

FISIOLOGIA:

Membrana Plasmatica:

La membrana plasmatica svolge una funzione di barriera che permette la compartimentazione di due ambienti diversi (intra ed extracellulare). Non si tratta di una struttura passiva, in quanto è estremamente dinamica e capace di discriminare le sostanze capaci di permeare da uno spazio all'altro.

Il modello identificato è quello di **mosaico fluido**, in cui viene descritta come un bilayer fluido in cui sono immersi lipidi, carboidrati e proteine capaci di spostarsi da un punto all'altro. Al suo interno tuttavia si identificano dei microdomini lipidici con funzioni particolari, che limitano la mobilità delle molecole. Sono costituiti da **LIPID RAFTS**, ovvero strutture piatte ricche di glicosfolipidi (ganglioside GMI) e colesterolo, che irrigidiscono la membrana e ne preservano l'architettura (si possono spostare da una regione all'altra come zattere); e le **caveole**, porzioni invaginate di 80-100 nm con forma ad Ω rovesciata, costituite da *caveolina* (proteina a forcina che oligomerizza e piega la membrana) e *cavina* (proteina che stabilizza la struttura): si tratta di piattaforme che clusterizzano molecole necessarie al signalling intracellulare, coinvolte in determinati pathway (hub, piattaforme per il segnale), in particolare sono coinvolte nelle risposte a stiramento meccanico (sono abbondanti in cell endoteliali, muscolari e adipose).

→ quando la membrana viene tesa, le caveole vengono stirate e perdono la loro forma, la cavina si dissocia, mentre la caveolina rimane nel bilayer. Queste normalmente sono associate all'enzima eNOS, che risente della distensione e quando ciò accade si dissocia e si attiva, producendo NO che induce una vasodilatazione e rilassamento delle fibre muscolari.

I lipidi presenti nel bilayer possono muoversi e diffondere lateralmente (osservato con FRAP) con una frequenza di $2\mu\text{m/s}$, oscillare, accorciarsi, ripiegarsi, fare flip-flop da un foglietto all'altro (uno all'ora).

Le proteine che compongono la membrana variano in base al tipo cellulare considerato (nei neuroni prevalgono i canali ionici, nelle cellule epiteliali i trasportatori) e sono vincolate da interazioni con citoscheletro, proteine, matrice, lipidi...

Si distinguono in proteine integrali (transmembrana), con ruoli molteplici (trasporto, recettoriali di riconoscimento, enzimatici, strutturali, di connessione...) e periferiche, a loro volta divise in intracellulari (con ruolo strutturale) ed extracellulari (importanti per il riconoscimento e protezione della cellula).

Le membrane sono strutture semipermeabili, esistono diversi tipi di trasporto:

-diffusione semplice: avviene in forma libera attraverso lo strato fosfolipidico, senza richiesta energetica. Può essere sfruttata da piccole molecole gassose neutre, acqua (in piccole quantità), e piccole molecole lipofile.

La direzione del trasporto è determinata dalla legge delle reazioni metaboliche: il sistema procede spontaneamente da uno stato ad alta energia (alta concentrazione chimica, elettrica, elettrochimica) ad uno a minore energia.

→ si definisce **flusso molare unidirezionale** il numero di moli che attraversano l'unità di superficie in un'unità di tempo. Il flusso netto è dato dalla somma algebrica dei due flussi unidirezionali.

Equazione di Teorell: $F_s = K_s \times X_s$ con F_s = intensità di flusso, K_s = costante e X_s = forza

Tale flusso varia in base alla superficie di membrana, la sua permeabilità (che dipende dalla solubilità della specie che diffonde nel bilayer lipidico, dimensioni della molecola, temperatura, spessore di membrana) e ampiezza della forza che guida il trasporto

→ La legge di Fick descrive la diffusione di una molecola attraverso il bilayer: tanto più è ampia la superficie di membrana, tante più molecole possono passare nell'unità di tempo. Vi è una diretta proporzionalità tra grandezza della superficie e il flusso, ma un'inversa proporzionalità con lo spessore, che ostacola il movimento.

