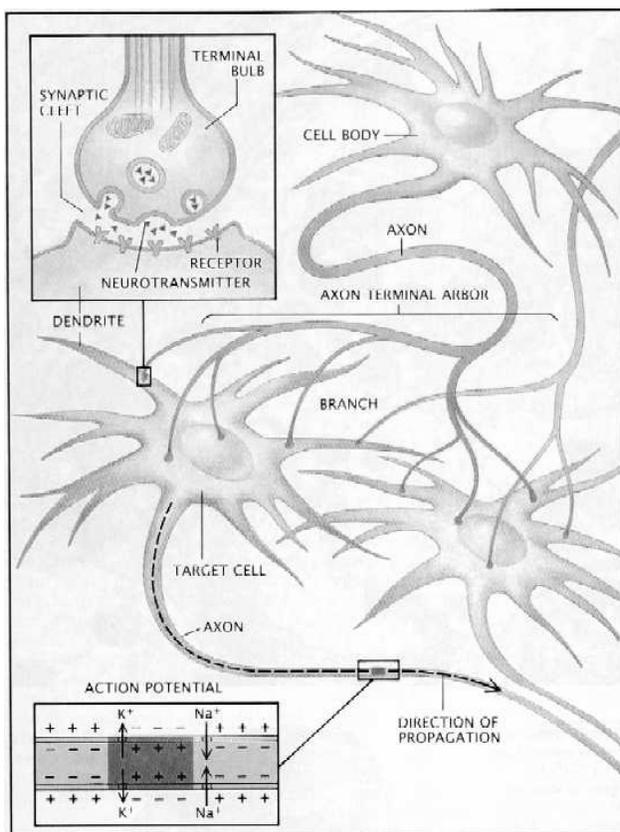


CURSO FISILOGIA INTEGRADA

Material de apoyo clases CANALES Y EXCITABILIDAD CELULAR



- *Canales iónicos*
- *Potencial de membrana*
- *Propiedades eléctricas de las membranas*

- *Prof. Gloria Riquelme*

ENFERMERIA - NUTRICION Y OBSTETRICIA

2007

EQUILIBRIO ELECTROQUIMICO Y DIFUSION A TRAVÉS DE CANALES

CONTENIDO

- I. INTRODUCCION
- II. IONES EN MOVIMIENTO
- III. POTENCIAL DE MEMBRANA
- IV. CANALES IÓNICOS
- V. CIRCUITO EQUIVALENTE DE LA MEMBRANA

I. INTRODUCCION

En las células, las señales eléctricas son llevadas por corrientes iónicas transmembranas correspondientes a flujos de iones positivos y negativos (principalmente K^+ , Na^+ , Cl^- y Ca^{+2}) que "viajan" al interior de la célula, entre células y finalmente, entre las diferentes partes del cuerpo. Estos flujos de cargas originan cambios en el *potencial de membrana* de las células y en muchas de ellas, estos cambios implican la primera señal para que un mensaje inicie la cadena de transmisión hasta llegar al objetivo correspondiente. El movimiento de los iones está definido por leyes físicas que revisaremos en este capítulo.

Los iones no están uniformemente distribuidos en los sistemas biológicos. En general, las concentraciones iónicas en cada compartimiento son muy diferentes entre sí. Por ejemplo, en la mayoría de las células, el ión K^+ está más concentrado en el citoplasma que en el espacio extracelular. La diferencia en la distribución iónica genera gradientes de concentración a través de la membrana dando origen a la *diferencia de potencial químico*. En ausencia de un potencial eléctrico, este gradiente de concentración determinará la dirección del flujo. Los principios termodinámicos predicen que en estas condiciones el flujo iónico ocurrirá desde la región de mayor concentración a la menor concentración, según el fenómeno llamado *difusión*.

Los iones tienen carga eléctrica, de modo que su movimiento estará influido no solamente por el gradiente de concentración, sino también por los campos eléctricos generados por diferencias de cargas de un lado a otro de la membrana. Como se verá más adelante, la mayoría de las membranas son permeables en forma *selectiva*, es decir, dejan pasar algunas especies iónicas y otras no. Esto produce separación y asimetría de las cargas generando un campo eléctrico a través de la membrana que a su vez, tendrá una profunda influencia en el movimiento de los iones. La diferencia de *potencial electroquímico* considera tanto el efecto de la diferencia de concentración, como el potencial eléctrico en el movimiento de los iones a través de la membrana. Durante este capítulo veremos los principios básicos del movimiento de los iones dirigido por el gradiente de potencial electroquímico.

Como se sabe, las membranas biológicas están compuestas por una doble capa de lípidos que es pobremente permeable a moléculas polares grandes (azúcares, aminoácidos, etc.) y a partículas cargadas. Tales moléculas pueden atravesar la membrana solamente a través de moléculas especiales que son proteínas integrales de membrana y que se conocen genéricamente como moléculas transportadoras. Un sub-grupo de estas proteínas transportadoras corresponde a aquellas llamadas *canales iónicos*, los cuales permiten un flujo "muy rápido" (un millón de iones por seg.). Estos flujos de carga dan origen a corrientes iónicas involucradas en múltiples procesos biológicos y que pueden ser registradas y medidas por métodos electrofisiológicos.

Los canales iónicos están formados por varias sub-unidades o polipéptidos que generan un "poro" central. Estas sub-unidades experimentan cambios conformacionales que determinan que el canal permita el paso de iones (*canal abierto*) o no lo permita (*canal cerrado*). Los canales varían según la conducta de su "*compuerta*" de *apertura* y *cierre*, siendo regulados por neurotransmisores, mensajeros citoplasmáticos o cambios de potencial de membranas entre otros. La elección del ion permeante o *selectividad* del canal le dará otra característica identificadora, así como también su eficiencia de conducción dada por el concepto de *conductancia*. La conductancia es la relación entre la corriente (flujos de carga por unidad de tiempo) y la diferencia de potencial a través de las membranas.

Históricamente, el estudio de los canales iónicos es relativamente reciente antes de mediado de la década del setenta, se midieron y caracterizaron corrientes totales, correspondientes a una población de canales individuales. A principio de la década del 80 Neher y Sakmann (un físico y un médico) publican una metodología que permite *medir el flujo de cargas que esta pasando por "una molécula"* (patch-clamp). Esta técnica revolucionó la electrofisiología y permitió un gran avance en la caracterización de las proteínas que subyacen las corrientes iónicas. Más recientemente, la biología molecular ha ayudado al entendimiento de la estructura y de su correlación con la función de estas moléculas transportadoras.

En este capítulo se estudiarán las características estructurales de los canales y sus propiedades biofísicas elementales.

II. IONES EN MOVIMIENTO

II.1 Carga Eléctrica

La existencia de cargas eléctricas en la naturaleza es algo cotidiano y conocido por Uds., también lo es el hecho que tales cargas están asociados a partículas sub-atómicas unitarias que pueden dar el carácter positivo o negativo. De sus conocimientos de electricidad recordarán que las cargas interactúan con fuerzas de repulsión o atracción entre sí y que la magnitud de tales fuerzas es directamente proporcional al producto de las cargas e inversamente a la distancia que las separa, al cuadrado. Se requiere una cuota de energía para juntarlas o separarlas según el caso lo cual justificaría que la materia sea esencialmente eléctricamente neutra, es decir posea igual número de cargas positivas que negativas.

Sin embargo, es posible acumular carga eléctrica negativa o positiva en alguna región, por separación de los electrones de sus átomo. Esta cantidad de *carga eléctrica* Q se mide en Coulomb (C).

