



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**MODELACIÓN MATEMÁTICA DE ANCLADO  
Y PRE-FUSIÓN VESICULAR EN SINAPSIS**

Tesis que presenta

**Ricardo Rosales Marines**

Para obtener el grado de

**Maestro en Control y Sistemas Dinámicos**

**Codirectores de la Tesis:**

Dra. Imelda Bonifas Arredondo

Dr. Eric Campos Cantón

San Luis Potosí, S.L.P., Noviembre de 2014



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Modelación matemática de anclado y pre-fusión vesicular en sinapsis**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Control y Sistemas Dinámicos fue elaborada por **Ricardo Rosales Marines** y aprobada el **tres de noviembre del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Matemáticas Aplicadas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dra. Imelda Bonifas Arredondo**  
Codirector de la tesis

**Dr. Eric Campos Cantón**  
Codirector de la tesis

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Jurado en el Examen

**Dr. Hugo Cabrera Ibarra**  
Jurado en el Examen



## Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en la División de Matemáticas Aplicadas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los doctores Imelda Bonifas Arredondo y Eric Campos Cantón.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 279391 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto CONACYT-Fondos Sectoriales-SEP No. 181002. y por el proyecto CONACYT Grant No. J-2007-84962.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 013 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Control y Sistemas Dinámicos está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 3 días del mes de noviembre del año 2014, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Marcial Bonilla Marín</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Imelda Bonifas Arredondo</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Eric Campos Cantón</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Hugo Cabrera Ibarra</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CONTROL Y SISTEMAS DINÁMICOS**

sustentó el C.

**Ricardo Rosales Marines**

sobre la Tesis intitulada:

*Modelación matemática de anclado y pre-fusión vesicular en sinapsis*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Imelda Bonifas Arredondo**  
**Dr. Eric Campos Cantón**

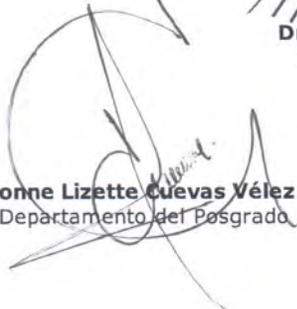
El Jurado, después de deliberar, determinó

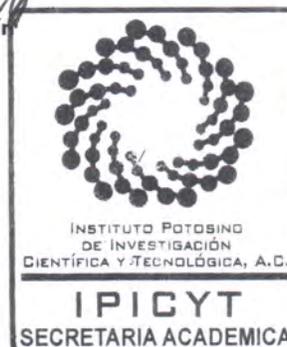
**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 13:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 3 días del mes de noviembre de 2014.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



*Dedicado a*

*Mi familia, que es mi fuente de inspiración.*

*Mis amigos, que son mis hermanos de batalla.*

*A ti, porque este no es el final, es solo el comienzo.*

# Agradecimientos

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado por medio de la beca No. 279391 para llevar a cabo mis estudios de maestría, al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por permitirme ser parte de esta grandiosa comunidad de científicos, investigadores y divulgadores que día a día contribuyen al desarrollo intelectual, científico y tecnológico de nuestro país y sobre todo a la división de matemáticas aplicadas por la confianza y el apoyo depositado en mi persona durante esta maravillosa etapa de crecimiento en mi vida.

A todos los doctores de la división, por sus atenciones, sus enseñanzas, por compartir su conocimiento y sabiduría. De manera especial al Dr. Eric Campos y la Dra. Imelda Bonifas, por todo su apoyo, consejos y experiencia aportados durante este viaje. Han aportado tanto a mi formación profesional y personal, que no tengo manera alguna de agradecerles.

Agradezco de manera inmensa a mi familia: a mis padres, que siempre han tenido un oído dispuesto para escuchar mis problemas, un buen consejo en los momentos de duda y un hombro en que apoyarme en los momentos difíciles, todo lo bueno que soy, es por ustedes. A mis hermanas, porque cada una a su manera, me han dejado grandes enseñanzas y lecciones de vida.

También agradezco a mis compañeros, a Ivone, Yuz, Jaime, Marco y Eber, por recorrer este camino junto a mí, por toda la ayuda y consejos durante esta maestría, por los momentos de risa y de nervios, por haberme permitido ser no solo su compañero, sino su amigo.

Finalmente quisiera agradecer de manera muy especial a mis amigos, a David, Kevin, Octavio, Miriam, Cintia, Esaú, Zenón, Lois, y todos aquellos que han convertido estos dos años no solo en una etapa de crecimiento académico y profesional, sino en una experiencia única en la vida. Sin ustedes estos dos años no hubieran sido lo mismo.

# Índice general

Constancia de aprobación de la tesis	iii
Créditos Institucionales	v
Acta de examen	vii
Dedicatorias	ix
Agradecimientos	x
Lista de figuras	xiii
Lista de cuadros	xv
Resumen	xvi
Abstract	xvii
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Sinapsis . . . . .	1
1.1.1. Exocitosis . . . . .	2
1.2. Esquema de la tesis . . . . .	3
<b>2. Transmisión sináptica</b>	<b>5</b>
2.1. Componentes de la sinapsis . . . . .	5
2.1.1. Zona activa . . . . .	5
2.1.2. Membrana plasmática de la célula . . . . .	6
2.1.3. Canales de calcio . . . . .	6
2.1.4. Vesícula sináptica . . . . .	8
2.1.5. Consorcios Vesiculares . . . . .	8
2.1.6. Citosol . . . . .	10
2.1.7. Citoesqueleto y redes de actina . . . . .	10
2.1.8. Complejo SNARE . . . . .	12
2.1.9. Entrada de calcio a la célula . . . . .	13
2.1.10. Translocación de vesículas sinápticas . . . . .	15
2.1.11. Anclaje Vesicular (Docking) . . . . .	16
2.1.12. Maquinaria mínima molecular para el anclado de vesículas . . . . .	17

2.1.13. Pre-fusión Vesicular . . . . .	18
2.1.14. MUNC-13 . . . . .	19
<b>3. Modelado Matemático</b>	<b>20</b>
3.1. Ensamble del complejo SNARE . . . . .	22
3.1.1. Varios complejos SNARE involucrados en una fusión . . . . .	22
3.1.2. Fuerza generada un complejo SNARE . . . . .	23
3.2. Resistencia Viscosa en el Citoplasma . . . . .	24
3.3. Fuerza de Van der Waals . . . . .	25
3.3.1. Interacción molécula-superficie infinita . . . . .	27
3.3.2. Interacción esfera-superficie infinita . . . . .	28
3.3.3. Interacción vesícula-membrana . . . . .	32
3.4. Repulsión electrostática . . . . .	33
3.4.1. Ecuación de Poisson-Boltzmann . . . . .	34
3.4.2. Longitud de Debye ( $k^{-1}$ ) . . . . .	37
3.4.3. Dos dobles-capas que se superponen . . . . .	39
3.4.4. Repulsión eléctrica entre una esfera y una superficie plana en distancias cortas . . . . .	40
3.5. Sumatoria de fuerzas . . . . .	41
<b>4. Resultados</b>	<b>43</b>
4.1. Análisis de las fuerzas intermoleculares . . . . .	43
4.2. Distancia mínima alcanzada durante el priming . . . . .	44
4.3. Simulaciones del sistema vesícula-membrana . . . . .	45
4.3.1. Simulaciones bajo una fuerza constante del complejo SNARE de 34 pN . . . . .	46
4.3.2. Simulaciones utilizando una función exponencial para repre- sentar el incremento de fuerza en el complejo SNARE . . . . .	49
4.3.3. Simulaciones utilizando una función escalonada para represen- tar el incremento de fuerza en el complejo SNARE . . . . .	50
<b>5. Discusión y Trabajo Futuro</b>	<b>52</b>
5.1. Discusión . . . . .	52
5.1.1. Con respecto a las fuerzas intermoleculares . . . . .	52
5.1.2. Posición final de la vesícula . . . . .	52
5.1.3. Tiempo de fusión y liberación . . . . .	53
5.1.4. Respecto a otros trabajos encontrados en la literatura . . . . .	53
5.2. Conclusiones . . . . .	54
5.3. Trabajo a futuro . . . . .	54
<b>A. Diagramas de bloques en Simulink</b>	<b>57</b>

# Índice de figuras

1.1. Esquema básico de la sinápsis [49]. . . . .	1
2.1. Zonas activas en una célula [1]. . . . .	5
2.2. Ilustración de una vesícula sináptica promedio. Notese las proteínas de membrana que esta presenta [30]. . . . .	8
2.3. Consorcios vesiculares [15]. . . . .	8
2.4. Actina . . . . .	12
2.5. Estados cis y trans del complejo SNARE . . . . .	18
3.1. Fuerzas actuantes en el modelo. . . . .	21
3.2. Diagrama de la interacción molécula-superficie. . . . .	27
3.3. Esquema para determinar el área de interacción en una esfera. . . . .	29
3.4. Diagrama de la interacción esfera-superficie. . . . .	30
3.5. Doble capa eléctrica. . . . .	34
3.6. Longitud de Debye. . . . .	37
3.7. Potencial eléctrico en dobles capas eléctricas superpuestas. . . . .	40
4.1. Gráfica de las fuerzas intermoleculares . . . . .	43
4.2. Gráfica de las fuerzas intermoleculares a una distancia menor a 1nm. . . . .	44
4.3. Posición de la vesícula sináptica bajo una fuerza constante de 34 pN de un único complejo SNARE. . . . .	46
4.4. Velocidad de la vesícula sináptica bajo una fuerza constante de 34 pN de un único complejo SNARE. . . . .	46
4.5. Posición de la vesícula sináptica bajo una fuerza constante de 34 pN de 3 complejos SNARE (102pN totales). . . . .	47
4.6. Velocidad de la vesícula sináptica bajo una fuerza constante de 34 pN de 3 complejos SNARE (102pN totales). . . . .	47
4.7. Posición de la vesícula sináptica bajo una fuerza constante de 34 pN de 10 complejos SNARE (340pN totales). . . . .	48
4.8. Velocidad de la vesícula sináptica bajo una fuerza constante de 34 pN de 10 complejos SNARE (340pN totales). . . . .	48
4.9. Posición de la vesícula sináptica bajo una fuerza exponencial de 3 complejos SNARE. . . . .	49
4.10. Velocidad de la vesícula sináptica bajo una fuerza exponencial de 3 complejos SNARE. . . . .	50
4.11. Fuerza generada por el complejo SNARE a través del tiempo. . . . .	50

4.12. Posición de la vesícula sináptica bajo una fuerza escalonada de 3 complejos SNARE. . . . .	51
4.13. Velocidad de la vesícula sináptica bajo una fuerza escalonada de 3 complejos SNARE. . . . .	51
A.1. Esquema de Simulink utilizando una fuerza constante de 34pN. . . . .	58
A.2. Esquema de Simulink utilizando una función exponencial para la fuerza. . . . .	59
A.3. Esquema de Simulink utilizando escalones de fuerza. . . . .	60

# Índice de cuadros

2.1. Composición de subunidades y función de los tipos de canales de $Ca^{2+}$ . [7] . . . . .	7
3.1. Concentración de iones y valencia para una célula eucariota. . . . .	38
4.1. Distancia mínima alcanzada por la vesícula sináptica . . . . .	45

# Resumen

Diferentes estímulos provocan una respuesta en la célula, involucrando muchas veces la secreción de diversas sustancias desde el interior de la célula hacia el medio externo que son captadas posteriormente por otra célula, desarrollando así un sistema de comunicación entre ambas. El proceso de secreción, conocido como exocitosis, es uno de los más importantes dentro de la célula y que involucra una serie de complejos pasos a nivel molecular. Dentro de este proceso se cuenta con la ayuda de un complejo proteico conocido como complejo SNARE, que tiene como principal función anclar y acercar las vesículas que contienen las sustancias a ser secretadas a la membrana plasmática de la célula. Si bien el área de la ciencia encargada de estudiar el fenómeno de la exocitosis ha sido objeto de un extenso estudio desde el punto de vista biológico y químico desde hace más de dos décadas, el proceso de exocitosis en células aún no ha sido descrito en su totalidad. Más aún, se han realizado muy pocos estudios de estos fenómenos desde el punto de vista físico-matemático. En el presente trabajo se propone un modelado de la dinámica de movimiento vesicular en el proceso docking/priming previo a la exocitosis de una vesícula sináptica por medio de leyes clásicas de la física y ecuaciones diferenciales, tomando en cuenta los principales factores físicos que comúnmente se han planteado intervienen en dicho fenómeno.

Palabras clave: Modelado, sinapsis, exocitosis, vesícula sináptica, SNARE, docking, priming.

# Abstract

Several stimulus unleash a reaction on the cell that many times involves the secretion of substances from inside the cell to the outside medium, developing a system of communication between both. This secretion process, known as exocytosis, is one of the most important inside the cell, and it involves a chain of complex steps at molecular level. This process is helped for a protein complex known as SNARE complex, which has as main function the docking of synaptic vesicles to the plasma membrane and subsequently priming and fusion between both membranes. Even though this area of science has been object of intense studies from the biological and chemical point of view for more of two decades, the process of exocytosis in cells is still not fully understood. Even more, there is almost none study of this phenomena from the physic and mathematical point of view.

In this work we propose a dynamical model of the vesicular movement in the docking/priming process that precedes vesicle fusion and neurotransmitter release through classic physic laws and differential equations that takes account of the principal forces and physical factors that has been told influences this phenomenon.

Keywords: mathematical model, SNARE, exocytosis, docking, priming, synaptic vesicle, biophysics.

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Sinapsis

Las sinapsis son las estructuras de transmisión de información básicas dentro del sistema nervioso. Estas pueden ser descritas como las conexiones existentes entre una célula presináptica y una célula postsináptica. La información transmitida llega hacia la terminal presináptica en forma de un potencial de acción y es transmitida a través de un neurotransmisor químico. Dentro de la terminal presináptica, el neurotransmisor será empacado dentro de vesículas sinápticas. Estas vesículas sinápticas serán liberadas en el medio exterior que se encuentra entre la célula presináptica y la célula postsináptica (grieta sináptica o «synaptic cleft») cuando un potencial de acción logre abrir un canal de calcio regulado por voltaje (voltage gated calcium channels), activando así los receptores postsinápticos presentes en la membrana plasmática de la célula postsináptica.

Estas sinapsis pueden ser vistas como dispositivos computacionales, es decir, no solo transmiten información mediante potenciales de acción, sino que también transforman esta información. La información sináptica es con frecuencia codificada por descargas o series de potencial de acción. Estos potenciales son procesados de manera específica por cada sinapsis, donde se llevan a cabo cambios en la liberación del neurotransmisor durante estas descargas[1] [2].

Las sinapsis varían de una a otra en sus propiedades, no solamente en términos del tipo de neurotransmisor, sino también en términos de otros parámetros básicos para la sinapsis, como la probabilidad de liberación de vesículas o la composición del postreceptor. Únicamente en el cerebro de los animales mamarios existen cientos de diferentes tipos de neuronas que forman y reciben sinapsis que presentan diferentes características que dependen de las neuronas pre sinápticas y postsinápticas. Como resultado tenemos cientos de tipos de sinapsis, que si bien operan con el mismo

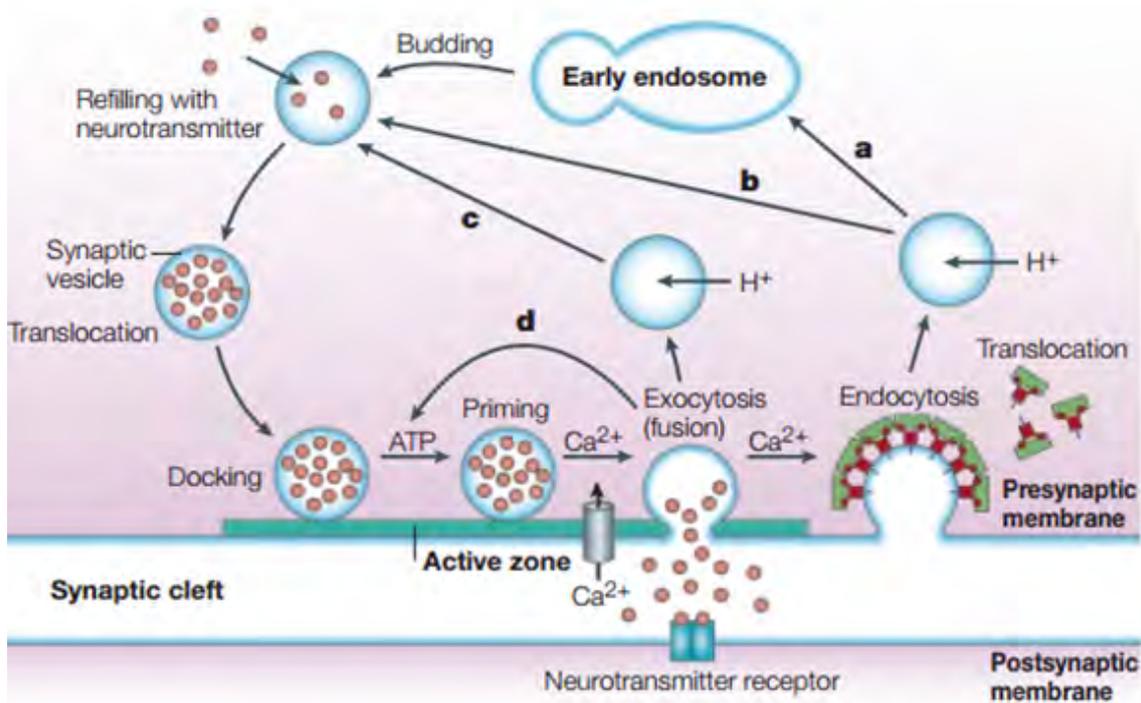


Figura 1.1: Esquema básico de la sinápsis [49].

resultado fundamental, presentan propiedades diferentes.

### 1.1.1. Exocitosis

La exocitosis es un proceso en el cual la membrana de una vesícula sináptica se fusiona con la membrana plasmática, resultando esto en la secreción del contenido vesicular hacia el exterior de la célula. En este proceso, los lípidos de ambas membranas se mezclan, formando eventualmente una única membrana. El contenido de las vesículas varía de célula a célula: Moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, proteínas y otras moléculas. Este contenido secretado puede ser utilizado como medio de comunicación con otras células o puede ser simplemente materia no deseada o peligrosa para la célula. La gran mayoría de las células son capaces de llevar a cabo la exocitosis, poniendo en claro que este proceso es de suma importancia para la célula. Vesículas sinápticas pequeñas se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido (neurotransmisores) en menos de un milisegundo del arribo de un potencial de acción al nervio terminal. La exocitosis de vesículas sinápticas es desencadenada por el flujo de iones calcio que entran por los canales de calcio regulados por voltaje. La mayor parte del tiempo de exocitosis es demandado en la apertura de estos canales. Dos tipos de secreción por exocitosis se pueden llevar a cabo en una célula, la secreción constitutiva y la regulada. La primera se lleva a cabo cons-

tantemente, mientras que la regulada tiene lugar únicamente cuando se presenta un estímulo específico interno o externo. Un ejemplo de este tipo de secreción es la liberación de neurotransmisor desde el nervio terminal. La membrana de las vesículas sinápticas contiene una gran cantidad de sustancias específicas, fisiológicamente activas. Atrapadas dentro de la vesícula, estas sustancias son preservadas de cualquier modificación que se pudiera dar debido a los componentes de la célula, es decir, las vesículas serán las encargadas de guardar y proteger estas sustancias. Como varias vesículas pueden contener la misma sustancia, la célula puede liberar grandes cantidades de cada sustancia en un periodo de tiempo pequeño gracias a la exocitosis regulada, logrando así un cambio rápido en la concentración de las sustancias del medio externo, facilitando reacciones rápidas en las células objetivo [3].

La exocitosis consiste principalmente de cuatro pasos: anclado, preparación, fusión y reciclaje (ver figura 1.1).

1. **Anclado (Docking).** El anclado es el proceso por medio del cual una vesícula sináptica queda anclada a la membrana plasmática por medio de proteínas especializadas para posteriormente llevar a cabo la fusión vesicular. El mecanismo molecular del docking aún no es del todo claro. Debido a que las vesículas únicamente se anclan a la membrana plasmática de la célula en la zona activa, algunos de los componentes de esta deben forzosamente estar involucrados en el docking, sin embargo, se piensa que no todos estos componentes han sido identificados.
2. **Preparación (priming).** Las vesículas que están ancladas no están inmediatamente listas para la exocitosis. Necesitan ser activadas para lograr fusionarse. Es decir, se debe dar un cambio en la configuración de las proteínas que anclaron las vesículas de tal forma que estas últimas entren en contacto con la membrana celular. Este proceso es llamado preparación o priming. A pesar de que el mecanismo de priming no es del todo claro, es muy posible que este involucre cambios conformacionales de las proteínas del complejo SNARE (Syntaxina 1, SNAP-25, y VAMP/sinaptobrevina) que están directamente involucradas en la exocitosis de vesículas.
3. **Fusión.** Se postula generalmente que la formación del complejo en forma de hélice empieza en las regiones terminal amino, extendiéndose hasta las regiones terminal carboxilo de las proteínas de manera similar a una cremallera. Esta estructura estable empuja a la vesícula sináptica hacia la membrana plasmática, llevando eventualmente a la fusión de ambas membranas. Estudios recientes han mostrado que se pueden tener al menos dos tipos de fusión: Una fusión total de ambas membranas o una fusión temporal (Kiss and run). Posteriormente, una pequeña estructura con forma similar a un tubo (poro de fusión, con un diámetro de 1-2nm) se forma temporalmente entre la vesícula y la membrana celular. Este poro permite la liberación de las sustancias contenidas en la vesícula sináptica. Este poro posteriormente se cierra y las vesículas

vuelven al citoplasma (*kiss and run*, o bien, estas colapsan totalmente en la membrana plasmática.

4. **Reciclaje.** Después de la exocitosis, las proteínas citosólicas NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) se unen a una parte del complejo SNARE, y disocian cada proteína SNARE para su reciclaje. Es importante señalar que, si bien estos fenómenos han sido extensamente estudiados durante las últimas décadas, a la fecha actual no se han presentado publicaciones que permitan describir cuantitativamente dichos fenómenos, i.e. no se han desarrollado modelos físico-matemáticos que permitan describir y predecir las diferentes etapas de la exocitosis.

## 1.2. Esquema de la tesis

Tomando en cuenta lo discutido en la presente introducción, la motivación de esta tesis es obtener un modelo físico-matemático que permita describir de la manera más sencilla posible algunos de los fenómenos fisiológicos previos a la fusión vesicular en la exocitosis, dando así un punto de vista de este proceso diferente al abordado en los trabajos químico-biológicos, y evaluando cuantitativamente la importancia de las diferentes fuerzas que se cree están involucradas en el mismo. Para lograr esto, se plantean los siguientes objetivos.

### Objetivo general.

Generar un modelo matemático que describa los mecanismos de anclaje y pre-fusión previos a la fusión vesicular en el fenómeno de exocitosis.

### Objetivos particulares.

- Caracterizar los parámetros y ecuaciones que representen el comportamiento de los diferentes factores presentes en la preparación y anclaje vesicular.
- Simular numéricamente el modelo matemático obtenido.
- Comparar los resultados arrojados por las simulaciones con los datos observados experimentalmente.

