

24.23



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES**

ZARAGOZA

**PROPIEDADES ELECTRICAS LINEALES EN
MUSCULO ESQUELETICO DESNERVADO
(EXTENSOR Y SOLEO) DE RATA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
RUBEN ORTEGA OTAMENDI

MEXICO, D. F.

JULIO 1986



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.

C O N T E N I D O

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | INTRODUCCION | 2 |
| 2. | GENERALIDADES | 5 |
| 2.1. | Sarcolema | 5 |
| 2.2. | Miofibrillas y Disco Z | 7 |
| 2.3. | Membrana Plasmática y Caveolas | 10 |
| 2.4. | Sistema T | 11 |
| 2.5. | Retículo Sarcoplásmico | 13 |
| 2.6. | Músculos Lentos y Rápidos | 16 |
| 2.7. | Proteínas Contráctiles | 18 |
| 2.8. | Transmisión Neuromuscular | 20 |
| 2.9. | Acople Excitación-Constracción | 26 |
| 2.10. | El Músculo Esquelético Desnervado | 28 |
| 2.11. | Propiedades Eléctricas Lineales | 38 |
| 3. | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 52 |
| 4. | HIPOTESIS | 53 |
| 5. | OBJETIVOS | 53 |
| 6. | PARTE EXPERIMENTAL | 54 |
| 6.1. | Equipo | 54 |
| 6.2. | Soluciones | 54 |
| 6.3. | Preparación de Microelectrodos | 56 |
| 6.4. | Método de la Impedancia | 57 |
| 6.5. | Procedimiento | 58 |
| 6.6. | Ajuste de Datos | 65 |
| 7. | RESULTADOS | 69 |
| 8. | DISCUSION | 90 |
| 9. | CONCLUSIONES | 96 |

| | | |
|-----|------------------------|-----|
| 10. | APENDICE I | 97 |
| 11. | APENDICE II | 104 |
| 12. | APENDICE III | 110 |
| 13. | BIBLIOGRAFIA | 117 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------|--|
| RS | Retículo sarcoplásmico. |
| Sistema T | Sistema tubular transverso. |
| I | Isotrópico. |
| A | Anisotrópico. |
| Ach | Acetil colina. |
| ATPasa | Adenosíntrifosfatasa. |
| EDL | Extensor Digitorum Longus. |
| \bar{V}_m | Potencial de reposo. |
| TTX | Tetrodotoxina. |
| λ | Constante de espacio de la membrana. |
| τ | Constante de tiempo. |
| Z | Impedancia. |
| \emptyset | Angulo de fase. |
| I_m | Corriente total a través de la membrana. |
| R_o | Resistencia de entrada de la membrana. |
| R_m | Resistencia específica de la membrana. |
| C_m | Capacidad de la membrana. |

INTRODUCCION

Los músculos son estructuras complejas que transforman la energía química en trabajo mecánico. Los mecanismos que controlan esta transducción de la energía química, están asociados con sistemas membranales de las fibras musculares y son estudiados sin dificultad por técnicas electrofisiológicas diseñadas para medir las propiedades de la membrana¹⁶.

Las enzimas, las proteínas estructurales y los organelos de las fibras musculares tienen una organización especializada, observándose diversos cambios si se modifica por ejemplo, la velocidad de crecimiento de una subestructura. La complejidad estructural que presentan las fibras del músculo esquelético es debida a los sistemas membranales que posee, ya que cada uno lleva a cabo funciones específicas directamente relacionadas con la contracción.

Los tres principales sistemas membranales son: la membrana plasmática, el sistema tubular transverso (sistema T) y el retículo sarcoplásmico (RS). Las propiedades eléctricas de la membrana plasmática y del sistema T, así como del RS, se utilizan para describir la morfología, la velocidad de conducción y la propagación radial del potencial de acción. Muchas de estas propiedades eléctricas se estudian por mediciones de la impedancia. La membrana plasmática conduce el potencial de acción longitudinalmente, permitiendo la contracción simultánea de sarcomeras a lo largo del músculo. El sistema T conduce el potencial de acción radialmente hasta lo profundo de la fibra; posteriormente el RS libera Ca^{++} en respuesta al potencial de ac

ción, iniciando así la contracción. Subsecuentemente el calcio es re capturado por el RS.

Un espacio de 120 Å separa la membrana del sistema T de la membrana del RS, lo que posibilita el flujo de solutos del sarcoplasma, aunque existen pequeños pies distribuidos en toda la membrana del RS, que permiten la unión mecánica del sistema T con el RS^{49,50}. Existen moléculas grandes que fluyen libremente por el lumen del sistema T, pero éstas no pueden difundir hacia el lumen del RS. Cada sistema membranal tiene un papel funcional diferente, por lo tanto, cada membrana tiene propiedades eléctricas distintas, resultado de las estructuras moleculares, así como de su geometría. Las propiedades eléctricas de estas membranas biológicas se dividen en dos categorías: lineales y no lineales. Las propiedades lineales son independientes de la intensidad de la señal usada y se analizan con la teoría general de los sistemas lineales.

La mayor parte de las derivaciones, así como de los resultados de la teoría eléctrica, se estudian en un amplio rango de frecuencias para usar la impedancia y relacionar la salida sinusoidal con la entrada sinusoidal de los sistemas lineales. Las propiedades no lineales, las cuales varían con la intensidad de la señal aplicada, son difíciles de analizar porque no hay una teoría general que describa su comportamiento. Estos sistemas no se estudian en un amplio rango de frecuencias y no se caracterizan por funciones de impedancia, porque tales funciones no describen el comportamiento no lineal.

¿Porqué deberá uno, estar interesado en las propiedades eléctricas de los sistemas biológicos, cuando su actividad natural es usualmente no lineal?. Las propiedades lineales son interesantes por varias razones. Describen las propiedades biofísicas de todas las membranas en reposo; también describen todas las propiedades eléctricas de algunos componentes celulares, como por ejemplo, el lumen del sistema T¹⁶. Por lo general, las propiedades eléctricas lineales de preparaciones biológicas son medidas usando funciones de impedancia, por medio de la aplicación de corriente sinusoidal o voltaje, lo que da como resultado una medida de la impedancia.

La impedancia (recíproco de la admitancia) incluye la respuesta a perturbaciones, que son la suma de sinusoides. El análisis de la impedancia no es hecho en el curso del tiempo de la señal aplicada y su respuesta; además, la señal aplicada y su respuesta son descompuestas en componentes sinusoidales por el análisis de Fourier, por lo que la frecuencia de la amplitud y el retardo de la fase dependen de todos los componentes estudiados.

2. GENERALIDADES

En los mamíferos, las aves, los batracios y los réptiles, la gran masa de músculos esqueléticos está constituida por haces de fibras, en los que cada fibra muscular es una célula. La distribución de las fibras musculares esqueléticas es de tipo peniforme (figura 2.1a), o bien, se encuentran en paralelo (figura 2.1b) o forman diferentes combinaciones de ambas modalidades.

Al considerar la contracción, será importante recordar que además de las fibras musculares, los músculos contienen tejido fibroso que incluye los tendones, lo que contribuye a la complicada respuesta del músculo a la carga que deba desplazar.

Las fibras musculares tienen forma aproximadamente cilíndrica, llegan a medir 60 micras de diámetro y son de longitud variable. Están envueltas por una membrana compleja, el sarcoplasma, que la separa del líquido intersticial. Cada fibra posee un haz de miofibrillas, que son cilindros de una micra de diámetro y de longitud igual al total de la fibra. Cada miofibrilla carece de cubierta membranal y los espacios entre ellas, se encuentra lleno de mioplasma, el cual está surcado por una fina red tubular⁴⁴.

2.1. Sarcolema

El sarcolema cubre la superficie entera de la fibra y está compuesto principalmente de mucopolisacáridos. Se divide en dos componentes: la membrana plasmática y una membrana gruesa externa,

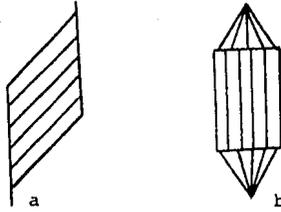


Fig. 2.1. Disposición de dos tipos de fibras musculares en reposo. a. Fibra peniforme en reposo. Los tendones están indicados por líneas que se extienden a ambos lados del paralelogramo. b. Fibras paralelas en reposo. Las líneas que irradian de los rectángulos apuntando a cada extremidad, representan los tendones.⁴⁴

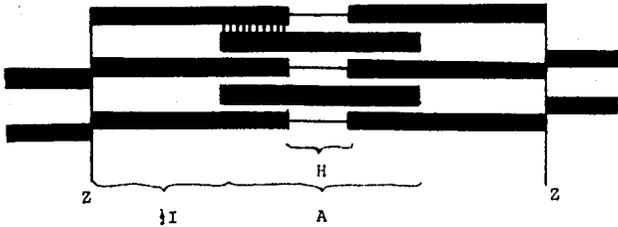


Fig. 2.2. Esquema de la organización de las miofibrillas. La sarcómera es la unidad limitada por las líneas Z que bisectan las bandas I; los puentes perpendiculares unen los filamentos gruesos con los delgados. En la vecindad de la línea Z, la disposición hexagonal se transforma en cuadrangular.⁴⁴

constituida de una lámina basal interna y una lámina reticular externa⁵⁰. La lámina basal contiene laminina, fibronectina y colágena IV. La lámina reticular contiene fibronectina, colágena V y otras proteínas colágenas y proteínas muy solubles en soluciones salinas concentradas.

Entre la lámina basal y la membrana plasmática de la fibra muscular se observa la presencia de una población de células satélite mononucleadas. Se supone que estas células satélite, son mioblastos capaces de activar y participar en la fusión y diferenciación de nuevas fibras musculares, cuando la original ha sido dañada.

2.2. Miofibrillas y Disco Z

Las fibras musculares esqueléticas están compuestas por unidades llamadas sarcómeras, que se repiten regularmente a lo largo de la fibra. Cada sarcómera es un cilindro, cuya longitud varía de 1.5 a 3.5 micras según el grado de estiramiento o acortamiento de la fibra. Convencionalmente, cada sarcómera se halla limitada por un disco, el llamado disco Z o línea Z. Las miofibrillas aparecen distribuidas dentro de las fibras de manera tal, que cortan los discos Z. Al ser observadas en el microscopio de luz, las fibras parecen mostrar estriaciones longitudinales que en realidad son las miofibrillas, así como estriaciones transversales en las que alternan bandas isotrópicas (I) y anisotrópicas (A). Por la presencia de estas estriaciones transversales, este tipo de tejido muscular recibe el nombre de músculo estriado. Cada banda I queda bisectada por un disco

Z. Las bandas A muestran asimismo una zona central isotrópica, la llamada zona H (figura 2.2). La longitud de la banda A es de 1.5 micras. Desde hace tiempo se sabe que al acortarse el músculo, la sarcomera también se acorta, aumentando la distancia entre los discos Z vecinos. Esto se realiza principalmente, si no por completo, a expensas de las bandas I, dado que las bandas A prácticamente no cambian³⁵.

Al microscopio electrónico las miofibrillas están compuestas por filamentos lineales. Existen dos tipos principales de filamentos, la banda I solo contiene filamentos delgados, también llamados filamentos de banda I. Su espesor es de 50 a 60 Å y su longitud de 1 micra. Se inician en cada línea Z y discurren longitudinalmente a lo largo de la banda I penetrando la banda A. En esta última, además de encontrarse porciones de los filamentos delgados, también existen los filamentos gruesos, llamados filamentos de la banda A, ya que se extienden a lo largo de ésta. Su longitud es de 1.5 micras y su grosor de 110 Å, aproximadamente. La zona H en el centro de la banda A no contiene filamentos delgados. Por lo tanto, la isotropía de la banda I se debe a que sólo existe un tipo de filamentos, mientras que cuando se presentan ambos, se observa anisotropía⁴⁴. También pueden existir filamentos de un tercer tipo, las llamadas fibrillas S, que corren a través de las zonas H, uniendo los extremos opuestos de los filamentos delgados en la banda A. La única conexión visible entre los filamentos gruesos y los delgados, son prolongaciones transversales en la banda A, los llamados puentes, que se presentan a intervalos más o menos regulares de 435 Å. Su espesor es de unos 40 Å y se extiende a lo largo de 180 Å entre las superficies de los filamentos

delgados y gruesos. Excepto en la vecindad inmediata del disco Z, los filamentos delgados se disponen en forma hexagonal. La longitud de cada lado del hexágono es de unos 260 Å, entre centros de filamentos delgados vecinos. La disposición hexagonal continúa en toda la longitud de los filamentos delgados a través de las bandas I y A. En la banda A, los filamentos gruesos ocupan el centro de cada hexágono de filamentos delgados.

La estructura del disco Z tiene una gran importancia en el mecanismo de la contracción. Conforme los filamentos delgados se aproximan a su origen en el disco Z, se dice que se redistribuyen, perdiendo la disposición hexagonal y adoptando una forma cuadrangular. En el disco Z, cada filamento delgado se divide o se une a cuatro filamentos llamados Z. Se ha demostrado que los filamentos forman pirámides tetrahédricas sobre bases cuadrangulares^{22,41,61}.

En cada vértice de la base cuadrangular del disco Z, los filamentos I forman una pirámide con cuatro filamentos que atraviesan completamente al disco Z; a su vez cada uno de estos filamentos se une a los otros tres filamentos Z de la cara opuesta del disco correspondiente y se conectan con un filamento I en la sarcómera adyacente. Se supone que las dimensiones del disco Z permanecen constantes durante la contracción muscular, pero ello no podría ser cierto y hace falta información más precisa⁴⁴.

2.3. Membrana Plasmática y Caveolas

La microscopía electrónica también ha mostrado que la membrana del músculo y el espacio entre las fibras musculares son estructuras complejas. Cada fibra o célula muscular está envuelta por la membrana plasmática, una bicapa de 100 Å de espesor que tiene una estructura común a todas las células.

En las fibras musculares es necesario conocer la forma de la membrana plasmática y el área superficial, ya que existe una relación importante con las mediciones de la impedancia¹⁶. En fibras musculares de mamífero las mediciones iniciales de la capacitancia a bajas frecuencias sugieren que el área de la membrana verdadera que cubre a la fibra muscular, debería ser considerablemente mayor que el área de un cilindro liso que pudiera cubrir la misma fibra muscular¹⁷. En muchos tipos de fibras musculares de vertebrados, la presencia de pliegues, caveolas y túbulos T hacen que el área de la membrana verdadera sea algunas veces, más grande que el área aparente. Posteriormente se sugirió que esta área es aparente¹¹.

La membrana plasmática cumple al menos dos funciones: forma la barrera que deben atravesar los materiales de recambio desde el espacio intersticial hasta el interior de las fibras y también contribuye a mantener las propiedades mecánicas del músculo. Las caveolas se encuentran distribuidas individualmente a lo largo de la membrana plasmática, aunque es frecuente encontrar grupos de dos o tres, conectadas al espacio extracelular a través de un túbulo común⁵⁰.

Existe una estructura reticular, que se entrelaza a través de las fibras y que parece formada por dos sistemas principales de tubos, uno de ellos es el sistema T y el otro es el RS, posiblemente análogo al retículo endoplásmico de otras células.

2.4. Sistema T

El sistema T es exclusivo de los músculos estriados y cardíaco. Está formado por una red o serie de redes con invaginaciones tubulares (túbulos T) que corren desde la membrana plasmática hasta el RS (figura 2.3). El elemento constitutivo es: un anillo alrededor de cada miofibrilla, situado en cada disco Z, o en cada unión entre las bandas A e I. En el primer caso existe un anillo por cada sarcómera a lo largo de cada miofibrilla y dos anillos en el segundo.

En el músculo esquelético la localización del anillo varía según la especie animal. Los anillos perifibrilares del sistema T están conectados entre sí, formando una especie de panal tubular que envía túbulos a través del sarcolema y que los comunican con el líquido intersticial. Al parecer, el sistema T mantiene a las sarcómeras de cada miofibrilla en comunicación con las miofibrillas vecinas y también une las miofibrillas con el sarcolema. En una sección transversal, el túbulo T tiene dos formas: en las fibras rápidas de los anfibios la forma más frecuente es de túbulos planos o forma de cinta plana y la menos común es la circular, cuyo diámetro es igual a la parte más pequeña de los túbulos planos. Las fibras de mamífero

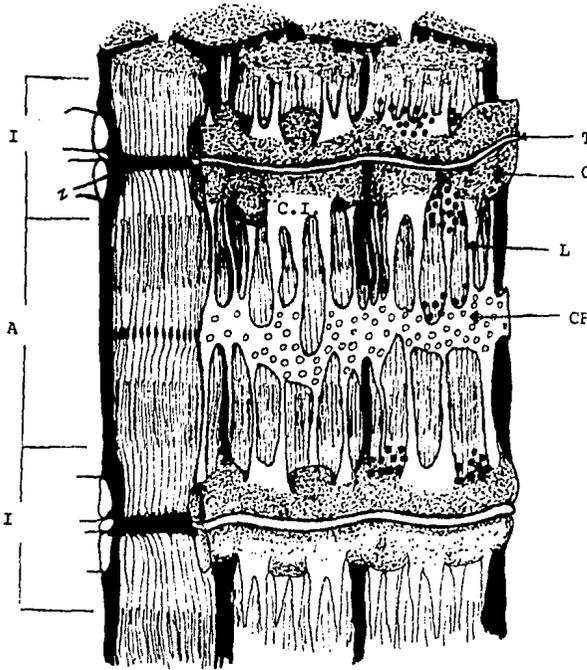


Fig. 2.3. Sistema T y RS de fibras de rana. Se puede apreciar una diferenciación específica de los sistemas membranales. Se muestran dos niveles de redes de túbulos T, con líneas Z adyacentes (Z) dentro de bandas I de miofibrillas y formando elementos centrales de 3 estructuras (triadas), las cuales también incluyen 2 RS. Las cisternas terminales (CT) del RS están conectadas a túbulos longitudinales (L), a uno y otro lado, a través de la cisterna intermedia (CI). Cerca del centro de la banda A, los túbulos L, se unen a el collar fenestrado del RS.⁵⁰

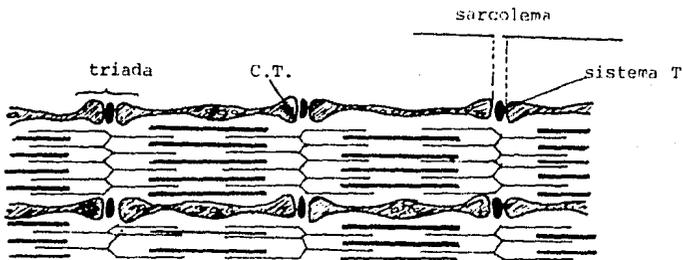


Fig. 2.4. Representación esquemática de la relación entre el sistema T y el RS y con las miofibrillas. En el plano de la línea Z, o en las uniones A-I en algunas especies, se encuentra la triada, que comprende la sección a través del túbulo T y el saco o cisterna terminal.⁵

tienen una apariencia similar, siendo la única diferencia entre ambos tipos de fibras, la presencia de dos redes de sistema T por sarcómera en las fibras de anfibio¹⁷.

2.5. Retículo Sarcoplásmico (RS)

El RS aparece constituido por túbulos orientados en dirección más o menos longitudinal, paralela a la de las miofibrillas, si bien se hace tortuosa en el espacio interfibrilar, entre dos anillos del sistema T de la misma miofibrilla (figura 2.4). El RS es un sistema membranaral interno no continuo con la membrana plasmática de la célula muscular, que atraviesa transversalmente a la fibra y penetra longitudinalmente algunas sarcómeras o parte de una de ellas.

Ambas extremidades del túbulo se ensanchan formando sacos relativamente grandes, que se aplanan en sus extremidades y establecen un amplio contacto con cada ánulo del sistema T. En consecuencia, una gran parte de este sistema se encuentra en relación con los sacos o cisternas terminales del RS. Luego, las cisternas terminales se adelgazan formando tubos largos y estrechos, de varios centenares de angstroms de diámetro que se dirigen aproximadamente hacia el centro de la sarcómera, en la zona H^4 . La unión del túbulo T mas dos cisternas terminales, recibe el nombre de triada muscular. Esta todavía en discusión la forma como se unen las cisternas terminales y el túbulo T, habiéndose sugerido que se trate de una unión estrecha²² (figura 2.5). Ello implica una sugerencia importante ya que la permeabilidad de la unión estrecha a los iones monovalentes es alta.

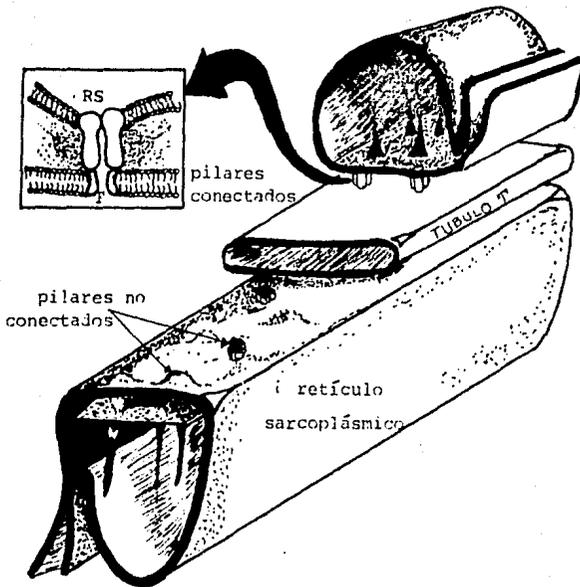


Fig. 2.5. Arreglo estructural de la unión del túbulo T y el RS. Este diagrama es un modelo imaginario, sacado de datos morfológicos.¹⁷

Sin embargo, en fotomicrografías electrónicas de gran claridad, se ha observado que la membrana plasmática del túbulo T está separada de la cisterna terminal por un espacio de unos 120 Å, de manera que su asociación no sería la de una unión estrecha²¹.

El RS juega un papel importante en el control del estado de activación de la maquinaria contráctil de la célula muscular, ya que regula la concentración de Ca^{++} en el espacio sarcoplásmico, el cual contiene los miofilamentos y miofibrillas contráctiles.

El RS cumple con dos funciones importantes: por medio de una bomba acarrea el Ca^{++} al interior reteniéndolo, por lo que la concentración de Ca^{++} libre en el espacio sarcoplásmico disminuye y alcanza una concentración de aproximadamente de 1×10^{-7} M. La segunda función del RS es liberar suficiente Ca^{++} cuando la célula muscular es activada y así unirse a la troponina para producirse la contracción, posteriormente el Ca^{++} es rebombeado al interior del RS durante la fase de relajación¹⁷. La contracción puede repetirse con una frecuencia de 10 veces por segundo o más rápido.

En algunas fibras musculares la estructura del RS es conocida por su desarrollo y distribución en tres o cuatro estructuras típicas; la cisterna terminal, la cisterna intermedia plana, los túbulos y la cisterna fenestrada. En fibras musculares de rata de tipo rápido, las cuatro regiones son encontradas en la parte media de cada sarcómera; la cisterna terminal cerca de cada línea Z y la cisterna fenestrada en la línea M⁶¹

2.6. Músculos Lentos y Rápidos

El músculo esquelético por sus características morfológicas ha sido clasificado en dos géneros, aunque los criterios usados para diferenciarlos son muy variados. Por ejemplo: oscuros y claros, largos y cortos, rojos y blancos, etc. También se ha encontrado que las diferencias están relacionadas a las distintas velocidades de contracción provocadas por estímulos eléctricos y con fármacos, por lo que se clasifican como: músculos lentos y rápidos^{7,8}.

Sin embargo, no ha sido posible realizar una clasificación discreta de los tipos de músculos esqueléticos existentes, contándose con un continuo aparente en un extremo del cual se encuentran los músculos puramente rápidos, con sus propias características estructurales, por ejemplo el extensor digitorum longus (EDL) y en el otro extremo los puramente lentos, como el sôleo. Las diferencias morfológicas más importantes entre estos dos tipos de músculo son:

a). Las miofibrillas de las fibras de contracción rápida están regularmente separadas, una de otra y son de igual diámetro; mientras que en las fibras de contracción lenta no tienen separación regular y son de diámetro variable.

b). En las fibras de contracción rápida el RS es más abundante comparado con las fibras de contracción lenta³⁷.

c). El sistema T de las fibras rápidas aparece más desarrollado, mientras que en las fibras lentas el sistema T está vir-

tualmente ausente o consiste solamente de elementos atrofiados³⁷.

d). En las fibras lentas la línea Z corre en zig-zag y es ancha; mientras que en las fibras rápidas corre casi recta y es muy estrecha en comparación con la de las fibras lentas³⁷.

e). La línea M se localiza en la parte media de la banda H de las fibras rápidas y está ausente en las fibras lentas³⁷.

f). En las fibras rápidas la distribución de los sitios sensitivos a la acetilcolina, se restringen al área final de la placa neuromuscular mientras que en las fibras lentas los sitios sensibles se han demostrado a lo largo de toda la membrana del músculo³.

g). El sarcolema postsináptico envuelve a las fibras rápidas y esta menos desarrollado o ausente en algunas fibras lentas³⁷.