Ejemplo 1:

La carga de un mol de iones Na⁺ se puede calcular con las siguientes consideraciones:

1. Cada átomo de Na⁺ tienen una carga elemental equivalente a la carga del electrón
 $e = 1.602 \times 10^{-19} \text{ C}$.
2. Un mol de iones monovalentes corresponde al número de Avogadro de iones
 $N_0 = 6.022 \times 10^{23} \text{ átomos}$
3. De 1 y 2 se deduce que la carga de un mol de iones es:

$$N_0 \times e = 96500 \text{ C/mol, este valor se denomina Constante de Faraday (F).}$$

$$F = 96500 \text{ C/mol}$$

La constante de Faraday (F) corresponde a la carga eléctrica por mol equivalente de un ion monovalente.

En general la carga de un mol de iones será:

$$Q = zF$$

Donde z es la valencia (1)

II.2 Flujo de carga

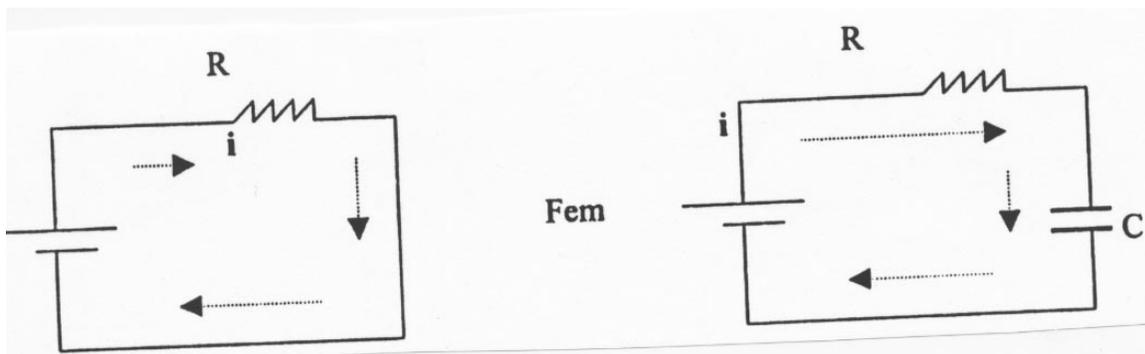
El movimiento de cargas de un punto a otro genera una *corriente eléctrica* que es el número de cargas que se mueven por unidad de Tiempo [$i = dQ/dt$ (Amperes)]. La corriente fluye de un punto a otro porque hay una *diferencia de potencial* entre los puntos (recuerde que el potencial eléctrico V se mide en Volt [V]). El potencial lo puede generar una pila

siendo la fuente de energía para que el movimiento de cargas ocurra en un circuito en particular; la energía empleada, será equivalente al trabajo realizado para trasladar la carga entre dos puntos con diferente potencial.

Suponiendo que se lleva una carga Q desde un punto de potencial cero a un punto de potencial V , la energía será:

$$E_{\text{elec}} = Q V \quad (2)$$

Recuerde un circuito sencillo como el de la figura: un conductor con resistencia R (ohm) y una fuente de energía, por ejemplo una batería con una diferencia de potencia V entre sus bornes. La corriente eléctrica i en es e circuito $i = V/ R$ (ley de Ohm). El recíproco de la resistencia R es la conductancia g ($g = 1/R$), su unidad es Siemens [S] y corresponde a (1/ohm) y, por lo tanto, la ley de ohm también se puede expresar como $i = gV$.



Otro elemento de un circuito es un *Condensador* de capacidad C . El más simple de ellos es el condensador plano, que consiste en dos placas de área A , separados una distancia d y con un medio aislante entre ellas de constante eléctrica (ϵ). Las características geométricas determinan su capacidad $C = \epsilon A/d$. La unidad de capacidad es farad (F). Si se aplica una diferencia de potencial a través del condensador, la cantidad de carga Q inducida en las placas es directamente proporcional al potencial aplicado (V) y la capacidad del condensador (C).

$$Q = C V \quad (3)$$

II.3 Iones en solución

Los iones en solución están en constante movimiento debido a la agitación térmica y pueden *difundir* libremente de una región a otra en función de dos condiciones: *la gradiente de concentración* y el campo eléctrico generado por la *diferencia de potencial*. Por lo tanto, el movimiento (electrodifusión) tendrá su fuente de energía en una *gradiente electroquímica (potencial electroquímico) ($D\bar{\mu}$)*.

Recordemos que la diferencia de potencial químico entre dos zonas de concentraciones C_1 y C_2 ($C_1 > C_2$) es:

$$\Delta\mu = RT \ln C_2 / C_1 \quad \text{energía química}$$

La energía necesaria para llevar una carga Q desde el punto de potencial V_1 a uno de potencial V_2 es:

$$E_{\text{elec}} = \Delta V \quad (\text{con } Q = zF) \quad \text{energía eléctrica}$$

Luego la diferencia de potencial electroquímico $\Delta\bar{\mu} = \bar{\mu}_2 - \bar{\mu}_1$ es:

$$\Delta\bar{\mu} = RT \ln C_2 / C_1 + zF \Delta V \quad (4)$$

II.4. Flujo de iones a través de la membrana biológica.

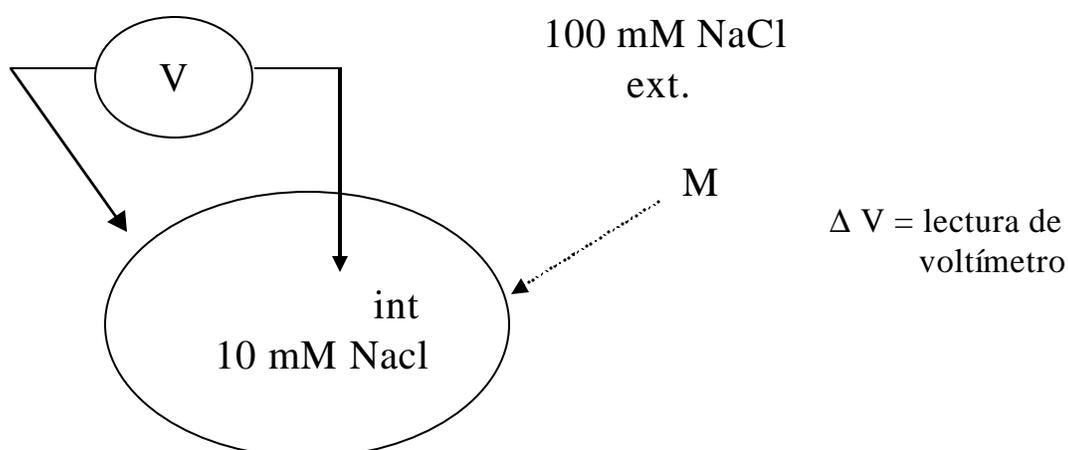
Modifiquemos la situación anterior, introduciendo la presencia de una *barrera* al proceso de electrodifusión. Esto es *la membrana biológica*, que separa dos compartimientos, cuya matriz es una bicapa lipídica prácticamente impermeable al paso de moléculas cargadas. La solución de la naturaleza ha sido la incorporación de un tipo de proteínas integrales especializadas que forman una *vía* de paso para los iones. Un tipo de estas proteínas son los llamados *canales iónicos* los cuales permitirán el cruce muy rápido de los iones ($10^6 - 10^7$ iones/seg) en solución de un lado a otro de la membrana. La dirección del flujo estará determinada por la diferencia de potencial electroquímico, pero la eficiencia es función además de otros factores, entre ellos: naturaleza del ión y la selectividad del canal, el número de canales por unidad de área, su conductancia individual y el tiempo que permanecen abiertos en determinadas condiciones.

