



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACIÓN DE LA MOLARIDAD DE LOS
CANALES DE AMFOTERICINA B Y
CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO MOLECULAR DE
SU ENSAMBLAJE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICO

P R E S E N T A:

JAVIER IÑIGUEZ STAHL



**DIRECTOR DE TESIS:
DR IVÁN ORTEGA BLAKE
2010**



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Iñiguez
Stahl
Javier
777 3263872
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Física
403005408

2. Datos del tutor

Dr
Iván
Ortega
Blake

3. Datos del sinodal 1

Dr
César
González
Beltrán

4. Datos del sinodal 2

Dr
Georges
Dreyfus
Cortés

5. Datos del sinodal 3

M en C
Alicia
Zarzosa
Pérez

6. Datos del sinodal 4

Dr
Armando
Antillón
Díaz

7. Datos del trabajo escrito

Determinación de la molaridad de los canales de Amfotericina B y construcción de un modelo molecular de su ensamblaje
95 p
2011

Agradecimientos

Al Dr. Iván Ortega Blake por su apoyo para la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado el Dr. César González Beltrán, el Dr. Georges Dreyfus Cortés, el Dr. Armando Antillón Díaz y la M. en C. Alicia Zarzosa Pérez.

A Javier González Damián por las asesorías teóricas y experimentales.

Al proyecto CONACYT CB-2005/50479 y al Sistema Nacional de Investigadores.

Al Instituto de Ciencias Físicas.

A la UNAM.

A los familiares y amigos que me acompañaron y apoyaron durante la realización de este trabajo.

Índice	Página
Resumen	1
I. Antecedentes	3
1.1 La Amfotericina B	3
1.2 Membranas	7
1.2.1 Función y estructura	7
1.2.2 Composición	10
1.2.3 Moléculas Anfifílicas	11
1.2.4 Estados Lamelares	12
1.2.5 Dinámica	13
1.2.6 Fases	14
1.2.7 Vesículas Liposomales	15
1.3 Canales de AmB	17
II. Objetivos	23
III. Materiales y Métodos	24
3.1 Solución liposomal	24
3.2 Microelectrodos	27
3.3 Arreglo experimental	29
3.4 Preparación de la bicapa	30
3.5 Registro	32
3.5.1 Puntos de cuidado	35
3.6 Análisis de resultados	36
3.6.1 Identificación de canales	36

3.6.2 Conductancias	37
3.6.3 Matrices de apertura y cerradura	40
3.6.4 Ocupación	41
3.6.5 Tiempo promedio de apertura	42
IV. Resultados y Discusión	43
4.1 Conductancias	43
4.2 Ocupación	48
4.3 Tiempo promedio de apertura	53
4.4 Número de moléculas	59
V. Conclusiones	63
VI. Perspectivas	66
VII. Referencias	69
Apéndice 1: El algoritmo SKM	80
Apéndice 2. Ejemplo del análisis de un experimento	86

Resumen

Las propiedades electrofisiológicas de los canales iónicos de Anfotericina B (AmB) en bicapas lipídicas han sido objeto de extensos estudios con el fin de entender los fenómenos de transporte transmembranal producidos por esta molécula. Además la AmB posee relevancia clínica debido a que a pesar de una considerable toxicidad colateral, es el antimicótico de elección para el tratamiento de infecciones sistémicas. Esto ha despertado interés por la búsqueda y el desarrollo de medicamentos análogos que resulten más eficaces en su acción antimicótica y que posean una toxicidad reducida, para lo cuál es conveniente conocer el modelo molecular de acción de la droga.

Uno de los propósitos al estudiar los poros de AmB consiste en determinar el número de moléculas involucradas en su formación. Algunos reportes sugieren que el número de moléculas que participan en la formación de canales puede ser de 4 a 12. Estos resultados corresponden a mediciones realizadas utilizando corrientes macroscópicas; en las cuales el resultado corresponde a poblaciones de canales y se obtienen valores promedio del número de moléculas.

En este trabajo se estudió la actividad de cada uno de los canales iónicos de AmB como función de la concentración de antibiótico en la membrana, para comprender el modo de acción del medicamento y determinar si hay procesos colectivos involucrados en la expresión de los canales. Se realizaron experimentos de canal unitario en los cuales se determinaron las propiedades eléctricas de un agregado molecular inmerso en una bicapa de

lecitina con el objetivo de determinar el número de moléculas involucradas en la formación de cada canal en forma separada.

Los resultados de este estudio confirman la existencia de tres diferentes molaridades para tres tipos de canal iónico y aunados a otros resultados obtenidos en el laboratorio, permiten avanzar en el objetivo de construir un modelo molecular. Este modelo dará un conocimiento mayor sobre el involucramiento de la matriz lipídica en procesos biológicos y en particular, el papel que juegan las propiedades fisicoquímicas de esta estructura y por tanto, será útil para el diseño de análogos de interés farmacológico.

I. Antecedentes

1.1 La Anfotericina B

A las orillas del río Orinoco en Venezuela crece un organismo llamado *Streptomyces nodosus*, el cual forma colonias especializadas similares a los micelios formados por los hongos. Dicho organismo posee las características de una célula procariota y es, por lo tanto, una bacteria. Las bacterias del género *Streptomyces* producen cerca de dos tercios de los antibióticos de uso clínico producidos por microorganismos [Kieser et al., 2000]; entre los cuales se encuentra el antibiótico polieno Anfotericina B (AmB). Su estructura química consiste en un anillo estérico cíclico, el cual contiene enlaces dobles conjugados carbón-carbón de un lado del anillo y grupos hidroxilo enlazados al otro lado. Su estructura a menudo contiene un grupo *d-mycosamínico* enlazado a la molécula. La serie de enlaces dobles conjugados tiene una fuerte absorción en la región ultravioleta del espectro electromagnético. En cuanto a su actividad química los antibióticos polienos pueden ser ácidos, básicos, anfóteros y neutros o zwitteriónicos; son poco solubles en agua y presentan autooxidación en presencia de luz.

La AmB es el polieno más conocido; la molécula fue aislada por primera vez en 1955 [Gold et al., 1956] y después de cincuenta años de uso clínico es el antimicótico más utilizado para el tratamiento de infecciones sistémicas a pesar de poseer efectos colaterales graves para el organismo, siendo la nefrotoxicidad el de mayor relevancia médica [Joly et al., 1992a, 1992b; Zager et al., 1992; Walev y Bhakdi, 1996].

El estudio de la AmB se intensificó a partir de que su estructura fue determinada a través de difracción de rayos X [Ganis et al., 1971]. Esta técnica permitió reconocer los grupos hidroxilo alineados a lo largo de un lado de la molécula, lo que genera una región hidrofílica y un sistema de dobles enlaces al otro lado que da lugar a una región hidrofóbica. Además, posee un grupo micosamínico polar y un grupo carboxílico en uno de los extremos y un grupo hidroxilo rodeado por tres grupos metilo en el otro extremo.

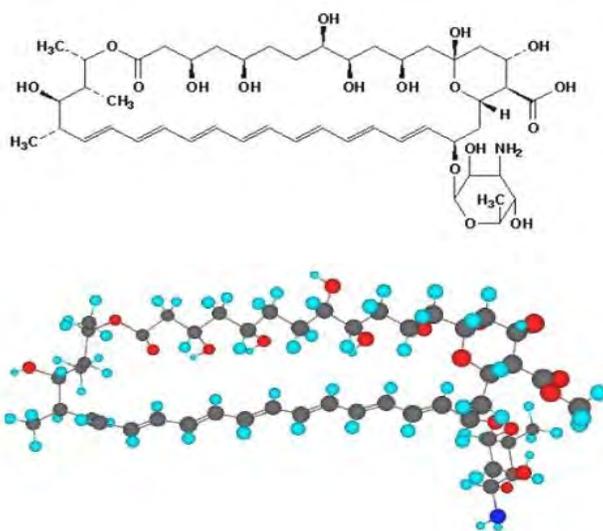


Figura 1. Estructura molecular de la AmB.

La AmB es una molécula anfotérica; la cual puede reaccionar ya sea como base o como ácido, es muy poco soluble en agua y para uso clínico es solubilizada por la adición de desoxicolato el cual al combinarse con la AmB forma una dispersión coloidal. La actividad de la AmB puede ser fungistática o fungicida (dependiendo de la concentración de la droga y de la sensibilidad del organismo) y su actividad *in vitro* es influenciada por el pH con actividad óptima entre pH 6.0 y 7.5.

Su mecanismo de acción está asociado -al menos en parte- a la presencia de esteroides en la membrana celular. Las moléculas del medicamento alteran la permeabilidad de la membrana formando poros hidrofílicos que permiten el paso de iones y moléculas pequeñas que conducen a la salida de componentes de la célula y provocan con esto la muerte celular. También existe evidencia de que la AmB tiene efectos proapoptóticos [Phillips et al., 2003] y afecta la capacidad de replicación en cultivos de *Candida albicans* [Liao et al., 1999].

La Amfotericina B posee diversas aplicaciones clínicas, entre las que se encuentran los tratamientos de infecciones del sistema nervioso central, peritonitis fúngica, infecciones genitourinarias, infecciones oftálmicas, terapia empírica y profiláctica para pacientes con cáncer neutropénico, terapia en pacientes con SIDA, infecciones dérmicas, pulmonares y candidemia. [Gallis et al., 1990].

Existe diferencia en la afinidad que tiene la AmB por el colesterol y el ergosterol, a pesar de esto, la alteración no selectiva de las células de mamíferos ha sido postulada como la etiología de muchos de los efectos tóxicos de este medicamento. Entre estos efectos, el de mayor relevancia es la nefrotoxicidad. A pesar de que el mecanismo exacto de este efecto no está bien definido, la droga disminuye la tasa de filtración glomerular y en el flujo de sangre a través del riñón. Las manifestaciones clínicas y en laboratorio de la toxicidad renal de la AmB incluyen evidencia de acidosis tubular renal, cilindros urinarios, azotemia, oliguria y pérdida de magnesio y potasio en la orina. El mecanismo principal puede estar relacionado con efectos en la permeabilidad de la membrana. Otros mecanismos propuestos, incluyen la activación de un mecanismo intrarenal conocido como retroalimentación tubuloglomerular, el

cual regula la entrega de iones en los túbulo proximal y distal. Más de la mitad de los pacientes a los que se les administra AmB, experimentan fiebre y escalofríos. Algunos pacientes toleran bien estos síntomas; sin embargo, pueden ser muy incómodos para ancianos y enfermos críticos. El mecanismo de estos síntomas es desconocido aunque se ha asociado a la relación que tiene la AmB con la producción de prostaglandinas [Gallis, 1990]. Además, la droga produce efectos como la disminución en la concentración de hemoglobina. Al iniciar la terapia con AmB es frecuente la presencia de náusea, vómito, cefalea, anorexia, mialgias y artralgias. También se han reportado anomalías en pruebas de función renal.

Como ya se ha mencionado, la versatilidad de esta droga es causada por alteraciones en la permeabilidad de la membrana. De hecho, existe evidencia experimental de que los efectos de lisis que produce la AmB en las células de hongos y de otros microorganismos susceptibles están relacionados con incrementos de la permeabilidad de la membrana celular producida por interacción del antibiótico con esteroides presentes en la membrana [Andreoli, 1973]. Es por esto que para comprender este trabajo es necesario hablar de las membranas, su función y estructura.

1.2 Membranas

La formación de membranas permitió la agrupación de entidades moleculares autoreproducibles aisladas de las hostilidades del medio y un intercambio selectivo de compuestos a través de dicha frontera. La evolución dio lugar a la formación de entidades cada vez más complejas, hasta aparecer las células, que al evolucionar lograron perfeccionar el intercambio molecular creando distintas funciones entre compartimentos. La formación de membranas ocurre gracias a un fenómeno denominado efecto hidrofóbico. Este efecto consiste en la asociación de grupos moleculares no polares en ambientes acuosos debido a la tendencia del agua a excluir a las moléculas no polares. Las membranas biológicas están formadas a partir de moléculas anfipáticas, las cuales poseen un gran catión o anión orgánico con una cadena de hidrocarburo larga no ramificada. La existencia de regiones polar y no polar en la molécula promueve la formación de micelas en solución acuosa diluida [A. D. McNaught & A. Wilkinson, 1997].

1.2.1 Función y Estructura.

La existencia de fronteras bien definidas para la célula y los organelos ha sido reconocida por mucho tiempo. La función de dichas fronteras o membranas y los procesos de permeabilidad y transporte se encuentran bien establecidos y la posible organización de sus dos principales componentes químicos, proteínas y lípidos, fueron sugeridas por Gorter y Grendel (1925) y por Danielli y Davson (1935) el siglo pasado. En los años cincuenta, los estudios de microscopía electrónica sugerían la existencia de una estructura uniforme o —membrana unitaria” [Robertson, 1959]. Más adelante, las características de bicapa

observadas en secciones delgadas de células animales, vegetales y microbianas coincidían con el modelo propuesto por Danielli y Davson (1935). Sin embargo, el modelo de bicapa arroja una impresión sobresimplificada de la estructura membranal; y el modelo de "sándwich" lípido-proteína ha sido reemplazado por estructuras granulo-fibrilares, globulares o tripartitas con arreglos moleculares más complejos.

La membrana celular no tiene como única función el aislar a la célula del medio exterior y dividirla en compartimentos. Desde el punto de vista de la biofísica, las membranas son un sistema bidimensional formador de coloides que posee propiedades físicas esenciales para el funcionamiento biológico, tales como el intercambio selectivo de iones y moléculas, la generación de gradientes electroquímicos y el transporte pasivo de iones y moléculas neutras.

El análisis químico de membranas celulares aisladas ha establecido que todas las biomembranas están compuestas por lípidos y proteínas, aunque existen grandes diferencias en la razón proteína-lípido según el tipo de célula [Smith & Korn, 1968]. Entre los lípidos de la membrana celular los fosfolípidos forman la mayor parte, mientras que la cantidad de colesterol varía entre ser el segundo componente más importante, por ejemplo en eritrocitos; hasta el estar ausente por completo en la membrana de todas las bacterias con excepción de las pertenecientes al grupo *Mycoplasma*.

Todas las membranas biológicas poseen la misma base estructural, que es la de una bicapa lipídica [Gorter y Grendel, 1925]. Los lípidos que forman la bicapa son moléculas anfífilas con la región hidrofóbica orientada hacia el centro y la región hidrofílica orientada a

los extremos de la bicapa. En 1972 se propuso un modelo de mosaico fluido, en el que existe una libre difusión de las distintas estructuras de la membrana en una mezcla homogénea de lípidos agregados [Singer & Nicolson, 1972]. Sin embargo, existen evidencias de que algunas estructuras se encuentran restringidas o ancladas debido a interacciones con el citoesqueleto o los lípidos circundantes [Sackmann, 1995; Gennis, 1989a]. También existe evidencia de asimetría en la bicapa [Gennis, 1989b]; de dominios en que abunda un tipo de lípido [Simons e Ikonen, 1997; Brown y London, 1997; Mouritsen y Jørgensen, 1997; Píknová, 1996] y de proteínas que inducen una partición lateral de lípidos en la membrana [Simons e Ikonen, 1997; Brown y London, 1997; Glaser et al., 1996].

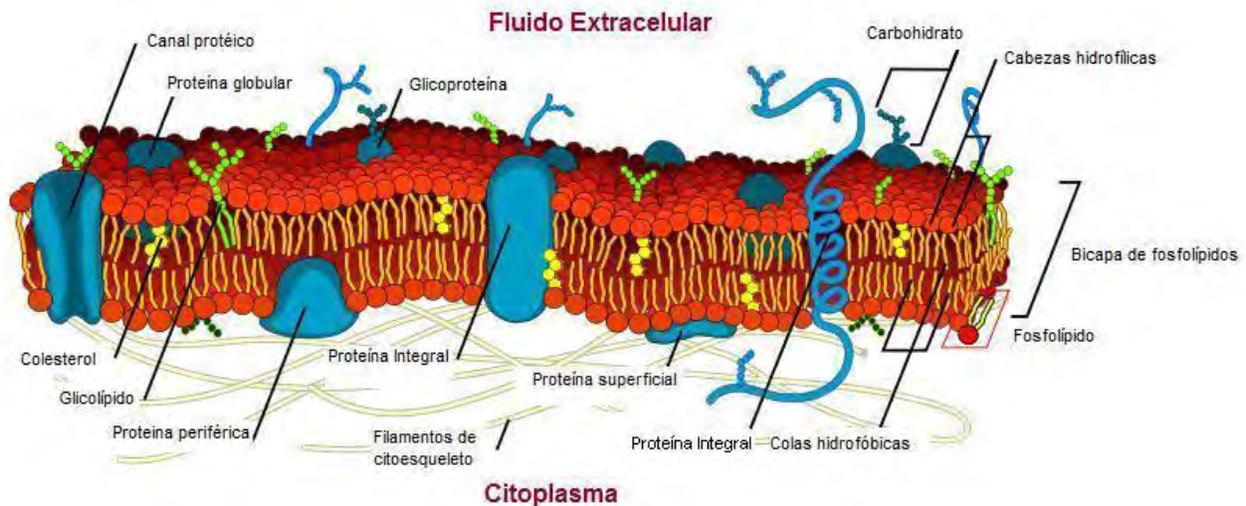


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de la membrana celular.
<http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/science/lecture0803.htm>

1.2.2 Composición

Como se mencionó anteriormente, las membranas biológicas están formadas por una bicapa de lípidos y por proteínas; ambos de carácter anfipático. La proporción lípido-proteínas depende del tipo de célula y de dicha proporción dependen las funciones bioquímicas que se realizan en la membrana de un tipo celular específico.

Los lípidos que se encuentran en las membranas biológicas pueden ser clasificados en tres grupos principales: glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides. Los glicerolípidos poseen un glicerol en el que se unen dos cadenas alifáticas y una región polar. Los esfingolípidos poseen una estructura similar, pero en lugar de un glicerol poseen una molécula de esfingosina. Cuando el carbono 3 del glicerol o de la esfingosina se encuentra unido un fosfato, se trata de un fosfolípido.

Dentro de los glicerofosfolípidos podemos encontrar la fosfatidilcolina (PC), la cual es muy abundante en las células animales y contiene, mayoritariamente; ácido palmítico o ácido esteárico en la posición del C-1 y los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico en la posición de C-2. La PC es zwitteriónica a pH fisiológico y posee comúnmente una cadena con 16 carbonos predominantemente saturada; mientras que la otra cadena por lo general se encuentra insaturada. Para realizar trabajo experimental utilizando PC es común utilizar lecitina de huevo, debido a que su obtención es sencilla y es un componente común en las membranas biológicas. La lecitina es una combinación de fosfolípidos cuya especie predominante es $C_{42}H_{82}NO_8P$.

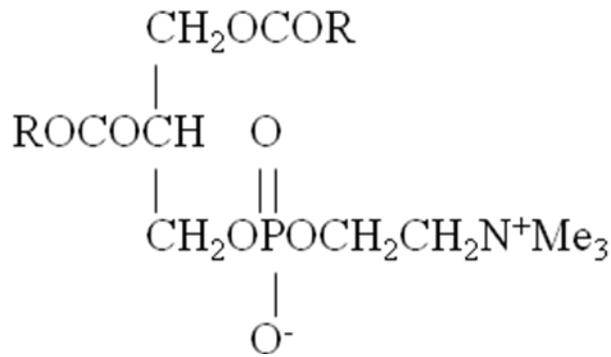


Figura 3. Representación esquemática de la estructura molecular de la lecitina. El radical R corresponde a ácidos grasos saturados o insaturados.

A diferencia de los lípidos mencionados hasta ahora, los esteroides son lípidos no saponificables y por lo tanto, no forman agregados lamelares o micelares por si mismos y son responsables de importantes propiedades físicas de las membranas. Se encuentran exclusivamente en células eucariotas. En células vegetales encontramos el lanosterol y el estigmasterol; en hongos y levaduras, el ergosterol; y el colesterol abunda en células de animales superiores.

1.2.3 Moléculas anfifílicas

El carácter dual de hidrofobicidad e hidrofiliidad de las moléculas anfifílicas las obliga a satisfacer -al estar en contacto con el agua- a las dos características, por la necesidad de minimizar la energía del sistema y conduce a la agregación de los grupos hidrófobos. Esto conduce a la formación de estructuras de gran complejidad. Algunas de estas estructuras se arreglan en forma de interfase; por ejemplo, una monocapa en la superficie de la solución, otras se encuentran inmersas en una solución y pueden ser micelas, liposomas o bicapas.