El contenido de esta tesis estará dividido de la siguiente manera: Durante el capítulo 2 abordaremos los conceptos biológicos y químicos que son necesarios para comprender el proceso de exocitosis, haciendo particular énfasis en el anclaje y pre-fusión vesicular, así como en los aspectos fisiológicos que envuelven a este proceso, y que nos permitirán determinar cuáles serán las consideraciones que necesitaremos hacer al

momento de efectuar la modelación del mismo. En el capítulo 3 mostraremos la modelación matemática que se llevó a cabo para describir el fenómeno docking/priming en la zona presináptica. En el capítulo 4 se mostrarán y discutirán los resultados obtenidos de la simulación computacional del sistema de ecuaciones diferenciales obtenido en el capítulo anterior. Asimismo comprobaremos los resultados obtenidos de las simulaciones con los datos experimentales reportados en la literatura científica. Finalmente, en el capítulo 5 expondremos las conclusiones y propondremos algunos puntos de interés para abordarse posteriormente como trabajo a futuro.

# Capítulo 2

## Transmisión sináptica

### 2.1. Componentes de la sinapsis

#### 2.1.1. Zona activa

La exocitosis de vesículas en la sinapsis está restringida a una pequeña sección de la membrana plasmática presináptica que contiene material con alta densidad de electrones, así como una gran cantidad de proteínas de anclaje, la cual es designada como zona activa. Estructuralmente, la zona activa es descrita como el área de la membrana plasmática presináptica, donde las vesículas sinápticas pueden fusionarse y se da la liberación regulada de neurotransmisor. La zona activa tiene como principal función el transformar un potencial de acción presináptico en una señal de neurotransmisor liberada. Típicamente, la zona activa puede ser descrita como un disco que posee un diámetro de varios cientos de nanómetros y raramente exceden un área de 0.4 micras cuadradas. Las sinapsis especializadas poseen diferentes zonas de diferentes medidas y formas adaptadas a cada función particular. En las sinapsis centrales de vertebrados, las zonas activas son estructuras con forma de disco con un diámetro entre 2 y 5 micras. Dentro de las zonas presinápticas se desarrollan cuatro funciones principales en la liberación de neurotransmisores. En primer lugar, se anclan y preparan las vesículas sinápticas, i.e., son una parte intrínseca de la maquinaria de fusión vesicular. Segundo, en las zonas activas enganchan los canales de calcio regulados por voltaje a la membrana plasmática para permitir una rápida sincronización de excitación-respuesta. Tercero, las zonas activas contribuyen a la localización precisa de pre y post especializaciones sinápticas exactamente opuestas una a la otra por medio de moléculas de adhesión celular transsináptica. [1] [4].

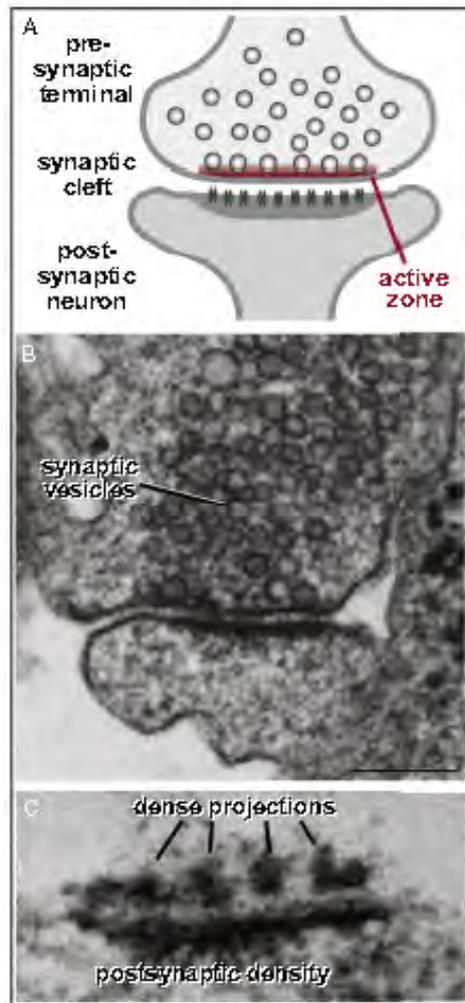


Figura 2.1: Zonas activas en una célula [1].

### 2.1.2. Membrana plasmática de la célula

### 2.1.3. Canales de calcio

La entrada de iones calcio a través de canales de calcio «voltage-gated» ( $ca_v$ ), es la que inicia la liberación de neurotransmisores, a través de una depolarización de membrana en respuesta a un potencial de acción. El calcio entrante a través de estos canales sirve como segundo mensajero de una señal eléctrica, iniciando varios eventos celulares de diferente naturaleza. Existen múltiples mecanismos que directa o indirectamente modulan la función de estos canales presinápticos y, por consecuencia, regulan la transmisión sináptica. La neuromodulación afecta la capacidad de estos canales para abrirse, cerrarse o inactivarse en respuesta a una depolarización de membrana y alterar su respuesta a diferentes impulsos de una manera dependiente de la actividad[6] [7].

En muchos tipos diferentes de células secretoras, los iones Calcio entran a la célula a través de los canales de calcio regulados por voltaje, regulando así la actividad enzimática, la expresión genética, y otros procesos bioquímicos. Por ejemplo, en las células endocrinas los canales de calcio regulan la entrada de calcio que inicia la secreción de hormonas. Es por esto que los canales de calcio regulados por voltaje son la parte clave en la transducción de señales eléctricas, convirtiendo una señal eléctrica de un potencial de acción presente en la superficie de la membrana plasmática en un transitorio de iones calcio dentro de la célula. La transducción de señales eléctricas en diferentes tipos de células envuelve diferentes subtipos moleculares de canales de calcio regulados por voltaje[7].

Las corrientes de calcio en diferentes tipos de células tienen diversos roles fisiológicos así como propiedades farmacológicas, así que una nomenclatura alfabética ha evolucionado para identificar a las distintas clases de corrientes de calcio. Las corrientes de tipo-N, tipo P/Q y tipo-R requieren una fuerte depolarización para la activación, y son bloqueadas por toxinas polipeptídicas observadas en algunos insectos como las arañas [6]. El calcio que entra por un canal puede desencadenar la liberación de vesículas sinápticas, y la exocitosis de estas depende del ensamblaje del complejo SNARE (del que se hablará más adelante), en el cual, las proteínas SNARE asociadas-Sinaptobrevinas, interactúan con dos proteínas SNARE de la membrana plasmática: la SNAP-25 y la sinaptotagmina. Además de unir los canales de calcio presináptico a la maquinaria liberadora de vesículas, la syntaxina-1 y el SNAP-25 regulan la función del canal. La coexpresión de estas proteínas con los canales de calcio reducen la disponibilidad de los canales para abrir y cambiar la dependencia de voltaje de inactivación hacia potenciales de membrana más negativos [6].

Los canales de calcio están formados por un complejo de proteínas de subunidades múltiples, consistente de una subunidad  $\alpha$  formadora de poros, junto con muchas otras proteínas auxiliares, las cuales incluyen a la subunidad intracelular  $\beta$  y una subunidad enlazada a un disulfuro  $\delta$ . Adicionalmente, en algunos tejidos una subunidad extra puede existir, esta es la subunidad transmembranal  $\gamma$ , la cual es parte del complejo del canal en el músculo esquelético.

Los canales de calcio pueden ser clasificados de acuerdo a su rango de activación en dos grandes grupos: uno que posee un bajo umbral de activación («LVA channels»; «Canales T») y los otros, que tienen un alto umbral de activación («HVA Channels»; canales L,N,P/Q y R) [8]. En el cuadro 2.1 se muestran los diferentes tipos de canales así como algunas de sus funciones fisiológicas. Como podemos apreciar, para la exocitosis de vesículas estaremos hablando de canales de calcio P/Q y R.

#### 2.1.4. Vesícula sináptica

Las células eucariotas poseen en su interior organelos rodeados por membranas que se comunican a través del tráfico membranal. Mientras que algunos de

Tipo de Corriente de $Ca^{2+}$	Subunidades $\alpha 1$	Bloqueador Específico	Principales Funciones Fisiológicas
L	$Ca_v1.1$	DHPs	Excitación y contracción del músculo esquelético, regulación de la transcripción
	$Ca_v1.2$	DHPs	Excitación y contracción en el músculo cardiaco y suave, secreción endocrina, transitorios de $Ca^{2+}$ en células del cuerpo y dendritas, regulación de la actividad enzimática, regulación de la transcripción
	$Ca_v1.3$	DHPs	Secreción endocrina, marcapasos cardiaco, transducción auditiva, transitorios de $Ca^{2+}$ en células del cuerpo y dendritas.
	$Ca_v1.4$	DHPs	transducción visual.
N	$Ca_v2.1$	$\omega - CTx - GVIA$	Liberación de neurotransmisor, transitorios de calcio en dendritas
P/Q	$Ca_v2.2$	$\omega - Agatoxin$	Liberación de neurotransmisor, transitorios de calcio en dendritas
R	$Ca_v2.3$	SNX-482	Liberación de neurotransmisor, transitorios de calcio en dendritas
T	$Ca_v3.1$	ninguno	liberación repetida
	$Ca_v3.2$		liberación repetida
	$Ca_v3.3$		

Cuadro 2.1: Composición de subunidades y función de los tipos de canales de  $Ca^{2+}$ . [7]

estos organelos realizan fusión o fisión por ellos mismos, normalmente el transporte y comunicación entre diferentes organelos se lleva a cabo por medio de vesículas especializadas. Estas vesículas viajan desde el organelo precursor hasta el compartimiento objetivo, donde se anclan para posteriormente fusionarse con la membrana del mismo. Las vesículas transportan material desde el organelo donante hasta el receptor o bien, hasta el medio extracelular. Estas pequeñas vesículas, que poseen generalmente una forma esférica y cuentan con diámetros entre 40 y 80nm, pueden ser consideradas como la unidad mínima básica del tráfico membranar. El transporte de vesículas, el anclado, la preparación y la fusión, cada uno de ellos involucra el reclutamiento ordenado y secuencial de complejos protéicos desde el citoplasma. Los constituyentes membranales de este organelo son los últimos responsables de todas estas tareas. A pesar de que muchas de las proteínas involucradas en estos procesos ya han sido identificadas, aún no se conoce por completo la estructura integral de la membrana. Las vesículas sinápticas se encuentran concentradas en la terminal nerviosa presináptica de cada neurona. Ellas almacenan neurotransmisores y son liberadas en la exocitosis bajo la acción de un flujo de iones calcio que llega en la forma de un potencial de acción. Después de la exocitosis, estas vesículas fusionadas regresarán al citosol vía exocitosis y serán recicladas para generar nuevas vesículas para la exocitosis.

### 2.1.5. Consorcios Vesiculares

El aumento en la concentración de calcio intracelular es el desencadenante para la fusión de vesículas con la membrana plasmática. En términos fisiológicos, el calcio fluye del espacio extracelular a través de los canales regulados por voltaje presinápticos, los cuales se abren debido a la depolarización de la membrana presináptica ante la llegada de un potencial de acción. Experimentos ópticos y fisiológicos con una resolución alta han permitido mostrar la distinción de vesículas en diferentes estados de maduración con respecto a la fusión, los llamados consorcios vesiculares o vesicle pools [15].

#### Consortio de liberación rápida (Ready Release Pool) y liberación lenta (Slow Release Pool)

Un análisis detallado del registro del incremento de la capacitancia dentro del primer segundo de la liberación de calcio ha permitido revelar la presencia de dos consorcios de vesículas listas para liberarse con diferentes cinéticas. Las vesículas que se fusionan primero con un tiempo constante de entre 20 – 40ms (en una concentración de calcio de  $20\mu M$ ) pertenecen al consorcio de liberación rápida (RRP) y dan el componente de liberación rápida. Después, las vesículas del consorcio de liberación lenta (SRP) se fusionan con un tiempo constante de 200 ms (en una concentración de calcio de  $20\mu M$ ) y median el componente de liberación lenta. Cabe resaltar que

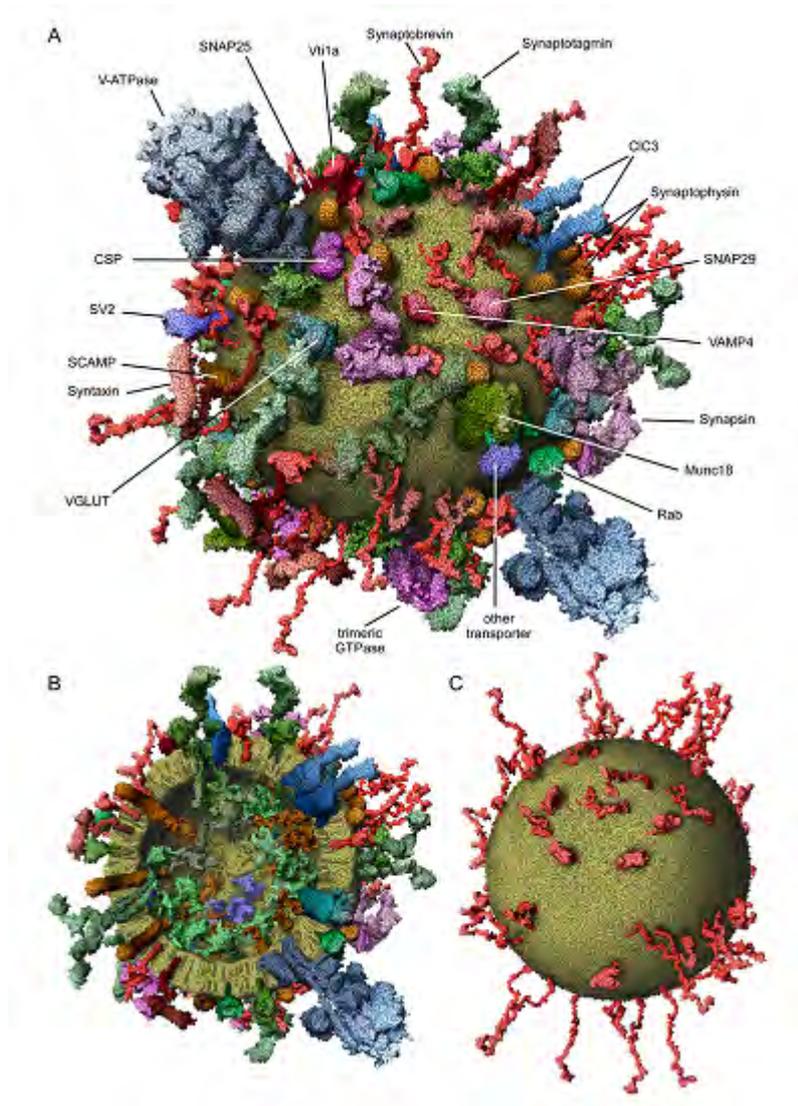


Figura 2.2: Ilustración de una vesícula sináptica promedio. Note las proteínas de membrana que esta presenta [30].

estos datos han sido registrados en células cromafines. En otro tipo de células los tiempos de exocitosis de los diferentes consorcios variarán. Aunque ambos consorcios pueden ser liberados ante una alta concentración de calcio, un estímulo fisiológico, como el arribo de un potencial de acción, únicamente provocará la liberación de la RRP. En una concentración de calcio en estado de reposo, es decir, cuando no hay ninguna señalización externa a la célula, se estima un número de aproximadamente 150 vesículas para cada consorcio.

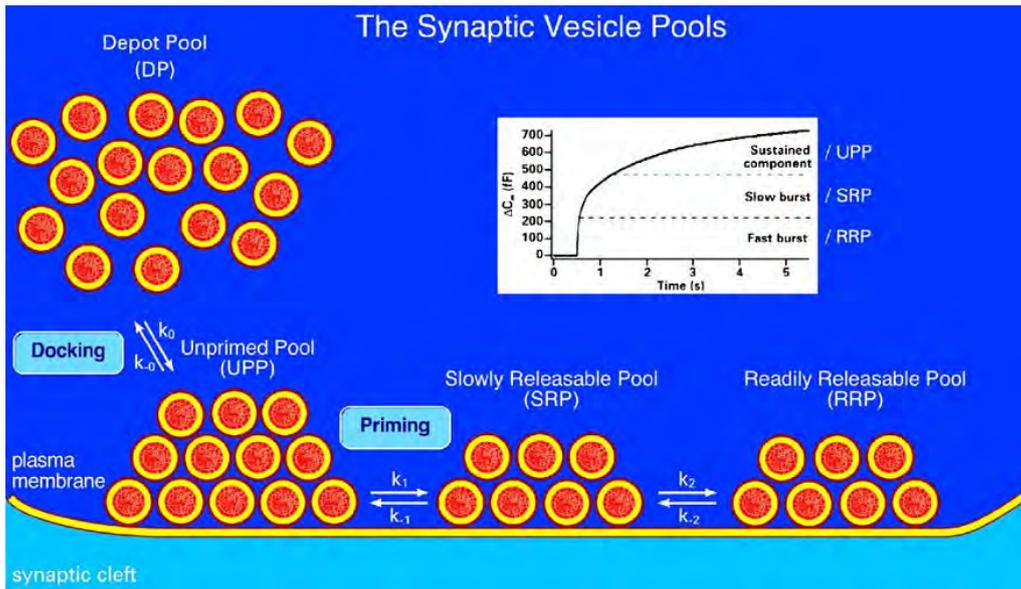


Figura 2.3: Consorcios vesiculares [15].

### Consortio de vesículas no preparadas (Unprimed Pool)

Los dos consorcios de liberación, RRP y SRP son rellenos desde este consorcio, mediante un proceso llamado preparación (priming). El tamaño de este consorcio es obtenido contando el número de vesículas dentro de los primeros 200nm al interior de la célula partiendo de la membrana plasmática en las micrografías electrónicas y sustrayendo el número de vesículas adyacentes a la membrana plasmática. El tamaño de este depósito depende de la fase de la sinapsis. En células cromafines adultas en reposo, este número se estima en alrededor de 750 vesículas. Este consorcio lleva a cabo el componente sostenido en la respuesta de la capacitancia de la membrana frente a una liberación de calcio. Este componente mantenido es lineal.

### Consortio de Depósito (Depot Pool)

El consorcio de depósito, o depot pool (DP) representa el consorcio más grande en células cromafines. Está definido como el número de vesículas sinápticas que se encuentran a una distancia mayor a 200nm de la membrana plasmática. El tamaño de este depósito es, como en el caso del RRP, dependiente de la fase de desarrollo de la sinapsis. En células cromafines de ratón, estimaciones conservadoras sitúan el DP en alrededor de 2000 vesículas. Estas vesículas son usadas para rellener los consorcios cercanos a la membrana plasmática, cuando se lleva a cabo el proceso de exocitosis [15].

## 2.1.6. Citosol

El citosol es la parte líquida del citoplasma que está comprendida entre la membrana celular y la membrana nuclear. Dentro de este se encuentran la mayoría de los organelos celulares. El citosol está compuesto por aproximadamente 85 por ciento de agua, y dentro de este encontramos una gran cantidad de proteínas, iones, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. La principal función de este es contener a los organelos celulares, sirviendo también como almacén para lípidos, azúcares, aminoácidos, etc. Dentro del citosol podemos encontrar al citoesqueleto, que es la matriz de filamentos encargada de dar soporte y estructura a la célula.

## 2.1.7. Citoesqueleto y redes de actina

Durante años pasados, la evidencia experimental ha sugerido que el citoesqueleto de la célula cortical puede estar envuelto en la secreción regulada. Mucha de esta investigación ha sido realizada en células cromafines de ratón y bovino. Estas células guardan sus productos secretorios en las vesículas cromafines, y, gracias a una estimulación, el contenido soluble de estas vesículas es liberado al espacio extracelular via exocitosis. A pesar de que el estudio del rol del citoesqueleto en las secreciones aún no ha sido completamente dilucidado, diversa evidencia experimental sugiere que las redes de filamento de actina en la periferia de la célula pueden representar una influencia inhibitoria en la exocitosis, y su remoción y/o reorganización puede preparar a la célula para el proceso de secreción. Diversos experimentos han mostrado que después de un desensamble de los filamentos de actina, un número mayor de vesículas cromafines fueron liberadas para alcanzar la membrana plasmática [10]. El citoesqueleto juega un papel fundamental en prácticamente todos los procesos biológicos celulares en eucariotas, desde la división celular y motilidad celular hasta el tráfico intracelular de organelos. Esta red red citoesquelética esta compuesta principalmente por tres tipos de filamentos de proteínas:

- Filamentos de actina
- Microtúbulos
- Filamentos Intermedios

Cada uno de estos poseen propiedades bioquímicas y biofísicas únicas. El remodelamiento de estos filamentos por múltiples e intrincadas señales, que actúan a través de vías de señalización conservadas, permiten al citoesqueleto controlar la enorme diversidad de formas en células eucariotas, y más aún, modificar los comportamientos dinámicos celulares [11].

## Organización del citoesqueleto en las terminales presinápticas

La actina es un componente crítico del citoesqueleto de todas las células eucariotas y participa en muchos eventos fisiológicos. Se ha propuesto que la actina juega un papel importante en la sinapsis, mas sin embargo, la evidencia científica que respalda esta noción es escasa. Los microtúbulos y los filamentos de actina están presentes en las terminales presinápticas, pero su localización en el citoplasma es diferente. En general, los microtúbulos no alcanzan la zona activa, y son encontrados más frecuentemente en el centro de las terminales. La matriz citoplasmática de las zonas activas muestra una textura más densa que en el dominio central, por lo tanto, los microtúbulos no regulan directamente la morfología o función de la sinapsis [12]. Cerca de la membrana plasmática, al menos 3 tipos diferentes de filamentos forman una red que está intercalada entre las vesículas sinápticas [11].

1. **Filamentos de Actina.** Los filamentos de actina son fibras flexibles de aproximadamente 6 o 7 nm de diámetro y hasta varios micrómetros de longitud, que recorren de manera aleatoria zonas cercanas a la membrana plasmática. Estos filamentos pueden ser identificados como actina debido a que ellos están decorados por el fragmento central de unión de actina, la miosina-1. El ensamblado o desensamblado de estos filamentos, sus cruces y sus interacciones con otras estructuras están regulados por una serie de proteínas ensambladoras.
2. **Vínculos de sinapsina.** Los filamentos de actina no están en contacto con las vesículas sinápticas pero se encuentran unidos a estas vesículas por medio de pequeños «vínculos» que tienen una longitud de 30nm. Esta segunda clase de filamentos también sirven para reticular vesículas sinápticas y para unir a las vesículas con la tercera clase de filamentos, descrita a continuación. Algunas líneas de evidencia sugieren que estos vínculos están compuestos de sinapsina, una fosfoproteína asociada con la membrana de la vesícula sináptica.
3. **Hilos de fodrina** Una tercer clase de filamentos no contiene la cabeza de miosina y, por lo tanto, no están compuestos por actina. Estos filamentos se extienden desde la zona activa hasta el citoplasma presináptico, donde son asociados con vesículas sinápticas mediante filamentos de sinapsina. Basados en sus dimensiones (de aproximadamente 100nm de largo) se ha propuesto que estos filamentos están hechos de fodrina (o caldespectrina).