III. POTENCIAL DE MEMBRANA

En todos los sistemas biológicos los iones están asimétricamente distribuidos generando un *gradiente* a través de las membranas celulares. Cuando los canales iónicos están abiertos, los iones se mueven en la dirección del gradiente electroquímico. La densidad, selectividad, modo de regulación y la cinética de los canales determinarán la *permeabilidad relativa* de la membrana y en consecuencia sus propiedades eléctricas y las señales que generan.

La diferencia de potencial eléctrico entre el lado interno y externo (intra y extracelular respectivamente) se conoce como *potencial de membrana* ($V_m = V_i - V_e$) y depende de la permeabilidad relativa de la membrana a los iones específicos y del gradiente de concentración transmembrana para esos iones.

Problema 1. Una membrana M separa el interior y exterior de una célula con las concentraciones iónicas que se señalan en la figura. Además se cuenta con un voltímetro que permitirá medir la diferencia de potencial $\Delta V = V_{in} - V_{ex}$ en las siguientes situaciones:



- I) M es impermeable al paso de cualquier ión: $\Delta V = 0$ ¿Por qué?
- II) M es sólo permeable al paso de agua: $\Delta V = 0$ ¿Qué sucede en este caso?
- III) M es permeable de igual manera a ambos iones: $\Delta V = 0$ ¿Por qué?
- IV) M es permeable sólo a Na^+ : $\Delta V = V_{\text{eqNa}^+}$ Donde V_{eqNa^+} es el

¿Qué significa potencial de equilibrio?

La respuesta la dio Nernst en 1888 mediante una ecuación conocida como "Ecuación de Nernst" que a continuación deduciremos.

El movimiento del Na⁺ ocurre en la dirección de la gradiente de potencial electroquímico para el Na⁺, es decir desde el exterior al interior $\Delta\bar{\mu} < 0$

$$\Delta\bar{\mu} = \bar{\mu}_{in} - \bar{\mu}_{ex} = RT \ln \frac{Na_{in}}{Na_{ex}} + zF (V_i - V_{ex}) \quad (4)$$

El equilibrio se alcanza cuando $\Delta\bar{\mu} = 0 \Rightarrow$ flujo neto de iones = 0

$$RT \ln \frac{Na_{in}}{Na_{ex}} + zF (V_i - V_{ex}) = 0 \quad (5)$$

$$V_{in} - V_{ex} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{Na_{ext}}{Na_i} \quad (6)$$

Potencial de equilibrio para Na⁺ : $V_{eqNa} = V_{in} - V_{ex}$

Ecuación de Nernst

$$V_{eqNa^+} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{Na_{ext}}{Na_{in}} \quad (7)$$

R: 1.98 cal /° K mol = 8.315 joule/° K mol

T= Temperatura absoluta (°K)

F=96500 C/mol

Z =1 para el Na⁺

Si suponemos que la temperatura es 19° C (292 °K) y las concentraciones de Na⁺, 100mM (exterior) y 10mM (interior) el potencial de equilibrio será $V_{eqNa} = 57.9$ mV

¿Cuántos iones se movilizaron a través de la membrana para establecer este potencial?

La respuesta depende de la capacidad de la membrana. Cuanto mayor sea este valor mayor será el número de iones movilizadas para establecer este potencial.

La capacidad de la membrana biológica ha sido estimada en 1 μF/cm² y la carga por cm² está dada por:

$$Q = C V$$

$$Q = 1 \mu F/cm^2 \cdot 57,9 \times 10^{-3} V = 57,9 \times 10^{-9} C/cm^2$$

Recordando que $Q = zF$ y F significa que un mol de iones Na⁺ corresponde a 96500 C, se puede calcular el número de moles y de iones movilizadas.

$$\# \text{ de moles} = 57,9 \times \frac{10^{-9} \text{ C/cm}^2}{96500} = 6 \times 10^{-13} \text{ moles /cm}^2$$

$$\# \text{ de iones} = \# \text{ de moles} \times N_A = 36 \times 10^{10} \text{ iones /cm}^2$$

El número de moles resultantes representa cantidades muy pequeñas en términos químicos.

¿Afectan la concentraciones iniciales en nuestro sistema?

La respuesta debe considerar el número real de moles que atraviesan la célula.

Si la "célula" de nuestro ejemplo tienen un radio de $r = 10 \mu\text{m}$, es área de esa esfera será $A = 4 \pi r^2 = 12,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$.

Por lo tanto, el número total movilizados será $= \frac{\# \text{ moles}}{\text{cm}^2} \times \text{área de la célula}$

$$\# \text{ moles movilizados} = 6 \times 10^{-13} \text{ moles /cm}^2 \times 12,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 = 75,6 \times 10^{-19} \text{ moles}$$

¿Es significativa esta cantidad como pérdida o incremento de las concentraciones iniciales interior y exterior de Na^+ ?

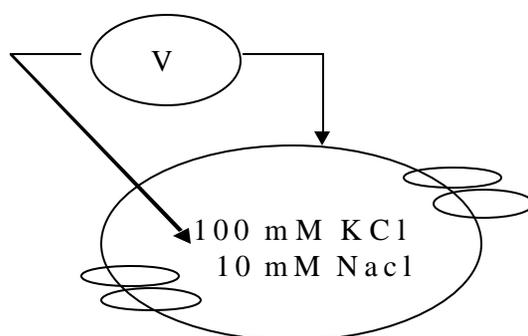
Nota: Si usted quiere calcular el cambio de concentración interna de Na^+ debe considerar el volumen de la célula que en este caso es $4,2 \times 10^{-9} \text{ cm}^3$.

V) Suponga que M es sólo permeable al Cl, es decir, contienen un canal sólo permeable al Cl. En este caso el potencial de membrana será igual al potencial de equilibrio del Cl.

$$\Delta V = V_{\text{eqCl}}$$

Con igual razonamiento que el caso anterior. ¿Puede obtener el valor numérico del potencial de equilibrio para el Cl en las condiciones dadas?

VI) Suponga que M es una membrana un poco más compleja que tienen canales selectivos a K^+ y a Na^+ : $\Delta V = ?$



¿Qué consecuencia puede tener el potencial de membrana?

100 mM NaCl
10 mM KCl

La dirección de la gradiente de potencial electroquímico implica una entrada de Na^+ y una salida de K^+ . En algún momento se llegará a la situación en que el flujo neto será cero (estado estacionario) es decir, los flujos de entrada serán igual a los de salida:

Flujo neto = 0 $\Rightarrow I_{\text{Na}^+} + I_{\text{K}^+} = 0$ estado estacionario (ninguno de los iones están en equilibrio)

I_{Na^+} = corriente de iones Na^+ y I_{K^+} = corriente de iones K^+

Recordando que $I = GV$ se puede obtener I_{Na^+} e I_{K^+} con $V = V_m - V_{\text{eq}}$

Reemplazando, se tiene: $G_{\text{Na}} (V_m - V_{\text{eqNa}}) + G_{\text{K}} (V_m - V_{\text{eqK}}) = 0$

Reagrupando y despejando V_m se tienen: $V_m = \frac{G_{\text{Na}}}{G_{\text{Na}} + G_{\text{K}}} V_{\text{eqNa}} + \frac{G_{\text{K}}}{G_{\text{Na}} + G_{\text{K}}} V_{\text{eqK}}$

$$G_{Na^+} G_K \quad G_{Na^+} G_K$$

De la expresión anterior se puede concluir que el potencial de membrana V_m en estado estacionario depende de:

- las condiciones relativas de la célula para Na^+ y K^+
- los potenciales de equilibrio para cada ión determinado por las gradientes de concentración para el K^+ , y el Na^+ respectivamente.