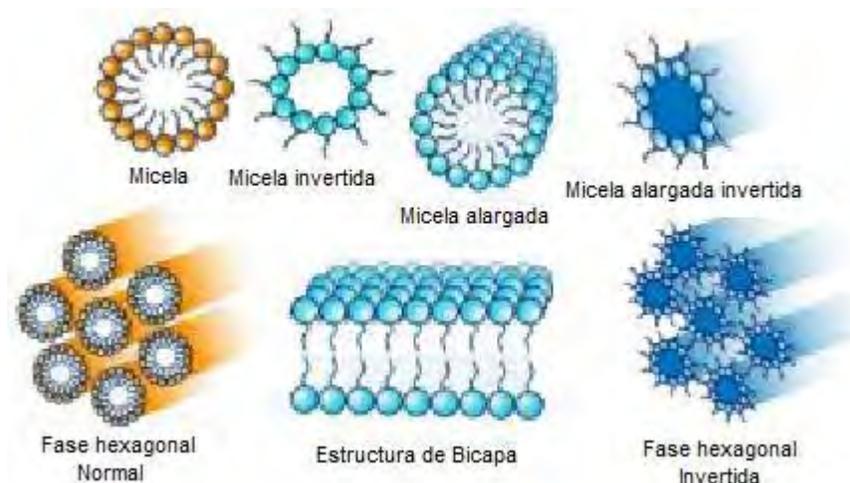


Figura 4. Representación esquemática de los estados de agregación de los fosfolípidos en solución acuosa.

El comportamiento de los lípidos en una solución acuosa depende de las propiedades físicas del lípido y del agua, así como de la cantidad de lípido en la solución. A bajas concentraciones el lípido se encuentra formando fases monoméricas y algunos oligómeros. A partir de cierta concentración crítica se comienzan a formar pequeñas micelas. Este valor es conocido como concentración micelar crítica (CMC) y depende de las propiedades del surfactante. [Seddon y Templer, 1995; Seddon, 1990; Small, 1986].

1.2.4 Estados lamelares

Las aproximaciones teóricas actuales, a pesar de no ofrecer una descripción completa para explicar las estructuras de sistemas agua-lípido, suponen una combinación entre interacciones atractivas (Van-der-Waals y dipolo-dipolo) y una ganancia entrópica del sistema compuesto, a lo largo de la interfase polar-apolar [Cheng et al., 1999]. Se piensa que para sistemas agua-lípido la ganancia entrópica es conducida por la configuración entrópica de la red de enlaces de hidrógeno a lo largo de la interfase. Las estructuras favorables dependen

de los detalles moleculares de los componentes involucrados, su concentración, temperatura y presión. Esto da lugar a un fenómeno llamado polimorfismo del lípido y a complicados diagramas de fase que comprenden regiones con pequeñas micelas (esféricas, con forma de disco, cilíndricas o con forma de gusano), bastones empaquetados hexagonalmente y estructuras de bicapas planas o cúbicas. Cuando el contenido de agua es muy grande es posible encontrar pequeñas membranas que se pliegan formando objetos cerrados llamados vesículas, las cuales pueden ser consideradas como modelos de membranas biológicas.

1.2.5 Dinámica

El estado fluido de las membranas se caracteriza por sus propiedades dinámicas. A escala microscópica se trata de vibración molecular, rotación de grupos químicos y de procesos de difusión de moléculas; mientras que a nivel macroscópico las bicapas exhiben fluctuaciones térmicas fuera del plano.

Debido a la difusión de los lípidos en la bicapa ocurre un fenómeno de intercambio transversal de los lípidos (*flip-flop*), el cual resulta menos frecuente que la difusión lateral o rotacional (con tiempos medios del orden de horas). Sin embargo, la ocurrencia de este fenómeno se incrementa en bicapas formadas por varios compuestos; esto ocurre debido a defectos como proteínas aisladas o bordes de dominio. A pesar de esto, el *flip-flop* es ineficiente para equilibrar diferencias en la composición de las monocapas de una membrana; por lo tanto, después de su formación y en ausencia de degradación molecular y de intercambio a través del medio acuoso, la bicapa puede considerarse como un sistema cerrado con flexibilidad y fluidez casi constantes.

1.2.6 Fases

Las fases de los lípidos y en especial la forma de las vesículas que forman, dependen de la estructura molecular de los anfifilos y del módulo de plegamiento como propiedades del sistema continuo de lípido. La formación de una bicapa requiere que dos monocapas separadas se combinen. Al encontrarse inmersos en solución acuosa los lípidos pueden organizarse de diversas maneras; desde monómeros de lípido en el medio acuoso, hasta estructuras más complejas como fases cristalinas y de cristal líquido. Los cristales líquidos pueden ser liotrópicos, termotrópicos o metalotrópicos; los dos primeros están compuestos por moléculas orgánicas, mientras que los metalotrópicos están compuestos por moléculas orgánicas e inorgánicas.

Las fases liotrópicas son aquellas en las que un cristal líquido puede formar lamelas, hexágonos o cubos. La estructura natural es aquella con energía de plegamiento mínima en ausencia de otras contribuciones energéticas. Estructuras complicadas de bicapa no-planar, se basan en el principio de mínima acción. Estas estructuras pueden formarse de manera espontánea y las transiciones entre las estructuras (de hexagonal a lamelar o de lamelar a cúbica) involucran cambios de simetría y topología.

Las fases termotrópicas ocurren si el ordenamiento de sus componentes está determinado por un cambio de temperatura. La bicapa plana, conformada por fosfatidilcolinas saturadas (PCs) en un medio acuoso, exhibe cuatro subestados termotrópicos (L_a , P_b , L_b , L_b). Estos estados pueden distinguirse por la estructura de la bicapa y su dinámica. Es indispensable considerar que, para los modelos de membrana celular utilizados en este

trabajo, las bicapas utilizadas en los experimentos deben poseer las mismas características en lo referente a la fase. Para lograr esto es necesario que todos los modelos de membrana se encuentren a la misma temperatura y que las proporciones entre los distintos lípidos y la solución acuosa, sean las mismas entre experimentos.

1.2.7 Vesículas Liposomales

Los liposomas son unas pequeñas vesículas huecas cuya membrana está compuesta de una bicapa de fosfolípidos y debido a sus propiedades fisicoquímicas han sido utilizados como modelos de membrana y vehículos de una gran diversidad de moléculas. Las vesículas unilamelares en su fase líquida son de gran relevancia para la comprensión de los procesos biológicos y para aplicaciones técnicas. Las membranas lipídicas que se forman de manera espontánea al haber demasiada agua con respecto a la cantidad de lípido (>95%) en una solución muestran estructuras temporales muy diversas coexistiendo, lo que ocasiona que al aislar estas vesículas para realizar un experimento no se obtenga reproducibilidad. Para realizar una preparación de poblaciones unimodales que consista únicamente de vesículas unilamelares, se requiere la aplicación de métodos invasivos tales como: sonicado, ultrafiltración, evaporación del solvente y electrohinchado. El resultado de estas preparaciones es a menudo inestable, con cambios en el tamaño de la distribución y en la forma de los objetos. Además, aún no está claro si el estado vesicular es un estado de equilibrio o si se trata de una fase transitoria para alcanzarlo.

Debido a la posibilidad de preparar soluciones que contengan poblaciones unimodales de vesículas liposomales y a la similitud que poseen con las membranas biológicas, estas

soluciones resultan ideales para estudiar los efectos de la AmB sobre la membrana celular, ya sea afectando la permeabilidad de la membrana o formando canales iónicos. Sin embargo, para realizar estudios de canales a baja conductividad es necesario utilizar bicapas con menor área que la de una vesícula liposomal; es por esto que utiliza una técnica denominada *membrane patch*, la cual consiste en formar una bicapa en la punta de un microelectrodo. Esta técnica se encuentra descrita con más detalle en el capítulo de materiales y métodos.

1.3 Canales de AmB

En la actualidad existen dos modelos que explican la actividad antibiótica de la AmB. El más antiguo propone la formación de canales iónicos pobremente selectivos en la membrana celular que permiten la salida de K^+ principalmente, hasta que se produce la muerte de la célula [Brutyan y McPhie, 1998; Bolard et al., 1991; Kleinberg y Finkelstein, 1984; Ermishkin et al., 1976]. La otra hipótesis atribuye la salida de estos iones a una alteración que produce el medicamento en el funcionamiento de los canales de K^+ propios de la célula [S. Hsu y Burnette, 1997; 1993]. Estos mecanismos no son necesariamente antagónicos; lo cual sugiere la posibilidad de que la toxicidad del medicamento no se deba solamente a la formación de canales iónicos y que tenga además, un efecto sobre otros componentes de la membrana.

La acción de la AmB en bicapas lipídicas se caracteriza por incrementar la permeabilidad de la bicapa de manera selectiva a iones y moléculas pequeñas [Cohen, 1992; Ramos et al., 1996; Henry-Toulmé et al., 1989; Cohen, 1986; Holz y Finkelstein, 1970; Cass et al., 1970]. En los primeros estudios sobre canales de AmB en bicapas la atención se centró en la cinética del antibiótico. El estudio realizado por A. Cass, A. Finkelstein y V. Krespi (1970) muestra la existencia de sitios de conducción, los cuales mantienen una conductividad de equilibrio (g_{eq}) dada por la ecuación (1):

$$g_{eq} = \left(\frac{k_1}{k_2} \right) P^\alpha \quad (1)$$

donde k_1 y k_2 son respectivamente las constantes de formación y de destrucción del poro, p es la concentración de antibiótico y α representa el número de moléculas de antibiótico polieno en el sitio de conducción. Este modelo pone especial atención a la cinética del antibiótico y es el más aceptado. Otros trabajos demostraron que al incrementar la fuerza iónica –que es una función de la concentración de iones en solución- se produce una saturación de los sitios de conducción, lo cual sugiere que los iones pasan a través de una región definida que constriñe el flujo [Cass et al., 1970].

El sitio de conducción propuesto está constituido por varias moléculas de AmB intercaladas con esteroides, acomodadas en círculo, de forma similar a las duelas de un barril. La región hidrofóbica de la molécula está orientada hacia el exterior del poro y la hidrofílica hacia el interior [Kruijff & Demel, 1974]. Las dimensiones del poro se determinaron observando la permeabilidad de solutos no cargados de distintos tamaños. La glucosa es la molécula más grande que pasa por el poro y de esta manera se determinó que el diámetro del poro es de 8\AA [Kruijff & Hoogevest, 1978].

El modelo de Kruijff y colaboradores propone que las moléculas de AmB necesitan formar complejos con el esteroide en la membrana los cuales posteriormente se agregan y forman la “estructura de barril”. En este modelo, el papel del esteroide es el de interactuar mediante puentes de hidrógeno con las moléculas de AmB. En ausencia de esteroide la interacción entre las moléculas de AmB sería mediante fuerzas de Van-der-Waals, las cuales son muy débiles y probablemente, incapaces de mantener la estructura del canal.

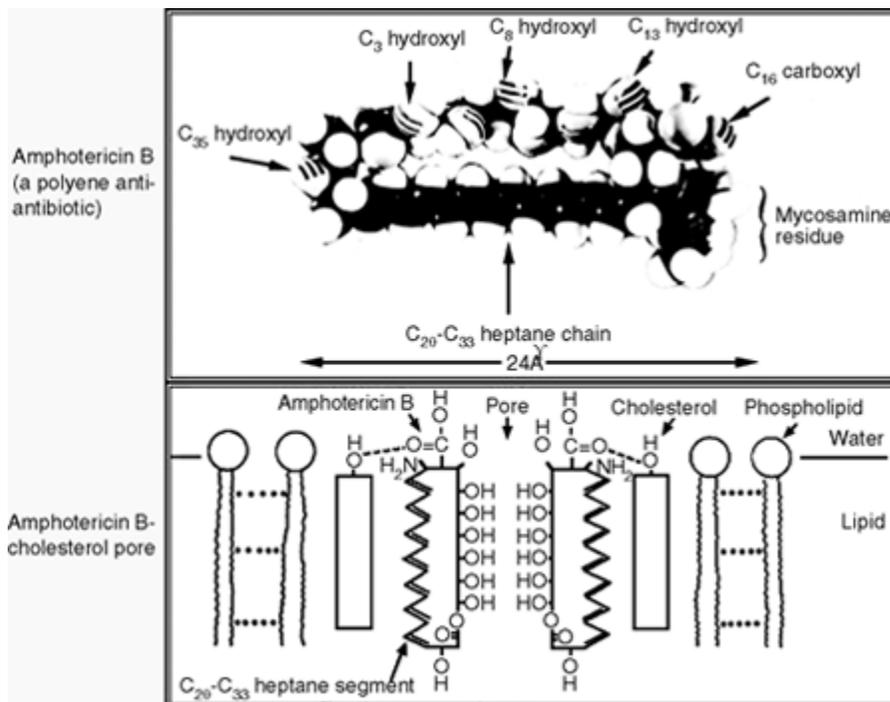


Figura 5. Modelo parcial del poro de AmB-Colesterol. Las líneas punteadas entre las cadenas de hidrocarburos de los fosfolípidos indican fuerzas de London-van der Waals [Andreoli, 1973].

En estudios más recientes ha sido posible realizar simulaciones de la dinámica de los canales de AmB. Sin embargo, los tiempos de simulación son demasiado breves (del orden de picosegundos) y no es posible observar la participación del esteroles en la formación del canal [Baginski et al, 1997].

De las simulaciones de dinámica molecular se sugiere que los canales están formados por un número par de monómeros, lo cual permite que las "cabezas" de las moléculas se intercalen y eviten repulsiones estéricas [Baginsky & Borowsky, 1997]. Estas simulaciones se han realizado en el vacío y por lo tanto, no modelan las diferentes interacciones del complejo AmB-esteroles con el resto del medio [Resat & Baginsky 2002, Baginsky & Borowsky, 1997].

A pesar de que existe gran cantidad de evidencia que soporta al modelo de Finkelstein y Holz existen resultados que lo contradicen, por ejemplo, la acción de la AmB en membranas carentes de esteroides [Ruckwardt et al., 1998; Cohen 1998, 1992; Wolf y Hartsel, 1995; Whyte et al., 1989; Archer 1976; Hsu-Chen y Feingold, 1973]. Algunos autores han definido estas estructuras como proto-canales, los cuales no son responsables de la actividad farmacológica, sino que el colesterol presente en la membrana, se agrega a esta estructura para dar lugar al canal activo [Cohen 1998].

Sin embargo, evidencia posterior confirma que los canales formados en ausencia de esteroides en la membrana poseen propiedades similares a cuando están presentes, pues las conductividades del canal unitario son independientes del esteroide. Esta evidencia sugiere que se trata de la misma estructura [Cotero, 1998; Venegas, 2003].

Se han clasificado seis tipos de canales de AmB y las conductancias son muy similares en ausencia o presencia de esteroides y en composiciones lipídicas diferentes, lo que sugiere que la estructura de los canales es independiente de estos dos factores. Debido a que la presencia de esteroides aumenta la actividad del antibiótico la concentración umbral es distinta para cada caso. Además, el colesterol incrementa la presencia de AmB en la membrana, lo que fomenta la formación de los canales grandes [Venegas, 2003].

Estudios con microscopía de fuerza atómica demostraron que en bicapas soportadas los agregados de AmB permanecen en la superficie de la membrana en ausencia de esteroide, unidos a ésta por puentes de hidrógeno mediados por agua; mientras que en presencia de ergosterol, los agregados se encuentran inmersos en ésta presentan una gran variedad de

tamaños y la mayoría presentan un hueco en el centro. Para formar dichos agregados en capas soportadas es necesario que transcurra un tiempo largo debido a su tamaño. Es importante destacar que los agregados así formados poseen una estructura distinta a la de los canales de AmB [Milhaud et al., 2002].

En un reporte que propone a la AmB como indicador del estado físico de la membrana, aparece evidencia de que existe una preferencia de la droga por un estado intermedio de la membrana, entre la fase líquida ordenada (l_o) y la fase líquida desordenada (l_d). Lo que sugiere que la presencia de AmB en la membrana es mediada por la estructura de la bicapa, modulada por la presencia de esteroides [Zumbuehl, 2004]. Además, es bien sabido que los esteroides, más que participar directamente en la estructura del canal, actúan como mediadores en la membrana y modifican la presencia del antibiótico en esta [Cohen, 1992].

Además de modificar la estructura de la membrana, la temperatura afecta el estado de agregación de la AmB. Existe evidencia de que al incrementar la temperatura la AmB en solución acuosa pasa a un estado de menor agregación. En presencia de colesterol la permeabilidad disminuye cuatro veces por cada 10°C de incremento; mientras que en las membranas con ergosterol no muestran variaciones al cambiar la temperatura, lo que sugiere que las membranas con colesterol son sensibles a la AmB en su estado agregado, mientras que la permeabilidad de las membranas con ergosterol es afectada tanto por agregados como por monómeros [Huang 2002].

Todos los estudios mencionados contribuyen a comprender el mecanismo molecular de acción de la AmB, pero aún existe incertidumbre en los procesos de formación del canal

así como en su estructura. En un esfuerzo por comprender dicho mecanismo, en este trabajo se aborda el problema a partir del análisis de la cinética de formación del canal.

II. Objetivos

El objetivo de este trabajo es avanzar en el entendimiento de los mecanismos moleculares de acción de la Amfotericina B, a partir de la cinética de formación del canal.

La comprensión del modo de acción de los antibióticos polienos es importante, pues permite entender más a fondo fenómenos relacionados con el transporte a través de membranas, además de poseer relevancia clínica debido a la existencia de gran variedad de infecciones micóticas sistémicas que se presentan en pacientes inmunodeprimidos y a los efectos adversos asociados a la administración de estos fármacos.

Para comprender los mecanismos moleculares de acción de la AmB es necesario estudiar la actividad de cada uno de los canales iónicos como función de la concentración de antibiótico en la membrana, para comprender el modo de acción del medicamento y determinar si hay procesos colectivos involucrados en la expresión de los canales; así como el número de moléculas involucradas en la formación de cada canal. Se realizaron experimentos de canal unitario en los cuales se determinan las propiedades eléctricas de un agregado molecular inmerso en una bicapa de lecitina. Los resultados del estudio, aunados a otros resultados obtenidos en el laboratorio, tienen como objetivo la construcción de un modelo molecular. Este modelo dará un conocimiento mayor sobre el involucramiento de la matriz lipídica en procesos biológicos y en particular, el papel que juegan las propiedades fisicoquímicas de esta estructura. Asimismo, será útil para el diseño de análogos de interés farmacológico.

III. Materiales y Métodos

3.1 Solución liposomal

Se prepararon 2 soluciones base, una de ellas con lípidos y iones y la otra de AmB en Dimetil sulfóxido. Para la preparación de la solución liposomal, inicialmente se prepararon soluciones base de lecitina ($C_{42}H_{82}NO_8P$ principalmente) (20 mg/ml) y colesterol ($C_{27}H_{46}O$) (10 mg/ml) disueltos en cloroformo; ambos lípidos de Avanti Polar Lipids. Se prepararon 2 ml de solución liposomal, mezclando en un matraz de bola 400 μ l de lecitina y 180 μ l de colesterol. Las cantidades fueron medidas utilizando jeringas *Hamilton* de 500 μ l y 250 μ l respectivamente, debido a que los volúmenes de lecitina y colesterol utilizados son muy pequeños y el utilizar la menor escala posible permite reducir el error al mínimo. La jeringa de 500 μ l tiene una incertidumbre de ± 2.5 μ l y la jeringa de 250 μ l tiene una incertidumbre de ± 1.25 μ l. Se consideró a la incertidumbre de las jeringas como la mitad de la mínima escala. Se utilizó este tipo de jeringas para la elaboración de la solución liposomal debido a que, al ser de vidrio, soportan los solventes en los que se encuentran disueltos los lípidos y a su precisión, pues pequeñas variaciones en las concentraciones al preparar cada experimento afectan las propiedades de la bicapa.

Después se evaporó la solución en un rotavapor modelo B-177 *BÜCHI Swizterland* a 400 mbar dentro de un baño a 48 °C durante una hora. Posteriormente se disminuyó la presión a 72 mbar y se dejó evaporar durante una hora más.