En adición a estas bien definidos estructuras de filamentos, la microscopía electrónica ha revelado la presencia de un material amorfo que se acumula específicamente en las zonas activas. Tres proteínas excepcionalmente grandes de la matriz presináptica: piccolo, basson y Aczonina, pueden ser parte de este material amorfo. En resumen, a pesar de que la organización estructural y composición molecular del citoesqueleto presináptico esta siendo cada vez más clara, todavía resta mucho por conocer acerca de cómo las proteínas del citoesqueleto producen la elaborada estructura de las terminales presinápticas [11].

## Estructura molecular de la actina

La actina puede existir en dos estados dentro de la célula: como filamentos de dos cadenas helicoidales (F-actina), o como monómeros (G-actina), los cuales proveen los bloques de construcción para el ensamblaje de actina. Los filamentos de actina son asimétricos, y los monómeros de actina se adhieren más rápidamente por el lado «barbudo» del filamento que por el lado «puntiagudo» del mismo (esta nomenclatura se debe a la forma de flecha que adquieren las cabezas de miosina que decoran los filamentos de actina). Un par de propiedades fundamentales de la actina son significativas para su dinámica de comportamiento. Primeramente, la F-actina se ensambla por medio de interacciones covalentes débiles de la G-actina. Esta propiedad permite que los filamentos rápidamente se ensamblen y desensamblen, lo cual se requiere para una rápida remodelación del citoesqueleto de actina en respuesta a estímulos cambiantes. Segundo, el balance entre F-actina y G-actina en regiones subcelulares está en constante flujo. Conforme los filamentos se van formando, la concentración de monómeros disponibles cae hasta que una concentración crítica de G-actina es alcanzada, esto es, cuando las tasas netas de ensamblaje y desensamblaje de filamentos están en un estado estacionario [12].

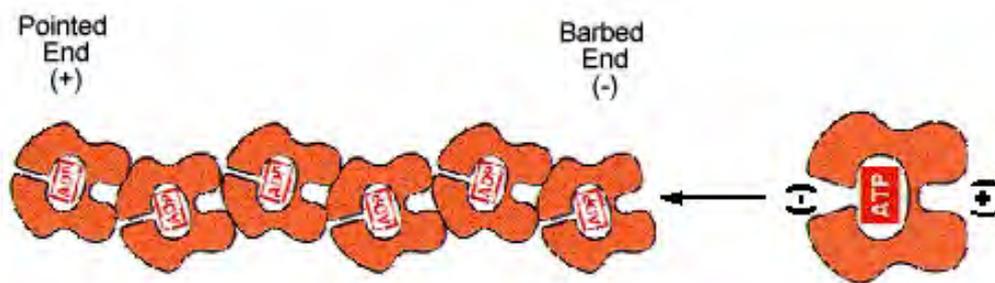


Figura 2.4: Actina

Los monómeros de actina son moléculas polarizadas, con un extremo barbudo con carga positiva o *barbed end* y un extremo puntiagudo o *pointed end* con carga negativa. El extremo puntiagudo de un monómero de actina se une por medio de ATP al extremo barbudo de otra.

Una serie de proteínas de enlace de actina (ABPs por sus siglas en inglés) afectan el remodelamiento de la actina en diferentes formas, resultando en una variedad de estructuras de filamentos de actina. Por ejemplo, algunas ABPs actúan como agrupadoras de actina o proteínas de enlace que llevan a la formación de agregados estrechos o de redes de filamentos de actina de 2 o 3 dimensiones. Algunos otros, como la gelsolina y la cofilina, afectan la polimerización y depolimerización de actina. Mas allá de ser moléculas estructurales que ayuden en la organización del citoesqueleto, las ABPs son objeto de una multitud de señales en cascada de origen intra-celular [12]. Algunos experimentos han sugerido que el citoesqueleto de actina forma estructuras parecidas a tubos huecos durante la exocitosis, de aproximadamente 300-400 nm de largo, a través de las cuales las vesículas se mueven hasta

llegar a la zona activa. [17].

### 2.1.8. Complejo SNARE

Las proteínas SNARE (acrónimo para «soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment Protein Receptor») son una larga familia de proteínas presentes principalmente en animales mamarios. La función principal de las proteínas SNARE es mediar la fusión vesicular, esto es, la exocitosis de vesículas de transporte al fusionarse estas con la membrana plasmática de la célula. Los SNAREs pueden ser divididos en dos categorías: Los SNARE vesiculares o v-SNAREs, que están incorporados en las membranas de las vesículas de transporte, y los t-SNAREs, que están localizados en la membrana objetivo. Las vesículas sinápticas son captadas en la zona activa en la membrana presináptica, pero no se fusionan instantáneamente. En su lugar, algunas vesículas son ancladas en la zona activa a la espera de un potencial de acción. La exocitosis se lleva a cabo en promedio 0.2ms después de que llega un flujo de calcio en forma de potencial de acción. También existe un estado de fusión pasivo de una sinapsis por minuto aún en ausencia de potenciales de acción. A este tipo de secreción se le conoce como secreción constitutiva. A pesar de ser extremadamente rápida, la liberación de neurotransmisor es un proceso probabilístico, con solo un evento de fusión por varias señalizaciones de calcio. Las proteínas SNARE están ligadas directamente a la liberación de iones calcio, mayormente en conjunto con un sensor de calcio. Muchas proteínas auxiliares han sido descubiertas ser esenciales para la liberación de neurotransmisor dependiente de calcio, como la sinaptotagmina, complexina, Munc 18 y Munc 13. Aunque la investigación deja poco lugar a dudas de que la sinaptotagmina es un sensor de calcio, el mecanismo de acción de la maquinaria de fusión sinaptotagmina-SNARE-membrana aún está siendo investigado [24].

La fusión de la bicapa lipídica de la membrana plasmática con la micela de la vesícula sináptica y la formación del poro de fusión es llevada a cabo por las proteínas SNARE. Estas proteínas se encuentran presentes individualmente tanto en la vesícula (v-SNARE) como en la membrana plasmática (t-SNARE) en un estado desdoblado. Estas proteínas pueden espontáneamente ensamblarse en un conjunto de 4 proteínas con forma de  $\alpha$  hélice, la cual es altamente estable (llamado complejo SNARE trans). Este complejo SNARE contiene tres hélices  $Q_a, Q_b, Q_c$  que son t-SNARE y una hélice v-SNARE. Se ha propuesto que el ensamble del complejo SNARE se lleva a cabo progresivamente desde el extremo terminal amino hasta la terminal carboxilo de las cuatro hélices que conforman al complejo. Dicho ensamble aproxima ambas membranas hasta estar próximas la una de la otra y puede provocar cambios en su curvatura. Se piensa que la energía liberada en el ensamble del complejo SNARE es transformada en una fuerza catalítica que promueve la unión de ambas membranas. [9] [47].

### 2.1.9. Entrada de calcio a la célula

La concentración de calcio intracelular tiene un rol sumamente importante en el desencadenamiento de la liberación de neurotransmisores y la regulación de la plasticidad de corto término. La transmisión sináptica es iniciada cuando un potencial de acción invade una terminal nerviosa, abriendo los canales de  $Ca^{2+}$ , lo que desencadena un alto incremento en la concentración de calcio en una zona altamente localizada, la zona activa. Los iones de calcio son los responsables de desencadenar la exocitosis de vesículas, y de ahí, liberando los neurotransmisores contenidos en estas vesículas e iniciando la transmisión sináptica [23]. En general, los estudios electrofisiológicos de la liberación de neurotransmisor han mostrado que un potencial de acción presináptico esta sumamente acoplado a un flujo de  $Ca^{2+}$  y asimismo a la fusión de vesículas, esto quiere decir, que el calcio desencadena la fusión vesicular en microsegundos, o incluso probablemente en menos de 100 microsegundos [23]. En estado estacionario, el citosol de la célula tiene una concentración de aproximadamente  $0.1\mu M$  mientras que la concentración externa se encuentra alrededor de  $1000\mu M$ , así como dentro del retículo endoplásmico, y esto, en consecuencia, produce gradientes de concentración que favorecen la difusión de los iones de calcio hacia el citosol. Este gradiente es mantenido por la acción de las ATP-*asas* en la membrana plasmática y los intercambiadores sodio/calcio. De una manera general, el estado estacionario de largo plazo de los iones libres de calcio en el citosol depende exclusivamente del equilibrio entre las tasas de los mecanismos de entrada y salida de calcio a través de la membrana plasmática, de hecho, cualquier modulación o perturbación en la actividad de los organelos que acumulan o liberan calcio, sólo afectan la concentración de calcio citosólica de una manera transitoria. [16]. Un potencial de acción desencadena una liberación corta de neurotransmisor (la llamada respuesta síncrona) seguido de una liberación decadente (liberación asíncrona), que es de cerca de dos órdenes de magnitud mas pequeña en términos de la tasa de liberación de vesículas. Estas respuestas asíncronas pueden acumularse durante una serie de potenciales de acción, en particular en algunos tipos de células inhibitorias. Durante un tiempo prolongado de inactividad las tasas de liberación pueden decaer hasta un nivel cercano al de liberación espontanea, que da lugar a corrientes postsinápticas muy pequeñas [5].

Los incrementos de la concentración local de calcio no solamente son regulados por la entrada de calcio mediante los canales de calcio regulados por voltaje, sino que también se secuestra y libera calcio desde el retículo endoplasmático y la mitocondria. El citosol tiene una capacidad receptora de calcio de aproximadamente  $4\text{mmol/l}$  de células. El coeficiente de actividad es de aproximadamente  $1/40$  en células cromafines de bovinos. El coeficiente de difusión bidimensional es de aproximadamente  $40\mu m^2/s$  y muestra heterogeneidades en el entorno en la membrana plasmática, generando los llamados microdominios, en una zona cercana a la boca de los canales de calcio. En estas zonas la concentración de calcio puede alcanzar valores cercanos a  $10\mu M$  y hasta  $100\mu M$ . Debido a la rápida difusión de calcio hacia el citosol, esto microdominios están severamente restringidos en tiempo y espacio.

Las vesículas contienen una gran cantidad de calcio, pero el intercambio a través de su membrana es demasiado lento para contribuir a la concentración de calcio que se genera transitoriamente en el citosol. El retículo endoplasmático se puede comportar como un único consorcio homogéneo sensible a la thapsigargina, desde el cual se puede liberar calcio a través de receptores de ryanodina. La entrada de calcio por medio de canales regulados por voltaje activa la liberación desde el retículo endoplasmático. El transporte de calcio en la mitocondria es llevado a cabo por el uniporte de calcio, un sistema de alta capacidad y baja afinidad. La fuerza motora en este transporte es el potencial de la membrana de la mitocondria, el cual promueve una acumulación de calcio dentro de la mitocondria en órdenes de hasta 6 veces la concentración de calcio externa. Mucho del flujo de calcio que entra a la mitocondria en regiones submembranales se puede difundir a través de la matriz de la mitocondria a otros lugares de la célula y eventualmente ser extruido desde la mitocondria cerca del núcleo. Se ha demostrado que, para depolarizaciones sostenidas de la membrana plasmática con una alta concentración de potasio, el 90 por ciento de la carga de calcio es tomada por la mitocondria durante el periodo de estimulación. Una vez que esta estimulación ha cesado, el calcio almacenado en la mitocondria es liberado hacia el citosol durante un periodo de segundos o minutos. La concentración de calcio en el citosol se mantiene relativamente elevada durante este periodo, y esto puede ayudar a las vesículas sinápticas a moverse de la DP hacia la membrana, donde estarán listas para su uso en la siguiente sinápsis. La homeostasis de calcio en cada momento es definida por flujos entre tres compartimientos: El medio extracelular, el citosol y los organelos almacenadores de calcio. En reposo, estos flujos son bajos, con tasas de cambio cercanas a  $1 - 10 \mu M / l \text{ de célula por segundo}$  en la membrana plasmática y el retículo endoplasmático. El uniporte desde la mitocondria es muy lento debido a la poca afinidad del calcio a este sistema de transporte y sus cinéticas exponenciales. La concentración de calcio libre en estado estacionario está en el rango de  $10^{-7} M$  en el citosol y la matriz mitocondrial y cerca de  $10^{-3}$  en el medio extracelular y dentro del retículo endoplasmático [8].

### 2.1.10. Translocación de vesículas sinápticas

#### Participación del citoesqueleto en la translocación de vesículas sinápticas

Muchas investigaciones morfológicas han mostrado que el citoplasma de las células de animales mamarios está altamente organizado y compartimentalizado por el citoesqueleto. Esta compartimentalización toma una parte importante en el proceso de comunicación sináptica y transducción de señales. Una célula recibe señales químicas externas por medio de moléculas receptoras o bien a través de estímulos eléctricos en los canales de membrana. Varios procesos de transducción de estas señales son llevados a cabo en el citoplasma. Finalmente, la célula libera hormonas o neurotransmisores (almacenados en vesículas sinápticas) por medio de un evento de secreción. Estas vesículas deben entrar en contacto con la membrana plasmáti-

ca y fusionarse con ella antes de la liberación de su contenido [21]. En estado de reposo, estas vesículas están muy juntas o unidas a unas densas redes citoesqueléticas. Diversas investigaciones han demostrado que estas redes están compuestas de filamentos de actina, por ejemplo en las células cromafines y en las terminales nerviosas presinápticas [21]. El citoesqueleto de filamentos de actina presente en el citosol, representa un control negativo para la secreción, y debe ser depolimerizado para permitir la exocitosis de vesículas en células cromafines [20]. Una de las características más importantes de la liberación de neurotransmisores es que ocurre a una tasa muy alta. Por ejemplo, dentro de 5ms pueden fusionarse más de 20 vesículas sinápticas dentro de la membrana plasmática en una sola zona activa en una sinapsis neuromuscular. Esta velocidad de fusión viene dada en parte, porque una cantidad substancial de vesículas sinápticas se encuentran ancladas a la membrana plasmática y preparadas para la fusión antes de que la neurona sea estimulada. Estas vesículas sirven como la RRP para la liberación de neurotransmisor. Debido a este arreglo espacial, la depolimerización de la red de actina puede no ser necesaria para que se lleve a cabo una sinapsis, sin embargo, durante una actividad sináptica prolongada el número de vesículas sinápticas que se fusionan con la membrana plasmática puede exceder el número de vesículas existente en la RRP. Así, para volver a llenar la RRP de vesículas sinápticas debe haber una DP y se deben movilizar esas vesículas. La reposición de vesículas puede ser llevada a cabo por el citoesqueleto y una serie de motores asociados, que mueven las vesículas sinápticas a los sitios de fusión. El citoesqueleto de actina ha sido propuesto para llevar a cabo ese papel. A pesar de que no existen demostraciones directas de la participación del citoesqueleto de actina en la movilización de vesículas sinápticas, muchos experimentos sugieren que los filamentos de actina pueden estar involucrados en la reposición de vesículas a la RRP durante actividad sináptica intensa. Más aún, esta evidencia sugiere que el ensamblado y desensamblado de los filamentos de actina puede controlar el equilibrio entre la RP y la RRP de vesículas sinápticas [11]. Antes de llegar a la exocitosis, las vesículas deben moverse desde la RP hasta la RRP. Se han propuesto dos distintos puntos de vista de como la actina promueve esta translocación. Primeramente, la actina puede proveer caminos a través del citoesqueleto que guíen el movimiento de las vesículas sinápticas hasta la RRP por medio de motores moleculares basados en actina. En segunda, la actina puede formar una barrera entre la RP y la RRP que es degradada únicamente mediante señales intracelulares que dependen de la actividad [12].

### **2.1.11. Anclaje Vesicular (Docking)**

El anclaje vesicular es considerado como el primer paso de maduración inmediatamente antes de que las vesículas ganen competencia para la fusión y liberación de neurotransmisores. Antes de la exocitosis, las vesículas que contienen neurotransmisores se deben anclar en la membrana plasmática presináptica. Recientemente, fue mostrado que solo una fracción de vesículas ancladas se fusionaban a través de un flujo de calcio [13], y, su disposición para liberar parece estar determinada por su pro-

ximidad a los canales de calcio. La fusión de estas vesículas involucra al complejo conservado evolucionariamente «N ethylmaleimide-sensitive-factor-attachment-protein-receptor (SNARE)-complex» Morfológicamente, las vesículas ancladas se definen como aquellas que no tienen una distancia medible entre la vesícula y la membrana plasmática, pero algunos autores usan criterios más flexibles [13]. La primera proteína de docking identificada es el Munc18. Después de un análisis ultraestructural de un grupo de vesículas se ha observado una marcada disminución de vesículas morfológicamente ancladas en células cromafines deficientes de Munc18. Además, se ha observado que las reducciones en la expresión genética del Munc18 reduce el docking, mientras que una mejora en la expresión genética lo incrementa, indicando, que el Munc18-1 promueve el docking de vesículas. También se han expresado otros isomorfismos del Munc18-1, como lo es el Munc18-2 y el Munc18-3 en células cromafines deficientes. Sin embargo, estos tienen un nivel de expresión relativamente bajo en células neuroendócrinas. Algunos estudios sugieren que el Munc18-1 está involucrado además en el priming de vesículas previo a la liberación. La segunda proteína identificada es la proteína SNARE syntaxina-1. Como en el caso del Munc18-1, se ha observado que la deficiencia de syntaxina-1 también produce fenotipos de anclaje robustos en las células cromafines. Es sabido que la syntaxina-1 interactúa con el Munc18-1 y en base a esto, se asume que la función de anclaje del Munc18-1 depende de la interacción con la syntaxina-1. Además de la syntaxina-1 y el Munc18-1, muchas otras proteínas están implicadas en el docking en diversos tipos de células secretoras, como por ejemplo el rab3 y el rab27, la rabphilin3A, granufilina, entre otras. Sin embargo, pareciera ser que estas otras proteínas no son esenciales en el anclaje de vesículas sinápticas en células cromafines [13].

## **Cambio estructural del complejo SNARE en el anclado y fusión vesicular**

Numerosos estudios bioquímicos, estructurales y genéticos han dado soporte al modelo de «zipper», el cual establece que el ensamblaje del complejo SNARE empieza en un estado «trans» (esto es, que los dos complejos SNARE residen en membranas opuestas), con SNARE'S separados en las membranas aceptora y donadora, y estos terminan en una configuración «cis» (Residiendo en la misma membrana) (ver figura 2.5) y que este plegamiento direccional de los complejos SNARE en un conjunto de cuatro hélices paralelas altamente estable es el que regula la fusión de membrana. Es importante resaltar que, además de unir membranas, los dominios transmembranales del SNARE también participan en etapas posteriores a la fusión vesicular [24]

### **2.1.12. Maquinaria mínima molecular para el anclado de vesículas**

Varios autores han sugerido que, previo al enlace de sinaptobrevina-2 a syntaxina-1/SNAP-25 en la membrana objetivo, la syntaxina-1 forma un heterodímero de re-

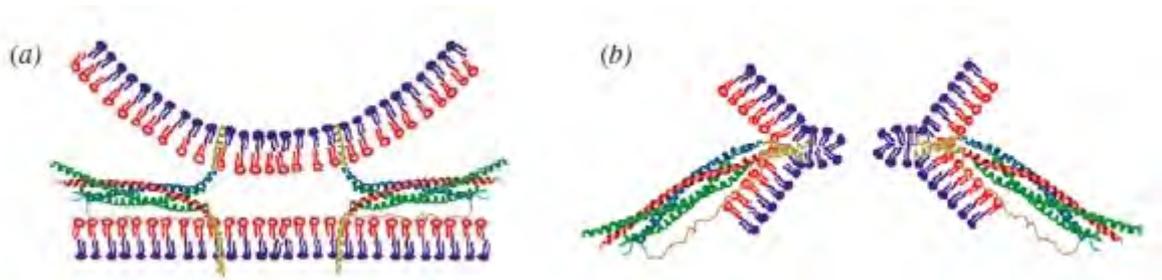


Figura 2.5: Estados cis y trans del complejo SNARE

(a) Estado *trans* parcialmente ensamblado de dos complejos SNARE que fijan una vesícula a una membrana blanco. Los dominios transmembranales se asumen de manera que sean cilíndricos. La región que conecta estos dominios transmembranales y el núcleo del complejo es probablemente flexible. Aunque se muestran dos complejos SNARE, el número exacto de estos es incierto. (b) Estado *cis* completamente ensamblado de los complejos SNARE después de la fusión y la formación del poro [24].

lación 1:1 con el SNAP-25 en un paso intermedio. Recientemente se ha demostrado que la sobre expresión del SNAP-25 ó un péptido de terminal C de sinaptobrevina-2 favorece la formación de heterodímeros de syntaxina-1/SNAP25 en una relación 1:1. Debido a que la fusión vesicular aún esta dañada después de la sobre expresión de SNAP-25 ó una terminal c del péptido de sinaptobrevina-2, se asume que el Munc18-1, además del docking, juega un papel fundamental en la desaceleración de los eventos que llevan a la exocitosis. El hecho de que los complejos de syntaxina-1/SNAP-25 actúen sugiere que el SNAP-25 es necesario para el docking, de manera análoga a la syntaxina-1. Observaciones demuestran que el SNAP-25 es la tercera proteína esencial en el docking de vesículas y que el Munc18-1 no puede promover el docking en ausencia del SNAP-25. La evidencia bioquímica sugiere que al menos otras dos proteínas de enlace pueden establecer anclaje de vesículas en la membrana plasmática: la sinaptobrevina-2 y la sinaptotagmina-1. Recientemente se ha confirmado que la inhibición de la sinaptobrevina-2 no produce fenotipos similares a los resultantes de la inhibición del Munc18-1 o la syntaxina-1, por lo que la sinaptobrevina-1 se sitúa como el principal candidato para ser una proteína fundamental de docking. De echo, se ha observado un fuerte defecto en el docking de células con sinaptotagmina-1 inhibida, muy similar al mostrado en las células con SNAP-25 *null*. Actualmente se desconoce si esta maquinaria esencial para el docking en las células neuroendócrinas es el mismo en todas las sinapsis. Sin embargo, parece ser que los principios de docking se conservan a través de los sistemas secretores [13].

### 2.1.13. Pre-fusión Vesicular

El proceso de pre-fusión (priming) es definido como la transferencia de vesículas desde el consorcio de vesículas ancladas pero no listas (UPP) hacia un consorcio listo

para la exocitosis (RRP). En términos cinéticos, esto es descrito como el equilibrio entre la tasa hacia adelante (priming) y la tasa hacia atrás (unpriming). Numerosos experimentos dejan poca duda de que, el proceso molecular que media el priming, es la formación del complejo SNARE desde sus proteínas individuales sinaptotagmina y SNAP-25 [15].

#### **2.1.14. MUNC-13**

Las proteínas MUNC-13 tienen dos funciones principales en la zona activa: preparar la maquinaria de fusión proteínica SNARE/SM para la exocitosis, haciendo así a las vesículas sinápticas competentes para la fusión, y como mediadora de la plasticidad de corto plazo regulando esta actividad de priming. Los munc-13 ejecutan su función de priming a través del dominio MUN. Este dominio puede actuar para abrir la forma cerrada de la proteína SNARE syntaxina-1, permitiendo a la misma formar complejos SNARE. La función de este dominio MUN puede ser general para la exocitosis regulada [1]. El hecho de que MUNC-13/UNC-13 y syntaxina lleve a la misma falla en el docking indica que los complejos SNARE, ensamblados o estabilizados por proteínas como MUNC 13, mantienen a las vesículas sinápticas ancladas a la membrana en un estado competente para la fusión. En consecuencia, el docking morfológico y el priming fisiológico no son eventos secuenciales sino dos manifestaciones diferentes del mismo proceso molecular que es mediado por MUNC 13 y complejos SNARE [14].