Piense las siguientes situaciones

- Si $G_{Na^+} \gg G_{K^+} \Rightarrow V_m \rightarrow V_{eqNa}$
- Si $G_{K^+} \gg G_{Na^+} \Rightarrow V_m \rightarrow V_{eqK^+}$
- Si $G_{K^+} = G_{Na^+} \Rightarrow V_m \rightarrow$ tiende a un valor equidistante entre los dos potenciales de equilibrio
- ¿Qué sucede si la célula es permeable a K^+ , Na^+ y Cl^- ? ¿Puede llegar a una relación, en función de las conductancias, como la deducida anteriormente?

$$\text{Con } I_k + I_{Na} + I_{Cl} = 0$$

$$V_m = \frac{G_{Na}}{G_T} V_{eqNa} + \frac{G_K}{G_T} V_{eqK} + \frac{G_{Cl^-}}{G_T} V_{eqCl^-}$$

$$\text{Con } G_T = G_{Na} + G_K + G_{Cl^-}$$

Esta ecuación permite determinar el potencial de membrana en función de las conductancias y los potenciales de equilibrio.

Existe, además, una relación para obtener el potencial de membrana en función de las permeabilidades, que se llama Ecuación de Goldman - Hodgkins y Katz.

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K K_{ex} + P_{Na} N_{aex} + P_{Cl^-} Cl_{in}}{P_K K_{in} + P_{Na} N_{ain} + P_{Cl^-} Cl_{ex}}$$

Donde P_K , P_{Na} , P_{Cl^-} son las permeabilidades al K^+ , Na^+ y Cl^- respectivamente.

Problema 2.

Las siguientes concentraciones (en mM) corresponden a las concentraciones intracelulares y extracelulares de las células (nerviosas) gigantes de "Aplisia" un caracol de mar:

$$\begin{array}{lll} K_{in}^+ = 168 & Na_{in} = 50 & Cl_{in} = 41 \\ K_{ex}^+ = 6 & Na_{ex} = 337 & Cl_{ex} = 340 \end{array}$$

Las conductancias en reposo medidas: Las razones de permeabilidad en reposo son:

$$\begin{array}{ll} G_{K^+} = 0,57 \times 10^{-6} \text{ S} & P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,019 : 0,381 \\ G_{Na^+} = 0,16 \times 10^{-6} \text{ S} & \\ G_{Cl^-} = 0,32 \times 10^{-6} \text{ S} & \end{array}$$

Calcular el potencial de membrana (V_m) por utilizando las expresiones de las ecuaciones 8 y 9.

IV CANALES IONICOS

IV.1.1 "Algo" de historia

La idea de canal es bastante más antigua que la etapa en que fue posible examinar sus características como entidades individuales. A principios de este siglo, los fisiólogos plantearon la posibilidad de la existencia de "canales" llenos de agua por donde "nadarán" los iones que tenían que "transitar" entre el medio intra y extracelular. Este modelo simple fue descartado cuando no pudo explicar la selectividad de estos procesos. Pasarían varias décadas hasta su resurgimiento, con nuevas evidencias experimentales y con un modelo mucho más complejo para su estructura y función.

A. Hodgkin y A. Huxley (1952) en estudios electrofisiológicos, hoy clásicos, registraron corrientes macroscópicas implicadas en la transmisión del impulso nervioso y las describieron mediante un modelo matemático. Estos investigadores propusieron que las corrientes iónicas ocurren "en sitios particulares" de la membrana, tales "sitios" llegarían más tarde a ser los canales de sodio y potasio involucrados en el potencial de acción. (ambos obtuvieron el Premio Nobel en 1963).

Experimentos posteriores realizados por B. Katz y R. Miledi (década del 70) de medición de corrientes activadas por acetilcolina en la placa neuromuscular (utilizando análisis de ruido para su cuantificación) llegaron a la conclusión que tales corrientes son la sumatoria de "paquetes" elementales de corriente que estarían pasando por "sitios" especializados de la membrana (canales). Por lo tanto, se dedujo que las corrientes iónicas eran la consecuencia del flujo a través de cientos o miles de esos "canales" funcionando.

En la década del 60 se descubrieron algunos bloqueadores específicos de las corrientes cuya acción es directa y específica para determinados canales. Por ejemplo, la tetrodotoxina (TTX), veneno del pez globo bloquea específicamente los canales de Na^+ dependientes de potencial. La especificidad de este bloqueador significó un aporte fundamental, ya que demostró que las corrientes de Na^+ en el axón pasan por entidades moleculares separadas de aquellas que conducen K^+ , dado que frente a la aplicación de la toxina estas últimas permanecieron invariables.

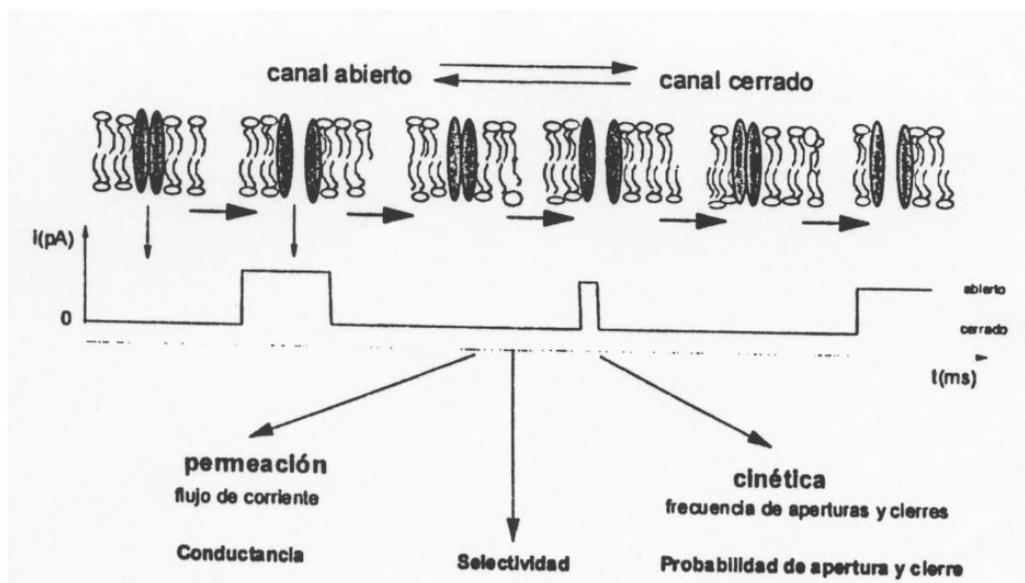
Paralelamente a los estudios electrofisiológicos en axones gigantes se desarrollaron metodologías para estudiar las características de la doble capa de lípidos que es la matriz de la membrana biológica. En esa época se pudo determinar las propiedades eléctricas de las bicapas artificiales: capacidad (C) y resistencia (R), esta última resultó ser muy alta lo que significaba que era muy impermeable al paso de los iones. Dos biofísicos (S. Hladky y D. Haydon) observaron que esta característica era modificada al agregar una pequeña cantidad de un antibiótico llamado gramicidina, pues la bicapa artificial adquiría la propiedad de "conducir" iones en una forma cuyo flujo era "saltatorio". La proteína agregada le permitía a un no conductor tener vías de paso al flujo de iones que podían ser detectadas como corrientes del orden de los pA.

