

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ORIGEN DEL POSTPOTENCIAL TARDIO EN EL MUSCULO
ESQUELETICO DE RANA.

QUE PARA OBTENER EL TITULO
DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA

MANUEL ENRIQUEZ DENTON

Facultad de Ciencias, enero 1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

RESUMEN	5
INTRODUCCION	8
El potencial de membrana	10
El potencial de acción	17
El postpotencial temprano	20
Canales ionicos	23
El postpotencial tardío	27
JUSTIFICACION DEL PROYECTO	29
EL CANAL DE POTASIO ACTIVADO POR CALCIO	32
SISTEMA DE REGISTRO E INSTRUMENTACION	34
Soluciones	40
EXPERIMENTOS DE SUSTITUCION DE CALCIO POR MAGNESIO	41
Calcio	43
Magnesio	46
Discusión	48
El postpotencial temprano	48
El postpotencial tardío	56
EXPERIMENTOS EN FASCICULOS AISLADOS	59
Discusión	61
EFECTO DE LAS SOLUCIONES HIPERTONICAS	64

RESULTADOS CON ELECTRODOS FLOTANTES	69
El postpotencial temprano	69
El postpotencial tardío	71
EXPERIMENTOS CON APAMIN	77
El postpotencial temprano	80
El postpotencial tardío	80
EXPERIMENTOS CON TETRAETILAMONIO	86
El postpotencial temprano	87
El postpotencial tardío	89
Discusión	92
EXPERIMENTOS CON CAFEINA	94
El postpotencial temprano	95
El postpotencial tardío	96
CONCLUSION	102
APENDICE: Microelectrodos	107
Rigidos	107
Flotantes	125
Tetraetilamonio	127
Cafeina	129
BIBLIOGRAFIA	133

RESUMEN

La célula muscular posee una membrana excitable capaz de generar cambios transitorios de voltaje conocidos como potenciales de acción, similares, cuando menos durante los primeros 15 milisegundos, a aquellos descritos para el axón gigante de calamar; es decir, poseen una fase despolarizante debida al desarrollo de corrientes entrantes de sodio. Una fase de repolarización rápida, debida al cese de la corriente de sodio y al desarrollo de un corriente saliente retardada de potasio. Esta repolarización no alcanza el nivel del reposo original sino que termina con una ligera despolarización, desde la cual se regresa al voltaje de reposo lentamente (50-70 msec). A esta fase de repolarización lenta se le conoce como postpotencial temprano y se atribuye a la recarga capacitiva del sistema tubular transverso (A. Persson, 1963).

Si a una célula muscular se le somete a estimulación repetitiva, con una frecuencia de 100 Hz, se observa que al terminar el último potencial de acción la fibra queda despolarizada alcanzando el nivel de reposo en varios segundos. A este periodo de repolarización muy lenta que acontece tras la estimulación se le denomina postpotencial tardío y se debe a la acumulación de potasio en el sistema tubular transverso durante los potenciales de acción tubulares (Kirsch et al, 1977).

La salida de potasio se atribuye a canales rectificadores tardíos (que son los encargados de repolarizar a la célula en el potencial de acción) localizados en el interior del sistema tubular, por lo que el postpotencial tardío es una consecuencia

de la presencia de estos canales en este espacio de difusión restringida (Kirsch et al, 1977). Sin embargo, existen evidencias que hacen pensar que la acumulación de este ion se puede ver afectada por canales de potasio activados por el incremento en la concentración interna de calcio dependientes de voltaje (Freygang et al, 1964; Adrian et al, 1970a; Fink & Luttgau, 1976; Sanchez & Stefani, 1978; Barret et al, 1981; Latorre et al, 1982; Latorre y Vergara, 1983; Moczydlowsky & Latorre, 1983; Cognard et al, 1984; Romey & Lazdunski, 1984; Fedel & Lehmann-Horn, 1985) y fue el propósito del presente trabajo el averiguarlo.

Para ello, se hicieron experimentos en fibras musculares esqueléticas enteras de Rana pipiens, de: a) sustitución de calcio extracelular por magnesio, el cual no pasa a través de canales de calcio (Almers & Palade, 1981), y si lo hace no activa a los canales de potasio activados por calcio (Latorre et al, 1982), encontrándose que hay una gran variación en los datos como para poder establecer alguna conclusión de la dependencia del postpotencial tardío respecto al ion calcio extracelular. b) Se aplicó la neurotoxina Apamin, capaz de bloquear a los canales de potasio activados por calcio de baja conductancia (Hugues et al, 1982), observándose que no altera al fenómeno que nos interesa. c) Se adiciono tetraetilamonio, potente inhibidor de corrientes de potasio (Stanfield, 1983), observándose que no permite la observación del postpotencial tardío debido a su baja especificidad de bloqueo. d) Se añadió cafeína a la solución externa con el fin de incrementar la concentración interna de calcio, obteniéndose que altera al postpotencial tardío debido a

los efectos colaterales que produce su aplicación sobre el potencial de membrana.

Los resultados anteriores sugieren que el postpotencial tardío no depende de canales de calcio ubicados en el sistema tubular transverso, ni de canales de potasio activados por calcio de baja conductancia sensibles a apamin.

Queda por esclarecer si este fenómeno eléctrico de la fibra muscular se ve afectado por canales de potasio de alta conductancia activados por calcio, así como si estos canales se encuentran en condiciones fisiológicas en el músculo esquelético de la rana.

Como resultado adicional del presente trabajo se concluye que el uso de soluciones hipertónicas para el registro de fenómenos eléctricos en la célula muscular trae efectos colaterales importantes por lo que los datos obtenidos por su aplicación deben ser evaluados con cuidado.

INTRODUCCION

La vida en nuestro planeta se desarrollo hace aproximadamente 3 500 millones de años en un mundo que presenta cambios tanto en tiempo geológico como real. Estos cambios generalmente no son favorables para los organismos, por lo que se hace necesario la capacidad de generar respuestas que conduzcan al posterior desarrollo de las especies. En tiempo real, los cambios en los organismos deben ser rápidos, mientras que para aquellos en tiempo geológico las alteraciones del medio acontecen de manera lenta y prolongada que exceden con mucho a la vida de los individuos, siendo la Selección Natural la que determina los cambios adaptativos de las especies al permitir la sobrevivencia de los más aptos.

Cuando los cambios son en tiempo real, la respuesta debe ser rápida por lo que se hace necesaria la presencia de: estructuras capaces de percibirlos e informar al resto del organismo de su existencia; medios de conducción de la información; centros integradores que la codifiquen y procesen; y por último de efectores, que son en si los que aportan la respuesta.

De entre los multiples efectores se encuentra el músculo, tejido que ocupa mas del 60% del peso seco del individuo cuya principal función es el generar contracción, que conjunto con la ayuda del tejido esquelético, subjuntivo y del nervioso, produce movimiento, calor y fuerza, contribuyendo asi al mantenimiennto de la homeostasis.

El músculo se puede dividir, en base a sus características histológicas en: Liso, Cardíaco y Esquelético. El primero lo

encontramos en las paredes de vasos sanguíneos, vísceras y tracto urinario, caracterisándose por carecer de patrones de bandeó. Por su parte, el cardíaco y el esquelético poseen estriaciones características. La contracción del esquelético esta bajo control directo del sistema nervioso, mientras que la del cardíaco es espontánea y automática donde la función de su inervación es modular su velocidad y fuerza.

El desarrollo de la contracción en el músculo esquelético es un fenómeno complejo que incluye sucesos tanto eléctricos como químicos, siendo en parte de los primeros sobre los que versara el presente trabajo. Para ello, en la primera parte se describe a la membrana celular, haciendo énfasis en su participación en los fenómenos eléctricos de la célula, como son el potencial de reposo y el potencial de acción, así como de la existencia en ella de canales iónicos. Todo ello con especial interés en la célula muscular. Posteriormente se describen dos fenómenos eléctricos importantes en este tipo de célula, el postpotencial temprano y el postpotencial tardío, dando las causas más aceptadas de su existencia. Ulteriormente se presentan las evidencias que justifican el presente trabajo, la instrumentación necesaria para su desarrollo, así como la metodología, para finalmente, describir los experimentos realizados con su discusión y conclusiones correspondientes.

EL POTENCIAL DE MEMBRANA

Las membranas son componentes esenciales de los organismos vivos. Actúan como barreras altamente selectivas de permeabilidad y se caracterizan por diversas propiedades. Establecen la individualidad celular y la de los organelos que las componen ya que conforman la frontera de medios distintos, como es, entre el plasma y el citoplasma, así como entre este último y el interior de algún organelo considerado. Las membranas juegan un papel esencial en la comunicación biológica tanto dentro como fuera de la célula ya que poseen receptores que dan lugar a la capacidad de responder a los distintos estímulos. Por otra parte, procesos vitales para la vida como es el de la fosforilación y la fotosíntesis son procesos que dependen de membranas.

El modelo de membrana más comúnmente empleado para describirla es aquel propuesto simultáneamente en 1969 por Lenard & Singer y por Wallach & Zehner conocido como "Modelo de mosaico fluido", el cual establece la presencia de proteínas globulares embebidas en una bicapa lipídica las cuales pueden atravesarla. Estos polipéptidos de alto peso molecular presentan al medio acuoso, limitado por la bicapa, sus extremos, siendo en ellos donde se encuentran residuos iónicos de la proteína, mientras que residuos no iónicos son los principales componentes de las porciones inmersas en la bicapa. Estas proteínas presentan además, como establece el modelo, un movimiento libre, como si estuvieran en un medio que no presentara fuerzas opuestas al movimiento lateral de las estructuras que la componen. Este

modelo aunque establece las propiedades de algunas membranas, excluye otras muy complejas. En lugar de ser un mar lipídico para el libre movimiento, más bien parece que los lípidos se encuentran distribuidos en zonas específicas las cuales pueden diferir importantemente en sus propiedades y composición. Por otra parte, la composición de las dos hojas de lípidos que componen a la membrana difieren importantemente tanto dentro de la misma membrana, dentro de la célula y entre los distintos tejidos (Benga & Holmes, 1984).

El exterior e interior celular difieren en su composición y concentración iónica, el primero posee altas concentraciones de iones sodio y cloruro mientras que el segundo las posee de potasio y una mezcla de proteínas ionizadas. Esta diferencia de concentraciones se da gracias a la membrana celular ya que posee bombas que retienen o retiran del interior de la célula ciertas sustancias y iones, así como la permeabilidad selectiva que posee para algunos iones, como es una alta permeabilidad para la salida de potasio y una muy baja permeabilidad para la entrada de sodio (Hodgkin y Horowicz, 1959).

El movimiento térmico azaroso de una partícula en solución determina que las sustancias se mezclen continuamente; si la concentración de una sustancia disuelta es mayor en un punto que en otro más moléculas de esta sustancia se moverán de la zona de mayor concentración a la de menor en un tiempo dado, dando lugar a un flujo neto de la sustancia, ello dado que el movimiento siempre existe, aun bajo condiciones en las que las sustancias estén en igualdad de concentraciones. Por ello el sodio y el cloro tienden a entrar a la célula mientras que el potasio y los

proteínatos tienden a salir de ella. La velocidad de difusión de estos iones depende no solo de la diferencia en concentraciones de los iones a través de la membrana celular, sino también de la facilidad con la que sea atravesada. De hecho, la permeabilidad de la membrana es tan baja que en sí es el factor que más limita el movimiento de sustancias a través de ella.

Por otra parte, el movimiento de sustancias ionizadas se ve afectado también por el voltaje transmembranal, esto es, por las cargas eléctricas que se encuentran separadas por la membrana. Esta fuerza electromotriz afecta positiva o negativamente el movimiento de los iones. Dado que la célula es negativa respecto al exterior, tiende a atraer cationes y a repeler aniones. Así, el ion potasio tiende a salir de la célula debido a su alta concentración interna, pero tiende a quedarse en la misma por las cargas negativas que lo atraen desde el interior. Estas dos tendencias casi se cancelan una con otra quedando solo una ligera tendencia a la salida de este ion. Lo mismo acontece para el cloruro, pero de manera inversa.

La situación es muy diferente para el ion sodio y para los proteínatos, ya que tanto la concentración como la diferencia de potencial tienden a meter y sacar estos iones respectivamente. Se supone que la membrana es impermeable a los proteínatos, y es muchísimo menos permeable al sodio que al potasio, más existe una entrada importante de sodio al interior celular, sin embargo, la célula es capaz de mantener la concentración de sodio interna muy baja respecto al exterior ya que posee un mecanismo que continuamente esta retirando este ion del citoplasma. Este

mecanismo actua en contra de un gradiente eléctrico y químico, por lo que requiere de energía para poderlo realizar, la cual es aportada por la hidrólisis de ATP, dando lugar a un transporte activo de sodio a través de la membrana. Se sabe que esta salida esta acoplada a una entrada de potasio de forma tal que se intercambian tres iones potasio por cada dos de sodio que salen. Es interesante puntualizar que es la misma molécula de membrana la que lleva a cabo esta función. Este mecanismo es importante ya que sin el la célula se cargaria irremediablemente de sodio, cosa demostrada en células donde se ha impedido la producción de ATP, por ejemplo, mediante el uso de venenos metabólicos. Dado que el movimiento de estos iones transporta carga y además el número de iones que se transporta no es igual para un lado de la membrana que para el otro, esta bomba de sodio-potasio es electrogénica. Así, la membrana celular divide dos soluciones muy distintas una de la otra, el medio extracelular (líquido intersticial) y el medio intracelular (citoplasma). Ambas soluciones difieren en su composición e importantemente en sus concentraciones iónicas.

Se sabe que la diferencia en concentraciones y muy importantemente la diferencia en permeabilidades son los que generan el potencial de reposo de las células, siendo para el caso del músculo esquelético el potasio (K) y el cloro (Cl) los que lo rigen ya que la membrana es permeable a potasio y cloro más muy poco a otros iones. El interior celular posee una mayor concentración para el primer ion mientras que el exterior posee más cloro y viceversa. Si se supone que el potasio y el cloro se distribuyen pasivamente, las proporciones de concentraciones y el potencial de membrana en el equilibrio obedecen a:

$$[K]_o/[K]_i = [Cl]_i/[Cl]_o = \exp(VF/RT).$$

donde $[]_o$ y $[]_i$ son las concentraciones externa e interna del ion en consideración; V es el potencial de membrana; F la constante de Faraday; R la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta.

Esta ecuación nos permite suponer que la membrana celular se comporta como un electrodo selectivo a alguno de los iones, y ello realmente acontece, ya que si se varían las concentraciones de cualquiera de los iones se observa que la membrana es sensible a estas alteraciones.

Cuando la concentración de potasio externa es menor a 10 mM el potencial de membrana no se ajusta perfectamente a la ecuación anterior, pero a mayores concentraciones se ajusta casi perfectamente. Esto fue demostrado por Hodgkin y Horowitz en 1959 en experimentos con fibras aisladas de Rana temporaria, y concluyeron que el potencial de membrana varía como un electrodo de potasio cuando la concentración de este ion y el cloro se cambiaban de manera recíproca manteniendo un producto constante entre ellos, o bien, si la concentración de potasio se alteraba en soluciones sin cloro. Bajo una concentración de potasio constante, la variación del ion cloro externo no produjo desplazamiento permanente del potencial de membrana, sino cambios temporales de 10 - 60 minutos de duración en forma esperada para un electrodo de cloruro. Sus resultados se explican cuantitativamente suponiendo un equilibrio de Gibbs-Donnan de forma tal que el producto de las concentraciones de cloruro y potasio de ambos lados de la membrana se mantenga constante

respecto al otro. Por otra parte, el potasio y el cloro son los iones que transportan corriente a través de la membrana en reposo, y la contribución relativa de cualquiera de los dos iones al potencial de reposo depende de la dirección en la que el potasio se este moviendo. La permeabilidad de este ion es alta (mas de 8×10^{-6} cm/sec) para su entrada pero muy baja para su salida (menos de 0.05×10^{-6} cm/sec). Mientras que la permeabilidad del cloro se mantiene en 4×10^{-6} cm/seg aproximadamente.

Asi la membrana se comporta siguiendo a la ecuación

$$V_m = RT/ZF \ln ([K]_o/[K]_i).$$

donde V_m es el potencial de membrana y \ln es logaritmo Neperiano.

Ahora bien, cuando la concentración de potasio externa es menor a 10 mM el potencial de membrana ya no se comporta como predice esta última ecuación sino a una del tipo:

$$V_m = RT/ZF \ln (\{ [K] + \alpha [Na] \}_o / \{ [K] + \alpha [Na] \}_i).$$

donde α es una constante que representa el cociente de permeabilidad del sodio respecto al potasio.

Ello quiere decir que cuando la concentración de potasio externa se reduce a menos de 10 mM la membrana se comporta como un electrodo de potasio con una pequeña permeabilidad de 0.01 para el sodio, por lo que el potencial de membrana queda descrito por:

$$V_m = RT/ZF \ln (\{ [K] + 0.01 [Na] \}_o / \{ [K] + 0.01 [Na] \}_i).$$

Todo lo anterior se puede resumir en la llamada HIPOTESIS IONICA DE MEMBRANA que establece: a) El potencial se desarrolla a través de la unidad de membrana, b) depende de la diferencia de concentraciones iónica y c) se desarrolla debido a que la

membrana es selectivamente permeable a algunos iones tanto para su ingreso como egreso. Un corolario de lo anterior es que la corriente electrica que fluye a traves de las membranas se debe al movimiento de los iones. Esta teoria se atribuye al fisiólogo Bernstein quien sugirio en 1902 que la membrana de las células musculares y nerviosas son permeables selectivamente a los iones potasio en reposo (Hille B. 1977).

EL POTENCIAL DE ACCION.

Como ya hemos visto, las células poseen, debido a la diferencia de concentraciones iónicas y a la permeabilidad selectiva de sus membranas, una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior celular. Gracias a ello, el organismo puede responder rápidamente a los cambios del medio, ya que al ocurrir se estimulan receptores que mediante sus membranas excitables los comunican y se generan respuestas. Todo ello con la ayuda de centros integradores y de efectores. La comunicación se realiza de dos maneras, químicamente como es por el uso de hormonas y neurotransmisores, o bien eléctricamente, mediante la generación de POTENCIALES DE ACCION. Ambos sistemas difieren en diversos aspectos como es, su velocidad ya que es más rápido el cambio propagado en polaridad eléctrica que la liberación de una molécula que debe difundir e interactuar con un receptor. La comunicación química puede dar lugar a potenciales de acción y viceversa, como ocurre en la unión sináptica. Por otra parte, el potencial de acción puede ser el mediador de la generación de la respuesta del efector, como sería en una fibra muscular o en una célula glandular.

El potencial de acción no es otra cosa que cambios en la polaridad eléctrica de membrana cuya duración y magnitud son constantes; de tal manera que la información que se envía va en forma de pulsos, y es la frecuencia y separación entre los mismos la que la aporta. Estos cambios de polaridad se deben a que en el estado activo la membrana cambia sus propiedades de selectividad, de ser poco permeable al sodio se hace muy

permeable, incrementandose notablemente su entrada, el cual lo hace ayudado por las dos fuerzas que explicamos anteriormente. Dijimos que la célula se comportaba en el reposo como un electrodo de potasio, ya que su potencial de membrana se acercaba al potencial de equilibrio electroquímico de este ión; ahora, en el estado activo, y por un breve periodo de tiempo, la membrana celular ya no se comporta de esta manera, sino que se aproxima al comportamiento de un electrodo de sodio, es decir, tiende a adquirir el potencial electroquímico de este ion, el cual es algunas decenas de milivoltios positivas respecto al exterior, por lo que, la membrana revierte su potencial eléctrico. Sin embargo, la membrana no alcanza el potencial de equilibrio del sodio ya que antes de llegar a él pierde la propiedad de permearlo, y al mismo tiempo se incrementa notablemente la permeabilidad del ion potasio, obligando a la membrana a regresar al valor de equilibrio de este ión.

Los potenciales de acción son una manera de comunicar los diferentes sistemas del organismo, pero además pueden generar la respuesta de ciertos tipos celulares como son las glandulares y las musculares. El presente trabajo se desarrollo en este último tipo de células, por lo que es importante describir su potencial de acción.

Los estudios de fijación de voltaje, principalmente los de Adrian, Chandler y Hodgkin de 1970, han demostrado la existencia de corrientes de entrada de sodio al despolarizar a la fibra muscular de manera parecida a como acontece en el axón gigante de calamar, teniendo una cinética de activación e inactivación

similar, así como la misma farmacología, es decir es bloqueada por la tetrodotoxina (TTX), y revierte a + 20 mV en 120 mM de sodio a tres grados centígrados.

Posteriormente le sigue una corriente de potasio retardada la cual es reducida, como en el axón, por la aplicación externa de un derivado cuaternario del amonio, el ion Tetraetilamonio (TEA). Este efecto de bloqueo prolonga la fase de repolarización del potencial de acción como acontece, una vez más, en el axón. Posee un potencial de equilibrio de - 85 mV y es producida por un canal con un cociente de permeabilidad potasio/sodio de 30:1 que es menor a aquella de la conductancia en reposo de la membrana, 100:1. A diferencia del axón presenta un fenómeno de inactivación similar al que ocurre en la corriente entrante temprana de sodio.

En resumen, tanto en el axón gigante de calamar como en la célula muscular la despolarización resulta del incremento de la conductancia al sodio que depende del voltaje y del tiempo, mientras que la repolarización obedece a un incremento retardado de conductancia al potasio que también depende de ambos factores. Estos incrementos en la conductancias se deben, respectivamente, a la apertura de canales de sodio así como de potasio. La apertura de los primeros en forma masiva, debido a la despolarización de la membrana, provocan una despolarización rápida de la misma, desde un potencial de membrana de - 60 mV (valor umbral del potencial de acción en el axón), hasta un valor cercano al potencial de equilibrio del ion sodio, dando lugar a que el potencial de membrana cambie de polaridad conocida como sobretiro cuyo tamaño, así como la máxima velocidad de

depolarización del potencial de acción dependen de la concentración del ion sodio extracelular (por las razones ya mencionadas anteriormente). La repolarización acontece por el cierre de estos canales y por la apertura de los segundos, regresando el potencial de membrana al valor de potencial de reposo (cercano al del equilibrio del ión potasio). Se puede observar que la apertura de los canales de potasio es retardada respecto a los de sodio. En la fibra muscular los canales de potasio presentan inactivación con el tiempo, cosa que difiere con aquellos del axón gigante de calamar (Adrian et al, 1977).

El postpotencial temprano.

Después de la fase de repolarización rápida de la fibra muscular sobreviene una de repolarización lenta, conocida como postpotencial temprano <EAP> (Nastuk & Hodgkin, 1950) el cual se puede observar en la figura 1. Su forma varia más que la de la espiga; su inicio puede ser suave hacia la caída o bien presentar una pequeña joroba o aplanamiento, siendo lo más común lo primero. Si se presenta joroba esta alcanza el máximo 5 mseg. después del máximo de la espiga. La transición entre las distintas formas es gradual. Presenta un curso temporal de decaimiento de tipo exponencial (Frank, 1957) principalmente en los 15 mseg. posteriores a la espiga, ya que para tiempos menores su forma es complicada (Persson, A., 1963). Esto último se puede atribuir a que acontecen cambios en las propiedades de permeabilidad en el inicio del post-potencial (Frank, 1957) los cuales han terminado después de 15 mseg. (Persson 1963). De tal manera que la membrana regresa al potencial de reposo por un

canal que posee la misma permeabilidad que en el reposo. Esto ha sido corroborado por comparar la resistencia en reposo y a tiempos mayores a los 15 mseg. del EAP, donde ambos valores son muy similares, mientras que para tiempos menores la resistencia es menor y se va incrementando hasta el valor que se tiene en el reposo. La magnitud de este fenómeno depende del Potencial de membrana en reposo para valores menores a 100 mV, mientras que para valores mayores no existe tal dependencia (Persson, 1963).

Adrian, Chandler y Hodgkin (1970a) propusieron que durante la espiga del potencial de acción el incremento en la conductancia retardada al potasio lleva el potencial de membrana a un valor cercano a aquel del equilibrio para este ión. El regreso al nivel de reposo depende parcialmente del tiempo que le tome a esta corriente en declinar (ya que se inactiva) y parcialmente a la constante de tiempo de la membrana.

En el axón gigante de calamar, también acontece un postpotencial, pero a diferencia del descrito anteriormente este es hiperpolarizante. La discrepancia entre ambas preparaciones fue explicada por ellos debido a diferencias en selectividad de la membrana en reposo, a saber: "En ambos tejidos el potencial máximo del postpotencial es cercano al valor de equilibrio del rectificador retardado, pero en el axón la selectividad en reposo es menor que la de este canal, mientras que en el músculo esquelético de la rana es mayor".

Como podemos ver, en el potencial de acción entra sodio por un cierto tiempo (milisegundos) y sale potasio. Una vez terminado el potencial de acción, las bombas que ya hemos

comentado se encargan de sacar sodio y meter potasio regresando a la situación original. Surge hora la pregunta, ¿cómo se generan estos cambios de permeabilidad? es decir, ¿cómo es que la membrana cambia de impermeable al sodio a permeable y despues de un cierto tiempo se hace otra vez impermeable? La respuesta esta, en . ciertas proteínas de membrana conocidas como canales iónicos.

CANALES IONICOS.

Una membrana lipídica representa una enorme barrera energética para el movimiento de pequeños iones, por ejemplo, el trabajo electrostático necesario para transferir un ión potasio desde un medio de alta constante dieléctrica, como es el medio acuoso que rodea a las membranas, al interior de las mismas, donde existe una constante dieléctrica baja es del orden de 260 Kcal/mol (Parsegian, 1969., en Latorre y Miller, 1983).

Muchos procesos celulares importantes requieren del transporte pasivo de iones a través de las membranas biológicas por lo que se hace necesario la existencia de mecanismos que permitan su libre paso; ello se logra mediante ciertas estructuras de membrana que catalizan este movimiento, los canales iónicos. Estos canales, son unidades discretas de membrana (proteínas) que la atraviesan y se encuentran presentes en todo tipo de célula hasta hoy estudiada. Intervienen en la generación de potenciales de acción, en la liberación de hormonas, transducción visual, transporte de electrolitos al través de epitelios, activación contráctil y regulación del volumen celular. Estas proteínas comunican ambas superficies a las que se enfrenta una membrana biológica. Conceptualmente se les puede considerar como enzimas, ya que reducen la energía necesaria para poder mover un ion a través de la membrana (desde 60 Kcal/mol a 4.8 Kcal/mol), que representa un incremento de 10^{39} veces en la velocidad de paso. Además comparten con ellas algunas otras propiedades importantes, a saber:

- Cinética de saturación con la concentración de su

sustrato (ion).

- Análogos de su sustrato producen inhibición competitiva (bloqueadores).

- Alta selectividad (selectividad iónica).

Sin embargo, los canales iónicos difieren de las enzimas en su alta velocidad de recambio: un canal puede transportar de 10^6 hasta 10^9 iones en un segundo. Además poseen una dependencia con la temperatura relativamente baja (Q_{10} de entre 1.2 y 1.4). Estas características indican que estas proteínas se deben formar poros hidrofílicos donde existe un continuo dieléctrico entre el exterior y el interior de la membrana y del interior de esta a su otro extremo. La estructura se puede suponer como un cilindro lleno de agua que atraviesa a la membrana, donde el diámetro interno debiese ser de algunos radios iónicos en el que existen moléculas de agua que permiten el libre paso de los iones en una sola fila.

Los canales tienen la propiedad de regular la apertura, cierre y conductancia del cilindro que conforman. Ello se logra por la capacidad de la proteína del canal de sufrir cambios conformacionales que deben ocurrir espontáneamente con una frecuencia que depende de la magnitud de la barrera energética para realizar la transición entre las diferentes conformaciones (Bezanilla F., 1985).

Los canales iónicos se pueden clasificar en función del fenómeno que favorece la activación como; dependientes del voltaje, o bien, dependientes de una molécula transmisora. En los primeros es el cambio en el voltaje a través de la membrana el

que regula la frecuencia de transición del estado abierto al cerrado y pueden a su vez ser dependientes del tiempo. En los segundos es la unión de una molécula mensajero la que favorece la apertura o cierre, donde el receptor puede estar en la misma molécula del canal o en algún otro punto; también ocurre que un mensajero se une a un receptor que activa un proceso que a su vez produce otro mensajero que finalmente activa al canal (Hille, 1984).

Los canales iónicos se pueden también clasificar en base a sus propiedades de conducción y propiedades de selectividad (Latorre & Miller, 1983) como:

a) Canales selectivos a iones, que son aquellos capaces de distinguir iones no solo acorde a su carga eléctrica sino además distinguen iones de similar valencia. Tal es el caso de los de sodio y potasio relacionados en la generación del potencial de acción, así como el rectificador de entrada de potasio presente en el músculo.

b) Canales selectivos a la valencia de los iones, los cuales son altamente selectivos a aquellos de una misma carga, más son poco selectivos a iones de valencia similar. Tal es el caso del canal de Acetilcolina de la unión neuromuscular donde pasa sodio y potasio más no cloruro.

Los anteriores canales saturan con la concentración iónica de la solución que los rodea.

c) Canales no selectivos, los cuales poseen alta conductancia y poca selectividad, ellos permiten el libre paso de iones de reducido tamaño, así como algunos no-electrolitos. Su conductancia es proporcional a la conductividad del medio acuoso. Tal es el caso del canal Porina de E. coli, el cual no posee ninguna selectividad.

d) Canales Maxi-K, los cuales son altamente selectivos para el ion potasio (K), pero poseen una muy alta conductancia (130 - 200 pS), los cuales se han encontrado en membranas celulares de animales. Tal es el caso del canal de potasio activado por calcio insensible a apamin de 240 pS de conductancia, encontrado en el sistema tubular transversal del músculo de rata.

Este último grupo difiere con respecto a los tres primeros en que se esperaría que, a mayor selectividad menor conductancia, siendo que ellos son altamente selectivos y de alta conductancia (Latorre & Miller, 1983).

EL POSTPOTENCIAL TARDIO.