## Capítulo 3

# Modelado Matemático

Como se explico en el capítulo 1, las sinapsis son estructuras básicas de transmisión de información en los seres vivos, por lo que la plena comprensión de sus mecanismos y funcionamientos son de vital importancia en la ciencia. Si bien en los últimos años se han dado pasos muy importantes en el conocimiento de estos sistemas a nivel biológico, químico y molecular, aún quedan muchas interrogantes en esta área del conocimiento. Más aún, el trabajo que se ha hecho para tratar de dar una explicación física y matemática a estos fenómenos ha sido escasa, y enfocada principalmente en la liberación de calcio al interior de la célula, así como el análisis de la cantidad de neurotransmisor liberado durante la exocitosis. Una de las partes principales de la liberación de neurotransmisores, es el anclaje de la vesícula sináptica a la membrana plasmática celular, así como el acercamiento y preparación de ambas membranas, en procesos conocidos como «docking» y «priming», respectivamente, donde, gracias a los cambios estructurales en el complejo SNARE, se logra generar la fuerza suficiente para acercar ambas membranas y permitir su fusión.

Siendo que este es un proceso físico, es natural pensar entonces en fuerzas que interactúan para poder llevar a cabo el acercamiento y fusión de membranas, y, dado que estas fuerzas se ejercen en una misma dirección pero algunas con sentido opuesto en el espacio tridimensional, podemos verlas como una sumatoria de fuerzas. Dado que la escala de estos fenómenos es microscópica, pero dista mucho de llegar a un nivel molecular o atómico, es justificable pensar que una sumatoria de fuerza es una aproximación válida para describir el efecto de las fuerzas en nuestro sistema. Por lo que entonces, podemos elaborar una sumatoria de fuerzas que nos permita describir la dinámica del docking y el priming en la fusión vesicular:

$$\sum F = m \cdot a. \tag{3.1}$$

donde  $m$  es la masa de la vesícula,  $a$  es la aceleración de la misma y la sumatoria

considera todas las fuerzas que interactúan en la formación del complejo SNARE, por lo que esta ley nos permitirá describir la dinámica de movimiento de una vesícula a lo largo de su aproximación hacia la membrana plasmática. Esta membrana celular será tomada como una superficie plana de longitud infinita cargada eléctricamente. Esto es debido a que la membrana de la célula es significativamente más grande que una vesícula sináptica (el tamaño de una célula es del orden de micras, mientras que el de una vesícula sináptica se encuentra en el rango de nanómetros).

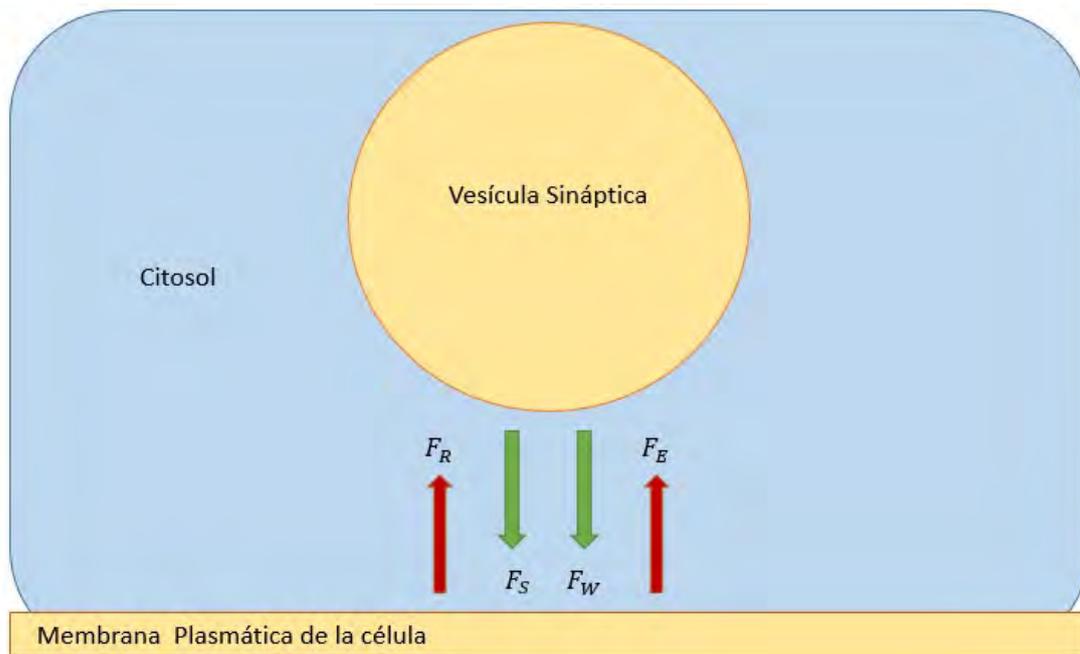


Figura 3.1: Fuerzas actuantes en el modelo.

Surge entonces la pregunta ¿cuántas fuerzas están actuando sobre el sistema «Vesícula-SNARE-Membrana» al momento de la formación del complejo SNARE? Si bien, biológicamente podemos observar que una infinidad de factores afectan el desempeño de estas fases de la exocitosis, muchos de estos no pueden ser descritos como fuerzas que actúan en el sistema, sino como efectos externos que modifican el comportamiento de las proteínas presentes en el complejo SNARE. Con base en esto, y con la intención de mantener la mayor simplicidad posible en un modelo biofísico bidimensional, buscando sin embargo no perder exactitud, se ha propuesto que sobre este proceso se ejercen únicamente las siguientes fuerzas:

- $F_S$  es la fuerza generada por el ensamblaje del complejo SNARE.
- $F_R$  es la fuerza generada por la resistencia viscosa del medio.
- $F_E$  es la fuerza electrostática que experimentan ambas membranas al aproximarse.
- $F_W$  es la fuerza de Van Der Waals presente entre membranas.

Estas fuerzas actuarán en una misma dirección pero con diferente sentido, favoreciendo o impidiendo la unión de ambas membranas lipídicas.

Una fuerza que normalmente es común ver en los modelos mecánicos que utilizan la segunda ley de Newton, es la fuerza de gravedad, más sin embargo, dado la escala del modelo, y, que dentro de una célula el efecto de la gravedad es despreciable, esta fuerza no será incluida dentro de nuestro modelo.

A continuación se describen detalladamente los efectos de cada fuerza y las consideraciones tomadas en cuenta a la hora de su aplicación en el modelo.

## **3.1. Ensamble del complejo SNARE**

### **3.1.1. Varios complejos SNARE involucrados en una fusión**

Una interrogante de vital importancia que hay que atender para modelar este fenómeno es la siguiente: ¿cuántos complejos SNARE participan durante el anclaje y pasos posteriores de una única vesícula sináptica? Diversos autores han intentado dar respuesta a esta pregunta mediante diversos experimentos, estimando entre tres y quince complejos SNARE participantes en una fusión vesicular, por lo que el número permanece sin ser del todo claro. Sin embargo, recientemente han sido publicados trabajos en los cuales se afirma que incluso un solo complejo SNARE sería suficiente para llevar a cabo una fusión vesicular, mientras que por otro lado, se requerirán al menos tres complejos para mantener el poro de fusión abierto y que se lleve a cabo una liberación de neurotransmisor satisfactoria [34], [35], [36]. Es decir, un solo complejo no generara la fuerza necesaria para mantener el poro de fusión abierto el tiempo suficiente para que la liberación de neurotransmisor sea completa, en cambio, un arreglo radial de tres o más complejos SNARE que empujan en direcciones opuestas pueden aportar la energía suficiente para mantener el poro de fusión abierto [35]. Esto se ha especulado que es de vital importancia en las fases rápidas de la exocitosis, por lo que se considera que para este tipo de liberación serán necesarios al menos tres complejos [36]. Los datos aportados en estos estudios sugieren que, el número de complejos SNARE que interactúan en un sitio de fusión determinado es estocástico, es decir, será el resultado de una distribución aleatoria de estos a través del plano en que se está interactuando, siendo un único complejo SNARE suficiente para llevar a cabo la fusión vesicular, pero siendo más común un número de tres o más complejos [34], [36].

Ahora bien, tomemos en cuenta la fisiología de una vesícula sináptica. En el 2006, Takamori y colaboradores hicieron un estudio completo describiendo molecular y comprensivamente a las vesículas sinápticas presentes en neuronas [30]. Dentro de este estudio se clasificaron y contabilizaron las proteínas presentes en la membra-

na de las vesículas. Se encontró que en una vesícula sináptica (de cerebro de ratón) contiene un promedio de setenta sinaptobrevinas en su membrana externa. Como se vio anteriormente, las sinaptobrevinas son las proteínas del complejo SNARE que se encuentran localizadas inicialmente en la vesícula sináptica, y que se unirán posteriormente con el SNAP-25 y la syntaxina presente en la membrana celular para formar el complejo SNARE. Basados entonces en esto, se puede argumentar que hasta setenta complejos SNARE pueden actuar en una fusión vesicular promedio. Sin embargo, si consideramos que esas setenta proteínas de sinaptobrevina se encuentran distribuidas homogéneamente en toda la superficie de la vesícula sináptica, es natural pensar que no todas podrán actuar en la fusión, por simples restricciones de espacio. Asumiendo esto, cuando una vesícula se encuentre a  $5nm$  de la membrana plasmática, únicamente 12 moléculas de sinaptobrevina estarán en condiciones de formar un complejo SNARE [30]. Viendo esto, podemos argumentar que el número de complejos SNARE que participan en una fusión vesicular irá desde uno hasta 12.

Abordando esta pregunta desde el punto de vista «geométrico», es fácil observar que la acción de un solo complejo SNARE no es la idónea, esto es, debido a que, al tener un solo punto de apoyo, la vesícula sería susceptible al movimiento inherente en el citosol, generando que esta estuviera en continuo movimiento, dificultando así la fusión vesicular. Tendríamos una situación similar con dos puntos de apoyo, es decir, dos complejos unidos a la vesícula. Si tomamos en cuenta la geometría euclideana, observaremos que tres puntos no colineales definen un plano, siendo así, desde este punto de vista, el número mínimo de complejos que se necesitarán para llevar a cabo el proceso de fusión sin que la vesícula experimente movimientos bruscos dentro del plano generado por estos puntos de anclaje, es decir, el plano  $yz$ , restringiendo los movimientos de la vesícula al eje  $x$ .

Con base en todo lo anterior, para objetos de nuestro trabajo, se considerará que en una fusión vesicular promedio actúan por lo menos tres complejos SNARE, pudiendo llegar hasta un máximo de 12 complejos, siendo entonces la suma de las fuerzas generadas por el ensamble de cada complejo, la fuerza total que se ejercerá para la formación del poro de fusión.

Si asumimos que cada complejo SNARE contribuye con la misma fuerza para la fusión vesicular, tendremos que la fuerza que aporta el ensamble del complejo SNARE será

$$F_S = n \cdot f_S. \tag{3.2}$$

donde  $n$  es el número de complejos SNARE que participan en la fusión vesicular y  $f_S$  es la fuerza generada por un único complejo SNARE.

### 3.1.2. Fuerza generada un complejo SNARE

Biológicamente es conocido que el cambio conformacional del complejo SNARE de una configuración trans a una configuración cis, es decir, el paso de un estado donde las proteínas integrantes del complejo residen en diferentes membranas, a residir en una misma membrana, es el generador de la fuerza que conduce la exocitosis en células sinápticas. La unión llevada a cabo entre la sinaptobrevina, syntaxina y SNAP-25 se da desde la terminal amino de las proteínas hasta la terminal carboxilo de las mismas, generando en el proceso energía que se traduce en la fuerza necesaria para acercar ambas membranas y llevar a cabo la fusión vesicular y posterior liberación de los neurotransmisores. Este mecanismo de ensamble es conocido en la literatura como un proceso de "zippering". A pesar de los avances obtenidos en los últimos años, y de que ya se cuenta con la estructura cristalográfica del complejo SNARE, aún permanecen muchas interrogantes acerca de como se lleva a cabo detalladamente este proceso. Estudios recientes llevados a cabo con pinzas ópticas y pinzas magnéticas para medir la fuerza necesaria para separar un complejo SNARE ya ensamblado, han arrojado datos que sugieren que el ensamble de este se puede dividir en tres etapas, cada una distinguida por una fuerza distinta [32] [31].

$$f_{S1} = 34pN \text{ para } D < 6nm.$$

$$f_{S2} = 22pN \text{ para } 18nm \geq D \geq 6nm.$$

$$f_{S3} = 5pN \text{ para } 30nm \geq D \geq 18nm.$$

## 3.2. Resistencia Viscosa en el Citoplasma

Una de las principales fuerzas a considerar en el movimiento que experimenta una vesícula sináptica en los movimientos previos a la exocitosis es aquella generada por la resistencia viscosa del citosol frente al movimiento de la vesícula. Si bien, se ha visto que la viscosidad media del citoplasma en la zona adyacente a la membrana plasmática es de seis a diez veces mayor que la viscosidad del agua [28], se ha propuesto que esto se debe principalmente a obstáculos móviles e inmóviles presentes en el citosol (proteínas, membranas, etc.).

En tanto, diversos experimentos han demostrado que la viscosidad de la fase fluida del citoplasma (la viscosidad percibida por un objeto pequeño en ausencia de colisiones o enlaces con macromoléculas presentes en el citoplasma), no es muy diferente de la viscosidad del agua, teniendo valores entre 20% y 40% mayores a esta [27] [29].

Teniendo en cuenta lo anterior, y, dado que la composición de la fase acuosa del citosol es similar a la del agua, es justificable el proponer que este fluido se

comportará de una manera parecida al agua, i.e., que será un fluido Newtoniano.

Como se ha descrito en capítulos anteriores, una vesícula sináptica es una micela formada principalmente por fosfolípidos y proteínas de membrana. Dado que las micelas son estructuras esféricas, es aceptable el considerar a la vesícula sináptica como una esfera de radio « $r$ ».

En base a las consideraciones hechas anteriormente, se propone utilizar la ley de Stokes para modelar la resistencia viscosa, la cual describe la resistencia que experimenta una esfera que atraviesa un fluido newtoniano a bajo número de Reynolds, es decir, en régimen laminar.

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R \cdot v. \quad (3.3)$$

donde  $F_R$  representa la fuerza generada por la resistencia viscosa del medio,  $R$  es el radio de la vesícula sináptica,  $\eta$  es la viscosidad del medio y  $v$  es la velocidad de la esfera.

Se utilizarán entonces los siguientes datos para describir la resistencia viscosa que experimenta una vesícula sináptica en el citosol:

$$\eta = 1.2cp = 0.0012 \frac{kg}{m \cdot s}$$

$$R = 20.8nm = 2.08 \times 10^{-8}m$$

Los valores de viscosidad media del citosol en zonas cercanas a la membrana plasmática y del radio promedio de la vesícula son tomados de [27] y [30], respectivamente. Sustituyendo estos valores en la ecuación tendremos:

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot 0.0012 \frac{kg}{ms} \cdot 2.08 \times 10^{-8}m \cdot v$$

$$F_R = 0.47048pN \cdot v \quad (3.4)$$

donde la velocidad será expresada en  $\frac{m}{s}$ . Es importante destacar que esta fuerza estará entonces en función de la velocidad de la vesícula. Si transformamos la ecuación para que la velocidad de la vesícula este dada en  $\frac{nm}{\mu s}$  tendremos

$$F_R = (4.7048 \times 10^{-1} \cdot v) pN \quad (3.5)$$

### 3.3. Fuerza de Van der Waals

Las fuerzas entre objetos macroscópicos son el resultado de una compleja interacción entre las moléculas de ambos objetos así como del medio que los separa. Las fuerzas de Van der Waals son las fuerzas atractivas o repulsivas entre moléculas, que son distintas al enlace covalente o a la interacción electrostática de iones con otros iones o moléculas neutras. Estas fuerzas son fuerzas de corto rango, que actúan a una escala de unos cuantos nanómetros, por lo que su inclusión en el modelo de nuestro sistema vesícula-membrana será de gran importancia.

Las fuerzas de Van der Waals están compuestas por las siguientes fuerzas:

1. Fuerza de Keesom (Interacción dipolo-dipolo). Esta fuerza se da entre dos dipolos que rotan libremente, los cuales se atraen el uno al otro debido a que están preferencialmente orientados con sus cargas opuestas encarándose la una a la otra.

$$W_{orient} = -\frac{C_{orient}}{D^6} = \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{3(4\epsilon_0)^2 K_B T D^6}.$$

2. Interacción de Debye. Es la fuerza que se da cuando un dipolo estático interactúa con una molécula polarizable.

$$W_{ind} = -\frac{C_{Ind}}{D^6} = \frac{\mu^2 \alpha}{(\pi\epsilon_0)^2 D^6}.$$

3. Fuerzas de dispersión de London. Son las fuerzas que surgen entre moléculas no polares en las que pueden aparecer dipolos instantáneos.

$$W_{disp} = -\frac{C_{disp}}{D^6} = -\frac{3}{2} \cdot \frac{\alpha_1 \alpha_2}{(\pi\epsilon_0)^2 D^6} \cdot \frac{h\nu_1 \nu_2}{(\nu_1 + \nu_2)}.$$

Hay que hacer notar que las tres ecuaciones anteriores contienen la misma dependencia a la distancia entre las partículas:  $1/D^6$ .

Entonces, se puede decir que la Fuerza de Van der Waals entre dos partículas será la suma de cada una de estas interacciones, considerándose así todas las interacciones dipolo-dipolo:

$$C_{AB} = C_{orient} + C_{ind} + C_{disp}.$$

Por lo tanto, la energía de interacción entre una molécula  $A$  y una molécula  $B$  estará dada por la siguiente ecuación:

$$W_{AB}(D) = -\frac{C_{AB}}{D^6}. \quad (3.6)$$

Cabe resaltar que el signo negativo es debido a que la interacción que tendremos entre ambas moléculas será atractiva. Normalmente de estas fuerzas la dispersión de London es la interacción más fuerte.

Si bien, la ecuación anterior nos proporciona la energía debida a las fuerzas de Van der Waals entre dos moléculas, para los fines de nuestro estudio nos interesa saber cual es la fuerza de Van der Waals que se genera entre dos objetos macroscópicos (la vesícula sináptica y la membrana plasmática). Para lograr obtener esta fuerza, primeramente debemos ver que es lo que sucede cuando una única molécula interactúa con una superficie plana de longitud infinita.

### 3.3.1. Interacción molécula-superficie infinita

Si asumimos aditividad, la energía de interacción de una molécula con una superficie plana de un sólido formado por moléculas será entonces la suma de las interacciones de todas las moléculas del cuerpo con la molécula externa.

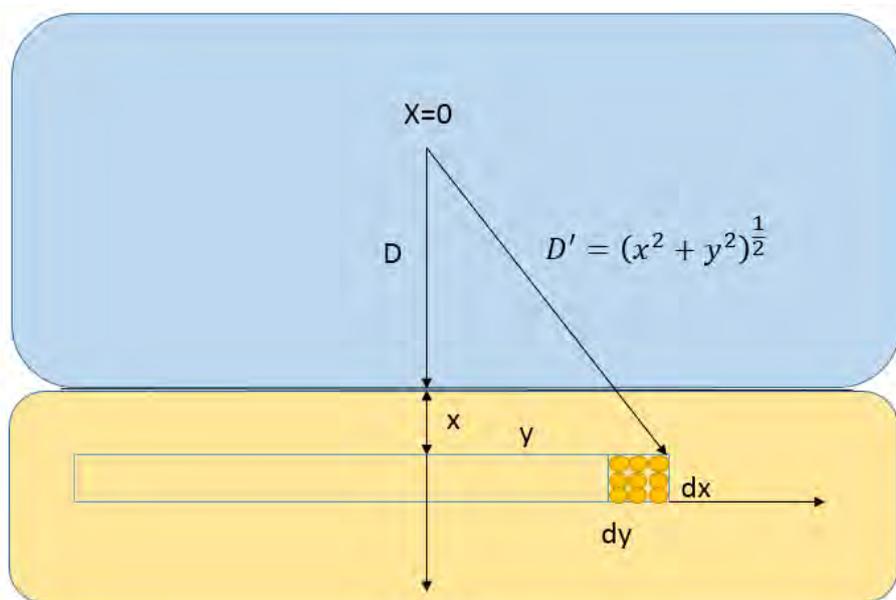


Figura 3.2: Diagrama de la interacción molécula-superficie.

Anteriormente hemos visto que la interacción presente entre dos moléculas  $A$  y  $B$  esta dada por la ecuación (3.6). Si asumimos que una molécula interactúa con todas

las moléculas de la superficie presentes en un anillo circular de área transversal  $dxdy$  y radio  $y$  (figura 3.3.1), tendremos que el volumen de dicho anillo es:

$$2\pi y dx dy.$$

y el número de moléculas presentes en este anillo esta dado por

$$2\pi \rho_A y dx dy.$$

donde  $\rho_A$  es el número de densidad de moléculas presentes en la superficie.