Una vez evaporado el cloroformo se agregaron 2 ml de solución electrolítica 2 M KCl,

1 mM CaCl₂, 10 mM Hepes a pH=8.0 [Neher & Sakmann, 1995] utilizando una micropipeta de 1 ml modelo *Pipetman* de *Gilson* y se colocó en atmósfera de nitrógeno. Finalmente, se sonicó durante 30 minutos en una sonicadora *Cole-Parmer* 8890.

Durante la preparación de solución lipídica se preparó Solución base de AmB 10 mM en dimetil sulfóxido (DMSO); ambos de *Sigma Aldrich* Química. Para cada concentración de AmB se utilizó un *stock* de 2 ml de solución liposomal preparada según se describió anteriormente. Se prepararon concentraciones de 6, 7, 8, 9 y 10 μ M agregando a la solución lipídica 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 y 2.0 μ l del *stock* de AmB y se sonicó la solución durante 15 minutos.

Debido a que los volúmenes de droga agregados a la solución liposomal son muy pequeños resulta fundamental verificar que dicho volumen no corresponda con los límites de la escala de las micropipetas, debido a que pequeñas variaciones en la concentración afectan la población de canales. En la figura 6 es posible apreciar cómo al aproximarse a los límites de la escala de la micropipeta el valor de la concentración de AmB se ve afectado.

Es necesario tener en cuenta que los lípidos usados, así como la AmB, deben ser almacenados en atmósfera inerte para evitar oxidación.

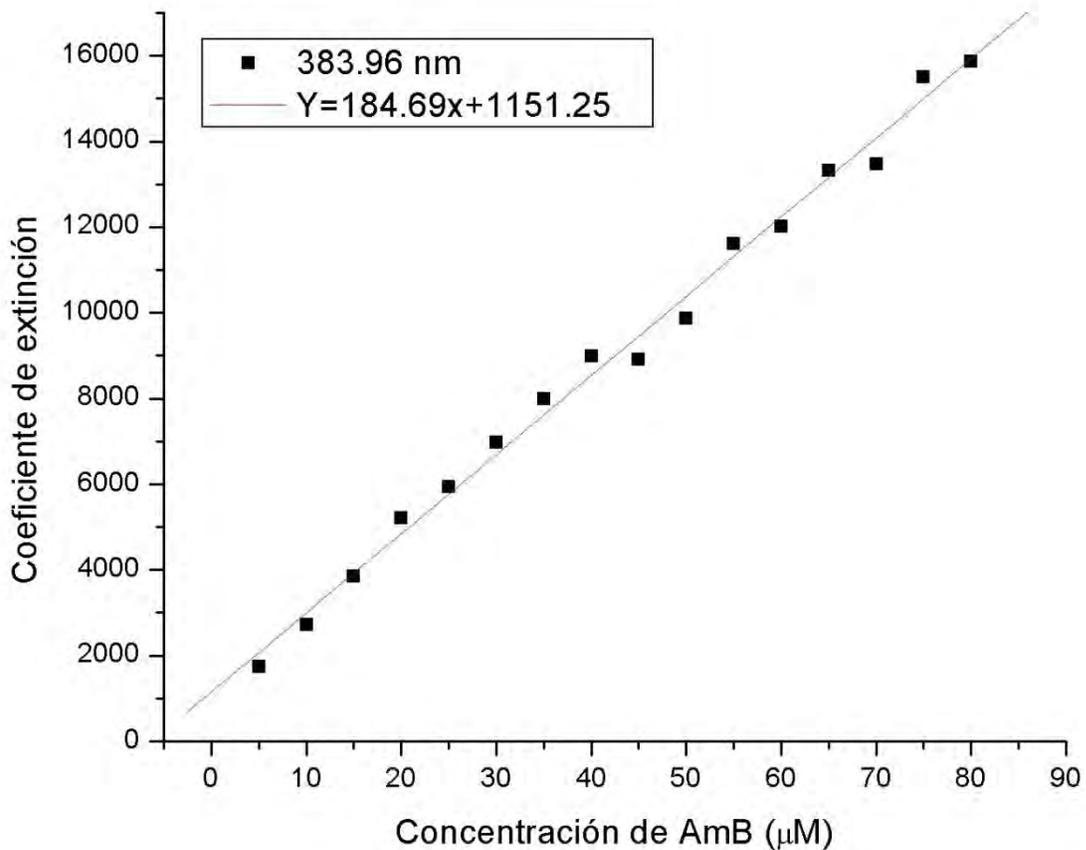


Figura 6. Curva espectroscópica de AmB. Los puntos corresponden al coeficiente de extinción según la ley de Beer-Lambert a una longitud de onda de 383.96 nm. Los puntos que se encuentran a partir de 45 μM , se cambió de pipeta de 10 μl por una de 100 μl incrementando esto el error en la medición del volumen de AmB.

3.2 Microelectrodos

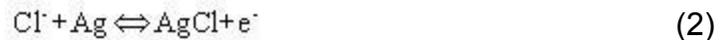
Se fabricaron microelectrodos con capilares de borosilicato de 1 mm de diámetro externo, 0.58 mm de diámetro interno y con filamento (el cual permite un llenado mas sencillo) de *World Precision Instruments, Inc.* Para formar las puntas, se utilizó un *puller* modelo P-2000 de *Sutter Instruments Co.* Utilizando la siguiente configuración:

HEAT=350, FIL=3, VEL=30, DEL=200, PUL=200

El parámetro HEAT (calor) especifica la potencia de salida del láser y en consecuencia la cantidad de energía aplicada al vidrio, la cual debe ser función del tamaño y la composición del electrodo. El valor de este parámetro afecta la longitud de la punta y su tamaño; al incrementar el valor se obtendrán puntas más largas y más finas. El parámetro FIL (filamento) especifica el patrón de barrido del rayo láser y en consecuencia el área de aplicación del calor. El aparato posee 16 patrones preprogramados. El parámetro VEL (velocidad) especifica la velocidad máxima a la que se mueve el vidrio antes del tirón final, el cual tiene más fuerza. El parámetro DEL (retardo) controla el tiempo de retardo para que el aparato efectúe el tirón final en relación con la desactivación del láser, la cual ocurre cuando el vidrio alcanza la velocidad máxima. El parámetro PUL (tirón), controla la fuerza del tirón final.

Dentro de la pipeta se colocó solución electrolítica en contacto con un electrodo de plata clorado (Ag/AgCl). Para poder convertir de manera reversible la corriente iónica en

corriente eléctrica evitando la polarización de la superficie metálica y por ende efectos capacitivos en la corriente, es necesario clorurar los alambres colocándolos en un potencial dentro de una solución saturada de cloruro de potasio (KCl) en agua; el potencial fue alternado periódicamente para asegurar que la capa de AgCl fuese uniforme sobre el electrodo y asegurar así que este estuviera anodizado. Los electrodos convierten la corriente de iones en la solución en corriente de electrones a través de los cables, los cuales están hechos de materiales que pueden participar en una reacción reversible con alguno de los iones en la solución. El material más utilizado para electrodos en la electrofisiología, es alambre de plata (Ag) cubierto con cloruro de plata (AgCl). Los iones de cloro (Cl^-) reaccionan con la plata produciendo cloruro de plata más un electrón o un electrón reacciona con el cloruro de plata produciendo plata metálica, más iones de cloro. Entonces, la corriente que portan los iones de Cl en la solución, se convierte en corriente de electrones de acuerdo a la siguiente reacción reversible:



Para el llenado de los microelectrodos fue necesario realizar varias consideraciones. Debido a que la punta del microelectrodo es muy pequeña se produce corrosión debido al contacto prolongado con la sal de la solución electrolítica afectando la geometría de la punta, lo cual puede dificultar la formación de una bicapa; la presencia de burbujas en el capilar puede alterar la resistencia y aumentar el ruido eléctrico y si el microelectrodo es sobrellenado, al introducir el electrodo de plata, el contenido se puede derramar y mojar el exterior del capilar.

3.3 Arreglo experimental

El dispositivo experimental consta de una mesa antivibratoria para reducir el ruido mecánico; una jaula de Faraday para reducir el ruido eléctrico; un amplificador *Axopatch 200B* y una tarjeta de adquisición *DigiData 1322A* de *Axon Instruments*, esta última convierte la señal de analógica a digital. La señal digital fue registrada en una computadora la cual además, permite fijar el voltaje a través de la membrana. Se utilizó también un control de temperatura TC2BiP de *Cell Microcontrols*, para mantener estable la temperatura durante los experimentos. El software utilizado para el registro de señales, fue el programa *Clampex 8.2* de *Axon Instruments*.

3.4 Preparación de la bicapa

Los experimentos fueron realizados a 30 °C y utilizando un potencial fijo de 200 mV, siguiendo la técnica conocida como tip-dip, descrita por Suarez-Islas (1983), la cual consiste en sumergir repetidas veces la punta de una micropipeta en la solución liposomal hasta obtener una bicapa con una resistencia del orden de decenas de gigaohms, la cual es reconocible fácilmente, al observar una respuesta capacitiva usando la función de *seal test* del programa Clampex (Figura 7).

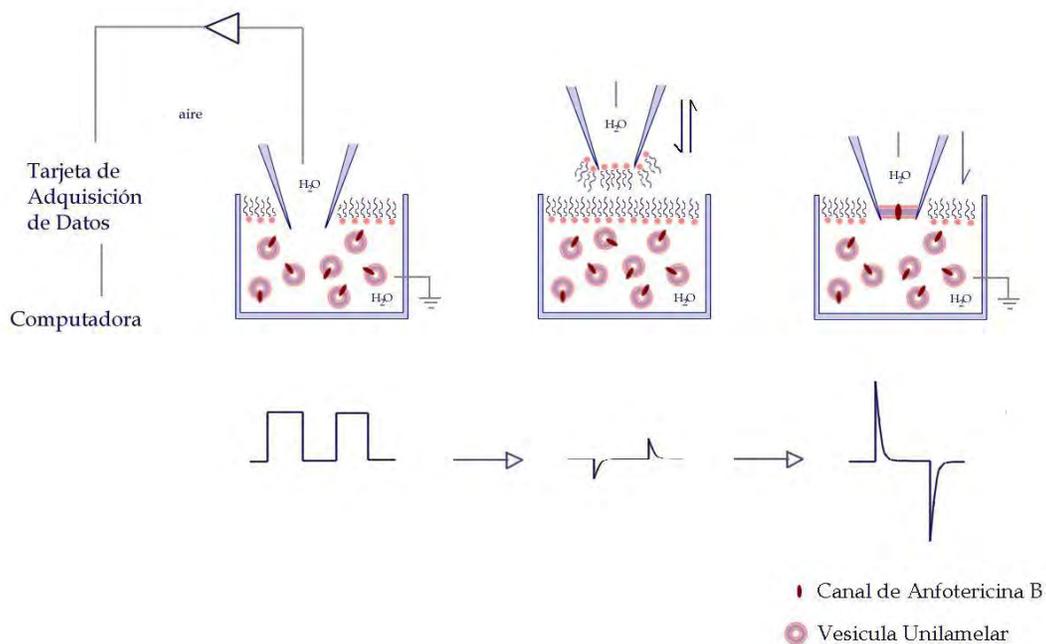


Figura 7. Esquematización de la formación de bicapas lipídicas en la punta de un microelectrodo de patch-clamp y la respuesta eléctrica que presenta cuando se aplica un pulso cuadrado.

Para mover el cabezal del Axopatch se utilizó un micromanipulador unido a un motor

de pasos, con la finalidad de evitar que las vibraciones mecánicas que pudieran producirse al manipular el dispositivo, afectaran la medición o que se rompiera la bicapa.

El procedimiento experimental comienza colocando en un recipiente 100 μl de solución lipídica con antibiótico. El recipiente es colocado en un soporte unido a una fuente de calor la cual funciona por efecto Peltier. Dentro del recipiente debe sumergirse el electrodo de referencia, procurando que no haga contacto con los bordes del recipiente.

Para formar una bicapa se sumergió el microelectrodo en el recipiente repetidas veces hasta observar una respuesta capacitiva con una resistencia del sello de entre 20 y 100 $\text{G}\Omega$; con el paso del tiempo, la bicapa se estabiliza y la resistencia se ubica entre 100 y 200 $\text{G}\Omega$. Una vez formada la bicapa se fue incrementando lentamente el potencial a lo largo de 10 minutos hasta llegar a 200 mV. Este potencial se utilizó debido a que es posible observar diferencias de corriente muy pequeñas.

3.5 Registro

Para realizar los registros se procuró que el ruido (I_{rms}) de fondo a 0 mV con la bicapa formada fuese de entre 0.150 y 0.190 pA. Los electrodos con un mayor nivel ruido fueron descartados y desechados.

Se efectuaron experimentos con una duración de 5 minutos con la finalidad de obtener eventos suficientes para un análisis estadístico más confiable. Se utilizó un intervalo de muestreo de 100 μ s (10 kHz) con el filtro pasa bajas de cuarto orden del amplificador ajustado a 2 kHz. Para analizar las mediciones se utilizó el programa QUB 1.4.0.122 (Department of Physiology and Biophysics, School of Medical and Biomedical Sciences, State University of New York at Buffalo) el cual utiliza el método *segmental k-means* (SKM) para analizar las mediciones (Apéndice 1).

Debido a que el algoritmo utilizado por el programa QUB está diseñado para análisis de canal unitario y a que a las concentraciones de medicamento utilizadas se producen canales superpuestos (montados), lo que impide al algoritmo contar los tiempos de apertura de esta clase de eventos; fue necesario utilizar otro programa para analizar los resultados de la idealización y contar nuevamente los tiempos de apertura y número de eventos y obtener así las matrices de ocupación (un ejemplo de estas se muestra en el apéndice 2), de eventos y de vida media del canal iónico.

Se procuró que los sellos tuvieran una resistencia de alrededor de 150 gigaohms para

asegurar que la geometría de la bicapa fuese la misma. Sin embargo, existe una gran variación debido a que los sellos formados no son idénticos entre sí en cuanto a geometría y ubicación en la punta del electrodo [Neher & Sakmann, 1995]. Con respecto a las dimensiones de la punta del electrodo, es posible estimar que el diámetro del orificio en la punta del electrodo es menor a 100 nm, pues no es posible observarlas en el microscopio óptico. En cuanto a la geometría de las puntas, existen diferencias entre cada electrodo debido a que la punta se fractura al formarse.

Observaciones de Neher y Sakmann (1995) confirman la formación de un sello con forma de “omega” en la punta del electrodo, el cual puede desplazarse dentro del electrodo (Figura 8). Las imágenes corresponden a un diámetro de apertura del electrodo de 0.5 mm; el cual es mayor al de los electrodos usados en el experimento.

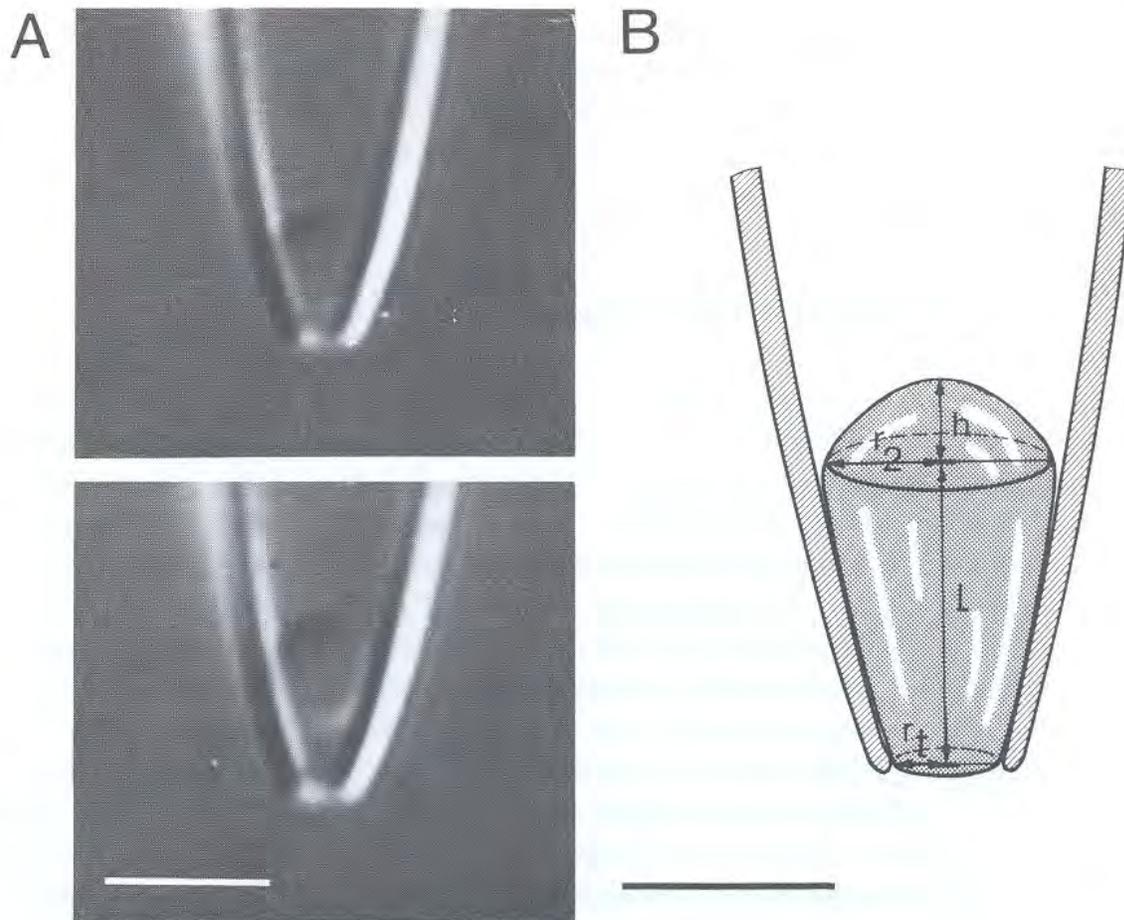


Figura 8. Geometría de una bicapa de $2M\Omega$ en el microelectrodo [Neher & Sakmann, 1995].

Otro factor a considerar fueron los niveles de ruido de cada sello. Se procuró que el nivel de ruido fuese el mismo para cada sello para poder utilizar los mismos valores de filtro digital al realizar el análisis. El nivel de ruido promedio de los experimentos fue $I_{rms} = 0.168 \pm 0.013$ pA.

Se realizó la corrección del *baseline* de cada archivo utilizando el programa QUB, con la finalidad de eliminar oscilaciones producto de ruido eléctrico, oscilaciones mecánicas de baja frecuencia o fluctuaciones del sello.

3.5.1 Puntos de cuidado

Durante el registro de los datos experimentales el primer obstáculo que se enfrenta, es la formación del sello. Es necesario verificar que la resistencia de los sellos sea la misma con la finalidad de que todos posean características geométricas similares. Sin embargo esto no es tan sencillo debido a que, como ya se ha mencionado, estas características están determinadas por la geometría de la punta de los electrodos y que puede ser distinta entre ellos, a pesar de que el proceso de formación de las puntas sea el mismo. Otro factor a tomar en cuenta durante el registro de datos experimentales es el nivel de ruido basal, el cual puede ser incrementado por fenómenos mecánicos y electromagnéticos. A pesar de que el dispositivo experimental se encuentra amortiguado para evitar las vibraciones mecánicas, las bajas frecuencias producidas por el paso y la operación de maquinaria y vehículos pesados en las inmediaciones del laboratorio, pueden llegar a producir oscilaciones en el *baseline*. También es necesario procurar que los componentes que se encuentran en contacto directo con el dispositivo experimental, no estén sujetos a presiones excesivas (por ejemplo que el tornillo del *holder* -que sujeta los electrodos al cabezal- no esté muy apretado). Al analizar los resultados experimentales es necesario definir un tiempo mínimo de apertura, para no tomar en cuenta los eventos muy breves (*spikes*); debido a que no existe evidencia de que estos sean resultado de la presencia de antibiótico en la bicapa y con frecuencia son producto de acumulación de cargas dentro del dispositivo. Estos eventos de poca duración suelen confundirse con falsos positivos y a pesar de ser muy breves, en ocasiones ocurren con mucha frecuencia durante un experimento y pueden afectar significativamente el tiempo y número de eventos al hacer un conteo total de los canales.

3.6 Análisis de resultados

Para realizar el análisis de resultados es necesario, en un principio, saber identificar los canales y reconocer si se trata de canales montados, para posteriormente medir su conductancia, ocupación, tiempo promedio de apertura y analizar estas últimas dos variables en matrices de apertura y cerradura.

