

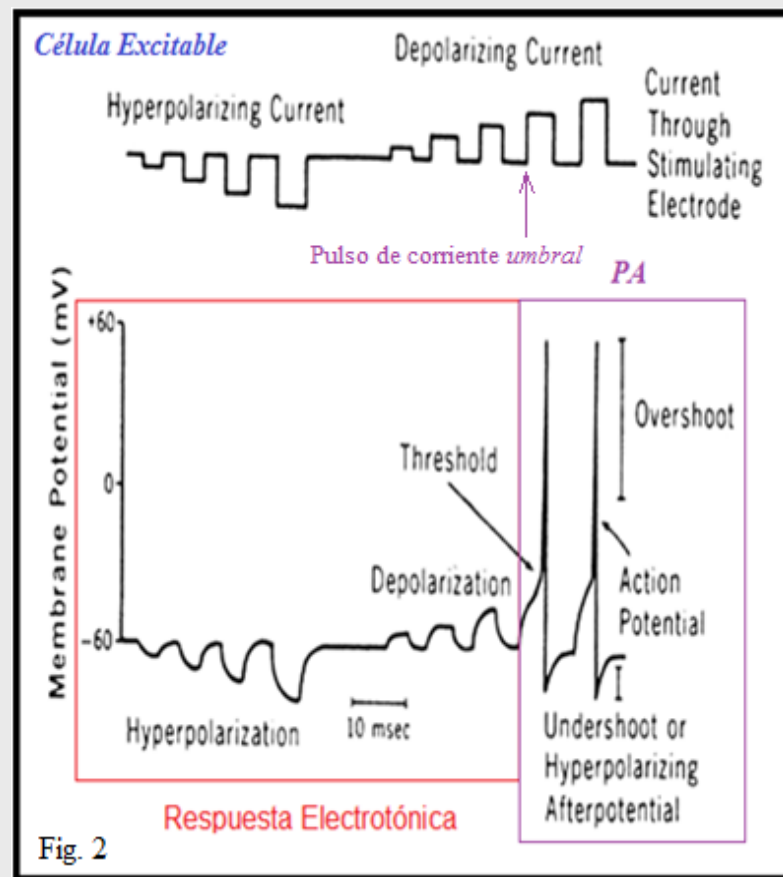
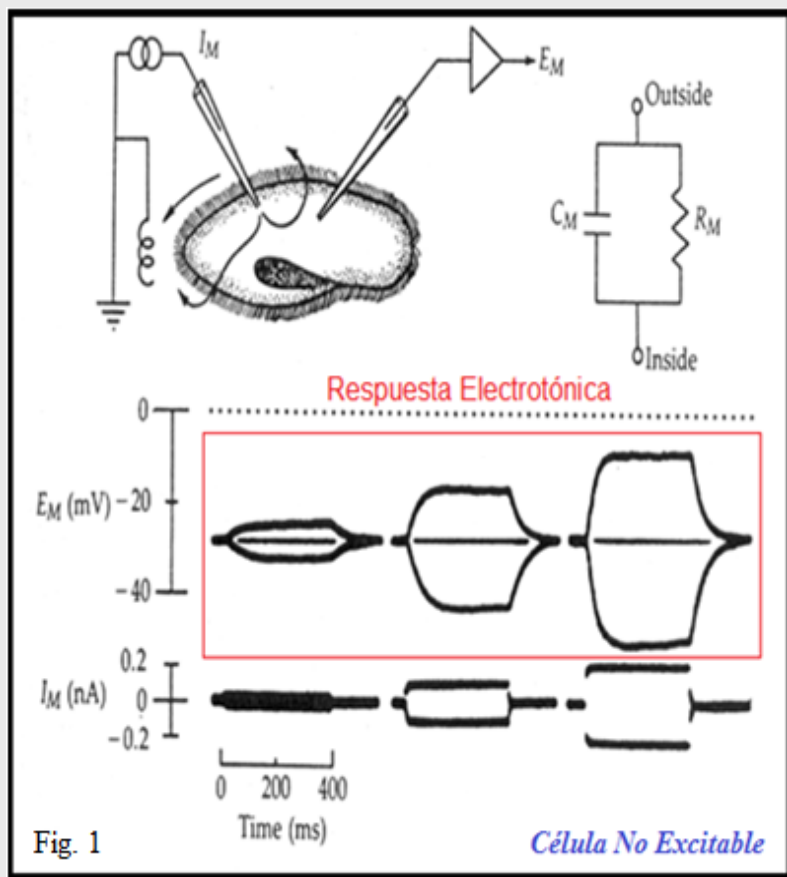
# Células Excitables

## Clase 3

**Ernesto Cristina**

**Año 2021 (SARS-CoV-2)**

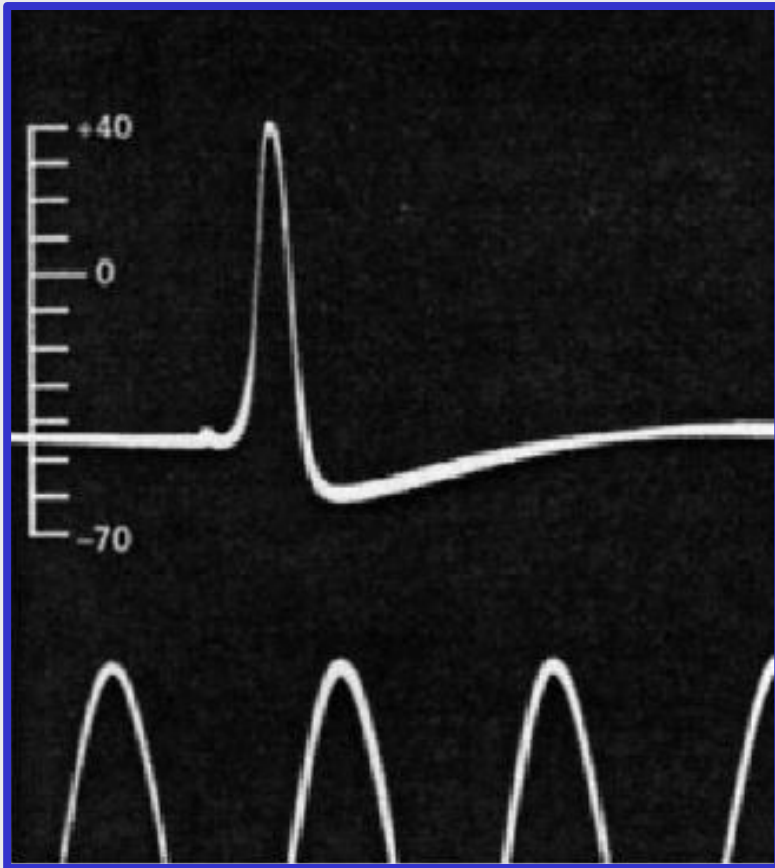
El análogo eléctrico permite reproducir el fenómeno llamado *electrotono*, el cual ocurre por debajo de lo que se denomina “*umbral*” [este *umbral* hace referencia a una cierta *intensidad de corriente* o a un determinado *valor de voltaje*, a partir del cual se desencadena una *respuesta exclusiva de las células excitables (ejemplo: células nerviosas y musculares) conocida como Potencial de Acción (PA)*]. Nota: *la respuesta electrotonica es propia de células no excitables como también de células excitables.*



Notas → Threshold: Umbral. Action Potential: Potencial de Acción (PA). Depolarizing Current: Corriente Despolarizante.

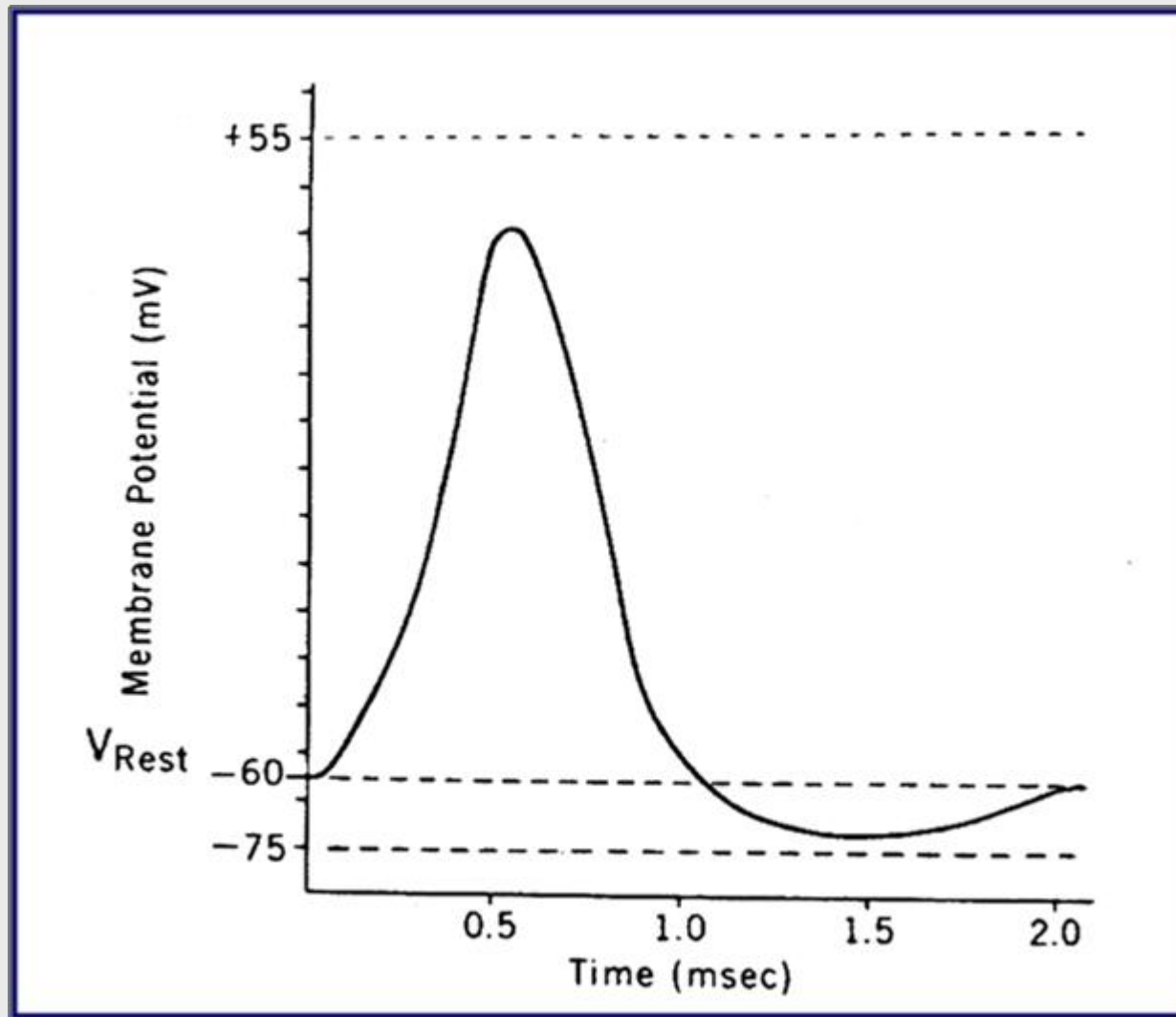
Fig. 1: Adaptado de “Ionic Channels of Excitable Membranes”. 2<sup>nd</sup> Edition. 1992. Pág. 11. Bertil Hille.

Fig. 2: Adaptado de “An Introduction to Membrane Transport and Bioelectricity”. 2<sup>nd</sup> Edition. 1994. Pág. 73. Byrne and Schultz.



Registro histórico de un PA en el AGC (*Loligo forbesi*). Fue obtenido por Hodgkin y Huxley en el año 1939 (*Nature*, volume 144, pages 710–711), utilizando electrodos “capilares” (micro electrodos) cuyo interior contenía una solución de agua de mar. A través del micro electrodo colocado en el axoplasma se “inyectó” una corriente *supra-umbral*. El eje de ordenadas representa el PM en el medio interno (*mili voltios*), el medio externo estaba compuesto por agua de mar y su potencial eléctrico fue tomado, por conveniencia, como “*tierra*” (0 mV). El marcador de tiempo es de 500 Hz (tener en cuenta que este tipo de registro se obtenía por medio del uso de osciloscopios analógicos). Correspondería al eje de abscisas (*mili seg.*).

Otro gráfico en el que se muestra la “clásica” curva temporal del PA. La duración del mismo puede variar según el tipo de neurona, pero un tiempo característico se halla entre 1 *mseg.* y 2 *mseg.* Notar que el PA implica un drástico cambio en el PM y, repitiendo, es una ***respuesta exclusiva de las células excitables.***



Adaptado de “An Introduction to Membrane Transport and Bioelectricity”. 2<sup>nd</sup> Edition. 1994. Pág. 83. Byrne and Schultz.

## **Electrotono** (ver Clases 1 y 2)

En una “respuesta electrotónica”:

1. El cambio en el PM es graduado; si el pulso de corriente es de menor intensidad, el cambio en el PM será de menor amplitud, y viceversa.
2. El cambio en el PM decae con la distancia.

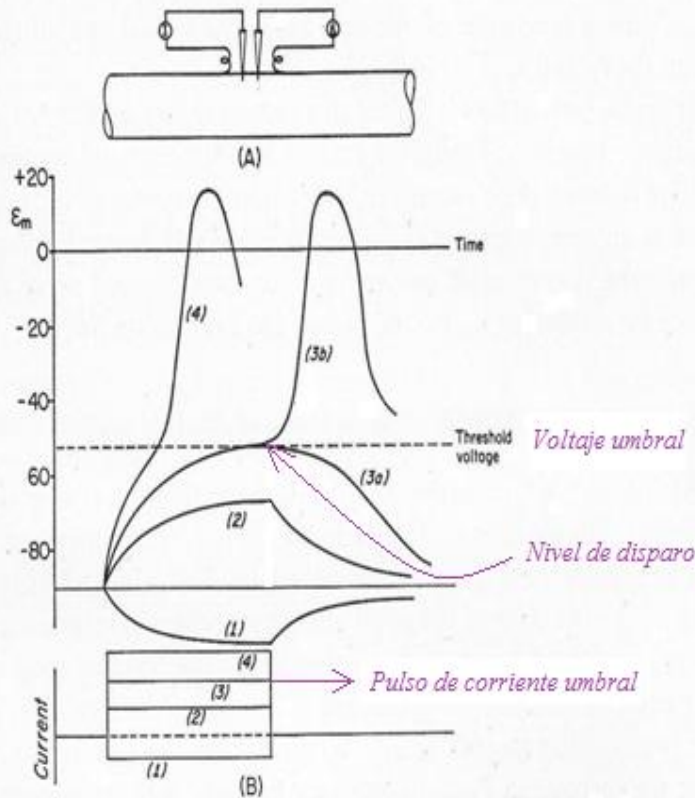
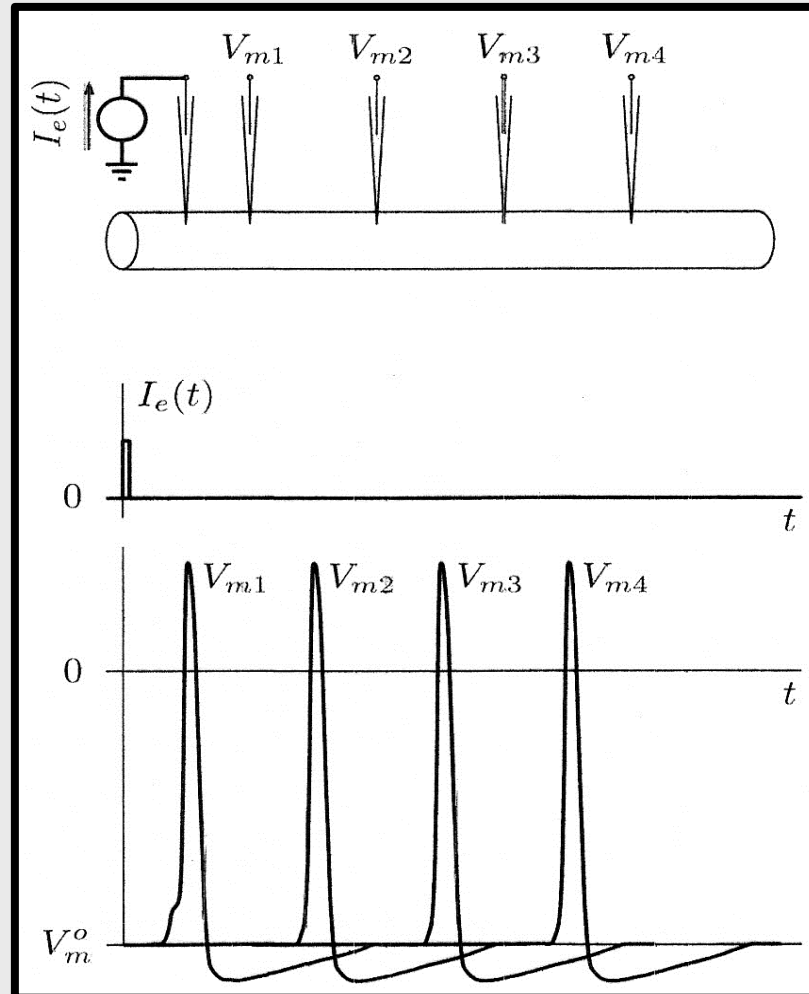


FIG. 19. Threshold. A, Schematic diagram of experimental arrangement showing intracellular stimulating ( $I$ ) and recording ( $\epsilon$ ) electrodes. B, Changes in  $\epsilon_m$  (upper records) produced by suddenly applied and terminated constant currents (lower records). Curve 1 in current records produced voltage changes shown by Curve 1 in  $\epsilon$  records, and so forth for Curves 2 to 6. Hyperpolarizing and subthreshold depolarizing currents of any strength produce the  $\epsilon_m$  changes expected from electrotonic considerations (Curves 1 and 2). Current of just threshold strength will produce one of two responses: Either membrane potential returns to steady value after a delay (3a), or an action potential is generated with its typical rapid rise and fall (3b). Any stronger stimulus (4) also generates an action potential, but progressively shorter times are required to depolarize membrane to threshold.

En la figura se observan los diversos cambios temporales en el PM ( $\epsilon_m$ ) de una célula muscular (A) al cual se la estimula con varios pulsos rectangulares de corriente ( $Current$ ) (no simultáneos) de distinta intensidad. Los pulsos de corriente (1) y (2) (pulsos *sub-umbrales*), correspondientes a las curvas (1) y (2) de  $\epsilon_m$ , generan respuestas electrotónicas (dos fases o tramos en cada curva siguiendo cursos exponenciales con respecto al tiempo). El pulso de corriente (3) representa un pulso *umbral*. Justo al final del pulso el PM alcanza el “nivel de disparo”. En ese nivel se puede dar origen a un PA [curva (3b)] o a lo que se denomina *respuesta local* [curva (3a)], la cual no se propaga más allá de una corta distancia y no sigue el curso exponencial característico de la respuesta electrotónica (la *respuesta local* no se produce en células no excitables). El pulso (4) (pulso *supra-umbral*), de mayor intensidad al pulso *umbral*, genera un PA [curva (4)] con características similares al de la curva (3b), solo que se requiere de un menor tiempo para que éste se inicie.

En la figura se observa el cambio en el PM de un axón (gráfico inferior) como consecuencia de un pulso rectangular de corriente *supra-umbral* [ $I_e(t)$ ]. Notar que se produce un único PA, y el mismo se registra a distintas distancias del punto de estimulación de corriente ( $V_{m1}$ ,  $V_{m2}$ ,  $V_{m3}$ ,  $V_{m4}$ ;  $V_m$ : PM). Es importante reiterar que se trata de un único PA que **se transmite a lo largo del axón sin experimental decremento** (no decae con la distancia; diferencia fundamental con respecto a la respuesta electrofónica). También observar que el eje de abscisas del gráfico inferior representa el tiempo ( $t$ ), esto implica lo expresado anteriormente (se trata del mismo PA registrado a diferentes distancias del punto de estimulación, pero a distintos tiempos).



Otra característica específica del PA es lo que se denomina “*sumación temporal*”. Implica la “sumación” de estímulos sub-umbrales *despolarizantes*, los cuales van promoviendo sucesivas respuestas electrofisiológicas que al sumarse terminan generando un PA. Un ejemplo de esto se muestra en la figura.

## Sumación temporal

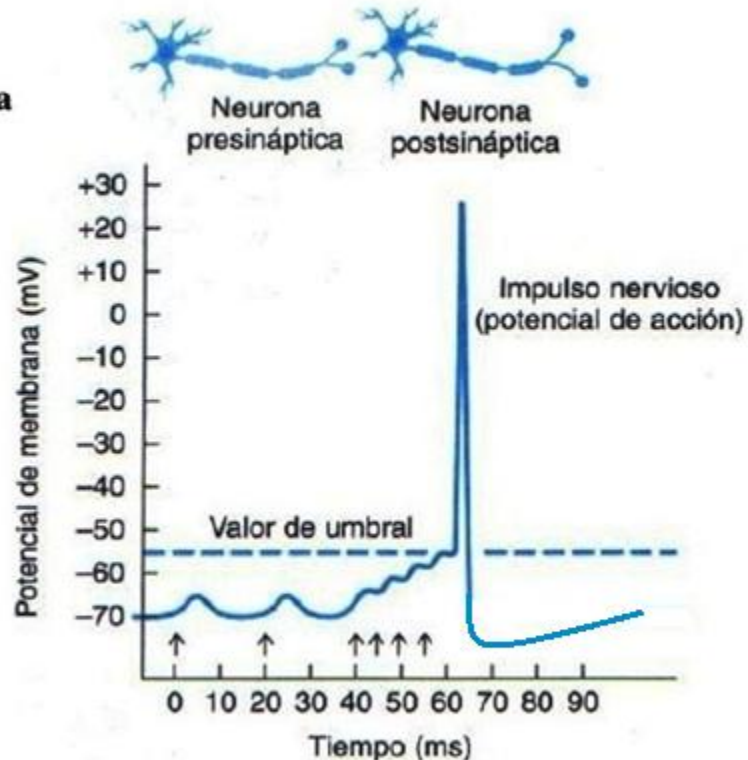
En este experimento se acumula un NT que libera dos o más veces, en rápida sucesión, un solo botón presináptico.

El PPSE dura unos 15 ms, de modo que la segunda liberación de NT (y las subsiguientes) debe ocurrir poco después de la primera para que haya una sumación temporal.

PPSE: Potenciales Postsinápticos Excitatorios.

NT: Neurotransmisor.

Botón presináptico: vesícula sináptica.



