



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

EFFECTO DE LOS ANIONES LIOTROPICOS SOBRE LAS PROPIEDADES ELECTRICAS ACTIVAS DE LA FIBRA MUSCULAR ESQUELETICA DEL ANFIBIO.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE MONTERRUBIO ALVAREZ

LOS REYES IZTACALA, MEXICO

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

A Patricia con amor.

Por llenar de amor cada momento de mi vida.

A mis adorados hijos

Eunice Carolina y Jorge Guillermo

Por la alegría de su existencia.

A mis queridos padres.

Jose Monterrubio V. (q.e.p.d.) y Dolores Alvarez
como un sencillo homenaje de amor y gratitud.

A mis hermanos queridos.

Jaime, Georgina, Arturo y Ma. de Carmen
Porque su felicidad es la mia.

A mi tía

Ma. del Carmen Alvarez
Por ser como una madre para mi.

A mi abuela

Sebastiana Alvarez (q.e.p.d.)
Por la inolvidable infancia que pase a su lado

Este trabajo fue realizado en el Dpto. de Farmacología y Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (I.P.N.) bajo la dirección del Dr. en C. Jorge A. Sánchez R.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial al Dr. en C. Jorge A. Sánchez R. por lo invaluable de su amistad y de sus enseñanzas y por haber despertado en mí el interés por la fisiología.

A mis compañeros del laboratorio: Biól. Jorge Calvo M., M. en C. Jorge Arreola, M. en C. Ismael Uribe y M. en C. Arturo Lievano, por el interés que siempre mostraron en el desarrollo de este trabajo.

Al Biól. José Martínez A. por su amistad y por su ayuda en el trabajo fotográfico.

Al grupo de sinodales: Dr. en C. Jorge A. Sánchez R., M. en C. Bertha Segura, Dr. en C. Ismael Jimenez, Biól. J. Enrique Bañuelos S. y Biól. René Arzuffi B., por sus acertadas consideraciones.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron en mi formación profesional y personal.

INDICE

PROLOGO -----	1
INTRODUCCION -----	4
I) Los primeros estudios sobre series liotrópicas de aniones -----	4
II) Efecto de los aniones sobre el músculo esquelético de la rana. -----	8
A) Propiedades de la membrana muscular en reposo -----	8
B) Efecto sobre la respuesta mecánica -----	16
C) Efectos sobre el acople excitación-contracción ----	19
ANTECEDENTES -----	24
PROPOSITOS DEL TRABAJO DE TESIS -----	29
METODOLOGIA -----	30
I) Experimentos con potenciales de acción de Na-K y potenciales de acción de calcio -----	30
A) Diseño experimental -----	30
B) Disección y montaje de la preparación biológica ---	32
C) Sistemas de estimulación y registro -----	34
II) Experimentos de fijación del voltaje -----	37
A) Diseño experimental -----	37
B) Preparación biológica -----	38
C) Técnica de fijación del voltaje con tres sellos de vaselina y el sistema de registro de las corrientes iónicas. -----	40
RESULTADOS -----	45
I) Potenciales de acción de Na-K -----	45
A) Efecto del TEA sobre el potencial de acción. -----	45
B) Reemplazo del cloruro por aniones monovalentes. ---	51
II) Potenciales de acción de calcio. -----	60
A) Registro de los potenciales de acción de calcio ---	60
B) Efecto del metanosulfonato sobre el potencial de acción de calcio -----	65

III) El efecto de metanosulfonato y del nitrato sobre las corrientes de calcio. -----	70
A) Características de las corrientes de calcio. -----	70
B) Los efectos del metanosulfonato y del nitrato sobre las corrientes de calcio. -----	72
DISCUSION Y CONCLUSIONES -----	85
A) Potenciales de acción de Na-K -----	85
B) Potenciales de acción de calcio y las corrientes de calcio -----	90
BIBLIOGRAFIA -----	94

PROLOGO

El interés de los fisiólogos por los aniones inorganicos de la serie liotrópica se debe a que incrementan la tensión durante una sacudida muscular cuando substituyen al cloruro en el medio extracelular.

En 1950, Kahn y Sadow demostraron que si se cambia el Cl^- por Br^- , NO_3^- o I^- , la tensión muscular se incrementa, tanto en amplitud como en duración, de ahí la denominación de potenciadores. Si bien se descubrió que este efecto potenciador se debe a un incremento en la tensión de las fibras individuales, no pudo entonces proponerse un mecanismo de acción satisfactorio.

Tratando de explicar el efecto potenciador, se abordó el problema por diferentes caminos. Así se demostró que los aniones liotrópicos incrementan la resistencia de la membrana en el estado de reposo, mientras que durante la actividad prolongan la duración del potencial de acción de Na-K. Como estos efectos sólo pueden explicar parcialmente la acción potenciadora, fueron propuestos otros mecanismos. Se sugirió entonces una posible acción facilitadora a nivel del acople excitación-contracción. Interesantes estudios han mostrado también que la capacidad del retículo sarcoplásmico para capturar el calcio se ve disminuida por los aniones de la serie liotrópica.

Aunque también son afectados otros factores, la causa primaria de la potenciación de la sacudida muscular por los aniones liotrópicos, parece ser una desviación de la activación

contráctil hacia potenciales más negativos. Entonces la membrana es alterada en tal forma que disminuye el umbral para la activación mecánica. Hodgkin y Horowicz (1960) sugirieron que los aniones liotrópicos actúan adsorbiéndose a la superficie de la fibra muscular y alteran el campo eléctrico dentro de la membrana. Si los aniones pueden unirse a un componente dentro de la membrana, entonces deberían desviarse también aquellos procesos que responden al voltaje.

En efecto, Kao y Stanfield (1968) descubrieron que cuando se reemplaza el cloruro por otros aniones liotrópicos se modifica la sensibilidad al voltaje de los canales de potasio de la rectificación tardía. Así mismo, Dani, Sánchez y Hille (1983) estudiando el efecto de los aniones sobre la fisiología del canal de sodio de la fibra muscular, demostraron que los aniones liotrópicos desvían tanto la activación como la inactivación hacia valores más negativos en el eje del voltaje.

Es probable que los aniones de la serie liotrópica también modifiquen la actividad de otros canales iónicos de la fibra muscular, que son activados por el voltaje. En este sentido Bianchi y Shanes (1959) han encontrado que al substituir el cloruro del medio extracelular por el ion nitrato, se incrementa la entrada de calcio radioactivo a la fibra muscular. Este efecto únicamente es observable si se estimula la célula. Por esta razón ellos han sugerido que el influjo de ^{45}Ca está relacionado con el potencial de acción de sodio-potasio. Sin embargo, también existe la posibilidad de que la entrada de ^{45}Ca haya ocurrido a través de los canales lentos de calcio localizados en las membranas del

sistema tubular transverso. Si esto es cierto, es razonable suponer que el nitrato afecte también a este canal iónico.

Por tal motivo este estudio está encaminado a explorar la acción del medio ambiente aniónico sobre la actividad de los canales lentos de calcio de la fibra muscular esquelética de la rana.

Los resultados generados por este trabajo ponen de manifiesto que los aniones liotrópicos pueden modular la actividad del canal lento de calcio. Ello no sólo es importante por el interés intrínseco que pueda tener, sino que ayuda a entender mejor los mecanismos involucrados durante la actividad de estos canales iónicos.

INTRODUCCION

1) Los Primeros estudios sobre series liotrópicas de aniones

Durante varias décadas la mayor parte de los trabajos experimentales en electrofisiología se han enfocado al movimiento de los cationes en las células excitables, como resultado, existe actualmente una base experimental muy sólida, que fundamenta la teoría iónica del potencial de acción y del potencial de reposo en los tejidos excitables, y así el potencial de acción puede describirse adecuadamente en términos de incrementos rápidos, pasajeros y secuenciados en la permeabilidad de la membrana, primero al sodio y después al potasio. Esos incrementos en la permeabilidad permiten que ambos cationes se muevan de acuerdo con sus gradientes electroquímicos. Los cambios asociados con el potencial transmembranal originan el potencial de acción.

Los aniones fueron mantenidos en el olvido, debido a que se consideró que sólo participaban pasivamente en los eventos bioeléctricos en las células excitables. No obstante, en las últimas décadas ha aumentado gradualmente el estudio de los movimientos del cloruro a través de las membranas celulares. La evidencia obtenida, aunque menos extensa y detallada que para los cationes, muestra claramente que los movimientos del Cl^- afectan significativamente la actividad de las células excitables.

A finales del siglo XIX, Hofmeister estudió cuidadosamente la concentración de electrolitos requerida para separar la albumina de huevo (citado por Dani, Sánchez y Hille, 1983) y

ordenó a los cationes y a los aniones en series separadas dependiendo de la concentración molar relativa para precipitar esta proteína. En los siguientes años tales series han sido utilizadas ampliamente como un modelo para describir los efectos aniónicos. Así, cuando los efectos de los aniones indican un arreglo de esos iones en el orden (o algunas veces en el orden opuesto) de las series de Hofmeister, entonces este arreglo es llamado serie liotrópica. Una amplia variedad de fenómenos en biología y en fisicoquímica son afectados por el anion de la solución del baño. En muchos casos la efectividad de los aniones sigue la serie de Hofmeister: SO_4^{2-} , $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^- < \text{ClO}_4^- < \text{SCN}^-$. Algunos ejemplos importantes incluyen la disolución de pequeñas moléculas y de macromoléculas y la tendencia a unirse o adsorberse a proteínas, geles e interfases aire-agua, lípido-agua o metal-agua.

En los estudios pioneros sobre los efectos de los aniones, los músculos fueron empleados extensamente, debido a que las contracciones podían medirse con relativa facilidad. Una técnica usada con frecuencia era examinar la respuesta del músculo a estímulos químicos, midiendo la aparición de actividad espontánea después de haberlos colocado en soluciones sin calcio ni potasio. La aparición de contracciones espontáneas en músculos expuestos a soluciones con 86 mM de NaCl, fue observada y estudiada por primera vez por Biedermann (vease Horowicz, 1964). Biedermann concluyó que tales contracciones se originaban por la acción de la sal de sodio sobre la fibra muscular debido a que las contracciones ocurrían en músculos completamente curarizados. La

substitución del cloruro por otros aniones liotrópicos constituyó una herramienta experimental para averiguar el papel que desempeña este anión en la fibra muscular. Uno de los primeros trabajos en que se utilizaron aniones diferentes al cloruro fue realizado por Zoethout en 1904 (vease Horowicz, 1964). Zoethout mostró que una solución de 125 mM de NaI era capaz de sensibilizar a las fibras musculares. Cuando los músculos eran tratados con esta solución, podían contraerse en una exposición subsecuente a 6.3 mM de potasio. Esta concentración de potasio ordinariamente no produce contracciones. Un tratamiento similar con 125 mM de NaBr origino el mismo efecto, aunque mas pequeño al exponerlo a la solución de potasio. En 1910, Lilli realizó una serie de experimentos utilizando diversos estímulos químicos (vease Horowicz, 1964). En este estudio también se encontró que la respuesta contráctil era potenciada por una exposición previa a soluciones de sales de sodio. La potenciación relativa que producian esas sales seguia el orden: $\text{NaCl} < \text{NaBr} < \text{NaNO}_3 < \text{NaClO}_3 < \text{NaI} < \text{NaSCN}$. En 1928 Gellhorn, estudiando la potenciación de las contracturas de potasio, encontró una secuencia similar a la anterior pero colocando al sulfato entre el nitrato y el ioduro. También mostró que el NaSCN tenía un efecto tan grande que la inmersión del músculo en una solución fisiológica, con una concentración de potasio normal, era suficiente para causar contracciones (vease Horowicz, 1964).

Además de los cambios en su excitabilidad, los músculos también experimentan cambios en su volumen cuando son sumergidos en soluciones de sales de sodio. Como Chao y Chen demostraron en 1937, la tasa de hinchamiento es afectada fuertemente por el

anión de la solución extracelular (vease Horowicz, 1964). La tasa de hinchamiento en solución de ioduro de sodio es mucho mayor que en cloruro de sodio en tanto que las tasas de hinchamiento en soluciones de bromuro y de nitrato conservan sus posiciones intermedias usuales de la serie liotrópica.

Otro método empleado en los estudios sobre la acción de los aniones fue desarrollado a partir de la observación de que los músculos se hacen eléctricamente inexcitables al ser colocados en soluciones de sacarosa o de glucosa. Bajo estas condiciones la adición de 12 mM de cloruro de sodio restablece la excitabilidad. Utilizando esta técnica, Schwartz en 1907, (vease Horowicz, 1964) examinó la acción de algunos aniones, midiendo su habilidad para restablecer y mantener la respuesta contráctil cuando los músculos eran estimulados a baja frecuencia. Schwartz encontró que el tiempo en que se mantenía la respuesta dependía del tipo de anión y que seguía el orden: citrato $< \text{SO}_4^{2-} < \text{CH}_3\text{COO}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{SCN}^-$. Esta misma secuencia fue encontrada posteriormente por Gellhorn en 1932 (vease Horowicz, 1964).

Varios experimentos con músculos utilizando otro tipo de estímulos para examinar la respuesta contráctil, resultaron en la serie liotrópica usual. por ejemplo, Chao y Chen en 1934, encontraron que la contractura producida al enfriar repentinamente el músculo de rana, después de haberlo sumergido en una solución conteniendo una sal de sodio, dependía no sólo de la diferencia de temperatura sino también del anión presente, siguiendo la secuencia encontrada comunmente para el efecto potenciador de los aniones. La misma secuencia fue obtenida

también cuando el músculo fue estimulado con luz después de teñirlo con eosina (vease Horowicz, 1964).

En 1935 Chao utilizó dos métodos diferentes para determinar la acción de los aniones sobre la excitabilidad eléctrica de las fibras musculares. Con uno de los métodos midió la reobase estimulando al músculo en presencia de diferentes aniones. En el segundo método determinó los cambios en la fuerza de contracción en respuesta a estímulos constantes, cuya intensidad era superior a la umbral sin ser máximos. Con este segundo método encontró un aumento en la fuerza de contracción que dependía del anión extracelular. El incremento en la fuerza mecánica fue interpretado como el reclutamiento de fibras musculares. Con ambos métodos se encontró la misma secuencia liotrópica, la cual coincidió con las series obtenidas en investigaciones anteriores. Finalmente Kahn y Sadow (1950) descubrieron que los incrementos en la fuerza mecánica, en el segundo método utilizado por Chao, fueron el resultado no sólo del reclutamiento de fibras musculares sino también de un incremento en la fuerza de sacudida de las fibras individuales.

II) Efecto de los aniones sobre el músculo esquelético de rana

A.- Propiedades de la membrana muscular en reposo

Durante mucho tiempo fue aceptado de manera general que la membrana de la fibra muscular, durante el reposo, era permeable al potasio y esencialmente impermeable a los aniones y al sodio. En 1941 Boyle y Conway propusieron que la membrana muscular es permeable al potasio y a otros cationes con el mismo diámetro o más pequeño en solución acuosa, al igual que a pequeños aniones

tales como el cloruro. Ellos mostraron que las diferencias en las concentraciones de potasio y de cloruro entre el exterior y el interior celular pueden ser explicadas por un sistema de equilibrio de Donnan en donde la membrana es permeable a ambos iones.

Hodgkin y Horowicz (1959b) midieron los efectos sobre el potencial de membrana, de cambios repentinos en la concentración externa de potasio y cloruro usando fibras musculares aisladas. Cuando la concentración de potasio se mantuvo constante, los cambios en el potencial de membrana fueron observados en la dirección esperada para un electrodo de cloro y cuando el Cl^- externo era reducido (remplazándolo con SO_4^{2-}) había una despolarización de la membrana; al incrementar la concentración de cloruro extracelular por arriba de su nivel normal, la membrana se hiperpolarizaba y luego regresaba al potencial de reposo. La explicación de esos resultados es razonablemente simple. Cuando el cloruro externo es reducido repentinamente, hay una fuga de Cl^- de la célula la cual produce la despolarización; cuando se altera el equilibrio por un aumento en la concentración de cloruro externo, el movimiento de este ion hacia el interior de la fibra causa una hiperpolarización. Hodgkin y Horowicz (1959b) sugirieron que la conductancia al cloruro (G_{Cl}) es aproximadamente el doble de la conductancia al potasio (G_{K}). Estos dos sistemas de conductancias representan el 90% de la conductancia total de la membrana en reposo.

Posteriormente Hutter y Noble (1960) midieron la caída en la conductancia de la membrana, al reemplazar el cloruro por aniones

impermeantes tales como el metilsulfato y el piroglutamato y encontraron que en el reposo la conductancia al cloruro representa el 68% de la conductancia total de la membrana. Un hallazgo interesante es que para una amplia gama de concentraciones externas de potasio y de cloruro, la permeabilidad al cloruro (P_{Cl}) permanece en un valor constante del orden de 4×10^{-6} cm/seg, mientras que la permeabilidad al potasio (P_K) depende de la dirección del movimiento de K^+ . La permeabilidad al potasio es muy alta para corriente hacia adentro pero disminuye con la corriente saliente. Esta propiedad de las fibras musculares ha sido llamada rectificación anómala o entrante.

Hutter y Warner (1967a) mostraron que las variaciones en el pH extracelular afectan significativamente la conductancia de la membrana al cloruro. Cuando el pH extracelular es cercano a 7.0, la conductancia al cloruro permanece constante, mientras que los pHs ácidos y básicos producen cambios considerables en la conductancia al cloruro. Si el medio extracelular es alcalino la conductancia al cloruro aumenta, pero se origina el efecto opuesto si el pH del medio se acidifica. La G_{Cl} aumenta aproximadamente cuatro veces si se cambia el pH extracelular desde 5.0 hasta 9.8. La relación entre el pH y G_{Cl} es sigmoideal y el pK_a aparente es cercano a 7.0. Por otro lado, si el cloruro es reemplazado por metilsulfato la conductancia de la membrana permanece constante para distintos valores de pH. Esto indica que el pH extracelular no afecta la conductancia al potasio.

En 1969 Hutter y Warner, en una breve nota, mostraron que la la conductancia al cloruro presenta propiedades de rectificación

en función del pH extracelular. Cuando el pH de la solución del baño esta muy cerca de la neutralidad, la G_{Cl} se mantiene constante. En solución alcalina sin embargo, la conductancia al cloruro disminuye fuertemente con valores negativos en el potencial intracelular. Al otro extremo de la escala de pH, en solución ácida, la pequeña conductancia al cloruro aumenta gradualmente con fuertes hiperpolarizaciones (Hutter y Warner, 1972; Warner, 1972).

Utilizando músculos detubulados mediante el tratamiento con glicerol, Eisenberg y Gage (1969) determinaron que las propiedades de la membrana superficial son diferentes de las de la membrana del sistema tubular transverso. Ellos calcularon que en el sarcolema se encuentra toda la conductancia al Cl^- y aproximadamente una tercera parte de la conductancia al potasio. Las dos terceras partes restantes de la G_K estan localizadas en la membrana tubular. Sus resultados estan de acuerdo con la sugerencia de que los canales de cloro estan localizados en la membrana superficial, mientras que la mayor parte de la G_K está en las membranas del sistema tubular transverso (Hodgkin y Horowicz, 1960). Estos datos y los efectos del pH sobre G_{Cl} pero no sobre G_K son evidencia de que el Cl^- y el K^+ utilizan canales separados. Una evidencia adicional surgio de la acción de algunos agentes químicos sobre la fibra muscular. Hutter y Warner (1967c) encontraron que una concentración de 10^{-4} M de Zn^{++} , Cu^{++} o UO_2^{++} a pH 7.0 reduce el eflujo de ^{36}Cl a la mitad de su valor testigo. De acuerdo con esto el Zn^{++} parece afectar solo la conductancia al Cloruro, en tanto que no modifica la G_K (Stanfield, 1970).

La membrana muscular también es permeable a otros aniones diferentes al Cl^- . Si el cloruro es remplazado por aniones poco comunes tales como aquellos de la serie liotrópica, muchos de ellos son capaces de atravesar la membrana. Sin embargo, la facilidad con la que pueden cruzar varía de un anión a otro. Así el bromuro atraviesa más fácilmente que el nitrato y este a su vez puede permear con menor dificultad que el yoduro. Las conductancias de membrana relativas al cloro, en el estado de reposo son: $\text{Cl}^- : \text{Br}^- : \text{NO}_3^- : \text{I}^- = 1.0 : 0.67 : 0.5 : 0.44$ (Hutter y Padsha, 1959). A diferencia de los demás aniones liotrópicos, la conductancia de la membrana al SCN^- depende de la concentración de este ion. En bajas concentraciones, el SCN^- incrementa la resistencia de la membrana mientras que tiene el efecto opuesto para concentraciones elevadas. Otros aniones tales como el SO_4^{2-} o algunos que no han sido clasificados como liotrópicos (metilsulfato y piroglutamato) no son capaces de atravesar la membrana muscular. Si el cloruro es substituido por el metilsulfato la conductancia de la membrana en el reposo disminuye dos terceras partes (Hutter y Noble, 1960).

Hutter y Warner (1967c) investigaron el efecto de algunos aniones liotrópicos sobre la permeabilidad al Cl^- a diferentes valores de pH extracelular. Sus resultados muestran que el Br^- , I^- y NO_3^- penetran lentamente la fibra muscular e interfieren con los movimientos del Cl^- . La presencia de Br^- , NO_3^- , I^- , ClO_4^- o SCN^- en el medio extracelular retarda el eflujo de cloruro (Harris, 1958). La efectividad con la que estos iones retardan la salida de ^{36}Cl sigue el orden $\text{SCN}^- = \text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^-$. El I^- extracelular disminuye fuertemente el eflujo de ^{36}Cl en solución

alcalina mientras que en medio ácido, donde la permeabilidad al cloruro ya ha disminuido, el efecto del ioduro es menor. Ocurre un efecto muy similar aunque menos pronunciado sobre el eflujo de ^{82}Br . Las variaciones en el pH extracelular no parecen tener efecto sobre el eflujo de ^{131}I cuando el anión de la solución del baño es I^- . Sin embargo, si el I^- extracelular es reemplazado por Cl^- , el eflujo de ioduro es acelerado tanto a pH 5.0 como a pH 9.8. Este caso es opuesto al efecto del ioduro sobre la caída de la permeabilidad al Cl^- . En solución alcalina las permeabilidades al ioduro y al bromuro son considerablemente mas bajas que la del cloruro, mientras que en solución ácida la membrana muscular distingue menos entre los tipos de aniones.