Las propiedades histoquímicas nos indican que las fibras rápidas tienen una alta actividad glucolítica, baja actividad oxidativa y alta actividad de la ATPasa, mientras que las miofibrillas de las fibras lentas tienen actividad glucolítica intermedia, alta actividad oxidativa y alta actividad de la ATPasa. El contenido mitocondrial es mucho mayor en las fibras rápidas que en las fibras lentas^{3,43,52}.

2.7. Proteínas Contráctiles

Son dos los tipos principales de miofilamentos: los gruesos, de la banda A, que están compuestos por la miosina y los delgados, de las bandas I compuestos por la actina, la tropomiosina y la troponina. Se observan filamentos en el disco Z, los llamados filamentos Z, dispuestos en forma de pirámides con base cuadrangular, que se conectan con los filamentos delgados de las bandas I. Pero son únicamente los filamentos de las bandas A e I los conocidos como proteínas contráctiles (figura 2.6).

La existencia de puentes transversales entre los filamentos gruesos y los delgados, sugirió que ésta fuera la forma de unión física de ambos filamentos; así se desarrollaría la tensión y el acortamiento²². Se ha sugerido que en la miosina y en la actina existe una cierta organización espacial de los puntos químicamente activos, de suerte que se producen uniones entre ellos a medida que los filamentos pasan a través de ciertas distancias críticas³⁴. Por otro lado se demostró la naturaleza química del modelo de Huxley proponiendo que los puntos activos en la actina, son una serie de grupos SH y OH en los que se forman y se rompen alternativamente puentes -S- y -O- entre la actina miosina³³. Posiblemente, la formación y ruptura de estas uniones depende de la concentración muy localizada de Ca^{++} y la configuración de la troponina y tropomiosina. Conforme se propagan los pulsos despolarizantes a los túbulos T, se liberan de las cisternas terminales ondas de Ca^{++} , asimismo hay una captación fásica de Ca^{++} por el RS longitudinal y en consecuencia se producen

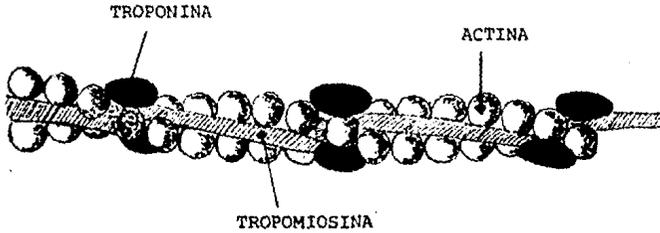


Fig. 2.6. Estructura propuesta para los filamentos delgados. En el plano longitudinal de la espiral de actina, se encuentra la tropomiosina, una proteína fibrosa con un período ligeramente mayor que el de la espiral de actina. A cada tropomiosina corresponde una troponina globular.⁴⁴

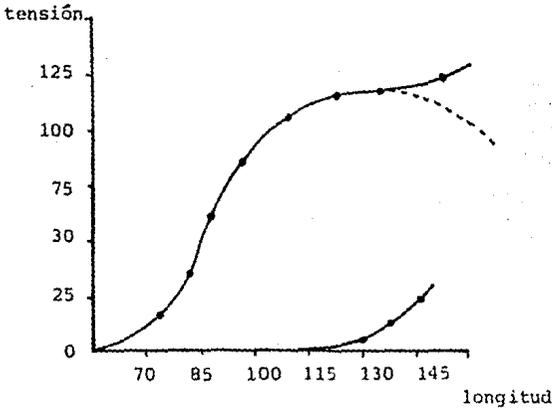


Fig. 2.7. Relación entre longitud y tensión. La longitud de reposo y la tensión máxima están representadas por 100. La curva de aumento monótonico en la parte inferior derecha representa el efecto de la distensión pasiva sobre la tensión. La curva continua superior es la obtenida para el sistema, integralmente. La línea discontinua representa el comportamiento de los elementos contráctiles cuando se sus-
trae la curva de distensión pasiva de la curva superior.⁴⁴

cambios fásicos en la concentración sarcoplásmica local de Ca^{++} y en la activación de la ATPasa de la actomiosina, produciéndose así la unión mecánica entre la actina y la miosina. En un momento dado, la tensión ejercida depende del promedio de uniones entre la actina y la miosina³⁵.

Cuando se distiende pasivamente un músculo o una sola fibra muscular, la distensión de lugar a la aparición de una fuerza de contracción que aumenta lentamente al principio y luego más rápidamente al aumentar la distensión, o sea que la permisividad resulta menor cuando el músculo está elongado (figura 2.7). Si se fija el músculo en su longitud de reposo (definida arbitrariamente de distintas maneras, pero considerando la que tiene cuando el organismo está en reposo) y se estimula hasta obtener una contracción máxima y tetánica, el músculo desarrolla la tensión máxima. Al aumentar o disminuir la longitud, referida a la del reposo, se reduce la fuerza desarrollada por el músculo durante la contracción tetánica isométrica⁴⁴.

2.8. Transmisión Neuromuscular

Las fibras nerviosas motoras que inervan el músculo esquelético, representan la superposición de un sistema divergente y otro convergente. La rama del axón motor mielínico llega a la fibra muscular y se divide en un fascículo de ramitas terminales amielínicas, que se extiende a lo largo de la fibra muscular en ambas direcciones, ocupando frecuentemente varios miles de micras cuadradas de su superficie.

Cada pie terminal amielínico penetra (a veces casi completamente) en una depresión de la superficie de la fibra muscular, pero las membranas del nervio y del músculo conservan su continuidad e individualidad y aparecen separadas por un espacio que mide 200 a 500 Å de ancho (figura 2.8). En la región del espacio sináptico, la membrana de la fibra muscular forma pliegues postsinápticos que ocupan dichos intersticios. El intersticio sináptico no forma un espacio extracelular indiferenciado, pues se encuentra en él una capa de substancia que intercepta el haz de electrones, separada de cada una de las dos membranas celulares por una zona más clara. Esta capa opaca sigue fielmente los contornos de los pliegues postsinápticos y cubre por completo la superficie de la fibra muscular. A nivel del límite del canal sináptico, se une con una capa semejante que cubre la superficie externa de las células. Cada pie terminal aparece repleto de mitocondrias y de gran número de otras pequeñas formaciones esféricas que se denominan vesículas sinápticas. Estas vesículas no parecen estar dispuestas al azar, pues con frecuencia se observan en el axoplasma frente a cada pliegue postsináptico de la membrana muscular. Los canales sinápticos suelen encontrarse en la parte superior de pequeñas eminencias de la fibra muscular formadas por la acumulación de sarcoplasma, mitocondrias y muchos núcleos celulares.

En un inicio se sugirió que la transmisión neuromuscular fuera eléctrica, es decir que la excitación de la célula muscular se efectuara a corrientes iónicas a través de la membrana, siendo producidas por la llegada de un potencial de acción a las terminaciones nerviosas. Por otro lado, en la transmisión química existe despolarización

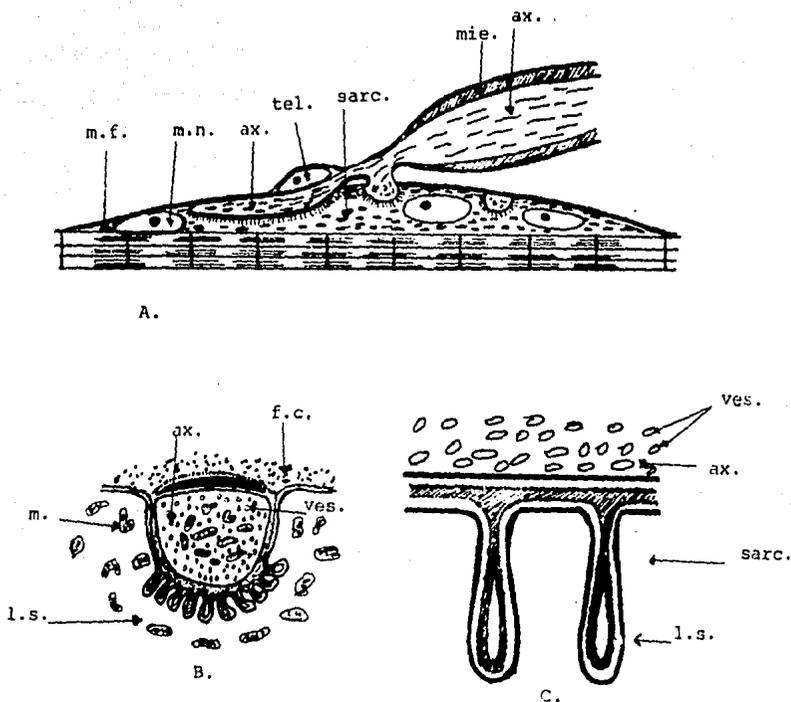


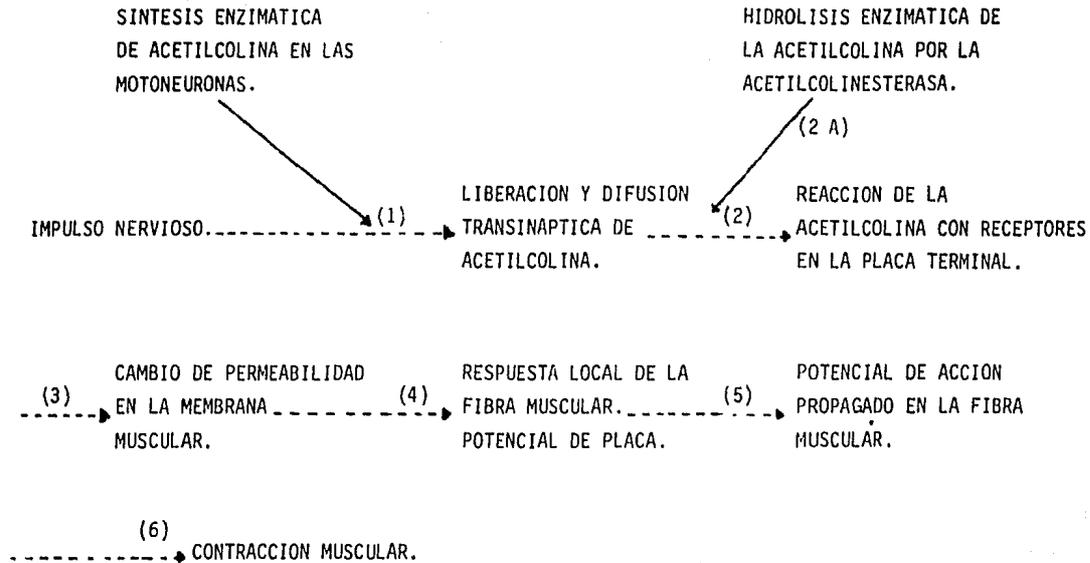
Fig. 2.8. Esquema de la unión neuromuscular típica. Las terminaciones nerviosas penetran en las depresiones sinápticas. A. Nivel del intersticio que separa el axoplasma del sarcoplasma, en donde pueden verse las laminillas subneurales en corte transversal, bajo forma de bastoncillos de 1 micra de longitud. La delgada célula de Schwann que cubre por completo las terminales está indicada solamente por su núcleo, tel.; mie., vaina mielínica; ax., axoplasma de la fibra motora; sarc., sarcoplasma; m.n., núcleo de la fibra muscular; m.f., miofibrillas. B. Esquema de una depresión sináptica en sección transversal; m., mitocondrias; ves., vesículas; l.s., intersticio sináptico; f.c., fibrillas de colágeno. C. Esquema de dos pliegues postsinápticos a nivel de la sinápsis neuromuscular.⁴⁴

zación de la membrana debido a la liberación de acetilcolina (Ach) de las vesículas sinápticas, que es capaz de unirse a sitios activos específicos, produciendo así la excitación. Estudios que se han hecho apoyan la segunda de estas hipótesis y brindan razones congruentes de igual peso para rechazar la hipótesis eléctrica^{5,44}.

2.8.1. Secuencia de Eventos. Los sucesos que se producen en la transmisión neuromuscular siguen el orden siguiente: las motoneuronas sintetizan Ach, que es almacenada dentro de vesículas del botón nervioso. Cuando la Ach es liberada de las vesículas por efecto de un impulso nervioso, atraviesa el espacio sináptico y se une a sitios activos específicos de la membrana muscular. La formación del complejo transmisor-receptor produce un cambio de permeabilidad en la célula, el que a su vez mediante una respuesta local denominada potencial de placa, genera un potencial de acción que se propaga por la fibra muscular y estimula la actividad contráctil. La Ach es destruida rápidamente por la acción hidrolítica de una enzima, la acetilcolinesterasa. En el esquema 2.9.1. se resume la secuencia de eventos.

2.8.2. Neurotransmisión. Los resultados obtenidos en los últimos años, en particular por el empleo de los métodos biofísicos, permiten definir los diferentes eventos con precisión, en términos cuantitativos. Podemos definir entonces:

a. Cortando los nervios motores y volviéndolos a unir en forma cruzada, se demostró que los nervios motores de los músculos estriados podían sustituir otros nervios colinérgicos o ser sustitui-



Esquema 2.9.1. Secuencia de los fenómenos producidos en la transmisión neuromuscular.

dos por ellos⁴⁴.

b. La estimulación de los nervios motores que inervan a los músculos estriados perfundidos, libera Ach en el líquido de perfusión siempre que se impida la destrucción enzimática del éster con alguna sustancia inhibidora de la acetilcolinesterasa. La contracción por estímulo directo del músculo no libera Ach. El estímulo del nervio sigue liberando nuevo transmisor aunque se inhiba la contracción por bloqueo de los canales de sodio con curare.

c. La inyección de Ach en la arteria del músculo provoca una contracción espasmódica tanto en el músculo estriado normal como en el desnervado. Dicha contracción toma la modalidad de un té-tanos asincrónico corto y los registros eléctricos muestran que los impulsos musculares se inician a nivel de las placas motoras.

d. Al aplicar sustancias que inhiben la acetilcolinesterasa (por ejemplo neostigmina), el potencial único del músculo y las sacudidas simples de la fibra (en respuesta a un impulso nervioso único) se transforman en un tren de pulsos y en una contracción tetáni-ca. Cuando se impide la descarga de impulsos, la inhibición de la colinesterasa se traduce por prolongación de la respuesta local a un impulso nervioso único.

2.9. Acople Excitación-Contracción

Cuando el potencial de acción del músculo se desplaza a lo largo de la fibra, se modifica casi de inmediato el mecanismo contráctil de ésta, fenómeno que se manifiesta por el acortamiento o el aumento de la tensión. Se desconoce la relación que puede existir entre el potencial de acción y la contracción muscular, o sea el acoplamiento excitación-contracción. Sin embargo, hay datos para considerar que la contracción no es iniciada por corrientes eléctricas en el interior de la fibra, ni por difusión de alguna sustancia liberada en la superficie de la membrana (proceso que sería demasiado lento), sino que más bien obedece al cambio de potencial de membrana.

No puede ser eléctrica porque:

- a). El espacio entre las caras externas del túbulo T y de la cisterna terminal es de 120 \AA , o sea mayor que la compatible con uniones cerradas permeables a iones monovalentes.
- b). El área de superficie del RS es mucho mayor que la del túbulo T, de modo que el RS, aún al recibir la carga total del túbulo T, la superficie no alcanzaría a despolarizarse para propagar el potencial de acción.
- c). Las determinaciones de la capacidad de la membrana muscular arrojan valores casi compatibles con la suposición de que toda esta capacidad es debida al sarcolema y a las paredes del túbulo T, en el entendimiento de que la capacidad por unidad de superficie es la misma en todas las superficies.

Un dato fundamental fue obtenido al estimular fibras aisladas de anfibio mediante pequeñas pipetas (de dos micras de diámetro) en distintas porciones de la fibra³⁴. Se observó que existe una despolarización moderada (de 20 a 40 mV) a nivel de la línea Z, la cual provoca una contracción localizada de las dos medias sarcómeras situadas a ambos lados de la misma. Cuando la pipeta se colocaba entre dos líneas Z, no se producía contracción localizada. Esta observación hizo que se pensara que la línea Z es un canal o un sistema de canales que transportan el líquido extracelular al centro de la fibra muscular³⁴.

La diferencia de potencial eléctrico a uno y otro lado de la pared del hipotético canal Z puede ser la misma que a uno y otro lado de la membrana de la fibra. Los cambios de potencial eléctrico a nivel de la membrana de la fibra muscular deben ir seguidos por cambios correspondientes a nivel de la membrana de los canales Z y el intervalo depende del diámetro, de la longitud de estos canales y de la capacidad de la membrana que los limita⁴⁴.

También la despolarización del RS, sea eléctrica o química, puede liberar Ca^{++} . Los gradientes de concentración de Na^+ , K^+ , Cl^- a través de las paredes del RS son probablemente similares a los que existen a través del sarcolema. Se ha comprobado que las paredes del RS son permeables a estos iones monovalentes y por tanto debe haber una diferencia de potencial de reposo a través de esta pared, con la posibilidad de que aquí se generen potenciales de acción propagados. Se concluye entonces que aún se desconoce el mecanismo

por el cual la despolarización de la pared del túbulo T produce la liberación de Ca^{++} a partir del RS^{5,44}. Sin embargo, mediante autorradiografías utilizando Ca^{++} radiactivo en músculos en reposo se ha demostrado que este ión se encuentra principalmente en la región de las cisternas terminales y posiblemente en la pared de esas estructuras^{13,14}. No se sabe como pasa el Ca^{++} de las cisternas terminales a la troponina, pero se postula que ello ocurre por difusión aunque este mecanismo sería demasiado lento y ofrecería demasiada dispersión para explicar el ascenso rápido que ocurre en la tensión del estado activo.

2.10. El Músculo Esquelético Desnervado

El efecto de una deficiencia en la innervación motora del músculo estriado ha sido de interés primario en la patología humana, ya que la destrucción de las motoneuronas o la lesión de los nervios periféricos producen alteraciones en la estructura, la función, la transmisión neuromuscular, la mecánica y bioquímica del músculo^{51,54}. Es bien conocido que la diferenciación de las fibras musculares esqueléticas está regulada por las innervaciones motoras en el músculo y la evidencia macroscópica más notable después de la desnervación, es la pérdida de peso del músculo, la cual está directamente relacionada con la atrofia muscular.

2.10.1. Cambios Estructurales. Como ya se mencionó, la evidencia macroscópica más notable después de la deservación es la pérdida de peso, aproximadamente una tercera parte la primera semana, la mitad en la segunda semana y cinco veces en la cuarta semana⁵¹. El diámetro de la fibra disminuye debido a la pérdida de filamentos contractiles y a la eventual desaparición de algunas miofibrillas, razón por la cual se produce un rearreglo en todo el músculo, acomodándose las miofibrillas de manera irregular.

Los espacios alrededor de las miofibrillas son irregulares y existe reducción en el número de miofibrillas debido a la fragmentación de éstas, aunque pueden encontrarse en formas onduladas con filamentos rotos en todas partes del mioplasma. Aparecen alteraciones en la línea Z, se modifica su posición y llega a ser inclinada, alcanzando algunas veces la banda H. Se observan algunas estructuras filamentosas, propagándose irregularmente en todo el sarcoplasma más comunmente llega a ser débil o desaparece^{51,54}.

En el sarcolema empiezan a aparecer ondulaciones focales, en algunas fibras el sarcolema no se distingue o desaparece y en otras puede aparecer fragmentado debido a hendiduras o indentaciones^{13,14}. Una de las diferencias más notables, con respecto a las fibras normales, es la que relaciona la proporción relativa de los elementos sarcotubulares y los componentes miofibrilares. La abundancia del RS en músculos desnervados es evidente en la sección transversal y longitudinal de la fibra, extendiéndose hasta los campos miofibrilares, particularmente a nivel de la banda I para finalmente romperse

en el interior^{12,13,18,25}.

Las triadas son muy numerosas y las bifurcaciones de los túbulos T se observan frecuentemente con forma de pentadas o estructuras más complejas¹⁸. Aunque las triadas corren longitudinalmente en los músculos desnervados se les encuentra muchas veces con orientación transversal hacia la banda A-I^{18,25}.

El sistema T se extiende formando mallas complejas, que muestran modelos hexagonales similares a estructuras en forma de panal^{18,56,57}. La diferenciación del sistema sarcotubular se debe esencialmente a la ausencia de influencia neuronal, ya que existe la formación de uniones estrechas entre los túbulos T y las cisternas del RS. En general, el sistema sarcotubular muestra como características anormales: hipertrofia del RS (se forman cisternas muy alargadas) y del sistema T (por la formación de redes tubulares irregulares). La hipertrofia del RS se explica debida a el incremento de Ca^{++} almacenado por las cisternas terminales del músculo desnervado.

En todos los casos, las fibras muestran grandes áreas que contienen algo de glucógeno, algunas mitocondrias y remanentes de RS, particularmente en la periferia. Estos remanentes forman vesículas que contienen: fragmentos de fibrillas, lisosomas, mitocondrias, gránulos densos y fragmentos de membrana atrofiados. Las vesículas dan la apariencia de un RS compartimentalizado⁵³. Con la desnervación el tejido conectivo incrementa observándose un marcado aumento en la concentración de hidroxiprolina, particularmente en el músculo soleo²⁶. Finalmente, podemos resumir que la atrofia por desnervación

va acompañada de:

- a. Pérdida de filamentos en la periferia.
- b. Proliferación o vesiculación del RS.
- c. Cambios nucleares.
- d. Sarcolema plegadizo.
- e. Disminución en tamaño y número de mitocondrias.

2.10.2. Cambios Bioquímicos. Desde el punto de vista bioquímico el EDL y el sóleo normales, poseen diferencias en cuanto a su composición enzimática. Mientras que el EDL normal está compuesto por fibras con alta actividad glucolítica, el sóleo posee un metabolismo oxidativo más desarrollado. Después de la desnervación, la actividad metabólica de los músculos mencionados disminuye progresivamente en algunas fibras musculares, mientras que en otras no existen cambios o su actividad se ve considerablemente aumentada. En la desnervación la actividad enzimática disminuye en las fibras del EDL y aparece sin cambios en el sóleo⁵².

La concentración subsarcolemal de enzimas es mayor en las fibras con metabolismo oxidativo, que en las que poseen metabolismo glucolítico. Después de la primera semana de desnervación, la actividad enzimática de las miofibrillas disminuye y comienza a ser más discontinua, pero en algunas regiones persiste la alta actividad enzimática dentro de las fibras^{21,22}.

Después de la desnervación, la actividad enzimática alrededor del aparato subneural, así como en el subsarcolema disminuye

muy rápidamente. Por otro lado, la actividad de la estearasa en el aparato subneuronal, disminuye muy lentamente, encontrándose indicios después de ocho días de desnervación⁵².

2.10.3. **Modificaciones en la Transmisión Neuromuscular.** La sección del nervio motor que inerva al músculo estriado produce parálisis y la pérdida completa de las contracciones voluntarias o reflejas. La estimulación del cabo distal del nervio seccionado todavía conserva durante muchas horas la propiedad de evocar contracciones del músculo. El primer cambio que se advierte consiste en la falla de la transmisión neuromuscular, fenómeno que al parecer se produce súbitamente en la placa motora. Es muy probable que este cambio se deba por entero a la supresión del transmisor liberado normalmente por las terminales presinápticas, pues en esta etapa todavía no se modifica la sensibilidad de la placa motora a la Ach. Hay que hacer notar que, aunque los potenciales de reposo y de acción (estos últimos producidos por estímulos eléctricos directos) de la fibra desnervada sean normales, las propiedades de la membrana se han modificado de suerte que la corriente mínima necesaria para excitar la fibra es menor, lo que explica el ligero aumento de la excitabilidad eléctrica del músculo estriado desnervado. El músculo desnervado generalmente aumenta su sensibilidad a la Ach, la que aparece una o dos semanas después de la desnervación y la sensibilidad puede aumentar hasta 100 veces⁴⁴.