Mentre il coefficiente di diffusione D considera l'energia termica, la dimensione e la natura della molecola e la viscosità del mezzo in cui diffonde.

NB: il segno negativo è una convenzione per annullare il segno del gradiente di concentrazione ($C_{tot} = C_f - C_i$)

La diffusione varia ogni istante e man mano che si avvicina all'equilibrio tende a raggiungere un valore costante in cui si alternano due flussi unidirezionali uguali e opposti.

Equazione di Fick: $J = -AD \times \frac{\Delta C}{\Delta X}$ con J =flusso, D =coefficiente diffusione soluto, A = area di membrana, ΔC = differenza di concentrazione e Δx = spessore di membrana

Per le sfere: $D = \frac{-KT}{6\pi r \eta}$ con K =costante Boltzman, T =temperatura, η =viscosità del mezzo

Partendo da una soluzione suddivisa in due camere da una membrana permeabile, in cui al tempo 0 si hanno x molecole concentrate in un ambiente e nessuna nell'altro, si osserva un flusso che varia in ogni istante e che si avvicina all'equilibrio, ovvero tende ad assestarsi intorno ad un valore costante in cui si alternano due flussi bidirezionali uguali e opposti (maggiore è il gradiente iniziale, maggiore è l'entità del flusso)

L'acqua passa per diffusione semplice, ma essendo polare il suo passaggio è lento e difficile. Il suo movimento viene detto **osmosi**: tendono a passare dall'ambiente dove sono presenti in maggiore quantità a quello dove ci sono meno molecole di acqua, che viene macroscopicamente visualizzato come una diluizione dell'ambiente più concentrato di soluti.

Applicando una pressione tale da frenare il movimento di acqua nel compartimento più ricco di soluti, si ottiene la pressione osmotica (sempre costante, se varia significa che avviene un cambiamento di volume). Questa dipende dal numero di soluti osmoticamente attivi.

→ si definisce **osmolarità** il numero di moli che considera come i soluti si dissociano in soluzione.

Se si verificano variazioni di osmolarità, si attivano meccanismi compensatori:

es: le cellule in crescita (anabolismo) fanno molta sintesi proteica e quindi presentano bassa osmolarità poiché assemblano insieme molti soluti che singolarmente sono osmoticamente attivi.

Viceversa, il catabolismo aumenta l'osmolarità, perché da un'unica proteina si ottengono molti amminoacidi che singolarmente esercitano una pressione osmotica.

Pertanto quando l'osmolarità aumenta e si ha la necessità di richiamare acqua, si aprono canali ionici che permettono la fuoriuscita di ioni, viceversa quando diminuisce avviene l'ingresso di soluti osmotici.

Oppure possono entrare in gioco altri canali per specie ioniche differenti che mediano l'ingresso di acqua, poiché l'acqua segue sempre il soluto.

-proteina-mediato: Può essere passivo (diffusione facilitata) o attivo (trasporto attivo primario o secondario).

Nel caso di *diffusione facilitata*, questa può essere mediata da **carrier** (trasporta 10^2 - 10^4 molecole/s) o da **canali ionici** (con il passaggio di 10^7 - 10^8 ioni/s). Questi sono accumulati dal fatto che evitano alle particelle trasportate il contatto diretto con la membrana, possiedono una porzione idrofila che permette il passaggio. Tuttavia si diversificano per le modalità di

permeazione e la cinetica: i carrier creano un legame chimico con le molecole che trasportano e vanno incontro a saturazione, pertanto hanno una cinetica e un trasporto più lento, mentre i canali presentano scarsa interazione con gli ioni, possono tendere a saturazione ma non la raggiungono mai e quindi sono più rapidi nella conduzione.