Cuando el cloruro externo es reemplazado repentinamente por un anión impermeante se observa una despolarización debida al eflujo de Cl^- hacia abajo de su gradiente electroquímico. Cuando el anión penetra la membrana, sin embargo, la despolarización es menos severa debido al influjo del anión extraño. Si además de ser permeante, el anión interactúa con los movimientos del Cl^- , de tal manera que origine una reducción de la P_{Cl} , entonces el influjo del anión extraño puede ser comparable en magnitud al eflujo del cloruro. Bajo estas condiciones, sería detectable una despolarización pasajera al aplicar un anion extraño tal como el nitrato (Hutter y Padsha, 1959; Hodgkin y Horowicz, 1959b, 1960). De la ausencia de grandes cambios de potencial al reemplazar el cloruro por nitrato se ha concluido que el NO_3^- disminuye la permeabilidad al cloruro hasta un valor cercano al de la P_{NO_3} .

Hutter y Warner (1968) determinaron diferencias en las

permeabilidades aniónicas relativas. Ellos equilibraron las fibras musculares en una solución de 100 mM de potasio y 220 mM de cloruro, para prolongar la presencia de cloruro en las fibras y para minimizar los cambios en el potencial de membrana originado por otras causas. También la contribución de G_K a la conductancia total de la membrana fue disminuida por reemplazar K^+ con Rb^+ en la solución externa y adicionar Ba^{++} . Bajo tales condiciones el potencial bi-aniónico, medido cuando se reemplazo Cl^- por NO_3^- fue pequeño cerca de pH 7.0, pero con valores altos y bajos en el pH se originaron cambios considerables en el potencial de membrana. A pH 5.0 el interior de la fibra se hizo mas negativo por 5-15 mV mientras que a pH 9.0 fue más positivo por la misma cantidad. Entonces en la situación bi-aniónica, el cloruro y el nitrato son aproximadamente equi-permeables sólo cerca de la neutralidad. En el lado ácido el NO_3^- es evidentemente más permeable que el Cl^- y en el lado alcalino el Cl^- es más permeable que el NO_3^- . Hutter y Warner (1968) interpretaron que estas inversiones en el orden en el que los aniones permean la membrana son debidas a una modulación del campo de fuerza en los sitios responsables del paso de aniones. Hutter y col. (1969) reportaron que a pH 9.8 la secuencia de conductancias sigue el orden: $Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^-$ y a pH 5.0 la secuencia es $Cl^- < Br^- < NO_3^- < I^-$.

Woodbury y Miles (1973) encontraron que la secuencia de conductancias aniónicas para el músculo esquelético de rana a pH 7.4 sigue el orden: $Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^- > \text{tricloroacetato (TCA)} > \text{Benzoato} > \text{Valerato} > \text{Butirato} > \text{Propionato} > \text{Formato} > \text{Acetato} > \text{Lactato} > \text{Bencensulfonato} > \text{Isotionato} > \text{Metilsulfato} >$

Glutamato > Cisteato. Tanto las secuencias de permeabilidad como las de conductancia siguen el mismo orden. Con base en su dependencia al pH clasificaron a los aniones en dos categorías. La primera, los aniones "Como-Cloruro" (del Cl^- hasta el tricloroacetato) tienen conductancias que disminuyen a medida que disminuye el pH. Los últimos seis miembros de la secuencia también son aniones "Como-Cloruro". En la segunda categoría los aniones "Como-Benzoato" (desde el Benzoato hasta el Acetato) son iones que tienen conductancias que se incrementan conforme el pH disminuye. Debido a que los iones Zn^{++} a un pH de 6.7 son capaces de bloquear la conductancia de los dos tipos de aniones ellos concluyeron que probablemente todos los aniones usan el mismo canal. También estimaron que el tamaño mínimo de la apertura del canal es de 5.5×6.6 Angstroms (el tamaño del anión permeante más grande, TCA y Benzoato) pero que el tamaño juega un pequeño papel en la determinación de la conductancia de esos aniones. Postularon entonces un modelo de la estructura del canal en el cual en un poro de 6.5×6.5 Angstroms existe una región hidrofóbica adyacente a un grupo imidazol. Los efectos del pH sobre la conductancia al Cl^- pueden explicarse en su modelo, suponiendo que la protonación de un sitio en el canal (presumiblemente el grupo imidazol) reduce el eflujo de Cl^- a través del canal. Si la protonación incrementa el campo de fuerza del grupo imidazol, incrementa la energía de unión del Cl^- al grupo, y reduce la G_{Cl} debido a que disminuye la tasa de disociación del Cl^- del grupo. El mismo argumento es postulado para todos los aniones "Como-Cloruro". Los aniones "Como-

Benzoato" son ácidos carboxílicos con una porción hidrofóbica. Debido a que el campo de fuerza del grupo carboxilo es grande, tiene una alta afinidad por los protones. Suponiendo que la energía de unión entre el carboxilo y el agua es mayor que entre el carboxilo y el grupo dipolar imidazol, entonces es desfavorable energéticamente para un ion "Como-Benzoato" dejar la solución y entrar a un canal aniónico. El ion "ve" al canal como una cresta de energía potencial. La altura de la barrera se traduce en una disminución de la frecuencia con la que el ión deja la solución, supera la barrera y cruza la membrana, lo cual conduce a una reducción en la conductancia. La conductancia de iones "Como-Benzoato" incrementa conforme el pH disminuye ya que la protonación del grupo imidazol incrementa su campo de fuerza, bajando la altura de la barrera de energía potencial e incrementando la frecuencia con la cual los iones cruzan ésta. La unión hidrofóbica entre iones "Como-Benzoato" y la matriz del canal también ayudan a reducir la altura de la barrera de energía potencial. Esto permite al menos cualitativamente un incremento en la conductancia de aniones "Como-Benzoato" a pH bajo, al aumentar la frecuencia de colisiones exitosas entre el anion y el canal.

B.- Efectos sobre la respuesta mecánica

La acción de los aniones sobre la respuesta mecánica del músculo aún no es entendida completamente. Cuando el cloruro es remplazado por otros aniones se originan profundos cambios en la respuesta mecánica del músculo esquelético. Esos cambios pueden ser mediados por cambios en el potencial de acción (Falk y Landa,

1960a) o por acción directa sobre las proteínas contráctiles o en otros sitios (Kahn y Sandow, 1955; Axelsson, 1961).

Kahn y Sandow (1955) mostraron que el remplazo de Cl^- por iones NO_3^- causa un gran incremento en el pico de tensión de la sacudida muscular y se prolongan los tiempos de contracción y relajación. Debido a que ellos utilizaron estímulos máximos para estimular los músculos en cloruro y en nitrato, concluyeron que la potenciación de la sacudida no pudo ser causada por el reclutamiento de fibras. Estas observaciones se han confirmado en otros experimentos en donde el NO_3^- incrementa la sacudida de fibras individuales (Hodgkin y Horowics, 1960). Kahn y Sandow (1955) sugirieron que el aumento en la fuerza de la respuesta es debido a dos fenómenos; a) una reducción en el umbral de excitación de las fibras musculares y b) un incremento en la tensión de las fibras individuales.

Se ha demostrado que en musculos completos no hay cambio en la tensión tetánica máxima (Kahn y Sandow, 1955). Para la mayoría de los aniones también se ha demostrado que no afectan apreciablemente en la velocidad de acortamiento del componente contráctil bajo condiciones isotónicas (Hill y Macpherson, 1954; Sandow y Mauriello, 1953). En términos del modelo desarrollado por Hill y sus colegas, la razón por la que la tensión en una sacudida isométrica es menor que en un tetanos, es que en una sacudida muscular el estado activo del elemento contráctil dura muy poco tiempo para estirar suficientemente el componente elástico y ejercer toda la tensión. Debido a que la tensión máxima y la relación fuerza-velocidad del elemento contráctil no

es alterada por aniones de la serie liotrópica, Ritchie (1954) y Hill y Macpherson (1954) han sugerido que el efecto de los aniones sobre la sacudida muscular, se debe a un incremento en la duración de la actividad del elemento contráctil. Al incrementar la duración de la actividad, el elemento contractil puede tener más tiempo para acortarse y así estirar completamente el componente elástico en serie. Siguiendo esta idea se ha mostrado que el metilsulfato y que muchos aniones liotrópicos incrementan la duración del estado activo del elemento contráctil durante la contracción muscular (Hill y Macpherson, 1954; Hutter y Noble, 1960; Ritchie, 1954)

Además del aumento en la tensión, los aniones liotrópicos también incrementan la producción de calor durante una sacudida muscular (Hill y Macpherson, 1954). Este incremento en la producción de calor es proporcional al incremento en el pico de tensión. Por el contrario, durante la tensión máxima de un tetanos isométrico, la producción de calor es independiente del anion del baño.

Otro efecto interesante es que los aniones también potencian las contracturas de cafeina siguiendo el orden usual de potenciación (Matsushima et. al., 1962).

Sadow y sus colegas (1955) mostraron que la tensión en una serie de sacudidas es reducida por la fatiga más rápidamente en presencia de nitrato que en solución de cloruro. Otros aniones liotrópicos tienen efectos mecánicos similares y todos los investigadores estan de acuerdo en que la efectividad potenciadora de los aniones sobre la sacudida muscular sigue el orden $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^- < \text{SCN}^-$ (Hill y Macpherson, 1954;;

Hodgkin y Horowicz, 1960b; Kahn y Sadow, 1955).

C.- Efectos sobre el acople excitación-contracción

El cambio repentino en el potencial de membrana es el evento que normalmente induce la contracción del músculo esquelético. En fibras musculares normales, colocadas en solución de cloruro, el grado de despolarización requerido para activar el sistema mecánico es cercano al umbral para la propagación de la excitación (Hodgkin y Horowicz, 1959b). Huxley y Taylor (1958) estudiaron la activación del sistema mecánico en fibras musculares utilizando pequeños electrodos colocados sobre la superficie externa del sarcolema. Pasando pulsos de corriente a través de esos electrodos, ellos exploraron la superficie membranal particularmente en sitios sensibles para la producción de contracciones. Cuando la membrana fue despolarizada, solo ciertas áreas fueron efectivas para producir contracciones locales. Esas áreas fueron localizadas sobre regiones asociadas con las triadas del retículo sarcoplásmico.

Kahn y Sadow (1955) y Hill y Macpherson (1954) mostraron que la tasa en la que se desarrolla el efecto de los aniones sobre el músculo completo y la tasa en la que los efectos son invertidos cuando los aniones son removidos del medio extracelular, están limitadas por la rapidez con la que los aniones pueden difundir a los interespacios. En experimentos mas recientes utilizando fibras únicas, donde los aniones pueden alcanzar más rápidamente la superficie de la fibra, se encontró un retardo de 1 a 3 segundos entre la aplicación de anión y el

incremento de la tensión de la sacudida muscular (Hodgkin y Horowicz, 1960b). Debido a que el reemplazo de Na^+ por colina bloquea muy rápidamente la sacudida, el retardo en el efecto de los aniones no pudo atribuirse a problemas de difusión. Está claro que hay un sitio en la membrana involucrado con los efectos potenciadores de los aniones. Esta idea es apoyada por el hecho de que los efectos se desarrollan completamente antes de que aparezcan cantidades significativas de aniones dentro de la célula y porque los efectos desaparecen rápidamente si se retiran los aniones extracelulares, aún cuando haya suficiente cantidad de aniones en el interior de la fibra (Hill y Macpherson, 1954)

Para explicar el por qué los efectos del nitrato sobre la amplitud de la sacudida muscular son más lentos que los efectos del sodio en la propagación, Hodgkin y Horowicz (1960) sugirieron que los sitios responsables del potencial de acción están probablemente sobre la superficie, mientras que los relacionados con la activación del sistema contráctil, los cuales son afectados por los aniones, deben localizarse en la membrana del sistema tubular.

Varios investigadores propusieron que el efecto de los aniones extraños sobre la sacudida muscular puede deberse parcialmente, al incremento en el tamaño y duración del post-potencial negativo y a la prolongación de la espiga misma. Washio y Mashima (1963) y Hutter y Noble (1960) han sugerido que el efecto potenciador de los aniones sobre la sacudida muscular es el resultado de dos procesos: el primero es un incremento en la resistencia de la membrana y una prolongación de la

despolarización (post-potencial), y el segundo es una facilitación directa sobre el acople excitación-contracción. Esta idea ha sido propuesta debido a que la duración del potencial de acción está en buena correlación con la resistencia de la membrana pero no con la tensión de la sacudida muscular. Los experimentos sobre la acción de los aniones extraños en las contracturas inducidas por potasio han revelado otro factor importante. En 1960, Hodgkin y Horowicz descubrieron que el NO_3^- y bajas concentraciones de SCN^- reducen la concentración de potasio, y con esto la despolarización de la membrana, requerida para inducir cierta cantidad de tensión. Un efecto similar también fue observado en soluciones de bromuro (Frank, 1961). De esas observaciones, el efecto que tienen los aniones sobre la sacudida muscular ha sido parcialmente atribuido a un incremento de la activación durante la espiga y parcialmente a una reducción del umbral mecánico por debajo del post-potencial.

Hodgkin y Horowicz (1960) observaron que el orden en que los aniones actúan ($\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^- < \text{SCN}^-$) es similar al orden de su adsorbilidad. Ellos sugirieron que la desviación del umbral mecánico hacia el potencial de reposo debe ser explicado por su adsorción a la superficie externa de la membrana. Tal adsorción de los aniones introduciría localmente un campo eléctrico dentro de la membrana que disminuiría el originado por el potencial de reposo. Entonces los aniones extraños podrían alterar la distribución de otros grupos cargados o dipolos dentro de la membrana sin cambiar la diferencia de potencial transmembranal. Si el evento crítico que inicia la contracción es una reducción del campo eléctrico en alguna región dentro de la membrana, tal

adsorción de los aniones desviaría el potencial umbral para la activación mecánica hacia el potencial de reposo.

Durante el reposo, el flujo de calcio es muy similar en músculos sumergidos en ringer de NO_3^- y en ringer de Cl^- . En la excitación, sin embargo, el flujo de calcio aumenta un 60% en solución de nitrato (Bianchi y Shanes, 1959). Frank (1961) encontró que la tensión en el músculo esquelético de rana es menor después de sumergirlo por periodos prolongados en una solución libre de calcio. Si el Cl^- es substituido por Br^- en esta solución, se origina un incremento en el tiempo de caída de la tensión máxima. Estos resultados sugieren una posible relación entre los aniones y el Ca^{++} así como cambios en la duración del estado activo.

Ebashi et.al. (1962) reportaron que la actividad del factor relajante, originada del retículo sarcoplásmico, junto con su capacidad para unir calcio varía con la especie de anión presente, y el grado de inhibición sigue el orden : $\text{Cl}^- < \text{CH}_3\text{SO}_4^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^- < \text{SCN}^-$.

Ebashi et. al. (1969) y Ebashi y Endo (1968) propusieron que los aniones extraños tienen dos tipos de efectos sobre el acople excitación-liberación de Ca^{++} . Uno es un efecto lento sobre el retículo sarcoplásmico para facilitar la liberación de calcio o la inhibición de la recaptura de calcio; el otro es un efecto más rápido sobre la membrana del sistema tubular, y especialmente sobre la superficie más cercana al retículo sarcoplásmico, para incrementar la eficiencia del acople eléctrico entre el sistema tubular y el retículo sarcoplásmico.

Es posible que todos los aniones liotrópicos de importancia biológica tengan una acción similar. Sin embargo, aún no se han determinado los sitios exactos, su naturaleza y la secuencia de eventos que tienen lugar.

ANTECEDENTES

De acuerdo con la teoría clásica de Hodgkin y Huxley, que explica los potenciales de acción en varios tejidos excitables, la corriente local despolariza a la membrana hasta un nivel en donde la permeabilidad al sodio incrementa de una manera regenerativa, de tal forma que la membrana se vuelve alta y selectivamente permeable al sodio. Como resultado los iones sodio pueden moverse hacia abajo de su gradiente electroquímico. En esta teoría, la fase de ascenso del potencial de acción se atribuye a la gran entrada de iones Na^+ . La fase de caída, es causada por un incremento tardío en la permeabilidad al potasio y una disminución en la permeabilidad al sodio. Entonces esta fase es debida a una gran salida de potasio por encima de alguna entrada residual de sodio.

En apoyo a esta teoría iónica, en el músculo esquelético Nastuk y Hodgkin (1950) han mostrado que el pico del potencial de acción depende fuertemente del potencial de equilibrio del sodio. Además se han evaluado los movimientos de sodio y potasio radioactivos durante la actividad de las fibras musculares aisladas (Hodgkin y Horowicz, 1959a). Cuando las fibras son estimuladas ocurre una entrada de $15.6 \pm 1.8 \text{ pmol/cm}^2$ de sodio por impulso. La salida neta de potasio es aproximadamente de 10 pmol/cm^2 por impulso. Hodgkin y Horowicz (1959a) sugirieron que la diferencia en la carga transportada a través de la membrana puede deberse a una entrada neta de cloruro durante el potencial de acción.

Al final del pico del potencial de acción ocurre una repolarización con dos componentes distintos. Inicialmente hay

una repolarización rápida que dura aproximadamente 2 a 3 mseg. después del pico de la espiga, dejando la membrana despolarizada por 15 o 20 mV. Después de la repolarización inicial, el potencial se aproxima lentamente a su valor de reposo. Esta segunda fase se ha denominado post-potencial negativo y generalmente dura 30 a 50 mseg. En 1957, Frank reportó que el post-potencial negativo declina exponencialmente con una constante de tiempo similar al decaimiento de una hiperpolarización. Persson (1963) ha mostrado que aunque la última fase del post-potencial decae exponencialmente, durante los primeros 10 a 15 mseg el comportamiento del potencial de membrana se desvía significativamente de su curso de tiempo final. Durante la parte inicial del post-potencial, la resistencia de la membrana es más baja que en el reposo. Esto parece indicar que después de los primeros 10 a 15 mseg. el post-potencial refleja la descarga pasiva del capacitor de la membrana a través de un canal que tiene una permeabilidad constante igual a la permeabilidad en el reposo. Sin embargo, la porción inicial del post-potencial está asociada con una resistencia de membrana baja, lo cual refleja probablemente las fases finales del incremento de la permeabilidad al potasio.

Washio y Mashima (1964) observaron que efectivamente puede prolongarse y potenciarse el post-potencial negativo, si se bloquean los canales de potasio que repolarizan la membrana durante el potencial de acción. La aplicación de Tetraetilamonio (TEA), un potente bloqueador de los canales de potasio de la rectificación tardía, incrementa la duración del potencial de

acción. Stanfiel (1973) también ha encontrado resultados similares.

El interés por conocer la participación del cloruro durante el potencial de acción de Na-K nació principalmente porque si el Cl^- se intercambia en el medio extracelular por otros aniones de la serie liotrópica ocurre un incremento en la tensión desarrollada durante la sacudida muscular. Originalmente Kahn y Sandow (1950) atribuyeron este efecto potenciador a una facilitación del acople excitación-contracción porque no observaron ningún cambio en el potencial de acción. Pero Hill y Mcpherson (1954) sugirieron que los aniones liotrópicos pueden actuar sobre la superficie de la membrana y no dentro de la fibra muscular debido que la potenciación aparece inmediatamente después de substituir al cloruro.

Etzensperger y Bretonneau en 1956 y Benoit en 1957 reportaron que el NO_3^- y otros aniones monovalentes (Br^- , I^- , SCN^-) prolongan el potencial de acción (véase Horowicz, 1964). Lubin (1957) reportó que el I^- y el SCN^- incrementan marcadamente el post-potencial negativo tanto en amplitud como en duración. Sin embargo, Lubin no encontró cambios apreciables en el potencial de acción, cuando el cloruro fue substituido por el ion nitrato en la solución del baño. Es probable que los efectos de los aniones liotrópicos sobre el potencial de acción sean enmascarados por la gran corriente saliente de potasio. Por esta razón en este trabajo de tesis se ha intentado explorar nuevamente los efectos del NO_3^- y del I^- sobre el potencial de acción bloqueando (con TEA) el canal de potasio de la rectificación tardía.

Los aniones liotrópicos también parecen modificar la

actividad de algunos canales iónicos de la fibra muscular esquelética de la rana. Por ejemplo, Dani, Sánchez y Hille (1983) estudiaron, bajo condiciones de fijación del voltaje, los efectos de los aniones liotrópicos sobre la actividad de los canales de sodio. Ellos encontraron que los aniones aplicados en la solución extracelular desvian reversiblemente los procesos que dependen del voltaje, hacia potenciales más negativos en la secuencia : metanosulfonato $\leq$ Cl $\leq$ acetato $<$ Br $\leq$ NO₃ $\leq$ SO₄ $<$ benzensulfonato $<$ SCN $<$ ClO₄ ; aproximadamente la secuencia liotrópica. Estos efectos sobre la actividad de los canales de sodio deberían de reflejarse también en el potencial de acción. Sin embargo, no se han observado cambios aparentes durante la fase de ascenso de la espiga de Na-K cuando el cloruro fue substituido por otros aniones liotropicos (Kahn y Sandow, 1955; Harris y Martins-Ferreira, 1954; Horowicz, 1964). También se ha reportado que la actividad de los canales de potasio de la rectificación tardía puede ser modulada por el tipo de anión de la solución del baño (Kao y Stanfield, 1968).

Los aniones impermeantes también incrementan la duración del potencial de acción al hacer más lenta la ultima porción de la repolarización. El SO₄²⁻, acetato, ferrocianato, y monoiometano sulfonato mantienen despolarizada la membrana por periodos de 20 a 30 segundos, durante los cuales ocurren descargas repetitivas (Falk y Landa, 1960a). El metilsulfato, un anión que no es capaz de permear la membrana muscular, también incrementa el post-potencial negativo en amplitud y duración (Hutter & Noble, 1960).

Debido a que la acción combinada del potasio y del cloruro contribuyen a la repolarización de la membrana después del pico del potencial de acción. Al bloquear los canales de potasio (utilizando TEA) y disminuir la conductancia al Cl^- (substituyendolo por SO_4^{2-}) debe esperarse que el post-potencial se incremente en amplitud y duración. En 1976, Beatty y Stefani equilibraron fibras musculares de rana en una solución de sulfato con 20 mM de TEA. Bajo estas condiciones encontraron que después de un potencial de acción la membrana se mantiene despolarizada por varios segundos y es seguida por una espiga lenta que alcanza un pico máximo aproximadamente a los +23 mV. La respuesta ha sido atribuida a un incremento en la conductancia de la membrana al calcio, debido a que el fenómeno pudo ser abolido al remover el Ca^{+} externo o por adicionar cobalto o D_{600} .

