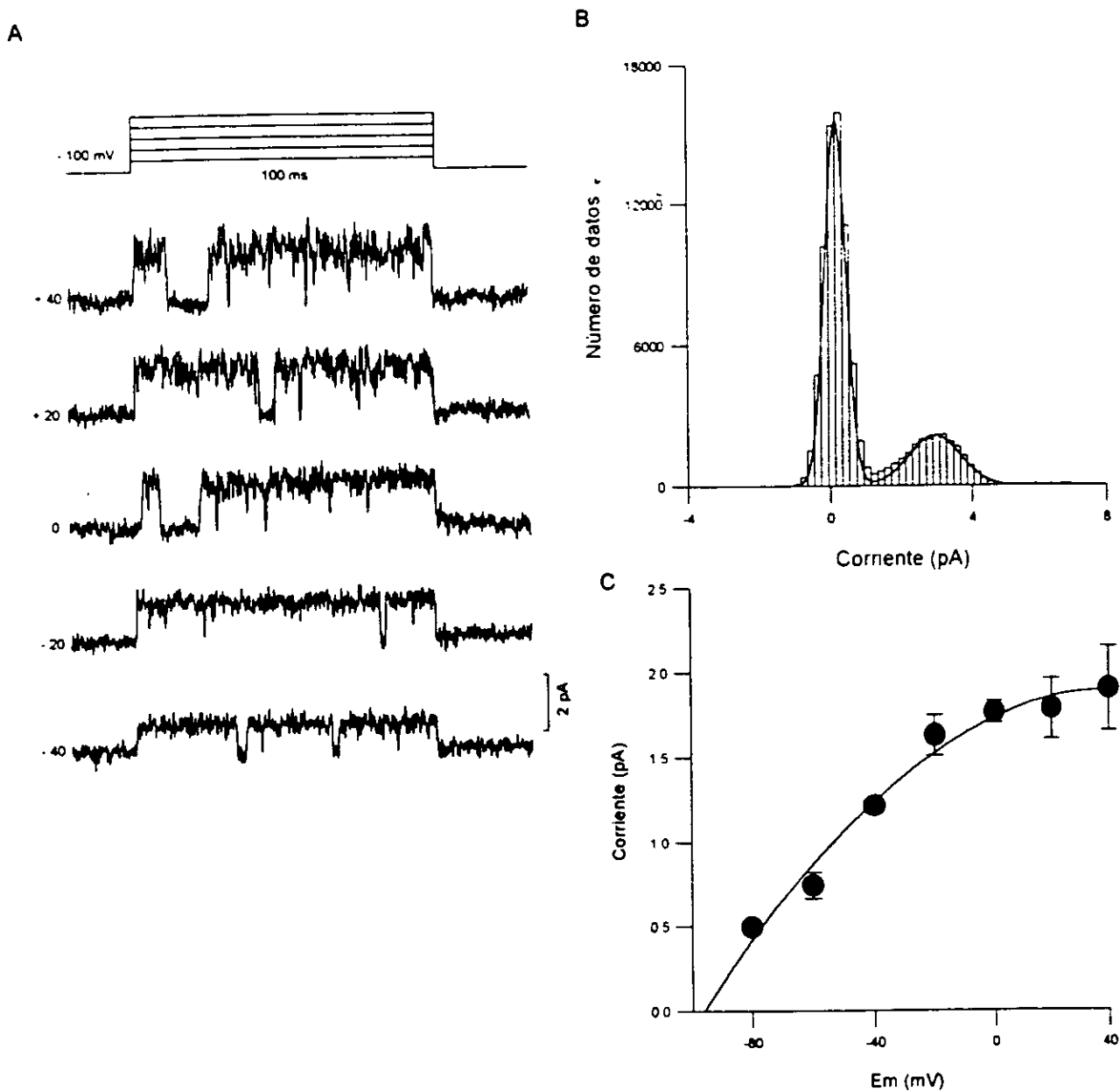


Fig. 22. (A), corrientes unitarias del canal K^+ de la rectificación tardía. $[K^+]_o = 2.5$ mM. El trazo superior muestra la duración y los pulsos de voltaje, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV hasta +40 mV. Los potenciales de membrana (a la izquierda de cada registro) indican el estado cerrado del canal. (B), histograma de la amplitud de las corrientes formado de 100 registros. El potencial fue a +40 mV. Del mismo parche como en A. La curva es la suma de dos distribuciones Gaussianas ajustada por el método de los mínimos cuadrados. Los parámetros (media y desviación estándar) fueron: 0.01, 0.12; 3.01, 0.038. (C), Relación corriente-voltaje de 10 experimentos similares a los mostrados en A.

Fig. 22C). El potencial de inversión no se obtuvo directamente, ya que los canales tienen una baja probabilidad de apertura a voltajes muy negativos. Sin embargo, el potencial de inversión extrapolado fue de -90 ± 2.3 mV ($n=10$). Además, la relación corriente-voltaje no es lineal, por esta razón, la conductancia unitaria es expresada como la conductancia cuerda ($\gamma = i / (E_m - E_K)$). De acuerdo a con esta definición, γ depende del potencial de equilibrio (E_K). Tomando el valor de $P_{Na} : P_K = 0.01$ (Standen y col., 1984; Standen y col., 1985) y bajo estas condiciones iónicas para el potasio, el E_K fue de -87 mV. γ fue de 26 ± 1.2 ps ($n=10$) a -40 mV y de 21 ± 0.8 pS ($n=8$) a $+40$ mV.

Los registros de corrientes a nivel unitario mostraron evidencias de un proceso de inactivación lenta. Los experimentos dan evidencia de que el agrupamiento de registros con y sin apertura de los canales en pulsos consecutivos ocurre de manera no aleatoria. La Fig. 23 muestra veinte registros consecutivos de una serie de 200 despolarizaciones a $+40$ mV durante 100 ms, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. El intervalo entre los pulsos fue de 1 segundo (s). Los registros sin apertura de canales (registros vacíos) tienden a agruparse más que a ordenarse al azar entre los registros con aperturas. Pareciera que los canales entran

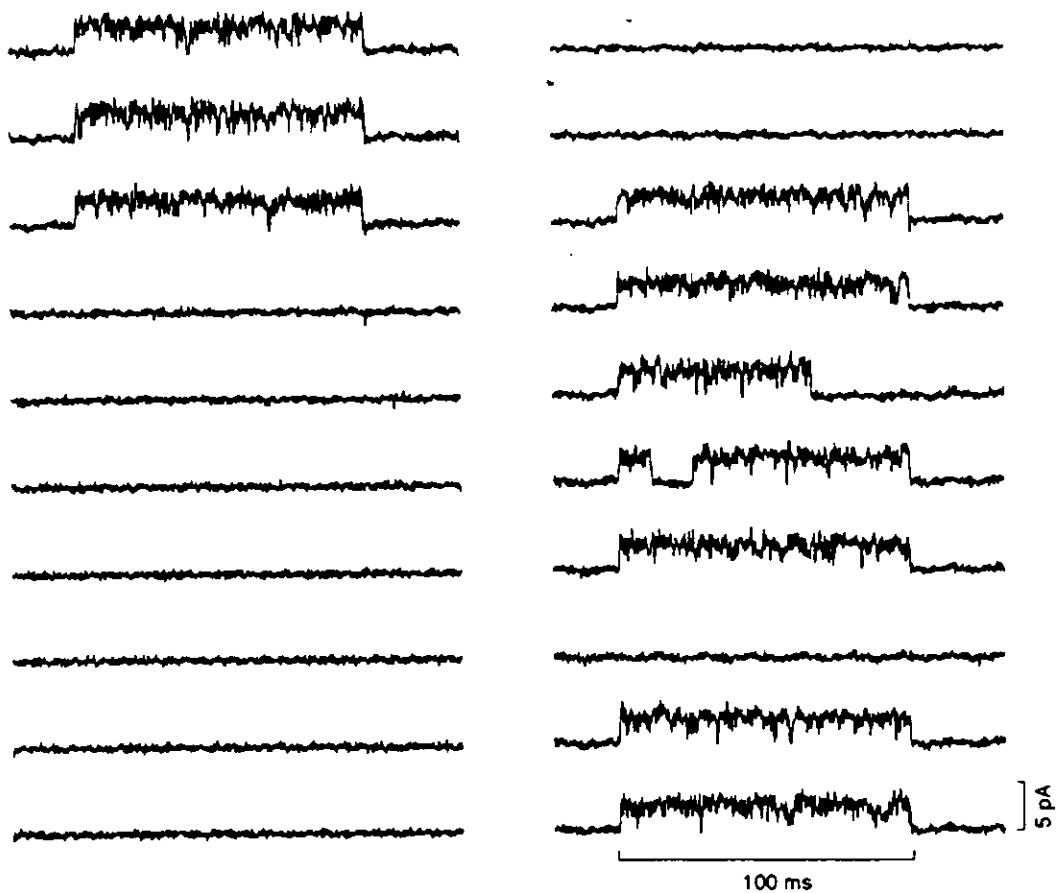


Fig. 23. Registros ordenados no aleatoriamente. Veinte registros consecutivos (iniciando en la columna de la izquierda y hacia abajo) de una serie de 200 despolarizaciones a + 40 mV durante 100 ms, repetidos s intervalos de 1s. El primer registro mostrado fue precedido de 54 registros, los cuales tuvieron el mismo comportamiento que los aquí presentados.

en un proceso de inactivación lenta en el cual los canales son incapaces de abrirse durante varios segundos. Un comportamiento similar fue descrito para los canales de Na⁺ (Horn y col., 1984),

para los canales de K* de la rectificación tardía (Standen y col., 1985) y para el canal de K* Shaker (Zagotta y Aldrich, 1990). El análisis de corridas se puede usar para estimar el grado de no aleatoriedad de los datos (Swéd y Eisenhart, 1943; Gibbons, 1971). El método predice que para muestras, donde el número de ensayos (n) es >40 , la distribución exacta del número de corridas puede ser aproximada por una distribución asintótica, formando una variable aleatoria estandarizada, Z , con promedio = 0 y varianza = 1 (Gibbons, 1971). La distribución del número de corridas es dada por:

$$Z = \frac{R - 2np(1-p)}{2\sqrt{np(1-p)}} \quad (11)$$

donde R es el número de corridas, n es el número total de ensayos y p es la probabilidad de que al menos un canal este abierto durante un ensayo. El número esperado de corridas es $2np(1-p)$. Valores de Z cercanos a cero indican una distribución aleatoria de los eventos y valores positivos de Z corresponden a un agrupamiento no aleatorio de los registros vacíos.

En estos experimentos el análisis de corridas mostró un patron de no aleatoriedad. Sin embargo, la no aleatoriedad esta subestimada debido a que los parches contenía más de un canal (Horn

y col. , 1984). En el experimento mostrado en la Fig. 23 hubo 72 registros blanco y 34 corridas. Para esta serie de eventos $Z=6.42$, lo cual es estadísticamente significativo ($P>0.02$) Cuando un canal entra al estado inactivado éste será incapaz de abrirse ante una nueva despolarización, de tal forma que la inactivación lenta lleva a cambios, con respecto al tiempo, en el número de canales activos en el parche. En cuatro experimentos, este proceso lento no se observó cuando el intervalo entre los pulsos fue mayor a 5 s (no se muestran los datos).

Tabla 5. Probabilidad de apertura de los canales de K^+

Potencial (mV)	P_o	T_o (ms)	(N)
-40	0.307 ± 0.01	3.03 ± 0.12	8
-20	0.360 ± 0.09	3.07 ± 0.14	8
0	0.560 ± 0.07	3.11 ± 0.08	8
+20	0.785 ± 0.11	4.56 ± 0.10	8
+40	0.873 ± 0.13	5.68 ± 1.11	8

P_o = probabilidad de apertura

T_o = tiempo abierto

media \pm E.S.

Una estimación adecuado de la P_o de los canales en función del

potencial de membrana o del tiempo, requiere la presencia de un sólo canal. Ya que en todos los registros existieron varios canales en los parches de membrana y que estos canales presentaron el fenómeno de inactivación lenta, la P_0 fue calculada con la ecuación 10. La tabla 5 muestra el promedio de la P_0 en función del potencial de membrana de 8 experimentos diferentes. Durante el cálculo de la P_0 se incluyeron los registros vacíos, pero es claro que la P_0 incrementa sus valores conforme la membrana se depolariza.

Los canales de este subtipo del rectificacador tardío se abren y se cierran independientemente. Mediante el análisis binomial, en estos parches que contenían varios canales, se investigó si la población de los canales era homogénea e independiente. La Fig. 24 muestra dos trazos representativos en donde el número máximo de canales abiertos a un tiempo dado fue dos. Los puntos en la Fig. 24 A y B muestran el cálculo de la probabilidad de tener exactamente 0 y 1 canales abiertos respectivamente. El teorema binomial predice que, para canales independientes, la probabilidad P_x de observar x canales abiertos de un número total N será:

$$P_x(t) = \binom{N}{x} \cdot P(t)^x \cdot [1 - P(t)]^{(N-x)} \quad (12)$$

donde $P(t)$ es la probabilidad de que cada canal este abierto a un tiempo dado. La línea continúa en la Fig. 24 A y B es el ajusta de las probabilidades experimentales de acuerdo con el teorema binomial. La gran concordancia entre las probabilidades estimadas y las calculadas es consistente con que los canales en el parche se abren y se cierran independientemente uno del otro y que la población es homogénea, tal como se ha documentado para el canal de Na^+ (Horn y col., 1984) y para el canal de K^+ de la rectificación tardía (Standen y col., 1985).

La reconstrucción de las corrientes macroscópicas a partir de los registros individuales mostró una cinética de activación tipo rectificador tardío, similar a la corriente promediada del axón de calamar (Llano y col., 1988). Además, esta corriente no presenta la inactivación rápida característica del músculo esquelético de rana (Adrian y col., 1970; Stanfield, 1970; Standen y col., 1985). Los primeros tres registros en cada panel de la Fig. 25 A-C corresponden a registros individuales a +40, 0 y -40 mV respectivamente; los trazos más inferiores corresponden a la corriente promediada de 100 a 150 registros individuales, las cuales tiene la apariencia de las corrientes macroscópicas del rectificador tardío. Estas corrientes promediadas llegan a su amplitud máxima a los 8.6 ± 1.6 ms ($n=4$) a -40 mV y, a los 4.2 ± 0.9 ms

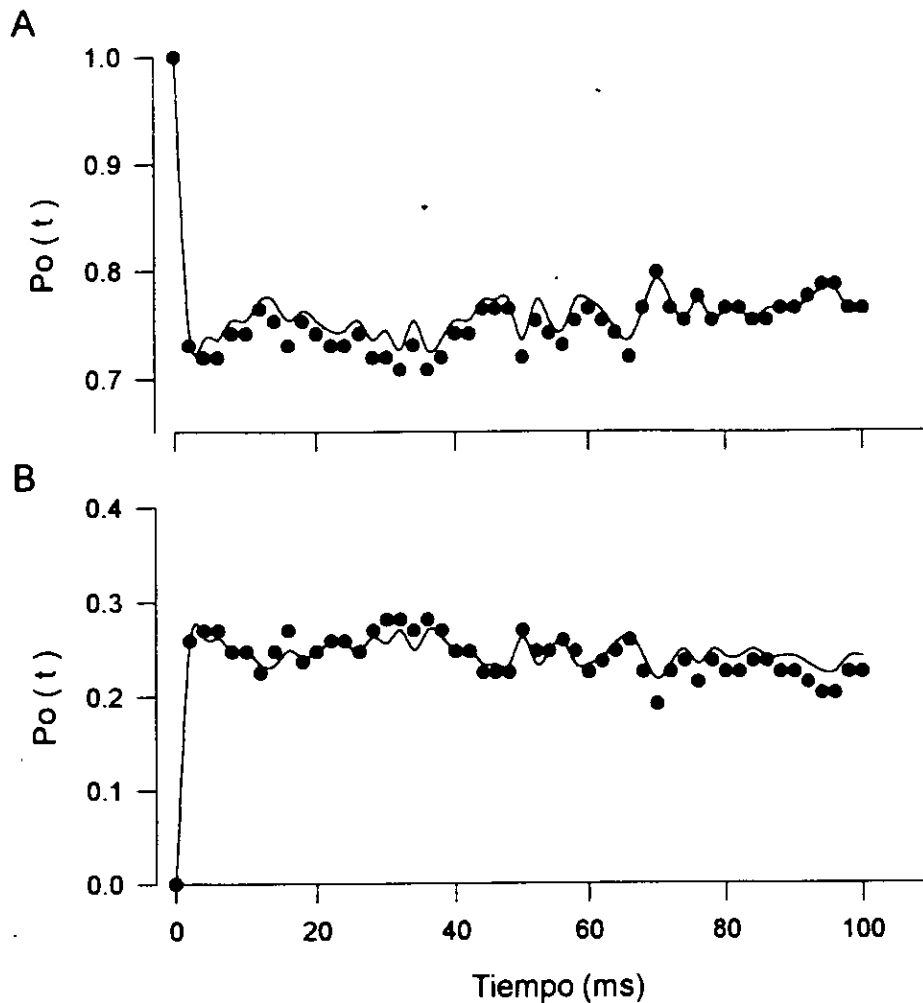


Fig. 24. Análisis binomial del mismo experimento mostrado en la fig. 23. Probabilidad de apertura como una función del tiempo. A y B, probabilidad de que 0 y 1 canal respectivamente estén abiertos como una función del tiempo. En cada caso los círculos representan los valores experimentales y la línea continua es la predicción binomial calculada a partir de la P_o usando la ecuación 12.

($n=5$) a +40 mV y, se mantienen a estos niveles durante todo el tiempo de la despolarización, de forma semejante a como sucede con

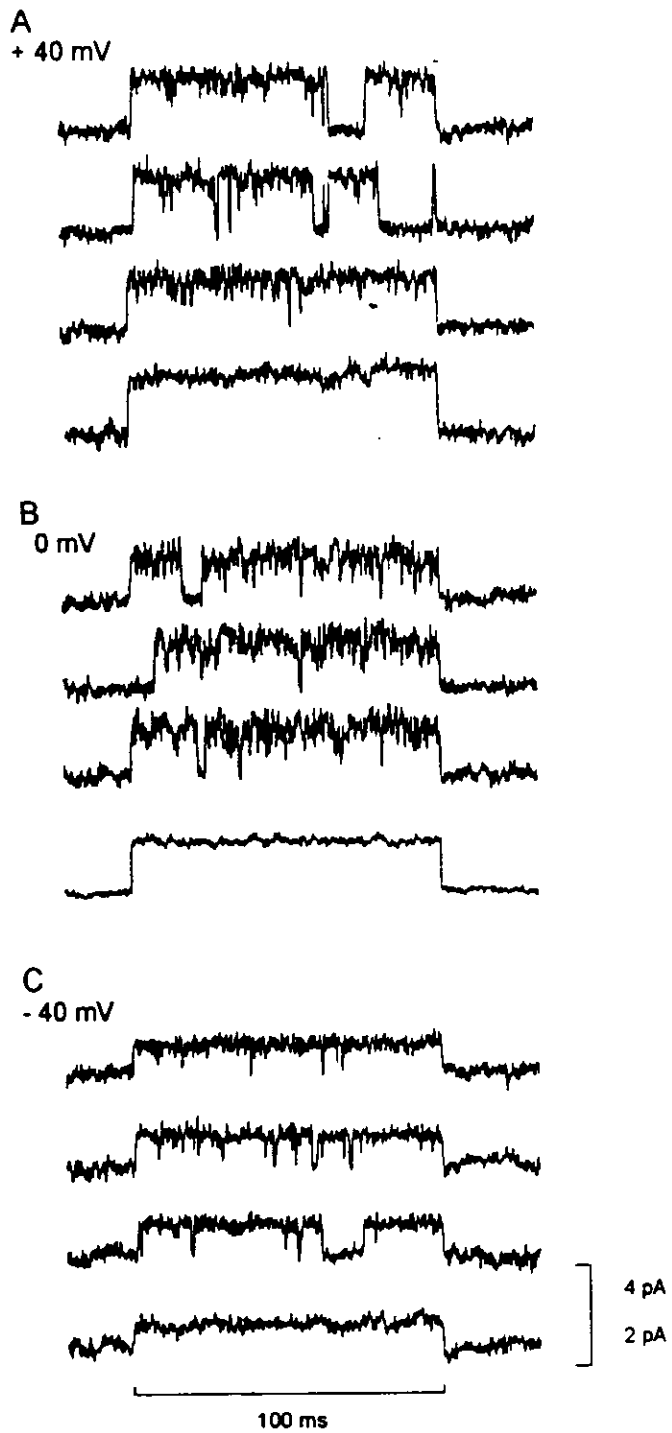


Fig. 25. Canales sin inactivación tipo "N". (A-C) Corrientes unitarias y la corriente promediada (el trazo más inferior en cada sección) resultante de los potenciales indicados. El potencial de mantenimiento fue de -100 mV. Las corrientes promediadas incluyen registros con y sin aperturas de los canales. La calibración de 4 pA corresponde a los registros individuales y la calibración de 2 pA a las corrientes promediadas. Ver pág. 117.

activación de las corrientes de K⁺ del rectificador tardío en el axón de calamar (Hogdkin y Huxley, 1952d; Llano y col., 1988).

La forma de las corrientes promediadas sugieren que ellas pueden ser ajustadas con una cinética de cuarto orden tipo Hodgkin-Huxley (Hodgkin y Huxley, 1952d):

$$I_{(t)} = I_{\max} [1 - \exp(-t/\tau_1)]^n, \quad (13)$$

con $n = 4$, donde $I(t)$ es la amplitud de la corriente al tiempo t , I_{\max} es la amplitud máxima de la corriente, τ_1 es la constante de tiempo para el proceso de activación. Los puntos en la Fig. 26A ilustran una corriente promediada a +40 mV y la línea continua es el mejor ajuste a los datos con la ecuación 13. Las constantes de tiempo obtenidas de los ajustes fueron dependientes del voltaje, declinando desde 5.225 ± 0.89 ms ($n=4$) a -40 mV hasta 0.152 ± 0.02 ms ($n=4$) a +40 mV.

Los canales presentaron el fenómeno de deactivación en función

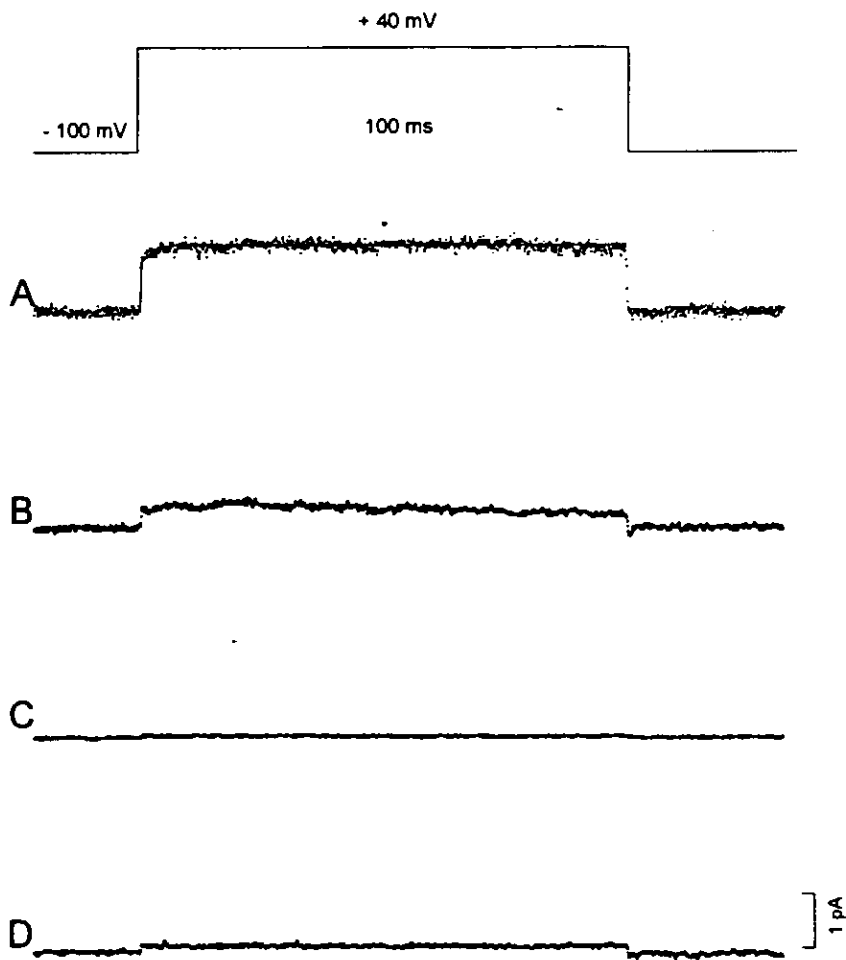


Fig. 26. Deactivación de los canales de la rectificación tardía. (A-D) corrientes promediadas obtenidas del mismo parche de membrana a +40 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. (A), corrientes obtenidas casi inmediatamente después de haber realizado el sello, los puntos son los datos experimentales y la línea continúa es el ajuste con la ecuación 13. La constante de activación fue de 0.142 ms. Corrientes promediadas obtenidas a los 5 min (B), a 30 min (C) y a 60 min (D) después de realizado el sello.

del tiempo ("run-down"). Así, a los 5 minutos los canales disminuyeron su P_o en casi el 80 % respecto a los registros

realizados inmediatamente después de haber realizado el sello, a tiempos mayores la P_o fue prácticamente de cero. La Fig. 26 muestra un ejemplo típico de este fenómeno, en la parte A se presenta la corriente promediada al inicio del experimento, en B a los 5 minutos (min), en C a los 30 min y en D a los 60 min después del registro inicial. Una vez que los canales entran en este estado (en todos los experimentos), nunca dieron evidencias de salir de él. Cuando los canales fueron expuestos a diferentes concentraciones de F^- su comportamiento cinético fue el mismo que en ausencia de este anión. Este tipo del rectificador tardío fue el canal que con más frecuencia se encontró en las vesículas del sarcolema del músculo esquelético; de 122 parches de membrana, este canal estuvo presente en 39 ocasiones.