Cuando se aplica a la fibra muscular un tren de estímulos tal que se encuentren en el periodo correspondiente al postpotencial temprano (100 Hz.) anteriormente descrito, se observa, en el registro intracelular que hay una ligera suma de los postpotenciales. Después del último postpotencial temprano prevalece una cierta despolarización respecto al potencial de reposo, la cual se recupera después de algunos segundos. A esta despolarización se le conoce como POSTPOTENCIAL TARDIO (LAP), vease figura 3; su magnitud aumenta al incrementarse el número de pulsos en el tren, siendo de aproximadamente un milivoltio por estímulo durante los primeros ocho, y después de este número, el incremento es menor. El número de impulsos, así como la magnitud alcanzada no influye en su curso temporal de declinación que es de tipo exponencial; su inicio puede poseer una cierta joroba que llega a un máximo al poco tiempo, 0.3 - 0,5 seg. de magnitud variable; después de la cual decae exponencialmente (Freygang, Goldstein y Hellam, 1964).

Freygang et al (1964) supusieron que el origen de este fenómeno era la acumulación de potasio en algún espacio extracelular durante la estimulación, el cual fue determinado como el sistema tubular transversal por Kirsch, Nichols & Nakajima mediante una serie de experimentos donde se cambiaba el medio extracelular rápidamente con soluciones de diferente concentración del ion potasio, a una fibra única con registro intracelular, donde vieron que el cambio de soluciones de 5 mM a 10 mM del anterior ion producía una repolarización lenta,

reflejo de la salida difusional de este ión desde el sistema tubular transverso. Por otra parte, si aplicaban estimulación tetánica a la misma fibra observaron que la tasa de declinación del post-potencial tardío era idéntico a la de repolarización lenta observada. Al comparar los tiempos de decaimiento a la mitad de ambos fenómenos bajo distintas condiciones se mantiene igual similitud. Ahora bien, tanto la repolarización de potasio y el LAP se hacen más lentos conforme el radio de la fibra se incrementa, por lo que ambos fenómenos son el mismo y su origen es una acumulación de potasio en el sistema tubular transverso.

Kirsch et al (1977), a diferencia de Freygang et al (1974), puntualizaron que la joroba del LAP observada no era producto de un artefacto de contracción sino un fenómeno real, ya que se encuentra presente aun en condiciones que reducen la contracción, como es el uso de soluciones hipertónicas, manteniendo el mismo tiempo de caída a la mitad de la magnitud alcanzada así como su polaridad.

Esta acumulación de potasio en el sistema tubular transverso sobreviene, según estos últimos autores por la salida del ion desde la célula a través de canales de rectificación tardía, ubicados en el interior de este sistema.

JUSTIFICACION DEL PROYECTO.

Hemos visto que el postpotencial tardío se debe a la acumulación de potasio en el sistema tubular transverso y se tribuye su salida a canales de rectificación tardía ubicados ahí (Kirsch et al, 1977). Sin embargo, el desarrollo de este fenómeno podría ser afectado por corrientes de potasio activadas por el incremento en la concentración interna de calcio ya que existen reportadas en la literatura distintas evidencias que así lo hacen pensar las cuales se pueden resumir como sigue.

Se han observado corrientes de este tipo en el músculo esquelético de conejo (Barret et al, 1981; Latorre et al, 1982; Latorre & Vergara 1983), rata (Moczydlowsky & Latorre, 1983; Romey & Lazdunski, 1984) y de rana (Fink & Luuttgau 1976; Sanchez & Stefani, 1978; Cognard et al, 1984).

En el músculo esquelético de rana existen cuando menos tres sistemas de conductancia al potasio. Uno rápido aportado por el rectificador tardío, otro debido al rectificador entrante, y un tercer lento en el que parece que cierta parte es sensible al calcio ya que se desarrolla poco después de la entrada de este ión a través de canales lentos de calcio y además desaparece si se retira el calcio externo (Sanchez & Stefani, 1978).

Por otra parte, Fink y Luttgau (1976) observaron un gran incremento en la conductancia a potasio en fibras fatigadas, donde se supone que la concentración interna de calcio se encuentra notablemente incrementada.

En 1970 Adrian et al demostraron la existencia en el músculo esquelético de rana adulta de una conductancia lenta de potasio cuyo curso temporal y potencial de reversión es similar al del postpotencial tardío (dentro de los primeros ocho estímulos), pudiendo representar el potencial de equilibrio promedio del sistema tubular despues del eflujo de ion potasio asociado con un solo potencial de acción (Barret et al, 1981).

Freygang et al (1964) observaron que el postpotencial tardío desaparece al aplicar 2 mM de niquel (potente inhibidor de corrientes de calcio) haciendo pensar en algún tipo de dependencia de este fenómeno respecto al calcio al traves de cambios en la conductancia lenta de potasio. De tal manera que la activación de una conductancia lenta de potasio en la membrana tubular, debida a un incremento en la concentración interna de calcio incrementaria la despolarización del postpotencial tardío.

Se han observado postpotenciales hiperpolarizantes (HAP) en miotubos y miobolas de rata (Barret et al, 1981), los cuales carecen de sistema tubular transverso y su origen se debe a canales de potasio activados por calcio.

Por último, se han aislado y caracterizado canales de potasio activados por el incremento en la concentración interna de calcio a partir del músculo esquelético de conejo (Latorre et al., 1982; Vergara & Latorre, 1983) y de rata (Moczydlowsky & Latorre, 1983) desde las fracciones correspondientes al sistema tubular transverso.

Se hace evidente: a) No es claro si la corriente de

potasio dependiente de calcio existe en el sistema tubular transverso en condiciones fisiológicas y si lo hace, si acontecen en la rana. b) Así como el si participan en el desarrollo del postpotencial tardío (Barret et al, 1981) y es el proposito del presente trabajo el averiguarlo a traves de registros de este último fenómeno en fibras musculares esqueléticas de Rana pipiens (Schreber 1872).

EL CANAL DE POTASIO ACTIVADO POR CALCIO.

Las corrientes iónicas se producen al pasar iones por las proteínas de membrana denominadas canales. En el caso de las de potasio lo hacen a través de aquellos que se abren por el incremento en la concentración del ion calcio interno así como por la despolarización de la membrana. Estas proteínas de membrana se han podido aislar del sistema tubular transverso del músculo esquelético del conejo (Latorre et al., 1982; Vergara & Latorre, 1983) y de la rata (Moczydlowsky & Latorre, 1983) habiéndose descrito sus propiedades (Latorre & Miller 1983; Moczydlowsky & Latorre, 1983; Vergara & Latorre, 1983) al incorporarlos a bicapas planas, de donde resumimos:

- Poseen muy alta conductancia ($>180\text{pS}$);
- Se pueden bloquear con tetraetilamonio (TEA) aplicado tanto en el lado interno ($K_b=10\text{ mM}$), como en el externo ($K_b = 0.1 - 1\text{ mM}$);
- Son altamente selectivos (no se encuentra potencial de reversión bajo condiciones bi-iónicas de K / Na) ya que la curva corriente voltaje del canal único se aproxima al eje del voltaje asintóticamente;
- Su conductancia se incrementa e-veces cada 12.5 mV ;
- Poseen dos estados cerrados y uno abierto cuando menos;
- La curva de probabilidad del estado abierto

(P_o) del canal como función del voltaje se corre a lo largo del eje de este último al cambiar la concentración de calcio interna (65 mV a 10 veces mayor concentración que el basal interno);

- Se requieren de dos a tres iones calcio para abrir un canal;

- Para obtener $P_o = 0.5$ en el canal único se requiere de 8 μM de calcio (para el del sistema tubular de la rata) a una milimola (para el de conejo);

- Estos canales operan por un mecanismo sencillo de canal único, i.e. el canal puede ser ocupado por más de un ion a la vez, (a diferencia del retardado y del anómalo).

Se encuentra descrito otro canal de potasio activado por el incremento en la concentración de calcio interno, que también es dependiente del voltaje, en el músculo esquelético. Este canal se diferencia del otro por poseer a) menor conductancia (menos de 50 pS), b) distinta farmacología (no es bloqueado por tetraetilamonio desde el lado extracelular a concentraciones tan altas como 5 mM, más si lo es por la neurotoxina apamina extraída a partir del veneno de abeja), y c) dependencia con el voltaje ya que se abre a potenciales más negativos (Romey & Lazdunski, 1984).

SISTEMA DE REGISTRO E INSTRUMENTACION.

La célula muscular es una célula excitable y cuyo tipo de respuesta a la estimulación es la generación de potenciales de acción que, gracias a los fenómenos de acople, dan lugar a la contracción. Este último fenómeno hace más difícil el registro del potencial de acción, respecto al axón gigante de calamar, y a nuestro interés, el registro del postpotencial tardío ya que el movimiento provoca que el microelectrodo se salga del interior celular además de dañar a la célula por lo que en un posterior registro el potencial de membrana se ve disminuido. Por ello se hace necesario la utilización de procedimientos que eviten el desarrollo de la contracción o bien que eviten que se salga el electrodo de la fibra sin que esta se dañe. En lo primero, una alternativa es alargando la longitud de las fibras, de forma tal que la contracción sea mínima debido a que se produce una separación entre los elementos contráctiles, tal que la interacción entre ellos es mínima. Otra es, el provocar el desacople entre la excitación y la contracción como es el detubular con glicerol, más este procedimiento provoca el desacople eléctrico del sistema tubular transversal haciéndolo inútil para el tipo de registros que se describen. Otra forma es el uso de soluciones hipertónicas, procedimiento que se empleó en algunos de los experimentos aquí expuestos, las cuales no afectan las propiedades eléctricas de la fibra muscular (Hodgkin & Horowicz, 1957). Estas soluciones hipertónicas se pueden hacer añadiendo sacarosa 350 mM a la solución Ringer de registro.

En lo segundo una alternativa es el utilizar electrodos flotantes, los cuales se mueven conjunto la célula y producen un daño mínimo a la membrana (para mayor información sobre este tipo de microelectrodos vease el apendice de microelectrodos).

Para el registro de las propiedades eléctricas de la fibra muscular esquelética se requiere de la utilización de microelectrodos intracelulares lo suficientemente finos como para no provocar un daño en el sarcolema que afecte los registros del potencial de reposo. Estos electrodos no deben de exceder de un diametro de punta mayor a la veinteava parte del diametro de la fibra (Lassen & Rasmussen 1978. en Giebisch et al., 1978). Por otra parte, conforme el diámetro de la punta disminuye la resistencia del electrodo se incrementa, dando a su vez lugar a un aumento del ruido de 60 ciclos que se registra. Por ello es más fácil el utilizar microelectrodos de diametro de punta mas bien grandes, por lo que es necesario el usar fibras musculares de radio considerable. El músculo sartorio de la Rana pipiens (Schereber, 1872) madura presenta radios de fibra del orden de 50 micrometros permitiendo la utilizacion de microelectrodos de resistencia no menores de 15 megaohmios, con los cuales es posible registrar el potencial de membrana, potencial de accion y postpotencial tardío. Este músculo presenta ademas la ventaja de ser de fácil disección ya que se encuentra en el músclo por su parte ventral siendo el más externo. La cara interna casi no posee tejido conjuntivo por lo que las fibras más externas son facilmente penetradas por los microelectrodos, evitando así daños a las mismas por penetración brusca.

Sin embargo, la utilización de músculo entero en los

experimentos donde se realiza cambio de soluciones, existe el problema de un buen recambio, por lo que lo más recomendable es la utilización de fascículos o de fibras aisladas. Para la obtención de estos últimos se debe realizar microdissección, siendo entonces recomendable la obtención desde músculos donde el tejido conjuntivo sea reducido. Uno de estos músculos es el Tibialis anterior, el cual posee fibras transversales a todo su largo, es de fácil extracción, por encontrarse directamente por debajo de la piel en la parte anterior de la tibia cubierto por un grueso perimicio, el cual no representa problemas para la disección.

Las células eléctricamente excitables producen cambios rápidos en el potencial de membrana, los llamados potenciales de acción, estos fenómenos son de muy baja magnitud y muy rápidos, siendo para los vertebrados de no más de 150 mV sucediendo en algunos milisegundos; por ello se requiere para su registro y cuantificación de sistemas capaces de seguirlos, esto es, que sean más rápidos que el fenómeno en si. La manera más usual de hacerlo es mediante el uso de amplificadores de alta resistencia de entrada acoplados a un osciloscopio (vease el apéndice correspondiente a electrodos para, mayor información). En la presente sección se describe la instrumentación empleada en el presente trabajo.

Microelectrodos.

- En el presente trabajo se utilizaron dos tipos de microelectrodos, rígidos y flotantes los cuales se

hicieron. Para ambos las micropipetas se hicieron a partir de tubo Pyrex de 1.5 mm de diametro externo con una fibra de vidrio en su interior, logrando con ello ser llenados facilmente con una solución filtrada de KCl 3M.

- Para los electrodos rígidos las micropipetas se obtuvieron en un paso al estirar el tubo antes descrito con un estirador de micropipetas <puller> horizontal Sutter P-77.

- Los electrodos flotantes se hicieron en el mismo aparato pero en dos pasos como fue descrito por Colomo y Rocchi (1965) [vease sección de electrodos].

- Hecho lo anterior fueron sujetas a un tubo de acrílico (holder) en cuyo interior se encontraba mas solución de KCl 3M y un electrodo impolarizable de plata-plataclorurada. Para el caso de los electrodos flotantes, entre el holder y la micropipeta se colocó un puente Ringer-agar del cual pendia una gota de solución de Ringer a la cual se adheria la micropipeta por tension superficial [vease seccion de microelectrodos].

- Así, la micropipeta por medio de la solución concentrada de KCl hace contacto con el electrodo de plata-plataclorurada dando lugar a un microelectrodo cuyas resistencias fueron para los rígidos entre 5 y 105 megaohmios y para los flotantes de 40 a 900 megaohmios.

Cuando se usaron microelectrodos rígidos se emplearon aquellos de resistencia entre 15 y 35 megaohmios mientras que para los flotantes entre 90 y 150 megaohmios ya que si poseían valores menores dañaban a las fibras y si se usaban con valores mayores al límite superior se tenía un ruido de 60 ciclos importante.

- El microelectrodo se conectaba a la entrada de un seguidor catódico el cual tiene como tierra real un electrodo exterior de plata-plataclorurada depositado en el baño. La salida del seguidor va a un preamplificador de alta resistencia de entrada Biodyne Electronics AM - 1 desde el cual es posible balancear los electrodos para llevarlos a una diferencia de voltaje entre ellos de cero milivoltios. Digamos aquí que no se utilizaron electrodos con diferencia de potencial entre ellos mayor a 100 mV.

- La salida del preamplificador era llevada a: a) La entrada de un amplificador de un osciloscopio Tektronix 5133. b) Un voltímetro digital Sympson 2840 del cual se obtenía el potencial de reposo de membrana con una precisión de decimas de milivoltio. c) Un graficador Gould 2200 S con el que se registraba en papel al postpotencial tardío.

- El registro permanente del osciloscopio se hizo fotográficamente con una cámara Nihon Kohden PC-2A.

- La estimulación se hizo con un estimulador Grass SD9, o bien con un estimulador digital programable EP - 11 hecho en el Instituto Nacional de Cardiología (México) acoplado con una unidad de aislamiento de estímulos Grass SIU5A. Ambos estimuladores produjeron pulsos cuadrados de corriente de intensidad variable que además sincronizaban al osciloscopio.

- La salida de estimulación de cualquiera de estos aparatos se conecto a un electrodo bipolar de plata cuyas terminales estaban aisladas excepto en su extremo distal, que terminaba libre y muy cerca de las fibras. La punta de cada terminal tenia la forma de pelotita con lo cual se estimulaba un número reducido de fibras.

Con este sistema de registro fue posible obtener el registro del potencial de membrana, potencial de acción y postpotencial tardío de solamente una fibra muscular tanto de músculo sartorio entero o bien fasciculos aislados del tibialis anterior de Rana pipiens (Schreber 1872). La estimulación se hizo, para el músculo entero, con los electrodos bipolares ya descritos colocados muy cerca de la célula a registrar y suficientemente alejados del microelectrodo evitando, con esto último, la aparición de un artefacto producido por la salida de corriente del electrodo de estimulación. Para los fascículos aislados se estímulo con dos alambres de plata ubicados en la base de la camarita dando igualdad de condiciones que las

anteriormente descritas.

SOLUCIONES.

En el presente trabajo se utilizaron las siguientes soluciones de Ringer cuya composicion ionica (mM) es la siguiente:

	Ca ²⁺	Na	K	Cl	Mg ²⁺	MOPS
Ringer Normal	2.0	117	2.5	121.5	--	4.0
Magnesio	---	117	2.5	121.5	3.0	4.0

MOPS = Acido 3-[N-Morpholino]propanesulfonico

Todas a un pH de 7.2 ajustado con NaOH o HCl.

Para las soluciones donde se emplearon bloqueadores la composicion ionica fue aquella del Ringer Normal añadiendose la cantidad milimolar del bloqueador.

EXPERIMENTOS DE SUSTITUCION DE CALCIO POR MAGNESIO.

Con la información expuesta en las paginas 29-33, se hace patente que la acumulación de potasio tubular que da origen al postpotencial tardío se puede ver afectada por canales de potasio que se activan por el incremento intracelular de la concentración de calcio. ahora, ¿de donde pudiese provenir este calcio?. Una respuesta es del interior celular ya que para el desarrollo de la contracción sucede un incremento importante en la concentración intracelular de este ion, desde 10^{-7} a 10^{-4} M (Endo M., 1977) debido a que el retículo sarcoplásmico lo libera en el conjunto de fenómenos que acontecen en el acople excitación contracción. Otra posibilidad es que provenga del exterior celular, entrando por medio de canales ionicos especificos para este ion (Beaty & Stefani, 1976b; Stanfield, 1977; Sanchez & Stefani, 1978; Almers & Palade, 1981; Sanchez & Stefani, 1983) los cuales se encuentran en el interior del sistema tubular transverso (Gage & Eisenberg, 1969a,b; Eisenberg & Gage, 1969; Nicola Siri, Sanchez & Stefani, 1980). De hecho se pueden producir potenciales de acción dependientes de calcio (Beaty & Stefani, 1976a).

Si suponemos que existen canales de potasio dependientes de calcio en el interior del sistema tubular transverso de la rana, que pudiesen ser activados por el ion calcio extracelular que penetra a la célula por los canales de calcio dependientes del voltaje que se encuentran en el interior de dicho sistema (Nicola Siri, Sanchez & Stefani, 1980), al sustituir este ion por

magnesio, el cual es poco permeable por los canales de calcio (Almers & Palade, 1981a; McCleskey & Almers, 1985) no bloquea a los canales de potasio dependientes de calcio ni los activa (Latorre et al, 1982), el postpotencial tardío debiese afectarse si esta originado por estos canales de potasio.

La sustitución del calcio por magnesio representa además multiples ventajas como son:

- Es poco permeable por los canales lentos de calcio dependientes del voltaje (Almers & Palade, 1981; McCleskey & Almers, 1985) por poseer el siguiente orden en selectividad:

$Ba > Sr > Ca > Mn > Mg.$

no siendo permeables el Co ni el Ni (Almers & Palade 1981a).

- No penetra al interior celular en la gama de concentraciones 1 a 4 mM (Flatman, 1984)

- Se sabe que existen sistemas que mantienen el nivel basal de este ion por debajo de su equilibrio electroquímico independientemente de la concentración extracelular (Flatman, 1984).

- La concentración de este ion dentro y fuera de la célula así como su bioquímica parecen hacer poco probable su participación como un "disparador" de alguna función como las realizadas por el calcio (Flatman, 1984).

- Es el segundo o tercer catión intracelular más abundante y es un cofactor importante en multiples sistemas enzimáticos jugando un papel relevante en la síntesis de proteínas (Flatman, 1984).

RESULTADOS.

En vías de probar la hipótesis planteada se realizaron experimentos en los que se registro al postpotencial tardío (LAP) sustituyendo el calcio extracelular por magnesio en músculo entero bajo soluciones hipertónicas.

En paralelo con esto, se registro el potencial de acción y el postpotencial temprano en las distintas soluciones evaluando las posibles diferencias entre los testigos y los experimentales.

Los experimentos descritos a continuación se realizaron de Mayo a Octubre de 1985 en músculos sartorio.

En la figura 1 se presentan tres tipos de postpotenciales temprano observados en solución de Ringer normal con 350 mM de sacarosa, siendo el primero el más frecuente (40% de un total de 77 registros), y donde se ilustra además los distintos tipos de evaluaciones que se hicieron a todos y cada uno de los registros realizados en el transcurso de este proyecto, a saber:

- Potencial de reposo, (E_m) que es la lectura de la diferencia de potencial entre el microelectrodo en el interior celular y el electrodo de referencia ubicado en el baño; previa anulación del potencial existente entre ambos electrodos al estar ubicados en el mismo medio.
- Sobretiro (St) que es la inversión del voltaje de membrana de negativo a positivo.
- Amplitud del potencial de acción (V_s) medido desde el potencial de reposo hasta el máximo del sobretiro.
- Amplitud desde el cero al inicio del postpotencial

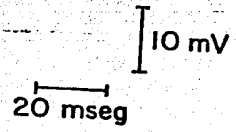
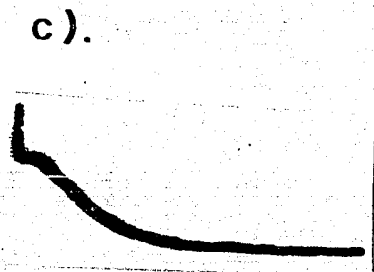
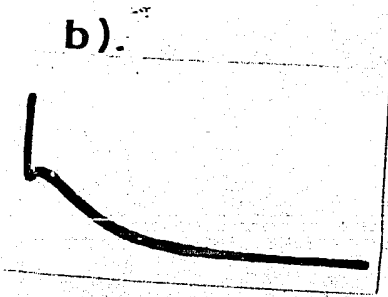
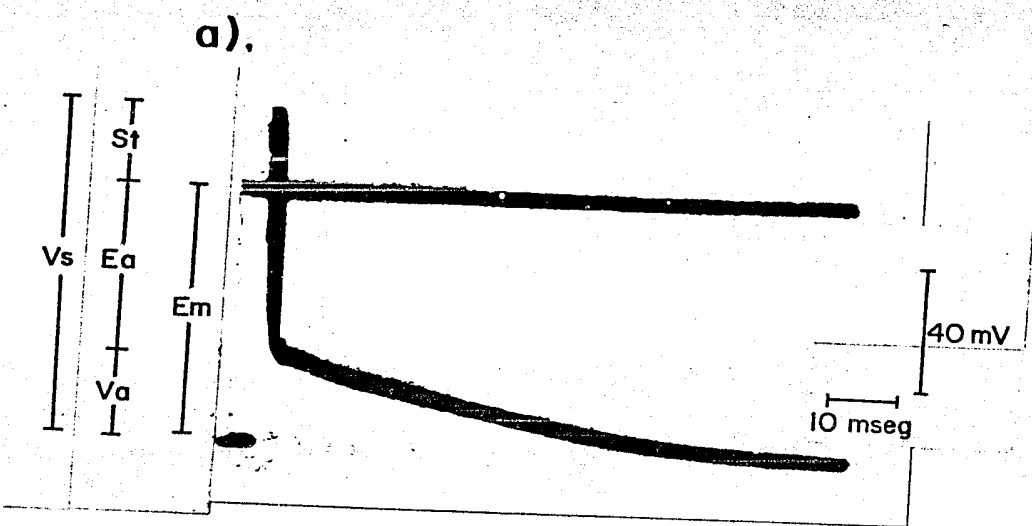


FIGURA I. Distintos tipos de postpotencial temprano observados en solución normal hipertónica. Tipo a) 40%, b) 33.3% y c) 26.6%; de 75 registros.

temprano (E_a), medido a los 10 mseg. del inicio del potencial de acción.

- Amplitud del postpotencial temprano (V_a) medido desde el potencial de reposo.

- Tiempo al potencial de reposo, medido desde el punto donde la repolarización lenta se hace evidente hasta alcanzar el potencial de reposo.

- Asimismo se observó la caída del postpotencial temprano respecto al tiempo muestreandose cada 10 mseg. hecho lo cual se normalizó cada registro respecto al máximo de cada fibra y posteriormente se linealizó para obtener así la constante de decaimiento y la amplitud máxima.

El segundo tipo posee una frecuencia de 33.3% mientras que el último de 26.6 %. De tal manera que podemos decir que el postpotencial temprano se manifiesta en una de tres formas. En la primera, la transición de repolarización rápida a lenta se hace repentina alcanzandose el potencial de reposo en 73.92 19.88 mseg. En la segunda se observa una ligera depolarización posterior al termino de la repolarización rápida despues de la cual se regresa al potencial de reposo en 88.75 14.52 seg. El tercer tipo presenta una fase donde por un cierto tiempo (2-5 mseg.) el potencial de membrana alcanzado por la repolarización rápida no cambia, despues del cual se regresa al potencial de reposo en 82.60 22.33 mseg. Esta variación se observó tanto en distintos músculos como dentro de uno mismo. La variación entre un tipo de postpotencial y otro es gradual.

A continuación se presenta una tabla (I) donde se ilustran

TABLA 1. Variación de los distintos parámetros evaluados en el potencial de acción muscular en solución hipertónica normal.

Fibra	Em mV	Eam mV	St mV	Ea mV	Va mV	Tt mseg	J
1	70	86	16	50	13	80	N
2	79	90	12	60	60	20	N
3	70	85	15	55	15	100	N
4	70	83	13	48	23	00	N
5	71	84	13	50	22	100	N
6	74	87	15	55	15	40	N
7	75	85	10	55	18	50	S
8	75	80	5	56	13	50	P
9	75	80	5	57	18	70	P
10	75	105	30	65	13	80	P
11	77	103	26	65	13	100	P
12	79	104	25	65	12	100	P
13	82	100	20	79	13	120	P
14	83	98	15	73	10	90	P
15	70	92	22	65	8	70	N
16	71	91	20	50	15	100	S
17	70	80	10	53	15	100	S
18	70	85	15	55	15	100	S
19	65	85	20	40	20	80	S
20	66	83	17	45	21	00	S
21	65	85	20	44	22	100	S
22	62	79	17	44	21	100	S
23	63	77	17	47	15	80	S
24	70	80	10	47	8	100	N
25	85	112	27	63	20	60	N
26	83	111	28	58	21	70	P
27	80	91	11	63	17	50	P
28	77	87	10	53	20	60	N
29	87	100	20	64	15	60	P
30	82	90	10	52	17	80	S
31	74	99	25	60	5	80	S
32	80	100	20	70	2	80	N
33	74	79	5	51	15	80	S
34	62	67	5	50	10	100	S
35	65	75	10	48	15	80	S
36	70	70	0.0	52	16	100	P

Total	77						
promedio	87.3	90.7	17.3	54	16.4	82.6	
± s.d	±8.5	±13	±8.2	±10.4	±5.3	±22.3	

donde: Em es el potencial de reposo; Eam es la amplitud del potencial de acción; St el sobretiro; Ea amplitud del postpotencial temprano evaluado desde el cero; Va lo mismo pero desde el reposo; Tt corresponde al tiempo en regresar al potencial de reposo; J es si el registro presenta joroba, meseta o ninguno de los dos.

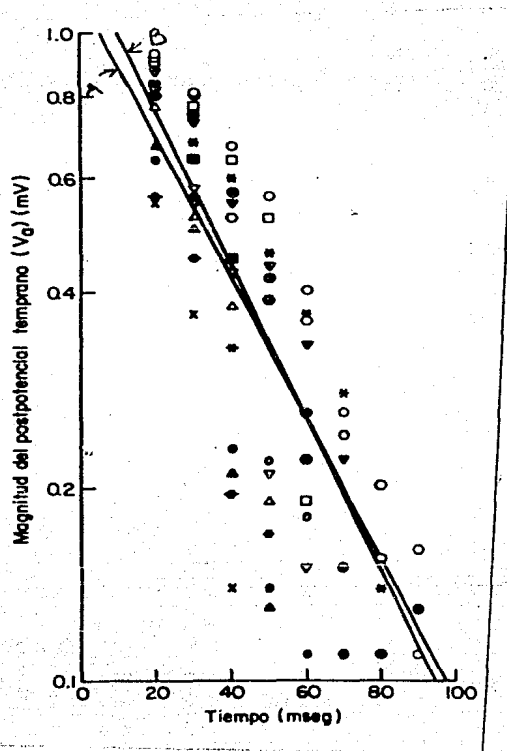


FIGURA 2. Decaimiento del postpotencial temprano normalizado (en escala semilogarítmica) respecto al tiempo en solución normal hipertónica. Se muestran solo algunos puntos. Los mejores ajustes al considerar la caída como una exponencial simple para (a) todos los puntos y (b) sin considerar los primeros 20 milisegundos de un total de 75 registros.

algunos de los valores de los distintos parametros evaluados hasta aqui.

En la figura 2 se presenta una gráfica de decaimiento del postpotencial temprano, en solución normal hipertónica, normalizado a uno, ello con el fin de que diferencias en escala no interfieran con el análisis. El inverso de la pendiente (Tau) [que es un estimador de la velocidad de repolarización] a la "mejor recta" [trazo A] por el criterio de minimos cuadrados, fue de 36.52 msec. con un coeficiente de ajuste de 0.99 para un total de 66 fibras. Como se describio anteriormente, el postpotencial temprano puede iniciarse con un cambio brusco de la repolarización rápida a lenta (tipo uno), con una pequeña joroba (tipo dos), o bien, con una meseta (tipo tres); por esta razón en los primeros milisegundos no se ha declarado perfectamente este fenómeno, por ello se calculó la mejor recta sin considerar los primeros 20 milisegundos (trazo B de la misma figura) cuya Tau resulto ser de 39.93 msec. con un coeficiente de ajuste de 1.001. Con ello podemos decir que el decaimiento del postpotencial temprano esta viendo interferido en el inicio del mismo, donde existe una fase de decaimiento aun más lenta que en tiempos mayores a 20 milisegundos.

En la tabla I, se ilustra la variación de los distintos parametros evaluados para el potencial de acción bajo las presentes condiciones.

Una vez observado el postpotencial temprano se procedió a aplicar un tren de estimulación de 100 Hz. En la figura 3 se observa la repolarización muy lenta (segundos) como la describieron Freytag, Goldstein y Hellam (1964); La constante de

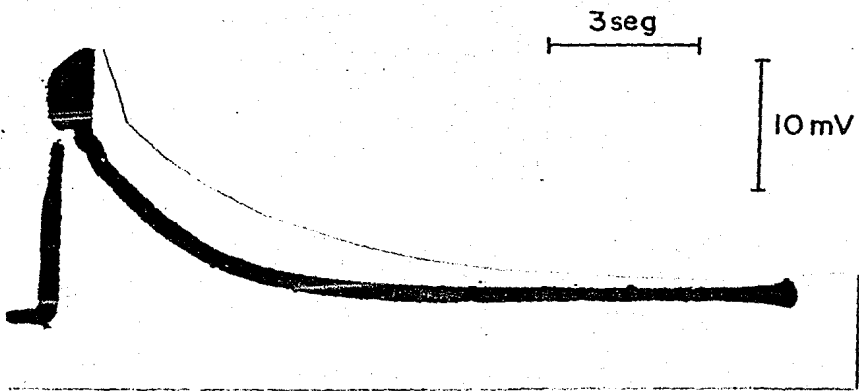


FIGURA 3. Registro típico de postpotencial tardío en solución normal hipertónica para una fibra con 82.5 mV de potencial de reposo.