La entrada de calcio a la fibra muscular también puede ser potenciada por los aniones liotrópicos. Bianchi y Shanes (1959) estimaron el influjo de ^{45}Ca en músculos de rana cuando el 70% del Cl^- fue substituido por NO_3^- en la solución extracelular. Sus resultados muestran que el nitrato incrementa la entrada de ^{45}Ca en un 60%. Este incremento solamente pudo ser observado cuando las fibras fueron estimuladas, ya que en el reposo el influjo de ^{45}Ca fue similar tanto en ringer de Cl^- como en ringer de NO_3^- . Debido a esto Bianchi y Shanes (1959) supusieron que la entrada de calcio radioactivo ocurría durante el potencial de acción de Na-K. Sin embargo, se ha demostrado que los canales lentos de calcio de la fibra muscular esquelética de la rana, son activados durante la excitación (Sánchez y Stefani, 1978, 1983; Almers y col. 1981). Pero se desconoce si el incremento en la entrada de

Ca^{45} , observado en presencia de nitrato es el resultado de alguna alteración en estos canales de calcio. No obstante, parece probable que su actividad también dependa del tipo de anion presente en el medio extracelular. Por este motivo en este tesis también se han explorado los posibles efectos anionicos sobre la actividad de estos canales de calcio

PROPOSITOS DEL TRABAJO DE TESIS

De lo expuesto anteriormente, resulta interesante investigar si la actividad eléctrica del músculo esquelético puede ser modulada por la especie aniónica de la solución extracelular.

Este trabajo fué realizado con el objeto de investigar la acción de diversos aniones NO_3^- , I^- , $\text{SO}_4^{=}$ y CH_3SO_4^- , sobre las propiedades eléctricas activas en la fibra muscular esquelética de la Rana pipiens. Particularmente, esta investigación tuvo como finalidad la de analizar los cambios producidos sobre el potencial de acción de sodio-potasio al reemplazar el cloruro extracelular por los aniones permeantes nitrato y ioduro, así como evaluar los efectos de los aniones impermeantes sulfato y metanosulfonato sobre los potenciales de acción de calcio.

METODOLOGIA

Los experimentos se realizaron en fibras del músculo sartorio y del músculo semitendinoso de especímenes adultos de Rana pipiens, sin distinción de sexos. Las ranas fueron mantenidas en recipientes de plástico con agua limpia a la temperatura del laboratorio ($20 - 22^{\circ}\text{C}$), alimentándolas con un homogenizado de carne de res dos veces por semana. Esto permitió mantener en buen estado a los organismos por períodos prolongados de tiempo.

I) Experimentos con potenciales de acción de Na-K y potenciales de acción de Calcio.

A) Diseño experimental.

Los experimentos fueron diseñados para evaluar el efecto de los diferentes aniones sobre las propiedades eléctricas activas de la fibra muscular esquelética de la rana. Para tal efecto los potenciales de acción de Na-K fueron registrados en presencia de los aniones monovalentes (Cl^- , NO_3^- , I^-) mientras que el sulfato y el metanosulfonato fueron ensayados sobre los potenciales de acción de calcio.

Debido a que la acción combinada del potasio y del cloruro contribuyen a la repolarización de la membrana después del pico del potencial de acción (Frank, 1957; Hutter y Noble, 1960; Persson, 1963), fue necesario bloquear la corriente de potasio para poder observar únicamente la participación del Cl^- el NO_3^- y el I^- en este proceso. Por tal motivo los músculos fueron equilibrados en una solución salina que contenía el anión de

prueba (Cl^- , NO_3^- o I^-), 40 mM de TEA y 350 mM de sacarosa. El tetraetilamonio (TEA) es un catión capaz de bloquear la rectificación tardía sin alterar las corrientes de cloruro (Stanfield, 1970). La sacarosa es empleada comunmente para inhibir la contracción muscular. Una sacudida muscular con los microelectrodos implantados ocasionaría un daño irreversible en la célula y la fractura de la punta de la micropipeta. Además, cuando los eventos eléctricos son muy lentos, como los potenciales de calcio, la contracción muscular introduce al registro eléctrico artefactos de contracción.

Para registrar los potenciales de Ca^{++} es requisito indispensable substituir el Cl^- por un anión impermeante tal como el sulfato y adicionar TEA. Además, debido a que el sulfato es capaz de quelar el calcio (Dani, Sánchez y Hille, 1983) es necesario elevar cinco veces la concentración extracelular de Ca^{++} para asegurar que este catión se encuentre en forma ionizada en una concentración de 2 mM. En estos experimentos el sulfato fue tomado como anión control debido a que originalmente los potenciales de Ca^{++} fueron descritos en solución de $\text{SO}_4^{=}$ (Beaty y Stefani, 1976).

Una vez equilibrados los músculos en las correspondientes soluciones experimentales (aproximadamente 15 min.), se registraron los potenciales de acción de Na-K y los potenciales de acción de Ca^{2+}

Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20 - 22 °C), y para evitar el problema de difusión de la solución experimental en el músculo, todos los registros del potencial de membrana fueron realizados utilizando las fibras

musculares superficiales. De estas fibras, únicamente se utilizaron las que poseían potenciales de reposo de 80 mV o mayores.

Para cada registro del potencial de acción de calcio se obtuvo la primera derivada del voltaje con respecto al tiempo. Para tal efecto, la salida del amplificador fué conectada a un circuito derivador (Fig. 1). Este procedimiento permitió calcular la densidad de corriente que fluye durante un potencial de acción de calcio. En esta técnica, desarrollada por Hodgkin y Katz en 1949, las corrientes iónicas están descritas por:

$$I_i = - C_m dE/dt$$

donde I_i es la corriente iónica del ion "i", C_m es la capacidad de la membrana, E es el voltaje a través de la membrana y t es el tiempo.

Esta forma de calcular las corrientes iónicas a partir del registro de la derivada del potencial transmembranal, sólo es aplicable para el caso particular de que el cambio del voltaje en el tiempo sea máximo o mínimo.

B) Disección y montaje de la preparación biológica.

Los animales fueron sacrificados por decapitación y destrucción posterior de la médula espinal con un estilete. Después de retirar la piel de las extremidades inferiores el músculo sartorio fué disecado en un microscopio estereoscópico Nikon modelo SMZ-10. Una vez disecado, el músculo sartorio se trasladaba a una cámara experimental con resina transparente en el fondo (Sylgar) donde se fijaba con pequeños alfileres

TABLA I

Soluciones empleadas para el registro de potenciales de membrana
(Concentracion en mM)

Soluciones de diseccion										
	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	I ⁻	CH ₃ SO ₄ ⁻	SO ₄ ⁼	Sac.	MOPS
Ringer-Cl	120	2.5	2.0	122.5						4.0
Ringer-NO ₃	120	2.5	2.0		122.5					4.0
Ringer-I	120	2.5	2.0			122.5				4.0
Ringer-CH ₃ SO ₃	120	2.5	2.0				122.5			4.0
Ringer-SO ₄	120	2.5	9.0					70.25	49.25	4.0

Soluciones experimentales.										
	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	I ⁻	CH ₃ SO ₄ ⁻	SO ₄ ⁼	TEA	Sac.MOPS
Ringer-Cl	80	2.5	2.0	122.5					40 350	4
Ringer-NO ₃	80	2.5	2.0		122.5				40 350	4
Ringer-I	80	2.5	2.0			122.5			40 350	4
Ringer-CH ₃ SO ₄	80	2.5	2.0				122.5		40 350	4
Ringer-SO ₄	80	2.5	9.0					70.25	40 399.25	4

Todas las soluciones fueron ajustadas a pH de 7.2.

En las soluciones experimentales el TEA se agrego por el reemplazo equimolar de sodio. Para incrementar la tonicidad del medio las soluciones experimentales fueron preparadas añadiendo 350 mM de sacarosa. Las soluciones se prepararon adicionando los hidroxidos de los cationes a sus correspondientes acidos.

entomològics (Fig. 1). Los músculos fueron montados horizontalmente de tal manera que su superficie más profunda in situ, quedara colocada hacia arriba. Fijando el tendón distal y la inserción pélvica los músculos se mantuvieron estirados lo que ayudo a reducir el movimiento.

Tanto la disección como el montaje de la preparación biológica se realizó en una solución ringer donde el único anión presente era el anión de prueba (vease sol. de disección, Tabla I). Para realizar los registros del potencial de membrana, la solución de disección era reemplazada por una solución experimental. Esta solución experimental contenía el mismo anión que la solución de disección, más 40 mM de TEA y 350 mM de sacarosa (Tabla I).

C) Sistemas de estimulación y de registro

Se emplearon las técnicas convencionales de registro del potencial de membrana con electrodos intracelulares (Fatt y Katz, 1951).

Los electrodos se construyeron con capilares de vidrio de un milímetro de diámetro externo, con una fibra de vidrio en su interior, utilizando un estirador de microelectrodos horizontal Sutter Instrument Co., modelo P-77 Brown-Flaming. Enseguida los microelectrodos se llenaban con una solución de KCl 3 M y eran colocados en una cámara húmeda donde se mantenían para permitir la salida de pequeñas burbujas de aire. La resistencia de los microelectrodos utilizados varió de 20 a 30 Megaohms. Los

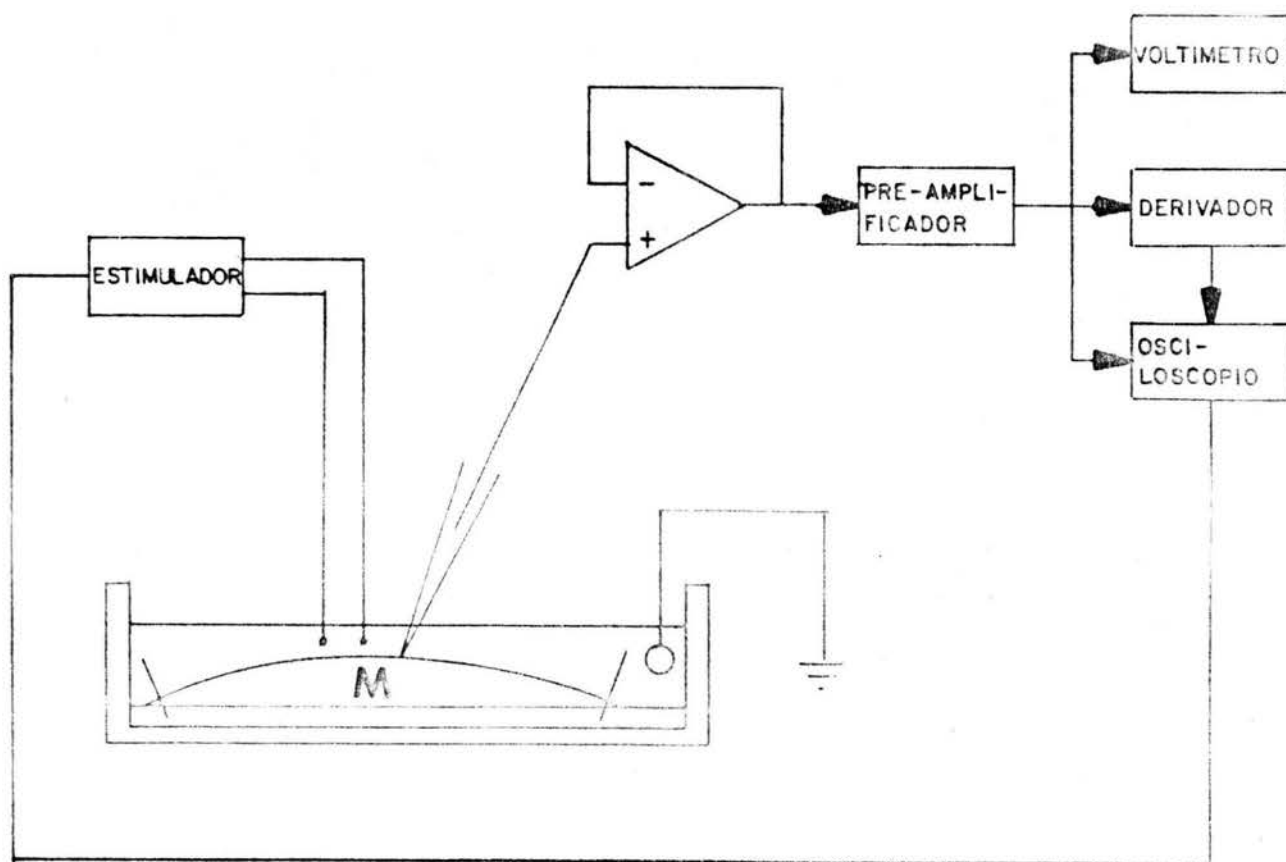


Figura 1. Montaje de la preparación biológica y sistemas de registro y estimulación. El músculo (M) se estiró fijándolo por sus extremos sobre resina plástica en el fondo de la cámara experimental. El registro fue realizado a través de un microelectrodo, conectado a un seguidor catodico el cual a su vez alimentaba un preamplificador. La salida del preamplificador se conectó simultaneamente a un voltímetro digital, a un circuito derivador y a un canal del osciloscopio. La salida del derivador alimentó a un segundo canal del osciloscopio. El registro se realizó en relación a un alambre de plata/plata clorurada que llevó a tierra la solución del baño. Las fibras musculares fueron estimuladas con pulsos cuadrados de voltaje mediante electrodos bipolares conectados a un estimulador. Este estimulador también sincronizó el barrido del osciloscopio.

microelectrodos fueron montados en un micromanipulador Huxley.

En la figura 1 se muestra el sistema empleado para el registro del potencial de membrana. En este sistema, las micropipetas fueron conectadas a través de un electrodo de plata/plata clorurada a un seguidor catódico y la salida se llevaba a un amplificador Biodyne Elec., modelo AM-1.

El registro se realizó en relación a un alambre de plata/plata clorurada en la solución del baño, el cual formaba una tierra real.

La salida del preamplificador fue llevada simultáneamente a:

- 1) Un circuito derivador que permitía registrar la derivada del voltaje con respecto al tiempo de las respuestas bioeléctricas.
- 2) Un voltímetro digital Sympson, modelo 2840, para obtener las lecturas del potencial de reposo.
- 3) Un canal del osciloscopio Tektronix, modelo 5133. La salida del derivador alimentaba a un segundo canal del osciloscopio.

Los eventos bioeléctricos registrados fueron fotografiados con una cámara Nihon Kohden, modelo PC-2A, para su análisis posterior.

La estimulación de las fibras musculares se llevo a cabo extracelularmente (Fig.1). El sistema de estimulación extracelular consistió de un estimulador Grass SD9 el cual sincronizaba el barrido del osciloscopio y mandaba pulsos cuadrados de voltaje a través de una unidad de estímulos aislados. La estimulación se realizó con la ayuda de electrodos bipolares contruidos con alambres de plata. Estos alambres fueron aislados con silicon excepto en la punta, lo que permitió estimular una área muy pequeña y así minimizar el acople con el

sistema de registro.

II) Experimentos de fijación del voltaje.

A) Diseño experimental.

Los experimentos se diseñaron para investigar los efectos del metanosulfonato y del nitrato sobre las corrientes entrantes de calcio en la fibra muscular esquelética de la rana. Para este fin, se utilizó la técnica de fijación del voltaje con tres sellos de vaselina desarrollada por Hille y Campbell (1976). Esta técnica consiste en registrar las corrientes iónicas utilizando una fibra muscular cortada, lo que facilita el acceso al medio intracelular tanto para la inyección de corriente como para el control interno del medio ambiente iónico.

En esta serie de experimentos, también el SO_4^- fue tomado como anión control, para evaluar los efectos tanto del NO_3^- como del CH_3SO_4^- . En cada caso se registraron las corrientes de calcio en la solución de SO_4^- antes y después de hacer los registros en las correspondientes soluciones de nitrato y de metanosulfonato. Todos los aniones utilizados se ensayaron sólo extracelularmente.

Para perfundir intracelularmente la fibra muscular se empleo una solución de TMA_2EGTA (ver tabla II). Esta solución disminuye las corrientes salientes de potasio y permite mantener en niveles muy bajos la concentración intracelular de calcio, que podría conducir a una contracción muscular ocasionando la ruptura de los sellos de vaselina.

Los experimentos se realizaron a la temperatura ambiente (20 - 22 °C). Además, debido a que la estimulación repetitiva puede provocar una deplesiòn de Ca^{++} en el sistema tubular (Almers,

Fink y Palade, 1981) y con esto una reducciòn de la corriente entrante, todos los registros fueron realizados dejando un intervalo de un minuto, entre el registro de una corriente y la siguiente.

B) Preparaciòn biològica

En los experimentos de fijaciòn del voltaje se utilizaron sòlo pequeños segmentos (aproximadamente de 1 mm. de largo) de una fibra muscular. Estas fibras fueron aisladas del mùsculo semitendinoso de Rana pipiens. La disecciòn de la fibra aislada fuè realizada con la ayuda de pinzas y tijeras de microdisecciòn en un microscopio estereoscòpico.

Todas las disecciones se realizaron en ringer de disecciòn (Tabla II). Una vez disecada, la fibra muscular era montada en una càmara experimental que previamente habìa sido inundada con soluciòn intracelular (Tabla II). Esta càmara experimental està dividida en cuatro compartimientos denominados A, B, C y E (Fig. 2A), lo que permite separar elèctricamente un segmento de fibra muscular mediante tres sellos de vaselina. La fibra muscular se colocò sobre los bordes de las cuatro pozas como se indica en la figura 2B. En seguida se aplicaron los sellos de vaselina con una jeringa hipodèrmica y una aguja del nùmero 26, teniendo cuidado de no dejar zonas de contacto elèctrico entre las diferentes pozas. Una vez realizado este paso, la fibra muscular era cortada por sus extremos en las pozas C y E. Finalmente, todo el lìquido sobrante se removìa hasta que no hubiera contacto elèctrico entre

TABLA II

Composicion de las soluciones fisiologicas empleadas para el registro de las corrientes de calcio con la tecnica de fijacion del voltaje.

(Concentracion en mM)

Sol. interna	Sol. externas		Ringer de Diseccion
	Ringer-SO ₄ ⁻	* Ringer- X	
77 (TMA) ₂ EGTA	9 CaSO ₄	2 Ca(X) ₂	10 Ca(CH ₃ SO ₄) ₂
4 TMA/MOPS	42 (TEA) ₂ SO ₄	124 TEAX	137.5 KCH ₃ SO ₄
	4 TEA/MOPS	4TEA/MOPS	4 K/MOPS
	113 Sacarosa		

* X representa CH₃SO₄⁻ o NO₃⁻

En cada solucion se utilizo como amortiguador acido morfolinopropanosulfonico (MOPS). Todas las soluciones fueron ajustadas a un pH de 7.2. Las soluciones externas se prepararon adicionando los hidroxidos de los cationes a sus correspondientes acidos.

las diferentes zonas en las que se había dividido al segmento de fibra muscular.

A continuación, con un ocular graduado se midió la zona de registro (A) y el diámetro de la fibra, ambas medidas permitieron calcular el área de membrana superficial en la zona de registro. Conociendo el área de la membrana que atraviesan los iones, es posible calcular la densidad de corriente ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$).

C) Técnica de fijación del voltaje con tres sellos de vaselina y sistema de registro de las corrientes iónicas de calcio.

La técnica de fijación del voltaje con tres sellos de vaselina, adaptada para el registro de las corrientes iónicas en el músculo esquelético, ha resultado del trabajo de Hille y Campbell (1976). Esta técnica se ha utilizado con éxito para registrar las corrientes de compuerta del canal de sodio y los movimientos de carga en el acople excitación-contracción (véase Bezanilla, Vergara y Taylor, 1982).

La idea del método se muestra en la figura 3. En la parte superior de la figura se esquematiza una fibra muscular dividida, en los compartimientos A, B, C y E, por tres sellos de vaselina (zonas sombreadas). Las pozas C y E están en contacto con los extremos cortados de la fibra muscular lo que permite utilizarlas para difundir sustancias al interior celular y reemplazar eventualmente el contenido iónico normal del sarcoplasma. Las pozas A y B bañan extracelularmente la fibra muscular. El circuito controlador del voltaje, representado en la figura 3,

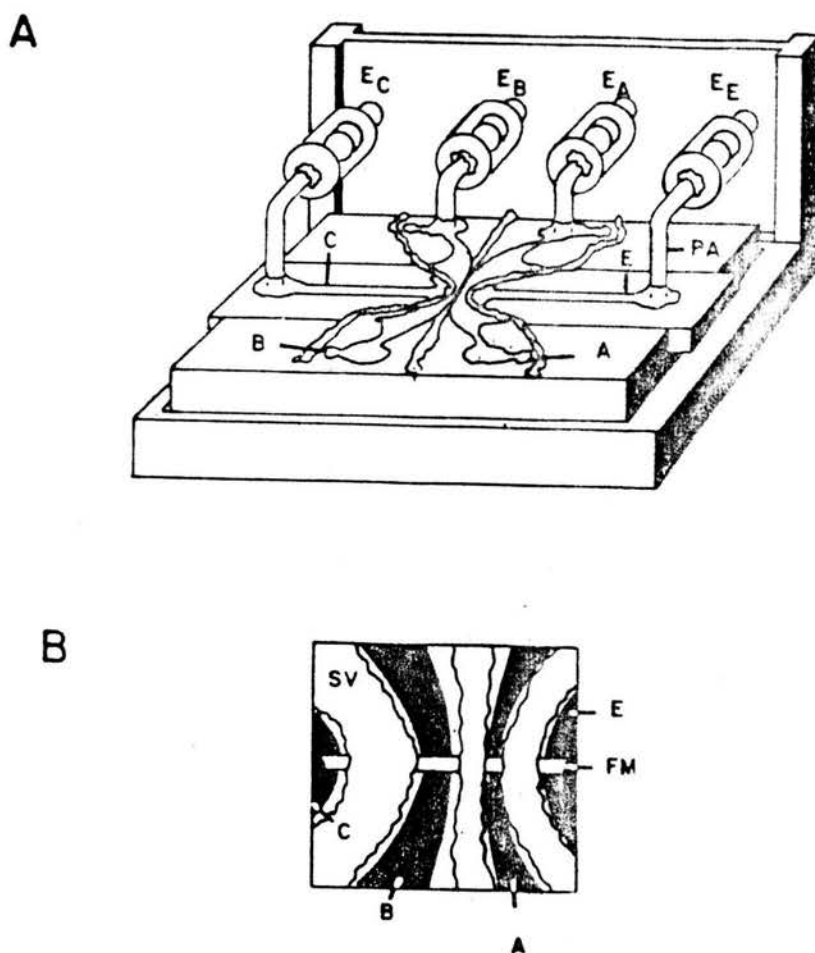


Figura 2. Camara experimental utilizada en la tecnica de fijacion del voltaje con tres sellos de vaselina. A: La camara esta dividida en cuatro compartimientos marcados con las letras A, B, C y E. Las pozas A y B bañan externamente el segmento de la fibra muscular en tanto que las pozas C y E estan conectadas directamente con el interior celular. La poza A se utilizo para hacer los cambios de solucio con los diferentes aniones. Los cuatro electrodos (E_C , E_B , E_A y E_E) son pastillas construidas de Ag/AgCl que conectan la camara experimental al circuito controlador del voltaje a traves de puentes de agar (PA) en 1 mM de KCl. B: En este esquema se muestra un segmento de fibra muscular montado sobre la camara experimental. La fibra muscular (FM) esta dividida en cuatro compartimientos (A,B,C y E) mediante tres sellos de vaselina (SV). Para el registro de las corrientes de Ca^{++} el segmento de fibra muscular en el compartimiento A media aproximadamente 140 micras. (Modificado de Bezanilla, Vergara y Taylor, 1982).

està compuesto esencialmente por dos amplificadores, el A_1 y el A_2 . El amplificador A_1 mide el potencial de membrana entre el punto C y el punto B. Este voltaje es comparado con un pulso comando (V com) por el amplificador A_2 . La salida de este último amplificador es inyectada al interior de la fibra muscular a través de la poza E. Bajo estas condiciones, el amplificador A_2 genera una corriente proporcional a la diferencia de voltajes de las dos señales de entrada de tal forma que el potencial de membrana es llevado a un valor igual al del voltaje comando.

