

Modelado de canales iónicos como procesos de Markov

Roberto Ávila-Pozos,*
Virginia González-Vélez,**
J. Rafael Godínez-
Fernández***

- * Centro de Investigación en Matemáticas. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Carretera Pachuca-Tulancingo, Km 4.5, 42074 Pachuca, Hgo.
- ** Área de Química Aplicada, Dpto. Ciencias Básicas, Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco Av. San Pablo 180, Edif. G Bis, 02200 México D.F.
- *** Laboratorio de Biofísica, Dpto. Ingeniería Eléctrica Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, 09340 México D.F.

Correspondencia:
Roberto Ávila Pozos, ravila@uaeh.edu.mx

Artículo recibido: 9/junio/2006
Artículo aceptado: 28/noviembre/2006

1. RESUMEN

En este trabajo se revisan los conceptos básicos de procesos de Markov, entendidos como una cadena de estados cuyas transiciones entre ellos siguen un comportamiento estocástico o no determinístico. Se hace énfasis en la forma de calcular las probabilidades de transición entre los estados que lo componen y en las variables aleatorias que pueden ser asociadas a cada estado. A lo largo de todo el artículo se discute cómo estos conceptos pueden ser aplicados al estudio teórico y modelado de canales iónicos presentes en la membrana celular, dado que éstos presentan varios estados conformacionales por los cuales transitan de manera estocástica durante su activación. Finalmente se detalla el análisis del modelo de dos estados para un canal iónico y se muestran algunas simulaciones de corriente unitaria obtenidas con este modelo. Estas corrientes son de gran interés ya que a partir de ellas se puede conocer la corriente macroscópica medible en células excitables.

Palabras clave:

Biofísica de canales iónicos, corrientes unitarias, procesos de Markov, membrana celular, fijación de voltaje, modelos de estados.

1. ABSTRACT

We review basic concepts of Markov processes as they are discrete state models with stochastic transitions. We emphasize how to calculate transition probabilities between states and their random variables. Through this paper we discuss how this concepts could be applied to support a mathematical modelling of ionic channels. Channels have several conformational states and they skip from one to another in a non-deterministic fashion, so these techniques may be useful to understand channel behavior.

Finally, we detail the mathematical analysis for a two-state model and include some simulations obtained from it. The unitary currents simulated are important since they can be added to obtain the whole-cell macroscopic current, found in excitable cells.

Key Words:

Unitary current, Ionic channels, Stochastic process, Cell membrane, Voltage-clamp, Markov processes.

2. INTRODUCCIÓN

El estudio del transporte a través de membranas biológicas tuvo un gran avance a finales de la década de los setenta, cuando se desarrollaron las técnicas para registrar corrientes iónicas de un solo canal¹. El desarrollo de estas técnicas ha permitido la investigación de las propiedades cinéticas de los canales, con una mejor resolución espacial, lo que ha llevado a realizar estudios detallados de los canales iónicos. Neher y Sakmann² desarrollaron la técnica de *patch clamp* que consiste en sellar una pequeña región de la membrana celular (*parche*) con microelectrodos pulidos, para luego fijar el voltaje (*voltage clamp*) en el área sellada, de tal forma que la corriente que fluye a través de los canales pueda medirse directamente. Si la región sellada es lo suficientemente pequeña y la densidad de canales es baja, se puede obtener un *parche* de membrana que contenga un solo canal iónico, lo que permite monitorear la apertura y cierre del canal con sólo medir la corriente unitaria.

En algún tiempo se pensaba que las corrientes a través de un solo canal eran réplicas, a escala, de las corrientes macroscópicas. Bajo esta idea, se imaginaba al canal como una compuerta cuya posición era una variable continua que permitía el paso de más o menos corriente, dependiendo de dicha posición. Sin embargo, esta suposición es incorrecta. Los registros de corriente unitaria han demostrado que los canales iónicos se abren y se cierran aleatoria y abruptamente, lo que significa que los canales varían estocásticamente entre múltiples estados de conductancia (activación) o de no conductancia³.

Matemáticamente, el comportamiento de un canal iónico se describe como *no determinístico*, por lo que se requiere del análisis estocástico para manejar e interpretar dicho comportamiento. Gracias a esta herramienta sabemos que la probabilidad de apertura y cierre de los canales está determinada por el voltaje a través de la membrana, para los canales dependientes de voltaje, o por la unión de ligandos en el caso de los canales dependientes de ligando⁴. El comportamiento de la corriente de muchos canales del mismo tipo (*promedio del ensamble*) puede aproximarse mediante una expresión matemática que incluya una conductancia promedio de cada canal y un número típico de canales activos, o bien, sabiendo su probabilidad de apertura⁵. Si se suma la corriente unitaria de muchos canales, se obtiene la *corriente macros-*

cópica, llamada *corriente de células completas* sólo si corresponde a la suma de la corriente debida a todos los canales del mismo tipo presentes en dicha célula.

Aunque las propiedades cinéticas de un canal iónico se han representado mediante más de un modelo matemático⁶⁻⁹, el modelo de *proceso de Markov* resulta ser muy útil puesto que proporciona un marco conceptual para una amplia gama de variables medibles para un canal iónico, tales como carga de compuerta, conductancia o corriente unitaria. Esto se logra suponiendo que el canal funciona como una cadena de estados discretos entre los cuales puede transitar el canal bajo diferentes condiciones, y que pueden ser asociables con algunos estados conformacionales de la molécula correspondiente a un tipo de canal iónico, por los cuales pasa el canal durante el proceso de activación^{10,11}.

Un proceso de Markov se define en términos de las probabilidades de transición entre los estados que lo componen^{12,13}. Esas probabilidades caracterizan al proceso, en el sentido de que todas las propiedades de un proceso de Markov pueden derivarse a partir de ellas.