La pregunta era si las membranas reales tenían proteínas que le diera similares características en la conducción iónica. La respuesta tuvo que esperar algunos años hasta que los avances de la bioquímica y de las técnicas de registros electrofisiológicos permitieran tener acceso a "canales de verdad". Hubo importantes contribuciones purificando membranas celulares por métodos bioquímicos e incorporándolas a bicapas planas. Numerosos canales se caracterizaron y se siguen caracterizando por este método llamado de Reconstitución de canales iónicos en bicapas artificiales. (Ver figura)

RECONSTITUCIÓN EN BICAPAS PLANAS: registro de

IV.2. Propiedades de los canales iónicos

CANALES IONICOS: Características funcionales



Se puede registrar en el tiempo y medir el flujo de corriente que pasa por una canal individual. El registro de tal actividad muestra (a lo menos) que el canal oscila entre dos niveles de conducción: *estado cerrado* (no hay flujo de corriente, estado conformacional no conductor) y *estado abierto*. Estos "saltos discretos" de corriente tienen una magnitud del orden de los pA (10^{-12} Amperes) y duraciones variables de tiempo del orden de 10^{-3} seg.

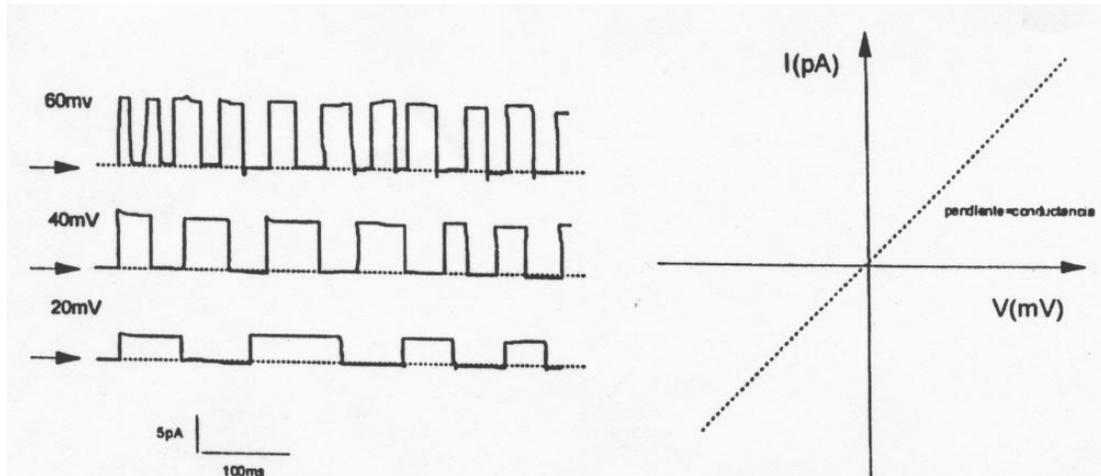
Esta respuesta a un estímulo en saltos discretos de corriente, corresponde a cambios conformacionales de la proteína tales que el "poro" conductor se abra y cierre con una *amplitud* (conductancia) y *frecuencia* que le será característica (cinética). Esta apertura y cierre en el tiempo en presencia del estímulo lo diferencia de un conductor físico tradicional, como por ejemplo un alambre de cobre, el cual conducirá todo el tiempo que tenga una diferencia de potencial aplicada entre sus extremos. Sin embargo, estas proteínas conductoras tienen un comportamiento similar a un conductor eléctrico inorgánico cada vez que se abre, de modo que podemos definir su capacidad de conducir mediante su "*conductancia*" al igual que un conductor clásico. Además tiene otras características que le darán la especificidad requerida para las funciones en las cuales están involucrados, estas son: *selectividad* y la capacidad de *responder a señales específicas*. La primera tienen que ver con la elección del ión a conducir y la segunda con la modulación de la cinética del canal, es decir, con las aperturas y cierres del mismo en el tiempo. Veremos estas características con algún detalle.

IV.2.1. Los canales tienen la capacidad de conducir: Conductancia

¿Cómo podemos determinar la conductancia de un canal? Utilizando su "recordada" ley de ohm: $i = gV$

Supondremos un experimento donde se está registrando la actividad de un canal en soluciones simétricas, es decir, tienen igual concentración iónica a ambos lados de la membrana. En respuesta a estímulos que consisten en diferentes potenciales se obtienen registros como los de la figura. La medición de la amplitud de corriente respectiva para cada potencial permitirá obtener un gráfico de corriente *versus* V:

CANALES IONICOS: curva corriente - potencial

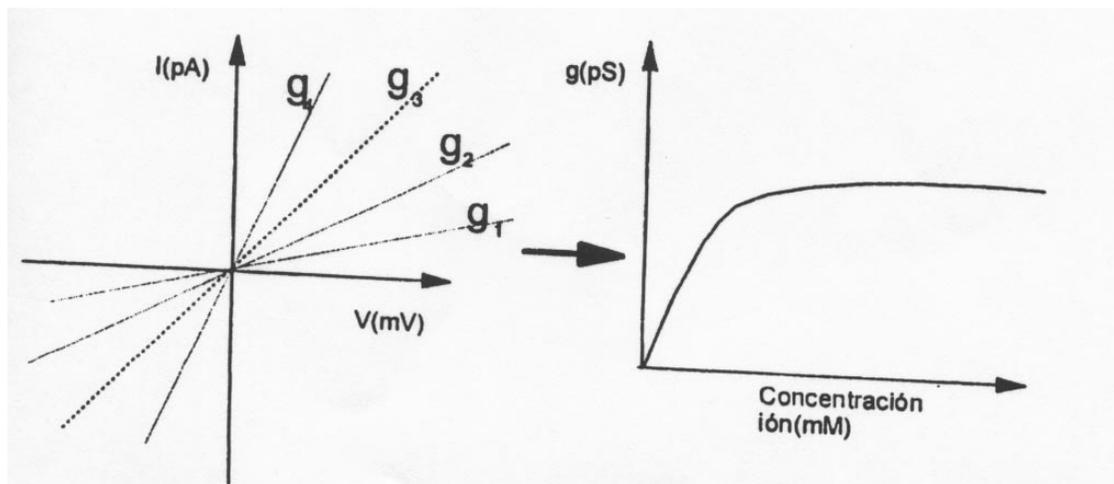


En este caso se obtuvo una línea recta, la pendiente corresponde a la conductancia del canal y por ser constante se dice que se está en presencia de un canal ohmico. Hay canales que no se comportan de manera lineal conduciendo de manera preferencial hacia un lado más que a otro, esto se llama Rectificadores y su conductancia es variable en función del potencial.

Recuerde que la "fuerza" que dirige el flujo de iones es la diferencia de potencial electroquímico ($\Delta\bar{\mu}$) y que este depende de la gradiente de concentración (ΔC) y de la diferencia de potencial (ΔV). ¿En función de esto puede explicar por qué la recta pasa por cero? ¿Qué sucedería si las soluciones *no* fueran simétricas?

La conductancia es función de la concentración del ión permeante: Volvamos a la curva corriente *versus* potencial en condiciones simétricas (Ej. 100 mM KCl) para un canal ohmico que deja pasar sólo K^+ ; la conductancia es independiente del potencial, pero ¿cómo será la relación con la concentración?

CANALES IONICOS: conductancia versus concentración del ión permeante



Reflexione sobre las siguientes situaciones:

¿Cómo será su gráfico si la concentración a ambos lados disminuye a 50, 10, 5, 1 mM ó aumenta a 200, 300, 500 mM. Superponga en su gráfico las posibles respuestas.

¿Está de acuerdo que fueran líneas rectas con diferentes pendientes? ¿Esta familia de rectas aumenta hasta que la pendiente sea infinitamente grande? ¿Podría "saturarse" el canal llegando a una situación que aunque aumente la concentración la pendiente permanezca invariable? ¿Por qué?

El gráfico de las diferentes pendientes (conductancias) versus concentración genera una curva de saturación similar a la obtenida en el caso de los transportadores, solamente que en este caso se trata de la *saturación de una molécula*.