El amplificador A_1 tiene una ganancia muy grande. Debido a esto y a que el potencial en el punto C es comparado con tierra real (punto B), se mantienen en tierra virtual tanto el punto D como el interior de los segmentos B y C. Esto previene el flujo longitudinal de corriente en la vía CD.

La corriente que fluye a través de la membrana en la poza A debe ser igual a la corriente en la vía ED ya que no hay flujo de corriente en la vía DC. Entonces la corriente inyectada por el amplificador A_2 es proporcional a las corrientes iónicas que atraviesan la membrana en la poza A. Esto permite obtener a las corrientes iónicas registrando la caída del voltaje a través de una resistencia de valor conocido.

En los experimentos de fijación del voltaje realizados en este trabajo de tesis, se registraron las corrientes iónicas a través de una resistencia de 10^6 ohms. Las corrientes así obtenidas,, fueron filtradas con un filtro Bessel de cuatro polos a 1 KHz y después se restaron analógicamente los componentes lineales y capacitivos. Estas señales fueron amplificadas 40

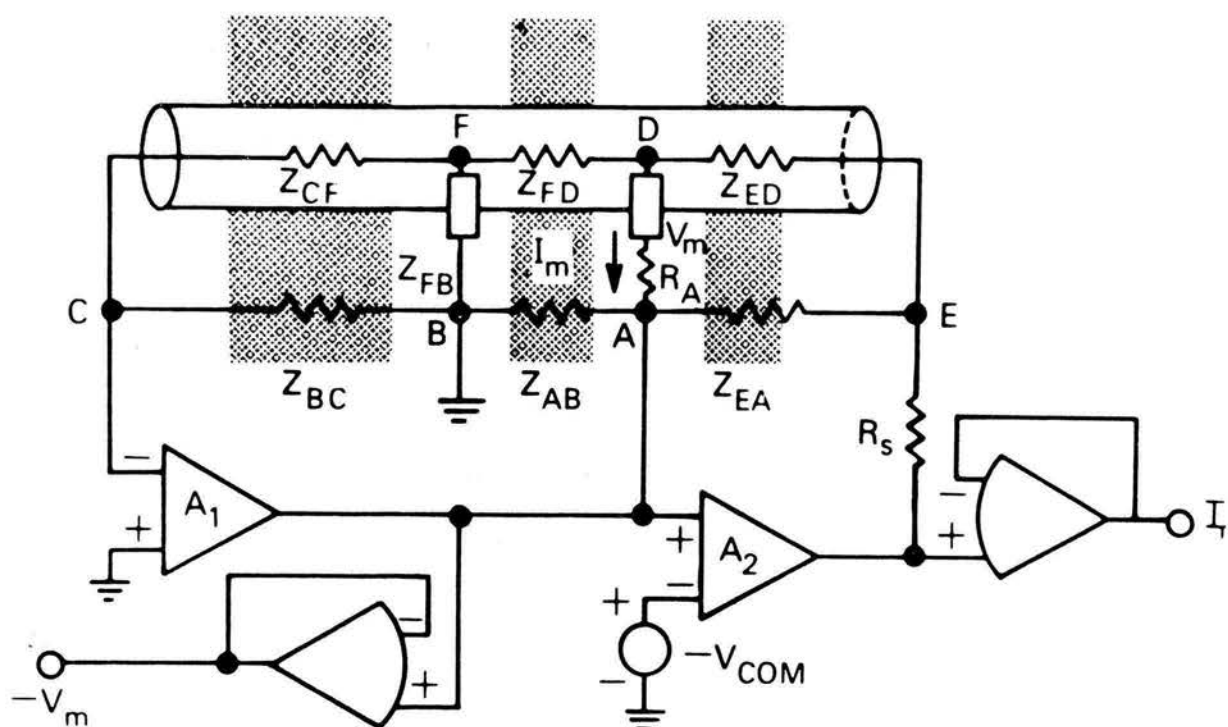


Figura 3. Circuito equivalente para la fijación del voltaje de fibras musculares únicas mediante la técnica de espacios de vaselina. En la parte superior se muestra un segmento de una fibra muscular dividido en cuatro compartimientos (A, B, C y E). Las zonas sombreadas representan los tres sellos de vaselina. El amplificador A_1 mide el potencial de la membrana entre la poza C y la poza B. La salida del amplificador A_1 es comparada con un voltage comando (V_{com}) por el amplificador A_2 . La salida del amplificador A_2 se inyecta al interior de la fibra a través de la poza E originando que el potencial de la membrana sea llevado al mismo valor del voltage comando.

veces antes de ser capturadas por un convertidor análogo-digital. El paso final consistió en almacenar las corrientes iónicas en el disco duro de una computadora North Star para su análisis posterior.

Las corrientes de calcio se obtuvieron estimulando a la fibra muscular con pulsos cuadrados de voltaje de 2 segundos de duración. Estos pulsos de voltaje fueron ordenados para llevar al potencial de la membrana a diferentes valores entre -60 mV y $+40$ mV.

Al inicio del experimento la solución de la poza A era reemplazada por la solución de sulfato. Después de esperar de 10 a 15 minutos para permitir que se equilibraran las temperaturas y los gradientes iónicos en la fibra, se procedía a establecer el potencial de mantenimiento (E_h) en -90 mV, el cual está cercano al potencial normal de las fibras musculares. A continuación se registraba una familia de 10 corrientes de calcio en la solución de $\text{SO}_4^{=}$. Una vez terminado este paso la solución de sulfatos era substituida por la solución de CH_3SO_4^- y se repetía todo el procedimiento anterior hasta obtener nuevamente diez corrientes de calcio. El paso final fue hacer el registro de las corrientes cuando se regresaba al ringer- $\text{SO}_4^{=}$. Este mismo procedimiento se realizó para el caso del nitrato.

RESULTADOS

1) Potenciales de acción de Na - K

A.- Efecto del TEA sobre el potencial de acción.

En la figura 4A. se muestra un potencial de acción típico registrado con microelectrodos intracelulares en la solución de ringer normal. El trazo superior es el nivel de referencia mientras que el trazo inferior es el potencial en la punta del microelectrodo intracelular. La distancia entre ambos trazos es entonces proporcional a la diferencia de potencial a través de la membrana. Este voltaje es conocido como el potencial de reposo (E_r) y puede observarse antes del inicio de la espiga. La estimulación de las fibras musculares produjo un cambio temporal en el voltaje de la membrana. En este proceso, llamado potencial de acción la membrana se despolarizó rápidamente hasta un valor donde el voltaje intracelular se hizo positivo. Esta inversión del potencial y la amplitud de la espiga (V_s) son indicados también en la figura 4A. Después del pico del potencial de acción la fibra muscular se repolarizó en dos etapas bien definidas. Al principio, el potencial declinó rápidamente hasta alcanzar un valor de -62.9 ± 1.7 mV (media $\pm$ E.E; 13 fibras) para posteriormente regresar a su potencial de reposo siguiendo un curso de tiempo exponencial. El cambio entre la fase rápida y la fase lenta de la repolarización ocurrió a los 1.74 ± 0.1 msec (media $\pm$ E.E; 13 fibras).

La fase lenta de la repolarización es conocida como el post-potencial negativo. Su forma puede describirse adecuadamente

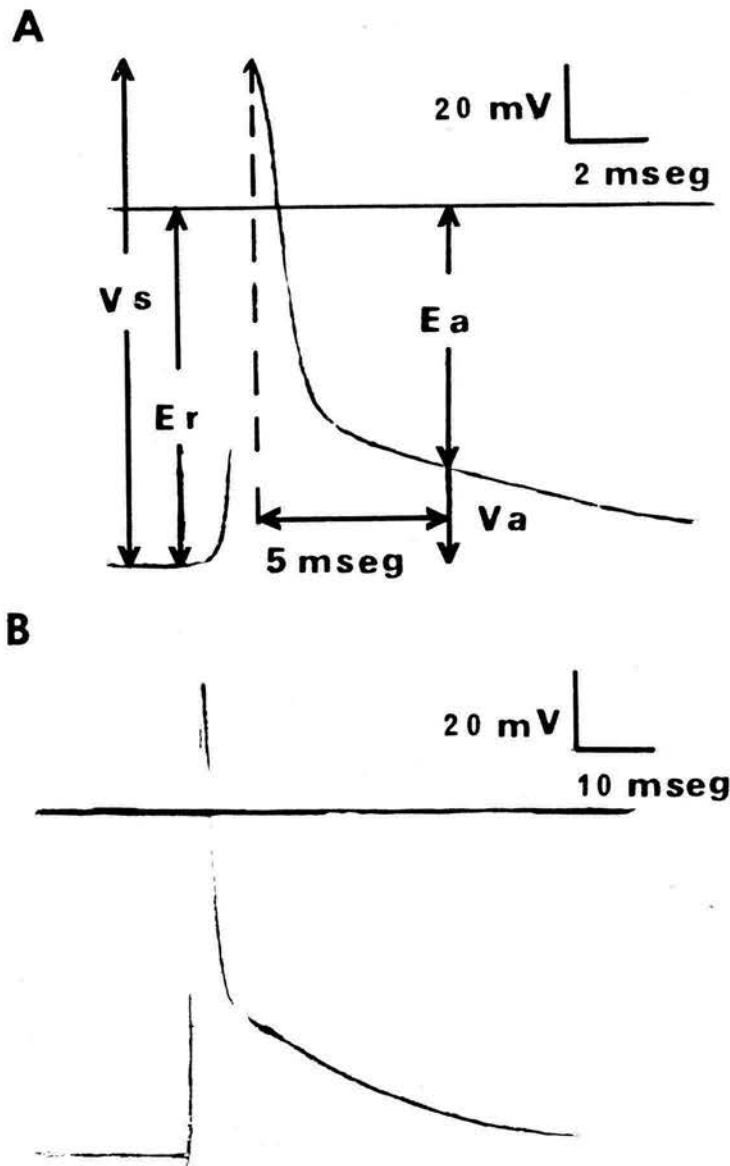


Figura 4. El efecto del TEA sobre el potencial de acción de Na-K. (A) Un potencial de acción típico registrado en la solución control (Ringer normal). (B) Un potencial de acción típico registrado en la solución de Ringer con 40 mM de TEA. (E_r) representa el potencial de reposo, (V_s) es la amplitud máxima de la espiga, (E_a) y (V_a) representan la amplitud del post-potencial negativo medidas a los 5 msec del pico del potencial de acción y (T_a) es la constante de tiempo del decaimiento de V_a . Note que las escalas de tiempo son diferentes.

mediante su amplitud (E_a) y por la constante de tiempo (T_a) con que se repolariza. Ambos parámetros pueden medirse fácilmente y probablemente son susceptibles de modificación por procedimientos experimentales. La amplitud del post-potencial negativo fue medida, como se indica en la figura 4A, a los 5 mseg. después del pico del potencial de acción. T_a representa la constante de tiempo del decaimiento de V_a .

Existe considerable evidencia de que la fase rápida de la repolarización del potencial de acción es producida por una rápida salida de iones potasio a través de los canales de la rectificación tardía (Adrian, Chandler y Hodgkin, 1970 a,b). Esta corriente de potasio permite que los potenciales de acción sean muy breves lo que conduce a una rápida recuperación de la célula (Hille, 1984). La corriente entrante de cloruro también participa en la repolarización de la membrana después de la actividad, aunque sólo en una pequeña parte (Hutter y Noble, 1960), por lo que esta corriente suele ser enmascarada por la gran salida de iones potasio. Afortunadamente es posible reducir la contribución del K^+ y de esta manera hacer más evidente la participación del cloruro, así como poder evaluar los efectos de otros aniones liotrópicos sobre las propiedades eléctricas activas de la fibra muscular.

Siguiendo esta idea se realizaron una serie de experimentos control, utilizando TEA como bloqueador de la rectificación tardía. En la figura 4B se muestra un potencial de acción típico registrado en la solución de Cl^- con 40 mM de TEA. Es evidente que el ion tetraetilamonio incrementó el tiempo de la fase de caída del potencial de acción. En la tabla III se comparan los

Tabla III

Valores promedio de los parametros obtenidos en los potenciales de accion registrados en presencia y en ausencia de 40 mM de TEA.

Parametro	Ringer Normal (13)	Ringer TEA (15)
Er (mV)	- 86.0 ± 1.9	- 88.0 ± 1.3
Vs (mV)	114.4 ± 3.4	121.6 ± 2.1
Ea (mV)	- 69.6 ± 2.3 (8)	- 50.5 ± 0.7
Ta (mseg)	3.31 ± 0.6 (5)	12.7 ± 0.4

La solucion de ringer TEA fue preparada remplazando 40 mM de Na⁺ por el ion tetraetilamonio. Los valores estan representados como la media ± error estandar. El numero de fibras promediadas se muestra entre parentesis.

Tabla IV

Resultados de las pruebas estadísticas empleadas para determinar diferencias en las medias y varianzas de los parametros de los potenciales de acción de Na-K registrados en presencia y en ausencia de TEA.

Parametro	Prueba de F	Prueba de t
Er	$P > 0.05$	$P > 0.05$
Vs	$P > 0.05$	$P > 0.05$
Ea	$P > 0.05$	$P < 0.05$
Ta	$P > 0.05$	$P < 0.05$

distintos parametros de los potenciales de acción registrados en presencia y en ausencia de TEA. El bloqueo de la rectificación tardía originó una potenciación del post-potencial negativo tanto en su amplitud como en su duración. En presencia de TEA la amplitud se incrementó aproximadamente en 20 mV mientras que la constante de tiempo aumentó aproximadamente 9 mseg.

Como se mencionó previamente en la sección de metodología las fibras musculares fueron seleccionadas en base a su apariencia y por poseer potenciales de reposo mayores de 80 mV. Esta medida fue adoptada como criterio de que las fibras se encontraban sanas y de que los efectos observados no eran el resultado de la muerte celular. De tal manera que el valor de E_r obtenido en cada solución experimental, sólo se muestra en la tabla III, como un índice del buen estado de las fibras sin considerar los efectos a nivel del potencial de reposo.

Para determinar si las diferencias observadas, en la amplitud y en la constante de tiempo del decaimiento del post-potencial negativo, fueron el resultado de la reducción de la corriente de potasio o si únicamente son el reflejo de la variabilidad de los registros, se utilizó la prueba estadística para la homogeneidad de varianzas o prueba de F (Zar, 1974). Este análisis mostró que los registros obtenidos están sujetos a la misma variabilidad (ver tabla IV). Es decir, que la variabilidad de los registros es igual en presencia y ausencia de TEA para todos los parámetros analizados.

La prueba estadística t de student fue empleada para determinar si existen diferencias entre los valores promedio de

los parámetros obtenidos de los potenciales de acción registrados en ambas soluciones. Los resultados de estos análisis se muestran en la tabla IV. La solución experimental de TEA únicamente afectó a los parámetros que definen la repolarización (E_a y T_a), sus medias fueron diferentes a un nivel de significancia de 5%. Este hecho apoya claramente la idea de que el ion tetraetilamonio reduce la contribución de las corrientes de potasio durante la repolarización del potencial de acción. Washio y Mashima (1963) y Stanfield (1973) han reportado resultados similares.

B.- Reemplazo del cloruro por aniones monovalentes.

El cloruro es con mucho el anión más abundante en la mayoría de las células animales. En las fibras musculares de la rana está distribuido casi en el equilibrio de tal forma que su potencial de equilibrio (E_{Cl}) está muy cercano al potencial de reposo. Es de esperarse entonces que los canales de cloro, al igual que los canales de potasio, deban oponerse a la excitabilidad normal y ayuden a repolarizar una célula despolarizada.

Durante la fase de repolarización del potencial de acción, además de la salida de K^+ , a través de los canales de la rectificación tardía, la entrada de iones Cl^- a la fibra muscular debe contribuir al restablecimiento del potencial de reposo. En 1960, Hutter y Noble sugirieron que durante la repolarización, del 10 al 15% de la corriente que fluye a través de la membrana puede ser atribuida al cloruro. Debido a esta contribución, un cambio en la concentración extracelular del Cl^- debería alterar

la forma del potencial de acción especialmente durante la fase de repolarización. Estos efectos parecen ser más pronunciados si el cloruro es reemplazado totalmente por un anión al cual la membrana es menos permeable. Se realizaron una serie de experimentos substituyendo el 100% del cloruro extracelular por nitrato y reduciendo la contribución del potasio con 40 mM de TEA. En la figura 5A se muestra un registro de tales experimentos. En presencia de NO_3^- efectivamente se hace más lenta la fase de repolarización. En todos los registros obtenidos no se observó una distinción clara entre la fase rápida y la fase lenta de la repolarización, sino mas bien hubo una transición gradual de una fase a la siguiente. El nitrato parece potenciar el post-potencial negativo tanto en su amplitud como en su duración. Bajo estas condiciones experimentales el valor de E_a (medido también a los 5 mseg.) fue de -26.4 ± 1.0 mV (media $\pm$ E. E.) y T_a fue de 17.4 ± 1.5 mseg. (media $\pm$ E.E.).

Estos efectos fueron aún mayores en presencia de yoduro. Cuando el cloruro extracelular fué substituido completamente por I^- , un anión menos permeante que el nitrato, la membrana se repolarizó más lentamente después del pico del potencial de acción. En presencia de yoduro la repolarización de la membrana se realizó en tres etapas distintas (Fig 5B). En la primera etapa, inmediatamente después del pico del potencial de acción la membrana se repolarizo lentamente hasta un valor de -43.1 ± 2.0 mV (media $\pm$ E.E.; 11 fibras). Esta primera repolarización fué seguida de una pequeña joroba cuyo pico generalmente ocurrio a los 11.6 ± 0.7 mseg. (media $\pm$ E.E.; 11 fibras) del pico del

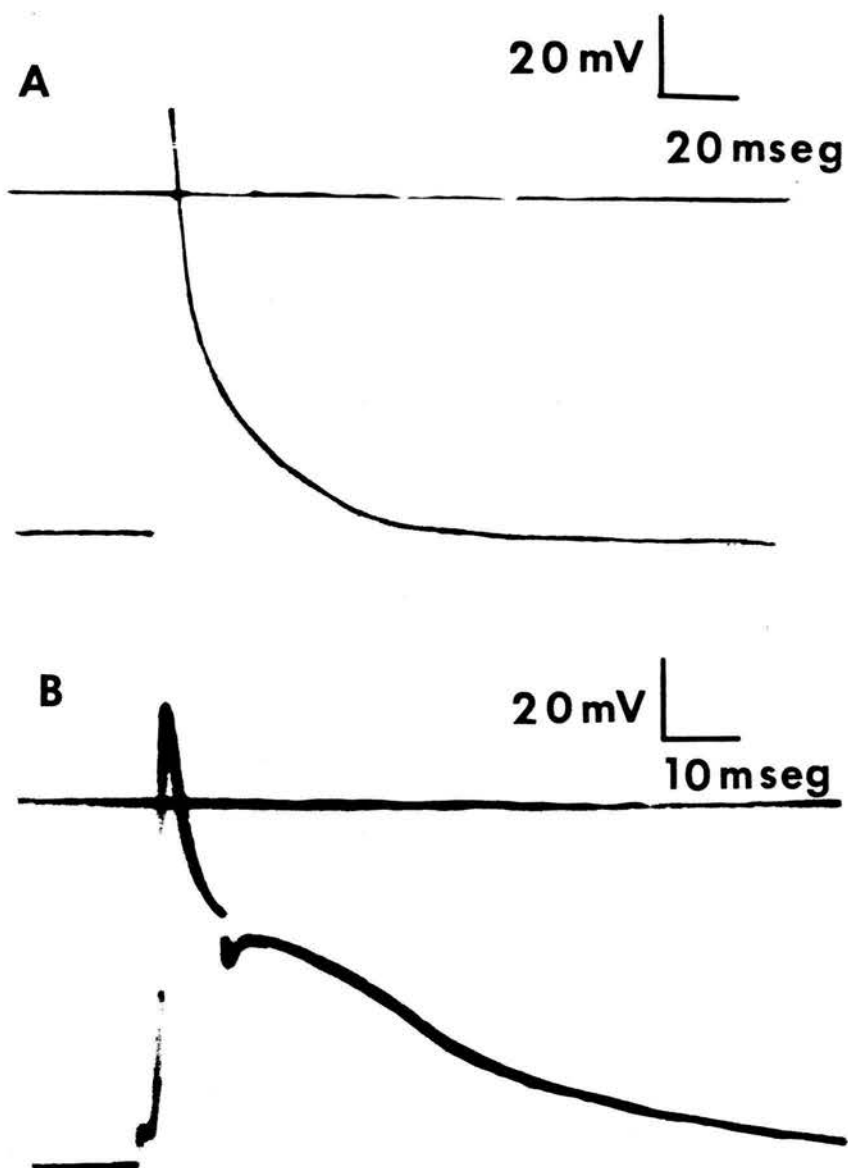


Figura 5. El efecto del nitrato y del ioduro sobre el potencial de acción de Na-K. (A) Un potencial de acción típico registrado en la solución de NO_3^- . (B) Un potencial de acción típico registrado en la solución de I^- . Note que son diferentes las escalas de tiempo.

potencial de acción. La amplitud máxima de la segunda despolarización, medida como la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo al inicio de esta joroba, fue de 7.7 ± 1.3 mV (media $\pm$ E.E.; 11 fibras). Finalmente en la tercera etapa el potencial de la membrana regresó a su valor de reposo siguiendo un curso de tiempo exponencial. La constante de tiempo de esta última fase fue de 26.0 ± 2.3 msec (media $\pm$ E.E.) y el valor de E_a fue de -23.5 ± 1.8 mV (media $\pm$ E.E.).