Los histogramas de la distribución de los tiempos de apertura fueron ajustados a la suma de dos exponenciales (no se muestran los histogramas). Las constantes de tiempo fueron de 0.190 ± 0.020 y 2.332 ± 0.036 ms ($n=8$) a -40 mV y, de 0.289 ± 0.042 y 6.670 ± 0.018 ms ($n=8$) a $+40$ mV. Estos resultados sugieren que los canales tienen por lo menos dos estados abiertos, sin embargo, ello puede resultar de la contribución de más de un canal en los registros (Llano y col., 1988; Colquhoun y Hawkes, 1995). Una estimación del tiempo

promedio de apertura, cuando existe más de un canal en la membrana, se obtiene mediante:

$$\tau_o = \frac{\sum_j t_j}{n_c}, \quad (14)$$

donde n_c es el número total de transiciones del estado abierto al cerrado, j y t_j tienen el mismo significado que para la ecuación 10 (Fenwick y col., 1982; Standen y col., 1985). Los valores de tiempo abierto (tabla 5) de los mismos experimentos fueron de 3.03 ± 0.12 ms ($n=8$) a -40 mV y de 5.68 ± 1.11 ms a $+40$ mV ($n=8$). La distribución de los tiempos cerrados mostró que el canal debe de transitar en por lo menos dos estados cerrados antes de que pase al estado abierto.

Canales con inactivación tipo N

Bajo condiciones iónicas y de registro similares, varios experimentos revelaron otro tipo de canal. Este canal difiere del descrito anteriormente en sus valores de conductancia, de sus propiedades cinéticas y de su probabilidad de estar abierto. La actividad de este canal a diferentes potenciales de membrana se muestra en la Fig. 27A. La relación corriente-voltaje de 6 a 7

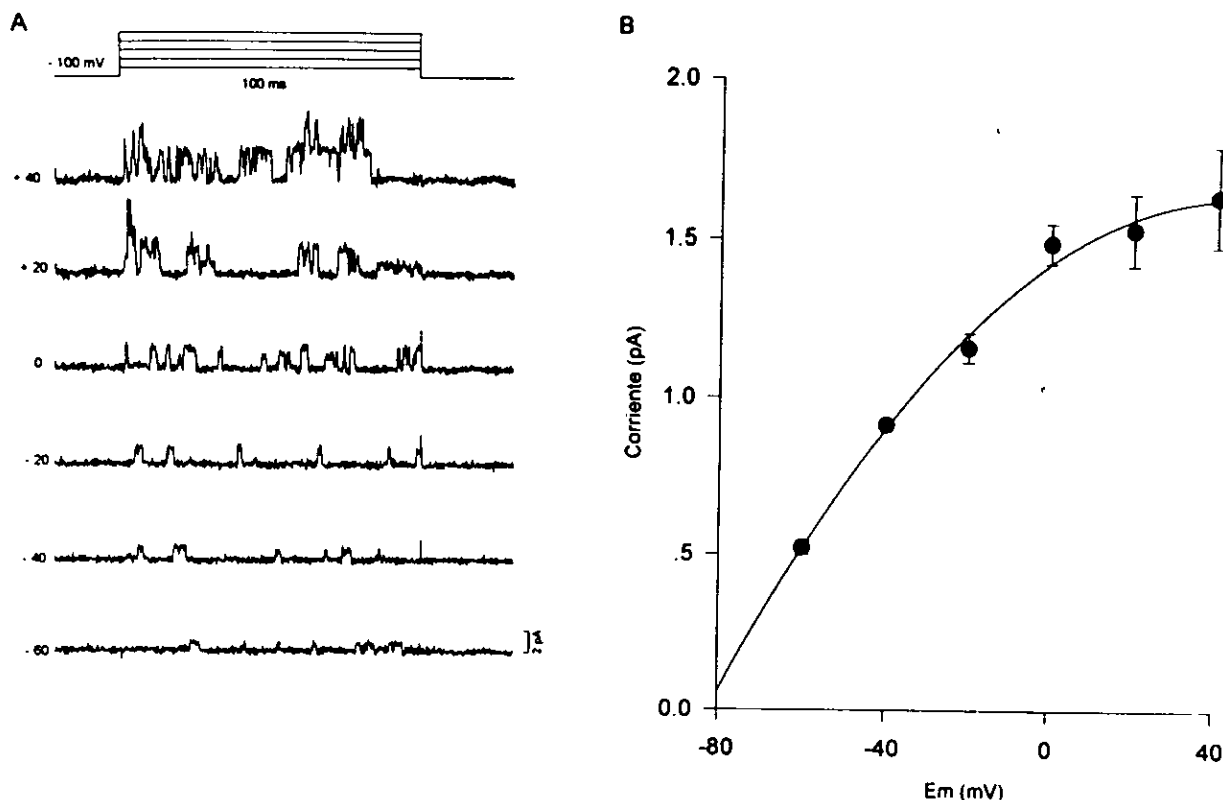


Fig. 27. (A) Dependencia al voltaje de las corrientes unitarias de K^+ ; la solución de la pipeta contuvo 2.5 mM de K^+ , el potencial de membrana fue escalonado desde -100 mV (voltaje de mantenimiento) a los potenciales indicados a la izquierda de cada registro. El esquema superior muestra los pulsos de voltaje, así como la calibración del tiempo. Los datos fueron filtrados a 2kHz y muestreados a 10 kHz. La resistencia del sello fue de 50 $G\Omega$. (B) Relación corriente-voltaje de experimentos similares a los mostrados en A. Cada círculo es el promedio de 6-7 experimentos; las barras verticales son el error estándar, donde ellas no se observan, es que el E.S. es dos veces más pequeño que el tamaño del símbolo.

experimentos similares es mostrada en la Fig. 27B; a -60 mV las corrientes empiezan a registrarse, por abajo de este voltaje las corrientes son indistinguibles del ruido. La relación corriente voltaje no es lineal, el potencial de inversión extrapolado es de -88 ± 2.8 mV (n=6). La conductancia cuerda fue de 19.33 ± 0.023 (n=6) y de 12.90 ± 1.30 (n=7) a -60 y +40 mV respectivamente.

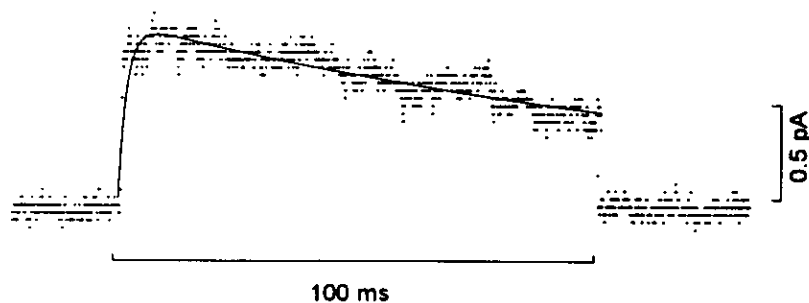


Fig. 28. Corriente promediada de 150 registros individuales del mismo experimento mostrado en la fig. 27, a una despolarización de +40 mV. Los puntos son los datos experimentales y la línea continua es el ajuste a una cinética tipo Hodgkin-Huxley (ecuación 13 más un término exponencial de caída). La constante de activación fue 1.81 ms y la constante de inactivación de 32.17 ms.

Las corrientes promediadas a partir de los registros individuales (Fig. 28) tienen la apariencia de las corrientes macroscópicas del rectificador tardío registradas del músculo esquelético de rana (Adrian y col., 1970; Stanfield, 1970). Las

corrientes macroscópicas del rectificador tardío en el músculo esquelético disminuyen paulatinamente durante un pulso despolarizante (Adrian y col., 1970; Stanfield, 1970) y las corrientes promediadas también declinan lentamente durante un pulso despolarizante (Fig. 28). Esta disminución paulatina de la corriente se debe a un proceso lento de inactivación (Standen y col., 1985). Sin embargo, en estos canales, el mecanismo por el cual sucede esta disminución muy probablemente ocurra por una disminución en la probabilidad de apertura de los canales en función del tiempo (Fig. 29), muy similar a como sucede para un canal de calcio (Carbone y Lux, 1984).

Los canales de Na^+ y de K^+ de la rectificación tardía a nivel unitario presentan un comportamiento independiente (Horn y col., 1984; Standen y col., 1985). En esta serie de experimentos, los parches de membrana contuvieron varios canales, investigamos si estos canales también presentaban esta independencia. El análisis binomial fue consistente con una población homogénea y, además, los canales se cierran y se abren independientemente uno del otro (Fig. 29).

Para canales que se activan con el voltaje, la latencia que existe entre que se inicia una depolarización, hasta el momento en que se abre por primera vez un canal, dará información acerca de

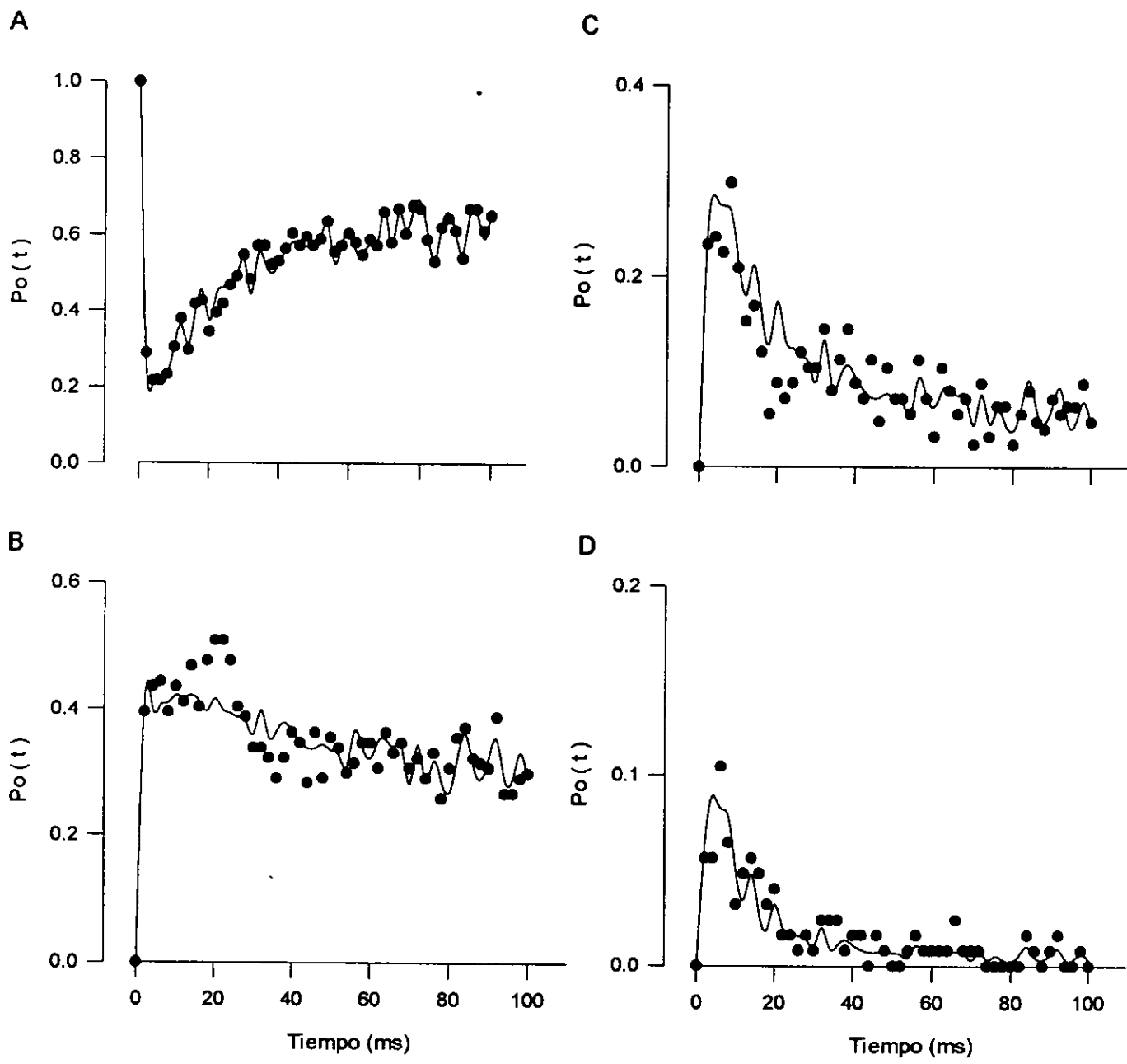


Fig. 29. Análisis binomial del experimento mostrado en la figura 27. (A-D) cada punto representa la probabilidad de que 0, 1, 2, y 3 canales estén abiertos a un tiempo dado; la línea continua es la predicción binomial.

cuantos estados cerrados debe de transitar el canal para poder abrirse (Patlak y Horn, 1982; French y Horn; 1983; Standen y col., 1985; Shao y Papazian, 1993). La Fig. 30 muestra dos histogramas de la latencia a la primera apèrtura a potenciales de -20 mV (Fig. 30A) y +40 mV (Fig. 30B). Es evidente en estos histogramas un pico a tiempos mayores que cero, lo que indica que el canal no se abre instantáneamente. En otras palabras, el canal debe de transitar por más de un estado cerrado antes de entrar al estado abierto. La fig. 30 muestra que los canales llegan más rápidamente al estado abierto conforme la membrana es más depolarizada. Del experimento ilustrado en la Fig. 30, el promedio de la latencia fue 29.30 ms a -20 mV y de 5.85 ms a +40 mV. Además, el histograma a +40 mV está más comprimido , indicando la ausencia relativa de aperturas tardías después de la despolarización. La línea continua representa el mejor ajuste de la distribución de las latencias para un modelo de tres estados, en el que dos estados cerrados preceden al estado abierto. En este modelo, la función de densidad de probabilidad para la distribución de las latencias se obtiene como:

$$f(t) = \frac{R_1 R_2}{R_1 - R_2} [\exp(-R_2 t) - \exp(-R_1 t)] \quad (15)$$

La relación entre R_1 , R_2 y la constante de velocidad k_i está

$$\text{dada por : } R_1, R_2 = [k_1 + k_2 + k_{-2} \pm \sqrt{(k_1 + k_2 + k_{-2})^2 - 4 k_1 k_2}] / 2$$

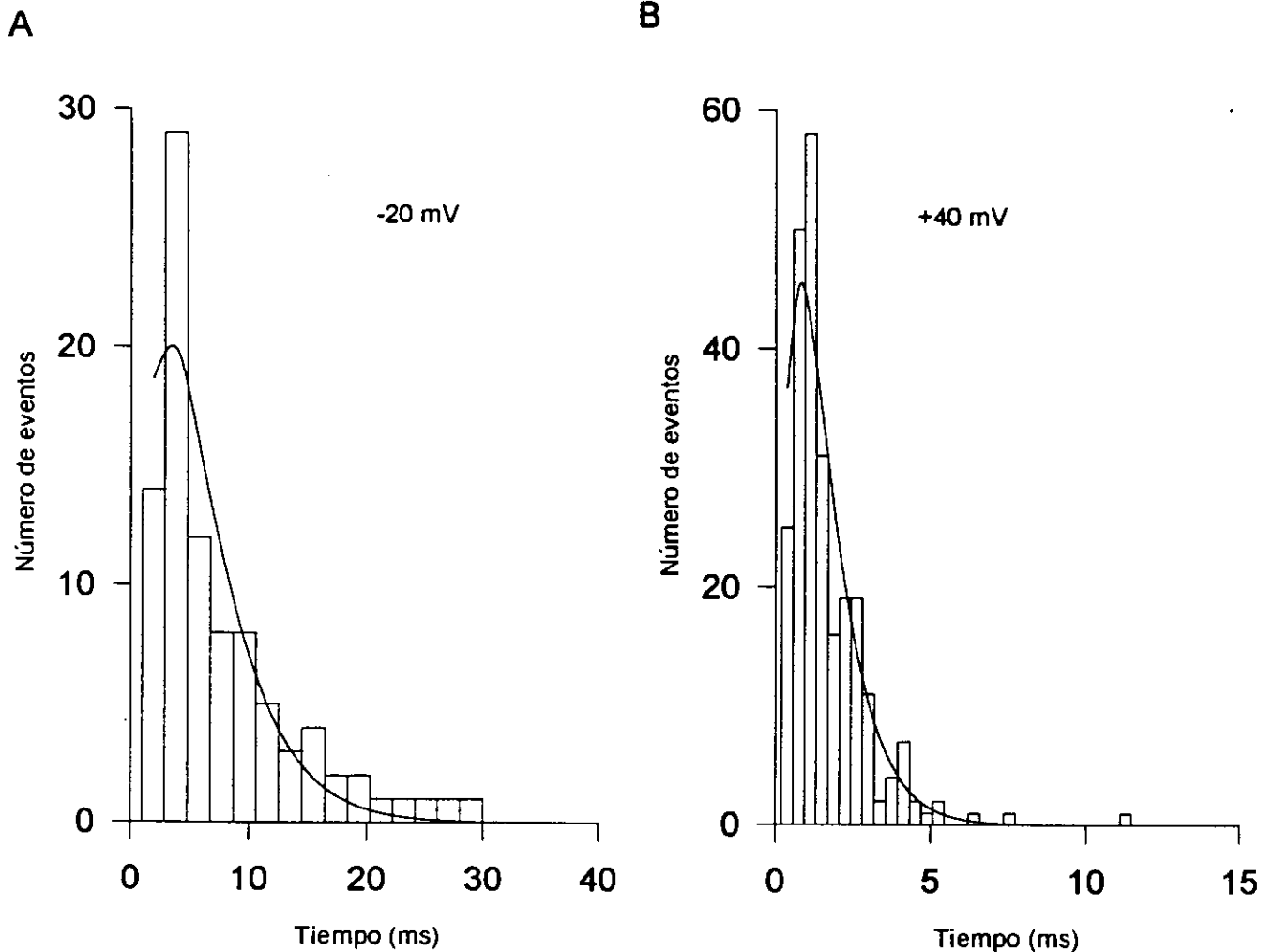


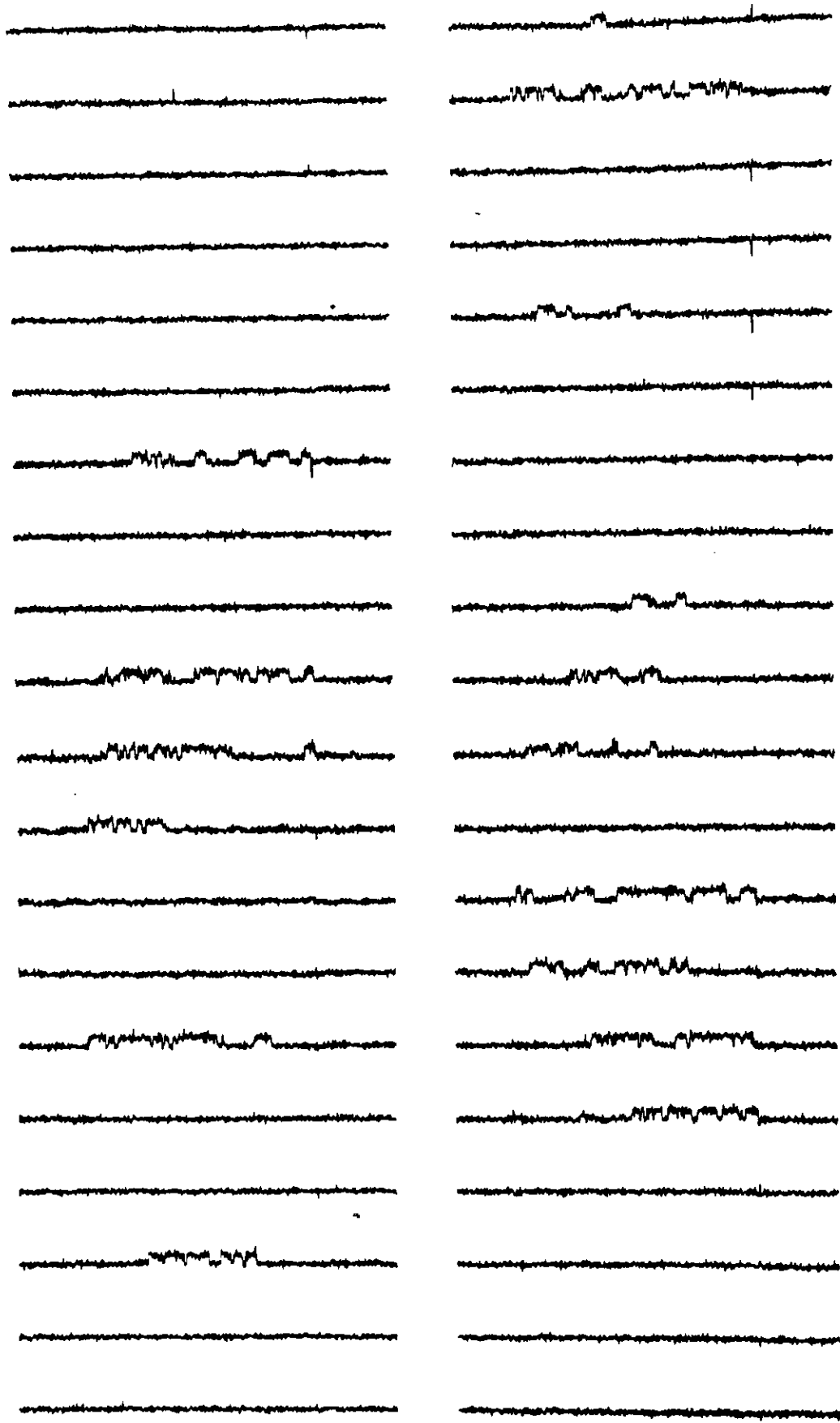
Fig. 30. Latencia a la primera apertura. (A), histograma de la latencia a -20 mV. La curva se obtuvo con la ec. (15) con $R_1=0.870 \text{ ms}^{-1}$, $R_2=0.707 \text{ ms}^{-1}$. La latencias fueron medidas de un parche que contenía tres canales. (B), histograma de la latencia a +40 mV del mismo parche como en A, $R_1=3.362 \text{ ms}^{-1}$, $R_2=2.823 \text{ ms}^{-1}$. Dada la presencia de varios canales, la latencia puede estar sobreestimada (ver discusión).

(Patlak y Horn, 1982; Standen y col. 1985). Similar a las observaciones de Standen y col., (1985) el modelo predice un pico inicial, sugiriendo la presencia de dos estados cerrados. Sin embargo, el modelo predicé una latencia que incrementa más rápidamente que los datos experimentales, por lo que un esquema con más de dos estados cerrados es necesario.

En cada uno de los registros se investigó el efecto del F^- aplicado a la cara interna del parche de membrana. La P_o no se modificó, en los registros control fue de 0.60 ± 0.021 ($n=8$), mientras que en presencia del F^- , en los mismos experimentos, fue de 0.66 ± 0.15 . La amplitud de la corriente fue de 1.63 ± 0.20 pA y 1.54 ± 0.022 pA en los experimentos control y en presencia de este anión respectivamente.

Canales de baja amplitud

Un tercer tipo de canal de potasio activado por el voltaje estuvo presente en las membranas del músculo esquelético. La Fig. 31 presenta una serie registro individuales de las corrientes activadas a una depolarización de +40 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Este tipo de corrientes unitarias sólo fueron registradas cuando el voltaje de membrana fue mayor a 0 mV.



]

100 ms

Fig. 31. Canales de K^+ de baja amplitud. Los registros con y sin apertura de canales tuvieron un ordenamiento altamente no aleatorio. Cuarenta registros consecutivos (de arriba hacia abajo e iniciando en la columna de la izquierda) de una serie de 150 depolarizaciones a +40 mV. El intervalo entre los pulsos fue de 1 s. Filtro 2 kHz; velocidad de muestreo 10 kHz; $[K^+]_o = 2.5$ mM; resistencia del sello 40 $G\Omega$. Ver pág. 129.