TABLA II. Variación de los distintos parámetros del postpotencial tardío en solución normal hipertónica.

Fibra	Em [mV]	Amplitud [mV]	Tau [mseg]	r	Tr [seg]
1	94.2	21.46	2.94	0.99	6.0
2	80.0	8.25	7.14	0.99	5.0
3	96.8	9.18	7.69	0.97	7.0
4	93.4	10.94	2.63	0.95	4.0
5	80.0	5.77	5.88	0.96	5.0
6	85.3	4.34	8.33	0.99	5.5
7	74.2	19.38	2.29	0.98	4.0
8	81.4	3.06	3.97	0.96	3.0
9	68.8	8.43	3.94	0.99	5.0
10	94.5	27.35	4.76	1.00	7.0
11	91.4	26.70	4.17	0.99	5.5
12	82.5	12.2	3.57	0.98	5.0
13	89.6	18.86	4.35	0.99	6.5
14	94.8	20.62	3.03	1.0	5.0
15	87.4	22.99	3.45	1.0	6.0
16	90.5	8.85	4.35	1.01	5.0
<hr/>					
Total	19				
promedio	87.3	14.2	4.5	0.98	5.28
± s.d.	±8.5	±7.8	±1.8	±0.012	±1.08

Donde:

- Em = potencial de reposo.
- Amplitud = amplitud máxima del postpotencial tardío.
- Tau = constante de caída del fenómeno.
- r = coeficiente de correlación.
- Tr = tiempo en alcanzar el potencial de reposo.

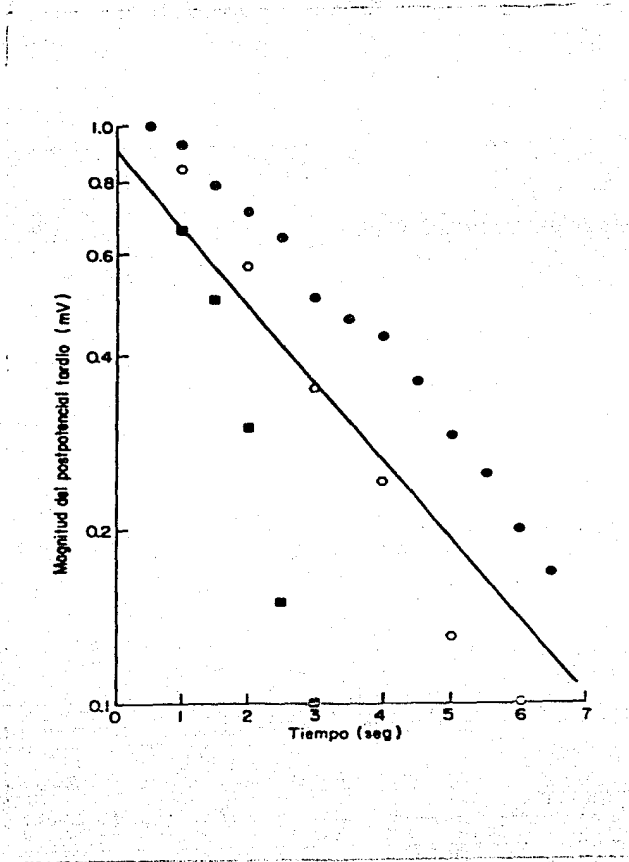


FIGURA 4. Decaimiento del postpotencial tardío normalizado en Ringer normal hipertónico en escala semilogarítmica. Se muestran solo tres registros, de un total de 19. Se ilustra la mejor recta de ajuste para los 19 registros cuyas constantes son:

$$b = 0.9 \text{ mV. } m = 3.1 \text{ seg.}; r = 0.87.$$

decaimiento para este registro fue de 3.57 seg. con un tamaño de postpotencial tardío (LAP) de 12.2 mV. y un coeficiente de ajuste de 0.98 . mientras que el tiempo a la mitad de la amplitud del LAP fue de 2.2 seg.

En la figura 4 se muestra el decaimiento del postpotencial tardío, en escala semilogarítmica, para 3 fibras normalizadas. La mejor recta para 19 registros se ilustra. La constante de decaimiento fue 3.10 seg. con un coeficiente de ajuste de 0.87. En la tabla II se muestra la variación de los parametros del postpotencial tardío en estas condiciones.

Experimentos de magnesio.

Una vez observado el postpotencial temprano así como el tardío se procedio a hacer el cambio de solución de Ringer normal hipertónico a una en la que se habia sustituido el ion calcio por 3.0 mM de magnesio a la cual denominaremos en adelante Ringer magnesio.

Entre el inicio del registro y el cambio de solución se permitió un tiempo de equilibración de 15 minutos del músculo con medio litro de solución isotónica bajo constante agitación, despues del cual se aplicaba Ringer magnesio hipertónico frio y al transcurrir tres minutos se procedia a registrar como anteriormente se menciona.

En la figura 5 se presenta un típico potencial de acción en solución magnesio hipertónico. En general se observaron los tres tipos de postpotencial temprano ya descritos, cuyas frecuencias fueron de 66.6% para el tipo I, 6.66% para el II y 26.66% para el III, de un total de 15 registros. La variación de los distintos

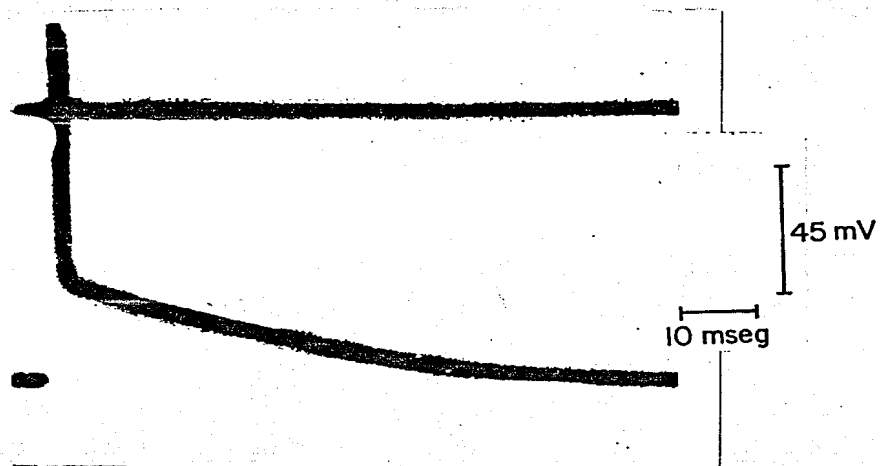


FIGURA 5. Potencial de acción en ringer magnesio hipertónico para una fibra con 95 mV. de potencial de reposo.

TABLA III. Variación de los distintos parámetros evaluados del potencial de acción solución de magnesio hipertónica.

Fibra	Em mV	Tam mV	St mV	Ea mV	Va mV	Tr mseg	J
1	90	125	35	75	9	80	N
2	92	140	38	70	14	80	N
4	88	118	30	70	10	40	N
5	36	111	25	78	10	40	N
6	85	106	21	75	9	60	N
7	90	115	15	70	8	70	N
8	85	100	15	63	20	80	P
9	70	100	30	45	26	70	N
10	80	106	26	55	20	80	P
11	73	93	20	47	20	100	P
12	75	76	1	60	14	50	S
13	88	100	12	82	3	100	P
14	90	131	41	52	37	100	N
15	77	115	38	26	38	86	N
16	80	97	17	66	15	30	N
<hr/>							
Total	16						
promedio		80	109	24	62	17	71
± s.d.		±14	±16	±11	±15	±10	±22

donde: Em es el potencial de reposo; Tam es la amplitud del potencial de acción; St el sobretiro; Ea amplitud del postpotencial temprano evaluado desde el cero; Va lo mismo pero desde el reposo; Tr corresponde al tiempo en regresar al potencial de reposo; J es si el registro presenta joroba, meseta o ninguno de los dos.

TABLE IV. Variación de los distintos parámetros del postpotencial tardío en solución de magnesio hipertónica.

Fibra	Em [mV]	Amplitud [mV]	Tau [mseg]	r	Tr [seg]
1	80.0	7.45	2.55	0.97	4.0
2	75.4	3.37	3.27	0.94	3.0
3	82.2	8.46	3.59	0.81	4.5
4	75.0	8.00	2.16	0.99	3.0
5	89.3	5.12	2.62	0.98	7.0
6	88.0	7.49	3.82	0.97	4.0
7	87.6	9.79	2.41	0.99	3.5
8	85.2	6.59	3.13	1.00	4.5
9	90.0	9.89	3.57	1.00	3.0
10	92.0	9.32	3.70	1.00	6.0
11	74.2	5.66	2.70	0.97	3.0
12	74.0	20.21	3.45	0.98	6.0
13	74.1	5.44	3.13	0.99	7.0
14	64.3	20.60	3.33	0.99	5.5
15	73.4	6.95	5.56	1.00	5.5
16	68.6	6.17	5.32	0.97	5.5
17	88.5	9.19	4.29	1.00	5.0
18	87.0	11.99	2.27	0.99	3.5
19	84.6	17.6	2.56	0.99	4.0

Total	32				
promedios:	80.9	9.79	3.3	0.97	5.31
± s . d.	± 8.0	± 5.04	± 1.03	± 0.05	± 1.61

Donde: Em = potencial de reposo.

Amplitud = amplitud maxima del postpotencial tardío.

Tau = constante de caída del fenomeno.

r = coeficiente de correlacion.

Tr = tiempo al potencial de reposo.

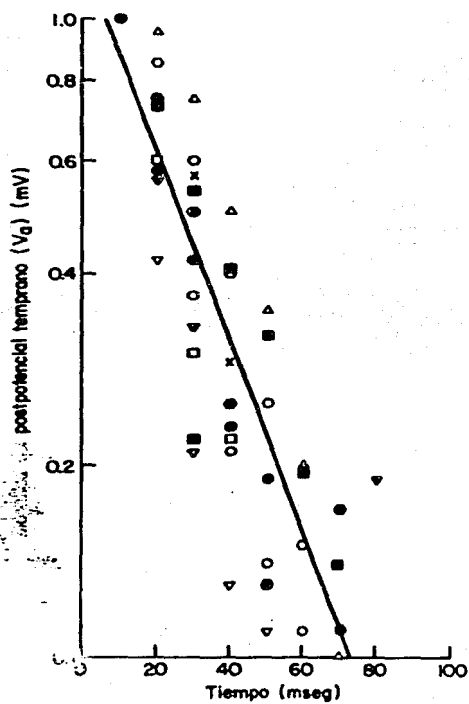


FIGURA 6. Decaimiento normalizado del postpotencial temprano (en semilogaritmico) en solución magnesio hipertónica. Se ilustran solo 10 registros de un total de 15. La mejor recta de ajuste para estos 15 registros se muestra, la cual no considera los primeros 20 mseg. Su constante de caída es 28.74 mseg. con un coeficiente de regresión de 0.91. Para detalles vease el texto.

parametros evaluados para el potencial de acción en la presente solución se ilustra en la tabla III. En la figura 6 se muestra la caída del postpotencial temprano respecto al tiempo en esta solución para las anteriores fibras. La constante de decaimiento para la mejor recta es 28.74 msec., la cual no toma en cuenta los primeros 20 milisegundos, con un coeficiente de regresión de 0.91.

Los registros del postpotencial tardío, los cuales se resumen en la tabla IV. En la figura 7 se presenta la repolarización lenta, en escala semilogarítmica, del potencial de membrana (normalizada) en el tiempo, cuya mejor recta de ajuste presenta una constante de decaimiento de 2.17 seg. y un coeficiente de correlación de 0.87.

Reversibilidad del efecto de Ringer magnesio.

Una vez registrado el postpotencial temprano y tardío en Ringer magnesio hipertónico se reaplicaba solución de Ringer normal isotónica, dejando un tiempo para equilibración de no menos de 15 minutos, también bajo constante agitación en un volumen de medio litro. Después de este tiempo se volvió a aplicar solución normal hipertónica y tras tres minutos de equilibración se procedía a registrar. La variación de los distintos parametros del potencial de acción bajo estas condiciones se ilustra en la tabla IV; mientras que para el postpotencial tardío, en la tabla V, respectivamente.

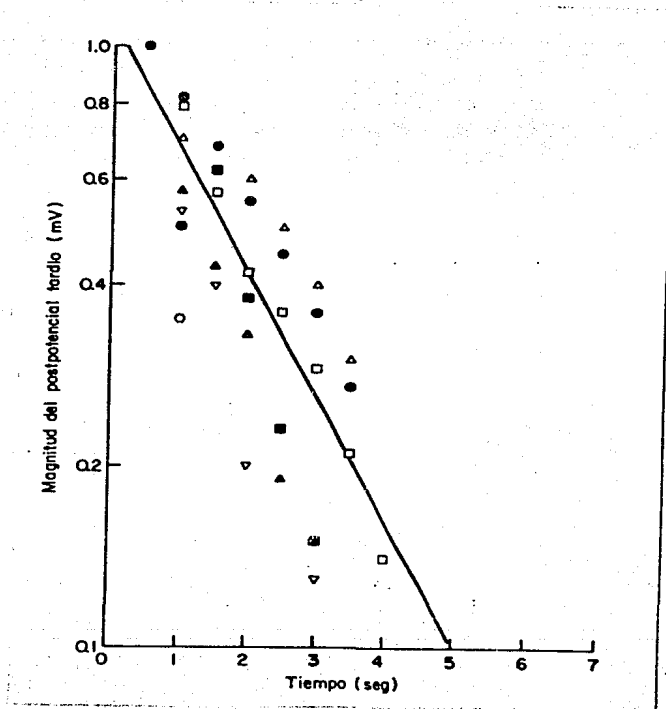


FIGURA 7. Caída del postpotencial tardío normalizado (en escala semilogarítmica) respecto al tiempo en ringer magnesio hipertónico. Se muestra ocho registros de un total de 32. Se ilustra el mejor ajuste para todos los registros ($r=0.87$) cuya constante es de 2.17 seg.

TABLA V . Variación de los distintos parámetros del postpotencial tardío en solución de normal hipertónica despues de aplicar solución de magnesio.

Fibra	Em [mV]	Amplitud [mV]	Tau [mseg]	r	Tr [seg]	
1	82.2	7.20	6.67	0.99	6.0	
2	79.4	3.13	6.25	0.99	4.0	
3	80.2	9.86	5.56	0.99	5.5	
4	82.3	9.78	4.17	0.99	7.0	
5	73.9	3.88	2.50	1.00	3.0	
6	65.8	5.80	5.56	0.98	5.0	
7	73.2	5.45	2.08	0.99	3.0	
8	71.0	4.11	2.63	0.97	3.0	
9	82.5	21.56	3.85	1.00	6.0	
10	62.1	18.89	4.00	0.99	6.0	
<hr/>						
Total promedios:	10	74.6	16.18	3.72	0.98	4.85
± s.d		±7.2	±11.02	±4.81	±0.01	±1.49

Donde:

Em = potencial de reposo.

Amplitud = amplitud máxima del postpotencial tardío.

Tau = constante de caída del fenomeno.

r = coeficiente de correlacion.

Tr = tiempo al potencial de reposo.

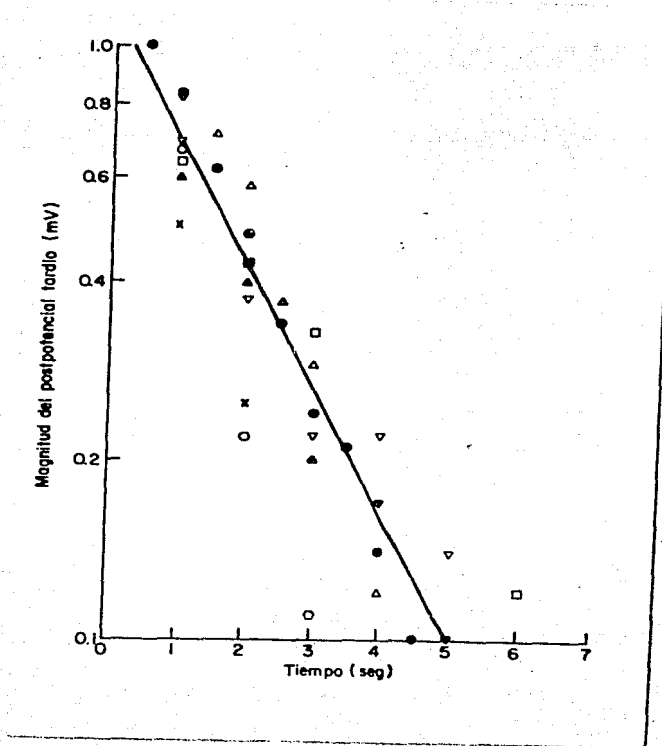


FIGURA 8. Decaimiento del postpotencial tardío normalizados respecto al tiempo en solución normal hipertónica tras la aplicación de solución de magnesio. Se ilustran solo ocho de un total de diez registros. El mejor ajuste ($r=0.93$) para los 10 registros posee una constante de caída de 2.07 seg.

DISCUSION DE LOS EXPERIMENTOS DE RINGER CALCIO-MAGNESIO-CALCIO.

El postpotencial temprano.

En la figura dos se pueden observar tres tipos de postpotenciales en Ringer normal hipertónico, los cuales se distinguen por la manera en que se hace la transición de repolarización rápida a lenta. Por su parte, en la figura tres, trazo B, se demostró que después de 20 milisegundos la repolarización del postpotencial temprano sigue un comportamiento netamente exponencial (vease la diferencia de coeficientes de correlación). Estas mismas diferencias en los postpotenciales tempranos fue observada por Anders Persson (1963) sobre fibras musculares esqueléticas de Rana temporaria y encontró que durante los primeros 15 milisegundos la resistencia de la membrana se encontraba disminuida, de tal manera que los cambios de permeabilidad que acontecen en el potencial de acción se encuentran aun presentes 10 msec. después del máximo de este. Mientras que, a tiempos mayores la repolarización de la membrana acontece de manera exponencial, debido a la recarga capacitiva de la membrana tubular, quedando así explicada las diferencias de este fenómeno. Almers (1980) atribuye estas diferencias al potencial de acción tubular, responsable del acople excitación contracción ya que es retardado respecto al potencial de acción del Sarcolema. La presencia de un potencial de acción tubular pudiese ser cierto ya que Adrian et.al (1973) mediante análisis numérico encontraron que la joroba presente en la gran mayoría de

los experimentos puede ser explicada por la presencia de una depolarización del sarcolema producto de la corriente iónica que fluye al través de la membrana del sistema T durante el potencial de acción tubular. Igualmente, encontraron que a mayor radio de la fibra mayor tiende a ser la joroba ya que la proporción de membrana Tubular - Sarcolema es mayor; sin embargo no pudieron demostrar que esto realmente ocurra ya que la coorrelación de presencia de joroba - radio de la fibra fue muy baja. Concluyendo que habia otros factores desconocidos dentro del desarrollo del postpotencial temprano. Sin embargo, el que no la encontraran podria deberse a la propia variación existente entre fibras de la proporción de áreas Sarcolema - membrana T (L. D. Peachey, comentario personal).

Observando los registros presentados por Anders Persson (1963) se observan varias diferencias respecto a las obtenidas en el presente trabajo; a saber:

Los tiempos de repolarización al potencial de reposo acontecen en aproximadamente 60 mseg, mientras que en el presente acontecen despues de 70 mseg (82.6 ± 22.33 mseg.). Una posible razón de esta discrepancia es la diferencia en especies con las que se trabajo. Otra es que los potenciales de reposo entre sus fibras y las ilustradas fuesen diferentes, ya que de ser asi se requeriria mayor tiempo para llegar al potencial de reposo en cuanto mayor sea este, sin embargo, los potenciales de reposo registrados en el presente trabajo fueron 87.31 ± 8.5 mV (n = 75) mientras que el citado autor observo 88.0 ± 4.6 mV. (n = 334) por lo que ésta, muy probablemente, no es la causa de ésta discrepancia. Otra posible causa es que la capacidad del sistema

tubular transverso entre ambas especies fuese diferente, cosa posible dado que R. temporaria posee fibras mucho mas grandes que R. pipiens, por lo que es de esperar que la primera posea mayor superficie de membrana tubular y por ende superior capacidad, por lo que le tome mayor tiempo el recargarse, más aquí se observa lo contrario. Otra causa seria una diferencia en las constantes de decaimiento del postpotencial temprano; el ya citado autor encontró que decae como 19.8 ± 6.1 msec para 111 fibras, mientras que en el presente se encontró ser de 38.04 ± 4.09 msec., ésta diferencia es importante ya que este mismo autor puntualizó que la constante de decaimiento del postpotencial temprano es muy similar a la constante de tiempo de la membrana en reposo para tiempos mayores a 15 msec del inicio del potencial de acción, de tal manera que, si el parecido entre ambas constantes no es una coincidencia, se tiene que las constantes de tiempo en reposo para sus experimentos y los presentes son distintas. Por otra parte, Frank (1957) encontró, para Rana pipiens, que la constante de tiempo del postpotencial temprano se encuentra dentro de 13.5 ± 0.9 msec que es poco menos de la mitad de la encontrada en el presente trabajo y ligeramente menor que la encontrada por Anders Persson. La diferencia entre ambos pudiese ser explicada por la diferencia en especies y por la distinta metodología empleada por uno y otro (Frank no utilizó soluciones hipertónicas).

La constante de tiempo de membrana (Tau) puede ser descrita como el tiempo al 85% (producto resistencia-capacidad, si se describe a la membrana como una resistencia y capacitor en paralelo por lo que solo posee una constante de espacio) definido

por:

$$\text{Tau} = r_m (c_e + c_m) + r_e * c_e .$$

donde:

r_m = resistencia de membrana.

c_m = capacidad de membrana.

c_e = capacidad del sistema tubular transverso.

r_e = resistencia en serie con c_e .

Por su parte, el producto $c_e * r_e$ posee solamente un valor de uno a dos milisegundos, por que la Tau esta determinada principalmente por r_m y $(c_e + c_m)$. Ahora c_m esta determinado por las propiedades dielectricas de la membrana, las cuales no varian en soluciones hipertónicas (Freygang et.al, 1967) de tal manera que la discrepancia entre los valores obtenidos por Frank (1957) y A. Persson (1963) respecto a los presentes se pueden atribuir a cambios en r_m y c_e . Esta idea no parece ser tan descabellada ya que Freygang et.al (1967) demostraron que r_m decrece 18% en soluciones hipertónicas similares a las aquí empleadas (atribuyendose a un incremento en la conductancia a cloro); mientras que en iguales condiciones $(c_e + c_m)$ se incrementa un 33%, de tal manera que en soluciones hipertónicas, Tau queda descrita por 28.36 ± 0.99 msec para 34 fibras de Rana pipiens, cuyo valor se asemeja más a la obtenida en el presente trabajo (38.04 ± 4.09 msec).

En resumen, la discrepancia de los valores obtenidos de la constante de decaimiento de membrana en reposo respecto a la reportada por Frank (1957) y A. Persson (1963) se atribuye a cambios en las propiedades eléctricas de la membrana, a saber, la capacidad de membrana tubular y la resistencia de membrana, debido a alteraciones provocadas por las soluciones hipertónicas aplicadas.

La causa del parecido de las constantes de decaimiento entre A. Persson (1963) y Frank (1957) se desconoce así como la discrepancia entre los valores del primero y las aquí encontradas ya que se utilizaron en ambos casos soluciones hipertónicas.

Anders Persson (1963) encontró que la amplitud de postpotencial temprano medido desde el reposo (V_a) fue de 20.9 ± 3.8 mV ($n = 334$) mientras que en el presente trabajo se encontró de 16.41 ± 5.26 mV. Por su parte Frank (1957) encontró que en once fibras este fenómeno aconteció en 19.0 ± 1.3 mV. por lo que podemos considerar que la diferencia no es importante entre los obtenidos por ellos y los aquí encontrados pensando, respecto a los de A. Persson, que sus fibras poseían mayor radio que las de R. pipiens.

Frank (1957) encontró que la amplitud del postpotencial temprano (V_a) para Rana pipiens no es independiente del potencial de reposo y por un "análisis estadístico" ilustra que se pueden relacionar por una recta descrita por:

$$y = ax + b.$$

$$\text{donde } a = -20.68 \text{ y } b = 0.432 \quad 0.041.$$

En la figura 9 se ilustra el tamaño del postpotencial temprano (V_a) respecto al potencial de reposo en solución de Ringer normal hipertónica, encontrándose que la mejor recta es aquella descrita por:

$$V_a = 0.916 E_r + 9.297$$

con un coeficiente de correlación de 0.1396, para las mismas 75 fibras anteriormente mencionadas.

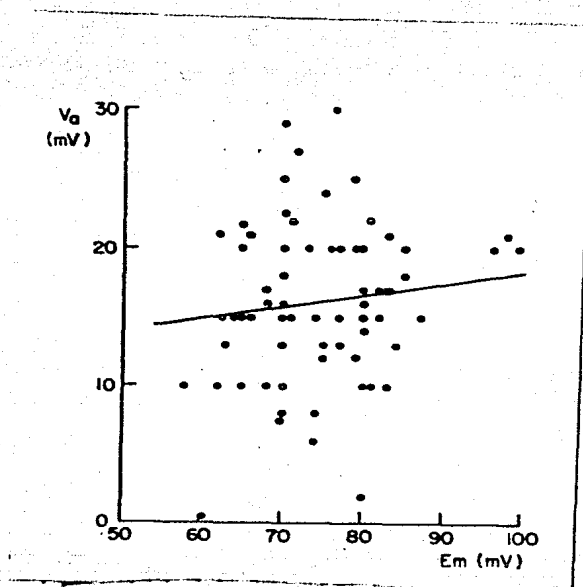


FIGURA 9. Amplitud del postpotencial temprano medido desde el reposo (V_a) respecto al potencial de membrana antes de la estimulación (E_m). El coeficiente de correlación para la mejor recta de ajuste, es de 0.1396 para 75 registros. Para detalles vease el texto.

Como se puede notar, parece que el tamaño del postpotencial temprano (V_a) es independiente del potencial de reposo para R. pipiens bajo estas condiciones. La causa de la discrepancia entre la conclusión de la dependencia de la amplitud del postpotencial temprano respecto al potencial de reposo llegada por Frank (1957) y a la que se puede llegar en el presente trabajo se desconoce.

Anders Persson (1963) relacionó la amplitud del postpotencial temprano medido desde cero (E_a) respecto al potencial de membrana (E_m) encontrando que se pueden correlacionar para potenciales de membrana menores a 95 mV. por una recta descrita por:

$$E_a = 0.66 E_m + 9.1 \quad (n = 40)$$

cuya pendiente de regresión vario entre 0.32 y 0.75 msec.

En la figura 10 se ilustra un análisis de correlación por el método de mínimos cuadrados para E_a respecto a E_m en solución fisiológica normal donde la mejor recta esta descrita por:

$$E_a = 0.85 E_r - 8.24 \quad (n = 75)$$

con un coeficiente de ajuste de 0.75.

Es interesante el observar que la magnitud del postpotencial temprano medida desde el cero (E_a) parece depender del potencial de reposo mientras que ello no acontece si se mide desde el reposo (V_a) por lo que podemos pensar que ambos fenómenos son diferentes e independientes. Ello pudiese ser cierto, si reconsideramos que E_a realmente lo que nos esta midiendo es la amplitud de la repolarización a la que llegó el potencial de membrana a los 10 msec. de el inicio del potencial de acción, que es el tiempo en que frecuentemente se notó la transición de

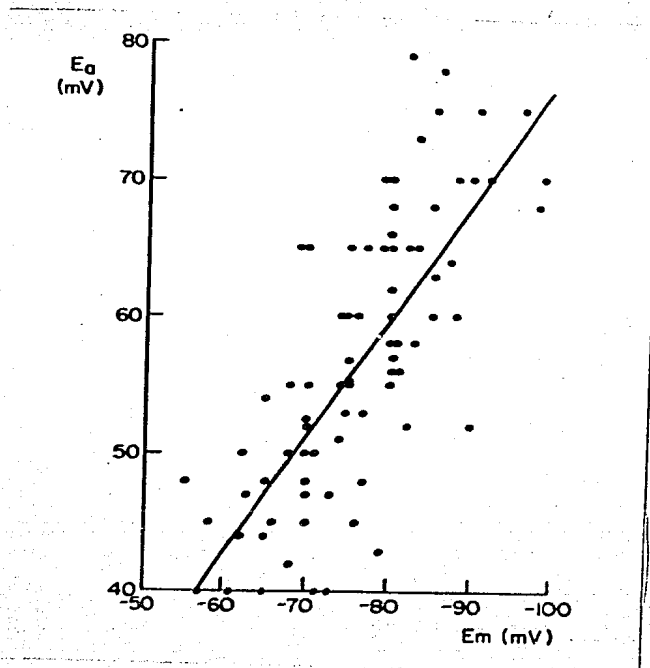


FIGURA 10. Magnitud del postpotencial temprano medido desde cero (E_a) respecto al potencial de reposo (E_m). Se muestra la mejor recta de ajuste ($r=0.75$) para 75 registros.

Repolarización rápida, que se debe a canales de potasio rectificadores tardíos (Adrian et.al 1970), a lenta.

Dicho en otra forma, se observó una dependencia en la repolarización rápida respecto al potencial de membrana y se sabe que esta repolarización se debe al rectificador tardío (Adrian et.al., 1970) de tal manera que podríamos pensar que este canal esta siendo afectado por el voltaje. Esto es cierto, ya que Adrian et.al (1970) encontraron, por la técnica de doble pulso, que la corriente retardada se inactiva con el voltaje del prepulso, de tal manera que lo que se está observando es el fenómeno de la inactivación de este canal con el voltaje de membrana, alterando así el tamaño de la repolarización rápida.