En la tabla V se comparan los diferentes parámetros obtenidos de los potenciales de acción registrados en las soluciones de Cl^- , I^- y NO_3^- . Estos resultados indican que el reemplazo del cloruro por cualesquiera de los otros dos aniones modifica significativamente la forma del potencial de Na-K. Es evidente que el efecto aniónico fue mayor sobre la fase de repolarización. Tanto el NO_3^- como el I^- incrementaron la amplitud y la duración del post-potencial negativo. Este efecto fue observado como una disminución de E_a y como un incremento en T_a respectivamente.

La potenciación del post-potencial negativo fue mayor en yoduro que en nitrato. Las constantes de tiempo del post-potencial negativo relativas a la constante de tiempo en presencia de cloruro fueron:

$$\text{Cl}^- : \text{NO}_3^- : \text{I}^- = 1 : 1.4 : 2.0$$

Este hecho indica que el incremento en el tiempo en el que la membrana se repolariza sigue la serie liotropica, al menos para los aniones probados.

La presencia del nitrato o del yoduro en el medio

Tabla V

Valores promedio de los parametros obtenidos de los potenciales de accion registrados en las soluciones hipertonicas de Cl^- , I^- y NO_3^- con 40 mM de TEA.

Anion	Er (mV)	Vs (mV)	Ea (mV)	Ta (mseg)	*Factor de incremento de Ta
(15) Cl^-	-88.0 ± 1.3	121.6 ± 2.1	-50.5 ± 0.7	12.7 ± 0.4	1.0
(12) NO_3^-	-90.0 ± 1.6	108.2 ± 2.2	-26.4 ± 1.0	17.4 ± 1.5	1.4
(11) I^-	-84.5 ± 1.5	105.6 ± 2.3	-23.5 ± 1.8	26.0 ± 2.3	2.0

* El factor de incremento de Ta en los diferentes aniones fue calculado como $\text{Ta}_x/\text{Ta}_{\text{Cl}}$ donde x= Cl, NO_3 o I. Los valores estan representados como la media $\pm$ error estandar. El numero de fibras promediadas se muestra entre parentesis.

Tabla VI

Resultados de las pruebas estadísticas empleadas para determinar las diferencias en varianzas, medias y contrastes de los parametros de los potenciales de acción de Na-K registrados en las soluciones de Cl^- , I^- y NO_3^- .

Parametro	Prueba Q de Bartlett	Analisis de Varianza	Prueba de Krustal-Wallis	Contrastes *
Er	$P > 0.05$	$P > 0.05$	-----	-----
Vs	$P > 0.05$	$P < .0005$	-----	$\text{Cl} \neq \text{NO}_3$ $\text{Cl} \neq \text{I}$ $\text{NO}_3 = \text{I}$
Ea	$P < 0.05$	-----	$P < 0.05$	$\text{Cl} \neq \text{NO}_3$ $\text{Cl} \neq \text{I}$ $\text{NO}_3 = \text{I}$
Ta	$P < 0.05$	-----	$P < 0.05$	$\text{Cl} \neq \text{NO}_3$ $\text{Cl} \neq \text{I}$ $\text{NO}_3 \neq \text{I}$

* Los contrastes se realizaron por la prueba de Student-Newman-Keuls para los grupos de varianzas homogéneas a un nivel de significancia del 5% y para los grupos donde las varianzas fueron desiguales, el estadístico utilizado fue la prueba de Mann-Whitney a un nivel de significancia de 0.1%

extracelular també provocà una disminució de la altura màxima del potencial de acció. En el nodo de Ranvier, se ha suggerido que la disminució de la altura del potencial de acció por los aniones liotrópicos, es originada por el incremento en la inactivación de los canales de sodio (Hashimura y Osa, 1963). Si este es el caso para el músculo esquelético, esta dependencia del voltaje de los canales de sodio también debería ser modificada al substituir el Cl^- por otros aniones liotrópicos. Graficando la amplitud del potencial de acció en funció del potencial de reposo en cada solució experimental puede evaluarse indirectamente la inactivación con el voltaje de los canales de sodio de la fibra muscular. En la figura 6 se muestra una relación de este tipo, tanto en la solució de nitrato como en la solució de cloruro. Es evidente que en la solució de nitrato las variaciones en la amplitud de la espiga de Na-K son más susceptibles a los cambios en el potencial de reposo que en la solució de cloruro. El nitrato parece desplazar hacia potenciales más negativos la dependencia con el voltaje de los canales de sodio. Este resultado puede ser explicado si se considera que los aniones de la serie liotrópica, son capaces de desviar hacia potenciales más negativos la curva de inactivación de los canales de sodio (Dani, Sánchez y Hille, 1983). Es decir, que la proporción de canales de Na inactivados aumenta siguiendo la serie liotrópica cuando el cloruro es substituido por alguno de estos aniones. En presencia de NO_3^- existen más canales de Na inactivados que en presencia de Cl^- y debido a que el I^- está situado después del nitrato en la serie liotrópica, existirá aún

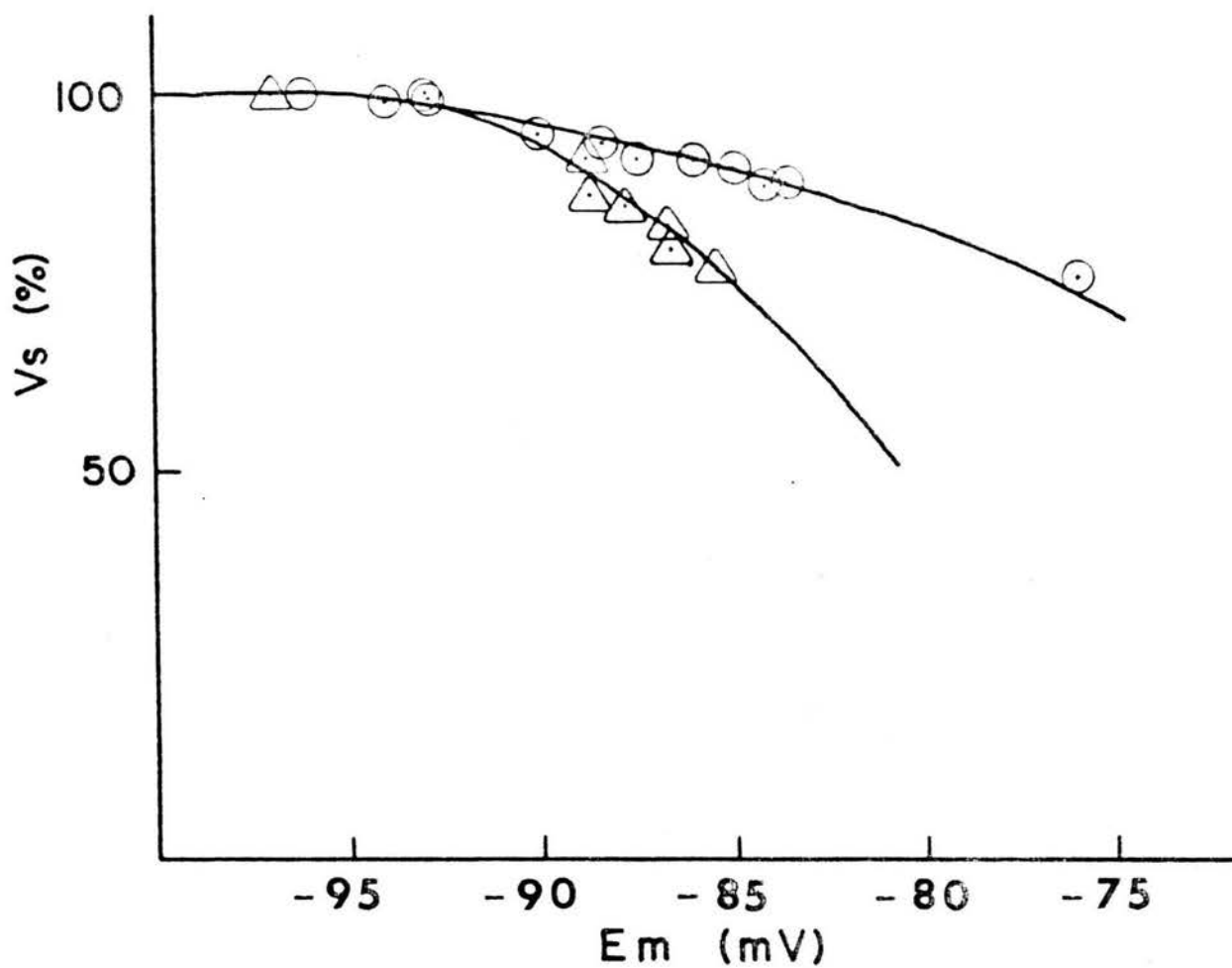


Figura 6. Relacion entre la amplitud del potencial de accion y el potencial de reposo en el ringer de Cl^- (○) y en el ringer de NO_3 (△). Ordenada : es la altura del potencial de accion normalizada. Abscisa : es el potencial de reposo en milivoltios.

un mayor número de canales de sodio inactivados que en presencia de NO_3^- . Bajo estas condiciones la corriente llevada por el Na^+ durante el potencial de acción será menor en I^- y mayor en Cl^- y en presencia de nitrato conservará una posición intermedia. La reducción de la corriente de sodio en función del anión del baño resultará entonces como una disminución de la altura del potencial de acción.

En la tabla VI se resumen los resultados obtenidos del análisis estadístico realizado. Para el análisis de la variabilidad de los distintos parámetros, se utilizó la prueba estadística Q de Bartlett (Zar, 1974). A continuación cada parámetro fue comparado entre si en las diferentes soluciones experimentales. Se empleo la prueba estadística del análisis de varianza para aquellos grupos donde las varianzas fueron homogéneas y la prueba no paramétrica de Kuskal-Wallis para los parámetros donde las varianzas no fueron iguales. Finalmente para determinar entre cuales aniones las diferencias fueron significativas se realizó la prueba de contrastes múltiples Student-Newman-Keuls para los grupos de varianzas homogéneas y la prueba de Mann-Whitney para los parámetros de varianzas desiguales (Zar, 1974).

Estos análisis indicaron que la altura del potencial de acción y los parámetros que definen la repolarización, esto es E_a y T_a , si parecen depender del anión del baño. Entonces en la solución de cloruro la altura del potencial de acción fue significativamente mayor (al 5% de error) que en las soluciones de nitrato o de yoduro, mientras que en presencia de estos

últimos dos aniones, la amplitud y la constante de tiempo del decaimiento de post-potencial negativo fueron incrementadas significativamente (al .1% de error).

Los resultados de este trabajo confirman que los aniones tales como el ioduro y el nitrato producen un incremento en la duración del potencial de acción, siguiendo el orden $\text{Cl}^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^-$. Este efecto tal como fué descrito por Harris y Martin-Ferreira (1955) y Lubin (1957) es el resultado de un aumento en la amplitud y en la duración del post-potencial negativo. También han sido observados efectos similares para otros aniones, tales como el Br^- (vease Horowics, 1964), SCN^- (Lubin, 1957), Tiosulfato, Monoiodometanosulfonato y acetato (Falk y Landa, 1960).

La disminución de la altura del potencial de acción observada en este trabajo, concuerda bien con las desviaciones de la curva de inactivación de los canales de sodio encontradas por Dani y colaboradores (1983). Este efecto también ha sido observado en los canales de sodio del nodo de Ranvier de las fibras nerviosas de Xenopus (Koppenhofer's, 1965).

2) Potenciales de acción de calcio.

A.- Registro de los potenciales de acción de calcio.

El empleo de una solución sin cloruro originó un incremento en la duración del potencial de acción cuando fueron bloqueados los canales de potasio. Bajo estas mismas condiciones el reemplazo del Cl^- por el ion sulfato produjo efectos aún mayores sobre el potencial de Na-K que la simple substitución por aniones

permeantes. En la figura 7 se muestra un registro típico obtenido en ringer de sulfatos con 40 mM de TEA. El trazo superior representa el nivel de referencia (cero mV) y el trazo inferior es el potencial en la punta del microelectrodo intracelular. El trazo intermedio corresponde a la primera derivada del voltaje con respecto al tiempo (dV/dt). El registro fuè tomado a una base de tiempo màs lenta por lo que el potencial de acciòn de Na-K aparece comprimido como una lînea vertical en el extremo izquierdo de la figura. Debido a que la membrana es impermeable al SO_4^{2-} despuès del potencial de acciòn, la fibra muscular no es capaz de regresar a su potencial de reposo. En su lugar, el potencial de membrana se mantiene despolarizado por varios segundos y entonces se origina una segunda espiga. Esta segunda despolarizaciòn ha sido descrita previamente (Beaty y Stefani, 1976) y es conocida como el potencial de acciòn de calcio ya que es generada por una pequeña entrada de este catiòn a la fibra muscular.

Los registros obtenidos de 79 fibras musculares sumergidas en la soluciòn de sulfatos, mostraron un valor promedio de $+14.4 \pm 0.7$ mV (media $\pm$ error estandar) para la inversiòn del potencial de calcio en tanto que el intervalo de tiempo entre el pico del potencial de acciòn de Na-K y el pico de la espiga de Ca^{2+} fuè de 1.2 ± 0.06 seg. (media $\pm$ error estandar). Beaty y Stefani (1976) notaron que este intervalo de tiempo varia de un musculo a otro y encontraron un valor promedio de 3.8 ± 0.5 seg. (media $\pm$ error estandar). La discrepancia entre estos dos valores puede ser explicada por el hecho de que ellos realizaron sus

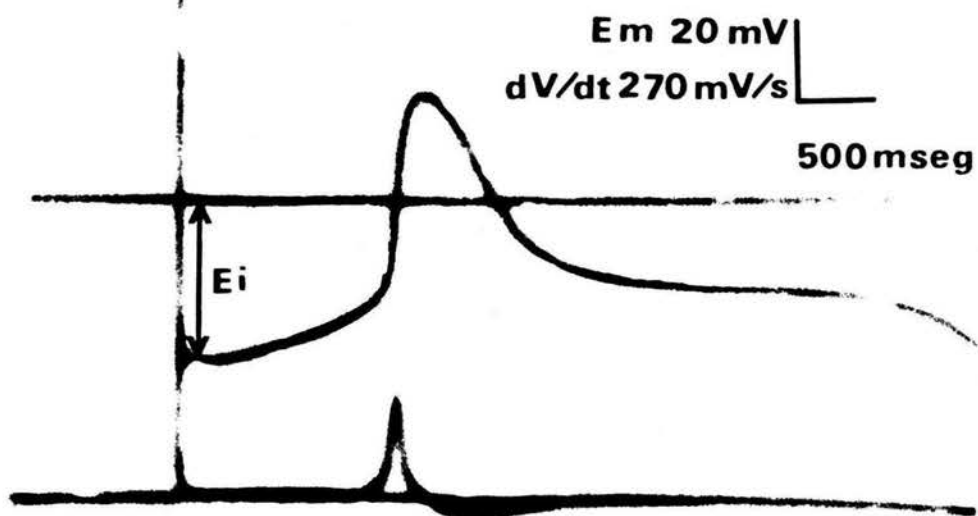


Figura 7. Un potencial de acción de calcio típico registrado en ringer de sulfatos. El trazo superior es el nivel de referencia (0 mV), mientras que el trazo inferior es el potencial en la punta del microelectrodo intracelular. El trazo intermedio es la primera derivada del voltaje con respecto al tiempo. "Ei" representa el voltaje al inicio de la meseta.

experimentos a temperaturas de 4 y 8 °C, mientras que los registros realizados en este trabajo fueron obtenidos a temperatura ambiente (20 - 22°C). Este incremento en la temperatura puede acelerar el potencial de Ca^{2+} ya que la fase de activación posee un Q_{10} de 3 (Cota, et al, 1983).

La variabilidad en el tiempo de ocurrencia de la espiga de Ca^{2+} parece estar determinada por el voltaje que adquiere la fibra muscular después del potencial de acción de Na-K. En la figura 8 se muestran los registros superpuestos obtenidos en la misma fibra muscular en respuesta al mismo estímulo aplicado en diferentes ocasiones. Cuando el voltaje al inicio de la meseta es más negativo, la espiga de Ca^{2+} aparece a tiempos mayores. Por el contrario cuando este voltaje se sitúa cerca de los cero milivoltios, el pico de calcio ocurre a tiempos más cortos. Esta dependencia al voltaje de la espiga de calcio está estrechamente relacionada con la cinética del canal de calcio, ya que estos canales también dependen del voltaje para su activación (Sánchez y Stefani, 1978). El canal de calcio comienza a conducir a los -40 mV alcanzando el valor máximo de la corriente aproximadamente a los cero milivoltios, por lo que cuanto más despolarizada quede la membrana después de un potencial de acción de Na-K, le tomará menos tiempo para generar la corriente máxima de Ca^{2+} lo que se traducirá también en un tiempo más corto para alcanzar el pico del potencial de acción de calcio.

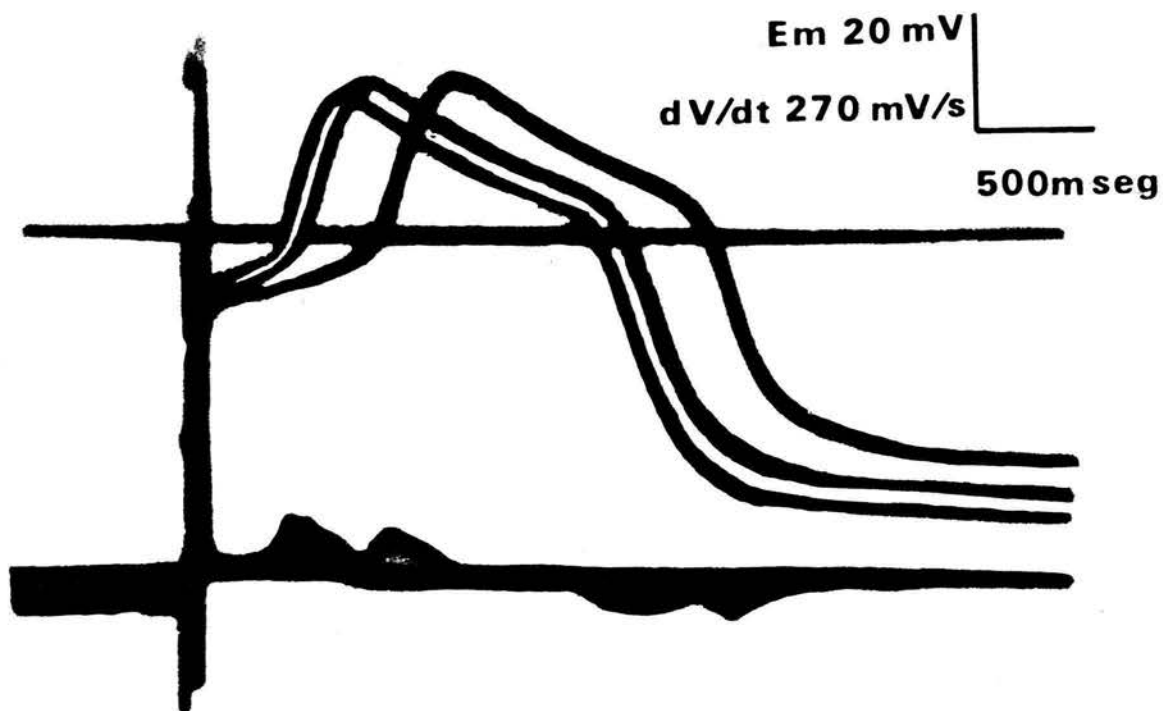


Figura 8. La relación entre el valor del voltaje al inicio de la meseta (E_i) y la ocurrencia de la espiga de calcio. Se muestra la sobre posición de tres potenciales de acción de calcio, obtenidos de la misma fibra muscular sumergida en la solución de sulfato. La ocurrencia de la espiga de calcio parece depender del voltaje al inicio de la meseta. Cuando el voltaje al inicio de la meseta fue más negativo la espiga de calcio apareció en un mayor tiempo. A medida que E_i se acercó a los cero milivoltios el pico de calcio ocurrió en tiempos más cortos.

B.- Efecto del metanosulfonato sobre el potencial de acción de calcio.

Los efectos producidos por los aniones liotrópicos sobre el potencial de acción de Na-K, descritos anteriormente, sugieren la posibilidad de que los canales de calcio también sean afectados por la especie aniónica presente en el medio extracelular. Debido a que la actividad de estos canales se evaluó indirectamente con la técnica del registro del voltaje intracelular, fue necesario utilizar otro anión impermeante distinto del sulfato para asegurar la generación del potencial de acción de calcio. Por esta razón fue empleado el ion metanosulfonato, que si bien no pertenece a la serie liotrópica de aniones, ha sido ampliamente utilizado como anión impermeante en la fibra muscular del anfibio (Hutter y Noble, 1960; Sánchez y Stefani, 1983; Almers y col, 1981).

Se realizaron una serie de experimentos para registrar el potencial de acción de calcio tanto en la solución de metanosulfonato como en la solución de sulfatos. En la figura 9 se muestra un registro típico obtenido en cada una de las soluciones experimentales. La fig. 9a corresponde al registro de la espiga de Ca^{2+} en sulfato, mientras que la figura 9b fue obtenida en la solución de CH_3SO_4^- . Es evidente que en presencia de metanosulfonato hay una disminución tanto de la altura de la espiga de calcio, como en su tiempo de ocurrencia. En la tabla VII se resumen los resultados obtenidos de los parámetros de los potenciales de acción de calcio registrados en presencia de $\text{SO}_4^{=}$ y

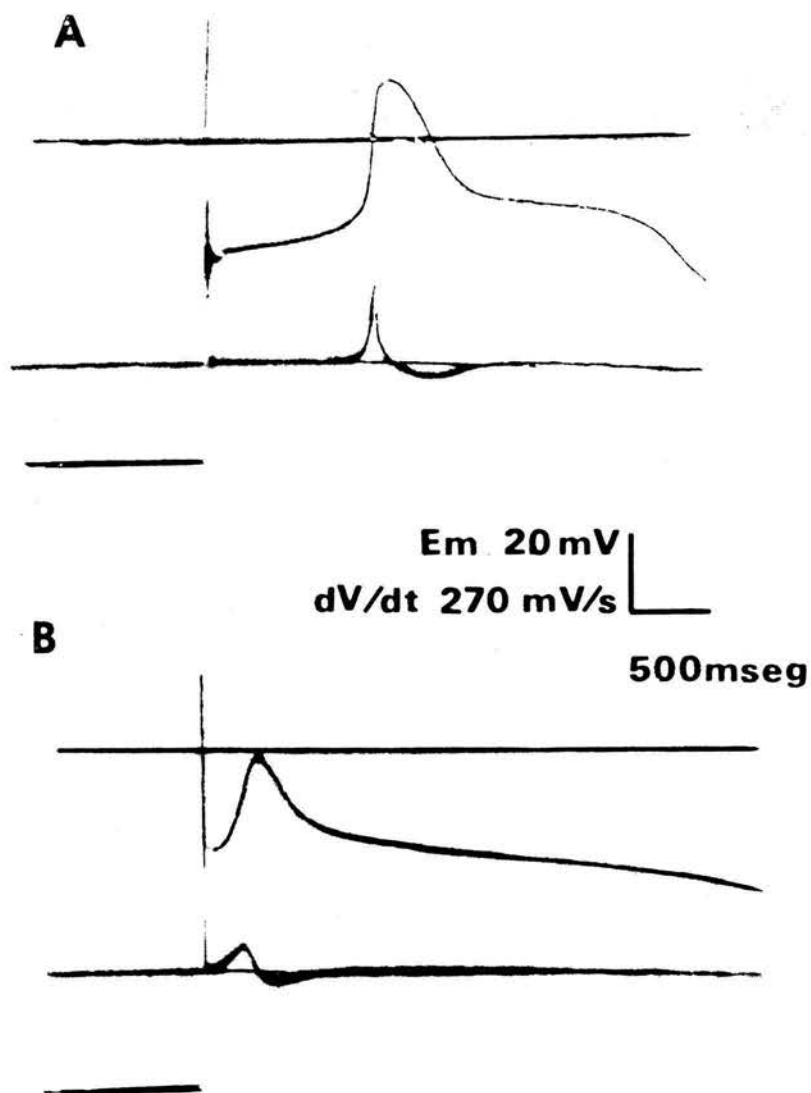


Figura 9. El efecto del metanosulfonato sobre el potencial de acción de calcio. A: Un potencial de acción de calcio registrado en la solución de sulfatos. B: Un potencial de acción de calcio registrado en la solución de metanosulfonato.

de CH_3SO_4^- . En presencia de sulfato el pico promedio de la espiga de calcio siempre llego a valores positivos, en tanto que en metanosulfonato el pico promedio se situo por debajo de los cero milivoltios. Esta disminuciòn de la altura de la espiga de calcio concuerda con la reducciòn de la dV/dt màxima durante el potencial de acciòn de calcio.