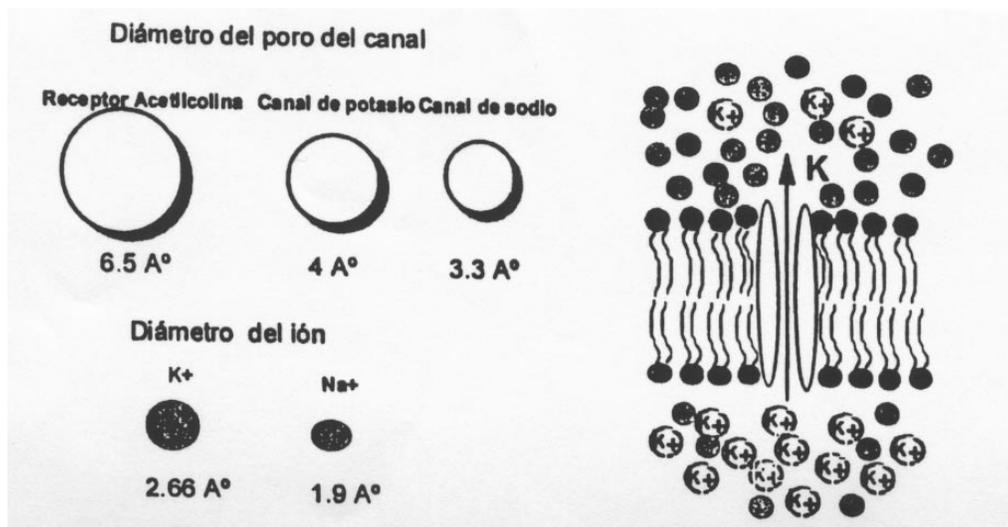
La relación de conductancia versus concentración se puede ajustar por la Ecuación de Michaelis-Mentem, donde K_m será la concentración a la cual se alcanza la mitad de la conductancia máxima. En el caso de los canales la K_m tiene valores bastante altos (~ 100 mM) a diferencia de los transportadores, indicando que la unión del ion con un sitio del canal es débil y no se quedará "atrapado" en el interior del canal sino "circulando rápidamente". La permeación dentro del poro del canal es más compleja que la simple difusión en una solución libre y hay diferentes factores que la modulan.

La capacidad de conducir de un canal puede ser inhibida bloqueando el acceso al poro del canal (moléculas que se unen a la boca de entrada) o actuando en alguna parte dentro del poro. La mayoría de las moléculas bloqueadoras son drogas o toxinas exógenas, sin embargo, hay algunas presentes en condiciones fisiológicas como por ejemplo, Mg^{+2} , Ca^{+2} que actúan como tales en determinadas clases de canales.

IV.2.2. Los canales iónicos son capaces de seleccionar los iones que transportan: *Selectividad*.

Una de las características más notables de los canales es su selectividad. Algunos son extremadamente selectivos, por ejemplo los canales de potasio del axón que prefieren K^+ sobre Na^+ en una razón 100: 1. ¿Cómo los canales discriminan entre los diferentes iones?. Las enzimas reconocen su sustrato por su estructura químicas y forma, pero en el caso del ejemplo lo anterior el ión K^+ y Na^+ tienen forma similar y carga positiva ¿cuál será la forma de distinguirlos?.

Los CANALES IONICOS seleccionan los iones que Conducen



La forma más simple de imaginarse la selección es por el tamaño del ion con relación al tamaño del poro del canal y de hecho, esto permite entender por qué un canal K^+ que tiene un radio de 3.3 Å no deja pasar iones con radios superiores. Sin embargo ¿por qué no deja pasar al ion Na^+ que es incluso más pequeño que el ion K^+ ? Una posible explicación es considerar el radio de hidratación en torno al ion. El Na^+ es más pequeño que el K^+ , sin embargo su radio de hidratación es más grande, ya que la "nube" de moléculas de agua atraídas en sus entorno es mayor. En estos términos, la razón de la selección sería la

exclusión en función del tamaño del radio de hidratación con respecto al poro del canal. Sin embargo la selectividad del canal es un proceso más complejo y difícil que la simple selección por tamaño.

G. Eisenman y B. Hille han propuesto que al interior de los canales existe una zona estrecha denominada "filtro de selectividad" en la cual tiene el encuentro más "íntimo" con las paredes internas del poro. En esta zona, el ion hidratado pierde la mayoría de las moléculas de agua quedando expuesto a interacciones electroestáticas con los residuos amoniocídicos polares o cargados que forman las paredes internas del canal. El ion permeante permanece unido un corto tiempo al filtro de selectividad y luego "sigue su camino". De modo que un factor determinante podría ser la facilidad con que el ion se deshidrate, en este caso, lo hace más fácilmente el ion más grande que uno más pequeño, lo que explicaría la selectividad al K^+ citada en el ejemplo.

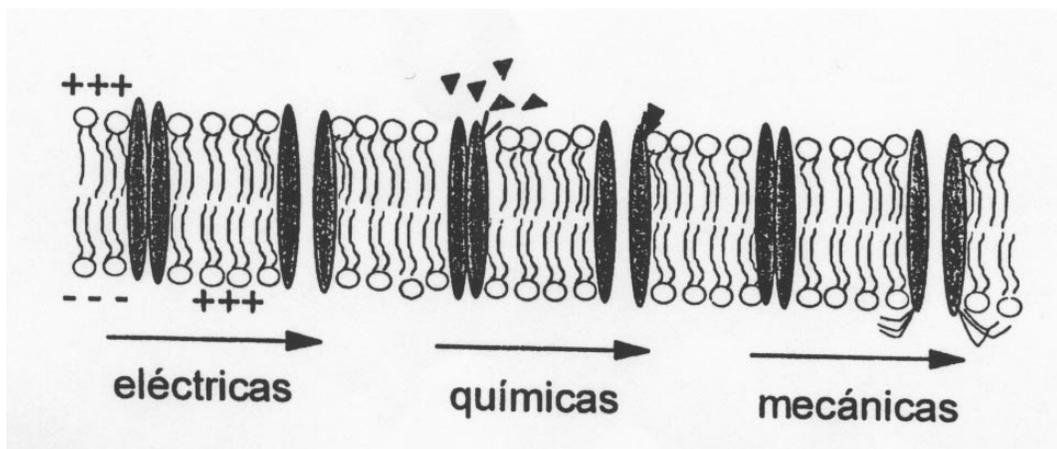
Existe una gran variedad de tamaños de poro de canales por lo tanto, también varía el número de moléculas de agua que pueden acomodar, así habrá canales que no "exigen" perder completamente las moléculas de agua. Las diferencias generarán múltiples tipos de interacciones entre el ion y las paredes del canal. Todas las posibles variedades de interacciones serán responsables del amplio rango de selectividad iónica.

Problema 3

En un gráfico de corriente versus potencial de membrana, la recta corta el eje de los potenciales en -60 mV cuando la concentración de NaCl es 100 mM y 10 mM en el extra e intracelular respectivamente. Los datos se obtuvieron de los registros de un canal en configuración "inside out" ¿Podría Ud. concluir si es selectivo a Cl^- o Na^+ ? ¿Cómo y por qué?