Comparando los valores de potencial de reposo (E_m), amplitud del potencial de acción (V_s), sobretiro (St), amplitud del postpotencial temprano a los 10 mseg. del inicio del potencial de acción medido desde el cero (E_a) y la amplitud del postpotencial temprano medido desde el reposo (V_a), así como el tiempo al potencial de reposo, con los presentados para Ringer con calcio se observa que estos y aquellos se encuentran dentro de una desviación estándar de ambos, por lo que las diferencias entre ambos tipos de registros para el postpotencial temprano no se consideran significativas, siendo las diferencias debidas a la propia variabilidad de las fibras y, muy importantemente, a la metodología empleada (vease adelante).

Por su parte, los experimentos de reversibilidad de los efectos de magnesio se puede observar que los valores promedio de potencial de reposo, tamaño de la espiga así como el sobretiro

difieren de manera importante de aquellos obtenidos en Ringer normal y en magnesio, siendo las posibles causas las siguientes.

a) El potencial de membrana decae con el tiempo, ello debido a que los compuestos de alta energía cuya hidrólisis permite el mantenimiento del potencial de reposo se agotan, y como a las células estos no se les proporciona, los procesos involucrados (bombas) se detienen.

b) Se ha mencionado que para todos y cada uno de estos registros se sometieron a los músculos a soluciones hipertónicas y cada vez que se aplicaba una nueva se retiraba esta sustituyéndose por otra con tonicidad igual a la normal y después de un tiempo de equilibración se reaplicaba la hipertonicidad para así registrar. Se hace evidente que las fibras sufrieron cambios osmóticos importantes que pueden retribuir en daño de las mismas, así como en cambios en la concentración iónica interna de las mismas, alterando así el potencial de reposo. Ello se hace patente en el número de experimentos exitosos (donde se pudo hacer la aplicación de las tres soluciones) ya que fueron muy reducidos (menos de 10 registros) porque en muchos al reaplicar la solución hipertónica normal el potencial de reposo obtenido era inadecuado (menos de 75 mV.) para la consecución del experimento.

c) Por otra parte, el tamaño de la espiga se encontró que depende también del potencial de reposo (vease adelante) explicando así este fenómeno.

Considerando exclusivamente al tamaño de la repolarización rápida (E_a) así como el tamaño del postpotencial temprano (V_a) se puede observar, como se hizo anteriormente para el Ringer

magnesio, que sus magnitudes caen dentro de una desviación estandard de las observadas en los registros control y de magnesio por lo que las diferencias observadas están dentro de la misma variabilidad del sistema.

Respecto a la constante de decaimiento del postpotencial temprano se puede observar que no difiere mucho respecto a aquella de Ringer normal, 35.91 mseg. y 39.93 mseg. respectivamente, siendo la diferencia debida, muy probablemente, a la propia variación de las fibras y al número tan reducido de datos.

El postpotencial tardío.

Kirsch et.al (1977) encontraron que la despolarización ~~máxima~~ del postpotencial tardío para Rana temporaria bajo soluciones hipertónicas hechas con 350 mM de sacarosa es de 6.1 2.8 mV; por su parte Freygang et.al (1964b) reportan que en R. pipiens bajo soluciones isotónicas esta despolarización es de 12.7 \pm 0.9 mV mientras que en soluciones hipertónicas con 232 mM de Sacarosa encontraron 10.0 \pm 0.5 mV y que el efecto era reversible (tras más de media hora de equilibración), ya que al reaplicar solución isotónica su valor era de 11.9 \pm 1.1 mV. Comparando exclusivamente los valores reportados por Freygang et.al (1964b) bajo soluciones hipertónicas, por ser la misma especie, respecto a los hasta aquí mencionados (14.21 \pm 7.82 mV.) se puede observar que son muy similares.

Respecto a la gran variabilidad obtenida en el promedio de la constante de decaimiento en Re-calcio se puede atribuir al efecto de las soluciones hipertónicas sobre las fibras después de

los tres cambios de tonicidad como se mencionó anteriormente.

Kirsch et.al (1977) mostraron que el curso temporal del postpotencial tardío es afectado importantemente por el tamaño de la fibra, de tal manera que el comparar las constantes de decaimiento se hace difícil por lo que utilizaron, al igual que Freygang et.al (1964a) el tiempo a la mitad de la repolarización lenta como un estimador de este fenómeno y encontraron que en soluciones hipertónicas este es de 1.2 ± 1.1 seg. para tres fibras de Rana temporaria, mientras que en el presente se encontro ser de 1.63 ± 0.678 seg. para 19 registros en R. pipiens. Por su parte Freygang et.al (1964a) encontraron que este tiempo es de 0.294 ± 0.23 seg. para R. pipiens. La razón de tan importante discrepancia entre los valores de Kirsch et.al (1977) y los presentes respecto a los de Freygang et.al. (1964a) se pueden atribuir a que este último no utilizó soluciones hipertónicas en sus registros. Kirsch et.al, en el mismo trabajo anterior, reportan que el tiempo medio de repolarización del LAP en soluciones no hipertónicas fue de 0.7 ± 0.3 seg. que se encuentra dentro de los valores observados por Freygang et.al. (1964a). Esto es cierto ya que Freygang et.al (1964b) describieron que en estas soluciones la caída del postpotencial tardío se prolonga aproximadamente cinco veces respecto al normal atribuyendose a que en ellas se altera la relación volumen de la fibra - sistema tubular porque se reduce el radio de la fibra y se dilata a este último (Freygang et.al 1964b, Freygang et.al 1967, L. D. Peachey comentario personal).

Comparando las tablas II, IV y V entre si se puede

observar que los tiempos medios de repolarización y la duración del postpotencial tardío son muy similares por lo que las defierencias no se consideran significativas.

Se puede observar que la amplitud del postpotencial tardío difiere en ringer magnesio respecto al testigo aunque esta dentro de la misma variación de este último. Sin embargo, pareciera que si hubo efecto si se compara el error estandard [14.2 1.79 mV para el testigo, 9.79 0.81 mV para con magnesio y 16.18 3.48 mV para la reaplicacion de calcio] pero se tiene mucha variación como para asegurar cualquier cosa (vease mas adelante).

Hasta aqui podemos concluir que el presente protocolo de la sustitución de calcio, como principal divalente extracelular, por ~~magnesio~~ parece no tener efecto sobre el postpotencial tardío. Si lo tiene es difícil establecerlo debido a la gran variación que se observa.

EXPERIMENTOS EN FASCICULOS AISLADOS.

Como se ha podido observar, la sustitución de Ringer normal por uno en el que se sustituye el calcio por magnesio no parece afectar al postpotencial tardío. Una de las posibles causas es que no exista un buen recambio del ion calcio por magnesio debido a la existencia de zonas de difusión restringida en el músculo entero, como es el caso de los intersticios celulares. El postpotencial tardío depende del radio celular, ya que ello determina la magnitud del sistema tubular transversal (Freygang et.al. 1967) y a su vez este determina las propiedades del postpotencial tardío (Freygang et.al. 1964b), de tal manera que si el efecto es muy pequeño se puede perder dentro de la propia variabilidad aportada por el método de registro (vease más adelante). Una manera de favorecer la observación de posibles efectos es registrar a la misma fibra en las distintas soluciones. Con ello se logra mantener como constante el radio celular. Para ello se procedió a hacer experimentos donde el recambio de soluciones fuese muy rápido, el volumen de solución fuese extremadamente grande respecto al de las fibras y además donde el número de estas fuese muy reducido para que con esto último se pudiese hacer el registro sobre la misma fibra. Todo esto es posible mediante el empleo de fascículos aislados que consiste en separar un número reducido de fibras mediante microdissección. Este tipo de experimento se encontró ser en extremo difícil ya que las fibras de R. pipiens son muy delgadas por lo que se pueden dañar fácilmente durante la microdissección. Además, en la época del año en que se realizaron estos

experimentos, octubre 1985 a febrero 1986, los organismos presentan una gran cantidad de tejido conjuntivo entre fibras lo cual se ha atribuido a la estación del año, invierno (J. Arreola, comentario personal), por lo que la microdissección se hace más difícil. Pese a lo anterior, se logró la obtención de unos pocos registros realizados sobre fascículos que presentaban un "buen aspecto visual" después de, cuando menos, 30 minutos de equilibración, los cuales, además debían presentar contracción al ser estimulados eléctricamente.

Los potenciales de acción observados así como los postpotenciales temprano fueron similares a los ya descritos para el músculo intacto en cualquiera de las soluciones empleadas, por lo que no nos detendremos en ellos.

En la tabla VI se resumen los registros del postpotencial tardío.

Si comparamos los datos de esta última tabla con aquellos de las tablas II, IV y V se hace patente que los de la VI son demasiado diversos, tanto como los de esas tablas; de tal manera que hasta aquí no podemos asegurar si el postpotencial tardío depende de canales de potasio activados por calcio.

TABLA VI. Variación de los distintos parámetros del postpotencial tardío en las diferentes soluciones hipertónicas para fascículos aislados.

ION	Fibra	Em [mV]	Amplitud [mV]	Tau [mseg]	r
Calcio	1	83.3	10.85	3.84	1.00
Magnesio	1	78.0	2.79	10.37	0.98
Magnesio	2	79.4	8.40	3.34	0.98
Magnesio	3	79.7	6.17	3.83	1.00
Calcio	1	84.3	11.01	7.54	1.00
Calcio	2	79.5	11.06	2.88	1.00
Calcio	3	78.5	11.80	3.26	1.00
Calcio	4	79.5	9.09	8.18	0.99
Calcio	5	77.6	5.86	3.1	0.98
Calcio	6	78.6	8.3	2.92	0.98
<hr/>					
	Total.		Promedios		
			s.d.		
Calcio	5	85.5 ±9.3	3.8 ±2.2	3.70 ±1.1	0.91
Magnesio	3	79.0 ±0.9	5.79 ±2.82	5.85 ±3.92	0.99 ±0.01
Calcio	6	79.6 ±2.4	9.52 ±2.23	4.65 ±2.5	0.99 ±0.01

Donde: Em = potencial de reposo.
 Amplitud = Amplitud máxima del postpotencial tardío.
 Tau = constante de caída del fenómeno.
 r = coeficiente de correlación.

DISCUSION.

Comparando los valores de Tau, Tt y T 1/2 para cada tipo de experimento se observa que todos estan dentro de la variación de unos y otros por lo que las diferencias se pueden considerar como no significativas, y si no se consideran asi no podemos asegurar efecto alguno.

Se puede concluir hasta aqui que con la metodología empleada, la substitución de una solución de Ringer que contenga al ion calcio por magnesio, no tiene efecto alguno sobre el postpotencial temprano mientras que para el tardío es dudoso; pudiendo ser explicado por lo siguiente.

- El que no existan canales de potasio activados por el incremento en la concentración del ion calcio en el sistema tubular de la rana.

- La metodología empleada no es la adecuada para observar el efecto del tratamiento sobre el postpotencial tardío (vease más adelante).

- Que la fuente principal de ion calcio para la activación del canal de potasio activado por calcio no sea el exterior celular sino el interior.

La vía de entrada más rápida de ion calcio extracelular al interior de la fibra por la cual se pueda cambiar de manera importante su concentración interna, es el canal lento de calcio, el cual, como ya se mencionó, se encuentra en el interior del sistema tubular Transverso. Este canal aporta una corriente importante de calcio despues de varios cientos de milisegundos bajo despolarización constante por lo que en la duración de un potencial de acción la entrada de este catión divalente por esta

vía es muy pequeña (Sanchez J., 1979); de tal manera que los cambios importantes en la concentración interna del ion calcio se deben atribuir a alguna otra fuente, la cual se sabe es el retículo sarcoplásmico al través de la cisterna terminal, cuya participación es importante para los fenómenos de activación contráctil. Esto es importante debido a que la cisterna terminal se encuentra muy cerca de la pared interna del sistema tubular transverso constituyendo la denominada TRIADA. De tal manera que si existe el canal de potasio activado por el incremento en la concentración de ion calcio intracelular en el sistema tubular de la Rana, el lado sensible del mismo, el interno, se encuentra viendo a una fuente infinita de calcio.

Para terminar con esta parte, diremos que la participación de la corriente de calcio del canal rápido de calcio descrito recientemente por Cota y Stefani (1986), suponiendo que esta en el sistema T, muy probablemente sea pequeña en las actuales condiciones ya que ellos mismos mencionan que la corriente transportada por este canal desaparece dentro de los primeros 15 minutos de encontrarse la fibra cortada en soluciones hipertónicas. Ahora, si este canal no desaparece bajo las presentes condiciones de hipertonicidad por desarrollarse en condiciones un poco más fisiológicas (fibra entera) y si este canal aporta una corriente de calcio durante un potencial de acción, dado que su curso temporal es rápido, lo anteriormente dicho se mantiene debido a que la sustitución de calcio por magnesio como principal divalente externo abole casi por completo la corriente de este canal (Arreola et.al., en prensa).

Por otra parte, mediante el empleo de técnicas ópticas se ha encontrado que el incremento en la concentración de calcio interno durante pulsos de estimulación bajo fijación del voltaje no se puede atribuir a las corrientes iónicas transportadas ni por el canal rápido ni por el lento de calcio por lo que la fuente debiese ser otra (E. Stefani, comentario personal).

De tal manera que no podemos asegurar de manera definitiva que el postpotencial tardío dependa del ion calcio extracelular para su desarrollo, debido a la gran variabilidad hasta ahora observada.

En la siguiente sección se discute un importante factor que altera los registros hasta aquí obtenidos.

EFFECTO DE LAS SOLUCIONES HIPERTONICAS.

Hasta el momento se han descrito experimentos realizados con electrodos rígidos por lo que para poder realizar el registro fue necesario el evitar la contracción muscular, lo cual se logró por el empleo de soluciones hipertónicas que se obtuvieron por añadir Sacarosa 350 mM. a la solución de Ringer que bañaba a los músculos.

Hodgkin y Horowicz (1957) mencionaron que el empleo de tales soluciones no afecta las propiedades eléctricas de la membrana e incluso que sus efectos son reversibles. Sin embargo, en el presente trabajo se observó que estas soluciones primeramente hiperpolarizan a las células, lo cual se puede atribuir a la deshidratación que sufren al ser bañadas en ellas por lo que la concentración interna de potasio se incrementa hasta 218 mM (Freygang et.al., 1964b., L.D. Peachey, comentario personal); mientras que despolarizan a las células con el transcurso del tiempo, siendo de manera irreversible después de 20 minutos, por lo que registros en tiempos mayores se hace imposible. Este tipo de hallazgo no es único ya que Gordon y Godt (1970) encontraron, en soluciones similares a las empleadas aquí, despolarizaciones de hasta 20 mV.

La importancia de este fenómeno no es despreciable ya que muchos canales iónicos son regulados por el voltaje de membrana (a nuestro interés, el canal de potasio dependiente de calcio). Lo cual fue hecho patente anteriormente respecto a la repolarización rápida del potencial de acción; solo para manifestar un poco más esto se presenta la figura 11 donde se

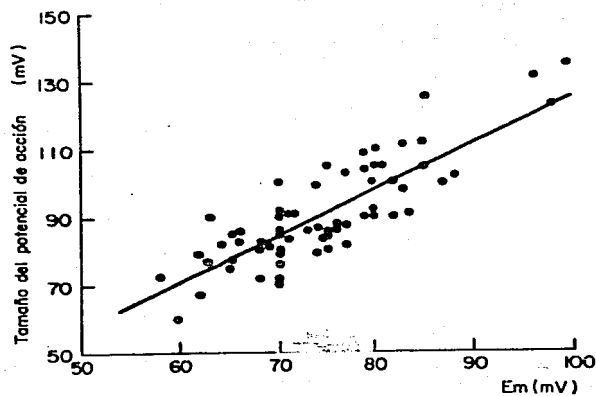


FIGURA 11. Efecto del potencial de membrana (E_m) sobre la magnitud del potencial de acción. Se ilustra la mejor recta de ajuste ($r=0.83$) para 80 registros.

ilustra la dependencia del tamaño del Potencial de Acción en Ringer normal hipertónico respecto al voltaje. Como se puede observar, existe una dependencia entre la amplitud de este fenómeno y el potencial de membrana, representada por una recta descrita por:

$$\text{Tamaño de la espiga} = 1.38 E_m - 12.31 \quad (n=80)$$

donde E_m es el potencial de reposo, con un coeficiente de ajuste de 0.83. La dependencia se puede explicar por fenómenos de inactivación dependientes del voltaje de los canales de Sodio los cuales son responsables de la fase de despolarización rápida del Potencial de Acción (Armstrong C.M. and Bezanilla F., 1977; Bezanilla F., and Armstrong C.M., 1977)

Otra posible explicación puede darse si consideramos cambios en la fuerza impulsora para el ion sodio, es decir, la magnitud de la corriente maxima se este ion puede representarse como

$$I_{Na} = g_{Na} (E_m - E_{Na})$$

donde I_{Na} es la magnitud de la corriente de sodio.

g_{Na} es la conductancia máxima de este ion.

E_m es el potencial de reposo.

E_{Na} es el potencial de equilibrio electroquímico del sodio.

Este potencial de equilibrio se puede calcular por

$$E_{Na} = \frac{RT}{zF} (\ln [Na]_o/[Na]_i)$$

Sin embargo, el intentar conocer este potencial no es sencillo ya que Adrian et al (1970a) encontraron que las

soluciones hipertónicas incrementan la concentración de sodio intracelular, producto de su fuerza osmótica (L.D. Peachey, comentario personal), produciendo así una disminución en la corriente saliente de sodio (Adrian et al, 1977a).

No se encontró dependencia entre el tamaño del Sobretiro respecto al potencial de reposo ($r = 0.30$) en 78 registros.

Un ejemplo impresionante del efecto de las Soluciones Hipertónicas sobre canales Iónicos fue presentado recientemente por Cota y Stefani (1986) quienes encontraron que conforme el tiempo transcurre en tales soluciones la corriente transportada por el canal Rápido de calcio decrece continuamente, atribuyéndose a cambios en la geometría de las fibras (Cota & Stefani, 1986).

Por otra parte, si se acepta que la constante de repolarización del postpotencial temprano, para tiempos mayores a 15 milisegundos, es reflejo de la constante de tiempo de la membrana en reposo (Anders Persson, 1963) se tiene que en el presente trabajo tal constante es distinta, tanto para el ya citado autor como para el trabajo de Frank (1957). Anteriormente se discutió que tal cambio en esta constante se puede atribuir a cambios en la capacidad del sistema tubular transverso así como en la resistencia de membrana. Lo primero fue demostrado por Freygang et.al (1967) quienes además de encontrar las diferencias eléctricas, bajo estudios con microscopía electrónica observaron, al igual que en su trabajo anterior (1964b), que en soluciones hipertónicas con sacarosa la fracción de área transversal de la fibra a nivel de la línea Z ocupada por el sistema T se incrementa de 0.3 en Ringer Normal a 0.4. en soluciones

hipertónicas. Al mismo tiempo, el diámetro de la fibra se reduce 0.8 veces respecto al Normal, por lo que el área del sistema T en el plano transversal se altera por un factor de 0.85. Por otra parte Freygang et.al (1964b) encontraron que las dimensiones longitudinales del sistema T se incrementan por un factor de 3.8 en tales soluciones por lo que si se supone que el perímetro de la fibra decrece por el mismo factor como el diámetro de la fibra, es decir 0.8, en solución de Ringer hipertónico con Sacarosa se puede estimar que el área orientada longitudinalmente del sistema T cambia por un factor de 3.0 que representa, a fin de cuentas, un incremento en el área del sistema tubular transversal de orden del 30% (Freygang et.al., 1967).

Por otra parte, se ha encontrado que el uso de este tipo de soluciones repercute en cambios importantes en la fisiología de la fibra, como son: movimiento de calcio, acople excitación-contracción, interrelación de las proteínas contráctiles y metabolismo del músculo en general; de tal manera que el estudiar un solo parámetro en la contracción muscular, (y como hemos visto, también en las propiedades eléctricas de la membrana) debe ser cuidadosamente sopesado contra sus efectos ubicuos (Homsher E., et.al. 1974).

Estos cambios en el radio de las fibras y en el área del sistema tubular no son despreciables en el presente trabajo ya que Freygang et.al (1964a y b) y Kirsch et.al (1977) demostraron que el postpotencial tardío es dependiente del radio de la fibra y por consiguiente del tamaño del sistema tubular transversal ya

que es en este último donde se acumula el ion potasio, que es la causa de este fenómeno.

De tal manera que debido a los cambios tan importantes que provoca el uso de soluciones hipertónicas sobre la fibra muscular se decidió no continuar haciendo experimentos bajo tales condiciones optandose por el empleo de la técnica de Electrodo Flotantes utilizandose aquella descrita por Colomo y Rochi (1965).

RESULTADOS CON ELECTRODOS FLOTANTES.

El postpotencial temprano.

En la figura 12 se presenta un típico potencial de acción registrado con electrodos flotantes en solución de Ringer normal isotónico a temperatura ambiente (18 - 22 grados centígrados). Como se puede observar, es similar al registrado con electrodos rígidos bajo soluciones hipertónicas. En la tabla VII se encuentran resumidos los parametros evaluados para veinte fibras en solución normal isotónica.

La constante de repolarización (Tau) promedio, calculada como se hizo para los registros similares de soluciones hipertónicas, fue de 26.7 ± 61.05 mseg, con coeficientes de ajuste promedio de 0.96. Ahora, si no se consideran los primeros 20 milisegundos de registro se tiene que el promedio es 20.45 ± 35.82 mseg. con coeficientes de ajuste promedio de 0.98.

Se puede observar que estas constantes son casi la mitad de aquellas obtenidas en soluciones hipertónicas y son similares a las descritas por G.B. Frank (1957) para Rana pipiens bajo similares condiciones [13.5 ± 0.9 mseg]. Así mismo son muy parecidas a las reportadas por A. Persson (1963) para R. temporaria bajo soluciones hipertónicas [19.8 ± 6.1 mseg].

Como en el caso de los registros con soluciones hipertónicas, se observaron tres tipos de postpotenciales los cuales se pueden diferenciar por la presencia, en los primeros milisegundos, de una joroba, una meseta o bien la ausencia de estos dos donde el regreso al potencial de reposo se hace de

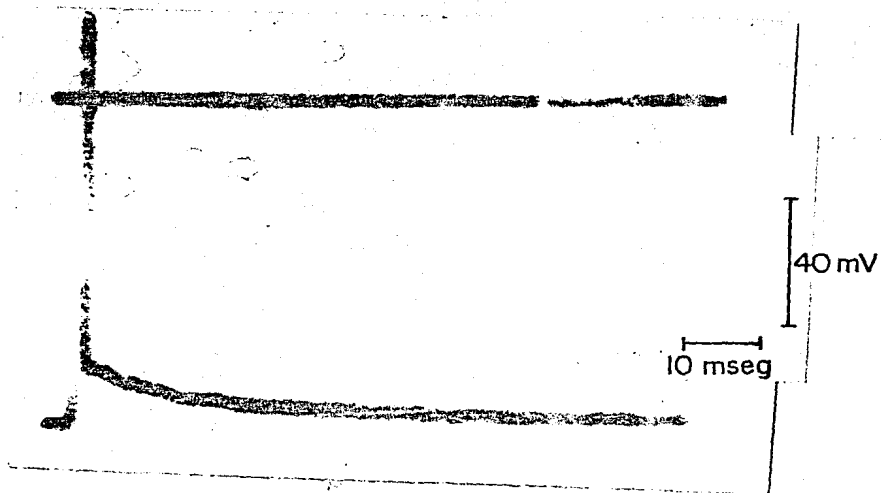


FIGURA 12. Típico potencial de acción registrado en solución normal isotónica para una fibra cuyo potencial de reposo fue de 85.2 mV.

TABLA VII. Variación de los distintos parámetros evaluados del potencial de acción muscular en solución normal isotónica.

Fibra	Em mV	Tam mV	St mV	Ea mV	Va mV	Tr mseg	J
1	82	115	33	64	15	100	N
2	95	102	27	65	16	90	N
3	95	112	17	72	10	70	P
4	86	112	26	72	12	70	P
5	86	110	24	71	11	100	P
6	80	105	25	63	14	90	N
7	90	122	32	70	20	--	N
8	75	101	26	60	15	80	N
9	85	100	15	68	10	50	P
10	90	118	28	72	11	100	N
11	90	106	16	70	16	70	N
<hr/>							
Total	20						
promedios	84	109	26	66	15	78	
f	f 6	f 7	f 6	f 6	f 5	f 24	

donde: Em es el potencial de reposo; Tam es la amplitud del potencial de acción; St el sobretiro; Ea amplitud del postpotencial temprano evaluado desde el cero; Va lo mismo pero desde el reposo; Tr corresponde al tiempo en regresar al potencial de reposo; J es si el registro presenta joroba, meseta o ninguno de los dos.

manera suave. En los presentes, se encontró que la frecuencia de los primeros fue de 11.76%, los segundos 47.06% mientras que los últimos se observaron con 41.17%. Diremos aquí que estas proporciones no se mantuvieron de manera uniforme a todo lo largo de los experimentos que se describen a continuación tanto en los registros testigo como en los experimentales, por lo que no nos detendremos más en esto, solo puntualizaremos lo que ya se dijo, la forma del postpotencial temprano depende, cuando menos en los primeros 15 milisegundos, de la depolarización de membrana acaecida por las corrientes iónicas que suceden en el sistema tubular transverso al despolarizarse este de manera retardada respecto al potencial de acción del sarcolema, siendo más evidente esta participación a mayor sea el radio de la fibra y muy importantemente a la proporción de áreas del Sarcolema - Membrana del sistema tubular (Adrian & Peachey, 1973). Mientras que a tiempos mayores la repolarización obedece a la recarga capacitiva del sistema tubular transverso por lo que sigue la constante de tiempo de este (G.B. Frank, 1957. A. Persson, 1963. Adrian et.al., 1970a).

Respecto al resto de los parámetros considerados, V_a , E_a , Sobretiro, Amplitud del potencial de acción y tiempo al potencial de reposo se puede observar que son muy similares a los obtenidos en soluciones hipertónicas salvo que la dispersión de los datos es importantemente reducida.

Comparando la amplitud del postpotencial temprano medido desde el reposo (V_a) con aquellos de A. Persson (20.9 ± 3.8

mV) se puede observar que son similares y lo mismo para los de G.B. Frank (19 ± 1.3 mV).

El postpotencial tardío.

En la figura 13 se presenta una serie de registros donde se observa el incremento en la amplitud del postpotencial tardío al incrementarse el número de estímulos, así como la repolarización lenta que acontece al finalizar la estimulación. En el recuadro se ha puesto los potenciales de acción que produjeron el postpotencial tardío de 15 estímulos.

En el recuadro de esta figura se observa que conforme se van dando los estímulos, a una frecuencia de 100 Htz., la amplitud de cada uno de los potenciales de acción consecutivos decrece. Esto se observó independientemente del número de estímulos aplicados y de manera consistente en todos los registros tanto testigos como experimentales. El decremento fue variable para cada una de las distintas fibras, donde además, el comportamiento de una fibra fue perfectamente reproducible por lo que es factible descartar daño a la célula. Esto mismo se observa en los Registros de Freygang et.al (1964a,b) y de Kirsch et.al. (1977) más no proponen ninguna explicación al respecto, sin embargo podemos aventurar lo siguiente.

a) Depleción de sodio próximo a la boca de los canales, por lo que el potencial de equilibrio para este ion se ve corrido a valores menos positivos dando por resultado que la magnitud de la despolarización sea menor por lo que la altura de la espiga también es menor. Este mismo fenómeno ha sido propuesto para canales de potasio de alta

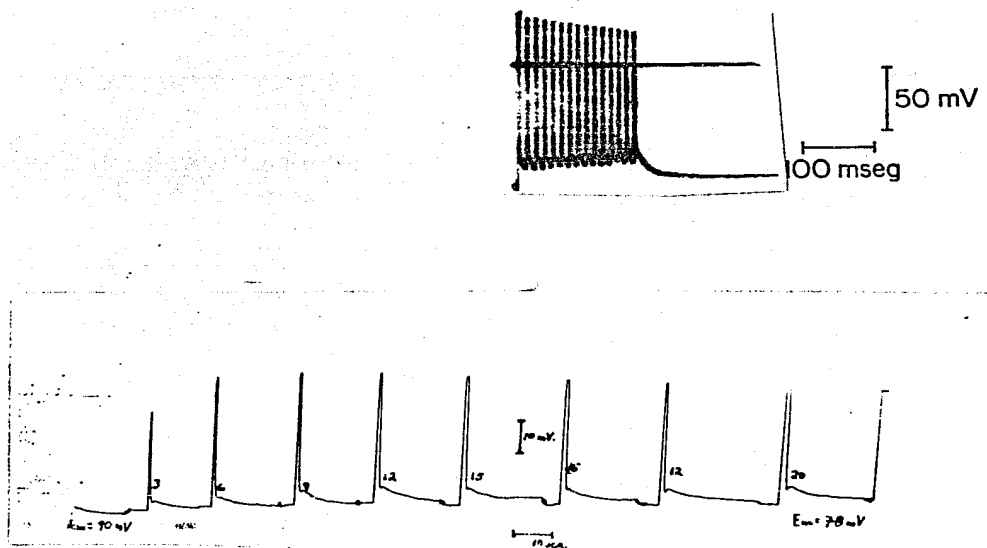


FIGURA 13. Incremento en la amplitud del postpotencial tardío a mayor número de estímulos (100 Hz.) en solución de ringier normal isotónico (no se observa toda la espiga). Em es el potencial de membrana que alcanza la célula despues de la estimulación. En el recuadro se muestra los 15 potenciales de acción que dieron lugar al registro correspondiente.

conductancia donde la corriente iónica, al activarse el canal, es tan alta que la concentración de ion potasio en las inmediaciones del canal disminuye debido a que la cantidad del ion que se restituye por simple difusión de las proximidades es menor que la cantidad de ion movida a su través (Latorre R., & Miller Ch., 1983). Esto mismo se ha dicho que acontece en el canal lento de calcio del sistema tubular transverso de la rana, donde al aplicarse pulsos depolarizantes de larga duración la cantidad de calcio existente en los túbulos se depleta debido a que estos canales poseen una alta corriente y se encuentran en un lugar de difusión restringida (Almers et.al., 1981b).

b) Se ilustro anteriormente (Figura 11) que la magnitud del potencial de acción depende del potencial de membrana y se atribuyó a que los canales de sodio, que producen la fase de subida del potencial de acción, se están viendo inactivados por el voltaje (Bezanilla F., & Armstrong C.M., 1977; Armstrong C. M. & Bezanilla F., 1977). Es posible suponer que esto mismo está sucediendo en el fenómeno que nos interesa ahora ya que los potenciales de acción se están produciendo a la mitad del postpotencial temprano del anterior, por lo que "en promedio" los canales están sujetos a un voltaje de membrana menor al de reposo. Esta idea se hace más factible si se piensa que la recuperación de la inactivación de los canales de sodio por el voltaje depende también del tiempo en que se permanezca en el potencial de reposo (Bezanilla F., & Armstrong C.M., 1977; Armstrong C. M. & Bezanilla F., 1977) dando por resultado que los

fenómenos de inactivación se hagan más evidentes al incrementarse el número de estímulos.