3. PROPIEDADES DE UN PROCESO DE MARKOV

3.1. Probabilidades de transición entre estados

Asumamos que un canal puede estar en uno de sus M diferentes estados de conductancia. Por ejemplo, un modelo propuesto para un canal de Na^+ dependiente del voltaje¹⁴, presenta tres estados *cerrados*, un estado *abierto* y un estado *inactivo*. Sea $\tilde{e}(t)$ el estado ocupado por el canal al tiempo t , el cual pueda describirse como un estado discreto de un proceso de Markov de tiempo continuo. En tales procesos, el estado del proceso en tiempos futuros depende sólo del estado actual y no de los estados anteriores. Esto significa que el estado de un proceso de Markov en algún tiempo futuro, es independiente de cómo llegó el sistema a su estado presente¹⁵.

Definamos la probabilidad de transición de estado $Y_{ij}(t_p, t)$ como la probabilidad de que el sistema esté en el estado j al tiempo t , dado que estaba en el estado i al tiempo previo t_p , es decir,

$$Y_{ij}(t_p, t) = \text{Prob}\{\tilde{e}(t) = j \mid \tilde{e}(t_p) = i\} \quad (1)$$

Observe que esta probabilidad es independiente de los estados anteriores al tiempo t_p .

Para un proceso de Markov independiente del tiempo, $Y_{ij}(t_p, t)$ depende únicamente de la diferencia entre t y t_p y no de ellos en forma individual^{10,12}. Por lo tanto

$$Y_{ij}(t) = \text{Prob}\{\tilde{e}(t + \tau) = j \mid \tilde{e}(\tau) = i\} \quad (2)$$

Asumamos que en cualquier momento t , los estados del canal son mutuamente excluyentes y colectivamente exhaustivos. Esto es, el canal está en uno de sus M estados en cada tiempo y ocupa sólo un estado a la vez. Esta suposición implica que

$$0 \leq Y_{ij}(t) \leq 1 \quad \text{y que} \quad \sum_j Y_{ij}(t) = 1 \quad \text{con} \quad Y_{ii}(t) = 1 - \sum_{i \neq j} Y_{ij}(t)$$

Podemos representar al conjunto de las probabilidades de transición para un proceso de M estados, como la matriz de transición $\mathbf{Y}(t)$, que estaría definida por

$$\mathbf{Y}(t) = \begin{bmatrix} Y_{11}(t) & Y_{12}(t) & \dots & Y_{1M}(t) \\ Y_{21}(t) & Y_{22}(t) & \dots & Y_{2M}(t) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ Y_{M1}(t) & Y_{M2}(t) & \dots & Y_{MM}(t) \end{bmatrix}$$

donde el índice de las filas representa el estado inicial, el índice de las columnas representa el estado final y M es el número total de estados del proceso.

De la definición de probabilidad de transición entre estados, tenemos que

$$Y_{ij}(t = 0) = Y_{ij}(0) = \delta_{ij}$$

con

$$\delta_{ij} = \begin{cases} 0 & \text{si } i \neq j \\ 1 & \text{si } i = j \end{cases}$$

donde δ_{ij} es la delta de Kronecker¹⁵. Por lo tanto, $\mathbf{Y}(0) = \mathbf{I}$, la matriz identidad.

En general, para cualquier estado discreto de un proceso estocástico de tiempo continuo³, se tiene que

$$\text{Prob}\{\tilde{e}(t) = k \mid \tilde{e}(t - \tau) = i\} = \sum_j (\text{Prob}\{\tilde{e}(t) = k \mid \tilde{e}(t - \tau) = i, \tilde{e}(t - t_p) = j\} \times \text{Prob}\{\tilde{e}(t - t_p) = j \mid \tilde{e}(t - \tau) = i\}) \quad \text{para } \tau > t_p$$

Sin embargo, en un proceso de Markov, debido a la propiedad de Markov¹², se tiene que

$$\text{Prob}\{\tilde{e}(t) = k \mid \tilde{e}(t - \tau) = i, \tilde{e}(t - t_p) = j\} = \text{Prob}\{\tilde{e}(t) = k \mid \tilde{e}(t - t_p) = j\} \quad (3)$$

Al combinar esta expresión con la ecuación 1, se obtiene la relación fundamental entre las probabilidades de transición de un proceso de Markov, que se conoce como *ecuación de Chapman-Kolmogorov*^{12,16}. Esta relación puede escribirse como

$$Y_{ik}(t) = \sum_j Y_{ij}(\tau) Y_{jk}(t - \tau) \quad \text{para } t > \tau \quad (4)$$

que significa que la probabilidad de que un canal pase de un estado i a un estado k es la suma de los productos de la probabilidad de transición de un estado i a un estado j y de la probabilidad de transición de un estado j a un estado k .

La ecuación de Chapman-Kolmogorov también puede escribirse en forma matricial como

$$\mathbf{Y}(t) = \mathbf{Y}(\tau) \mathbf{Y}(t - \tau) \quad (5)$$

3.2. Velocidades de transición entre estados

Preguntémonos ahora ¿cuál es la probabilidad de que suceda una transición entre dos estados durante un intervalo de tiempo muy pequeño? Siendo congruentes con lo mencionado en la sección anterior, para un intervalo de tiempo dado, la probabilidad de que ocurra una transición en ese intervalo depende únicamente de él. Supongamos entonces que para un intervalo muy pequeño, las probabilidades sean proporcionales a la duración del mismo, es decir,

$$Y_{ij}(\Delta t) = \alpha_{ij} \Delta t + o(\Delta t) \quad \text{para } i \neq j \quad (6)$$

donde α_{ij} es la razón de transición de un estado i a un estado j y $o(\Delta t)$ es la probabilidad de que ocurra más de una transición durante el intervalo Δt , donde

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{o(\Delta t)}{\Delta t} = 0$$

Dado que la probabilidad de que no ocurra la transición del estado i al estado j en ese intervalo de tiempo es $1 - \alpha_{ij} \Delta t - o(\Delta t)$, entonces la probabilidad de que no ocurran transiciones a algún estado diferente del estado i está dada por

$$1 - \sum_{j \neq i} \alpha_{ij} \Delta t - o(\Delta t)$$

De esta manera, las velocidades de transición o no transición para cada estado i estarían definidas como

$$\alpha_{ij} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{Y_{ij}(\Delta t)}{\Delta t} \quad \text{para } i \neq j$$

$$\alpha_{ii} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{Y_{ii}(\Delta t) - 1}{\Delta t} \quad (7)$$

