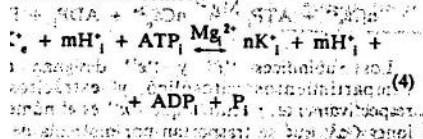


El transporte activo de H⁺ en las células de la mucosa gástrica

La mucosa gástrica produce una secreción cuya concentración de H⁺ es un millón de veces superior a la del medio interno (Capítulo III-3). Esto se debe al transporte activo de H⁺ en las células parietales de la mucosa gástrica cuya membrana posee una ATPasa tipo E₁E₂ que acopla la hidrólisis del ATP en la superficie citosólica de la membrana al intercambio intracelular por K⁺ de la luz estomacal. De acuerdo con la nomenclatura habitual, esta ATPasa signa como (K⁺, H⁺)-ATPasa.

(K⁺, H⁺)-ATPasa. Esta ATPasa es la menos común y la más localizada de las ATPasas de tipo E₁E₂ está restringida exclusivamente a la membrana de las células parietales de la mucosa gástrica y no de esta membrana, a la zona apical y a los canales secretorios. No se la encuentra en la zona lateral de la membrana. En condiciones fisiológicas la reacción catalizada por la (K⁺, H⁺)-ATPasa puede simbolizarse como:



Las letras "n" y "m" indican el número de iones H⁺, respectivamente, que son transportados por una de ATP que se hidroliza. De acuerdo con ciertos autores, uno o dos H⁺ se transportan por un ATP. Parece haber acuerdo en que se transporta un K⁺ por cada H⁺ que se transporta.

BIBLIOGRAFIA

S. L. and De Pont, J. J. (eds.): New Comprehensive Biochemistry, Vol. 2: Membrane Transport. Elsevier/North Holland Medical Press, Amsterdam, 1981.

Lehninger, A. L.: The Sarcoplasmic Reticulum. J. Wiley & Sons, New York, 1981.

Rega, A. F. and Garrahan, P. J.: Transporte a través de la membrana celular. Monografía Científica N° 18, Organización de los Estados Americanos, 1978.

Glynn, I. M.: The Na⁺, K⁺-transporting ATPase. In Martonosi, A. (ed.): The Enzymes of Biological Membranes, 2nd. ed. Plenum Press, New York, 1985.

Rega, A. F. and Garrahan, P. J.: The Calcium Pump of Plasma Membranes. CRC Press, Boca Ratón, 1986.

por ciclo. Esto deja abierta la posibilidad de que el sistema sea electrogénico.

El funcionamiento del sistema lleva a la acumulación de H⁺, y por lo tanto, a la acidificación de la luz del estómago y a la acumulación de K⁺ en el medio intracelular. El gradiente de K⁺ generado por este sistema origina un flujo pasivo de K⁺ hacia la luz estomacal, el cual es acompañado por un flujo pasivo de Cl⁻ en la misma dirección. En consecuencia, el resultado neto del funcionamiento de la (K⁺, H⁺)-ATPasa es el transporte hacia la luz estomacal de ácido clorhídrico, el principal responsable de la acidez del jugo gástrico.

La velocidad de transporte o de la actividad de ATPasa de la (K⁺, H⁺)-ATPasa varía con la concentración de K⁺ extracelular a lo largo de una curva que tiende a la saturación y que alcanza su valor semimáximo cuando la concentración de K⁺ es de 1-2 mM.

La reacción de hidrólisis del ATP tiene lugar siguiendo los pasos que se han descrito, en general, para las ATPasas de tipo E₁E₂. En el caso de la (K⁺, H⁺)-ATPasa la formación de E₂P requiere, aparte de Mg²⁺, que no es transportado, H⁺ en la superficie citoplásmica de la membrana. Se ha propuesto que el H⁺ queda ocluido en E₂P y que es liberado hacia la superficie opuesta de la membrana durante la transición E₂P → E₁P. La desfosforilación de E₂P es acelerada por el K⁺ extracelular. Se ha propuesto que el K⁺ queda ocluido en E₂ y que, como sucede en la (Na⁺, K⁺)-ATPasa, la transición E₂ → E₁, requiere la liberación del K⁺ ocluido, proceso que es acelerado por el ATP que actúa con baja afinidad y sin sufrir hidrólisis.

Rega, A. F. and Garrahan, P. J.: The Calcium Pump of Plasma Membranes. CRC Press, Boca Ratón, 1986.

Lehninger, A. L.: The Sarcoplasmic Reticulum. J. Wiley & Sons, New York, 1981.

Rega, A. F. and Garrahan, P. J.: Transporte a través de la membrana celular. Monografía Científica N° 18, Organización de los Estados Americanos, 1978.

Glynn, I. M.: The Na⁺, K⁺-transporting ATPase. In Martonosi, A. (ed.): The Enzymes of Biological Membranes, 2nd. ed. Plenum Press, New York, 1985.

Rega, A. F. and Garrahan, P. J.: The Calcium Pump of Plasma Membranes. CRC Press, Boca Ratón, 1986.

Fisiología Humana.
Bernardo A. Houssay.
Tomo 1. Bs. As.: El Ateneo, 1985.



BIBLIOTECA

Introducción

Los gradientes iónicos que existen en la membrana celular, y particularmente, aunque no en forma exclusiva, los de Na⁺ y K⁺, son el prerequisite indispensable para que ciertas células (nerviosas, musculares, etc.) presenten una característica que las distingue claramente del resto: son excitables. Es decir que tienen la capacidad de cambiar rápida y transitoriamente su potencial de reposo en respuesta a un estímulo (eléctrico, químico, mecánico) de intensidad adecuada, y de que dicho cambio se transmita en forma de una onda de amplitud constante (potencial de acción) a lo largo de axones o fibras musculares, con una velocidad que dependerá, entre otros factores, del diámetro del axón o de la fibra muscular de que se trate.

La excitabilidad confiere a estas células la capacidad de transmitir mensajes en forma veloz y eficiente sobre distancias relativamente grandes. Por ejemplo, un potencial de acción que se inicia en una célula nerviosa del asta anterior de la médula (motoneurona) y cuyo axón forma parte del nervio ciático, puede llegar a las fibras musculares del pie que inerva en unos 10 milisegundos o menos. Del mismo modo, una sensación dolorosa originada en la piel (pinchazo, quemadura, etc.) puede alcanzar la corteza cerebral también en pocos milisegundos. Una comunicación rápida entre distintas partes del organismo es fundamental en términos de defensa frente a agresiones del medio ambiente. Un sistema de comunicación de tipo hormonal, por ejemplo, sería totalmente inadecuado para canalizar un mensaje destinado a producir la contracción de un músculo o para transmitir información sobre lo que está ocurriendo en un momento dado en la periferia del cuerpo. Baste imaginar, por ejemplo, qué ocurriría si la información sobre la producción de una quemadura en un pie o una mano dependiese de la llegada al cerebro, a través de la circulación, de una sustancia liberada por las células lesionadas. En primer lugar, en el mejor de los casos, el mensaje tardaría varios segundos, y en segundo lugar no brindaría ninguna información sobre la localización de la lesión.

En este capítulo estudiaremos los mecanismos básicos de la excitabilidad en el nervio y el músculo.

Transporte iónico y excitabilidad

Roque A. Venosa

quelético, los cuales dependen fundamentalmente de las propiedades eléctricas de la membrana celular y de los movimientos iónicos a través de la misma.

Potencial de membrana

En toda célula existe una diferencia de potencial a través de su membrana plasmática (E_m). La primera demostración experimental de E_m se debe al fisiólogo italiano Matteucci (1838) quien, mediante el uso de un galvanómetro rudimentario, midió la corriente que circulaba entre una zona lesionada (superficie de sección) y la superficie intacta de un músculo de rana (fig. 3-1). La dirección de la corriente, llamada corriente de lesión, indicó que la superficie intacta era positiva respecto de la zona lesionada.

A principios de este siglo, Bernstein (1902) postuló que la membrana celular era impermeable al Na⁺, selectivamente permeable al K⁺ y, por lo tanto, que el potencial de membrana (E_m) debería corresponder al potencial de equilibrio de este último ion (E_K) de acuerdo con la ecuación de Nernst (véase Cap. I-1, ecuación 21):

$$E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_i}{[K^+]_e} \quad (1)$$

Se sabe que la mayoría de los aniones intracelulares (fundamentalmente aminoácidos, proteínas), son impermeables. De modo que en principio, en la hipótesis de Bernstein la desigualdad [K⁺]_i > [K⁺]_e podría explicarse en términos de un equilibrio Donnan (véase Cap. I-1) donde los iones permeables (K⁺ y Cl⁻) estarían en equilibrio, es decir, sus flujos netos serían igual a cero y sus concentraciones intra y extracelulares se vincularían de acuerdo con la relación de Donnan (r):

$$\frac{[K^+]_i}{[K^+]_e} = \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_e} = r \quad (2)$$

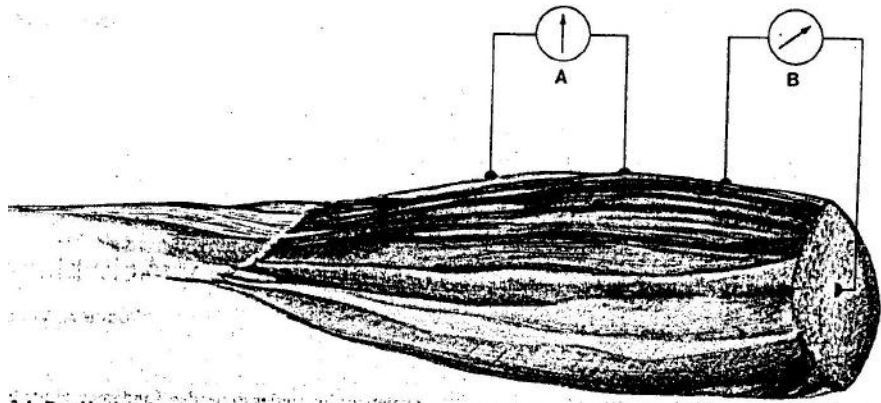
y por lo tanto, de acuerdo con la ecuación (1):

$$E_m = E_K = E_{Cl}$$

Como se vio en el Capítulo I-1, en el equilibrio Donnan la presión osmótica del compartimiento



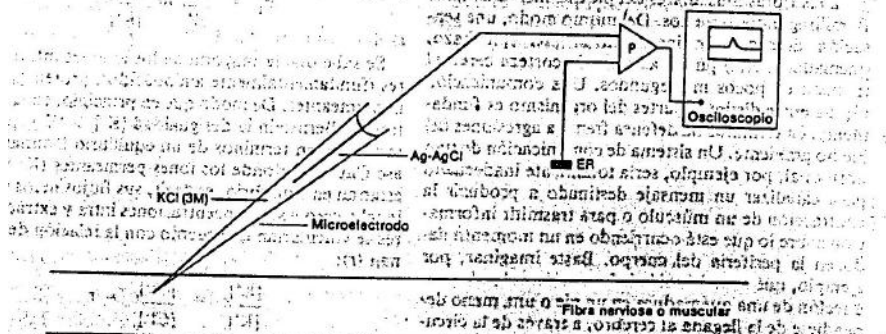
107636



3-1. Porción de músculo seccionado. En A, ambos electrodos están en contacto con la superficie intacta del músculo y el amperímetro no indica paso de corriente: no hay diferencia de potencial entre ellos. En B, un electrodo está en contacto con la superficie intacta del músculo y el otro con la superficie de sección del mismo. En este caso el amperímetro registra corriente cuya dirección indica que la zona lesionada es negativa respecto de la superficie intacta.

En el caso de un ion permeante como el K^+ , el compartimiento que contiene sólo iones permeantes. Esto conduciría a una entrada de agua y al siguiente aumento de volumen de las células, con tensión y finalmente ruptura de la membrana plasmática (lisis celular). Para que esto no ocurra debería haber en el medio extracelular alguna molécula o ion impermeante para mantener el equilibrio osmótico. Ante muchos años se adjudicó este papel al Na^+ , por su permeabilidad, aunque relativamente baja, no es impermeante. De todos modos, este ion se comporta como un ion impermeante (ver más adelante). Es así que el anión intracelular y el catión extracelular no permeantes determinarían un doble equilibrio. Donde además de estar los iones permeantes (Cl^-) en equilibrio, habría equilibrio osmótico. Hace

más de 40 años, Boyle y Conway (1941) demostraron que el sistema formado por el músculo esquelético de rana y el medio extracelular, cuando $[K^+]_i > 10$ mM, se comporta muy aproximadamente de acuerdo con un equilibrio de este tipo. La ventaja de un sistema como éste es que se establecen gradientes iónicos cuyo mantenimiento no demanda gastos de energía a la célula, aunque tropieza con dos inconvenientes: el primero es que a $[K^+]_i$ normal (2,5 mM en músculo de rana) la relación de la ecuación (2) no se cumple (es decir, el K^+ no está en equilibrio), y el segundo es la ya mencionada permeabilidad al Na^+ que determina una constante entrada de este ion en la célula a favor de su gradiente de potencial electroquímico. La relación entre E_m , las concentraciones iónicas y las permeabilidades a los distintos iones de las membra-



2. Esquema del método de registro de potenciales intracelulares. El electrodo de vidrio cuya punta tiene un diámetro de $0.5 \mu m$, montado en un micromanipulador (no mostrado), atraviesa la membrana celular virtualmente sin alteración de la célula. El sistema de registro mide la diferencia de potencial entre el interior de la célula (electrodo de vidrio) y el del electrodo de referencia (ER) que se encuentra en el espacio extracelular. Habitualmente el medio conductor del electrodo de vidrio es una solución de KCl 3 M, la cual está en contacto con un alambre de plata clorurado ($Ag-AgCl$) adosado al sistema de registro que generalmente está formado por un preamplificador de alta impedancia y un osciloscopio.

nas excitables (y no excitables) es considerablemente más compleja que la descrita hasta aquí. El avance en el conocimiento de los mecanismos del transporte iónico transmembrana se debió al desarrollo de diversas técnicas tales como la determinación de: a) E_m , mediante microelectrodos de vidrio (fig. 3-2); b) contenidos iónicos mediante la espectrofotometría de llama; c) actividades iónicas con microelectrodos específicos; d) flujos mediante radioisótopos; etcétera.

Consideremos las concentraciones intracelulares de K^+ , Na^+ y Cl^- a ambos lados de la membrana y E_m medidos experimentalmente y veamos cómo se relacionan.

En la fig. 3-3 se esquematizan los gradientes de potencial y de concentración de las principales especies iónicas permeantes en una fibra muscular esquelética de rana.

En estas células, E_m promedio es de -92 mV (interior negativo respecto del exterior). Los potenciales de equilibrio de K^+ , Na^+ y Cl^- a $20^\circ C$ de acuerdo con los valores de la fig. 3-3 serán:

$$E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i} = 58 \log \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i} = 2$$

$$= 58 \log \frac{2,5}{140} = -101 \text{ mV}^*$$

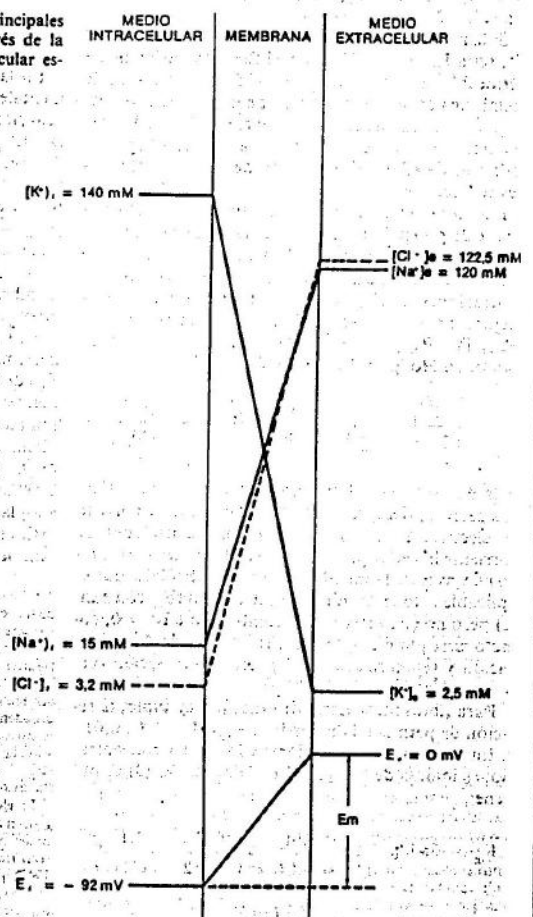
$$E_{Na} = 58 \log \frac{[Na^+]_e}{[Na^+]_i} = 58 \log \frac{120}{15} = +52 \text{ mV}$$

$$E_{Cl} = -58 \log \frac{[Cl^-]_e}{[Cl^-]_i} =$$

$$= -58 \log \frac{122,5}{3,2} = -92 \text{ mV}$$

* Para $z = 1$ y $20^\circ C$ ($T = 293^\circ K$) $\frac{RT}{zF} \ln = \frac{RT}{zF} 2,3 \log = 58 \text{ mV log.}$

Fig. 3-3. Gradientes de concentración de los principales iones permeantes y de potencial eléctrico a través de la membrana celular (sarcolema) de una fibra muscular esquelética de rana.