I carrier sono dotati di specificità chimica, sono soggetti a **saturazione** (poiché il loro numero è finito e ciascuno opera ad una velocità fissa, quindi all'aumentare della concentrazione della specie si raggiunge un plateau di **flusso massimo**, pari a $\frac{F_{max}}{1+K_a/C}$), dipendono da T e pH e possono essere bloccati da inibitori competitivi → queste caratteristiche rendono la loro cinetica simile a quella enzimatica (la differenza risiede nel fatto che i carrier modificano il loro target molecolare). Il trasporto dipende dalla concentrazione di ligando e dall'affinità che questo possiede per il carrier.

Es: diffusione facilitata di glucosio, sfrutta la concentrazione di glucosio ematica per immagazzinare secondo gradiente la molecola nella cellula. Una volta internalizzata viene fosforilata così da mantenere il gradiente in ingresso e impedirne la fuoriuscita.

I canali ionici sono macromolecole ubiquitarie dotate di pori idrofilici e porzioni intra-extracellulari modificabili, con ruolo di regolazione. La driving force è data dal gradiente elettrochimico della specie ionica che conducono. Svolgono molti ruoli, come mantenere il potenziale di riposo, innescare il potenziale d'azione, il flusso di Ca, controllare il volume cellulare attraverso la regolazione di molecole osmolaricamente attive, regolare i processi di secrezione e assorbimento...

Presentano due proprietà principali:

1) **Gating**: fluttuano da uno stato aperto ad uno inattivo o chiuso. Si distinguono canali costitutivamente aperti (il gating non è influenzato da fattori estrinseci), che contribuiscono al mantenimento del potenziale di riposo e canali regolati (ROC, SAC, VOC) che si aprono in seguito ad un opportuno stimolo

2) **Permeabilità ionica**: ciascun canale è selettivo per determinate specie ioniche, che permeano ad elevata velocità secondo gradiente. La selettività è data da dimensioni del poro (discrimina per diametro) e dalla carica dello ione: per quanto riguarda ioni piccoli di dimensioni simili, questi vengono selezionati in base alla hydratation mimicry, ovvero l'energia di solvatazione.

Ciascuno ione in soluzione acquosa si trova in uno stato di solvatazione (o idratazione), in cui forma legami con molecole di H₂O che abbassano la sua energia libera e lo stabilizzano: allo stesso modo, nel poro, grazie all'ambiente acquoso e idrofilico che si crea, lo ione instaura una serie di interazioni che ne stabilizzano l'energia libera e la rendono simile a quella presente in soluzione. Ciò accade in modo specifico per ciascuno ione (l'energia di idratazione di Na è diversa da K), grazie ai residui presenti in ciascun poro (per Na sono Asp, Glu, Lys, Ala), che pertanto vengono detti **filtro di selettività**.

Il meccanismo di permeazione viene detto **knock-on** ed è basato su una repulsione di cariche. Nel poro sono presenti 4 siti in cui gli ioni possono formare legami stabilizzanti, ma poiché sono carichi e si respingono tra loro, possono essere occupate contemporaneamente solo 2 posizioni alternate per volta (1-3 o 2-4). Quando un nuovo ione si affaccia in posizione 1, quello che si trova in posizione 2 viene scalzato alla 3, mentre quello che si trova in posizione 4 viene spinto fuori dal poro, così da favorire il flusso → la concentrazione della specie determina la velocità di questo flusso.

→ **Canali ionici mecano-sensibili (stretch attivati, SAC):**

La meccanotrasduzione è una proprietà universale che permette alle cellule di collegare stimoli meccanici (interni o esterni) ad eventi elettrici e biochimici, con cui è possibile generare un'ampia varietà di risposte (es: percezione udito, pressione...)

In particolare a livello vascolare, il flusso sanguigno esercita una forza detta, shear stress, direttamente proporzionale alla sua viscosità e inversamente proporzionale al raggio del condotto. È una forza tangenziale che influenza il comportamento delle cellule endoteliali e del muscolo liscio che avvolge i vasi, poiché quando aumenta, impone una tensione che determina una meccanotrasduzione e ha come effetto la produzione di NO, un mediatore di vasodilatazione (il rilassamento della vascolatura riporta lo shear stress a valori fisiologici).