La energía de interacción neta de molécula a una distancia  $x$  de la superficie será entonces:

$$W(D) = -C_W \cdot \int \int \int \frac{\rho_A}{D^6} dV.$$

$$W(D) = -C_W \rho_A \int \int \frac{2\pi y dy dx}{(x^2 + y^2)^3}.$$

Dado que estamos hablando de un sólido de una longitud infinita, la integración será infinita

$$W(D) = -2\pi C_W \rho_A \int_{x=D}^{x=\infty} dx \int_{y=0}^{y=\infty} \frac{y dy}{(x^2 + y^2)^3}.$$

$$W(D) = -\frac{2\pi C_W \rho_A}{4} \int_D^{\infty} \frac{dx}{x^4}.$$

$$W(D) = -\frac{\pi C_W \rho_A}{6D^3}. \quad (3.7)$$

Si derivamos la energía podremos obtener la fuerza resultante:

$$F(D) = -\frac{dW(D)}{dD} = -\frac{\pi C_W \rho_A}{2D^4}. \quad (3.8)$$

### 3.3.2. Interacción esfera-superficie infinita

Ahora que conocemos la interacción presente entre una molécula y una superficie cargada eléctricamente, calcularemos cual es la interacción presente entre una esfera y una superficie de longitud infinita. Primeramente necesitamos determinar cuál es el área de interacción efectiva que presenta una esfera que se encuentra cerca de la superficie plana. Para esto necesitamos calcular un área que pueda incluir a moléculas externas entre las superficies, es decir, tendremos que determinar el área

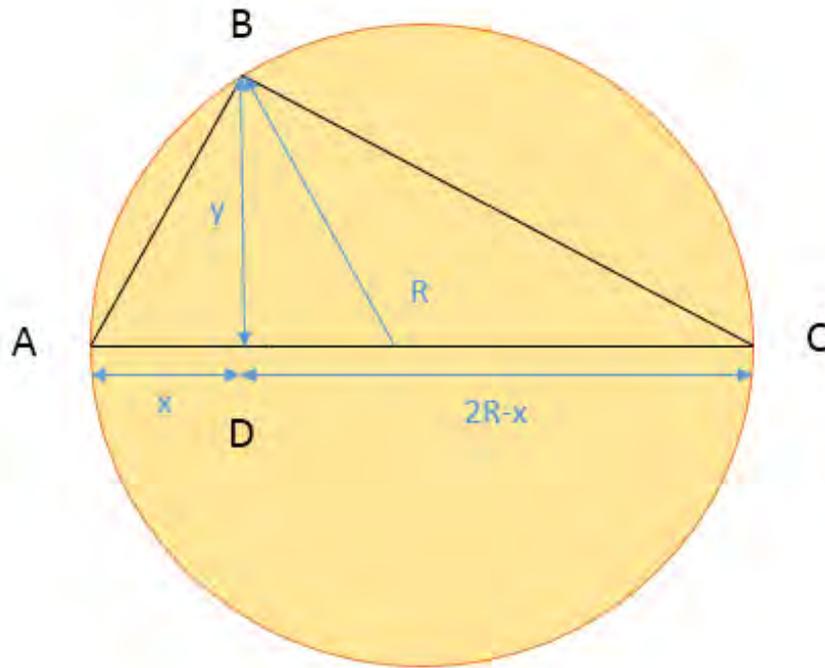


Figura 3.3: Esquema para determinar el área de interacción en una esfera.

de la esfera en función de  $x$  y  $y$ . En base al esquema de triángulos mostrado en la figura 3.3, podemos aplicar el teorema de pitágoras:

$$AC^2 = AB^2 + BC^2 = AD^2 + BD^2 + BD^2 + DC^2.$$

Dejando cada uno de los lados de los triángulos en función de  $A$  y  $R$  tendremos:

$$AC^2 = 4R^2.$$

$$AD^2 = x^2.$$

$$BD^2 = y^2.$$

$$DC^2 = (2R - x)^2 = 4R^2 - 4xR + x^2.$$

Sustituyendo obtendremos:

$$4R^2 = x^2 + 2y^2 + 4R^2 - 4xR + x^2.$$

despejando:

$$y^2 = (2R - x)x. \quad (3.9)$$

Ahora bien, el área transversal de una esfera esta dada por  $\pi \cdot r^2$ , y dado que en este caso el radio del área transversal esta dado por la ecuación (3.9) el área transversal de moléculas que interactúan con la superficie es:

$$\pi \cdot r^2 = \pi \cdot y^2 = \pi(2xR - x^2).$$

Por lo que el volumen de una delgada área circular  $\pi y^2$  estará dado por:

$$\pi y^2 dx = \pi x(2R - x) dx.$$

y el número de moléculas en esta sección estará dado por la multiplicación del volumen por la densidad de moléculas en la esfera:

$$\pi \rho_B x(2R - x) dx.$$

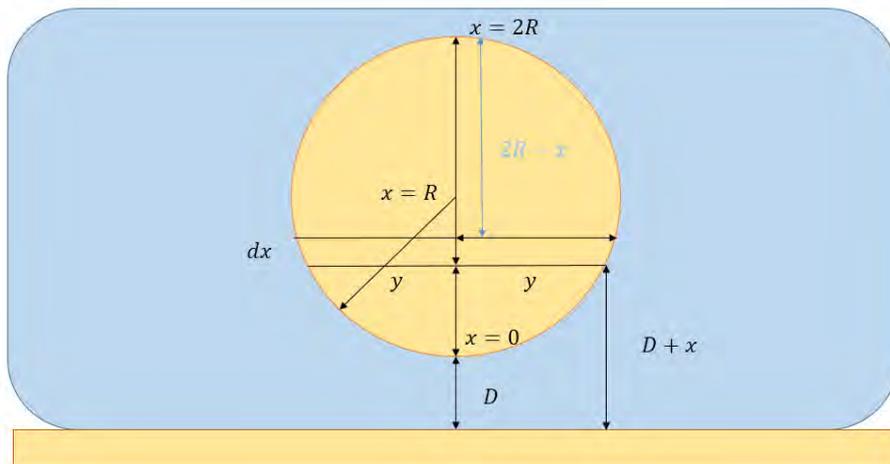


Figura 3.4: Diagrama de la interacción esfera-superficie.

Ahora bien, la interacción de una sola molécula está dada por la ecuación (3.7), por lo que la integración para todas las moléculas de la esfera a una distancia  $D+x$  será:

$$W(D) = -\frac{\pi^2 C_W \rho_A \rho_B}{6} \int_{x=0}^{x=2R} \frac{(2R-x)xdx}{(D+x)^3}. \quad (3.10)$$

Integrando tenemos:

$$W(D) = -\frac{\pi^2 C_W \rho_A \rho_B}{6} \left[ -\frac{2(R+D)}{x+D} + \frac{D(2R+D)}{2(x+D)} - \log(x+D) \right]_0^{2R}$$

Ahora evaluaremos los límites. Para el límite superior ( $x = 2R$ ) tendremos

$$\lim_{sup} = -\frac{2(R+D)}{(2R+D)} + \frac{D(2R+D)}{2(2R+D)^2} - \ln(2R+D)$$

simplificando

$$\lim_{sup} = -1 - \frac{D}{2(2R+D)} - \ln(2R+D)$$

En tanto, para el límite inferior ( $X = 0$ )

$$\lim_{inf} = -\frac{2(R+D)}{D} + \frac{D(2R+D)}{2D^2} - \ln(D)$$

simplificando

$$\lim_{inf} = -\frac{2R+D}{2D} - 1 - \ln(D)$$

Ahora procedemos a realizar la operación  $\lim_{sup} - \lim_{inf}$ :

$$\lim_{sup} - \lim_{inf} = -1 - \frac{D}{2(2R+D)} - \log(2R+D) + \frac{2R+D}{2D} + 1 + \ln(D).$$

simplificando

$$\lim_{sup} - \lim_{inf} = \frac{2R^2 + 2RD}{D^2 + 2RD} + \ln(D) + \ln(2R+D).$$

Por lo tanto, la energía de Van der Waals para una esfera aproximándose a una lámina infinita será

$$W(D) = -\frac{\pi^2 C_W \rho_A \rho_B}{6} \left[ \frac{2R^2 + 2RD}{D^2 + 2RD} + \ln(D) + \ln(2R + D) \right]. \quad (3.11)$$

Si utilizamos la derivada negativa del potencial para obtener la fuerza tendremos:

$$\begin{aligned} F(D) &= -\frac{dW(D)}{dD}, \\ F(D) &= -\frac{\pi^2 C_W \rho_A \rho_B}{6} \frac{d}{dD} \left[ \frac{2R^2 + 2RD}{D^2 + 2RD} + \ln(D) + \ln(2R + D) \right], \\ F(D) &= -\frac{\pi^2 C_W \rho_A \rho_B}{6} \left[ -\frac{2R(2R^2 + 2RD + D^2)}{D^2(2R + D)^2} + \frac{1}{D} - \frac{1}{2R + D} \right], \end{aligned}$$

simplificando

$$F(D) = -\frac{\pi^2 C_W \rho_A \rho_B}{6} \left[ \frac{-4R^3 - 4R^2D - 2RD^2 + 4R^2D + 4RD^2 + D^3 - 2RD^2 - D^3}{D(2R + D)^2} \right],$$

$$F(D) = -\frac{2\pi^2 C_W \rho_A \rho_B}{3} \cdot \frac{R^3}{D^2(2R + D)^2}. \quad (3.12)$$

Finalmente, hay que ver que estas ecuaciones están en términos de la constante de interacción  $C_{AB}$  y la densidad de moléculas, más sin embargo, para fines prácticos, es más fácil reescribir estas ecuaciones en función de la llamada constante de Hamaker

$$A_H = \pi^2 C_{AB} \rho_A \rho_B.$$

Si sustituimos esta constante en las ecuaciones que se dedujeron anteriormente para una molécula (3.8) y una esfera (3.12) tendremos:

$$F_W(D) = -A_H/2\pi D^4. \quad (3.13)$$

$$F_W(D) = -\frac{2A_H R^3}{3D^2(2R + D)^2}. \quad (3.14)$$

### 3.3.3. Interacción vesícula-membrana

Ahora que tenemos la ecuación que describe la interacción de Van der Waals entre una esfera y una superficie infinita, podemos aplicarla para describir el comportamiento de esta fuerza en el caso de una vesícula sináptica aproximándose a la parte interna de la membrana plasmática de una célula.

De acuerdo con [38], para interacciones de superficies orgánicas polares débiles en soluciones acuosas, como es el caso de proteínas o membranas, la constante de Hamaker es normalmente del orden de  $1 \times 10^{20} J$ . Utilizando este valor de la constante de Hamaker para nuestro caso de estudio, y retomando el valor del radio de la vesícula de [30], tendremos:

$$F_W = \frac{-2 (10^{20} J)(20.8nm)^3}{3 D^2(D + 41.6nm)^2},$$
$$F_W = \left( \frac{-2 (10^{11})(20.8)^3}{3 D^2(D + 41.6)^2} \right) Newtons,$$
$$F_W = \frac{-59992.746}{D^2(D + 41.6)^2} pN. \quad (3.15)$$

Donde la distancia estará expresada en nanómetros y la fuerza en pico Newtons.

## 3.4. Repulsión electrostática

El electromagnetismo es una fuerza básica en las interacciones químicas. Combinado con los efectos de las mecánicas estadística y cuántica, las fuerzas electromagnéticas mantienen la estructura y conducen los procesos de la química alrededor y dentro nuestro. Debido a la naturaleza de largo-rango de las interacciones tipo coulomb, la electrostática juega un papel vital en las interacciones intra e intermoleculares de la química y la bioquímica. De la ecuación de coulomb sabemos que dos cargas puntuales  $q_1$  y  $q_2$  se atraen o se repelen de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$F_E = k \frac{q_1 q_2}{r^2}$$

A partir de esta ley y de la ley de cargas sabemos que las cargas del mismo signo se atraen, mientras que las cargas opuestas se repelen. Para cuerpos más grandes, esta ley puede ser generalizada por medio del potencial eléctrico. Teniendo en nuestro sistema dos membranas lipídicas que se están aproximando (la membrana de

la vesícula y la membrana celular). Dado que las membranas lipídicas están formadas mayoritariamente por fosfolípidos y, los fosfolípidos orientan su extremo polar (el cual es hidrófilo) hacia el exterior, tendremos entonces membranas con cargas parciales negativas, por lo que es de esperar que ambas membranas presenten una repulsión entre ellas debido a su potencial eléctrico de superficie.

Además del potencial eléctrico que presentan las membranas, hay que considerar otro factor clave a la hora de modelar la interacción electrostática entre las membranas. Este factor es el medio en el que ambas membranas interactúan. El citosol es un medio acuoso con características similares al agua, donde se encuentra una diversa cantidad de iones (e.g. calcio, sodio, potasio) que desempeñan diversas funciones al interior de la célula. Estos iones pueden llevar a cabo una interacción con las membranas cargadas lo cual afectará significativamente el efecto de repulsión electrostática que se da en el sistema. Es de esperar que, si las membranas poseen una carga eléctrica, los iones de carga opuesta presentes en la solución serán atraídos hacia la misma, mientras que los iones de la misma carga serán repelidos. Debido a su alta constante dieléctrica el agua es considerada normalmente un buen solvente para iones. Es debido a esta razón que la mayoría de las superficies en agua están cargadas. Estas superficies cargadas, generan entonces, un campo eléctrico. Dicho campo eléctrico atrae contra iones. La unión de superficies cargadas y contra iones es normalmente llamada «doble capa eléctrica». Para entender como cambia el potencial eléctrico que puede generar una membrana eléctricamente cargada a través del espacio y como es afectado por los iones presentes en la solución en la que se encuentra la membrana, es necesario conocer los factores que afectan este potencial eléctrico y la relación que existe entre los mismos.

### 3.4.1. Ecuación de Poisson-Boltzmann

La ecuación de Poisson-Boltzmann es una ecuación diferencial que nos permite describir las interacciones electrostáticas entre moléculas en soluciones iónicas. Esto será de gran importancia ya que tanto la micela de la vesícula sináptica como la membrana plasmática de la célula se encuentran en el citosol, el cual es un medio fluido en el que interactúan varios tipos de iones.

Consideremos el operador Laplaciano:

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}.$$

Si  $\psi$  es el potencial electrostático y  $\rho_\epsilon$  es la densidad de carga, tendremos la ecuación de Poisson:

$$\nabla^2 \psi = -\frac{\rho_\epsilon}{\epsilon \epsilon_0}. \quad (3.16)$$

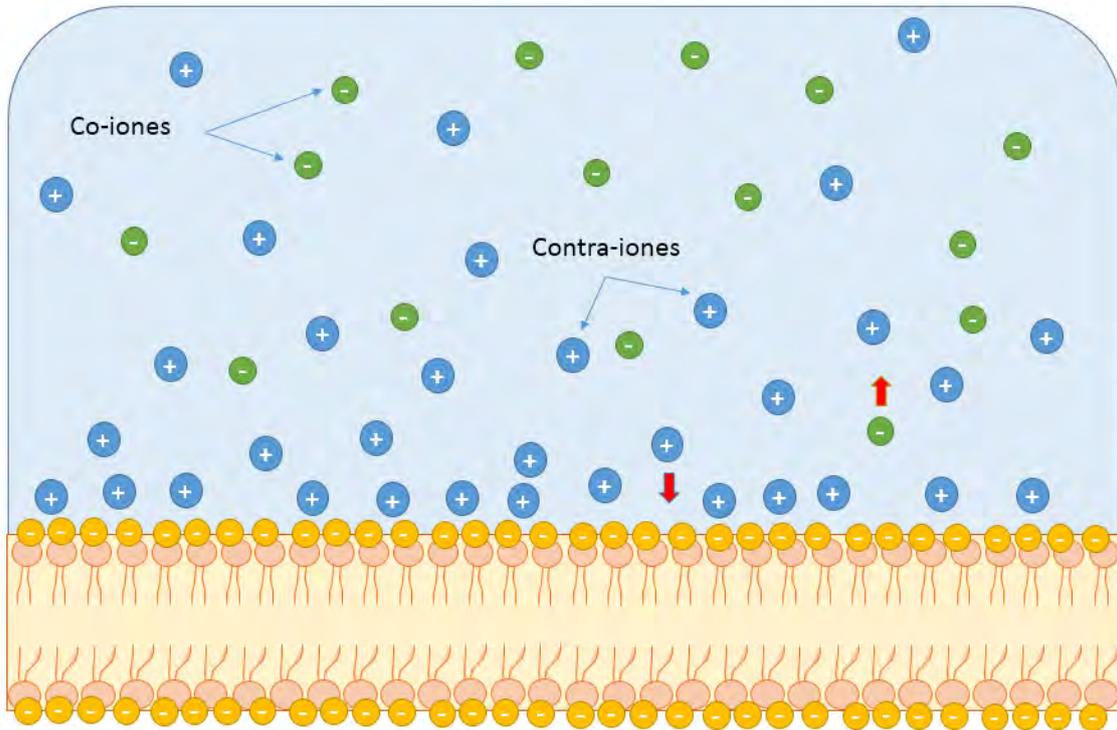


Figura 3.5: Doble capa eléctrica.

Donde  $\epsilon$  es la constante dieléctrica de la solución y  $\epsilon_0$  es la permitividad eléctrica del vacío. Si el campo eléctrico está dado por:

$$E = -\nabla\psi.$$

Podemos transformar a la ecuación de Poisson en:

$$\nabla \cdot E = \frac{\rho_{\epsilon}}{\epsilon\epsilon_0}.$$

Que nos describe una relación electrostática entre el gradiente del potencial eléctrico y la densidad de carga.

Ahora bien, la relación de concentración de carga al potencial eléctrico es dada por la mecánica estadística. De acuerdo a la relación de Boltzmann, la probabilidad de que una partícula tenga una energía  $E$  es proporcional a  $\exp[-E/KT]$  donde  $K$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta. Un ion de valencia  $Z$  en un campo eléctrico  $\psi$  tiene una energía potencial eléctrica  $Ze\psi$ , donde  $e$  es la carga elemental que posee un electrón. Entonces, dada la relación de Boltzmann:

$$C_i = C_i^{\infty} \exp[-E/KT].$$

Donde  $C_i$  representa la concentración del  $i$ -ésimo ion de la solución en un punto y  $C_i^{\infty}$  representa la concentración total o analítica del  $i$ -ésimo ion (en un punto tal

que el gradiente de concentración del mismo es cero). Podemos dejar la ecuación como:

$$C_i = C_i^\infty \exp[-Z_i e \psi / KT]. \quad (3.17)$$

Ahora, en una solución electrolítica, la densidad de carga está dada por

$$\rho_\epsilon = \sum_i C_i Z_i e.$$

En una solución donde tenemos el mismo número de co-iones y contra-iones, tendremos una densidad de carga global neutra (e.g. una solución salina de NaCl). Sin embargo, esto no se cumplirá si nos enfocamos únicamente en una sección específica de nuestra solución, como en los casos donde tenemos una pared o superficie cargada. En estos casos, veremos que la densidad de carga no es necesariamente cero. Dada esta situación, podemos sustituir la  $C_i$  por la obtenida en la relación de Boltzmann

$$\rho_\epsilon = \sum_i C_i^\infty \exp[-Z_i e \psi / KT] Z_i e.$$

Y dado que la densidad de carga está dada por la ecuación de Poisson, podremos sustituirla para obtener

$$\nabla^2 \psi = -\frac{e}{\epsilon \epsilon_0} \sum_i Z_i C_i^\infty \exp[-Z_i e \psi / KT]. \quad (3.18)$$

Esta ecuación es conocida como la Ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann

Esta ecuación puede ser adimensionalizada si definimos

$$\psi^* = \frac{\psi}{KT/e}.$$

Y utilizando la fuerza iónica del medio

$$I_c = \frac{1}{2} \sum_i C_i Z_i^2.$$

obtendremos

$$\nabla^2 \psi^* = \frac{-2e^2 I_c}{\epsilon \epsilon_0 RT} \sum_i C_i^{\infty*} Z_i \exp[-Z_i \psi^*].$$

En base a esto podemos definir la longitud de Debye

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon \epsilon_0 KT}{2e I_c}}. \quad (3.19)$$

y finalmente adimensionalizando  $\nabla$

$$\nabla^{*2} = \lambda_D \nabla^2.$$

tendremos:

$$\nabla^{*2}\psi^* = -\frac{1}{2} \sum_i C_i^{\infty*} Z_i \exp[-Z_i\psi^*]. \quad (3.20)$$

Esta ecuación es la Ecuación de Poisson-Boltzmann Adimensional. Ahora, si suponemos que los iones en nuestra solución son simétricos, es decir, que tanto los co-iones como los contra-iones tienen la misma valencia (e.g. una disolución de NaCl) la ecuación (3.20) se puede transformar en

$$\nabla^{*2}\psi^* = \frac{1}{Z} \sinh[Z\psi^*]. \quad (3.21)$$

Ahora, para valores de  $\psi^*$  podemos linealizar la ecuación anterior obteniendo

$$\begin{aligned} \nabla^{*2}\psi^* &= \psi^*. \\ \nabla^2\psi &= k^2\psi. \\ \frac{d^2\psi}{dx^2} &= k^2\psi. \end{aligned} \quad (3.22)$$

La solución a esta ecuación lineal, teniendo como condiciones iniciales que  $\psi = \psi_0$  en  $x = 0$  así como  $\psi = 0$  en  $x = \infty$  es

$$\psi = \psi_0 \exp\left[\frac{-x}{\lambda_D}\right]. \quad (3.23)$$

Como podemos ver en las ecuaciones anteriores, tanto la distancia como la longitud de Debye juegan un papel primordial a la hora de determinar el potencial electrostático que tendrá una membrana al interactuar en una solución iónica con otros objetos cargados (como lo es una vesícula sináptica).

### 3.4.2. Longitud de Debye ( $k^{-1}$ )

En la ecuación (3.19) se define la relación de varios factores como la llamada Longitud de Debye. Este valor representa y determina el rango de las interacciones electrostáticas que se llevarán a cabo en un medio iónico. Supongamos que tenemos una capa uniforme de iones con carga negativa presente en una solución de co-iones y contra-iones. Los protones serán entonces atraídos por la carga negativa y formarán una capa de carga positiva sobre ella. A partir de cierta distancia, la carga habrá quedado neutralizada y no se tendrán efectos apreciables. La longitud de Debye será entonces una aproximación de esa distancia.

La longitud de Debye decae a medida que se incrementa la concentración de iones en el medio. Esto es lógico, debido a que, mientras más iones se encuentren presentes

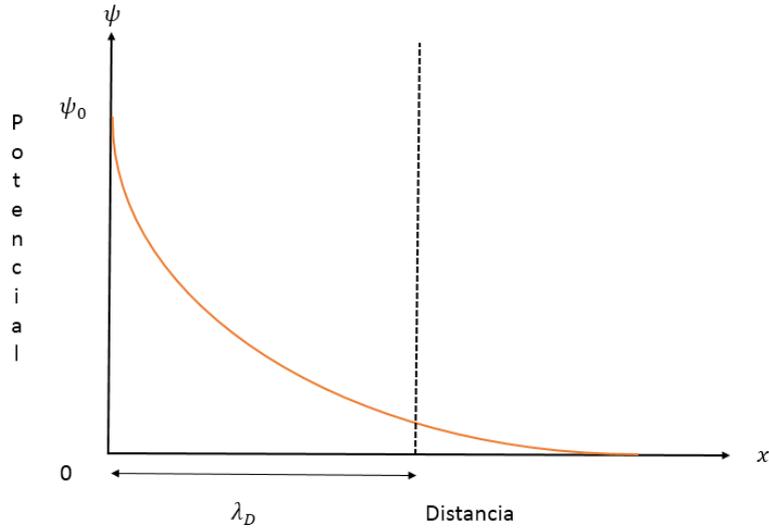


Figura 3.6: Longitud de Debye.

en la solución, el apantallamiento de la carga superficial será más efectivo. Cabe destacar que en el agua la longitud de Debye máxima no supera los 100nm. Existen varias fórmulas que permiten calcular esta longitud característica, sin embargo, si tenemos iones de diferente valencia presentes en la solución, la inversa de la longitud de Debye estará dada por:

$$k = \sqrt{\frac{e^2}{\epsilon\epsilon_0 k_B T} \sum_i c_i^\infty Z_i^2}. \quad (3.24)$$

donde:

- $e$  es la carga eléctrica del electrón.
- $\epsilon$  es la constante dieléctrica (permitividad relativa) de la solución.
- $\epsilon_0$  es la permitividad eléctrica del vacío.
- $K_B$  es la constante de Boltzmann.
- $T$  es la temperatura del sistema, medida en Kelvin.
- $c_i^\infty$  es la concentración analítica del  $i$ -ésimo ion en la solución, expresada en *partículas/m<sup>3</sup>*.
- $Z_i$  es la valencia normalizada por magnitud de carga del electrón del  $i$ -ésimo ion de la solución.

Ion	Concentración ( $mM$ )	Concentración (Partículas/ $m^3$ )	$Z_i$
$K^+$	139	$8.37 \times 10^{25}$	1
$Na^+$	12	$7.22 \times 10^{24}$	1
$Cl^-$	4	$2.40 \times 10^{24}$	-1
$HCO_3^-$	12	$7.22 \times 10^{24}$	-1
$X^-$	138	$8.31 \times 10^{25}$	-1
$Mg^{2+}$	0.8	$4.81 \times 10^{23}$	2
$Ca^{2+}$	0.0002	$1.20 \times 10^{20}$	2

Cuadro 3.1: Concentraciones y valencia de los iones más comunes en una célula eucariota de un mamífero mamario. «X» representa a las proteínas presentes en el citosol

Ahora bien, para poder calcular la longitud de Debye presente en nuestro sistema debemos conocer la concentración de iones presentes al interior de una célula. De acuerdo con [48], la concentración iónica típica de una célula mamaria esta resumida en el cuadro 3.1.