La matriz de transiciones α para el proceso de M estados, en términos de las velocidades de transición, sería

$$\alpha(t) = \begin{bmatrix} \alpha_{11} & \alpha_{12} & \dots & \alpha_{1M} \\ \alpha_{21} & \alpha_{22} & \dots & \alpha_{2M} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \alpha_{M1} & \alpha_{M2} & \dots & \alpha_{MM} \end{bmatrix}$$

3.3. La ecuación de Kolmogorov

Si conocemos las razones de transición entre estados, entonces las probabilidades de transición entre estados pueden determinarse resolviendo una ecuación diferencial: la ecuación de Kolmogorov¹⁶. Esta ecuación puede deducirse al expresar la probabilidad de transición al tiempo $t + \Delta t$ en términos de la probabilidad de transición entre estados al tiempo t

$$Y_{ij}(t + \Delta t) = Y_{ij}(t)(1 + \alpha_{jj}\Delta t) + \sum_{k \neq j} Y_{ik}(t)(\alpha_{kj}\Delta t + o(\Delta t)) \quad (8)$$

El primer término de la ecuación 8 es la probabilidad de que $\tilde{e}(t) = j$ sin que ocurran transiciones en el intervalo $t + \Delta t$. El segundo término es la probabilidad de que $\tilde{e}(t) = k$ y que haya una transición de k a j en el intervalo $t + \Delta t$. Reacomodando los términos y dividiendo por Δt , tenemos

$$\frac{Y_{ij}(t + \Delta t) - Y_{ij}(t)}{\Delta t} = Y_{ij}(t)\alpha_{jj} + \sum_{k \neq j} Y_{ik}(t)\alpha_{kj} + \frac{o(\Delta t)}{\Delta t}$$

Si tomamos el límite cuando $\Delta t \rightarrow 0$, obtenemos la ecuación de Kolmogorov

$$\frac{dY_{ij}(t)}{dt} = \sum_k Y_{ik}(t)\alpha_{kj} \quad (9)$$

Para todos los estados, se puede reescribir la ecuación 9 en notación matricial como

$$\frac{d\mathbf{Y}(t)}{dt} = \mathbf{Y}(t)\alpha \quad (10)$$

que es una ecuación diferencial lineal homogénea de primer orden cuya solución es

$$\mathbf{Y}(t) = e^{\alpha t} \quad (11)$$

donde el término del lado derecho es una matriz exponencial¹⁷, la cual podría calcularse usando una expansión en series de potencias

$$e^{\alpha t} = \mathbf{I} + \alpha t + \frac{(\alpha t)^2}{2!} + \dots \quad (12)$$

o bien, mediante diagonalización. Para ello, la matriz α puede expresarse como

$$\alpha = \mathbf{E}\mathbf{\Lambda}\mathbf{E}^{-1} \quad (13)$$

donde $\mathbf{\Lambda}$ es una matriz diagonal construida con los valores propios de α , \mathbf{E} es una matriz ortogonal construida con los vectores propios de α y \mathbf{E}^{-1} es su inversa, de manera que $\mathbf{E}\mathbf{E}^{-1} = \mathbf{I}$.

Los valores propios de α pueden obtenerse al resolver la matriz característica

$$|\alpha - \lambda\mathbf{I}| = 0$$

Puesto que la matriz α es una matriz singular, uno de sus valores propios es cero y el resto tienen parte real negativa, para que las funciones $\mathbf{Y}(t)$ alcancen un valor de estado estable. Por simplicidad, asumiremos que estos valores propios son distintos y denotaremos al conjunto de valores propios como $\{\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_M\}$. La ecuación 11 puede entonces reescribirse en términos de los valores propios de α como

$$\mathbf{Y}(t) = e^{\mathbf{E}\mathbf{\Lambda}t\mathbf{E}^{-1}} = \mathbf{E}e^{\mathbf{\Lambda}t}\mathbf{E}^{-1} \quad (14)$$

La ecuación 14 nos dice que las probabilidades de transición entre estados pueden expresarse como una superposición lineal de funciones exponenciales, cuyos exponentes están determinados por los valores propios de la matriz de transiciones, $\alpha(t)$.

3.4. Probabilidades de ocupación de un estado

La probabilidad de ocupación de un estado, es la probabilidad de que el canal esté en un estado en particular, en un tiempo determinado. Sea $X_i(t)$ la probabilidad de que el canal esté en el estado i al tiempo t . Si definimos a la probabilidad de ocupación inicial para ese estado como $X_i(t = 0) = X_i(0)$,

podemos encontrar las probabilidades de ocupación de un estado i para cualquier tiempo a partir de la expresión

$$X_i(t) = \sum_j X_j(0)Y_{ji}(t) \quad (15)$$

que muestra que la probabilidad de que el canal se encuentre en el estado i es la suma de las probabilidades condicionales de que inicialmente estuvo en un estado j y transitó al estado i , o bien, inició en i y no tuvo transición a otro estado.

La ecuación 15 puede escribirse en forma compacta usando notación matricial. Si definimos $\mathbf{X}(t)$ como una matriz renglón que contiene las probabilidades de ocupación de todos los estados, es decir, todas las $X_i(t)$, entonces

$$\mathbf{X}(t) = \mathbf{X}(0)\mathbf{Y}(t) \quad (16)$$

donde $\mathbf{X}(0)$ es la matriz renglón de las probabilidades iniciales de cada estado.