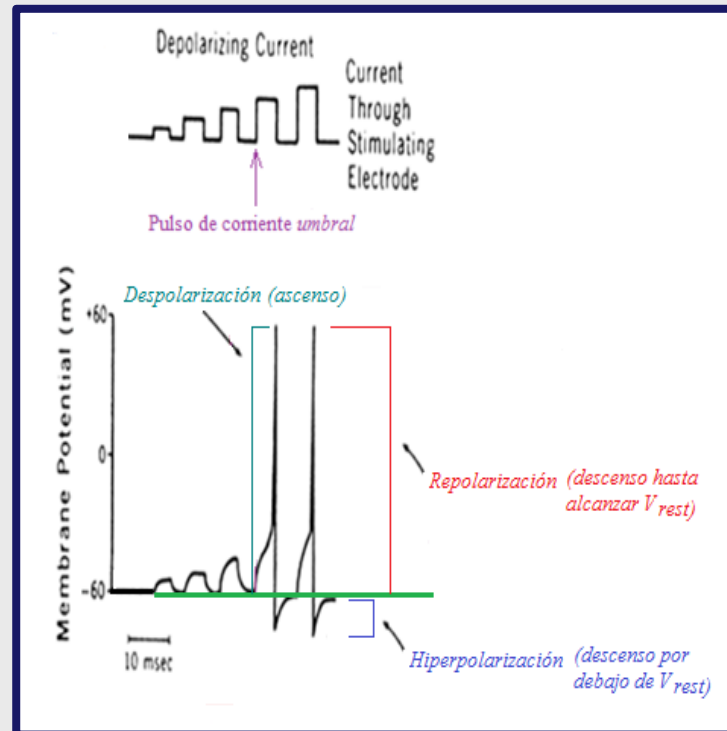


## Características generales del PA

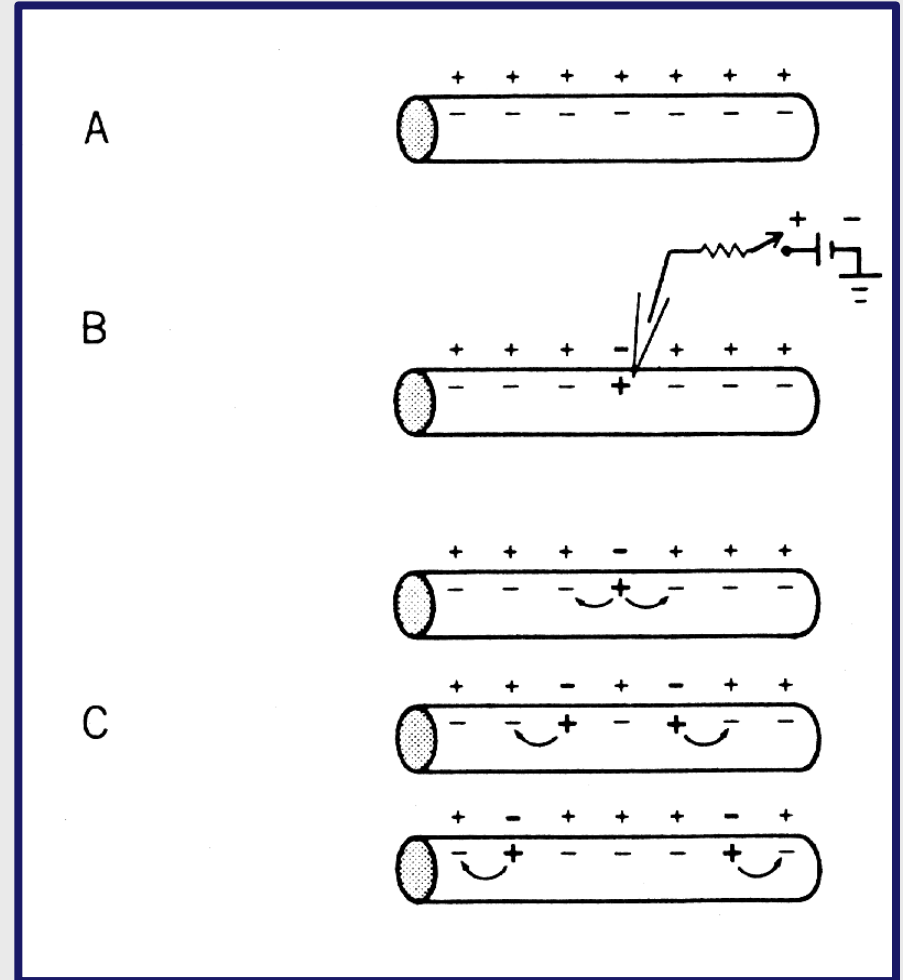
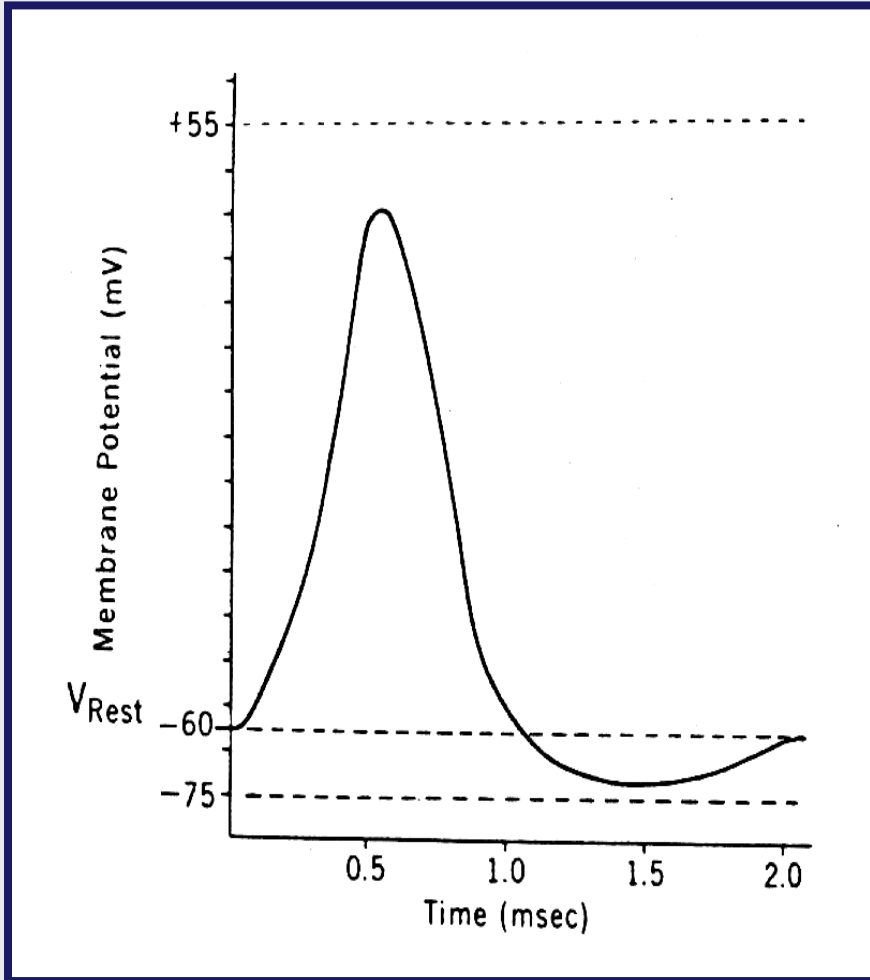
a.- Representa un importante cambio en el PM de las células excitables. Durante el curso temporal de este cambio se pueden apreciar 3 fases: 1) una fase de despolarización, 2) una fase de repolarización, y 3) una fase de hiperpolarización.

b.- Se genera en una modalidad que se llama “*todo o nada*”. Esto significa que si el estímulo alcanza el *nivel de disparo (umbral)*, podrá producirse el PA. Si el estímulo fuera *sub-umbral* no se generará PA, mientras que un estímulo *supra-umbral* desencadenará un PA que ocurrirá antes en el tiempo, con respecto al generado por un estímulo *umbral*, pero presentará las mismas características.

c.- Su transmisión a lo largo del axón se verifica sin decremento, y una vez generado también se propagará de acuerdo a la modalidad “*todo o nada*” [en una neurona típica el PA se inicia en el *cono axónico (axon hillock)* y se propaga hacia los *bulbos sinápticos (synaptic endbulbs)* (ver diapositiva Nro. 3, Clase 2)].



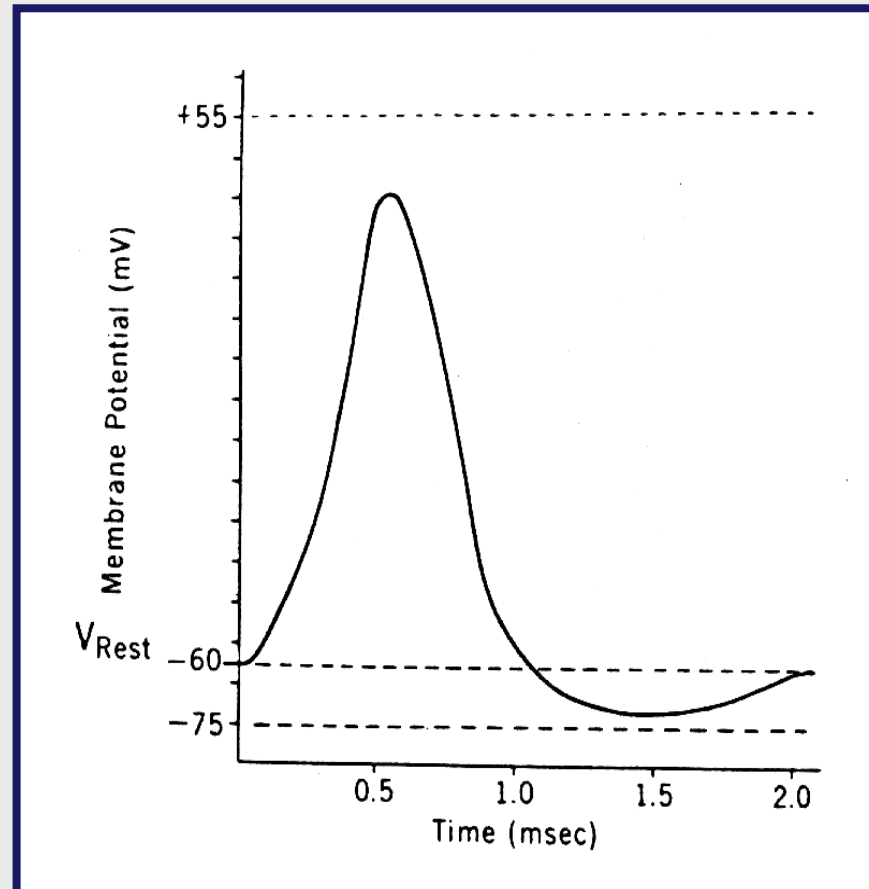
El esquema “A” muestra lo que sería la membrana del axón en estado de reposo. En el esquema “B” se representa lo que sucede cuando se estimula eléctricamente al axón con un pulso capaz de generar un PA (el axón se despolariza). Los esquemas “C” muestran la propagación de esa “onda despolarizante”, en ambos sentidos a lo largo del eje longitudinal del axón, y el retorno al estado de reposo luego del pasaje de la “onda”.



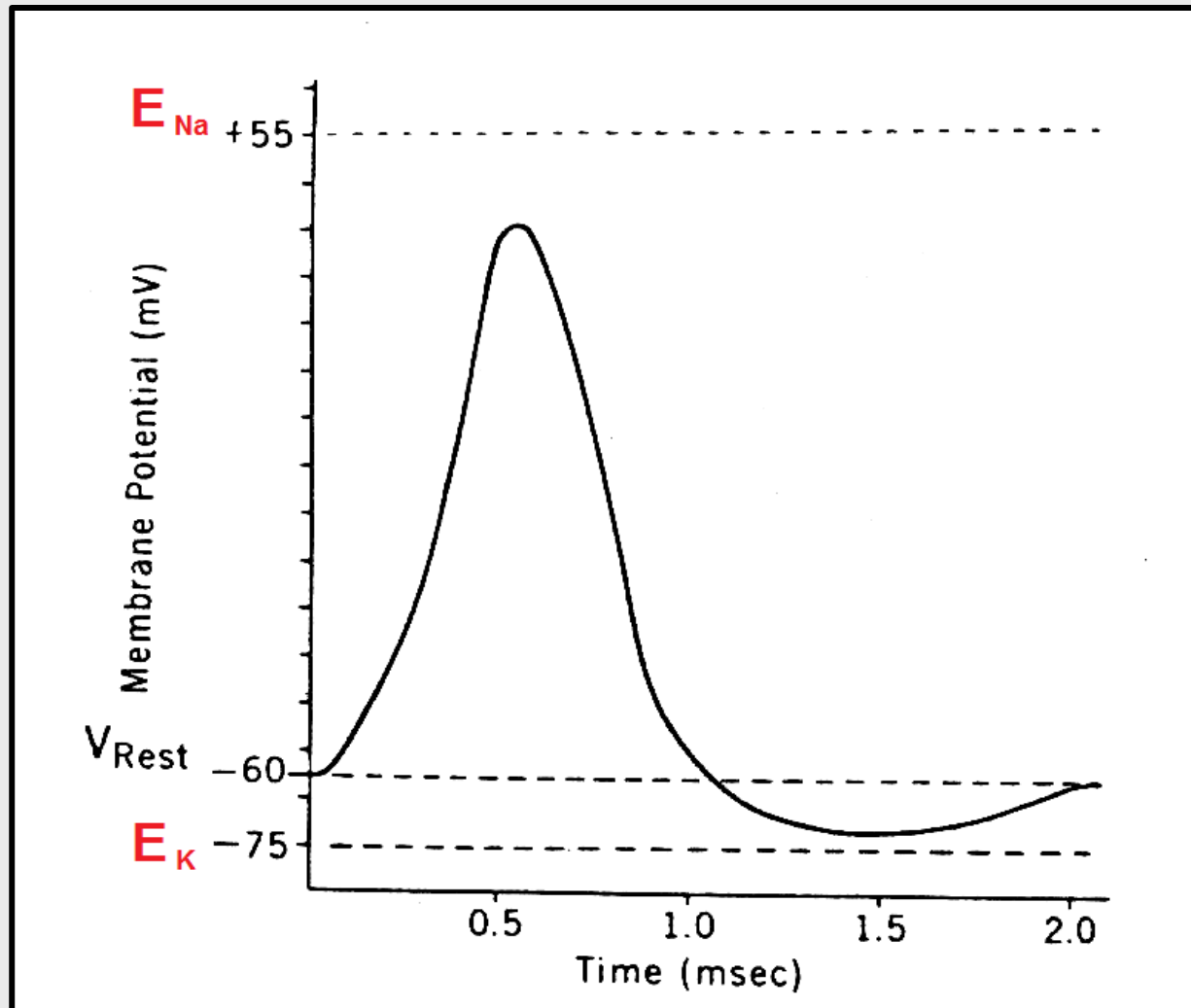
Adaptado de “An Introduction to Membrane Transport and Bioelectricity”. 2<sup>nd</sup> Edition. 1994. Págs. 83 y 105. Byrne and Schultz.

- El PA es el “vehículo” a través del cual la información periférica (por ejemplo, la que proviene de los receptores sensoriales, mediante *vías aferentes*), es codificada y transmitida hacia el Sistema Nervioso Central; allí se iniciarán, por ejemplo, comandos motores que se propagarán hacia la periferia (mediante *vías eferentes*), por medio de potenciales de acción, siendo éste el primer “paso” en el inicio de la contracción muscular.
- Cuando se trata de transmitir información a cortas distancias en el sistema nervioso, la respuesta electrotónica y la respuesta local pueden ser útiles (recordar que ambas decaen con la distancia, lo que implica un “deterioro en la señal”). Cuando las distancias son considerables, la forma en que se transmite la información se basa en el PA (se transmite sin decremento, en otras palabras no se deteriora la “señal” con la distancia).

- En el **Axón Gigante de Calamar (AGC)** el valor aproximado de  $V_{rest}$  es de **-60 mV**. Durante la fase inicial (fase 1) del PA se produce una marcada **despolarización**, alcanzando el PM un valor máximo (“pico” de la curva) de aproximadamente unos **+40 mV**. Notar que el valor total de esta despolarización es de unos 100 mV (el PM se incrementa desde su valor de reposo de -60 mV hasta alcanzar un valor de +40 mV).
- A esto le sigue la fase de **repolarización** (fase 2), y luego la fase de **hiperpolarización** (fase 3). En esta última fase existe un período de tiempo durante el cual el PM se vuelve **más negativo** con respecto a  $V_{rest}$ .

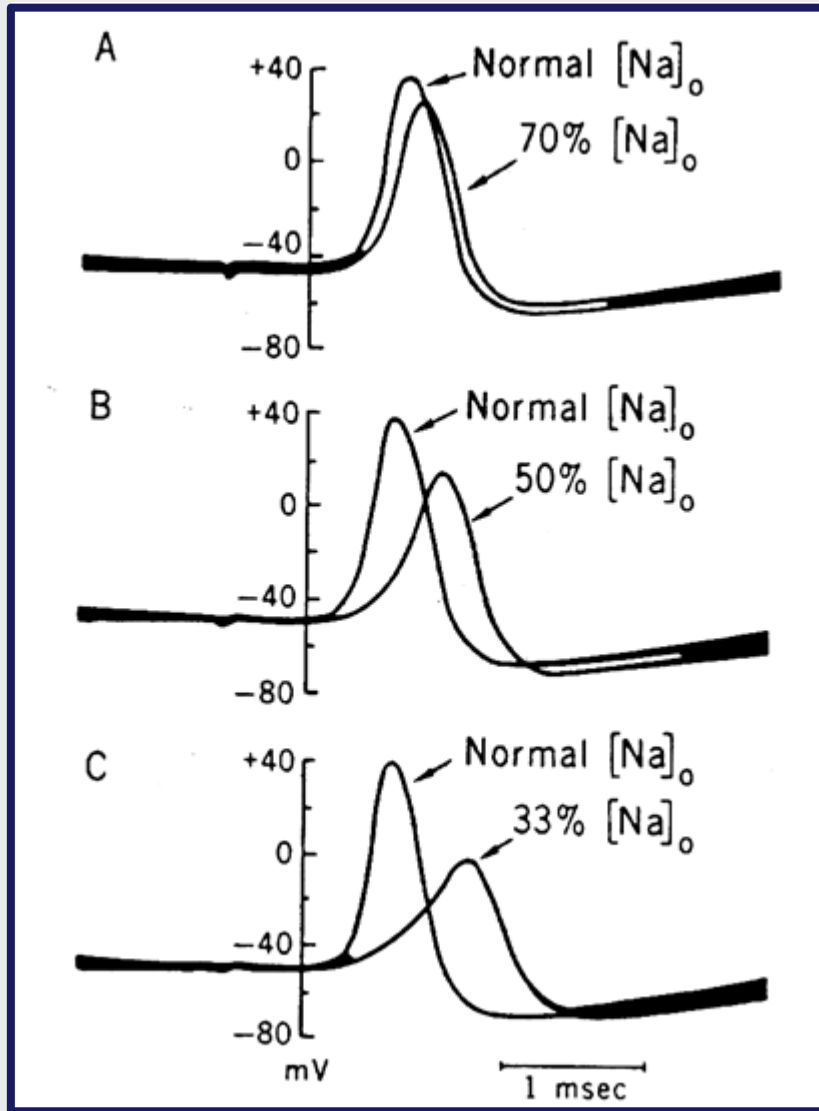


Una observación importante acerca del curso (trayectoria) temporal del PA es que el cambio en el PM atraviesa una región que se halla limitada por un valor cercano a  $E_{Na}$  (potencial de equilibrio de  $Na^+$ ) en uno de sus extremos, y por un valor próximo a  $E_K$  (potencial de equilibrio de  $K^+$ ) en su otro extremo.



¿Es posible dilucidar los mecanismos iónicos que generan un PA? Hodgkin y Katz iniciaron potenciales de acción en el AGC para diferentes  $[Na^+]$  en el medio externo (“o”), obteniendo los siguientes resultados (extraído de “An Introduction to Membrane Transport and Bioelectricity”. 2<sup>nd</sup> Edition.

1994. Pág. 81. Byrne and Schultz):



Se puede observar que al ir disminuyendo la  $[Na^+]$  en el medio externo (esto se logra mediante la disminución en la  $[NaCl]$  en ese medio), se producen notorios cambios en la curva temporal del PA:

- disminuye el valor máximo (“pico”), y por lo tanto también disminuye la amplitud del PA, con respecto al PA “Normal” (100% de  $Na^+$  en “o”), y
- aumenta la latencia, es decir se produce un retraso (“*delay*”) en la generación del PA, con respecto al PA “Normal”.

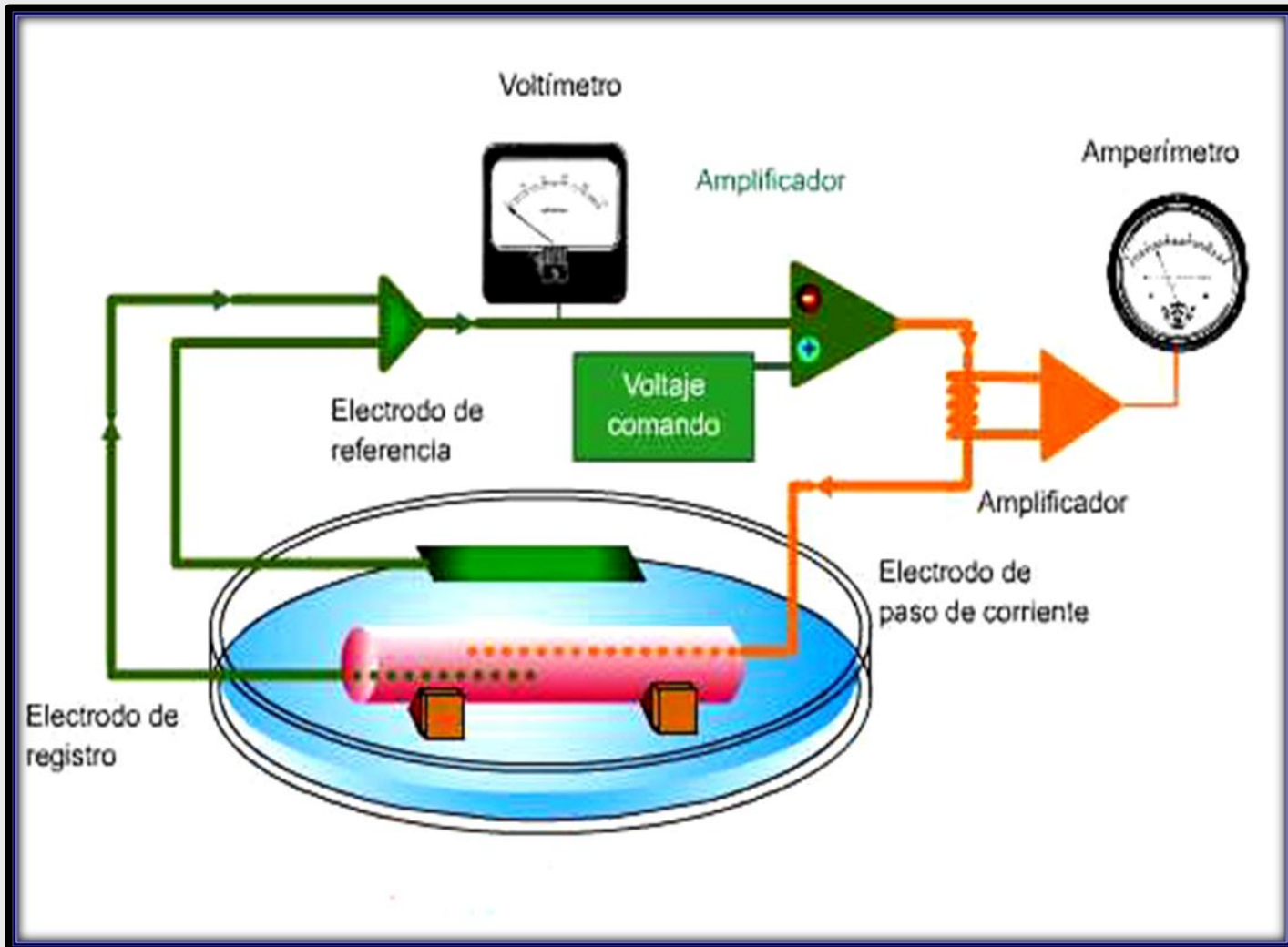
Este experimento constituye un sólido argumento con respecto a que el ión  $Na$  se halla involucrado, por lo menos, en la fase inicial del PA.

- **Problema:** cuando se alcanza el umbral y se “dispara” el PA se genera una corriente a través de la membrana [ese drástico cambio en el PM involucra una redistribución de cargas en ambos lados de la membrana (ambas “placas del condensador”). Las 3 fases del PA ponen de manifiesto este movimiento de cargas]. Siendo este fenómeno tan rápido (PA “clásico”  $\approx 1 \text{ mseg. a } 2 \text{ mseg.}$ ), resultó ser algo muy difícil poder medir esa corriente producida. Es decir, al generarse el PA el investigador no tenía forma de fijar y controlar el PM en un valor establecido, y en consecuencia poder registrar la corriente producida, pues el PM variaba muy rápidamente siguiendo el curso temporal característico del PA.
- Esto representó uno de los principales obstáculos que enfrentaron los investigadores de la época (desde la década de los años 30 hasta la de los años 50) para develar los mecanismos iónicos que gobiernan la generación y propagación del PA.

- Hodgkin, Huxley, y sus colegas, perfeccionaron un dispositivo que les permitió estabilizar el PM en diferentes valores de voltaje por prolongados períodos de tiempo (en otras palabras, establecer por parte del investigador una determinada diferencia de potencial eléctrico en la membrana del AGC). Este dispositivo electrónico de retroalimentación se denominó “*voltage-clamp amplifier*” (para nosotros, controlador o regulador de voltaje). Permitted el desarrollo de la técnica de “*voltage-clamp*” (“*clampeo de voltaje*”).
- El mismo toma la diferencia entre el registro actual del PM (por ejemplo, el valor del potencial de reposo) y el valor deseado (valor al cual se lleva el PM por parte del investigador), y genera una corriente entrante o saliente, según sea el caso, para minimizar la diferencia (concretamente, para hacerla nula). La cantidad de corriente necesaria para mantener el PM en el valor deseado (el que establece el investigador) representa la corriente que atraviesa la membrana, para ese “step” (“escalón” o “paso”) específico de voltaje, pero con signo contrario. Esto se debe a que la corriente producida por el dispositivo circula en sentido opuesto a la que atraviesa a la membrana como resultado de ese “step” de voltaje; es precisamente así como se anula la corriente que surge como resultado del voltaje fijado por el investigador.
- **NOTA IMPORTANTE:** como se explicó más arriba, este dispositivo permite fijar y mantener por un determinado tiempo una DPE específica en la membrana. Es decir, se trata de un tipo de experimento diferente al que hemos estado analizando hasta ahora (estímulos de corriente en la célula y el registro del cambio en el PM como consecuencia de ese estímulo). Con este dispositivo se “impone” una determinada DPE en la membrana de la célula, se mantiene durante un cierto tiempo, y se registra la corriente generada como consecuencia de ese voltaje establecido. Este tipo de experimento y los de estimulación de corriente constituyen las dos formas históricamente clásicas de estudio de las células excitables.