El acortamiento en el tiempo de la ocurrencia de la espiga de calcio en presencia de metanosulfonato, parece estar de acuerdo tambièn con el valor del voltaje al inicio de la meseta, ya que en esta soluciòn E_i fue menos negativa que en la soluciòn de sulfato, por lo que la espiga de calcio aparecio aproximadamente 0.6 seg antes que en el ringer de sulfatos.

En la tabla VIII se resumen los resultados obtenidos de las distintas pruebas estadìsticas empleadas. Para el anàlisis de la variabilidad de los distintos paràmetros se utilizò la prueba estadìstica para la homogeneidad de varianzas o prueba de F (Zar, 1974). La prueba estadìstica de t de student se aplicò para determinar diferencias en las medias de los grupos donde las varianzas fueron iguales. Mientras que para grupos con diferente variabilidad se utilizò la prueba de t' , que incluye una modificaciòn de la estimaciòn mancomunada de la varianza y los grados de libertad (Zar, 1974).

Estos anàlisis estadìsticos indicaron que en presencia de metanosulfonato, todos los paràmetros utilizados fueron significativamente disminuidos (ver tabla VIII).

Estas observaciones sugieren fuertemente que la actividad de los canales lentos de calcio de la fibra muscular esquelètica de la rana dependen de la naturaleza del medio ambiente aniònico.

Tabla VII

Valores promedio de los parametros obtenidos en los potenciales de accion de Calcio registrados en las soluciones hipertonicas de sulfato y de metanosulfonato.

Parametro	Sulfato	Metanosulfonato
	(79)	(32)
Ei Inicio de la meseta (mV)	$\begin{matrix} - 27.9 \\ \pm 0.7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} - 22.9 \\ \pm 1.1 \end{matrix}$
Pico de Calcio (mV)	$\begin{matrix} + 14.4 \\ \pm 0.7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} - 3.0 \\ \pm 1.4 \end{matrix}$
dV/dt max (mV/seg)	(76) $\begin{matrix} 152.3 \\ \pm 10.8 \end{matrix}$	(31) $\begin{matrix} 64.1 \\ \pm 5.2 \end{matrix}$
Tiempo al Pico de Calcio (mseg)	$\begin{matrix} 1191.4 \\ \pm 59.6 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 551.6 \\ \pm 27.6 \end{matrix}$

Todos los valores mostrados estan expresados como la media $\pm$ el error estandar. El numero de fibras promediadas se muestra entre parentesis.

Tabla VIII

Resultados de las pruebas estadísticas empleadas para determinar las diferencias en medias y varianzas de los parámetros de los potenciales de acción de Calcio, registrados en las soluciones de sulfato y de metanosulfonato.

Parametro	Prueba de F	Prueba de t	Prueba de t
Ei inicio de la meseta	$P > 0.05$	$P < 0.05$	-----
Pico de Calcio	$P > 0.05$	$P < 0.05$	-----
dV/dt max	$P < 0.05$	-----	$P < 0.05$
Tiempo al pico de Calcio	$P < 0.05$	-----	$P < 0.05$

3) El efecto del metanosulfonato y del nitrato sobre las corrientes de calcio.

A.- Características de la corriente de calcio.

Las corrientes de calcio fueron registradas en soluciones que contenían 2 mM de Ca^{2+} en forma ionizada y en presencia de iones orgánicos impermeantes tanto en el medio extracelular (TEA_2SO_4) como en el medio intracelular (TMA_2EGTA). Bajo estas condiciones la corriente a través de la membrana es principalmente de calcio (Almers y Palade, 1981).

En la figura 10 se muestran las corrientes de calcio registradas de una fibra muscular bañada en la solución de sulfato (ver tabla II). Las corrientes fueron generadas al aplicar pulsos cuadrados de voltaje de 2 seg. de duración. Estos pulsos llevaron el potencial de la membrana, desde el potencial de mantenimiento ($E_h = -90$ mV), hasta diferentes valores de voltaje (indicados a la derecha de cada trazo). Cuando el voltaje de la membrana fue ordenado en -60 mV (trazo a) la corriente de calcio no se observó durante el pulso. Sin embargo, en -20 mV algunos canales de calcio comenzaron a conducir y apareció en el registro una pequeña corriente entrante (hacia abajo). A medida que el potencial de la membrana se acercó a los cero milivoltios, la corriente de calcio incremento hasta alcanzar un valor máximo (trazo e) y posteriormente comenzó a disminuir a potenciales más positivos (trazos f-h). La corriente máxima ocurrió cuando el voltaje de la membrana fue ordenado a $+10$ mV. Mientras que la corriente de calcio se incrementó con la

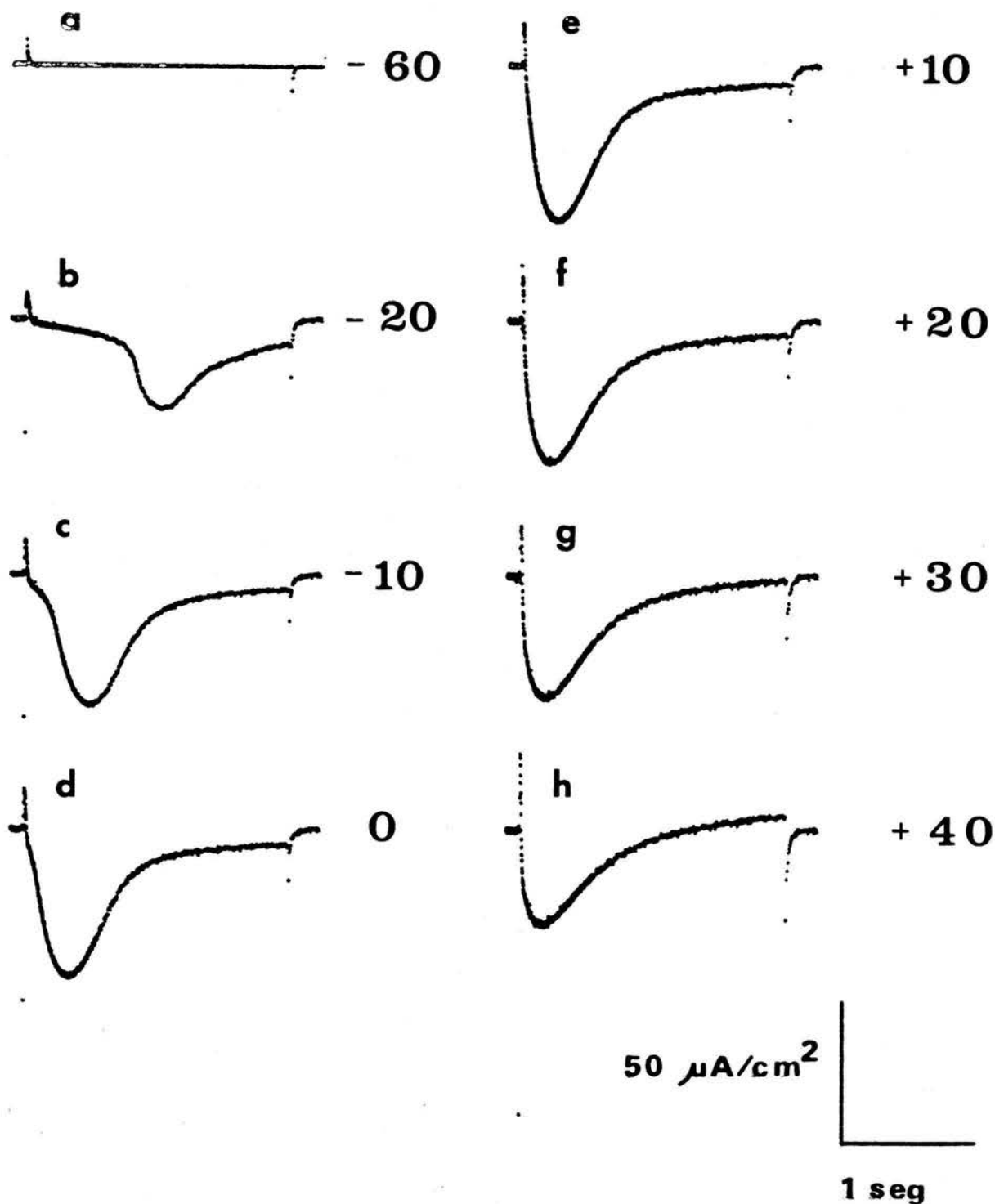


Figura 10. Corrientes de membrana registradas en la solución de sulfato de TEA. El potencial de mantenimiento fue ordenado en -90 mV. Los números a la derecha de cada trazo corresponden al potencial de la membrana durante pulsos de 2 seg. de duración. El diámetro de la fibra fue de 152.7 μm y el ancho de la zona de registro fue de 140 μm .

despolarización de la membrana, ocurrió una disminución del tiempo para alcanzar el pico máximo de la corriente. Esto significa que el voltaje de la membrana acelera la apertura de los canales de calcio. También es evidente que las corrientes de calcio disminuyen con el tiempo ya que no fueron mantenidas durante la despolarización, sino que declinaron lentamente antes de que terminara el pulso.

Estas características de las corrientes de calcio de la fibra muscular esquelética de la rana, concuerdan bien con las encontradas por otros autores (Sánchez y Stefani, 1978, 1983; Almers y Palade 1981; Almers, Fink y Palade, 1981).

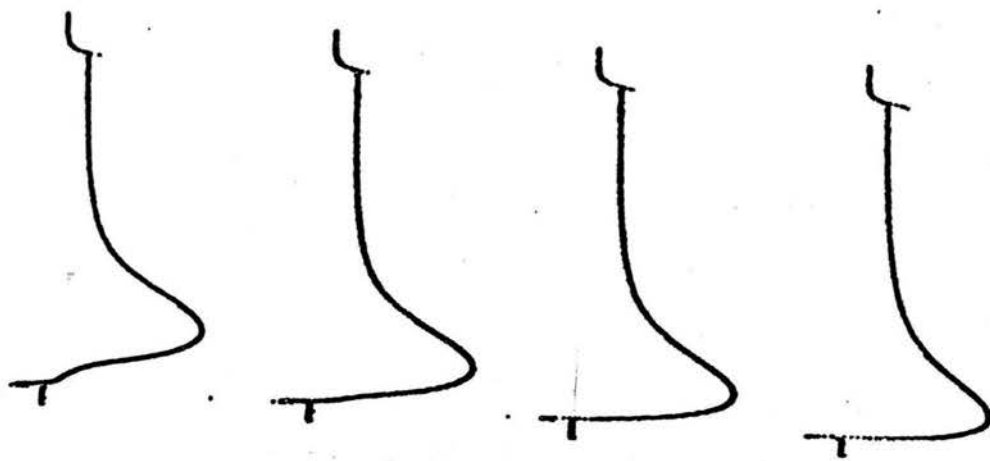
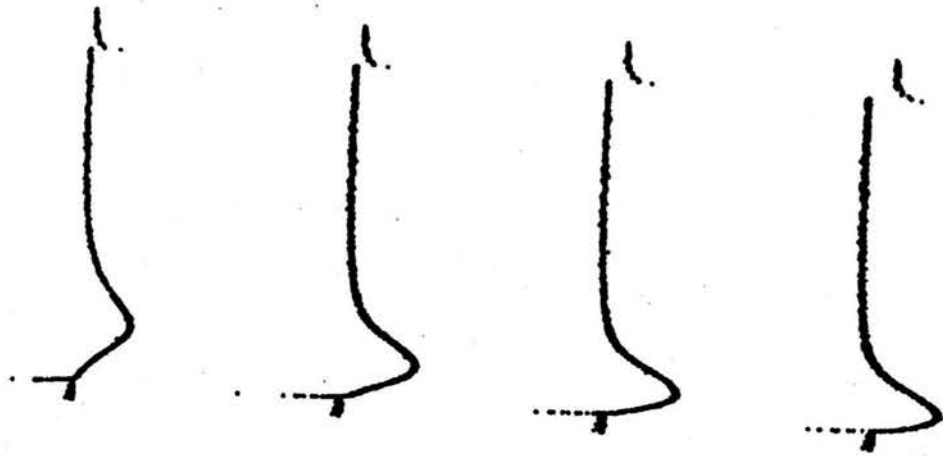
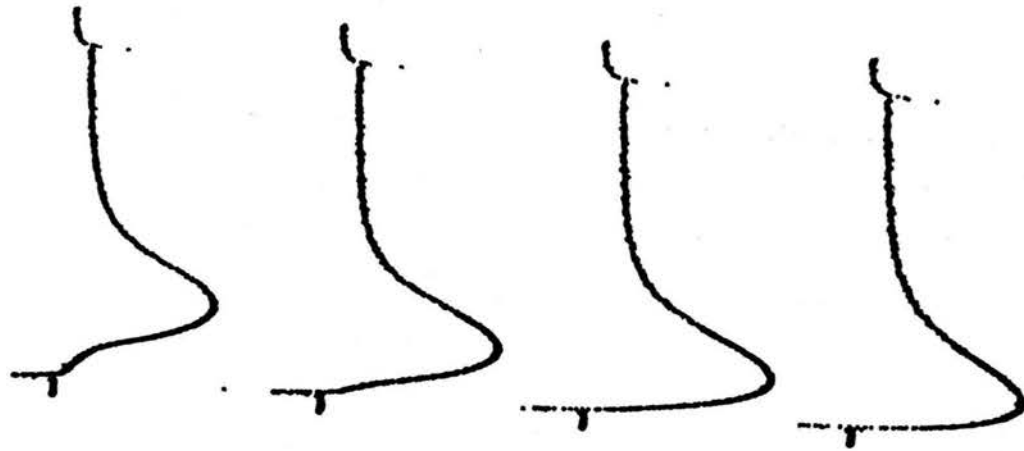
B.- Los efectos del metanosulfonato y del nitrato sobre las corrientes de calcio.

Además de la larga historia de que los aniones liotrópicos potencian la sacudida muscular (Kahn y Sandow, 1955) y la irritabilidad eléctrica y química del músculo esquelético (Hutter y Padsha, 1959; Hodgkin Horowicz, 1960) se ha demostrado que otras funciones de la membrana que dependen del voltaje también pueden ser modificadas. Por ejemplo, Kao y Stanfield (1968) han descrito que los aniones de la serie liotrópica disminuyen el umbral del canal de potasio de la rectificación tardía así como el umbral mecánico de la fibra muscular. También se ha encontrado que la activación y la inactivación del canal de sodio se altera cuando el cloruro normal es reemplazado por aniones tales como el Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , SCN^- , etc. (Dani, Sánchez y Hille, 1983). Los

SO_4^-

CH_3SO_4^-

SO_4^-



$50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$

Fig 11

Figura 11. El efecto del metanosulfonato sobre las corrientes entrantes de calcio. Las corrientes de calcio fueron registradas en la solución de sulfato antes y después de hacer los registros en la solución de metanosulfonato. Los números a la derecha de cada serie de trazos corresponden al potencial de la membrana durante pulsos de 2 segundos de duración. Los componentes lineales fueron restados digitalmente. $E_h = -90$ mV, diámetro de la fibra 152.7 μ m.

efectos del metanosulfonato sobre los potenciales de acción de calcio, descritos anteriormente, sugieren la posibilidad de que los aniones también puedan modificar la actividad de los canales de calcio.

Con esta idea fue empleada la técnica de fijación del voltaje con tres sellos de vaselina, para evaluar los efectos tanto del metanosulfonato como del nitrato sobre el comportamiento eléctrico de los canales lentos de calcio de la fibra muscular. En cada caso se realizó un experimento piloto registrando las corrientes de calcio en la solución control (solución de sulfatos) antes y después de hacer los registros en la solución experimental (sol. de metanosulfonato o de nitrato). En la figura 11 se muestran los resultados del experimento con metanosulfonato. Cuando el sulfato fue reemplazado por el CH_3SO_4^- la corriente de calcio disminuyó considerablemente. En presencia de sulfato la I_{Ca} máxima fue de -52.6 uA/cm^2 , mientras que en metanosulfonato la corriente máxima de calcio fue de -23.0 uA/cm^2 . Esto es, en la solución de metanosulfonato la corriente de calcio disminuyó aproximadamente un 56%. El efecto fue claramente reversible. Este resultado está de acuerdo con el hallazgo de que el CH_3SO_4^- reduce la corriente máxima de calcio durante el potencial de acción de calcio.

Cuando el sulfato fue reemplazado por nitrato en la solución del baño, se obtuvo un resultado similar. En la figura 12 se muestran los resultados de este experimento. Las corrientes de calcio también disminuyeron en presencia del nitrato pero en mayor porcentaje (65.3%). La I_{Ca} máxima fue de -42.9 uA/cm^2 en la solución de sulfato y -14.9 uA/cm^2 en la solución de nitrato. En

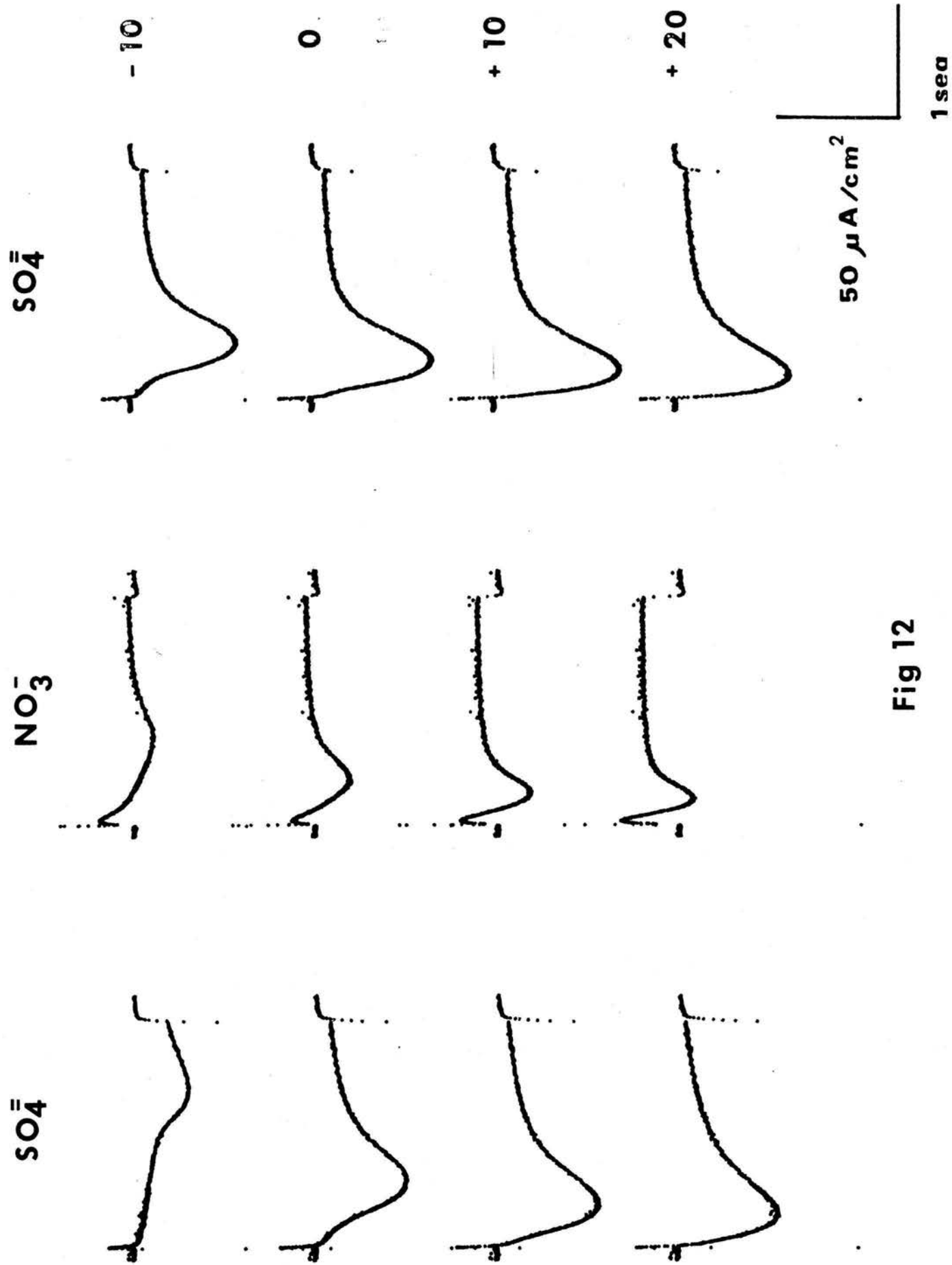


Fig 12

Figura 12. El efecto del nitrato sobre las corrientes entrantes de calcio. Las corrientes de calcio fueron registradas en la solución de sulfato antes y después de hacer los registros en la solución de nitrato. Los números a la derecha de cada serie de trazos corresponden al potencial de la membrana durante pulsos de 2 segundos de duración. Los componentes lineales fueron restados digitalmente. $E_h = -90$ mV; el diámetro de la fibra fue de 152.7 μm .

este caso el efecto tambien fue reversible.