E_K es de -101 mV, es decir que E_m debería tener ese mismo valor para que el K^+ estuviese en equilibrio a través de la membrana. Sobre este catión actúa una fuerza impulsora hacia afuera relativamente pequeña dada por $E_m - E_K = -92 - (-101) = 9$ mV; lo que determinará un flujo neto pasivo de K^+ hacia afuera. En otras palabras, el interior de la célula no es lo suficientemente negativo respecto del exterior como para anular la tendencia a escapar del K^+ hacia el medio extracelular a favor de su gradiente de concentración.

El Na^+ , por otra parte, se encuentra mucho más alejado del equilibrio que el K^+ . La magnitud de la fuerza impulsora que actúa sobre el mismo, es $E_m - E_{Na} = -92 - (+52) = -144$ mV, y está dirigida de afuera hacia dentro de la célula, determinando, como ya se dijo, una constante entrada pasiva de Na^+ . De modo que para que esta entrada pasiva fuese nula (fuerza impulsora igual a cero) debería ser $E_m = E_{Na} = +52$ mV. En este ejemplo, el Cl^- es el único ion en equilibrio a través de la membrana ($E_m - E_{Cl} = 0$) y, por lo tanto, su flujo neto es cero (véase Apéndice 2).

Si la membrana fuese exclusivamente permeable al K^+ , sería $E_m = -100$ mV y si fuese exclusivamente permeable al Na^+ sería $V_m = +52$ mV. Cuando la membrana es permeable a más de una especie iónica, tal el caso de la membrana celular, el valor de E_m dependerá no sólo, de los potenciales de equilibrio de cada una de ellas, sino también de las permeabilidades respectivas.

Basándose en la hipótesis del campo eléctrico (gradiente de potencial) constante a través de la membrana celular de Goldman (1943), Hodgkin y Katz (1949) derivaron una ecuación que relaciona E_m con las concentraciones de K^+ , Na^+ y Cl^- a ambos lados de la membrana y sus permeabilidades correspondientes (P_{Na} , P_K , P_{Cl}), y que se conoce como ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK):

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K]_e + P_{Na} [Na]_e + P_{Cl} [Cl]_i}{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_e} \quad (3)$$

Esta ecuación es válida sólo para movimientos iónicos pasivos, siempre y cuando la densidad de corriente eléctrica total, I_T (suma de las densidades de corriente llevadas por cada uno de los iones permeantes) a través de la membrana sea cero. Es decir que es aplicable sólo en condiciones de reposo (E_m constante) pero no cuando E_m está cambiando e $I_T \neq 0$, como ocurre por ejemplo durante las fases de despolarización y repolarización del potencial de acción (ver más adelante).

Para fibras musculares de rana, por ejemplo, la relación de permeabilidad es $P_K : P_{Na} : P_{Cl} :: 1 : 0,01 : 2$. Introduciendo estos valores y los de las concentraciones iónicas de la fig. 3-3 en la ecuación (3) se obtiene:

$$E_m = 58 \log \frac{2,5 + 0,01 \times 120 + 2 \times 3,1}{140 + 0,01 \times 15 + 2 \times 121} = -92,0 \text{ mV}$$

La ecuación de GHK relaciona muy adecuadamente E_m con las concentraciones y las permeabilidades iónicas en una gran variedad de células.

La derivación de la ecuación de GHK a partir de la ecuación (18) del Capítulo I-1 se detalla en el Apéndice 1 de este capítulo.

Es obvio que si por alguna razón la membrana se hiciese impermeable al Cl^- y al Na^+ ($P_{Na} = P_{Cl} = 0$) la ecuación (2) se transforma en la ecuación de Nernst (ecuación 1) para el K^+ . Por otra parte, si el Cl^- está en equilibrio a través de la membrana ($E_m = E_{Cl}$) como parece ser el caso en el músculo esquelético de rana (y otras células), la ecuación de GHK (véase Apéndice 1) se reduce a:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K]_e + P_{Na} [Na]_e}{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i} \quad (4)$$

Además, en el denominador de la ecuación (4) el término $P_{Na} [Na]_i$ ($0,01 \times 15$), es casi mil veces menor que $P_K [K]_i$ (1×140) por lo que se lo puede eliminar de la ecuación (3) obteniéndose la ecuación (5):

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K]_e + P_{Na} [Na]_e}{P_K [K]_i} \quad (5)$$

En la fig. 3-4 se ve también que los datos experimentales cumplen con otra característica de la ecuación (4), a saber: que a medida que se incrementa $[K]_e$ el término $P_{Na} [Na]_e$ tiende a hacerse despreciable frente a $P_K [K]_e$; de modo que a $[K]_e$ altas (> 10 mM) la relación entre E_m y $[K]_e$ está dada por la ecuación de Nernst para K^+ (ecuación 1) con $[K]_i = 140$ mM (constante). Ello coincide con la igualdad $E_K = E_m$ postulada por Bernstein, aunque él lo hizo basándose en la suposición de que la membrana era exclusivamente permeable al K^+ y no a otros iones.

Si, por las razones apuntadas, a $[K]_e$ altas E_m está determinado exclusivamente por $[K]_e$ y $[K]_i$ ($E_m = E_K$) de acuerdo con la ecuación de Nernst, debería esperarse que los cambios de $[K]_i$ a $[K]_e$ constante también produjeran variaciones de E_m acordes con dicha ecuación. Este experimento se realizó en el axón gigante de calamar, cuyo diámetro (300-1000 μ m) permite cambiar la composición del axoplasma perfundiéndolo con distintas disoluciones artificiales (Baker *et al.*, 1962), comprobándose que también en esas condiciones $E_m = E_K$.

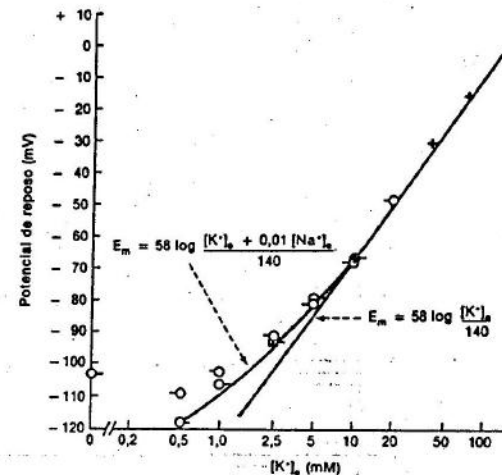
* La ecuación del potencial de reposo de GHK supone permeabilidades constantes, lo cual es cierto en general para P_{Na} y P_{Cl} pero no siempre para P_K . En algunas células, tales como las del músculo esquelético de rana (Katz, 1949) y las fibras de Purkinje del corazón (Hutter y Noble, 1960), cuando la fuerza impulsora sobre el K^+ es hacia afuera ($E_m - E_K > 0$), P_K disminuye, tanto más cuanto mayor sea aquélla. Por el contrario, cuando la fuerza impulsora es hacia adentro ($E_m - E_K < 0$), P_K aumenta con la misma. Es decir que el sistema de permeabilidad al K^+ en reposo se comporta como una válvula, la cual se abre cuando la fuerza impulsora es hacia adentro ($E_m - E_K < 0$) y se cierra cuando ésta es hacia afuera ($E_m - E_K > 0$). Esto se denomina rectificación hacia adentro.

En electricidad, un rectificador es un elemento de un circuito cuya resistencia al paso de corriente es mayor en un sentido que en el opuesto. Es decir que no cumple con la ley de Ohm ($V = IR$). La rectificación hacia adentro originalmente se llamó *anómala* (Katz, 1949), por cuanto su dirección es opuesta a la de la rectificación que se obtiene cuando se calcula I_K en función de E_m mediante la ecuación (14) del Apéndice 1.



BIBLIOTECA

Fig. 3-4. Relación entre el potencial de reposo y la concentración externa de potasio ($[K]_e$) en fibras musculares esqueléticas de rana. Para $[K]_e < 10$ mM la relación es descrita muy satisfactoriamente por la ecuación 5 con $P_{Na}/P_K = 0,01$. Para $[K]_e > 10$ mM la relación está dada por la ecuación de Nernst para K^+ . Nótese que la escala de la abscisa es logarítmica. (Modificado de Hodgkin, Horowitz, 1959.)



Es de hacer notar que las permeabilidades y concentraciones iónicas varían considerablemente de un tipo de célula a otro.

Lo dicho hasta aquí implica que debido a los flujos netos pasivos de Na^+ y K^+ , $[Na]_i$ debería aumentar y $[K]_i$ debería disminuir constantemente. Sin embargo, se comprueba experimentalmente que $[Na]_i$ y $[K]_i$ se mantienen muy constantes durante la vida de las células. Esa constancia de $[Na]_i$ y $[K]_i$ constituye un estado estacionario y no de equilibrio (véase Capítulo I-1).

Con respecto al Na^+ , a priori, no habría ninguna razón para que su distribución transmembrana no sea similar a la del K^+ (concentración intracelular > concentración extracelular) y no, como vimos, a la inversa. Esto indujo a Dean (1941) a postular la existencia de un mecanismo de transporte activo que expulsara Na^+ a la misma velocidad con que entra en la célula a favor de su gradiente de potencial electroquímico, de manera que $[Na]_i$ se mantenga constante y unas diez veces menor que $[Na]_e$. El mismo Dean acuñó el nombre con el que habitualmente se designa a este proceso: bomba de Na^+ . Por las mismas razones el K^+ debe ser transportado activamente hacia el interior de la célula de modo que $[K]_i$ se mantenga en un valor constante y mayor que el que debería tener si este ion estuviese en equilibrio ($E_m = E_K$).

Como se vio en detalle en el Capítulo I-2, los transportes activos de Na^+ y K^+ están acoplados (bomba de $Na^+ - K^+$) y se realizan con gasto de energía aportada por la hidrólisis de ATP catalizada por la actividad ATPásica de la bomba. El mantenimiento de $[Na]_i$ baja (10-15 mM) frente a $[Na]_e = 120$ mM mediante el bombeo de Na^+ hacia fuera de la célula es equivalente, desde el punto de vista osmótico, a la presencia en el medio externo de un catión no permeante (la baja P_{Na} es un factor coadyuvante) que cancele la desigualdad osmótica generada por la presencia de los aniones no permeantes en el citoplasma. De allí que anteriormente dijéramos que en reposo el

Na^+ se comporta como un ion efectivamente inerte.

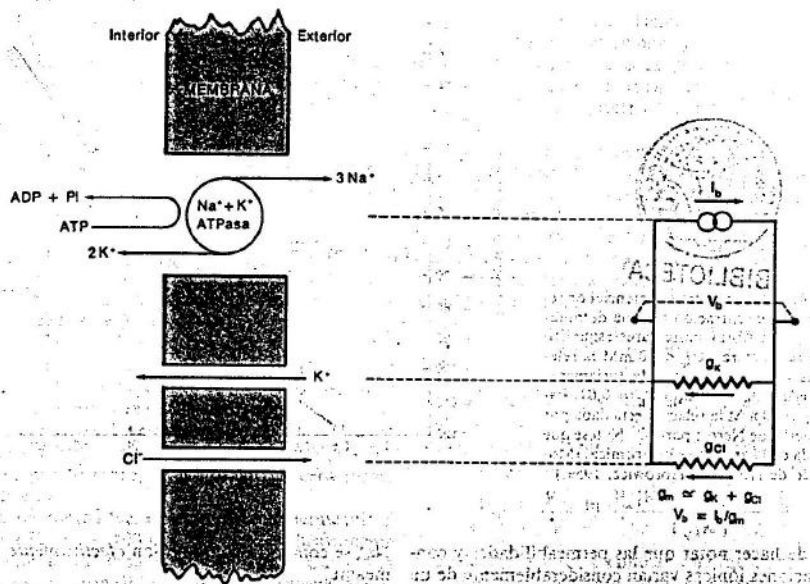
La ausencia de moléculas o iones efectivamente impermeantes (normalmente Na^+) en el medio celular conduce inevitablemente a la entrada en la célula, con la consiguiente despolarización (reducción de $[K]_i$), distensión y eventual ruptura de la membrana plasmática.

La ouabaina, un inhibidor específico de la actividad por Na^+ y K^+ de la membrana plasmática (véase Cap. I-2), bloquea un 70-80 % del flujo reccional de salida de Na^+ en el axón gigante de mar (Baker *et al.*, 1969; De Weer, 1970) y en el músculo sartorio de rana (Horowitz *et al.*, 1969). Debe tenerse en cuenta que la porción no ir por ouabaina de ninguna manera represente un flujo pasivo de Na^+ . En el músculo de rana, por ejemplo, alrededor del 40 % del flujo de salida es por un mecanismo de intercambio de Na^+ exterior por Na^+ intracelular, y del resto (10 %), el flujo residual, 1/10 sería estrictamente pasivo (De Weer, 1970), mientras que se desconoce el mecanismo de los 9/10 restantes.

Mediante el uso de ouabaina tritioada (ouabaina se ha estimado la densidad de bombeo de sodio en la membrana de diversas células, musculares y nerviosas. El número de bombas por μ m² en la mayoría de las fibras nerviosas y musculares estudiadas es del orden de 1000.

El acople entre los flujos activos de Na^+ y K^+ se debe a que la actividad de la bomba de $Na^+ - K^+$ depende de la actividad de la bomba de Na^+ .

En el músculo de rana el reemplazo mol a mol de Na^+ por K^+ previene la entrada de agua en las fibras puesto que la deshidratación de la membrana producida por el aumento de $[K]_i$ es una fuerza impulsora hacia adentro sobre el Cl^- (que antes bio estaba en equilibrio). La entrada de Cl^- , por razones de neutralidad, irá acompañada por la de K^+ . Es decir que esto aumentará la presión osmótica intracelular provocando la entrada de agua y el consiguiente aumento de volumen de las fibras musculares, el volumen de las fibras depende exclusivamente de la actividad de la bomba de $Na^+ - K^+$ y es inversamente proporcional a ésta (Boyle y Conway, 1941).



Esquema de una bomba electrogénica de $\text{Na}^+\text{-K}^+$, donde por cada molécula de ATP hidrolizada se transportan 3 hacia el medio extracelular y 2 iones de potasio hacia el medio intracelular. Esta transferencia neta de una carga hacia el medio exterior (una corriente eléctrica) en cada ciclo de la bomba puede representarse por una fuente de e constante (∞). La corriente generada por la bomba (I_b) para circular lo debe hacer a través de un circuito cerral se completa con las conductancias al K^+ (g_K) y al Cl^- (g_{Cl}), las cuales representan prácticamente la totalidad de la ancia de la membrana g_m ($g_m = g_K + g_{Cl}$) en reposo. De acuerdo con la ley de Ohm, se tiene que $V_m = I_b / g_m$. En encia V_m aumentará con la velocidad de bombeo (aumento de I_b) y con la disminución de g_m (por disminución de g_{Cl}). En condiciones normales, en la mayoría de las células $V_m = 1-2$ mV.

de K^+ hacia adentro a través de la bomba de K^+ en la mayoría de las células excitables par-electrogénico (véase Cap. 1-2), es decir que por olécula de ATP hidrolizada por la bomba, ésportaría un número mayor de iones Na^+ hacia que de iones K^+ hacia adentro. La relación aría con las condiciones y el tipo de célula. ón de calamar, el valor de dicha relación es nadamente 2 (Sjodin y Beaugé, 1968), is que en el músculo de rana con alto conteni- Na^+ es de alrededor de 1,5 ($3\text{Na}^+ / 2\text{K}^+$) (Sjodin , 1975). Esto implica que la bomba transporta positivas desde el interior al exterior de las cé- Este flujo de carga a través de la membrana tuye una densidad de corriente I_b io cm^2). Por lo tanto, si se considera la tancia ($1/\text{resistencia}$) por unidad de área de ana, g_m ($\text{S} \cdot \text{cm}^2$), de acuerdo con la ley n habrá de generarse una diferencia de poten- I_b / g_m que tenderá a hacer el interior de la más negativo. V_m se sumará así al potencial de- do por la distribución transmembrana de Na^+ , y sus respectivas permeabilidades de acuerdo ecuación de GHK (ecuación 3). ralmente, V_m será tanto mayor cuanto más al- nidad de conductancia es el siemens ($\text{S} =$)

ta sea la velocidad de bombeo (es decir I_b) y menor g_m . La fig. 3-5 esquematiza el mecanismo de una bom- ba electrogénica. En condiciones normales, la contribución directa de la bomba (V_b) al potencial de reposo (E_m) es pe- queña (1 a 2 mV) y por lo tanto, difícilmente detec- table. Pero en condiciones experimentales, donde el bombeo es estimulado por ejemplo, por aumento de $[\text{Na}^+]_i$, tanto en fibras musculares como en neuronas es posible observar hiperpolarizaciones del orden de 10 a 40 mV, inhibibles por ouabaina (Fru- mento, 1965; Adrian y Slayman, 1966; Thomas, 1969). Dichas hiperpolarizaciones, particularmente las más pronunciadas, difícilmente podrían ser debi- das a una bomba electroneutra ($1\text{Na}^+ / 1\text{K}^+$) que pro- duciera una caída de $[\text{K}^+]_o$ en contacto con la cara ex- terna de la membrana plasmática y la consiguiente hip- erpolarización que cabría esperar por dicho cambio de acuerdo con la ecuación de GHK. Debe tenerse en cuenta que de la actividad de la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, sea neutra o electrogénica, dependerá el manteni- miento de los gradientes de concentración de K^+ y Na^+ y, por ende, el potencial de reposo. Pero una bomba electrogénica, por generar una corriente hacia afuera, contribuirá además directamente al potencial de reposo. Aunque, como ya dijimos, dicha con- tribución en condiciones normales es modesta.