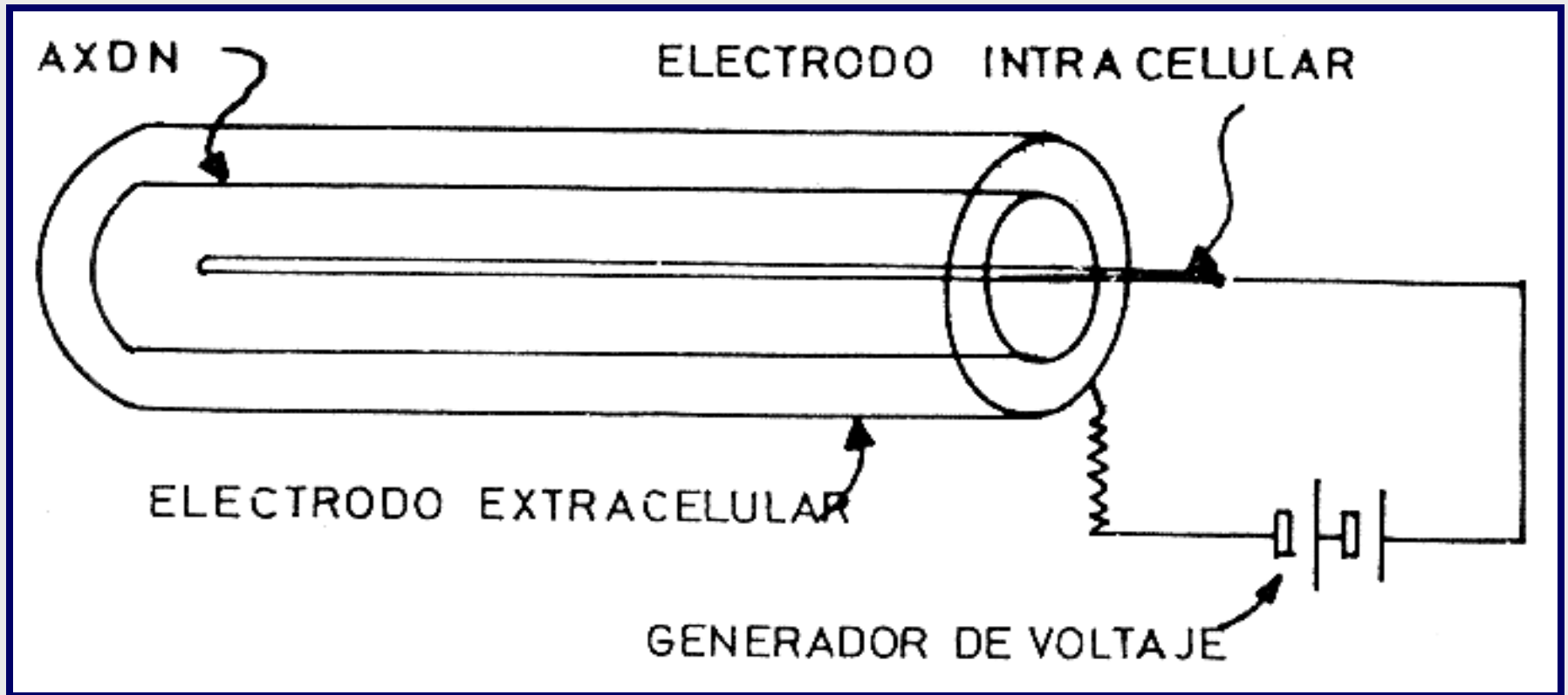
La técnica de “*voltage-clamp*” ofreció por primera vez la posibilidad de medir la corriente iónica que se genera en la membrana de una célula excitable (originalmente en el AGC), ante los diferentes valores de voltaje impuestos por el experimentador.



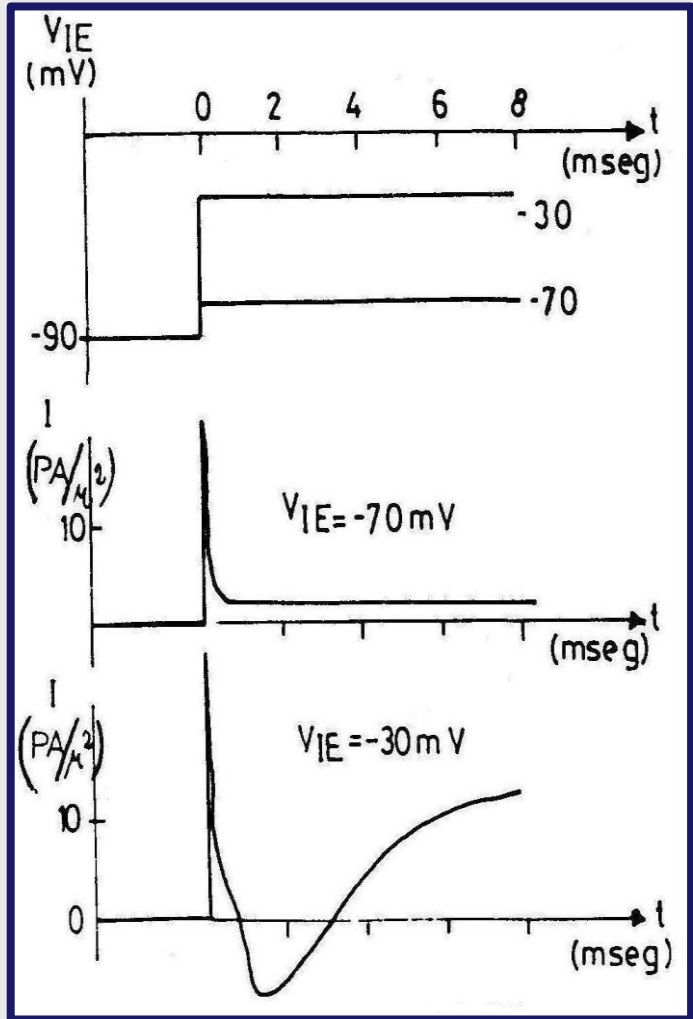
Esquema ilustrativo del dispositivo regulador de voltaje. Imagen extraída de Internet.

- **Otro Problema:** si el voltaje establecido en la membrana del AGC por parte del investigador es capaz de generar un significativo grado de despolarización (recordar que el PA se produce ante estímulos de corriente despolarizantes; ver diapositivas Nros. 2 y 6), se podrá alcanzar el umbral y podría “dispararse” el PA, el cual se transmitirá longitudinalmente a lo largo del axón en su característica modalidad “*todo o nada*”. Esto impediría registrar la corriente generada a través de la membrana, ya que rápidamente desaparecería a nivel local como consecuencia de la propagación.
- Para evitar esto último, el dispositivo regulador de voltaje se emplea conjuntamente con un muy delgado electrodo metálico, usualmente de plata, que se extiende a lo largo de toda la longitud del axón (recordar que el diámetro del AGC es de aproximadamente 1 mm). A través de este electrodo (el cual se conecta a un *Generador de Voltaje*) es posible establecer voltajes específicos a través de toda la extensión de la membrana del axón, dando lugar a la técnica conocida como “*space-clamp*” (“*clampeo espacial*”). El término inglés “*clamp*” podría entenderse en este contexto como “*restricción*” (se “*restringe*” espacialmente al axón para evitar la transmisión longitudinal de los cambios en el PM a nivel local, en otras palabras el cambio en el PM, mediante el uso de un electrodo con estas características, ocurre simultáneamente en toda la membrana del axón). Esto permite registrar exclusivamente los *cambios temporales* en la corriente generada a través de la membrana a lo largo de toda la extensión del axón –el axón pasaría a ser isopotencial con la aplicación de esta metodología–.
- **Nota:** los registros experimentales que se presentan en las próximas diapositivas son el resultado de la utilización del dispositivo controlador de voltaje, el cual permite la técnica de “*voltage-clamp*”, y del empleo de la técnica de “*space-clamp*”.

# “Space Clamp” o Método del “Cable Axial” (Axón Isopotencial)



Extraído de “Transporte y Excitabilidad”. 1983. Pág. 57. Eduardo Ríos.



Extraído de “Transporte y Excitabilidad”. 1983. Pág. 57.  
Eduardo Ríos.

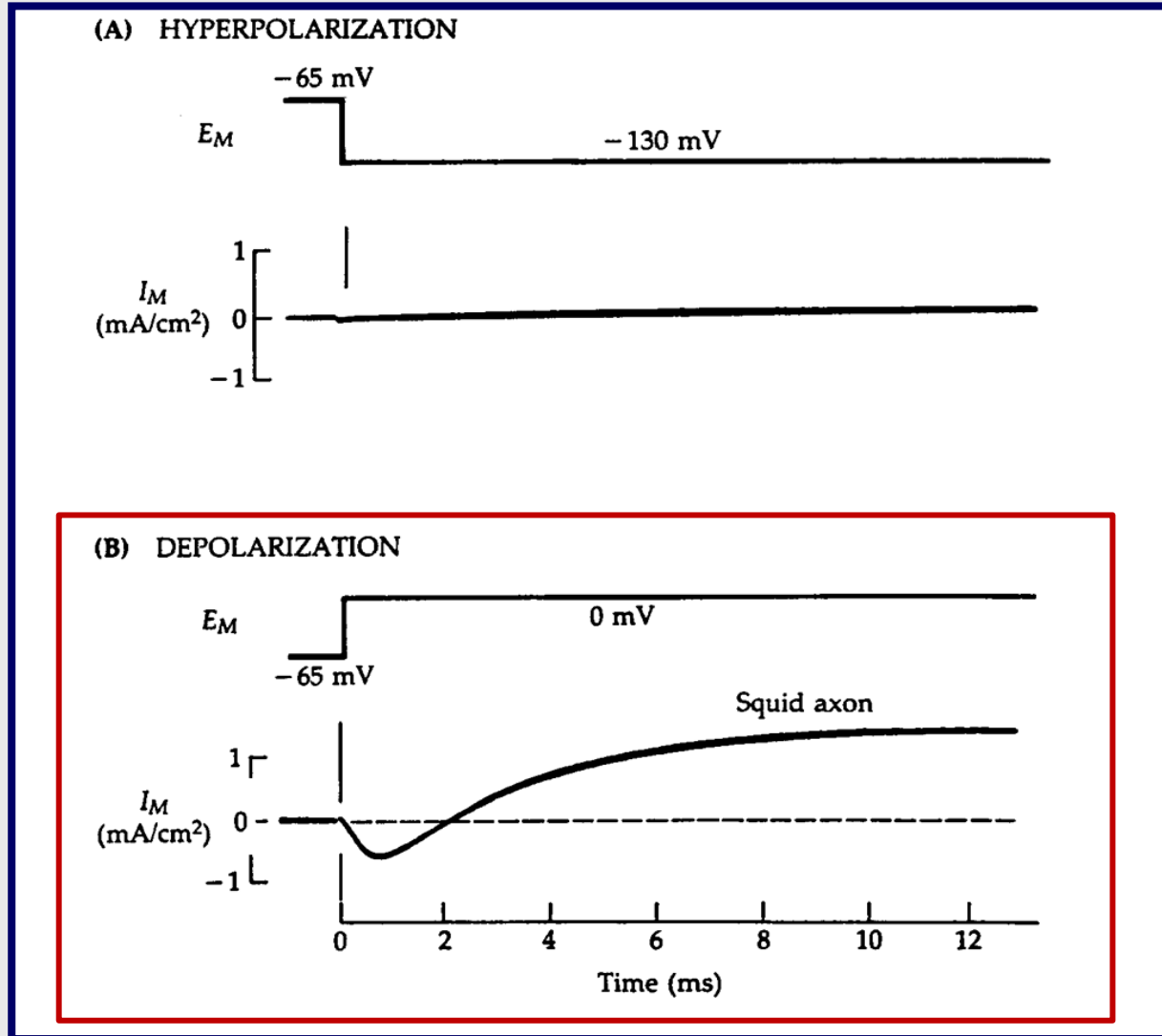
Registros de corriente ( $I$ ) vs. tiempo, en una célula muscular, mediante el uso de las técnicas de “voltage-clamp” y de “space-clamp”. En el gráfico superior se observan los 2 “steps” de voltaje ( $V_{IE}$ ) fijados por el experimentador mediante el dispositivo regulador de voltaje. El PM exhibe un drástico salto desde su potencial de reposo ( $V_{rest} = -90 \text{ mV}$ ) a un 1<sup>er</sup> valor de  $-70 \text{ mV}$ , y luego, en un 2<sup>do</sup> experimento independiente del anterior, a  $-30 \text{ mV}$ . En los gráficos inferiores se observan los registros temporales (t en mili seg.) de corriente ( $I$ ) [ $\text{pico amperios (PA)}$  por  $\text{micrómetro cuadrado} (\mu\text{m}^2) \rightarrow (\text{PA}/\mu\text{m}^2)$ ] para cada uno de esos “steps” de voltaje.

En el gráfico de “I” correspondiente a  $V_{IE} = -70 \text{ mV}$ , la membrana se comporta de acuerdo al análogo eléctrico. Se observa un 1<sup>er</sup> pico de corriente capacitiva. Recordar que  $I_c \equiv dQ/dt = C \cdot dV_m/dt$ , por lo tanto al llevar el PM ( $V_{IE}$ ) a  $-70 \text{ mV}$  está ocurriendo un gran cambio en éste ( $dV_m/dt \neq 0$ ). En consecuencia se verifica una rápida corriente capacitiva, pero como el PM se mantiene en ese valor constante de  $-70 \text{ mV}$  la variación de  $V_m$  con respecto al tiempo ( $dV_m/dt$ ) se hace 0, lo cual implica que la corriente capacitiva desaparece (se llega a una nueva distribución de cargas en ambos lados de la membrana mientras se mantenga el generador de voltaje encendido). Luego se observa una corriente de valor constante, se trata de una corriente iónica que atraviesa la “rama resistiva” de la membrana ( $I_R$ ) (ésta se mantiene constante ya que el generador de voltaje permanece encendido y en un valor fijo).

En el gráfico de “I” correspondiente a  $V_{IE} = -30 \text{ mV}$  se observa algo diferente: la corriente presenta un pico inicial como en el caso anterior ( $I_c$ ) pero de mayor magnitud (consecuencia de una mayor despolarización,  $V_{IE} = -30 \text{ mV}$ ), aunque aparece un 2<sup>do</sup> pico en sentido opuesto (*notar que el 1<sup>er</sup> pico es de corriente saliente; el 2<sup>do</sup> es de corriente entrante*). Posteriormente, la corriente vuelve a ser saliente y crece lentamente. Este 2<sup>do</sup> componente de la corriente total (el que sigue al de corriente capacitiva) corresponde a una corriente iónica que atraviesa la membrana ( $I_R$ , corriente resistiva). El cambio en la corriente total que atraviesa la membrana y que se observa en el gráfico inferior ya no puede ser explicado por el análogo eléctrico (éste solo da cuenta de respuestas como la descrita en el párrafo anterior).

*Debemos destacar que en el 2<sup>do</sup> experimento de control de voltaje, el PM fue llevado a un valor superior al “nivel de disparo”. La corriente entrante (pico de corriente resistiva) haría aún menos electronegativo el potencial interno y se generaría el PA si el PM no estuviera controlado y fijado en  $-30 \text{ mV}$ .*

Registros de *corriente de membrana* ( $I_M$ ) vs. *tiempo* obtenidos en el AGC [PM ( $E_M$ ) controlado mediante la técnica de “*voltage-clamp*” y empleando además la técnica de “*space-clamp*”]. (A) Se lleva el PM de  $-65\text{ mV}$  ( $V_{rest}$ ) a  $-130\text{ mV}$  (fuerte hiperpolarización) sin observarse ninguna corriente a través de la membrana. (B) El PM se fija en  $0\text{ mV}$  (fuerte despolarización), esto genera una importante corriente a través de la membrana. La corriente capacitiva que debería observarse en el registro “(B)” fue sustraída del gráfico. **Temperatura del experimento  $3,8\text{ }^\circ\text{C}$ .**



- Hodgkin y Huxley (HH) (1952) pensaron y desarrollaron una serie de experimentos para poder determinar cuáles eran los iones que producían esa corriente ante “steps” despolarizantes de voltaje capaces de generar un PA, y de qué forma los cambios en la conductancia (o permeabilidad) de la membrana se encontraban relacionados con esa corriente. Es importante destacar que la conductancia de la membrana no es estrictamente igual a la permeabilidad de la misma, no obstante, y solo como una aproximación en este contexto, la consideraremos equivalente a la permeabilidad (la conductancia es proporcional a la permeabilidad, pero la igualdad entre ellas implica un conjunto de coeficientes que multiplican a la permeabilidad).
- Como se trataba de un área de investigación totalmente novedosa para la época, debieron formular nuevas estrategias para dilucidar los mecanismos involucrados en la generación del PA.

# Hipótesis formuladas por HH

**Hipótesis 1.** Asumieron que los iones involucrados en la corriente total que atraviesa a la membrana del axón durante un PA *se desplazaban pasivamente a favor de su gradiente electroquímico*. En consecuencia, basándose en argumentos termodinámicos se podría predecir si el movimiento de un ión específico ocurrirá hacia el interior o hacia el exterior de la célula.

Por ejemplo, corrientes generadas por iones Na ocurrirían hacia el interior celular a PM menores a  $E_{Na}$ , y hacia el exterior celular a PM mayores a  $E_{Na}$ . A un PM igual a  $E_{Na}$ , no habría ninguna contribución de este ión a la corriente total que atravesaría la membrana.

Argumentos similares se aplicarían a otros iones ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ , etc.), teniendo en consideración sus respectivos potenciales de equilibrio (potenciales de Nernst).

## ¿Qué implica la Hipótesis 1?

Tomando como ejemplo al  $\text{Na}^+$ , conociendo el valor de su potencial de equilibrio en el AGC ( $E_{\text{Na}} \approx +55 \text{ mV}$ ), el valor del potencial de reposo del AGC ( $V_{\text{rest}} \approx -60 \text{ mV}$ ), y aplicando la ley de Ohm “*versión iónica*”, podemos entender lo que implica la Hipótesis 1:

$$I = G_{\text{Na}} \cdot (V_m - E_{\text{Na}}),$$

sabiendo que las conductancias toman siempre valores positivos, el signo de “ $I$ ” estará dado por la diferencia entre  $V_m$  (este valor lo fija el experimentador utilizando el dispositivo regulador de voltaje) y el potencial de equilibrio del ión, es decir:

Para valores de  $V_m$  menores a  $E_{\text{Na}}$ ,  $I$  tomará valores negativos  $\Rightarrow$  la corriente será entrante.

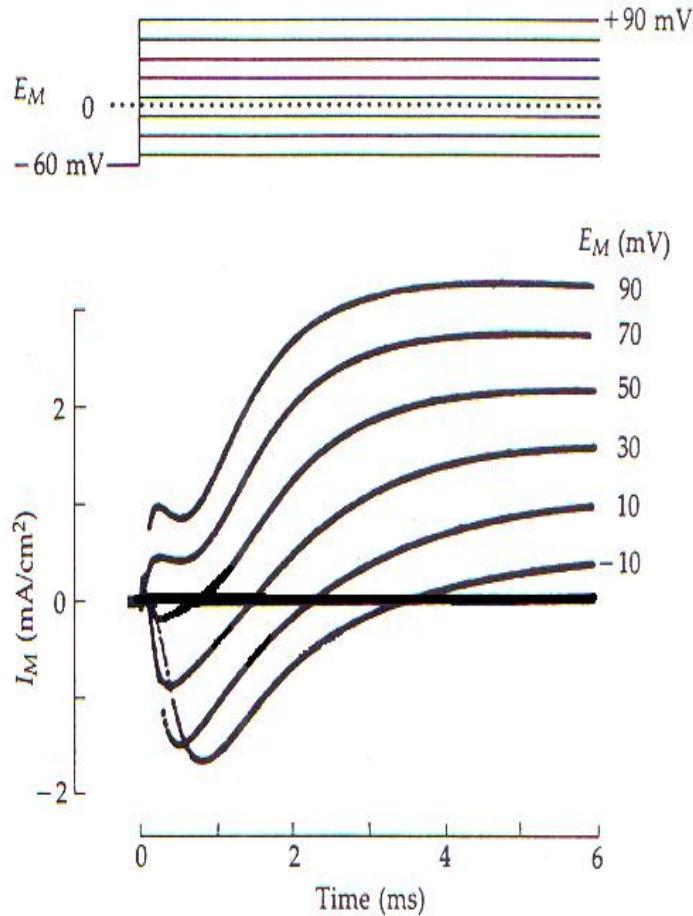
Para un valor de  $V_m$  igual a  $E_{\text{Na}}$ ,  $I$  será igual a cero  $\Rightarrow$  no habrá corriente.

Para valores de  $V_m$  mayores a  $E_{\text{Na}}$ ,  $I$  tomará valores positivos  $\Rightarrow$  la corriente será saliente.

De la misma manera se procedería con otros iones. La gran ventaja de esta simple hipótesis es que puede ser “*testada*” empleando la técnica de “*voltage-clamp*” mediante el dispositivo regulador de voltaje (resultados de un experimento de este tipo se muestran en la próxima diapositiva).



Registros de *corriente de membrana* ( $I_M$ ) vs. *tiempo* obtenidos en el AGC [PM ( $E_M$ ) controlado mediante la técnica de “*voltage-clamp*” y empleando además la técnica de “*space-clamp*”]. Observar que se lleva el PM de  $-60\text{ mV}$  ( $V_{rest}$ ) hasta un valor de  $+90\text{ mV}$  (“steps” de voltaje despolarizantes cada vez de mayor magnitud). **Temperatura del experimento  $6,6\text{ }^\circ\text{C}$ .**



Notar que a medida que aumenta el grado de despolarización [se trata de varios experimentos independientes cuyos registros se muestran en un solo gráfico ( $I_M$  vs. *tiempo*)], el componente entrante de la corriente total se hace cada vez más pequeño, e incluso casi desaparece a un valor de voltaje de  $+50\text{ mV}$  (valor cercano al potencial de equilibrio del ión  $\text{Na}$ ). Cuando el PM toma valores mayores al potencial de equilibrio de  $\text{Na}^+$  ( $+70\text{ mV}$ ,  $+90\text{ mV}$ ), el componente de la corriente total que antes era entrante se vuelve saliente. Estos resultados son consistentes con una corriente de  $\text{Na}^+$  si se tiene en cuenta lo asumido en la Hipótesis 1. En otras palabras, *el 1<sup>er</sup> componente de la corriente total (el componente entrante) parece ser generado por un flujo del ión  $\text{Na}$  hacia el interior del axón.*

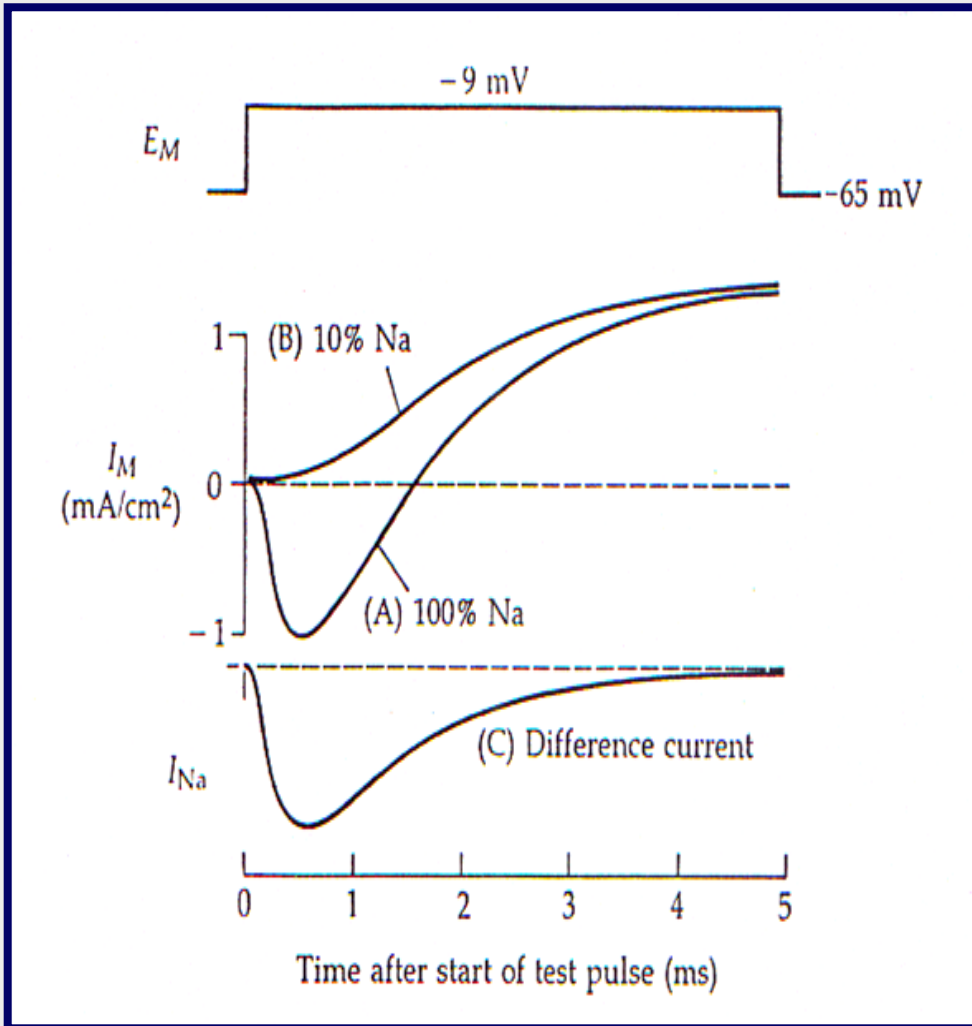
También se observa que el 2<sup>do</sup> componente de la corriente total es saliente para todos los “steps” de voltaje aplicados. *Esto es consistente con un flujo del ión  $\text{K}$  hacia el exterior del axón (considerando, una vez más, lo que se asume en la Hipótesis 1).* Recordar que el potencial de equilibrio de  $\text{K}^+$  ( $E_K$ ) en el AGC es aproximadamente igual a  $-75\text{ mV}$ , y como todos los “steps” de voltaje aplicados en estos experimentos son superiores a  $E_K$ , el  $\text{K}^+$  tendería a salir del axón generando una corriente saliente (aplicar la ley de Ohm “*versión iónica*” para  $\text{K}^+$  como se hizo para  $\text{Na}^+$ ).