La actividad de los canales sólo se registró en cuatro parches de membrana de un total de 122. La conductancia unitaria a 0 mV fue de 8.11 ± 0.02 pS ($n=4$) y a +40 mV fue de 6.90 ± 0.178 pS ($n=4$). Los registros sin apertura de canales presentan una clara tendencia a agruparse más que a distribuirse entre los registros con apertura de canales, durante pulsos consecutivos (Fig. 31). El intervalo entre los pulsos fue de 1 s. El análisis de corridas mostró que los agrupamientos con y sin apertura de canales sucede de forma altamente no aleatoria, muy similar a como sucede con los dos canales de la rectificación tardía descritos previamente.

El trazo de la Fig. 32 corresponde a la corriente promediada obtenida del ensamblaje de todos los registros que presentaron aperturas con este tipo de canal. En el experimento mostrado en la Fig. 32, la aperturas de los canales suceden mucho tiempo después de que ha iniciado la despolarización y con una probabilidad de apertura muy baja (en este parche, sólo 40 de 150 registros

individuales presentaron apertura de canales a este voltaje). La reconstrucción de las corrientes macrocópicas presenta un gran retardo en el curso temporal de activación.

Finalmente, el F^- no tuvo efectos sobre el comportamiento cinético de este tipo de canales.

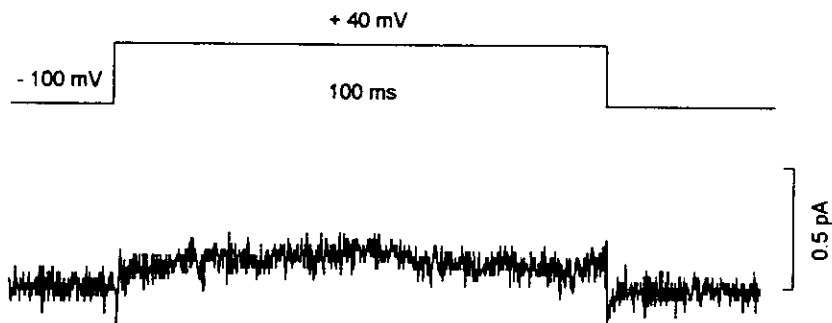


Fig. 32. Corriente promediada que incluye sólo pulsos que presentaron actividad de canales (40 registros individuales).

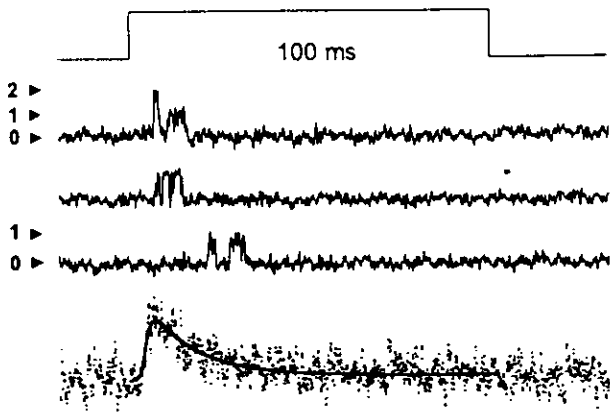
Canales de K^+ similares al canal tipo A

La Fig. 33 muestra registros de corrientes salientes transitorias que fluyen a través de un sólo canal, registradas de un parche de membrana durante pulsos despolarizantes a 0, +20 y +40 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. La actividad de los canales fue registrada bajo las mismas condiciones iónicas y de

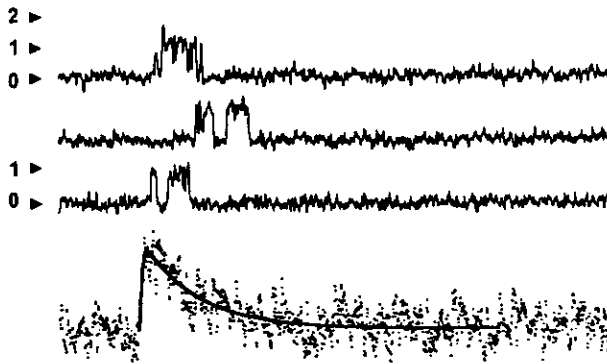
registro que durante la caracterización de los canales de la rectificación tardía . Con esta situación experimental, todos los parches de membrana registrados tuvieron al menos dos o tres canales activos. Las aperturas ocurren en bursts breves de sólo algunas aperturas. Las corrientes transitan rápidamente entre la línea de base al nivel de apertura, de tal manera que las corrientes unitarias pueden ser fácilmente resueltas. Esto se puede observar del histograma de amplitud punto a punto de 150 registros como los que se muestran en la Fig. 33C, el cual puede ser ajustado por la suma de tres distribuciones Gaussian (Fig 33D). La Fig. 33d es una amplificación de la Fig. 33D para observar en detalle estas distribuciones. La corriente estimada del ajuste fue de 2.27 pA. La Fig. 33A (a 0 mV) y la Fig. 33B (a +20 mV) muestran registros del mismo parche. Los histogramas de amplitudes semejantes a los que se muestran en la Fig. 33D fueron usados para estimar la corriente unitaria a diferentes voltajes.

La Fig. 33E presenta la relación corriente-voltaje de 5-8 experimentos en donde se registró la actividad de canales similares a los ilustrados en 33 A-C. La relación corriente-voltaje tiene un comportamiento lineal de -20 a +40 mV, sin embargo a -40 mV este comportamiento cambia ligeramente. El potencial de inversión extrapolado fue de -90 mV. La conductancia unitaria expresada

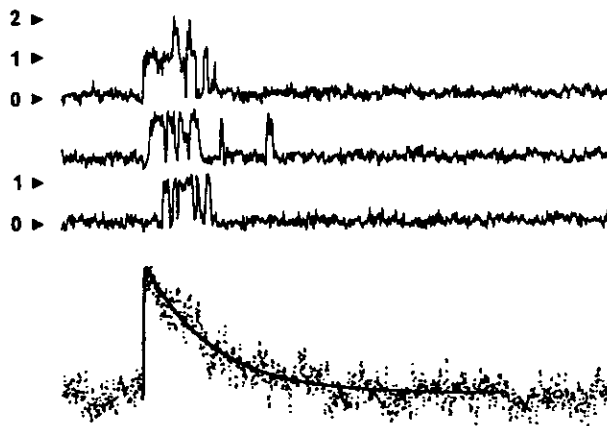
A 0 mV



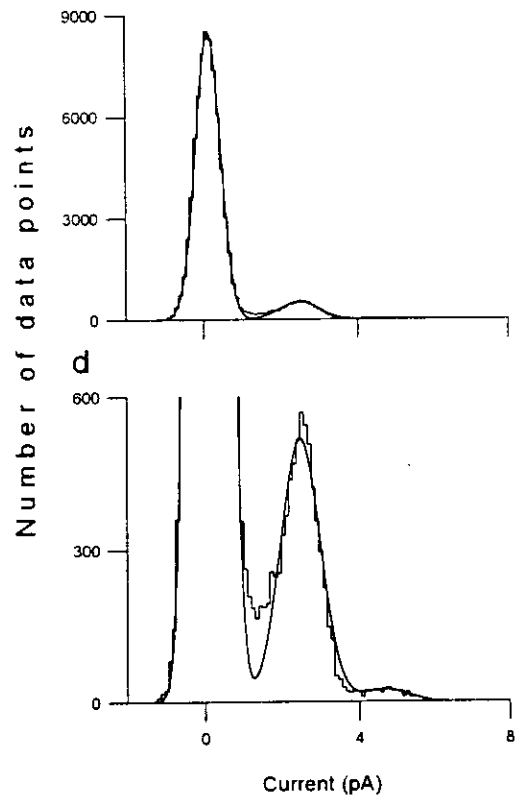
B +20 mV



C +40 mV



D



E

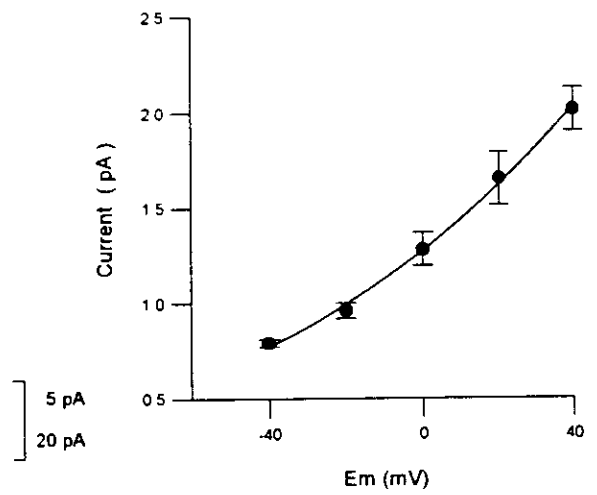


Fig. 33. Propiedades de las corrientes de K^+ salientes y transitorias. (A) El registro más superior muestra la duración del pulso de voltaje desde un potencial de mantenimiento de -100 a 0 mV. Las puntas de flecha numeradas con 0, 1 y 2 a la izquierda, indican el número de canales abiertos. El trazo más inferior presenta la corriente promediada de 100 registros, la línea sólida corresponde al ajuste de los datos con la ecuación 16. Los parámetros del ajuste (constante de activación, constante de inactivación): 1.22 ms, 15.72ms. La calibración de 5 pA corresponde a los trazos de las corrientes unitarias y la calibración de 1.2 pA corresponde a las corrientes promediadas. (B) y (C) Corrientes unitarias del mismo parche como en A a un pulso despolarizante a +20 y +40 mV respectivamente. En cada panel el trazo más inferior es la corriente promediada. Los parámetros de ajuste en B: 0.53 ms, 14.42 ms; y, en C: 0.17 ms, 16.60 ms. (D) y (d) Histograma de amplitud de todos los puntos-datos del conjunto de pulsos a +40 mV. La curva es la suma de tres distribuciones Gaussianas. Los parámetros (área, media y desviación estándar) fueron: 297.1, 0, 0.007; 209.5, 2.27, 0.022; 116.2, 4.45, 0.034. (E) Relación corriente-voltaje de experimentos similares a los ilustrados en A-C. Las amplitudes de la corriente fueron obtenidas de los ajustes Gaussianos a los histogramas de amplitud. Ver pág. 133.

como la conductancia cuerda (γ) fue de 16.93 ± 1.41 pS ($n=5$) y de 17.3 ± 2.54 pS ($n=8$) a -40 mV y +40 mV respectivamente. No obstante, la Prueba-t de Student no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las conductancias cuerda a -40 y +40 mV. Un ajuste lineal a los datos a voltajes de -20 a +40 mV dió una conductancia pendiente de 18.4 pS.

Los canales se abren con latencias breves después de iniciado el pulso y las aperturas ocurren sólo al inicio del pulso,

posteriormente el canal pasa a un estado cerrado hasta el final del pulso (Fig. 33, A-C), debido a que el canal rara vez se reabre, este estado cerrado se ha identificado como un estado inactivado (Zagotta y Aldrich, 1990). Los trazos más superiores en cada panel de la Fig. 33 A-C corresponden a registros individuales seleccionados; los trazos más inferiores corresponden a la corriente promediada de 100 a 150 registros. El ensamblaje de las corrientes tienen la apariencia de las corrientes macroscópicas tipo A (Camacho y col., 1996; Solc y col., 1987; Taylor, 1987). La forma de las corrientes promediadas sugiere que ellas pueden ser ajustadas por una ecuación de la forma:

$$I_{(t)} = I_{\max} [1 - \exp(-t/\tau_a)]^n \exp(-t/\tau_h), \quad (16)$$

con $n = 4$, donde $I(t)$ es la amplitud de la corriente al tiempo t , I_{\max} es la amplitud máxima de la corriente, τ_a es la constante de tiempo para el proceso de activación y τ_h es la constante de tiempo para la inactivación (Connor y Stevens, 1971; Smith, 1978). La constante de tiempo τ_a fue dependiente del voltaje, declinando de 1.225 ms (a 0 mV) a 0.176 ms (a +40 mV). La constante de inactivación no mostró dependencia al voltaje, siendo de 15.72 y 16.60 ms a 0 y +40 mV respectivamente. τ_h estimada de las corrientes

promediadas de diferentes parches varió en un rango de 11.43 a 19.32 ms a +40 mV. Sin embargo, en estos experimentos τ_h no exhibió alguna dependencia al voltaje. La tabla 6 resume los valores promedio de activación e inactivación para diferentes experimentos.

Tabla 6. Activación e inactivación de las corrientes de K⁺

Potencial (mV)	ACTIVACION (ms)	INACTIVACION (ms)	(N)
-20	2.775 ± 0.276	12.995 ± 0.014	8
0	1.614 ± 0.011	14.015 ± 1.750	8
+20	1.031 ± 0.007	10.522 ± 1.940	7
+40	0.504 ± 0.276	13.751 ± 5.358	6

Promedio ± E.S.

Los experimentos a nivel de canales únicos dan evidencia de que el agrupamiento de registros con y sin apertura de los canales en pulsos consecutivos ocurre de manera no aleatoria. La Fig. 34 muestra treinta registros consecutivos de una serie de 150 despolarizaciones de 100 ms a +40 mV desde un potencial de

mantenimiento de -100 mV, el intervalo entre los pulso fue de 1 s. Los registros sin apertura de canales (registros vacíos) muestran una tendencia a agruparse más que a distribuirse aleatoriamente entre los registros con aperturas. Los canales entran en un proceso de inactivación lenta en el cual son incapaces de abrirse por tiempos relativamente prolongados (Horn y col., 1984; Standen y col., 1985; Zagotta y Aldrich, 1990). El análisis de corridas mostró un patron de no aleatoriedad, la cual está subestimada ya que los parches contenía varios canales (Horn y col. , 1984). En el experimento mostrado en la Fig. 34 hubo 52 registros vacíos y 24 corridas. Para esta serie de eventos $Z = 8.23$. Si los eventos fueran ordenados aleatoriamente, la probabilidad de observar este valor de Z sería $<10^{-5}$. Este proceso de inactivación modifica el número de canales activos, de tal forma que ante una nueva despolarización ellos son incapaces de abrirse. En dos experimentos, la inactivación lenta no se observó cuando el intervalo entre los pulsos fue mayor a 7 s (no se muestran los datos).

La presencia de la inactivación lenta y más de un canal en el parche hace difícil obtener una estimación precisa de la probabilidad de apertura (P_o) del canal en función del tiempo o en función del potencial de membrana. A pesar de estas limitaciones,

la P_o fue calculada de acuerdo a la ecuación 10. La Fig. 35 muestra

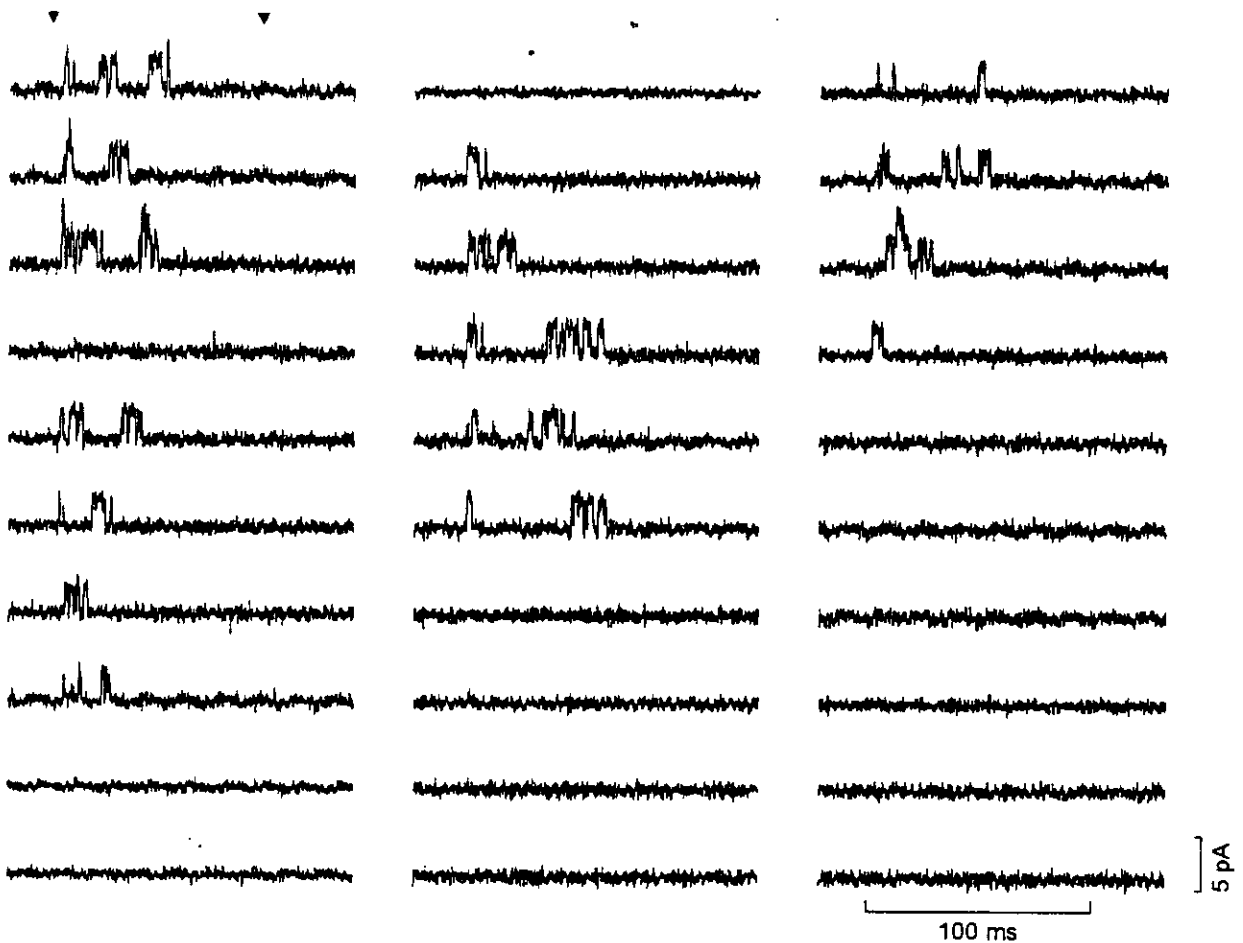


Fig. 34. Treinta registros consecutivos (de arriba hacia abajo en cada columna, iniciando en la columna de la izquierda) mostrando agrupamiento de registros con y sin aperturas, de una serie de 150 despolarizaciones a +40 mV. Los registros son del mismo parche como en la Fig. 33 C. El intervalo interpulso fue 1 s.

una gráfica de P_o contra el potencial de membrana de cuatro experimentos diferentes. La P_o presenta una gran variabilidad de un

parche a otro, pero es claro que la P_o incrementa sus valores conforme la membrana se depolariza. Los valores tan bajos de la P_o son debidos a que durante el cálculo de la P_o se incluyeron los registros sin apertura de canales. Cuando se realizó una segunda estimación de la P_o (de estos mismos experimentos) sólo de

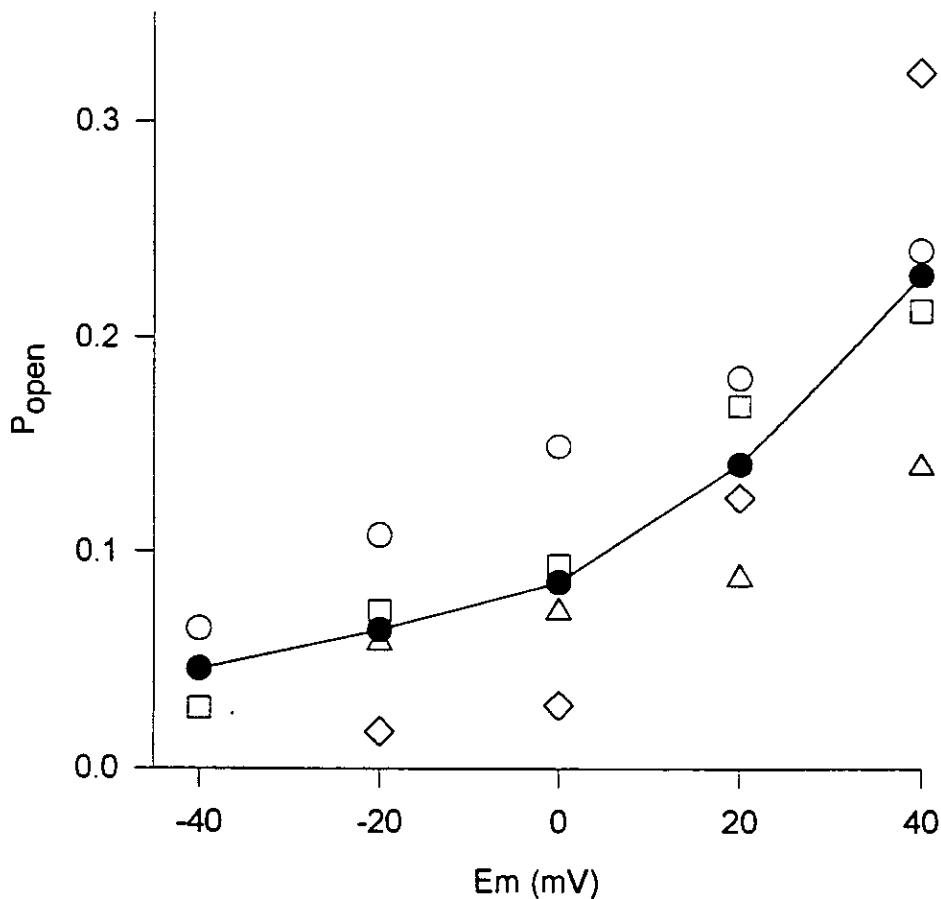


Fig. 35. Probabilidad de apertura vs. potencial de membrana. La probabilidad de que un canal este abierto fue determina con la ec. (10). Para cada potencial de membrana, se analizaron 10 s efectivos de registro. Los diferentes símbolos vacíos representan datos de cuatro parches diferentes. Los círculos llenos son el promedio de los cuatro experimentos.

registros con aperturas, la P_o se incrementó aproximadamente al doble (no se muestran los datos), no obstante la dependencia al voltaje no se modificó.

Mediante el análisis binomial, en estos parches que contenían varios canales similares al Tipo A, se investigó si la población de los canales era homogénea e independiente. La Fig. 36 muestra tres trazo representativos en donde el número máximo de canales abiertos a un tiempo dado fue dos. Los puntos en la Fig. 36 A, B y C muestran el cálculo de la probabilidad de tener exactamente 0, 1 y 2 canales abiertos respectivamente. La línea continua en la Fig. 36 A, B y C es el ajusta de las probabilidades experimentales de acuerdo con el teorema binomial. El modelo predice con bastante precisión los datos experimentales, por tanto, además de que los canales comprenden una población homogénea, ellos tienen un comportamiento independiente (Horn y col., 1984; Standen y col., 1985).

Los histogramas de la distribución de los tiempos de apertura a todos los potenciales de membrana explorados (-40 a +40 mV) requirieron de dos exponenciales para obtener el mejor ajuste de estos histogramas. La Fig.37 A y B presenta dos histogramas típicos de la distribución del tiempo abierto de los canales activados por pulsos a -40 mV y +20 mV respectivamente. Las

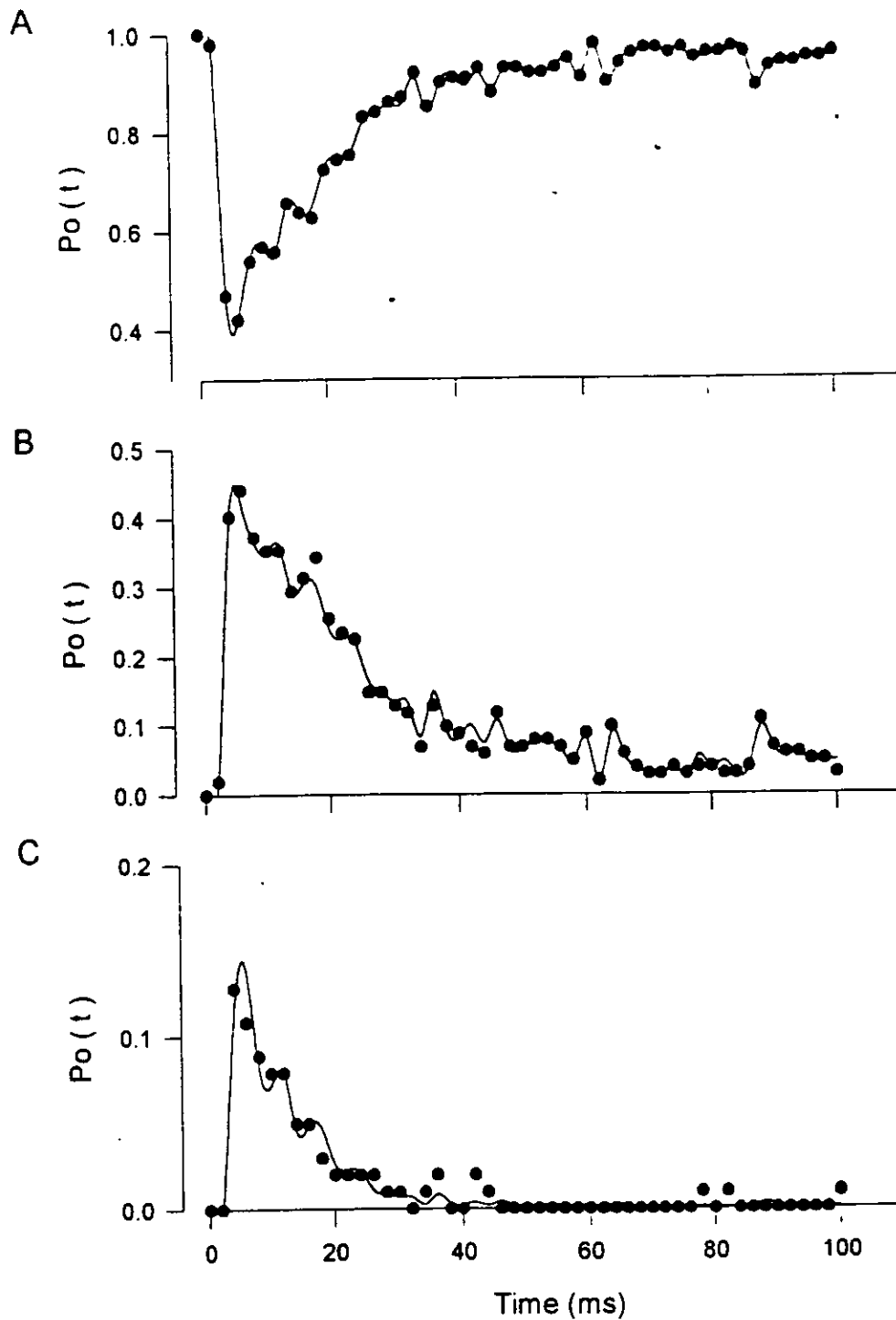


Fig 36. Análisis binomial del experimento ilustrado en la Fig. 33C. El parche contuvo 2 canales. (A-C), los puntos dan el valor de la probabilidad de que exactamente 0, 1 y dos canales respectivamente estuvieran abiertos en función del tiempo y la línea continua es la predicción binomial utilizando la ecuación (4).