Al derivar respecto al tiempo obtenemos

$$\frac{d\mathbf{X}(t)}{dt} = \mathbf{X}(0)\frac{d\mathbf{Y}(t)}{dt} + \mathbf{Y}(t)\frac{d\mathbf{X}(0)}{dt}$$

al sustituir la ecuación 10, esta ecuación aparece como

$$\frac{d\mathbf{X}(t)}{dt} = \mathbf{X}(0)\frac{d\mathbf{Y}(t)}{dt} = \mathbf{X}(0)\mathbf{Y}(t)\boldsymbol{\alpha}$$

la cual, combinada con la ecuación 16 nos arroja la siguiente expresión

$$\frac{d\mathbf{X}(t)}{dt} = \mathbf{X}(t)\boldsymbol{\alpha} \quad (17)$$

Esta expresión nos indica que la probabilidad de ocupación de estados también satisface una ecuación diferencial lineal de primer orden, al igual que la probabilidad de transición entre estados. La solución de esta ecuación sería

$$\mathbf{X}(t) = e^{\boldsymbol{\alpha}t} \quad (18)$$

Para un conjunto dado de estados ocupados inicialmente y conociendo las velocidades de transición entre los estados, la ocupación de estados puede entonces encontrarse como una función del

tiempo, haciendo uso de la matriz de valores propios de $\boldsymbol{\alpha}$, de manera análoga a lo descrito en la sección anterior para $\mathbf{Y}(t)$.

3.5. Tiempo de ocupación de un estado

El tiempo que un canal permanece en un estado se conoce como *tiempo de ocupación*. La distribución de probabilidad de los tiempos de ocupación también está relacionada con las razones de transición entre estados, siendo la más simple la distribución de los intervalos de tiempo para un estado j .

Sea $\mathcal{F}_j(t)$ la función de distribución de probabilidad de los tiempos de ocupación de un canal definida por

$$\mathcal{F}_j(t) = \text{Prob}\{\bar{e}(t_p) = j \text{ para } 0 \leq t_p \leq t\}$$

y sea

$$\mathcal{F}_j(t + \Delta t) = \text{Prob}\{\text{no hay transiciones en } (t + \Delta t) \mid \bar{e}(t_p) = j \text{ para } 0 \leq t_p \leq t\} \mathcal{F}_j(t) \quad (19)$$

Combinando las ecuaciones en la ecuación 19, nos queda

$$\mathcal{F}_j(t + \Delta t) = \left(1 - \sum_{i \neq j} \alpha_{ji} \Delta t\right) \mathcal{F}_j(t) = (1 + \alpha_{jj} \Delta t) \mathcal{F}_j(t)$$

Reacomodando los términos podemos escribir

$$\frac{\mathcal{F}_j(t + \Delta t) - \mathcal{F}_j(t)}{\Delta t} = \alpha_{jj} \mathcal{F}_j(t)$$

Si tomamos el límite de esta expresión cuando $\Delta t \rightarrow 0$, obtenemos

$$\frac{d\mathcal{F}_j(t)}{dt} = \alpha_{jj} \mathcal{F}_j(t)$$

que nuevamente es una ecuación diferencial lineal de primer orden cuya solución es de la forma

$$\mathcal{F}_j(t) = e^{\alpha_{jj}t} \quad (20)$$

donde el coeficiente de la exponencial es uno, ya que la probabilidad de que el tiempo de ocupación en el estado j exceda una duración de cero es igual a uno.

La ecuación 20 establece que la función de distribución de probabilidad de que el tiempo de ocupación en un estado j exceda un tiempo t , tiene un

comportamiento exponencial con un valor igual al negativo de la suma de las razones de abandonar el estado j .

La probabilidad de que el tiempo de ocupación del estado j sea menor que t está dada por

$$\mathcal{F}'_j(t) = 1 - \mathcal{F}(t) = 1 - e^{-\alpha_{jj}t}$$

La función de densidad de probabilidad de los tiempos de ocupación sería entonces la derivada de la función de distribución de probabilidad

$$F_J(t) = \frac{d\mathcal{F}'_j(t)}{dt} = -\alpha_{jj}e^{-\alpha_{jj}t}$$

A partir de esta función de densidad, podemos calcular el valor esperado del tiempo de ocupación del estado j como

$$E[t_j] = \int_0^\infty t_j F_J(t) dt_j = - \int_0^\infty t_j \alpha_{jj} e^{-\alpha_{jj}t} dt_j = -\frac{1}{\alpha_{jj}}$$

Este resultado nos indica que el tiempo promedio de ocupación de un estado j es inversamente proporcional a la razón de transición del estado j hacia cualquier otro.

4. VARIABLES ALEATORIAS ASOCIADAS A LOS ESTADOS DE UN PROCESO DE MARKOV

En el modelo de procesos de Markov, es muy importante asociar ciertos atributos a cada estado del canal. Denotaremos por a_j al valor de un atributo cuando el canal está en el estado j y definiremos un vector columna de atributos como \mathbf{a} . Un atributo puede ser la conductancia del canal $g(t)$, la corriente a través del canal $i(t)$ o la carga de compuerta $q_g(t)$ ^{10,18-20}. Esta formulación nos permitirá calcular las propiedades estadísticas de cualquiera de estos atributos, considerándolos como variables aleatorias discretas asociada al canal. Puesto que el canal estará cambiando de un estado a otro, la variable también cambia entre los diferentes valores del atributo.

4.1. Propiedades estadísticas de las variables aleatorias del canal iónico

4.1.1. Valor esperado

El valor esperado de una variable aleatoria discreta $\tilde{v}(t)$ es

$$E[\tilde{v}(t)] = v(t) = \sum_j a_j X_j(t) = \mathbf{X}(t)\mathbf{a} \quad (21)$$

donde X_j es la probabilidad de que el canal esté en el estado j al tiempo t y a_j es el valor del atributo cuando el canal está en el estado j .

Por ejemplo, el valor esperado de la conductancia del canal se puede expresar como $g(t) = E[\tilde{g}(t)] = \sum_j \gamma_j X_j(t)$, donde γ_j es la conductancia del canal cuando está en el estado j . Otro caso es el valor esperado de la carga de compuerta del canal $q_g(t) = E[\tilde{q}_g(t)] = \sum_j Q_j X_j(t)$, donde Q_j es la carga de compuerta del canal cuando está en el estado j .