3.6.1 Identificación de canales

Para el análisis de canal unitario, un evento se define como un cambio súbito en la corriente como resultado de la apertura o cerradura de un canal iónico. Cada evento se caracteriza por, al menos, dos parámetros: amplitud y tiempo. Para facilitar el análisis los canales se agrupan en niveles o clases, uno para cada amplitud. Para evitar incluir falsos eventos en la estadística es posible añadir un tiempo umbral a partir del cual un cambio de corriente es considerado un evento [Neher & Sakmann, 1995]. En este estudio se utilizó un tiempo umbral de 0.7 ms debido a que usando un menor valor, el programa de idealización no toma en cuenta parte del canal abierto y usando un valor mayor se incluían a la muestra eventos tales como las descargas capacitivas del control de temperatura. Cuando dos eventos coinciden temporalmente se denominan canales montados, este tipo de eventos es fácil de distinguir pues si agrupamos los canales en niveles según su amplitud, uno de los eventos ocurre a partir de un nivel que no es el nivel basal. En la figura 13 de la siguiente sección se puede ver un ejemplo de canales montados.

3.6.2 Conductancia

Una vez que es posible identificar los eventos y clasificarlos según su amplitud es posible definir su conductancia de acuerdo con la ley de Ohm, debido a que se trabaja con un voltaje fijo y se conoce la amplitud o corriente de cada canal.

Para definir las conductancias se realizó una idealización de los datos usando el algoritmo SKM con niveles de corriente a intervalos de 0.25 pA, para concentraciones de 6 μM y 7 μM de AmB y se realizaron histogramas de eventos. La principal complicación para definir las conductancias al utilizar una mayor concentración de droga es una mayor incidencia en la aparición de montaje de canales, refiriéndose al montaje como la simultaneidad en la aparición de un canal durante otro evento de la misma o diferente conductancia. Este tipo de suceso se ve reflejado en los histogramas de eventos, como una superposición de curvas gaussianas o incluso como una gaussiana con una desviación muy grande, dando como resultado un espectro que parece ser continuo y carente de niveles bien definidos.

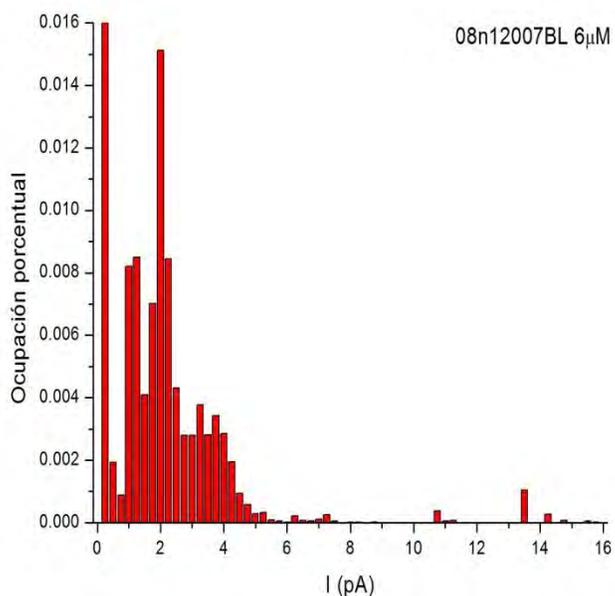
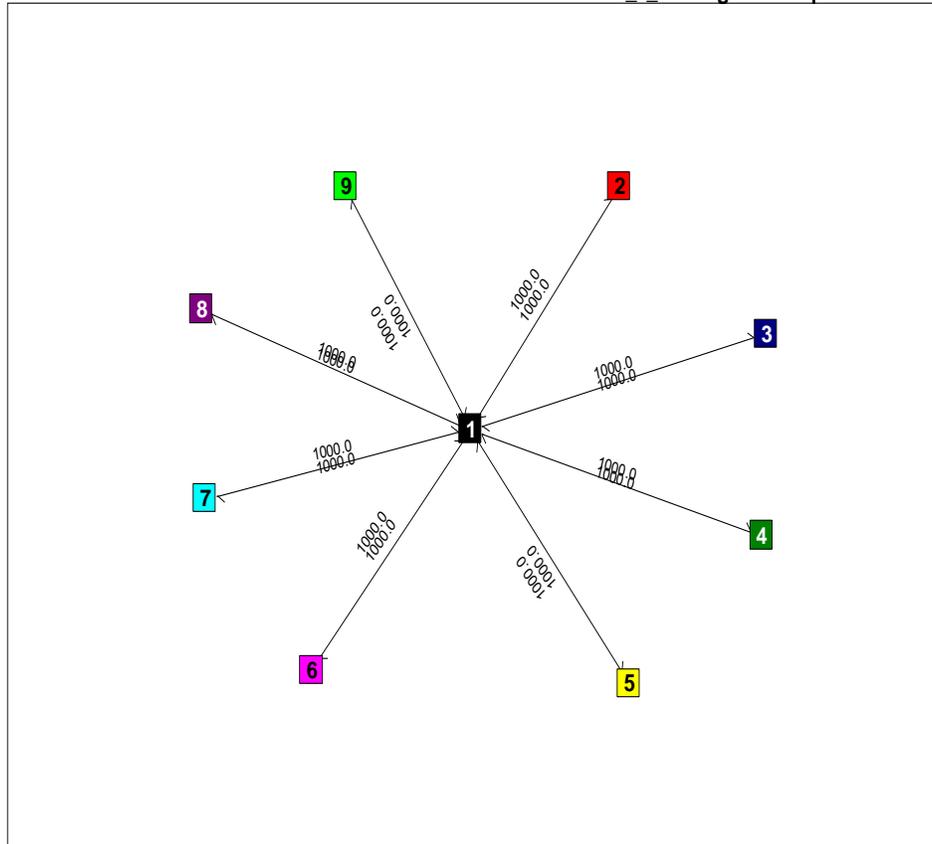


Figura 9. Histograma de eventos de un experimento a concentración 6 μ M. Se ajustaron gaussianas para determinar los niveles de corriente y se promediaron con los valores de los demás experimentos a 6 y 7 μ M.

Una vez definidos los niveles de corriente se construyó un modelo de Markov utilizando estos valores y se realizó análisis SKM de cada archivo. Se calcularon las matrices de eventos, de tiempo de vida y de ocupación de cada archivo. El primer análisis se realizó tomando en cuenta todos los niveles de corriente; sin embargo, el software QUB está diseñado para análisis de canal unitario y al aparecer montaje de canales, no toma en cuenta el tiempo correspondiente a los eventos que coinciden, lo cual repercute en las matrices de ocupación de cada canal. Esto se vio reflejado, al graficar la ocupación en función de la concentración en una gráfica log-log, con una caída en la ocupación al incrementar la concentración.



QuB (C) 2000-01 University at Buffalo. 05/11/2009 07:38:18 p.m.

Figura 10. Modelo de Markov utilizado para construir la idealización de los experimentos. En este modelo, cada estado puede ocurrir desde el nivel basal (0.00 pA, estado 1). Los estados del 2 al 9 corresponden a los distintos niveles de corriente con valores 1.01, 2.03, 3.51, 4.52, 6.80, 12.01, 15.78 y 0.5 pA respectivamente. El estado 9 posee un valor menor, debido a que se agregó después de fabricar el modelo pues en algunos de los experimentos se encontró un nivel de corriente que confundió al algoritmo haciéndolo cambiar entre el estado 1 y 2. Para el modelo se aplicó una desviación estándar de 0.2 pA.

Para solucionar el problema del traslape de los tiempos de apertura se utilizó un programa que considera los eventos que coinciden temporalmente, es decir, los tiempos de montaje y los suma a la matriz de ocupación. Al realizar este análisis surgió una nueva complicación debido a que los canales de mayor conductancia se pueden expresar como combinaciones de los canales pequeños; lo cual vuelve indistinguible si el nivel de corriente ocurre como consecuencia de un montaje o si se trata de un canal unitario.

Esta situación puede resolverse recurriendo a las matrices de ocupación del canal. En ellas, está incluida información sobre las corrientes de apertura y de cerradura. Sin embargo, el montaje sigue produciendo problemas al realizar el análisis pues es difícil distinguir entre las conductancias de los canales montados.

Para solucionar esto se partió de la hipótesis de que los canales son eventos independientes; y como consecuencia de esto es posible realizar una normalización considerando solamente los canales que abren y cierran desde el nivel cero y dividiendo su tiempo de ocupación entre el tiempo de *baseline* -como primera aproximación- obteniendo con esto una ocupación porcentual del canal unitario. Esta aproximación tiene sus limitaciones y consecuencias las cuales se describen más adelante.

Para realizar el análisis de esta forma es necesario recurrir a las matrices de apertura y cerradura del canal e identificar los eventos que parten desde el nivel cero.

3.6.3 Matrices de apertura y cerradura

Una matriz de apertura y cerradura es un arreglo que permite reconocer el montaje de canales de manera muy detallada, así como si el evento es unitario y puede contener información sobre el número de eventos, la ocupación y el tiempo de apertura. Los renglones de la matriz corresponden al nivel desde el cual ocurre la apertura del canal y las columnas corresponden al nivel en que se cierra [Neher & Sakmann, 1995]. Para un ejemplo de matrices de apertura y cerradura ver el apéndice 2.

3.6.4 Ocupación

Podemos definir a la ocupación como la suma del tiempo durante el cual un nivel de corriente ocurre a lo largo del experimento [Neher & Sakmann, 1995]. Comúnmente se utiliza de forma porcentual y esta asociado con la probabilidad de que un tipo de evento ocurra a lo largo de un experimento.

Se calculó la ocupación de cada canal utilizando el software QUB; sin embargo, la incapacidad de este programa para analizar el montaje de canales ocasionó que los valores de ocupación para las concentraciones mayores, se vieran afectados. Al ocurrir eventos montados, el tiempo de apertura se considera por cada nivel de corriente sin distinguir si se trata de un canal que abre desde el nivel basal o se trata de canales montados y por lo tanto, no es posible sumar el tiempo en que los dos canales se encuentran abiertos simultáneamente utilizando dicho programa.

Se diseñó un programa para tomar en cuenta esos tiempos, el cual permitió mejorar los valores de ocupación. Sin embargo, la similitud entre las conductancias de los montajes y las de los canales unitarios, pueden causar confusión entre los eventos y alterar nuevamente la ocupación.

Como se mencionó anteriormente, se recurrió a las matrices de apertura y cerradura de cada canal, de las cuales se consideró exclusivamente la información correspondiente a eventos de canal unitario; es decir, únicamente se consideraron eventos cuya apertura y cerradura ocurrieran desde el nivel de *baseline* y se descartó la conductancia de 1.98 pS y

fue considerada como parte del *baseline*.

Esta forma de análisis arrojó resultados en que los tiempos totales fueron distintos entre experimentos, lo cual conduce a que para concentraciones de droga muy grandes el tiempo de cerradura se reduzca y se vea reflejado en un incremento en la ocupación. Sin embargo esto no afecta los resultados en forma significativa debido a que al reducirse el tiempo de cerradura también se reduce la probabilidad de eventos que ocurren desde la línea basal. Es por esto que se consideró la razón entre el tiempo de ocupación de cada canal y el tiempo de ocupación de *baseline*, para obtener el tiempo de apertura del canal en relación con el tiempo en que no hay canales abiertos y con esto, normalizar los valores experimentales en función del tiempo sin canales.

3.6.5 Tiempo promedio de apertura

Para calcular el tiempo promedio de apertura se suman los tiempos individuales de un nivel de corriente y se divide ese valor entre el número de eventos [Neher & Sakmann, 1995].

IV. Resultados y discusión

4.1 Conductancias

Se identificaron nueve niveles de conductancia los cuales se exhiben en la tabla 1.

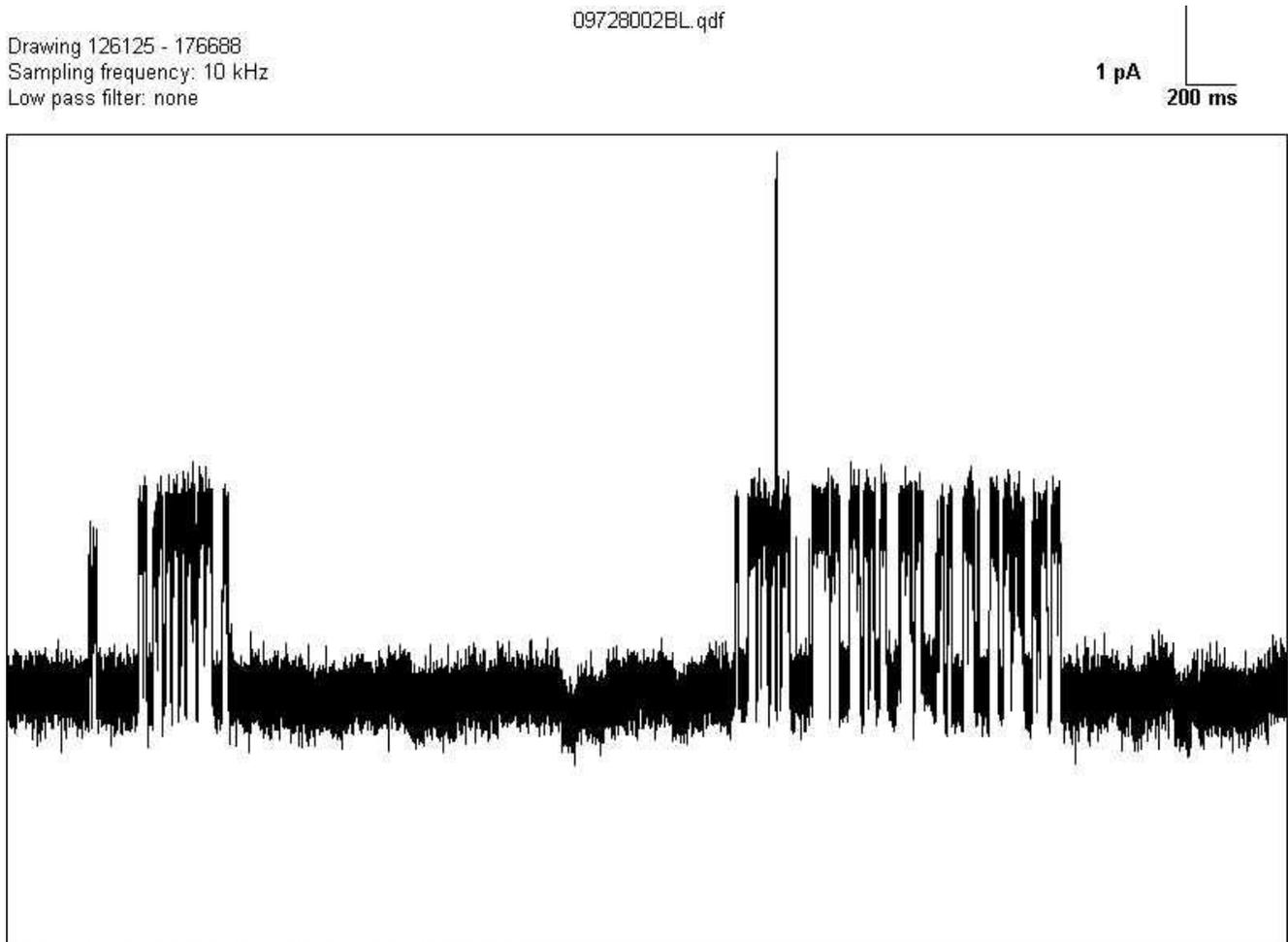
Concentración (µM)	5		6		6.5		7		7.5		8		9		10		Promedio	
	G (pS)	σ	G (pS)	σ														
BL	0.01	0.03	0.08	0.09	-0.02	0.04	0.23	0.29	-0.01	0.01	0.01	0.03	0.04	0.06	0.03	0.05	0.05	0.08
O	n.o.	-	n.o.	-	1.40	0.19	n.o.	-	1.57	0.40	1.75	0.88	2.38	0.19	2.82	0.83	1.98	0.53
I	4.37	0.83	4.53	0.86	5.14	0.26	4.68	0.33	5.34	0.14	5.12	0.47	5.21	0.21	6.18	2.02	5.07	0.53
II	9.02	-	9.65	0.35	9.23	0.82	9.44	0.75	9.06	1.51	9.64	1.07	9.98	1.09	10.50	2.85	9.57	0.47
III	15.61	-	15.31	-	17.10	1.51	16.03	0.81	16.00	1.24	16.40	1.10	16.87	0.44	16.97	2.56	16.29	0.61
IV	n.o.	-	n.o.	-	21.88	0.55	22.06	0.17	22.29	0.48	21.89	0.38	22.46	0.11	24.01	3.79	22.43	0.74
V	n.o.	-	33.22	-	28.73	1.87	27.70	0.86	25.84	0.21	26.42	0.51	31.47	0.85	33.22	9.58	29.53	2.87
VI	n.o.	-	61.11	-	53.82	0.00	n.o.	-	n.o.	-	n.o.	-	50.36	0.46	63.14	12.08	57.14	5.19
VII	n.o.	-	74.42	-	80.61	2.45	n.o.	-	n.o.	-	n.o.	-	80.27	8.71	n.o.	-	78.43	2.84

Tabla 1. La etiqueta BL corresponde al *Baseline* o línea basal, es decir al nivel de conductancia cero correspondiente al estado en que los canales de Amfotericina B se encuentran cerrados. El nivel etiquetado como O, corresponde a un fenómeno observado a 6.5 µM y a concentraciones superiores o iguales a 8 µM, el cual fue considerado en el modelo de Markov debido a que el algoritmo SKM lo confunde como canal. Es difícil considerar este evento como un canal de AmB; debido a que se encuentra muy cercano al nivel de ruido y no aparece a todas las concentraciones. Para ser considerado en el análisis, es necesario poseer una mayor cantidad de datos experimentales que confirmen la existencia de un poro con esta conductancia, además de mayor resolución. La etiqueta "n.o." corresponde a datos no observados.

En la tabla 1 se puede apreciar que, debido a los valores y a los niveles de ruido, es posible expresar las conductancias a partir del canal II como combinaciones de las que tienen menor magnitud. Esto, aunado a los niveles de ruido que poseen los canales abiertos, dificulta considerablemente distinguir si la apertura corresponde a un canal aislado o a una superposición de eventos que coinciden en el tiempo. Esta superposición de eventos es muy poco probable a bajas concentraciones pues la actividad es baja; sin embargo, la probabilidad se incrementa considerablemente al aumentar la concentración. Existen valores para la conductancia de las combinaciones de canales que no posee ningún evento que abra y cierre desde el nivel de *baseline*, estas conductancias se eliminaron del análisis debido a que se trata, con seguridad, de canales montados; los canales montados no fueron tomados en cuenta debido a que el ruido durante la apertura es imposible de distinguir de algunas cerraduras muy breves y esto afecta el conteo de canales y los tiempos de apertura. Es por esto que se consideraron para el análisis únicamente los eventos que abren y cierran desde el nivel de *baseline*.