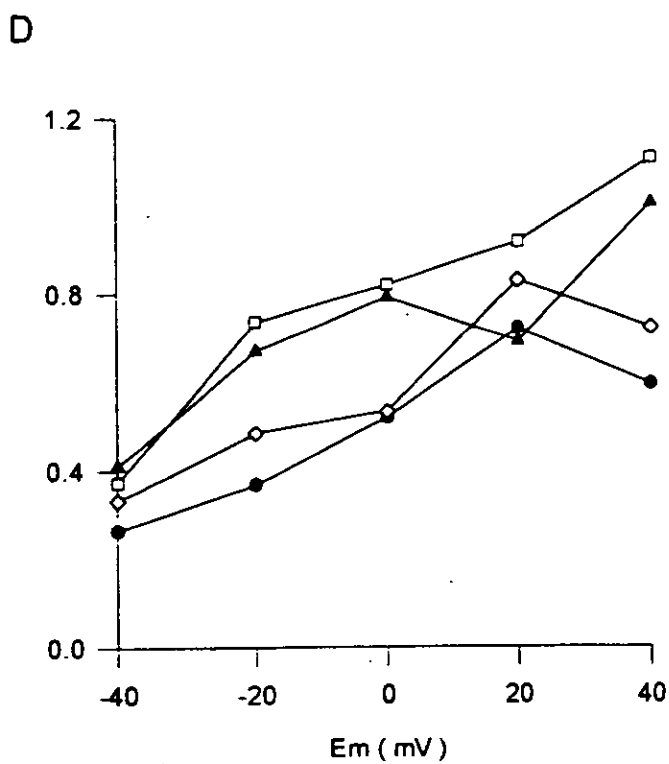
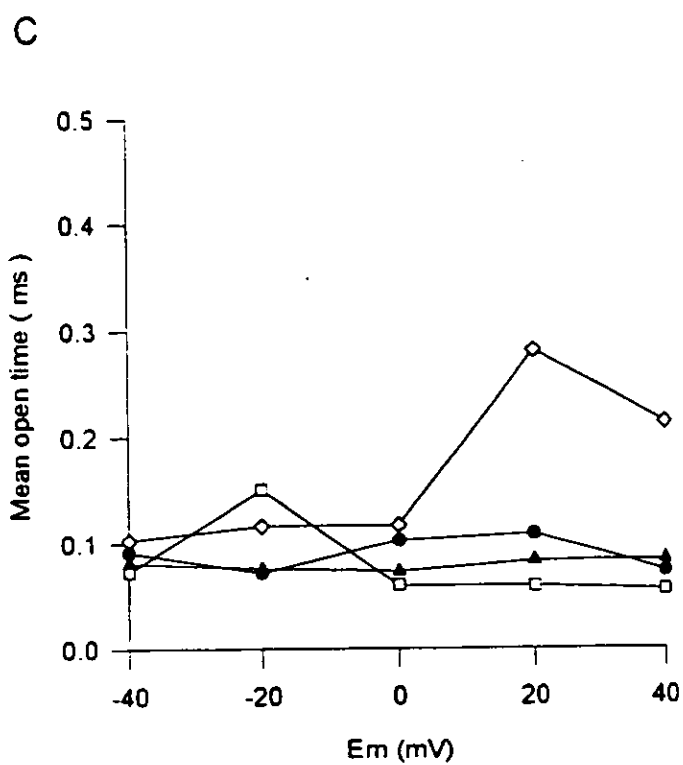
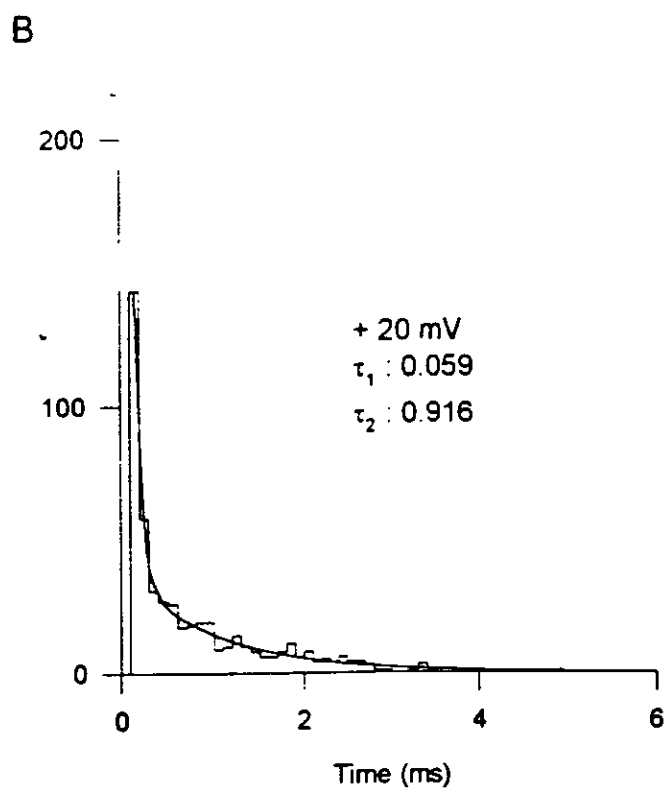
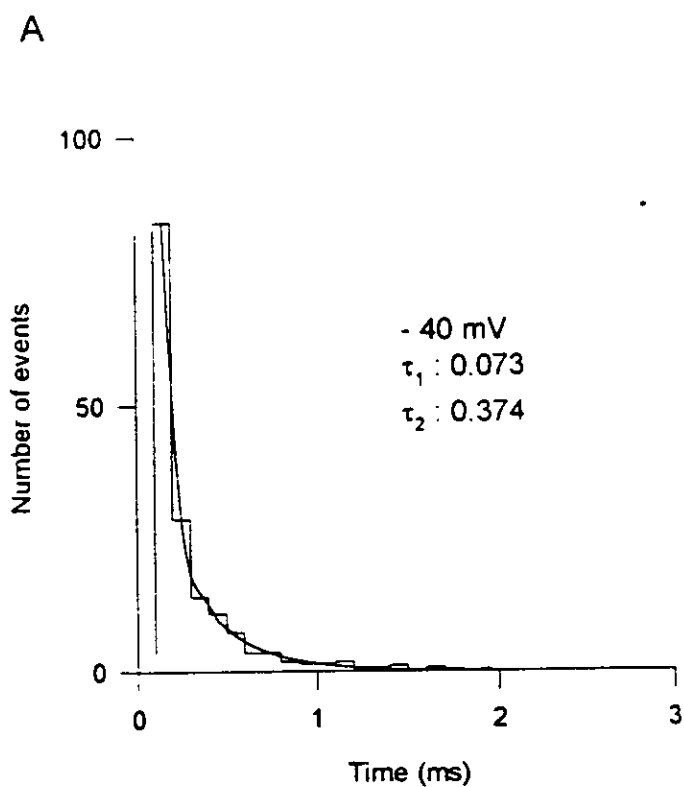


Fig. 37. Determinación de la distribución del tiempo abierto. (A) Un ejemplo del histograma del tiempo abierto durante pulsos de voltaje a -40 mV. La línea sólida corresponde al ajuste con dos exponenciales, las constantes de tiempo fueron 0.073 y 0.374 ms. (B) Histograma del tiempo abierto durante a $+20$ mV, ajustado con dos exponenciales. Las constantes de tiempo fueron 0.059 y 0.916 ms. (C) Valores de τ_1 se graficaron como una función voltaje. (D) Valores de τ_2 se graficaron como una función del voltaje. C-D, los símbolos diferentes representan datos de cuatro parches diferentes. Ver pág. 142.

constantes de tiempo fueron de 0.073 y 0.374 ms a -40 mV y de 0.059 y 0.916 ms a $+20$ mV. Estos resultados concuerda con la idea de que los canales tienen al menos dos estados abiertos, sin embargo, esto puede deberse a la presencia de más de un canal en la membrana (Llano y col., 1988). El tiempo promedio de apertura de los canales presenta mucha variabilidad de un parche a otro (ver Tabla 7). En la Fig. 37 C y D se graficaron las constantes de tiempo abierto resultantes, τ_1 y τ_2 , respectivamente, en función del potencial de membrana de cuatro experimentos diferentes. τ_1 no presenta ninguna dependencia al voltaje, mientras que τ_2 incrementa con la despolarización de la membrana. El incremento en el tiempo abierto (τ_2) de -40 mV a $+40$ mV fue de aproximadamente el 33%. La Fig. 38 ilustra una gráfica del promedio del tiempo abierto, τ_0 , calculado con la ecuación 14, en función del potencial de membrana.

La τ_o muestra una incremento en su dependencia al voltaje de casi el 50% de -40 mV a +40 mV. Los puntos representan el promedio de los mismos experimentos mostrados en la Fig. 37.

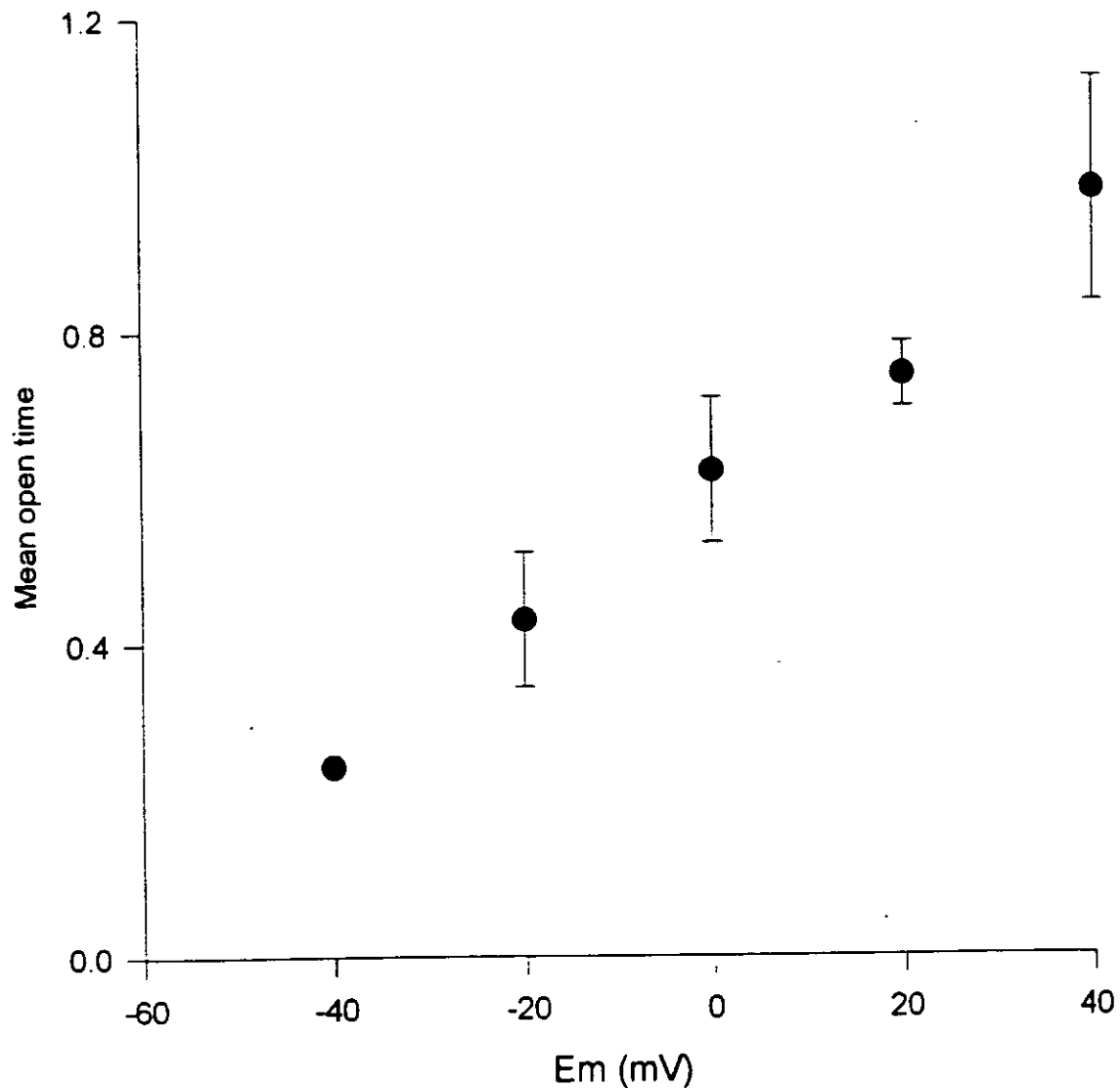


Fig. 38. Tiempo promedio en el estado abierto vs. potencial de membrana. La duración promedio en el estado abierto fue calculado con la ec. (14). Cada punto representa el promedio de cuatro experimentos y las barras verticales el error estándar.

Los histogramas de los tiempos cerrados fueron ajustados a dos o tres exponenciales. Las dos constantes de tiempos cerrados más

Tabla 7. Tiempos abierto y cerrado

TIEMPO ABIERTO									
Experimentos									
(mV)	1			2			3		
	τ_1	τ_2	τ_0	τ_1	τ_2	τ_0	τ_1	τ_2	τ_0
-40	0.073	0.374	0.256	0.075	0.409	0.113	0.103	0.332	0.228
-20	0.141	0.738	0.550	0.076	0.672	0.389	0.097	0.486	0.351
0	0.056	0.818	0.731	0.073	0.790	0.504	0.102	0.564	0.629
+20	0.059	0.916	0.780	0.095	0.856	0.695	0.281	0.829	0.737
+40	0.050	1.292	1.164	0.078	1.004	0.945	0.231	0.724	0.820

TIEMPO CERRADO									
Experimentos									
(mV)	1			2			3		
	τ_1	τ_2	τ_3	τ_1	τ_2	τ_3	τ_1	τ_2	τ_3
-40	0.257	6.942	123.9	0.258	11.83	98.65	0.289	4.548	81.45
-20	0.293	5.087	64.30	0.277	10.15	79.56	0.229	3.124	65.74
0	0.270	2.573	46.57	0.270	6.412	38.45	0.307	4.229	9.966
+20	0.317	2.037	18.52	0.151	3.485	21.34	0.279	5.402	---
+40	0.285	1.659	---	0.281	2.926	---	0.217	4.704	---

Constantes de tiempo (τ_j): ms

lentas (τ_{c2} y τ_{c3}) fueron claramente dependientes del voltaje, mientras que la constante de tiempo más rápida (τ_{c1}) fue prácticamente independiente (ver Tabla 7). Las constantes de tiempo lentas disminuyeron marcadamente conforme se incrementó el potencial de membrana, mientras que el tiempo promedio en el estado abierto fue aumentando.

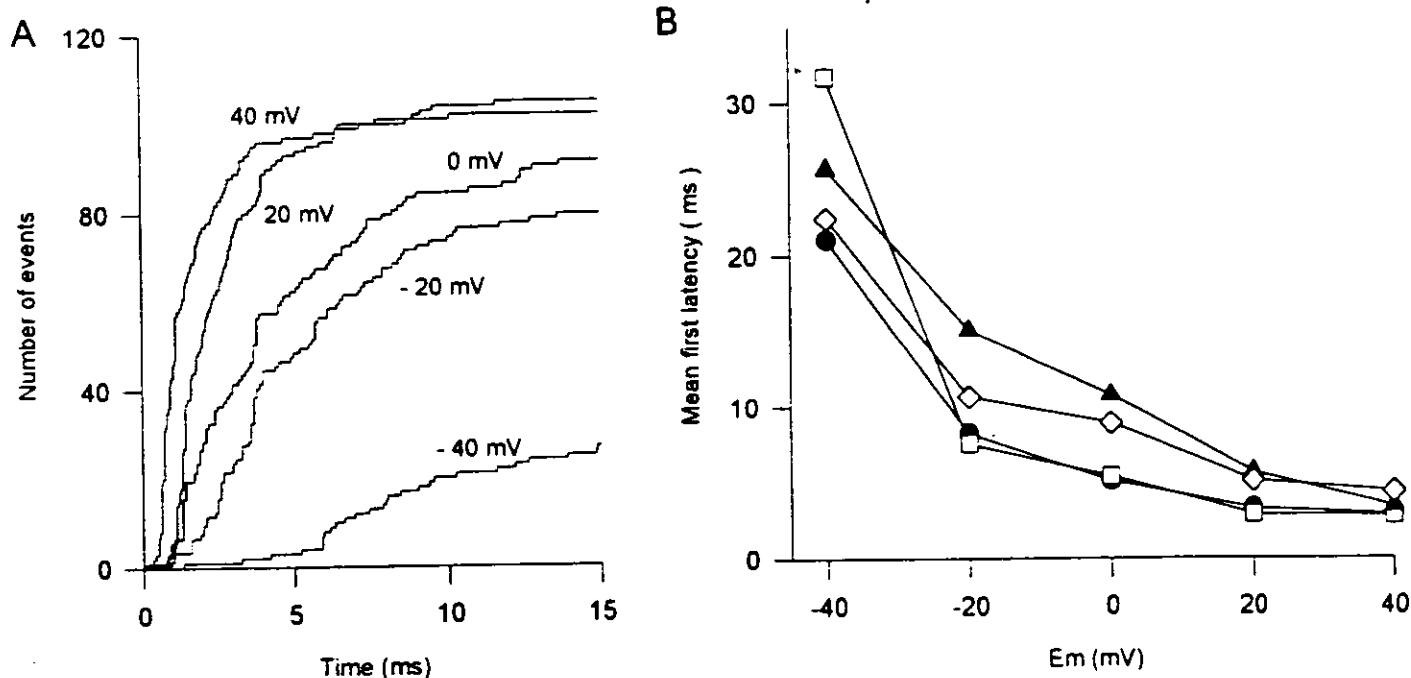


Fig. 39. Dependencia al voltaje de la latencia a la primera apertura. (A), distribución acumulada de la latencia a la primera apertura durante pulsos de voltaje a -40, -20, 0, +20 y +40 mV. (B), gráfica del promedio de la latencia a la primera apertura vs. potencial de membrana. Los símbolos diferentes representan datos de cuatro experimentos diferentes.

La distribución acumulada de las latencias a la primera

apertura son mostradas en la Fig. 39A para los potenciales de membrana de -40, -20, 0, +20 y +40 mV. Las latencias fueron medidas de 100 registros individuales, en cada uno de los potencial de membrana, de un parche que contenía tres canales. Las distribuciones ilustran que a voltajes más negativos las primeras aperturas suceden mucho tiempo después de que se ha aplicado el pulso, y que este período de tiempo va disminuyendo considerablemente conforme el voltaje va siendo más positivo. El promedio de la latencia al primer evento disminuye monotónicamente con la despolarización, desde 21-32 ms a -40 mV a casi 4 ms a +40 mV (Fig. 39B). El cambio en el promedio de la latencia fue de 6-8 veces sobre el rango del voltaje explorado, lo cual indica una gran dependencia al voltaje para al menos alguna de las velocidades de transición entre los estados cerrados que llevan a la apertura del canal (Zagotta y Aldrich, 1990).

La Fig. 40 muestra histogramas de la latencia entre el inicio del pulso y el tiempo de la primera apertura del canal a -40 mV (Fig. 40A) y +20 mV (Fig. 40B). Los picos de estos histogramas a tiempos mayores que cero, indican que la apertura es precedida por un retardo. El retardo en la latencia indica que el canal tiene que transitar por más de un estado cerrado para llegar a un estado abierto (French and Horn, 1983; Horn y col. 1984; Standen y col.

1985). Además, el histograma a +20 mV está más comprimido ,
indicando la ausencia relativa de aperturas tardías después de una

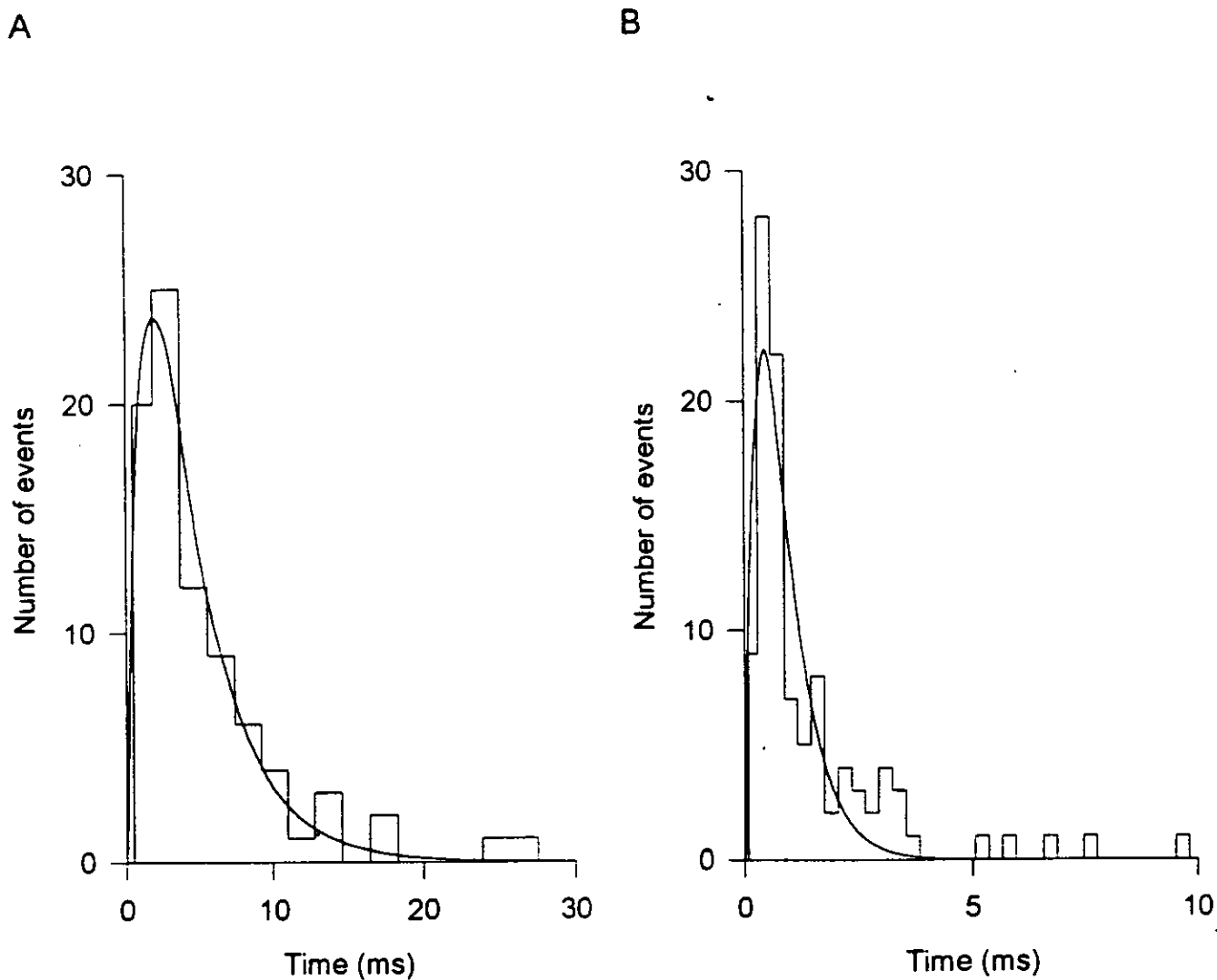


Fig. 40. Latencia a la primera apertura. (A), histograma de la latencia a -40 mV. La curva se obtuvo con la ec. (15) con $R_1=0.542 \text{ ms}^{-1}$, $R_2=0.341 \text{ ms}^{-1}$, escalados a la misma área que el histograma. (B), histograma de la latencia a +20 mV, con $R_1=3.421 \text{ ms}^{-1}$, $R_2=1.047 \text{ ms}^{-1}$, escalada como en A.

despolarización. La línea continua representa el mejor ajuste de la distribución de las latencias para un modelo de tres estados, en el que dos estados cerrados preceden al estado abierto. El modelo predice un pico inicial, sugiriendo la presencia de dos estados cerrados. Sin embargo, el modelo predice una latencia que incrementa con mayor velocidad que los datos experimentales, por lo que es necesario un esquema cinético con más de dos estados cerrados (Standen y col., 1985).