Si tomamos estos valores de concentración, podemos calcular la carga iónica presente en la solución. En base a los valores obtenidos en el cuadro 3.1 tendremos:

$$\sum_i c_i^\infty Z_i^2 = 1.856 \times 10^{26} \text{partículas}/m^3.$$

Si multiplicamos por la carga eléctrica  $e = 1.6022 \times 10^{-19}C$

$$e^2 \cdot \sum c_i Z_i^2 = 4.76451 \times 10^{-12} C^2/m^3.$$

Si la temperatura corporal del cuerpo humano es de aproximadamente  $36.8c$  y, en la mayoría de los animales mamarios esta se encuentra entre los  $34$  y  $38c$  es aceptable tomar una temperatura de  $37c$  como base para nuestros cálculos

$$T = 37c = 310.15K.$$

Debido a que el citosol tiene una composición y características similares a las del agua, utilizaremos el valor de conductividad eléctrica del agua a los  $37c$

$$\epsilon = 74.7(\text{aproximadamente}).$$

por lo tanto tendremos:

$$\epsilon \epsilon_0 K_B T = 2.81413 \times 10^{-30} C^2/m.$$

De esta manera, el valor inverso de la longitud de Debye (denotado como « $k$ ») será:

$$k = 1.2990nm^{-1}. \quad (3.25)$$

y la longitud de Debye del sistema será:

$$\lambda = 0.7697nm. \quad (3.26)$$

### 3.4.3. Dos dobles-capas que se superponen

La ecuación de Poisson-Boltzmann y la ecuación de Debye nos permiten describir como varía el potencial eléctrico de una membrana a través del espacio, de acuerdo a la teoría de la doble capa, pero es de gran importancia analizar que es lo que sucede cuando dos estructuras de doble capa eléctrica se superponen.

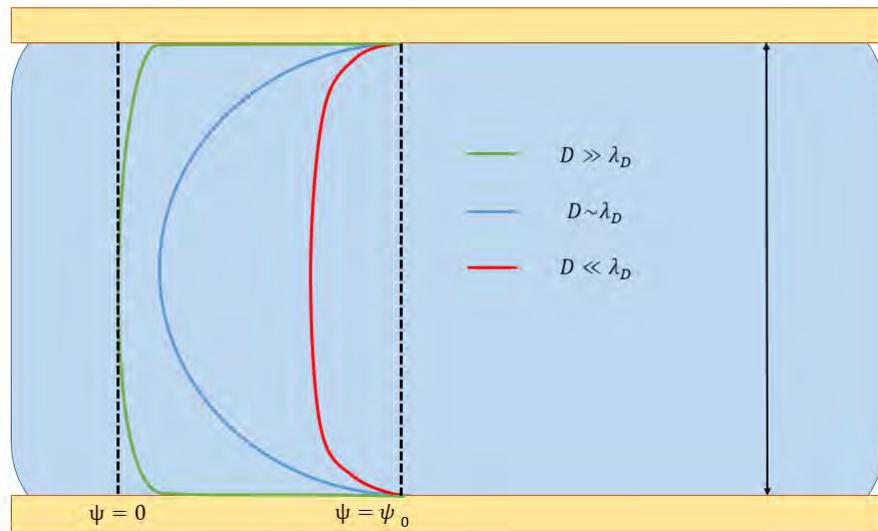


Figura 3.7: Potencial eléctrico en dobles capas eléctricas superpuestas.

Cuando la distancia que haya entre ambas superficies sea mucho mayor que la longitud de Debye, el efecto del potencial eléctrico de una superficie no afectará a la otra, por lo que podremos considerar que ambas superficies no interactúan eléctricamente. Como vimos en el apartado anterior, la longitud de Debye dentro del citosol no excede el nanómetro, en tanto que la distancia en la que se posiciona una vesícula sináptica durante el dockinh y el priming puede llegar hasta 20 nanómetros. Con base en lo anterior, se puede argumentar que la fuerza de repulsión electrostática  $F_E$  entre la membrana plasmática y la membrana de la vesícula tiene un valor de cero para distancias superiores a un par de nanómetros en el citosol. Conforme

las membranas se acerquen la una a la otra, eventualmente la distancia entre ambas será cercana a la longitud de Debye, por lo que se comenzará a presentar una repulsión electrostática entre ambas membranas. Finalmente, cuando la distancia entre superficies es considerablemente menor que la longitud de Debye, el potencial eléctrico de ambas membranas entrará en contacto, teniendo así una fuerza de repulsión electrostática considerable. Dado el carácter de las ecuaciones de repulsión electrostática, el crecimiento de esta fuerza tendrá un carácter exponencial.

### 3.4.4. Repulsión eléctrica entre una esfera y una superficie plana en distancias cortas

Con base en [38] y [39] la ecuación de fuerza resultante al resolver la ecuación Poisson-Boltzmann (3.18) tomando el cuenta el sistema esfera-superficie a una distancia menor que el radio de la esfera es:

$$F_R = kRZ \cdot \exp[-kD]. \quad (3.27)$$

donde la constante  $k$  es el inverso de la longitud de Debye (definido ya en secciones pasadas),  $R$  es el radio de la esfera,  $D$  es la distancia que separa a ambas membranas y  $Z$  es una constante propia de las superficies (análoga a la constante de Hamaker en las fuerzas de Van der Waals). La constante  $Z$  es una constante que (aparte de la valencia del electrolito  $z$ ) depende únicamente de las propiedades de las superficies. Para el sistema de nuestro interés esta constante está definida como:

$$Z = 64\pi\epsilon\epsilon_0(KT/e)^2 \tanh^2(ze\psi_0/4KT). \quad (3.28)$$

donde  $z$  representa la valencia de los iones presentes en la solución. Observando el cuadro 3.1 podemos ver que los iones presentes en el citosol tienen principalmente una valencia de 1, por lo que tomaremos este valor para la constante  $z$ .

Ahora bien, recordando lo visto en secciones anteriores, para el interior de una célula eucariota de un mamífero tendremos los siguientes valores:

- $\epsilon = 74.7$ .
- $\epsilon_0 = 8.8541 \times 10^{-12} F/m$ .
- $K_B = 1.3806 \times 10^{-23} J/k$ .
- $T = 310.15k$ .

- $e = 1.6021 \times 10^{-19}C$ .
- $z = 1$ .

Sustituyendo estos valores en la ecuación anterior obtendremos:

$$Z = (9.5 \times 10^{-11}) \tanh^2(\psi_0 * 9.3538) Jm^{-1}. \quad (3.29)$$

donde el valor de  $\psi_0$  tendrá que estar dado en voltios. Cabe destacar que esta ecuación nos provee el valor de la constante  $Z$  únicamente en función del potencial de superficie de membrana  $\psi_0$ .

De acuerdo con [48] tendremos que típicamente  $\psi_0 = -70$  para la membrana plasmática de la célula, lo que nos deja con el siguiente resultado:

$$Z = 3.1395 \times 10^{-11} Jm^{-1}. \quad (3.30)$$

Conociendo entonces el valor del inverso de la longitud de Debye, el radio de la vesícula y la constante de interacción  $Z$  podemos resolver la ecuación

$$F_R = (1.3nm^{-1})(20.8nm)(3.1395 \times 10^{-11} J/m^{-1}) \cdot \exp[-1.3D].$$

$$F_R = (-848.8923 \cdot \exp[-1.3D]) pN. \quad (3.31)$$

donde la distancia  $D$  estará expresada en nanómetros.

### 3.5. Sumatoria de fuerzas

Una vez que conocemos las ecuaciones que rigen a las fuerzas interactuantes en nuestro sistema, podemos aplicar una sumatoria de fuerzas

$$\sum_i F_i = ma.$$

$$ma = F_S - F_R - F_E + F_W.$$

y, sustituyendo estas fuerzas por las ecuaciones (3.2) (3.5), (3.31) y (3.15), respectivamente:

$$ma = \left[ \frac{59992.746}{D^2(D + 41.6)^2} - 4.7048 \times 10^{-7} \cdot v - 848.8923 \cdot \exp[-1.3D] + n \cdot f_S \right] pN. \quad (3.32)$$

Despejando la aceleración tendremos:

$$a = \left[ \frac{59992.746}{mD^2(D + 41.6)^2} - \frac{4.7048 \times 10^{-7} \cdot v}{m} - \frac{848.8923 \cdot \exp[-1.3D]}{m} + \frac{n \cdot f_S}{m} \right] pN.$$

Si la masa de una vesícula sináptica es, de acuerdo con [30]

$$29.6 \times 10^{-18}g = 29.6 \times 10^{-21}Kg.$$

obtendremos:

$$a = \left[ \frac{59992.746}{29.6 \times D^2(D + 41.6)^2} - \frac{4.7048 \times 10^{-7} \cdot v}{29.6} - \frac{848.8923 \cdot \exp[-1.3D]}{29.6} + \frac{n \cdot f_S}{29.6} \right] \frac{pN}{kg} \times 10^{21}.$$

$$a = \left[ \frac{2.0267 \times 10^9}{D^2(D + 41.6)^2} - 1.5894 \times 10^5 \cdot v - 2.8678 \times 10^7 \cdot e^{[-1.3D]} + 3.3783 \times 10^4 \times n \cdot f_S \right] \frac{nm}{\mu s^2}.$$

(3.33)

Si hacemos la siguiente sustitución:

$$D = x_1.$$

$$\dot{x}_1 = x_2.$$

tendremos el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\dot{x}_1 = x_2. \tag{3.34}$$

$$\dot{x}_2 = \frac{2.0267 \times 10^9}{x_1^2(x_1 + 41.6)^2} - 1.5894 \times 10^5 \cdot x_2 - 2.8678 \times 10^7 \cdot e^{[-1.3x_1]} + 3.3783 \times 10^4 \times n \cdot f_S. \tag{3.35}$$

Recordemos que  $n$  representa el número de complejos SNARE involucrados en el anclado y la preparación, por lo que en las simulaciones realizadas en el siguiente capítulo este valor se irá variando desde 1 hasta 12.

# Capítulo 4

## Resultados

### 4.1. Análisis de las fuerzas intermoleculares

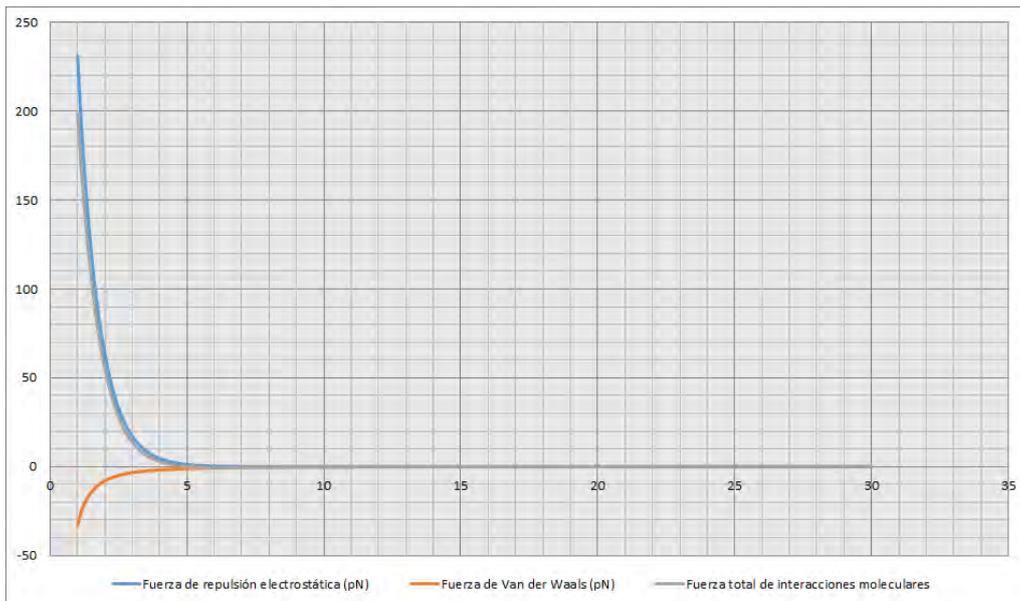


Figura 4.1: Gráfica de las fuerzas intermoleculares

Analizaremos primero las fuerzas debido a las interacciones intermoleculares entre la membrana plasmática y la vesícula sináptica. Como podemos observar al graficar dichas fuerzas, ambas presentan un comportamiento exponencial, siendo la magnitud de estas mucho mayor conforme la vesícula se acerque a la membrana celular. Las fuerzas intermoleculares presentes en nuestro sistema tendrán un efecto prácticamente nulo durante una gran parte del recorrido de la vesícula, y empezarán a tomar trascendencia a partir de una separación de unos cuantos nanómetros. Con base en esto establecemos que la fuerza generada por el complejo SNARE será la fuerza preponderante durante una gran parte del trayecto, y será la principal fuerza

en el docking vesicular. Conforme la vesícula y la membrana celular empiecen a acercarse, podremos observar el crecimiento exponencial de las fuerzas intermoleculares, llegando hasta un punto donde dichas fuerzas serán comparables en magnitud con la fuerza máxima ejercida por el complejo SNARE. En una primera instancia, la fuerza de repulsión electrostática sobrepasará a la fuerza conjunta de las interacciones de Van der Waals y el complejo SNARE, por lo que será necesario un número mayor de complejos para que la vesícula pueda entrar en contacto con la membrana celular.

Sin embargo, habiendo llegado la vesícula a una distancia lo suficientemente cerca de la membrana plasmática, las fuerzas de Van der Waals sobrepasarán en magnitud a la repulsión electrostática, promoviendo así de manera natural el acercamiento y posterior fusión entre la vesícula y la membrana. Consideraremos entonces dicho punto (donde las fuerzas de Van der Waals superan la fuerza electrostática) como la distancia mínima en la que podremos tener un docking/priming vesicular. Habiendo sobrepasado esta distancia, ambas membranas tenderán a acercarse y fusionarse, aún sin la ayuda de la fuerza motora del complejo SNARE. Esta distancia la calculamos simplemente buscando la distancia en que la fuerza electrostática y las fuerzas de Van der Waals tienen la misma magnitud. Determinamos que esta distancia es de aproximadamente 0.234 nm.

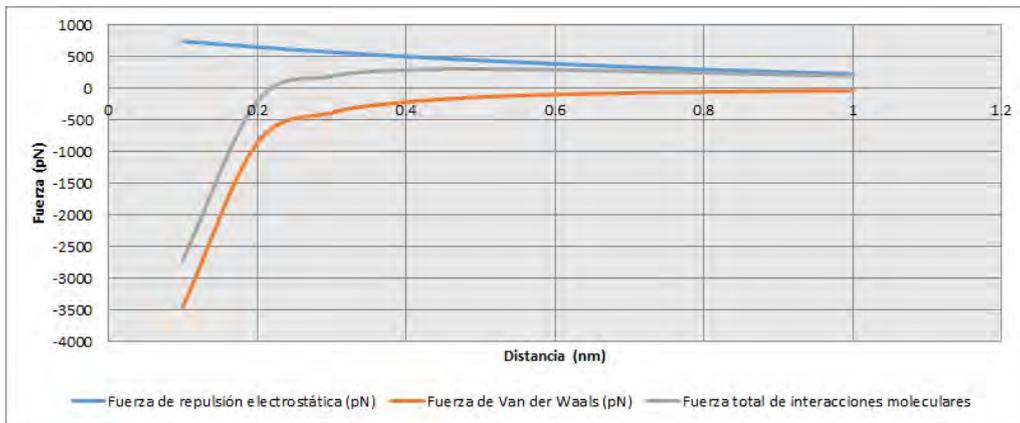


Figura 4.2: Gráfica de las fuerzas intermoleculares a una distancia menor a 1nm.

## 4.2. Distancia mínima alcanzada durante el priming

Con base en el sistema obtenido en el capítulo anterior, deduciremos cual es la distancia mínima que podrá alcanzar una vesícula sináptica con la ayuda de la acción del complejo SNARE. Al llegar a la posición final de su recorrido durante este fenómeno, la vesícula tendrá necesariamente que estar en reposo, es decir, después del movimiento generado por el docking y priming deberá llegar a una posición final donde tanto su aceleración como su velocidad sean cero. Dado que la velocidad de

Número de complejos SNARE	Fuerza máxima desarrollada	Distancia mínima (nm)
1	34	2.3581
2	68	1.8426
3	102	1.5328
4	136	1.3078
5	170	1.1283
6	204	0.9557
7	238	0.8386
8	272	0.7052
9	306	0.5288
10	340	-
11	374	-
12	408	-

Cuadro 4.1: Distancia mínima alcanzada por la vesícula sináptica

la vesícula es cero, la fuerza de resistencia viscosa ante el movimiento tendrá que ser necesariamente de cero, puesto que esta depende directamente de la velocidad. A su vez, en este punto, la fuerza generada por el complejo SNARE deberá ser la fuerza máxima que pueda proporcionar, es decir, la fuerza entregada por el complejo será de 34pN. Entonces, para encontrar la distancia mínima tendremos que buscar aquella distancia donde la sumatoria de las fuerzas intermoleculares y la fuerza generada por el complejo de SNARE tenga como resultado cero. En la siguiente tabla podemos observar el resultado obtenido de dicha distancia en función del número de complejos SNARE que estén participando en la exocitosis de la vesícula. Conforme se aumente el número de complejos involucrados en el docking/priming, la distancia entre ambas membranas se irá haciendo cada vez más pequeña. Notemos que cuando tenemos diez o más complejos participando en el proceso, no se llega a un punto donde la sumatoria de fuerzas es cero, esto es debido a que, como se mencionaba, pasada una cierta distancia, las fuerzas de Van der Waals sobrepasarán en magnitud a la repulsión electrostática, promoviendo que ambas membranas entren en contacto para su posterior fusión. Entonces, de aquí en adelante diremos que el proceso de anclado y pre-fusión tendrá un rango de acción que va desde los 30nm hasta los 0.235nm de distancia de la membrana celular, i.e. será el espacio donde viven las fuerzas de nuestro sistema.

### 4.3. Simulaciones del sistema vesícula-membrana

Para la simulación de nuestro sistema empleamos el entorno de programación visual Simulink, el cual está presente en el software Matlab. Los diagramas de construcción para cada una de las simulaciones realizadas pueden ser consultados en el apéndice A del presente trabajo. A pesar de que los trabajos actuales dan soporte a la teoría de que el complejo SNARE tiene un ensamblado en forma de cremallera o

«zipper», aún no se conoce con certeza cual es el comportamiento in vivo de dichas proteínas. Es debido a esto que utilizaremos tres distintos enfoques para tratar de representar la fuerza generada por este.

### 4.3.1. Simulaciones bajo una fuerza constante del complejo SNARE de 34 pN

Como primer acercamiento en nuestro sistema, utilizaremos la fuerza máxima registrada en el complejo SNARE (de 34pN) durante todo el recorrido de la vesícula sináptica.

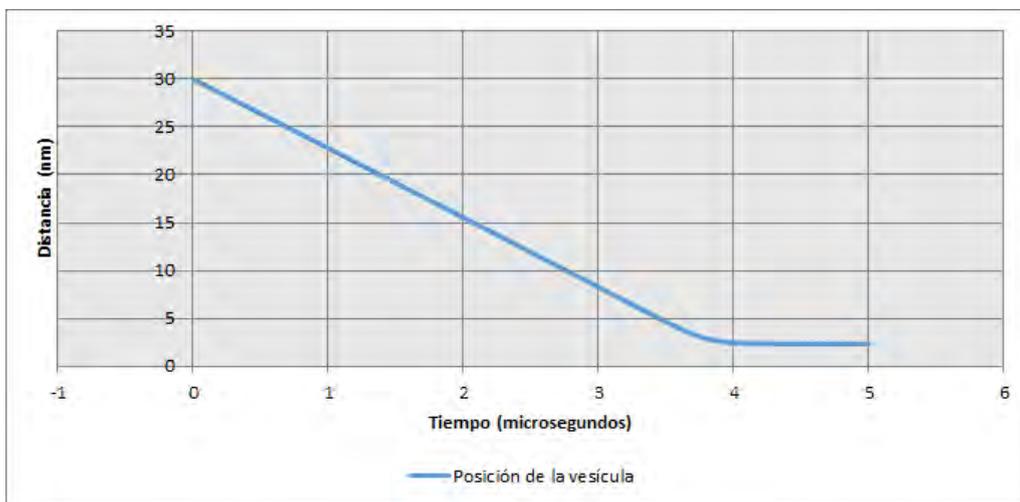


Figura 4.3: Posición de la vesícula sináptica bajo una fuerza constante de 34 pN de un único complejo SNARE.

Como podemos apreciar en las gráficas, se logra casi instantáneamente una velocidad máxima, y en la parte final del recorrido esta velocidad reducirá su magnitud hasta llegar a una velocidad cero. El tiempo que le toma a la vesícula hacer todo el recorrido varía en un rango de 5 a 0.45 microsegundos, dependiendo del número de complejos SNARE que estén actuando sobre la misma. Igualmente, la velocidad máxima de la vesícula dependerá de este factor. Hay que resaltar que este tiempo es mucho menor que el visto en experimentos de sinápsis. En todas las simulaciones pudimos constatar que la distancia mínima alcanzada por la vesícula sináptica fue la misma que se predijo en la sección anterior. Sin embargo, es poco probable que el complejo de SNARE genere una fuerza de 34 pN de manera instantánea. Más aún, sería un desperdicio en términos energéticos utilizar una fuerza constante de 34 pN durante todo su recorrido cuando en una gran parte del mismo se requiere una fuerza de mucha menor magnitud para lograr el movimiento de la vesícula. Por lo tanto, examinaremos otras alternativas en el desarrollo de la fuerza generada por el complejo SNARE

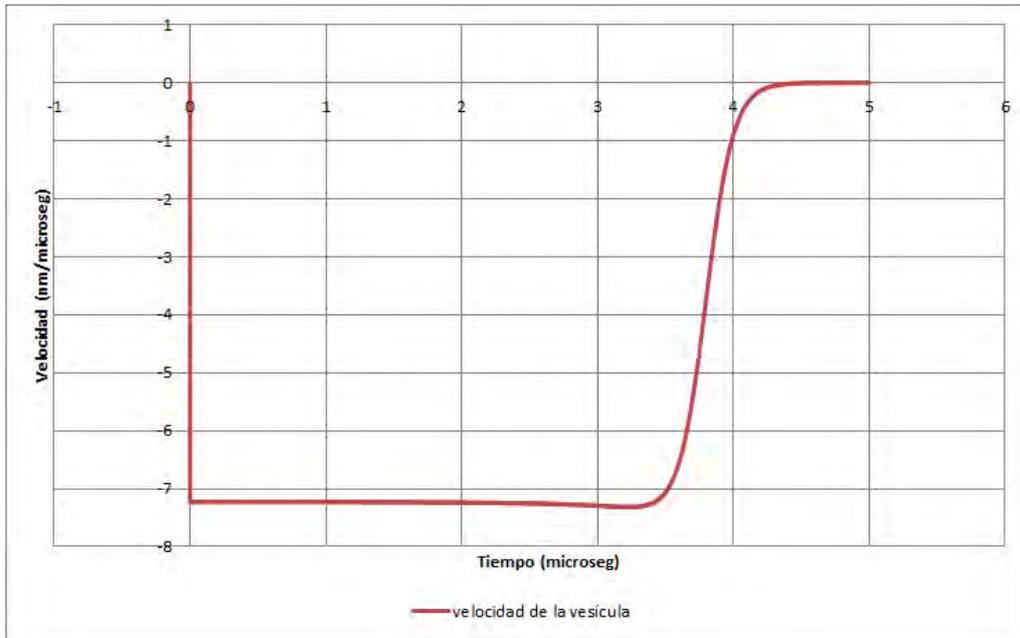


Figura 4.4: Velocidad de la vesícula sináptica bajo una fuerza constante de 34 pN de un único complejo SNARE.