Después de la desnervación, la región de la fibra muscular sensible a la Ach se extiende gradualmente sobre la superficie

de la célula y unas semanas después de la desnervación, toda la superficie de la célula presenta sensibilidad a la Ach semejante a la que presentaba la placa con inervación normal³. La aplicación de Ach en todas las regiones provocó despolarizaciones cuya amplitud y evolución temporal son similares a las que se encuentran en la placa motora del músculo inervado. La extensión de la sensibilidad a la Ach en toda la superficie celular, permite que dicha substancia despolarice la totalidad de la fibra muscular, produciendo así la contractura prolongada sucitada por la Ach que se observa en el músculo desnervado de mamífero^{5,44}. El aumento de la zona quimiosensible de una fibra muscular después de la desnervación puede explicarse por : 1) la diseminación de las moléculas receptoras a la Ach desde la placa motora, o 2) en caso de que estas moléculas se encuentran sobre toda la membrana del músculo, por la pérdida de alguna sustancia protectora normalmente presente en toda la superficie celular, salvo en la propia placa motora. El músculo desnervado muestra movimientos espontáneos muy ligeros y habitualmente el temblor es tan ligero, que la única manera de percibirlo consiste en observar con luz reflejada la superficie expuesta del músculo.

2.10.4. Cambios en las Propiedades Mecánicas. Las propiedades eléctricas y contráctiles del músculo esquelético también dependen del tipo de inervación que reciben, así como de su propia organización estructural. Como se vió en las secciones anteriores, las fibras desnervadas sufren graves alteraciones estructurales, lo cual como es de esperarse, repercutirá en sus características funcionales.

Una de las primeras manifestaciones que aparecen en el músculo esquelético desnervado, es una actividad fibrilar bastante manifiesta. Esta actividad se ha relacionado con una actividad repetitiva presente en este tipo de fibras, lo que coincide con la fase de relajación simple. Desde las primeras observaciones en músculo de mamífero se mostró que después de la desnervación las contracciones se hacen más lentas. El tiempo para alcanzar la máxima tensión desarrollada por el músculo en una sacudida simple (tiempo al pico), aumenta tanto en los músculos considerados rápidos, como en los lentos, sin embargo, permanecen las diferencias entre los músculos^{20,42}.

Los cambios en las proteínas contráctiles son tales, que se ha sugerido que a esto se debe la reducción en la velocidad de acortamiento isotónico presente en esos músculos, lo cual también podría ser la causa del aumento en el tiempo al pico de una sacudida simple⁴².

Por otro lado, aumenta el potencial de acción y disminuye su amplitud. La tensión tetánica decae progresivamente con el tiempo de desnervación y se ha observado que para obtener una fusión tetánica aparente es necesario estimular al músculo desnervado con frecuencias mayores que las utilizadas en músculo normal²⁰.

2.10.5. **Parámetros Eléctricos.** En la rata, los cambios en las propiedades eléctricas de la membrana aparecentempranamente y se manifiestan por la caída en el potencial de reposo de las fibras musculares, siendo acompañada por cambios aparentes en la resistencia, los cuales lo hacen más tardíamente^{3,31}. Por otro lado, se ha propuesto que pueden ocurrir alteraciones en la concentración de K^+ , con lo cual se podría explicar la despolarización de la membrana⁴. Sin embargo, no se han encontrado alteraciones en las concentraciones internas de Na^+ , ni de K^+ . Dado que las membranas del EDL (músculo de contracción rápida) y el sóleo (músculo de contracción lenta), tienen diferencias en cuanto a sus propiedades eléctricas y la información existente se encuentra dispersa, se realizó un estudio comparativo con el objetivo de confrontar algunas de las propiedades de la membrana, en estos músculos de rata.

Se ha mostrado que después de la deservación, las propiedades de membrana de ambos músculos cambian marcadamente (tabla I.a)^{3,4,40,46}.

La resistencia de entrada (R_0) y la constante de tiempo (τ) de ambos músculos (EDL y sóleo deservado) aumentan significativamente⁴. La τ de fibras deservadas aumentó casi tres veces su valor con respecto a el de fibras normales. La resistencia de membrana (R_m) calculada en la unidad de área de la membrana, aumentó casi el doble en el EDL deservado con respecto al sóleo deservado³. Por otro lado, el cambio de la R_m fué pequeño en el sóleo deservado e incluso disminuyó con respecto al sóleo normal. Así la capacidad de

| MUSCULO | R_m MOHM | λ mm | τ msec | a μ m | R_m ohm/cm ² | C_m μ F/cm ² |
|---------------------|---------------|-----------------|----------------|--------------|------------------------------|----------------------------------|
| EDL NORMAL | 0.40 | 0.54 | 1.7 | 21 | 559 | 3.9 |
| SOLEO NORMAL | 0.32 | 0.56 | 1.7 | 24 | 483 | 3.5 |
| EDL DESNERVADO | 1.11 | 0.5 | 4.4 | 12 | 759 | 5.8 |
| SOLEO DESNERVADO | 0.76 | 0.4 | 4.8 | 12 | 458 | 10.8 |

TABLA Ia. Parámetros eléctricos registrados en fibras normales y desnervadas de EDL y sóleo (4).

| MUSCULO | r_m Kohm/cm | λ mm | C_m nF/cm | a μ m | R_m ohm/cm ² | C_m μ F/cm ² |
|---------------------|------------------|-----------------|----------------|--------------|------------------------------|----------------------------------|
| EDL NORMAL | 160 | 2.10 | 160 | 82.4 | 4137 | 6.20 |
| SOLEO NORMAL | 273 | 1.35 | 112 | 37.6 | 3259 | 9.76 |
| EDL DESNERVADO | 297 | 1.30 | 67.3 | 53.6 | 4993 | 4.0 |
| SOLEO DESNERVADO | 282 | 1.47 | 158 | 43.5 | 3944 | 11.30 |

TABLA Ib. Parámetros eléctricos registrados en fibras normales y desnervadas de EDL y sóleo, en experimentos de movimiento de carga (12).

membrana (C_m) incrementa más en el soleo desnervado que en el EDL desnervado, a pesar de que ambos músculos tienen idénticas constantes de tiempo. Los cambios observados en las propiedades eléctricas aparentemente reflejan cambios estructurales en la membrana celular, dado que es muy improbable que la resistencia del mioplasma tenga cambios tan marcados³.

Por otro lado, las propiedades eléctricas fueron registradas durante experimentos sobre movimiento de carga y algunas propiedades eléctricas fueron registradas¹⁴. Las mediciones fueron hechas en la solución para registrar movimiento de carga, para que las conductancias del Na^+ , K^+ y Cl^- fueran reducidas; obteniéndose así que los valores para la R_o y R_m en fibras normales, fueron más altas en comparación con los valores registrados para fibras en soluciones externas normales⁴. Los valores promedio se enlistan en la tabla I. b.

Los efectos más significativos de la desnervación se observan en el diámetro (a) calculado y en la capacidad específica de membrana de las fibras (C_m). Los otros parámetros como son la constante de espacio (λ), la resistencia (r_m), la capacidad de membrana por centímetro de fibra (c_m) y la resistencia total de membrana (R_m) no fueron alterados. Normalmente la capacidad de membrana (C_m) de fibras con diámetro pequeño es menor que el de las fibras de diámetro grande (siempre que la fracción del sistema T, la geometría de los túbulos T y de la superficie sean constantes), porque en fibras pequeñas la contribución de la membrana del sistema T es relativamente pe-

queña¹². Por tanto, es sorprendente observar que existe un incremento en la capacidad de membrana de las fibras desnervadas, siendo que el diámetro de la fibra está disminuido. Esto podría ser explicable, si observamos que existe un aumento en la fracción del sistema sarcotubular. La C_m es similar a aquellas que son descritas para soluciones con concentraciones de Cl^- bajas³⁰, pero son significativamente más altas que las obtenidas en soluciones de Krebs con concentraciones normales de Cl^- ⁴ (tabla Ia).

En fibras de mamífero esta diferencia de valores aumenta por el hecho de que concentraciones altas de Cl^- , el valor del tubo T es bajo¹⁰.

2.11. Propiedades Eléctricas Lineales

La utilización de las propiedades eléctricas lineales ha sido de gran ayuda para describir la función de los sistemas membranales que intervienen en el proceso de excitación del músculo esquelético. El uso de modelos eléctricos y su ajuste con la estructura muscular nos permite conocer más en detalle, la contribución de cada sistema membranal al total de las propiedades eléctrica, así como su función. En esta parte, nos referimos a la descripción de los modelos eléctricos propuestos para el músculo esquelético de rana, pero aplicables al músculo esquelético de mamífero (principalmente de rata) y a describir los parámetros utilizados.

2.11.1. **Teoría de Cable para el Músculo Estriado.** El sistema físico constituido por un núcleo de material conductor, recubierto por una capa de resistencia relativamente alta y ambos sumergidos en un medio conductor, presenta propiedades de cable o sea, que todo desplazamiento de potencial a través de la capa superficial, en cualquier punto de cable, da lugar a otro desplazamiento hacia las regiones vecinas de dicha capa⁶. La teoría de cable unidimensional puede aplicarse a la membrana cilíndrica rodeada de fluido intracelular y de área transversal constante. A fin de simplificar el análisis matemático se hacen algunas suposiciones, que si bien son arbitrarias, parecen apegarse bastante a la realidad como para no incurrir en graves errores de interpretación. Las resistencias, tanto del axoplasma como del líquido extracelular, se consideran isotrópicas y constantes, si bien no necesariamente iguales. También se supone que la impedancia del fluido intracelular está representada por una resistencia ohmica y que los gradientes de voltaje no axial son despreciables³⁶ (figura 2.9). Los principales supuestos y definiciones utilizadas en la derivación de las ecuaciones de cable son:

- a. La célula está representada por un cilindro circular infinito.
- b. Dentro del cilindro (citoplasma) la resistencia eléctrica es relativamente alta.
- c. La cubierta del cilindro (membrana) tiene resistencia eléctrica relativamente alta.

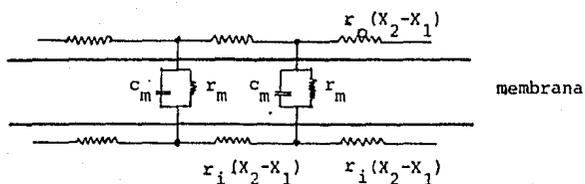


Fig. 2,9 Circuito eléctrico equivalente de una célula. La resistencia y la capacidad de la membrana están representadas en forma unitaria, por conveniencia; en realidad se encuentran distribuidas uniformemente a lo largo de la célula⁴⁴

d. La resistencia eléctrica de la región exterior del cilindro (espacio extracelular) es relativamente baja.

e. En la superficie el potencial es radialmente simétrico.

f. Los potenciales interno y externo son independientes de la distancia radial.

g. El potencial electrotónico puede superponerse linealmente con el potencial de reposo.

Estas suposiciones nos permiten deducir las propiedades eléctricas lineales (y algunas veces las no lineales) como son: la resistencia (r_m) y la capacitancia de la membrana celular (c_m) a partir de mediciones experimentales de corriente y potenciales. Ya se ha demostrado que la membrana se comporta electricamente como si fuera un condensador con fugas, o sea como una capacidad conectada en paralelo con una resistencia pura. La corriente total a través de la membrana (I_m) será la suma de la corriente a través de la resistencia, más el desplazamiento de corriente a través de la capacidad (ver figura 2.9). Así:

$$I_m = I_R + I_C = V_m/R_m + C_m \frac{dV_m}{dt} \dots (1)$$

dónde:

V_m = potencial electrotónico a través de la membrana (voltios).

R_m = resistencia de la membrana por unidad de área del cilindro (ohm/cm^2).

C_m = capacidad de la membrana por unidad de área del cilindro ($\text{faradios}/\text{cm}^2$).

I_m = corriente total radial de la membrana (amp).

En el estado estacionario $dV_m/dt = 0$. Conviene ahora definir dos nuevas variables:

$$\tau = r_m + c_m \dots (2)$$

$$\lambda^2 = r_m/r_i + r_o \dots (3)$$

dónde:

c_m = Capacidad de la membrana superficial en la unidad de longitud (F/cm).

r_m = Resistencia de la membrana superficial en la unidad de longitud (ohm/cm).

τ = Constante de tiempo de la membrana.

λ = Constante de espacio de la membrana.

r_o = Resistencia externa de la membrana en la unidad de longitud (ohm/cm).

r_i = Resistencia interna de la membrana en la unidad de longitud (ohm/cm).

Nótese que la constante de tiempo de la membrana (τ) depende solo de los parámetros de la propia membrana, en tanto que la constante de espacio (λ) comprende no sólo la resistencia de la membrana, sino también las resistencias interna y externa.

Si suponemos que las fibras musculares tienen propiedades de cable unidimensional, que se extienden indefinidamente en ambas direcciones y que sus impedancias internas, dentro y fuera, son lineales e independientes de la coordenada final, entonces en la impedancia Z , la proporción de V con respecto a I_0 , donde I_0 es la corriente AC aplicada en un punto dado de la fibra y V es el potencial resultante AC en la distancia X , está dada por la ecuación:

$$Z = Z_0 e^{-\gamma X} \dots (4)$$

La impedancia de entrada Z_0 y la constante de propagación están dadas por:

$$Z_0 = (z_i/4Y)^{\frac{1}{2}} \dots (5)$$

$$\gamma = (z_i Y)^{\frac{1}{2}} \dots (6)$$

donde z_i es la impedancia interna de la fibra y Y es la admitancia dentro y fuera, ambas por unidad de longitud de la fibra. Z_0 , Z , z_i y γ son funciones de la frecuencia^{19,56}. La impedancia de una capacidad es muy dependiente de la frecuencia, dado que la capacidad para pasar corriente está determinada por el cambio proporcional de voltaje, el cual es mayor a altas frecuencias que a bajas frecuencias. Si la frecuencia angular ($j\omega$), la reactancia de la capacidad esta dada por:

$$X_c = \frac{1}{j \omega C_m} \dots (7)$$

dónde:

j = Indica que la magnitud de la reactancia es graficada en 90° . j es $\sqrt{-1}$.

C_m = Capacidad de la membrana por unidad de área (ohm/cm²).

Si suponemos que R_m y C_m están en paralelo, la impedancia total Z está dada por:

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{R_m} + \frac{1}{X_c} = \frac{1}{R_m} + j \omega C_m \dots (8)$$

ó:

$$Z = \frac{R_m}{(1 + j \omega C_m R_m)} \dots (9)$$

dónde:

R_m = Resistencia de la membrana por unidad de área (ohm/cm²). La ecuación (9) no da las coordenadas de Z , dado que no es de la forma $X + jY$ (en esta forma X es la parte real y Y es la parte imaginaria). Podemos separar la parte real y la imaginaria para obtener:

$$Z = \frac{R_m}{1 + \omega^2 \tau_m^2} - j \frac{R_m \omega \tau_m}{1 + \omega^2 \tau_m^2} \dots (10)$$

Así, la parte imaginaria siempre es negativa. De hecho en el resultado final asumimos que la reactancia es puramente capacitativa (reactancia inductiva de valores positivos para la parte imaginaria).

2.11.2. Modelo Acumulado. El modelo acumulado del sistema T ha tenido particular atención debido a su sencillez^{19,23,29,49}. En este modelo el sistema tubular está representado como una serie de resistores con un capacitor (figura 2.10). Es decir, se supone que la resistencia del sistema T está localizada en un solo lugar, más probablablemente en la boca de los túbulos y esta resistencia se supone está en serie con la capacitancia total de todas las membranas tubulares.

En este modelo podemos notar que hay ausencia de un elemento del circuito para representar la resistencia de la solución en el lumen de los túbulos. El modelo acumulado nos dice que no hay gradientes radiales de potencial dentro del sistema tubular, lo cual esta en desacuerdo con la interpretación líneal^{1,24}. Si los parámetros del circuito no son normalizados, aumentan las dificultades para calcular la impedancia, ya que pequeños cambios en algunos de los parámetros tienen efectos complicados en toda la curva y a bajas frecuencias.

Los parámetros normalizados son:

\underline{r} = es la resistencia de la membrana (DC).

c_m = es la capacitancia de la membrana superficial.

c_w = es la capacitancia de la pared tubular.

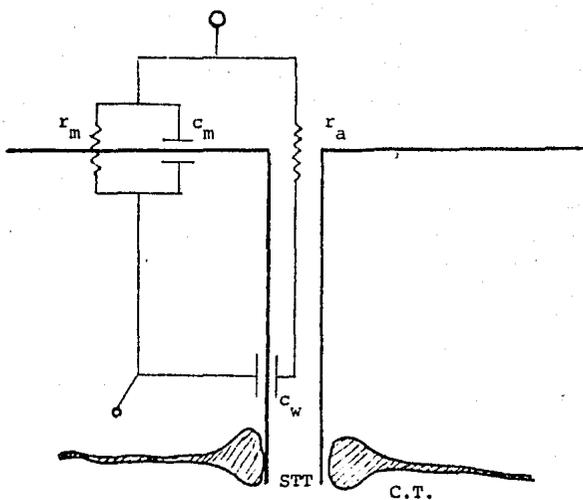


Fig. 2.10. Circuito equivalente del modelo acumulado, donde: c_m es la capacidad de la membrana superficial; r_m es la resistencia de la membrana superficial; r_a es la resistencia de acceso; c_w es la capacitancia de la membrana tubular; C.T. son las cisternas terminales; y STT es sistema tubular transverso.¹⁹

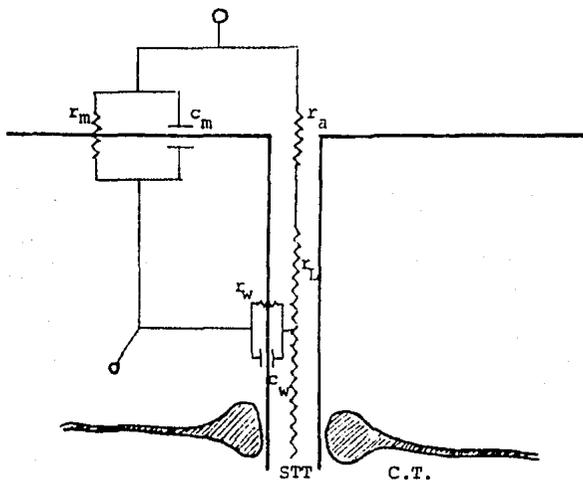


Fig. 2.11. Circuito equivalente del modelo híbrido, donde: r_m , c_m , r_a , c_w , STT y C.T., son descritos en el modelo acumulado; r_L es la resistencia luminal del túbulo y r_w es la resistencia de la membrana tubular.⁶⁰

\underline{c} = es la capacitancia total de la membrana superficial y de la membrana del sistema tubular.

cec = es el cociente de la capacitancia del sistema tubular con respecto a la capacitancia c , $\text{cec} = c_w/\underline{c}$.

rer = es el cociente de la resistencia en la boca de los túbulos con respecto a la resistencia DC, $\text{rer} = r_a/\underline{r}$.

Usando las variables de la tabla II, podemos definir la admitancia como:

$$Y_T = \frac{1}{r_a - j \frac{1}{\omega c_w}} \dots\dots\dots (11)$$

dónde:

$$j = \sqrt{-1}$$

ω = Frecuencia angular en hertz.

Y = Admitancia total.

2.11.3. Modelo Híbrido. En este modelo se introduce la resistencia de los túbulos y la resistencia de acceso^{48,49}, ya que tienen un efecto significativo en las propiedades eléctricas de las fibras musculares. Referimos este modelo como híbrido para no juzgar de antemano la localización física de las resistencias de acceso. Para describir tal modelo usamos las variables dimensionales:

r_m = Resistencia DC de la membrana superficial, igual $R^*_m/2\pi a$.

g_w = Conductancia DC de la membrana tubular, igual a

$$\bar{C}_W \pi a^2.$$

c_W = Capacitancia total en la membrana tubular, igual

$$\text{a } \bar{C}_W \pi a^2.$$

c_m = Capacitancia de la membrana superficial, igual a

$$C_m^* 2\pi a.$$

r_a = Resistencia de acceso, igual a $R^* a / 2\pi a$.

r_L = Resistencia radial del lumen de los túbulos, y es definida como $1/8\pi\bar{G}_L$; para bajas frecuencias el comportamiento del modelo híbrido con una resistencia radial total r_L , es similar al comportamiento a bajas frecuencias del modelo acumulado con resistencia radial $r_a = r_L$.

Todas las variables son en la unidad de longitud de la fibra muscular. Las variables normalizadas son:

$\underline{c} = c_m + c_W$ que es la capacitancia total de la membrana tubular y la superficial.

$$\underline{cec} = c_W / \underline{c}.$$

$\underline{r} = [1/r_m + 1/(r_a + r_L + 1/g_W)]^{-1}$ que es aproximadamente igual la resistencia DC para el flujo de corriente fuera de la fibra muscular.

$$\underline{rer} = (r_a + r_L) / \underline{r}.$$

$$\underline{gwg} = \underline{r} / g_W$$

$$\underline{rare} = r_a / (r_a + r_L).$$

La ecuación que describe la admitancia del sistema T esencialmente reemplaza las resistencias de la membrana, con la co-

respondiente impedancia de membrana e interpretando el resultado como una cantidad compleja⁴⁹, con la impedancia definida por la transformada de Laplace:

$$\frac{1}{Y} = \frac{4r_L}{T} \frac{I_0(\tau a)}{I_1(\tau a)} + r_a \dots (12)$$

dónde:

T = Función de propagación de frecuencia.

$I_0(z)$, $I_1(z)$ = Funciones modificadas de Bessel.

2.11.4. **Modelo Distribuido.** Este modelo es usado tentativamente para describir el sistema T como una membrana en forma de disco con una resistencia interior (figura 2.12). Aquí solamente existe resistencia al flujo de corriente radial en el lumen de los tubos^{51, 55, 60}. El modelo distribuido es un caso especial del modelo híbrido, ya que la variable rare es llevada a cero. Todas las demás variables utilizadas en el modelo híbrido, tanto normalizadas como dimensionales, son las mismas.

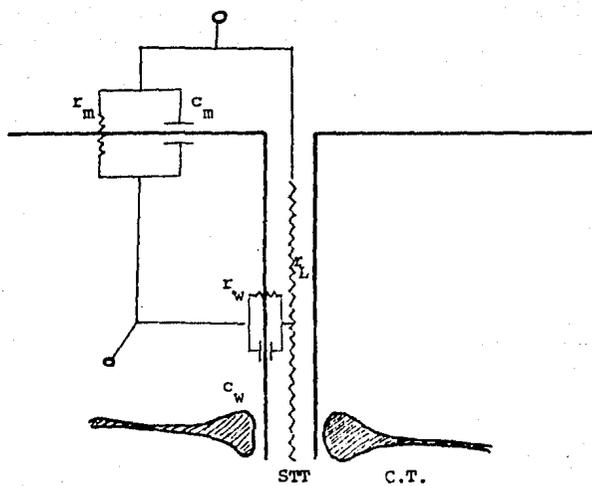


Fig. 2.12. Circuito equivalente del modelo distribuido, en donde todas las variables son descritas en el modelo híbrido.⁶²

| Propiedades Eléctricas | Estructura de la Fibra | Superficie de un cilindro ideal | Longitud de la Fibra | Volumen de la Fibra | Dimensiones variables para el ajuste |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|--|--------------------------------------|
| Capacitancia de la Membrana Tubular | $C_w(F/cm^2)$ | $C^*w(F/cm^2)$ (muchas veces Ce) | $\bar{C}_w(F/cm)$ | $\bar{C}_w(F/cm^2)$ | cec |
| Conductancia de la Membrana Tubular | $G_w(mho/cm^2)$ | $G^*w(mho/cm^2)$ | $g_w(mho/cm)$ | $\bar{G}_w(mho/cm^2)$ | g_wg |
| Resistencia ó Conductancia Luminal Tubular | — $G_L(mho/cm)$ | $R^*L(ohm/cm^2)$ | $r_L(ohm/cm)$ — | $\bar{R}_L(ohm/cm)$ $\bar{G}_L(mho/cm)$ | rer — |
| Resistencia de Acceso | $R_a(ohm/cm^2)$ (Muchas veces Re) | $R^*a(ohm/cm^2)$ | $r_a(ohm/cm)$ (Muchas veces re) | — | rare |
| Resistencia ó Capacitancia de la Membrana Superficial | $R_m(ohm/cm^2)$ $G_m(mho/cm^2)$ | $R^*m(ohm/cm^2)$ $G^*m(mho/cm^2)$ | $r_m(ohm/cm)$ $g_m(mho/cm)$ | — — | 1-rer — |
| Capacitancia de la Membrana Superficial | $C_m(F/cm^2)$ | $C^*m(F/cm^2)$ | $C_m(F/cm)$ | — | 1-cec |
| Resistividad Sarcoplásmica | $R_i(ohm/cm)$ | — | $r_i(ohm/cm)$ | $R_i(ohm/cm)$ | — |

TABLA II. Variables ordenadas del ajuste de modelos. Las variables son referidas al volúmen de la fibra, al cilindro ideal¹⁹, y la relación de estas variables, ambas en la unidad de la longitud del músculo⁶⁰.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los sistemas membranales son necesarios para la función muscular, ya que por ellos se propaga la actividad eléctrica que provoca la liberación de Ca^{++} del RS, que a su vez inicia la actividad mecánica muscular. La influencia que ejerce el nervio motor sobre las propiedades del músculo al que inerva, han sido estudiadas de manera particular por gran número de investigadores desde hace tiempo. La desnervación del músculo esquelético (sección del nervio motor) trae como consecuencia una serie de cambios estructurales, así como en sus propiedades mecánicas, eléctricas, bioquímicas y farmacológicas, ignorándose la razón por la cual se provocan estas alteraciones, aunque existen varias hipótesis que tratan de explicarlo. Debido a la naturaleza de los cambios producidos, el estudio y la solución del problema ha requerido de la acción coordinada de investigadores de diversas disciplinas.