**Hipótesis 2.** La remoción de iones específicos en la solución externa al axón podría ocasionar cambios en la corriente total que atraviesa a la membrana, para un “step” de voltaje establecido mediante la técnica de “*voltage-clamp*”. Considerando una situación extrema, si un ión permeable se sustituye completamente por uno no permeable *alguno de los componentes de la corriente total debería desaparecer si este ión genera parte de esa corriente.*

*La identificación de  $I_{Na}$  fue confirmada* mediante el reemplazo de la mayor parte del *cloruro de sodio* del medio externo (agua de mar) por *cloruro de colina* (*colina: catión monovalente que no difunde a través de la membrana*), en experimentos de “*voltage-clamp*” y de “*space-clamp*” como los descritos anteriormente. Un ejemplo de este tipo de experimentos se muestra en la próxima diapositiva.

**Nota Importante:** 10 años después (entre los años 1961 y 1962) de los experimentos de HH del año 1952 se desarrolló un método para modificar las concentraciones de los iones a nivel del axoplasma (técnica de *perfusión* del AGC).

La corriente entrante (1<sup>er</sup> componente de la corriente total) que se observa en el “control” [(A) (100% de Na<sup>+</sup> en el medio externo)] desaparece en un medio con una baja [Na<sup>+</sup>] [(B) (10% de Na<sup>+</sup> en el medio externo)], mientras que la corriente saliente tardía (2<sup>do</sup> componente de la corriente total) se mantiene. **T = 8,5 °C.**



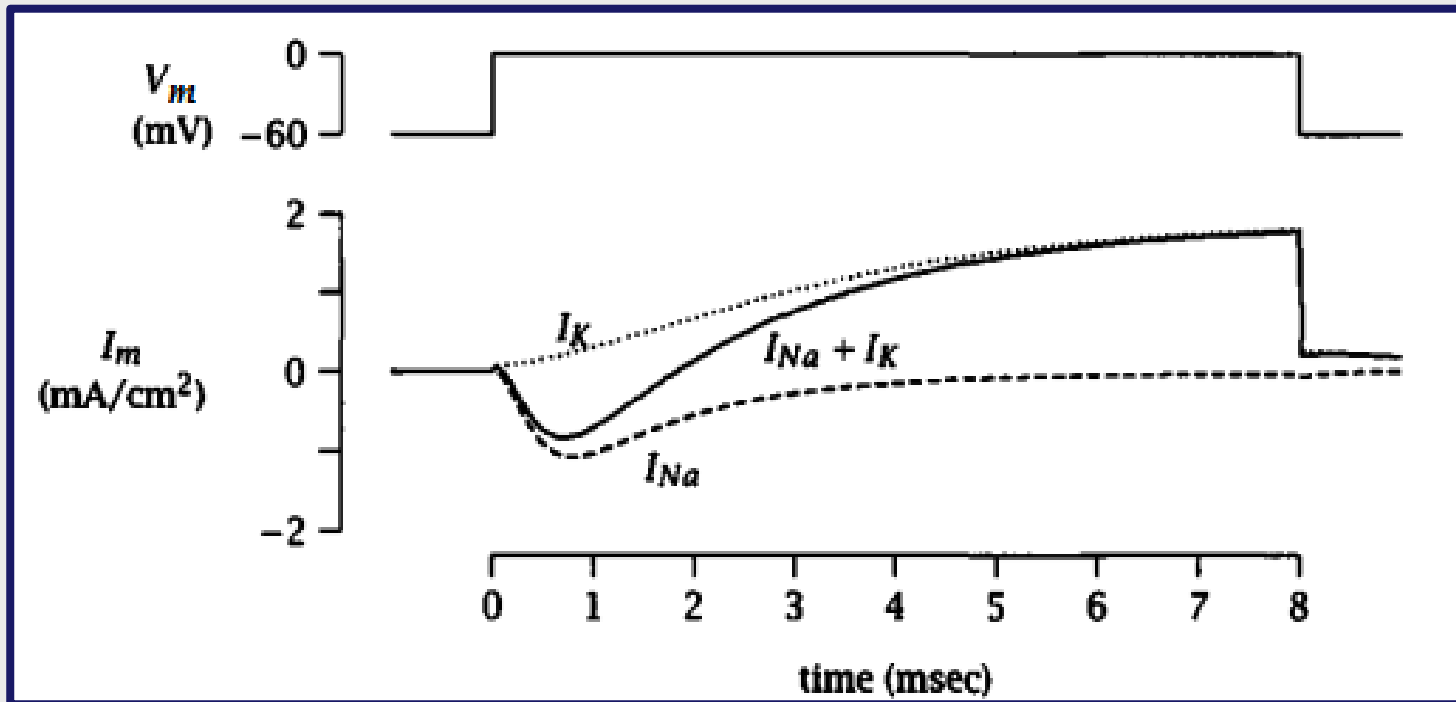
Notar que el potencial de membrana ( $E_M$ ) se lleva desde su valor de reposo ( $V_{rest} = -65$  mV) a  $-9$  mV (fuerte despolarización), durante un período de tiempo de 5 msec.

El experimento (A) representa la situación “control” (condiciones fisiológicas). En el experimento (B) se sustituye el Cloruro de Sodio del medio externo por Cloruro de Colina (90% del cloruro de sodio es reemplazado por cloruro de colina). Son 2 experimentos realizados en forma independiente. Los resultados se muestran en un solo gráfico ( $I_M$  vs. tiempo). Es evidente que en el experimento (B) desaparece el 1<sup>er</sup> componente de la corriente total (corriente entrante), manteniéndose exclusivamente el 2<sup>do</sup> componente de la corriente total (la corriente saliente). Es decir, el reemplazo de Na<sup>+</sup> del medio externo por un catión no difusible (colina) a través de la membrana del axón produjo la desaparición de uno de los 2 componentes de la corriente total. *A partir de esta evidencia experimental es posible afirmar que el 1<sup>er</sup> componente de la corriente total es generado por una corriente entrante de Na<sup>+</sup> al axón.* La curva  $I_{Na}$  se obtiene mediante la diferencia algebraica entre las curvas (A) y (B). Esta curva representa únicamente a la corriente entrante de Na<sup>+</sup> (C).

Notar que la curva (B) equivale a  $I_K$ , ya que este 2<sup>do</sup> componente de la corriente total es siempre saliente para “steps” de voltaje superiores al potencial de reposo ( $V_{rest}$ ) del AGC (ver diapositiva 25).

*Esta clase de experimento de sustitución de iones permitió “disecar” cada componente de la corriente total y poder identificar los iones que la producían. Las temperaturas a la cuales se llevaban a cabo los experimentos presentados en esta diapositiva, así como en las Nros. 21 y 25, eran muy bajas; esto se debía a que a esas temperaturas era posible enlentecer la respuesta exhibida por el axón y facilitar así el registro de la misma.*

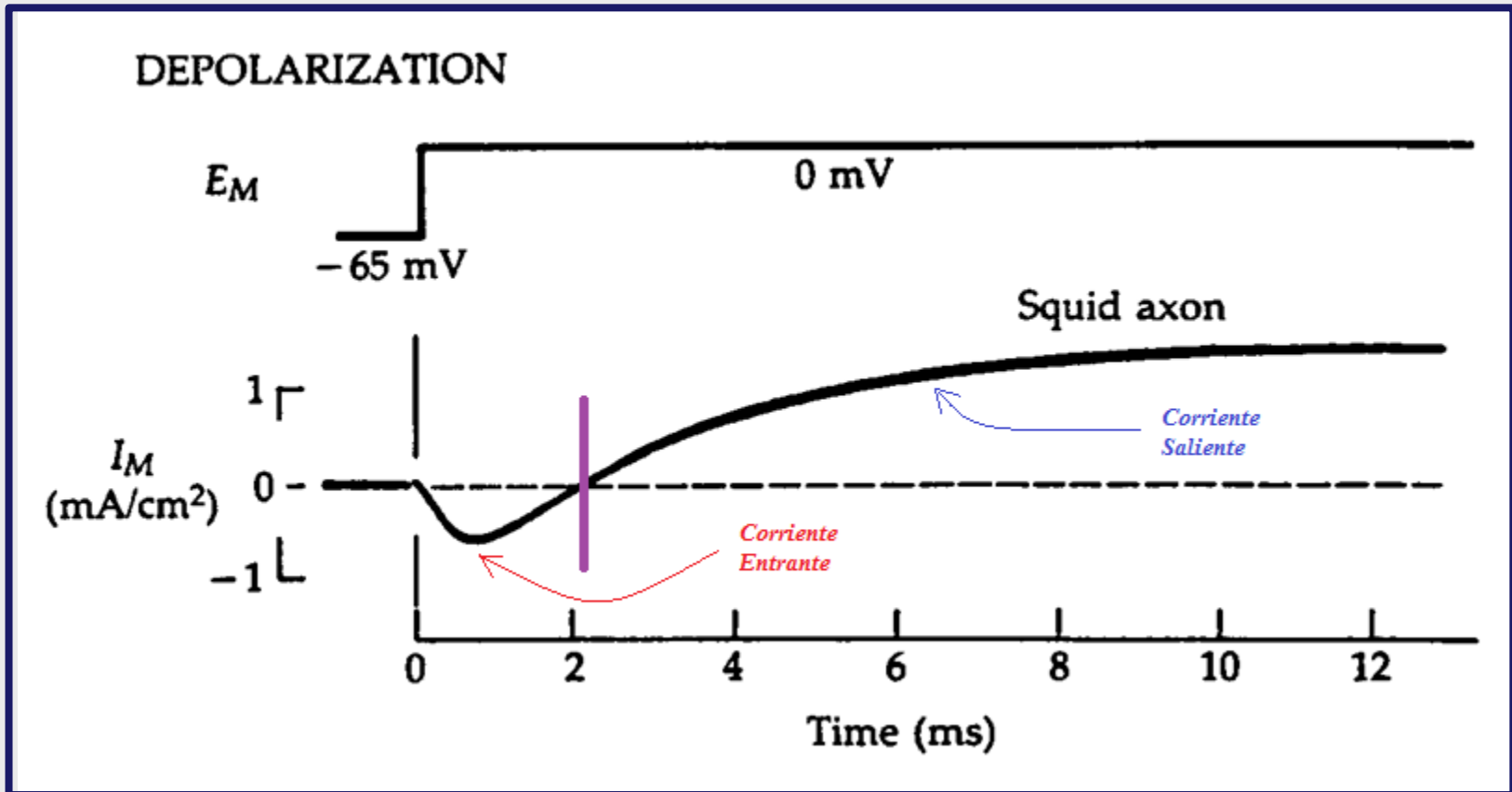
Experimento similar al descrito anteriormente (sustitución de  $\text{Na}^+$  en el medio externo), solo que en este caso el potencial de reposo es de  $-60 \text{ mV}$  ( $V_{rest}$ ) y se fija un nuevo valor de PM en  $0 \text{ mV}$ . La línea continua representa la corriente total como consecuencia de este “step” de voltaje. La línea punteada representa la corriente de  $\text{K}^+$  ( $I_K$ ), mientras que la línea quebrada la corriente de  $\text{Na}^+$  ( $I_{Na}$ ).



Adaptado de “Foundations of Cellular Neurophysiology”. 1992. Pág. 146. Daniel Johnston and Miao-Sin Wu. MIT.

Componente *Entrante* de la Corriente Total: *Corriente de Na<sup>+</sup>*.

Componente *Saliente* de la Corriente Total: *Corriente de K<sup>+</sup>*.



Como hemos visto, el 1<sup>er</sup> componente de la corriente total que atraviesa a la membrana del axón durante un “step” despolarizante de voltaje es una corriente entrante de iones Na.

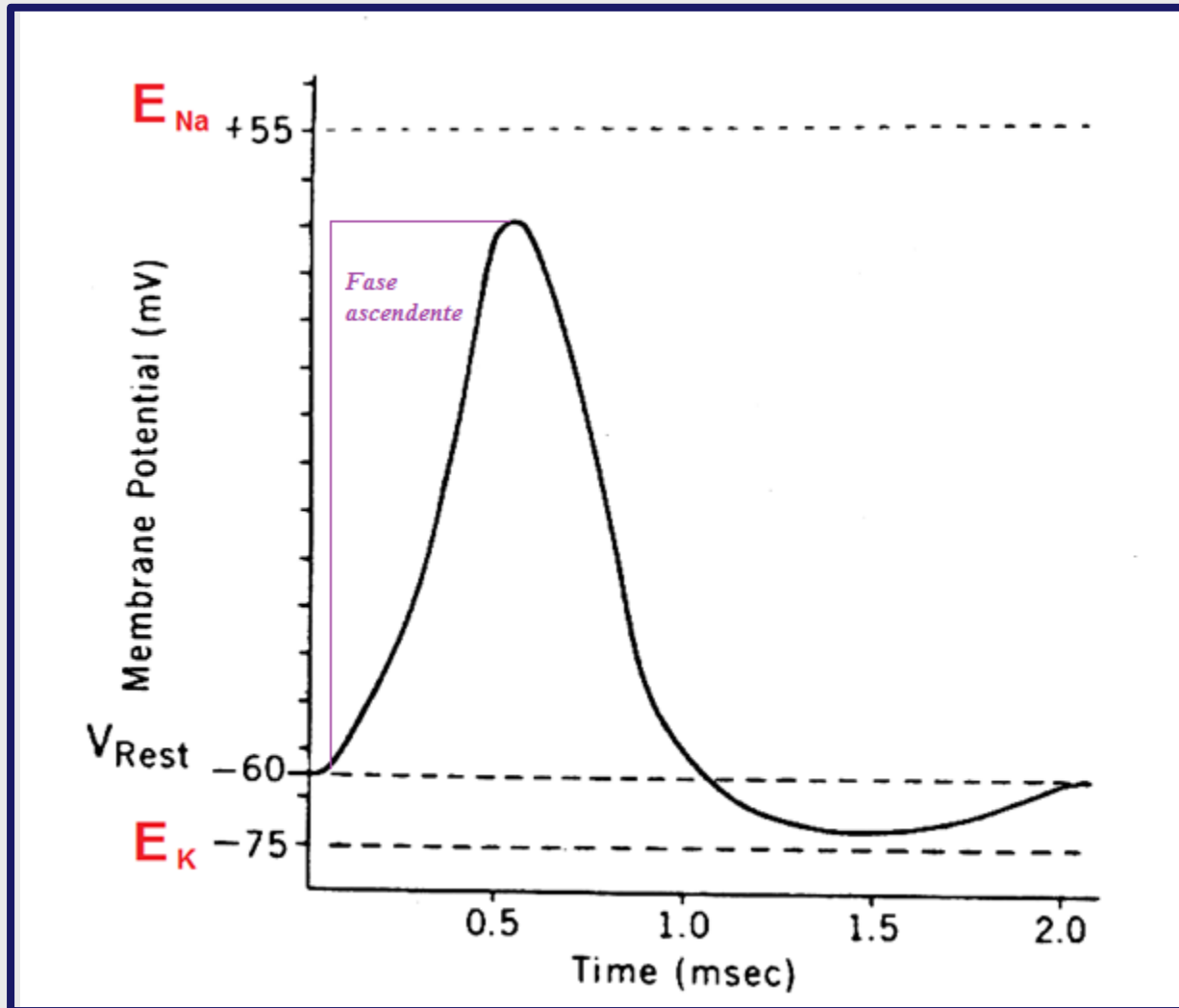
**Pregunta:** ¿cómo puede esto ser posible si las membranas de las células animales en estado de reposo suelen ser mucho más permeables al K<sup>+</sup> que al Na<sup>+</sup>?

Hodgkin y Huxley sugirieron, en base a los resultados obtenidos, que durante la “*fase ascendente*” (fase 1) de un PA la membrana se vuelve selectivamente permeable al Na<sup>+</sup>. Es decir, **la membrana pasa** de un estado de **alta conductancia (o permeabilidad) al K<sup>+</sup>** (condiciones de reposo) hacia un estado de **alta conductancia (o permeabilidad) al Na<sup>+</sup>**.

**Pregunta:** si la membrana se vuelve altamente permeable al Na<sup>+</sup>, ¿qué valor de PM se podría predecir?

**Respuesta:** el valor del **PM** se **acercará** al valor de  $E_{Na}$  (**no alcanzará ese valor**, se acercará). En una primera aproximación, y solo para entender lo expresado anteriormente, considerando una situación “*extrema*” podemos asumir que  $G_{Na} \gg G_K$ , por lo tanto

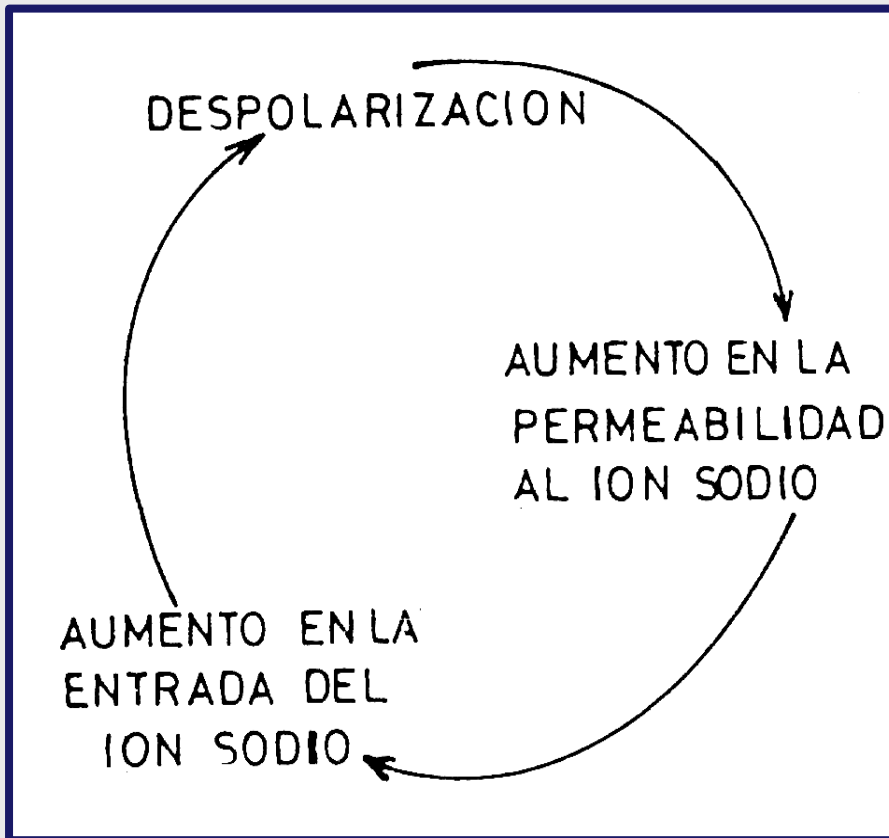
$$V_m = \frac{G_K \cdot E_K + G_{Na} \cdot E_{Na}}{G_K + G_{Na}} \quad \longrightarrow \quad V_m = \frac{G_{Na} \cdot E_{Na}}{G_{Na}} = E_{Na}$$



**Pregunta:** ¿Cómo puede ser posible que la membrana sea altamente permeable al  $K^+$  en el estado de reposo (algo habitual en la mayoría de las células animales), y en un determinado momento, como consecuencia de un estímulo despolarizante, se vuelva altamente permeable al  $Na^+$ ?



**Hipótesis 3.** Hodgkin y Huxley propusieron que este cambio en la conductancia es dependiente del voltaje (o sensible al voltaje), entiéndase a los cambios en el PM. La  $G_{Na}$  es baja en estado de reposo, pero si la célula se despolariza  $G_{Na}$  se incrementa. Esto explicaría, en principio, la “fase ascendente” (fase 1) del PA.

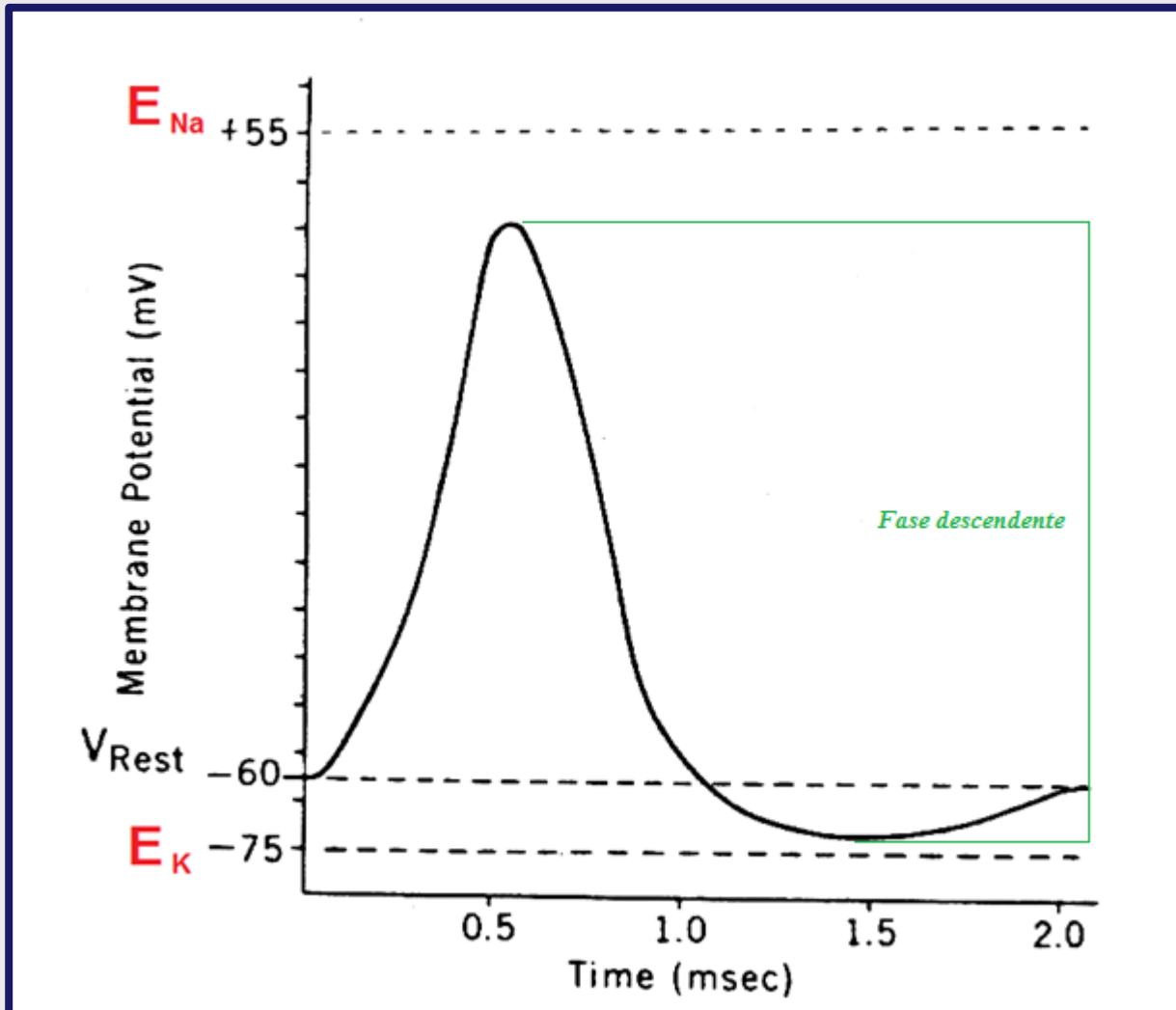


Notar que de acuerdo a esta 3<sup>era</sup> hipótesis, la despolarización causada por un “step” de voltaje promovería el aumento en la permeabilidad (conductancia) al ión Na por parte de la membrana del axón. Esto a su vez produciría la entrada al axoplasma de iones Na (cargas positivas), lo cual llevaría a una mayor despolarización en el axón, en consecuencia aumentaría aún más la permeabilidad de la membrana al Na<sup>+</sup>. Se establece lo que se denomina un “*ciclo de retroalimentación positiva*” (o “*positive feedback*”, en idioma inglés).