De la figura 13 se hace evidente que conforme se desarrollaba el registro el potencial de reposo va disminuyendo entre los periodos de estimulación. Es decir, no se alcanza el valor de potencial de reposo incluso después de cinco minutos entre estímulos. La razón de esto se atribuye a que el movimiento de las fibras provoca un aumento de la separación entre las paredes externas del microelectrodo y la membrana celular dando lugar a una pequeña corriente que elimina parte del potencial de reposo.

En la tabla VIII se muestra el promedio de las mejores constantes de decaimiento exponencial para el número de registros de la magnitud obtenida bajo un cierto número de estímulos, así como el tiempo a la mitad del registro y la amplitud.

Se puede relacionar la amplitud del postpotencial tardío con respecto al número de pulsos aplicados por una función potencial de forma

$$A = A_m (1 - \exp(-p/\tau))^2$$

donde "A" es la amplitud del postpotencial tardío; A_m es el valor máximo de la amplitud del postpotencial tardío; p es el número de estímulos aplicados y τ es una constante que determina la tasa de subida de la gráfica.

En la figura 14 se presenta una gráfica del cambio en la amplitud del postpotencial tardío respecto al incremento en el número de estímulos. Se representa el promedio más menos un error estándar. La cifra a la izquierda de cada uno de los promedios

TABLA VIII. RESULTADOS DEL POSTPOTENCIAL TARDIO
REGISTRADO CON ELECTRODOS FLOTANTES.
SOLUCION DE RINGER NORMAL

Pulsos	No	Em [mV]	Tl/2 [seg]	Tau [seg]	Amplitud [mV]
1	7	82.8 ± 9.2	0.4 ± 0.2	0.52 ± 0.68	1.43 ± 1.2
2	3	82.0 ± 9.4	0.5 ± 0.2	0.52 ± 0.94	2.08 ± 0.4
3	6	80.1 ± 8.3	0.5 ± 0.4	0.57 ± 1.1	2.87 ± 1.1
6	8	82.1 ± 8.6	0.4 ± 0.3	0.62 ± 1.01	4.19 ± 1.1
9	9	80.1 ± 9.7	0.7 ± 0.4	1.07 ± 0.34	5.11 ± 2.2
12	4	81.5 ± 8.7	0.7 ± 0.2	1.01 ± 3.03	6.00 ± 1.4
15	9	82.4 ± 6.6	0.6 ± 0.2	0.96 ± 2.08	6.81 ± 2.7
20	2	77.6 ± 3.3	0.9 ± 0.2	1.15 ± 7.56	5.50 ± 2.1

Donde:

Pulsos = Número de estímulos aplicados.

No = Número de registros considerados.

Em = Potencial de reposo promedio ± s.d.

Tl/2 = Tiempo promedio a la mitad del registro.

Tau = Promedio de las mejores constantes de decaimiento.

Amplitud = Promedio de amplitud del postpotencial tardío.

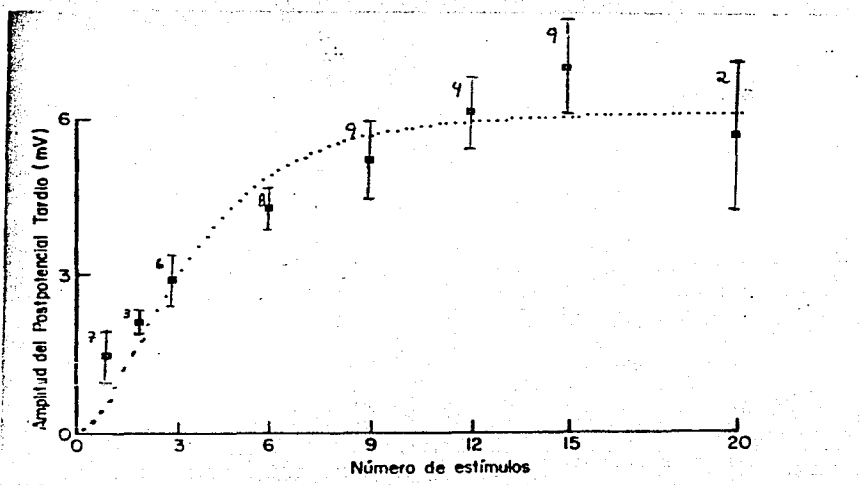


FIGURA 14. Incremento de la amplitud del postpotencial tardío respecto al número de estímulos aplicados en solución normal isotónica. Se muestra el promedio más, menos un error estándar del número de registros indicado a la izquierda de cada punto. La curva representa la mejor potencial que ajusta a los datos presentados. Para detalles vease el texto.

es el número de fibras tomadas en consideración. La línea punteada representa el mejor ajuste de la función ya mencionada que describe el comportamiento de los datos calculado por un procedimiento no lineal (D. Colquhoun, 1971) donde A_m es 5.90 y τ es 2.56, con una bondad de ajuste de 0.022, donde 0.00 sería el perfecto.

Freygang et.al. (1964a) encontraron que la amplitud del postpotencial tardío para Rana pipiens, a 22 grados centígrados, en soluciones isotónicas, se incrementa un milivoltio por estímulo aplicado dentro de los primeros ocho, siendo menor este a un mayor número de pulsos. Por otra parte en el trabajo de este mismo autor de 1964b encontraron que la amplitud alcanzada con nueve o diez estímulos es 12.7 ± 0.9 mV. Estos valores difieren importantemente de los encontrados en el presente trabajo ya que con nueve estímulos se observaron amplitudes de postpotenciales de 5.11 ± 2.15 mV. que es poco menos de la mitad de los descritos por estos autores. La razón de estas diferencias puede ser el radio de las fibras en que se registro, siendo para el presente trabajo mucho más pequeño que aquel de los citados autores. Estas diferencias son importantes ya que los citados autores usaron el tiempo de caída de 6 a 3 mV. medido desde el reposo, como un estimador de este fenómeno y como se puede observar tal procedimiento en los registros aquí encontrados es difícil.

Freygang et.al. en los trabajos ya citados ilustran que la caída del postpotencial tardío obedece a una función exponencial dentro del intervalo ya mencionado. En el presente

trabajo se encontró similar relación para registros obtenidos con quince estímulos desde la amplitud máxima hasta el reposo.

EXPERIMENTOS CON APAMIN.

Uno de los grandes avances para el estudio de los canales iónicos ha sido el descubrimiento de toxinas capaces de bloquearlos de manera altamente selectiva. Tal es el caso de la TTX que bloquea al canal de sodio sin afectar de forma alguna a cualquier otro, permitiendo así su disección farmacológica por lo que es posible estudiar a otros al eliminar su participación eléctrica en los fenómenos de membrana, como es el caso de los de potasio.

Para los canales de potasio activados por el incremento en la concentración de calcio interno, se han descrito también bloqueadores. Para el de baja conductancia se ha descrito al Apamin, polipéptido de 18 segmentos con dos enlaces disulfuro extraída del veneno de la abeja considerándosele como la principal neurotoxina de este veneno. Única toxina proteica conocida capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

Banks y colaboradores (1979) fueron los primeros en demostrar que esta toxina bloquea selectivamente el incremento en la permeabilidad al potasio mediada por el incremento en la concentración del ion calcio interna en Hepatocitos. En todas las pruebas la unión de Apamin a sus receptores fue de alta afinidad ($10 - 30 \text{ pM}$) ($K_d = 1.6 - 2.2 \cdot 10^{-11} \text{ M}$) y muy baja disociación (tiempo medio de 58 min. a cero grados centígrados y pH de siete). La unión se favorece por la presencia de potasio ($10 \text{ uM} - 5 \text{ mM}$) por un factor de 1.8. El pH óptimo es de 9 y no se observa unión específica a pH de 5. Compuestos de Guanidino o compuestos guanidinados, amilorida y Verapamil actúan como

competidores siendo el más efectivo la Neurotensina, probablemente porque contiene una secuencia que mimetiza el arreglo espacial de las Argininas adyacentes en la molécula de Apamin. Esta molécula es muy estable e incluso cuando se eliminan los puentes disulfuro, bajo condiciones adecuadas, la molécula puede regresar a su estado nativo. De tal manera que ha sido posible la fabricación de isotoxinas. En general se supone que el Apamin es un bloqueador altamente selectivo para la proteína que media el incremento en la conductancia de potasio dependiente de la concentración de calcio interna insensible al bloqueo por el ion amonio cuaternario TEA. Este canal se encuentra en una amplia gama de tejidos proveyendo una conexión entre el metabolismo del ion calcio celular y la polarización de la membrana. Se supone en general que este canal tiene que ver con la modulación de la actividad repetitiva de neuronas marcapaso (Shipolini R.A., 1984).

En músculo esquelético en cultivo se han observado postpotenciales hiperpolarizantes posteriores al potencial de acción cuyo origen se debe a un incremento en la conductancia al ion potasio que se activa con el incremento en la concentración del ion calcio (Barret et al., 1981). Este incremento en conductancia se debe a dos tipos de canales de potasio activados por calcio. Uno, de baja conductancia (18 - 20 pS), bloqueado por Apamin 10 nM activado por bajas concentraciones de calcio e insensible a bloqueo por TEA. Un segundo componente bloqueado por TEA (20 mM) de alta conductancia (200 pS) insensible a apamin y activado por altas concentraciones del ion calcio (Romey &

Lazdunski, 1984). De tal manera que el potencial hiperpolarizante que resulta de la entrada de calcio a la célula en cultivo, producto del potencial de acción, se debe a dos canales distintos en farmacología y propiedades fisiológicas.

Para el músculo esquelético adulto de Rana se ha demostrado la existencia de receptores para el Apamin, ya que Cognard et al. (1984) encontraron que segmentos de fibra muscular sometidas a fijación de voltaje mostraban una depleción en la magnitud de la corriente lenta de potasio al administrar de 50 a 100 nM de esta toxina. Este decremento se hizo evidente al añadir Diaminopiridina, el cual tiene la propiedad de Bloquear al canal de rectificación retardada, quitando con ello la participación de la corriente de este canal sobre sus registros. Al añadir la toxina de la abeja encontraron un decremento en la magnitud de la corriente del orden de 20 %. De tal manera que parte de la corriente de potasio lenta pudiese ser mediada por el incremento en la concentración del ion calcio intracelular y de esta, parte pudiese ser debida a canales de potasio dependientes de calcio sensibles a apamin, quedando también la posibilidad que en esta preparación existan los dos componentes descritos por Romey & Lazdunski (1984).

En vías de probar la hipótesis sobre la posible participación de los canales de potasio dependientes del incremento en la concentración del ion calcio interno se hicieron experimentos, de mayo a junio de 1986, en los que se aplicó la neurotoxina apamin, a concentraciones de 100 nM, esperando con ello bloquear a los canales de potasio de baja conductancia por lo que se supondría así un decremento en la amplitud del

postpotencial tardío respecto al número de estímulos aplicados.

El postpotencial temprano.

En la figura 15 se ilustra un típico potencial de acción registrado con solución de Ringer normal isotónico, a la cual se añadió 100 nM de Apamin (Sigma), tras cinco minutos de equilibración. Las características evaluadas de catorce fibras en estas condiciones se presentan en la tabla IX.

Como se hace evidente (vease figura 12), el potencial de acción muscular así como el postpotencial temprano no se ven afectados por la aplicación de la toxina a 100 nM. Esto mismo es reportado por (Cognard et.al., 1984).

El postpotencial tardío.

En la figura 16 se muestra un registro del incremento en la amplitud del postpotencial tardío al incrementarse el número de estímulos para una fibra. cuyo potencial de reposo al iniciarse el registro fue de 88.5 mV.

En la figura 17 se ilustra el incremento (promedio *t.e.s.*) en la amplitud del postpotencial tardío al incrementarse el número de estímulos aplicados a una frecuencia de 100 Hz. El número a la izquierda de cada promedio corresponde al número de registros considerados. Haciendo el mismo tipo de análisis como aquel realizado en solución fisiológica normal isotónica, se encuentra que la función que mejor describe al incremento en la amplitud del postpotencial tardío respecto al número de estímulos aplicados es:

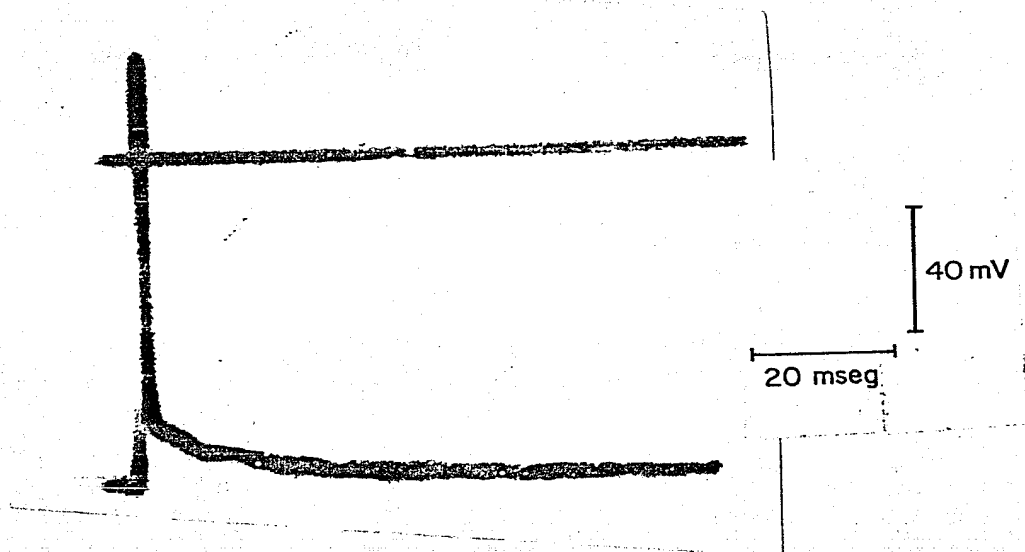


FIGURA 15. Típico potencial de acción registrado en solución de ringer isotónico con 100 nM de apamin para una fibra con 92.0 mV de potencial de reposo.

TABLA IX. Variación de los distintos parámetros evaluados del potencial de acción muscular en solución normal isotónica. con 100 nM de Apamin.

Fibra	Em mV	Tam mV	St mV	Ea mV	Va mV	Tr mseg	J
1	80	110	30	65	13	100	N
2	80	110	30	63	13	100	N
3	85	110	25	70	10	60	P
4	86	87	1	62	14	70	N
5	77	101	24	60	10	120	N
6	71	99	28	50	18	90	N
7	80	90	10	50	20	100	S
8	83	97	14	70	12	60	N
9	90	118	28	72	11	100	N
10	90	106	16	70	16	70	N
11	90	118	28	72	12	100	N
12	90	110	20	72	20	100	N
Total	14						
promedios:		84	104	20	64	15	76
s. d.		6	10	9	8	5	13

donde: Em es el potencial de reposo; Tam es la amplitud del potencial de acción; St el sobretiro; Ea amplitud del postpotencial temprano evaluado desde el cero; Va lo mismo pero desde el reposo; Tt corresponde al tiempo en regresar al potencial de reposo; J es si el registro presenta joroba, meseta o ninguno de los dos.

$$A = 6.062 (1 - \exp [-p/1.91])^2$$

la cual ha sido trazada de manera punteada en la misma figura.

En la tabla X se resumen los resultados promedio de las fibras que dieron lugar a la anterior figura, concernientes a potencial de reposo, tiempo a la mitad de repolarización, constante de decaimiento (Tau) y amplitud del postpotencial tardío.

Comparando la figura del incremento en la amplitud del postpotencial tardío respecto al número de estímulos en solución de Ringer normal (Figura 14) con su similar en solución con 100 nM de Apamin (Figura 17) se puede decir que ambas son muy similares y casi idénticas en lo que al valor máximo de la amplitud se refiere (5.9 y 6.06 respectivamente). En cuanto a las Tau, estas lo único que determinan es que tan rápido asciende la curva; los valores calculados (2.56 en normal y 1.91 en Apamin) así como el trazo respectivo (comparese figuras) son similares, por lo que estas diferencias se pueden atribuir a la propia variabilidad del sistema.

Respecto a las constantes de decaimiento del postpotencial tardío, considerando solo los registros de 15 y 20 estímulos (0.96 ± 2.08 y 1.15 ± 7.56 para el normal y 0.73 ± 1.44 y 1.14 para Apamin) se puede observar que son similares, y como la constante de decaimiento depende del volumen del sistema tubular, podemos decir que las diferencias no son importantes.

Lo mismo para el tiempo a la mitad de repolarización.

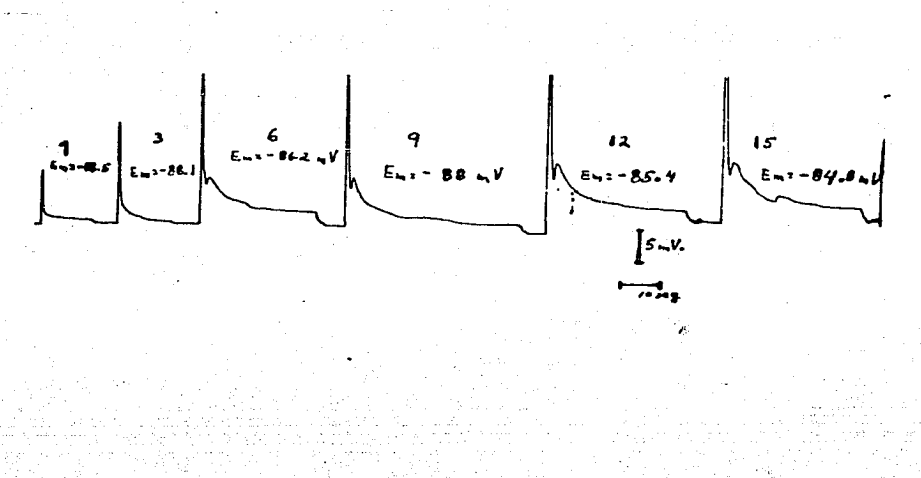


FIGURA 16. Incremento en la amplitud del postpotencial tardío al aumentar el número de estímulos (100 Htz.) en solución isotónica con 100 nM de apamin. E_m es el potencial de membrana que tuvo la fibra después de la estimulación.

TABLA X . RESUMEN DE LOS REGISTROS DEL POSTPOTENCIAL

TARDIO EN RINGER ISOTONICO MAS APAMIN 100 nM.

Pulsos	No	Em [mV]	T 1/2 [seg]	Tau [seg]	Amplitud [mV]
1	10	82.5 ± 8.8	0.45 ± 0.49	0.45 ± 1.03	2.1 ± 1.2
3	7	84.0 ± 3.8	0.43 ± 0.18	0.71 ± 1.80	4.0 ± 1.6
6	3	81.4 ± 4.3	0.75 ± 0.07	0.99 ± 2.88	3.8 ± 1.0
9	2	82.0 ± 8.5	0.35 ± 0.07	0.57 ± 1.31	6.8 ± 1.0
12	2	81.7 ± 5.2	0.80 ± 0.00	1.05 ± 2.41	6.5 ± 0.7
15	9	80.7 ± 6.9	0.71 ± 0.32	0.73 ± 1.44	5.1 ± 1.8
20	1	80.0 ± 0.0	0.90 ± 0.00	1.14 ± 0.00	7.0 ± 0.0

donde:

Pulsos = número de estímulos.

No = número de registros.

Em = potencial de reposo promedio con su desviación estandar

T 1/2 = tiempo a la mitad de la amplitud promedio.

Tau = constante de caída promedio.

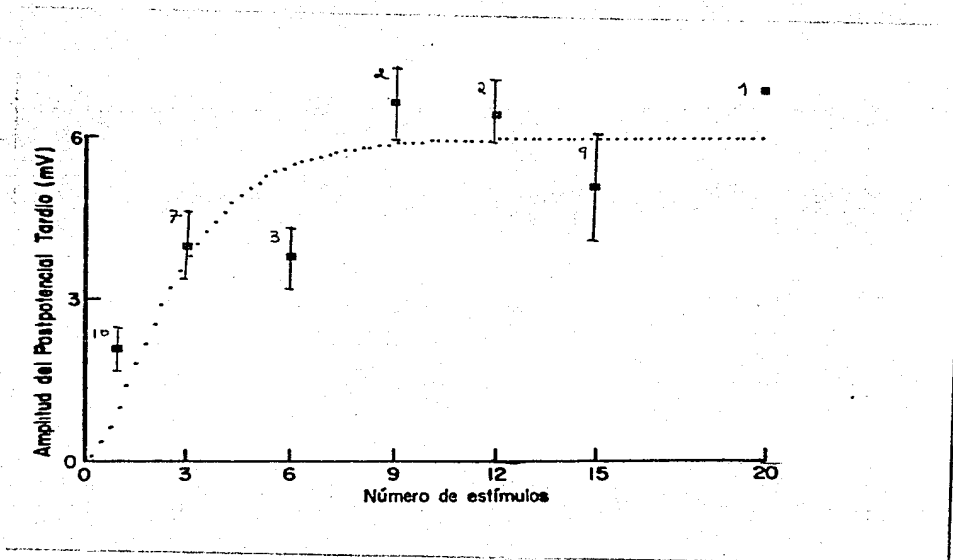


FIGURA 17. Incremento de la amplitud del postpotencial tardío respecto al número de estímulos aplicados en solución normal con 100 nM de apamin. Se muestra el promedio mas, menos un error estandard del numero de registros indicado a la izquierda de cada punto. La curva representa la mejor potencial que ajusta a los datos. Para detalles vease el texto.

DISCUSION.

Se hace evidente que la aplicación de 100 nM de Apamin no produce efectos importantes, si alguno, sobre el potencial de acción, postpotencial temprano, y a nuestro interes, el postpotencial tardío. Las causas de ello pueden ser las siguientes:

a) Al principio de esta parte se dijo que el canal de potasio activado por el incremento en la concentración interna de calcio que es bloqueado por Apamin es de baja conductancia (18 - 25 pS) por lo que si este es capaz de activarse durante los fenómenos que dan lugar al postpotencial tardío, pudiesemos suponer que su participación es pequeña. Esto pudiese ser el caso, si recordamos que para poder observar los efectos de la toxina sobre las corrientes de este canal se ha requerido el suprimir corrientes de potasio de muy alta magnitud (Cognard et.al, 1984), lo cual puede ser importante si consideramos las condiciones en que se han realizado los presentes registros.

b) Recientemente Renaud et.al (1986) describieron la expresión de receptores a Apamin en células musculares de pacientes que sufren distrofia muscular. Donde mencionan que no se han registrado a los canales de potasio activados por calcio sensibles a apamin, ni a los receptores de la toxina en células musculares adultas de rata. Realmente solo se han encontrado en miotubos de rata no inervados, en células musculares en periodo embrionario "in vivo", antes

que el patrón de inervación se haya completado y después de la denervación del músculo adulto de rata. Por todo ello es factible el suponer que este canal iónico no se encuentra en estado activo en el músculo adulto bajo condiciones enteramente fisiológicas. Esta idea puede no estar equivocada, ya que todas las veces en que se han registrado a los canales de potasio activados por calcio de baja conductancia en músculo, han sido condiciones no fisiológicas como: Células musculares en cultivo (Romey & Lazdunski, 1984) y fibras cortadas (Cognard et al. 1984, Traore et al. 1986). Apoyando un poco más esta idea está el trabajo de Ewald, Williams y Levitan (1985) donde se describen fenómenos de modulación de la actividad de canales únicos (conductancia de 20 pS) de células ganglionares de Helix por proteínas fosforiladoras. De tal forma que si este canal descrito en Helix es el mismo que existe (si lo hace) en el músculo adulto normal pudiese ser que en este se encuentre inactivo o bien su participación eléctrica sea reducida. Queda aquí solo el preguntarse cual será la función de este canal en las células en estadio no inervado, en específico, en la célula muscular embrionaria antes de la inervación.

c) Una dosis baja de la toxina, cosa poco probable ya que Cognard et al. (1984) observaron que 50 nM producía efectos en fibras de Rana rudibunda, mientras que Romey y Lazdunski (1984) observaron efectos en células musculares en cultivo a concentraciones tan bajas como 10 nM.

d) Lazdunzki ha mencionado que el Apamin adquirido desde Sigma posee un contaminante que puede complicar la interpretación de los resultados (N. Sperelakys, comentario personal). Sin embargo, en el 16th congreso de Neurociencias se describio que la toxina de esta fuente suprime selectivamente la post-hiperpolarización de motoneuronas espinales del gato (L.Zhang & K.Krnjevic.,1986).

e) Otra posibilidad es que la manipulación de la toxina para su aplicación no fuese el idoneo, más esto es poco factible debido a que se siguieron las recomendaciones de Hugues et.al (1982), las de Cognard et.al (1984) asi como las del fabricante.

f) Para concluir, el hallazgo de canales de potasio activados por calcio sensibles a apamin en Rana solo se ha descrito para R. rudibunda (Cognard et.al 1984, Traore et al. 1986) existiendo la posibilidad que en R. pipiens no esten presentes.

EXPERIMENTOS CON TETRAETILAMONIO (TEA).

Los experimentos descritos a continuación se realizaron durante el mes de Julio de 1986.

Se estableció anteriormente que el postpotencial tardío no parece depender de aquellos canales de potasio activados por la concentración de calcio interna bloqueados por Apamin. Sin embargo, queda la posibilidad que no dependa de estos canales sino de los canales de potasio activados por la concentración de calcio interna insensibles a apamin, sensibles a tetraetilamonio. Ambos tipos de canales son diferentes en propiedades eléctricas y farmacológicas (Romey & Lazdunski, 1984; Inoue et.al 1985), y pudiesen encontrarse también en las fibras musculares de Rana (Cognard et.al. 1984). El canal sensible a apamin no lo es a la aplicación externa de TEA; posee baja conductancia (15-60 pS); activándose a concentraciones bajas (1 μ M) de calcio; incluso se bloquea con las altas concentraciones de este ion. Por su parte el insensible al apamin lo es importantemente al TEA aplicado desde el exterior (Latorre & Miller, 1983) a concentraciones bajas como de 2 mM (Iwatsuki & Petersen, 1985); posee una muy alta conductancia (220 pS) y se activa a concentraciones altas de calcio interno (Romey & Lazdunski, 1984).

En el músculo, se ha descrito, en el interior del sistema tubular transversal, al canal de potasio activado por calcio de alta conductancia bloqueándose con 5 mM de TEA (Latorre., Vergara & Hidalgo, 1982).

Para más información sobre el tetraetilamonio, vease el

apéndice correspondiente.

El incremento en la concentración interna de calcio en la célula muscular, debido a la liberación del mismo desde las cisternas terminales del Reticulo Sarcoplásmico durante los fenómenos del acople excitación contracción, es muy grande (de $1 \cdot 10^{-7}$ a $1 \cdot 10^{-5}$), por lo que es factible suponer que durante los fenómenos de activación mecánica los canales sensibles a apamin (si existen) se encuentran inactivados; mientras que los sensibles a TEA no lo esten. De esta manera, como son de alta conductancia, la cantidad de potasio que sale por el canal podría acumularse en el interior de este sistema participando así en el desarrollo del postpotencial tardío.

En vías de probar esta hipótesis se realizaron experimentos donde se añadió a la solución de Ringer Normal 3 mM. de Hidroxido de tetraetilamonio el cual se aplicó (previa corrección del pH) a músculos sartorio registrados por la técnica de electrodos flotantes.

En general se puede decir que esta substancia imposibilita el registro del postpotencial tardío bajo las presentes condiciones.

El postpotencial temprano.

En la figura 18 (a) se observa un potencial de acción muscular registrado bajo las anteriores condiciones tras 5 minutos de acción del TEA. Como se puede observar, difiere de manera importante de aquellos registrados bajo condiciones normales (Figura 12) ya que la espiga tiende a ser mayor (100.7

TABLA XI. Variación de los distintos parámetros evaluados del potencial de acción muscular en solución normal isotónica con 3.0 ml de hidróxido de Tetraetilamonio.

Fibra .	Em . mV	Tam . mV	St . mV	Ea . mV	Va . mV	Tr . mseg	J .
1	90	125	35	40	30	50	N
2	95	112	27	55	30	--	S
3	80	110	30	45	32	60	P
4	75	115	40	30	30	120	N
5	70	106	36	40	32	---	-
6	90	130	40	42	40	100	P
7	90	105	15	40	20	80	N
8	85	110	25	30	45	100	N
9	80	109	29	35	45	100	N
10	85	111	26	42	35	130	N
11	80	117	32	45	34	100	N
12	70	107	32	31	35	100	N
Total	14						
promedios:		97	101	31	40	33	96.67
t s. d.		±5	±35	±8	±8	±6	±25

donde: Em es el potencial de reposo; Tam es la amplitud del potencial de acción; St el sobretiro; Ea amplitud del postpotencial temprano evaluado desde el cero; Va lo mismo pero desde el reposo; Tr corresponde al tiempo en regresar al potencial de reposo; J es, si el registro presenta joroba, meseta o ninguno de los dos.