En este trabajo se estudia el efecto de la desnervación sobre las propiedades eléctricas lineales del músculo esquelético de mamífero (extensor digitorum longus y sóleo). Estas propiedades nos dan información acerca de los cambios estructurales y funcionales ocurridos en el músculo además de la contribución relativa de cada uno de los sistemas membranales al total de las propiedades eléctricas, lo cual es importante para el proceso de excitación-contracción del músculo esquelético. El estudio de las propiedades eléctricas lineales ha sido tema de investigación en años atrás. Sin embargo, los métodos utilizados no permitieron distinguir la con-

tribución de cada uno de los sistemas membranales al total de las propiedades eléctricas, ya que las técnicas no fueron las indicadas para estos propósitos.

Por este motivo, se decidió medir las propiedades eléctricas lineales de las fibras musculares desnervadas usando el método de la impedancia, en un rango de 0.2 a 10000 hertz de frecuencia, el cual nos permite separar la contribución de los diferentes sistemas membranales. La información obtenida es importante para explicar las propiedades fisiológicas del músculo desnervado, lo cual puede ser de utilidad clínica, tanto desde el punto de vista terapéutico (rehabilitación), como de diagnóstico.

4. HIPOTESIS

Aplicando corriente sinusoidal a fibras musculares desnervadas de rata a través del método de la impedancia se demuestra la contribución relativa de cada uno de los sistemas membranales al total de las propiedades eléctricas lineales, así como el circuito equivalente que mejor ajusta con los parámetros eléctricos lineales.

5. OBJETIVOS

a). Estudiar mediante el método de la impedancia las propiedades eléctricas pasivas de fibras musculares desnervadas (EDL y sóleo) de rata.

b). Ajustar los parámetros eléctricos lineales, con los modelos eléctricos: Acumulado, Híbrido y Distribuido, propuestos

para fibras normales de rata.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Equipo

- a. Detector sensitivo de fase 9412 a Ortec Brokdeal.
- b. Detector de nivel de voltaje CIEA-IPN.
- c. Oscilador Krohn-Hite 4025AR.
- d. Osciloscopio 5103N.
- e. Amplificador diferencial 5A20N.
- f. Base dual de tiempo 5B12N.
- g. Amplificador de trazo dual 5A18N.
- h. Registrador Gould-Brush 220.
- i. Impresor Anadex.
- j. Microscopio óptico Leitz, Wetzlar.
- k. Objetivos de X10, X40, y X40 inmersión en agua.
- l. Micromanipuladores Leitz.
- m. Aparato vertical de pipetas 700C, David Kopf Instruments.
- n. Cámara de músculo aislado.

6.2. Soluciones

- a. Solución Madre Ringer Krebs Henseleit Normal.
- b. Solución Ringer Krebs Henseleit Normal.
- c. Solución de Tetrodotoxina (TTX).
- d. Solución Ringer Krebs Henseleit Normal con TTX.

| Reactivo | Peso (g/l) | mM/l |
|---------------------------------|------------|--------|
| NaCl | 69.264 | 1184.0 |
| KCl | 1.1175 | 150.0 |
| CaCl ₂ | 3.8227 | 260.0 |
| MgSO ₄ | 2.9579 | 120.0 |
| KH ₂ PO ₄ | 2.9940 | 220.0 |

a. Solución Madre Ringer Krebs Henseleit Normal.

| Reactivo | NaCl | KCl | CaCl ₂ | MgSO ₄ | KH ₂ PO ₄ | NaHCO ₃ | Dextrosa |
|----------|--------|--------|-------------------|-------------------|---------------------------------|--------------------|----------|
| Peso g/l | 6.9264 | 0.1117 | 0.3822 | 0.2957 | 0.2994 | 2.0918 | 1.8016 |
| mM/l | 0.1184 | 0.0015 | 0.0026 | 0.0012 | 0.0022 | 0.0249 | 0.01 |

b. Solución Ringer Krebs Henseleit Normal.

| Reactivo | NaCl | KCl | CaCl ₂ | MgSO ₄ | KH ₂ PO ₄ | NaHCO ₃ | Dextrosa | TTX |
|------------|--------|--------|-------------------|-------------------|---------------------------------|--------------------|----------|--------|
| Peso (g/l) | 6.9264 | 0.1117 | 0.3822 | 0.2957 | 0.2994 | 2.0918 | 1.8016 | 0.001 |
| mM/l | 0.1184 | 0.0015 | 0.0026 | 0.0012 | 0.0022 | 0.0249 | 0.01 | 3.1E-7 |

d. Solución Ringer Krebs Henseleit Normal con TTX.

6.3. Preparación de Microelectrodos

La preparación de microelectrodos es una de las partes fundamentales para obtener un registro adecuado de los parámetros eléctricos lineales. Para que tienda a la linealidad, la especificación más importante que deben cumplir los microelectrodos, es tener una resistencia entre 15 y 30 megohms³⁸.

Para su elaboración se utilizó un aparato de pipetas verticales. Los microelectrodos preparados con estas especificaciones fueron lavados con metanol filtrado, (con filtros Millipore) por medio de vacío y después de llenados con metanol, fueron puestos en agua tridestilada por 30 minutos, para que por capilaridad se eliminase el metanol. Posteriormente, fueron colocados en soluciones de cloruro de potasio 2.5M y citrato de potasio 2.0M respectivamente y se les dejó en las soluciones por espacio de 24 horas, para que por capilaridad se desplazara el agua existente y se llenasen con las soluciones respectivas.

Luego fueron sacados de las soluciones y se lavaron por el exterior con agua tridestilada. Con el objeto de evitar que las sales precipiten y tapen los microelectrodos, estos fueron puestos en vasos con agua tridestilada para mantener un ambiente húmedo, de tal manera que el agua no tocara la punta de los mismos. Los microelectrodos de cloruro de potasio se utilizaron para registrar el voltaje y se les mantuvo en refrigeración. Los microelectrodos de citrato de potasio sirvieron para aplicar corriente y se pintaron con una suspensión de plata preparada con metilisobutilcetona, de tal ma-

nera que, existiera un espacio en la punta de 100 micras sin pintar y un espacio en la parte superior también sin pintar para que fuera introducido el soporte. Los efectos tóxicos de la pintura se evitaron cubriendo la punta con una capa de barniz (Q-Dopa).

6.4. Método de la Impedancia

La medición de la respuesta celular a un estímulo sinuoidal en un amplio rango de frecuencia, requiere de atención y cuidado para evitar que la sinusoide se contamine con ruido. En muchos casos, la proporción entre el ruido y la señal registrada, es de 3 a 1 (el ruido fue registrado alrededor de 800 V rms, en la amplitud de banda de 100 Hz, aunque la señal comienza a registrarse a 1mV rms).

Las medidas de la impedancia se realizaron en un osciloscopio 5103N, donde las placas verticales del osciloscopio fueron conectadas a una sinusoide y las horizontales a la otra^{19,55}. No se utilizaron las figuras de Lissajous obtenidas dado que la introducción de un error sistemático hace que la exactitud de los resultados sea pobre¹⁹.

La amplitud y la fase fueron medidas usando un principio basado en la idea de la detección sincrónica (muchas veces llamado detección sensitiva de fase), usado para registrar señales con gran cantidad de ruido⁵⁸. Los detectores sensitivos de fase usan una señal de referencia para conectar la señal de ruido^{58,59,60}. La sinusoide resultante se aplicó a un integrador, siendo la respuesta del detector de fase, idealmente $|V| \cos \theta$, donde $|V|$ es la amplitud de

la señal de entrada y θ la diferencia entre la señal obtenida y la de referencia. En un detector, el componente en fase de la señal (también llamada parte real) esencialmente es independiente del ruido. En suma, para determinar tanto el ángulo como la magnitud se utilizó el componente fuera de fase de la señal (también llamado la cuadratura o la parte imaginaria). Para ello se cambió la fase de referencia a 90° . Por lo tanto, el detector de fase midió la parte imaginaria de la señal ($IVI \sin \theta$). Así, los detectores de fase midieron directamente las partes real e imaginaria de la señal^{55,58} y se calculó la amplitud y el ángulo de fase.

Estas dos señales de referencia fueron aplicadas a dos detectores de fase, cada uno de los cuales recibió la misma señal de entrada y así los dos componentes de la señal fueron medidos simultáneamente. Las salidas de los dos detectores de fase fueron leídas en un voltímetro digital e impresas. Con este dispositivo aumenta la exactitud de los detectores sensitivos de fase en presencia y ausencia de ruido.

6.5. Procedimiento

6.5.1. Desnervación. La desnervación se llevó a cabo en 28 ratas Wistar macho con peso de entre 190 y 220 gramos. Se les anestesió aplicándoles una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (0.0945g/1 Kg de peso), procediendo posteriormente a desinfectar el área de trabajo con Benzal al 10%. A la rata anestesiada se le hizo una incisión profunda de 1 cm en la región coxo-femoral (a la altura de la cabeza del femur) hasta que se localizó el nervio ciático.

Una vez localizado se le extrajo con unas pinzas para ser anudado en los extremos y se le seccionó con tijeras de microcirugía. Posteriormente se suturó la incisión, se desinfectó la herida con benzal al 10% y se le dejó un espacio de 10 días de recuperación.

6.5.2. Disección. Se anestesió una rata desnervada con pento barbital sódico (0.0945g/1 Kg de peso) intraperitonealmente y se colocó en la tabla de disección. El músculo EDL se disecó colocando la rata en la posición de decubito ventral y el músculo sóleo en decúbito dorsal.

Localizado el músculo (el EDL o el soleo), se amarró por la parte inferior del tendón, sin tocar el músculo y se procedió a disecarlo, sin estirar o picar la parte interna del músculo con el instrumental, para no lesionarlo. La disección fue hecha bajo microscopio.

Una vez disecado el músculo, se le colocó en una cámara con solución de Krebs Normal y TTX previamente oxigenada, teniendo cuidado que el Krebs-TTX cubriera todo el músculo*. Dentro de la misma cámara el músculo se amarró del tendón superior para posteriormente sujetarlo por los extremos procurando que la parte interna del músculo quedase hacia el exterior de la cámara. Con pinzas y tijeras de disección para microcirugía y observando a través del microscopio, se eliminó el tejido conectivo de la parte interna del músculo, sin tocar las fibras y se eliminó tejido muscular de la parte externa del músculo para observar nítidamente las fibras.

* La TTX se utilizó para bloquear los canales rápidos de Na^+ .

6.5.3. Registro.

El músculo desnervado se colocó en una cámara de tejido aislado (perfundido con Ringer-TTX), sujetándolo de los extremos, quedando la parte interna del músculo hacia el exterior de la cámara. La temperatura a la cual se trabajó durante el registro fue de 22°C. El músculo se estiró con los tornillos micrométricos de la cámara de tejido aislado, hasta que el espacio sarcomérico fue de 2.5 micras. Para medir el espacio sarcomérico se utilizó el objetivo de x40 inmersión en agua y una escala micrométrica de 100 unidades. La distancia existente entre cada división es de 1.93 micras, vista con el objetivo de x40 inmersión en agua, de tal forma que para que exista una distancia entre sarcómera y sarcómera de 2.5 micras, deben encontrarse 10 sarcómeras en 13 divisiones de la escala.

Ya determinado el espacio sarcomérico, se colocaron los microelectrodos; el de corriente conectado al oscilador y el de voltaje al amplificador de entrada y osciloscopio para registrar las diferencias de potencial (figura 6.1.). Al microelectrodo de voltaje (lleno con cloruro de potasio 2.5M) se le determinó la resistencia, la cual fue de 30 megohms y después se verificó el acople (fuga de corriente) del microelectrodo de corriente (lleno con citrato de potasio 2M y pintado con plata). La resistencia del microelectrodo de voltaje se determinó como sigue: la punta del microelectrodo de voltaje se introdujo en el baño de la solución y se aplicó un pulso de 95 mV; el voltaje que se registró fue transformado a megohms por medio de una tabla de equivalencias.

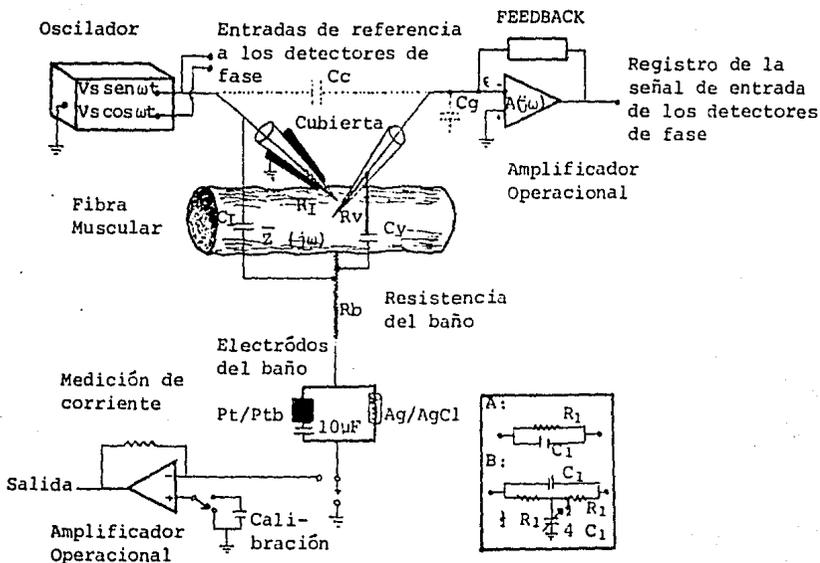


Fig. 6.1. Se muestra el aparato experimental. El osciloscopio tiene dos salidas, una de las cuales sirve como entrada del microelectrodo de corriente y ambas se utilizan como señales de referencia de los detectores de fase. La corriente fluye a través de las paredes de los microelectrodos y la resistencia del baño de la solución produce potenciales extracelulares significativos, incluyéndose la resistencia efectiva del baño de la solución en el circuito. Las propiedades eléctricas lineales de la fibra son representadas por la impedancia $Z(j\omega)$. El arreglo del baño de los electrodos tiene una impedancia despreciable a bajas y altas frecuencias. El acople de la capacitancia es medida por abajo de $2 \times 10^{-17} \text{ F}$ y también es despreciable. Nosotros usamos el circuito B, porque tiene una desviación de fase mínima para un valor dado de C_1 . Los detectores sensitivos de fase miden directamente la parte real e imaginaria del voltaje de salida (V_{out}), del amplificador operacional de corriente y del de voltaje de salida del osciloscopio, permiten mediciones de R_I . La inyección de potencial de la batería calibrada, permiten medir el R_V . Los valores de R_I , R_V , R_I y V_{obs} nos permiten calcular Z_{obs} ó ζ_{obs} y así Z es determinada.

La medida del acople se llevó a cabo introduciendo la punta del microelectròdo de corriente en el baño de la solución (cerca de la fibra en la cual se llevó el registro) y la punta del microelectròdo de voltaje fuera de la solución, al nivel de ésta. Se aplicó un voltaje máximo de 0.9 volts y se observó que no existiera registro de voltaje, es decir, que no se presentase fuga de corriente.

Una vez determinada la resistencia del microelectròdo de voltaje y el acople del microelectrodo de corriente, se comprobó que no existieran corrientes directas DC debido a falsos contactos o a tierras mal colocadas. El potencial de reposo de la fibra muscular se obtuvo introduciendo el microelectrodo de voltaje en la fibra, aplicando un pulso de 95 mV y midiendo el desplazamiento de la paji-lla a partir de la línea basal y se multiplicó la distancia por la ganancia del aparato en la cual se midió. Posteriormente se introdujo el microelectrodo de corriente a una distancia de 40 micras, contando a partir de la punta del microelectròdo de voltaje. Para que existiera propagación de corriente en sentido longitudinal y radial, las puntas de los microelectrodos se colocaron en el centro de la fibra muscular con el micromanipulador, procurando que el manejo no fuese brusco. De esta manera se evitó que los microelectrodos una vez dentro de la célula, se salieran o más aún que la punta se rompiera.

Los registros de la impedancia fueron hechos en el siguiente rango de frecuencias: 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 22, 32, 46, 68, 100, 127, 215, 316, 464, 681, 10, 1000, 1270, 2150, 3160, 4640, 6810, 10000 y 10 hertz. (Figura 6.2.).

| | | |
|-------|----|-------|
| -0008 | 20 | 0022 |
| -0004 | 20 | 0022 |
| -0003 | 26 | -0070 |
| -0002 | 27 | -0021 |
| -0001 | 26 | -0021 |
| -0000 | 25 | -0021 |
| -0000 | 24 | -0021 |
| -0001 | 22 | 0021 |
| 0000 | 21 | 0022 |
| 0001 | 20 | -0021 |
| 0001 | 19 | 0021 |
| 0001 | 18 | 0022 |
| -0001 | 17 | 0021 |
| P.I. | | P.R. |

Reg. ext.

Dist.

$f = 33.36$

1500μ 0.011

0001 0025

0014 -0193

$f = 35.27$

1000μ 0.007

0001 0020

0008 -0231

$f = 34.27$

500μ 0.004

7x32

7x22

$R_v = 32.45910^4 \Omega$

$R_v = 33.36 \text{ oct}$

| | |
|----------|------------------|
| -0001 | 0022 |
| 0000 | 0022 |
| 0013 | -0191 |
| 40 μ | 0.003 V |
| P.I. | P.R. |
| 0025 | 31 -0192 |
| 0055 | 30 -0014 |
| 0082 | 29 -0270 |
| 0099 | 28 -0094 |
| 0117 | 27 -0121 |
| 0134 | 26 -0150 |
| 0152 | 25 -0179 |
| 0174 | 24 -0215 -0.015V |
| 0030 | 23 -0027 |
| 0093 | 22 -0135 |
| 0095 | 21 -0124 |
| 0112 | 20 -0118 |
| 0127 | 19 -0178 |
| 0145 | 18 -0214 |
| 0159 | 17 -0250 -0.006V |
| 0028 | 16 -0032 |
| 0079 | 15 -0155 |
| 0076 | 14 -0101 |
| 0067 | 13 -0075 |
| 0054 | 12 -0021 |
| 0044 | 11 -0032 |
| 0033 | 10 -0039 |
| 0025 | 9 -0043 |
| 0020 | 8 -0015 |
| 0016 | 7 -0052 |
| 0015 | 6 -0052 |
| 0018 | 5 -0022 |
| 0022 | 4 -0053 |
| 0030 | 3 -0046 |
| 0041 | 2 -0027 |
| 0041 | 1 -0026 -0.003V |

Resist.

Reg.

Reg.

Dist.

$f = 12.4 \text{ MHz}$

Rég.

$R_{v \text{ out}}$

$R_{v \text{ INP}}$

p.r.

g.

Fig. 6.2.b Registro en el Gold-Brush, donde p.r., es el potencial de reposo y g. es la ganancia del aparato.

Fig. 6.2.a Registro de datos de una fibra de-nervada. Datos impresos donde: Reg. es el registro a todas las frecuencias; Resist., son

resistencias dentro y fuera de la célula; Reg. ext., son los registros con el microelectrdo de voltaje fuera de la célula; y Dist., son las distancias medidas.

$j = 5$

Al final del registro se midió la resistencia del microelectrodo de corriente dentro de la fibra muscular, por la aplicación de un pulso de 95 mV y midiendo el desplazamiento de la pajilla a partir de su línea basal. Para medir la resistencia del microelectrodo de voltaje éste fue sacado de la fibra muscular, permaneciendo dentro de la solución y dejando el microelectrodo de corriente dentro de la fibra muscular. De la misma forma que en el paso anterior, se aplicó un pulso de 95 mV y se midió el desplazamiento de la pajilla. Con el microelectrodo de voltaje fuera de la célula y el de corriente dentro de la misma, se determinaron los potenciales extracelulares en el siguiente rango de frecuencias: 100, 127, 215, 316, 464, 681, 1000, 1270, 2150, 3160, 4640, 6810, 10000 hertz.

Finalmente se determinaron las propiedades DC de la fibra muscular a 40, 500, 1000 y 1500 micras de distancia entre punta y punta de los microelectrodos y a 1 hertz de frecuencia. Se desplazó el microelectrodo de voltaje con el micromanipulador y el microelectrodo de corriente se mantuvo en el lugar donde inicialmente fue introducido. Las mediciones entre la corriente sinusoidal aplicada y el potencial registrado a través del microelectrodo de voltaje fueron procesadas en una computadora Digital PDP 11/34. Se diseñaron programas específicos para obtener los parámetros DC, el ajuste de modelos (Acumulado, Híbrido y Distribuido) y las gráficas correspondientes del ángulo de fase y magnitud de la impedancia contra el logaritmo de la frecuencia.

6.6. Ajuste de Datos

Las propiedades eléctricas pasivas de las fibras musculares fueron obtenidas ajustando los datos de impedancia registrados experimentalmente, con los modelos de circuitos equivalentes descritos anteriormente. Los resultados del ajuste dependen de los datos registrados experimentalmente en todas las frecuencias⁵⁸, enfatizando en los datos centrales, los cuales usualmente son los más exactos. Con el ajuste de datos encontramos medidas estadísticamente definidas tal como la desviación estándar de los parámetros estimados del circuito. Las ventajas obtenidas con el ajuste de datos fueron:

a. Proporcionan información acerca del coeficiente de correlación entre los parámetros del circuito, para poder definir si dos parámetros del circuito están estrechamente correlacionados y no pueden ser evaluados independientemente⁵⁸.

b. Es posible obtener el mejor ajuste, manteniendo constante algunas variables⁵⁸.

c. El procedimiento no utilizó mucho tiempo en la computadora, dado que algunas veces es necesario hacer un gran número de ajustes en el análisis de los resultados experimentales⁵⁸.

Se usó el método de ajuste de curvas, derivado y analizado para la determinación de estructuras moleculares a partir de datos cristalográficos. Se definieron las siguientes variables, ya que otros autores utilizan diferentes notaciones:

$\vartheta(\omega_i)$ Es el ángulo de fase experimentalmente observado, siendo ω la frecuencia angular. El subíndice $i = 1, 2, 3, \dots, M$, donde M es la frecuencia en la que el dato fue registrado.

$\theta(\omega_i, \beta_j)$ Es el ángulo de fase teórico predicho en la frecuencia angular ω_i para los valores de los parámetros (β_j) del circuito. Cada β_j es un parámetro diferente y $j = 1, 2, 3, \dots, N$, donde N es el número de parámetros independientes del circuito, cuyos valores queremos determinar.