Extraído de “Transporte y Excitabilidad”. 1983. Pág. 60. Eduardo Ríos.

- Hodgkin y Huxley sugirieron, además, que durante un PA también se produce un aumento en la conductancia (o permeabilidad) de la membrana al  $K^+$ , fundamentalmente durante la “*fase descendente*” (fases 2 y 3) del PA.
- **Pregunta:** si la membrana se vuelve más permeable al  $K^+$ , ¿qué valor de **PM** se podría predecir?
- **Respuesta:** el valor del **PM** se **acercará** al valor de  $E_K$  (**no alcanzará ese valor**, se acercará). En una primera aproximación, y solo para entender lo expresado anteriormente, considerando una situación “*extrema*” podemos asumir que  $G_K \gg G_{Na}$ , por lo tanto

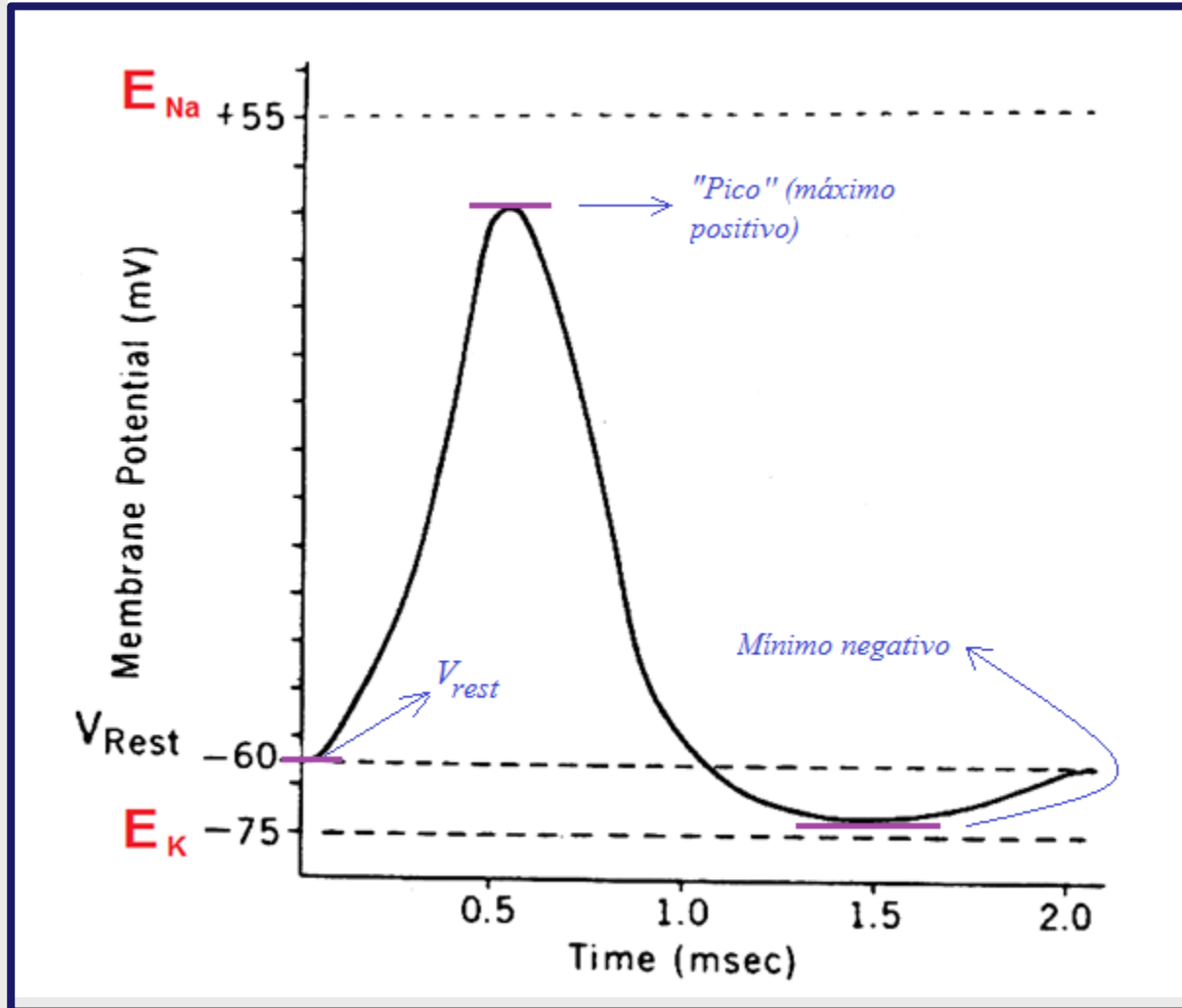
$$V_m = \frac{G_K \cdot E_K + G_{Na} \cdot E_{Na}}{G_K + G_{Na}} \quad \longrightarrow \quad \boxed{V_m = \frac{G_K \cdot E_K}{G_K} = E_K}$$



**Es importante desatacar lo siguiente:** en las diapositivas anteriores se empleó la ecuación de GHK en su “*versión eléctrica*” para lograr una interpretación acerca del valor al que tendería el PM bajo distintas condiciones de permeabilidad a ciertos iones específicos. Recuerden que según lo que vieron en sus clases de “Transporte 1 y 2” y de “Potencial de Membrana” (Clases del Curso Teórico como del Curso Práctico de Biofísica), esta ecuación es aplicable al estado estacionario, o de reposo, celular. Es decir, esta ecuación se aplica bajo condiciones en las cuales ciertas variables fisiológicas fundamentales de la célula permanecen en valores constantes con respecto al tiempo. Algunos ejemplos serían la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de la célula, el volumen celular, y las concentraciones internas de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$ . *La misma ecuación no permite describir el curso temporal de un PA, ya que esta “señal electroquímica” implica un importantísimo cambio en el valor del PM de la célula (alejamiento del estado de reposo).*

Sin embargo, existen *tres puntos* en la curva temporal del PA en los cuales es posible aplicar la ecuación de GHK “*versión eléctrica*”. Estos puntos son aquellos en los que la derivada del PM con respecto al tiempo es igual a cero ( $dV_m/dt = 0$ ) (si la derivada es cero,  $V_m$  toma un valor constante). En otras palabras, en donde la tangente en un punto de la curva se hace horizontal (esto es equivalente a decir que  $dV_m/dt = 0$ ). Estos *tres puntos* son: 1) el *estado de reposo* ( $V_{rest}$ ), 2) el “*pico*” o *máximo positivo* del PA, y 3) el *mínimo negativo* del PA (ver la próxima diapositiva).

*Puntos en la curva temporal del PA donde es válido aplicar la ecuación de GHK “versión eléctrica”.*

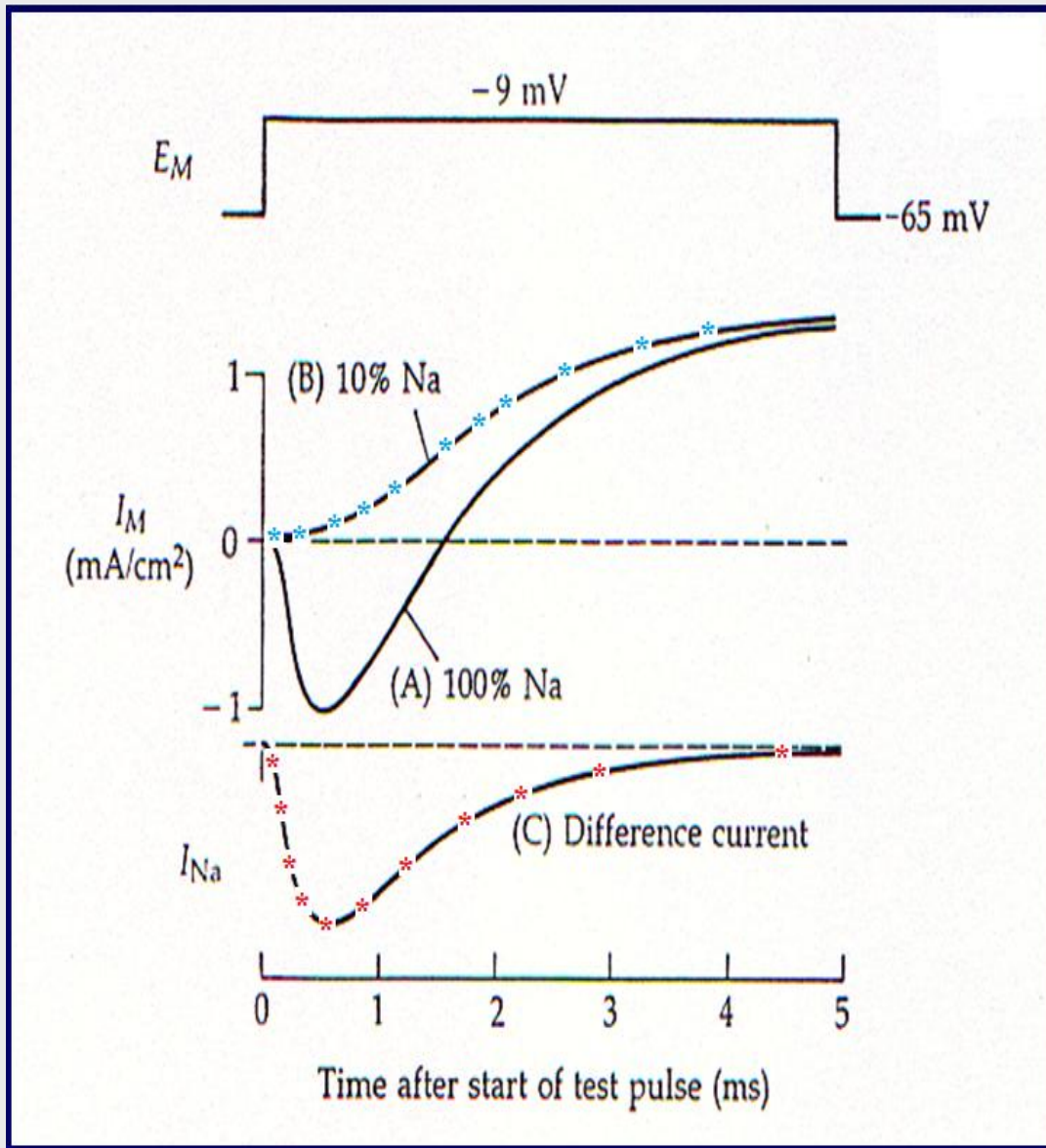


**Pregunta:** ¿Cómo se podría verificar la existencia de una dependencia con el voltaje en las conductancias de  $\text{Na}^+$  ( $G_{Na}$ ) y de  $\text{K}^+$  ( $G_K$ )?

- Registrando los valores de la corriente iónica en función del tiempo,  $I(t)$  (mediante las técnicas de “*voltage-clamp*” y de “*space-clamp*”); conociendo  $V_m$  (cuyo valor se establece por medio del dispositivo regulador de voltaje, el cual permite aplicar la técnica de “*voltage-clamp*”), y efectuando los experimentos de sustitución de  $\text{Na}^+$  en el medio externo por colina, las conductancias de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  en función del tiempo,  $G(V_m, t)_{\text{Na}}$  y  $G(V_m, t)_{\text{K}}$ , se pueden calcular aplicando la Ley de Ohm “*versión iónica*”:

$$G(V_m, t)_{\text{Na}} = \frac{I(t)_{\text{Na}}}{V_m - E_{\text{Na}}} \quad G(V_m, t)_{\text{K}} = \frac{I(t)_{\text{K}}}{V_m - E_{\text{K}}}$$

- Cambiando  $V_m$  mediante el dispositivo de control de voltaje, se pueden determinar las conductancias de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  correspondientes a una gran variedad de potenciales de membrana impuestos por el experimentador, y obtener de esta manera, mediante el empleo de las ecuaciones anteriores, el cambio en la conductancia de la membrana a estos iones ante diferentes valores de  $V_m$ . En la próxima diapositiva se muestra un ejemplo de cómo hacerlo.

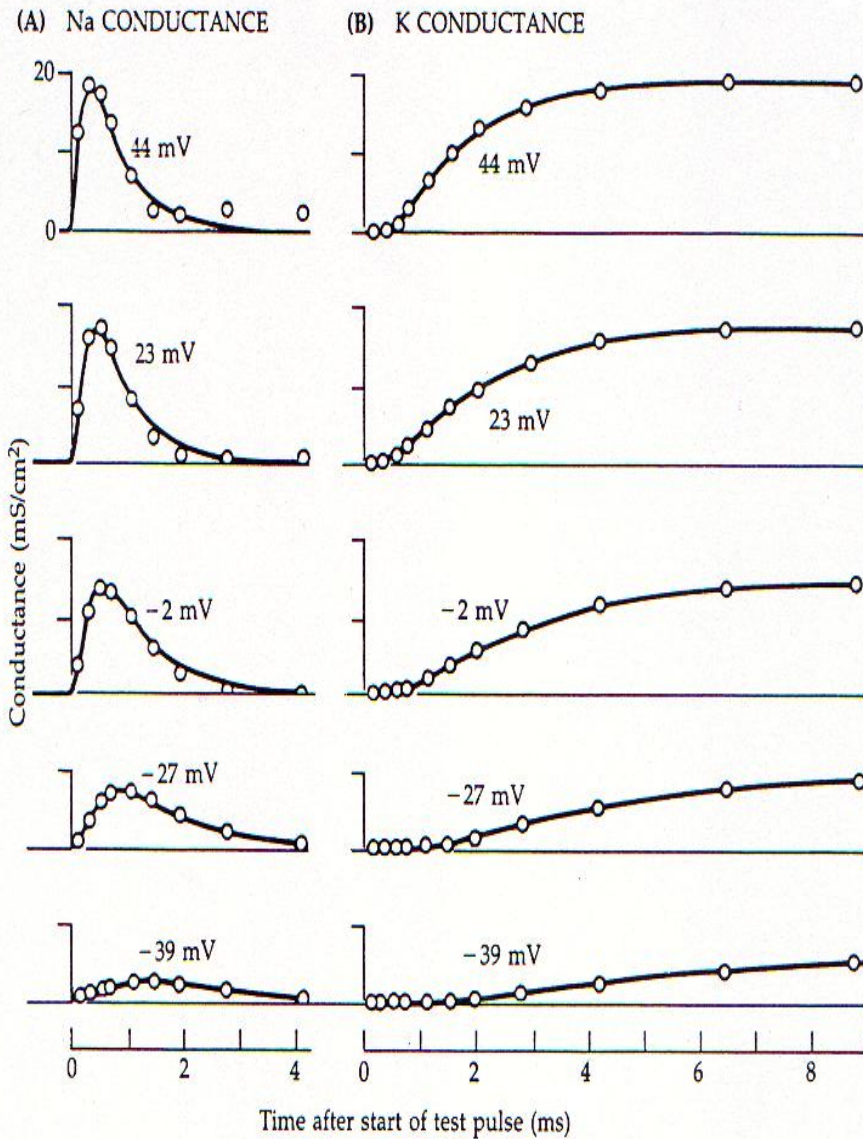


Este experimento es el mismo que se describió en la diapositiva Nro. 27. Simplemente agregué pequeños asteriscos en las curvas correspondientes a las corrientes de  $\text{Na}^+$  ( $I_{Na}$ ) (curva "C") y de  $\text{K}^+$  ( $I_K$ ) (curva "B"). Recordar que se trata de 2 experimentos independientes que se presentan en un mismo gráfico ( $I_M$  vs. tiempo). Mediante el dispositivo que permite controlar el voltaje (empleando la técnica de "voltage-clamp" y de "space-clamp"), más la sustitución del  $\text{Na}^+$  externo por colina, se obtienen para *este "step" de voltaje de  $-9\text{ mV}$*  la curva de corriente "control" ("A") y la corriente correspondiente a  $\text{K}^+$  (curva "B") (la curva "C" representa la diferencia algebraica entre las curvas "A" y "B").

Para calcular el cambio en las conductancias de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  *para este "step" de voltaje de  $-9\text{ mV}$*  se toman los valores de los puntos de corriente (asteriscos en colores) en ambas curvas, y cada uno de esos valores son sustituidos en las respectivas ecuaciones presentadas en la diapositiva anterior. Estos puntos (11 en cada curva; tomados solo a modo ilustrativo) serían los valores de  $I_{Na}(t)$  e  $I_K(t)$  en esas ecuaciones.  $V_m$  correspondería al valor del "step" de voltaje ( $-9\text{ mV}$ ), y  $E_{Na} (\approx +55\text{ mV})$  y  $E_K (\approx -75\text{ mV})$  los respectivos potenciales de equilibrio de cada ión. De esta manera es posible calcular un valor de  $G(V_m, t)_{Na}$  y de  $G(V_m, t)_K$  para cada uno de esos 11 puntos, obteniéndose las *curvas temporales* de cambio de estas conductancias con respecto a este "step" de voltaje.

De una forma similar habría que proceder para otros "steps" de voltaje aplicados a la membrana del AGC. Resultados obtenidos mediante este procedimiento se muestran en la próxima diapositiva.





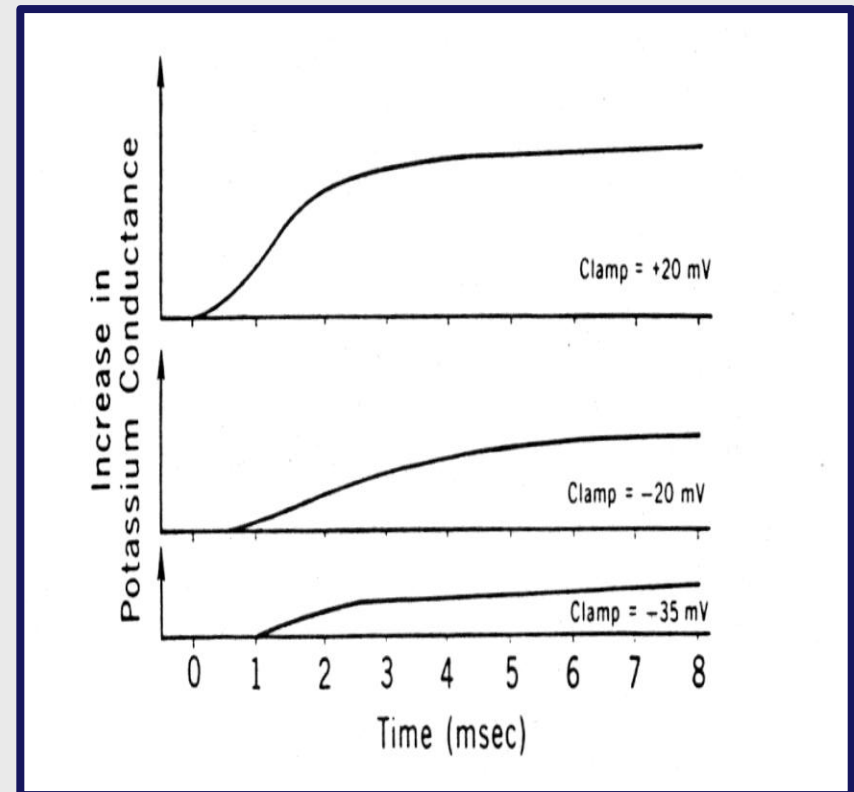
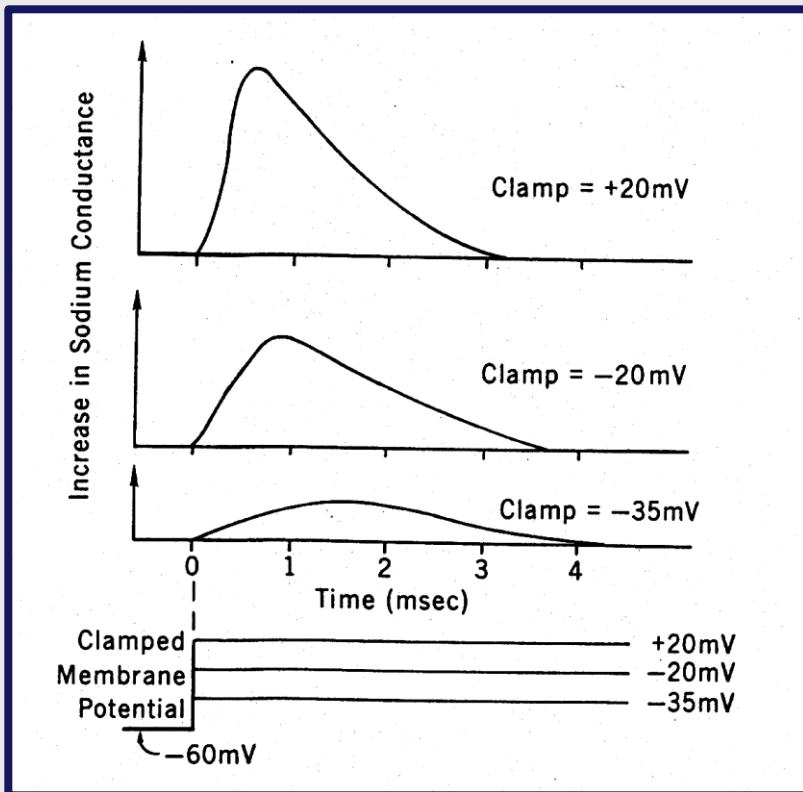
CONDUCTANCE CHANGES AT MANY VOLTAGES

(A): Conductancia de  $\text{Na}^+$  (mili siemens por  $\text{cm}^2$ ) vs. tiempo (mili seg.), para cada uno de los “steps” de voltaje aplicados (en mV). (B): Conductancia de  $\text{K}^+$  (mili siemens por  $\text{cm}^2$ ) vs. tiempo (mili seg.), para cada uno de los “steps” de voltaje aplicados (en mV).

*Es notorio el incremento que se verifica en ambas conductancias al aumentar el grado de despolarización en el AGC (desde  $-39$  mV hasta  $+44$  mV) (recordar que  $V_{rest} \approx -60$  mV), lo cual implica una dependencia con el voltaje. Estos experimentos representan una prueba contundente acerca de que estas conductancias son dependientes del voltaje (cambios en el PM). En otras palabras, la permeabilidad de la membrana del AGC aumenta para estos dos iones cuando el axón se despolariza.*

**Nota:** los círculos que aparecen en las curvas son los valores de conductancia calculados mediante un procedimiento como el que se explicó en la diapositiva anterior, para cada “step” de voltaje. Las líneas continuas (curvas en negro) representan un ajuste a esos puntos basado en los resultados de un modelo teórico que describe, además, otros aspectos propios del AGC ante experimentos de este tipo (modelo teórico desarrollado por HH).

Este tipo de experimento proporciona una robusta evidencia experimental a la hipótesis de que el cambio en las conductancias de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  son sensibles al voltaje, y al tiempo, y presenta una forma de explicar las fases “ascendente” y “descendente” del PA.



Extraído de “An Introduction to Membrane Transport and Bioelectricity”. 2<sup>nd</sup> Edition. 1994. Pág. 92. Byrne and Schultz.