I recettori che scatenano questa risposta sono i canali SAC e sono attivati da alterazioni a livello del glicocalice, matrice extracellulare, giunzioni cellulari o cellula-matrice, fibre citoscheletriche, membrana nucleare che quando vengono stirate possono trasmettere segnali di tensione. Infine la membrana può determinare una risposta intracellulare e attivare i SAC, questa può irrigidirsi, aumentare la sua fluidità a seconda delle condizioni ambientali in cui si trova, può variare le proprie dimensioni e volume mediante spostamenti di ioni o acqua (cambiamenti di osmolarità), può subire modificazioni chimiche che determinano risposta drastiche (apoptosi)... Si dice quindi che hanno attivazione polimodale.

L'apertura di canali SAC comporta una risposta acuta, in cui vi è l'ingresso di ioni (Na e Ca) che determinano l'attivazione di cascate del segnale di fosforilazione e attivazione di fattori di espressione.

Le principali famiglie sono:

-TRP: transient receptor potential, costituiti da 6 segmenti transmembrana, con un poro tra S5 e S6, che si autoassemblano a formare eterotetrameri selettivi per Ca

-K2P: canali per K a due pori, hanno 4 domini transmembrana e ne esistono diversi tipi, alcuni costitutivamente aperti (TASK1 e TASK3), altri che si aprono in seguito a stretch e sono modulati da pH, volume cellulare e interazione con citoscheletro (actina).

-CANALI K rectifier: hanno 4 subunità con segmenti transmembrana e poro centrale, sono molto rappresentati nel ventricolo, nel SNC e a livello endoteliale (isoforma Kir sensibile a shear stress)

-eNAC: Canale selettivo per NA, dotato di due regioni transmembrana e costituito da un tetramero con 4 basi omologhe (2alfa, beta, gamma), si apre in seguito a stiramento di membrana e shear stress, determinando uno spostamento di Na e quindi di acqua, con la conseguenza che la cellula aumenta il proprio volume. Sono importanti a livello renale e polmonare, dove mediano il riassorbimento di acqua e fluido alveolare. Riassorbendo acqua si aumenta il volume in circolo e quindi indirettamente la tensione.

Quando si verifica shear stress perché il flusso dell'ultrafiltrato è elevato a livello renale, i canali eNAC aumentano la loro probabilità di apertura, così da poter consentire un maggiore riassorbimento di acqua e NA e controllare volemia e pressione: se dovessero verificarsi malfunzionamenti del canale, come il mancato turn over di eNAC (malattia di Liddle) si assiste ad una condizione di ipertensione secondaria, in cui avviene un riassorbimento eccessivo.

A livello polmonare invece è presente sugli alveoli, dove regola lo strato di fluido che permette gli scambi gassosi: tale strato deve rimanere sottile per consentire scambi veloci ed efficienti, pertanto eNAC lo riassume man mano che viene prodotto mantenendo uno spessore costante. SE viene a mancare il suo funzionamento, si verifica un'eccessiva secrezione di fluido che porta ad un ridotto uptake di ossigeno e un edema polmonare per eccessiva acqua presente nei polmoni.

→ L'ipossia esaspera il fenomeno perché altera la stechiometria di eNAC e lo rende meno specifico, quindi inefficiente nel suo lavoro.

Si parla di meccanopatologie quando si verificano alterazioni del funzionamento dei canali ionici, dovute ad una variazione di tensione di membrana, come aritmie cardiache, ipertensione, glaucoma, distrofia di Duchenne, rene policistico...

Possono essere causate anche da stress chimico, come molecole che attraversano la membrana e causano una curvatura della stessa o una disfunzione dei canali.

Il **trasporto attivo** richiede energia per essere effettuato e si basa su movimenti contro-gradiente di concentrazione o elettrico, sfruttando l'idrolisi di ATP.

Es: *pompa Na/K*, è un antiporto cationico che per ogni ATP estrude 3 Na⁺ e internalizza 2 K⁺ (è elettrogenica: antiporto cationico; e modifica l'osmolarità cellulare, poiché comporta la perdita di un soluto osmoticamente attivo) → consuma il 40% di ATP dell'organismo e se viene interrotta determina il rigonfiamento e la lisi cellulare.