El procedimiento para determinar los mejores valores de los parámetros del circuito y su varianza, dependió de la distribución de los datos experimentales. Se siguió el procedimiento recomendado para datos con distribución Gaussiana, observando que los valores minimizarán el error cuadrado medio, entre los ángulos de fase teóricamente predichos y los experimentalmente observados⁵⁸. La función minimizada es:

$$\psi = \sum_{i=1}^M W_i F_i^2(\vartheta_i, \theta_i)$$

donde los pesos W_i , son definidos y discutidos abajo, y

$$F_i(\vartheta_i, \theta_i) = \vartheta_i(\omega_i) - \theta(\omega_i; \beta_j)$$

Se usó el algoritmo Levenberg-Marquardt, implementado por Brown porque fue conveniente y eficiente⁵⁸. La selección de los pesos (los cuales son números positivos entre cero y uno) dependió de cada situación. Se ajustaron los datos de una fibra muscular, propo-

niendo el peso en la unidad, aunque a veces se seleccionaron valores bajos de peso para puntos contaminados por error sistemático.

La desviación estándar de los parámetros (la raíz cuadrada de la varianza) se computó con la siguiente fórmula:

$$\text{Var}j = \sum_{i=1}^M \frac{W_i F_i^2}{(M-N) \sum_{i=1}^M \omega_i \left(\frac{dF_i}{d\beta_j} \right)^2}$$

donde el valor de las derivadas, fue estimado en base a sus diferentes aproximaciones finitas⁵⁸. La desviación estándar de cada parámetro fue vista, como el recíproco de la derivada de la curva teórica, con respecto a los parámetros. Así, si la curva cambia significativamente de forma, por cambios en el valor de los parámetros, la derivada es grande y el error estándar del parámetro es pequeño. Si la curva no cambia significativamente de forma, por cambios en el parámetro (por ejemplo si el parámetro fuera g_{wg} del modelo híbrido), la derivada sería pequeña y la desviación estándar sería alta. Durante el ajuste, se realizó la prueba R de Hamilton⁶⁰ (una prueba parecida a la F del análisis de varianza), con:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^M W_i F_i^2}{\sum_{i=1}^M \omega_i \delta_i}$$

Así, un valor de $R = 0.01$ implica que el ajuste teórico y experimental está dentro del 1% de significancia. Si uno de los

modelos tiene parámetros mejor ajustables que el otro, se podría ajus
tar mejor si la diferencia entre los modelos es significativa. El va
lor de R toma en cuenta el número de parámetros ajustables en el mode
lo usado, para generar las curvas teóricas. La distribución de R ha
sido estudiada y se tienen tablas, que permiten determinar entre los
valores de R y así saber cuando dos curvas teóricas son significati-
vamente diferentes. Estos son los caminos para evaluar estadística-
mente la significancia del valor de un parámetro. Esta prueba tiene
la ventaja de que los valores de todos los otros parámetros (no cons-
tantes) sean libres y tomen sus mejores valores en el ajuste.

7. RESULTADOS

La figura 7.1a nos muestra la relación existente entre el ángulo de fase y la frecuencia, y la figura 7.1b la relación entre la magnitud de la impedancia y la frecuencia en fibras normales del EDL de rata y las figuras 7.1c y 7.1d relacionan los parámetros antes mencionados en fibras normales de sóleo; en donde las X representan los datos experimentales obtenidos directamente de las mediciones y los O los datos corregidos, es decir, aquellos obtenidos a partir de la corrección de los datos experimentales, menos los valores de potenciales extracelulares y el efecto de "cargado" de los aparatos (loading).

Las figuras 7.2a y 7.2c muestran los ángulos de fase obtenidos a partir de los datos registrados experimentalmente en fibras musculares desnervadas con una concentración de TTX de 3.1×10^{-7} M, tanto de EDL como de sóleo y las figuras 7.2b y 7.2d la magnitud de la impedancia de EDL y sóleo respectivamente, ambas a diferentes frecuencias. Observamos en las figuras 7.2a y 7.2c que a bajas frecuencias (0.2-0.7) generalmente se presenta inversión de signo en la mayor parte de las fibras desnervadas de EDL (22) y del sóleo (25). Aún cuando no se llegara a observar esta inversión en el ángulo de fase, en las figuras 7.2b y 7.2d observamos que la magnitud de la impedancia va aumentando conforme se aumenta la frecuencia (a bajas frecuencias).

La inversión del ángulo de fase a bajas frecuencias (0.2 - 0.7 Hz), nos llevó a realizar el ajuste de modelos en el rango

de frecuencias de 1.0 - 10000 hertz, como muestran las figuras 7.3a y 7.3b para el EDL desnervado y 7.3c y 7.3d, para el sóleo desnervado debido a que los programas no contemplan el comportamiento no lineal que presenta la membrana en estas frecuencias.

Por otro lado, se determinaron las propiedades eléctricas lineales en fibras desnervadas de EDL (n=5), aumentando la concentración de TTX 500%, para tener una concentración de 1.5×10^{-4} M y así verificar si la inversión del ángulo de fase a bajas frecuencias, era debido a la presencia de un componente inductivo. Los resultados se muestran en la tabla III. Las figuras 7.4a y 7.4b muestran el ángulo de fase y la magnitud de la impedancia obtenidas con esta concentración, observándose que no existe inversión de signo a bajas frecuencias.

Posteriormente se obtuvieron los parámetros DC del EDL y del sóleo desnervados en la unidad de la longitud (tabla IV). El número total de fibras sujetas a experimentación fue de 22 y 25, para EDL y sóleo respectivamente, con una concentración de TTX de 3.1×10^{-7} M y 5 fibras desnervadas de EDL con una concentración de TTX de 1.5×10^{-4} . Los resultados de músculo desnervado (EDL y sóleo) fueron comparados con los resultados obtenidos para músculo normal (EDL y sóleo) por Mendiola y Valdiosera (datos no publicados).

- Ang. de Fase

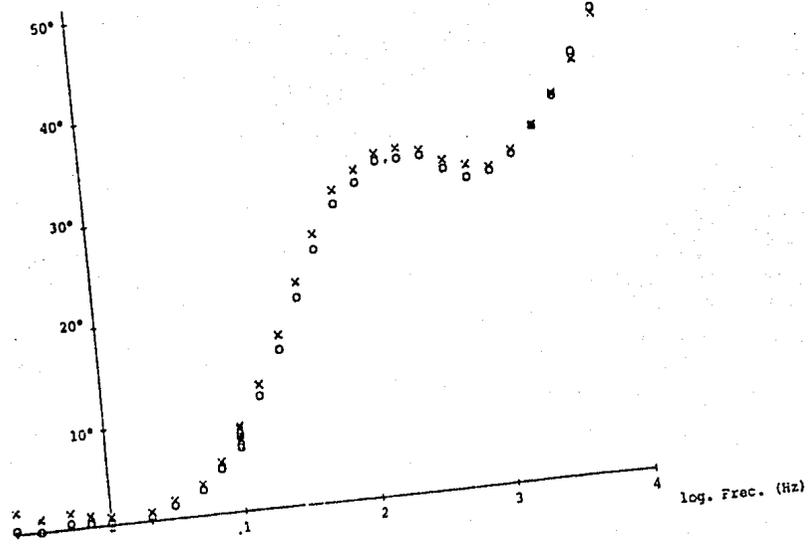


Fig. 7.1.a Gráfica del -ángulo de fase vs log. de la frecuencia de EDL normal. Dónde X son los datos experimentales y los O datos corregidos.

Magn. Imped. (ohm-cm)

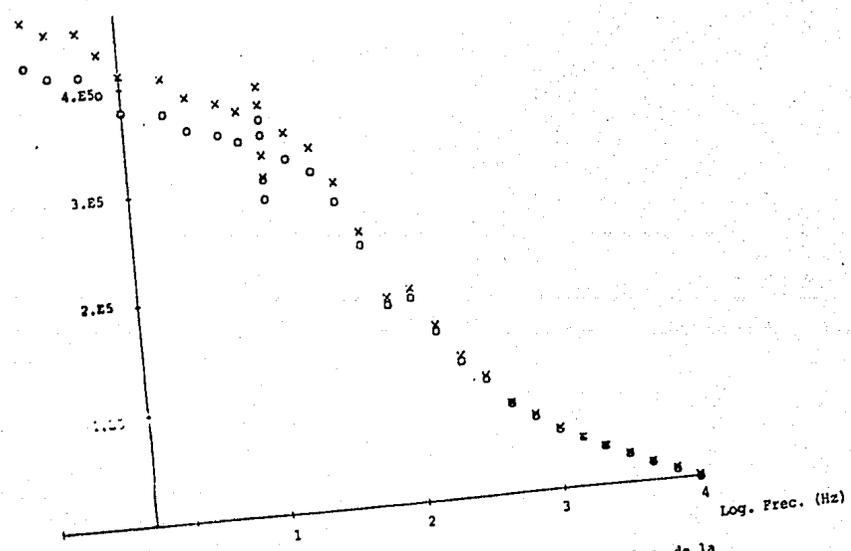


Fig. 7.1.b Gráfica de la magnitud de la impedancia vs Log. de la frecuencia de EDL normal. Dónde X son los datos experimentales y los O datos corregidos.

- Ang. de Fase

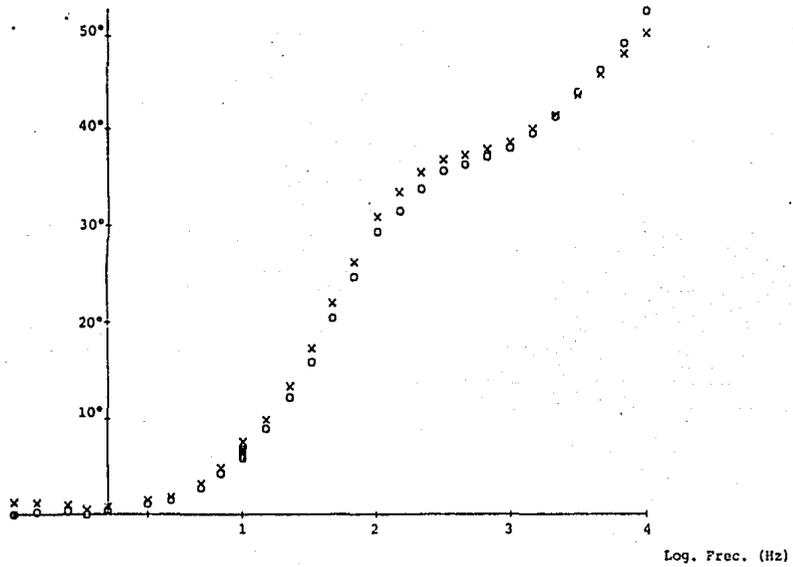


Fig. 7.1.c Gráfica del ángulo de fase vs Log. de la frecuencia de sódio normal. Dónde X son los datos experimentales y los O datos corregidos.

Mag. Imped. (ohm-cm)

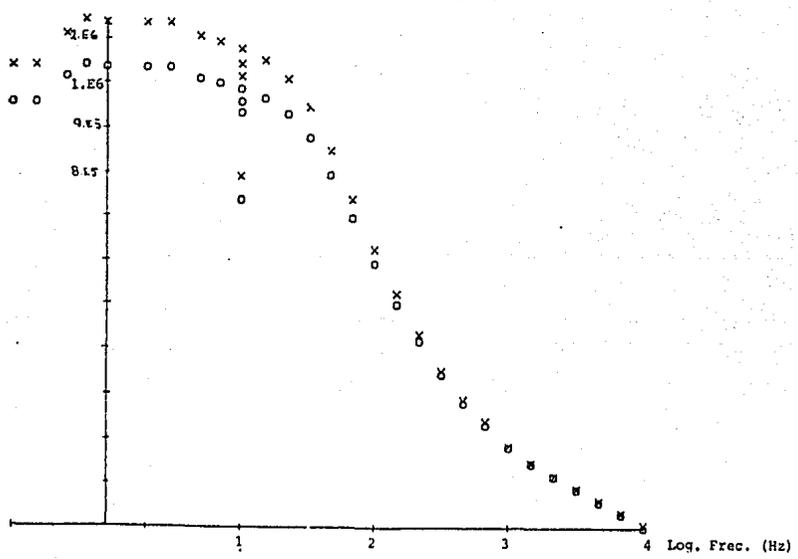


Fig. 7.1.d Gráfica de la magnitud de la impedancia vs Log. de la frecuencia de sódio normal. Dónde X son los datos experimentales y los O datos corregidos.

- Ang. de Fase

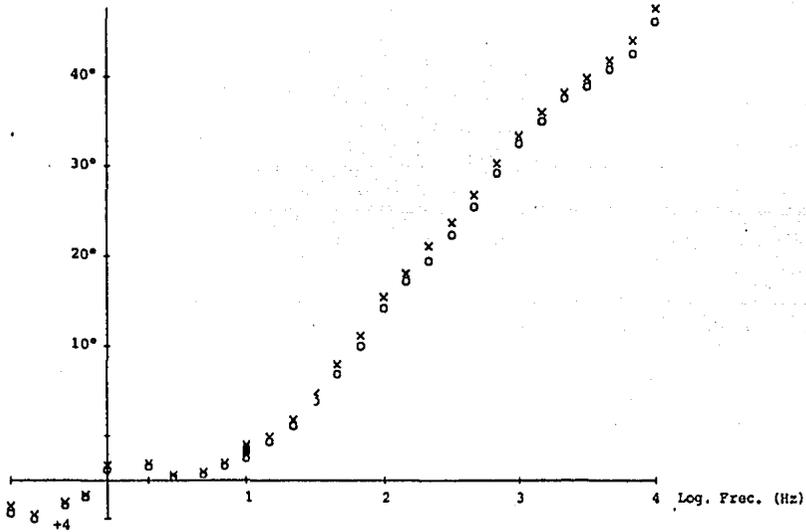


Fig. 7.2.a Gráfica de -ángulo de fase vs Log. de la frecuencia en EDL de hervado ($3.1E^{-7}$ M de TTX). Dónde X son los datos experimentales y O datos corregidos.

Mag. Imped. (ohm-cm)

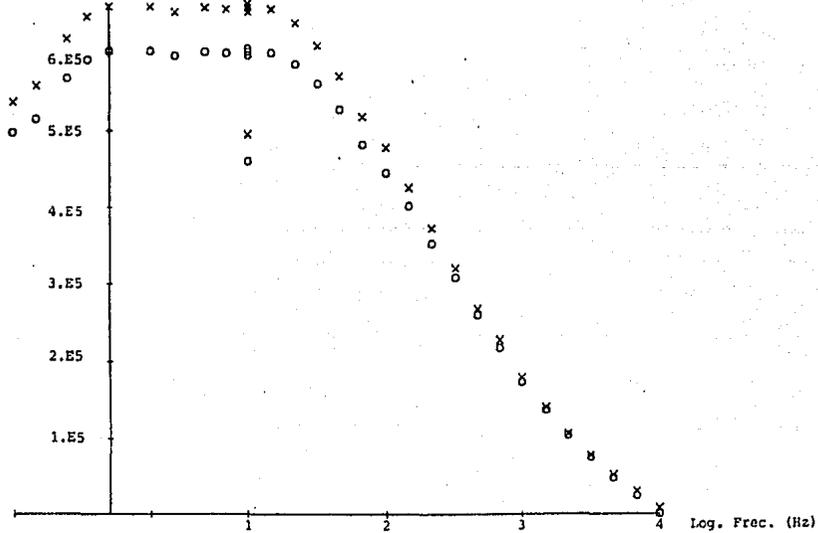


Fig. 7.2.b Gráfica de la magnitud de la impedancia vs Log. de la frecuencia en EDL de hervado ($3.1E^{-7}$ M de TTX). Dónde X son los datos experimentales y los O datos corregidos.

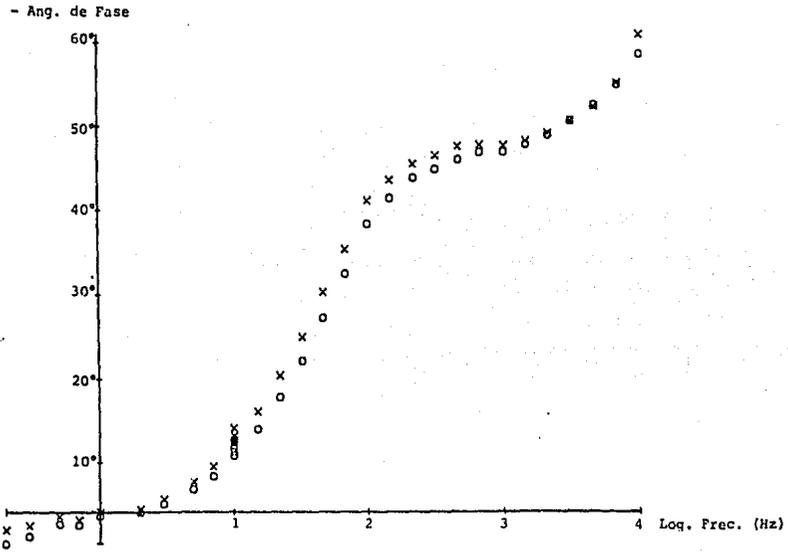


Fig. 7.2.c Gráfica del -ángulo de fase vs Log. de la frecuencia en sólo decaffinado (3.1E-7 M de TTX). Dónde X son los datos experimentales y los O datos corregidos.

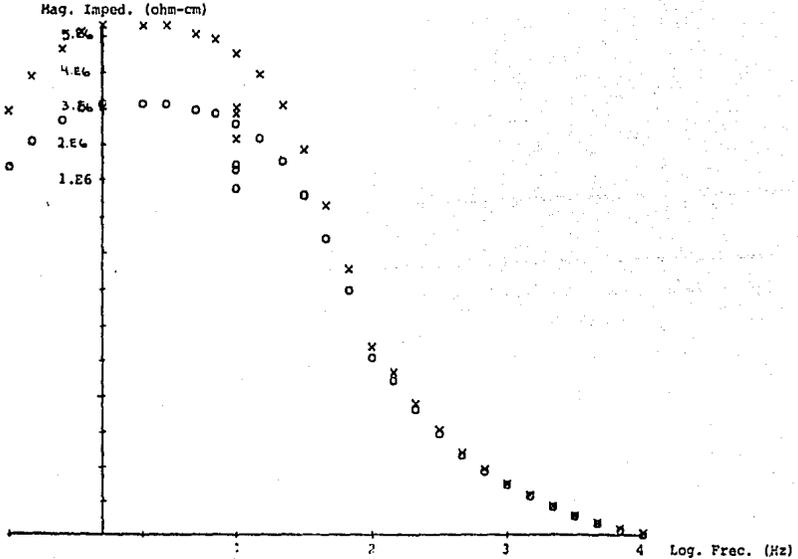
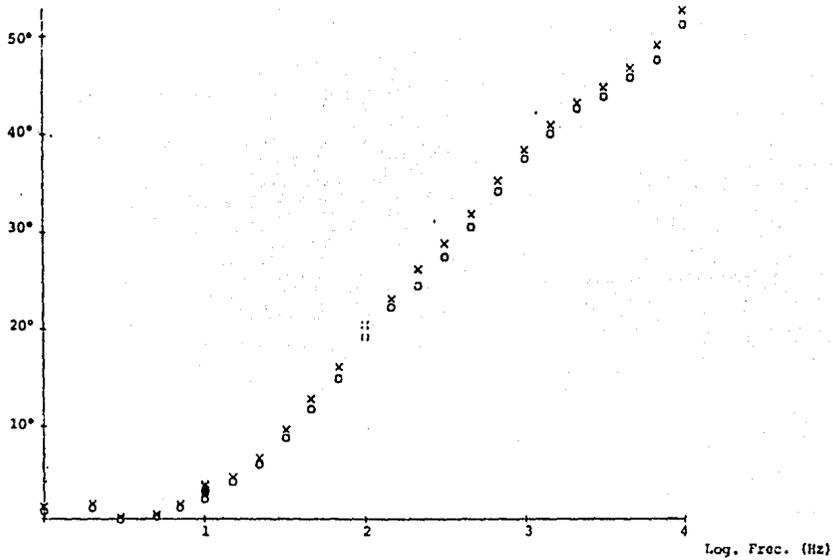


Fig. 7.2.d Gráfica de la magnitud de la impedancia vs Log. de la frecuencia en EDI decaffinado (3.1E-7 M de TTX). Dónde X son los datos experimentales y los O datos corregidos.

- Ang. de Fase



75

Fig. 7.3.a Gráfica de EDL derivado con 27 frecuencias para llevar a cabo el ajuste de modelos: Acumulado, Híbrido y Distribuido. Dónde X son los datos experimentales y O los datos corregidos.

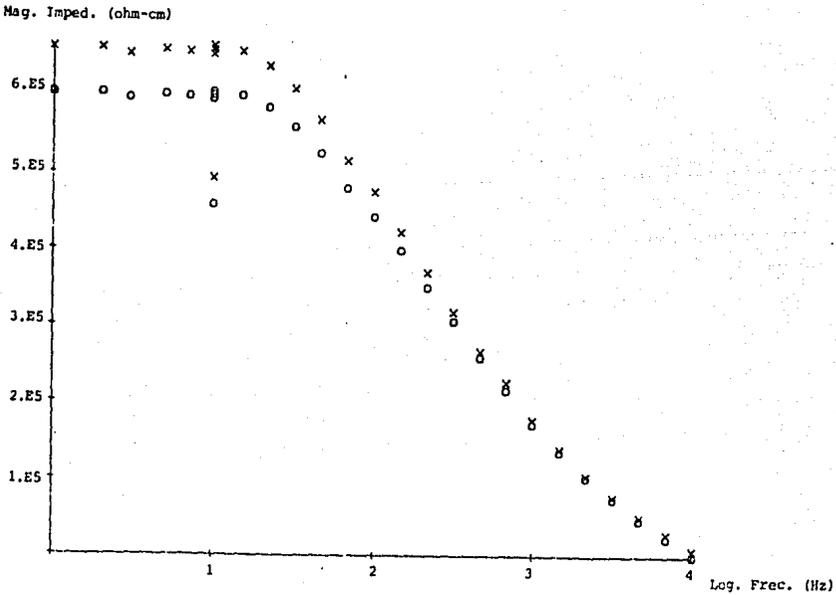


Fig. 7.3.b Gráfica de EDL derivado con 27 frecuencias, para llevar a cabo el ajuste de modelos: Acumulado, Híbrido y Distribuido. Dónde X son los datos experimentales y los O datos corregidos.

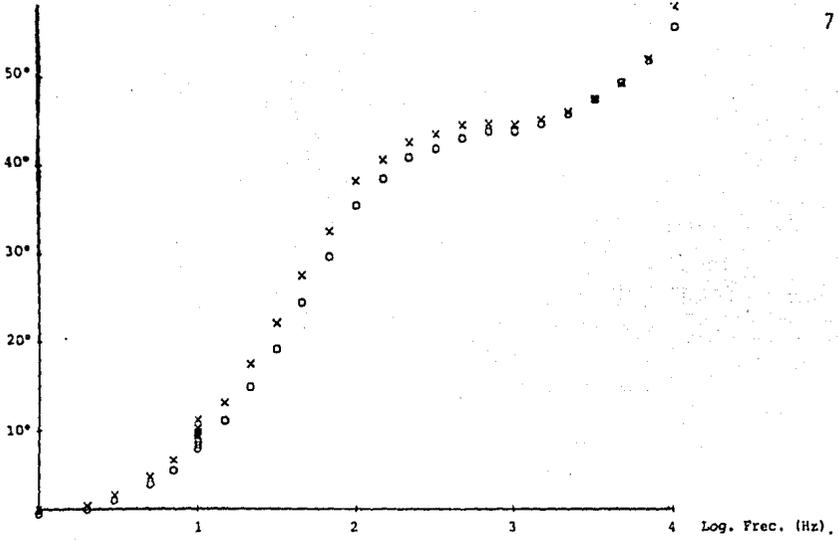


Fig. 7.3c Gráfica de sólo deharvado con 27 frecuencias, para llevar a cabo el ajuste de modelos: Acumulado, Híbrido y Distribuido. Dónde X son los datos experimentales y O datos corregidos.