Las corrientes tipo A son bloqueadas por el compuesto de amonio cuaternario 4-aminopiridina (4-AP) a concentraciones mM (Rogawsky, 1985; Rudy, 1988; Solc y col. 1987; Zagotta y col. 1988). Se estudió el efecto del 4-AP sobre las corrientes unitarias adicionando una concentración de 5 mM a la solución de la pipeta. Los pulsos de voltaje fueron a 0, +20 y +40 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV, el intervalo entre los pulsos fue de 7 s para evitar el fenómeno de la inactivación lenta. En ocho parches no se registró ninguna actividad de canales, en otros dos parches se registro la actividad de un canal que no presentaba la inactivación rápida y el ensamblaje de la corriente promediada a partir de los registros individuales tenían la apariencia de las corrientes del rectificador tardío (ver Fig. 28) (Standen y col., 1985). En otro parche y sólo durante la

aplicación de 2 pulsos a +40 mV, de un total de 100 pulsos, se registraron corrientes unitarias de K^+ (no se muestran los datos) similares a las mostradas en la Fig. 33. El efecto del tetraetilamonio (TEA) externo fue investigado mediante la sustitución de 10 mM de TEA-cloruro por NaCl en la solución de la pipeta. En estos experimentos (n=3) el TEA no tuvo ningún efecto significativo sobre la amplitud de las corrientes ni sobre la P_o de los canales.

La Fig. 41 muestra cuarenta registros típicos a un voltaje de membrana de +40 mV, en los cuales estuvieron presentes los 4 tipos de canales presentados anteriormente. Por ejemplo, en los trazos 1, 5 y 18 (de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha) se registró la actividad de los canales clasificados como "sin inactivación tipo N"; los trazos 8, 9 y 36 muestran las corrientes que fluyen a través de los canales clasificados como de "baja conductancia"; todos los registros muestran los canales con "inactivación tipo N", así como los canales similares al tipo A. Cuando se realizó el ensamblaje de las corrientes (Fig. 42), las corrientes promediadas tuvieron la apariencia de las corrientes macroscópicas de los canales de potasio de la rectificación tardía registradas de células o segmentos de células de músculo esquelético (Adrian y col., 1970a y b; Stanfield, 1970; Vergara y col., 1978; Beam y

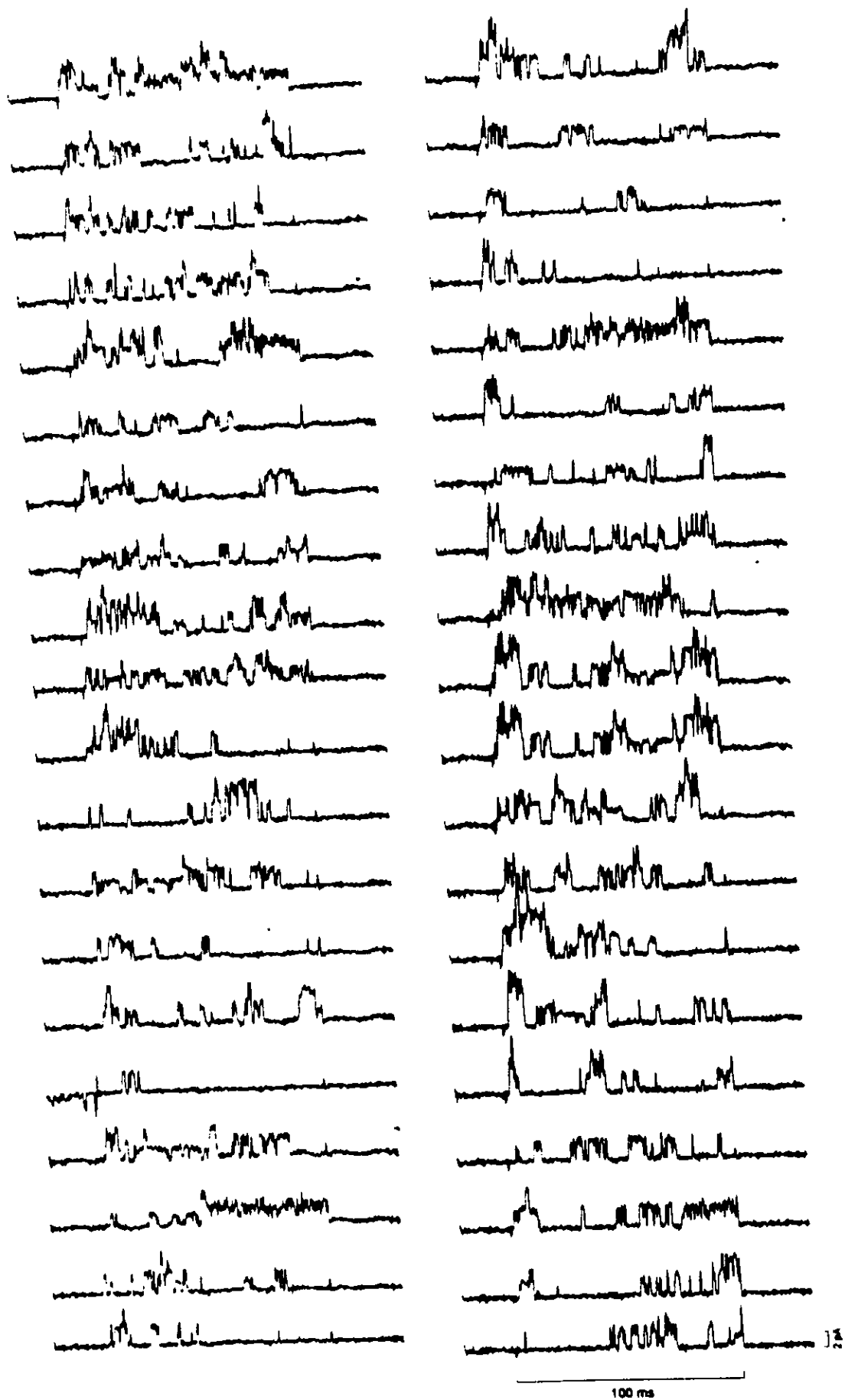


Fig. 41. Corrientes unitarias de los canales de K^+ de la rectificación tardía. Cuarenta trazos (de arriba hacia abajo iniciando en la columna de la izquierda) consecutivos de una serie de 150 despolarizaciones a +40 mV, en donde se muestra la actividad de los diferentes canales de K^+ descritos previamente. El potencial de mantenimiento fue de -100 mV. Filtro 2 kHz; digitalización 10 kHz; resistencia del sello 60 G Ω . Ver pág. 151.

Donaldson, 1983a). Las corrientes promediadas tuvieron un curso temporal de activación dependiente del voltaje, el cual fue ajustado a una cinética de cuarto orden tipo Hodgkin-Huxley (Hodgking y Huxley, 1952) más dos términos de inactivación y un término constante.

Los tres primeros trazos de la Fig. 43 muestran las corrientes promediadas de los canales tipo "A", "sin inactivación tipo N" y de "baja conductancia", el trazo inferior izquierdo corresponde a la corriente promediada cuando todos los canales estuvieron presentes en el mismo parche y, el trazo inferior derecho es la suma de los tres primeros trazos más el canal con "inactivación tipo N". Se puede apreciar la gran similitud entre los trazos más inferiores.

La Fig. 44 muestra que el F^- no tiene efectos sobre ninguno de estos canales de potasio. El trazo de mayor amplitud es la corriente promediada en ausencia del ión, y el trazo de menor amplitud es en presencia de este anión, ambas situaciones de

registro fueron hechas sobre el mismo parche de membrana. La

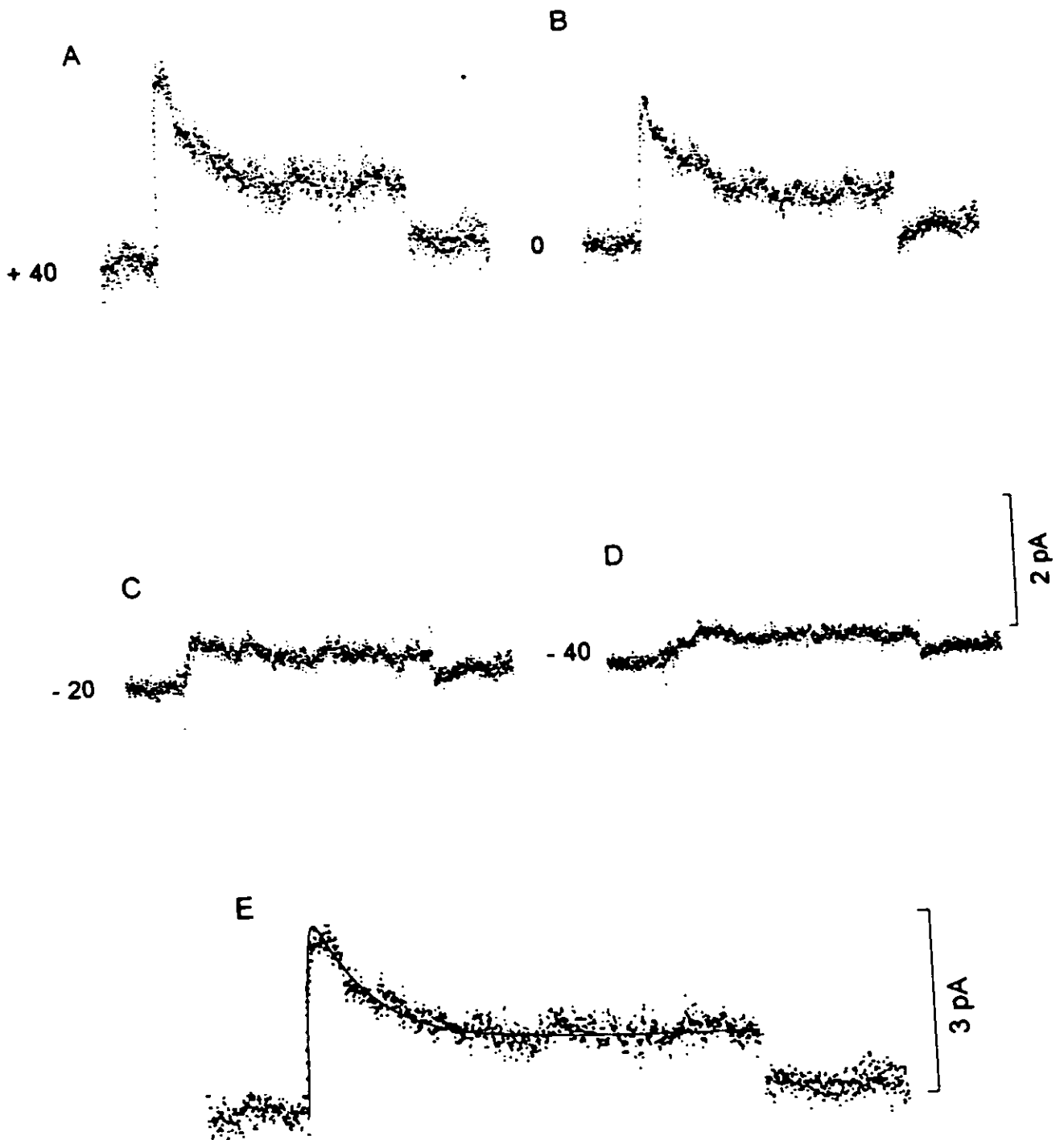
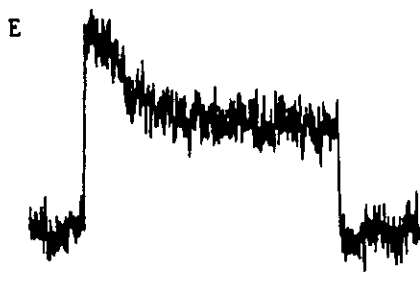
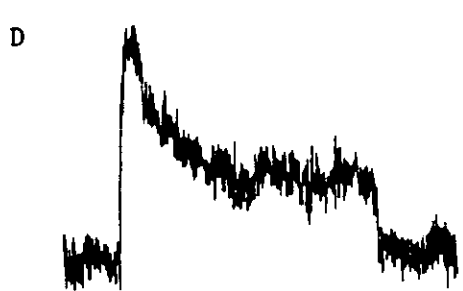
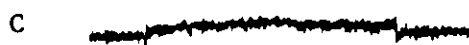


Fig. 42. Corrientes promediadas a partir de las corrientes unitarias de K^+ . Cada trazo corresponde al promedio de 100 pulsos a + 40 (A), 0 (B), -20 (C) y -40 (D) mV. (E) es el mismo trazo que en A, los puntos son los datos experimentales y la línea continúa es el ajuste a la cinética tipo Hodgkin-Huxley, con tres términos de inactivación y una constante. La constante de activación fue 2.85 ms, las constantes de inactivación fueron 0.70, 26.50 y 66.70 ms. Ver pág. 153.

disminución, al inicio del trazo, es de aproximadamente el 25%, sin embargo este efecto puede deberse a que el canal "sin inactivación tipo N" presenta el fenómeno de deactivación en función del tiempo. Cuando el registro fue realizado a tiempos mayores a 30 min., la corriente promediada disminuyó en más del 70% y la actividad de estos canales (sin inactivación tipo N) no se observó en ninguno de los registros.

Fig. 43. Reconstrucción de las corrientes de K^+ . (A), corriente promediada tipo "A". (B), corriente promediada del canal sin inactivación tipo "N". (C), corriente promediada del canal de "baja amplitud". (D), corriente promediada de un parche de membrana que contenía los cuatro tipos de canales de K^+ . (E), la suma de (A)+(B)+(C). Ver pág. 155.



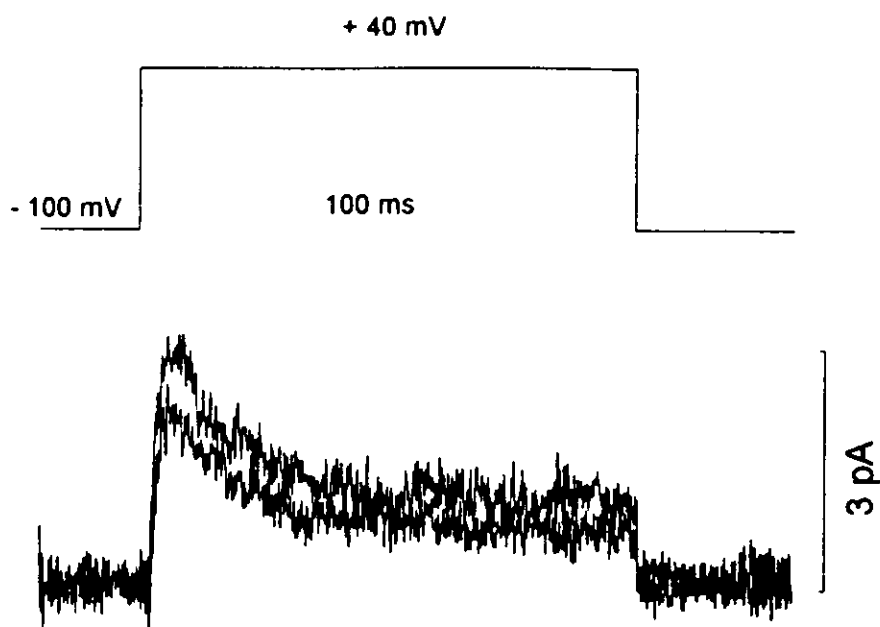


Fig. 44. Efecto del F^- sobre los canales de K^+ . El trazo superior muestra la duración del pulso de voltaje el cual fue desde un potencial de mantenimiento de -100 mV a +40 mV. La corriente promediada de mayor amplitud fue registrada a una concentración de 120 mM de KCl en la solución del baño; la corriente promediada de menor amplitud fue en presencia de 15 mM de F^- en la solución del baño.

DISCUSION

En esta tesis, se dan evidencias de que el canal de K^+ sensible a ATP del músculo esquelético de la rana es modulado por una proteína G, sin que haya participación de segundos mensajeros difusibles en el citoplasma. Nuestros experimentos muestran por primera vez la presencia de tres tipos de canales de K^+ de la rectificación tardía en vesículas del sarcolema del músculo esquelético de rana. Por otra parte, se describen corrientes de K^+ salientes y transitorias similares a la corrientes tipo A encontradas en otras preparaciones biológicas. Ninguno de los canales activados por el voltaje son susceptibles de ser modulados por el F^- o por alguna proteína G. Tampoco requieren de la presencia de Ca^{++} para su activación.

MODULACION DEL CANAL DE K⁺ SENSIBLE A ATP POR UNA PROTEINA G

Los registros de corrientes unitarias corroboran la presencia de canales de K⁺ sensibles a ATP en las vesículas que se obtienen de la membrana del músculo esquelético de rana (Spruce y col., 1987). De acuerdo con Spruce y col., (1987), la conductancia pendiente en concentraciones asimétricas de K⁺ (2.5 mM en la pipeta y 120 mM en el baño) fue de 19.3 pS. La conductancia unitaria de 56.5 pS que medimos en soluciones simétricas de K⁺ (120 mM) es comparable a los valores reportados de 62 pS en soluciones isotónicas de K⁺ (155 mM) del músculo esquelético de rata (McKillen y col., 1994) y al de 60 pS del músculo esquelético de humano (Burton y col., 1988). También confirmamos que los canales son bloqueados por el TEA interno (10 mM), disminuyendo su probabilidad de apertura, mientras que la amplitud de las corrientes a esta concentración de TEA no sufrió modificaciones (Spruce y col., 1987; Hille, 1992). Los canales fueron selectivos a K⁺, variando la concentración extracelular de K⁺ el potencial de inversión fue igual o estuvo cerca del potencial de equilibrio del K⁺, tal como se ha reportado para el canal de K⁺ sensible a ATP (Parent y Coronado, 1989; McKillen y col., 1994; Spruce y col., 1987)

Efecto del ATP sobre los canales de K⁺

Los experimentos en el estado estacionario mostraron que estos

canales no modificaron su actividad por efecto del ATP. Sin embargo, cuando realizamos los registros mediante la aplicación de pulsos de voltaje, el ATP disminuyó la P_o a valores cercanos a cero. Por supuesto que este resultado contradecía por completo la caracterización del canal de K^+ de la rectificación tardía, hecho que posteriormente comprobamos.

EL Na_2ATP que utilizamos en los experimentos en el estado estacionario fue adquirido de la compañía Sigma Chemical Company, el número de catálogo es A-6144, su adquisición fue hace aproximadamente 12 años. El Na_2ATP que se usó durante los registros de corrientes mediante la aplicación de pulsos de voltaje, se obtuvo de la misma compañía, sin embargo, el número de catálogo es A-5394 el cual se adquirió hace aproximadamente 2 años. El efecto que ejerce el ATP- Na_2 A-5394 sobre los canales de K^+ muestra que esta conductancia es la sensible a ATP. Estos canales sensibles a ATP tiene las mismas características cinéticas que los canales que habíamos caracterizado como de la rectificación tardía. La pregunta que surgió entonces fue: ¿A qué se deben estos efectos diferentes del ATP sobre los mismos canales?. Primero, para aclarar que el efecto del ATP no estaba influenciado por la aplicación de pulsos de voltaje, realizamos nuevamente experimentos en el estado estacionario, pero ahora con el Na_2ATP A-5394, los registros

mostraron que realmente la disminución de la probabilidad de apertura se debía al efecto que ejerce al ATP sobre estos canales, es decir los pulsos de voltaje no modificaban el comportamiento de los canales. Segundo, otra posibilidad es que el $\text{Na}_2\text{ATP A-6144}$ estuviera inactivado, dado que su adquisición fue hecha hace mucho tiempo y que desafortunadamente las condiciones de los suministros de energía eléctrica no son los adecuados. Pero, debido a que este ATP lo agotamos en su totalidad, no tuvimos oportunidad de investigar cual era su estado de funcionalidad. Tercero, dentro de los residuos del $\text{Na}_2\text{ATP A-6144}$ se encuentra el vanadio a una concentración de 26 partes por millón (ppm), a diferencia del $\text{Na}_2\text{ATP A-5394}$ que sólo contiene 0.1 ppm de vanadio, el cual se ha identificado como un potente inhibidor de la ATPasa Sodio/Potasio en el músculo papilar de gato, en células de riñón de perro, en eritrocitos humanos, etc. (Beaugé y Glynn, 1977; Colston y col., 1994; Hackbarth y col., 1978; Hudgins y Bond, 1977; Cantley y col., 1977). El vanadio en su estado oxidado forma un complejo iónico de ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), con una estructura muy similar al fosfato. En la actualidad es bien conocido que el ortovanadato es un inhibidor de muchas enzimas que catalizan la transferencia de fosfatos (Tracey y Gresser, 1986; Dantzing y Goldman, 1985; Maughan y col., 1995; Wilson y col., 1995; Shintani y Marunaka, 1996). Su

efecto inhibitor se debe: a) el ortovanadato es muy similar en dimensiones y en carga al fosfato inorgánico y, b) su esfera de coordinación se incrementa considerablemente rápido (5 sitios de oxidación) y exhibe una gran plasticidad, de tal forma que puede modificar con gran facilidad la distancia entre sus puentes (Smith y Rayment, 1986). Estas características permiten a este ion adoptar una estructura de bipyramide triangular que se ha propuesto que mimetiza la conformación del grupo fosfato justo en el estado transicional que permite la fosforilación (Lindquist y col., 1994; Westheimer, 1987).

El ortovanadato modifica la actividad de canales de Cl^- en ovocitos de *Xenopus laevis* a través de activar la fosfolipasa C acoplada a una proteína G, esta modulación parece ser mediada por un receptor a nivel de membrana y no por activación directa de la proteína G (Sakuta, 1994). Así mismo, el ortovanadato al inhibir la proteína tirosin fosfatasa, disminuye la actividad de los canales de Cl^- activados por Ca^{++} (Shintani y Marunaka, 1996) y los canales de Ca^{++} tipo L en células GH₃ (Cataldi y col., 1996), los cuales son defosforilados a nivel de la tirosina del canal por la proteína tirosin fosfatasa.

Los canales de K^+ sensibles a ATP tiene un sitio de afinidad para ATP y probablemente otro sitio de afinidad para GTP (Lederer

y Nichols, 1989), además en este trabajo presentamos evidencias de que pueden ser modulados por una proteína G. El ortovanadato podría impedir que el ATP se uniera al canal iónico y de esta forma se podría explicar porque el ATP contaminado con vanadio no causara el efecto característico sobre estos canales. Por otra parte, los resultados aquí mostrados sugieren que el ortovanadato no interfiere con el efecto que ejercen las proteínas G sobre este canal.

Modulación de los canales de K⁺ sensibles a ATP por proteínas G

Los canales de K⁺ inhibidos por ATP (K(ATP)) se han descrito en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo el músculo esquelético (Spruce y col., 1987; McKillen y col., 1994), músculo cardíaco (Trube y Hescheler, 1984; Noma, 1983), células beta pancreáticas (Findlay y col., 1985), células endoteliales (Sauvé y col., 1988), etc.

Reportes actuales muestran que la actividad de los canales K(ATP) disminuye después que el parche de membrana que queda dentro de la punta de la pipeta es desprendido del resto de la membrana celular (configuración "inside-out"), un fenómeno llamado "run-down" (Trube y Hescheler, 1984; Mislér y col., 1986; McKillen y col., 1994; Parent y Coronado, 1988). Se ha propuesto que la deactivación de los canales -run-down-, es un evento que involucra

defosforilación de los canales, y que la refosforilación regresa al canal a su estado activo (McKillen y col., 1994; Parent y Coronado, 1988). A pesar de que el "run-down" de los canales del músculo esquelético de rana es ligero (Spruce y col., 1987), en todos los experimentos, el efecto del AlF_4^- y del $GTP\gamma S$ se estudió en los primeros 3 a 4 minutos después de haber desprendido el parche de membrana, a fin de evitar la desactivación de los canales en función del tiempo.