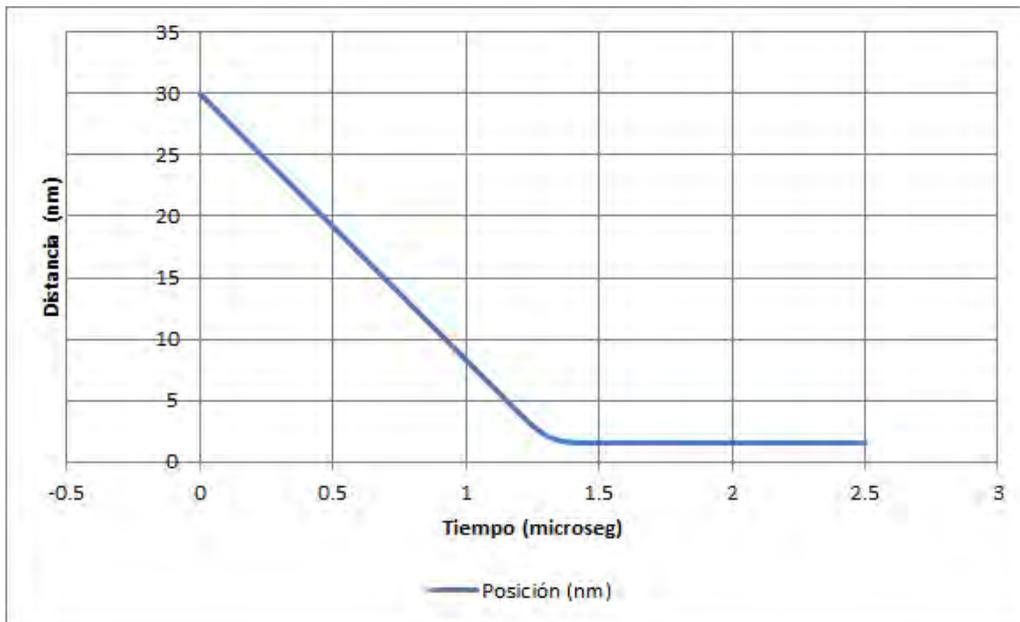


Figura 4.5: Posición de la vesícula sináptica bajo una fuerza constante de 34 pN de 3 complejos SNARE (102pN totales).

### 4.3.2. Simulaciones utilizando una función exponencial para representar el incremento de fuerza en el complejo SNARE

En esta ocasión intentaremos representar la fuerza generada por el complejo SNARE con una función exponencial que parta de un valor de 0pN hasta llegar a un

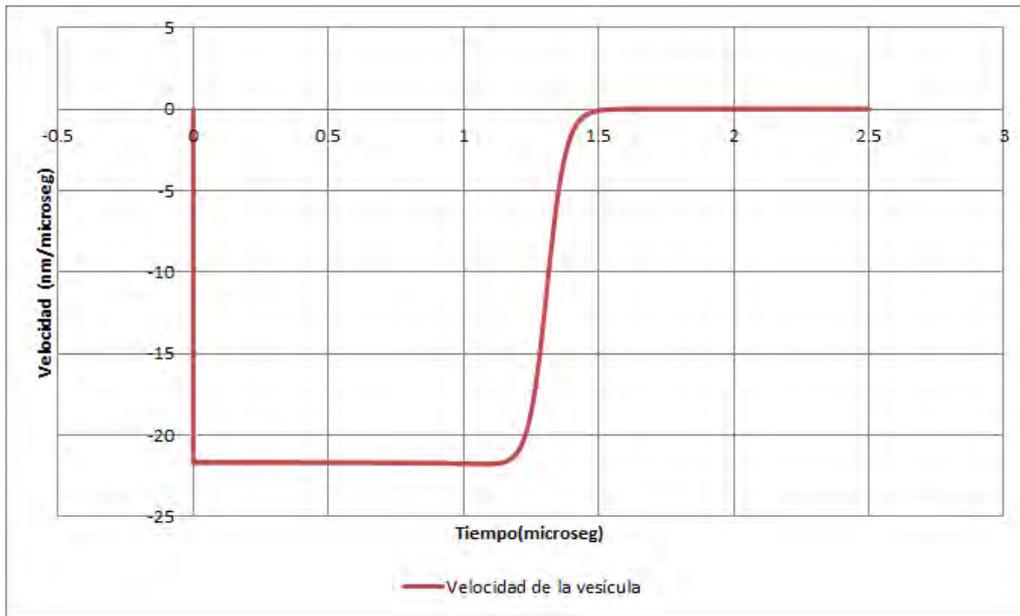


Figura 4.6: Velocidad de la vesícula sináptica bajo una fuerza constante de 34 pN de 3 complejos SNARE (102pN totales).

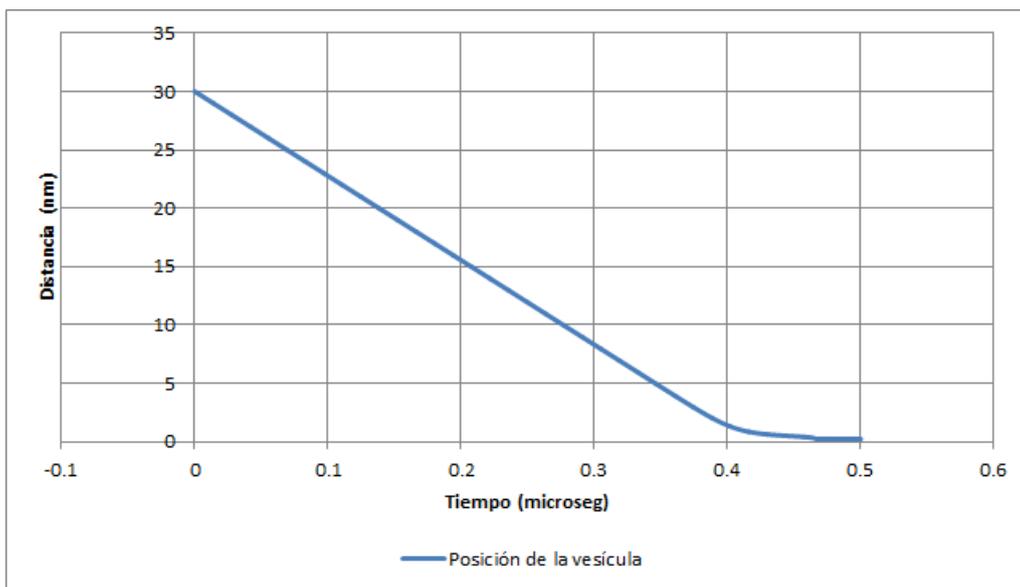


Figura 4.7: Posición de la vesícula sináptica bajo una fuerza constante de 34 pN de 10 complejos SNARE (340pN totales).

valor máximo de 34pN cuando la distancia entre membranas sea cero. Los parámetros adimensionales utilizados para la ecuación así como el diagrama de construcción de la simulación se encuentran en el apéndice A. Graficando este sistema con un número de 3 complejos SNARE actuantes, podemos observar que, en comparación con el caso anterior donde teníamos una fuerza constante, el tiempo en que la vesícula llega a la distancia mínima es considerablemente menor, sin embargo, sigue

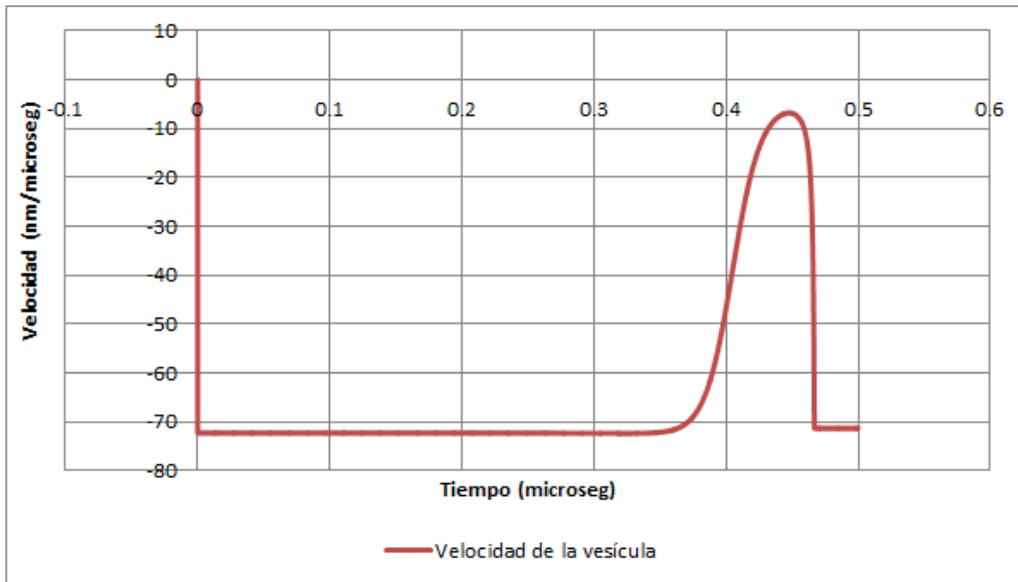


Figura 4.8: Velocidad de la vesícula sináptica bajo una fuerza constante de 34 pN de 10 complejos SNARE (340pN totales).

siendo un tiempo muy pequeño en comparación con los datos reportados experimentalmente. Un problema encontrado al utilizar esta ecuación es que el complejo de SNARE, al no llegar necesariamente a una distancia mínima, no desarrollará su máxima fuerza, y, por lo tanto, la distancia mínima entre las membranas será mayor. Por lo tanto, este modelo exponencial pareciera ser una no muy buena aproximación a la dinámica real del complejo SNARE.

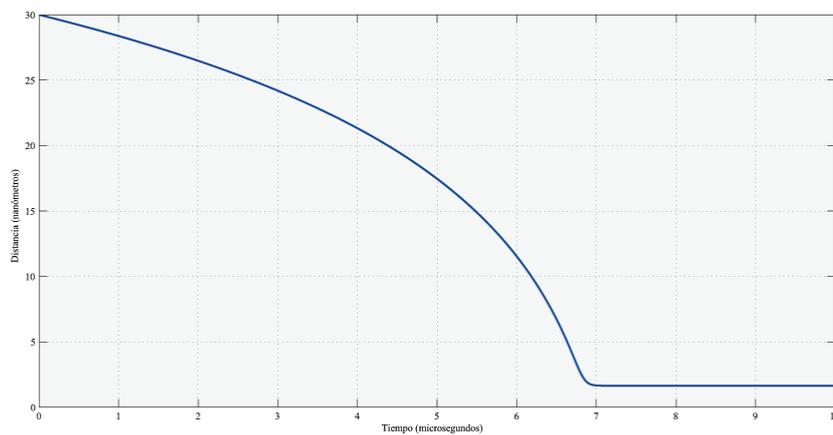


Figura 4.9: Posición de la vesícula sináptica bajo una fuerza exponencial de 3 complejos SNARE.

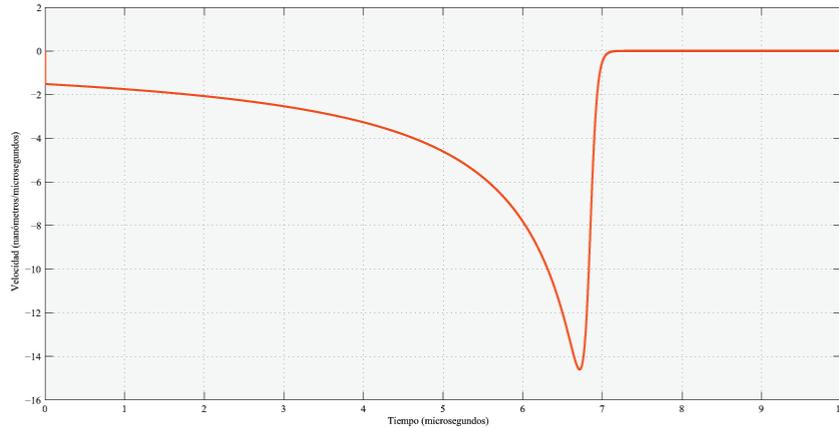


Figura 4.10: Velocidad de la vesícula sináptica bajo una fuerza exponencial de 3 complejos SNARE.

### 4.3.3. Simulaciones utilizando una función escalonada para representar el incremento de fuerza en el complejo SNARE

Finalmente utilizaremos una función escalonada para representar la dinámica de fuerza que presenta un complejo SNARE. Para esto nos basaremos en la hipótesis que proponen en su artículo de investigación Ying Gao *et. al.* (2013). En lugar de tener un aumento definido por una función, utilizaremos cambios abruptos de fuerza para representar los cambios configuracionales del complejo SNARE.

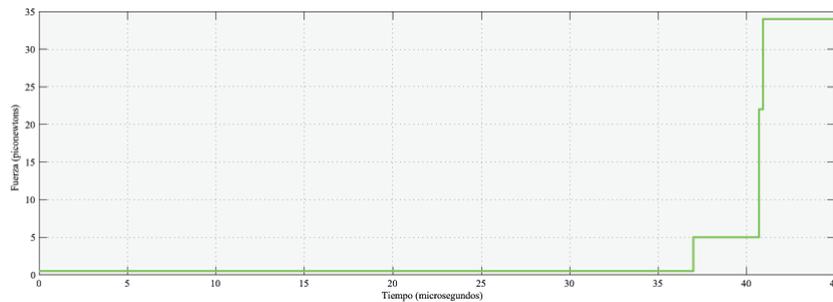


Figura 4.11: Fuerza generada por el complejo SNARE a través del tiempo.

Observando la posición de la vesícula con respecto al tiempo podemos constatar que se aumenta considerablemente el tiempo transcurrido para llegar a una distancia mínima de la membrana plasmática, la cual, es la misma posición calculada en la tabla presentada anteriormente en este capítulo. Obviamente, este tiempo de recorrido seguirá siendo menor conforme añadimos más complejos SNARE al sistema. El tiempo bajo esta función escalonada cuando tres complejos SNARE están actuando sobre la vesícula es de aproximadamente 41.2 microsegundos. Asimismo la

máxima velocidad alcanzada será de  $18\text{nm}/\mu\text{s}$ . Hay que resaltar que para este caso de 3 complejos SNARE, el tiempo que lleva llegar a la posición mínima es similar al tiempo reportado en la literatura.

En la gráfica de velocidad podemos apreciar los cambios de velocidad que presenta la vesícula sináptica, y como estos corresponden con los cambios de fuerza que se presentan en el complejo SNARE.

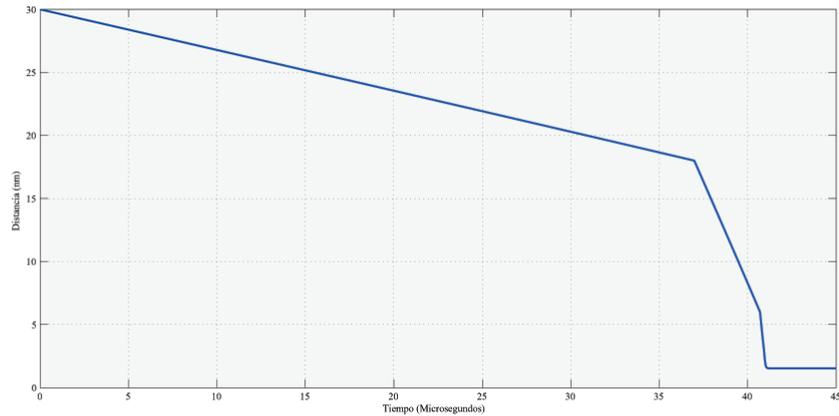


Figura 4.12: Posición de la vesícula sináptica bajo una fuerza escalonada de 3 complejos SNARE.

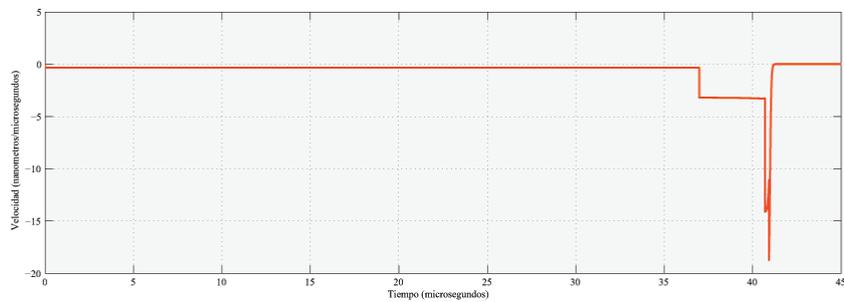


Figura 4.13: Velocidad de la vesícula sináptica bajo una fuerza escalonada de 3 complejos SNARE.

# Capítulo 5

## Discusión y Trabajo Futuro

### 5.1. Discusión

#### 5.1.1. Con respeto a las fuerzas intermoleculares

Como vimos en el capítulo anterior, cuando tengamos por lo menos diez complejos SNARE interactuando durante la exocitosis, estos desarrollarán una fuerza máxima que vencerá a la fuerza generada por la repulsión electrostática de ambas membranas, permitiendo de esta manera un contacto más estrecho entre estas que lleve a una posterior fusión vesicular. En base a esto podemos conjeturar que la secreción constitutiva (i.e. la liberación espontánea de neurotransmisor, sin presencia de un potencial de acción) estará determinada por el número de complejos SNARE que estén actuando sobre nuestro sistema. Tendremos entonces una secreción constitutiva cuando tengamos por lo menos diez complejos SNARE, mientras que será necesaria la llegada de un potencial de acción para que las vesículas que se encuentren en docking o priming con un menor número de complejos SNARE puedan fusionarse con la membrana.

#### 5.1.2. Posición final de la vesícula

Existe una gran cantidad de bibliografía que coloca la distancia en que la vesícula es competente para la fusión desde estar a un par de nanómetros de distancia hasta estar prácticamente en contacto con la membrana plasmática. De hecho, en [43] y [44] se menciona que mediciones de difracción de rayos X muestran que el complejo SNARE contrarresta la fuerza de repulsión electrostática hasta llevar a ambas membranas a una distancia de aproximadamente 2.8 Armstrong, antes de que estas puedan llevar a cabo una fusión. Esta cifra es muy similar a cifra de 0.235nm (2.35

Armstrong) que calculamos como la distancia a partir de la cual se producirá de manera natural un acercamiento y fusión entre ambas membranas.

### **5.1.3. Tiempo de fusión y liberación**

Dado que este trabajo no abarca el proceso de fusión vesicular, nos es imposible definir el tiempo que abarca dicho fenómeno, de tal manera que no podemos determinar cuál será el tiempo total de exocitosis desde que el complejo SNARE empieza el proceso de docking hasta que es liberado el contenido de la vesícula al medio externo. A pesar de esto, nosotros podemos definir el tiempo que tomará desde que se inicia el docking vesicular hasta que la vesícula se encuentra en la posición más cercana para iniciar la fusión vesicular. Este tiempo irá desde un par de microsegundos hasta poco menos de 100 microsegundos, dependiendo del número de complejos SNARE involucrados en la exocitosis así como de la dinámica de la fuerza del complejo SNARE. Con base en diversos estudios que sugieren que una liberación rápida de vesículas ante la llegada de un potencial de acción se sitúa alrededor de los 60 microsegundos [40] [41] [42] (relacionando este tiempo con la liberación de aquellas vesículas sinápticas que se encuentran en una etapa de docking o priming), nos inclinamos a pensar que el ensamble del complejo SNARE responde a una mecánica similar a la descrita por una función escalonada, ya que es la que daría un mayor tiempo para que se dieran los cambios configuracionales del complejo SNARE durante el docking vesicular. A pesar de ser, de las opciones vistas, la dinámica más lenta, sigue estando por debajo de la barrera de tiempo de los 60 microsegundos, dejando todavía tiempo suficiente para que se lleve a cabo la fusión de membranas y la liberación de neurotransmisor. Hay que aclarar que, si bien ya se han realizado experimentos que permitieron determinar la fuerza necesaria para desensamblar un complejo SNARE, y, en base a esto, se propuso un modelo de ensamble, hasta la fecha no se ha observado ni medido la formación de un complejo SNARE in vivo, lo que nos impide determinar con total certeza la dinámica de ensamble del mismo.

### **5.1.4. Respecto a otros trabajos encontrados en la literatura**

Cabe destacar que hasta la fecha, no se ha publicado ningún trabajo que describa los procesos llevados a cabo durante la exocitosis (traslocación, docking, priming, fusión, etc.) en términos de ecuaciones que describan de una manera sencilla la dinámica de los mismos, si bien son numerosos los trabajos en el ámbito de experimentación. Como hemos visto, aún cuando nuestro trabajo está delimitado a una pequeña parte del proceso de la exocitosis, los resultados arrojados por esta modelación son en muchos casos similares a los reportados experimentalmente, en cuestiones de tiempos y distancias, por lo que consideramos que, a pesar de la aparente sencillez del modelo, sirve para explicar muchos de los fenómenos y fuerzas envueltas en el docking y priming vesicular.

## 5.2. Conclusiones

En el presente trabajo de tesis se presentó un modelo físico-matemático formado por dos ecuaciones no lineales diferenciales ordinarias que representan la dinámica del sistema vesícula sináptica-membrana plasmática durante el proceso de anclado y pre-fusión vesicular. Para la construcción del presente modelo se tomaron en cuenta las principales fuerzas existentes, i.e. las fuerzas de repulsión electrostática, fuerzas de van del Waals, resistencia viscosa y la fuerza generada por el complejo de SNARE. Las ecuaciones resultantes nos permitieron observar el cambio en la posición y velocidad de la vesícula con respecto al tiempo, así como estimar la distancia mínima a la que podrán llegar las membranas antes de empezar el evento de fusión vesicular.

Propusimos una función escalonada con base en las observaciones realizadas en estudios experimentales para modelar la fuerza generada por el complejo. De esta manera se logró encontrar y resolver un sistema de ecuaciones que describe a las fuerzas que interactúan en nuestro sistema. El modelo propuesto satisfizo las simulaciones computacionales del sistema de ecuaciones y nos permitió observar el comportamiento de la vesícula sináptica a través del tiempo. Asimismo, logramos predecir un estimado de la distancia mínima a la que llegaría la vesícula durante esta fase de la exocitosis.