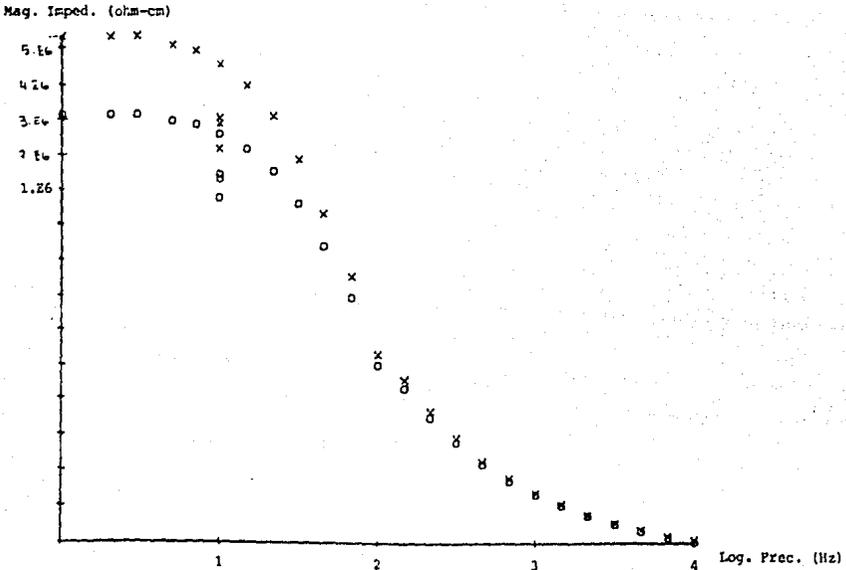


Fig. 7.3d Gráfica de sólo deharvado con 27 frecuencias, para llevar a cabo el ajuste de modelos: Acumulado, Híbrido y Distribuido. Dónde X son los datos experimentales y O datos corregidos.

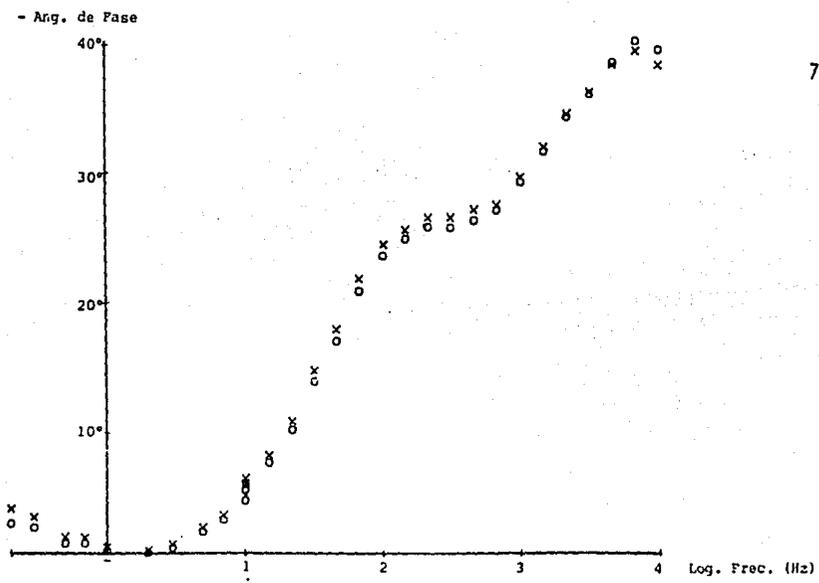


Fig. 7.4.a Gráfica del ángulo de fase vs Log. de la frecuencia en fibras de EDL dehergado con una concentración 500% ($1.5E^{-4}$ M), con respecto a lo normal ($3.1E^{-7}$ M). Dónde X son los datos experimentales y O datos corregidos.

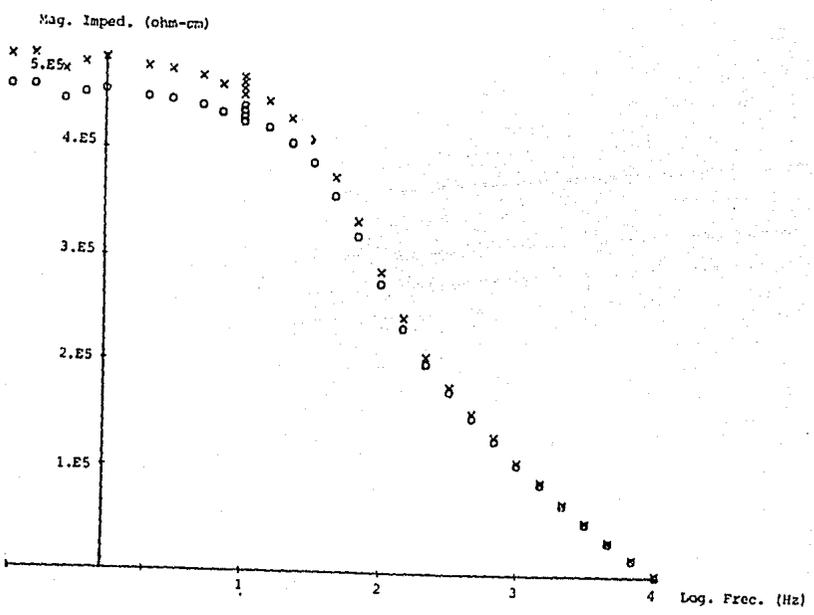


Fig. 7.4.b Gráfica de la magnitud de la impedancia vs Log. de la frecuencia en fibras de EDL dehergado con una concentración 500% ($1.3E^{-4}$ M), con respecto a lo normal ($3.1E^{-7}$ M). Dónde X son los datos experimentales y O datos corregidos.

7.1. Potencial de Reposo ($-V_m$)

Después de la desnervación el efecto inicial que se presenta es la disminución del potencial de reposo, en fibras de ambos músculos (tabla IV). El V_m del EDL normal es -84.23 ± 8.46 mV ($n=24$) y del EDL desnervado es de -68.30 ± 7.49 mV ($n=22$), existiendo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Por otro lado el V_m del soleo normal es de -84.23 ± 8.46 mV ($n=24$) y del soleo desnervado es -64.50 ± 8.36 mV ($n=25$), existiendo también diferencia significativa. Los valores de V_m del EDL y del soleo desnervados no presentan diferencias significativas entre sí, al igual que el valor de V_m del EDL desnervado con concentración de 1.5×10^{-4} M de TTX que es de -55 ± 9.3 mV ($n=5$).

La disminución del V_m fue de 15 y 16 mV en el EDL y soleo desnervado, con respecto a los valores obtenidos para músculos normales.

7.2. Resistencia de Entrada (R_o)

La R_o obtenida sufre cambios significativos con respecto a los valores normales. Así, tenemos que la R_o del EDL normal es de 44.0 ± 16.08 ohms ($n=24$) y del EDL desnervado es de 67.61 ± 17.76 ohms ($n=22$), siendo la diferencia significativa ($p < 0.01$), al igual que la R_o del soleo normal 48.85 ± 17.74 ohms ($n=16$) con respecto a la del soleo desnervado, que es de 114.15 ± 31.39 ohms ($n=25$).

Comparativamente, la R_o del EDL y del soleo desnervado

también presenta diferencias significativas existiendo un aumento de casi el doble en la R_o del soleo con respecto al EDL desnervado (Tabla IV).

7.3 Resistencia de Membrana (R_m)

La R_m también presenta alteraciones en sus valores, siendo para el EDL normal de $561.43 \pm 249.88 \text{ ohm/cm}^2$ ($n=24$), y para el EDL desnervado de $912.03 \pm 396.23 \text{ ohm/cm}^2$ ($n=22$) lo que es estadísticamente significativo ($p < 0.01$). Lo mismo ocurre entre la R_m del sóleo normal $617.68 \pm 325.76 \text{ ohm/cm}^2$ ($n=16$) y la del sóleo desnervado $1414.0 \pm 256.64 \text{ ohm/cm}^2$ ($n=25$), que presenta un aumento de más del doble con respecto a la R_m del soleo normal (Tabla IV).

Las diferencias de R_m entre el EDL y sóleo desnervados también son significativas, aumentando la R_m en el soleo desnervado casi la mitad con respecto al valor de R_m del EDL desnervado. La R_m del EDL desnervado con $1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ de TTX es de $950.72 \pm 284.31 \text{ ohm/cm}^2$ ($n=5$), no existiendo diferencia significativa con respecto al valor del EDL desnervado con $3.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ de TTX (Tabla III).

7.4. Constante de Espacio (λ) y Diámetro (a)

La λ del EDL normal es de $0.560 \pm 0.155 \text{ mm}$ ($n=24$) y del EDL desnervado de $0.689 \pm 0.194 \text{ mm}$ ($n=22$), no existiendo diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor del EDL normal. Ocurre lo mismo entre el sóleo normal que tiene una λ de $0.622 \pm 0.615 \text{ mm}$ ($n=16$) y el soleo desnervado con $0.752 \pm 0.126 \text{ mm}$ ($n=25$) co-

mo se observa en la Tabla IV. Entre el EDL y sóleo desnervado, tampoco existen diferencias significativas. Por otro lado, el diámetro del EDL y sóleo desnervados disminuye con respecto a los valores de músculos normales. El diámetro del EDL normal es de $18.89 \pm 4.90 \mu\text{m}$ ($n=24$) y del EDL desnervado de $17.24 \pm 6.49 \mu\text{m}$ ($n=22$), lo cual no es significativo, no ocurriendo lo mismo con el sóleo normal que tiene un diámetro de $18.98 \pm 4.47 \mu\text{m}$ ($n=16$) y el sóleo desnervado con $12.83 \pm 2.37 \mu\text{m}$ ($n=25$), lo cual si es significativo (Tabla IV). Entre el EDL y el sóleo desnervado, existe también diferencia significativa ($p < 0.01$), existiendo una mayor disminución en el diámetro del sóleo (5 micras), con respecto al EDL desnervado y de casi 6 micras con respecto al sóleo normal. La disminución del radio del EDL con 1.5×10^{-4} M de TTX es de $17.24 \pm 6.49 \mu\text{m}$ ($n=5$), no existiendo diferencia significativa con respecto al EDL normal y al EDL desnervado con 3.1×10^{-7} M de TTX (Tabla III).

7.5. Capacidad Total de la Membrana (C_{tot})

Las tablas V, VI y VII muestran que la C_{tot} , derivada de la suma de la capacidad de la membrana superficial, más las de los sistemas membranales internos, aparece disminuida en los músculos desnervados en todos los modelos con respecto a los normales. La C_{tot} del EDL normal en el modelo acumulado es de $5.19 \pm 1.50 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=20$) y del EDL desnervado de $2.93 \pm 0.950 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=20$); en el modelo híbrido es de $6.14 \pm 1.12 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=17$) para el EDL normal y para el EDL desnervado de $3.40 \pm 0.90 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=20$); y en el modelo distribuido el EDL normal tiene una C_{tot} de $5.81 \pm 1.40 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=16$) y pa-

ra el EDL desnervado de $3.33 \pm 0.95 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=20$), existiendo una disminución de casi la mitad en el modelo distribuido y más de la mitad en los modelos restantes, lo cual es significativo ($p < 0.01$). Lo mismo ocurre en el sóleo desnervado con respecto al sóleo normal, siendo la C_{tot} para el sóleo normal en el modelo acumulado de $4.99 \pm 2.23 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=12$) y para el sóleo desnervado de $2.37 \pm 0.435 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=23$), la C_{tot} del sóleo normal en el modelo híbrido es de $6.33 \pm 3.68 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=14$) y para el sóleo desnervado de $2.62 \pm 0.630 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=21$), y la C_{tot} de sóleo normal en el modelo distribuido es de $6.47 \pm 3.84 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=13$) y para el sóleo desnervado de $2.53 \pm 0.610 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, observándose que en el modelo híbrido la C_{tot} disminuye a más de la mitad en el sóleo desnervado, con respecto al sóleo normal y en los modelos restantes la disminución es la mitad con respecto al valor normal.

La C_{tot} del EDL desnervado en cada modelo no presenta diferencias significativas, al igual que la C_{tot} del sóleo desnervado. Comparativamente el EDL y sóleo desnervados no presentan diferencias estadísticamente significativas en sus valores de C_{tot} en cada modelo ajustado.

La C_{tot} del EDL desnervado con 1.5×10^{-4} M de TTX en el modelo acumulado es de $3.29 \pm 1.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=3$); en el modelo híbrido de $3.55 \pm 1.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=4$) y en el modelo distribuido de $3.52 \pm 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=5$), no existiendo diferencia significativa con respecto al EDL desnervado con 3.5×10^{-7} M de TTX, pero si con el EDL normal ($p < 0.01$), siendo las diferencias similares a las referidas para el EDL desnervado con 3.5×10^{-4} M de TTX.

La contribución relativa de la capacidad de la pared tubular real (C_w) aparece disminuida de manera significativa en el soleo desnervado con respecto al soleo normal, principalmente. Así, tenemos que la C_w del EDL normal en el modelo acumulado es $1.23 \pm 0.430 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=16$) y para el EDL desnervado es de $0.813 \pm 0.447 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=20$); en el modelo híbrido la C_w del EDL normal es $4.05 \pm 1.25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=17$) y para el EDL desnervado de $2.26 \pm 1.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=20$) y finalmente para el modelo distribuido la C_w del EDL normal es $3.96 \pm 1.13 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=16$) y para el EDL desnervado de $2.43 \pm 1.15 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=20$), no existiendo diferencias significativas, excepto la C_w del EDL desnervado en el modelo híbrido que disminuyó a casi la mitad con respecto al EDL normal. Por otro lado, la C_w del sóleo normal en el modelo acumulado es de $4.77 \pm 4.09 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=12$) y del sóleo desnervado es de $0.550 \pm 0.214 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=23$); la C_w del sóleo normal en el modelo híbrido es de $8.59 \pm 7.74 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=14$) y del sóleo desnervado de $4.20 \pm 1.78 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=21$) y finalmente la C_w del sóleo normal en el modelo distribuido es de $9.22 \pm 8.36 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=13$) y para el sóleo desnervado de $4.09 \pm 1.85 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=25$), siendo significativa la diferencia del sóleo desnervado con respecto al normal ($p < 0.01$). La disminución de la C_w en el sóleo desnervado fue de más de la mitad en el modelo acumulado y distribuido y la mitad en el modelo híbrido con respecto al sóleo normal (Tablas V, VI y VII).

La C_w del EDL desnervado disminuye a casi la mitad en el modelo distribuido e híbrido con respecto al sóleo desnervado lo cual es significativo y aparece con un ligero aumento en el modelo acumulado con respecto al sóleo desnervado, no siendo significativo

el aumento.

La capacidad de la pared tubular ideal (C^*w) también disminuye en los músculos desnervados con respecto a los normales, siendo significativa la disminución. La C^*w del EDL normal en el modelo acumulado es $3.31 \pm 1.13 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=16$) y del EDL desnervado es de $1.78 \pm 0.818 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=20$); en el modelo híbrido la C^*w del EDL normal es de $5.28 \pm \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=17$) y del EDL desnervado es $2.50 \pm 0.870 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=20$) y en el modelo distribuido la C^*w del EDL normal es $5.40 \pm 1.35 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=16$) y del EDL desnervado $2.68 \pm 1.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=20$), siendo la disminución de la C^*w de casi la mitad en el EDL desnervado con respecto al normal. La C^*w del sóleo normal en el modelo acumulado es $2.47 \pm 1.53 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=12$) y del sóleo desnervado de $1.01 \pm 0.259 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=23$); para el modelo híbrido la C^*w del sóleo normal es $4.49 \pm 3.16 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=14$) y del sóleo desnervado de 1.61 ± 0.450 y para el modelo distribuido la C^*w del sóleo normal es de $4.75 \pm 3.38 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=13$) y del sóleo desnervado de $1.54 \pm 0.44 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n=25$), siendo la disminución de la C^*w del sóleo desnervado de más la mitad con respecto al normal ($p < 0.01$). La diferencia entre el EDL y sóleo desnervado es significativa, disminuyendo la C^*w del sóleo en todos los modelos a casi la mitad con respecto al EDL desnervado (Tablas V, VI y VII).

La tabla VIII, nos muestra los resultados de este trabajo y los resultados obtenidos por otros autores por diferentes métodos^{3,4,12}.

| MUSCULO | n | a μm | -Vm mV | r _m cmX10 ³ | r _i cmX10 ⁶ | R _o \sim X10 ⁴ | R _m \sim /cm ² |
|---------|---|-----------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|---|
| EDL | 5 | \bar{x} 16.709 DE 1.81 | 55.55 9.31 | 91.47 29.27 | 18.43 3.54 | 64.19 13.62 | 950.72 284.31 |

Tabla III.a Propiedades DC de fibras de músculo de mamífero.

| MUSCULO | n | T °C | C*m $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ | C*w $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ | Cw $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ | R*m \sim /cm ² | CTOT ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$) |
|---------|---|---------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| EDL | 3 | 22 | \bar{x} 1.27 DE 0.34 | 2.029 0.77 | 0.806 0.299 | 950.72 284.31 | 3.29 1.00 |

Tabla III.b. Modelo Acumulado.

| MUSCULO | n | T °C | C*m $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ | C*w $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ | Cw $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ | CTOT $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ |
|---------|---|---------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| EDL | 4 | 22 | \bar{x} 0.926 DE 0.19 | 2.725 1.0 | 2.003 0.57 | 3.5506 1.0 |

Tabla III.c Modelo Híbrido.

| MUSCULO | n | T °C | C*m $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ | C*w $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ | Cw $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ | CTOT $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ |
|---------|---|---------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| EDL | 5 | 22 | \bar{x} 0.491 DE 0.24 | 3.0337 1.0 | 2.4841 0.9107 | 3.5244 1.0 |

Tabla III.d Modelo Distribuido.

TABLA III. Media (\bar{x}) y desviación estandar (DE) de las propiedades DC, parámetros del modelo Acumulado, Híbrido y Distribuido, registradas en el músculo EDL desnervado a una concentración de TTX de 1.5×10^{-4} M. Esta concentración es 500% mayor a la concentración normal de TTX que es de 3.1×10^{-4} M.

PROPIEDADES DC DE FIBRAS DE MUSCULO DESNERVADO DE MAMIFERO

| músculo | n | T °C | -V _m mV | r _m ohm-cm x 10 ³ | r _i ohm-cm x 10 ⁶ | a μm | R ₀ ohm x 10 ⁴ | R _m ohm/cm ² | λ mm |
|-----------|----|---------|-----------------------|--|--|---------|---|---------------------------------------|---------|
| ext. nor. | 24 | 21 | \bar{x} 84.25* | 48.39 | 18.53 | 18.89 | 44.00* | 561.43* | 0.560 |
| | | | D.E. 8.46 | 23.27 | 15.27 | 4.90 | 16.08 | 249.88 | 0.155 |
| sol. nor. | 16 | 20 | \bar{x} 80.85* | 56.81 | 16.45 | 19.89* | 48.85* | 617.68* | 0.622 |
| | | | D.E. 8.56 | 16.97 | 10.38 | 4.47 | 17.74 | 325.76 | 0.615 |
| ext. des. | 22 | 22.5 | \bar{x} 68.30* | 85.80 | 22.60 | 17.24 | 67.61* | 912.03* | 0.689 |
| | | | D.E. 7.49 | 29.47 | 11.61 | 6.49 | 17.76 | 396.23 | 0.194 |
| sol. des. | 15 | 22 | \bar{x} 64.50* | 186.02 | 36.91 | 12.83* | 114.15* | 1414.60* | 0.752 |
| | | | D.E. 8.36 | 78.13 | 27.53 | 2.37 | 31.39 | 256.64 | 0.126 |

TABLA IV. Media (\bar{x}) y desviación estandar (D.E.) de las propiedades DC de los músculos EDL y sóleo, normal y desnervado. Los asteriscos (*) marcan la diferencia existente entre los valores de los músculos desnervados con respecto a los normales, con una significancia de $p < 0.01$, en donde n es el número de fibras; V_m es el potencial de reposo; r_i y r_m son las resistencias interna y de membrana respectivamente en la unidad de la longitud; a es el diámetro de la fibra; R₀ es la resistencia de entrada; R_m es la resistencia de la membrana por unidad de área y λ es la constante de espacio.

MODELO ACUMULADO

| músculo | n | T °C | C _m [*] μF/cm ² | C _w [*] μF/cm ² | C _w μF/cm ² | R _m [*] ohm/cm ² | C _{tot.} μF/cm ² |
|-----------|----|----------------|---|---|--------------------------------------|--|---|
| ext. nor. | 16 | 21 \bar{x} | 1.88 | 3.31* | 1.23 | 530.95* | 5.19* |
| | | DS | 0.470 | 1.13 | 0.430 | 166.00 | 1.50 |
| sol. nor. | 12 | 20 \bar{x} | 2.52 | 2.47* | 4.77* | 719.85* | 4.99* |
| | | DS | 0.820 | 1.53 | 4.09 | 262.90 | 2.23 |
| ext. des. | 20 | 22.5 \bar{x} | 1.13 | 1.78* | 0.813 | 1055.73* | 2.93* |
| | | DS | 0.340 | 0.818 | 0.447 | 403.96 | 0.950 |
| sol. des. | 23 | 22 \bar{x} | 1.36 | 1.01* | 0.550* | 1433.23* | 2.37* |
| | | DS | 0.293 | 0.259 | 0.214 | 251.67 | 0.435 |

TABLA V. Media (\bar{x}) y desviación estandar (D.E) de los parámetros del Modelo Acumulado, en donde los asteriscos (*) marcan la diferencia entre los músculos desnervados (ENL y sóleo) con respecto a los normales con una significancia de $p < 0.01$. n es el número de fibras; T es la temperatura; C_m^{*} es la capacidad de la membrana ideal; C_w^{*} es la capacidad de la pared tubular ideal; C_w es la capacidad de la pared tubular real; R_m^{*} resistencia de la membrana ideal y C_{tot} es la capacidad total de la membrana.

MODELO HIBRIDO

| músculo. | n | T °C | C _m [*] μF/cm ² | C _w [*] μF/cm ² | C _w μF/cm ² | C _{tot} μF/cm ² |
|-----------|----|------------|---|---|--------------------------------------|--|
| ext. nor. | 17 | 21 DS | \bar{x} 0.860 DS 0.540 | 5.28* 1.21 | 4.05* 1.25 | 6.14* 1.12 |
| sol. nor. | 14 | 20 DS | \bar{x} 1.84 DS 0.890 | 4.49* 3.16 | 8.59* 7.74 | 6.33* 3.68 |
| ext. des. | 20 | 22.5 DS | \bar{x} 0.902 DS 0.370 | 2.50* 0.870 | 2.26* 1.00 | 3.40* 0.900 |
| sol. des. | 21 | 22 DS | \bar{x} 1.00 DS 0.280 | 1.61 * 0.450 | 4.20* 1.78 | 2.62 * 0.630 |

TABLA VI. Media (\bar{x}) y desviación estandar (D.E) de los parámetros del Modelo Híbrido, en donde los asteriscos (*) marcan la diferencia entre los músculos desnervados (EDL y sóleo) con respecto a los normales con una significancia de $p < 0.01$. n es el número de fibras; T es la temperatura; C_m^{*} es la capacidad de la membrana ideal; C_w^{*} es la capacidad de la pared tubular ideal; C_w es la capacidad de la pared tubular real y C_{tot} es la capacidad total de la membrana.