È costituita da una subunità alfa (con siti per ATP, Na e K) di 10 eliche transmembrana, un dominio attivatore (a), uno di legame di nucleotidi (n), uno di fosforilazione (p) sul lato citosolico; e una subunità beta con ruolo di regolazione e stabilizzazione.

(Stato E: si lega ATP al dominio n, si legano 3 Na e avviene un cambio conformazionale che porta l'ATP vicino al sito p. Stato E2: si ha una fosforilazione che chiude il gate citosolico e apre il gate extracellulare, Na esce ed entrano 2 K.)

Pompa Ca: espelle 2 Ca per ogni ATP fuori dalla cellula (PMCA) o nel lume del reticolo (SERCA), è un uniporto cationico, fondamentale per la trasduzione del segnale e il rilassamento delle cellule muscolari. L'estrusione rallenta con l'invecchiamento, ciò causa un minor riempimento del reticolo e una minore funzione di pompa del cuore.

Pompa K/H: non è elettrogenica, determina l'espulsione di H del lume dello stomaco per acidificarlo.

Il **trasporto attivo secondario** sfrutta il gradiente di una specie creato da una pompa primaria (es: il gradiente di Na in ingresso) e lo accoppia al trasporto di un'altra specie molecolare (glucosio, Ca).

Un esempio è il trasportatore NCX (scambiatore Na/Ca), importante per l'estrusione di Ca dal citosol e il rilassamento muscolare: se le concentrazioni di Na non vengono mantenute, si ha reverse mode; il co-trasportatore NKCC (Na, K, Cl, Cl) che richiede tutte le specie chimiche per poter funzionare in un preciso ordine di legame (Na, Cl, K, Cl) ed è importante per il riassorbimento ionico a livello renale.

Oppure il simporto Na/glucosio, che sfrutta il gradiente di Na creato dall'ATPasi Na/K per assorbire nella cellula glucosio: in seguito al legame con 2 Na, il carrier forma un sito ad alta affinità per lo zucchero, che si lega e determina un cambiamento conformazionale verso l'interno, con conseguente ingresso delle molecole.

-**vescicola mediata**: richiede energia per effettuare sia endocitosi che esocitosi, inoltre si formano vescicole che devono essere rivestite da clatrina o proteine specifiche.

POTENZIALE DI RIPOSO:

Tutti i fenomeni elettrici che avvengono sono dovuti ad una distribuzione asimmetrica di cariche a livello di membrana, che crea gradienti elettrochimici necessari al trasporto e alla conduzione di impulsi segnale. Per convenzione la direzione della corrente è definita dalle cariche +: la corrente di Na intracellulare, secondo gradiente, viene detta entrante, viceversa la corrente di K, che

fuoriesce viene detta uscente. LA corrente di Cl⁻, pur essendo volta verso l'interno, determina un ingresso di cariche negative e quindi viene detta uscente.

Si definisce **depolarizzante** una riduzione della separazione di cariche a livello di membrana, che riduce il potenziale negativo; mentre viene detta **iperpolarizzante** l'aumento di cariche a cavallo di membrana, che determina un valore più negativo di potenziale.

L'equazione di Nernst permette di calcolare il potenziale di equilibrio di uno ione a cavallo di

$$\text{membrana: } E_x = \frac{RT \left(\log_e \frac{X_e}{X_i} \right)}{ZF}$$

E il flusso ionico che ne deriva: $F = (\text{Gradiente elettrochimico} \times \text{conduttanza})$

→ per questo motivo si ha una conduttanza molto diversa per ioni diversi (per esempio $K \gg Na$) passiva, controbilanciata dal lavoro di pompe ATPasiche che mantengono i gradienti.