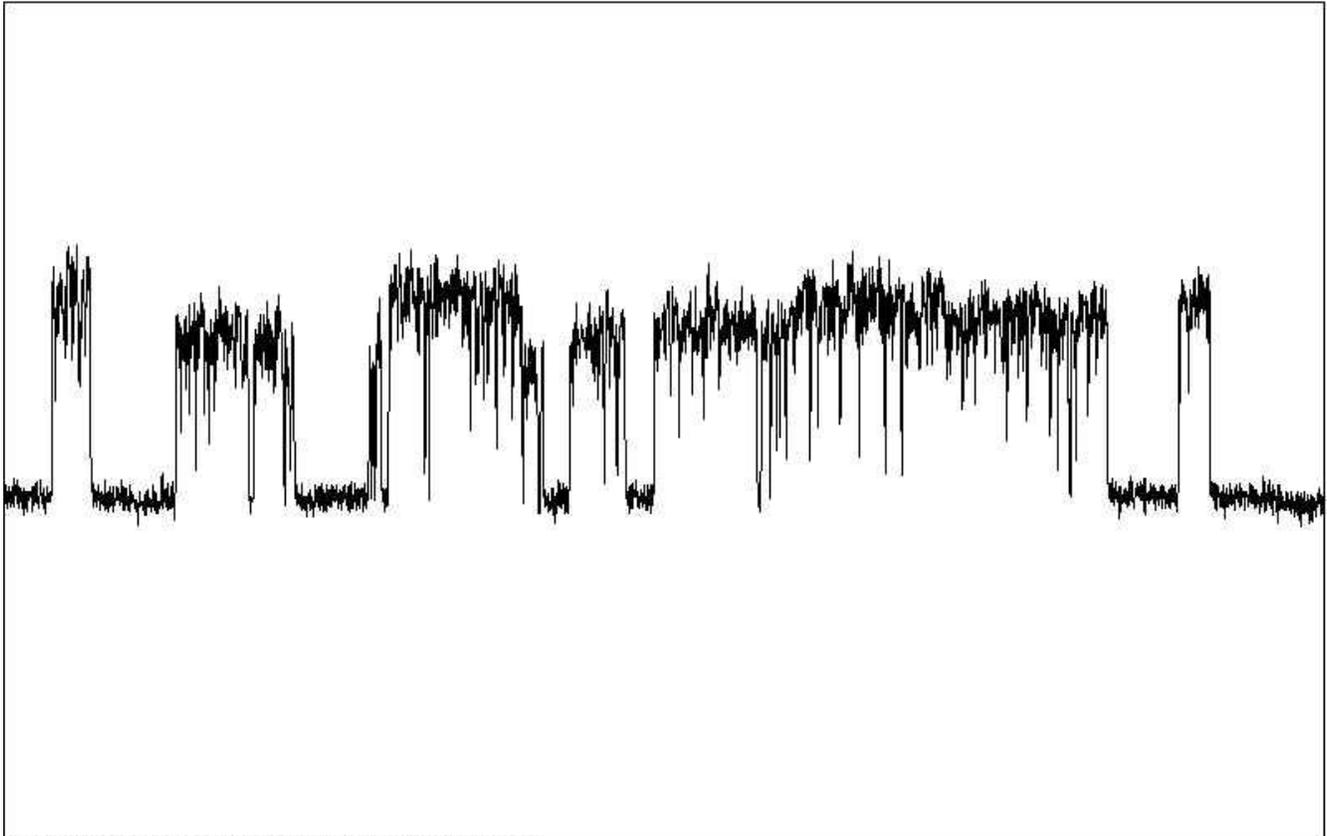
El evento de 1.98 pS fue descartado del análisis debido a que se encuentra muy cerca del nivel de ruido del experimento y no aparece en todos los registros. Esto dificulta su interpretación, pues es posible que se trate tanto de una forma de expresión de canal, como de un evento no relacionado con la droga; tal como pueden ser fluctuaciones en la resistencia del sello o a alteraciones en la permeabilidad de la membrana provocadas por con el potencial usado de 200 mV. Para eliminar este evento de la estadística se sumaron las ocupaciones de los canales que abren y cierran en el *baseline*, con los que suceden desde este nivel de conductancia.

Es necesario considerar que las conductancias en la tabla 1 corresponden a todos los niveles de corriente en los archivos, incluyendo los canales montados. Es posible apreciar también, que los valores de cada canal son muy similares para todas las concentraciones, sugiriendo que no existe una dependencia entre la concentración y los distintos niveles de conductancia. En las siguientes imágenes se muestran algunos ejemplos de canales individuales y de canales montados



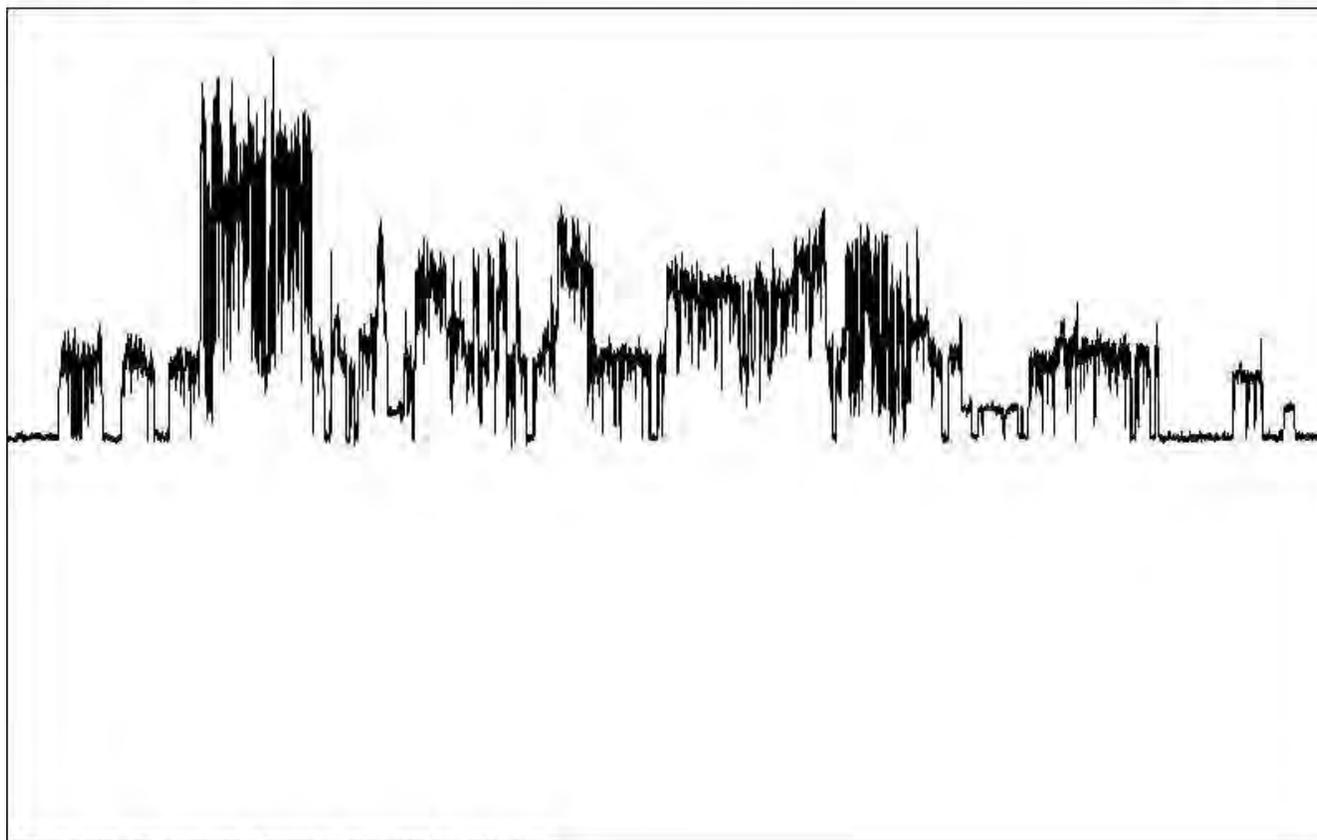
QuB (C) 2000-07 University at Buffalo. 18/11/2009 12:22:58 p.m.

Figura 11. Canales de 5.09 pS en una bicapa de lecitina con 30% mol de colesterol y una concentración 8 μM de AmB a 30° C con un potencial de 200 mV. En uno de los eventos se observa un fenómeno de muy corta duración del cual no es posible conocer la causa, sin embargo no se considera como un evento relacionado con los canales de AmB debido a los criterios de análisis tales como duración del canal y nivel de corriente.



QuB (C) 2000-07 University at Buffalo. 18/11/2009 12:29:35 p.m.

Figura 12. Canales de 9.77 pS en una bicapa de lecitina con 30% mol de colesterol y una concentración 8 μ M de AmB a 30°C con un potencial de 200 mV.



QuB (C) 2000-07 University at Buffalo, 18/11/2009 01:17:33 p.m.

Figura 13. Canales montados en una bicapa de lecitina con 30% mol de colesterol y una concentración $9 \mu\text{M}$ de AmB a 30°C con un potencial de 200 mV. Las corrientes observadas van de 1 pA a 6 pA. Es posible observar, que existe un mayor nivel de ruido para los canales más grandes.

4.2 Ocupación

En la tabla 2 se muestran los resultados de la ocupación en función de la concentración. En las figuras 14, 15 y 16 se muestran las pendientes correspondientes.

Concentración (mM)	5		6		6.5		7		7.5		8		9		10	
	Log Ocupación	σ														
I	-3.07	0.61	-2.64	0.36	-2.66	0.35	-1.81	0.63	-1.89	0.4	-1.89	0.54	-1.43	0.41	-1.36	0.45
II	-3.96	0.61	-3.44	0.4	-2.63	0.69	-2.23	0.5	-2.06	0.47	-2.27	0.53	-1.17	0.26	-1.27	0.45
III	-3.48	0.61	-4.28	0.61	-3.37	0.52	-2.42	0.39	-2.36	0.6	-1.66	0.72	-0.88	0.42	-1.16	0.46
IV	n.o.	-	n.o.	-	n.o.	-	-4.09	0.75	n.o.	-	-3.97	0.65	-1.73	0.47	-3.67	0.73
V	n.o.	-	n.o.	-	-3.57	0.63	-3.8	0.76	-4.88	0.75	n.o.	-	-1.83	0.5	-3.25	0.57
VI	n.o.	-	-4.63	0.61	n.o.	-										
VII	n.o.	-	-4.57	0.61	n.o.	-										

Tabla 2. Logaritmo de la ocupación contra concentración de AmB. El valor del logaritmo de la ocupación se incrementa con la concentración de AmB en la bicapa. “n.o.” corresponde a eventos no observados.

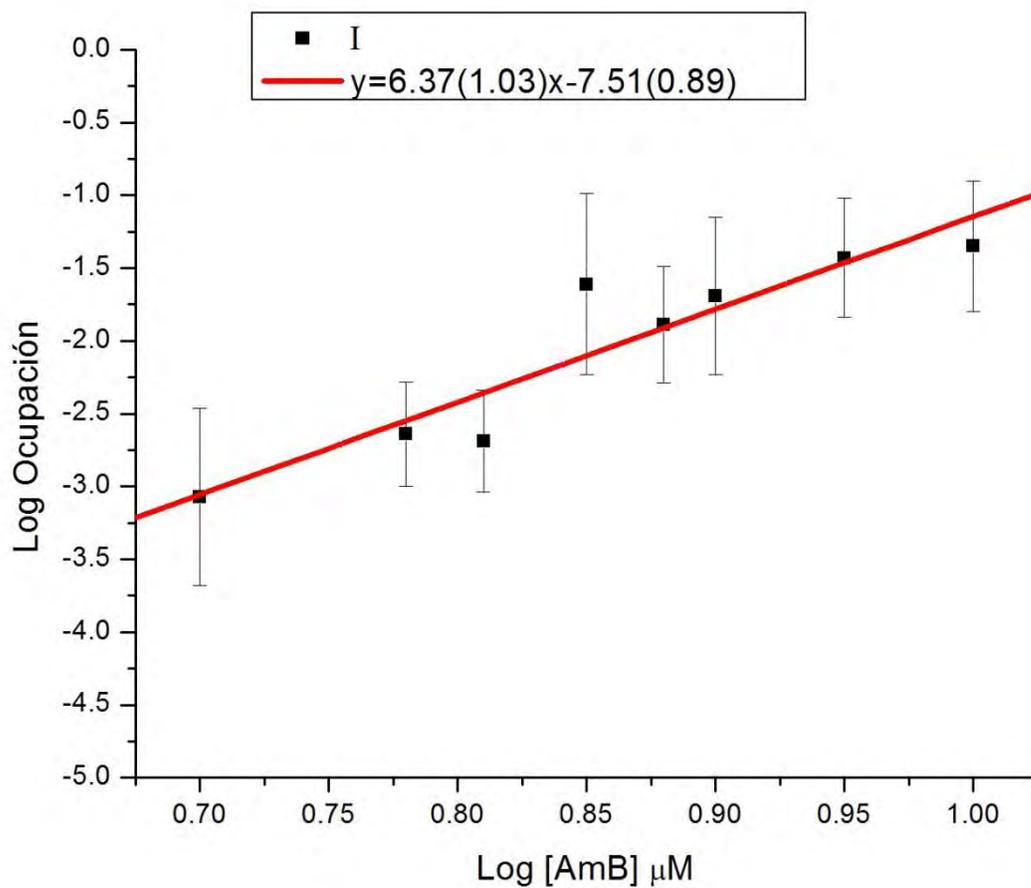


Figura 14. Gráfica de la ocupación del canal I de conductancia 5.07 ± 0.53 pS en función de la concentración. La pendiente de la gráfica es 6.37 y la cantidad entre paréntesis corresponde a la desviación estándar.

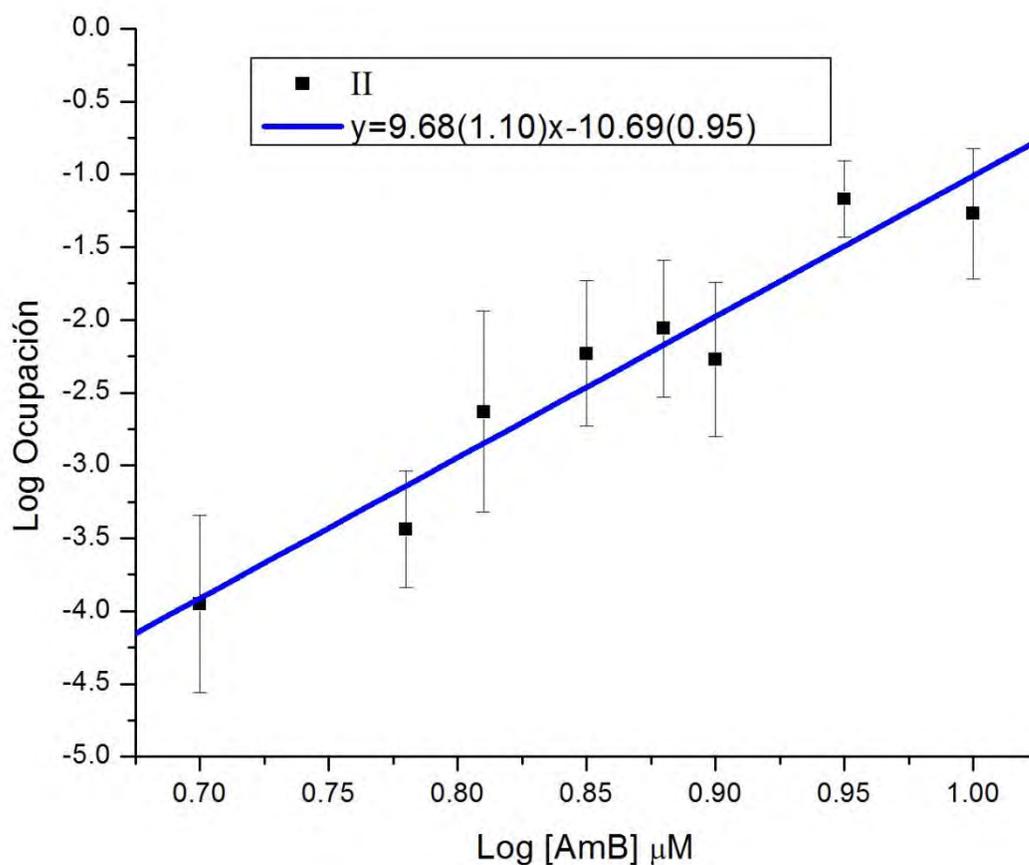


Figura 15. Gráfica de la ocupación del canal II de conductancia 9.57 ± 0.47 pS en función de la concentración. La pendiente de la gráfica es 9.68 y la cantidad entre paréntesis corresponde a la desviación estándar.

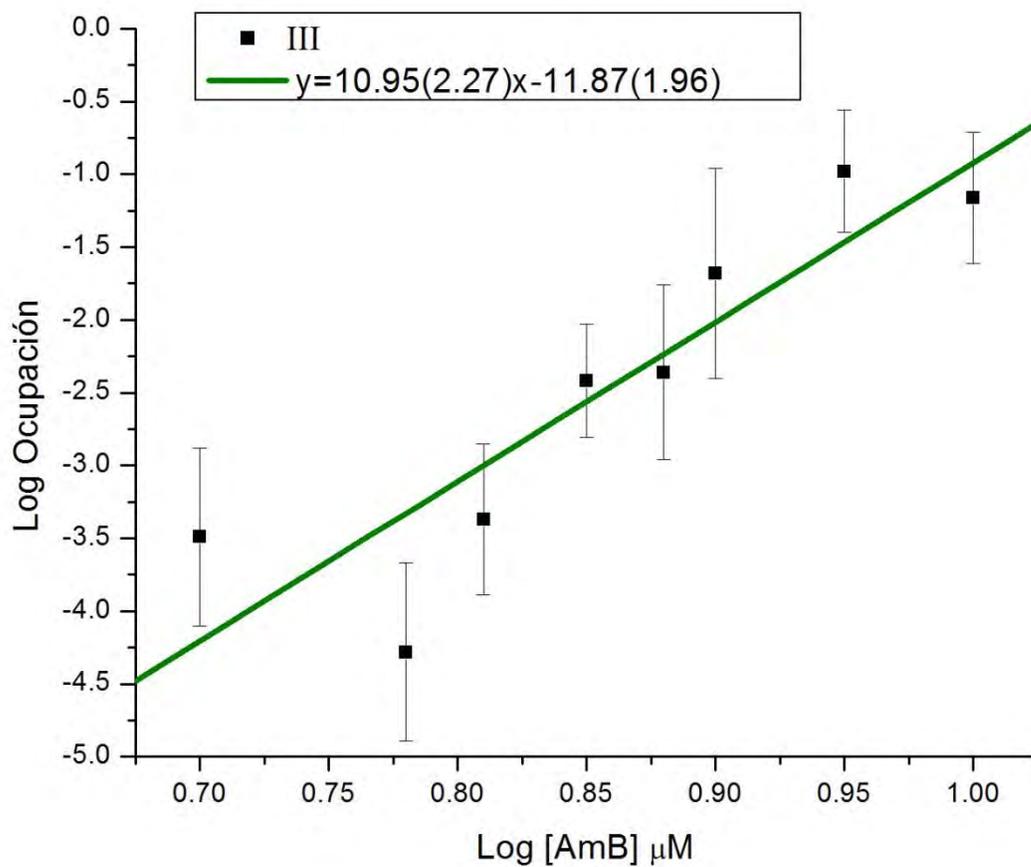


Figura 16. Gráfica de la ocupación del canal III de conductancia 16.29 ± 0.61 pS en función de la concentración. La pendiente de la gráfica es 10.95 y la cantidad entre paréntesis corresponde a la desviación estándar.

En la figura 16 los puntos correspondientes a las concentraciones 5 μM y 6 μM caen por fuera del ajuste debido a que a dichas concentraciones ésta conductancia no es muy frecuente y se tiene una estadística pobre.

Para las conductancias IV, V, VI y VII no se realizaron gráficas debido a que no aparecen en todas las concentraciones. Esto ocurre debido a que, aparentemente, es necesaria la participación de un mayor número de monómeros en la formación del canal haciendo que este tipo de eventos ocurra con menor probabilidad. Para poder obtener datos consistentes de estos eventos es necesario realizar experimentos durante tiempos mas largos, lo cual se dificulta debido a que los sellos no siempre son tan estables y se rompen, o los electrodos suelen taparse después de tiempos muy largos, es decir, es necesario mejorar el protocolo experimental.

Además, ya se ha mencionado que el montaje de canales suele ser bastante frecuente, sobre todo en concentraciones de AmB iguales o superiores a 7 μM y es por eso que se realizó una normalización de los tiempos totales de ocupación relacionándolos con el tiempo total de nivel basal; lo cual reduce notablemente la cantidad de datos estadísticos e incrementa la incertidumbre experimental.

4.3 Tiempo promedio de apertura

Se calculó el tiempo promedio de apertura (*lifetime* o LT) de cada canal como función de la concentración utilizando las matrices de apertura y cerradura; los resultados se exhiben en la tabla 3. Se consideró el tiempo promedio de apertura de los canales que abren y cierran desde el nivel de *baseline*.