Si la corriente iónica a través del canal cuando está en el estado j se define como $I_j = \gamma_j(V_m - V_{eq})$, donde V_{eq} es el potencial de inversión del canal y V_m es el potencial de membrana, el valor esperado de la corriente será $i(t) = E[\tilde{i}(t)] = \sum_j \gamma_j (V_m - V_{eq}) X_j(t)$ ^{10,18,20}.

4.1.2. Varianza

Una medida de la variabilidad de una variable aleatoria discreta es la varianza, la cual está definida como

$$\sigma(t) = E[\tilde{v}^2(t)] - v^2(t) = \sum_j a_j^2 X_j^2(t) - \left(\sum_j a_j X_j(t) \right)^2 \quad (22)$$

4.1.3. Covarianza

La función de covarianza proporciona información de la variable aleatoria, en el dominio del tiempo. Esta función da la relación entre las probabilidades de eventos ocurridos en determinado momento, y aquéllos ocurridos antes o después de ese momento. La función de covarianza de una variable aleatoria discreta está definida por

$$c(\tau) = E[\tilde{v}(t + \tau)\tilde{v}(t)] = \sum_{i,j} \text{Prob}\{\tilde{v}(t + \tau) = a_j \wedge \tilde{v}(t) = a_i\}$$

que puede escribirse como

$$c(\tau) = \sum_{i,j} \text{Prob}\{\tilde{v}(t + \tau) = a_j \mid \tilde{v}(t) = a_i\} \text{Prob}\{\tilde{v}(t) = a_i\}$$

El valor de estado estable (cuando $t \rightarrow \infty$) para la función de autocovarianza puede escribirse como

$$c(\tau) = \sum_{i,j} Y_{ij}(\tau) X_i(\infty) \quad (23)$$

donde $X_i(\infty)$ es la probabilidad de que el canal se encuentre en el estado i para tiempos largos (estado estacionario).

4.1.4. Espectro de potencia

El espectro de potencia proporciona información de la variable aleatoria, en el dominio de la frecuencia. El espectro de potencia $C(f)$ de los cambios en la variable $\tilde{v}(t)$, se puede obtener a partir del teorema de Wiener-Khinchin²¹, el cual establece que el espectro de potencia es la transformada de Fourier de la función de covarianza, es decir

$$C(f) = \int_{-\infty}^{\infty} c(\tau) e^{-j2\pi f\tau} d\tau = \int_{-\infty}^{\infty} \sum_k d_k e^{\lambda_k |\tau|} e^{-j2\pi f\tau} d\tau \quad (24)$$

que puede evaluarse término a término para obtener

$$C(f) = d_1 \delta(f) + \sum_{k \neq 1} d_k \frac{-2\lambda_k}{(2\pi f)^2 + \lambda_k^2} \quad (25)$$

donde los λ_k son los valores propios, con λ_1 el valor propio igual a cero. $\delta(f)$ es la función impulso. Nótese que $C(f)$ es una función discreta en la frecuencia.

5. MODELOS DE ESTADOS PARA CANALES IÓNICOS

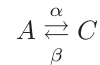
La apertura o cierre de un solo canal iónico puede verse como un proceso estocástico ya que no se puede predecir con exactitud cuándo un canal tendrá una transición o no entre un estado u otro; por ejemplo, no podemos anticipar si el canal pasará de un estado abierto a uno cerrado²².

Se han propuesto diferentes modelos de canales iónicos con el fin de explicar las propiedades conocidas mediante técnicas experimentales. Estas propiedades incluyen la dinámica de activación, ya sea por ligando o por voltaje, la inactivación y la desactivación, las cuales comúnmente dependen del voltaje, de un ion o de la fosforilación. Estos modelos van desde los más simples, donde se suponen sólo dos estados posibles, hasta algunos más sofisticados, donde el canal transita en el tiempo entre varios estados abiertos, cerrados e inactivos, dependiendo de las variables antes menciona-

das^{6,23,24}. La Figura 1 muestra un registro de canal unitario obtenido con la técnica de *match clamp*, en el cual se observa que los canales sólo transitan entre dos estados ($I_m = 0$ e $I_m = 6$ pA). Este registro corresponde a un *match* de canales de K^+ dependientes de voltaje.

5.1. El modelo de dos estados

El modelo más sencillo es el que considera que el canal sólo tiene dos posibles estados, A abierto y C cerrado, mutuamente excluyentes. El diagrama cinético de un sistema de este tipo es:



De este diagrama es claro que la probabilidad de que el canal esté cerrado más la probabilidad de que el canal esté abierto suman uno, lo que representa una conservación de probabilidad de manera análoga a la conservación de masa que se tiene en una reacción reversible cuyo esquema cinético fuera idéntico²⁵. Entonces, para conocer cuál es la probabilidad de que el canal se encuentre en alguno de los estados a un tiempo t , debe resolverse el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden extraído del modelo cinético arriba mostrado. Asignemos arbitrariamente el número 1 al estado abierto y el número 2 al estado cerrado. Entonces, el sistema de ecuaciones diferenciales que describe las probabilidades de transición entre los dos estados es:

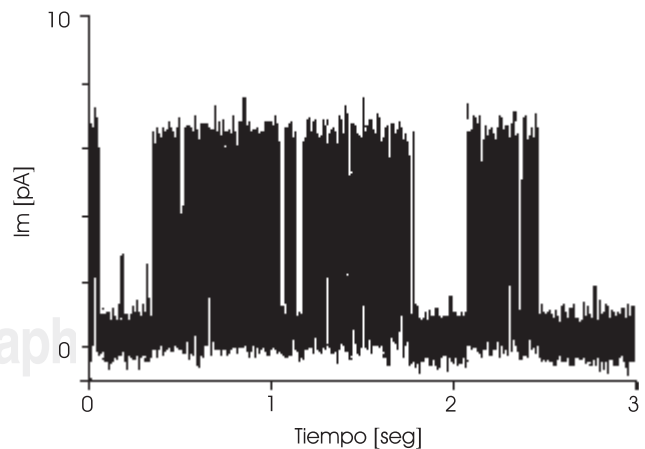


Figura 1. Corriente unitaria de un canal de K^+ dependiente del voltaje, obtenida con la técnica de *patch clamp* (Original). 6 pA corresponde al estado abierto del canal.