## Pregunta de Examen

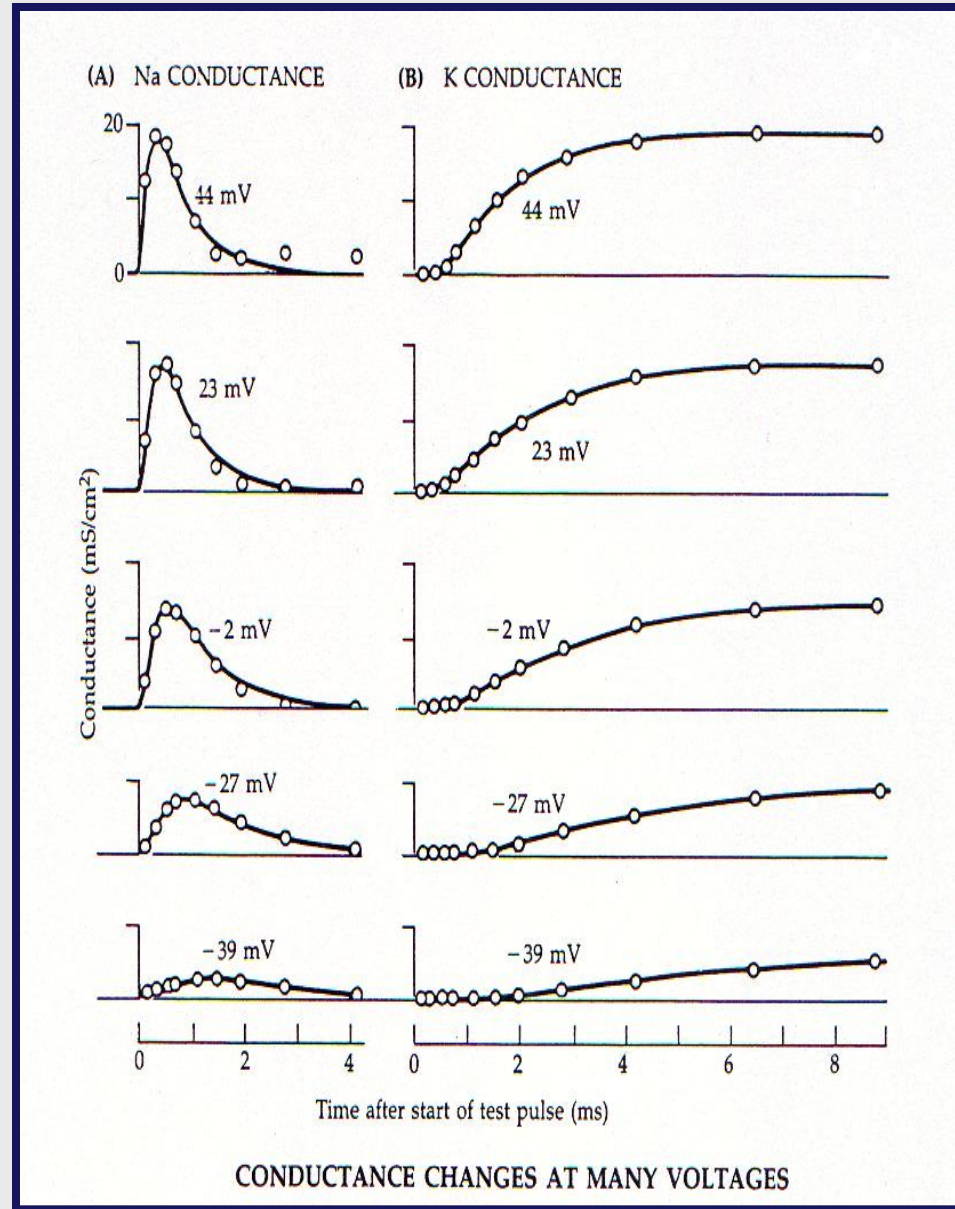
Describa las principales diferencias entre los cursos (trayectorias) temporales de las conductancias de sodio y de potasio sensibles al voltaje, durante la aplicación de un estímulo *supra-umbral* en el AGC. Los experimentos se realizan empleando las técnicas de control de voltaje (“*voltage-clamp*”) y de “*space-clamp*”.

La respuesta a esta pregunta implica describir la dos grandes diferencias que se observan “a simple vista” en la curvas temporales correspondientes a estas conductancias, y también una breve explicación sobre el fenómeno de “*inactivación*” de los canales de Na<sup>+</sup> sensibles al voltaje, y el “comportamiento” de los canales de K<sup>+</sup> sensibles al voltaje (ausencia en estos últimos de “*inactivación*” y presencia exclusivamente de “*compuertas*” de “*activación*”). Leer con atención las próximas diapositivas.

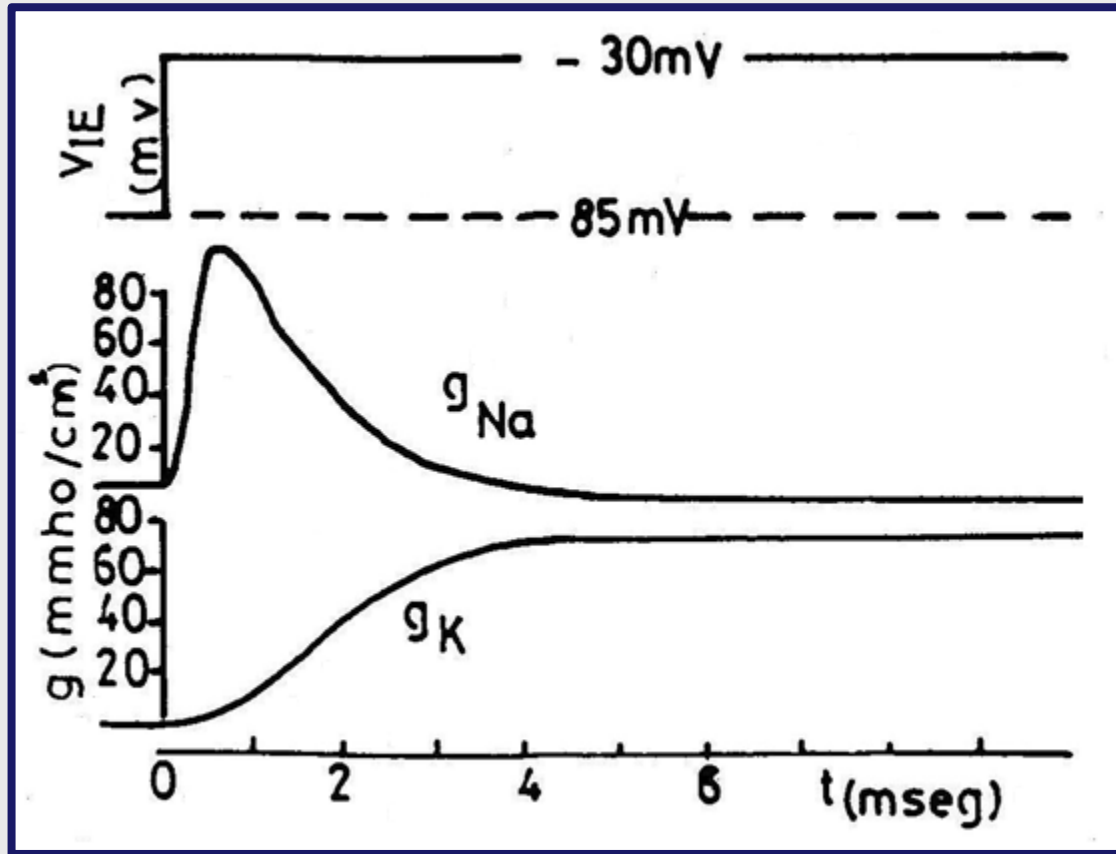
Antes de describir las diferencias, observar que ambas conductancias *no se modifican instantáneamente una vez fijado el valor del PM (“steps” de voltaje)*. Esto significa que *los cambios en estas conductancias también son dependientes del tiempo*, y su evolución temporal es distinta.

Notar que hay *2 importantes diferencias* en la forma en que varían las conductancias de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  [ $G(V_m, t)_{\text{Na}}$  y  $G(V_m, t)_{\text{K}}$ ]:

1. El cambio en  $G(V_m, t)_{\text{K}}$  es mucho *más lento* que el cambio en  $G(V_m, t)_{\text{Na}}$ .
2.  $G(V_m, t)_{\text{Na}}$  presenta el fenómeno de Inactivación.  $G(V_m, t)_{\text{K}}$  permanece elevada en tanto se mantenga la despolarización.



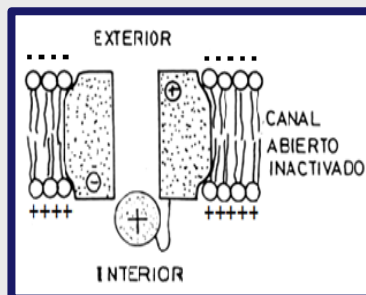
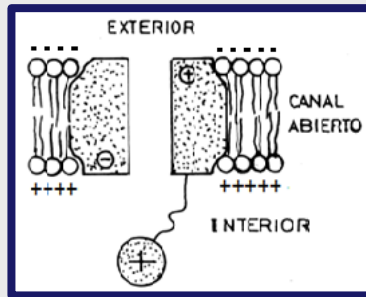
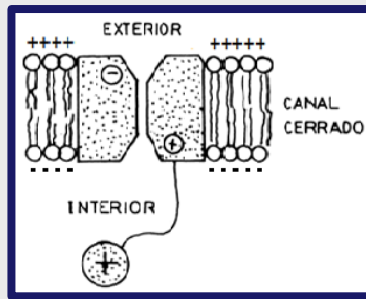
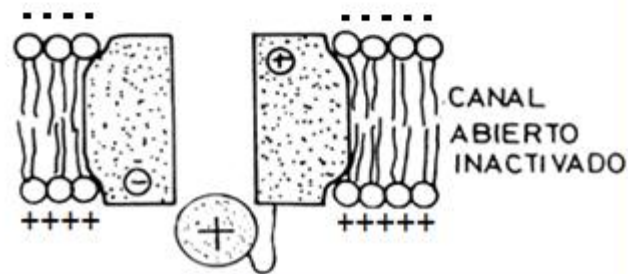
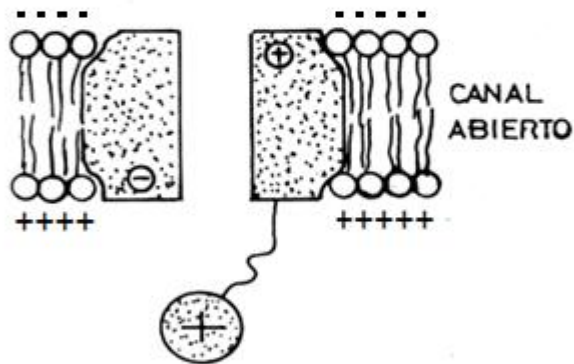
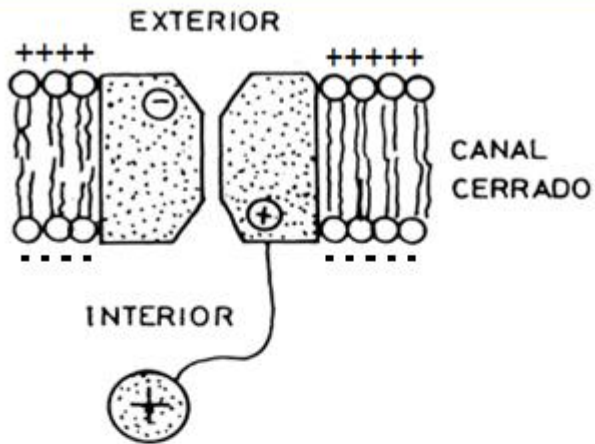
Otros registros experimentales de los cambios en las *conductancias* de  $\text{Na}^+$  ( $g_{\text{Na}}$ ) y de  $\text{K}^+$  ( $g_{\text{K}}$ ) ( $g$ : *mili mhos/cm<sup>2</sup>*) vs. *tiempo* (*mili seg.*) (célula muscular). “Step” de voltaje de  $-30 \text{ mV}$  ( $V_{\text{IE}}$ ).  $V_{\text{rest}} = -85 \text{ mV}$ .



Extraído de “Transporte y Excitabilidad”. 1983. Pág. 59. Eduardo Ríos.

- **Inactivación de la  $G(V_m, t)_{Na}$**  : aunque la despolarización en el axón se mantenga durante todo el tiempo que dura el “step” de voltaje, la  $G(V_m, t)_{Na}$  decae a su valor de reposo. **El incremento en la  $G(V_m, t)_{Na}$  es sólo transitorio.** La  $G(V_m, t)_{Na}$  aumenta hasta llegar a un valor máximo, luego del cual comienza a decaer hasta hacerse nula (esto ocurre mientras se mantiene el “step” de voltaje). A esto se lo conoce como *Inactivación*.
- En la actualidad resulta evidente que este flujo de  $Na^+$  hacia el interior del axón, así como el flujo de  $K^+$  hacia el exterior del axón, se verifican a través de **canales de  $Na^+$  y de  $K^+$**  que presentan la particularidad de ser *sensibles al voltaje (voltaje dependientes)*.
- En estos canales existen estructuras cargadas eléctricamente capaces de moverse según la orientación del campo eléctrico de la membrana. Los primeros biofísicos que estudiaron este tipo de proteínas llamaron a estas estructuras cargadas “*compuertas*” (“*gates*”, en idioma inglés).
- En el caso concreto del canal de  $Na^+$ , se puede pensar que posee *dos tipos de compuertas*: de “*activación*” y de “*inactivación*” (este último tipo de compuerta *bloquea* al canal aunque éste se halle abierto, impidiendo el pasaje de  $Na^+$  a través del mismo; ver esquema en la próxima diapositiva). En el caso del canal de  $K^+$  podemos asumir que *presenta exclusivamente compuertas de “activación”* (al no tener compuertas de *inactivación*, el pasaje de  $K^+$  por este canal se mantendrá mientras perdure el “step” de voltaje). La estructura real de estos canales es muy compleja, por lo que esquemas como los que se muestran en las próximas diapositivas representan simplificaciones acerca de la estructura de los mismos.
- **Nota Importante:** en el año en el que HH publicaron sus trabajos más importantes referentes al PA (1952) *se desconocía la existencia de canales iónicos.*

## Modelo “Ball and Chain” (Bola y Cadena) del canal de Na<sup>+</sup> dependiente de voltaje

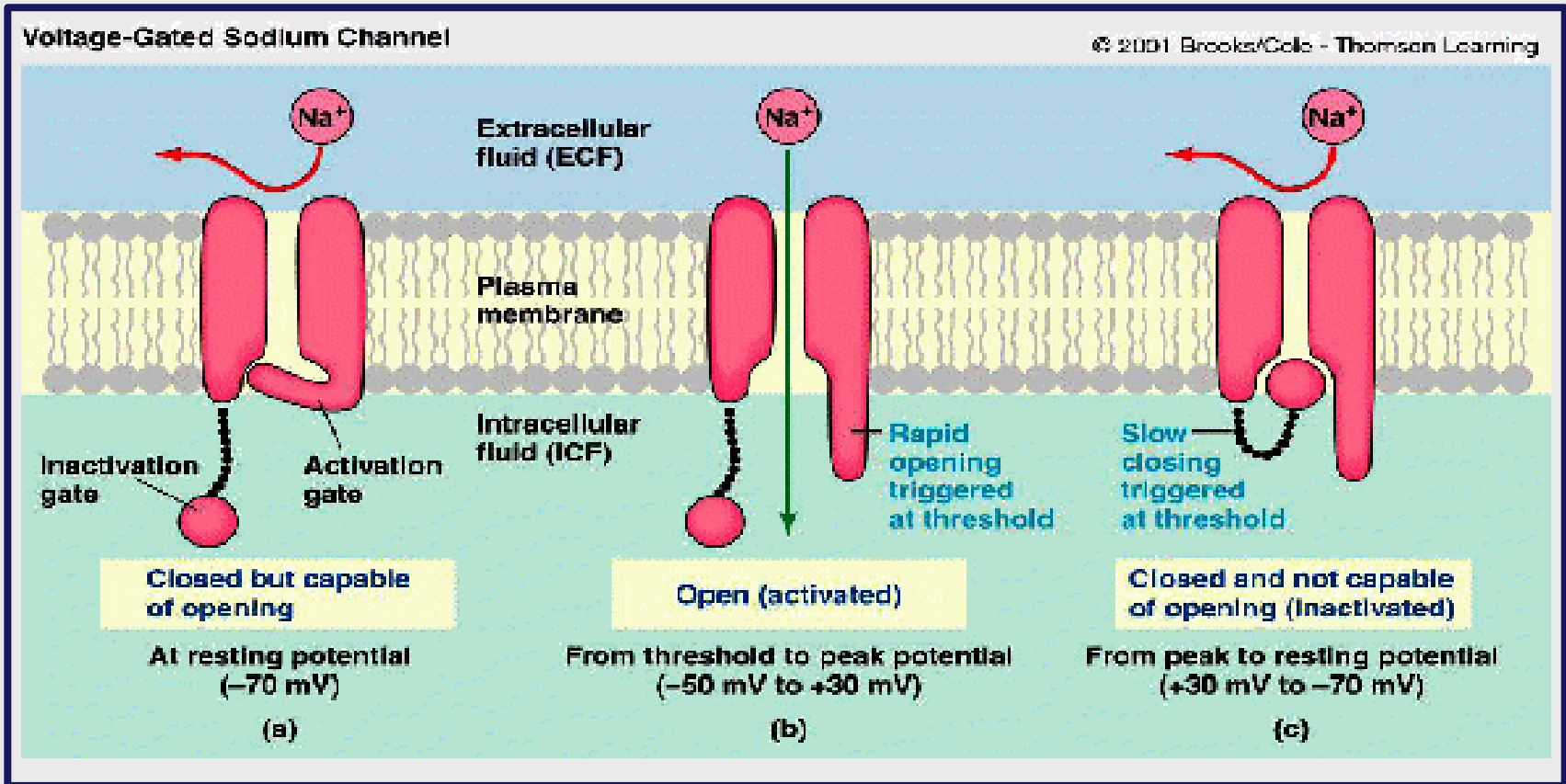


2 compuertas de *activación* (una de ellas con una carga “-” y la otra con una “+”) más una compuerta de *inactivación* con una carga “+” (“bola”). **Estado de reposo** → **Canal Cerrado**. Prestar atención a la conformación (estructura) de las compuertas de activación y a la ubicación de las cargas eléctricas de estas compuertas.

Se fija un determinado PM (mediante la técnica de “*voltage-clamp*”) tal que el exterior se vuelve negativo con respecto al interior (**fortísima despolarización**). **Importante Alejamiento del estado de reposo** → **Canal Abierto**. Observar el *cambio de conformación de las compuertas de activación* (lo cual permite la apertura del canal), y la migración de sus respectivas cargas eléctricas en función de la nueva distribución de cargas en la membrana.

La conformación de las compuertas de *activación* sigue siendo la misma, así como la orientación de las cargas en ambos lados de la membrana (*se mantiene el “step” de voltaje aplicado*). La carga “-” de la compuerta izquierda de *activación* atrae a la carga “+” de la compuerta de *inactivación* (la cinética de esta compuerta es más lenta; la “bola” se aproxima paulatinamente a esa carga). La “bola” termina **bloqueando** al canal, impidiendo el pasaje de Na<sup>+</sup>. Notar que el canal se halla abierto, pero *inactivado* → **Canal Abierto Inactivado**. 47

Otra representación del Modelo “*Ball and Chain*” para el canal de  $\text{Na}^+$  voltaje dependiente. La compuerta de *inactivación* (“bola”) deja de bloquear al canal luego de un breve tiempo en el que el axón retornó al potencial de reposo ( $V_{rest}$ ) [el canal volvería al estado cerrado (a)].

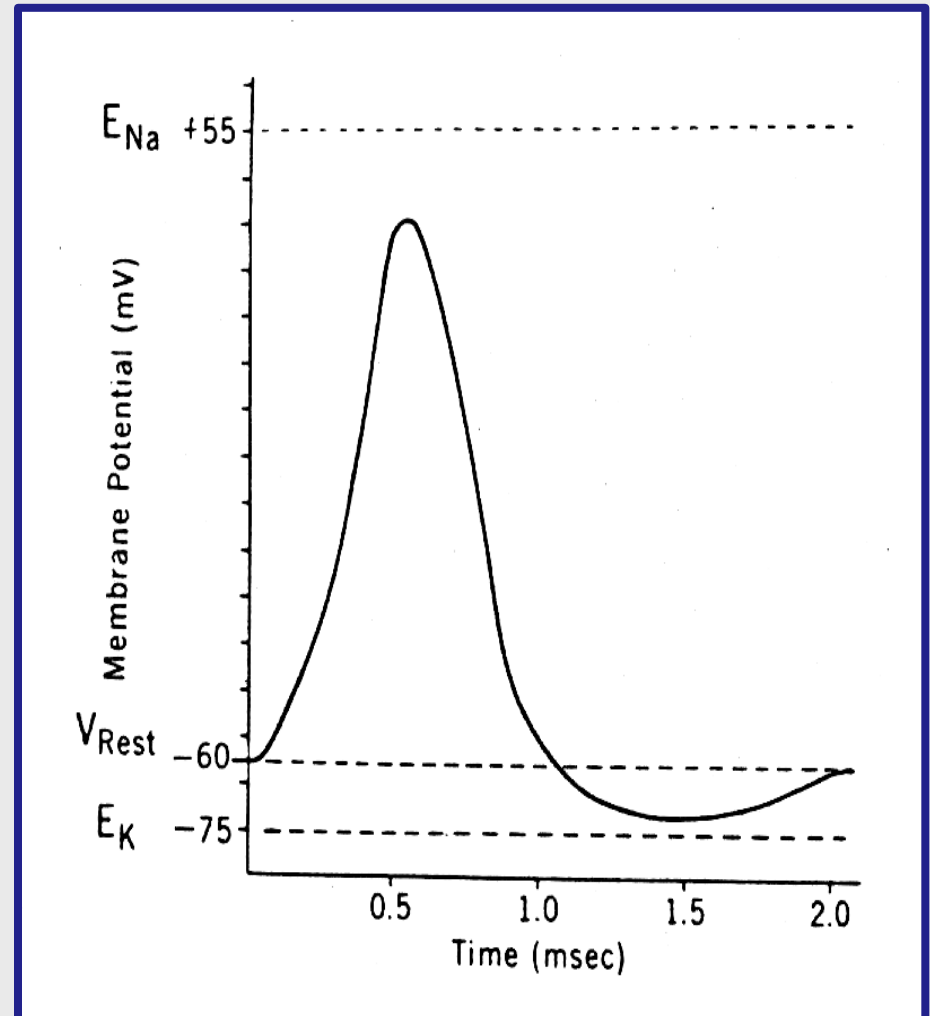
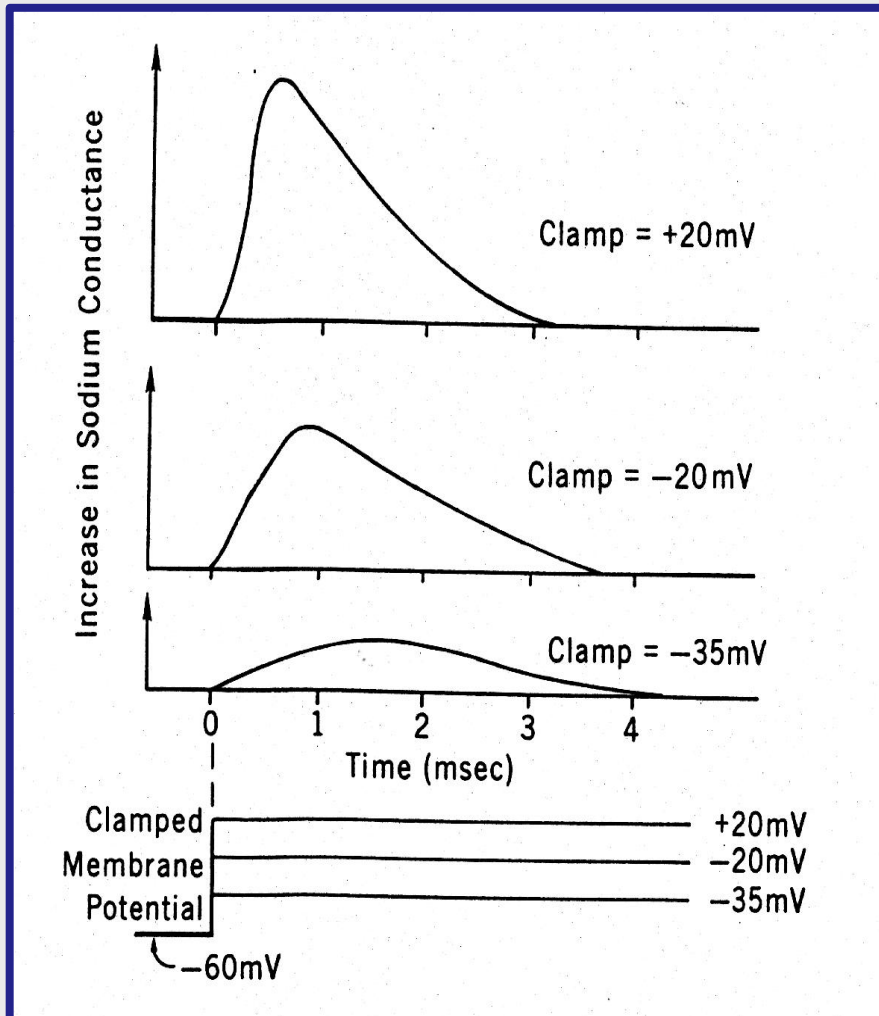


Esquema ilustrativo extraído de Internet.