Los resultados presentados en esta tesis muestran que los canales de $K(ATP)$ en el músculo esquelético son modulados directamente por una proteína G sin la participación de segundos mensajeros difusibles en el citoplasma, es decir, esta modulación ocurre sólo a nivel de la membrana celular. Esta conclusión se basa en el efecto que ejercen el F^- y el $GTP\gamma S$ sobre las corrientes de K^+ . Actualmente, es bien conocido que el F^- a concentraciones milimolares activa proteínas G heterotriméricas (Birnbaumer y col., 1990). Su acción depende de la formación de complejos de fluoruro de aluminio (AlF_4^-) y además requiere de la presencia de magnesio (Sternweiss y Gilman, 1982). Al parecer, el AlF_4^- mimitiza al γ fosfato del GTP, lo que provoca que la subunidad α se disocie de las subunidades $\beta-\gamma$, con la consecuente activación de la proteína

G (Bigay y col., 1987).

La participación de las proteínas G en la acción del fluoruro sobre los canales de K⁺ en nuestros experimentos está fuertemente apoyado por la gran similitud entre el efecto de este anión y el efecto del GTPγS. Así mismo, los efectos del fluoruro fueron antagonizados por el GDPβS.

La modulación de los canales iónicos por proteínas G, sin la participación de segundos mensajeros, fue demostrada inicialmente en los canales de K⁺ activados por receptores a acetilcolina (ACh), específicamente los acoplados a receptores muscarínicos, en miocitos cardíacos (Pfaffinger y col., 1985; Breitwieser y Szabo, 1985; Yatani y col., 1988) y recientemente, otros tipos de canales de K⁺ han mostrado ser blancos de las proteínas G. Por ejemplo, los canales de K⁺ activados por calcio y canales de K⁺ neuronales acoplados a una gran variedad de neurotransmisores y peptidos, además, los canales de Ca⁺⁺ tipo N y los tipo L también son modulados por proteínas G (Hille, 1992; Brown, 1993). Nuestros experimentos confirman los hallazgos de Noma (1983), Kakei y col., (1895), Spruce y col., (1987) y Lederer y Nichols (1989), que el GTP puede causar inhibición de la actividad del canal de K(ATP) en ausencia de ATP, pero adicionalmente, también observamos que el

efecto inhibitorio de GTP es antagonizado por el GDPβS. Estos resultados muestran que la activación de las proteínas G tienen efectos drásticos sobre los canales de K⁺ sensibles a ATP. Esta modulación es claramente diferente a la acción de las proteínas G en otros tipos de canales de K⁺ reportada previamente, es decir, la activación de las proteínas G incrementa la probabilidad de apertura de los canales de K⁺, mientras que en nuestro caso hubo una gran disminución en su probabilidad de apertura. El aumento en la actividad de los canales de K⁺ por proteínas G en el corazón, está asociado con la hiperpolarización de la membrana y un decremento en la frecuencia cardíaca (Hille, 1992; Brown, 1993). En el músculo esquelético el papel que juega este canal no está plenamente determinado. El hecho que la concentración de ATP del músculo esquelético este bien amortiguada por la creatinín-fosfatasa y la creatinín-cinasa hace difícil precisar cual es el papel de estos canales en la función muscular. Probablemente, los canales de K(ATP) participan en la alta permeabilidad al K⁺ encontrada bajo condiciones de rigor producido por la estimulación repetida en presencia del ion cianuro y de iodoacetato (Fink y Lüttgau, 1976), cuando la concentración de ATP se reduce a casi el 20% de su valor normal. También se ha sugerido que está alta

permeabilidad refleja la apertura de los canales de K^+ activados por Ca^{++} , cuya sensibilidad al Ca^{++} se incrementa por la disminución en los niveles de ATP (Fink y col., 1983). Sin embargo, la alta permeabilidad al K^+ en fibras fatigadas no se reduce por la subsecuente detubulación, lo cual sugiere que la permeabilidad está localizada en la membrana superficial (Grabowski y col., 1972). Actualmente, no se han encontrado los canales de K^+ activados por Ca^{++} en la membrana superficial del músculo de rana, por el contrario, el canal de K^+ sensible a ATP está presenta en una gran densidad (Spruce y col., 1987). Por otra parte, los canales no solo son regulados por ATP, sino también por otros constituyentes citoplásmicos tales como el Mg^{++} , ADP, GTP, GDP y protones (Forestier y col., 1996; Lederer y Nichols, 1989; Parent y Coronado, 1989; Spruce y col., 1987; Schwanstecher y col., 1994; Terzic y col., 1995), por lo que al converger estos mecanismos reguladores sobre los canales de K^+ sensibles a ATP servirían para ajustar la excitabilidad de la membrana al metabolismo celular. Así, ellos parecen ser uno de los mecanismos principales en fenómenos que involucren cambios en los estados energéticos, por ejemplo, en la fatiga muscular (Castle y Haylett, 1987), isquemia e hipoxia (Coetzee, 1992) o en la liberación de glucosa dependiente de insulina (Rorsman y col., 1994). Una posibilidad adicional en la

que participen los canales de K(ATP), sería en algunas alteraciones del músculo esquelético de humano, asociados con errores del metabolismo de los carbohidratos, tales como las deficiencias de fosfofructocinasa y miofosforilasa, las cuales presentan grandes cambios en los electromiogramas después de ejercicios moderados, tal como es de esperarse si la excitabilidad estuviera disminuída (Wiles y col., 1981).

Si los canales de K⁺, por momentos, tuvieran una disminución en su sensibilidad al ATP, o si las concentraciones de ATP disminuyeran momentáneamente por abajo de los niveles fisiológicos, entonces ellos se podrían incrementar su probabilidad de apertura en fibras musculares individuales. Este efecto incrementaría la conductancia a K⁺, lo que redituaría en mantener el potencial de membrana cerca del potencial de equilibrio del K⁺ y de esta forma reduciría los cambios en la excitabilidad de la fibra.

A pesar de que es claro el papel de las proteínas G en la modulación del canal, no tenemos evidencia directa de cual es la proteína G que esta participando en esta regulación. La membrana plasmática del músculo esquelético tiene varios tipos de proteínas G. Se han identificado tres tipos de proteínas heterotriméricas, la G_i, G_s y G_o (Mickelson y Louis, 1985; Scherer y col., 1987; Toutant y col., 1988; Doucet y Tuana, 1991). Además, existen datos que

apoyan la existencia de una proteína G monomérica en el músculo esquelético (Doucet y Tuana, 1991), sin embargo, es poco probable que esta proteína participe en esta modulación, ya que el complejo de fluoruro de aluminio no activa este tipo de proteínas (Kahn, 1991). Tenativamente concluiremos que cualquiera de las proteínas heterotriméricas podrían estar modulando al canal de K^+ sensible a ATP en el músculo esquelético.

Por otra parte, el canal de K(ATP) puede sufrir una modulación directa por GTP, tal como lo ha determinado Spruce y col. (1987) para el músculo esquelético de rana, y Lederer y Nichols (1989) para el miocito cardíaco. En ambos músculos, esquelético y cardíaco, el GTP disminuye la actividad de los canales de manera similar a como lo hace el ATP. Se ha propuesto que el canal de K(ATP) tiene un sitio de afinidad para nucleótidos diferentes del ATP, además del sitio de afinidad para ATP (Lederer y Nichols, 1989), por lo que una doble modulación -a través de una proteína G y del GTP mismo sobre el canal- no se puede descartar. Aún, los efectos del GTP y del ATP sobre el canal en el músculo esquelético de rana son aditivos (Spruce y col., 1987).

Es difícil suponer cuál es el papel funcional de la modulación por proteínas G. Si los canales evitan la excitabilidad de las fibras musculares cuando los niveles de ATP disminuyen por abajo de

la concentración promedio citoplásmica, regresando la membrana a su potencial de reposos, la pregunta es ¿cual es el papel funcional de la modulación por proteínas G, si ellas disminuyen la probabilidad de apertura de los canales a corto plazo (< de 4 min)?.

Adicionalmente, los canales de K(ATP) sufren el fenómeno de "run-down", y existen evidencias de que las proteínas G previene que los canales entren a este estado cinético (Parent y Coronado, 1989), esto es, el efecto que ejercen las proteínas G es la de mantener o incrementar la probabilidad de apertura de los canales antes de que ellos presenten el "run-down", el cual sucede a tiempos relativamente prolongados (aproximadamente 9 min). Una posibilidad es que los canales experimenten una doble modulación, tanto de una proteína G_o como de una G_s , tal como lo demostrado Yatani y col., (1990) para los canales de K^+ acoplados al receptor muscarínico en células del nodo sinoatrial. Si consideramos la posibilidad de que los canales de K^+ regulados por ATP se abren durante las contracciones musculares prolongadas y que además estos canales son susceptibles de ser modulados por una proteína G, es difícil probar está hipótesis con el método del "patch-clamp".

CANALES DE K^+ DE LA RECTIFICACION TARDIA

Nuestros resultados muestran la existencia de por lo menos

tres diferentes tipos de canales de K^+ en el músculo esquelético de la rana. Estos canales difieren en sus conductancias unitarias así como en sus propiedades cinéticas. El valor de la conductancia unitaria, a concentraciones fisiológicas de K^+ , de aproximadamente 21 pS a +40 mV para el canal que no presenta la inactivación tipo N, es similar al reportado por Llano, Webb y Bezanilla (1988) para uno de los canales de K^+ del axón de calamar. Los canales de K^+ de la rectificación tardía del calamar, incorporados en membranas artificiales, tienen una conductancia de 18 pS (Coronado y Bezanilla, 1984). Otras estimaciones de la conductancia unitaria del rectificador tardío en células excitables son similares a la reportada en esta tesis para este canal que no presenta la inactivación rápida. Por ejemplo, un valor de 21 pS se obtuvo del rectificador tardío del músculo esquelético de ratón (Hocherman y Bezanilla, 1996).

Con base en estos resultados, es probable que este canal de 21 pS sea uno de los principales contribuidores a la conductancia del rectificador tardío estudiado en el músculo esquelético de rana. Esto está apoyado en el curso temporal de activación del ensamblaje de las corrientes promediadas obtenidas a partir de los registros individuales a diferentes potenciales de membrana. Las reconstrucciones de las corrientes macroscópicas tienen una

activación semejante al rectificador tardío en el músculo esquelético de rana y de mamífero (Adrian y col., 1970a y 1970b; Beam y Donaldson, 1983; Standen y col., 1985), y del axón de calamar (Bezanilla y col., 1986; Conti y Neher, 1980; Llano y col., 1988). Similar a las corrientes poblacionales en el axón gigante de calamar y en el axón de calamar (Hogkin y Huxley, 1952; Chabala, 1984), los eventos a nivel unitario no presentan la inactivación rápida durante los pulsos de 100 ms de duración. La gran concordancia que existe entre la probabilidad de tener exactamente cero, uno o dos canales abiertos a un tiempo dado, con el teorema binomial, supone que los canales son idénticos e independientes (Barret y col., 1982; Patlak y Horn, 1982; Llano y col., 1988; Standen y col., 1985). También mostramos evidencias de que el número de canales activos, en la microárea de membrana, disminuyen cuando los potenciales depolarizantes se aplican a intervalos breves, un fenómeno que se ha denominada inactivación lenta; cuando los canales han entrado a este estado, ellos son incapaces de abrirse por períodos relativamente prolongados (Hess y col., 1984; Horn y col., 1984; Standen y col., 1985).

Este rectificador tardío consistentemente presentó "run-down" tanto en soluciones con K^+ como cuando parte del K^+ fue sustituido por F^- en la solución del baño. La fig. 26 ilustra el curso

temporal con el cual se desarrolla el "run-down" y, una vez establecido, fuimos incapaces de revertir el evento. Cuando el axón gigante de calamar es diálisado con soluciones sin ATP, la corriente del rectificador tardío disminuye considerablemente (Bezanilla y col., 1986). Esta disminución en la conductancia se debe a una defosforilación del canal, la cual puede ser revertida por la adición de 2 mM MgATP a la solución de diálisis (Perozo y Bezanilla, 1990). Nuestros registros siempre fueron realizados en presencia de 2 mM de Na₂ATP y 2 mM de Mg⁺⁺ en la solución del baño, de tal forma que la presencia de ATP no parece modificar el desarrollo del "run-down". Cuando se incrementó la concentración de ATP a 5 mM, que es aproximadamente la concentración fisiológica en el músculo esquelético de rana (Dawson y col., 1980), el "run-down" parece no presentar ninguna alteración en su desarrollo. Por otra parte, en varios tipos de canales el "run-down" es prevenido por mecanismos de fosforilación dependiente de proteínas cinasas (Hille, 1992). Sin embargo, no existen evidencias que apoyen alguna fosforilación dependiente de proteínas cinasas para el rectificador tardío.

El comportamiento cinético de los canales se analizó en términos de un proceso Markov (Colquhoun y Hawkes, 1995), en el cual un canal transita entre una serie de estados en el que el

tiempo de permanencia en cualquier estado particular depende sólo de las constantes de velocidad para salir de ese estado. Los tiempos de apertura y cierre y, el ajuste de las corrientes promediadas a un cinética de n^* (Hodgkin y Huxles, 1952) permiten sugerir que los canales tienen por lo menos cuatro estados cerrados y dos estados abiertos. Pero, el número de estados abiertos puede resultar de la contribución de más de un canal en el parche de membrana (Llano y col., 1988; Colquhoun y Hawkes, 1995).

Los canales de K^+ de la rectificación tardía se abren en salvas, tal como ocurre para una gran variedad de canales (Blatz y Magleby, 1987; Fenwick y col., 1982; Standen y col., 1985; Zagotta y Aldrich, 1990). Los histogramas de la distribución de los tiempos cerrados fueron ajustados a una doble exponencial, lo cual sugiere que los canales transitan en por lo menos dos estados cerrados dentro de la salva. En este esquema cinético, los cierres más breves dentro de la salva representarían el estado cerrado más cercano al estado abierto, mientras que los cierres más prolongados (entre las salvas), serán uno de los estados cerrados más lejano al estado abierto.

El canal de aproximadamente 13 pS probablemente también contribuya a la corriente poblacional del rectificador tardío obtenida con despolarizaciones relativamente breves. Su valor de

conductancia es muy similar al de 9 a 11 pS reportado por Conti y Neher (1980) para canales de K^+ en el axón calamar. Otra estimación de la conductancia unitaria del rectificador tardío en células excitables es similar a la reportada en esta tesis, por ejemplo Standen y col., (1985) reportaron una conductancia de 15 pS para el rectificador tardío en fibras musculares esqueléticas. A pesar de que la conductancia unitaria es significativamente menor que la del canal de 21 pS, la frecuencia con la cual este canal aparece es menor en aproximadamente el 25-30%, con respecto al canal de 21 pS. No obstante, el canal tiene una mayor probabilidad de apertura, lo que resultaría en una considerable contribución a la corrientes poblacional de K^+ . Es probable, que en el músculo esquelético de rana, la corriente del rectificador tardío este compuesta de por lo menos dos tipos de canales de K^+ . Se necesitarían mayores trabajos para definir la contribución de varios canales activos a las conductancias macroscópicas.

Estos canales de 13 pS parecen abrirse y cerrarse independientemente tal como el canal de 21 pS. La corriente promediada de muchos registros individuales tienen la apariencia de las corrientes macroscópicas de la rectificación tardía. La activación de las corrientes promediadas fueron ajustadas a la cinética tipo Hodgkin-Huxley (Hodgkin y Huxley, 1952), de manera

similar a las corrientes macroscópicas registradas de fibras o segmentos de fibras musculares (Adrian y col., 1970; Stanfield, 1970). Las corrientes macroscópicas del rectificador tardío del músculo de rana declina durante despolarizaciones mantenidas, debido a un proceso de inactivación (Adrian y col., 1970; Stanfield, 1970) y las corrientes promediadas del canal de 13 pS también disminuyen en función del tiempo durante depolarizaciones de 100 ms. Esta disminución de la corriente podría ser una inactivación de los canales, reflejándose como una disminución de la probabilidad de apertura en función del tiempo, tal como la han propuesto Carbone y Lux (1984) para un canal de calcio.

Un esquema secuencial de la cinética de los canales de K^+ involucra varios estados cerrados y un sólo estado abierto. Este modelo se ha utilizado para explicar la cinética de activación del rectificador tardío (Gilly y Armstrong, 1982; Llano y col., 1988; Standen y col., 1985). El ajuste a la cinética tipo Hodgkin-Huxley y el análisis de la latencia a la primera apertura, concuerdan con que el canal debe de transitar en por lo menos tres estados cerrados antes abrirse.

Un tercer tipo de canales de K^+ activados por el voltaje, fue detectado. Este canal de casi 7 pS sólo se detecto a grandes despolarizaciones, por arriba de 0 mV desde un potencial de

mantenimiento de -100 mV. Los canales se abren y se cierran independientemente uno de otro; al igual que los canales de 21 pS, los canales presentan la inactivación lenta, la técnica de análisis de corridas mostró que las agrupaciones de registros sin aperturas suceden de manera altamente no aleatoria. Por otra parte, la baja probabilidad de registrar esta corriente, nos hace suponer que su contribución a la corriente macroscópica de la rectificación tardía es sumamente baja.

La hipótesis de trabajo planteada en este trabajo de tesis, se rechaza. Esto baso en toda la serie de evidencias experimentales, las cuales muestran que la actividad de los tres tipos de canales de la rectificación tardía no se modificó por la presencia del F⁻ ni del GTPγS, por lo que la modulación por proteínas G de los canales de la rectificación tardía es descartada.

Ya que los canales de 21 pS, que aparecen con mayor frecuencia en las membranas de las vesículas y que probablemente ellos sean los canales que fundamentalmente participan en las corrientes macroscópicas del rectificador tardío, presentan dos estados cinéticos que llevan a los canales a un estado de no conducción, podrían existir dos posibilidades que expliquen los resultados obtenidos por Hille y Campbell en 1976 para las corrientes del

rectificador tardío. Primero, los canales desarrollan un proceso de inactivación lenta, en donde el número de canales activos disminuye, este evento probablemente determinaría en parte que al registrarse las corrientes poblacionales, estas estuvieran severamente disminuidas; los registros hechos por Hille y Campbell (1976) fueron realizados desde un potencial de mantenimiento de -90 mV y desde ahí se aplicaron pulsos despolarizantes en pasos de 15 mV hasta +50 mV, a pesar de que en ese trabajo no se aclara cual fue el intervalo entre los pulsos, es probable que se hayan aplicada a una frecuencia tal que pudiera llevar a los canales a la inactivación lenta, lo cual redituaria en una gran disminución en la amplitud de la corriente iónica. Segundo, nuestros registros muestran que los canales presentan una deactivación, prácticamente irreversible, que se desarrolla en tiempos relativamente cortos (aproximadamente a los 5 minutos), estos también podría explicar parcialmente la casi ausencia de las corrientes del rectificador tardío en el trabajo de Hille y Campbell (1976). Como se muestra en este trabajo de tesis, esta deactivación no se revierte agregando ATP o Mg^{++} a la solución que baña la cara citoplásmica de la membrana celular. Aún, todos nuestros registros fueron realizados en presencia de ATP y Mg^{++} . Esta posibilidad cobra importancia ya que en los experimentos de Hille y Campbell, previo al montaje del

segmento de la fibra muscular en la cámara de registro, la fibra fue depolarizada durante por lo menos 30 minutos, lo cual podría llevar a la deactivación de los canales de K^+ de la rectificación tardía, lo que explicaría la ausencia de la conductancia a K^+ . Estas dos posibilidades, deberían de probarse en fibras musculares o segmentos de fibras musculares. Es decir, aplicar pulsos de voltaje a intervalos de 1 s que es la frecuencia a la cual nosotros observamos la inactivación lenta, y segundo realizar registros a tiempos relativamente largos para evidenciar el probable "run-down" de estos canales.

CANALES DE POTASIO SIMILARES AL TIPO A

En este trabajo de tesis, las corrientes transitorias salientes medidas a nivel de canales únicos en el músculo esquelético tienen varias características en común con las macroscópicas I_A descritas en otras preparaciones (Hagiwara y col., 1961; Connor y Stevens, 1971; Neher, 1971; Rudy, 1988; Zhang y McBain, 1995). Estas características incluyen: a) las corrientes promediadas se activan rápidamente, con cinética en el rango de los milisegundos y b) las corrientes promediadas inactivan rápidamente con una constante de tiempo de 10-14 ms a temperatura ambiente. La

conductancia unitaria, 18.4 pS, fue lineal sobre mucho del rango fisiológico. Este valor es similar al reportado para los canales de potasio tipo-A del músculo de la drosophila (Zagotta y col., 1988; Solc y col., 1987), de neuronas mamífero (Cooper y Shrier, 1985) y de neuronas de molusco (Taylor, 1987).

Las corrientes promediadas exhiben una rápida activación dependiente del voltaje seguida de una inactivación independiente del voltaje (Solc y col., 1987; Zagotta y Aldrich, 1990). Estas corrientes inactivan con un curso temporal que debe ser ajustado por una exponencial simple (Cooper y Shrier, 1985; Rogawski, 1985). La constante de inactivación presenta mucha variabilidad de un parche a otro, pero esencialmente fue la misma de -20 a + 40 mV en cada uno de los experimentos (ver tabla 6). A pesar que no se estudio en detalle la variabilidad en las velocidades de inactivación, parece que este tipo de comportamiento se presenta cuando el parche de membrana es desprendido del resto de la membrana celular (Zagotta y col., 1988).

Estos canales presentan a un proceso similar al de la inactivación lenta, en el cual los canales entran a un estado en donde ellos son incapaces de abrirse por períodos de tiempo relativamente prolongados cuando las despolarizaciones de la membrana se repiten a intervalos breves. Este comportamiento es muy

similar al descrito para los canales de potasio de la rectificación tardía (Standen y col., 1985) y para el canal de K^+ Shaker (Hoshi y col., 1991; Zagotta y Aldrich, 1990). También existen evidencias de que un canal se abre y se cierra independientemente de los demás canales presentes en el parche de membrana, tal como se ha reportado para los canales de sodio (Aldrich y Stevens, 1987; Horn y col., 1984; Patlak y Horn, 1982) y los canales de potasio de la rectificación tardía (Standen y col., 1985).

A partir del análisis de canales únicos y de las mediciones de las corrientes de compuertas se ha propuesto que los canales tipo-A transitan entre varios estados cerrados antes de que ellos entren al estado abierto (Bezanilla y col., 1991; Perozo y col., 1993; Zagotta y Aldrich, 1990).

La latencia a la primera apertura indica la dependencia al voltaje antes de que se abra el canal (Aldrich y col., 1983; Aldrich y Stevens, 1987), reflejando una serie de cambios conformacionales (de la carga) que preceden a la apertura del canal (Zagotta y col., 1989; Zagotta y Aldrich, 1990). El análisis de las latencia a la primera apertura del canal similar al tipo A, sugiere un esquema con al menos tres estados cerrados antes de que el canal se abra. Las transiciones entre estos estados cerrados son altamente dependientes del voltaje (Fig. 39), de manera muy

similar a como se ha reportado para el canal tipo A (Zagotta y col., 1989; Zagotta y Aldrich, 1990).

Las distribuciones de los tiempos cerrados se ajustaron a dos o tres exponenciales. Las constantes de tiempo cerrado más lentas fueron dependientes del voltaje, mientras que la constante de tiempo más rápida fue independiente del voltaje. El componente rápido probablemente representa las duraciones del estado cerrado dentro del burst, lo cual reflejarían las velocidades de transición del último estado cerrado al estado abierto durante un burst (Hoshi y col., 1991; Shao y Papazian, 1993; Zagotta y Aldrich, 1990), mientras que los componentes lentos reflejarían las velocidades de recuperación desde el estado inactivado (Hoshi y col., 1991; Shao y Papazian, 1993). La falta de dependencia al voltaje de las velocidades de transición rápida indica que no ocurre una redistribución de la carga entre los estados cerrados y la transición al estado abierto (Zagotta y Aldrich, 1990). Los dos componentes más lentos muestran una dependencia al voltaje y quizá puedan ser una evidencia de dos estados conformacionales asociados con la inactivación tipo N (Gómez-Laguna y Armstrong, 1994; Ruppertsberg y col., 1991).

Los histogramas del tiempo abierto (Fig. 37) muestran una distribución biexponencial a todos los voltajes, lo cual concuerda

con la idea de que el canal tiene dos estados abiertos (Colquhoun y Hawkes, 1995). La constante de tiempo más rápida no muestra ninguna dependencia al voltaje, tal como se ha reportado para el canal tipo A (Zagotta y Aldrich, 1990). Por otro lado, el segundo estado abierto muestra una ligera dependencia al voltaje, el tiempo promedio de apertura incremento aproximadamente el 33% de -40 a +40 mV, una dependencial al voltaje similar a la reportada por Shao y Papazian (1993) para el canal de K⁺ Shaker. Asimismo, el tiempo promedio de apertura calculado mediante la suma de los tiempos de apertura individuales y divididos por el número total de cierres mostro la misma dependencia al voltaje que la constante de tiempo lenta. No obstante, es difícil estimar con precisión si estos canales tienen dos estados abiertos ya que, en todos los registros (47) siempre existio más de un canal activo en el parche de membrana. En general, en los parches con varios canales independientes, cada uno con cierta probabilidad de apertura, la entrada y salida del estado abierto no está sincronizada para la población entera, por lo que la distribución de los tiempos de apertura y cierre, así como la latencia a la primera apertura de un canal estarán enmascarados por cualquiera de los otros canales presentes en el parche de membrana (Colquohoun y Sigworth, 1995). Además, a diferencia del canal de K⁺ Shaker del músculo de la

Drosophila, el cual presenta el fenómeno de run-down (Zagotta y Aldrich, 1990), el canal similar al tipo A del músculo esquelético de la rana no muestra este fenómeno, por lo que fue imposible registrar un sólo canal. Los canales permanecieron activos por períodos mayores a 90 min.