Concentración (µM)	5		6		6.5		7		7.5		8		9		10		Promedio	
	LI (ms)	σ	LI (ms)	σ	LI (ms)	σ	LI (ms)	σ	LI (ms)	σ	LI (ms)	σ	LI (ms)	σ	LI (ms)	σ	LI (ms)	σ
I	23.07	-	30.89	8.39	47.55	17.47	46.76	15.51	50.7	17.31	33.99	14.08	34.07	10.58	59.28	25.97	40.9	11.14
II	20.06	-	28.97	18.54	48.59	26.32	41.68	4.2	34.83	9.34	32.63	9.01	46.98	7.47	37.43	17.41	36.4	8.88
III	24.38	-	23.5	-	34.54	15.99	43.31	18.13	40.86	18.58	51.17	23.4	34.84	12.92	58.63	15.13	38.9	11.44
IV	n.o.	-	n.o.	-	27.2	-	41.85	-	n.o.	-	15.48	3.08	32.44	16.11	22.87	9.42	27.97	8.69
V	n.o.	-	n.o.	-	25.15	10.05	40.37	-	15.1	-	n.o.	-	51.28	3.13	29.69	9.84	32.42	12.55
VI	n.o.	-	10.4	0	n.o.	-	n.o.	-										
VII	n.o.	-	8.03	0	n.o.	-	n.o.	-										

Tabla 3. Tiempos promedio de apertura para cada clase de canal por concentración. La etiqueta “n.o.” corresponde a eventos no observados. Promediar los valores de las distintas concentraciones es válido debido a que el tiempo promedio de apertura de cada canal no depende de la concentración de AmB como se muestra en las figuras 17, 18 y 19. Además el valor promedio está dentro de las barras de error pues la dispersión es muy grande. La magnitud del error, es a causa del tipo de análisis en que se consideraron los eventos que ocurren únicamente desde el nivel basal; pues se reduce el número total de eventos y se incrementa la dispersión.

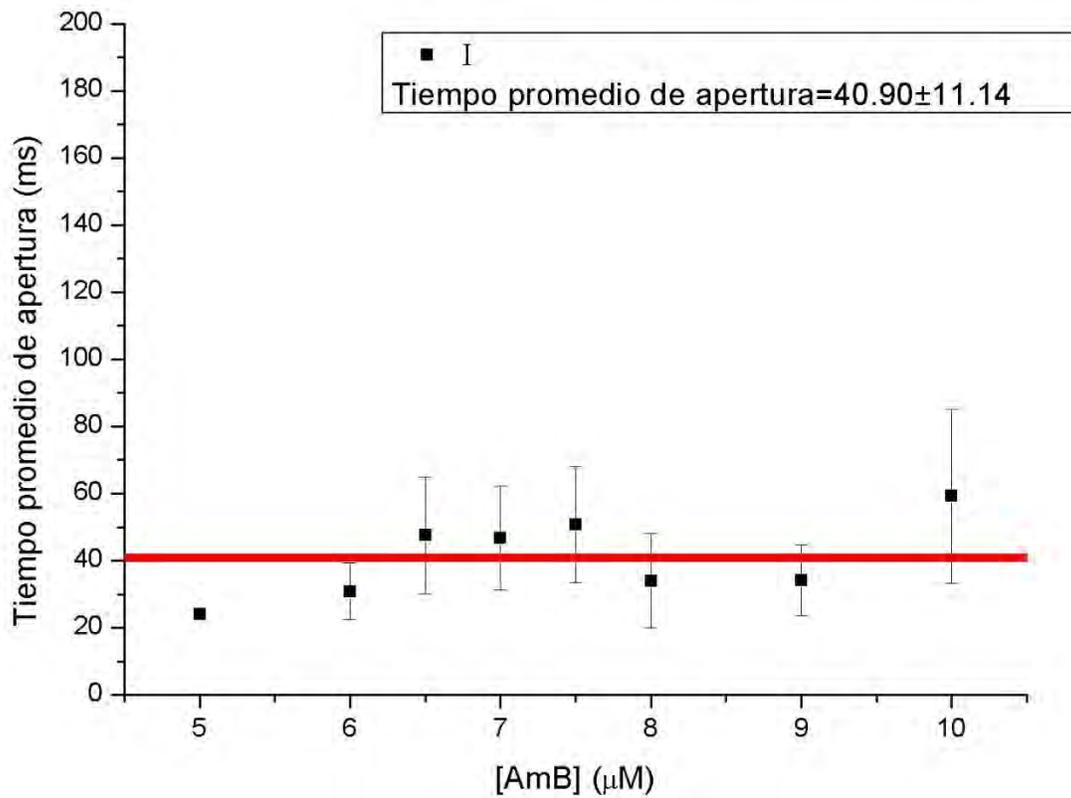


Figura 17. Tiempo promedio de apertura del canal I de conductancia 5.07 ± 0.53 pS en función de la concentración. El tiempo de promedio de apertura para esta conductancia es de 40.90 ± 11.14 ms.

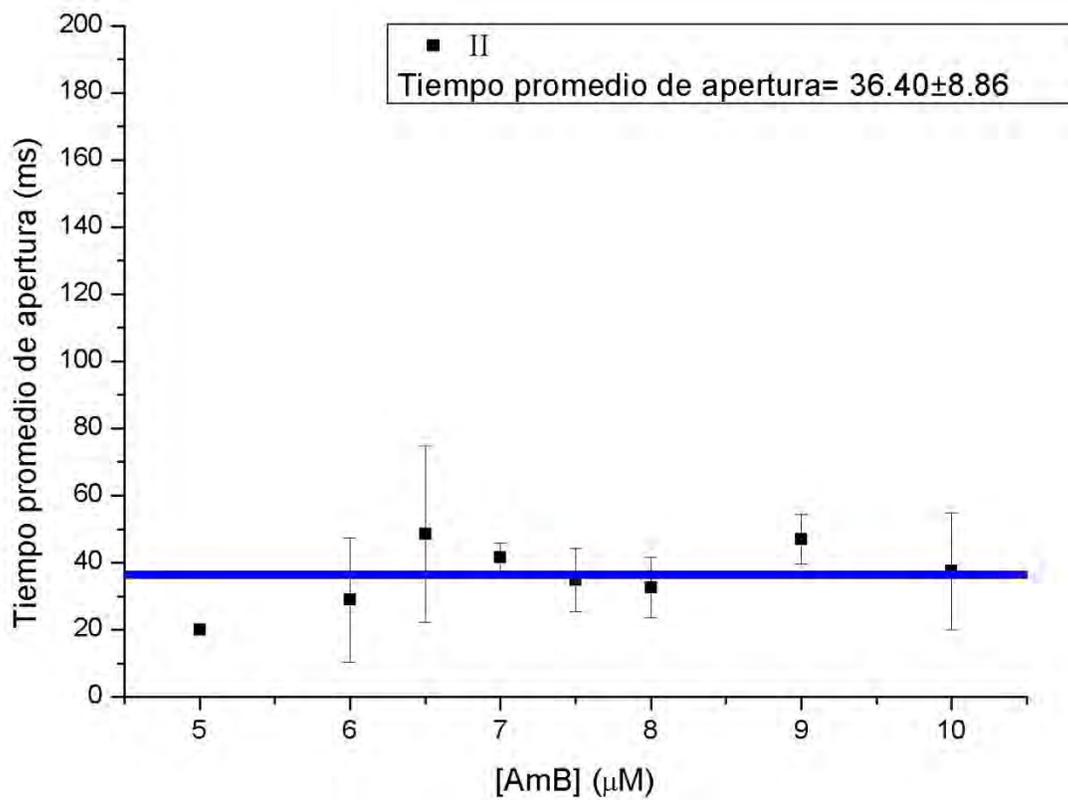


Figura 18. Tiempo promedio de apertura del canal II de conductancia 9.57 ± 0.47 pS en función de la concentración. El tiempo promedio de apertura para esta conductancia es de 36.40 ± 8.86 ms.

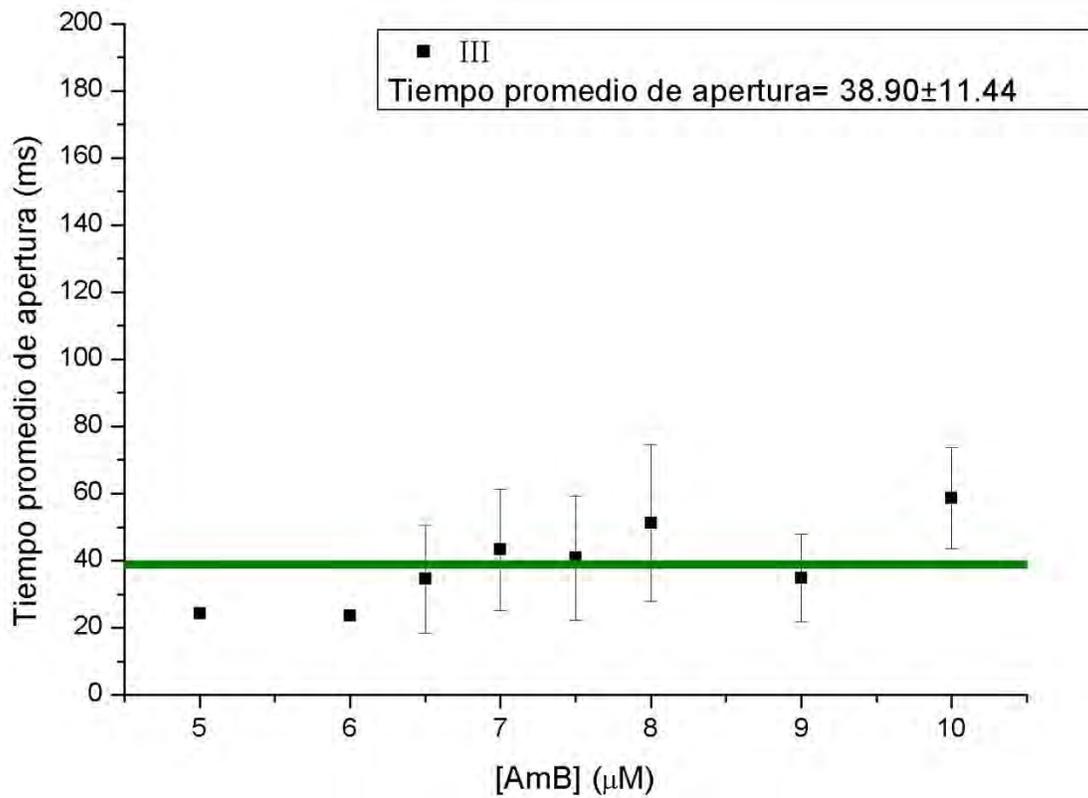


Figura 19. Tiempo promedio de apertura del canal III de conductancia 16.29 ± 0.61 pS en función de la concentración. El tiempo de promedio de apertura para esta conductancia es de 38.90 ± 11.44 ms.

En las gráficas de tiempo promedio de apertura es posible observar que no existe una variación significativa entre las distintas concentraciones. Es posible observar que algunos puntos poseen barras de error muy grandes. Esto ocurre debido a que el número de eventos es muy pequeño y, por lo tanto, una pequeña variación en esta cantidad entre distintos experimentos se convierte en una fuente considerable de error estadístico. Además, como se mencionó anteriormente, para el análisis están siendo considerados únicamente los canales que abren y cierran desde el *baseline*. Al realizar este tipo de análisis existe el riesgo de que los canales con un tiempo de apertura muy largo no estén siendo considerados debido a que, al permanecer el canal abierto durante un lapso de tiempo más largo, tiene una mayor probabilidad de coincidir con otro evento ocasionando esto un montaje de canales. A concentraciones sin montaje el valor del tiempo promedio de apertura es más grande que en aquellas con montaje, lo cual muestra que la aproximación utilizada es razonable.

En la figura 17 es posible notar que los tiempos promedio de apertura son muy similares con excepción del punto correspondiente a 5 μM debido a que no hay suficiente estadística en este caso. Es posible observar que a concentraciones más altas el error en la medición se reduce notablemente como consecuencia del tipo de análisis, pues a dichas concentraciones es que ésta conductancia aparece desde el nivel basal con frecuencia suficiente sin que exista montaje de canales. A mayores concentraciones se observa una caída en el valor y un aumento del error debido a que comienza a aparecer con más frecuencia la superposición de canales. Los tiempos promedio de apertura observados para los canales de Amfotericina B fueron: 40.90 ± 11.14 ms para el canal I, 36.40 ± 8.86 ms para el canal II, y 38.90 ± 11.44 para el canal III.

4.4 Número de Moléculas

Las pendientes de las figuras 14-16 de la ocupación en función de la concentración se pueden interpretar como el número de moléculas de AmB involucradas en la formación del canal de acuerdo con la ecuación (1) de la página 17. Se calcularon las pendientes de las conductancias I, II y III usando el algoritmo de ajuste lineal (*Linear Fit*) del software *Origin pro 7.0*.

	G (pS)	α
I	5.07 \pm 0.53	6.37 \pm 1.03
II	9.57 \pm 0.47	9.68 \pm 1.10
III	16.29 \pm 0.61	10.9 \pm 2.3

Tabla 4. El valor α corresponde a las pendientes de las gráficas de ocupación contra concentración. De acuerdo con la ecuación (1), este valor puede ser considerado como el número de moléculas involucradas en la formación del canal de AmB.

De acuerdo con los resultados de la tabla 4 los canales I, II y III, están constituidos por 6.37 \pm 1.03, 9.68 \pm 1.10 y 10.95 \pm 2.27 moléculas de AmB respectivamente. Estos valores caen dentro del intervalo de valores reportados en la literatura e incluso permiten predecir la molaridad de canales mayores; los cuales ocurren sobre todo a altas concentraciones de antibiótico y, por lo tanto, es muy difícil determinar su ocupación independiente debido al gran número de eventos simultáneos. Un modelo simplificado surge al pensar en las moléculas de AmB como cilindros elipsoidales, los cuales coalescen formando un poro de acuerdo con la ecuación:

$$G = A \left(\frac{\sqrt{\varepsilon^2 + \tan^2(\pi/n)} - 1}{\tan(\pi/n)} \right)^2 \quad (3)$$

en donde G es la conductancia a potasio del poro, ε es el cociente de los semiejes de las elipses y A es un factor de conversión, que relaciona el diámetro del poro con la conductancia [Comunicación personal con Armando Antillón].

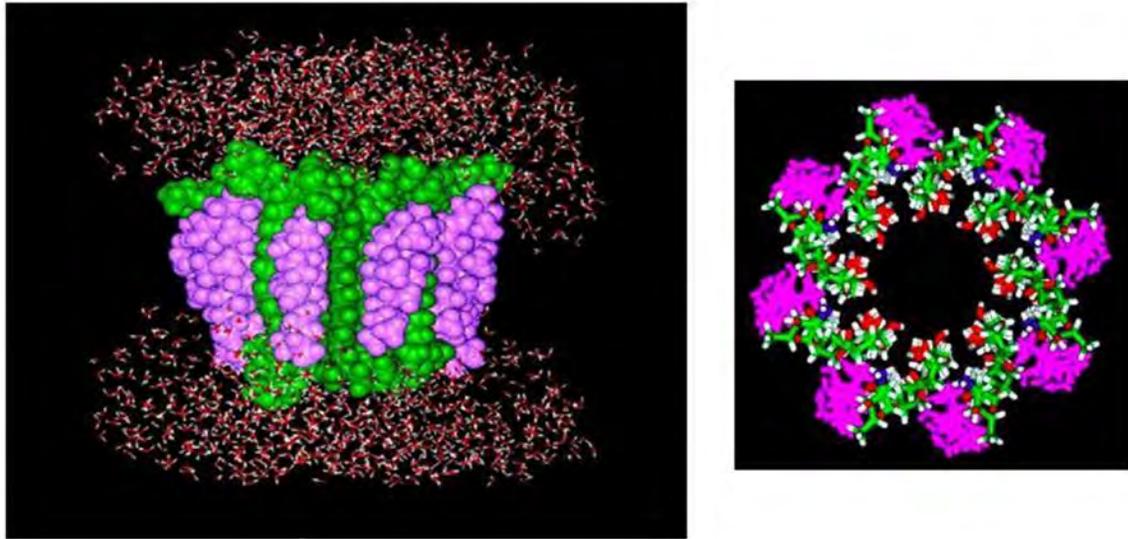


Figura 20. Modelo del canal de AmB. La imagen de la izquierda corresponde a una vista lateral del canal de AmB. La imagen de la derecha corresponde a una vista superior del canal de AmB. La estructura en verde corresponde a la molécula de AmB y la estructura en magenta a la molécula de colesterol (Baginsky, 1997).

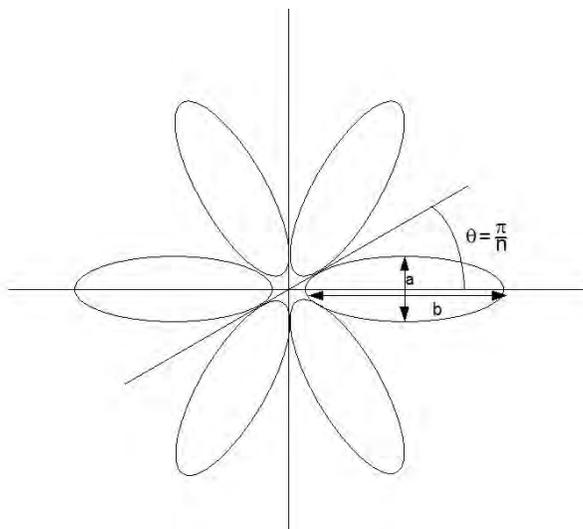


Figura 21. Modelo del canal de AmB. Las elipses representan las moléculas de AmB desde la perspectiva vertical sobre el eje del anillo poliénico desde la región del azúcar al igual que en la figura 20.

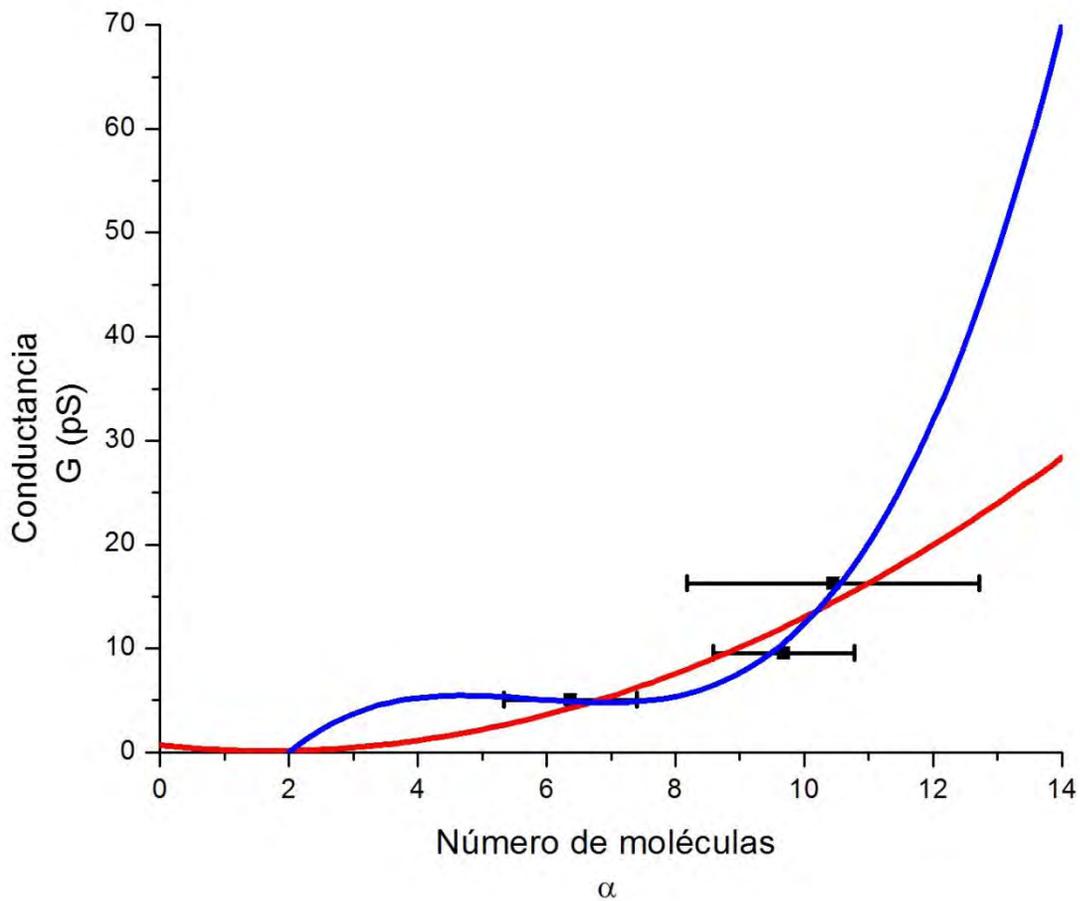


Figura 22. Conductancia en función del número de moléculas de AmB.