$$\frac{dP_{11}(t)}{dt} = -\alpha P_{11}(t) + \beta P_{12}(t) \quad (26)$$

$$\frac{dP_{12}(t)}{dt} = \alpha P_{11}(t) - \beta P_{12}(t) \quad (27)$$

$$\frac{dP_{21}(t)}{dt} = -\alpha P_{21}(t) + \beta P_{22}(t) \quad (28)$$

$$\frac{dP_{22}(t)}{dt} = \alpha P_{21}(t) - \beta P_{22}(t) \quad (29)$$

En forma matricial, estas ecuaciones diferenciales pueden escribirse como:

$$\begin{bmatrix} P_{11}(t) & P_{12}(t) \\ P_{21}(t) & P_{22}(t) \end{bmatrix}' = \begin{bmatrix} P_{11}(t) & P_{12}(t) \\ P_{21}(t) & P_{22}(t) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} -\alpha & \alpha \\ \beta & -\beta \end{bmatrix}$$

Observe que la suma en las filas de la matriz de razones de transición (matriz de transición, α) de estados es igual a cero.

Para encontrar las probabilidades de transición como función del tiempo, $\mathbf{Y}(t)$, debemos determinar los valores propios de α , esto es, resolver el problema de valores propios asociados:

$$\begin{vmatrix} -\alpha - \lambda & \alpha \\ \beta & -\beta - \lambda \end{vmatrix} = 0$$

que arroja el polinomio característico

$$\lambda(\lambda + (\alpha + \beta)) = 0$$

De donde se obtienen los dos valores propios del modelo 5.1: $\lambda_1 = 0$ y $\lambda_2 = -(\alpha + \beta)$. Estos valores propios nos indican que el modelo se comportará como asintóticamente estable, y que el valor de estado estacionario que alcanzarán las probabilidades será una constante diferente de cero.

Para $\lambda_1 = 0$, la matriz característica $\alpha - \lambda_1 \mathbf{I}$ sería

$$\alpha - \lambda_1 \mathbf{I} = \begin{bmatrix} -\alpha & \alpha \\ \beta & -\beta \end{bmatrix}$$

de donde el vector propio se obtiene como aquel vector Z_1 que resuelve el problema de valores propios asociado a α para $\lambda_1 = 0$; esto es:

$$\begin{bmatrix} -\alpha & \alpha \\ \beta & -\beta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} z_{11} \\ z_{12} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

Por lo tanto, el vector propio asociado a $\lambda_1 = 0$ es

$$\mathbf{Z}_1 = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix}$$

o cualquier múltiplo constante de él. De manera similar, se puede plantear la matriz característica para el valor propio $\lambda_2 = -(\alpha + \beta)$:

$$\alpha - \lambda_2 \mathbf{I} = \begin{bmatrix} \beta & \alpha \\ \beta & \alpha \end{bmatrix}$$

y el vector propio asociado a $\lambda_2 = -(\alpha + \beta)$ sería

$$\mathbf{Z}_2 = \begin{bmatrix} 1/\beta \\ -1/\alpha \end{bmatrix} \text{ o cualquier múltiplo constante de él.}$$

Para encontrar las probabilidades de transición entre los estados, de acuerdo con la ecuación 5, debemos diagonalizar la matriz α . Esto se logra construyendo las matrices \mathbf{E} , \mathbf{E}^{-1} y λ con los valores y vectores propios, tal como se especificó en la sección 2.3, es decir:

$$\mathbf{E} = \begin{bmatrix} 1 & 1/\beta \\ 1 & -1/\alpha \end{bmatrix}, \mathbf{E}^{-1} = \frac{1}{\alpha + \beta} \begin{bmatrix} \beta & -\alpha \\ \alpha\beta & -\alpha\beta \end{bmatrix} \text{ y } \lambda = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & -(\alpha + \beta) \end{bmatrix}$$

La matriz de transición $\mathbf{Y}(t)$, ya se había definido como

$$\mathbf{Y}(t) = \begin{bmatrix} P_{11}(t) & P_{12}(t) \\ P_{21}(t) & P_{22}(t) \end{bmatrix} = \mathbf{E}e^{\lambda t}\mathbf{E}^{-1}$$

donde $P_{12}(t)$ y $P_{21}(t)$ son las probabilidades de que el canal pase del estado abierto al cerrado y viceversa, respectivamente.

Lo anterior es posible dado que

$$\begin{bmatrix} 1 & 1/\beta \\ 1 & -1/\alpha \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & -(\alpha + \beta) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta/(\alpha + \beta) & \alpha/(\alpha + \beta) \\ \alpha\beta/(\alpha + \beta) & -\alpha\beta/(\alpha + \beta) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\alpha & \alpha \\ \beta & -\beta \end{bmatrix}$$

De acuerdo a lo anterior, las probabilidades de transición entre estados se obtienen del producto $\mathbf{E}e^{\lambda t}\mathbf{E}^{-1}$, que finalmente queda así:

$$\begin{bmatrix} Y_{11}(t) & Y_{12}(t) \\ Y_{21}(t) & Y_{22}(t) \end{bmatrix} = \frac{1}{\alpha + \beta} \begin{bmatrix} \beta + \alpha e^{-(\alpha + \beta)t} & \alpha - \alpha e^{-(\alpha + \beta)t} \\ \beta - \beta e^{-(\alpha + \beta)t} & \alpha + \beta e^{-(\alpha + \beta)t} \end{bmatrix}$$

Note que la suma de cada fila de la matriz de transición es igual a uno, lo que habla de la conservación de probabilidad para cada estado ($Y_{21}(t) + Y_{22}(t) = 1$, es decir, las dos posibles transiciones partiendo del estado cerrado).