Inoltre sono presenti anioni immobili nel citoplasma, che contribuiscono a creare il gradiente elettrico, ma non possono essere spostati. Il loro contributo viene calcolato mediante l'equilibrio

$$\text{di Donnan: } V_m = \frac{RT \left(\log_e \frac{K_e}{K_i} \right)}{ZF} = \frac{RT \left(\log_e \frac{Cl_i}{Cl_e} \right)}{ZF} \rightarrow [K_i]^+ \times [Cl_i]^- = [K_e]^+ \times [Cl_e]^-$$

Con questa equazione è possibile determinare una maggiore concentrazione di anioni e cationi diffusibili dal lato di membrana dove si trova la specie non diffusibile: un soluto carico immobile può influenzare l'equilibrio degli ioni mobili attraverso la membrana. Si stabilisce sempre una differenza di potenziale e una pressione osmotica maggiore che assicura il turgore fisiologico cellulare.

→ il potenziale di riposo è dato da $V_m = V_i - V_e$ con V_i = potenziale interno e V_e = potenziale esterno

L'equazione di Goldman permette di stabilire in termini quantitativi il contributo dei diversi ioni,

$$\text{ma si applica solo quando } V_m \text{ è costante: } \frac{RT \left(\log_e \frac{P_k (K_e) + P_{Na} (Na_e) + P_{Cl} (Cl_i)}{P_k (K_i) + P_{Na} (Na_i) + P_{Cl} (Cl_e)} \right)}{F}$$

CANALI VOC:

I canali voltaggio dipendente sono sensibili a variazioni di potenziale e si aprono soltanto quando la membrana raggiunge un valore di voltaggio soglia. Sono costituiti da una subunità principale alfa, divisa in 4 domini, responsabile della via di conduzione degli ioni, costituisce infatti un poro attraverso il quale le varie specie chimiche possono permeare. Può essere una singola catena polipeptidica, oppure può essere formata da tetrameri di proteine uguali o diverse tra loro. Ciascun dominio di alfa possiede 6 segmenti transmembrana, collegati da loop peptidici intra ed extracellulari, modificati post-traduzionalmente (glicoproteine con funzione modulatrice del microambiente del canale). I segmenti S1-S4 sono detti **VSD** (Voltage sense domain), in particolare S4 è deputato al **sensing del voltaggio** ed è ricco di Arg (cariche +) distribuite in modo regolare, mentre S5 e S6 formano il **PD** (pore domain) e fungono da filtro di selettività.

In condizioni di riposo, S4 è spostato verso il citoplasma, dove sono presenti molte cariche negative, così da mantenere il poro chiuso.

A seguito di depolarizzazione, tale attrazione elettrostatica viene meno e il sensore S4 viene indotto a spostarsi verso l'esterno, dove trova gli altri segmenti, che sono dotati di cariche negative e che stabilizzano la struttura, formando appaiamenti elettrostatici con le Arg (formano contro-cariche), in questo modo il poro viene aperto e il canale diviene conduttivo.

→ la persistenza della corrente depolarizzante induce però un nuovo cambiamento, che porta il canale a transitare in uno stato inattivo, non più conduttivo.

Il gating prevede 3 transizioni, tra loro reversibili, ma non in condizioni fisiologiche (deattivazione, close-state inactivation e resurgent current):

-apertura: a seguito di stimoli depolarizzanti sopra soglia

-inattivazione: meccanismo di refrattarietà dei canali VOC delle cellule eccitabili, volto a prevenire eccitazioni premature e mantenere l'unidirezionalità dello stimolo. Affinché il canale torni conduttivo è fondamentale che questo si sottoponga ad un periodo di recupero dell'attivazione a potenziali negativi.

Tale inattivazione può essere **FAST (10 ms)**, grazie ad un meccanismo di ball and chain al dominio N terminale, che occlude il poro e rende il canale non conduttivo, oppure **SLOW (100 ms)**, che interviene quando viene rimossa la ball e implica un cambiamento conformazionale di tutte le subunità del canale: viene rimossa attraverso movimenti retrogradi del segmento S4 in seguito a ripolarizzazione, che ripristinano la conformazione originale

-chiusura: avviene in seguito a iperpolarizzazione e ritorno al potenziale di riposo. I canali sono di nuovo disponibili per essere aperti da ulteriori stimoli sopra soglia.