MODELO DISTRIBUIDO

| músculo | n | T °C | C_m^* $\mu F/cm^2$ | C_w^* $\mu F/cm^2$ | C_w $\mu F/cm^2$ | C_{tot} $\mu F/cm^2$ |
|-----------|----|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------|
| ext. nor. | 16 | \bar{x} 21 D.E. | 0.454 0.290 | 5.40* 1.35 | 3.96* 1.13 | 5.81* 1.40 |
| sol. nor. | 13 | \bar{x} 20 D.E. | 1.72 0.730 | 4.75* 3.38 | 9.22* 8.36 | 6.47* 3.84 |
| ext. des. | 20 | \bar{x} 22.5 D.E. | 0.648 0.340 | 2.68* 1.00 | 2.43* 1.15 | 3.33* 0.950 |
| sol. des. | 25 | \bar{x} 22 D.E. | 0.980 0.350 | 1.54* 0.440 | 4.09* 1.85 | 2.53* 0.610 |

TABLA VII. Media (\bar{x}) y desviación estandar (D.E) de los parámetros del Modelo Distribuido, en donde los asteriscos (*) marcan la diferencia entre los músculos desnervados (EDL y sóleo) con respecto a los normales con una significancia de $p < 0.01$. n es el número de fibras; T es la temperatura; C_m^* es la capacidad de la membrana ideal; C_w^* es la capacidad de la pared tubular ideal; C_w es la capacidad de la pared tubular real y C_{tot} es la capacidad total de la membrana.

| PROCEDECENCIA DE LOS DATOS. | r_i $\text{cm} \times 10^6$ | r_m $\text{cm} \times 10^3$ | λ mm | a μm | R_m ohm/cm^2 | C_{tot} $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ |
|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------------------------|---|
| PRESENTE TRABAJO | 22.60 | 85.88 | 0.68 | 17.24 | 912.0 | 3.62 |
| ALBUQUERQUE Y THESLEFF (4) | 111.0 | ----- | 0.50 | 12.00 | 759.0 | 5.80 |
| DULHUNTY (12) | ----- | 297.0 | 1.30 | 53.60 | 4993 | 4.00 |

TABLA VIIIa. Comparación de las propiedades eléctricas lineales, registradas por diferentes autores, incluyendo los resultados obtenidos en el presente trabajo para el EDL desnervado de rata.

| PROCEDECENCIA DE LOS DATOS | r_i $\text{cm} \times 10^6$ | r_m $\text{cm} \times 10^3$ | λ mm | a μm | R_m ohm/cm^2 | C_{tot} $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------------------------|---|
| PRESENTE TRABAJO | 36.91 | 186.0 | 0.75 | 12.83 | 1414.6 | 3.31 |
| ALBUQUERQUE Y THESLEFF (4) | 76.0 | ----- | 0.40 | 12.0 | 458.0 | 10.8 |
| DULHUNTY (12) | ----- | 282.0 | 2.47 | 43.6 | 3944.0 | 11.30 |

TABLA VIIIb. Comparación de las propiedades eléctricas lineales, registradas por diferentes autores incluyendo los resultados obtenidos en el presente trabajo para el sóloo desnervado de rata.

8. DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el ajuste de modelos, en general, fue adecuado para todas las fibras probadas, excepto aquellas que no presentaron un comportamiento lineal.

Después de la desnervación, las propiedades eléctricas cambian marcadamente en ambos músculos, lo cual es un reflejo de los cambios estructurales en la membrana celular, dado que es muy improbable que la resistencia del mioplasma cambie de modo muy acentuado³.

En el axón gigante de calamar se ha observado que, en algunos casos el locus de la impedancia se encontraba en el medio inductivo del plano que relaciona las partes real e imaginaria⁹. Los resultados obtenidos muestran que a bajas frecuencias (0.2 - 0.7 Hz) el locus de impedancia entra en el plano inductivo. Se sabe de antemano que el efecto inductivo está directamente relacionado con la conductancia del Na^+ en la membrana de la fibra muscular y que en un pequeño rango de potenciales de reposo de la membrana de la fibra muscular la conductancia no es constante^{9,36}. Así, en muchas fibras excitables el incremento en la despolarización es debida a las conductancias de Na^+ , motivo por el cual se utilizó TTX para bloquear los canales de este ión.

Los canales rápidos de Na^+ fueron bloqueados con TTX, sin embargo, estudios recientes muestran que en el músculo esquelético desnervado de rata, aparecen canales lentos de Na^+ resistentes a la

TTX^{15,47,56}. Para apoyar la hipótesis de la aparición de una nueva población de canales de Na⁺, se han analizado curvas dosis-respuesta en fibras normales y desnervadas de EDL de rata⁴¹ (figura 8.1.).

Por lo general, después de agregar 1×10^{-9} M de TTX, en las fibras normales se bloquea el 95% de los canales de Na⁺, mientras que en fibras desnervadas permanecen sin bloquear más del 35% de los canales¹⁵. Esto es debido a la aparición de canales lentos de Na⁺ resistentes a la TTX, de que si reemplazamos el Na⁺ externo por tetrametilamonio (TMA⁺) o por una mezcla de Ca⁺⁺ (50 mM) y sacarosa, los canales son inactivados⁴⁵. Es posible que pudiera ocurrir un retardo en la cinética, si los canales resistentes a la TTX tuvieran características normales y fueran localizados preferencialmente en el sistema T. Sin embargo, estudios realizados muestran que usando el modelo de malla², la velocidad de inactivación es más rápida en el sistema T comparada con la superficie⁴⁶. La aparición de canales resistentes a la TTX, debido a una nueva síntesis o por la modificación de los ya existentes, son generalmente selectivos y dependientes del voltaje. Como podemos observar en la curva dosis-respuesta de la TTX (figura 8.1.), la caída de la curva es muy lenta en el EDL desnervado en comparación con el EDL normal y se necesitan altas concentraciones de TTX para alcanzar el nivel mínimo de conductancia, lo cual indica la existencia de una población de canales de Na resistentes a la TTX, que a medida que aumenta la concentración de TTX son bloqueados. Lo anterior podría explicar la inversión de signo observado a bajas frecuencias, ya que en las curvas de EDL con 3.1×10^{-4} M de TTX, no se observa la inversión del signo en la curva a bajas frecuencias (figura 7.4).

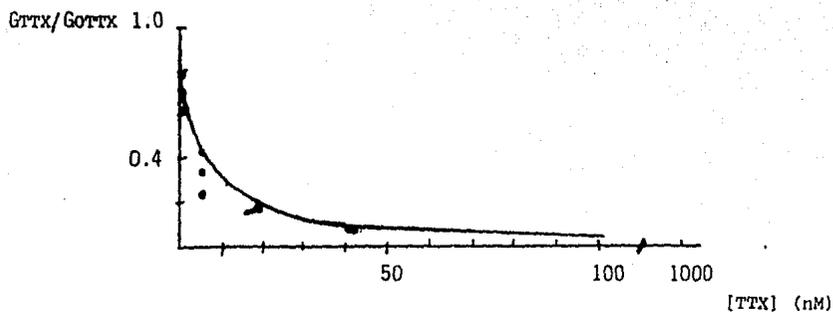


Fig. 8.1.a Curva dosis-respuesta de TTX, en fibras normales de EDL.⁴⁷

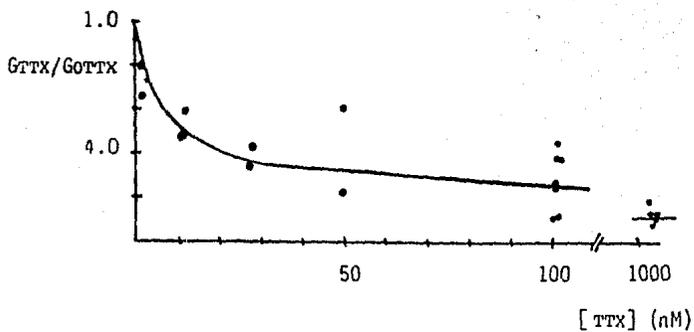


Fig. 8.1.b Curva dosis-respuesta de TTX, en fibras desnervadas de EDL.⁴⁷

Inicialmente después de la desnervación, la densidad total de canales rápidos de Na^+ permanece constante pero posteriormente aparecen canales lentos de Na^+ resistentes a la TTX que reemplazan a algunos de los canales rápidos de Na^+ sensibles a la TTX²⁷. Una alternativa más para explicar esta inversión de signo en el ángulo de fase, es el movimiento de cargas intramembranales que se presenta^{26,39}.

Una posible explicación a la despolarización provocada por la desnervación, sería que la contribución electrogénica al potencial de membrana dependiera de la inervación. Otra alternativa sería que la desnervación causa alteraciones significativas en la permeabilidad membranal; en los mamíferos se ha demostrado que la desnervación provoca disminución de la conductancia al Cl^- ⁴. También es posible que la redistribución del K^+ interno sea la causante de la disminución del potencial de reposo. Se ha observado que los iones K^+ son necesarios para la síntesis de proteínas y en los estados iniciales de la desnervación, ésta es incrementada al igual que los iones K^+ ^{3,4,28}. No se puede descartar la aparición de receptores de la Ach en regiones fuera de la placa neuromuscular después de la desnervación, ya que ésta ocurre casi simultáneamente con la disminución del potencial de reposo, así como con el aumento de la síntesis protéica.

El incremento en la resistencia específica (R_m) podría estar relacionado con la disminución en la conductancia del K^+ ⁶². Se sabe que la capacidad total de la membrana (C_{tot}) es proporcional al diámetro de la fibra⁴⁷ y normalmente la C_{tot} de fibras con diámetro pequeño (como las desnervadas) debería ser menor que las fibras de diámetro

mayor¹⁴. Esto sucede en las fibras desnervadas, por lo que el sobre desarrollo del sistema sarcotubular (Sistema T y RS)¹⁷ no contribuye de manera significativa a la C_{tot} . Esta conclusión se basa en que, el sistema tubular por unidad de área aumenta en la fibra desnervada, pero disminuye el volumen de la misma.

Hay que señalar que en el aumento del sistema sarcotubular no participan de igual manera los sistemas T y RS y que los parámetros eléctricos fueron medidos en el sistema T y no en el RS. Por lo general, las propiedades eléctricas están referidas a varias estructuras y al área superficial de una fibra hipotética, es decir, con área de sección circular, sin invaginaciones y sin plegamientos de la membrana plasmática. Tomando en consideración este factor, es fácil suponer que se está subestimando la cantidad total de la membrana por unidad de área.

La disminución de la C_{tot} y el aumento de la R_m y de la R_o , podría indicar que existe disminución en el área del túbulo T, aunque para afirmarlo es necesario hacer el estudio morfométrico ultraestructural de fibras desnervadas. Actualmente, se desconocen las alteraciones que ocurren en el sistema T del músculo desnervado, así como el flujo de corriente a lo largo del túbulo, por lo que es difícil predecir como el mayor desarrollo del RS y sistema T contribuirán a la C_{tot} de la membrana. La discrepancia en los resultados obtenidos por el método de la impedancia y la de otros autores^{5, 12} podría deberse a:

a). El método utilizado para la determinación de los parámetros del circuito equivalente. Los resultados serán más homo-

gêneos o heterogêneos dependiendo del método utilizado, ya que cada método controla variables diferentes.

b). El circuito equivalente seleccionado. Cada circuito equivalente mantiene constantes diferentes variables, que afectan directamente a los resultados, además de que existen diferentes modelos que ajustan mejor que otros, según el método utilizado.

c). La contribución de factores no considerados, como podría ser la conducta no lineal, es decir, la aparición de componentes de tipo inductivo que contaminarán los resultados, como podría ser nuestro caso.

d). La longitud de la sarcómera en los diferentes estudios; es importante que se tome en cuenta este factor, porque existe una dependencia de los parámetros del circuito con la longitud de la sarcómera⁵⁶.

9. CONCLUSIONES

1. Los modelos eléctricos propuestos para determinar los parámetros lineales en músculo esquelético de rana, también son útiles para calcular los mismos parámetros, en músculo esquelético desnervado de rata.

2. El estudio de las propiedades eléctricas lineales en músculo esquelético desnervado, debe hacerse tomando en cuenta diversos factores, ya que la aparición de un componente de tipo inductivo (no lineal) a bajas frecuencias puede contaminar los resultados y no facilita el ajuste de modelos eléctricos.

3. El modelo distribuido fue el que mejor ajustó los datos y en el que se obtuvieron mejores resultados en las propiedades eléctricas del músculo.

4. En el músculo desnervado, la disminución de la capacidad total (C_{tot}), aunado al aumento de la resistencia total de la membrana (R_m), se debe a la disminución del área de la membrana y del túbulo T, aunque es necesario realizar un análisis morfométrico detallado, ya que si bien es conocido que el área del RS aumenta, no necesariamente implica también el aumento del área del sistema T.

10. APENDICE I. DISTRIBUCION DEL POTENCIAL EN EL SISTEMA T

Parte de la gran capacidad eléctrica que tiene el músculo es debida a las redes de túbulos transversos.¹⁹ Considerando que la contracción es activada eléctricamente, es necesario conocer como el sistema T se carga rápida y completamente, a partir de un cambio súbito en la diferencia de potencial entre el sarcoplasma y el fluido externo. Por otro lado, se desarrollaron análisis, partiendo de las siguientes suposiciones:^{2,55}

1. Los túbulos se encuentran abiertos en la superficie y forman una red regular del tipo que se ilustra en la figura I.1.

2. El diámetro de los túbulos es pequeño en comparación con la malla.

3. La malla es más pequeña en comparación con el diámetro del músculo.

El lumen de los túbulos tiene una conductividad específica G_L en mho-cm^{-1} , su membrana una capacitancia y conductancia por unidad de área C_w (F-cm^{-2}) y G_w (mho-cm^{-2}) respectivamente. A partir de estos conceptos básicos, se requiere derivar 3 constantes prácticas que aparecen en la ecuación de propagación de corriente del sistema T. Estas constantes son: \bar{C}_w , \bar{G}_w , la capacitancia y conductancia de la membrana tubular por unidad de volumen de la fibra y \bar{G}_L , que es la conductividad efectiva radial del lumen tubular en mho-cm^{-1} .

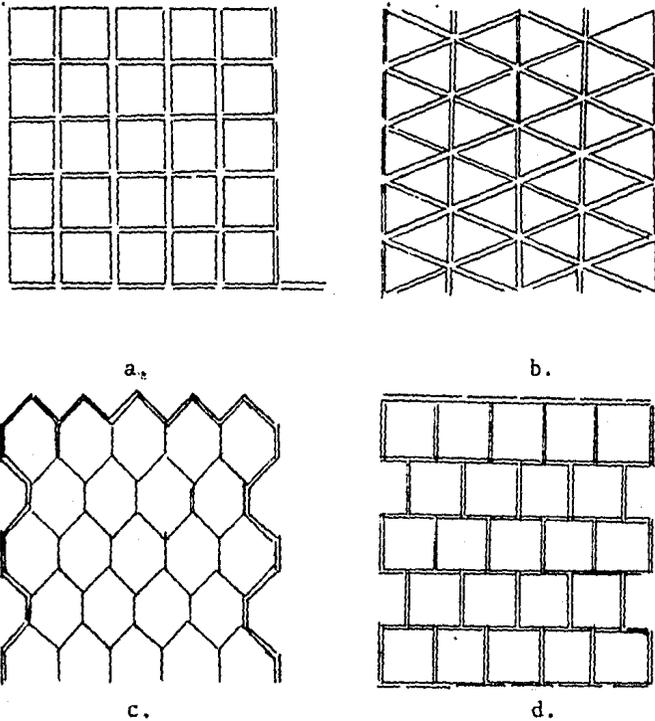


Fig.I.1 Arreglo hipotético de redes tubulares consideradas en el apéndice; a, cuadrada; b, trigonal; c, hexagonal; d, cuadrada escalonada²

Si ρ es la fracción del volumen total del músculo ocupado por los túbulos y ξ es la relación entre el volumen y la superficie tubular, tenemos que:

$$\bar{C}_w = C_{wp}/\xi$$

$$\bar{G}_w = G_{wp}/\xi$$

$$\bar{G}_L = G_L \rho \sigma$$

donde σ es el factor de tortuosidad², ya que las ramificaciones del sistema tubular tendrán un marcado efecto sobre el flujo radial de la corriente. Para el tipo de redes a, b y c de la figura I.1, σ tiene un valor de 1/2; la red d es anisotrópica con $\sigma = 1/10$ para el flujo de corriente paralelo a las uniones verticales T y $\sigma = 1/2$ para la dirección en ángulos rectos.

En la luz tubular se permiten gradientes radiales de potencial, mientras que en el sarcoplasma no se permiten. La solución del flujo de corriente en sentido radial se resuelve separadamente de las ecuaciones que describen el flujo de corriente en sentido longitudinal. Dado que el interior de la fibra es considerado equipotencial, la corriente radial externa por unidad de longitud es:

$$-i = 2\pi r \bar{G}_L \frac{du}{dr} \dots\dots 1$$

donde u es el desplazamiento de la diferencia de potencial a través de la membrana tubular y r es la distancia en sentido radial. Por la ley de Ohm tenemos que:

$$i_r = - \frac{du}{dr} \frac{1}{r} \dots\dots 2$$

Si:

$$\bar{G}_L = \frac{1}{rL}$$

la corriente a través de la membrana tubular es:

$$i_w = i_{wz} + i_{wc} \dots 3$$

si:

$$i_{wz} = U/RW = \bar{C}_w 2\pi r U \dots 4$$

$$i_{wc} = C_w du/dt = \bar{C}_w 2\pi r du/dt \dots 5$$

sustituyendo en los valores anteriores

$$i_w = 2\pi r \bar{C}_w U + 2\pi r \bar{C}_w du/dt$$

$$i_w = 2\pi r (\bar{C}_w U + \bar{C}_w du/dt) = dU/dr \dots 6$$

sustituyendo la ecuación 1 en 6, ya que por la ley de Kirchoff:

$$i_w = - \frac{di_x}{dx}$$

$$\frac{d}{dx} (2\pi r \bar{G}_L du/dr) = 2\pi r (\bar{C}_w U + \bar{C}_w du/dt) \dots 7$$

$$\frac{-\bar{G}_L}{r} \frac{d}{dx} (r du/dr) = \bar{C}_w U + \bar{C}_w du/dt$$

$$\frac{\bar{G}_L}{r} \left[r \frac{d^2 U}{dr^2} + \frac{du}{dr} \right] = \bar{C}_w U + \bar{C}_w du/dt$$

$$\bar{G}_L \frac{d^2 U}{dr^2} + \frac{\bar{G}_L}{r} \frac{du}{dr} = \bar{C}_w U + \bar{C}_w du/dt$$

dividiendo entre \bar{C}_w :

$$\frac{\bar{G}_L}{\bar{C}_w} \frac{d^2 U}{dr^2} + \frac{\bar{G}_L}{\bar{C}_w} \frac{1}{r} \frac{du}{dr} = \frac{\bar{C}_w}{\bar{C}_w} U + \frac{du}{dt}$$

si:

$$K = \bar{G}_L / \bar{C}_w$$

y:

$$\bar{G}_w / \bar{C}_w = 1 / \epsilon_w$$

entonces:

$$K = \frac{d^2 U}{dr^2} + \frac{K}{r} \frac{du}{dr} = \frac{1}{\epsilon_w} U + du/dt \dots 8$$

En el estado estacionario:

$$\frac{du}{dt} = 0$$

$$K \frac{d^2 U}{dr^2} + \frac{K}{r} \frac{du}{dr} = \frac{U}{\epsilon_w}$$

$$\epsilon_w K \frac{du^2}{dr^2} + \epsilon_w K \frac{1}{r} \frac{du}{dr} = U \dots 9$$

$$\epsilon_w K = \lambda^2 T = \bar{G}_r / \bar{G}_w$$

$$\lambda^2 \frac{du^2}{dr^2} + \lambda^2 \frac{1}{r} \frac{du}{dr} - U = 0 \dots 10$$

La ecuación 10, es una ecuación del tipo modificada de Bessel de orden cero, cuya solución es la función de Bessel*.

Si: $U = I_0(r/\lambda t) \dots 11$

Relacionando U/U_a tenemos que:

$$\frac{U}{U_a} = \frac{I_0(r/\lambda t)}{I_0(a/\lambda t)} \dots 12$$

donde a es el radio de la fibra y U_a es el potencial en el punto $r=a$.

La densidad de corriente en el sistema tubular de la superficie de la fibra se encuentra dado por:

$$\text{si: } I_a = \overline{G}_L (du/dr)a \dots 13$$

$$u = I_o (r/\lambda t)$$

$$\frac{du}{dr} = \frac{d}{dr} [I_o(r/\lambda t)]$$

La derivada de $I_o(x)$ se denomina $I_1(x)$ que es la función modificada de Bessel de primer orden, cuya solución es:

$$\frac{d}{dx} I_o(x) = I_1(x) = \frac{x}{2} + \frac{x^3}{2^2 \cdot 4} + \frac{x^5}{2^2 \cdot 4^2 \cdot 6} + \dots$$

$$\frac{du}{dr} = \frac{1}{\lambda t I_1} (a/\lambda t)$$

$$\text{Por tanto: } I_a = \frac{\overline{G}_L}{\lambda t} [I_1(a/\lambda t)] \dots 14$$

Por otro lado, la resistencia total del sistema tubular esta dada por:

$$R_T = \frac{U_a}{I_a} = \frac{\lambda t I_o(a/\lambda t)}{\overline{G}_L I_1(a/\lambda t)} \dots 15$$

$$\text{si: } a/\lambda t \longrightarrow 0 \text{ por ejemplo cuando } \lambda t \gg a$$

$$\text{y si tomamos: } I_o = 1 + \frac{x^2}{2^2}; I_1 = \frac{x}{2} + \frac{x^3}{2^2 \cdot 4} = \frac{x}{2} \left(1 + \frac{x^2}{8}\right)$$

sustituyendo en la ecuación 15: donde $x = a/\lambda t$

$$R_T = \frac{\lambda t [1 + (a/\lambda t)^2/4]}{\overline{G}_L \left[\frac{(a/\lambda t)}{2} \left(1 + \frac{(a/\lambda t)^2}{8}\right) \right]}$$

$$R_T = \frac{2\lambda^2 T}{a \overline{G}_L} + 1/4 \frac{a}{\overline{G}_L}$$

como: $\lambda^2 T = K \xi_w = \bar{G}_L / \bar{G}_w$

entonces: $R_T = \frac{2}{a \bar{G}_w} + \frac{a}{4 \bar{G}_L}$

donde: $2/a \bar{G}_w =$ resistencia de la membrana tubular.

$a/4 \bar{G}_L =$ resistencia efectiva del fluido tubular.

* Ecuación Modificada de Bessel de Orden Cero:

$$\frac{d^2 y}{dx^2} + \frac{1}{x} \frac{dy}{dx} - y = 0$$

Solución: $I_0(x) = 1 + \frac{x^2}{2^2} + \frac{x^4}{2^2 4} + \frac{x^6}{2^2 4^2 6} + \dots +$ Función Bessel.

NOTA: Todas las derivadas utilizadas, son parciales y no totales.

11. APENDICE II. UNIDADES

Las células de acuerdo a su forma pueden tener estructuras geométricas regulares tales como: cilindros, esferas, etc., para facilitar el estudio de sus propiedades eléctricas. Las propiedades eléctricas lineales de células cilíndricas (fibras musculares y nerviosas), pueden ser descritas por medio de las ecuaciones para un cable, sin embargo en esta sección únicamente me remitiré a la derivación de las unidades de los diferentes parámetros y no propiamente a las ecuaciones de cable, que han sido ampliamente analizadas por diversos autores. Este apéndice pretende cubrir en cierta forma lo que en la literatura aparece mas o menos disperso, mostrando en forma detallada los pasos y las relaciones que conducen a la obtención de las diferentes variables involucradas en los modelos eléctricos de las fibras musculares.

La célula se considera como un cable homogéneo de radio (a) y longitud (h), que presenta un interior conductor, separado del medio externo (también conductor) por una membrana que posee cierta conductancia y capacidad. Las resistencias del interior, exterior y de la membrana se consideran como óhmicas. La resistencia de un cilindro es proporcional a su longitud, entre el área de sección:

$$R \propto h/A \dots 1$$

La constante de proporcionalidad recibe el nombre de resistividad (ρ) y es una característica de cada material.

$$R = \rho h/A \dots 2$$

De manera que la resistencia longitudinal interna (r_i) por unidad de longitud de una fibra será:

$$r_i = R/h = \rho/A = R_i/\pi a^2 \dots 3$$

A la resistividad del mioplasma se la denota con R_i , ($\rho = R_i$).

1. Resistencia Transversal de la Membrana. La resistencia transversal de la membrana es proporcional a su espesor (W) entre el área de la membrana (A):

$$R \propto W/A \dots 4$$

La constante de proporcionalidad, es la resistividad de la membrana:

$$R = \rho W/A = \rho W/2\pi ah \dots 5$$

donde la resistividad de la membrana por su espesor se denomina resistencia específica de la membrana (R_m); la resistencia transversal de la membrana por unidad de longitud será:

$$R_h = R_m/2\pi a = r_m \dots 6$$

NOTA: Las variables que aparecen con asterisco (*) son aquellas que se derivan de un cilindro regular.

La mayoría de los autores no marcan la diferencia entre las variables derivadas a partir de la suposición de que la fibra se modela como un cilindro y aquellas variables que se derivan de la estructura

propia de la fibra; tomando en consideración los parámetros obtenidos del análisis ultraestructural de la preparación (los cuales se denotan con la letra mayúscula y sin asterisco), ya que existe falta de información cuantitativa de la estructura muscular.