Propiedades eléctricas de la membrana celular

Actualmente se tiene una idea bastante detallada de las propiedades eléctricas de la membrana, particularmente de células excitables. Como veremos en- seguida, la membrana de un axón o de una fibra mus- cular puede describirse en términos de su resistencia, capacidad, constantes de tiempo y longitud, etcétera.

¿Cómo se llegó al desarrollo de modelos eléctricos de la membrana? A fines del siglo pasado se hicieron las primeras mediciones de las propiedades eléctricas de tejidos. Se vio, por ejemplo, que: a) la resistencia de los tejidos vivos al pasaje de una corriente conti- nua era considerablemente más alta que la de los teji- dos muertos o la de los líquidos corporales, y b) la re- sistencia de la sangre aumentaba con el aumento de la concentración de glóbulos rojos y cuando éstos se he- molizaban, la resistencia caía a niveles similares a los del plasma. Estas, entre otras muchas observaciones, indicaron claramente que la resistencia de las células al pasaje de corriente reside principalmente en la membrana (Cole, 1968).

Los valores de resistencia de membrana en distin- tos tipos de fibras nerviosas y musculares varían entre 500 y $5000 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

La conductancia ($1/\text{resistencia}$) de la membrana plasmática es unas 10^{-7} veces menor que una capa del mismo espesor de cualquiera de las disoluciones con las que están en contacto.

Una ventaja inmediata de la baja conductancia (baja permeabilidad iónica) de la membrana celular es el ahorro en la utilización de energía metabólica destinada a mantener, entre otros, los gradientes transmembrana de Na^+ y K^+ mediante la acción de la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$.

La imagen que tenemos actualmente de la membrana plasmática está basada en el modelo de Singer y Nicolson (1972). En dicho modelo, los lípi- dos están ordenados en una bicapa fluida con sus grupos polares hidrofílicos orientados hacia las caras de la membrana y sus cadenas hidrocarbonadas hidrófobas hacia el interior de aquélla. Las proteínas constituyen un 60 % de la membrana. Algunas de ellas, denominadas intrínsecas, se encuentran inmer- sas en la matriz lipídica y son suficientemente gran- des como para ponerse en contacto con las disolu- ciones que bañan ambas caras de la membrana. Es

muy probable que, este tipo de proteínas formen ca- nales acuosos por donde los iones atraviesan la membrana, y las mediciones de resistencia indican la facilidad con que ese pasaje tiene lugar cuando se aplica una diferencia de potencial a través de la membrana (véase fig. 1-1).

Cuando en lugar de corriente continua se emplea una corriente alterna para determinar la resistencia, en este caso impedancia, de una porción de un tejido, se comprueba que al aumentar la frecuencia de la corriente dicha resistencia disminuye hasta hacerse prácticamente igual a la de los medios intra y extracel- ulares. Este comportamiento es característico de los circuitos que tienen condensadores y resistencias en paralelo.

La fig. 3-6 muestra un modelo eléctrico elemental de la membrana celular basado en sus propiedades eléctricas pasivas.

Los lípidos son excelentes dieléctricos (en cierto ti- po de condensadores el dieléctrico es aceite), de mo- do que el sistema formado por la bicapa lipídica y las disoluciones intra y extracelulares (las cuales, como vimos, son comparativamente buenos conductores) constituye un condensador. La capacidad de un con- densador es inversamente proporcional a la distancia entre sus placas, es decir, al espesor del dieléctrico. En el caso de las membranas biológicas ese espesor es de 75 \AA . Esta pequeña distancia hace que la capaci- dad de membranas celulares de muy distinto origen, entre ellas las de las células excitables, sea del orden de $1 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^2$, un valor considerablemente alto si se lo compara con los de los condensadores manufac- turados por el hombre.

Es de hacer notar que una diferencia de 70 a 90 mV a través de una membrana de alrededor de 75 \AA de espesor representa un gradiente de potencial o campo eléctrico del orden de $10^8 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$.

En la fig. 3-6 se muestran los canales correspon- dientes al Na^+ , K^+ y Cl^- con sus respectivas conduc- tancias y potenciales de equilibrio. Aunque perme- ability y conductancia ($= 1/\text{resistencia}$), no son estrictamente sinónimos, ambas magnitudes son una medida de la permisividad de la membrana para el pasaje a su través de una especie iónica. Así, la densi- dad de corriente llevada por el ion j (I_j) es directa- mente proporcional a la fuerza impulsora que actúa sobre el mismo, la cual, como vimos anteriormente,

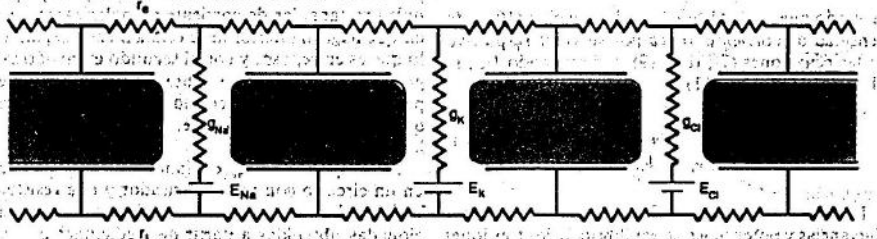
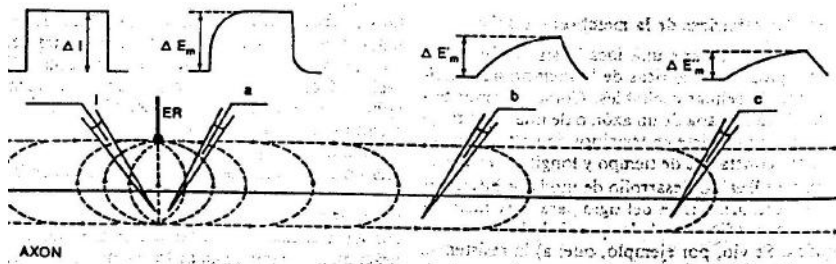


Fig. 3-6. Circuito equivalente de la membrana celular. r_e y r_i representan la resistencia del medio extracelular e intracelular, respectivamente. Los canales acuosos para el movimiento pasivo de Na^+ , K^+ y Cl^- están representados por las conductancias g_{Na} , g_{K} y g_{Cl} en serie con las baterías que representan los potenciales de equilibrio de cada uno de ellos. Los condensadores en paralelo con las conductancias representan la capacidad de la membrana.



La inyección de una corriente despolarizante (ΔI) en un axón mediante un microelectrodo (i) produce una despolarización ΔE_m en el sitio de inyección que es registrada por otro microelectrodo en la posición a. La corriente inyectada entre la punta del microelectrodo i y el electrodo extracelular de referencia ER a través de la membrana, y su densidad representada por el número de líneas de trazos que atraviesan la membrana por unidad de longitud disminuye con la distancia a al sitio de inyección, dado que a medida que circula por el axoplasma, parte de la misma escapa a través de la membrana hacia ER. La resistencia por unidad de área es la misma en cualquier lugar del axón; luego, por la ley de Ohm ($V = IR$) ΔE_m será directamente proporcional a la densidad de corriente y por lo tanto disminuirá con la distancia al sitio de inyección (ΔE_m en b; ΔE_m en c).

ida por $E_m - E_j$, y a la conductancia de g_j de tal que:

$$I_j = g_j (E_m - E_j) \quad (6)$$

g_j representa la conductancia de j por cm^2 de área y E_j su potencial de equilibrio. Cuando $E_j = E_m$, $I_j = 0$; esto es coherente con lo ya visto respecto al flujo neto de un ion (J_j): j está en equilibrio con la membrana cuando la fuerza impulsora ($E_m - E_j = 0$) y por lo tanto, J_j es cero. La ley de Ohm no es casual ya que $I_j = zFJ_j$. Las densidades de las corrientes de K^+ , Na^+ y Cl^- de acuerdo con la ecuación (6):

$$I_K = g_K (E_m - E_K) \quad (7)$$

$$I_{Na} = g_{Na} (E_m - E_{Na}) \quad (8)$$

$$I_{Cl} = g_{Cl} (E_m - E_{Cl}) \quad (9)$$

En condiciones de reposo E_m es constante y por lo tanto la densidad de corriente total I_T debe ser cero,

$$I_T = I_K + I_{Na} + I_{Cl} = 0 \quad (10)$$

o que, reemplazando en la ecuación (10) cada una de las corrientes iónicas por su valor respectivo de las ecuaciones (7), (8) y (9), y despejando E_m , se obtiene la ecuación (11):

$$E_m = \frac{g_K E_K + g_{Na} E_{Na} + g_{Cl} E_{Cl}}{g_K + g_{Na} + g_{Cl}} \quad (11)$$

La ecuación (11) expresa E_m en función de las concentraciones y potenciales de equilibrio de los tres iones permeantes. Anteriormente vimos (ecuación 3) que E_m puede expresarse en términos de las permeabilidades y concentraciones intra y extracelulares de los iones. Una forma sencilla de mostrar la

congruencia entre las ecuaciones (2) y (11), es considerar dos situaciones: a) supóngase el caso de una membrana exclusivamente permeable a una especie iónica, K^+ , por ejemplo. Es claro que ambas ecuaciones conducen al mismo resultado: $E_K = (RT/F) \ln ([K^+]_o / [K^+]_i)$; b) si uno de los iones está en equilibrio, los términos correspondientes al mismo pueden eliminarse en la ecuación (11) sin alterar el E_m calculado con los términos correspondientes a los tres iones. Por ejemplo, si Cl^- estuviese en equilibrio ($E_m = E_{Cl}$), la ecuación (11), como se demuestra en el Apéndice 3, se reduce a:

$$E_m = \frac{g_K E_K + g_{Na} E_{Na}}{g_K + g_{Na}} \quad (12)$$

Anteriormente vimos también que en el caso de Cl^- en equilibrio, los términos correspondientes al mismo se pueden eliminar de la ecuación GHK sin que cambie E_m (véanse ecuaciones 3 y 4).

Propiedades de cable

Consideremos un axón o una fibra muscular la cual es penetrada por dos microelectrodos separados por una distancia tan pequeña como sea posible. Si por uno de los microelectrodos se inyecta un pequeño pulso rectangular de corriente despolarizante, es decir que haga al interior de la célula menos negativo de lo que es en reposo, y con el segundo electrodo se registra el cambio de E_m ; se observará que el curso temporal del mismo será considerablemente más lento que el del pulso de corriente. Esto se esquematiza en la fig. 3-7.

Esa respuesta de E_m es similar a la que se observa en un circuito con un condensador y una resistencia en paralelo y corrobora las conclusiones antes mencionadas obtenidas a partir de mediciones de impedancia utilizando corriente alterna.

Otra característica del cambio de potencial, ΔE_m , producido por inyección de corriente a la célula, llamado clásicamente potencial electrotrónico, e ilustra-

do en la fig. 3-7, es que la magnitud del mismo disminuye con la distancia al sitio de aplicación de la corriente. Como lo indican las líneas de trazos en la fig. 3-7, la corriente tiende a fluir por el citoplasma cuya resistencia (r_i) es baja, pero a medida que avanza parte de la misma se pierde hacia el exterior a través de la membrana, la cual tiene una resistencia (r_m) que, como se vio antes, es relativamente alta pero, por supuesto, no infinita. Es claro que cuanto más lejos se esté del sitio de inyección, menor será la densidad de corriente transmembrana (I_m), y como r_m es constante a lo largo de la fibra, de acuerdo con la ley de Ohm ($\Delta E_m = I_m r_m$) ΔE_m irá disminuyendo con la distancia desde el sitio de inyección. Esta reducción es exponencial y está dada por la siguiente expresión:

$$\Delta E_m = \Delta E_{m_0} e^{-x/\lambda} \quad (13)$$

donde ΔE_m es el cambio en E_m a la distancia x del sitio de inyección de corriente, ΔE_{m_0} es el cambio de E_m a $x = 0$ (en el sitio de inyección de corriente), mientras que λ , es la constante de longitud cuyo valor depende del tipo de célula, razón por la cual también se la denomina longitud característica. Se ve que cuando $x = \lambda$, resulta:

$$\Delta E_m = \Delta E_{m_0} \cdot e^{-1} = \Delta E_{m_0} \cdot 0,37$$

Es decir que λ es la distancia a la cual el valor de ΔE_m cae a un 37% del que tiene a $x = 0$ (fig. 3-8).

La longitud característica es una función de la resistencia de la membrana plasmática del axón (o fibra muscular) y de la del medio intracelular, de modo tal que:

$$\lambda = \sqrt{R_m / R_i} = \sqrt{r_m a / 2r_i} \quad (14)$$

donde R_m (en $\Omega \cdot cm$) y R_i (en $\Omega \cdot cm^{-1}$) representan la resistencia de la membrana y del citoplasma

respectivamente por unidad de longitud; y r_m es la resistencia por unidad de área de membrana ($\Omega \cdot cm^2$); r_i es la resistencia específica del citoplasma ($\Omega \cdot cm$) y a el radio del axón. *

Para ver cómo la resistencia de la membrana afecta el valor de E_m en función de la distancia, x, al sitio de inyección de corriente, consideremos el caso de dos axones A y B, idénticos en todo respecto, excepto que la resistencia de la membrana por unidad de área de B es doble ($2r_m$) de la de A (r_m). Esto implica que λ_B será 1,41 veces mayor que λ_A ($\lambda_B / \lambda_A = \sqrt{2r_m / r_m} = \sqrt{2} = 1,41$) (véase fig. 3-8). Por otra parte, si consideramos un axón C, cuyo radio es el doble del de A pero idéntico a éste en todo respecto, también será $\lambda_C / \lambda_A = 1,41$ ($\lambda_C / \lambda_A = \sqrt{2a/a} = \sqrt{2} = 1,41$). La relación entre ΔE_m y x en el caso del axón C se ilustra en la fig. 3-8 y coincide con la del axón B. Es decir que tanto la duplicación del radio como la de r_m (sin cambio de radio) producen un incremento de λ del 41%. Intuitivamente se ve, con la ayuda de la fig. 3-7, que ΔE_m decaerá tanto menos cuanto más se facilite el flujo de corriente por el axoplasma (aumentando su sección, por ejemplo) y cuanto menos corriente se pierda a través de la membrana (cuanto más alta sea r_m). A igualdad de otros factores, en una fibra nerviosa miélica (mayor r_m) λ será mayor que en una amielínica.

La constante de longitud de diversos axones y fibras musculares es de sólo unos pocos milímetros. Así, por ejemplo, en fibras musculares esqueléticas de rana λ es del orden de 2 mm, mientras que en el axón gigante de calamar es de unos 5 mm.

De lo dicho hasta aquí queda claro que el potencial electrotrónico es un medio totalmente ineficaz para transmitir mensajes en forma de una alteración del potencial de membrana, aun sobre distancias que representen una fracción muy pequeña de la longitud total de una fibra muscular o nerviosa.