Canale Na⁺:

-NE esistono 9 isoforme tessuto specifiche (NaV 1.1 e 1.2 sono del SNC, mentre 1.4 muscolo scheletrico, 1.5 cuore), con un elevato grado di omologia. LA subunità alfa ha una struttura a 4 domini omologhi costituiti ciascuno da 6 eliche transmembrana che costituiscono i segmenti S1-S6: S4 è il sensore del voltaggio, tra S5 e S6 si localizza il loop di selettività, il loop tra S1 e S2 presenta siti fosforilabili con ruolo di modulazione dell'attività del canale, mentre quello tra S3 e S4 presenta una tripletta IFM conservata importante nel meccanismo di inattivazione.

La subunità beta modula il canale rendendo diversa la cinetica di inattivazione o l'ampiezza di corrente.

-Cinetica caratteristica: conduce corrente entrante (per convenzione è nel piano negativo), con fase di attivazione estremamente rapida, seguita da una prima inattivazione fast, (10 ms) al persistere dello stimolo depolarizzante, e una più lenta e graduale che riporta il potenziale a valori di riposo.

Studiare la relazione corrente-voltaggio:

Si applica alla cellula uno stimolo depolarizzante e si registra il passaggio di corrente che si verifica. Si parte da potenziali molto negativi (più negativi del resting) e si procede per gradi verso valori più elevati, in modo da osservare al variare del voltaggio la quantità di corrente prodotta e quindi la quantità di canali aperti.

→ Man mano che il gradiente sale, si osserva una corrente più ampia fino ad un valore massimo, che per il canale Na⁺ è -10mV (potenziale di equilibrio). Successivamente la corrente inizia a diminuire poiché tutti i canali sono stati aperti e alcuni iniziano a inattivarsi.

Dividendo qualsiasi valore di voltaggio per il valore che ha registrato il massimo di corrente, si ottiene una sigmoide che indica la % di canali attivi per ogni gradino.

Per calcolare il tempo necessario per passare da inattivazione e chiusura, si forniscono due stimoli depolarizzanti consecutivi, intervallati da uno iperpolarizzante. Inizialmente questi saranno molto ravvicinati tra loro e il secondo stimolo non produrrà corrente (sono tutti inattivi), successivamente si aumenta in modo progressivo il tempo che intercorre tra i due pulsii e si osserva una corrente sempre crescente, fino ad arrivare ad un valore pari a quella del primo stimolo. Questo tempo corrisponde al tempo refrattario del canale.

Unendo curve di attivazione e inattivazione si osserva una finestra di sovrapposizione, pari all'1% dei canali, che identifica una corrente, detta **window current**, data da canali sempre disponibili ad aprirsi a quei valori di potenziale.

Esiste anche una corrente di Na⁺ persistente (**late current**) pari allo 0,5-1% del picco, che rimane dopo l'inattivazione dei canali. Può essere determinata da uno *scatter mode* (apertura casuale del canale nel tempo, senza uno schema preciso) o da un *burst mode* (continua apertura e chiusura)

Canale Ca²⁺:

-Ha una struttura simile a quella dei canali Na^v, tuttavia presenta più subunità, solitamente beta, alfa2delta, gamma, espresse in modo tessuto-specifico: esistono diverse isoforme che prendono il nome di Ca_v (1.1 scheletrica, 1.2 cardiaca, 1.3 sistema endocrino; 3.3 canali di tipo T).

-Hanno un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale, poiché Ca è un secondo messaggero. Hanno una corrente entrante con rapida attivazione e inattivazione più lenta.

Si dividono in L (long lasting), ad attivazione ad alta soglia (HPV) e cinetica di inattivazione molto lenta (100 ms- 1s): aumentano Ca intracellulare per innescare i processi di contrazione muscolare; e T (transienti) con inattivazione voltaggio-dipendente di 10 ms e attivazione a bassa soglia (LVA).