Cuando la membrana muscular fue despolarizada en la solución de nitrato, aparecieron en el registro de la corriente tres componentes principales. Al principio, inmediatamente después del componente capacitivo, se origino una pequeña corriente saliente que fuè seguida por la conocida corriente de calcio. El componente final fuè una corriente saliente residual que permanecio hasta que terminó el pulso de voltaje. Estas corrientes salientes son muy similares a las corrientes anionicas registradas por Warner (1972). Aunque es probable que se deban a una entrada de nitrato a través de los canales de cloro, es necesario realizar más estudios antes de decidir el origen de estas corrientes.

Almers y Palade (1981) han señalado que la magnitud de la corriente máxima de calcio varía ampliamente de una fibra a otra. Ellos encontraron que la I_{Ca} máxima variò desde -28 a - 143 $\mu A/cm^2$, supuestamente porque la densidad de canales de calcio también varía entre fibra y fibra. La reducción de la corriente máxima al calcio encontrada en este trabajo, no puede ser explicada como un resultado de esta variabilidad, ya que los registros de las corrientes de calcio en las diferentes soluciones fueron obtenidos de la misma fibra muscular. Además la reversibilidad del efecto cuando se regreso al sulfato indica que la disminución de la corriente es debida a la presencia del metanosulfonato o del nitrato en el medio extracelular.

Se ha demostrado previamente, en segmentos de fibra muscular, que la declinación de la corriente de calcio en el tiempo depende fuertemente de la magnitud de la corriente que

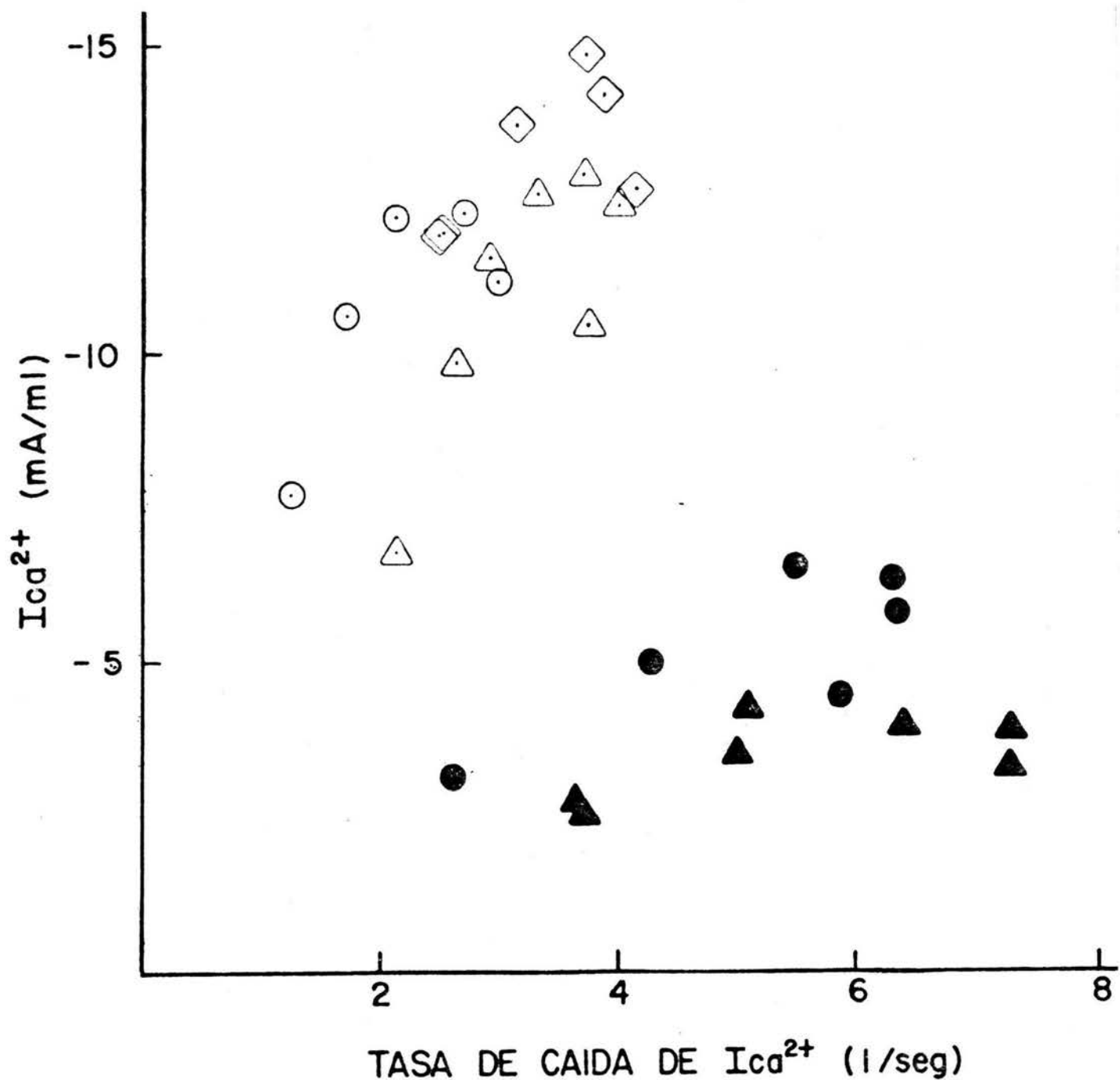


Figura 13. La relación entre la magnitud de la corriente de calcio y el recíproco de la constante de tiempo de la declinación. Los símbolos vacíos corresponden a las corrientes de calcio registradas en la solución de sulfato. Los símbolos llenos fueron obtenidos de las corrientes de calcio registradas en la solución de CH_3SO_4^- (●) y en la solución de NO_3^- (▲).

pasa a través de los canales de calcio (Almers, Fink y Palade, 1981). Cuando las corrientes son muy grandes, la tasa de declinación es mayor que cuando las corrientes son pequeñas. Sin embargo, de las figuras 11 y 12 puede apreciarse que aunque en la solución de sulfato las corrientes son más grandes, su declinación es más lenta que en las soluciones de metanosulfonato o de nitrato, donde las corrientes son más pequeñas. Estas diferencias parecen indicar que el sulfato podría estar actuando como un amortiguador de la concentración de calcio en los túbulos y de esta forma origine una menor deplesiòn de Ca^{++} que en presencia de los otros dos aniones. Si la cantidad de calcio disponible es mayor en la solución de sulfato, debería esperarse que la magnitud de las corrientes de calcio fuera también mayor que en las soluciones de metanosulfonato o de nitrato.

Para investigar este punto, se ajustaron (en una computadora IBM-AT) exponenciales simples a las porciones finales de la declinación de la corriente y el recíproco de las constantes de tiempo se graficò contra la magnitud de las corrientes de calcio, como se muestra en la figura 13. Puede observarse que a diferencia del comportamiento en la solución de sulfato, las corrientes de calcio declinaron más rápidamente en las soluciones de metanosulfonato y de nitrato. Entonces, bajo la hipótesis de deplesiòn (Almers, Fink y Palade, 1981) las corrientes de calcio en CH_3SO_4 y en NO_3 son más pequeñas que el sulfato, probablemente porque este último anión puede mantener sin muchas variaciones la concentración de calcio en los túbulos transversos.

Sin embargo, este argumento no concuerda con la disminución de la I_{Ca} máxima en metanosulfonato observada durante el registro

Fig 14

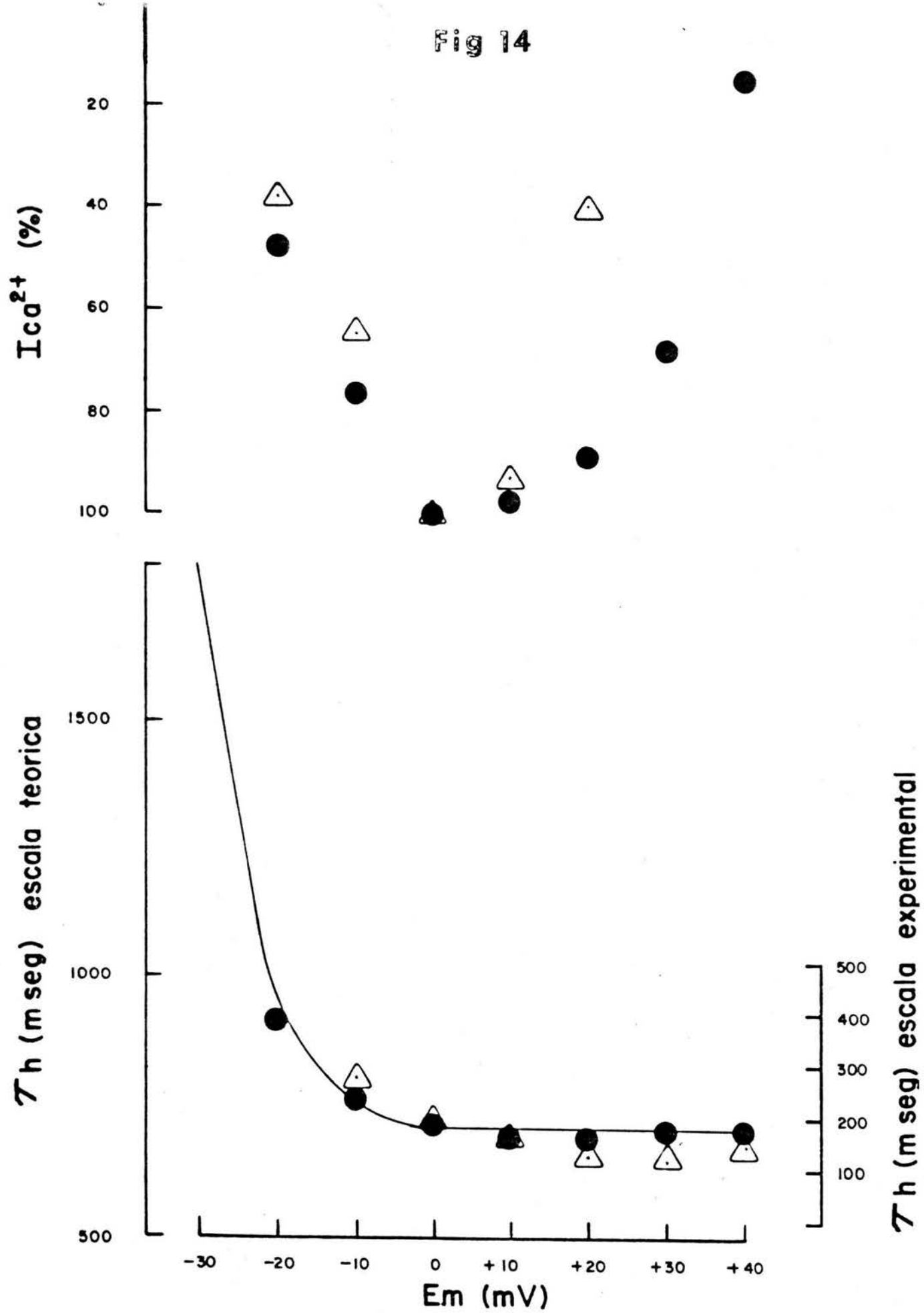


Figura 14. La relacion entre las corrientes de calcio (arriba) y la constante de tiempo de su declinacion (abajo) en funcion del voltaje de la membrana. Los circulos llenos corresponden a los valores obtenidos en la solucion de metanosulfonato mientras que los triangulos vacios fueron obtenidos de las corrientes de calcio registradas en la solucion de nitrato. La curva continua es el modelo de inactivacion para los canales de calcio y fue calculada de acuerdo a los parametros propuestos por Sanchez y Stefani (1983). En la parte inferior derecha se muestra la escala para las constantes de tiempo experimentales. La escala de la izquierda corresponde a los valores teoricos.

de los potenciales de acción de calcio en fibras musculares completas, donde se ha demostrado claramente que la declinación de la corriente en el tiempo es el resultado de un proceso de inactivación de los canales de calcio (Sánchez y Stefani, 1983 ; Avila-Sakar y col., 1986). Aún más de la figura 13, es evidente que aunque la tasa de declinación de la I_{Ca} varía ampliamente en las soluciones de metanosulfonato y de nitrato, la magnitud de las corrientes de calcio sólo se modifica en unos cuantos mA/ml, a diferencia de lo que ocurre en la solución de sulfato. Esto indica que la tasa de declinación de la corriente en presencia de CH_3SO_4 y de NO_3 depende menos directamente de la magnitud de la corriente misma.

En la figura 14 se muestra la relación entre la constante de tiempo del decaimiento de I_{Ca} en metanosulfonato (círculos llenos) y de nitrato (círculos vacíos) con el voltaje de la membrana. En esta figura también se ha incluido la curva I-V de las corrientes de calcio de estos dos aniones. Como puede observarse, cuando el voltaje de la membrana es negativo, la corriente de calcio es pequeña y la constante de tiempo es grande; esto es, la corriente declina lentamente para corrientes pequeñas. Conforme la corriente incrementa, la constante de tiempo disminuye, lo que indica que la declinación se hace más rápida. Después de los cero milivoltios, a potenciales positivos, la corriente disminuye nuevamente pero la constante de tiempo no se modifica apreciablemente. Esto indica que otro proceso distinto de la deplesiòn determina también la declinación de la corriente de calcio. La forma de la curva de la constante de tiempo con el voltaje se ajusta razonablemente bien a la del

Fig 15

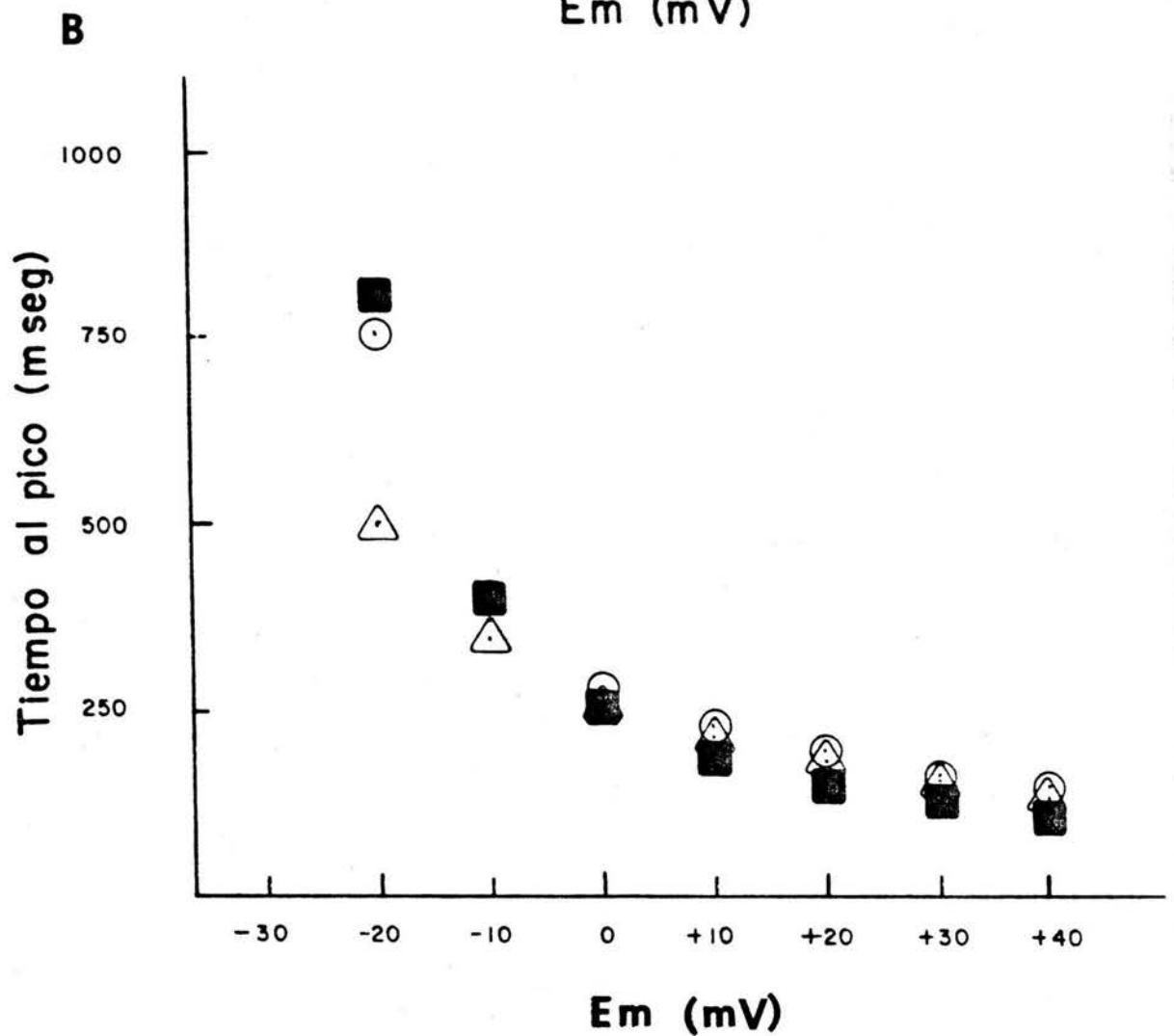
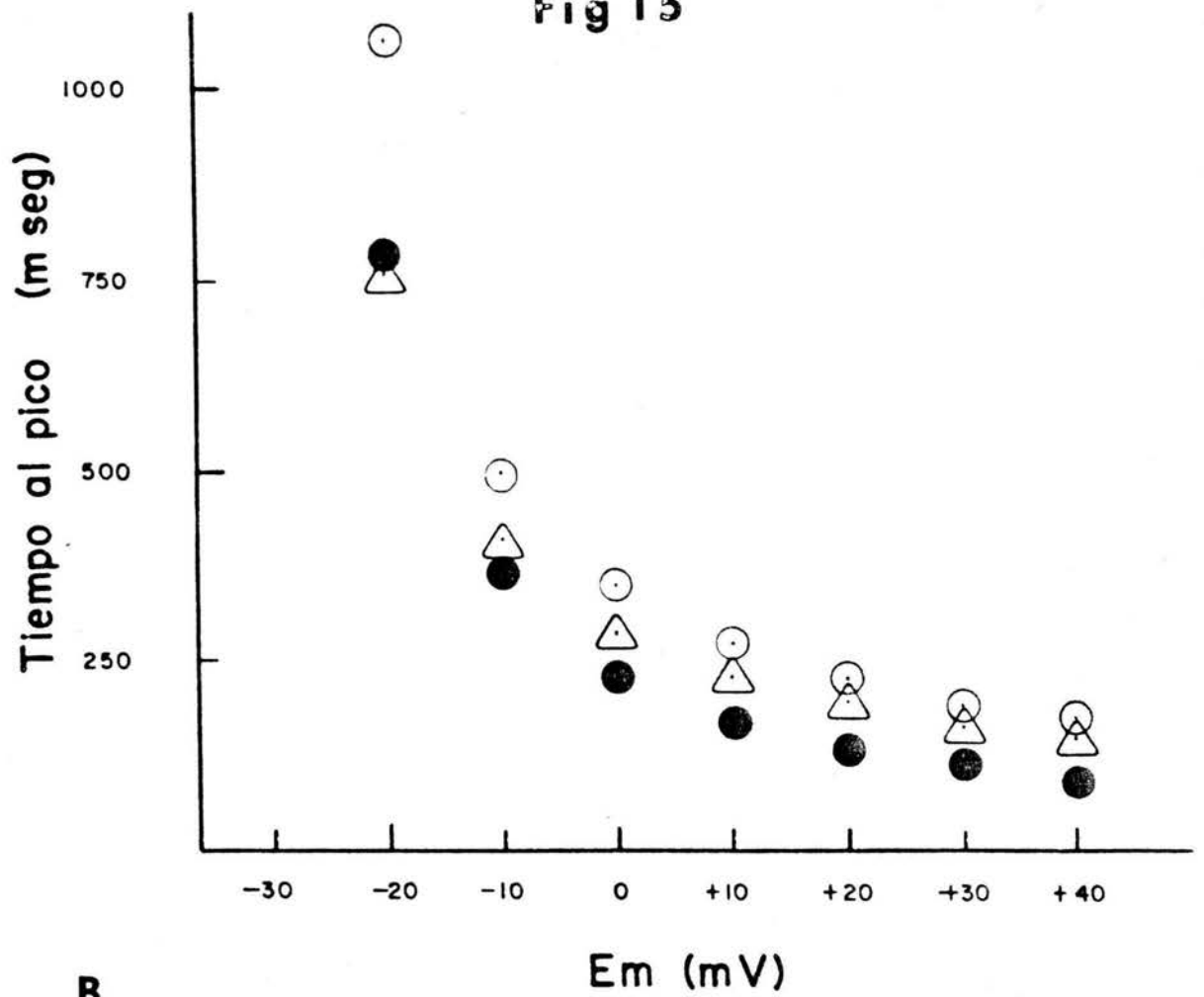


Figura 15. El tiempo al pico de la corriente de calcio como una funcion del voltaje de la membrana. En A se muestran los tiempos al pico de las corrientes de calcio registradas en presencia de metanosulfonato (●). En B se graficaron los tiempos al pico de las corrientes de calcio registradas en presencia de nitrato (■). En ambos casos los simbolos vacios corresponden a los tiempos al pico de la corriente de calcio registradas en la solucion de sulfato antes (○) y despues (△).

modelo de inactivación para los canales de calcio (línea continua) propuesto por Sánchez y Stefani (1983), aunque los valores experimentales se sitúan por debajo de los valores teóricos por un factor de 530 msec. (note la diferencia de escalas entre los valores teóricos y los valores experimentales).

Ya que la inactivación de los canales de calcio también parece estar relacionada con la declinación de la corriente, la deplesiòn de calcio en los túbulos transversos sólo puede explicar parcialmente la disminución de la I_{Ca} en presencia de metanosulfonato o de nitrato en el medio extracelular.

Esta reducción de la I_{Ca} máxima podría ser el resultado de un efecto directo del $CH_3SO_4^-$ y del NO_3^- sobre el canal de calcio. Para analizar esta posibilidad se graficaron los tiempos al pico de las corrientes de calcio con el voltaje de la membrana tanto para el caso del metanosulfonato (figura 15A) como para el del nitrato (figura 15B). En ambos casos no se observaron diferencias importantes en el tiempo de apertura de los canales de calcio en los tres aniones ensayados. Este resultado indica que el reemplazo del sulfato por metanosulfonato o por nitrato no parece afectar significativamente la cinética de apertura de los canales de calcio. No obstante, es necesario realizar un estudio cinético más completo para poder decidir si efectivamente alguna alteración de la maquinaria cinética del canal pudiera explicar los efectos observados sobre las corrientes de calcio en función del medio ambiente aniónico.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

A.- Potenciales de acción de Sodio-Potasio

Los experimentos descritos en este trabajo generaron principalmente dos resultados que pueden resumirse de la siguiente manera: Cuando los iones cloruro presentes normalmente en el fluido extracelular, fueron substituidos por los aniones liotrópicos, ioduro o nitrato, se produjeron dos cambios observables en el potencial de acción de sodio-potasio del músculo sartorio : (1) El post-potencial negativo fué incrementado en amplitud y duración y (2) La altura máxima de la espiga de sodio-potasio fué reducida apreciablemente. Ambos efectos fueron observados en el orden usual de la serie liotrópica : $\text{Cl} < \text{NO}_3 < \text{I}$.