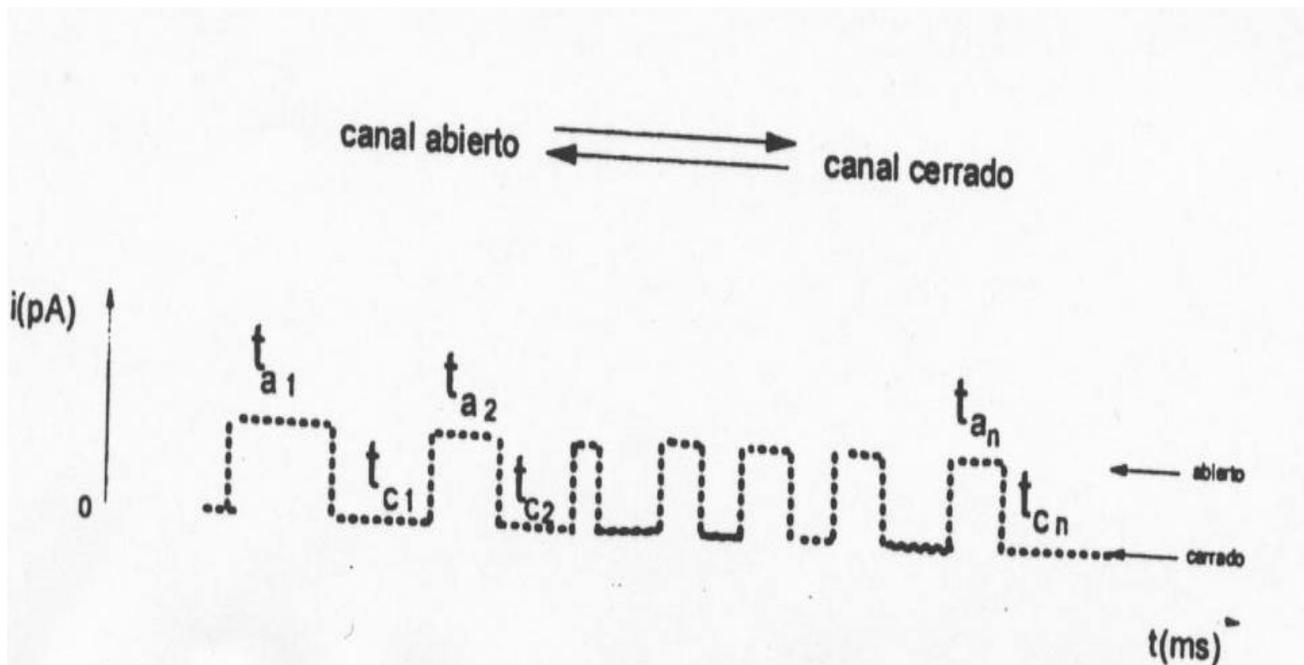
IV.2.3. Los canales son modulados por diferentes señales que pueden ser eléctricas, químicas o mecánicas

CANALES IONICOS: FAMILIAS PRINCIPALES SEGÚN LA SEÑAL QUE LOS ABRE



Los diferentes moduladores o reguladores afectan la cinética del canal, es decir, la fracción de tiempo de apertura o cierre, que está directamente relacionado con la probabilidad de encontrarlo abierto o cerrado a las diferentes condiciones.

CANALES IONICOS: cinética



La fracción de tiempo abierto (f_a) es la razón entre la sumatoria de todos los tiempos abiertos sobre el tiempo total de registro

$$F_a = \frac{t_{a1} + t_{a2} + \dots + t_{a_n}}{t_T} \qquad t_T = \text{tiempo total de registro}$$

De igual forma, la fracción de tiempo cerrado (f_c) es la sumatoria de todos los tiempos cerrados sobre el tiempo total de registro

$$F_c = \frac{t_{c1} + t_{c2} + \dots + t_{c_n}}{t_T} \qquad \boxed{f_a + f_c = 1}$$

Se conoce relativamente poco acerca de los mecanismos de apertura y cierre de los canales, aparte que estos involucran cambios conformacionales. La modulación del mecanismo es crucial para dar cuenta de las funciones en las que están los canales involucrados.

Algunos canales son regulados por ligandos químicos, constituyéndose la familia de canales dependientes de ligandos, tales como neurotransmisores, hormonas por el lado externo de la célula o segundos mensajeros por el lado citoplasmático. En otro conjunto de ellos, son los cambios de potencial de membrana los que regulan la apertura y cierre (familia de canales potencial dependiente) y también los hay que responden a cambios mecánicos como el "estiramiento" de la membrana o cambios de presión.

IV.2.4. Nomenclatura

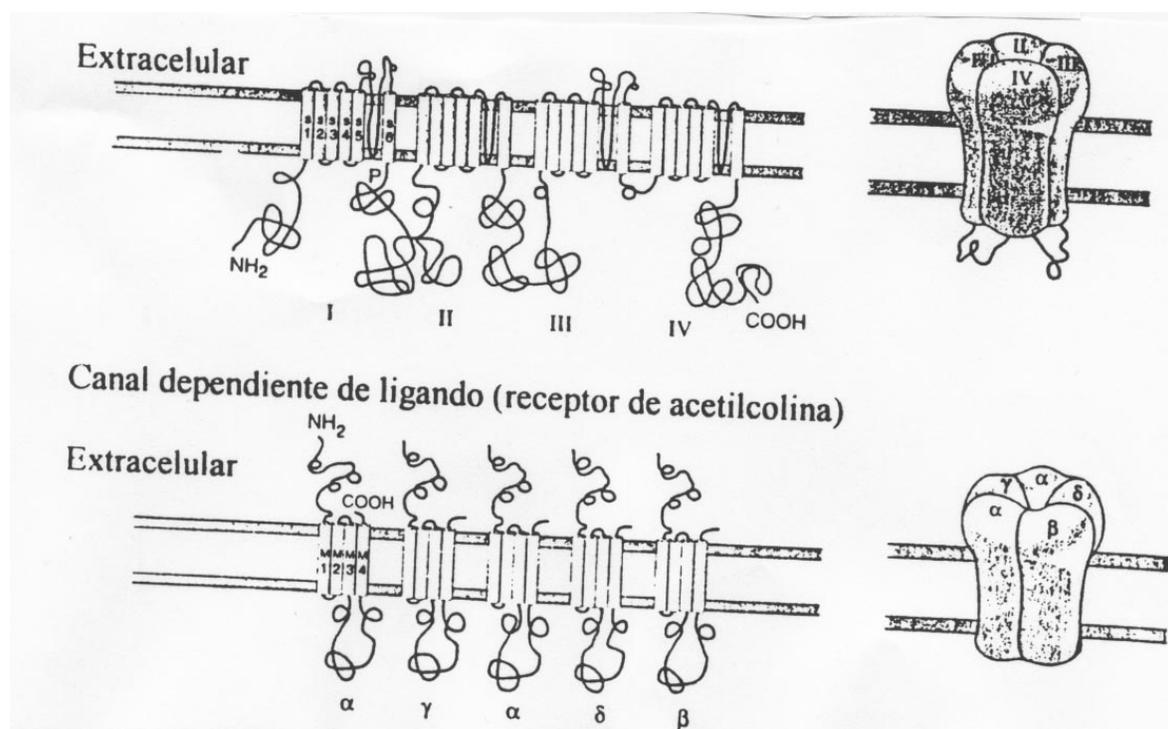
Se han encontrado muchos tipos de canales sobrepasando las expectativas de la búsqueda inicial. Esta diversidad ha implicado gran variedad de clasificaciones y nomenclaturas. Una forma ha sido agruparlos en familias según su mecanismo de respuesta, de sus selectividad y también según el tejido del cual provienen. Por ejemplo, se habla de canales de K^+ potencial dependiente del axón o canales catiónicos asociados al receptor de acetilcolina de la placa neuromotora, o canales de potasio activados por calcio, etc. La gran diversidad no solo ha sido un desafío para nombrarlos sino en la comprensión del rol que pueden jugar.