El presente análisis de los tiempos abierto y cerrado y de la latencia a la primera apertura permite hacer una sugerencia tentativa acerca del comportamiento cinético de estos canales con al menos 3 estados cerrados, 2? estados abiertos y 2 estados inactivados. Además de que generan corrientes salientes transitorias, la cinética parece muy semejante al canal A, por lo que posiblemente algunos de los detalles estructurales de los canales del músculo esquelético de la rana sean similares al canal de K⁺ Shaker descrito en otros tipos celulares.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, B. A., and Levitan, I. B. 1982. Intracellular injection of protein kinase inhibitor blocks the serotonin-induced increase in K⁺ conductance in *Aplysia* neuron R15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 3877-3880.
- Adams, D. J., and G. S. Oxford. 1983. Interaction of internal anions with potassium channels of the squid giant axon. *J. Gen. Physiol.* 82: 429-448.
- Adams, D. J., S. J. Smith, and S. H. Thompson. 1980. Ionic currents in molluscan soma. *Ann. Rev. Neurosci.* 3: 141-167.
- Adrian, R. H., W. K. Chandler, and A. L. Hodgkin. 1970a. Voltage clamp experiments in striated muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)*. 208: 607-644.
- Adrian, R. H., W. K. Chandler, and A. L. Hodgkin. 1970b. Slow changes in potassium permeability in skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 208: 645-668.
- Adrian, R. H., and W. H. Freygang. 1962. Potassium conductance of frog muscle membrane under controlled voltage. *J. Physiol. (Lond.)*. 163: 104-114.
- Adrian, R. H., and M. W. Marshall. 1976. Action potential reconstructed in normal and myotonic muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)*. 258: 125-143.
- Aghajanian, G. K. 1985. Modulation of a transient outward current in serotonergic neurones by α_1 -adrenoreceptors. *Nature (Lond.)*. 315: 501-503.
- Aldrich, R. W., D. P. Corey, and C. F. Stevens. 1983. A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature (Lond.)*. 306: 436-441.
- Aldrich, R. W., and C. F. Stevens. 1987. Voltage-dependent gating sodium channels from mammalian neuroblastoma cells. *J. Neurosci.* 7: 418-443.
- Almers, W., and C. M. Armstrong. 1980. Survival of K⁺ permeability and gating currents in squid axons perfused with K⁺-free media. *J. Gen. Physiol.* 75: 61-78.
- Argibay, J. A., and O. F. Hutter. 1973. Voltage-clamp experiments on the inactivation of the delayed potassium current in skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)*. 41p-43p.
- Armstrong, C. M. 1969. Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injection in squid axons. *J. Gen. Physiol.* 54: 553-575.
- Armstrong, C. M. 1971. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J. Gen. Physiol.* 58: 413-437.
- Armstrong, C. M., and B. Hille. 1972. The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channel of the node of Ranvier. *J. Gen. Physiol.* 59: 388-400.
- Armstrong, C. M., and S. R. Taylor. 1980. Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. *Biophys. J.* 30: 473-488.
- Ashcroft, F. M., D. E. Harrison, and S. J. H. Ashcroft. 1984. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -

cells. *Nature (Lond.)*. 312: 446-448.

Ashford, M. L. J., N. C. Sturgess, N. J. Trout, N. J. Gardner, and C. N. Hales. 1988. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflügers Archiv*. 412: 297-304.

Barret, J. N., K. L. Magleby, and B. S. Pallota. 1982. Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 331: 211-230.

Beam, K. G., and L. Donaldson. 1983a. A quantitative study of potassium channel kinetics in rat skeletal muscle from 1 to 37°C. *J. Gen. Physiol.* 81: 485-512.

Beam, K. G., and L. Donaldson. 1983b. Slow components of potassium tail currents in rat skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 81: 513-530.

Beaugé, L. A., and I. M. Glynn. 1977. A modifier of (Na⁺ + K⁺) ATPase in commercial ATP. *Nature (Lond.)*. 268: 355-356.

Belluzi, O., O. Sacchi, and E. Wanke. 1985. A fast transient outward current in the rat sympathetic neurone studied under voltage-clamp conditions. *J. Physiol. (Lond.)*. 358: 91-108.

Bezanilla, F. 1985. Gating of sodium and potassium channels. *J. Memb. Biol.* 88: 97-111.

Bezanilla, F., and C. M. Armstrong. 1972. Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J. Gen. Physiol.* 60: 588-608.

Bezanilla, F., C. Caputo, R. DiPolo, and H. Rojas. 1986. Potassium conductance of the squid giant axon is modulated by ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 2743-2745.

Bezanilla, F., E. Perozo, D. Papazian, and E. Stefani. 1991. Molecular basis of gating charge immobilization in Shaker potassium channels. *Science*. 254: 679-683.

Bigay, J., P. Deterre, C. Pfister, and M. Chabre. 1985. Fluoroaluminates active transducin-GDP by mimicking the γ -phosphate of GTP in its binding site. *FEBS Letters*. 191: 181-185.

Bigay, J., P. Deterre, C. Pfister, and M. Chabre. Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on G-proteins as reversible bound analogues of the γ phosphate of GTP. *EMBO J.* 6: 2907-2917.

Binstock, L., and L. Goldman. 1969. Current- and voltage-clamped studies on *Myxicola* Giant axons. *J. Gen. Physiol.* 54: 730-740.

Birnbaumer, L., A. Yatani, A. M. VanDongen, R. Graf, J. Codina, K. Okabe, R. Mattera, and A. M. Brown. 1990. G protein coupling of receptors to ionic channels and other effector systems. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30: 13S-22S.

Blackmore, F., S. B. Bocckino, L. E. Waynick, and J. H. Exton. 1985. Role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the hydrolysis of hepatocyte phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by calcium-mobilizing hormones and the control of cell calcium. *J. Biol. Chem.* 260: 14477-14483.

Blatz, A. L., and K. L. Magleby. 1984. Ion conductance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Gen. Physiol.* 84: 1-23.

Blatz, A. L., and K. L. Magleby. 1986. Quantitative description of three modes of activity of fast chloride channels from rat skeletal muscle. *J.*

Physiol. 378: 141-174.

Blatz, A. L., and K. L. Magleby. 1989. Adjacent interval analysis distinguishes among gating mechanisms for the fast chloride channel from rat skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 410: 561-585.

Bockaert, J., V. Homburger, and B. Rouot. 1987. GTP binding proteins: a key role in cellular communication. *Biochimie*. 69: 329-338.

Bourne, H. R., D. A. Sanders, and F. McCormick. 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature (Lond.)*. 348: 125-132.

Bourne, H. R., D. A. Sanders, and F. McCormick. 1990. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature (Lond.)*. 349: 117-127.

Bourque, C. W., J. C. Randle, and L. P. Renaud. 1985. Calcium-dependent potassium conductance in rat supraoptic nucleus neurosecretory neurons. *J. Neurophysiol.* 54: 1375-1382.

Boyle, P. J., and E. J. Conway. 1941. Potassium accumulation in muscle and associated changes. *J. Physiol. (Lond.)*. 100: 1-63.

Breitwieser, G. E., and G. Szabo. 1985. Uncoupling of cardiac muscarinic and β -adrenergic receptors from ion channels by a guanine nucleotide analogue. *Nature (Lond.)*. 317: 538-540.

Brezden, B. L., D. R. Gardner, and C. E. Morris. 1986. A potassium selective channel in isolated *Lymnaea stagnalis* heart muscle cells. *J. Exp. Biol.* 123: 175-189.

Brown, A. M. 1993. Membrane-delimited

cell signaling complexes: direct ion channel regulation by G proteins. *J. Membrane Biol.* 131: 93-104.

Brown, A. M., and L. Birnbaumer. 1988. Direct G protein gating of ion channels. *Am J. Physiol.* 254 (Heart Circ. Physiol. 23): H401-H410.

Brown, A. M., and L. Birnbaumer. 1990. Ionic channels and their regulation by g protein subunits. *Ann, Rev. Physiol.* 52: 197-213.

Brum, G., W. Osterrieder, and W. Trautwein. 1984. β -Adrenergic increase in the calcium conductance of cardiac myocytes studied with the patch clamp. *Pflüger Archiv.* 401: 111-118.

Buck, L., and R. Axel. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell.* 65: 175-187.

Burton, F., U. Dörstelmann, and O. F. Hutter. 1989. Single-channel activity in sarcolemmal vesicles from human and other mammalian muscles. *Muscle and Nerve.* 11: 1029-1038.

Camacho, J., M. J. Delay, M. Vazquez, C. Argüello, and J. A. Sánchez. 1996. Transient outward K⁺ channels in vesicles derived from frog skeletal muscle plasma membranes. *Biophys. J.* 71: 171-181.

Cantley, L. C. Jr., L. Josephson, R. Warner, M. Yanagisawa, C. Lechene, and G. Guidotti. 1977. Vanadate is a potent (Na, K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.* 252: 7421-7423.

Castle, N. A., and D. G. Haylett. 1987. Effects of channel blockers on potassium efflux from metabolically exhausted frog skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 383: 456-459.

Carbone, E., and H. D. Lux. 1984. A

- low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature (Lond.)*. 310: 501-502.
- Cataldi, M., M. Taglialatela, S. Guerriero, S. Amoroso, G. Lombardi, G. Renzo, and L. Annunziato. 1996. Protein-tyrosine kinases activate while protein-tyrosine phosphatases inhibit L-type calcium channel activity in pituitary GH₃ cells. *J. Biol. Chem.* 271: 9441-9446.
- Chabala, L. D. 1984. The kinetics of recovery and development of potassium channel inactivation in perfused squid (*Loligo pealei*) giant axons. *J. Physiol. (Lond.)*. 356: 193-220.
- Chandler, W. K., and H. Meves. 1965. Voltage clamp experiments on internally perfused giant axons. *J. Physiol. (Lond.)*. 180: 788-820.
- Chandler, W. K., and H. Meves. 1970. Evidence for two types of sodium conductance in axons perfused with sodium fluoride solution. *J. Physiol. (Lond.)*. 211: 653-678.
- Choquet, D., P. Sarthou, D. Primi, P. Cazenave, and H. Korn. 1987. Cyclic AMP-modulated potassium channels in murine B cells and their precursors. *Science*. 235: 1211-1214.
- Codina, J., D. Grenet, A. Yatani, L. Birnbaumer, and A. Brown. 1987. Hormonal regulation of pituitary GH₃ cell K⁺ channels by G_s is mediated by its α -subunit. *FEBS Lett.* 216: 104-106.
- Codina, J., J. D. Hildebrandt, L. Birnbaumer, and R. D. Sekura. 1984a. Effects of guanine nucleotides and Mg on human erythrocyte N_i and N_o, the regulatory components of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 259: 11408-11418.
- Codina, J., J. D. Hildebrandt, R. Iyengar, L. Birnbaumer, R. D. Sekura, and C. R. Manclark. 1983. Pertussis toxin substrate, the putative N_i of adenylyl cyclases, is an α/β heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80: 4276-4280.
- Codina, J., J. D. Hildebrandt, R. D. Sekura, M. Birnbaumer, J. Bryan, C. R. Manclark, R. Iyengar, and L. Birnbaumer. 1984b. N_s and N_i: the stimulatory and inhibitory regulatory components of adenylyl cyclase. Purification of the human erythrocyte proteins without the use of activating regulatory ligands. *J. Biol. Chem.* 259: 5871-5886.
- Coetzee, W. A. 1992. ATP-sensitive potassium channels and myocardial ischemia-why do they open. *Cardiovasc. Drug Ther.* 6: 201-208.
- Cole, K. S. 1949. Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Arch. Sci. Physiol.* 3: 253-258.
- Colquhoun, D., and Hawkes, A. G. 1983. The principles of the stochastic interpretation of ion-channel mechanisms. In *Single-channel recording*. B. Sakmann and E. Neher editors. Plenum Press, New York, NY. 191-263.
- Colquhoun, D., and Hawkes, A. G. 1995. The principles of the stochastic interpretation of ion-channel mechanisms. In *Single-channel recording*. 2nd ed. B. Sakmann and E. Neher editors. Plenum Press, New York, NY. 397-482.
- Colquhoun, D., and B. Sakmann. 1985. Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J. Physiol. (Lond.)*. 369: 501-557.

Colquhoun, D., and F. J. Sigworth. 1995. Fitting and statistical analysis of single-channel records. In *Single-channel recording*. 2nd ed. B. Sakmann and E. Neher editors. Plenum Press, New York, NY. 483-587.

Colston, J. T., P. Kumar, J. P. Chambers, and G. L. Freeman. 1994. Altered sarcolemmal calcium channel density and Ca^{2+} -pump ATPase activity in tachycardia heart failure. *Cell Calcium*. 16: 349-356.

Connor, J. A. 1978. Slow repetitive activity from fast conductance changes in neurons. *Fed. Proc.* 37: 2139-2145.

Connor, J. A., and C. F. Stevens. 1971. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol. (Lond.)*. 213: 21-30.

Cook, D. L., and N. Hales. 1984. Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature (Lond.)*. 311: 271-273.

Cooper, E., and A. Shrier. 1985. Single-channel analysis of fast transient potassium currents from rat nodose neurones. *J. Physiol. (Lond.)*. 369: 199-208.

Conti, F., and E. Neher. 1980. Single channel recording of K^+ currents in squid axons. *Nature (Lond.)*. 285: 140-143.

Corey, D. P., and C. F. Stevens. 1983. Science and technology of patch-recording electrodes. In *Single-Channel Recording*. B. Sakmann and E. Neher, editors. Plenum Press. New York, NY. 53-60.

Coronado, R., and F. Bezanilla. 1984. Functional channels extracted from the squid giant axon. *Biophys. J.* 45: 38a.

Cota, G., and C. M. Armstrong. 1988.

Potassium channel "inactivation" induced by soft-glass patch pipettes. *Biophys. J.* 53: 107-109.

del Castillo, J., and B. Katz. 1957. Interaction at endplate receptors between different choline derivatives. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 146: 369-381.

Dantzing, J. A., and Y. E. Goldman. 1985. Suppression of muscle contraction by vanadate. Mechanical and ligand binding studies on glycerol-extracted rabbit fibers. *J. Gen. Physiol.* 86: 305-327.

Doucet, J. P., and B. S. Tuana. 1991. Identification of low molecular weight GTP-binding proteins and their sites of interaction is subcellular fractions from skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 266: 17613-17620.

Dawson, M. J., D. G. Gadian, and D. R. Wilkie. 1980. Mechanical relaxation rate and metabolism studied in fatiguing muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. *J. Physiol. (Lond.)*. 299: 465-484.

Downs Jr., R. W., A. M. Spiegel, M. Singer, S. Reen, and G. D. Aurbach. 1980. Fluoride stimulation of adenylate cyclase is dependent on the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 255: 949-954.

Dubois, J. M. 1981. Evidence for the existence of three types of potassium channels in the frog Ranvier node membrane. *J. Physiol. (Lond.)*. 318: 297-316.

Dubois, J. M. 1983. Potassium currents in the frog node of Ranvier. *Prog. Biophys. molec. Biol.* 42: 1-20.

Dubois, J. M., and C. Bergman. 1977. The steady-state potassium conductance of the ranvier node at various external K^+ -concentrations. *Pflügers Arch.* 370: 185-194.

- Duval, A., and C. Léoty. 1978. Ionic currents in mammalian fast skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 278: 403-423.
- Duval, A., and C. Léoty. 1980a. Ionic currents in slow twitch skeletal muscle in the rat. *J. Physiol. (Lond.)*. 307: 23-41.
- Duval, A., and C. Léoty. 1980b. Comparison between the delayed outward current in slow and fast twitch skeletal muscle in the rat. *J. Physiol. (Lond.)*. 307: 43-57.
- Eaton, D. C., and M. S. Brodwick. 1980. Effects of barium on the potassium conductance of squid axon. *J. Gen. Physiol.* 75: 727-750.
- Eckstein, F., D. Cassel, H. Levkovitz, M. Lowe, and Z. Selinger. 1979. Guanosine 5'-O-(2-Thiodiphosphate). An inhibitor of adenylate cyclase stimulation by guanine and fluoride ions. *J. Biol. Chem.* 254: 9829-9834.
- Edry-Schiller, J., S. Ginsburg, and R. Rahamimoff. 1991. A bursting potassium channel in isolated cholinergic synaptosomes of *Torpedo electric* organ. 439: 627-647.
- Elmslie, K. S., W. Zhou, and S. W. Jones. 1990. LHRH and GTPγS modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron*. 5: 75-80.
- Escobar, a., y J. Vergara. 1993. Identificación de vesículas membranosas de músculo esquelético que proceden del sistema tubular-T. II Congreso Iberoamericano de Biofísica. p93.
- Ewald, D. A., A. Williams, and I. B. Levitan. 1985. Modulation of single Ca^{2+} -dependent K^+ -channels activity by protein phosphorylation. *Nature (Lond.)*. 315: 503-506.
- Fabiato, A. 1985. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac Purkinje cell. *J. Gen. Physiol.* 85: 247-290.
- Fenwick, E. M., A. Marty, and E. Neher. 1982. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)*. 331: 599-635.
- Findaly, I., M. J. Dunne, and O. H. Petersen. 1985. ATP-sensitive inward rectifier and voltage and calcium-activated K^+ channels in cultured pancreatic islet cells. *J. Membr. Biol.* 88: 165-172.
- Frankenhaeuser, B. 1965. Computed action potential in nerve from *Xenopus laevis*. *J. Physiol. (Lond.)*. 180: 780-787.
- Frankenhaeuser, B., and A. F. Huxley. 1964. The action potential in the myelinated nerve fibre of *Xenopus laevis* as computed on the basis of voltage clamp data. *J. Physiol. (Lond.)*. 171: 302-324.
- French, R. J., and R. Horn. 1983. Sodium channel gating: models, mimics, and modifiers. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 12: 319-356.
- Forestier, C., J. Pierrard, and M. Vivaudou. 1996. Mechanism of action of K^+ channel openers on skeletal muscle K_{ATP} channels. *J. Gen. Physiol.* 107: 489-502.
- Fukushima, Y. 1982. Blocking kinetics of the anomalous potassium rectifier of tunicate egg studied by single channel recording. *J. Physiol. (Lond.)*. 331: 311-331.
- Gadsby, D. C. 1983. B-adrenoceptor agonist increase membrane K^+ conductance in cardiac Purkinje

- fibres. *Nature (Lond.)*. 306: 691-693.
- Galvan, M., and C. Sedlmeir. 1984. Outward currents in voltage-clamped rat sympathetic neurones. *J. Physiol. (Lond.)*. 356: 115-133.
- García, J., R. Gamboa-Aldaco, and E. Stefani. 1990. Charge movement and calcium current in skeletal muscle fibers are enhanced by GTPγS. *Pflügers Archiv*. 117: 114-116.
- Gibbons, J. D. 1971. *Nonparametric Statistical Inference*. McGraw Hill, Inc., New York.
- Gilly, W. F., and C. M. Armstrong. 1982. Divalent cations and the activation kinetics of potassium channels in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* 79: 965-996.
- Gilman, A. G. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 615-649.
- Goldman, D. E. 1943. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* 27: 37-60.
- Gómez-Laguna, F., and C. M. Armstrong. 1994. The relation between ion permeant and recovery from inactivation of ShakerB K⁺ channels. *Biophys. J.* 67: 1806-1815.
- Grabowski, W., E. A. Lobsiger, and H. C. Lüttgau. 1972. The effect of repetitive stimulation at low frequencies upon the electrical and mechanical activity of single muscle fibres. *Pflügers Archiv*. 334: 222-239.
- Graff, I., J. Mockel, E. Laurent, C. Erneux, and J. E. Dumont. 1987. Carbachol and sodium fluoride, but not TSH, stimulate the generation of inositol phosphates in the dog thyroid. *FEBS Lett.* 210: 204-210.
- Hackbarth, I., W. Schmitz, H. Scholz, E. Erdmann, W. Krawietz, and G. Philipp. 1978. Positive inotropism of vanadate in cat papillary muscle. *Nature (Lond.)*. 275: 67.
- Hagiwara, S., and Y. Kidokoro. 1971. NA and Ca components of action potential in amphioxus muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)*. 219: 217-232.
- Hagiwara, S., K. Kusano, and N. Saito. 1961. Membrane changes of Onchidium nerve cell in potassium-rich media. *J. Physiol. (Lond.)*. 155: 470-489.
- Hagiwara, S., and K. Takahashi. 1974. The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell. *J. Membr. Biol.* 18: 61-80.
- Hagiwara, S., and M. Yoshii. 1979. Effects of internal potassium and sodium on the anomalous rectification of the starfish egg es examined by internal perfusion. *J. Physiol. (Lond.)*. 292: 251-265.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp technique for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflügers. Arch.* 391: 85-100.
- Hamilton, S. L., J. Codina, M. J. Hawkes, A. Yatani, T. Sawada, F. M. Strickland, S. C. Froehner, A. M. Spiegel, L. Toro, E. Stefani, et al. 1991. Evidence for direct interaction of G_α with the Ca²⁺ channel of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 266: 19528-19535.
- Hatta, S., M. M. Marcus, and M. M. Rasenick. 1986. Exchange of guanine nucleotide between GTP-binding proteins that regulate neuronal adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 5439-5443.
- Heidbuchel H., G. Callewart, J.

Vereecke, and E. Carmeliet. 1990. ATP-dependent activation of atrial muscarinic K⁺ channels in the absence of agonist an G-nucleotide. *Pflügers Archiv.* 416: 213-215.

Hescheler, J., W. Rosenthal, W. Trutwein, and G. Shultz. 1987. The GTP-binding protein, G_o, regulates neuronal calcium channels. *Nature (Lond.)*. 325: 445-447.

Hess, P., J. B. Lansman, and R. W. Tsien. 1984. Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonist and antagonist. *Nature (Lond.)*. 311: 538-544.

Hestrin, S. 1981. The interaction of potassium with the activation of anomalous rectification in frog muscle membrane. *J. Physiol. (Lond.)*. 317: 497-508.

Hille, B. 1973. Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations. *J. Gen. Physiol.* 61: 669-686.

Hille, B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. 607 pp.

Hille, B., and D. T. Campbell. 1976. An improved vaseline gap voltage clamp for skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 67: 265-293.

Hille, B., and W. Schwarz. 1978. Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J. Gen. Physiol.* 72: 409-442.

Hille, B., and W. Schwarz. 1979. K channels in excitable cells as multi-ion pores. *Brain. Res. Bull.* 4: 159-162.

Hocherman, S. D., and F. Bezanilla. 1996. A patch-clamp study of delayed

rectifier currents in skeletal muscle of control and mdx mice. *J. Physiol. (Lond.)*. 493: 113-128.

Hodgkin, A. L., and P. Horowicz. 1960a. The effect of sudden changes in ionic concentrations on the membrane potential of single muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)*. 153: 370-385.

Hodgkin, A. L., and P. Horowicz. 1960b. Potassium contractures in single muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)*. 153: 386-403.

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

Hodgkin, A. L., and A. F. Huxley. 1952b. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)*. 116: 473-496.

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

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

Hodgkin, A. L., A. F. Huxley, and B. Katz. 1949. Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch. Sci. physiol.* 3: 129-150. Hodgkin, A. L., A. F. Huxley, and B. Katz. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)*. 116: 424-448.

Hodgkin, A. L., and B. Katz. 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon

of the squid. *J. Physiol. (Lond.)*. 108: 37-77.

Holz, G. G. IV, S. G. Rane, and K. Dunlap. 1986. GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature (Lond.)*. 319: 670-672.

Horn, R., C. A. Vandenberg, and K. Lange. 1984. Statistical analysis of single sodium channels: effects of N-bromoacetamide. *Biophys. J.* 45: 323-335.

Hoshi, T., W. N. Zagotta, and R. W. Aldrich. 1991. Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*. 7: 547-556.

Hotson, J. R., and D. A. Prince. 1980. A Ca-activated hyperpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 43: 409-419.

Howlett, A. C., P. C. Sternweis, B. A. Macik, P. M. Van Arsdale, and A. G. Gilman. 1979. Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 254: 2287-2295.

Hudgins, P. M., and G. H. Bond. 1977. (Mg²⁺ + K⁺)-dependent inhibition of NaK-ATPase due to a contaminant in equine muscle ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 1024-1029.