Al graficar el número de monómeros de AmB contra la conductancia en pS (Figura 22), el ajuste de los datos experimentales, de acuerdo con la ecuación (3), está descrito por la curva mostrada en color rojo. Este resultado predice que los canales de conductancias mayores (~70 pS) están formados por un número muy elevado de monómeros (~21 moléculas), lo cual resulta muy poco probable. Por otra parte, si los puntos experimentales son ajustados a una función cúbica -la cual se encuentra trazada en azul- el comportamiento es muy distinto. De hecho, el ajuste presenta un acuerdo considerable con el experimento e incluso predice la existencia de un canal de menor conductancia, el cual ha sido observado

pero requiere un análisis más exhaustivo. Para realizar el ajuste fue necesario considerar que la función fuese cero para el caso en el que se tienen 2 monómeros debido a la configuración geométrica utilizada.

Además, existe una meseta entre las molaridades 4 y 8; lo cual podría explicar porque estos canales más comunes aparecen con una conductancia de alrededor de 5 pS y 6 monómeros con gran dispersión y la siguiente conductancia da un salto hasta 9 monómeros. El canal más grande que esta curva predice posee una molaridad de 14, que resulta un valor más realista para las conductancias del orden de 70 pS.

Existe un modelo más reciente dentro del laboratorio (comunicación personal con Armando Antillón) en el cual se le agrega un grado de libertad a las moléculas de AmB que forman el poro, el cual considera la posibilidad de que las elipses giren con eje en su centro. La ventaja que presenta este modelo es que la conductancia posee dependencia cúbica con respecto al número de moléculas, lo cual permite que un mismo número de monómeros puedan formar canales de distintas conductancias (como se muestra en la región cercana al punto de inflexión de la curva cerca de las concentraciones que van de 4 a 8 μM en la figura 22) dependiendo de la posición de las elipses.

V. Conclusiones

Los resultados de este trabajo contribuyen a la construcción de un modelo de la estructura de los canales de Amfotericina B y su modo de acción, así como también a determinar los diferentes tipos de poro y el comportamiento de éstos a distintas concentraciones. Además, presenta una forma de análisis que permite realizar estudios de canal unitario a concentraciones en la que la actividad de la droga es muy alta y existe una elevada ocurrencia de eventos simultáneos.

Sin embargo, este tipo de análisis elimina parte del tiempo total de experimento, lo cual reduce considerablemente la cantidad de eventos totales analizados. Esta situación afecta principalmente a las conductancias mayores, las cuales son menos frecuentes y ocurren a mayor concentración y por lo tanto, la mayor parte del tiempo ocurren superpuestas a conductancias menores.

A partir de los resultados experimentales se determinó la molaridad y se construyó un modelo del poro que forma la AmB en una bicapa lipídica con colesterol, el cual permite conocer más a fondo el mecanismo de acción del medicamento en la membrana celular de los mamíferos. Sin embargo, existen algunos fenómenos que ocurren en presencia de la droga que no están del todo claros y es necesario realizar un mayor número de experimentos para incrementar la cantidad de datos experimentales y así poder interpretar dicha fenomenología.

El estudio de los canales de AmB utilizando la técnica de canal unitario permite obtener información sobre el comportamiento de cada canal, así como de procesos cooperativos y competitivos relacionados con el mecanismo de acción de la droga. En particular, el estudio realizado en esta tesis permite avanzar en la comprensión de los principios biofísicos involucrados en la formación y, principalmente, la estructura de los canales de AmB en bicapas lipídicas; así como también en las consideraciones que deben hacerse para obtener resultados consistentes y mediciones reproducibles.

La realización de este tipo de experimentos requiere de extrema precisión desde el momento de preparar la solución liposomal. Debido a que los volúmenes de stock y las alícuotas son muy pequeños, es necesario medirlos con extremo cuidado.

El aumentar el número de experimentos para cada concentración contribuye a disminuir la magnitud del error experimental, al igual que el agregar una mayor cantidad de puntos entre concentraciones, para hacer así un refinamiento de los datos experimentales. Esto último permitirá además de reducir el error, verificar si existen variaciones en el comportamiento de la actividad entre las concentraciones utilizadas; sin embargo, debido a los volúmenes de stock utilizados para la preparación de la solución liposomal, el error se incrementa en lo referente a las concentraciones. La solución a esto último es trabajar con volúmenes más grandes; sin embargo, esto resulta en experimentos más costosos y en los que se desperdicia mucha materia prima. En conclusión a estas últimas observaciones, la solución a los problemas relacionados con la confiabilidad de los experimentos es tener extremo cuidado en la preparación de los experimentos y aumentar el número de experimentos para cada concentración, así como también considerar el incluir -al menos- un

punto más entre cada concentración de AmB y verificar con espectroscopia las concentraciones.

Los resultados de este estudio permiten construir un modelo molecular para el poro de AmB en el cual las moléculas de AmB se encuentran distribuidas en forma similar al modelo de barril de duela; sin embargo, en este caso las duelas tienen una estructura de cilindro con base elipsoidal con uno de los semiejes de las elipses alineado con el radio del poro. Esta aproximación geométrica permite modificar la excentricidad de la elipse, dependiendo en parte de la orientación de la molécula y en parte, de intercalar esteroides o lípidos de la bicapa entre las moléculas de Amfotericina.

El modelo de las elipses además de ser más coherente con los resultados experimentales ha sido mejorado agregando un grado de libertad a las elipses permitiéndoles rotar con el eje de giro en su centro, para construir un modelo en el cual la conductancia se incrementa como una función cúbica de la luz del poro y aproximarse más al comportamiento descrito por la función graficada en azul en la figura 22.

VI. Perspectivas

El mecanismo de acción de la AmB sigue siendo estudiado aún después de más de 40 años desde su aparición como medicamento antifúngico. En los últimos años, los avances y estudios al respecto son esencialmente estudios *in-vivo* y pruebas farmacológicas, así como el desarrollo de nuevos derivados y de mecanismos de administración de la droga. Sin embargo, todo esto se realiza sin poseer certeza de la estructura y mecanismo de acción de la droga a nivel celular. Los resultados de este estudio proponen un modelo, el cual puede ser mejorado incrementando el número de experimentos y reduciendo el error experimental.

El modelo molecular propuesto en esta tesis funciona para los puntos experimentales estudiados, pero es necesario incrementar el número de experimentos para obtener una mayor cantidad de datos experimentales de conductancias superiores a los 16 pS y así conocer si los canales de estas conductancias se comportan de acuerdo al modelo.

De acuerdo con los resultados de esta tesis es necesario estudiar más a fondo el modelo en el cual los cilindros de base elipsoidal giran sobre su propio eje. Este modelo otorga mucha más libertad al canal para modificar su estructura, según el tipo de poro (es decir la conductancia) y dentro de estas elipses, sería posible considerar el involucramiento de fosfolípidos o esteroides en la formación del canal.

Para obtener resultados más confiables es necesario incrementar el número de datos experimentales para cada concentración de droga; así como también incrementar los tiempos

de registro. El incremento de los tiempos de registro resulta una opción menos factible ya que las bicapas formadas son muy inestables, debido a que el potencial aplicado es muy alto. Una manera de contrarrestar esto último podría ser reduciendo el potencial a 150 mV o 100 mV.

Asimismo, será necesaria la creación de un modelo molecular que sea consistente con este modelo; debido a que el carácter anfifílico de la AmB podría restringir algunas de estas estructuras. Para confirmar experimentalmente el modelo mencionado es necesario poseer más estadística de las conductancias mayores, para poder conocer la molecularidad de estos canales. Esto solo es posible de realizar incrementando los tiempos de experimento y el número de experimentos analizados, para aumentar la ocurrencia de este tipo de canales como eventos unitarios. También es necesario realizar el mismo tipo de análisis en bicapas con ergosterol para confirmar si la estructura que se produce es similar y comprender los mecanismos de selectividad de la droga.

En la actualidad se propone un modelo de poro con estructura toroidal (figura 23) para canales peptídicos, en el cual el lípido se intercala entre las moléculas de péptido, permitiendo que varíe la conductancia, sin necesidad de alterar significativamente el número de moléculas de péptido involucradas en la formación del poro. Este modelo podría funcionar también para los canales de AmB permitiendo una mayor flexibilidad al relacionar las conductancias. Sin embargo, los resultados de esta tesis van más de acuerdo con el modelo de barril. Estos resultados sólo dan información sobre los poros con conductancias menores a 16 pS; y es necesario obtener más datos de conductancias mayores a esta, para comprobar si la estructura del poro es la misma.

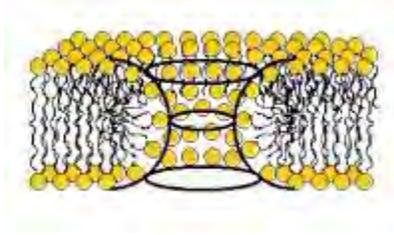


Figura 23. Ejemplo de un poro de estructura toroidal. En el caso de la AmB, las moléculas de la droga estarían intercaladas con los fosfolípidos.

VII. Referencias

Andreoli T. (1973) On the anatomy of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes. *Kidney international* **4**: 337-345.

Archer D.B. (1976) Effects of the lipid composition of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* and phosphotidyl-choline vesicles upon the action of polyene antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta.* **436**: 68-76.

Axon Guide for Electrophysiology and Biophysics, Laboratory Techniques. 1993. Axon Instruments, Inc.

Baginski M., Borowski E. (1997) Distribution of electrostatic potential around amphotericin B and its membrane targets. *Theochem J Mol Struct* **389**: 139-146.

Baginski M., Resat H., McCammon A., (1997) Molecular Properties of Amphotericin B Membrane Channel: A Molecular Dynamics Simulation. *Mol Pharm* **52**: 560-570.

Blunsom P. (2004) Hidden Markov Models.

<http://ww2.cs.mu.oz.au/460/2004/materials/hmm-tutorial.pdf>

Bolard J., Legrand P., Heitz F., Cybulska B., (1991) One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry*. **30**:5707-5715.

Brown D. A., London E. (1997) Structure of detergent-resistant membrane domains: Does phase separation occur in biological membranes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**: 1-7

Brutyan R.A., McPhee P. (1996) On the one-sided action of amphotericin B on lipid bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* **107**: 69-78.

Cass A., Finkelstein A., Krespi V. (1970) The Ion Permeability Induced in Thin Lipid Membranes by the Polyene Antibiotics Nystatin and Amphotericin B. *J Gen Physiol*, 56: 10-124.

Cheng Y.-K., Sheu W.-S., Rosky P. J. (1999) Hydrophobic hydration of amphipathic peptides, *Biophys. J.* **76**: 1734-1743

Cohen B.E. (1986) Concentration- and time-dependence of amphotericin B induced permeability changes across ergosterol-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **857**:117-122.

Cohen B.E. (1998) Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *Int J Pharmaceutics* **162**:95–106

Cohen B.E. (1992) A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition. *Biochim. Biophys. Acta*. **1108**:49-58.

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

Danielli J.F., Davson H. (1935). A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Phys.* **5**(4): 495.

de Kruijff, B., Gerritsen W.J., Oerlemans A., Demel R.A., van Deenen L.L. (1974a) Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. *Biochim Biophys Acta*, **339**: 30-43.

de Kruijff, B., Gerritsen W.J., Oerlemans A., van Dijk P.W., Demel R.A., Van Deenen L.L. (1974b) Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. II. Temperature dependence of the polyene antibiotic-sterol complex formation. *Biochim Biophys Acta*, **339**: 44-56.

de Kruijff, B., Demel R.A. (1974) Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. *Biochim Biophys Acta* **339**: 57-70.

de Kruijff, B., Van Hoogevest R.A. (1974) Effect of Amphotericin B on cholesterol-containing liposomes of egg phosphatidylcholine and didicosenoyl phosphatidylcholine. A refinement of the model for the formation of pores by Amphotericin B in membranes. *Biochim Biophys Acta* **511**: 397-407.

Dias J.G, Cortinhal M.J. (2008) The SKM Algorithm: A K-Means Algorithm for Clustering Sequential Data. H. Geffner et al. (Eds.) pp. 173–182,. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008

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

Gallis H.A., Drew R.H., Pickard W.W. (1990) Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Reviews of Infectious Diseases* **12**(2): 308-329

Ganis, P., Avitabile G., Mechlinski W., Schaffner C.P. (1971) Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative *J Am Chem Soc* **93**(12): 4560-4564.

Gennis R.B. (1989a) *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. Springer Advance Texts in Chemistry, pp 147-148. Springer-Verlag, New York.

Gennis R.B. (1989b) *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. Springer Advance Texts in Chemistry, pp 151-159. Springer-Verlag, New York.

Glaser M., Wanaski S., Buser C.A., Boguslavsky V., Rashidzada W., Morris A., Rebecchi M., Scarlatta S.F., Runnels L.W., Prestwich G.D., Aderem J., Ahn J., McLaughlin S. (1996) Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate (MARCKS) Produces Reversible Inhibition of Phospholipase C by Sequestering Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in Lateral Domains *J Biol Chem* **271**: 26187-26193.

Gold W., Stout H.A., Pagano J.F., Donovan R. (1956) Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiotic Annals*, pp. 579-586.

Gorter, E., Grendel F. (1925) On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *J Exp Med* **41**: 439-443.

Henry-Toulme N., Sarthou P., Seman M., Bolard J. (1989) Membrane effects of the polyene antibiotic amphotericin B and of some of its derivatives on lymphocytes. *Molec. Cell. Biochem.* **91**: 39-44.

Holz R, Finkelstein A. (1970) The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J Gen Physiol.* ;**56**(1): 125-145

Hsu S.F., Burnette R.R. (1993) The effect of amphotericin B on the K-channel activity of MDCK cells. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol.* **1152**: 189-191.

Hsu S.F., Burnette R.R. (1997). Characterization of the effects of Amphotericin B on ion channels in MDCK cells using the Patch-Clamp technique. *Biochim Biophys Acta* **1329**: 26-38.

HsuChen C.C., Feingold D.S. (1973). Polyene antibiotic action on lecithin liposomes: effect of cholesterol and fatty acyl chains. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **51**(4): 972-978

Huang W., Zhang Z., Han X., Tang J., Wang J., Dong S., Wang E. (2002) Ion Channel Behavior of Amphotericin B in Sterol-free and Cholesterol- or Ergosterol-Containing Supported Phosphatidylcholine Bilayer Model Membranes Investigated by Electrochemistry and Spectroscopy. *Biophys J.* **83**: 3245-3255 .

John D. (2001) The Laboratory Computer. A Practical Guide for Physiologists and Neuroscientists (Biological techniques series), Academic Press, London. ISBN 0-12-209551-0

Joly, V., Bolard J., Saint-Julien L., Carbon C., Yeni P. (1992) Influence of phospholipid/amphotericin B ratio and phospholipid type on in vitro renal cell toxicities and fungicidal activities of lipid-associated amphotericin B formulations. *Antimicrob Agents Chemother* **36**(2): 262-266.

Joly V., Saint-Pierre-Chazalet M., Saint-Julien L., Bolard J., Carbon C., Yeni P. (1992) Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and toxicity of amphotericin B against rabbit renal tubular cells in primary culture. *Journal of Infectious Diseases* **165**: 337-343.

Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics* (2nd ed.). Norwich, England: John Innes Foundation. [ISBN 0-7084-0623-8](#).

Kleinberg M. E., Finkelstein A. (1984) Single-Length and Double-Length Channels Formed by Nystatin in Lipid Bilayer Membranes. *Journal of Membrane Biology* **80**: 257-269.

Liao R.S., Rennie R.P., Talbot J.A. (1999) Assessment of the Effect of Amphotericin B on the Vitality of *Candida Albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(5): 1034-1041

McNaught A.D., Wilkinson A. (1997) The "Gold Book". Blackwell Scientific Publications, IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed Oxford . XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8.

Milhaud J., Ponsinet V., Takashi M., Michels B. (2002) Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight into the role of ergosterol". *Biochim Biophys Acta* **1558**: 95-108

Mouritsen O.G., Jørgensen K. (1997) Small-scale lipid-membrane structure: Simulation versus experiment. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 518-527.

Phillips A. J., Sudbery I., Ramsdale M. (2003) Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *PNAS* **100**(24): 14327-14332.

Piknová B., Marsh D., Thompson T.E. (1996) Fluorescence-quenching study of percolation and compartmentalization in two-phase lipid bilayers. *Biophys J* **71**: 892-897.

Qin F., Auerbach A., Sachs F. (1996) Estimating single channel kinetic parameters from idealized patch-clamp data containing missed events. *Biophys J* **70**: 264–280.

Qin F., Auerbach A., Sachs F. (1997). Maximum likelihood estimation of aggregated Markov processes. *Proc. R. Soc. Lond.* **264**: 375–383.

Qin F., Auerbach A., Sachs F. (2000a) A direct optimization approach to hidden Markov modeling for single channel kinetics. *Biophys J* **79**: 1915–1927.

Qin F., Auerbach A., Sachs F. (2000b) Hidden Markov modeling for single channel kinetics with filtering and correlated noise. *Biophys J* **79**: 1928–1944.

Qin F. (2004) Restoration of Single-Channel Currents Using the Segmental k-Means Method Based on Hidden Markov Modeling. *Biophys J.* **86**:1 488–1501.

Ramos H., Valdivieso E., Gamargo M., Dagger F., Cohen B.E. (1996) Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *J. Membr. Biol.* **152**:65-75.

Resat H., Baginski M. (2002) Ion passage pathways and thermodynamics of the amphotericin B membrane channel. *Eur Biophys J Biophys Le* **31**: 294–305.

Robertson J.D. (1959) The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochemical Society Symposia*, **16**: 3-43.

Ruckwardt, T., A. Scott, J. Scott, P. Mikulecky, and S. C. Hartsel. (1998) Lipid and stress dependence of amphotericin B ion selective channels in sterol-free membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1372**:283-288.

Sackmann E. (1995). Structure and Dynamic of Membranes from cells to vesicles. Pp 1-64. Ed. R. Lipowsky y E. Sackmann. Elsevier Science B.V. Amsterdam.

Sakmann B., Neher E. (1995). Single-Channel Recording, 2nd ed. Plenum Press, New York.

Seddon, J.M. (1990) Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochim Biophys Acta* **1031**: 1-69.

Seddon, J.M., Templer R.H. (1995) Structure and Dynamic of Membranes from cells to vesicles. pp 97-160. Ed. R. Lipowsky y E. Sackmann. Elsevier Science B.V. Amsterdam.

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

Singer, S.J., G.L. Nicolson. (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**: 720—731.

Small D.M. (1986) Physical Chemistry of Lipids, de la serie Handbook of Lipids Research 4, pp 43-95. Plenum Press New York.

Smith F.R., Korn E.D. (1968) 7-Dehydrostigmasterol and ergosterol: the major components of an amoeba. *J. Lipid Res.* **9**: 405-408.

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

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

Walev, I., Bhakdi S. (1996) Possible reason for preferential damage to renal tubular epithelial cells evoked by amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* **40**(5):1116-1120.

Whyte, B. S., R. P. Peterson, and S. C. Hartsel. (1989) Amphotericin B and nystatin show different activities on sterol-free vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**: 609-614.

Wolf B.D., Hartsel S.C. (1995) Osmotic sensitizes sterolfree phospholipid bilayers to the action of amphotericin B. *Biochim. Biophys. Acta.* **1238**: 156-162

Zager R.A., Bredl C.R., Schimpf B.A. (1992) *Direct amphotericin B mediated tubular toxicity: assessment of selected cytoprotective agents* *Kidney International* **41**: 1588-1594.

Apéndice 1: El algoritmo SKM

El método de análisis de amplitud media es quizá la forma más simple para dividir registros de canal unitario en los estados de apertura y cerradura. Usando un estimado de la amplitud de corriente derivado de la distribución de amplitudes, se agrega un umbral entre el cero y los niveles de corriente de canal unitario del registro. Los eventos que exceden ese nivel umbral son asignados como el estado de apertura del canal y los que quedan por debajo de este nivel se asignan al estado cerrado. Al recorrer cada punto del registro digital, es posible crear una idealización del registro en la que solo se incluyan los estados abierto y cerrado. Sin embargo, los niveles de ruido en la señal pueden volver esta labor complicada, debido a que pueden aparecer falsas aperturas o cerraduras en la idealización. [Dempster, 2001]

Sin embargo el análisis de amplitud media posee limitaciones; entre las cuales se encuentra el asumir que cada punto de tiempo es independiente de los demás cuando en realidad las transiciones poseen dependencia temporal, lo cual refleja la necesidad de un método de análisis que incluya información de muestras adyacentes.