La potenciación del post-potencial negativo por los aniones liotrópicos diferentes al cloruro ya ha sido observada previamente (Lubin, 1957) y la explicación de este incremento en la fase de repolarización del potencial de acción, parece estar relacionada con el aumento en la resistencia de la membrana. En efecto, se ha demostrado que la resistencia de la membrana incrementa siguiendo la serie liotrópica cuando el cloruro es reemplazado por nitrato o por ioduro (Hutter y Padsha, 1959; Washio y Mashima, 1963) . Durante un potencial de acción la fase de repolarización puede hacerse más lenta si se reduce la conductancia al cloruro, reemplazándolo con otro anión

impermeante (Hutter y Noble, 1960). Ya que todos los aniones liotrópicos atraviesan la membrana por el mismo canal (Woodbury y Miles, 1973) una reducción en la permeabilidad de la membrana al substituir el cloruro con nitrato o yoduro ocasionaría que la célula se repolarizara más lentamente después de un potencial de acción. Entonces la explicación para la potenciación del post-potencial negativo parece simple. Debido a que el cloruro contribuye con corriente durante la fase de repolarización del potencial de acción, al reemplazarlo por otros aniones menos permeantes como el nitrato o el yoduro, el voltaje de la membrana regresara más lentamente a la condición de reposo.

Como se discutió previamente en la sección de resultados, la disminución de la altura máxima del potencial de acción se puede explicar por la desviación hacia potenciales más negativos de la curva de inactivación de los canales de sodio de la fibra muscular. Esta idea concuerda bien con los datos de Dani, Sánchez y Hille (1983), quienes demostraron que efectivamente al substituir el cloruro por diversos aniones inorgánicos la inactivación es desplazada hacia el potencial de reposo. La explicación de este efecto aún es materia de discusión. Originalmente Hodgkin y Horowicz (1960) sugirieron que los aniones se adsorben a la membrana y modifican así su potencial de superficie, alterando el campo eléctrico a través de la membrana.

La disminución del potencial de superficie incrementa el campo eléctrico estabilizando así a los canales iónicos. Una reducción del campo eléctrico debida al aumento del potencial de superficie ocasionaría un efecto opuesto, originando que los canales iónicos llegaran más fácilmente a la condición de

actividad. Como los canales de sodio de la fibra muscular esquelética de la rana son macromoléculas que pueden seguir las variaciones del potencial a través de la membrana y que responden esencialmente al campo eléctrico, al despolarizar a esta en presencia de I^- o de NO_3^- , los canales de sodio se abrirían más fácilmente mientras que la corriente al pico disminuiría por la inactivación de algunos de ellos. Entonces la adsorción del yoduro o del nitrato a la membrana sería semejante a una despolarización parcial, lo cual conduciría a que los procesos que dependen del voltaje como la activación y la inactivación de los canales de sodio se establecieran con mayor facilidad que en presencia de cloruro.

Existen sin embargo, varias observaciones experimentales que no pueden explicarse adecuadamente por la teoría del potencial de superficie. Por ejemplo, Gomola, Gottschalk y Luttgau (1983) encontraron que las alteraciones inducidas por el perclorato sobre los parámetros eléctricos y mecánicos en la fibra muscular esquelética de la rana, son similares independientemente de si este anión era ensayado por el lado externo o por el lado interno de la membrana. Evidentemente estos resultados no pueden ser explicados por la teoría del potencial de superficie. Bajo esta teoría la adsorción por la cara externa de la membrana provocaría un aumento del potencial de superficie mientras que la adsorción por el lado interno disminuiría el potencial microscópico aumentando el campo eléctrico. Entonces deberían de esperarse resultados totalmente opuestos cuando el anión se adsorbiera a la membrana por su cara interna que cuando la adsorción se realizara

por la cara externa.

Aùn mäs, Gilly y Armstrong (1982) demostraron que la aplicaciòn de 30 mM de Zn^{++} por el lado externo, afecta solamente la apertura de los canales de sodio sin que haya efectos sobre el cierre de los mismos. Segùn la teorìa del potencial de superficie, la modificaciòn del campo elèctrico ocasionarìa que todos los paràmetros cinèticos que dependen del voltaje fueran alterados en igual magnitud. Las observaciones de Gilly y Armstrong (1982) tampoco pueden explicarse siguiendo los postulados de la teorìa de superficie.

Gilly y Armstrong (1982) han sugerido, sin embargo, que el Zn^{++} mäs que adsorberse a la membrana, interactúa con una carga negativa de la maquinaria cinètica del canal expuesta al fluïdo extracelular, pero que debe moverse hacia el interior durante la activaciòn. La apertura serìa mäs lenta ya que el Zn^{++} debe disociarse primero.

Los efectos de los aniones liotròpicos sobre la espiga de Na-K descritos anteriormente, podrìan explicar al menos en parte el incremento en la tensiòn durante una sacudida muscular. De acuerdo con Hutter y Noble (1960) el efecto potenciador de los aniònes poco comunes sobre la sacudida muscular podrìa deberse parcialmente a la prolongacion de la espiga de Na-K al incrementar el post-potencial negativo. Ademäs de este efecto Hodgkin y Horowicz (1960) han propuesto que los aniònes podrìan desviar hacia el potencial de reposo la relaciòn entre la tensiòn y el potencial de membrana. Entonces el efecto potenciador de los aniònes liotròpicos podrìa atribuirse parcialmente a un incremento en la activaciòn durante la espiga y en parte a una

reducciòn del umbral mecànico por debajo del nivel del post-potencial negativo.

Hill y Macpherson (1954) y Ritchie (1954) encontraron que el reemplazo del cloruro por I, NO_3 y Br incrementa la duraciòn del estado activo del m̀sculo esquel̀tico de la rana durante una sacudida muscular. Ellos explicaron este resultado sugiriendo que de alguna manera desconocida en presencia de los aniones extraños el componente contràctil se acorta el tiempo suficiente como para estirar el elemento elàstico en serie, de tal modo que se genera m̀s tensiòn. Durante un tetanos los aniònes no parecen tener efecto ya que ambos componentes estàn a su m̀xima capacidad.

Tanto Hill y Macpherson (1954) como Ritchie (1954) coincidieron en que los efectos no eran debidos a una acciòn directa sobre la maquinaria contràctil sino que los aniònes extraños potenciaban la sacudida muscular desde la membrana superficial. Sin embargo, no pudieron explicar còmo estos aniònes afectaban desde la superficie debido a la ausencia de cambios en el potencial de acciòn (Kahn y Sandow, 1955).

El incremento en la duraciòn del estado activo podr̀a estar correlacionado con un incremento en la actividad el̀ctrica durante un potencial de acciòn. En este sentido, la potenciaciòn del post-potencial negativo reportada en este trabajo, podr̀a incrementar el tiempo efectivo de actividad del componente contràctil originando el incremento en la tension.

Mientras que la resistencia de la membrana esta relacionada directamente con el incremento del post-potencial negativo cuando el cloruro es reemplazado por otros aniones liotròpicos, no se ha

encontrado una correlación directa entre la potenciación del post-potencial negativo y el incremento en la tensión (Washio y Mashima, 1963). Por este hecho se ha pensado que además del incremento en la resistencia de la membrana, debería de estar involucrado otro factor con el efecto potenciador de los aniones extraños. Washio y Mashima (1963) sugirieron que la potenciación originada por la substitución del cloruro sería el resultado de dos acciones: una acción indirecta donde el anión cambia la permeabilidad de la membrana y produce la prolongación de la despolarización, y la otra es una facilitación directa sobre el acople excitación contracción.

De acuerdo con esto se ha encontrado que los aniones afectan también la recaptura de Ca^{++} por el retículo sarcoplasmico en el orden : $\text{Cl} \leq \text{CH}_3\text{SO}_4 \leq \text{Br} < \text{NO}_3 < \text{I} < \text{SCN}$ (Ebashi y col, 1962). Además los aniones liotrópicos también incrementan las contracturas por cafeína (Nagai y col, 1978; Matsushima y col, 1962). Estos efectos podrían dar lugar a un incremento del periodo mecánicamente efectivo y de esta manera generar un aumento en la tensión durante una sacudida muscular.

B.- Potenciales de acción de calcio y las corrientes de calcio

En el pasado, el sulfato y el metanosulfonato se han utilizado indistintamente como aniones impermeantes para registrar las corrientes de calcio de la fibra muscular esquelética de la rana (Sánchez y Stefani, 1978, 1983; Almers, y

col., 1981; Stanfield, 1977) sin considerar la influencia del medio ambiente aniònico sobre la actividad de los canales de calcio. El resultado màs sorprendente encontrado en los experimentos descritos en este trabajo, es el hallazgo de que al substituir el sulfato por metanosulfonato en la soluciòn extracelular, se reduce considerablemente la corriente màxima al calcio. Este efecto se observò registrando indirectamente la I_{Ca} màxima durante el potencial de acciòn de calcio y directamente en las corrientes de calcio registradas bajo condiciones de fijaciòn del voltaje. Estos resultados concuerdan bien con los reportados por otros autores. Asì las corrientes de calcio que han sido registrdas independientemente en presencia de sulfato (Sànchez y Stefani, 1978) tienden a ser màs grandes que aquellas que han sido registradas en la soluciòn de metanosulfonato (Sànchez y Stefani, 1983, Almers y col., 1981).

Otro resultado interesante es que cuando el nitrato esta presente en la soluciòn extracelular, tambièn son reducidas las corrientes de calcio. En desacuerdo con este efecto, Bianchi y Shanes (1959) han reportado que en presencia de nitrato la entrada de ^{45}Ca a la fibra muscular se incrementa en un 60% durante la actividad. Estas discrepancias podrìan deberse a diferencias en las condiciones experimentales empleadas en esta tesis y en los experimentos con flujos radioactivos. Por ejemplo, en las mediciones de calcio radioactivo se utilizaron mùsculos completos, donde la captura de calcio en los interespacios puede obscurecer las estimaciones del contenido de Ca^{45} en el mioplasma. Ademàs los efectos del nitrato fueron medidos unicamente durante la actividad de los canales lentos de calcio,

mientras que el influjo de ^{45}Ca se observó estimulando la fibra muscular en donde también podrían estar involucrados otros sistemas transportadores de calcio. Por otro lado, el nitrato puede entrar a la célula vía los canales de cloro (Woodbury y Miles, 1973). Como posee carga negativa, el nitrato debe generar una corriente opuesta a la corriente de calcio. Por esta razón es muy probable que la magnitud de la I_{Ca} sea subestimada por la entrada de nitrato a la fibra muscular.

El mecanismo por el que el nitrato o el metanosulfonato reducen las corrientes de calcio es desconocido. Probablemente el sulfato se comporte como un amortiguador de la concentración de calcio en el sistema de túbulos transversos, donde están localizados los canales de calcio, y provoque una menor deplesiòn de este catiòn. Este efecto conduciría a que las corrientes de calcio fueran mayores en la solución de sulfato debido a que la cantidad de calcio disponible también sería mayor. Mientras que este argumento explicaría la disminucion de la I_{Ca} en los experimentos de fijaciòn de voltaje, no està de acuerdo con los resultados encontrados registrando los potenciales de acciòn de calcio. En fibras musculares completas, se han encontrado fuertes evidencias de que la declinaciòn de la corriente de calcio màs que depender de la deplesiòn, es el resultado de un proceso de inactivaciòn (Sànchez y Stefani, 1983; Avila-Sakar y col., 1986). Estas diferencias entre ambas tècnicas indican que el efecto "amortiguador" del sulfato solamente es una consecuencia colateral y que se requiere de otra explicaciòn.

Por otro lado, aunque el metanosulfonato y el nitrato no

parecen alterar la apertura del canal de calcio en comparación con el sulfato, los resultados de este trabajo no permiten descartar un efecto directo de estos aniones sobre la maquinaria cinética del canal. Es necesario realizar un estudio más completo de la cinética del canal de calcio e investigar si la apertura o el cierre del canal pueden ser modificados dependiendo de la especie aniònica de la solución extracelular.

Finalmente, la reconstitución de los canales de calcio del sistema tubular transversal en membranas artificiales es una técnica poderosa que permite la manipulación de estos sistemas de transporte y del medio ambiente iònico así como el control del tipo de lípidos que constituyen la membrana artificial. Ya que bajo estas condiciones la deplesiòn de calcio no sería un factor importante en la declinaciòn de las corrientes, podríase obtenerse más informaciòn del comportamiento elèctrico de los canales de calcio en presencia de metanosulfonato y de nitrato así como de otros aniònes de la serie liotròpica.

BIBLIOGRAFIA

- Adrian, R.H., Chandler, W.K. & Hodgkin, A.L. (1970a). Voltage clamp experiments in striated muscle fibres. *J. Physiol.* 208: 607-644.
- Adrian, R.H., Chandler, W.K. & Hodgkin, A.L. (1970b). Slow changes in potassium permeability in skeletal muscle. *J. Physiol.* 208: 645-668.
- Almers, W. & Palade, P.T. (1981) Slow calcium and potassium currents across frog muscle membrane: measurements with a vaseline-gap technique. *J. Physiol.* 312:159-176.
- Almers, W., Fink, R. y Palade, P.T. (1981) Calcium depletion in frog muscle tubules: The decline of calcium current under maintained depolarization. *J. Physiol.* 312:177-207.
- Avila-Sakar, A.J., Cota, G., Gamboa-Aldeco, R., Garcia, J., Huerta, M., Muñiz, J. y Stefani, E., (1976) Skeletal muscle Ca^{2+} channels. *J. of muscle research and cell motility.* 7: 291-298.
- Axelsson, J. (1961) The effect of nitrate on electrical and mechanical activity of smooth muscle. *J. Physiol.* 155: 9-10 P.
- Beatty, G.N. & Stefani, E. (1976a) Calcium dependent electrical activity in twitch muscle fibres of the frog. *Proc. R. Soc. London, B* 194:141-150.
- Bezanilla, F., Vergara, J. & Taylor R.E. (1982) Voltage clamping of excitable membranes. In *Methods of Experimental Physics*, Vol.20 . , Ehrenstein G. & Lecar H. (eds) Academic Press. N.Y.
- Bianchi, C.P. & Shanes, A.M. (1959) Calcium influx in skeletal muscle at rest, during activity, and during potassium contracture. *J. Gen. Physiol.* 42: 803-815.
- Boyle, P.J. & Conway, E.J. (1941) Potassium accumulation in muscle and associated changes. *J. Physiol.* 100: 1-63.
- Cota, G., Nicola Siri, L. Stefani, E. (1983) Calcium channel gating in frog skeletal muscle membrane : Effect of temperature. *J. Physiol.* 338: 395-412.
- Dani, J.A. Sánchez, J.A. & Hille, B. (1983) Lyotropic Anions. Na channel gating and Ca electrode response. *J. Gen. Physiol.* 81: 255-281.

- Ebashi, S. et. al. (1962) Calcium binding of the relaxing factor and the link between excitation and contraction. *Excerpta Medical, International Congress, series No. 48*: 899
- Ebashi, S. & Endo, M. (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. molec. Biol.* 18: 123-183.
- Ebashi, S., Endo, M. & Ohtsuki, I. (1969) Control of muscle contraction. *Q.Rev.Biophys.* 2: 351-384.
- Eisenberg, R.S. & Gage, P.W. (1969) Ionic conductances of the surface and transverse tubular membranes of frog sartorius fibers. *J. gen. Physiol.* 53: 279-297.
- Falk, G. & Landa, J.F. (1960) Prolonged response of skeletal muscle in the absence of penetrating anions. *Amer. J. Physiol.* 198: 289-299.
- Fatt, P. & Katz, B. (1951) An Analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol.* 115: 320-370.
- Frank, G.H. (1957) Negative after-potential of frog 's skeletal muscle. *J. Neurophysiol.* 20: 602-614.
- Frank, G.H. (1961) The influence of bromide ions on excitation-contraction coupling in frog 's skeletal muscle. *J. Physiol.* 156: 31-48.
- Gilly, W.F. & Armstrong, C.M. (1982) Slowing of sodium channel opening kinetics in squid axon by extracellular zinc. *J. Gen. Physiol.* 79: 935-964.
- Gomolla, M., Gottschalk & Lutgau, H.C. (1983) Perchlorate induced alterations in electrical and mechanical parameters of frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 343: 197-214.
- Harris, E.J. (1958) Anion interaction in frog muscle. *J. Physiol.* 141: 351-365.
- Harris, E.J. & Martin-Ferreira, H. (1955) Membrane potentials in the muscles of the South American frog, Leptodactylus ocelatus. *J. exp. Biol.* 32: 539-542.
- Hashimura, S. & Osa, T. (1963) The effect of nitrate and Thiocyanate ions on the resting and action potentials of cobalt-treated single nodo of Ranvier. *Jpn. J. Physiol.* 13: 219-230.
- Hill, A.V. & Macpherson, L. (1954) The effect of nitrate, iodide and bromide on the duration of the active state in skeletal muscle. *Proc. R. Soc., ser B* 143: 81-102.
- Hille, B. (1984) Ionic channels of excitable membranes. *Sinauer Assoc. Inc. Sunderland, Massachusetts.* 426 pp.

- Hille, B. & Campbell D.T. (1976) An improved vaseline gap voltage clamp for skeletal muscle fibers. *J.Gen.Physiol.* 67: 265-293
- Hodgkin, A.L. & Horowicz, P. (1959a) Movement of Na and K in single muscle fibres. *J. Physiol.* 145: 405-432.
- Hodgkin, A.L. & Horowicz, P. (1959b) The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibers. *J. Physiol.* 148: 127-160.
- Hodgkin, A.L. & Horowicz, P. (1960b) The effect of nitrate and other anions on the mechanical response of single muscle fibers. *J. Physiol.* 153: 404-412.
- Hodgkin, A.L. & Katz, B. (1949) The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108: 37-77.
- Horowicz, P. (1964) The effects of anions on excitable cells. *Pharmacolo. Rev.* 16: 193-221.
- Hutter, O.F. & Noble, D. (1960) The chloride conductance of frog skeletal muscle. *J Physiol.* 151: 89-102.
- Hutter, O.F. & Padsha, S.M. (1959) Effect of nitrate and other anions on the membrane resistance of frog skeletal muscle. *J Physiol.* 146: 117- 132.
- Hutter, O.F. & Warner, A.E. (1967a) The pH sensitivity of the chloride conductance of frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 189: 403-425.
- Hutter, O.F. & Warner A.E. (1967b) The effect of pH on the ^{36}Cl efflux from frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 189: 427-444.
- Hutter, O.F. & Warner A.E. (1967c) Action of some foreign cations and anions on the chloride permeability of frog muscle. *J. Physiol.* 189: 445-460.
- Hutter, O.F. & Warner, A.E. (1968) The anion discrimination of the skeletal muscle membrane. *J. Physiol.* 194: 61-62 P.
- Hutter, O.F. & Warner, A.E. (1969) Rectifier properties of the chloride conductance of skeletal muscle at different pH. *J. Physiol.* 200: 82-83 P.
- Hutter, O.F. & Warner, A.E. (1972). The voltage dependence of the chloride conductance of frog muscle. *J. Physiol.* 227: 275-290.
- Huxley, A.F. & Taylor, R.E. (1958) Local activation of striated muscle fibers. *J. Physiol.* 144: 426-441.

- Kahn, A.J. & Sandow, A. (1950) The potentiation of muscular contraction by the nitrate-ion. *Science* 112: 647-649.
- Kahn, A.J. & Sandow, A. (1955) Effects of bromide, nitrate and iodide on responses of skeletal muscle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 62: 137-176.
- Kao, C.Y. & Stanfield, P.R. (1968) Actions of some anions on electrical properties and mechanical threshold of frog twitch muscle. *J. Physiol.* 198: 291-309.
- Koppenhöfer, E. (1965) Die Wirkung verschiedener Anionen auf den isolierten Ranvierschen Schnürring. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 282: 338-350.
- Lubin, M. (1957) The effect of iodide and thiocyanate ions on the mechanical and electrical properties of frog muscle. *J. cell. comp. Physiol.* 49: 335-349.
- Matsushima, J.T. et.al. (1962) Effects of anomalous anions on the caffeine contracture. *Jap. J. Physiol.* 12: 106-112.
- Nagai, I., Oota, I. & Nagai, T. (1978) Caffeine contracture in transverse tubules-disrupted fiber and effect of anomalous anions on the contracture in frog twitch fiber. *Jap. J. Physiol.* 28: 783-798.
- Nastuk, W.L. & Hodgkin, A.L. (1950) The electrical activity of single muscle fibers. *J. cell. comp. Physiol.* 35: 39-73.
- Persson, A. (1963) The negative after-potential of frog skeletal muscle fibers. *Acta physiol. scan.* 58: suppl. 205.
- Ritchie, J.M. (1954) The effect of nitrate on the active state of muscle. *J. Physiol.* 126: 155-168.
- Sandow, A. & Mauriello, G.E. (1953) Force-velocity relation of nitrate treated muscle. *Fed. Proc.* 12: 123-124.
- Sánchez, J.A. & Stefani, E. (1978) Inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 283: 197-209.
- Sánchez, J.A. & Stefani, E. (1983) Kinetic properties of calcium channels of twitch muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 337: 1-17.
- Stanfield, P.R. (1970) The effect of the tetraethylammonium ion on the delayed currents of frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 209: 209-229.
- Stanfield, P.R. (1973) The onset of the effects of zinc and tetraethylammonium ion on action potential duration and twitch amplitude of single muscle fibres. *J. Physiol.* 235: 639-654.

- Stanfield, P.R. (1977) A calcium dependent inward current in frog skeletal muscle fibres. *Pflügers Arch.* 368:267-270.
- Washio, H. & Mashima, H (1963) Effects of some anions and cations on the membrane resistance and twitch tension of frog muscle fibre. *Jap. J. Physiol.* 13: 617-629.
- Warner, A.E. (1972) Kinetic properties of the chloride conductance of frog muscle. *J. Physiol.* 227: 291-312.
- Woodbury, J.W. & Miles, P.R. (1973) Anion conductance of frog muscle membranes: on channel, two kinds of pH dependence. *J. Gen. Physiol.* 62: 324-353.
- Zar, J. H. (1974) *Biostatistical analysis.* Prentice Hall Inc, N.Y.