IV. 3. Estructura molecular de los canales iónicos

Los canales son proteínas integrales que forman con su estructura un poro a través del cual pasan los iones. Un típico canal dependiente de potencial es el canal de Na^+ . Su estructura de Na^+ presenta fue identificada en cerebro de rata y consiste en 3 subunidades (α de 260 KD, β_1 de 39 y β_2 de 37 KD), en general esta familia de canales tienen el "poro" en la subunidad α y las subunidades β son reguladores de la cinética. Las unidades α tienen cuatro dominios homólogos y seis segmentos transmembranas siendo el llamado S4 el sensor de potencial. Estas características estructurales se repiten parcialmente en los canales de la misma familia selectivos a K^+ , Na^+ , Ca^{+2} .

Tal vez, el canal más estudiado es el canal ligando dependiente de acetilcolina. Tiene una estructura espacial de 5 sub-unidades con un total de 2305 aminoácidos. De cada subunidad se conoce la secuencia aminoacídica que la conforma, se ha identificado cuales son los aminoácidos presentes en el sitio de ligamen de la acetilcolina y el conjunto de aminoácidos implicados en el filtro de selectividad, etc. Estos estudios permiten establecer un correlato entre la estructura y su funcionalidad.

Canal dependiente de potencial (canal de Na^+)



En general, los canales iónicos están formados por una o más unidades peptídicas. El patrón común es que están formados por una "roseta" de 4, 5 ó 6 subunidades con un poro central. Cada subunidad contiene n secuencias peptídicas transmembranas. Con los 20 aminoácidos se han generado cientos de secuencias diferentes que a su vez pueden generar proteínas con diferentes características. El conocimiento de cómo funciona una determinada proteína será enriquecido por la información sobre su estructura primaria así como de su estructura secundaria y terciaria. El correlato estructura - función ha sido fundamental en el conocimiento "fino" de los canales iónicos.

IV.4. Canales con alteraciones en su función originan enfermedades en el ser humano

Los canales iónicos están implicados en los orígenes y tratamientos de varias enfermedades. En algunas enfermedades autoinmunes el enfermo genera anticuerpos para sus propios canales, así es el caso de la *miastenia gravis*. En esta enfermedad, se producen anticuerpos para el receptor de acetilcolina de la junta neuromuscular, provocando parálisis parcial muscular.

Otros ejemplos de enfermedades asociadas a disfunciones de canales son, por ejemplo, aquellas producidas por mutaciones en el canal de sodio del músculo esquelético. Por lo

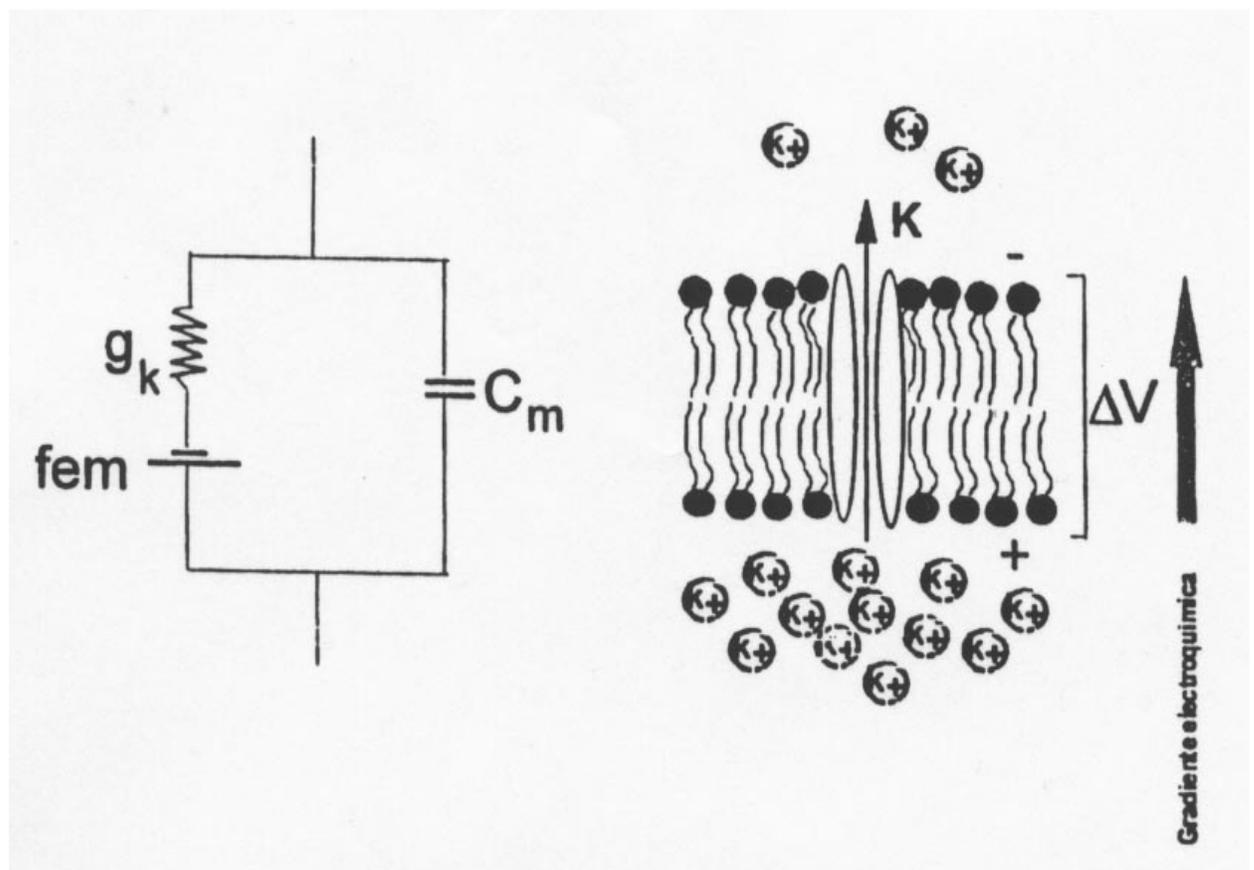
menos hay tres tipos de ellas en que, electrofisiológicamente, se ha demostrado que el canal alteraciones en su función en biopsia de músculo enfermo. El entendimiento molecular de estas enfermedades se logró en 1990 cuando se identificó las alteraciones de la secuencias aminoacídica del canal. En muchas ocasiones se ha encontrado que basta un reemplazo u omisión de un solo aminoácido para que suceda un cambio radical en la función de ese canal.

Largas listas de enfermedades asociadas a canales de calcio, de potasio y canales de cloruro se han ido incrementando a medida que el conocimiento de los canales y de su estructura avanza.

V. CIRCUITO EQUIVALENTE DE LA MEMBRANA

Con los conceptos revisados anteriormente, se puede representar las propiedades de las membranas, desde el punto de vista biofísico, por un circuito eléctrico simple que tienen equivalencia con las características de ella.

CIRCUITO EQUIVALENTE DE LA MEMBRANA



En este circuito el elemento *conductor* está representado por la resistencia o su inverso que es la conductancia (en nuestro ejemplo es un *canal* selectivo a K^+), la *bateria* o fuente de poder, *fem* (el gradiente electroquímico para el ión permanente) y la capacidad de un *condensador* (la *bicapa lipídica*) es un condensador plano). En la siguiente etapa veremos con más detalle las características de estas proteínas llamadas canales iónicos.

BIBLIOGRAFIA

Ion Channels, D. J. Aidley and P. R. Stanfield, Cambridge University Press, 1996

Ion Channels of Excitable Membranes, B. Hille, Sinauer Associates INC., 1992

Foundations of Cellular Neurophysiology, D. Johnston and S Miao-Sin Wu, 1995