De acuerdo a la ecuación 15, las probabilidades de ocupación de los estados Abierto y Cerrado, $X_A(t)$ y $X_C(t)$, serían:

$$\begin{bmatrix} X_A(t) & X_C(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_A(0) & X_C(0) \end{bmatrix} \frac{1}{\alpha + \beta} \begin{bmatrix} \beta + \alpha e^{-(\alpha+\beta)t} & \alpha - \alpha e^{-(\alpha+\beta)t} \\ \beta - \beta e^{-(\alpha+\beta)t} & \alpha + \beta e^{-(\alpha+\beta)t} \end{bmatrix}$$

Recordemos que $X_A(t) = 1 - X_C(t)$, y viceversa, por lo que si sustituimos este valor en la ecuación 5.1 y reacomodamos algunos términos, obtenemos:

$$X_A(t) = X_A(0)e^{-(\alpha+\beta)t} + \frac{\beta}{\alpha + \beta} \left(1 - e^{-(\alpha+\beta)t}\right)$$

$$X_C(t) = X_C(0)e^{-(\alpha+\beta)t} + \frac{\alpha}{\alpha + \beta} \left(1 - e^{-(\alpha+\beta)t}\right)$$

La ecuación para $X_C(t)$ nos hace ver que la probabilidad de ocupación del estado *Cerrado* es una función exponencial con constante de tiempo $1/(\alpha + \beta)$, valor inicial $X_C(0)$ y valor de estado estacionario $\alpha/(\alpha + \beta)$. Por ejemplo, si el estado inicial del canal es *Cerrado*, esto es $X_C(0) = 1$, la probabilidad de que el canal esté cerrado para tiempos muy largos (estado estacionario) es $\alpha/(\alpha + \beta)$. Por conservación de probabilidad, la probabilidad de que el canal esté abierto en el estado estacionario es $1 - \alpha/(\alpha + \beta)$, es decir, $\beta/(\alpha + \beta)$. Análogamente podríamos concluir lo que sucede si el estado inicial del canal es *Abierto*.

Con esto concluimos que en un modelo de dos estados para un canal iónico, la probabilidad de ocupación en estado estacionario sólo depende de las velocidades de transición, $\alpha + \beta$. Durante la fase transitoria, la ocupación de un estado depende exponencialmente del tiempo.

Estos resultados pueden ser empleados para simular la actividad de un solo canal, como se muestra en la Figura 2. Para obtener estas simulaciones se empleó un modelo de dos estados, en donde las razones de transición son diferentes. En la Figura 2a) se definió $\beta + 3\alpha$ mientras que en la Figura 2b), las velocidades de transición seguían la relación $\beta = 2\alpha$.

6. CONCLUSIÓN

En este trabajo se proporcionan herramientas conceptuales y matemáticas para analizar el comportamiento estocástico de las corrientes de canal unitario y aquellas generadas por un gran número de canales iónicos. De un registro experimental de canal iónico, como el de la Figura 1, se pueden medir los tiempos medios de apertura, cierre, ráfagas, espacio intra y entre ráfagas, etc., de tal manera que se puede determinar el esquema de transición, así como las velocidades de transición. Al hacer estos registros durante largos periodos, se puede observar el comportamiento de apertura y cierre del canal, y a partir de esto es posible proponer el esquema de transición que sigue el canal.

Los mecanismos de funcionamiento de un canal iónico se han descrito a partir de las mediciones experimentales de señales producidas por ellos durante su actividad en reposo y bajo estímulos. Las señales que comúnmente se miden son la corriente unitaria (corriente de un solo canal), la corriente de compuerta, la corriente macroscópica (corriente debida a todos los canales) y las conductancias unitaria y máxima total¹¹. Según se ha planteado anteriormente, cualquiera de estas

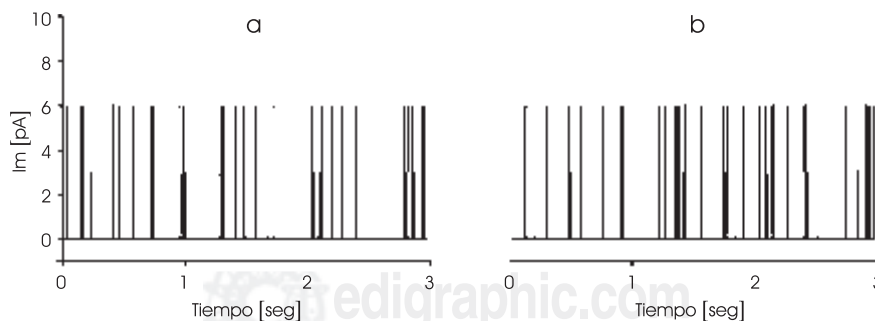


Figura 2. Corriente de canal unitario simulada con un modelo de dos estados, como el mostrado en la sección 5.1. Las velocidades de transición empleadas se eligieron como a) $\beta = 3\alpha$ y b) $\beta = 2\alpha$ para mostrar lo que ocurre en las ráfagas al variar las velocidades de transición entre los estados. 6 pA corresponde al estado abierto del canal, para hacerlo comparable con el registro experimental de la Figura 1.

mediciones puede ser asociada a una variable aleatoria que la describa, de forma que cada canal tenga asociados como atributos a estas variables, para cada estado incluido en un modelo de ese tipo de canal.

Así, el poder establecer la probabilidad de que un canal se encuentre en un estado u otro, nos permite definir el valor de cada atributo para un tiempo dado. Con ello podemos llegar a predecir, sobre bases estadísticas, el comportamiento de cada variable en el tiempo, y así complementar el estudio experimental de los canales iónicos y sus propiedades. La herramienta del análisis estocástico así como los modelos de Markov son útiles para describir el comportamiento de cada canal en forma individual, para luego asociarlo con las corrientes macroscópicas, tal como lo hemos discutido en trabajos previos^{26,27}.