* $R_m = r_m / 2\pi a$ y $R_i = r_i / \pi a^2$; por lo tanto, $R_m / R_i = r_m a / 2r_i$.

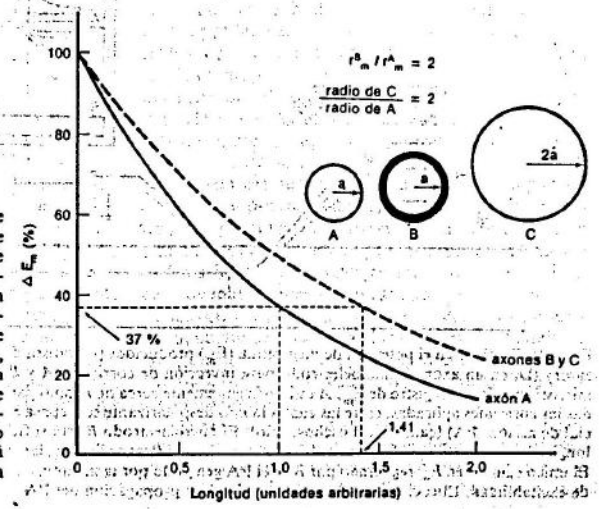


Fig. 3-8. Si en un experimento como el de la figura 3-7 se grafica ΔE_m en función de la distancia al sitio de inyección de corriente, se obtiene una curva exponencial tal que $\Delta E_m = \Delta E_{m_0} e^{-x/\lambda}$ (ecuación 13). El axón B, cuya resistencia por unidad de área de membrana (r_m) es doble de la del axón A y su radio igual al de A, tendría una constante de longitud (λ) (a igualdad de r_i) 1,41 veces mayor que la de A ($\lambda_B / \lambda_A = \sqrt{2} = 1,41$). El axón C, cuyas r_m y r_i son idénticas a las de A pero cuyo diámetro es doble del de A, tendrá también una λ 1,41 veces mayor que la de A.

El problema de la transmisión de mensajes a distancia en un axón es cualitativamente similar al que se presenta con el caso de la transmisión de mensajes sobre grandes distancias a través de un cable formado por dos alambres conductores, el cual desde un punto de vista eléctrico es análogo a un axón. Es decir, los alambres representan los medios conductores intra y extracelulares, mientras que el material aislante que los separa es el equivalente de la membrana. La resistencia del metal conductor del cable es mucho menor que la resistencia del axoplasma, y la del medio aislante (plástico) es mucho mayor que la de la membrana del axón. Esto hace que en un cable, la fracción de la corriente circulante por uno de los conductores que *escapa* a través del aislante regresando a la fuente por el otro conductor antes de llegar a su destino, sea muchísimo menor que en el axón. En un cable, λ se mide en kilómetros pero también las distancias sobre las cuales se transmiten mensajes por cable son de muchos kilómetros. La atenuación de la señal en un cable se soluciona mediante el uso de estaciones colocadas a intervalos adecuados a lo largo del mismo, que restituyen la señal a su forma y amplitud originales. Es así como antes del empleo de satélites de comunicaciones, un mensaje originado en este lado del Atlántico podía ser recibido en Europa mediante un cable trasatlántico sin mayor distorsión. En el caso del axón la transmisión de una señal, sin atenuación, se debe a la capacidad de las células excitables de generar un *potencial de acción* en respuesta a un estímulo adecuado.

Potencial de acción

Cuando se altera V_m en un axón mediante la inyección de un pulso rectangular de corriente hiperpolarizante, el cambio en E_m aumenta con la magnitud del pulso de corriente, y ambos ocurren en forma local y

simultáneamente. Para pulsos de corriente despolarizantes relativamente pequeños, los cambios de E_m son simétricos con los producidos por las corrientes hiperpolarizantes, pero cuando se sobrepasa cierto nivel crítico de despolarización, la misma se torna incontrolable, acelerándose, y después de llegar a un valor máximo retorna espontáneamente al E_m de reposo. A esta perturbación transitoria de V_m que se produce al llegar a un nivel crítico llamado *umbral* y que se propaga a lo largo del axón sin atenuación como una onda de amplitud constante y una duración de 1-2 ms, se la llama *potencial de acción* (fig. 3-9).

La capacidad de producir potenciales de acción se denomina *excitabilidad*. Son células excitables por excelencia las neuronas y las fibras musculares esqueléticas y cardíacas.

Antes del advenimiento de técnicas que permitieran la inserción de microelectrodos en el interior de las células se suponía, de acuerdo con la hipótesis de Bernstein, que durante el potencial de acción la membrana perdía su selectividad al K^+ despolarizándose. Lo que en realidad ocurre es que el valor de E_m , que en reposo es negativo, se invierte durante el potencial de acción haciéndose positivo. La figura 3-10 muestra las características de un potencial de acción en un axón registrado por dos electrodos intracelulares, uno, *a*, cerca del sitio de aplicación del estímulo (200 ó 300 μm , por ejemplo), y el otro, *b*, a 2 ó 3 cm de *a*. La única diferencia entre *a* y *b* es que en *a*, por la cercanía al sitio del estímulo, se ve la despolarización local o potencial electrotonico, el cual al llegar al umbral *U* genera la rápida fase de despolarización (FD) del potencial de acción. Si la despolarización producida por el estímulo es subumbral no habrá potencial de acción, mientras que despolarizaciones supraumbrales generarán un potencial de acción cuya amplitud y duración son independientes de la intensidad del estímulo. A esa propiedad, típica de las fibras

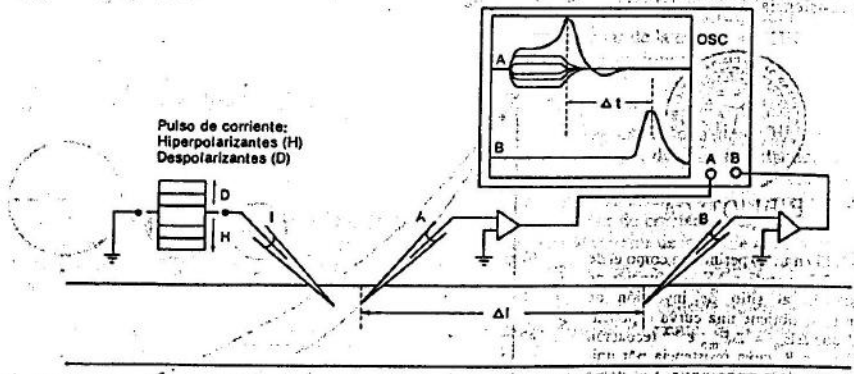


Fig. 3-9. Cambios en el potencial de membrana (E_m) producidos por pulsos de corriente hiperpolarizantes (H) y despolarizantes (D) en un axón. *I*, microelectrodo para inyección de corriente; *A* y *B*, microelectrodos de registro de E_m . *A* y *B*, microelectrodos de registro de E_m . *A* está suficientemente cerca de *I* como para registrar cambios en E_m producidos por todas las corrientes aplicadas, entre las cuales la más despolarizante sobrepasa el umbral de excitación produciendo un potencial de acción (PA) (canal *A* del osciloscopio). El microelectrodo *B* está suficientemente alejado de *I* (varias constantes de longitud), como para que E_m se vea alterado por las corrientes aplicadas, las cuales producen perturbaciones locales de E_m . El único cambio en E_m registrado por *B* es el PA generado por la máxima corriente despolarizante al sobrepasar el umbral de excitabilidad. El cociente $\Delta t/\Delta t$ es la velocidad de propagación del PA.

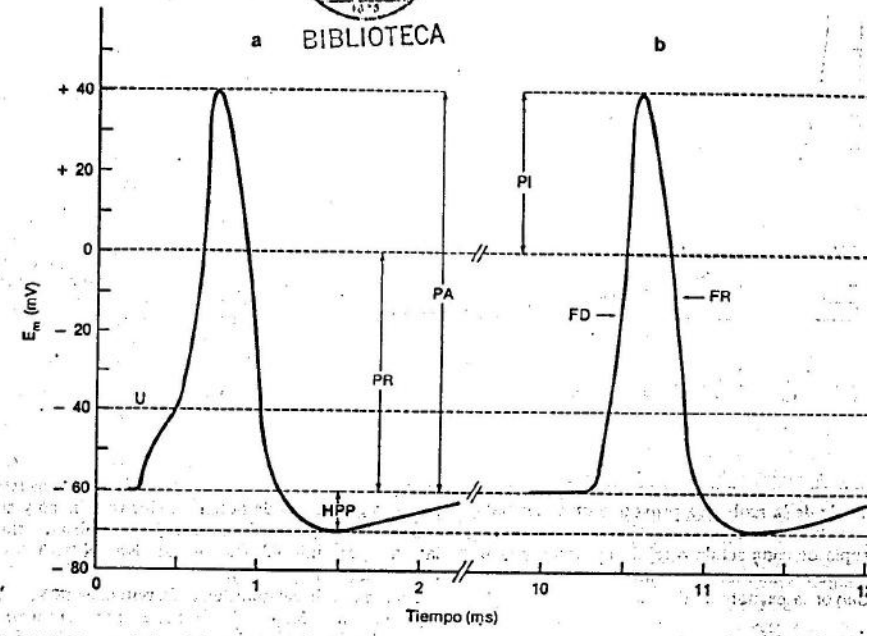


Fig. 3-10. Características del potencial de acción (PA) en un axón. El PA *a* fue registrado cerca del sitio de estimulación despolarización lenta inicial es producida por el estímulo que, al alcanzar el umbral (U), da lugar a la fase de despolarización FD del PA. En *b* se representa PA en un sitio alejado del de estimulación. PR: potencial de reposo; PI: potencial vertido (interior de la célula positivo respecto del exterior); FR: fase de repolarización; HPP: hiperpolarización pospotencial.

nerviosas y musculares esqueléticas, se la conoce como *ley del todo o nada*. No siempre una despolarización supraumbral producirá un potencial de acción. Si la despolarización se lleva a cabo con suficiente lentitud, podrá sobrepasarse el valor umbral sin que se produzca un potencial de acción. A este fenómeno se lo llama *acomodación* y sus causas se exponen más adelante. Por otra parte, si dos estímulos subumbrales se aplican en rápida sucesión, pueden generar un potencial de acción. Es lo que se denomina *sumación temporal*.

La amplitud del potencial de acción (PA) y el potencial de reposo (E_m) registrados por ambos electrodos en la fig. 3-10 son idénticos, indicando que en reposo la célula es isopotencial y que el potencial de acción se propaga sin atenuación a lo largo de la fibra. La porción del mismo por encima de 0 mV (alrededor de 40 mV, depende del tipo de célula) se denomina *potencial invertido* (PI), en tanto que la hiperpolarización transitoria que sigue a la fase repolarizante (FR) del potencial de acción es el *potencial positivo* o, poniéndolo en términos más descriptivos, *hiperpolarización pospotencial* (HPP). Si se aplica un estímulo a una porción de membrana donde se está generando un potencial de acción, no se producirá

una nueva respuesta, cualquiera sea la intensidad del estímulo. A este periodo se lo llama *periodo refractario absoluto* (PRA) y se prolonga aproximadamente hasta el final de la fase de repolarización. De adelante continúa el *periodo refractario relativo* (PRR), llamado así porque estímulos de mayor intensidad que la umbral, aplicados durante dicho periodo, pueden generar un nuevo potencial de acción. El PRA pone un límite a la frecuencia con que una célula excitable puede ser estimulada. El mecanismo del periodo refractario (PRA + PRR) se describe más adelante en relación con la activación e inactivación de las corrientes iónicas que tienen lugar durante el potencial de acción.

Un estímulo (corriente despolarizante) capaz de producir un potencial de acción debe tener cierta intensidad y duración. Por ejemplo, un estímulo intenso puede ser ineficaz si el tiempo de aplicación es demasiado breve, mientras que otro menos intenso pero de mayor duración podrá generar un potencial de acción. En general, cuanto más débil sea un estímulo, mayor deberá ser su duración para producir un potencial de acción. La fig. 3-11 muestra la relación intensidad-umbral del estímulo *versus* tiempo de aplicación del mismo. A la mínima intensidad de corriente capaz de generar un potencial de acción, se la denomina *reobtronicidad*, mientras que el tiempo necesario para obtener una respuesta es el *tiempo de utilización*. Por otra pa

* Llamado así porque en la nomenclatura (ahora obsoleta) que introdujo la denominación, una hiperpolarización se tomaba como positiva.

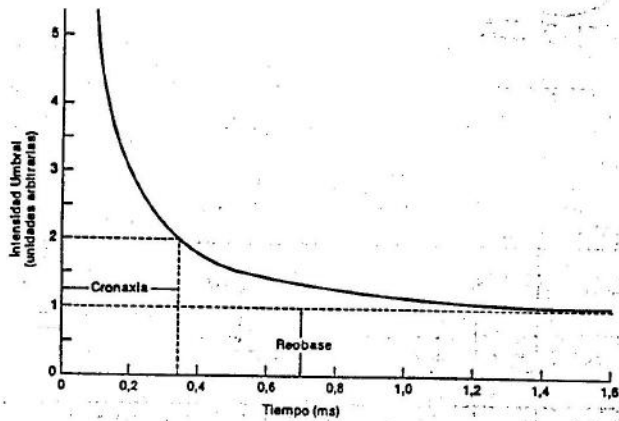


Fig. 3-11. Curva intensidad umbral del estímulo versus duración del estímulo en un axón. Nótese que la aplicación de un estímulo de intensidad menor que la reobásica, por prolongado que fuere, no podrá generar una respuesta. Por otra parte, un estímulo, para generar una respuesta, deberá durar un tiempo mínimo, por debajo del cual no se obtendrá respuesta, cualquiera que fuere su intensidad (ver texto).

el tiempo necesario para que un estímulo de intensidad doble de la reobásica provoque un potencial de acción es la *cronaxia*. La cronaxia es una característica propia de cada célula o tejido excitable y es una medida de excitabilidad: cuanto más breve la cronaxia, mayor la excitabilidad.

Bases iónicas del potencial de acción

A principios de este siglo, Overton observó que el músculo esquelético de rana perdía su excitabilidad en presencia de disoluciones isotónicas con menos del 10 % de su contenido normal de NaCl. El hecho de que el reemplazo de Cl⁻ por otros aniones no afectara la excitabilidad fue una clara indicación de que, de los dos iones, el Na⁺ era el que desempeñaba un papel principal en los fenómenos excitables.

En la fig. 3-10 se ve que durante el potencial de acción, E_m se aleja de E_K y se acerca a E_{Na} en forma transitoria. La simple inspección de la ecuación (3) sugiere que el desplazamiento de E_m hacia E_{Na} podría deberse a: 1) un aumento de la permeabilidad al Na⁺ (P_{Na}); 2) una disminución de P_K; o 3) ambas cosas. Si se considera la expresión 12 es también evidente que tanto un aumento de g_{Na} como una reducción de g_K, en forma aislada o simultánea, conducirán al desplazamiento de E_m hacia E_{Na}. La no participación de cambios de g_{Cl} en la producción del potencial de acción se explica porque aun si ocurrieran, por estar el Cl⁻ prácticamente en equilibrio (E_m = E_{Cl}), esos cambios no alterarían el potencial de reposo.

Mediante análisis químicos, en las investigaciones iniciales, y más tarde el uso de isótopos radiactivos de Na⁺ y K⁺ (²²Na⁺ y ⁴²K⁺), pudo comprobarse que durante el potencial de acción en la mayoría, aunque no en todas las células excitables, se produce una entrada neta de Na⁺ y una salida neta de K⁺ (en reposo la suma de los flujos unidireccionales activos y pasivos de cada uno de los iones es cero). Esto último descarta la posibilidad de que el desplazamiento de E_m hacia E_{Na} se deba a una disminución de P_K (o g_K). Más aún, tanto la entrada de Na⁺ como la salida de K⁺ implican un aumento de P_{Na} y P_K, por cuanto

ambos flujos son pasivos: ocurren a favor de sus respectivos gradientes de potencial electroquímico y no son afectados por inhibidores del metabolismo celular ni por inhibidores de la Na⁺K⁺-ATPasa (ouabaina, por ejemplo).

En el axón de calamar, en cada potencial de acción ingresan unos 3,5 × 10⁻¹² moles por centímetro cuadrado de membrana y sale una cantidad similar de K⁺.