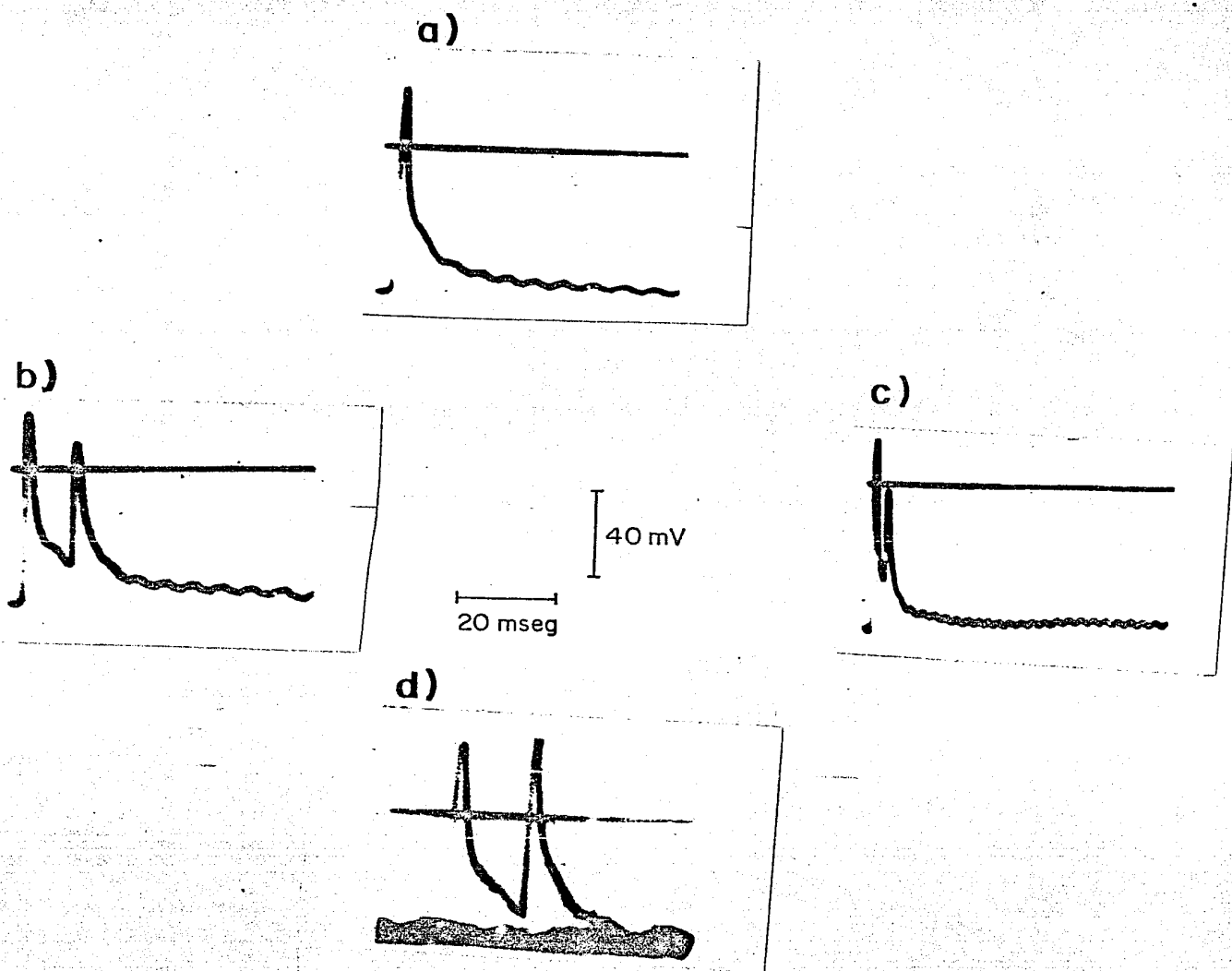


FIGURA 18. Efecto de 3.0 mM de tetraetilamonio sobre el potencial de acción y fibra en reposo. a) Alteración del potencial de acción. b) y c) respuesta repetitiva a la estimulación. d) Desarrollo espontáneo de potenciales de acción. Para detalles vease el texto.

TABLA XI. Variación de los distintos parámetros evaluados del potencial de acción muscular en solución normal isotónica con 3.0 ml de hidroxido de Tetraetilamonio.

Fibra .	Em . mV	Tam . mV	St . mV	Ea . mV	Va . mV	Tr . mseg	J .
1	90	125	35	40	30	50	N
2	95	112	27	55	30	--	S
3	80	110	30	45	32	60	P
4	75	115	40	30	30	120	N
5	70	106	36	40	32	---	-
6	90	130	40	42	40	100	P
7	90	105	15	40	20	80	N
8	85	110	25	30	45	100	N
9	80	109	29	35	45	100	N
10	85	111	26	42	35	130	N
11	80	117	32	45	34	100	N
12	70	107	32	31	35	100	N
Total	14						
promedios:		97	101	31	40	33	96.67
t s. d.		±5	±35	±8	±8	±6	±25

donde: Em es el potencial de reposo; Tam es la amplitud del potencial de acción; St el sobretiro; Ea amplitud del postpotencial temprano evaluado desde el cero; Va lo mismo pero desde el reposo; Tt corresponde al tiempo en regresar al potencial de reposo; J es, si el registro presenta joroba, meseta o ninguno de los dos.

±35.6 mV; promedio desviación estándar de 14 registros, así como el sobretiro ya que alcanzó valores de 31.0 ± 8.0 mV; mientras que en solución normal estos valores fueron de 109.0 ± 7.0 mV y 26.0 ± 6.0 mV respectivamente). Se hace evidente que cambia la forma del postpotencial temprano ocurriendo la repolarización al reposo en 96.67 ± 24.9 mseg. con una constante de decaimiento de 24.16 ± 7.1 mseg. (promedio de las mejores constantes de los anteriores registros previa linearización con coeficientes de correlación de 0.97 ± 0.02). Por su parte, la amplitud del postpotencial temprano medido desde el reposo (V_a) fue de 33.07 ± 6.3 mV, que es casi el doble del encontrado bajo condiciones normales (15.4 ± 4.6 mV), por lo que la amplitud de la repolarización rápida a los 10 mseg del inicio del potencial de acción fue de 40.0 ± 8.4 mV., que difiere también de aquellos encontrados bajo condiciones sin TEA (66.3 ± 5.9 mV).

Se observó que las fibras se contraían de manera espontánea y se atribuye al desarrollo de potenciales de acción generados como producto de la despolarización hasta el nivel de umbral. Esto queda ilustrado en la parte (c) de la figura 18 donde se observa el desarrollo de potenciales de acción espontáneos registrados al mantener el microelectrodo dentro de la célula y permitiendo que el osciloscopio estuviera bajo condición de registro constante (velocidad de registro 20 mseg/div). La amplitud de la barra negra corresponde a la magnitud de despolarización, la cual, tras alcanzar un cierto valor umbral, genera dos potenciales de acción. Todos estos efectos del tetraetilamonio fueron completamente reversibles, ya que tras

cinco minutos de la sustitución de la solución con TEA por solución normal, los registros fueron iguales a aquellos encontrados bajo condiciones previas a la aplicación de la solución con TEA (no mostrado).

El postpotencial tardío.

Este fenómeno fue imposible de registrar, ya que se encontró que las células respondían de manera repetitiva, con una diferencia de tiempo variable entre potenciales de acción, a la estimulación, por lo que su número no fue posible mantenerlo constante. Asimismo, la amplitud de la espiga no fue constante entre pulsos (b y c de la figura 18). Por otra parte, se hizo evidente que el potencial de membrana no se mantiene estable, sino que oscila alrededor del potencial de reposo tanto de manera hiperpolarizante como despolarizante. Stanfield (1970b) observa una ligera despolarización de 5 mV al aplicar una solución con cloruro de TEA (115 mM). La magnitud de esta despolarización es importante en el registro del postpotencial tardío, ya que se encuentra dentro del promedio registrado para la amplitud máxima del fenómeno tras 15 estímulos. Por otra parte, después de la estimulación, la célula muscular no sigue un comportamiento simple hacia el reposo, sino que oscila.

Resultados similares a los presentes encontraron Hagiwara & Watanabe (1955) en fibras musculares del sartorio obtenidas del sapo japonés Bufo vulgaris quienes, a diferencia de lo aquí expuesto, observaron que 5.5 mM de cloruro de TEA no produce cambios importantes en el potencial de acción ni en el postpotencial temprano; más efectos similares a los aquí

expuestos acontecen a concentraciones de 27 mM. Se puede observar que es una diferencia importante ya que en el presente, se trabajo con 5.0 mM de Hidroxido de TEA y no es factible el suponer que el usar hidroxilos o cloruros afecte a la capacidad de bloqueo del ion cuaternario. Por su parte, Stanfield (1970a) encontró una reducción en la conductancia retardada al potasio del 50% con 8.0 mM de TEA. Se podría pensar que las diferencias encontradas entre Stanfield (1970a) y las aquí descritas a las de Hagiwara & Watanabe, se deben a la diferencia en genero (Stanfield utilizo Rana temporaria), más se carece de argumentos como para esclarecer esta hipótesis. Sin embargo, descartando la diferencia en concentraciones, se puede observar que los resultados de Hagiwara & Watanabe son similares a los aquí encontrados y se pueden explicar, distinto a como ellos lo hicieron, como sigue.

a) Prolongación del potencial de acción. Se dijo anteriormente que el tetraetilamonio es un bloqueador inespecifico de los canales ionicos que permiten el paso de iones potasio (Stanfield 1983), de tal manera que la prolongación del potencial de acción, en cuanto a duración, se puede explicar por un bloqueo al canal rectificador tardío, encargado de repolarizar a la célula por permitir la salida de potasio conjunto con el cese del incremento en la conductancia al sodio, (Stanfield, 1983) por lo que la membrana repolariza al nivel de reposo a traves de la constante de tiempo en reposo [demostrado por Hagiwara & Watanabe (1955)].

b) Incremento en la amplitud de la espiga. Se sabe que la

altura máxima de la espiga depende del potencial de equilibrio del sodio; el cese de conductancia, debido a la inactivación de los canales de sodio; y al incremento retardado en la conductancia saliente de ion potasio. Ahora, si el TEA bloquea a esta última conductancia el valor máximo de despolarización, tendera a acercarse más al potencial de equilibrio del sodio.

c) Variación en la altura de las espigas de potenciales de acción sucesivos. Se recordara de la figura 11, que la altura máxima del potencial de acción depende del valor del potencial de membrana previo al desarrollo de la espiga, debido a una inactivación dependiente del voltaje de los canales de sodio. Si tomamos como valido que la prolongación del potencial de acción se debe al bloqueo de la conductancia de potasio retardada, entonces el voltaje que se está aplicando a los canales iónicos es menor por un mayor tiempo respecto al potencial de acción normal, por lo que cuando se desarrolla la segunda espiga, una alta proporción de los canales se encuentra inactivada (Hagiwara & Watanabe, 1955; Stanfield, 1983).

d) Estimulación repetitiva. El incremento en la duración del potencial de acción se hace evidente por una repolarización más lenta al potencial de reposo, mucho más lenta que la del postpotencial temprano. Esta repolarización más lenta permite que la célula se encuentre cerca del nivel de voltaje umbral del potencial de acción por más tiempo dando por resultado a que exista la probabilidad de que se desarrolle una segunda espiga.

e) Estimulación y contracción espontanea. Peter R. Stanfield (1983) menciona que este fenómeno se debe a la acción del bloqueador sobre las terminales finas amielínicas de la

fibra, ya que el TEA prolonga también el potencial de acción de la terminal nerviosa, dando por resultado, un incremento en la liberación de Acetil colina en la placa. Como se puede observar, la conclusión a la que se puede llegar en el presente trabajo es distinta, ya que el registro presentado en la figura 18 d parece bastante concluyente. Más sin embargo una combinación de ambos fenómenos pudiese estar implicada.

f) Oscilación del potencial de membrana. El potencial de reposo de la fibra muscular se debe a que, dentro de una cierta gama de concentraciones, se comporta como un electrodo de potasio (Hodgkin & Horowicz, 1959), por lo que cualquier agente que altere las propiedades de permeabilidad del sarcolema para este ion, retribuirá en alteración de la diferencia de voltaje de la misma, en particular, sobre la conductancia en reposo y del rectificador entrante (Stanfield, 1970a,b; 1983). La razón de la oscilación se puede pensar como un bloqueo parcial de estos sistemas de conductancia.

DISCUSION.

Por lo anteriormente expuesto, se puede concluir que el utilizar tetraetilamonio como un bloqueador del canal de potasio activado por calcio de alta conductancia, bajo las presentes condiciones, es poco adecuado para el registro del postpotencial tardío debido a los efectos colaterales que conlleva. De tal manera que lo que se debe buscar, entonces, es un bloqueador específico para este canal. Este bloqueador ya se encuentra descrito y es un componente menor del veneno del escorpión israeli Leiurus quinquestriatus conocido como charybdotoxina.

Esta toxina fue descrita como bloqueador de este canal por Christopher Miller et.al. (1985). Su purificación hasta el nivel homogéneo fue presentada por Smith, Phillips y C. Miller en el 16th congreso de Neurociencias (1986) y presentada en extenso en el J. Biological Chemistry, 1986. Quedando así el utilizar esta toxina para probar la hipótesis de la dependencia del desarrollo del postpotencial tardío respecto al ion potasio que sale por canales de potasio activados por el incremento en la concentración interna de calcio de alta conductancia.

EXPERIMENTOS CON CAFEINA.

Se concluyó que el utilizar TEA no es la mejor manera de intentar bloquear al canal de potasio activado por calcio, de alta conductancia, quedando así sin resolver si este canal participa o no en el desarrollo del postpotencial tardío. Una manera alternativa de intentar probar su participación es el incrementar sus funciones. Se dijo que en el canal de potasio activado por el incremento en la concentración de calcio se regula su probabilidad de apertura de dos maneras: por el voltaje de membrana y por el incremento en la concentración interna de calcio. En los experimentos hasta ahora descritos no se ha modificado la condición intracelular de este divalente, por lo que cualquier incremento en la concentración de este ion se deba a su entrada al citoplasma por la membrana celular, o bien, por su salida desde las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico.

En los experimentos siguientes lo que se pretende es, incrementar la concentración interna de calcio en el reposo. Así, al aplicar la estimulación, la salida de calcio desde las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico provocara un incremento aun mayor en la concentración del ion, por lo que, junto con la despolarización del sistema tubular se espera que los canales permanescan abiertos mayor tiempo, dando por resultado que la salida de potasio a través de los mismos sera mayor por estímulo aplicado; así, la cantidad de estímulos necesarios para producir el postpotencial tardío, sera menor.

En los registros esto se observaria como un aumento en la

amplitud del postpotencial tardío respecto al testigo mientras que la curva Amplitud del postpotencial tardío - Número de estímulos subiría más rápido; llegando al valor asintótico más pronto que en condiciones normales o bien, un aumento en el valor máximo del postpotencial tardío.

Una manera de incrementar la concentración de calcio interna basal es por el uso de cafeína, capaz, a bajas concentraciones (3 mM), de incrementar de manera moderada la concentración basal de calcio citoplasmática desde 0.12 a 0.31 μM sin producir contractura (Lopez et.al., 1983 y 1984). Hemos de decir que el modo de acción de este alcaloide no se conoce bien, por lo que para una mayor discusión de sus efectos se remite al apéndice correspondiente.

El postpotencial temprano.

Los experimentos descritos a continuación se realizaron de Junio a Julio de 1986. En la figura 19 se observa un potencial de acción obtenido de una fibra del músculo sartorio de Rana pipiens tras cinco minutos de la aplicación de 3 mM de cafeína registrado por la técnica de electrodos flotantes. Como se puede observar, es similar a aquel registrado bajo condiciones normales (Figura 12). Las características de diez fibras bajo tales condiciones se presentan en la tabla XII.

Comparando los valores de esta tabla con aquella de condición normal (VII) se puede observar que no difieren de manera importante, salvo el referente al potencial de reposo.

Hemos de decir aquí, que pese a lo que se encuentra en la literatura, se observaron contracturas espontáneas de las fibras

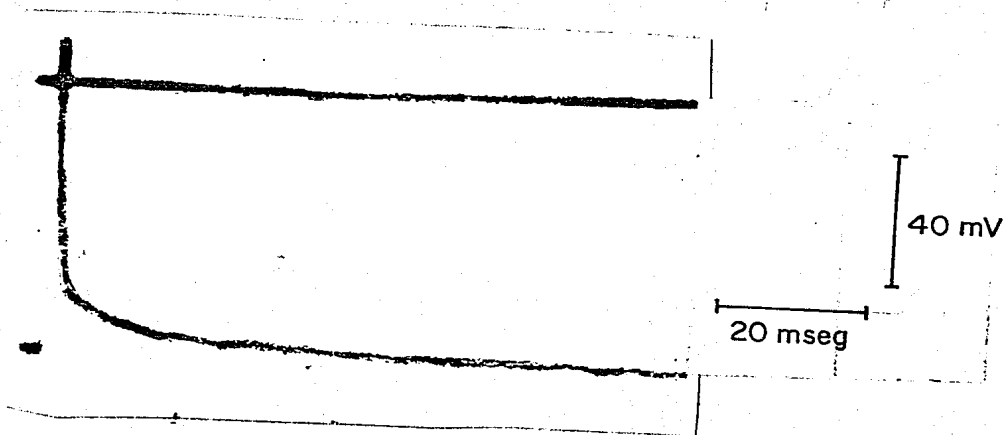


FIGURA 19. Potencial de acción típico registrado en solución normal con 3.0 mM de cafeína para una fibra con 82.6 mV. de potencial de reposo.

TABLA XII. Variación de los distintos parámetros evaluados del potencial de acción muscular en solución normal isotónica con 3.0 mM de Cafeína.

Fibra	Em mV	Tam mV	St mV	Ea mV	Va mV	Tr mseg	J
1	90	92	2	70	15	--	-
2	75	99	24	54	17	80	N
3	80	96	16	58	15	50	N
4	70	82	12	52	13	60	N
5	80	116	36	61	15	120	P
6	80	102	22	67	11	40	N
7	78	109	31	60	11	80	P
8	85	112	27	66	15	80	N
9	76	101	25	65	10	80	N
10	85	113	28	60	20	70	P
Total promedios:	10	79.3	101	21	40	14.7	66.3
f s. d.		± 5.8	± 10	± 8	± 8	± 4.56	± 16

donde: Em es el potencial de reposo; Tam es la amplitud del potencial de acción; St -el sobretiro; Ea amplitud del postpotencial temprano evaluado desde el cero; Va lo mismo pero desde el reposo; Tr corresponde al tiempo en regresar al potencial de reposo; J es, si el registro presenta joroba, meseta o ninguno de los dos.

y, extrañamente, la supervivencia de los músculos se notó reducida bajo tales circunstancias.

El postpotencial tardío.

En la figura 20 se observa un registro típico del incremento en la amplitud del postpotencial tardío respecto al número de estímulos.

En la figura 21 se muestra la gráfica del incremento en la amplitud del postpotencial tardío respecto al número de estímulos aplicados. La mejor curva, calculada como se hizo anteriormente queda descrita como:

$$A = 4.19(1 - \exp(-p/2.16))^2$$

En la tabla XIII se resumen los registros que dieron lugar a la anterior figura.

Comparando los valores para la constante de decaimiento (Tau), y tiempo a la mitad observados tras quince estímulos respecto a los equivalentes de solución normal (0.96 ± 2.08 y 0.63 ± 0.22 para los parámetros respectivos), se observa que no difieren de manera importante, pudiéndose atribuir a la misma variabilidad del sistema.

En lo que se refiere a la amplitud del postpotencial tardío observada para el mismo número de estímulos (quince) comparada a la respectiva en solución normal (6.81 ± 2.66 mV), se observa que existe una diferencia notable (mas de 3 mV); ahora si comparamos el valor máximo del postpotencial tardío calculado para las funciones que describen el incremento en la amplitud respecto al número de estímulos aplicados (Am) se observa que difieren también (5.9 para el normal y 4.18 para cafeína). Estas

diferencias se pueden explicar, o como un artefacto resultado de la aplicacion de cafeina, o bien como un efecto real sobre el fenomeno que nos interesa.

La hipótesis principal de los presentes experimentos es que al aplicar cafeina, la concentración de calcio interna se incrementa y como resultado de esto, conjunto con la despolarizacion de membrana del potencial de accion, se espera un aumento en la amplitud del postpotencial tardío. Como se mostró anteriormente, el utilizar cafeína, mas que incrementar el

TABLA XIII. RESUMEN DE LOS REGISTROS DEL POSTPOTENCIAL

TARDIO EN RINGER ISOTONICO MAS 3 mM. DE CAFEINA.

PULSOS.	No	Em [mV]	T/2 [seg]	Tau [seg]	Amplitud [mV]
1	10	78.9 ± 8.6	1.3 ± 1.16	0.55 ± 0.48	2.56 ± 2.28.
3	5	73.4 ± 5.4	0.6 ± 0.25	0.52 ± 0.44	2.30 ± 1.15.
6	5	74.0 ± 2.4	0.35 ± 0.1	0.67 ± 1.08	2.78 ± 1.87.
9	5	73.8 ± 2.2	0.4 ± 0.15	0.66 ± 1.99	3.49 ± 1.67.
12	5	72.8 ± 2.4	0.38 ± 0.0	0.54 ± 1.43	3.95 ± 1.86.
15	5	70.8 ± 2.6	0.66 ± 0.6	0.64 ± 0.73	3.46 ± 1.87.
20	2	74.5 ± 3.5	0.35 ± 0.0	0.72 ± 3.15	6.25 ± 6.01.

donde :

Pulsos = número de estímulos aplicados.

No = número de registros considerados.

Em = promedio mas/menos una desviación estandard del potencial de membrana.

T/2 = tiempo promedio tomado por las fibras en alcanzar la mitad de la amplitud del postpotencial tardío.

Tau = mejor constante promedio, de caída del registro hacia el potencial de reposo.

Amplitud = Tamaño promedio del postpotencial tardío.

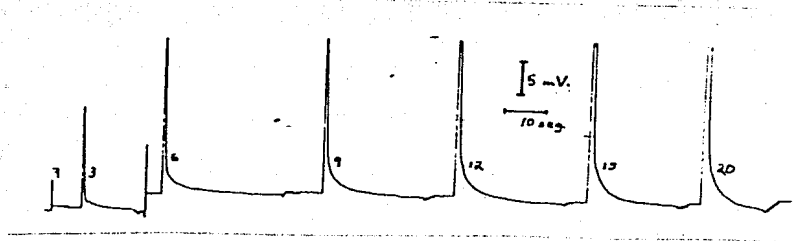


FIGURA 20. Incremento en la amplitud del postpotencial tardío al aumentar el número de estímulos (100 Htz.) en solución normal con 3.0 mM de cafeína para una fibra cuyo potencial de reposo, antes de la estimulación, fue de 85.4 mV. Escala como se indica.

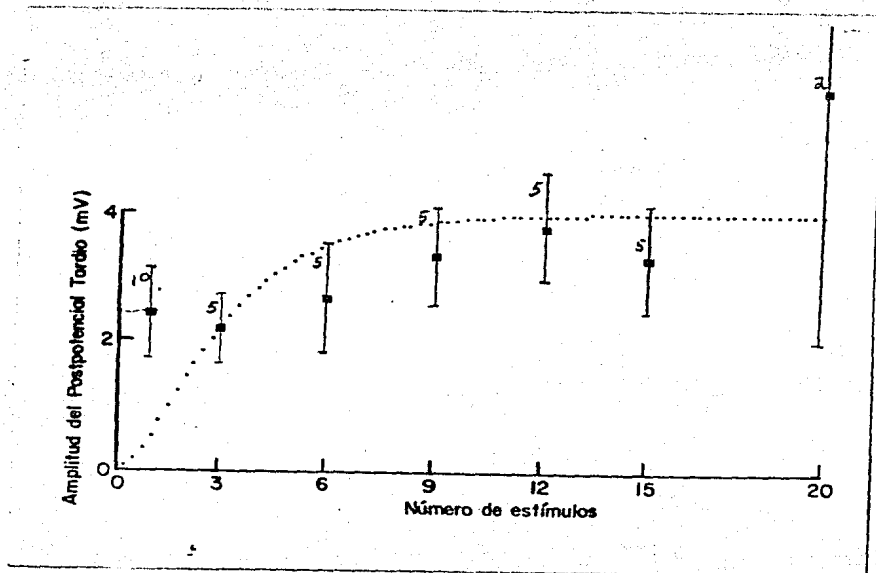


FIGURA 21. Incremento de la amplitud del postpotencial tardío respecto al número de estímulos aplicados en solución normal con 3.0 mM de cafeína. Se muestra el promedio más, menos un error estándar del número de registros indicado a la izquierda de cada punto. La curva representa la mejor potencial que ajusta a los datos.

fenómeno, lo disminuye. Esto se puede explicar si consideramos que la amplitud del postpotencial tardío se refiere siempre al potencial de reposo. Desde la tabla anterior (XIII) se hace evidente que para un cierto número de estímulos esta magnitud de membrana se encuentra disminuida respecto al testigo. Esto es importante, ya que si suponemos que para un cierto número de estímulos la cantidad de potasio que sale de la fibra es constante, entonces la magnitud de despolarización respecto al reposo es menor. Hemos de decir que un efecto despolarizante de la cafeína fue también encontrado por Lüttgau & Oetliker (1968), así como por Axelsson & Thesleff (1958). Los primeros encontraron, a una concentración igual a la aquí empleada, en Rana temporaria, que no hay una despolarización mayor a 0.5 mV. mas si aplican una mayor concentración la caída en el voltaje es importante e irreversible, atribuyéndola a efectos deletereos del alcaloide sobre la membrana. Ahora, Axelsson & Thesleff encuentran que un miligramo del alcaloide (0.1 mM) provoca, en R. esculenta, despolarizaciones de 11 mV a 22 grados centígrados. Se hace evidente que el efecto de la cafeína sobre el potencial de reposo difiere dependiendo de la especie en la que se trabaje.

La razón de la despolarización podría atribuirse a que el alcaloide provoque la apertura de canales de calcio dando así lugar a una corriente capaz de suprimir el voltaje de membrana. Este fenómeno en los de canales de calcio por cafeína fue planteada por Saldaña (1981) para fibras lentas de pollo, ya que 3 mM de cafeína provoca contractura, la cual desaparece con el lavado; si posteriormente se aplica una alta concentración de

calcio, se tiene una contractura de igual magnitud y menor duración que bajo la xantina, por lo que le parece factible postular que la cafeína abre canales de calcio que permanecen "encendidos" al retirar el alcaloide.

Otra posible razón de la discrepancia en la magnitud del postpotencial tardío para un cierto número de estímulos, es que se este liberando menos calcio por potencial de acción desde las cisternas terminales. Esto, aunque parezca contradictorio, es reportado por M. Delay et al (1986), donde observan que tres milimoles de cafeína provocan un decremento en el transiente de calcio de sus registros respecto al testigo, y la atribuyen a depleción del divalente en el retículo sarcoplásmico. Este hallazgo apoya la hipótesis de la participación del canal de potasio activado por el incremento en la concentración de calcio interna en el postpotencial tardío, ya que al disminuir la concentración interna de este ion la cantidad de potasio que saldría sería menor, dando así lugar a un decremento en la amplitud del fenómeno. Sin embargo, esto no solo produciría una disminución en el valor máximo del fenómeno, sino también un decremento en la velocidad de ascenso de la curva Amplitud del postpotencial tardío-número de estímulos. Esta velocidad depende de la constante (τ) de la ecuación que la describe y si se compara para los presentes experimentos (2.16), con la obtenida en solución normal (2.56) se observa que son muy parecidas por lo que podemos pensar que este no es el caso.

En conclusión podemos decir que con el presente protocolo la participación, si existe, del canal de potasio

activado por el incremento en la concentración de calcio interna dependiente del voltaje, de alta conductancia en el postpotencial tardío no se hace evidente y los resultados observados se pueden atribuir a los efectos colaterales del alcaloide sobre las fibras.

CONCLUSION.

Se concluye del presente trabajo que el postpotencial tardío, con la presente metodología no es afectado por los protocolos experimentales a saber: sustitución del calcio extracelular por magnesio; aplicación de la toxina apamin, capaz de bloquear a canales de potasio activados por el calcio de baja conductancia; aplicación de cafeína, con el fin de incrementar la participación de aquel de alta conductancia.

Todo ello se puede deber a dos razones: a) que el postpotencial tardío no dependa de canales de potasio activados por calcio dependientes del voltaje, por lo que Kirch et.al. (1977) tendrían razón en atribuir el fenómeno a la salida de potasio al través de canales rectificadores tardíos; o bien b) que el postpotencial tardío dependa de manera reducida de canales de potasio activados por calcio dependientes del voltaje, en magnitud tal que quede fuera del límite de resolución de la metodología empleada.

Respecto a lo primero debemos decir que la hipótesis de Kirsch et al. sigue siendo factible, porque existe casi la completa certeza del desarrollo de potenciales de acción en el sistema tubular transversal (Adrian et al. 1973; L.D. Peachey, comentario personal). Hemos de decir aquí algo importante: Almers (1981) ha expresado que la existencia del postpotencial temprano así como del tardío son una consecuencia inmediata al desarrollo de un sistema tubular transversal, ya que este lo que permite es una sincronización radial de la fibra muscular para el desarrollo de tensión y dice que estos fenómenos no son

favorables para la vida de los organismos que los manifiestan, porque propician el desarrollo de estimulación repetitiva muscular, mejor conocida como miotonía. Aquí, entonces surge una pregunta, ¿cual sera el papel fisiológico del postpotencial temprano y tardio ?. A lo que podemos contestar: en el transcurso de estos fenomenos, la fibra muscular se encuentra más cerca del nivel de disparo, por lo que se requiere menos energía de estimulación para producir respuesta. Sin embargo, los argumentos de Almers son importantes y este es el primer caso conocido por el autor del presente trabajo, donde existan consecuencias deletereas por el mejoramiento de una función, en específico, el de la contracción muscular.

Al analizar los datos obtenidos, para la amplitud del postpotencial tardio en soluciones hipertónicas en condiciones normal y con magnesio, se concluyó que la metodología no hace evidente si este fenómeno depende del ion calcio extracelular debido a la gran variación en los datos. Sin embargo si se comparan estos tomando en consideración el error-estandard, y no la desviación estandard como se habia hecho en su momento, se tiene que los valores se convierten en 14.05 ± 1.05 mV para los de calcio (n=19), 9.05 ± 0.56 mV para aquellos en magnesio (n=32) y 16.18 ± 3.48 mV (n=10) para la reaplicación de solución normal. Por lo que la amplitud de este fenómeno se ve afectada por el protocolo utilizado, implicando que este parametro del postpotencial tardio depende del ion calcio extracelular para su desarrollo. Por lo que, bajo nuestra hipótesis de trabajo, el calcio que entra a la célula durante la estimulación por los

canales de calcio del sistema tubular activa aquellos de potasio dependientes de calcio ubicados ahí mismo. Sin embargo, si se observan los valores de ordenada al origen de estos mismos experimentos al normalizarlos en las figuras 4, 7 y 8 se observa que se contraponen a esta conclusión. Ahora, para los valores obtenidos con fascículos aislados (Tabla VI) se tiene lo mismo. De tal manera que no podemos establecer si los datos son concluyentes. Para poder esclarecer de manera precisa si los valores son significativos se requiere diseñar experimentos que produzcan valores realmente concluyentes.