Para citar un ejemplo, la corriente macroscópica medible en un miocito debida al ingreso de Ca^{2+} al interior celular puede definirse como $I_{Ca} = n \cdot p \cdot i_{Ca}$, donde n es el número de canales disponibles, p es la probabilidad de que esos canales estén abiertos e i_{Ca} es la amplitud de la corriente de un solo canal⁵. Si cada canal presente en la célula puede ser modelado como un proceso de Markov de dos estados, de acuerdo a lo presentado en la sección anterior podríamos conocer tanto la disponibilidad de cada canal como el tiempo de ocupación de cada estado, con lo cual seríamos capaces de evaluar la corriente total para cada tiempo.

Cabe mencionar que el modelo de dos estados ignora los otros estados conformacionales de un canal iónico. Esto es, un canal en realidad presenta otros estados durante su proceso de activación o desactivación, tales como el estado inactivo, ampliamente reportado^{5,9,28}. En consecuencia, un modelo de dos estados sólo nos permite estudiar y simular parte de la información que se obtiene durante un registro experimental. Esta es la razón principal por la cual se han publicado modelos que incluyen decenas de estados discretos y que reproducen con mayor fidelidad el comportamiento real de un cierto tipo de canal iónico^{6,7,11,23,24}.

Dado que muchas propiedades de canales iónicos son funciones del voltaje, entre otras variables, es frecuente medir estas propiedades como cambios ocasionados por valores fijos y controlados de voltaje a los cuales se somete la célula. Una técnica común para hacer estas mediciones es la técnica de fijación de voltaje^{2,29}.

BIBLIOGRAFÍA

1. OP Hamill, Marty A, Neher E, Sackman B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* 1981; 391: 85-100.
2. Sakmann B, Neher E. *Single-Channel Recording*. Plenum, London, first edition, 1985.
3. Colquhoun D, Hawkes AG. On the stochastic properties of single ion channels. *Proc R Soc London [Biol.]* 1981; 211: 205-235.
4. Hille B. Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A four-barrier model. *J Gen Physiology* 1975; 66: 535-560.
5. Ochi R. Single-channel mechanism of β -adrenergic enhancement of cardiac L-type calcium current. *Japanese Journal of Physiology* 1993; 43: 571-584.
6. Greenstein JL, Winslow RL. An integrative model of the cardiac ventricular myocyte in incorporating local control of Ca^{2+} release. *Biophysical Journal* 2002; 83: 2918-2945.
7. Rice JJ, Jafri S, Winslow RL. Modeling gain and gradedness of Ca^{2+} release in the functional unit of the cardiac dyadic space. *Biophysical Journal* 1999; 77: 1871-1884.
8. Vandenberg CA, Bezanilla F. A sodium channel gating model based on single channel, macroscopic ionic, and gating currents in the squid giant axon. *Biophysical Journal* 1991; 60(6): 1511-1533.
9. Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. Shaker potassium channel gating evaluation of kinetic models for activation (iii). *Journal of General Physiology* 1994; 103(2): 321-3623.
10. Becker JD, Honerkamp J, Hirsch J, Fröbe U, Schlatter E, Gregor R. Analysing ion channels with hidden Markov models. *Pflügers Archiv* 1994; 426: 328-332.
11. Sigworth FJ. Voltage gating of ion channels. *Quarterly Review of Biophysics* 1999; 27(1): 1-40.
12. Brzeźniak Z, Zastawniak T. *Basic stochastic processes*. First edition. Springer, London, 1999.
13. Doob JL. *Stochastic Processes*. First edition, Wiley, New York, 1990.
14. Hornand R, Vandenberg CA. Statistical properties of single sodium channels. *Journal of General Physiology* 1984; 84: 505-534.
15. Tuckwell HC. *Introduction to Theoretical Neurobiology: Vol. 2, Nonlinear and Stochastic Theories*. Cambridge University Press, Cambridge, 1997.
16. Johnston DS, Miao-Sin Wu. *Foundations of cellular neurophysiology*. First edition. MIT Press, London, 1997.
17. Hirsch MW, Smale S, Devaney RL. *Differential equations, dynamical systems and an introduction to chaos*. Second edition, Elsevier Academic Press, San Diego, 2004.
18. Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Trends in Neurosciences* 1993; 16: 500-506.
19. Scott A. *Neuroscience. A mathematical primer*. First edition. Springer-Verlag, New York, 2002.
20. Stefani E, Toro L, Perozo E, Bezanilla F. Gating of Shaker K^+ channels: I. Ionic and gating currents. *Biophysical Journal* 1994; 66: 996-1010.
21. Schwartz M. *Information transmission, modulation, and noise*. Third edition. McGraw Hill, New York, 1981.
22. Brown AM, Camerer H, Kunze DL, Lux HD. Similarity of unitary Ca^{2+} currents in three different species. *Nature* 1982; 299: 156-158.
23. Jafri S, Rice JJ, Winslow RL. Cardiac Ca^{2+} dynamics: the roles of ryanodine receptor adaptation and sarcoplasmic reticulum load. *Biophysical Journal* 1998; 74: 1149-1168.

24. Tanskanen AJ, Greenstein JL, O'Rourke B, Winslow RL. The role of stochastic and modal gating of cardiac L-type Ca^{2+} channels on early after-depolarizations. *Biophysical Journal* 2005; 88: 85-95.
25. Smith GD. Modeling the stochastic gating of ion channels. In: Fall CP, Marland ES, Wagner JM, Tyson JJ, editors. *Computational cell biology, interdisciplinary applied mathematics*. Springer-Verlag, New York, 2002; 11: 285-316.
26. Ávila-Pozos R, Godínez-Fernández JR. Modelación estocástica de las corrientes iónicas en células excitables. *Contactos*, ISSN 0186-4084 2003; 49: 46-53.
27. González-Vélez V, González-Vélez H. A grid-based stochastic simulation of unitary and membrane Ca^{2+} currents in spherical cells. *Proc 18 th IEEE CBMS Symposium* 2005; 1: 171-175.
28. Lipscombe D. L-Type calcium channels: Highs and new lows. *Circulation Research* 2002; 90: 933-935.
29. Hille B. *Ionic channels of excitable membranes*. Second edition. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, 1992.