Hay que considerar que la cantidad mínima de carga (ΔQ) positiva que deberá ser transferida desde el exterior al interior de la membrana para llevar E_m desde aproximadamente -60 mV (axón de calamar *in vitro*) a alrededor de +40 mV (pico de potencial de acción), será la necesaria para cambiar el potencial de la capacidad (C_m) de la misma en 100 mV (40 - (-60) = 100 mV). La relación entre ΔQ, C_m y E_m es: ΔQ = C_m ΔE_m = 10⁻⁷ F/cm² × 100 × 10⁻³ V = 10⁻⁷ culombios/cm². Y teniendo en cuenta que la carga de 1 mol de Na⁺ es de 96.500 culombios (constante de Faraday), el número mínimo de moles de Na⁺ a transferir será entonces:

$$(10^{-7} \text{ culombios cm}^{-2}) (96.500 \text{ culombios mol}^{-1})^{-1} = 10^{-12} \text{ moles cm}^{-2}$$

Es decir que la entrada de Na⁺ por potencial de acción excede holgadamente el requerimiento mínimo. En cuánto aumenta [Na⁺]_i por la entrada de Na⁺ en cada potencial de acción? Para un axón de 200 μm de radio cuya [Na⁺]_e es 50 mM, el volumen del mismo correspondiente a 1 cm² de membrana contendrá 5 × 10⁻⁷ moles de Na⁺. Si la entrada de Na⁺ por potencial de acción es de 3,5 × 10⁻¹² M cm⁻², esto representará un aumento de [Na⁺]_i en dicho axón de (3,5 × 10⁻¹²) / (5 × 10⁻⁷) = 7 × 10⁻⁴ % por potencial de acción.

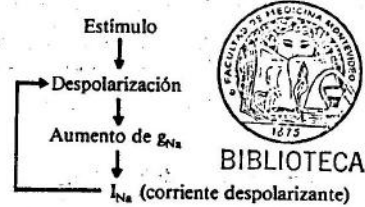
El desplazamiento de E_m desde su nivel de reposo hasta un valor cercano a E_{Na} en el pico del potencial de acción, difícilmente podría ocurrir si los aumentos

de P_{Na} y P_K ocurrieran simultáneamente, puesto que ambos tienden a desplazar E_m en sentidos opuestos: el aumento de P_{Na} hacia E_{Na} (despolarización) y el de P_K hacia E_K (hiperpolarización).

En realidad P_{Na} y P_K aumentan transitoriamente en forma secuencial, primero P_{Na} y luego P_K. Naturalmente, si en el pico del potencial de acción V_m → E_{Na} = (RT/F) ln ([Na⁺]_i/[Na⁺]_e) cabe suponer que una disminución del [Na⁺]_i reducirá la amplitud del potencial de acción. Esto en efecto es así, como lo ilustra el experimento de la fig. 3-12.

Si se altera [Na⁺]_i, manteniendo [Na⁺]_e constante, los cambios en V_m son coherentes con los que se muestran en la fig. 3-12 (Baker *et al.*, 1962). Es decir que aumentar [Na⁺]_i es equivalente a reducir [Na⁺]_e, puesto que E_{Na} es función del cociente [Na⁺]_i/[Na⁺]_e. El aumento de P_K luego del de P_{Na} cuando E_m está cerca de E_{Na}, y la fuerza impulsora sobre el K⁺ (E_m - E_K), que es grande y hacia afuera, determinan la salida de K⁺. La entrada de Na⁺ y la salida de K⁺ constituyen dos corrientes: despolarizante la de Na⁺ (cargas positivas moviéndose hacia adentro), y repolarizante la de K⁺ (cargas positivas moviéndose hacia afuera).

El aumento de g_{Na} producido por un estímulo despolarizante capaz de generar un potencial de acción puede esquematizarse así:



Este es un proceso de tipo regenerativo en el cual la despolarización producida por el estímulo aumenta g_{Na} y la subsecuente corriente de Na⁺ (I_{Na}) despolariza aún más la membrana, lo cual a su vez incrementa g_{Na}. En principio este proceso debería detenerse cuando E_m = E_{Na}, es decir cuando el Na⁺ está en equilibrio y por lo tanto I_{Na} = g_{Na} (E_m - E_{Na}) = 0.

Cuando la despolarización es suficiente (cerca del pico del potencial de acción) se produce el aumento de g_K y la correspondiente I_K que repolariza la membrana.

En 1952, Hodgkin y Huxley publicaron una brillante serie de experimentos, realizados con la técnica del potencial controlado, los cuales develaron la relación entre g_{Na}, g_K, E_m y tiempo, lo que les permitió explicar, además del mecanismo del potencial de acción, otras propiedades de las células excitables, tales como el potencial umbral, el período refractario y la propagación del potencial de acción.

Corrientes de Na⁺ y K⁺

De acuerdo con lo visto anteriormente (ecuación 6), la densidad de la corriente del ion j a través de la membrana es j = g (E_m - E_j). Durante el potencial de acción hay cambios transitorios de I_{Na}, I_K, g_{Na} y g_K, que son potencial y tiempo-dependientes. La

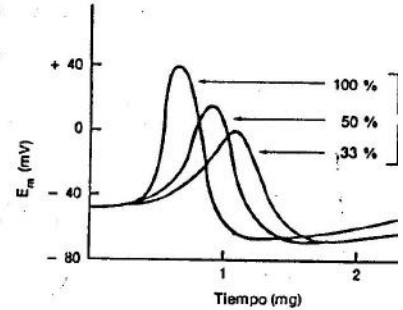


Fig. 3-12. Potencial de acción en un axón de calamar en presencia de 100, 50 y 33 % de [Na⁺]_e (ver texto). (Módulo de Hodgkin, Katz, 1949.)

técnica del potencial controlado permitió a Huxley y Katz (1952) y a Hodgkin y Huxley (b, c, d) determinar cómo evolucionaban las conductancias y las corrientes iónicas cuando se altera el potencial de reposo, en forma de escalón, el valor de E_m lo mantenía fijo en el nuevo valor. Para ello se utilizó: a) una célula suficientemente grande como poder colocar en su interior electrodos metálicos en un axón gigante de calamar con un diámetro del de 300-1000 μm, y b) un sistema electrónico de medición negativa capaz de mantener E_m en un valor determinado, corrigiendo cualquier desvío del mismo en términos de 1 μs (potencial controlado).

En la fig. 3-13 se muestra el comportamiento de la densidad de corriente iónica (I_j) cuando a la membrana se le impone una despolarización de 56 mV, pasando E_m desde -65 a -9 mV. I_j es bifásica: inicialmente, se dirige en forma transitoria de I_{Na} hacia dentro del axón (corriente inicial) y luego a I_K hacia fuera (corriente opuesta, manteniéndose en un valor constante mientras dura el desplazamiento de E_m (corriente tardía). De lo visto hasta aquí, cabe suponer que el resultado de movimientos de Na⁺ y K⁺ a través del axolema. Una manera de separar el componente correspondiente al Na⁺ (I_{Na}) del correspondiente al K⁺ (I_K) consiste en anular la fuerza impulsora que actúa sobre el Na⁺ (E_m - E_{Na}) durante la fijación de E_m en -9 mV. Una reducción del 90 % en I_{Na} (reemplazado por un catión no permeante), hace que E_{Na} se reduzca de +55 a -9 mV y, por lo tanto en esas condiciones cuando cambia E_m abruptamente de -65 a -9 mV manteniéndoselo fijo en este nivel, la corriente que resulte no podrá ser llevada por I_{Na} = g_{Na} (E_m - E_{Na} = 0); y por lo tanto quedará en I_K. Esto es precisamente lo que se muestra para obtener la curva I_K en la fig. 3-13. De la diferencia entre I_j e I_K se obtiene I_{Na}, la cual aumenta durante el potencial de acción y luego declina más lentamente llegando a anularse aunque el pulso de despolarización se prolongue; es decir que en presencia de una despolarización, g_{Na} y la conductancia al Na⁺ mero se activa y luego se inactiva. La inactivación de g_{Na} aumenta con la magnitud y la duración de la polarización.

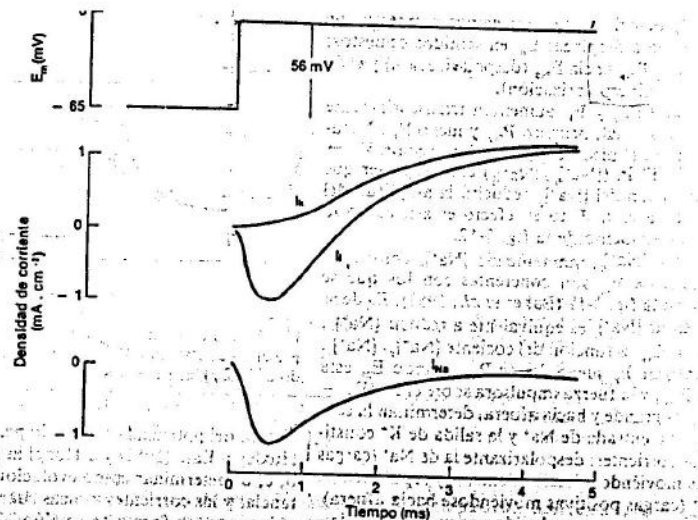


Fig. 3-13. Registro de las densidades de corrientes de membrana en respuesta a un pulso despolarizante de potencial controlado de 56 mV en el axón de calamar. I_h : curso temporal de la corriente iónica transmembrana en presencia de $[Na^+]_o$, $[Na^+]_i$, $[K^+]_o$ y $[K^+]_i$ normales. Hasta la aplicación del pulso la corriente transmembrana es cero. Durante el pulso se hace transitoriamente negativa y luego positiva por el resto de la duración del pulso. Los valores negativos corresponden a corrientes hacia adentro, y los positivos a corrientes hacia afuera. I_h : registro en presencia de una $[Na^+]_o$ igual a un 10% de la normal. En esas condiciones (ver texto) la fuerza impulsora que actúa sobre Na^+ durante el pulso es cero ($E_m - E_{Na} = 0$) y por lo tanto la corriente que pueda ser llevada por Na^+ debe ser cero. La concomitante desaparición de la corriente hacia adentro demuestra que ésta es llevada por Na^+ (I_{Na} , corriente de Na^+). I_h es una corriente de K^+ hacia afuera; desaparece cuando $[K^+]_o = 0$ y es específicamente bloqueada por TEA. Sustrayendo I_h de I , se obtiene I_{Na} (Basado en Hodgkin y Huxley, 1952a.)

Que la corriente tardía (I_h) es llevada por K^+ , se demostró comparando la transferencia de carga eléctrica desde el interior del axón, en condiciones experimentales donde $I_{Na} = 0$, con la salida de K^+ (axoplasma marcado con ^{42}K) durante un pulso despolarizante de potencial controlado (Hodgkin y Huxley, 1953). La relación obtenida entre ambas magnitudes, medidas en el mismo segmento del axón, fue prácticamente igual a 96.500 culombios/mol de K^+ (recuérdese que 96.500 culombios es la carga de un mol de un ion monovalente); g_K se activa mucho más lentamente que g_{Na} , no se inactiva mientras dure el pulso de potencial controlado.

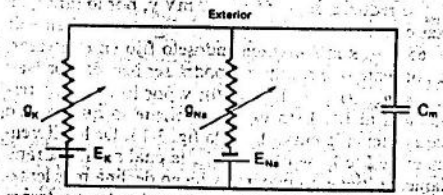


Fig. 3-14. Circuito equivalente de una membrana de axón mostrando únicamente los canales potencial-dependientes representados por las conductancias variables g_K y g_{Na} . E_K y E_{Na} : potenciales de equilibrio de K^+ y Na^+ , respectivamente; C_m : capacidad de la membrana.

La corriente de Na^+ y la de K^+ fluyen por distintos canales potencial-dependientes. Tal vez la demostración más convincente en tal sentido es la farmacológica. Con respecto a los canales de Na^+ existe una toxina que los bloquea específicamente: la tetrodotoxina (TTX), una de las toxinas más potentes que se conocen, es de origen animal. Se la extrae del hígado de un pez (*puffer fish*; pez globo) cuya ingestión puede ser fatal. Una concentración 10^{-11} M de TTX produce un bloqueo completo de I_{Na} , sin afectar I_h . De modo que en presencia de la toxina un registro de la corriente iónica (I) en condiciones experimentales como las de la fig. 3-13, es idéntico al de I_h en dicha figura (ausencia de I_{Na}).

Los canales de K^+ cuya permeabilidad aumenta durante el potencial de acción, posibilitando el retorno de E_m al valor de reposo, son bloqueados específicamente por el tetraetilamonio (TEA). Aparte de su especificidad, el TEA se diferencia de la TTX en que bloquea I_h sólo cuando se encuentra en el axoplasma (la TTX actúa sólo desde el exterior) y a concentraciones mucho más altas (≈ 5 mM) que la TTX. En presencia de TEA el registro de I en las condiciones experimentales de la fig. 3-13 es similar a la curva I_{Na} (ausencia de I_h).

La fig. 3-14 muestra el circuito equivalente de una membrana excitable (axón) con g_K y g_{Na} potencial y tiempo-dependientes. La especificidad de la TTX ha permitido estimar la densidad de los canales de Na^+ potencial-

dependientes. Para ello se han empleado diferentes métodos destinados a determinar el número de moléculas de TTX que se unen a la membrana por unidad de área. Los datos experimentales indican que las moléculas de TTX se unen (bloquean) a los canales de Na^+ en una relación 1:1. La densidad de canales de Na^+ en fibras nerviosas varía entre 20 y 500 μm^{-2} , dependiendo del tipo de axón y de la especie. A partir de mediciones de ruido de membrana (fluctuaciones de E_m y de conductancia) se ha estimado que la densidad de canales de K^+ potencial-dependientes sería del orden de 50 a 100 por μm^2 de axolema con una conductancia del orden de 10^{-11} siemens por canal. La conductancia de los canales de Na^+ potencial-dependientes determinada a partir de mediciones de densidad de corriente en pequeñas porciones de axolema, es de unos $4,5 \cdot 10^{-12}$ siemens por canal (Bekkers *et al.*, 1983). Por otra parte, los canales potencial-dependientes son selectivos, es decir que los canales de Na^+ aceptan, si no con exclusividad, con notable preferencia a este catión respecto de otros. Lo mismo ocurre con los canales de K^+ en relación con el K^+ . Esto se debe aparentemente a la presencia de un filtro de selectividad, tanto en el canal de Na^+ como en el de K^+ . Experimentos en fibras nerviosas mielínicas aisladas de rana, en los que se reemplazó el Na^+ en el medio exterior por diversos cationes orgánicos de distinta estructura y tamaño molecular, sugieren que el área de sección del filtro de selectividad del canal de Na^+ debería ser del orden de 3 por 5 Å y estar localizado cerca de la boca externa del canal. La boca a su vez debería tener un área de sección de 9 por 10 Å para poder alojar a los bloqueadores específicos del canal tales como la saxitoxina (STX) o la TTX (Hille, 1971). En cuanto al filtro de selectividad para K^+ , parecería tener un diámetro de 3 Å (Bezanilla y Armstrong, 1972; Hille, 1973).

Corrientes de compuerta

El hecho de que los cambios en g_{Na} y g_K son potencial-dependientes, indujo a Hodgkin y Huxley a sugerir que los canales deberían contener moléculas o partículas con carga eléctrica, las cuales se moverían bajo la influencia de un campo eléctrico (gradiente de potencial) abriéndolos (activación) o cerrándolos (inactivación). El movimiento de esas partículas cargadas que actuarían como compuertas dentro de los canales constituye corrientes eléctricas, llamadas corrientes de compuerta, las cuales por ser mucho más pequeñas que I_{Na} e I_h , no son detectables en los registros de potencial controlado. Más de veinte años después de haber sido propuestas, la existencia de las corrientes de compuerta fue demostrada experimentalmente (Armstrong y Bezanilla, 1974; Keynes y Rojas, 1974). La magnitud de las corrientes de compuerta de los canales de Na^+ es cerca de cien veces menor que I_{Na} (fig. 3-15).

La TTX, que en concentraciones adecuadas, como ya vimos, bloquea completamente I_{Na} , no afecta la corriente de compuerta, lo cual sugiere que esta toxina actúa impidiendo el acceso de los iones Na^+ al canal sin afectar el movimiento potencial-dependiente de las compuertas de dicho canal. El canal de Na^+ tendría dos compuertas, una cerrada en reposo que se abre cuando se despolariza la membrana (compuerta de activación o compuerta m), y otra, abierta en reposo, que tiende a cerrarse cuando la membrana es despolarizada (compuerta de inactivación o compuerta h). La pronasa, una enzima proteolítica, cuando es aplicada al interior del axón, reduce o anula la inactivación de I_{Na} , lo que sugiere, además de la naturaleza proteica de las compuertas, que la de inactivación estaría localizada en el extremo interno del canal de Na^+ (Armstrong *et al.*, 1973).