Finalmente, al comparar los datos de tiempo y distancia obtenidos en la simulaciones con aquellos reportados en la literatura científica, podemos concluir que nuestro modelo representa una buena aproximación al proceso de anclado y pre-fusión vesicular, tomando en cuenta que la dinámica del ensamble del complejo SNARE aún no es comprendida en su totalidad. Teniendo esto en cuenta, será necesario seguir trabajando en el presente modelo conforme se descubran y reporten nuevos avances en el entendimiento de este proceso. Con respecto a la distancia mínima que se alcanza durante el anclaje y pre-fusión, llegamos a resultados muy similares a los expuestos en la literatura, por lo que concluimos que si bien la dinámica del ensamble del SNARE podría ser distinta (afectando así el tiempo de fusión) la fuerza máxima desarrollada por el complejo necesariamente tendría que estar dentro del rango de fuerzas presentado en esta tesis.

## 5.3. Trabajo a futuro

El trabajo a futuro referente a la modelación matemática de los fenómenos presentes durante la exocitosis, y más aún, sobre la sinápsis en general, tiene un gran potencial, dado que aún es un campo poco explorado. En esta tesis se exploraron las fuerzas más comunes que intervienen en los pasos previos a la fusión vesicular, y se observó la importancia de vencer la resistencia electrostática que se genera entre ambas membranas a la hora de acercarse estas y lograr una fusión. Sin embargo, aún quedan muchas interrogantes a responder durante dicho fenómeno y que pueden constituir un interesante punto de partida para investigaciones futuras. Algunas de

estos puntos a tratar son:

- Durante el presente trabajo, nos hemos basado en las observaciones e hipótesis desarrolladas por las investigaciones referentes al ensamblado y desensamblado del complejo SNARE, dando diferentes valores de fuerza al complejo según su nivel de ensamblado. Sin embargo, aún no conocemos con exactitud cómo funciona el ensamblado de este complejo in vivo. Teniendo en cuenta lo anterior, se debe encontrar cual es la dinámica exacta que rige el cambio conformacional del complejo SNARE y en función de que parámetros está dada dicha dinámica. Considerar el efecto que podrían tener diversas proteínas auxiliares en la generación de fuerza por parte del complejo SNARE, dilucidando cual es el efecto que estas podrían tener en la dinámica del mismo.
- Si bien dentro de este modelo se han introducido las principales fuerzas intermoleculares (fuerza electrostática y atracción de Van der Waals), no se han tomado en cuenta otras fuerzas intermoleculares que actúan en una escala inferior al nanómetro de separación y que pudieran, en un momento determinado, afectar la dinámica de la fusión vesicular, por ejemplo, las fuerzas de hidratación.
- En el modelo se ha representado el efecto de repulsión electrostática gracias a la ecuación de Poisson-Boltzmann, sin embargo, es necesario tomar en cuenta que durante la exocitosis está presente una depolarización de la membrana plasmática, lo que afectará la manera en que interactúan ambas membranas, por lo que es necesario plantear otra ecuación que describa las interacciones electrostáticas de las membranas ante dicha depolarización.
- También será necesario dilucidar si parte de la fuerza aplicada por el complejo SNARE es disipada por las membranas, o utilizada de alguna forma en la ruptura de las mismas para su posterior fusión.

Asimismo, también existen otras partes del fenómeno de la exocitosis que aún no han sido tratadas desde el punto de vista de modelación matemática, o bien, no han sido desarrolladas en su totalidad, y que, de ser estudiadas, permitirían un conocimiento integral del fenómeno, permitiendo comprender de una manera completamente nueva este fenómeno de comunicación celular. Entre dichos fenómenos podemos observar:

- La entrada y distribución de los iones calcio al interior de la célula, tomando en cuenta factores como la mecánica de fluidos y distribución de materia.
- La reorganización de la red de actina en el citosol ante la entrada de los iones calcio, así como el paso de las vesículas sinápticas a través de dicha red gracias al efecto de diversos motores moleculares.
- La mecánica de la fusión vesicular. Dentro de este apartado, si bien ya existen investigaciones referentes a la energía que sería necesaria para romper ambas membranas y simulaciones respecto al cambio estructural de dichas membranas, aún es necesario un modelo que conjunte todos estos factores y logre explicar adecuadamente dicho fenómeno.

- La difusión del contenido vesicular a través de la grieta sináptica, para su posterior captación por parte de la célula postsináptica.

Finalmente será necesario llevar a cabo un trabajo que integre todos estos fenómenos y los conjunte en un solo modelo que permita comprender de manera integral el fenómeno de la exocitosis, y más aún, que permita predecir el comportamiento de la exocitosis ante una serie de factores externos. Sin embargo, para llevar a cabo dichas modelaciones, en muchos casos aún es necesario llevar a cabo más investigaciones experimentales que nos permitan comprender con claridad estos fenómenos, y tracen el rumbo de acción que deberán tomar los modelos matemáticos.

# Apéndice A

## Diagramas de bloques en Simulink

En el presente capítulo se muestran los diagramas de bloques utilizados en Simulink para simular el sistema de ecuaciones resultante de la modelación matemática. En todos los casos la función embebida en el bloque «fcn» es la misma y es la siguiente:

$$((-2.0276*10^9)/((u(1)^2)*(u(1)+41.6^2))-(1.5894*10^5)*u(2)+(2.8678*10^7)*exp(-1.3*u(1)))$$

De igual manera, en todos los casos los bloques de velocidad y posición tienen los mismos valores iniciales y los mismos límites de integración. Para el integrador de velocidad se utilizó una condición inicial de 0, un límite de saturación inferior de «-inf» y un límite de saturación superior de 0.1. Para el caso del integrador de posición se utilizó una condición inicial de 30, un límite de saturación inferior de 0.235 y un límite de saturación superior de 30. En todos los diagramas el bloque de ganancia tiene un valor de  $-3.3783*10^4$ .

Para el caso del primer esquema tenemos un bloque de constante que representa una fuerza constante de 34 (pN). En el segundo diagrama podemos observar que la fuerza del complejo SNARE depende de una función dependiente de la posición. La función embebida en dicho bloque es

$$34 * 0.915^u(1).$$

Finalmente, en el último diagrama se utilizó un bloque de decisión que permite determinar la fuerza con la que actúa el complejo SNARE en función de la distancia entre la vesícula y la membrana, generando de esta manera una función escalonada.

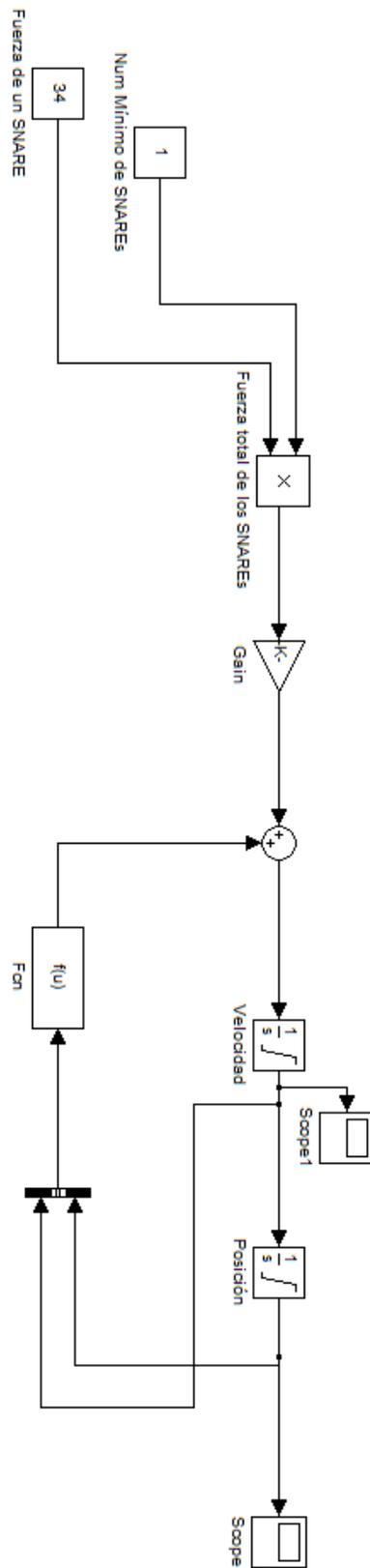


Figura A.1: Esquema de Simulink utilizando una fuerza constante de 34pN.

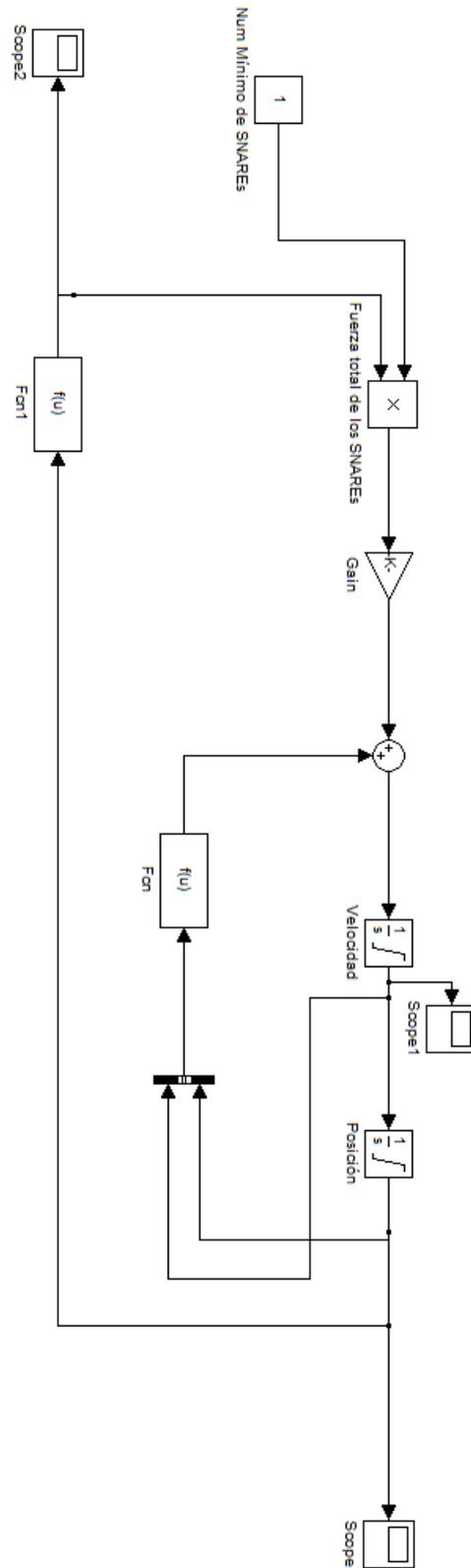


Figura A.2: Esquema de Simulink utilizando una función exponencial para la fuerza.

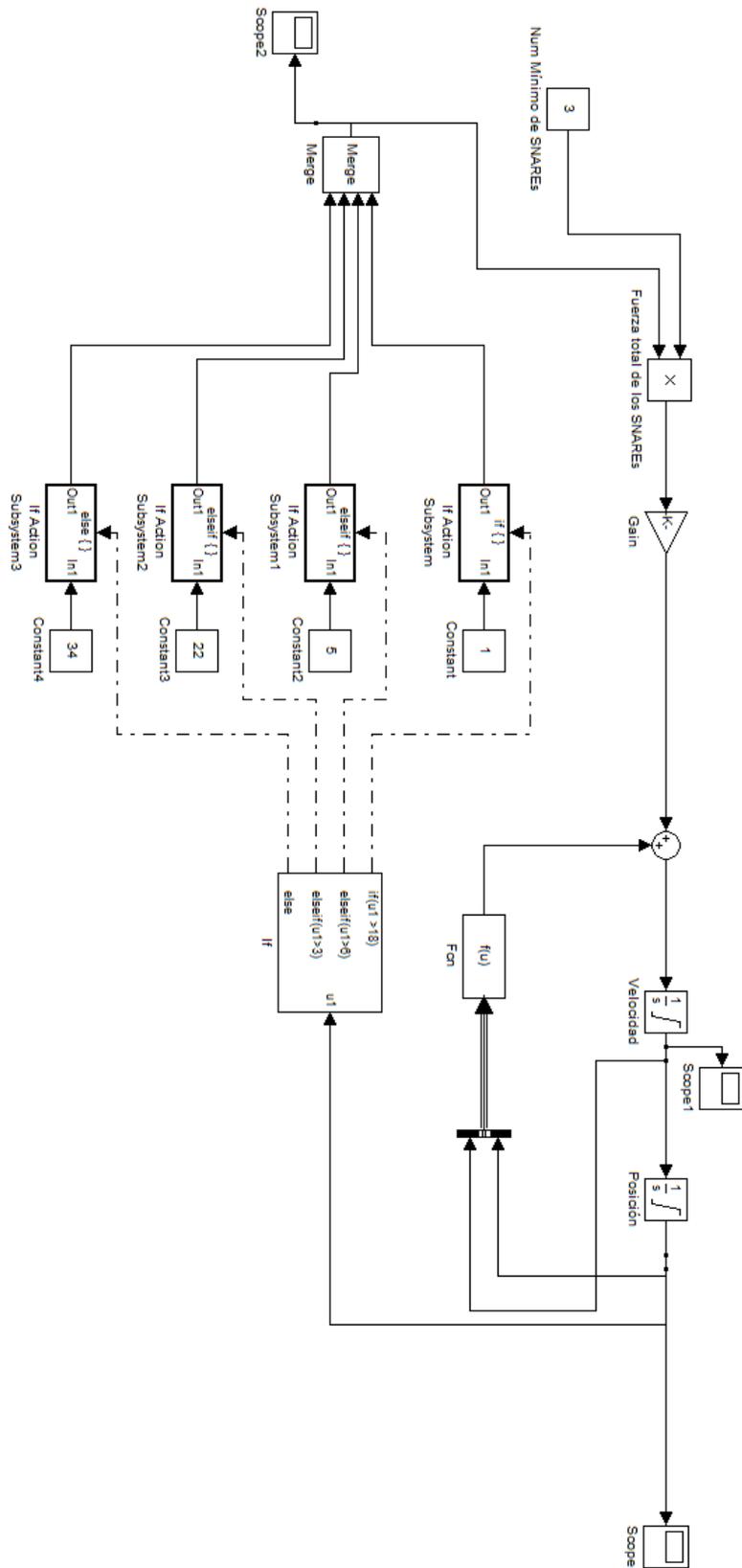


Figura A.3: Esquema de Simulink utilizando escalones de fuerza.

# Bibliografía

- [1] T.C. Südhof, The Presynaptic Active Zone, *Neuron*, *Neuron*. 75, 11-25 (2012)
- [2] T.C. Südhof, *Synapses*, The Johns Hopkins University Press (2001)
- [3] M.C Binder, N. Hirokawa and U. Windhorst, *Encyclopedia of Neuroscience*, Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg (2009).
- [4] F.E Schweizer, K.M. Myers and A. Caputo, In the Zone: presynaptic function at high res, *Nature*, 15, 928-229 (2012)
- [5] E. Neher and T. Sakaba, Multiple Roles of Calcium Ions in the Regulation of Neurotransmitter Release, 59, 861-872, (2008)
- [6] W.A. Catterall and A.P. Few, Calcium Channel Regulation And Presynaptic Plasticity, *Neuron*. 59, 861-872 (2008)
- [7] W.A. Catterall, Voltage-Gated Calcium Channels, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, (2011)
- [8] A.G. García, A.M. García-de-Diego, L. Gandía, R. Borges, J. García-Sancho, Calcium Signaling and Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells, *physiol Rev*. 86, 1093-1131 (2006)
- [9] N. Vardjan, J. Jorgacevski and R. Zorec, Fusion Pores, SNAREs and Exocytosis, *The Neuroscientist*, 19(2), 160-174 (2012).
- [10] M. L. Vitale, E. P. Seward and Col, Chromaffin Cell Cortical Actin Network Dynamics Control the Size of the Release-Ready Vesicle Pool and the Initial Rate of Exocytosis, *Neuron Cell Press*, 14, 353-363 (1995)
- [11] F. Doussau, G.J. Augustine, The Actin Cytoskeleton and Neurotransmitter Release: An Overview, *Biochimie*, 82, 353-363 (2000)
- [12] C. Dillon and Y. Goda, The Actin Cytoskeleton: Integrating Form and Function at the Synapse, *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 25-55 (2005)
- [13] H. de Wit, Morphological Docking of Secretory Vesicles, *Histochem Cell Biol*, 134, 103-113 (2010)

- [14] L. Siksou, F. Varogeaux, O. Pascual, A. Triller, N. Brose, S. Marty, A Common Molecular Basis For Membrane Docking and Functional Priming of Synaptic Vesicles, *Journal of Neuroscience*, 30, 49-56 (2009)
- [15] U. Becherer and J. Rettig, Vesicle Pools, Priming and Release, *Cell Tissue Res*, 326, 393-407 (2006)
- [16] R. Rizzuto and T. Pozzan, Microdomains of Intracellular  $Ca^{2+}$ : Molecular Determinants and Functional Consequences, *Physiol Rev*, 86, 369-408 (2006)
- [17] D. Giner and Col, Real-Time Dynamics of the F-Actin Cytoskeleton During Secretion From Chromaffin Cells, *Journal Of Cell Science*, 118, 2871-2880 (2005)
- [18] C. Villalobos, L. Nuñez, M. Montero, A.G. García, M.T. Alonso, P. Chamero, J. Álvarez, J. García-Sancho, Redistribution Of Calcium Among Cytosol and Organella During Stimulation Of Bovine Chromaffin Cells, *the FASEB Journal*, 16, 343-353 (2002)
- [19] R. Bertram, Mathematical Models of Synaptic Transmission and Short-Term Plasticity, *Lect. Notes Math.* 1867, 173-202 (2005)
- [20] L. Zhang, M.G. Marcu, K. Nau-Staud, J.M. Trifaró, Recombinant Scinderin Enhances Exocytosis, an Effect Blocked by Two Scinderin-Derived Actin-Binding Peptides and  $PIP_2$ , *Neuron*. 17, 287-296 (1996)
- [21] S. Miyamoto, T. Funatsu, S. Ishiwata, S. Fujime, Changes in mobility of chromaffin granules in actin network with its assembly and  $Ca^{2+}$  - dependent disassembly by gelsolin, *Biophysical Journal*. 64, 1139-1149 (1993)
- [22] J.A. Steyer, H. Horstmann, W. Almers, Transport, docking and exocytosis of single secretory grnaules in live chromaffin cells, *Nature*. 388, 474-478 (1997)
- [23] T.C. Shüdoof, Calcium Control of Neurotransmitter Release, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2012)
- [24] A.T. Brunger, Structure and Function of SNARE and SNARE-Interacting proteins, *Quarterly Reviews of Biophysics*. 38, 1-47 (2006)
- [25] T.C. Shüdoof, Understanding Synapses: Past Present and Future, *Neuron*. 60, 469-476 (2008)
- [26] S.M. Wojcik and N. Brose, Regulation of Membrane Fusion in Synaptic Excitation-Secretion Coupling: Speed and Accuracy Matter, *Neuron* 55, 11-24 (2007)
- [27] R. Swaminathan, S. Bicknese, N. Periasamy, A.S. Verkman, Cytoplasmic Viscosity Near the Cell Plasma Membrane: Translational Diffusion of a Small Fluorescent Solute Measured by Total Internal Reflection-Fluorescence Photobleaching Recovery. *Biophysical Journal*, 71, 1140-1151 (1996)

- [28] S. Bicknese, N. Periasamy, S.B. Shohet, A.S. Verkman, Cytoplasmic Viscosity Near the Cell Plasma Membrane: Measurement by Evanescent Field Frequency-Domain Microfluorimetry. *Biophysical Journal*, 65, 1272-1282 (1993)
- [29] K. Fushimi and A.S. Verkman, Low Viscosity in the Aqueous Domain of the Cell Cytoplasm Measured by Picosecond Polarization Microfluorimetry. *The Journal of Cell Biology*, 112, 719-725 (1991)
- [30] S. Takamori, M. Holt, K. Stenius, E.A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brügger, P. Ringler, S.A Müller, B. Rammner, F. Gräter, J.S. Hub, B.L. de Groot, G. Miekse, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmüller, J. Heuser, F. Wieland, R. Jahn, Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell*, 127, 831-846 (2006)
- [31] D. Min, K. Kim, C. Hyeon, Y.H. Cho, Y.K. Shin, T.Y. Yoon, Mechanical Unzipping and Reziping of a SNARE Complex Reveals Hysteresis as a Force-generating Mechanism. *Nature communications*, (2013)
- [32] Y. Gao, S. Zorman, G. Gundersen, Z. Xi, L. Ma, G. Sirinakis, J.E. Rothman, Y. Zhang, Single Reconstituted Neuronal SNARE Complexes Zipper in Three Distinct Stages. *Science*, 337, (2012)
- [33] F. Li, F. Pincet, E. Pérez, W.S. Eng, T.J. Melia, J.E. Rothman, D. Tarese, Energetics and Dynamics of SNAREpin Folding Across Lipid Bilayers. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14, 890-896 (2007)
- [34] G. Van den Bogaart, M.G. Holt, G. Bunt, D. Riedel, F.S. Wouters, R. Jahn, One SNARE Complex is Sufficient for Membrane Fusion. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17, 358-365 (2010)
- [35] L. Shi, Q.T. Shen, A. Kiel, J. Wang, H.W. Wang, T.J. Melia, J.E. Rothman, F. Pincet, SNARE Proteins: One to Fuse and Three to Keep the Nascent Fusion Pore Open. *Science*, 335, 1355-1359 (2012)
- [36] R. Mohrmann, H. de Witt, M. Verhage, E. Neher, J.B. Sorensen, Fast Vesicle Fusion in Living Cells Requires at Least Three SNARE Complexes. *Science*, 330, 502-505 (2010)
- [37] H.J. Butt, K. Graf and M. Kappl, *Physics and Chemistry of Interfaces*. Wiley, (2003)
- [38] D. Leckband And J. Israelachvili, *Intermolecular Forces in Biology*. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 34, 105-267 (2001)
- [39] J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces Third Edition*. Elsevier (2011)
- [40] B.L. Sabatini and W.G. Regehr, Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. *Nature*, 384 (1996)

- [41] B.L. Sabatini and W.G. Regehr, Timing of synaptic transmission. *Annu Rev Physiol*, 61, 521-542 (1999)
- [42] D. Bruns R. Jahn, Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature*, 377, 62-65 (1995)
- [43] P.B. Jena, Role of SNAREs in membrane fusion. *Adv Exp MEd Biol*, 713, 13-32 (2011)
- [44] P.B. Jena, Membrane fusion: Role of SNAREs and Calcium. *Protein Pept Lett*, 16, (2009)
- [45] M.B. Jackson, SNARE Complex Zipping as a Driving Force in the Dilatation of Proteinaceous Fusion Pores. *J Membr Biol*, 235, 89-100 (2010)
- [46] A. Maximov, J. Tang, X. Yang, Z.P. Pang, T.C. Südhof, Complexin Controls the Force Transfer from SNARE Complexes to Membranes in Fusion, *Science*, 323, 516-521 (2009)
- [47] R. Mohrmann and J.B. Sorensen, SNARE Requirements En Route to Exocytosis: from Many to Few, *J Mol Neurosci*, 48, 387-394 (2012).
- [48] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Robe, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, Garland Science, 2002.
- [49] E.D. Gundelfinger, M.M. Kessels and B. Qualmann, Temporal and Spatial Coordination of Exocytosis and Endocytosis, *Nature reviews molecular cell biology*, 4, 127-139 (2003).