Hudspeth, A. J. 1989. How the ear's works work. *Nature (Lond.)*. 341: 397-404.

Hutter, O. F., and D. Noble. 1960. Rectifying properties of heart muscle. *Nature (Lond.)*. 188: 495.

Ibarra, J., G. E. Morley, and M. Delmar. 1991. Dynamics of the inward rectifier K⁺ current during the action potential of guinea pig ventricular

myocytes. *Biophys. J.* 60: 1534-1539.

Imoto, Y., A. Yatani, J. P. Reeves, J. Codina, L. Birnbaumer, and A. M. Brown. 1988. The α subunit of G_i directly activates cardiac calcium channels in lipid bilayers. *Am J. Physiol.* 255: H722-H728.

Jenerick, H. 1959. The control of membrane ionic currents by the membrane potential of muscle. *J. Gen. Physiol.* 42: 923-930.

Jonas, P., M. E. Bräu, M. Hermsteiner, and W. Vogel. 1989. Single-channel recording in myelinated nerve fibers reveals one type of Na channel but different K channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 7238-7242.

Kahn, R. A. 1991. Fluoride is not an activator of the smaller (20-25 kDa) GTP binding proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 15595-15597.

Takei, M., A. Noma, and T. Shibasaki. 1985. Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol. (Lond.)*. 363: 441-462.

Kandel, E. R., and L. Tauc. 1966. Anomalous rectification in the metacerebral giant cells and its consequences for synaptic transmission. *J. Physiol. (Lond.)*. 183: 287-304.

Katada, T., G. M. Bokoch, M. D. Smigel, M. Ui, and A. G. Gilman. 1984a. The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259: 3578-3585.

Katada, T., G. M. Bokoch, M. D. Smigel, M. Ui, and A. G. Gilman. 1984b. The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J.*

Biol. Chem. 259: 3586-3595.

Katz, B. 1949. Les constantes électriques de la membrane du muscle. Arch. Sci. Physiol. 2: 285-299.

Kleuss, C., J. Hescheler, C. Ewel, W. Rosenthal, G. Schultz, and B. Wittig. 1991. Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. Nature (Lond.). 353: 43-48.

Klein, M., J. Camardo, and E. R. Kandel. 1982. Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in *Aplysia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 6912-6916.

Kunze, D. L. 1972. Reflex discharge patterns of cardiac vagal efferent fibres. J. Physiol. (Lond.). 222: 1-15.

Kurachi, Y., T. Nakajima, and T. Sugimoto. 1986a. On the mechanism of activation of muscarinic K⁺ channels by adenosine in isolated atrial cells: involvement of GTP-binding proteins. Pflügers Arch. 407: 264-74.

Kurachi, Y., T. Nakajima, and T. Sugimoto. 1986b. Acetylcholine activation K⁺ channels in cell-free membrane of atrial cells. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.). 251: H681-H684.

Kurachi, Y., T. Nakajima, and T. Sugimoto. 1986c. Role of intracellular Mg²⁺ in the activation of muscarinic K⁺ channel in cardiac atrial cell membrane. Pflügers Arch. 407: 572-574.

Latorre, R., A. Oberhauser, P. Labarca, and O. Alvarez. 1989. Varieties of calcium-activated potassium channels. Annu. Rev. Physiol. 51: 385-399.

Latorre, R., and C. Miller. 1983.

Conduction and selectivity in potassium channels. J. Membrane Biol. 71: 11-30.

Lederer, W. J., and C. G. Nichols. 1989. Nucleotide modulation of the activity of rat heart ATP-sensitive K⁺ channels in isolated membrane patches. J. Physiol. (Lond.) 419: 193-211.

Lewis, D. L., F. F. Weight, and A. Luini. 1986. A guanine nucleotide-binding protein mediates the inhibition of voltage-dependent calcium current by somatostatin in a pituitary cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 9035-9039.

Lindquist, Y., G. Schneider, and P. Vihko. 1994. Crystal structures of rat acid phosphatase complexed with the transition-state analog vanadate and molybdate. Eur. J. Biochem. 221: 139-142.

Llano, I., C. K. Webb, and F. Bezanilla. 1988. Potassium conductance of the squid giant axon. Single-channel studies. J. Gen. Physiol. 92: 179-196.

Llinás, R. 1988. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: Insights into central nervous system function. Science. 242: 1654-1664.

López, H. S., and A. M. Brown. 1991. Correlation between G protein activation and reblocking kinetics of Ca²⁺ channel currents in rat sensory neurons. Neuron. 7: 327-336.

Lüttgau, H. C. 1963. The action of calcium ions on potassium contractures of single muscle fibres. J. Physiol. (Lond.). 168: 679-697.

Marmont, G. 1949. Studies on the axon membrane. A new method. J. Cellular Comp. Physiol. 34: 351-382.

- Matsuda, H. 1988. Open-state substructure of inwardly rectifying potassium channels revealed by magnesium block in guinea-pig heart cells. *J. Physiol. (Lond.)*. 397: 237-258.
- Matsuda, H. 1990. Magnesium gating of the inwardly rectifying K⁺ channel. *Annu. Rev. Physiol.* 53: 289-298.
- Maughan, D. W., J. E. Molloy, M. A. P. Brotto, and R. E. Godt. 1995. Approximating the isometric force-calcium relation of intact frog muscle using skinned fibers. *Biophys. J.* 69: 1484-1490.
- McAllister, R. E., and D. Noble. 1966. The time and voltage dependence of the slow outward current in cardiac purkinje fibres. *J. Physiol. (Lond.)*. 186: 632-662.
- McCann, J. D., and M. J. Welsh. 1990. Regulation of Cl⁻ and K⁺ channels in airway epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 115-135.
- McKillen, H. C., N. W. Davies, P. R. Stanfield, and N. B. Standen. 1994. The effect of intracellular anions on ATP-dependent potassium channels of rat skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 479: 341-351.
- McManus, O. B., and K. L. Magleby. 1988. Kinetic states and modes of single large-conductance calcium-activated potassium channels in cultured rat skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 402: 79-120.
- McManus, O. B., and K. L. Magleby. 1991. Accounting for the Ca²⁺-dependent kinetics of single large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 443: 739-777.
- McNaughton, P. A. 1990. Light response of vertebrate photoreceptor. *Physiol. Rev.* 62: 70: 847-883.
- Meech, R. W. 1974. The sensitivity of *Helix aspersa* neurones to injected calcium ions. *J. Physiol. (Lond.)*. 237: 259-277.
- Meves, H., and Y. Pichon. 1977. The effect of internal and external 4-aminopyridine on the potassium currents in intracellularly perfused squid giant axons. *J. Physiol. (Lond.)*. 268: 511-532.
- Mickelson, J. D., and C. F. Louis. 1985. Components of purified sarcolemma from porcine skeletal muscle. *Arch. Biochemistry and Biophysics*. 242: 112-126.
- Mihara, S., Y. Katayama, and S. Nishis. 1985. Slow postsynaptic potentials in neurones of submucous plexus of guinea-pig caecum and their mimicry by noradrenaline and various peptides. *Neuroscience*. 16: 1057-1068.
- Misler, S., L. C. Falke, K. Gillis, and M. L. McDaniel. 1986. A metabolite-regulated potassium channel in rat pancreatic B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 7119-7123.
- Mouzou, A., J. P. Poindessault, and G. Raymond. 1992. Involvement of a pertussis toxin-sensitive G-protein in excitation-contraction coupling of intact and cut-end voltage-clamped skeletal muscle. *Pflügers Archiv*. 421: 510-512.
- Näbauer, M., G. Callewaert, L. Cleemann, and M. Morad. 1989. Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science*. 244: 800-803.
- Neher, E. 1971. Two fast transient current components during voltage clamp on snail neurones. *J. Gen. Physiol.* 58: 36-53.

- Neher, E. 1988. Exploring secretion control by patch-clamp techniques. In Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lecture. Raven Press, New York, NY. 37-53.
- Neher, E., and B. Sakmann. 1992. The patch clamp technique. *Sci. Am.* 266: 28-35.
- Nelson, P. G., and K. Frank. 1967. Anomalous rectification in cat spinal motoneurons and effect of polarizing currents on excitatory postsynaptic potential. *J. Neurophysiol.* 30: 1097-1113.
- Nichol, J. A., and O. F. Hutter. 1996. Tensile strength and dilatational elasticity of giant sarcolemmal vesicles shed from rabbit muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 493: 187-198.
- Nichol, J. A., and O. F. Hutter. 1996. Ca^{2+} loading reduces the tensile strength of sarcolemmal vesicles shed from rabbit muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 493: 199-209.
- Nicoll, R. A. 1988. The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels in the brain. *Science*. 241: 545-551.
- Niggli, E., and W. J. Lederer. 1990. Voltage-independent calcium release in heart muscle. *Science*. 250: 565-568.
- Noble, D. 1979. The Initiation of Heartbeat. 2nd edition. Clarendon Press, Oxford, 156 pp.
- Noble, D., and R. W. Tsien. 1968. The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol. (Lond.)*. 195: 185-214.
- Noma, A. 1983. ATP-regulated single K channels in cardiac muscle. *Nature(Lond.)*. 305: 147-148.
- Northup, J. K., P. C. Sternweis, and A. G. Gilman. 1983. The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 258: 11361-11368.
- Northup, J. K., P. C. Sternweis, and A. G. Gilman. 1983. The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 258: 11369-11376.
- Ogden, D. C., and P. R. Stanfield. 1987. Introduction to single channel recording. In *Microelectrode Technique. The Plymouth Workshop Handbook*. N. B. Standen, P. T. A. Gray, and M. J. Whitaker editor. Company of Biologists Ltd., Cambridge. 63-81.
- Ohmori, H. 1978. Inactivation kinetics and steady-state current noise in the anomalous rectifier of tunicate egg cell membrane. *J. Physiol. (Lond.)*. 281: 77-99.
- Ohmori, H., S. Yoshida, and S. Hagiwara. 1981. Single K⁺ channel currents of anomalous rectification in cultured rat myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 4960-4964.
- Osterrieder, W., G. Brum, J. Hescheler, W. Trautwein, F. Hofmann, and V. Flockerzi. 1982. Injection of subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates Ca^{2+} current. *Nature (Lond.)*. 298: 576-578.
- Pallota, B. S., K. L. Magleby, and J. N. Barret. 1981. Single channel recordings of Ca^{2+} -activated K⁺ currents in rat muscle cell culture. *Nature (Lond.)*. 293: 471-474.
- Parent, L., and R. Coronado. 1989. Reconstitution of the ATP-sensitive potassium channel of skeletal muscle. Activation by a G protein-dependent process. *J. Gen. Physiol.* 94: 445-463.

- Patlak, J., and R. Horn. 1982. Effect of N-bromoacetamide on single sodium channel currents in excised membrane patches. *J. Gen. Physiol.* 79: 333-351.
- Pennefather, P., C. Oliva, and N. Mulrine. 1992. Origin of the potassium and voltage dependence of the cardiac inwardly rectifying K-current (I_{K1}). *Biophys. J.* 61: 448-462.
- Perozo, E., and F. Bezanilla. 1990. Phosphorylation affects voltage gating of the delayed rectifier K⁺ channel by electrostatic interaction. *Neuron.* 5: 685-690.
- Perozo, E., R. MacKinnon, F. Bezanilla, and E. Stefani. 1993. Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels. *Neuron.* 11: 353-358.
- Petersen, O. H., and D. V. Gallacher. 1988. Electrophysiology of pancreatic and salivary acinar cells. *Annu. Rev. Physiol.* 50: 65-80.
- Petersen, O. H., and I. Findlay. 1987. Electrophysiology of the pancreas. *Physiol. Rev.* 67: 1054-1116.
- Petersen, O. H., and Y. Maruyama. 1984. Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature (Lond.)*. 307: 693-696.
- Peyer, J. E., A. B. Cachelin, I. B. Levitan, and H. Reuter. 1982. Ca²⁺-activated K⁺ conductance in internally perfused snail neurons is enhanced by protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 4207-4211.
- Pfaffinger, P. J., J. M. Martin, D. D. Hunter, N. M. Nathanson, and B. Hille. 1985. GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K⁺ channel. *Nature (Lond.)*. 317: 536-538.
- Pollo, A., M. Tagliatela, and E. Carbone. 1991. Voltage-dependent inhibition and facilitation of Ca channel activation by GTPγS and Ca-agonists in adult rat sensory neurons. *Neurosci. Lett.* 123: 203-207.
- Rall, T. W., and E. W. Sutherland. 1958. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J. Biol. Chem.* 232: 1065-1076.
- Reuter, H. 1983. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature (Lond.)*. 301: 569-574.
- Rogawsky, M. A. 1985. The A-current: how ubiquitous a feature of excitable cells is it?. *Trends Neurosci.* 8: 214-219.
- Romey, G., and M. Lazdunski. 1984. The coexistence in rat muscle cells of two distinct classes of Ca²⁺-dependent K⁺ channels with different pharmacological properties and different physiological function. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 118: 669-674.
- Rorsman, P., K. Bokvist, C. Ammala, L. Eliasson, E. Renstrom, and J. Gabel. 1994. Ion channels, electrical activity and insulin secretion. *Diabete. Metab.* 20: 138-145.
- Rorsman, P., and G. Trube. 1985. Glucose dependent K⁺ channels in pancreatic β-cells are regulated by intracellular ATP. *Pflügers Arch.* 405: 305-309.
- Ross, E. M., and A. G. Gilman. 1980. Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 533-564.
- Rudy, B. 1988. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience.* 25: 729-749.

Ruppersberg, J. P., R. Frank, O. Pongs, and M. Stocker. 1991. Cloned neuronal $I_{K(A)}$ channels reopen during recovery from inactivation. *Nature (Lond.)*. 353: 657-660.

Sakmann, B., and E. Neher. 1983. *Single-Channel Recording*. Plenum Press, New York, NY. 503 pp.

Sakmann, B., A. Noma, and W. Trautwein. 1983. Acetylcholine activation of single muscarinic K^+ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature (Lond.)*. 303: 250-253.

Sakuta, H. 1994. Vanadate-induced inward Cl^- currents in *Xenopus laevis* oocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 268: 305-309.

Sauvé, R., L. Parent, C. Simoneau, and G. Roy. 1988. External ATP triggers a biphasic activation process of a calcium-dependent K^+ channel in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflügers Archiv.* 412: 469-481.

Scherer, N. M., J. M. Toro, M. L. Entman, and L. Birnbaumer. 1987. G-protein distribution in canine cardiac sarcoplasmic reticulum and sarcolemma: comparison to rabbit skeletal muscle membranes and to brain and erythrocyte G-proteins. *Arch. Biochemistry and Biophysics.* 259: 431-440.

Schwanstecher, C., C. Dickel, and U. Panten. 1994. Interaction of tolbutamide and cytosolic nucleotide in controlling the ATP-sensitive K^+ channel in mouse β -cells. *Br. J. Pharmacol.* 111: 302-310.

Shao, X. M., and D. M. Papazian. 1993. S4 mutations alter the single-channel gating kinetics of Shaker K^+ channels. *Neuron.* 11: 343-352.

Shintani, Y., and Marunaka, Y. 1996. Regulation of single Cl^- channel

conductance by insulin and tyrosine phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 142-147.

Shrager, P. 1974. Ionic conductance changes in voltage clamped crayfish axons at low pH. *J. Gen. Physiol.* 64: 666-690.

Shuster, M. J., J. S. Camardo, S. A. Siegelbaum, and E. R. Kandel. 1985. Cyclic AMP-dependent protein kinase closes the serotonin-sensitive K^+ channels of *Aplysia* sensory neurones in cell-free membrane patches. *Nature (Lond.)*. 392-395.

Sigurdson, W. J., C. E. Morris, B. L. Brezden, and D. R. Gardner. 1987. Stretch activation of a K^+ channel in molluscan heart cells. *J. Exp. Biol.* 127: 191-209.

Simon, M. I., M. P. Strathmann, and N. Gautam. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science.* 252: 802-808.

Sitaramayya, A., J. Harkness, J. H. Parkes, C. González-Oliva, and P. A. Liebman. 1986. Kinetic studies suggest that light-activated cyclic GMP phosphodiesterase is a complex with G-protein subunits. *Biochemistry.* 25: 651-656.

Smith, C. A., and I. Rayment. 1996. X-ray structure of the magnesium (II)-ADP-vanadate complex of the *Dictyotellium discoideum* myosin motor domain to Armstrong resolution. *Biochemistry.* 35: 5404-5417.

Soejima, M., and A. Noma. 1984. Mode of regulation of the Ach-sensitive K^+ channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. *Pflügers Archiv.* 400: 424-431.

Solc, C. K., W. N. Zagotta, and R. W. Aldrich. 1987. Single-channel and genetic analysis reveal two distinct

A-type potassium channels in *Drosophila*. *Science*. 236: 1094-1098.

Somasundaram, B., R. T. Treger, and D. R. Trentham. 1991. GTPyS causes contraction of skinned frog skeletal muscle via the DHP-sensitive Ca^{2+} channels of sealed T-tubules. *Pflügers Archiv*. 418: 137-143.

Spruce, A. E., N. B. Standen, and P. R. Stanfield. 1987. Studies of the unitary properties of adenosine-5'-triphosphate-regulated potassium channels of frog skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 382: 213-236.

Standen, N. B., A. I. Pettit, N. W. Davies, and P. R. Stanfield. 1992. Activation of ATP-dependent K^+ currents in intact skeletal muscle fibre by reduced intracellular pH. *Proc. R. Soc. Lon. B*. 247: 195-198.

Standen, N. B., and P. R. Stanfield. 1978. A potential- and time-dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle fibres by barium and strontium ions. *J. Physiol. (Lond.)*. 280: 169-191.

Standen, N. B., and P. R. Stanfield. 1978. Inward rectification in skeletal muscle: a blocking particle model. *Pflügers Arch*. 378: 173-176.

Standen, N. B., and P. R. Stanfield. 1979. Potassium depletion and sodium block of potassium currents under hyperpolarization in frog sartorius muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 294: 497-520.

Standen, N. B., and P. R. Stanfield. 1980. Rubidium block and rubidium permeability of the inward rectifier of frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 304: 415-435.

Standen, N. B., P. R. Stanfield, and T. A. Ward. 1985. Properties of single potassium channel from sarcolemma of

frog skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 364: 339-358.

Standen, N. B., P. R. Stanfield, T. A. Ward, and S. W. Wilson. 1984. A new preparation for recording single-channel currents from skeletal muscle. *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* 221: 455-358.

Stanfield, P. R. 1970. The effect of the tetraethylammonium ion on the delayed currents of frog skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 209: 209-229.

Stanfield, P. R. 1983. Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 97: 1-67.

Stanfield, P. R., Y. Nakajima, and K. Yamaguchi. 1985. Substance P raises neuronal membrane excitability by reducing inward rectification. *Nature (Lond.)*. 315: 498-501.

Sternweis, P. C., and A. G. Gilman. 1982. Aluminum: A requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79: 4888-4891.

Storm, J. P. 1987. Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol. (Lond.)*. 365: 733-759.

Suzuki, K., C. H. Petersen, and O. H. Petersen. 1985. Hormonal activation of single K^+ channels via internal messenger in isolated pancreatic acinar cells. *FEBS Lett.* 192: 307-312.

Swed, F. S., and C. Eisenhart. 1943. Tables for testing randomness of grouping in a sequence of alternatives. *Annu. Math. Statistics*. 14: 66-87.

Tatsumi, H., M. Costa, M. Schimerlik, and R. A. North. 1990. Potassium conductance increased by noradrenaline, opioids, somatostatin, and G-proteins; whole-cell recording from guinea-pig submucous neurons. *J. Neurosci.* 10: 1675-1682.

Taylor, P. S. 1987. Selectivity and patch measurements of A-current channels in *Helix aspersa* neurones. *J. Physiol. (Lond.)*. 388: 437-447.

Terzic, A., A. Jahangir, and Y. Kurachi. 1995. Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels: regulation by intracellular nucleotides and K⁺ channels-opening drugs. *Am. J. Physiol.* 269 (Cell Physiol. 38): C525-C545.

Thompson, S. H. 1977. Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones. *J. Physiol. (Lond.)*. 265: 465-488.

Toutant, M., J. Barhanin, J. Bockaert, and B. Rouot. 1988. G-proteins in skeletal muscle. *Biochem. J.* 254: 405-409.

Tracey, A. S., and M. J. Gresser. 1986. Interaction of vanadate with phenol and tyrosine: implications for the effects of vanadate on systems regulated by tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 83: 609-613.

Trautwein, W., and J. Hescheler. 1990. Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G protein. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 257-274.

Trautwein, W., J. Taniguchi, and A. Noma. 1982. The effect of intracellular cyclic nucleotides and calcium on the action potential and acetylcholine response of isolated cardiac cells. *Pflügers Archiv.* 392: 307-314.

Trube, G., and J. Hescheler. 1984. Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membranes: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflügers Archiv.* 401: 178-184.

Trube, G., P. Rorsman, and T. Ohno-shosaku. 1986. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic B-cells. *Pflügers Archiv.* 407: 493-499.

Tsien, R. W. 1983. Calcium channels in excitable cell membrane. *Ann. Rev. Physiol.* 45: 341-358.

Tsien, R. W., W. Giles, and P. Greengard. 1972. Cyclic AMP mediates the effects of adrenaline on cardiac Purkinje fibres. *Nature (Lond.)*. 240: 181-183.

Vandenberg, C. A. 1987. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 2560-2564.

Van Dongen, A., J. Codina, J. Olate, R. Mattera, R. Joho., y col. 1988. The brain protein, G_o, directly activates K⁺ channels in hippocampal pyramidal cells. *Science*. 242: 1433-1437.

Van Heukelom, J. S. 1991. Role of the anomalous rectifier in determining membrane potential of mouse muscle fibres at low extracellular K⁺. *J. Physiol. (Lond.)*. 434: 549-560.

Vergara, J., F. Bezanilla, and B. M. Salzberg. 1978. Nile blue fluorescence signals from cut single muscle fibers under voltage or current clamp conditions. *J. Gen. Physiol.* 76: 775-800.

Waldo, G. L., J. L. Boyer, A. J. Morris, and T. K. Harden. 1991. Purification of an AlF₄⁻ and G-protein

β -subunit-regulated phospholipase C-activating protein. *J. Biol. Chem.* 266: 14217-14225.

Walsh, K. B., T. B. Begenisich, and R. S. Kass. 1989. β -adrenergic modulation of cardiac ion channels. Differential temperature sensitivity of potassium and calcium currents. *J. Gen. Physiol.* 93: 841-854.

Westheimer, F. H. 1987. Why nature chose phosphates. *Science.* 235: 1173-1178.

Wiles, C. M., D. A. Jones, and R. H. T. Edwards. 1981. Fatigue in human metabolic myopathy. In *Human Muscle Fatigue: Physiological Mechanisms*. Porter, G. and Whelan, J. editors. 264-282. London: Pitman Medical.

Wilson, G. J., S. E. Shull, and R. Cooke. 1995. Inhibition of muscle force by vanadate. *Biophys. J.* 68: 216-226.

Yamazaki, A., M. W. Bitensky, and J. A. Garcia-Sainz. 1987. The GTP-binding protein of rod outer segments. *J. Biol. Chem.* 262: 9324-9331.

Yarom, Y., M. Sugimori, and R. Linás. Ionic currents and firing patterns of mammalian vagal motoneurons in vitro. *Neuroscience.* 16: 719-737.

Yatani, A., J. Codina, A. M. Brown, and L. Birnbaumer. 1987. Direct activation of mammalian atrial muscarinic potassium channels by GTP regulatory protein G_s . *Science.* 235: 207-211.

Yatani, A., Y. Iamoto, J. Codina, S. L. Hamilton, A. M. Brown, and L. Birnbaumer. 1988. The stimulatory G protein of adenylyl cyclase, G_s , also stimulates dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.* 263: 9887-9895.

Yatani, A., K. Okabe, J. Codina, L. Birnbaumer, and A. M. Brown. 1990. Heart rate regulation by G proteins acting on the cardiac pacemaker channel. *Science.* 249: 1163-1166.

Yellen, G. 1984. Ionic permeation and blockade in Ca^{2+} -activated K⁺ channels of bovine chromaffin cells. *J. Gen. Physiol.* 84: 157-186.

Zagotta, W. N., and R. W. Aldrich. 1990. Voltage-dependent gating of A-type potassium channels in *Drosophila* muscle. *J. Gen. Physiol.* 95: 29-60.

Zagotta, W. N., M. S. Brainard, and R. W. Aldrich. 1988. Single-channel analysis of four distinct classes of potassium channels in *Drosophila* muscle. *J. Neurosci.* 8: 4765-4779.

Zagotta, W. N., T. Hoshi, and R. W. Aldrich. 1989. Gating of single Shaker potassium channels in *Drosophila* muscle and in *Xenopus* oocytes injected with Shaker mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7243-7247.

Zhang, L., and C. J. McBain. 1995. Voltage-gated potassium currents in stratum oriens-alveus inhibitory neurones of the rat CA1 hippocampus. *J. Physiol. (Lond.).* 488: 647-660.