Las corrientes de compuerta del canal de Na^+ dependiente de K^+ también fueron medidas en el axón de calamar (compuerta de activación o compuerta n). El máximo movimiento de carga observado fue de 500 electrones por μm^2 de membrana, lo cual representa alrededor de un tercio de la carga de los canales de Na^+ (Bezanilla *et al.*, 1982).

A partir de los experimentos de potencial controlado, cuyo detalle excede los propósitos de este libro, se puede esquematizar así (fig. 3-16):

- 1) Ante un estímulo (despolarización) de suficiente magnitud (suprarrumbral), las compuertas de activación m de los canales de Na^+ potencial-dependiente se abren rápidamente, con lo cual g_{Na} aumenta bruscamente (la compuerta h de inactivación ya está abierta).
- 2) Por los canales de Na^+ con las dos compuertas abiertas se produce la entrada de este ion (I_{Na}), a favor de su gradiente de potencial electroquímico. ¿Qué Na^+ y no otros iones? Aparentemente por lo que dijimos, la boca externa del canal de Na^+ tiene un filtro de selectividad, el cual "reconoce" al Na^+ posiblemente debido a su valencia, su tamaño,

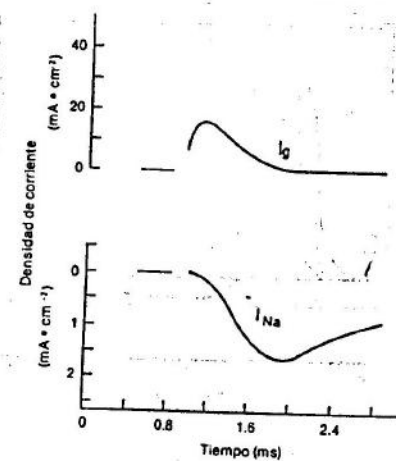


Fig. 3-15. Curso temporal de la corriente de compuerta del canal de Na^+ y de la corriente de Na^+ (I_{Na}). Nó que I_g se produce antes que I_{Na} y su cinética es más que la de ésta, b) la gran diferencia de magnitud en las: I_{Na} 100 I_g (modificado de Armstrong y Bezanilla, 1974.)

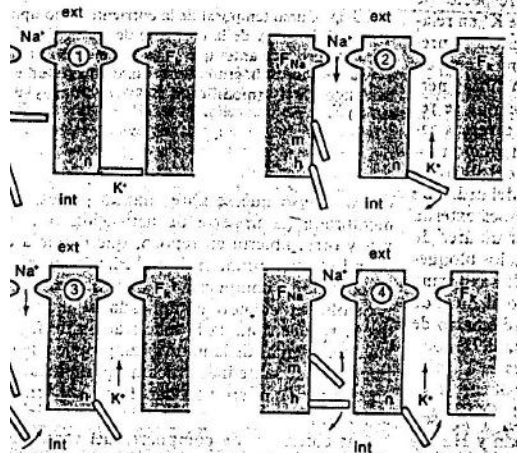
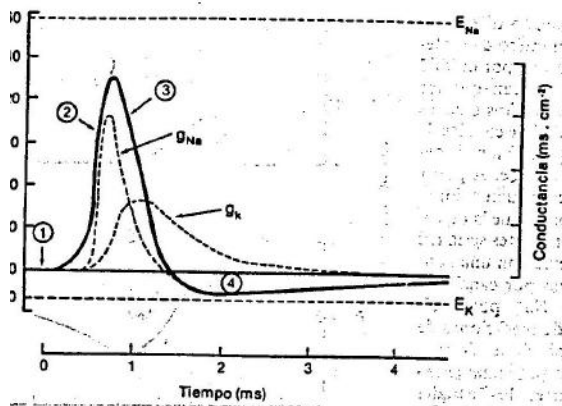


Fig. 3-16. Panel superior: potencial de acción (curva de trazo continuo) y los cambios de conductancia del Na⁺ (g_{Na}) y del K⁺ (g_K) que lo generan (modificado de Hodgkin y Huxley, 1952d.) Panel inferior: representación esquemática de los canales de Na⁺ y K⁺ con sus filtros de selectividad (f_{Na}, f_K) y compuertas a distintos tiempos antes y durante el potencial de acción (1, 2, 3 y 4). El canal de Na⁺ posee una compuerta de activación (m) y una de inactivación (h), mientras que el de K⁺ sólo posee compuerta de activación (n). Este esquema es sólo operacional y de ninguna manera pretende representar la realidad física a nivel molecular. Ver texto.

... necesaria para despojarlo parcialmente de su hidratación, etc. * La despolarización propiamente dicha contribuye a activar más canales, lo que a su vez aumenta I_{Na} y E_m → E_{Na} (pico de potenciación). Durante la fase de despolarización, la compuerta de activación en el canal de Na⁺ (h) comienza a cerrarse y la de activación del canal de K⁺ (n) comienza a abrirse. Estos procesos son mucho más lentos que la apertura de las compuertas de activación del Na⁺ y ambos tienden a impedir que E_m llegue a E_{Na} porque disminuyen g_{Na} y aumentan g_K. La compuerta de inactivación de Na⁺ termina de cerrarse completamente. La compuerta n, en tanto que continúa abriéndose, por lo cual g_K aumenta y la

... El período refractario absoluto se explica en base a la posición de las compuertas en los canales de Na⁺ y K⁺. Es así como durante la parte ascendente del potencial de acción, un nuevo estímulo es inefectivo porque ambas compuertas del canal de Na⁺ ya están abiertas. En la fase repolarizante, por otra parte, la refractariedad seguirá siendo absoluta por las siguientes razones: a) la compuerta h de inactivación de los canales de Na⁺ está cerrada debido a la despolarización, y b) una gran proporción de compuertas n ya se han abierto con el consiguiente aumento de g_K c

9

I_K. Estos dos factores hacen que cualquier estímulo (pulso de corriente despolarizante), para ser efectivo, además de contrarrestar el efecto hiperpolarizante de I_K debería ser capaz de producir la apertura de la compuerta h, lo cual es imposible porque, como se dijo antes, la despolarización promueve el cierre de esta compuerta.

Pasada la fase de repolarización del potencial de acción, la refractariedad deja de ser absoluta (período refractario relativo). Esto se debe a que durante esta fase, las compuertas h de inactivación de los canales de Na⁺ se están abriendo, de modo que un pulso de corriente despolarizante (estímulo), si es suficientemente intenso (mayor que el umbral), abrirá la cantidad de compuertas de activación necesarias para generar una I_{Na} (despolarizante) que supere a I_K (hiperpolarizante, que está ocurriendo simultáneamente), produciendo así un potencial de acción. La intensidad del estímulo necesaria para producir un nuevo potencial de acción durante el período refractario relativo irá disminuyendo hacia el valor umbral en función del tiempo transcurrido desde la terminación del potencial de acción en la medida en que las compuertas h y n regresen a su posición de reposo.

El fenómeno de la acomodación (pág. 1-43) también se explica en base a la cinética de las compuertas del canal de Na⁺. Si la membrana de un axón o fibra muscular se despolariza lentamente las compuertas m, aunque de cinética rápida, se abrirán lentamente. A medida que la despolarización progresa, las compuertas h, cuya cinética es mucho más lenta que la de las m, "tendrán tiempo" de ir cerrándose. El resultado será que g_{Na} no aumentará lo necesario como para que se genere un potencial de acción, aunque la intensidad del estímulo llegue a sobrepasar en mucho el valor umbral.

Debe enfatizarse que los movimientos de Na⁺ y K⁺

que generan el potencial de acción son pasivos, es decir que la fuerza impulsora que provoca cada uno de ellos proviene exclusivamente, y en cada instante, de la diferencia E_m - E_{ion}. La bomba de Na⁺ - K⁺ no desempeña ningún papel en el mecanismo del potencial de acción. El bloqueo de dicha bomba (mediante la aplicación de ouabaina, por ejemplo) no afecta la generación ni la forma del potencial de acción.

Propagación del potencial de acción

En condiciones fisiológicas (no de potencial controlado), el potencial de acción generado en el sitio de aplicación de un estímulo se propagará en ambas direcciones a lo largo del axón (o fibra muscular) con amplitud y velocidad constantes. Esto se muestra en forma diagramática en la fig. 3-17, donde dos pares de electrodos extracelulares equidistantes del sitio de estimulación registran las diferencias de potencial entre A y B (V_{A-B}) y entre A' y B' (V_{A'-B'}).

La llegada al electrodo B del potencial de acción que se desplaza hacia la izquierda es simultánea con la llegada al electrodo B' del que se desplaza hacia la derecha. La porción de membrana donde se está produciendo un potencial de acción, será negativa respecto de otra en reposo, de modo que la diferencia V_{A-B} será positiva cuando el potencial de acción esté en B y negativa cuando el potencial de acción se encuentre en A. Lo mismo es cierto para A' y B'. Además, el cociente entre la distancia Δl y el tiempo, Δt, que tarda el potencial de acción en recorrerla, representa la velocidad de propagación del potencial de acción que se desplaza hacia la izquierda, y será igual al cociente Δl/Δt' correspondiente a la velocidad de propagación del que se desplaza hacia la derecha.

¿Por qué se propaga el potencial de acción? Entre

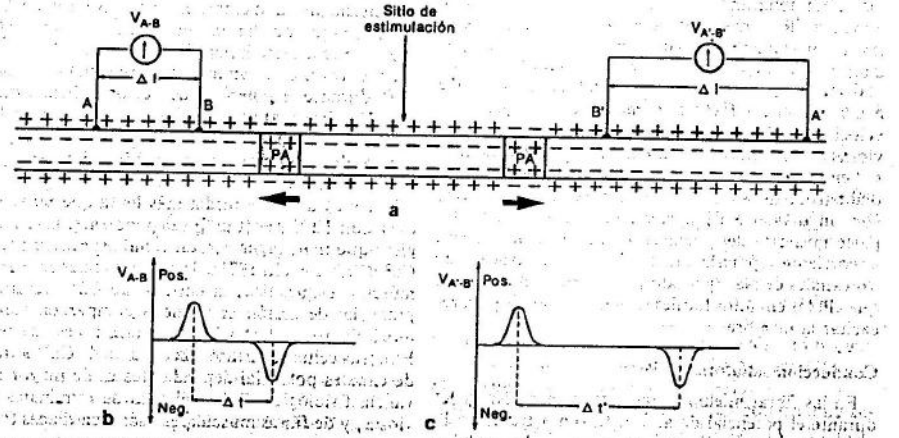
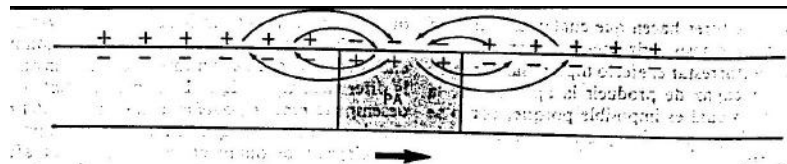


Fig. 3-17. a, propagación de potenciales de acción (PA) a partir del sitio de estimulación en una fibra nerviosa. A, B, A' y B': electrodos extracelulares. b, registro (V_{A-B}) del PA que se desplaza hacia la izquierda al pasar por los electrodos B y A. El registro es bifásico porque al pasar por B la porción de membrana en contacto con este electrodo es negativa respecto de la que está en contacto con A, produciéndose una deflexión transitoria hacia arriba (V_{A-B} positiva), y cuando el PA pasa por B la situación se invierte (V_{A-B} negativa); c, idéntico a b excepto que la distancia entre A' y B' es mayor (doble) que entre A y B. Δl/Δt = Δl'/Δt' = velocidad de conducción (ver texto).



8. Circuitos locales entre la porción de axón ocupado por un potencial de acción (PA) y las zonas adyacentes en reposo por delante del PA son despolarizantes y actúan como estímulo de la zona en reposo provocando la (activación) de los canales de Na⁺ potencial-dependientes determinando así la propagación del PA. Las corrientes establecidas entre la zona del PA y la región en reposo por detrás del mismo también son despolarizantes, pero debido a la inactivación (canales de Na⁺ inactivados) dejado por el PA, son inefectivas. De allí que en la propagación del PA no existe posibilidad de retorno (ver texto).

ión de membrana ocupada por un potencial de donde E_m es positivo, y la membrana en reposo por delante del mismo, se establece una corriente que fluye por el axoplasma desde la zona del potencial de acción hacia la zona de reposo. La despolariación así producida, en la medida que se sobrepasa el umbral de excitabilidad, determina la apertura de un número suficiente de canales de activación (m) como para generar un potencial de acción en la zona hasta entonces en reposo. En palabras, el potencial de acción que está en un instante dado en una porción de axón actúa como estímulo sobre una zona del axón que lo precede. La extensión de ésta depende de la longitud característica (λ) del axón (véase pág. 40, Propiedades de cable). Cuanto mayor sea λ , mayor será el alcance de los circuitos y por ende, mayor la velocidad de propagación y modo que las velocidades de propagación as tendrán lugar en aquellos axones donde R_m es menor ($\lambda = R_m/R_i$). Es así como en los axones mielínicos (R_m alta) y los de mayor R_i (R_i baja) son los que exhiben mayor velocidad de propagación del potencial de acción. De los factores mencionados, la gama de valores del potencial de acción en fibras nerviosas de mamíferos se extiende desde unos 120 mV en las fibras A (mielínicas) de alrededor de 10 μm de diámetro, a unos 0,6 mV en fibras C (amielínicas) de diámetro de aproximadamente 0,5 μm . La velocidad del potencial de acción coincide con la inactivación de K⁺ y la inactivación de los canales de Na⁺ (período refractario), lo cual hace que los circuitos locales sean insuficientes para reactivar la membrana.

Propagación saltatoria

En las fibras mielínicas las corrientes de Na⁺ y K⁺ y el potencial de acción fluyen a través de la membrana correspondiente a los nodos de Ranvier, de los cuales hay aproximadamente uno por metro de fibra. Por lo tanto, la propagación del potencial de acción sólo en los nodos, de allí que se la denomina propagación saltatoria. Además de incrementar la velocidad de

propagación, confiere otra ventaja a los axones que la poseen: minimiza la entrada de Na⁺ y la salida de K⁺ por potencial de acción de lo cual resulta un menor gasto de energía por parte de la bomba de Na⁺ - K⁺, para el mantenimiento de [Na⁺]_i y [K⁺]_i constantes. En un axón mielínico la entrada de Na⁺ por potencial de acción y por cm² de membrana, es unas 5000 veces menor que en un axón de calamar, mientras que su volumen por unidad de longitud es unas 1000 veces menor que el de éste.

[Ca²⁺] y excitabilidad

La concentración de Ca²⁺ en el medio extracelular influye sobre la excitabilidad en el nervio y el músculo. Una disminución de [Ca²⁺]_e baja el umbral de excitabilidad, efecto análogo al producido por la despolariación. En un medio sin Ca²⁺, tanto axones como fibras musculares esqueléticas producen potenciales de acción espontáneamente. Por el contrario, un aumento de [Ca²⁺]_e tiende a aumentar E_m alejándolo del umbral, por lo que se dice que este catión estabiliza la membrana. Se cree que normalmente el Ca²⁺ neutraliza cargas negativas localizadas en la cara externa de la membrana. En ausencia de Ca²⁺ dichas cargas quedarían sin neutralizar, lo cual es equivalente a despolariar la membrana.

En el axón de calamar se produce una entrada de Ca²⁺ durante el potencial de acción. Esta entrada tiene dos fases: a) una fase inicial rápida que es bloqueable por TTX, lo cual indica que ocurriría por los canales de Na⁺ aunque la permeabilidad de éstos para el Ca²⁺ es mucho menor que para el Na⁺ ($P_{Ca}/P_{Na} = 0,01$); y b) una fase tardía más lenta que no se bloquea con TTX y es [Ca²⁺]_e dependiente. Lo cual sugiere que tiene lugar por un canal específico para el Ca²⁺ (Baker et al., 1971). Tanto en axones como en el músculo esquelético, la entrada de Ca²⁺ durante el potencial de acción es pequeña comparada con los movimientos de Na⁺ y K⁺. Pero esto no es una regla. En otras células excitables la entrada de Ca²⁺ a través de canales potencial-dependientes es de mayor relevancia fisiológica. Tal es el caso de terminales nerviosos, y de fibras musculares lisas y cardíacas (véase Cap. I-4).

* En el medio externo del axón de calamar (agua de mar) [Ca²⁺]_e es 10 mM y el calcio libre en el axoplasma es del orden de $0,3 \times 10^{-7}$ mM; por lo tanto, $E_{Ca^{2+}}$ será de +131 mV y la fuerza impulsora hacia adentro para $E_m = -60$ mV, será: $E_m - E_{Ca^{2+}} = -60 - 131 = -191$ mV.