- Si la  $G(V_m, t)_{Na}$  decae, la despolarización se reducirá, y esta reducción promoverá un descenso en el ingreso de  $Na^+$  al axón. Como resultado, un nuevo ciclo se inicia, tendiente a **repolarizar** al axón. Esto explicaría en parte el retorno al potencial de reposo ( $V_{rest}$ ).
- Aunque debemos notar lo siguiente:
  1. La **duración** del PA se halla entre **1 msec.** y **2 msec.**, mientras que el **cambio en la  $G(V_m, t)_{Na}$**  dura alrededor de **4 msec.** Según esto, el PA debería durar un período de tiempo mayor al mencionado anteriormente.
  2. Solo con el descenso en  $G(V_m, t)_{Na}$  (consecuencia del proceso de *inactivación*) resulta imposible explicar la **hiperpolarización** que se verifica en el curso temporal del PA.

Cuando todos los canales de  $\text{Na}^+$  voltaje dependientes se encuentran en el estado “*Abierto Inactivado*”, la conductancia de éstos es 0. En consecuencia, solo con la *inactivación* de estos canales no es posible explicar la fase 3 del PA (hiperpolarización).

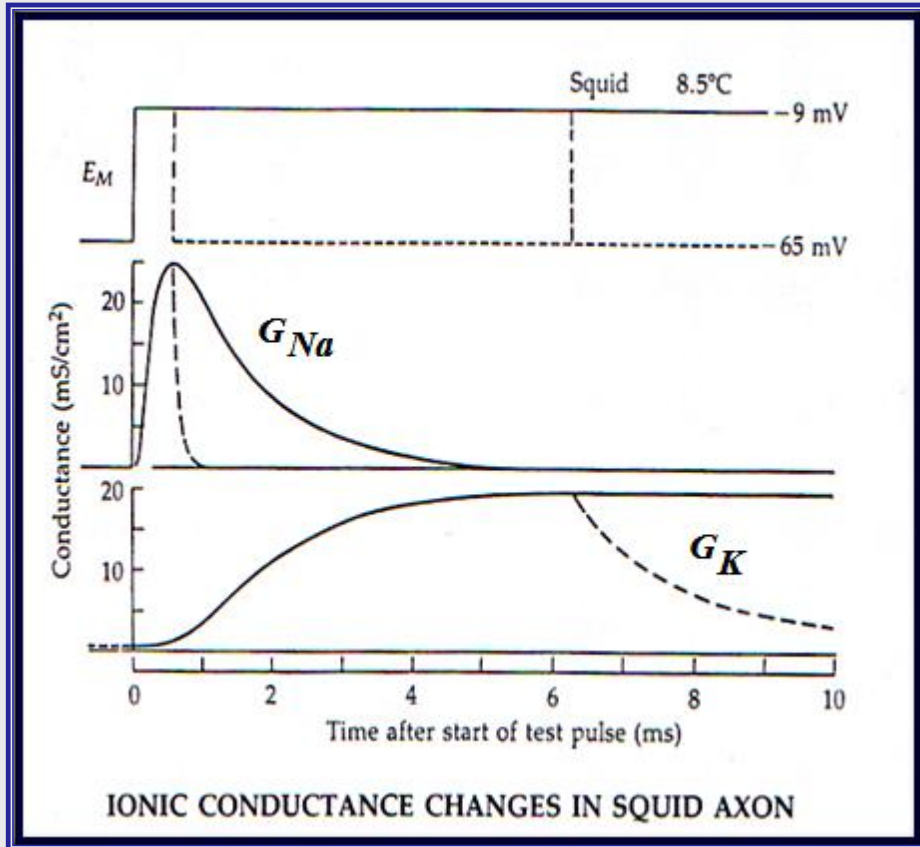


***Tener en cuenta lo siguiente:*** los cambios en la  $G(V_m, t)_K$  permiten que el axón se repolarice más **rápidamente**, existiendo entonces **2 factores** que contribuyen a la repolarización:

1. La ***inactivación*** de los canales de sodio.
2. El ***incremento*** en la  $G(V_m, t)_K$ , lo cual implica la salida de cargas positivas del interior del axón.

**Estos dos fenómenos explican la corta duración del PA y el retorno del PM a su valor de reposo ( $V_{rest}$ ).**

- ¿Pueden los cambios en la  $G(V_m, t)_K$  explicar la **hiperpolarización**?
- Es notorio que **el aumento en la  $G(V_m, t)_K$  es lento**. También **su descenso ocurre en forma lenta**. Mientras el axón se repolariza, y la  $G(V_m, t)_{Na}$  se hace nula, el valor de la  $G(V_m, t)_K$  aún sigue siendo un tanto mayor que el de su valor de “reposo” (prácticamente 0). En consecuencia, el PM se aproximará a  $E_K$ , ocurriendo una hiperpolarización.



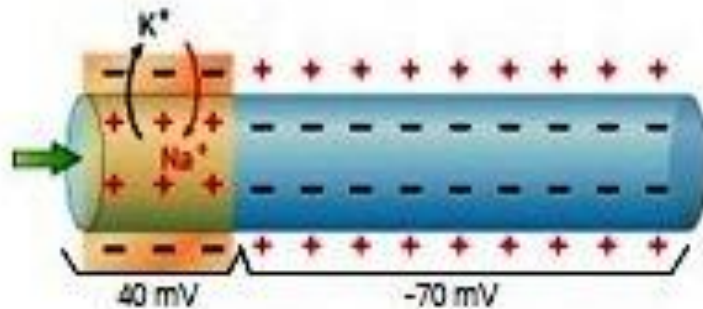
Adaptado de “Ionic Channels of Excitable Membranes”. 2<sup>nd</sup> Edition. 1992. Pág. 40. Bertil Hille.

“Step” de voltaje en el AGC, empleándose las técnicas de “voltage-clamp” y de “space-clamp”. El PM ( $E_M$ ) se fija en un valor de  $-9 \text{ mV}$  ( $V_{rest} = -65 \text{ mV}$ ).

Se observan los cambios en las *conductancias* de  $\text{Na}^+$  ( $G_{Na}$ ) y de  $\text{K}^+$  ( $G_K$ ) en función del *tiempo*. Las líneas quebradas coinciden con el tiempo al cual se apaga el generador de voltaje, retornando el PM a su valor de reposo. Observar las diferencias en las cinéticas de descenso en ambas conductancias (líneas quebradas). La  $G_{Na}$  decae de la misma forma en que crece, rápidamente. Algo similar ocurre con la  $G_K$ , también decae de la misma manera en que asciende, lentamente. Es precisamente esta cinética lenta en el cierre de los canales de  $\text{K}^+$  sensibles al voltaje la que produce una corriente saliente de este ión cuando todos los canales de  $\text{Na}^+$  ya se hallan en el estado “*Abierto Inactivado*”. En otras palabras, sigue existiendo un flujo de  $\text{K}^+$  hacia el exterior del axón (salida de cargas “+”) que se suma al flujo de “leak” (fuga) de este ión que ocurre normalmente en el estado de reposo o estacionario. En consecuencia, la salida de  $\text{K}^+$  se halla incrementada con respecto a la que se verifica en la condición de reposo. Esto promueve la hiperpolarización del axón. Luego de un breve tiempo, estos canales voltaje dependientes se cierran completamente y el PM retorna a su valor de reposo.

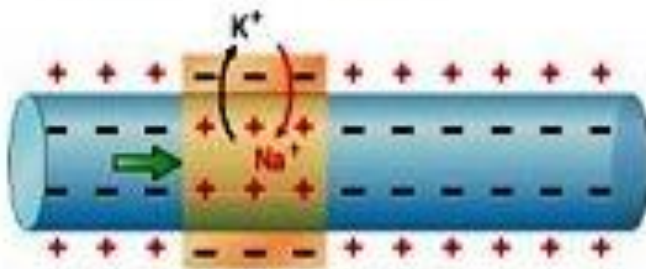
Representación esquemática de un PA propagado, en la que se muestra las corrientes de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  que dan lugar a la generación y transmisión de esta “*señal electroquímica*”.

La desigual distribución de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a ambos lados de la membrana neuronal provoca que la membrana se encuentre **polarizada** con una carga positiva en el exterior y negativa en el interior.

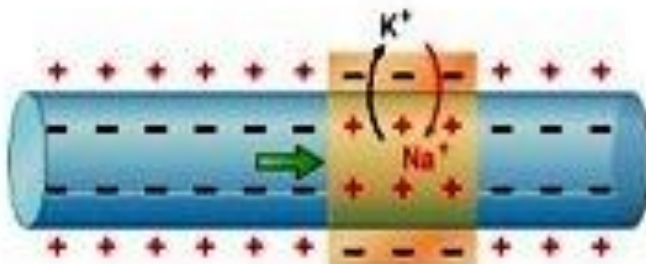


La desigual distribución de cargas provoca un potencial de reposo de  $-70 \text{ mV}$ .

Al llegar un estímulo a la membrana se produce una inversión de la polaridad durante  $1,5$  milisegundos que se llama potencial de acción.



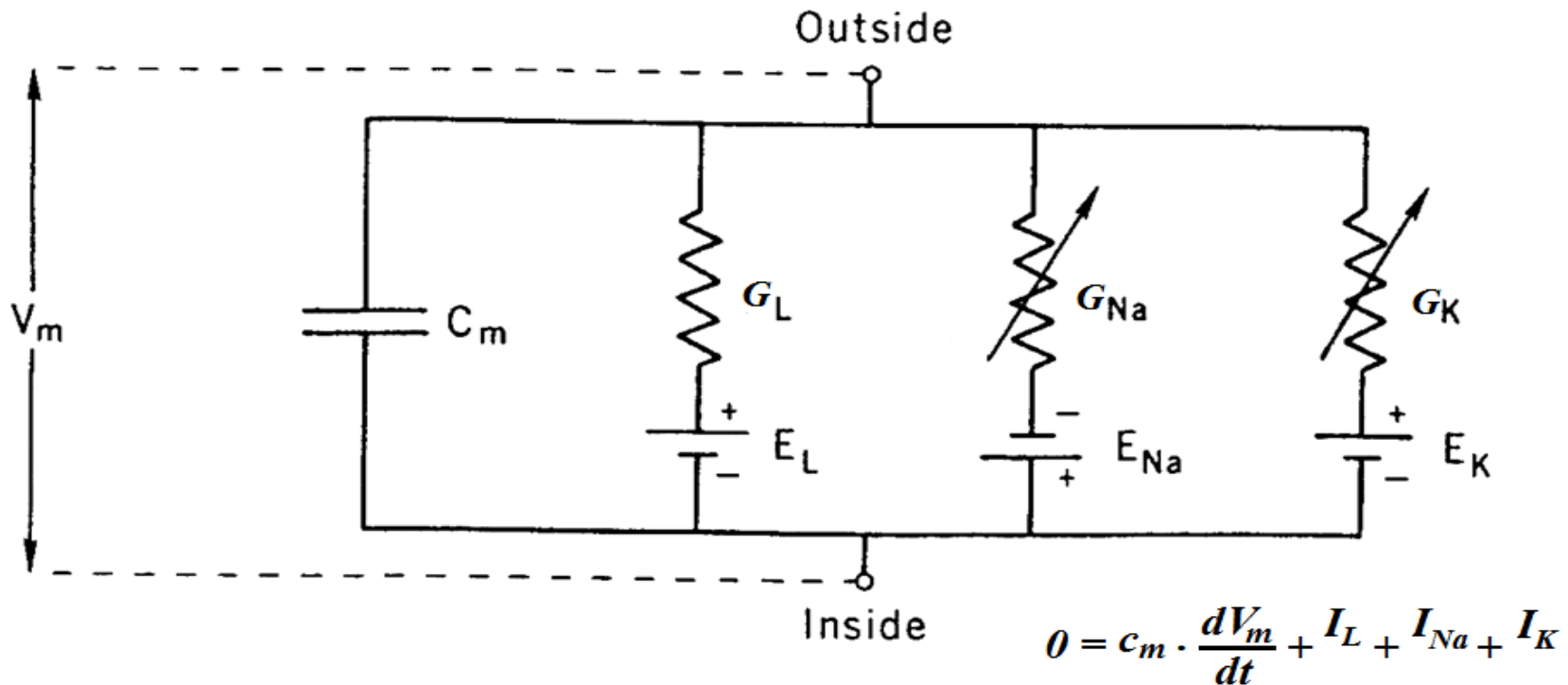
La despolarización en un punto induce una perturbación eléctrica en las zonas adyacentes, produciéndose despolarizaciones sucesivas.



Cuando el potencial de acción ha recorrido unos pocos milímetros, el punto de inicio se repolariza.

- Hodgkin y Huxley buscaron darle un marco teórico a sus resultados experimentales obtenidos en el AGC. Para ello, desarrollaron un modelo matemático del PA basado en los registros de los cambios en las conductancias de la membrana a los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , *conductancias dependientes del voltaje y del tiempo*.
- En el año en el que HH desarrollaron sus investigaciones más relevantes en el AGC (1952), y reiterando lo ya expresado en la diapositiva Nro. 46, *se desconocía la existencia de los canales iónicos*. Sin embargo, en su trabajo teórico (modelo matemático) resultaba fundamental la presencia de cierta clase de “*partículas cargadas*”, vinculadas a la membrana del axón, que debían encontrarse en una posición específica, en un determinado tiempo, para que se produjera el cambio en la conductancia de la membrana (las compuertas, o “*gates*”, de los canales iónicos de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  voltaje dependientes que se conocen actualmente).

El circuito equivalente que emplearon HH con el fin de deducir las ecuaciones del modelo matemático para el PA *no propagado*, incluye las conductancias voltaje y tiempo dependientes de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> (conductancias con flechas) presentes en dos ramas resistivas que se incorporan al análogo eléctrico estudiado en las Clases 1 y 2 :



*Ecuación que se obtiene a partir de la primera Ley de Kirchhoff; diapositiva Nro. 32, Clase 1.*

En su trabajo del año 1952 (“A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve”. *J. Physiol.* 1952. A. L. Hodgkin and A. F. Huxley) Hodgkin y Huxley desarrollaron un modelo matemático para describir el PA *no propagado* y otro para el PA *propagado*.

Estos modelos se basan en sistemas no lineales de ecuaciones diferenciales.

En esta clase de sistemas no es posible obtener soluciones analíticas de las variables que forman parte de los mismos, por lo cual es necesario aplicar lo que se conoce en el campo de los Sistemas Dinámicos como *Métodos de Integración Numérica* o *Métodos de Cálculo Numérico*. Todo esto excede al contenido temático de un curso de formación básica, específicamente por su complejidad, por lo que no será tratado en esta clase.



## Pregunta de Examen

Un axón con un cable conductor insertado longitudinalmente cursa un potencial de acción uniformemente [ $\partial V_m / \partial x = 0$  (*esta condición implica que las corrientes capacitiva e iónica son iguales y de signo contrario*)]. Para  $V_m = -10 \text{ mV}$  las conductancias de membrana son las siguientes:

$$G_{Na} = 15 \text{ mS/cm}^2 \text{ y } G_K = 5 \text{ mS/cm}^2.$$

Calcular la velocidad de cambio de  $V_m$  ( $dV_m/dt$ ) si los potenciales de equilibrio de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  y la capacidad de la membrana son los siguientes:

$$E_{Na} = + 50 \text{ mV}, E_K = - 90 \text{ mV};$$

$$C_m = 1 \text{ } \mu\text{F/cm}^2.$$

## Solución

Según la 1<sup>era</sup> Ley de Kirchhoff (ver diapositiva Nro. 32, Clase 1) la suma algebraica de todas las intensidades de corriente en cualquier punto (*nodo*) de un circuito es nula (en este caso el circuito sería el que se muestra en la diapositiva Nro. 55). Las condiciones que se plantean en la letra de la pregunta implican el uso de la técnica de “*space-clamp*”, ya que no cambia el PM con respecto a la distancia (“*x*”). Además, se pide calcular  $dV_m/dt$  en un valor concreto del PA (-10 mV) correspondiente a *un instante específico de tiempo*. En otras palabras, es como si se “congelara” (**no literalmente**) el estado en el que se halla el axón en ese instante de tiempo para el cual se registran los valores de esas variables y parámetros que aparecen en la letra de la pregunta [otra analogía podría ser la de tomar una “fotografía” (**no literalmente**) en ese instante de tiempo y registrar los valores de esas variables y parámetros en ese preciso momento]. La 1<sup>era</sup> Ley de Kirchhoff es una ley de conservación, concretamente de la energía eléctrica en un circuito. Debido a que la corriente debe conservarse, la suma de las corrientes debe ser igual a cero:

$$0 = \underbrace{(c_m \cdot dV_m/dt)}_{I_C} + \underbrace{I_L + I_{Na} + I_K}_{I_R}.$$

Considerando en una primera aproximación solamente  $I_{Na}$  e  $I_K$ , obtenemos

$$-c_m \cdot dV_m/dt = G_{Na} \cdot (V_m - E_{Na}) + G_K \cdot (V_m - E_K).$$

Despejando  $dV_m/dt$  de la ecuación anterior y sustituyendo por los valores dados, el resultado es:

$$dV_m/dt = 500 \text{ amperios/faradios.}$$

1 Amperio = 1 Coulomb / 1 Segundo y

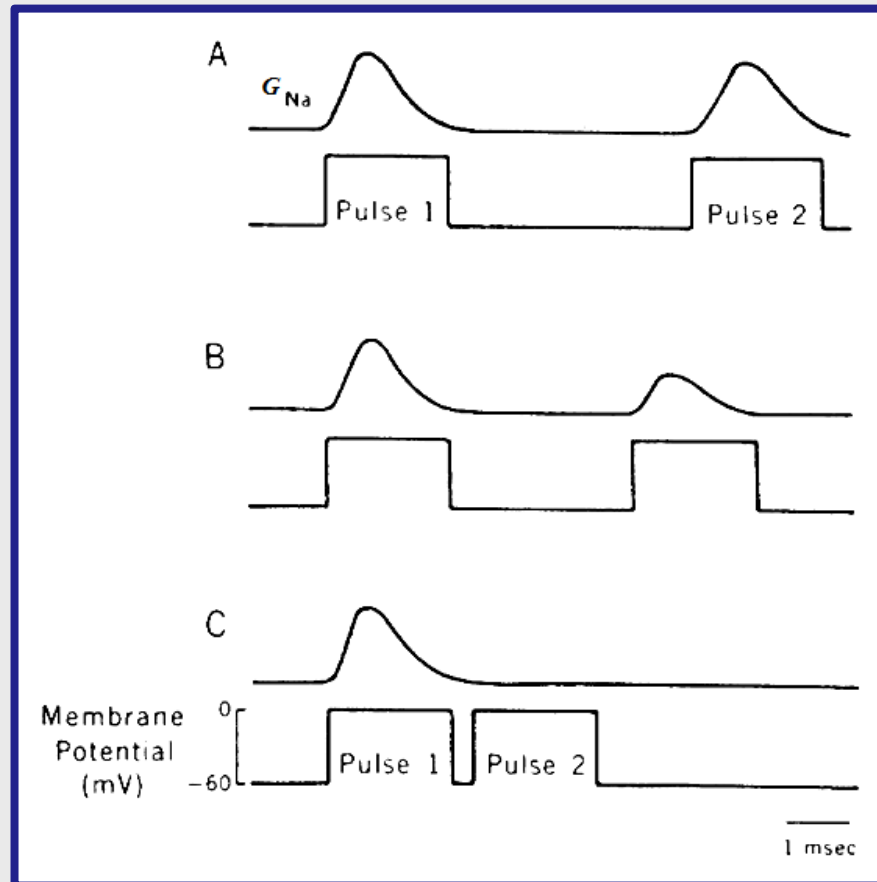
1 Faradio = 1 Coulomb / 1 Voltio, por lo tanto

$$dV_m/dt = 500 \text{ voltios /segundos.}$$

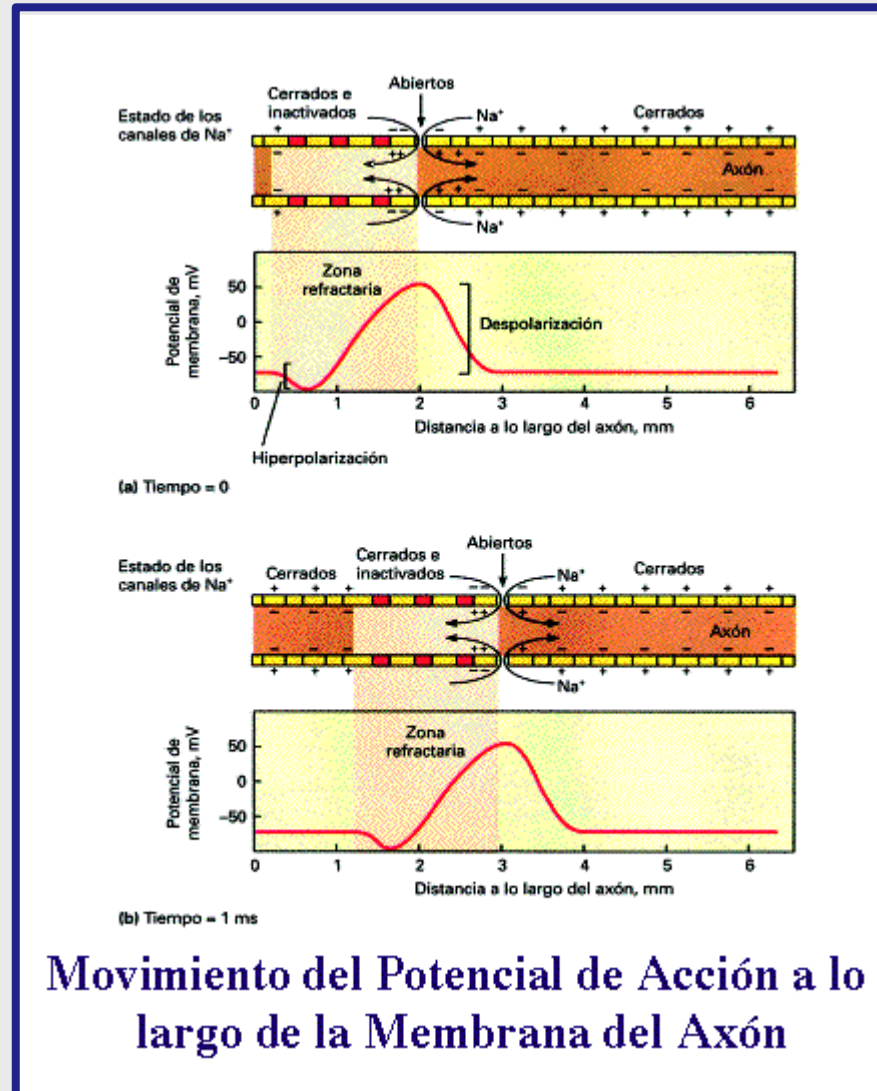
- Como resultado de un PA el cambio en la  $[\text{Na}^+]_i$  por  $\text{cm}^2$  de **área de membrana** es de aproximadamente **1 pM (1 pico Molar;  $10^{-12}$  moles/lit)**, y ese cambio se halla restringido a la superficie interna de la membrana. Dicho cambio es **despreciable** en comparación con la  $[\text{Na}^+]_i$  que se halla en el orden de **mM (mili Molar)**. Algo similar ocurre con el  $\text{K}^+$ . En otras palabras, las concentraciones internas de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  ***prácticamente no se modifican durante un PA.***
- De hecho, **si la bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  fuera bloqueada en el AGC, sería posible iniciar más de 500.000 PA antes de que se pudieran evidenciar cambios en el PM o en la amplitud del PA (condiciones de laboratorio)** (“An Introduction to Membrane Transport and Bioelectricity”. 2<sup>nd</sup> Edition. 1994. Pág. 99. Byrne and Schultz).
- **La bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  mantiene los gradientes iónicos necesarios para que se produzca esta “señal electroquímica”, pero no participa en el mecanismo molecular que da lugar a la generación y a la propagación del PA, ni en la repolarización de la célula.**

- **Umbral:** se alcanza cuando el flujo entrante de  $\text{Na}^+$  supera al flujo saliente de  $\text{K}^+$ , durante la despolarización.
- **Período Refractario Absoluto:** hace referencia al período de tiempo (aproximadamente entre 0,5 *mseg.* - 1 *mseg.*), luego de iniciado un PA, durante el cual **no es posible generar un nuevo PA**, independientemente de la intensidad del estímulo despolarizante. Esto se debe a que se requiere de un cierto número de canales de sodio que haya “salido” de su estado “*Abierto Inactivado*” para poder iniciar un nuevo PA.
- **Período Refractario Relativo:** hace referencia al período de tiempo, luego de iniciado un PA, durante el cual es posible iniciar un nuevo PA, pero únicamente **con un estímulo de mayor intensidad con respecto al empleado para la iniciación del primer PA**. En parte se explica teniendo en cuenta que la membrana se encuentra hiperpolarizada.