Una alternativa para el análisis de canal unitario, es utilizar Modelos Ocultos de Markov (HMM). Con este método, la actividad de canales es modelada como un proceso de Markov de primer orden el cual es sumado a ruido blanco gaussiano. El algoritmo utilizado es el *segmental k-means* (SKM).

Cadenas de Markov

Digamos que tenemos n objetos por agrupar. Cada objeto es denotado por i , ($i = 1, 2, \dots, n$) y está caracterizado por un estado x_i . Sean $x = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ una muestra de tamaño n y x_{it} el estado del objeto i en la posición t . Asumamos un tiempo discreto t , ($t = 0, 1, \dots, T_i$). Entonces el vector x_i denota estados consecutivos x_{it} , con $t = 0, 1, \dots, T_i$. La secuencia

$$x_i = (x_{i0}, x_{i1}, \dots, x_{iT_i-1}, x_{iT_i}) \quad (\text{A1})$$

posee dimensión (T_i+1) ; y por lo tanto puede ser muy difícil de calcular en muestras muy grandes. Para simplificar esta secuencia es necesario asumir la propiedad de Markov; según la cual, la ocurrencia de un evento x_t depende únicamente del estado previo x_{t-1} ; es decir, que x_t es condicional en x_{t-1} e independiente de los estados en otros puntos de tiempo. De esta propiedad, la probabilidad de una secuencia x_i es

$$p(x_i) = p(x_{i0}) \prod_{t=1}^{T_i} p(x_{it} | x_{i(t-1)}) \quad (\text{A2})$$

donde $p(x_{i0})$ es la distribución inicial, y $p(x_{it} | x_{i(t-1)})$ es la probabilidad de que el objeto i esté en el estado x_{it} en el tiempo t , dado que se encuentre en el estado $x_{i(t-1)}$ en el tiempo $t-1$.

Una cadena de Markov de primer orden está dada por su distribución inicial

$$I_j = P(x_{i0} = j) \quad (\text{A3})$$

y por sus probabilidades de transición.

$$a_{jk} = P(x_t = k | x_{t-1} = j) \quad (\text{A4})$$

Los parámetros de la cadena de Markov pueden estimarse por

$$\hat{l}_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I(x_{i0} = j) \quad (\text{A5})$$

$$\hat{a}_{jk} = \frac{\sum_{i=1}^n n_{ijk}}{\sum_{r=1}^K \sum_{i=1}^n n_{ijr}} \quad (\text{A6})$$

donde K es el número de estados, $I(x_{i0} = j)$ es la función indicadora al tiempo $t=0$ y n_{ijk} es el número de transiciones desde el estado j al estado k para el objeto [Blunson, 2004; Quin 2000a; Quin 2000b].

El algoritmo *K-Means*

Este proceso permite hacer una partición de una muestra de datos y agruparlos en cierto número S de conjuntos previamente seleccionados de modo que se minimice la suma de cuadrados dentro del conjunto. Este método resuelve los problemas de agrupamiento y es capaz de aprender sin supervisión.

El algoritmo *K-Means* consta de los siguientes pasos:

1. Establecer el número de agrupaciones, S ;
2. Generar de manera aleatoria los centroides iniciales de la agrupación;
3. Asignar cada objeto i a la agrupación s con centroide más cercano;
4. Recalcular las posiciones de los centroides;
5. Si las posiciones de los centroides no varían, terminar; de lo contrario volver al paso 2.

Sin embargo, ese algoritmo aun presenta problemas para el análisis de canal unitario; pues datos con estructura secuencial no son considerados a nivel individual; esto es, que estados consecutivos de la secuencia son tratados como observaciones independientes condicionales a pertenecer a una agrupación. Estas dificultades se superan utilizando el algoritmo *Segmental K-Means*.

El algoritmo *Segmental K-Means*

Sea $z_{is}=1$ si el objeto i pertenece a la agrupación s y 0 si no pertenece a este. Entonces, la probabilidad de transición de cada agrupación son los centroides, y están definidos por:

$$\hat{a}_{sjk} = \frac{\sum_{i=1}^n z_{is} n_{ijk}}{\sum_{r=1}^K \sum_{i=1}^n z_{is} n_{ijr}} \quad (A7)$$

Sea d_{is} la distancia del objeto i a la agrupación prototipo s . Como se pretende medir la divergencia o distancia de cada objeto i a cada centroide s y sabiendo que el centroide de

cada agrupación es definido por el conjunto de probabilidades de transición \hat{a}_{sjk} , la distancia de Kullback-Leibler (KL) es la apropiada para este tipo de centroides.

$$d_{is} = \sum_{j=1}^K \sum_{k=1}^K \hat{a}_{sjk} \ln \frac{\hat{a}_{sjk}}{p_{ijk}} \quad (A8)$$

Donde p_{ijk} es la probabilidad de transición del estado j al estado k para el objeto i definida como:

$$p_{ijk} = \frac{n_{ijk}}{\sum_{k=1}^K n_{ijk}} \quad (A9)$$

El SKM es un algoritmo iterativo el cual comienza a partir de una solución aleatoria. Dado un número de agrupaciones, se genera una asignación aleatoria de objetos los cuales son reasignados en cada iteración de acuerdo a la distancia KL; es decir, cada objeto es asignado al centroide más cercano. Esto se repite hasta encontrarse con un criterio de finalización, el cual puede ser un número máximo de iteraciones o la ausencia de cambio en la asignación de objetos entre dos iteraciones consecutivas.

Debido a que los algoritmos de tipo *k-means* poseen una solución óptima local con soluciones vecinas, es conveniente repetir el proceso iterativo con distintos valores aleatorios iniciales. De un conjunto de R corridas, se selecciona la solución que maximice la clasificación *log-likelihood*:

$$L = \sum_{i=1}^n \sum_{s=1}^S z_{is} \log p_s + \sum_{j=1}^K I(x_{i0} = j) \log l_{sj} + \sum_{j=1}^K \sum_{k=1}^K n_{ijk} \log a_{sjk} \quad (A10)$$

donde l_{sj} es la probabilidad inicial y p_s es la proporción de objetos en la agrupación s y están

definidos cómo:

$$\hat{l}_{sj} = \frac{\sum_{i=1}^n z_{is} I(x_{i0} = j)}{\sum_{i=1}^n z_{is}} \quad (\text{A11})$$

$$\hat{\rho}_s = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n z_{is} \quad (\text{A12})$$

[Dias & Cortinhal, 2008; Quin et al., 1996; Quin, 2004].

Apéndice 2.

Ejemplo del análisis de un experimento a concentración 10 μ M. Se eligió este experimento en particular debido a la gran actividad que presenta, la cual permite apreciar el montaje es las matrices de apertura y cerradura además de reconocer las diferentes conductancias de los canales de AmB.

```
Nombre del archivo 08904009
Concentración 10 uM
dwell 5.0000000000000000
TIEMPO TOTAL DEL EXPERIMENTO 299999.99889099563

% de apertura del canal 1
desde el canal 0 abierto 91.0076 840. 923
desde el canal 2 abierto 3.4670 32. 923
desde el canal 3 abierto 3.6836 34. 923
desde el canal 4 abierto 1.8418 17. 923
% de apertura del canal 2
desde el canal 0 abierto 35.1528 161. 458
desde el canal 1 abierto 43.6681 200. 458
desde el canal 3 abierto 19.8690 91. 458
desde el canal 4 abierto 1.3100 6. 458
% de apertura del canal 3
desde el canal 0 abierto 19.2884 103. 534
desde el canal 1 abierto 15.9176 85. 534
desde el canal 2 abierto 54.8689 293. 534
desde el canal 4 abierto 9.7378 52. 534
desde el canal 6 abierto 0.1873 1. 534
% de apertura del canal 4
desde el canal 0 abierto 37.0229 97. 262
desde el canal 1 abierto 14.5038 38. 262
desde el canal 2 abierto 2.6718 7. 262
desde el canal 3 abierto 43.8931 115. 262
desde el canal 5 abierto 0.3817 1. 262
desde el canal 6 abierto 1.5267 4. 262
% de apertura del canal 5
desde el canal 3 abierto 7.6923 1. 13
desde el canal 4 abierto 76.9231 10. 13
desde el canal 6 abierto 15.3846 2. 13
% de apertura del canal 6
desde el canal 0 abierto 6.6667 1. 15
desde el canal 1 abierto 6.6667 1. 15
desde el canal 3 abierto 13.3333 2. 15
desde el canal 4 abierto 73.3333 11. 15
```

% de cerradura del canal			1		
al canal	0 abierto	100.0000	923.	923	
% de cerradura del canal			2		
al canal	0 abierto	44.3231	203.	458	
al canal	1 abierto	55.6769	255.	458	
% de cerradura del canal			3		
al canal	0 abierto	25.8427	138.	534	
al canal	1 abierto	18.5393	99.	534	
al canal	2 abierto	55.6180	297.	534	
% de cerradura del canal			4		
al canal	0 abierto	36.6412	96.	262	
al canal	1 abierto	14.8855	39.	262	
al canal	2 abierto	2.6718	7.	262	
al canal	3 abierto	45.8015	120.	262	
% de cerradura del canal			5		
al canal	4 abierto	100.0000	13.	13	
% de cerradura del canal			6		
al canal	3 abierto	6.6667	1.	15	
al canal	4 abierto	80.0000	12.	15	
al canal	5 abierto	13.3333	2.	15	

nivel	0 ocp	185837.40	tprom	154.48	Nevs	1203
nivel	1 ocp	72719.50	tprom	78.79	Nevs	923
nivel	2 ocp	35940.90	tprom	78.47	Nevs	458
nivel	3 ocp	30104.00	tprom	56.37	Nevs	534
nivel	4 ocp	18836.90	tprom	71.90	Nevs	262
nivel	5 ocp	191.30	tprom	14.72	Nevs	13
nivel	6 ocp	352.90	tprom	23.53	Nevs	15

ocupación total de canales 158145.50001300010

ocupación %	nivel	0	61.945799859327131
ocupación %	nivel	1	24.239833429606975
ocupación %	nivel	2	11.980300039620678
ocupación %	nivel	3	10.034666700761631
ocupación %	nivel	4	6.2789666952113343
ocupación %	nivel	5	6.37666669023917165E-002
ocupación %	nivel	6	0.11763333376818626

diferencia entre tiempos y aperturas del canal			1		
eventos	tiempos individuales	1180	montaje sin cerrar	923	
ocupación	tiempos individuales	48445.400004999996	montaje sin cerrar	72719.500020000109	
tiempos	tiempos individuales	41.055423733050844	montaje sin cerrar		
78.786023856988194					
diferencia entre tiempos y aperturas del canal			2		
eventos	tiempos individuales	662	montaje sin cerrar	458	
ocupación	tiempos individuales	23081.999978000003	montaje sin cerrar	35940.899985999982	
tiempos	tiempos individuales	34.867069453172213	montaje sin cerrar		
78.473580755458471					
diferencia entre tiempos y aperturas del canal			3		
eventos	tiempos individuales	601	montaje sin cerrar	534	
ocupación	tiempos individuales	23714.900000999998	montaje sin cerrar	30103.999991000004	
tiempos	tiempos individuales	39.459068221297834	montaje sin cerrar		
56.374531818352068					
diferencia entre tiempos y aperturas del canal			4		
eventos	tiempos individuales	282	montaje sin cerrar	262	
ocupación	tiempos individuales	18376.100016000004	montaje sin cerrar	18836.900015999989	
tiempos	tiempos individuales	65.163475234042565	montaje sin cerrar		
71.896564946564837					
diferencia entre tiempos y aperturas del canal			5		
eventos	tiempos individuales	13	montaje sin cerrar	13	
ocupación	tiempos individuales	191.30000000000001	montaje sin cerrar	191.30000000000001	
tiempos	tiempos individuales	14.715384615384616	montaje sin cerrar		
14.715384615384616					

diferencia entre tiempos y aperturas del canal 6
 eventos tiempos individuales 15 montaje sin cerrar 15
 ocupación tiempos individuales 352.89999999999998 montaje sin cerrar 352.89999999999998
 tiempos tiempos individuales 23.526666666666664 montaje sin cerrar

23.526666666666664

matriz de eventos del canal 1

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	722.00	0.00	91.00	15.00	12.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	95.00	0.00	97.00	16.00	3.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	27.00	0.00	9.00	52.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	12.00	0.00	3.00	2.00	21.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de eventos porcentual del canal 1

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	61.19	0.00	7.71	1.27	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	8.05	0.00	8.22	1.36	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	2.29	0.00	0.76	4.41	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	1.02	0.00	0.25	0.17	1.78	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de ocupación del canal 1

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	32157.40	0.00	4544.20	331.20	377.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	4609.80	0.00	2580.60	360.70	294.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	793.00	0.00	223.50	1372.40	21.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	310.40	0.00	47.10	37.20	375.80	0.00	9.50	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de ocupación porcentual del canal 1

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	66.38	0.00	9.38	0.68	0.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	9.52	0.00	5.33	0.74	0.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	1.64	0.00	0.46	2.83	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.64	0.00	0.10	0.08	0.78	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de apertura del canal				1								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	44.54	0.00	49.94	22.08	31.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	48.52	0.00	26.60	22.54	98.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
3	29.37	0.00	24.83	26.39	10.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
4	25.87	0.00	15.70	18.60	17.90	0.00	9.50	0.00	0.00	0.00	0.00	
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

matriz de apertura porcentual del canal				1								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	108.49	0.00	121.63	53.78	76.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	118.19	0.00	64.80	54.91	238.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
3	71.54	0.00	60.49	64.28	26.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
4	63.00	0.00	38.24	45.30	43.59	0.00	23.14	0.00	0.00	0.00	0.00	
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

matriz de eventos del canal				2								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	65.00	22.00	0.00	72.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
1	20.00	163.00	0.00	15.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
3	66.00	23.00	0.00	203.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
4	0.00	3.00	0.00	3.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

matriz de eventos porcentual del canal				2								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	9.82	3.32	0.00	10.88	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
1	3.02	24.62	0.00	2.27	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
3	9.97	3.47	0.00	30.66	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
4	0.00	0.45	0.00	0.45	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

matriz de ocupación del canal											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	3047.80	818.60	0.00	3105.00	85.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	1000.10	4090.10	0.00	1002.80	16.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	3061.80	556.40	0.00	6057.90	75.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	71.90	0.00	83.30	9.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de ocupación porcentual del canal											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	13.20	3.55	0.00	13.45	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	4.33	17.72	0.00	4.34	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	13.26	2.41	0.00	26.25	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.31	0.00	0.36	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de apertura del canal											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	46.89	37.21	0.00	43.13	42.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	50.00	25.09	0.00	66.85	8.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	46.39	24.19	0.00	29.84	37.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	23.97	0.00	27.77	9.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de apertura porcentual del canal											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	134.48	106.72	0.00	123.68	122.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	143.42	71.97	0.00	191.74	22.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	133.05	69.38	0.00	85.59	108.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	68.74	0.00	79.64	26.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de eventos del canal											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	25.00	11.00	55.00	0.00	12.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	8.00	38.00	36.00	0.00	3.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	49.00	40.00	201.00	0.00	3.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	17.00	1.00	1.00	0.00	97.00	1.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de eventos porcentual del canal											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	4.16	1.83	9.15	0.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	1.33	6.32	5.99	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	8.15	6.66	33.44	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	2.83	0.17	0.17	0.00	16.14	0.17	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de ocupación del canal											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	574.90	1042.80	2258.10	0.00	242.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	386.50	2819.60	2779.80	0.00	36.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	1648.50	2368.70	7170.60	0.00	110.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	518.20	16.80	14.30	0.00	1549.10	39.00	69.50	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	69.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de ocupación porcentual del canal											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	2.42	4.40	9.52	0.00	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	1.63	11.89	11.72	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	6.95	9.99	30.24	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	2.19	0.07	0.06	0.00	6.53	0.16	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de apertura del canal				3								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	23.00	94.80	41.06	0.00	20.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
1	48.31	74.20	77.22	0.00	12.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	33.64	59.22	35.67	0.00	36.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
4	30.48	16.80	14.30	0.00	15.97	39.00	34.75	0.00	0.00	0.00	0.00	
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
6	0.00	0.00	69.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

matriz de apertura porcentual del canal				3								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	58.28	240.25	104.05	0.00	51.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
1	122.44	188.04	195.69	0.00	30.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	85.26	150.07	90.41	0.00	92.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
4	77.25	42.58	36.24	0.00	40.47	98.84	88.07	0.00	0.00	0.00	0.00	
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
6	0.00	0.00	175.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

matriz de eventos del canal				4								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	44.00	10.00	1.00	38.00	0.00	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
1	7.00	16.00	2.00	10.00	0.00	0.00	3.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	1.00	2.00	1.00	1.00	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
3	36.00	9.00	2.00	64.00	0.00	3.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
5	4.00	1.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
6	4.00	1.00	1.00	2.00	0.00	3.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

matriz de eventos porcentual del canal				4								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	15.60	3.55	0.35	13.48	0.00	1.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
1	2.48	5.67	0.71	3.55	0.00	0.00	1.06	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	0.35	0.71	0.35	0.35	0.00	0.00	0.71	0.00	0.00	0.00	0.00	
3	12.77	3.19	0.71	22.70	0.00	1.06	0.35	0.00	0.00	0.00	0.00	
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
5	1.42	0.35	0.00	1.42	0.00	0.00	1.42	0.00	0.00	0.00	0.00	
6	1.42	0.35	0.35	0.71	0.00	1.06	0.35	0.00	0.00	0.00	0.00	
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

matriz de ocupación del canal					4						
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	3417.30	1130.90	38.50	2523.10	0.00	597.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	283.70	1069.80	249.10	831.80	0.00	0.00	300.80	0.00	0.00	0.00	0.00
2	20.50	382.60	18.20	62.20	0.00	0.00	152.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	1681.10	704.30	196.70	2522.60	0.00	162.00	35.50	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	445.40	17.10	0.00	231.40	0.00	0.00	133.90	0.00	0.00	0.00	0.00
6	665.90	15.20	9.20	209.20	0.00	200.20	68.10	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de ocupación porcentual del canal					4						
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	18.60	6.15	0.21	13.73	0.00	3.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	1.54	5.82	1.36	4.53	0.00	0.00	1.64	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.11	2.08	0.10	0.34	0.00	0.00	0.83	0.00	0.00	0.00	0.00
3	9.15	3.83	1.07	13.73	0.00	0.88	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	2.42	0.09	0.00	1.26	0.00	0.00	0.73	0.00	0.00	0.00	0.00
6	3.62	0.08	0.05	1.14	0.00	1.09	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de apertura del canal					4						
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	77.67	113.09	38.50	66.40	0.00	149.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	40.53	66.86	124.55	83.18	0.00	0.00	100.27	0.00	0.00	0.00	0.00
2	20.50	191.30	18.20	62.20	0.00	0.00	76.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	46.70	78.26	98.35	39.42	0.00	54.00	35.50	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	111.35	17.10	0.00	57.85	0.00	0.00	33.48	0.00	0.00	0.00	0.00
6	166.48	15.20	9.20	104.60	0.00	66.73	68.10	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de apertura porcentual del canal					4						
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	119.19	173.55	59.08	101.89	0.00	229.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	62.20	102.61	191.13	127.65	0.00	0.00	153.87	0.00	0.00	0.00	0.00
2	31.46	293.57	27.93	95.45	0.00	0.00	116.63	0.00	0.00	0.00	0.00
3	71.66	120.09	150.93	60.49	0.00	82.87	54.48	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	170.88	26.24	0.00	88.78	0.00	0.00	51.37	0.00	0.00	0.00	0.00
6	255.47	23.33	14.12	160.52	0.00	102.41	104.51	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de ocupación del canal											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0.00	0.00	0.00	0.00	18.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	16.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	43.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	65.90	136.40	72.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de ocupación porcentual del canal											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0.00	0.00	0.00	0.00	5.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	4.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	12.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	18.67	38.65	20.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de apertura del canal											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0.00	0.00	0.00	0.00	18.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	16.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	21.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	65.90	17.05	36.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

matriz de apertura porcentual del canal											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0.00	0.00	0.00	0.00	77.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	69.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	92.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	280.11	72.47	154.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00