6

Potencial de acción en el músculo esquelético

Las fibras musculares esqueléticas son excitables y generan potenciales de acción propagados cuyo mecanismo está determinado, como en las fibras nerviosas, por cambios en la conductancia de canales potencial-dependientes específicos para Na⁺ y K⁺. Normalmente el potencial de acción en el músculo inicia una serie de procesos que culminan con la contracción de la fibra.

La activación de los elementos contráctiles tiene lugar radialmente desde el sarcolema, por donde se propaga el potencial de acción, hacia el centro de la fibra. La posibilidad de que dicha activación se debiera a la difusión centripeta desde la membrana de alguna sustancia liberada por aquélla, o de algún ion que la atraviesa durante el potencial de acción, puede descartarse porque un proceso de tal naturaleza sería demasiado lento para explicar la velocidad del acoplamiento excitocontráctil (Hill, 1949).

La presencia del sistema tubular transversal (túbulos T), constituido por invaginaciones del sarcolema, brinda la infraestructura adecuada para el envío de una señal eléctrica (despolariación) desde el sarcolema superficial al interior de la fibra. Una indicación clara de la continuidad entre el sarcolema superficial y los túbulos T la da el hecho de que la capacidad de la membrana, que en la inmensa mayoría de las membranas biológicas, si no en todas, es de aproximadamente $1 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ (prácticamente una constante biológica), en el músculo esquelético es entre 4 y 8 veces mayor (su valor depende de la especie y diámetro de la fibra). Esto se debe a que cada cm² de sarcolema superficial, cuya capacidad es del orden de $1 \mu\text{F}$, tiene en paralelo la capacidad correspondiente a los túbulos T que se originan en esa área de membrana superficial (las capacidades en paralelo se suman). Es decir que a cada cm² de membrana superficial se le asocian 3 a 7 cm² de membrana tubular.

La primera demostración de que los túbulos T podían conducir una señal eléctrica desde la periferia al centro de la fibra, fue obtenida por Huxley y Taylor (1958). Estos investigadores utilizaron un microelectrodo de vidrio extracelular para aplicar corrientes hiper o despolarizantes en porciones muy localizadas de la superficie de una fibra muscular de rana. La observación microscópica reveló que las corrientes hiperpolarizantes no producían respuesta alguna mientras que las despolarizantes generaban una respuesta contráctil local pero únicamente cuando el microelectrodo se hallaba sobre la región de la línea Z, y esa respuesta consistía en el acercamiento de los dos hemisarcómeros adyacentes a dicha línea. Despolarizaciones de la región de la banda A fueron inefectivas (fig. 3-19). La importancia de esta observación estriba en que en las fibras musculares de rana, las bocas de los túbulos T están localizadas exclusivamente en la región de la línea Z (fig. 4-12, A). Una prueba terminante del papel de los túbulos T la da el hecho de que cuando éstos son desconectados de la superficie (destubulación) mediante un choque osmótico con glicerol 400 mM (Howell y Jenden, 1967), las fibras conservan la capacidad de generar potenciales de acción pero no se contraen.

A partir de la propagación del potencial de acción

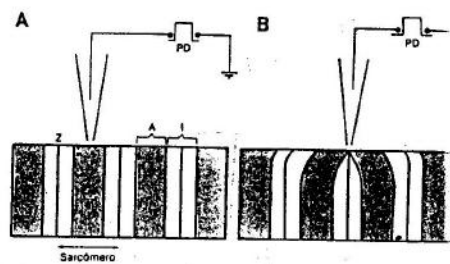


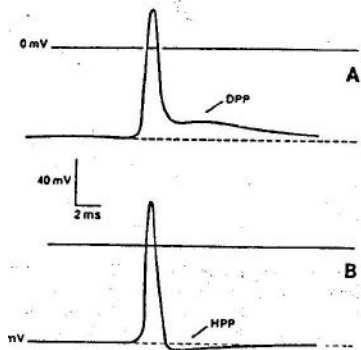
Fig. 3-19. Experimento de Huxley y Taylor. A, pulso despolarizante (PD) aplicado sobre una fibra muscular de rana a la altura de la banda A. No se produce respuesta mecánica. B, el mismo pulso aplicado sobre la línea Z produce el acercamiento de los dos hemisarcómeros adyacentes. Los pulsos hiperpolarizantes no producen respuesta, cualquiera que sea el lugar de su aplicación (ver texto).

por el sarcolema superficial, la despolariación de los túbulos T podría ocurrir de dos maneras: a) por una despolariación decremental centripeta cuya extensión dependerá de la longitud característica de los túbulos si éstos se comportan pasivamente como cables (véase pág. 40, Propiedades de cable), b) por medio de un potencial de acción tubular.

Numerosos resultados experimentales indican que la despolariación de los túbulos T se debe a la propagación por ellos de un potencial de acción de características similares al que tiene lugar en el sarcolema superficial (Constantin, 1970; Bezanilla et al., 1972; Bastian y Nakajima, 1974). Si los túbulos T no fueran excitables, la despolariación decremental pasiva (electrotónica) por los mismos a partir de un potencial de acción que se propaga por el sarcolema superficial sería insuficiente para activar adecuadamente los elementos contráctiles más alejados de la superficie. Mediante la fijación de TTX en fibras musculares de rana normales y destubuladas se ha estimado que aproximadamente la mitad de los canales de Na⁺ potencial-dependientes se encuentran en la membrana de los túbulos T. En términos de densidad, el número de canales de Na⁺ sería aproximadamente de $175 \mu\text{m}^{-2}$ en el sarcolema superficial y de alrededor de $45 \mu\text{m}^{-2}$ en los túbulos T (Jaimovich et al., 1976).

La presencia de canales potencial-dependientes en los túbulos T es coherente con el hecho de que el flujo de entrada de Na⁺ por potencial de acción en el músculo de rana es de 10 a 27 picomoles (10^{-12} moles) por cm² de sarcolema superficial (Hodgkin y Horowitz, 1959; Venosa, 1974), mientras que en axones gigantes es del orden de 10 pmol cm⁻². La diferencia es porcentualmente más acentuada si se consideran los flujos netos por potencial de acción: $15,6$ pmol cm⁻² para la fibra muscular y $3,7$ para el axón (Hodgkin y Horowitz, 1959; Keynes, 1951).

La fig. 3-20, A muestra un típico potencial de acción de fibra muscular esquelética de rana. Una característica que diferencia claramente el potencial de acción de la fibra muscular del de la fibra nerviosa es el pospotencial. En el axón, como vimos, aquél presenta una hiperpolarización pospotencial (HPP). En el músculo, por el contrario, se observa una despolariación generalmente de unos 10-15 mV, también



20. Potencial de acción de fibras musculares esqueléticas de rana. A, fibra control con su despolarización pos-tetánica (DPP) característica; B, fibra destubulada (túbulos desconectados del sarcolema superficial). La s reemplazada por una hiperpolarización pospoten-PP (ver texto).

oria, denominada clásicamente *postpotencial vo*, aunque un término más descriptivo sería *arización postpotencial (DPP)*. La DPP está in-lemente ligada al sistema tubular trasverso. Es no en fibras "destubuladas" la DPP desapare-frecuentemente reemplazada por una HPP si-la observada en axones (fig. 3-20, B). La DPP temente se debería en parte a que el canal de-ncial-dependiente (llamado rectificador retar-cuyo aumento de conductancia posibilita la rización, es menos selectivo respecto del K⁺ que el de K⁺ (llamado rectificador hacia adentro), sable de la permeabilidad al K⁺ en condiciones oso. Es decir, durante la DPP la relación es mayor que en reposo. A esto habría que la posible contribución de un pequeño y tran-aumento de [K⁺]_i en el lumen de los túbulos a la salida de este ion durante el potencial de

le funcional entre los túbulos T y el retículo ásmico. Como se verá en el Capítulo 4, la ción muscular se inicia con la liberación de sde el retículo sarcoplásmico (RS), el cual ac-no reservorio de este catión, hacia el citosol. úbulos T y el RS constituyen dos redes o siste-ulares entre los cuales no hay continuidad pes-membranas en determinados lugares se acer-na distancia de alrededor de 100Å formando tructuras que, dependiendo del tipo de mús-denominan triadas (un túbulo T y dos cister-ninales del RS) o diadas (un túbulo y una cis-Es a nivel de estas estructuras donde el mensa- desde el sarcolema superficial por los túbu- forma de una despolarización (potencial de-ubular) es transferido al RS determinando la-ón de Ca²⁺. El mecanismo de este acople fun-ntre los túbulos T y el RS no está definitiva-clarado. Al respecto se han propuesto cuatro mecanismos.

1. mecanismo eléctrico según el cual las

corrientes que fluyen por la pared de los túbulos T invadirían y despolarizarían la membrana del RS, lo cual produciría la liberación de Ca²⁺. Esto requeriría que los túbulos T y el RS estuvieran conectados a través de una unión estrecha de baja resistencia, pero de acuerdo con la microscopía electrónica la relación entre las membranas de ambos sistemas tubulares no tiene las características de una unión estrecha. De la membrana del RS se desprenden unas prolongaciones llamadas *pies* que se extienden hacia el túbulo T aunque sin llegar a ponerse en contacto con éste (Franzini-Armstrong, 1970). Este mecanismo eléctrico aparece como muy poco probable.

2) Otra hipótesis que ha sido propuesta es la de la liberación de Ca²⁺ del RS provocada por la entrada de Ca²⁺ desde el medio externo (Ford y Podolsky, 1972). De hecho, durante el potencial de acción se produce una entrada de Ca²⁺ (Bianchi y Shanés, 1959). Determinaciones electrofisiológicas han demostrado que cuando se bloquea el canal de K⁺ potencial-dependiente con TEA (ver antes) en un medio con baja [Na⁺]_i y sin Cl⁻, puede observarse un potencial de acción lento dependiente de [Ca²⁺]_i con una duración, a media amplitud, de alrededor de 1 s (Beaty y Stefani, 1976). La corriente lenta de Ca²⁺ (hacia adentro), I_{Ca}, de este potencial de acción tiene lugar en los túbulos T (Nicola-Siri *et al.*, 1980), por lo que podría estar relacionada con el acople entre la despolarización de los túbulos y la liberación de Ca²⁺ por parte del RS. Pero debido a la lentitud de su curso temporal, es improbable que I_{Ca} desempeñe algún papel en la producción de la contracción simple normal, como lo sugiere el hecho de que fibras musculares aisladas sigan contrayéndose después de reducir [Ca²⁺]_i < 10⁻⁸ M (Armstrong *et al.*, 1972).

3) La tercera hipótesis se basa en que los *pies* del RS podrían vehicular el acople túbulo T-RS. Schneider y Chandler (1973), en experimentos de potencial controlado en fibras musculares de rana en los cuales las corrientes de Na⁺ y K⁺ que ocurren durante el proceso de excitación fueron bloqueadas por TTX y TEA (ver antes), detectaron un movimiento de cargas, presumiblemente localizadas a nivel de las triadas. Estos autores estimaron una densidad de grupos cargados de 700 por μm² de membrana de túbulo T, valor cercano al de la densidad de *pies* del RS. En base a esto se especuló que si los grupos cargados pertenecieran a dichos *pies*, éstos podrían ser un nexo móvil mediante el cual la despolarización de los túbulos T provocaría la liberación de Ca²⁺ de las cisternas terminales del RS (Chandler *et al.*, 1976 a y b).

4) Observaciones más recientes (Vergara *et al.*, 1985) han sugerido que el acoplamiento excitación-contracción probablemente se efectúa mediante la liberación de inositol-trifosfato (InsP₃) de la membrana del túbulo T a partir de un precursor (fosfatidilinositol-4,5-difosfato). Este proceso estaría provocado por la despolarización del túbulo T (potencial de acción). El InsP₃ en el citosol actuaría como un mediador químico, el que al unirse a un receptor en la membrana del RS produciría la liberación de Ca necesaria para la contracción muscular. El InsP₃ sería ulteriormente inactivado por la enzima InsP₃ 5-fosfatasa.



APENDICE I

Derivación de la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK)

En el Capítulo I-1 la ecuación (18) expresa la tendencia al escape o potencial electroquímico del componente j de una disolución:

$$\bar{u}_j = u_j(T) + u_j(P) + RT \ln(a_j) + z_j F E_m \quad (1)$$

La tendencia del componente j a pasar a través de una membrana permeable a dicho componente que separa dos compartimientos (intra y extracelular, por ejemplo) dependerá del gradiente de \bar{u}_j en la dirección normal al plano de la membrana.

Si T y P son uniformes dentro del sistema (membrana y disoluciones que la bañan) y las disoluciones son diluidas ($a_j = C_j$), el gradiente de u_j estará dado por:

$$-\frac{d\bar{u}_j}{dx} = -RT \frac{d \ln C_j}{dx} - z_j F \frac{dE_m}{dx} \quad (2)$$

donde C_j representa la concentración del componente j dentro de la membrana y los gradientes de \bar{u}_j , $\ln C_j$ y E_m están representados por sus respectivas derivadas respecto de la distancia (x) transmembrana. En cálculo elemental se demuestra que:

$$\frac{d \ln C_j}{dx} = \frac{1}{C_j} \frac{d C_j}{dx}$$

es decir que la ecuación (2) queda:

$$-\frac{d\bar{u}_j}{dx} = \frac{RT}{C_j} \frac{d C_j}{dx} - z_j F \frac{d E_m}{dx} \quad (3)$$

La velocidad con que j atraviesa un plano interior a la membrana, paralelo a sus caras, será proporcional a du_j/dx y a la facilidad con la cual se pueda mover j dentro de la membrana. La movilidad U es una medida de esa facilidad y se define como la velocidad que adquiere j en presencia de un gradiente de potencial electroquímico unitario (1 julio mol⁻¹ cm⁻¹) y por lo tanto sus unidades serán cm² mol⁻¹ julio⁻¹.

Multiplicando ambos miembros de (3) por U_j se obtiene la velocidad uniforme, v_j, que adquirirá j en la membrana en presencia de un gradiente de concentración, dC_j/dx y de potencial, dE_m/dx:

$$v_j = \frac{d\bar{u}_j}{dx} U_j = - \frac{RTU_j}{C_j} \frac{dC_j}{dx} - z_j F U_j \frac{dE_m}{dx} \quad (4)$$

El número de moles de j que ingresen por unidad de tiempo (1 segundo, por ejemplo) en un volumen de membrana determinado por el producto de la distancia recorrida por j en ese lapso y el área del plano considerado, estará dado por el producto de dicho volumen por la concentración de j en el mismo (cm³ · moles · cm⁻³ = moles). Si al número de moles así obtenido se lo divide por el área del plano y por el tiempo de pasaje considerado, se tiene el flujo neto de j (J_j), es decir:

$$\begin{aligned} J_j &= \frac{\text{concentración (moles cm}^{-3}) \times \text{volumen (cm}^3)}{\text{área (cm}^2) \times \text{tiempo (s)}} \\ &= \text{concentración (moles cm}^{-3}) \times \text{velocidad (cm s}^{-1}) \\ &= J_j \text{ (moles cm}^{-2} \text{ s}^{-1}) \end{aligned}$$

Por lo tanto, multiplicando ambos miembros de la ecuación

• Dimensiones entre paréntesis.

(4) por C_j se obtiene J_j en función de dC_j/dx y de dE_m/dx

$$J_j = v_j C_j = - RTU_j \frac{dC_j}{dx} - z_j F U_j C_j \frac{dE_m}{dx} \quad (5)$$

Si se supone que el gradiente de E es lineal (campo constante), será:

$$\frac{dE_m}{dx} = \frac{E_m}{a}$$

donde a es el espesor de la membrana y E_m es el ΔE entre sus caras.

Separando las variables (dC_j y dx) se obtiene la ecuación (6):

$$dx = RTU_j \frac{dC_j}{J_j + z_j U_j F \frac{E_m}{a} C_j} \quad (6)$$

Integrando (6) a lo largo del espesor de la membrana (entre x = 0 y x = a), se obtiene:

$$J_j = \frac{z_j F U_j E_m}{a} \frac{C_i - C_e e^{-z_j F E_m / RT}}{e^{-z_j F E_m / RT} - 1} \quad (7)$$

C_i y C_e las concentraciones de j en la membrana adyacentes a las interfases con el medio intracelular y extracelular, respectivamente. Es conveniente expresar J_j en términos de las concentraciones de j en las disoluciones en contacto con la membrana ([j]), las cuales pueden medirse, de modo que haciendo uso del concepto de coeficiente de partición, K, visto en el Capítulo I-1, de modo tal que:

$$C_j = K [j] \quad (8)$$

tendremos:

$$J_j = \frac{z_j F U_j K}{a} E_m \frac{[j]_i - [j]_e e^{-z_j F E_m / RT}}{e^{-z_j F E_m / RT} - 1} \quad (9)$$

En ausencia de un gradiente de potencial a través de la membrana (dE/dx = 0), y teniendo en cuenta la relación (8), el flujo del ion j estará dado (véase ecuación 5) por:

$$J_j = -RTU_j K \frac{d[j]}{dx} \quad (10)$$

Esta es la primera ley de Fick, donde RTU_j = D_j = coeficiente de difusión (véase Capítulo I-1).