Las variables referidas al volumen de la fibra (letras mayúsculas con barra) y a la estructura particular de ésta, fueron definidas en el apéndice I.² Tanto la membrana superficial, como la luz tubular y las membranas de los sistemas internos (RS y sistema T), presentan una capacidad y una cierta conductancia de acuerdo a la estructura específica que presentan a cada tipo de músculo. Las variables que lo describen se relacionan de la siguiente manera:

$$G_L = G_L \rho \sigma \dots \dots \dots \text{Ec. c}$$

$$G_w = G_w \rho / \xi$$

donde:

ρ = fracción del volumen total del músculo ocupado por los túbulos.

ξ = relación entre el volumen y la superficie tubular.

σ = factor de tortuosidad.

De la ecuación 14 del apéndice I, sabemos que la resistencia del sistema T es igual a la suma de la resistencia de la membrana tubular, más la resistencia efectiva del fluido tubular (propuesta y desarrollada matemáticamente en la ec. 19

del apéndice I).

$$R^*T = 2/a\bar{G}_W + a/4\bar{G}_L \dots 19$$

y que por definición la resistencia efectiva de la luz tubular es:

$$R^*L = a/4\bar{G}_L \dots 7$$

donde \bar{G}_L es la conductividad de la luz tubular por unidad de volumen de una fibra "cilíndrica".

También por definición y de la misma manera que la resistencia específica de la membrana se relaciona a la resistencia de la luz transmembranal (r_m) por unidad de longitud, la resistencia de la luz tubular por unidad de longitud se define como:

$$r_L = R^*L/2\pi a \dots 8$$

sustituyendo en la ecuación 8 el valor de R^*L :

$$r_L = \frac{1}{8\pi\bar{G}_L} \dots 9$$

La conductancia de la membrana tubular de una fibra cilíndrica se define como:

$$G^*W = a \bar{G}_W/2 \dots 10$$

y la conductancia de la pared tubular por unidad de longitud de la fibra es:

$$g_w = G^*W/2\pi a \dots 11$$

Por lo que:

$$g_w = \bar{G} w r a^2$$

La resistencia que se opone al paso de corriente en la entrada de los túbulos (resistencia de acceso) es proporcional a:

$$R_a = \rho d / 2 r a h \dots 13$$

$$R_h = r_a = R_a^* / 2 r a \dots 14$$

En un condensador de placas paralelas, la capacidad es proporcional al área de las placas (A) entre la separación de ellas (W). La constante de proporcionalidad se denomina como constante de permitividad (ϵ_0), por lo que la capacidad se define como:

$$c = \epsilon_0 A / W \dots 15$$

La capacidad de un cilindro de longitud h será:

$$c = 2 r a h \epsilon_0 / W \dots 16$$

Se denomina como capacidad específica de la membrana (C_m) a la constante de permitividad de la membrana, entre su espesor, de manera que:

$$C = C_m 2 r a h \dots 17$$

y la capacidad de la membrana entre su espesor, de manera que:

$$C_m = C^* m 2 r a \dots 18$$

Utilizando la definición de la capacidad para un cilindro de longitud h (ec. 16) se puede definir la capacidad de la membrana tubular:

$$c = 2\pi ah \epsilon_0/W \dots 16$$

y en este caso:

$$\epsilon_0/W = C^*w \dots 18$$

será la constante de permitividad de la membrana tubular sobre su espesor y se le denota como C^*w :

$$c/n = c_w = C^*w 2\pi a \dots 19$$

Todas las variables calculadas anteriormente son condensadas en la tabla II del capítulo 2: Propiedades Eléctricas Lineales.

12. APENDICE III. CIRCUITO EQUIVALENTE DEL APARATO

El circuito equivalente del aparato experimental, se muestra en la figura III.1.^{58,59,60}

El significado de las unidades utilizadas es el siguiente:

R_v y R_i = Son las resistencias de los microelectrodos de voltaje y corriente respectivamente.

C_2 y C_3 = Son las capacitancias entre el interior de los microelectrodos de voltaje, corriente y el baño.

R_2 = Es la resistencia equivalente de la solución en el baño.

C_4 = Es la capacitancia que acopla la salida del oscilador a el microelectrodo de registro de voltaje.

Z = Es la impedancia de la fibra.

Z_{obs} = Es la impedancia definida por las medidas con ambos microelectrodos dentro de la célula.

V_s = Es el voltaje de salida del oscilador.

E_{obs} = Es el voltaje de salida del amplificador.

R_f = Es la resistencia de la red de retroalimentación del amplificador de entrada.

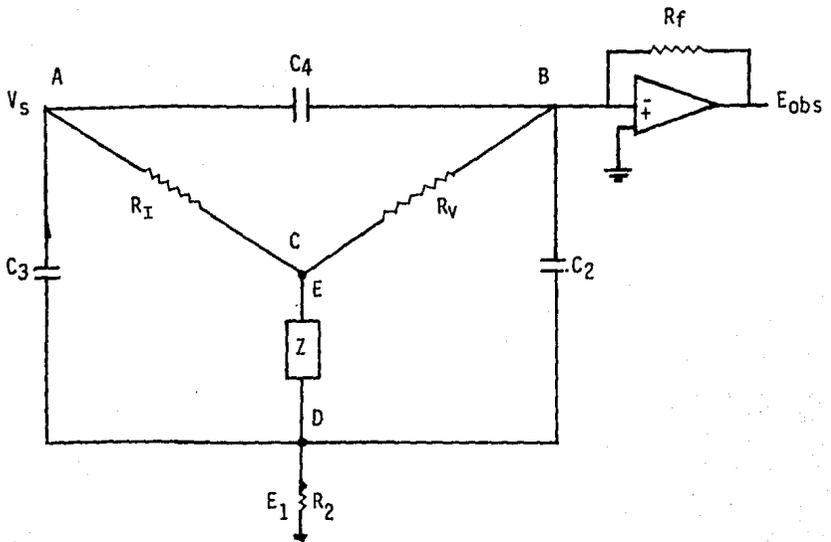


Fig. III.1. Circuito equivalente acumulado del equipo usado.^{5, 6, 5, 6, 6}

E = Es el potencial intracelular. E_1 = Es el potencial extracelular.

Idealmente no existen C_2 , C_3 , C_4 , ni R_2 y por tanto

$Z \rightarrow Z_{obs}$. Por la ley de Ohm, se tiene que:

$$I_i = \frac{V_s}{R_I} \dots 1$$

$$I_v = \frac{E}{R_V} \dots 2$$

$$-I_f = \frac{E_{obs}}{R_f} \dots 3$$

$$E = I_i Z_{obs} \dots 4$$

Sustituyendo (1) en (4) se tiene:

$$E = \frac{V_s}{R_I} Z_{obs} \dots 5$$

Sustituyendo (5) en (2):

$$I_v = \frac{V_s/R_i Z_{obs}}{R_v} \dots 6$$

Si $I_v = -I_f$, entonces:

$$\frac{V_s/R_i Z_{obs}}{R_v} = - \frac{E_{obs}}{R_f} \dots 7$$

Despejando Z_{obs} de (7):

$$Z_{obs} = \frac{-R_i R_v}{V_s} \left(\frac{E_{obs}}{R_f} \right) \dots 8$$

Realmente:

$$-I_f = I_v + I_4 + I_2 \dots 9$$

Si:

$$I_4 = V_s S C_4 \dots 10$$

$$I_2 = V_s S C_2 \dots 11$$

donde S es la transformada de Laplace, sustituyendo entonces (10) y (11) en (9) se tiene:

$$-I_f = \frac{E}{R_v} + V_s S C_4 + V_s S C_2 \dots 12$$

Sustituyendo (12) en (8):

$$Z_{obs} = - \frac{R_i R_v}{V_s} \left[\frac{E}{R_v} + V_s S C_4 + V_s S C_2 \right] \dots 13$$

Resolviendo (13) se tiene:

$$Z_{obs} = -R_i R_v S C_4 + \frac{E}{V_s} R_i + \frac{E_1}{V_s} R_i R_v S C_2 \dots 14$$

Puesto que el objetivo final es conocer Z y no Z_{obs} , entonces se necesita tomar en cuenta todas las ramas del circuito por donde puede fluir la corriente, para conocer su contribución y así poder eliminarlas de nuestros datos experimentales. Por lo tanto, para el nodo C se tiene:

$$\frac{E-V_s}{R_1} + \frac{E}{R_v} + \frac{E-E_1}{Z} = 0 \dots 13$$

Resolviendo (13) se tiene:

$$V_s = \frac{E}{Z} \left[1 + \frac{Z}{R_1} + \frac{Z}{R_v} \right] - \frac{E_1}{Z} \dots 16$$

Para el nodo D se tiene:

$$\frac{E_1-E}{Z} + \frac{E_1}{R_2} + E_1 - V_s (SC_3) + E_1 SC_2 = 0 \dots 17$$

Resolviendo (17) se tiene:

$$V_s SC_3 = -\frac{E}{Z} + E_1 \left[\frac{1}{Z} + \frac{1}{R_2} + S(C_2+C_3) \right] \dots 18$$

1a. Aproximación.

Como $S(C_2+C_3) \ll 1/Z$, entonces:

$$V_s SC_3 = -\frac{E}{Z} + E_1 \left[\frac{1}{Z} + \frac{1}{R_2} \right] \dots 19$$

Multiplicando la ec. (19) por $[1 + Z/R_1 + Z/R_v]$ se tiene:

$$V_s SC_3 \left(1 + \frac{Z}{R_1} + \frac{Z}{R_v} \right) = -\frac{E}{Z} \left(1 + \frac{Z}{R_1} + \frac{Z}{R_v} \right) + \frac{E_1}{Z} \left(1 + \frac{Z}{R_2} + \frac{Z}{R_1} + \frac{Z}{R_v} + \frac{Z^2}{R_2 R_1} + \frac{Z^2}{R_2 R_v} \right) \dots 20$$

Si sumamos la ec. (16) con la ec. (20) se obtiene:

$$V_s \left[\frac{1}{R_1} + SC_3 \left(1 + \frac{Z}{R_1} + \frac{Z}{R_v} \right) \right] = E_1 \left(\frac{1}{R_2} + \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_v} + \frac{Z}{R_2 R_1} + \frac{Z}{R_2 R_v} \right) \dots 21$$

2a. Aproximación.

Como $1/R_1 + 1/R_v \ll 1/R$, entonces:

$$V_s \left[\frac{1}{R_1} + SC_3 \left(1 + \frac{Z}{R_1} + \frac{Z}{R_v} \right) \right] = E_1 \left(\frac{1}{R_2} + \frac{Z}{R_2 R_v} + \frac{Z}{R_2 R_1} \right) \dots 22$$

Despejando E_1/V_s de la ec. (22):

$$\frac{E_1}{V_s} = R_2 \left[SC_3 + \frac{1}{R_1} \left(\frac{1}{1 + Z/R_2 + Z/R_v} \right) \right] \dots 23$$

Si la ec. (16) se multiplica por $(1/Z + 1/R_2)$ se obtiene:

$$\frac{V_s}{R_1} \left(\frac{1}{Z} + \frac{1}{R_2} \right) = \frac{E}{Z} \left[1 + \frac{Z}{R_1} + \frac{Z}{R_v} \right] \left(\frac{1}{Z} + \frac{1}{R_2} \right) - \frac{E_1}{Z} \left(\frac{1}{Z} + \frac{1}{R_2} \right) \dots 24$$

Si la ec. (19) se divide entre Z , se obtiene:

$$\frac{V_s SC_3}{Z} = -\frac{E}{Z^2} + \frac{E_1}{Z} \left(\frac{1}{Z} + \frac{1}{R_2} \right) \dots 25$$

Sumando las ecuaciones (23) y (24), se obtiene:

$$V_s \left(\frac{R_2 + Z + SC_3 R_1 R_2}{Z R_1 R_2} \right) = \frac{E}{Z} \left[\frac{1}{R_2} \left(1 + \frac{Z}{R_1} + \frac{Z}{R_v} \right) \right] \dots 26$$

Despejando E/V_s de la ec. (26), se obtiene:

$$\frac{E}{V_s} = \left(\frac{R_2 + Z + SC_3 R_1 R_2}{R_1} \right) \left(\frac{1}{1 + Z/R_1 + Z/R_v} \right) \dots 27$$

Sustituyendo las ecs. (22) y (27) en la ec. (14), se obtiene:

$$Z_{obs} = S R_i R_v C_4 = \frac{R_2 + Z + S (C_3 R_i R_2 + C_2 R_2 R_v)}{1 + Z/R_i + Z/R_v} + S^2 C_3 C_2 R_2 R_i R_v \dots 28$$

Como $S = j\omega$ y $J = \sqrt{-1}$ o $J^2 = -1$, entonces:

$$Z_{obs} = j\omega R_i R_v C_4 + \frac{R_2 + Z + j\omega R_2 (C_3 R_i + C_2 R_v)}{1 + Z/R_i + Z/R_v} + \omega^2 C_3 C_2 R_2 R_i R_v \dots 29$$

Despejando Z de la ecuación (29), se obtiene:

$$Z = \frac{Z_{obs} - R_2 (1 - \omega^2 C_3 C_2 R_v R_i) - j\omega [R_v R_i C_4 + R_2 (C_3 R_i + C_2 R_v)]}{1 - \left(\frac{Z_{obs}}{R_i} + \frac{Z_{obs}}{R_v}\right) + R_v + R_i (-R_2 \omega^2 C_3 C_2 - j\omega C_4)} \dots 30$$

3a. Aproximación.

Si $|\omega^2 C_3 C_2 R_2 - j\omega C_4| \ll 1/(R_v + R_i)$, entonces la ecuación (29) queda como:

$$Z = \frac{Z_{obs} - R_2 (1 - \omega^2 C_3 C_2 R_v R_i) - j\omega [R_v R_i C_4 + R_2 (C_3 R_i + C_2 R_v)]}{1 - \left(\frac{Z_{obs}}{R_i} + \frac{Z_{obs}}{R_v}\right)} \dots 31$$

Con todas las aproximaciones hechas se introduce un error de menos del 0.1%, bajo todas las condiciones de interés. Si $1 - Z_{obs} [1/R_i + 1/R_v] = L_f$, entonces la ec. (30) queda:

$$Z = \frac{Z_{obs} - R_2 (1 - \omega^2 C_3 C_2 R_v R_i) - j\omega [R_v R_i C_4 + R_2 (C_3 R_i + C_2 R_v)]}{L_f} \dots 32$$

La ecuación (32) requiere medidas y cálculos extensos, si se utiliza así, para eliminar los artefactos capacitivos de nuestros resultados experimentales. Sin embargo, éste no es el caso. El denominador de la ecuación, denominado L_f , describe la atenuación del voltaje en el interior de la fibra causada por el flujo de corriente a tierra, a través de los dos microelectrodos. El artefacto capacitivo es descrito por el numerador de la ec. (32) y puede ser medido directamente, al pasar el microelectrodo de voltaje, al interior de la fibra a una posición en la proximidad de la superficie de ésta, manteniéndose el microelectrodo de corriente en el interior de la fibra. Puesto que las resistencias de los microelectrodos son independientes de la frecuencia, entonces se puede definir una impedancia extracelular por:

$$\zeta_{obs} = - (R_i R_v / R_i) (V_{obs}_{(out)} / V_s_{(out)}) \dots 33$$

BIBLIOGRAFIA

1. Adrian, R.H., L.L. Constantin and L.D. Peachey. 1969. Radial spread of contraction in frog muscle fibers. *J. Physiol.* (Lond.), 204:231.
2. Adrian, R.H., W.K. Chandler and A.L. Hodgkin. 1969. The kinetics of mechanical activation in frog muscle. *J. Physiol.* (Lond.), 204:207.
3. Albuquerque, E.X. and M. Thesleff. 1968. A comparative study of membrane properties of innervated and chronically denervated fast and slow skeletal muscles of the rat. *Acta Physiol. Scand.*, 73: 471.
4. Albuquerque, E.X. and R.J. McIssac. 1970. Fast and slow mammalian muscles after denervation. *Exp. Neur.*, 26:183.
5. Bard, P. 1966. *Fisiología Médica*. La Prensa Médica Mexicana Ed., México, D.F. 839.
6. Brophy, J.J. 1979. *Electrónica fundamental para científicos*. Segunda edición. Ed. Reverte, México. 1.
7. Close, R. 1969. Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat after nerve cross-union. *J. Physiol.* (Lond.), 204:331.
8. Close, R. 1972. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.*, 52:129.
9. Cole, K.S. and Baker, R.F. 1941. Longitudinal impedance of the squid giant axon. *J. Gen. Physiol.*, 24:771.
10. Dulhunty, A.F., G. Carter and C. Hinrichsen. 1984. The membrane

- capacity of mammalian skeletal muscle fibers. *J. Musc. Res. Cell Mot.*, 5:315.
11. Dulhunty, A.F. and C. Franzini-Armstrong. 1975. The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibers at different sarcomere lengths. *J. Physiol. (Lond.)*, 250:555.
 12. Dulhunty, A.F. and F.W. Gage. 1985. Excitation-Contraction coupling and charged movement in denervated rat extensor digitorum longus and soleus muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 358: 75.
 13. Dulhunty, A.F., P. Gage and A. Valois. 1983. Identations in the terminal cisternae of slow and fast twitch muscle fibers from normal and paraplegic rats. *J. Ultras. Res.*, 84:150.
 14. Dulhunty, A.F., and A. Valois. 1983. Identations in the terminal cisternae of amphibian and mammalian skeletal muscle fibers. *J. Ultras. Res.*, 84:34.
 15. Duval, A., and C. Léoty. 1985. Changes in the ionic currents sensitivity to inhibitors in twitch rat skeletal muscles following denervation. *PLügers Arch.*, 403:407.
 16. Eisenberg, S.R. 1983. Impedance measurement of the electrical structure of skeletal muscle. *Handbook of Physiology, Skeletal Muscle*, Sect 10, 11:300.
 17. Eisenberg, B.R. and A. Gilai. 1979. Structural changes in muscle single fiber after stimulation at a low frequency. *J. Gen. Physiol.*, 74:1.
 18. Engel, A.G. and Stonnington, H.H. 1974. Morphological effects of denervation of muscle. A quantitative ultrastructural study.

Ann. New York Acad. Sci., 228:68.

19. Falk, G. and P. Fatt. 1964. Linear electrical properties of striated muscle fibers observed with intracellular electrodes. Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci., 160:69.
20. Finol, H.J., D.M. Lewis and R. Owens. 1981. The effects of denervation on contractile properties of rat skeletal muscle. J. Physiol. (Lond.), 319:81.
21. Franzini-Armstrong, C. 1970. Studies of the triad. I. Structure of the junction in frog twitch fibers. J. Cell Biol., 47:488.
22. Franzini-Armstrong, C. and K.R. Porter. 1964. The Z disc of skeletal muscle fibers. Z. Zell. Mik. Anat., 61:661.
23. Freygang, W.H., S.I. Rapaport, and D.H. Peachey. 1969. Some relations between changes in the linear electrical properties of striated muscle fiber and changes in ultrastructure. J. Gen. Physiol., 50:2437.
24. González-Serratos, H. 1971. Inward spread of activation in vertebrate muscle fibers. J. Physiol. (Lond.), 212:777.
25. Göpfert, H. and H. Echaefter. 1938. Veber den direkt und indirect arregten aktionstrom und die funktion der motorischen end plate. Arch. Gen. Physiol., 239:597.
26. Gori, Z. 1972. Proliferations in the sarcoplasmic reticulum and the T system in denervated muscle fibers. Virchous Arch. Abt. B. Zellpath., 11:147.
27. Hansen, B.C. and G.R. Strichartz. 1980. Saxitoxin resistant action potentials in denervated muscle. Acta Physiol. Scand., 300:382.

28. Harris, E.J. and K.L. Manchester. 1966. The effects of potassium ions and denervation on protein synthesis and transport of amino acids in muscle. *Biochem. J.*, 101:135.
29. Hodgkin, A.L. and S. Nakajima. 1972. The effects of diameter on the electrical constants of frog skeletal muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)*, 221:105.
30. Hollingworth, S. and M.W. Marshall. 1981. A comparative study of charge movement in rat and frog skeletal muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)*, 321:583.
31. Hubbard, S.J. 1963. The electrical constants and the component conductance of frog skeletal muscle after denervation. *J. Physiol. (Lond.)*, 165:443.
32. Huxley, H.E., and J. Hanson. 1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, 173:973.
33. Huxley, A.F. and R. Niedergerke. 1954. Interference microscopy of living muscle fibers. *Nature*, 173:971.
34. Huxley, A.F. and R.E. Taylor. 1958. Local activation of striated muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)*, 144:426.
35. Huxley, A.F. and L.D. Peachey. 1959. The maximum length for contraction in the striated muscle. *J. Physiol.*, 146:55.
36. Jack, B.J., D. Noble, and R.W. Tsien. 1975. *Electric current flow in excitable cells*. Oxford University Press, Ely House, (Lond.), 1.
37. Jolesz, F., and F.A. Sreter. 1981. Development, innervation and

- activity pattern induced changes in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, 43:531.
38. Katz, B. *Physiological Medical*. 1966. McGraw-Hill Book Company, New York, 11.
 39. Kernan, R.P. 1965. Active transport in innervated and denervated mammalian skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 179:63.
 40. Kiyohara, T., and M. Sato. 1967. Membrane constants of red and white muscle fibers in the rat. *Jap. J. Physiol.*, 17:720.
 41. Knappeis, G.C., and F. Carlsen. 1962. The ultrastructure of the Z disc in skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 144:426.
 42. Lewis, D.M. 1972. The effect of denervation on the mechanical and electrical responses of fast and slow mammalian twitch muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 222:51.
 43. Miledi, R., and C.R. Slater. 1968. Some mitochondrial changes in denervated muscle. *J. Cell Sci.*, 3:49.
 44. Mountcastle, B.V. 1974. *Fisiología Médica*. Vol. I. Ed. La Prensa Médica Mexicana, México, D.F., 52.
 45. Neville, M.C. 1979. The extracellular compartments of frog skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 228:45.
 46. Nicholls, J.B. 1956. The electrical properties of denervated skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 137:1.
 47. Pappone, A.P. 1980. Voltage-clamp experiments in normal and denervated mammalian skeletal muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)*, 306:377.

48. Peachey, L.D. 1973. Electrical events in the T-system of frog skeletal muscle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 87:479.
49. Peachey, L.D. and R.H. Adrian. 1973. Electrical properties of the transverse tubular system. In *structure and function of muscle*. Ed. G. Bourne, 2nd edition.
50. Peachey, L.D. and C. Franzini-Armstrong. 1983. Structure and function of membrane systems of skeletal muscle cells. *Handbook of Physiology, Muscle Skeletal*, Sect. 10, 2:45.
51. Pellegrino, M.D. and C. Franzini. 1963. An electron microscope study of denervation atrophy in red and white skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.*, 17:337.
52. Romanul, C.A., and E.L. Logan. 1965. Enzymatic changes in denervated muscle. *Arch. Neurol.*, 13:263.
53. Schiaffino, S., V. Hanzlikova, and S. Pierobon. 1970. Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.*, 47:107.
54. Schiaffino, S., and P. Sttembrini. 1970. Studies on the effect of denervation in developing muscle. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.*, 4:345.
55. Schneider, M.F. 1970. Linear electrical properties of the transverse tubules and surface membrane of skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, 56:671.
56. Sellin, C.L. and S. Thesleff. 1980. Alterations in membrane electrical properties during ions-term denervation of rat skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.*, 108:243.
57. Tomanek, R.J., and D.D. Lund. 1973. Denervation of diferent

- types of skeletal muscles fibers. *J. Anat.*, 3:395.
58. Valdiosera, R., C. Clausen, and S. Eisenberg. 1974. Measurement of the impedance of frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.*, 14: 295.
 59. Valdiosera, R., C. Clausen, and S. Eisenberg. 1974. Impedance of frog skeletal muscle fibers in various solutions. *J. Gen. Physiol.*, 63:460.
 60. Valdiosera, R., C. Clausen, and R.S. Eisenberg. 1974. Circuit models of the passive electrical properties of frog skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, 63:432.
 61. Walker, S.M., and G.P. Shrodt. 1971. The sarcoplasmic reticulum and development of Z line in skeletal muscle fibers of fetal and postnatal rats. *Anat. Rec.*, 169:601.
 62. Westgaard, R.H. 1975. Influence of activity on the passive electrical properties of denervated soleus muscle fibers in the rat. *J. Physiol. (Lond.)*, 251:683.