Son importantes las evidencias existentes de la presencia de los canales que nos interesan en el sistema tubular transversal y, con base en los resultados obtenidos en este trabajo, podríamos pensar que el postpotencial tardío depende, de manera reducida, de estos canales, por lo que la segunda opción parece factible, planteándose volver a cambiar de metodología por una en la que se incremente la resolución al eliminar la variación del radio de la fibra. Es decir, hacer experimentos donde se puedan aplicar todos los protocolos en una misma fibra y para ello se propone el método de fijación de corriente para fibra cortada (Hille & Campbell, 1976), en el cual existen las siguientes ventajas: i) Se pueden aplicar distintos tipos de soluciones al mismo segmento de fibra, por lo que el radio se mantiene constante para todo el desarrollo de los experimentos. ii) Se puede manipular tanto el medio intracelular como el extracelular pudiéndose así diseñar experimentos realmente concluyentes.

Se puede hacer una estimación, muy tentadora, de la proporción de canales de potasio de la rectificación tardía y de los activados por calcio en el sistema tubular transversal, suponiendo su existencia en esta membrana, de la manera siguiente: Kirsch et al. (1977) estimaron una proporción de canales de potasio entre la membrana superficial y el sistema tubular transversal de 5:1 basándose en sus datos de acumulación de potasio tubular, al que contribuyen en principio todo tipo de canal de potasio. Por su parte, Vergara y Delay (1986) midieron el potencial de acción tubular mediante técnicas ópticas y estimaron, basándose en el modelo de Adrian & Peachey (1973) una relación de 10:1. Es de suponer que solo los canales de potasio de la rectificación tardía contribuyen a esta estimación ya que, con mucho, son los que más dependen del voltaje y afectan al potencial de acción tubular. De lo anterior, es factible suponer que alrededor del 50% de los canales de potasio del sistema tubular transversal no serían de la rectificación tardía haciendo posible que se trate de canales de potasio activados por calcio.

No debemos olvidar los trabajos mencionados en los que se hace evidente que el canal objeto de este trabajo se encuentra regulado en ciertas preparaciones, dando por resultado que aunque se encuentre en el sistema tubular podría no ser funcional, quedando así por esclarecer su papel fisiológico, en específico, respecto a su localización. Por otra parte, se ha demostrado, en otros tipos celulares que su papel es de regulador de la actividad repetitiva, pero por su posición en el músculo esta, probablemente, no sea su función.

Para terminar aclaremos algo: A todo lo largo de este trabajo se planteo que los canales de potasio activados por calcio, debian estar en el interior del sistema tubular transverso de la rana, que aunque parece lógico desde los trabajo de Latorre et.al. no se tenia la certeza de que ello sucediera en el vertebrado en el que se desarrollo esta tesis. Sin embargo, Traore et.al. (1986) demuestran la localización del canal sensible a apamin en el sistema tubular de Rana rudibunda y, además, que sus corrientes no dependen de manera importante del calcio extracelular, confirmando con ello nuestra hipótesis de trabajo y los resultados obtenidos, cuando menos para los experimentos con esta toxina.

A P E N D I C E S .

MICROELECTRODOS.

Todas las células están rodeadas por una membrana plasmática que modifica y limita el movimiento de sustancias adentro y fuera de las mismas. Solamente aquellas células, tales como el axón gigante de calamar, o en estructuras geoméricamente favorables, tales como los nervios mielinizados, es posible obtener información acerca del potencial de membrana y la corriente a su través sin la penetración mecánica de la membrana en el área que encara el medio que constituye al potencial de referencia en el exterior celular. La manera más usual de hacer estas mediciones es el introducir un electrodo a través de la membrana y medir el cambio de potencial.

El principal requerimiento para hacer estas medidas es que el procedimiento dañe mínimamente a las células y que el registro obtenido sea lo más cercano al real posible.

Para el registro del potencial celular y potencial de acción es de común uso emplear micropipetas, que se asemejan a un gotero con una punta que se prolonga a diámetros menores de una micra.

Como medio conductor en el interior del microelectrodo se pone un electrolito, que llena todas sus partes y haciendo contacto con el, se encuentra un electrodo de plata-plataclorurada que sirve como terminal eléctrica.

Una consideración importante se hace respecto al diámetro de la punta, ya que a mayor diámetro, menor el potencial medido (Woodbury et.al., 1951. citado en Geddes, 1972). Desde lo cual se extrapola que un buen electrodo es aquel que posee un diámetro de punta entre uno y diez por ciento del tamaño de la célula a

medir.

Este tipo de electrodos se realizan desde 1925, cuando Ettisch y Peterfi describieron el uso de un tubo de vidrio, de 1.0 mm para ser jalado bajo flama, dando origen a diametros de punta de 10 micras.

El registro del potencial de membrana se realiza comunmente en d.c., ya que los componentes de las uniones sólido líquido del arreglo de registro de los electrodos se escogerian preferentemente.

Considerese el siguiente esquema.

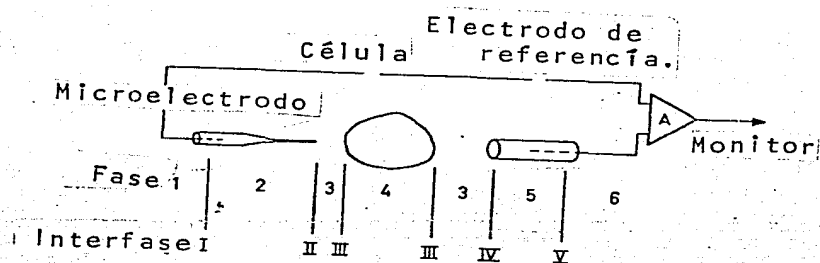


DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA CADENA DE REGISTRO
EMPLEADA EN LA ESTIMACION DEL POTENCIAL DE MEMBRANA
CON MICROELECTRODOS.

En esta representación solo se consideran las uniones solido liquido entre un electrodo de plata con una cubierta de plata-clorurada que esta en contacto con una solución que contiene cloro en forma de ion. La diferencia de potencial medido V a través del sistema se puede representar como la suma de los

términos:

$$V = {}^1\Delta^2\psi + {}^2\Delta^5\psi + {}^5\Delta^6\psi = {}^1\Delta^2\psi + {}^2\Delta^5\psi - {}^6\Delta^5\psi .$$

donde ${}^2\Delta^5\psi = \psi_2 - \psi_5$ es la diferencia de potencial de las masas totales de 2 y 5. La diferencia de potencial ${}^1\Delta^2\psi$ y ${}^6\Delta^5\psi$ son inaccesibles para las medidas electroquímicas, ya que son diferencias a través de una sola interfase. Sin embargo bajo las condiciones experimentales usuales, donde las condiciones de las fases 2 y 5 son casi idénticas y la corriente a través del sistema es pequeña, se puede suponer que la diferencia

$${}^1\Delta^2\psi - {}^6\Delta^5\psi$$

sería mínima por lo que la diferencia de potencial medido (V) iguala a ${}^2\Delta^5\psi$, la cual a su vez se puede pensar como la suma de los términos, estando el microelectrodo dentro de la célula.

$$\begin{aligned} {}^2\Delta^5\psi &= {}^2\Delta^4\psi + {}^4\Delta^3\psi + {}^3\Delta^5\psi + \text{terminos ohmicos} = \\ {}^2\Delta^4\psi &+ v^m - {}^5\Delta^3\psi + \text{terminos ohmicos.} \end{aligned}$$

Las cantidades ${}^2\Delta^4\psi$ y ${}^5\Delta^3\psi$ son los potenciales de difusión a través de las uniones líquidas II y IV respectivamente,

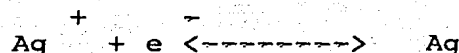
$$v^m = {}^4\Delta^3\psi$$

es el potencial de membrana, y los términos ohmicos son la caída de potencial en el arreglo completo, causado por una pequeña pero finita corriente a través del sistema, necesaria para el amplificador A. Actualmente los amplificadores producen corrientes de 10^{-12} amperios o aun más pequeñas, por lo que los términos ohmicos pueden ser ignorados.

Respecto a los dos potenciales de difusión, su valor absoluto no se puede medir. Más si existe una alta concentración

de KCl en la unión del microelectrodo con el electrodo de plata-clorurada (pellet) así como en el interior del primero, el potencial de difusión es pequeño, ya que los iones presentes poseen la misma movilidad (cloro y potasio).

Estrictamente hablando, el sistema electroquímico no está en equilibrio. Los procesos irreversibles suceden en las uniones líquidas (difusión) mientras que la pequeña corriente eléctrica neta dará lugar a una pequeña generación de calor. El trabajar con electrodos no polarizables da lugar a que la diferencia de potencial $\Delta^2 \psi$ y $\Delta^5 \psi$ sean independientes de la pequeña corriente que fluye en el sistema. La difusión a través de las uniones líquidas puede alterar las actividades iónicas cercanas a la interfase sólido-líquido si se deja al microelectrodo en el interior celular por períodos prolongados de tiempo. Sin embargo, la pérdida de sales es un proceso lento y las reacciones de transferencia de carga en las interfases sólido-líquido (I y V) pueden, en la práctica, considerarse en equilibrio.



por lo que

$$\mu_{\text{Ag}}^{(i)} = \mu_{\text{e}^-}^{(i)} - F \cdot \psi + \mu_{\text{Ag}^+}^{(i)} + F \cdot \psi_2 = \mu_{\text{e}^-}^{(i)} + \mu_{\text{Ag}^+}^{(i)} - F \cdot \Delta^2 \psi$$

donde $\mu_a^{(i)}$ es el potencial químico de la sustancia "a" en la fase "i".

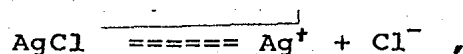
De igual manera, para las reacciones de transferencia de carga en el límite V:

$$\mu_{\text{Ag}}^{(6)} = \mu_{\text{e}^-}^{(6)} + \mu_{\text{Ag}^+}^{(6)} - F \cdot \Delta^5 \psi$$

$$F (\Delta^2 \psi - \Delta^5 \psi) = \mu_{\text{Ag}^+}^{(2)} - \mu_{\text{Ag}^+}^{(6)}$$

ya que el potencial químico de la plata sólida y los electrones están en la misma fase (1 y 6). La concentración de los iones.

plata en las fases 2 y 5 en cambio estan controladas por la reaccion:



por lo que

$$\begin{aligned} M_{\text{AgCl}}^{(1)} &= M_{\text{Ag}^+}^{(2)} + M_{\text{Cl}^-}^{(2)} \\ M_{\text{AgCl}}^{(4)} &= M_{\text{Ag}^+}^{(5)} + M_{\text{Cl}^-}^{(5)} \end{aligned}$$

asi en las condiciones de equilibrio

$$M_{\text{Ag}^+}^{(2)} - M_{\text{Ag}^+}^{(5)} = M_{\text{Cl}^-}^{(5)} - M_{\text{Cl}^-}^{(2)} ,$$

lo que implica que

$${}^1\Delta^2 \varphi - {}^6\Delta^5 \varphi = 1/F \cdot (M_{\text{Cl}^-}^{(5)} - M_{\text{Cl}^-}^{(2)})$$

o en terminos de actividades ionicas

$${}^1\Delta^2 \varphi - {}^6\Delta^5 \varphi = RT/F \cdot \ln (a_{\text{Cl}^-}^{(5)} / a_{\text{Cl}^-}^{(2)}) .$$

Bajo condiciones simetricas, el lado derecho de esta ultima ecuacion debiese ser despreciable, pero bajo condiciones no simetricas, la relacion de las actividades ionicas se aproxima al promedio de las actividades de la sal.

La cobertura del electrodo de plata con cloruro de plata hace al electrodo no polarizable (reversible), que es casi equivalente a retirar el componente capacitivo de la impedancia del electrodo. Así, en contraste con un conductor de plata con propiedades tipicas de un filtro de paso alto, la cobertura de cloruro de plata sobre el electrodo de plata es casi independiente de la frecuencia de d.c., muy por encima de los 30 KHZ (Geddes y Baker, 1968). Por otra parte, el incremento en el área de la superficie arrugada de esta cubierta reduce la resistencia ohmica. Más esta cubierta no debe ser muy gruesa, ya que daría lugar a un incremento de la resistencia de unión,

ello a que la AgCl posee una muy alta resistencia especifica del orden de 10^7 cm. Lo cual es poco deseable, especialmente para el electrodo de referencia.

El liquido en el microelectrodo o en el sostenedor <Holder> (fase 2 en la misma figura) es usualmente una solucion de electrolitos de composicion similar a la que esta en contacto con el electrodo de referencia. Casi siempre se utiliza KCl concentrada que representa la ventaja de reducir la resistencia del electrodo y el potencial de difusion en la micropunta.

Como se puede ver, la mayoria de los problemas con respecto al uso de microelectrodos para medir el potencial celular puede mas o menos solucionarse de manera sencilla, dando lugar a que los problemas con los que uno mas comunmente se enfrenta se relacionan con la punta del microelectrodo, los cuales se deben solucionar en el transcurso de la experimentacion por lo que es de mucha utilidad la experiencia que se va adquiriendo conforme se va desarrollando el trabajo.

Cuando acontece un cambio de soluciones en lo que a concentracion ionica se refiere, tiene lugar un cambio en la composicion ionica que rodea al electrodo de referencia dando origen a un cambio en el potencial de este electrodo respecto a su entorno. Este cambio es importante si se mantiene el electrodo de registro en el interior celular, por lo que se deben de hacer calculos para conocer y asi compensar este cambio, ya que afecta directamente al potencial que se registre. Ahora bien si el cambio de soluciones se lleva a cabo con ambos electrodos, fuera de la celula se puede compensar este corrimiento de manera

electronica simplemente dando lugar a un lapso de tiempo como para que se equilibren las soluciones en las inmediaciones de los electrodos.

Hasta aqui se ha visto que el uso de microelectrodos presenta muchas ambigüedades en lo que al registro se refiere, ya que hay muchas partes del sistema que no se conocen en lo que a potencial se refiere, por lo que algunos autores han puntualizado que hay ambigüedades en los registros bioelectricos debiendose tener cuidado al momento de interpretarse. Pero se debe puntualizar que la informacion relevante se puede obtener por estos metodos, teniendo siempre en concideracion las caractetisticas del sistema (Tasaki y Singer, 1968. citado en Giebisch et.al., 1978). El problema fundamental reside en el conflicto de suponer electroneutralidad al mismo tiempo que exista un campo electrico entre cargas positivas y negativas.

En la figura 22 se presentan arreglos para la obtencion de datos bioelectricos, siendo importante considerar al amplificador <denominado como A> y su relacion con la cadena de electrodo y el aparato para registrar permanentemente la informacion (display).

Una de las entradas del amplificador, usualmente la positiva esta conectada al microelectrodo. Un microelectrodo representa una gran resistencia ohmica, del orden de 10^7 ohms ó mas. El amplificador debe tener una resistencia de entrada de cuando menos 10^8 o, preferiblemente, 10^9 veces la resistencia del electrodo. De no ser asi el voltaje registrado sera atenuado por la division de voltaje entre el electrodo y el amplificador.

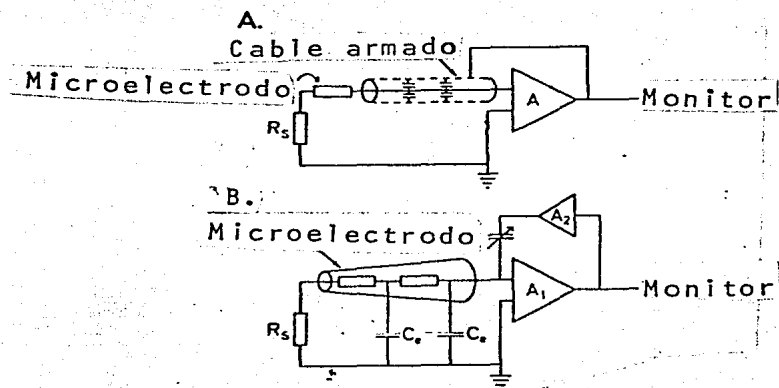


FIGURA 22 .

CARACTERISTICAS COMUNMENTE EMPLEADAS EN LOS SISTEMAS DE REGISTRO BIOELECTRICO .

Triangulos A, A o A simbolizan aplicadores.

(A) representa un director cubierto. (B) a un amplificador de capacitancia negativa usado para compensar la capacidad de entrada del microelectrodo .

Por otra parte, este error dependera de la magnitud relativa de la resistencia del microelectrodo comparada a la resistencia de entrada del amplificador. Como la resistencia de la cadena del electrodo usualmente se incrementa cuando la punta del microelectrodo se introduce al interior celular, la atenuacion debida a una insuficiente resistencia de entrada del amplificador se hara mas grande, dando origen a subestimacion del voltaje de membrana registrado. En los inicios de la electrofisiologia, la construccion de amplificadores de alta resistencia de entrada era dificil teniendo que ser resuelta principalmente por el propio investigador, pero hoy dia este problema se ha visto solucionado gracias al desarrollo de los circuitos integrados en la era de los semiconductores. Un amplificador operacional tipico posee una resistencia de entrada del orden de 10^{13} a 10^{15} ohms. Que es unos ocho ordenes de magnitud mayor que la cadena de resistencias del sistema de registro.

Para evitar perturbacion del potencial de membrana con el electrodo dentro del interior celular y el evitar cambios en el potencial del electrodo, se requieren amplificadores con "fuga de corriente" minima de la entrada a tierra, cosa igualmente solucionada con los amplificadores actualmente disponibles, capaces de generar corrientes de de entrada del orden de 10^{-13} amps. En el caso de un microelectrodo con resistencia de 15 Mohms la variacion en el voltaje del electrodo de referencia sera de menos de 15 microvoltios, muy por debajo del potencial de membrana celular.

Para registrar los cambios bioelectricos se requiere equipo

electrónico con una adecuada respuesta de banda de frecuencia. Este requerimiento está fuertemente influenciado por las diversas capacitancias en el sistema de registro, principalmente entre las entradas del amplificador (incluyendo al microelectrodo) y la tierra. Tales capacitancias de pérdida tenderán a atenuar los cambios en el potencial del interior del microelectrodo. Un caso sencillo sería la división del voltaje entre la capacitancia de membrana y la capacitancia de pérdida en el potencial inicial es importante para la estimación inmediatamente después de la penetración de la célula. El cambio en el potencial inicial es importante para la estimación del potencial de reposo de células únicas. Por ello es deseable el reducir la capacitancia de pérdida tanto como sea posible. Lo anterior se puede lograr de dos formas: con un director cubierto <driven shield>, y un amplificador de capacitancia negativa.

La figura 22 (A) muestra un amplificador con cable blindado de entrada. El blindaje tiene el propósito primario de reducir la influencia de los campos externos sobre el potencial del electrodo de entrada. El cable armado, por otra parte, posee una gran capacitancia al propio electrodo de entrada. Mas una simple conexión de la armadura a tierra agravaría los efectos indeseables de la capacitancia de pérdida. Si, en lugar de ello, el blindaje en todo tiempo se mantiene en un potencial muy cercano a aquel de la entrada de electrodo, la corriente capacitiva de la entrada al blindaje es casi despreciable. En el esquema (A) está conectado a la salida en fase del amplificador.

El amplificador también posee capacitancia de entrada, pero

esta es despreciable en los modernos amplificadores IC ya que es del orden de 0.2 pF.

En las mediciones con microelectrodos el director armado es poco suficiente para garantizar una buena amplitud de banda en el sistema de registro. El microelectrodo se puede representar como un conductor resistivo con capacitancias de perdida distribuidas a tierra (vease esquema (B) en la misma figura). La magnitud de esta capacitancia es del orden de 1 pF por milimetro de inmersión de la punta del microelectrodo. Por razones obvias no es posible el encerrar la micropunta en una armadura conductora, como se discutió para el cable de entrada. Una alternativa de reducir la capacitancia de entrada es el sistema del amplificador de capacitancia negativa. La figura 22 en el esquema (B) resume las características de esta configuración. La señal de salida del amplificador principal es retroalimentada a la entrada del electrodo (no a la armadura) por medio de otro amplificador y un capacitor (retroalimentación positiva). A los cambios en el potencial de la entrada, el asa de retroalimentación positiva acoplada en ac causara un movimiento de carga adicional, proporcional a la tasa original de cambio. Esto puede provocar respuesta regenerativa (oscilación) en el asa que contiene a ambos amplificadores, más si se ajusta adecuadamente, es decir, ajustando la magnitud de C_f , retroalimentación sera, en el caso ideal, solo lo suficiente para compensar el flujo de carga a traves de las capacitancias de fuga. Una completa compensación nunca es posible debido a la alta resistencia del interior del microelectrodo que se encuentra en serie con la capacitancia de

perdida de la punta. Sin embargo, es posible obtener tiempos de desarrollo del orden de 25-50 microsegundos. Esto permite mediciones a células relativamente grandes, mas es insuficiente para medir los potenciales de celulas pequeñas y organelos.

Es conveniente hacer mediciones de la resistencia del microelectrodo antes, durante y despues de la penetración a las células. Al estar la micropunta dentro de la célula se observa un incremento en la resistencia. Este incremento extra es, en algunos casos, una medida directa de la resistencia de membrana. En otros casos, la fuga de corriente en la membrana causada por el daño que haga la micropunta al penetrar a la célula, hara que se pierda resistencia, debido a que este el daño, alrededor de la micropunta, posee menor resistencia que el resto de la membrana. Sin embargo, el probar la resistencia nos permite conocer si ya se ha penetrado a la célula o si se tienen problemas con la penetración, ya que se observa que cuando existe mucho tejido conjuntivo alrededor de las células la resistencia cambia aun sin haber penetrado a las mismas; o bien, cuando se tiene que la micropunta no puede penetrar por alguna razon, tambien la resistencia tiende a cambiar. De tal manera que el checar la resistencia del microelectrodo nos permite saber las condiciones en las que se encuentra tanto respecto a la celula como sus características de trabajo, vease mas adelante.

El típico microelectrodo para el registro del potencial intracelular esta hecho de vidrio Pyrex o algun otro tipo de tubo de borosilicato. Este vidrio posee la característica de ser resistente, mecánicamente hablando, y soporta sin romperse cambios importantes en la temperatura, como se vera sucede en la

en la elaboración de los mismos. Por otra parte, la delgada pared de la punta del microelectrodo es menos conductora y posee menores cargas de superficie que las micropipetas hechas de vidrio común de similares dimensiones. La baja solubilidad de el vidrio de borosilicato y sus pocas cargas de superficie parecen estar relacionadas de manera importante en el minimizar el llamado potencial de punta.

El diametro externo del tubo de vidrio empleado para la elaboracion de microelectrodos es de 0.7 a 2 mm. El microelectrodo se produce al calentar la parte media del tubo, ya sea por flama o por calentamiento desde un anillo de metal en algun tipo de instrumento automático o semiautomático para jalarlo una vez que este lo suficientemente caliente como para hacerse suave. Una vez estando plástico la maquina "jala" de manera homogénea, ambos extremos; este jalón ocurre generalmente en dos pasos: uno inicial suave y otro brusco final. En la mayoría de las máquinas uno de los extremos del tubo se mantiene fijo respecto al alambre de calentamiento, mientras que el otro extremo es retirado de la zona del alambre por el último tirón, esto es importante ya que el retirar el microelectrodo de la zona de calentamiento evita la oclusión de la punta, aun si la corriente se corta al alambre al momento del tirón. También es importante que la micropunta se enfrie rapidamente para evitar que sufra deformaciones longitudinales, siendo ellas no atribuibles a que el tubo estuviese sucio antes de sufrir el proceso, por lo que muchas maquinas automaticas <puller> para hacer los microelectrodos, poseen sistemas de enfriamiento

rápido, como es el aplicar pequeñas cantidades de nitrógeno. Con estos sistemas se pueden obtener diámetros de punta del orden de 0.1 a 0.5 micras, y ángulos de agudeza del orden de 5 a 15 grados. La magnitud de estos diámetros de punta están muy por debajo del límite de resolución del microscopio óptico de inmersión por lo que algunos investigadores estiman la calidad del microelectrodo en su punta mediante su resistencia. Este procedimiento puede dar una impresión errónea que los electrodos de alta resistencia poseen puntas muy agudas. La única manera segura de estimar los diámetros de punta es mediante electromicroscopia, donde la punta se baña con oro para evitar así la formación de "corona" a su alrededor y consecuentes distorsiones en la imagen obtenida.

El llenado de las micropipetas es un paso crucial en el proceso de fabricación de los microelectrodos. La publicación original de Ling y Gérard (1949) describe como el aire en las micropipetas fue remplazado por KCl en solución durante burbujeo vigoroso y evaporación gradual del agua de la solución, en la cual los microelectrodos estaban inmersos. Una adición final de una solución de KCl fría completaba el proceso. Los microelectrodos elaborados de esta manera mostraban resistencias variables y considerables potenciales de punta. Por ello Nastuk (1953) llenó las micropipetas sumergiéndolas en una solución 3M de KCl muy bien filtrada por dos horas. La aguda punta del microelectrodo se llenaba por acción capilar así como el retiro de burbujas remanentes se hacía con una hebra de vidrio muy fina que se introducía en su interior. El uso de soluciones 3 M de KCl introducido por Nastuk y Hodgkin (1950), reduce la

resistencia del microelectrodo y reduce los cambios en el potencial de unión líquida en su punta, al cambiar a esta última de la solución extracelular al citoplasma.

Por las casi iguales movibilidades de los iones potasio y cloro en la solución (y a la alta concentración de ellos en el interior de la micropipeta) se producen pequeños potenciales de unión líquida. Más los procedimientos de llenado por burbujeo de los electrodos, o bien, su almacenaje por tiempo prolongado en soluciones salinas produce la aparición de potenciales de punta. Este fenómeno es la diferencia de potencial registrado con un electrodo intacto y el mismo con la micropunta rota. Por otra parte se observa un mayor potencial de punta a mayor resistencia de los electrodos. El potencial de punta es importante porque distorciona las mediciones del potencial de membrana registrado. Es conveniente el utilizar procedimientos para el llenado de los microelectrodos que eviten el desarrollo de este fenómeno. A este respecto se han diseñado diversos procedimientos que evitan su aparición; como es el de poner una gota de agua destilada en el interior del electrodo de forma tal que aplicando calor al exterior del tubo, el agua se evapore alcanzando la micropunta, posteriormente el microelectrodo se llena con la solución de electrolito a utilizar (generalmente KCl 3M) y se deja equilibrar. Hay que decir aquí que el principal problema para el llenado de las micropipetas es la tensión superficial de las paredes internas del tubo, ya que conforme se agudiza la punta llega a un punto tal que impide el movimiento de una solución a lo largo de la micropunta.

En 1968 Tasaki et.al. reportaron un metodo para el llenado de los microelectrodos, sin ponerlos en contacto con soluciones de algun tipo. Esto se logra por la insercion de fibras delgadas de vidrio en el interior del tubo de borosilicato antes de fabricar el microelectrodo. Una vez producida la micropipeta se inyecta la solución electrolítica, la cual alcanza rápidamente la punta sin problemas de tension superficial. Este procedimiento presenta la gran ventaja que no es necesario esperar para que se llenen los electrodos, pudiendose asi utilizar al momento de prepararlos. De tal manera que toma menos de tres minutos obtener un electrodo útil aun en el transcurso de un experimento con un rendimiento de hasta el 99%.

La medición del voltaje de membrana operacionalmente consiste en cuatro pasos: 1) Registrar la diferencia de potencial entre los electrodos asi como su resistencia, conociendo asi que tan bueno es para hacer el registro. Hay que decir aqui que si la resistencia del electrodo es alta se tiende a incrementar el efecto de antena del mismo, incrementandose por ello los 60 ciclos de ruido en los registros. Tambien, un incremento en la resistencia provoca que el sistema de registro se haga mas lento respecto a los cambios en el potencial de membrana rapidos (potencial de acción), dando una subestimacion de la magnitud del mismo. 2) Anular la diferencia de potencial entre los electrodos electrónicamente, estando asi listos para evaluar el potencial celular. Anular como sea posible el ruido de 60 ciclos, lo cual se puede hacer implementando una campana de Faraday. Y por último incrementar la velocidad de respuesta del sistema, lo cual se hace electrónicamente; ahora bien, a mayor

velocidad se obtiene más ruido, de tal manera que es recomendable utilizar una velocidad de respuesta baja, siendo siempre posible si se utilizan electrodos de relativamente baja resistencia (20Mohms). 3) Introducir el microelectrodo en la célula, obteniendo el registro correspondiente, tanto para el potencial de reposo como para el potencial de acción. 4) Habiendo hecho lo anterior se retira el microelectrodo del interior celular y se evalúa una vez más el potencial entre los electrodos así como su resistencia, lo cual es importante si se desea reutilizar el microelectrodo en otro registro, ya sea para la misma célula o una diferente, tanto en las mismas o diferentes condiciones. Un incremento en el voltaje entre los electrodos nos representa que el electrodo no es estable, dándonos como resultado que el registro obtenido es poco confiable. Si se observa un decremento en la resistencia nos indica que la micropunta está rota, siendo en el peor de los casos necesario retirar el microelectrodo y utilizar uno nuevo. Si se observa un incremento pronunciado de la resistencia nos indica que la micropunta está tapada, ello generalmente acompañado de oscilaciones muy pronunciadas y rápidas en el potencial entre los electrodos.

Si todo sale bien, y en buenas condiciones es posible hacer hasta 10 registros antes que sea necesario cambiar el microelectrodo.

Aunque el proceso parece simple en principio, existen gran cantidad de dificultades prácticas en el paso crucial de penetrar la membrana citoplasmática, ya que el introducir la micropunta debe ser de manera suave como para evitar vibraciones que horaden

a la membrana (ello se puede solucionar usando todo el sistema con un amortiguador de vibraciones). Tambien es necesario el solo introducir la micropunta, ya que a mayor penetracion puede suceder que se abocarde mas la membrana o bien, dado que casi no se tiene idea de la posición de la micropunta, que se atravesase a la célula y se perfore otra. Tambien, si existe tejido conjuntivo, la penetracion pudiese ser no tan suave como se desea (todo lo anterior se soluciona utilizando micromanipuladores para controlar avances pequeños y lentos del microelectrodo).