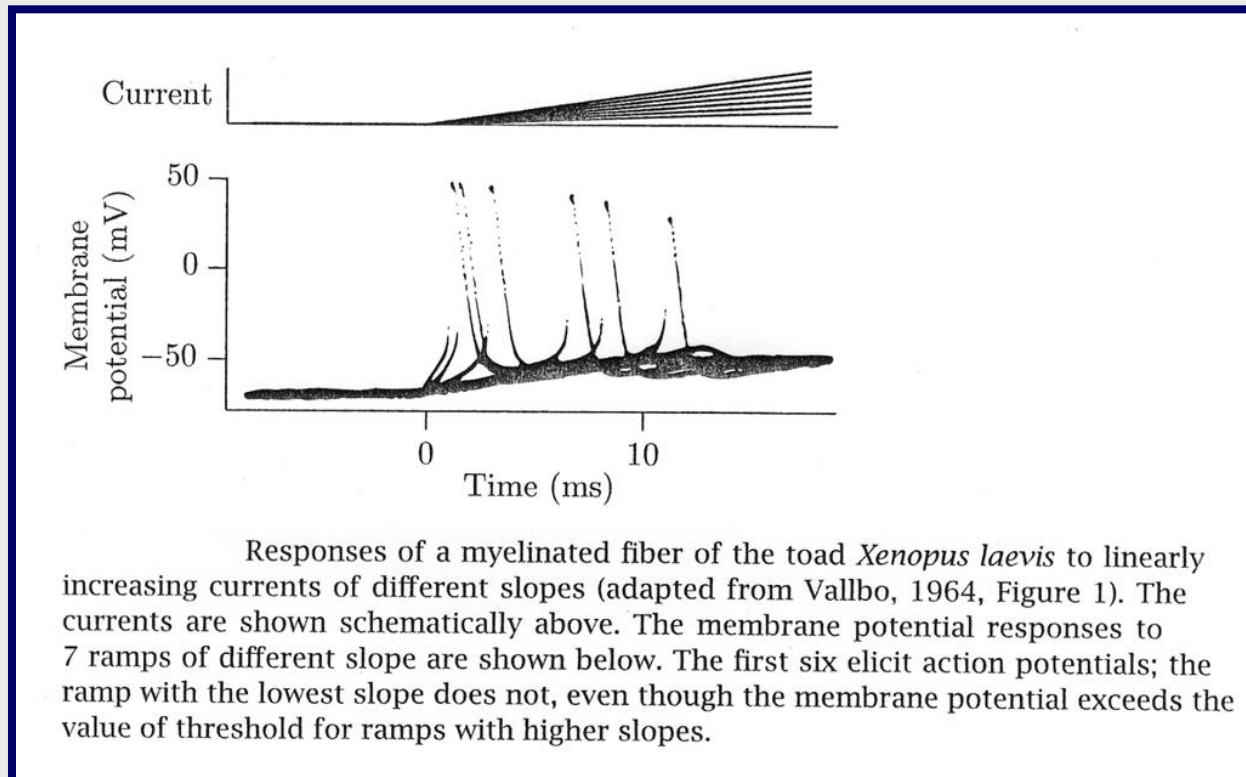
Cambios en la conductancia de  $\text{Na}^+$  ante 6 “steps” de voltaje en el AGC [en c/u de ellos se fija el PM en  $0 \text{ mV}$  ( $V_{rest} = -60 \text{ mV}$ )]. A) La separación en el tiempo de los 2 “steps” de voltaje permite una apertura prácticamente similar en los canales de  $\text{Na}^+$  voltaje dependientes (ambas curvas de  $G_{Na}$  son muy similares). B) Los “steps” de voltaje se aproximan en el tiempo, observándose un descenso en  $G_{Na}$  para el caso del segundo “step” (el axón se encuentra en el “*Período Refractario Relativo*”). Si el segundo “step” de voltaje hubiera sido de mayor magnitud con respecto al primero, posiblemente habría generado un cambio en  $G_{Na}$  similar al del primer “step”. C) La proximidad en el tiempo de ambos “steps” de voltaje es tal que no es capaz de producir cambios en  $G_{Na}$ , ya que los canales de  $\text{Na}^+$  voltaje dependientes se encuentran en el “*Estado Abierto Inactivado*”. En esta tercera situación el axón se halla en el “*Período Refractario Absoluto*”.



Esquema en el que se muestra un PA propagado en el AGC (notar que el eje de abscisas representa “Distancia”). Tener en cuenta que la fase de despolarización (fase 1) es la que avanza hacia adelante (derecha, en este caso), mientras que las fases 2 y 3 (repolarización e hiperpolarización, respectivamente) se observan en el lado izquierdo de la curva espacial de PA. También se representa la “Zona refractaria”.



- **Acomodación:** se define como el **cambio en el umbral** de una célula excitable cuando una **lenta despolarización** es aplicada. De hecho, si la despolarización es lo suficientemente lenta ningún PA se generará. **La inactivación de los canales de Na<sup>+</sup> contribuye a este fenómeno**, ya que un proceso de lenta despolarización imposibilita alcanzar el número necesario de estos canales en el “*Estado Abierto*”; la mayoría de ellos se abrirán pero irán pasando al “*Estado Abierto Inactivado*”. Esto impide que la corriente entrante de Na<sup>+</sup> pueda superar a la corriente saliente de K<sup>+</sup>, en consecuencia no se alcanzará el “nivel de disparo”.



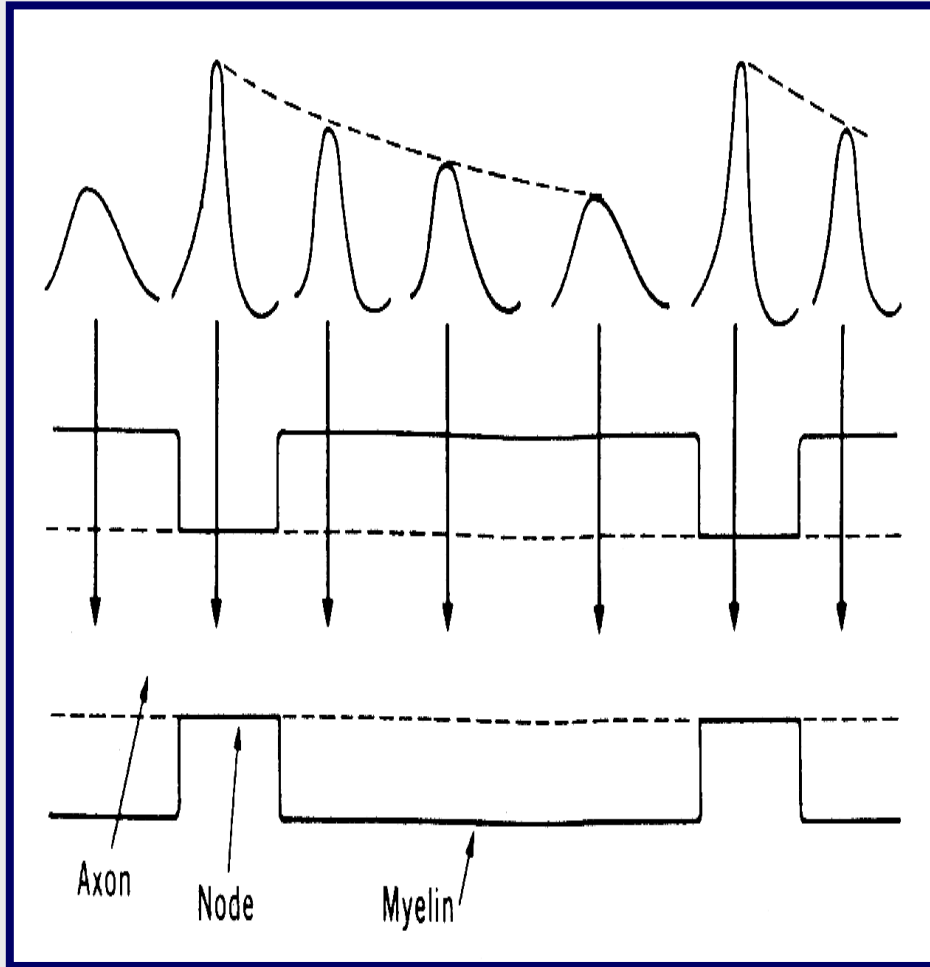
Responses of a myelinated fiber of the toad *Xenopus laevis* to linearly increasing currents of different slopes (adapted from Vallbo, 1964, Figure 1). The currents are shown schematically above. The membrane potential responses to 7 ramps of different slope are shown below. The first six elicit action potentials; the ramp with the lowest slope does not, even though the membrane potential exceeds the value of threshold for ramps with higher slopes.

**Electrotono** (respuesta “*pasiva*”) y **PA** (respuesta “*activa*”). Nota: en este contexto, los términos “*pasivo*” y “*activo*” no hacen referencia al no consumo o consumo de energía, respectivamente.

- ***Electrotono:*** 1) es graduado; si el estímulo es de menor intensidad, la respuesta (cambio en el PM) será de menor amplitud, y viceversa. 2) Decae con la distancia.
- ***Potencial de Acción:*** 1) es de tipo “*todo o nada*”, y sus características básicas, una vez generado, son independientes de la intensidad del estímulo; 2) se propaga sin sufrir modificación (sin decremento) a lo largo de grandes distancias en los axones de las células nerviosas y en fibras musculares.



## Propagación del PA en axones con mielina

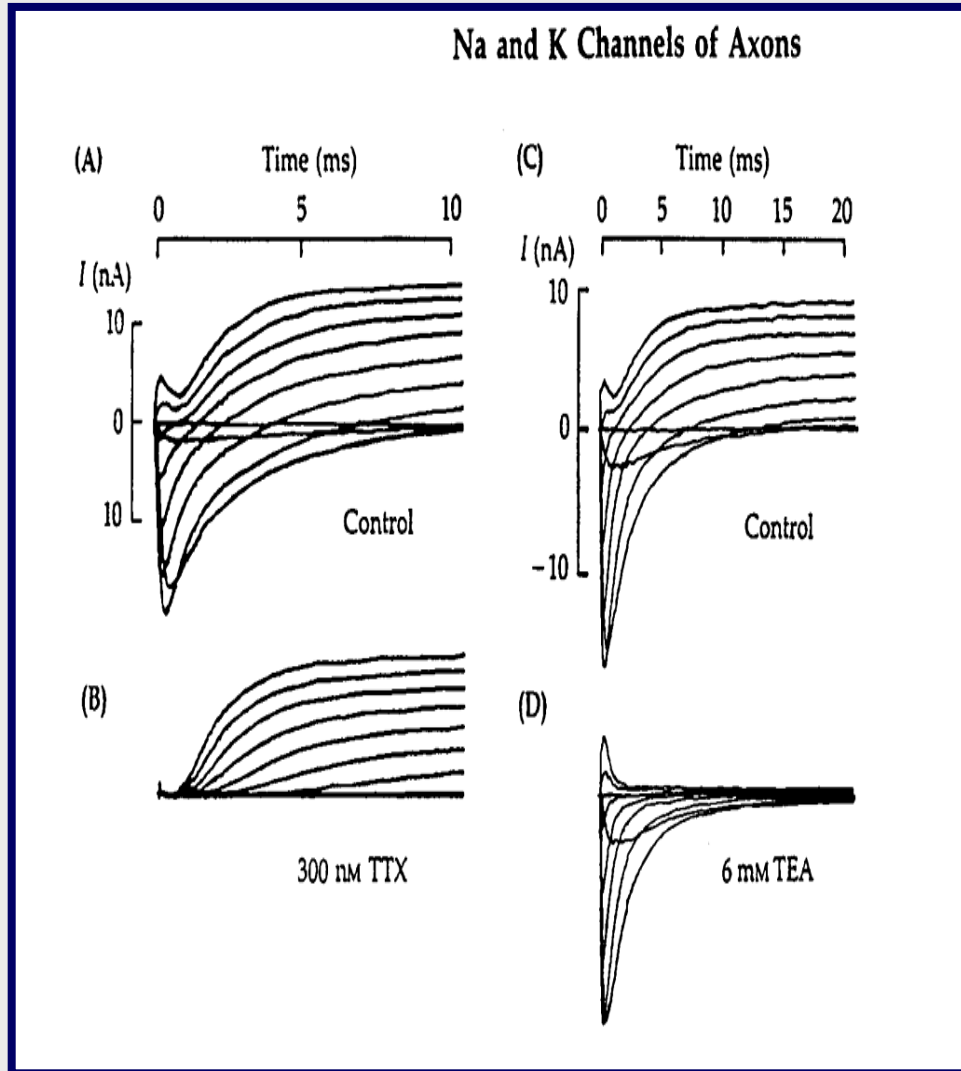


En los nodos (Node) de Ranvier, el axón de los vertebrados no está cubierto por mielina (Myelin) (ésta cumple una función de aislante eléctrico). La transmisión del PA en las zonas con mielina es de tipo electrotónica, y muy rápida. En estas zonas el PA disminuye en amplitud, pero alcanza el siguiente nodo como para provocar una suficiente despolarización que permite reclutar la cantidad necesaria de canales de  $\text{Na}^+$  voltaje dependientes para que se regenere esta “*señal electroquímica*”. A menudo se dice que se trata de un PA “*saltatorio*”, pues si se registra el cambio en el PM en cada nodo de Ranvier lo que se observa es precisamente el PA (como si “*saltara*” de un nodo a otro).

Extraído de “An Introduction to Membrane Transport and Bioelectricity”.  
2<sup>nd</sup> Edition. 1994. Pág. 111. Byrne and Schultz.

# Toxinas

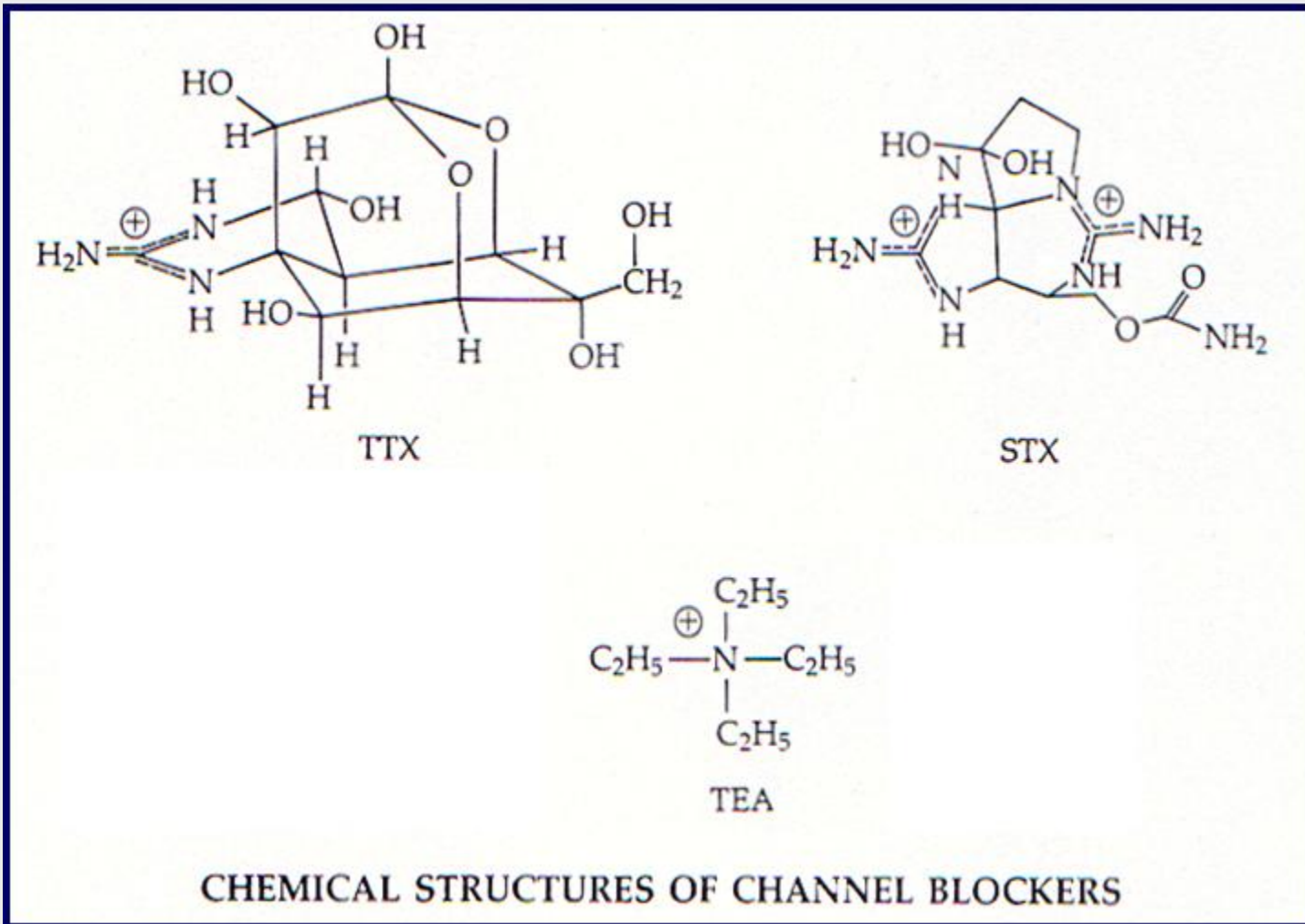
Descubiertas varios años después de los experimentos realizados por HH en el año 1952.



TTX: tetrodotoxina. Se extrae de ciertas glándulas de algunas especies de peces globo (“*puffer fish*”). (A) Sucesivos experimentos de control de voltaje (“*voltage-clamp*”). Se observan las curvas de la corriente total que se genera en un nodo de Ranvier como consecuencia de varios “steps” de voltaje (valores de voltaje cada vez mayores en cada “step”). Este gráfico representa el conjunto de experimentos “*control*” (condiciones fisiológicas). (B) El gráfico muestra los resultados de un mismo conjunto de experimentos cuando se agrega al medio 300 nM (*nano moles/lt*) de TTX. El resultado es evidente. Esta toxina bloquea *canales de  $Na^+$  voltaje dependientes*, ya que el componente entrante ( $I_{Na}$ ) correspondiente a la corriente total desaparece, persistiendo exclusivamente el componente saliente ( $I_K$ ). Otra toxina con un efecto similar al de la TTX es la STX (saxitoxina).

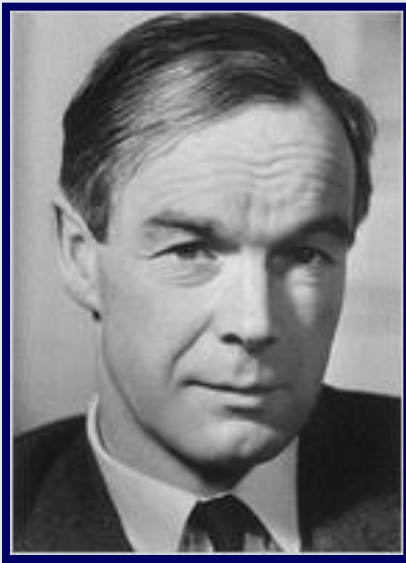
TEA: tetraetilamonio. Sustancia química cuyos efectos se observan en los experimentos del gráfico (D). Las curvas del gráfico (C) son obtenidas mediante una metodología similar a la de los experimentos en (A) (experimentos “*control*”). Las curvas de corriente del gráfico (D) fueron obtenidas bajo los mismos procedimientos experimentales que en (C), pero con el agregado al medio de una concentración de 6 mM (*mili moles/lt*) de TEA. El efecto de esta toxina es evidente. *Bloquea canales de  $K^+$  voltaje dependientes*, ya que desaparece el componente saliente de la corriente total ( $I_K$ ), persistiendo exclusivamente el componente entrante ( $I_{Na}$ ).

Drogas como la TTX, la STX, y el TEA fueron llamadas en su tiempo “*magic bullets*” (“*balas mágicas*”), ya que cada molécula de cada una de estas toxinas bloquea un único canal de Na<sup>+</sup> o de K<sup>+</sup> sensibles al voltaje, respectivamente. Representó una forma de confirmar lo que HH habían encontrado a través de sus brillantes experimentos (sustitución de Na<sup>+</sup> en el medio externo, más el empleo del dispositivo regulador de voltaje y las técnicas de “*voltage-clamp*” y de “*space-clamp*”; 1952), es decir, vías independientes para el pasaje de estos cationes en las membranas de las células nerviosas. También permitieron realizar las primeras estimaciones, por parte de otros investigadores, acerca del número de estos canales presentes en un gramo de nervio por unidad de superficie en varias especies animales.



Adaptado de “Ionic Channels of Excitable Membranes”. 2<sup>nd</sup> Edition. 1992. Pág. 60. Bertil Hille.

- La selectividad del bloqueo con TTX o STX por un lado, y con TEA por el otro, *años después de los experimentos de HH de 1952*, suministraron los argumentos más importantes para la existencia de dos vías separadas para  $I_{Na}$  e  $I_K$  en la membrana de las células excitables. *Ninguna de estas drogas bloquea  $I_L$  (corriente de “leak”), ésta circula por otras vías.*
- La **dependencia con el voltaje de la conductancia (permeabilidad) de la membrana** es cualitativamente **similar en los axones de moluscos, anélidos, artrópodos y vertebrados**, y cuando la temperatura es la misma los cambios en la conductancia son similares.
- Los canales de  $Na^+$  y de  $K^+$  sensibles al voltaje ya estaban bien estructurados y funcionando de manera estable en el ancestro común de estos phyla, hace ya 500 millones de años atrás.
- Prácticamente, todos los axones usan estos dos tipos de canales dependientes de voltaje originalmente descritos en el AGC.
- La simplicidad del mecanismo de excitabilidad de los axones está de acuerdo con la simplicidad de su “misión” (“tarea”): propagar los impulsos en forma “incondicional” (“*todo o nada*”).



- **Name:** Alan Lloyd Hodgkin.
- **Birth Date:** February 5, 1914.
- **Death Date:** December 20, 1998.
- **Nationality:** English.
- **Occupations:** Physiologist and Biophysicist.



- **Name:** Andrew Fielding Huxley.
- **Birth Date:** November 22, 1917.
- **Death Date:** May 30, 2012.
- **Nationality:** English.
- **Occupations:** Physiologist and Biophysicist.

Ganadores del Premio Nobel de “*Fisiología o Medicina*” en el año 1963.

# Algunos datos relativos al AGC

- $[\text{Na}^+]_i = 50 \text{ mM}; \quad [\text{Na}^+]_e = 440 \text{ mM}.$
- $[\text{K}^+]_i = 400 \text{ mM}; \quad [\text{K}^+]_e = 20 \text{ mM}.$
- $E_K \approx -75 \text{ mV}; \quad E_{Na} \approx +55 \text{ mV}.$
- $V_{rest} \approx -60 \text{ mV}.$

## Bibliografía consultada (de la cual se extrajeron las figuras de las tres clases)

- A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. A. L. Hodgkin and A. F. Huxley. *J. Physiol.* (1952) 117, 500-544.
- **An Introduction to Membrane Transport and Bioelectricity. Second Edition. John H. Byrne, Stanley G. Schultz. Raven Press. 1988. En Biblioteca de FC.**
- Biophysics of Computation. Information Processing in Single Neurons. Christof Koch. Oxford University Press. 1998.
- Cellular Biophysics – Electrical Properties. Thomas Fischer Weiss. The MIT Press. Cambridge, Massachusetts. London, England. 1996. **En Biblioteca de FC.**
- Foundations of Cellular Neurophysiology. Daniel Johnston and Miao-Sin Wu. MIT. 1994.
- **Ionic Channels of Excitable Membranes. Second Edition. Bertil Hille. SINAUER ASSOCIATES INC. Publishers Sunderland, Massachusetts. 1992. En Biblioteca de FC.**
- Medical Physiology, 14<sup>th</sup> Edition. Vernon B. Mountcastle. The C. V. Mosby Company. 1979.
- Methods in Neuronal Modeling. Edited by Christof Koch and Idan Segev. MIT. 1999.
- **Transporte y Excitabilidad. Eduardo Ríos. División Publicaciones y Ediciones, Facultad de Odontología, UdelaR. 1983.** Nota: **lo publica la AEM sin la primera parte, o sea, solamente cuenta con los capítulos referidos a Excitabilidad. Está completo en el “libro” de BF (Subespacio).**