En el primer capítulo se vio que la permeabilidad (P_j) y D_j se vinculan de acuerdo con la siguiente relación:

$$P_j = \frac{D_j K}{a} \quad (11)$$

luego:

$$P_j = \frac{RTU_j K}{a} \quad (12)$$

y por consiguiente:

$$\frac{U_j K}{a} = \frac{P_j}{RT}$$

y reemplazando en (9) se obtiene:

$$J_j = P_j \frac{z_j F E_m}{RT} \frac{[j]_i - [j]_e e^{-z_j F E_m / RT}}{e^{-z_j F E_m / RT} - 1} \quad (13)$$

ecuación expresa el flujo neto pasivo de j a través de la membrana en función de sus concentraciones intracelulares y del potencial de membrana.

$$J_j = J_{je} - J_{ji} =$$

= flujo de salida - flujo de entrada.

Los flujos iónicos pueden expresarse en términos de densidad de corriente. La relación entre flujo iónico neto y densidad de corriente está dada por:

$$J_j z_j F = I_j$$

J_j es la densidad de corriente llevada por el ion j a través de la membrana. Luego, teniendo en cuenta que para iones monovalentes z es $+1$ para cationes y -1 para aniones, las densidades de las corrientes de los principales iones K^+ , Na^+ y Cl^- , estarán dadas por:

$$I_K = P_K \frac{F^2 E_m}{RT} \frac{[K^+]_i - [K^+]_e e^{-FE_m/RT}}{e^{-FE_m/RT} - 1} \quad (14)$$

$$I_{Na} = P_{Na} \frac{F^2 E_m}{RT} \frac{[Na^+]_i - [Na^+]_e e^{-FE_m/RT}}{e^{-FE_m/RT} - 1} \quad (15)$$

$$I_{Cl} = P_{Cl} \frac{F^2 E_m}{RT} \frac{[Cl^-]_i - [Cl^-]_e e^{FE_m/RT}}{e^{FE_m/RT} - 1} \quad (16)$$

Al aplicar el numerador y denominador de esta última ecuación por $e^{-FE_m/RT}$ se obtiene:

$$I_{Cl} = P_{Cl} \frac{F^2 E_m}{RT} \frac{[Cl^-]_e - [Cl^-]_i e^{-FE_m/RT}}{e^{-FE_m/RT} - 1} \quad (17)$$

La densidad de corriente total, I_T , a través de la membrana es la suma de las densidades de corrientes de cada uno de los iones:

$$I_T = I_K + I_{Na} + I_{Cl} \quad (18)$$

De (14), (15), (17) y (18) se obtiene:

$$I_T = \frac{F^2 E_m}{RT} (P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e) - (P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i) e^{-FE_m/RT} \quad (19)$$

En condiciones de reposo la corriente total a través de la membrana es cero ($I_T = 0$). Luego, de (19) obtenemos:

$$P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e = (P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i) e^{-FE_m/RT} \quad (20)$$

Tomando $e^{FE_m/RT}$:

$$e^{FE_m/RT} (P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e) = P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i \quad (21)$$

Tomando logaritmos naturales:

$$\ln \frac{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e}{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i} = FE_m/RT \quad (22)$$

y despejando E_m se obtiene la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e} \quad (23)$$

Si alguno de los iones involucrados estuviese en equilibrio, los términos correspondientes al mismo pueden eliminarse de la ecuación (23). Así es como en el músculo esquelético de rana, donde el Cl^- está en equilibrio, tendremos:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e} = E_{Cl} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_{Cl} [Cl^-]_e} \quad (24)$$

Por lo tanto:

$$\frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e} = \frac{P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_{Cl} [Cl^-]_e} \quad (25)$$

Luego:

$$\frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_{Cl} [Cl^-]_e} = \frac{P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_{Cl} [Cl^-]_e} \quad (26)$$

reordenando:

$$P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + 1 = P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + 1 \quad (27)$$

Eliminando 1 en ambos miembros y reordenando:

$$\frac{P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_{Cl} [Cl^-]_e} = \frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i} \quad (28)$$

Simplificando P_{Cl} y multiplicando ambos miembros por $e^{FE_m/RT}$, se obtiene la ecuación (4):

$$\frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_e} = E_{Cl} = E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i} \quad (29)$$

No en todas las células el Cl^- está en equilibrio. En el axón gigante de calamar $[Cl^-]_i$ es mayor de lo que correspondería al equilibrio debido a un transporte activo hacia adentro. En los eritrocitos, por otra parte, el Cl^- está en equilibrio. Otra causa obvia para eliminar los términos correspondientes a Cl^- de la ecuación (3) es cuando $P_{Cl} = 0$ como ocurre en algunas neuronas de moluscos.



APENDICE 2

Fuerza impulsora sobre un ion $BIBLIOTECA$

La ecuación de Nernst para j se puede escribir así:

$$\frac{[j]_i}{[j]_e} = e^{-z_j FE_j/RT} \quad (5)$$

Reemplazando $[j]_i/[j]_e$ en 4 por su valor en (5) se obtiene:

$$J_j = P_j \frac{z_j FE_m}{RT} \frac{[j]_i - [j]_e e^{-z_j FE_m/RT}}{e^{-z_j FE_m/RT} - 1} \quad (1)$$

Cuando $[j]_e = 0$, el flujo neto será igual al flujo unidireccional hacia afuera (J_{je}):

$$J_{je} = P_j \frac{z_j FE_m}{RT} \frac{[j]_i}{e^{-z_j FE_m/RT} - 1} \quad (2)$$

Del mismo modo, haciendo $[j]_i = 0$, se obtiene el flujo unidireccional hacia adentro (J_{ji}):

$$J_{ji} = P_j \frac{z_j FE_m}{RT} \frac{[j]_e e^{-z_j FE_m/RT}}{e^{-z_j FE_m/RT} - 1} \quad (3)$$

De (2) y (3):

$$\frac{J_{je}}{J_{ji}} = \frac{[j]_i}{[j]_e} e^{z_j FE_m/RT} \quad (4)$$

$$\frac{J_{je}}{J_{ji}} = e^{z_j FE_m - E_j/RT} \quad (6)$$

Cuando $E_m - E_j = 0$:

$$\frac{J_{je}}{J_{ji}} = e^0 = 1$$

es decir que $J_{je} = J_{ji}$, luego el flujo neto ($J_{je} - J_{ji}$) es cero y por lo tanto j estará en equilibrio a través de la membrana. Cuanto mayor sea el valor absoluto de $E_m - E_j$, mayor será el flujo neto de j . De modo que $E_m - E_j$ constituye la fuerza impulsora que determina el flujo neto de j por electrodifusión simple a través de la membrana. La dirección del flujo neto dependerá del signo de $z_j (E_m - E_j)$.

APENDICE 3

Derivación de la ecuación (12)

Si $E_m = E_{Cl}$:

$$\frac{g_K E_K + g_{Na} E_{Na} + g_{Cl} E_{Cl}}{g_K + g_{Na} + g_{Cl}} = E_{Cl}$$

pasando el denominador al segundo miembro:

$$g_K E_K + g_{Na} E_{Na} + g_{Cl} E_{Cl} = g_K E_{Cl} + g_{Na} E_{Cl} + g_{Cl} E_{Cl}$$

o sea:

$$g_K E_K + g_{Na} E_{Na} = g_K E_{Cl} + g_{Na} E_{Cl} = E_{Cl} (g_K + g_{Na})$$

luego:

$$E_{Cl} = \frac{g_K E_K + g_{Na} E_{Na}}{g_K + g_{Na}}$$

y por ser $E_m = E_{Cl}$:

$$E_m = \frac{g_K E_K + g_{Na} E_{Na}}{g_K + g_{Na}}$$

BIBLIOGRAFIA

Libros

- Aidley, D. J.: The Physiology of Excitable Cells. Cambridge University Press, 1971.
- Cole, K. C.: Membranes Ions and Impulses. University of California Press, Berkeley, 1968.
- Hille, B.: Ionic Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Mass., 1984.
- Katz, B.: Nerve Muscle and Synapse. Mc Graw-Hill Book Company, 1966.
- Kuffler, S. W. and Nicholls, J. G.: From Neuron to Brain. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Mass., 1976.

Revistas

- Adrian, R. H. and Slayman, C. L.: Membrane potential and conductance during transport of sodium, potassium and rubidium in frog muscle. J. Physiol. (Lond.), 184: 920, 1966.
- Armstrong, C. M. and Bezanilla, F.: Charge movement associated with the opening and closing of the activation

- gates of Na channels. J. Gen. Physiol., 63: 533, 1974.
- Armstrong, C. M.; Bezanilla, F. and Horowitz, P.: Twitches in the presence of ethylene glycol bis (β -aminoethyl ether) - N, N' - tetraacetic acid. Biochem. Biophys. Acta, 267: 603, 1972.
- Armstrong, C. M.; Bezanilla, F. and Rojas, E.: Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. J. Gen. Physiol., 62: 375, 1973.
- Baker, P.; Blaustein, M. P.; Keynes, R. D.; Manil, J.; Shaw, T. I. and Steinhardt, R. A.: The ouabain-sensitive fluxes of sodium and potassium in squid axon. J. Physiol. (Lond.) 200: 459, 1969.
- Baker, P. F.; Hodgkin, A. L. and Ridgway, E. B.: Depolarization and calcium entry in squid giant axons. J. Physiol. (Lond.), 218: 709, 1971.
- Baker, P.; Hodgkin, A. L. and Shaw, T. I.: Replacement of the axoplasm of giant nerve fibers with artificial solutions. J. Physiol. (Lond.), 164: 330, 1962.
- Bastian, J. and Nakajima S.: Action potential in the transverse tubules and its role in activation of skeletal muscle. J. Gen. Physiol., 62: 257, 1974.

- G. and Stefani, E.: Calcium dependent electrical activity in twitch muscle fibers of the frog. *Proc. R. Soc. Lond.*, 194: 141, 1976.
- Greff, J. M.; Greeff, N. G. and Neumcke, B.: The conductance of sodium channels in the squid giant axon. *J. Biol. Chem.* (Lond.), 343: 24P, 1983.
- in, J.: Untersuchungen zur Thermodynamik der elektrischen Ströme. *Pflügers Arch. Physiol.*, 92: 1902.
- la, F. and Armstrong, C. M.: Negative conductance induced by entry of sodium and cesium ions into the K channels of squid axons. *J. Gen. Physiol.*, 60: 588, 1973.
- la, F.; Caputo, C.; González Serratos, H. and Velázquez, R. A.: Sodium dependence of inward spread of calcium in isolated twitch muscle fibres of the frog. *J. Biol. Chem.* (Lond.), 223: 507, 1972.
- a, F.; White, M. M. and Taylor, R. E.: Gating currents associated with potassium channel inactivation. *Nature*, 296: 657, 1982.
- C. P. and Shanes, A. M.: Calcium influx in skeletal muscle at rest during activity and during potassium unblock. *J. Gen. Physiol.*, 42: 803, 1959.
- J. and Conway, E. J.: Potassium accumulation in skeletal muscle and associated changes. *J. Physiol.* (Lond.), 1, 1941.
- tin, L.: The role of sodium current in the radial spread of contraction in frog muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, 55: 703, 1970.
- r, W. K.; Rakowski, R. F. and Schneider, M. F.: A linear voltage dependent charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* (Lond.), 254: 245, 1976a.
- r, W. K.; Rakowski, R. F. and Schneider, M. F.: Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle. *J. Physiol.* (Lond.), 254: 285, 1976b.
- B.: Theories of electrolyte equilibrium in muscle. *Sym.*, 3: 331, 1941.
- P.: Effects of intracellular adenosine-5'-diphosphate and orthophosphate on the sensitivity of sodium current from squid axon to external sodium and potassium. *J. Gen. Physiol.*, 56: 583, 1970.
- E. and Podolsky, R. J.: Intracellular calcium movements in skinned muscle fibres. *J. Physiol.* (Lond.), 21, 1972.
- Armstrong, C.: Studies of the triad. I. Structure and function in frog twitch fibers. *J. Cell. Biol.*, 47: 1970.
- A. S.: Sodium pump: its electrical effects in skeletal muscle. *Science*, 147: 1442, 1965.
- D. E.: Potential, impedance and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.*, 27: 37, 1943.
- .: The onset of contraction. *Proc. R. Soc. Lond.*, 42, 1949.
- The permeability of sodium channel to organic ions in myelinated nerve. *J. Gen. Physiol.*, 58: 599, 1972.
- Potassium channel in myelinated nerves: selective ability to small cations. *J. Gen. Physiol.*, 61: 669, 1973.
- A. L. and Horowitz P.: Movements of Na and K in skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* (Lond.), 145: 405, 1959.
- A. L. and Katz, B.: The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Biol. Chem.* (Lond.), 108: 37, 1949.
- A. L.; Huxley, A. F. and Katz, B.: Measurement of current-voltage relations in the membrane of the axon of *Loligo*. *J. Physiol.* (Lond.), 116: 424, 1952a.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F.: Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* (Lond.), 116: 449, 1952a.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F.: The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* (Lond.), 116: 473, 1952b.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F.: The dual effect of membrane potential on membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* (Lond.), 116: 497, 1952c.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. E.: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* (Lond.), 117: 500, 1952d.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F.: Movement of radioactive potassium and membrane current in a giant axon. *J. Physiol.*, 121: 403, 1953.
- Horowitz, P.; Taylor, J. M. and Waggoner, D. M.: Fractionation of sodium efflux in frog sartorius muscles by strophantidin and removal of external sodium. *J. Gen. Physiol.*, 55: 401, 1970.
- Howell, J. N. and Jenden, D. J.: T-tubules of skeletal muscles: morphological alterations which interrupt excitation-contraction coupling. *Fed. Proc.*, 26: 553, 1967.
- Hutter, O. F. and Noble, D.: Rectifying properties of heart muscle. *Nature*, 188: 495, 1960.
- Huxley, A. F. and Taylor, R.: Local activation of striated muscle fibres. *J. Physiol.* (Lond.), 144: 426, 1958.
- Jaimovich, E.; Venosa, R. A.; Shrager, P. and Horowitz, P.: Density and distribution of tetrodotoxin receptors in normal and detubulated frog sartorius muscle. *J. Gen. Physiol.*, 67: 399, 1976.
- Katz, B.: Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch. Sci. Physiol.* 3: 285, 1949.
- Keynes, R. D.: The ionic movements during nervous activity. *J. Physiol.* (Lond.), 114: 119, 1951.
- Keynes, R. D. and Rojas, E.: Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon. *J. Physiol.* (Lond.), 239: 393, 1974.
- Matteucci, C.: Sur le courant électrique de la grenouille. *Ann. Chim. Phys.*, 68: 93, 1838.
- Nicola-Siri, L.; Sánchez, J. A. and Stefani, E.: Effect of glycerol treatment on calcium current of frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, 305: 87, 1980.
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720, 1972.
- Schneider, M. F. and Chandler, W. K.: Voltage charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature*, 242: 244, 1973.
- Sjodin, R. and Beaugé, L. A.: Coupling and selectivity of sodium and potassium transport in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.*, 51: 152, 1968.
- Sjodin, R. and Ortiz, O.: Resolution of the potassium ion pump in muscle fibers using barium ions. *J. Gen. Physiol.* 66: 269, 1975.
- Thomas, R. C.: Membrane current and intracellular sodium changes in shail neurone during extrusion of injected sodium. *J. Physiol.* (Lond.), 201: 495, 1969.
- Ussing, H. H.: Transport of ions across cellular membranes. *Physiol. Rev.*, 29: 127, 1949.
- Venosa, R. A.: Inward movement of sodium ions in resting and stimulated frog's sartorius muscle. *J. Physiol.* (Lond.), 241: 155, 1974.
- Vergara, J.; Tsien R. Y. and Delay, M.: Inositol 1, 4, 5-triphosphate: A possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6352, 1985.