Como la punta del microelectrodo penetra la membrana celular, la superficie hidratada de la primera provee un medio conductor de baja resistencia que da lugar a fugas del voltaje registrado. Por otra parte, si el tamaño de separacion entre la micropunta y la membrana es grande puede dar lugar a cambios en las concentraciones internas de la célula así como en la inmediata superficie de la célula en registro. De tal manera que es importante la formación de un sello, lo más perfecto posible entre el electrodo y la membrana celular. Ello se logra utilizando electrodos suficientemente finos, con penetración rápida y sin vibraciones. Aunque podemos pensar que la formación de tales sellos no es perfecta, la información relevante se puede obtener siendo restringido por las usuales limitaciones del sistema. Muchas veces ocurre que al introducir la micropunta en una célula se registra un buen potencial de reposo (-80 a -95 mV.) pero con el transcurso del tiempo se observa un decaimiento en dicho potencial, ello se puede atribuir a que no existe un

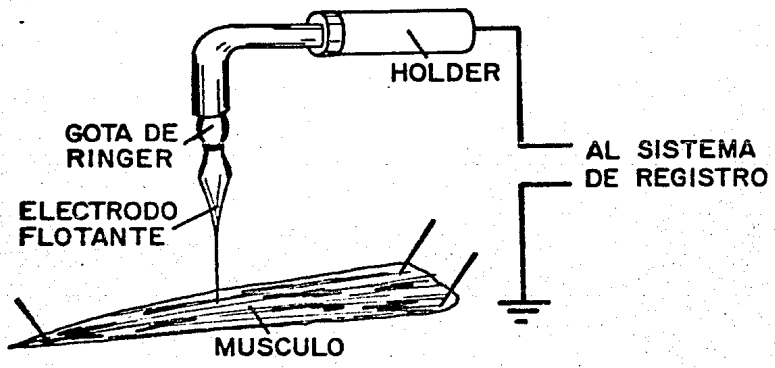
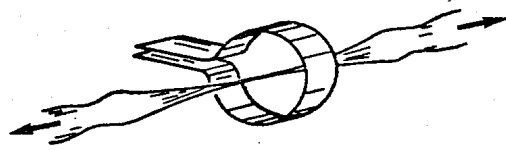
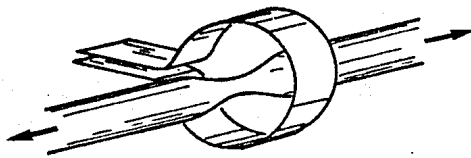
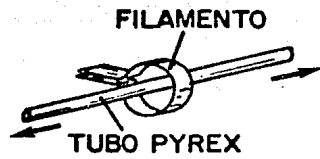
buen sello. Puede ocurrir que con el transcurso de un cierto tiempo, (segundos a minutos) este se forme.

El utilizar microelectrodos de vidrio llenos con KCl en alta concentracion (3 M) permite obtener valores del potencial de membrana de 78 a 93 mV, valores que se piensa son reales. Este tipo de electrodos poseen potenciales de union liquida de -2.6 mV. (Hironaka & Morimoto, 1979).

ELECTRODOS FLOTANTES.

La célula muscular es una de tipo excitable cuya respuesta a la estimulación es la generación de un potencial de acción, así como el desarrollo de tensión gracias a los procesos involucrados en el acople excitación-contracción. El desarrollo de este último fenómeno imposibilita, de manera sencilla, el registro de los cambios eléctricos que acontecen en el sarcolema ya que los electrodos, o se salen de la fibra, perdiendo el registro, o bien, al moverse la célula provocan un agujero que determina una caída en el voltaje registrado. Por ende, se debe de procurar el evitar el desarrollo de tensión, lo cual se logra de distintas maneras: a) Por la aplicación de soluciones hipertónicas, que según Hodgkin y Horowitz (1957) no alteran las propiedades eléctricas de las fibras. b) Provocando el desacople excitación-contracción al detubular con glicerol. c) Reducir el movimiento al estirar a las fibras hasta longitudes tales que la interacción de los elementos contráctiles sea mínima. d) Utilizar electrodos (denominados flotantes) que se muevan junto con la fibra.

Dentro de este último tipo de procedimientos podemos



mencionar dos clases, a saber: aquellos en que la cabeza del microelectrodo se mantiene unida al resto del mismo por un plástico que presenta muy poca resistencia al movimiento lateral; y aquellos en que el microelectrodo se mantiene suspendido de una gota de solución conductora. Este último tipo de microelectrodos, los cuales se utilizaron en parte de los experimentos aquí presentados, fueron ingeniosamente diseñados por F. Colomo y P. Rocchi en 1965, que consisten en hacer una gota de vidrio invertida cuya cola se prolonga hasta convertirse en la punta de un microelectrodo (vease esquema adjunto). La parte gorda de la gota se suspende, por tensión superficial, a una gota de solución de ringer normal que pende de un puente de agar lleno de solución de cloruro de potasio 3 M. Este último, se encuentra sujeto al detenedor <holder> de electrodos. Para el presente trabajo se vio que estos electrodos se salen espontáneamente de las fibras, no tanto porque no se muevan con ellas, sino que el agua de la gota de solución normal se evapora dando lugar al ascenso del microelectrodo que termina por salirse. Haciéndose necesario el evitar el desarrollo de este fenómeno, que una vez controlado da origen a electrodos altamente eficientes y relativamente fáciles de utilizar en músculos enteros.

EL TETRAETILAMONIO

El tetraetilamonio es un ion amonio cuaternario que posee una variedad de efectos farmacológicos que se pueden dividir en dos clases; la primera se desarrolla debido a que por ser un ion amonio cuaternario puede antagonizar o mimetizar las funciones de otros iones de igual tipo (particularmente Colina y Acetilcolina) que existen en condiciones fisiológicas. El segundo grupo de efectos se relaciona a la habilidd del TEA para afectar los mecanismos de permeabilidad o transporte de pequeños cationes, principalmente el potasio. Tal es su accion bloqueadora al canal que se encuentra en la placa neuromuscular activada por acetilcolina permeable al sodio y al potasio que es independiente de alguna reaccion entre el amonio cuaternario y el receptor del neurotransmisor siendo mas bien de tipo dependiente del potencial ya que se incrementa el efecto con la hiperpolarizacion. El tetraetilamonio actua sobre sitios que se relacionan de manera directa con la excitabilidad electrica, bloqueando de manera especifica, las vias de permeabilidad al potasio tanto en nervio, musculo y estructuras sensoriales. El bloqueo selectivo del TEA por estas vias se atribuye a que su diametro es parecido a aquel del ion potasio hidratado (0.8 nm y 0.46 nm respectivamente). El desarrollo del bloqueo depende de una previa apertura de los canales de potasio por lo que el bloqueo adquiere características de dependencia con el voltaje, ya que la apertura de los canales es dependiente del voltaje siendo en relacion 1:1, es decir un canal es bloqueado por una molecula de TEA.

En el músculo esquelético la conductancia al potasio es

compleja, ya que se encuentran, al menos, tres (y posiblemente cuatro) tipos de canales de potasio distintos. Una retardada, activada por la despolarización que regresa, conjuntamente con la inactivación de la conductancia al sodio, al potencial de reposo a la membrana durante el potencial de acción (Adrian et.al. 1970a). Por otra parte, el potencial de reposo está determinado en gran medida por una conductancia a potasio independiente descrita primeramente por Katz (1949), confirmada por Hodgkin & Horowitz (1959). Una tercera se activa lentamente con la depolarización (Adrian et.al 1970) la cual pudiese estar constituida por dos elementos distintos. Uno dependiente del potencial de membrana presente en fibras con alto EGTA interno (Almers & Palade, 1981) y otro dependiente de la concentración de calcio liberado del retículo en la despolarización.

CAFEINA

Una manera de incrementar la concentración de calcio interna en la fibra muscular es por el uso de cafeína. Esta sustancia es un alcaloide (Metil-Xantina) extraído de diversas plantas como Paullinia spp., Ilex spp., Thea spp. y Coffea spp. entre otras, capaz, a bajas concentraciones (3 mM), de incrementar de manera moderada la concentración basal de calcio citoplasmática desde 0.12 a 0.31 μM sin producir contractura (Lopez et.al., 1983 y 1984), [vease mas adelante]. Además no altera las propiedades eléctricas de la membrana y, en particular, no altera al potencial de acción (Axelsson & Thesleff, 1958; Delay et.al., 1986), dejando intacto al sistema actomiosina (Korey, 1950; Hasselbach, 1953; in Luttgau & Oetliker, 1968). Por otra parte, si la fibra se estimula eléctricamente bajo concentraciones pequeñas de cafeína, es capaz de potenciar la sacudida simple, atribuyéndose a un incremento en la cantidad de calcio liberada desde el retículo. Ahora, si se aplica a altas concentraciones, se observa que es capaz de producir contractura. El calcio adicional, se sabe, proviene de fuentes intracelulares, ya que la supresión del calcio externo provoca iguales incrementos en su concentración interna (Luttgau & Oetliker., 1968; Delay et.al., 1986). Respecto a su modo de acción, la información que se encuentra en la literatura es confusa, ya que hay datos que parecen indicar que sus efectos son mediante interacción con alguna parte del sistema sarcotubular, el cual es fácilmente accesible a los iones externos y drogas por su fuerte conexión

con la membrana superficial (Luttgau & Oetliker, 1968), por lo que el sistema tubular y la cisterna terminal del reticulo sarcoplasmico serian los sitios mas probables de accion de la droga (Sandow, 1965). Sin embargo Bianchi (1960) encontro que la cafeina marcada es capaz de cruzar facilmente las membranas celulares e incluso (in vitro), es capaz de provocar la liberacion de calcio de fracciones microsomales aisladas del reticulo sarcoplasmico que parecen provenir desde las cisternas terminales (Weber A. & Herz, 1968). De tal manera que parece factible la existencia de dos sitios de accion de la droga. La primera, de manera indirecta en la pared tubular del sistema T o bien, la segunda, la cual actua directamente con el mecanismo de transporte de calcio en las membranas de la cisterna terminal, implicando que la accion del alcaloide puede ser controlada, en una cierta magnitud, por procesos que se llevan a cabo en la pared del sistema tubular (Luttgau & Oetliker, 1968). Para los anteriores autores la segunda alternativa les parecio mas factible ya que encontraron: a) Una similitud entre el tiempo medio del desarrollo de tension, asi como de su caida, al añadir o retirar la droga con el tiempo de difusion calculado para iones y moleculas pequenas en el sistema tubular. b) El incremento en la cantidad de ion calcio o magnesio externo que suprime parcialmente las contracturas con el alcaloide, donde la velocidad de accion de los iones sugiere su accion en las paredes del sistema T. c) La tetracaina actua antagonisticamente a la cafeina cuya accion es competitiva y por su velocidad de accion, parece actuar a nivel de la pared membranal ya mencionada. d) La amplitud de las contracturas con cafeina depende del potencial de

membrana, lo cual favorece como sitio de acción al sistema tubular por su papel implicado en el acople. e) El experimento, al parecer contradictorio al de Herz & Weber (1965) de la liberación de calcio (in vitro) de fracciones microsomales pesadas del retículo, parece contener triadas intactas, por lo que pudiese ser necesaria la presencia de estas triadas para su acción, ya que Suzuki (1962) demostró que el músculo cardíaco de la rana no produce contracturas inducidas por cafeína y este músculo carece de triadas. Sin embargo, ninguno de estos argumentos excluye de manera concluyente la acción de la droga en el sistema longitudinal (Luttgau & Oetliker, 1968).

Existe otro trabajo publicado por W. R. Thorpe & P. Seeman (1971), realizado con músculo esquelético de conejo en el que aislaron una preparación del gastrónemio y al comparar los efectos de la cafeína con aquellos de la tetracaina se concluye que la acción de la primera es sobre el retículo sarcoplásmico, mientras que la segunda es a nivel del sarcolema. Por su parte, M. Delay et.al. (1986), concluyen que el probable sitio de acción del alcaloide es a nivel del acople excitación-contracción ya que provoca un incremento en la liberación de calcio, desde el retículo sarcoplásmico al sarcoplasma, al ser estimulada la fibra, y un corrimiento en la dependencia con el voltaje de la liberación de calcio desde el retículo hacia valores menos positivos.

Las medidas de la concentración de calcio interna en reposo, bajo la aplicación de 3 mM de cafeína son contradictorias, ya que en el trabajo de M. Delay et.al. (1986)

se presentan resultados en los que la cantidad de calcio citoplasmático en reposo es igual que aquel bajo condiciones normales ya que no observaron contractura, y el nivel basal de absorbancia de cualquiera de los colorantes que usaron no cambia respecto a las condiciones normales. Por su parte, en el trabajo de Lopez et.al (1983,1984) bajo condiciones de reposo, observaron un incremento desde 0.12 a 0.31 μM al aplicar 3 mM del alcaloide. La razón de la discrepancia entre ambos autores pudiese ser la manera en que se hicieron las medidas. M. Delay et.al (1986) utilizaron, para fibra cortada, colorantes metalocromicos de calcio (Antypyralazo III y Arsenazo III), mientras que Lopez et.al (1983,1984) utilizaron fibra entera, haciendo las medidas con electrodos sensibles a iones. A nuestro interes pudieran ser mejores las medidas de Lopez et al., por el simple hecho de ser condiciones "mas fisiologicas", ya que Delay et al. ademas de usar fibra cortada, aplican en la solucion interna EGTA conjunto con el colorante, mas se carece de criterios suficientes como para decir cual metodo es mejor para la evaluacion de la concentracion de este ion divalente.

BIBLIOGRAFIA

- ADRIAN R.H., CHANDLER W.K. and HODGKIN A.L. (1970a): Voltage Clamp experiments in striated muscle fibres. J. Physiol. 208:607 - 644.
- ADRIAN R.H., CHANDLER W.K. and HODGKIN A.L. (1970b): Slow changes in Potassium Permeability in Skeletal Muscle. J. Physiol. 208: 645 - 668.
- ADRIAN R.H. and PEACHEY L.D. (1973). Reconstruction of the Action Potential of Frog Sartorius Muscle. J. Physiol. 235: 103 - 131.
- ALMERS W. (1980). Potassium concentration changes in the transverse tubules of vertebrate skeletal muscle. Federation Proc. 39: 1527 - 1532.
- ALMERS W., PALADE P.T. (1981a). Slow Calcium and Potassium currents across frog muscle membrane: measurements with a vaseline-gap technique. J. Physiol. 312 : 159 - 176.
- ALMERS W., FINK R. & PALADE P.T. (1981b). Calcium Depletion in Frog Muscle Tubules: the decline of Calcium current under maintained depolarization. J. Physiol. 312: 177 - 207.
- AMSTRONG, C.M. and BEZANILLA F., (1977). Inactivation of the Sodium channel. II. Gating current experiments. J. gen. Physiol. 77: 567 - 590.
- ARREOLA J., CALVO J., GARCIA M.C., & SANCHEZ J.A. (1986). Modulation of Calcium Channels of Twitch

- skeletal muscle fibres of the Frog by Adrenaline and Cyclic AMP. (In press).
- AXELSSON, J. & THESLEFF, S. (1958). Activation of the contractile mechanism in striated muscle. *Acta Physiol. Scand.* 44:55-66.
 - BARRETT J.N., BARRET E.F. and DRIBIN L.B. (1981) Calcium-Dependent Slow Potassium Conductance in Rat Skeletal Myotubes. *Developmental Biology* 82: 258 - 266.
 - BARRETT J.N., MAGLEBY K.L. & PALLOTTA B.S., (1982) Properties of single Calcium-activated Potassium Channels in cultured rat muscle. *J. Physiol.* 331:211-230.
 - BEATY, G.N. & STEFANI E., (1976) Calcium dependent electrical activity in twitch muscle fibres of the frog. *Proc. R. Soc. London. B* 194: 141-150.
 - BENGA G., and HOLMES R.P. (1984) Interactions between components in biological membranes and their implications for membrane function. *Prog. Biophys. molec. Biol.* 43.: 195-257.
 - BEZANILLA Francisco., (1985) Gating of Sodium and Potassium Channels. *J. Membrane Biol.* 88, 97 - 111 (1985).
 - BEZANILLA F. and AMSTRONG C.M. (1977). Inactivation of the Sodium Channel. I. Sodium current experiments. *J. gen. Physiol.* 70: 549 - 566.
 - BLATZ A. L. & MAGLEBY K. L. (1986) Single apamin-blocked Ca-activated K channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 323: 718-720.

- BIANCHI C.P. (1960). The effect of Caffeine on Radiocalcium movement in frog sartorius. J. gen. Physiol. 44:845-858.
- BIANCHI C.P. (1962) Kinetics of radiocaffeine uptake and release in frog sartorius. J. Pharmacol. 138: 41.
- CHIARANDINI D.J., SANCHEZ J.A. & STEFANI E. (1980). Effect of Calcium Withdrawal on Mechanical Threshold in Skeletal Muscle Fibres of the Frog. J. Physiol. 303:153-163.
- COGNARD C., TRAORE F., POTREAU D., and RAYMOND G. (1984). Effects of Apamin on the outward potassium current of isolated skeletal muscle fibres. Pflugers Archiv 402: 222 - 224.
- COLOMO F. and ROCCHI P. (1965). Staircase effect and post-tetanic potentiation in frog nerve-single muscle fibre preparations. Archo. Fisiol. 64: 189-266.
- COTA G. & STEFANI E. (1986). A fast-activated inward Calcium current in twitch muscle fibres of the frog (Rana montezume). J. Physiol. 370: 151 - 163.
- DELAY M., RIBALET B., & VERGARA J., (1986). Caffeine potentiation of Calcium release in frog skeletal muscle fibres. J. Physiol. 375:535-559.
- ENDO MAKOLO (1977) Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol. Revs. 57 No.1,:71-108
- EWALD D.A., WILLIAMS A., & IRWIN LEVITAN (1985). Modulation of single Ca-dependent K-channel activity by protein phosphorylation. Nature 315: 503 - 506.

- FINK R. & LUTTGAU H.C. (1976) An evaluation of the membrane constants and the potassium conductance in metabolically exhausted muscle fibres. J. Physiol. 263: 215-238.
- FLATMAN Peter W. (1984). Magnesium Transport across Cell Membranes. J. Membrane Biol. 80: 1 - 14.
- FRANK G. B. (1957). Negative After Potentials of Frog's Skeletal muscle. J. of Neurophysiology 20: 602 - 614.
- FRANK G.B. (1962) Utilization of bound calcium in the action of caffeine and certain multivalent cations on skeletal muscle. J. Physiol. 163:254-268.
- FREYGANG W.H. Jr., GOLDSTEIN D.A., HELLAM D.C. (1964a). The After-Potential that follows trains of impulses in frog muscle fibers. J. Gen. Physiol. 47: 929 - 952.
- FREYGANG W.H. Jr., GOLDSTEIN D.A., HELLAM D.C. & PEACHEY L.D. (1964b). The Relation Between the Late After Potential and the Size of the Transverse Tubular System of Frog Muscle. J. gen. Physiol. 48: 235 - 263.
- FREYGANG W.H. Jr., RAPOPORT S.I., and PEACHEY (1967). Some Relations between Changes in the Linear Electrical Properties of Striated Muscle Fibers and Changes in Ultrastructure. J. gen. Physiol. 50: 2437 - 2458.
- GAGE P.W., and EISENBERG R.S. (1969). Capacitance of the Surface and Transverse Tubular Membrane of Frog Sartorius Muscle Fibers. J. gen. Physiol. (1969). 53: 265 - 278.
- GAGE P.W., and EISENBERG R.S. (1969b). Ionic Conductances of the Surface and Transverse Tubular

- Membranes of Frog Sartorius Fibers. J. gen. Physiol. (1969) 53: 279 - 310.
- GHASSAN BKAILY, SPERALAKIS NICK, RENAUD JEAN-FRANCOIS & PAYET MARCEL D. (1985). Am. J. Physiol. 248: H961-H965.
- GEDDES L.A. and BAKER L.E. 1968. Principles of Applied Biomedical instrumentation. John Wiley & Sons., Inc. New York.
- GIEBISCH G., TOSTESON D.C. & USSING H.H. (ed.); Membrane transport in Biology. Vol. 1. Springer-Verlag Berlin. 1978.
- GONZALES-SERRATOS H., VALLE-AGUILERA R., LATHROP D.A. & GARCIA M.C. (1982) Slow inward Calcium Currents have no obvious role in frog twitch muscle excitation-contraction coupling. Nature 298: 292 - 294.
- GORDON A.M. & GODT R.E., (1970). Some effects of Hypertonic Solutions on Contraction and Excitation-Contraction Coupling in Frog Skeletal Muscles. J. gen. Physiol. 55: 254 - 275.
- HAGIWARA S. and WATANABE A. (1955). The effect of Tetraethylammonium chloride on the muscle membrane examined with an intracellular microelectrode. J. Physiol. 129:513-527.
- HENDERSON, R. (1981). In, Membranes and Intercellular communication. (Balian R., Chabre M. & Devaux Ph.F. eds.) p. 232. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- HERMANN A. & GORMAN A.L.F. (1981) Effects of

Tetraethylammonium on potassium currents in a Molluscan Neuron. J. gen. Physiol. 78* 87-110.

- HILLE Bertil.,(1977). Ionic basis of resting and action potentials. In Handbook of Physiology V.I, part.1, sec. 1. Amer. Physiol. Soc. Bethesda, Maryland.

- HILLE Bertil.,(1984). Ionic Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates Inc. Publishers. Massachusetts.

- HILLE B. & CAMPBELL D.T., (1976) An improved Vaseline Gap Voltage Clamp for Skeletal Muscle Fibers. J. gen. Physiology, 67: 265-293.

- HIRONAKA T. and MORIMOTO Sh. (1979). The resting membrane potential of frog sartorius muscle. J. Physiol. 297: 1 - 8.

- HODGKIN A.L. and HOROWICS P. (1957). The differential action of hipertonic solutions on the Twitch and action potential of muscle fibre. J. Physiol. (London). 136; 17P.

- HODGKIN A.L. and HOROWICZ P. (1959). The influence of Potassium and Chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. J. Phisiol. 149, 127-160.

- HOMSHER E., BRIGGS F.N. & WISE R.M. (1974). Effects of hypertonicity on resting and contracting frog skeletal muscles. Amer. J. of Physiology 226: 855 - 863.

- HUGUES M., ROMÉY G., DUVAL D., VINCENT J.P. & LAZDUNSKI (1982). Apamin as a selective blocker of the Calcium-dependent potassium channel in Neuroblastoma cells: Voltage-clamp and biochemical characterization of

- the toxin receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1308-1312, February.
- INOUE R., KITAMURA K., & KURIYAMA H. (1985). Two Ca-dependent K-channels classified by the application of Tetraethylammonium distribute to smooth muscle membranes of the rabbit portal vein. Pflugers Arch. (1985)405:173-179.
 - IWATSUKI N. & PETERSEN O.H. (1985). Action of Tetraethylammonium on Calcium-Activated Potassium Channels in Pig Pancreatic Acinar Cells Studied by Patch-Clamp Single-Channel and Whole-Cell Current Recording. J. Membrane Biol. 86:139-144 (1985).
 - KATZ B. (1949). Les constantes'electriques de la membrana du muscle. Arch. Sci. Physiol. 3:285-299.
 - KIRSCH G.E., NICHOLS R.A., and NAKAJIMA S. (1977). Delayed rectification in the transverse tubules; Origin of the late after potential in frog skeletal muscle. J. Gen Physiol. 70: 1 - 21.
 - LATORRE R., VERGARA C., HIDALGO C. (1982) Reconstitution in planar bilayers of a Ca-dependent K channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 805-809; February.
 - LATORRE R, and MILLER Ch. (1983). Conduction and selectivity in Potassium Channels. J. Membrane Biol. 71: 11-30.
 - LAZDUNSKI MICHAEL (1983) Apamin, a neurotoxin specific

for one class of Ca-dependent K channels. *Cell Calcium* 4: 421-428.

LING, G. and GERARD, G.W.: *J. cell. comp. Physiol* 34, 383 (1949).

- LOPEZ J.R., ALAMO L., CAPUTO C., VERGARA J. & DIPOLO R. (1983). Determination of ionic calcium in frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 43:1-4.

- LOPEZ J.R., ALAMO L., CAPUTO C., VERGARA J. & DIPOLO R. (1984). Direct measurement of intracellular free magnesium in frog skeletal muscle using Magnesium-selective microelectrodes. *Biochimica et Biophysica Acta* 804:1-7.

- LUTTGAW H.C. & OETLIKER H. (1968) The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres. *J. Physiol.* 194: 51 - 74.

- McCLESKEY E.W. and ALMERS W. (1985). The Ca channel in Skeletal muscle is a large pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 7149 - 7153.

- MILLER CH., MOCZYDLOWSKI E., LATORRE R. & PHILLIPS M. (1985). Charibdotoxin, a protein inhibitor of single Ca-activated K channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313: 316-318.

- MOCZYDLOWSKI E. & LATORRE R. (1983). Gating kinetics of Ca-activated K channels from rat muscle incorporated into Planar Lipid Bilayers. *J. gen. Physiol.* 82: 511-542.

NASTUK, W.L.: *J. cell. comp. Physiol* 42, 249 (1943).

- NASTUK, W.L. and HODGKIN A.L.: *J. cell. comp. Physiol.*

- 35, 39s (1950).
- NICOLA SIRI L. SANCHEZ J.A. and STEFANI E. (1980). Effect of Glycerol treatment on the Calcium current of frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 305: 87 - 96.
 - PERSSON Anders (1963). The negative After-Potential of frog Skeletal Muscle Fibres. *Acta Physiologica Scandinavica* 58, suplementum 205, 1 - 31.
 - RENAUD J-F., DESNUELLE C., SCHMID-ANTOMARCHI H., HUGUES M., SERRATRICE G. & LAZDUNSKI M. (1986). Expression of Apamin receptor in muscles of patients with myotonic muscular dystrophy. *Nature* 319:678 - 680.
 - ROMÉY G., LAZDUNSKI M. (1984). The Coexistence in Rat muscle cells of two distinct classes of Ca²⁺-dependent K Channels with different Pharmacological properties and different physiological functions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 118 No. 2: 669 - 674.
 - ROSEMBLATT M., HIDALGO C., VERGARA C. and IKEMOTO N. (1981). Immunological and Biochemical Properties of Transverse Tubule Membranes Isolated from Rabbit Skeletal Muscle. *J. Biological Chem.* 256: 8140 - 8148.
 - RUCH TH., & PATTON H.D. <eds.> (1982). *Physiology and Biophysics*. Twentieth edition. W. B. Saunders Company. Philadelphia.
 - RUDEL R. & LEHMANN-HORN F. (1985) Membrane changes in cells from Myotonia Patients. *Physiological Reviews* 65: 310-356.
 - SALDANA BERNAL PATRICIO LAURO (1981) Propiedades

- mecanicas de las fibras musculares lentas del Pollo. Tesis. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico.
- SANCHEZ RODRIGUEZ J. A. (1980) Analisis de la corriente de calcio en fibras musculares esqueléticas del anfibio. Tesis Doctoral. Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional. Mexico.
 - SANCHEZ J.A. and STEFANI E. (1978). Inward Calcium current in twitch muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 283: 197 - 209.
 - SANCHEZ J.A. and STEFANI E. (1983). Kinetic Properties of Calcium channels of twitch muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 337: 1 - 17.
 - SHIPOLINI R.A. (1984). Biochemistry of Bee Venom., in TU T.A. (editor). *Insect Poisons, allergens and other invertebrate Venoms. Hand book of Natural Toxins. V II., Ch. 2: 49-84.* Marcel Dekker, Inc. New York.
 - SMITH C.D., PHILLIPS M. & MILLER C. (1986a). Purification of Charybdotoxin, a specific inhibitor of high conductance calcium activated potassium channels. In: *Abstracts of the Society for Neuroscience, 16th annual meeting, pt. 2, Washington D.C., November 9 - 14, pp. 1199.*
 - SMITH C.D., PHILLIPS M. & MILLER C. (1986b). Purification of Charybdotoxin, a specific inhibitor of high-conductance Ca-activated K channel. *J. Biol. Chem.* 261: No. 31, 14607 - 14613.
 - SQUIRE J., (1981) The structural basis of muscular

contraction. Plenum Press.

- STANFIELD P.R. (1970a). The effect of the Tetraethylammonium ion on the delayed currents of frog skeletal muscle. *J. Physiol.* (1970) 209:209-229.
- STANFIELD P.R. (1970b). The differential effects of Tetraethylammonium and Zinc ions on the resting conductance of frog skeletal muscle. *J. Physiol.* (1970). 209:231-256.
- STANFIELD P.R. (1983). Tetraethylammonium Ions and the Potassium Permeability of Excitable Cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 97:1-67.
- SUZUKI, K. (1962). Studies on the mechanism of the excitation-contraction coupling in cardiac muscle, with special reference to the caffeine contracture. *Jap. J. Physiol.* 12:186-199.
- TRAORE F., COGNARD CH., POTREAU D., & RAYMOND G. (1986). The apamin-sensitive Potassium current in frog skeletal muscle: its dependence on the extracellular calcium and sensitivity to calcium channel blockers. *Pflugers Arch.* 407: 199 - 203.
- THORPE W. & SEEMAN PH., (1971). The site of action of caffeine and procaine in Skeletal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 179:324-330
- VAUGHAN WILLIAMS E.M. (1959). A method of mounting micro-electrodes for intracellular recording from contracting muscle. *J. Physiol.* 147, 3p-4p.
- VERGARA J. & LATORRE R., (1983) Kinetics of Ca-

- activated K channels from Rabbit muscle incorporated into planar bilayers; evidence for a Ca and Ba blockade. *J. gen. Physiol.* 82: 543-568.
- VERGARA J. & DELAY M. (1986). A transmission delay and the effect of temperature at the triadic junction of skeletal muscle. *Proc. R. Soc. Lond. B* 229: 97 - 110.
 - WEBER A. (1968) The mechanism of the action of caffeine on sarcoplasmic reticulum. *J. gen Physiol.* 52: 760-772.
 - WEBER A. & HERZ R. (1968). The relation between Caffeine Contracture of Intact Muscle and the effect of Caffeine on Reticulum. *J. gen. Physiol.* 52:750-772.
 - WOODBURY J.L., & BRADY A.J. (1956). Intracellular recording from moving tissues with a flexibly mounted ultramicroelectrode. *Science* 123: 100-101.
 - ZHANG L. & KRNJEVIC K., (1986). Apamin depresses selectively the After-hyperpolarization of Cat spinal motoneurons. In: *Abstracts of the Society for Neuroscience, 16th annual meeting, pt. 2, Washington D.C., November 9 - 14, pp. 1199.*