

**EFFECTOS DEL PH INTRACELULAR SOBRE LAS
CORRIENTES DE K⁺ DE LAS NEURONAS DEL
ORGANO-X DEL CRUSTÁCEO.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA PRESENTA

ING. VALENTINA CASTAINGTS MEJIA.

DIRECTOR DE LA TESIS

M en C. RAFAEL GODINEZ FERNÁNDEZ

SEPTIEMBRE, 1996

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

EFFECTOS DEL PH INTRACELULAR SOBRE LAS
CORRIENTES DE K^+ DE LAS NEURONAS DEL
ORGANO-X DEL CRUSTACEO.

TESIS QUE PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN ING. BIOMEDICA
PRESENTA

ING. VALENTINA CASTAINGTS MEJIA

MEXICO D.F. SEPTIEMBRE 1996

DIRECTOR:
M en C. RAFAEL GODINEZ FERNÁNDEZ

SINODALES:
M en C. MIGUEL CADENA MENDEZ.
M en C. CAROLINA CAMPOS MUÑIZ
Dra. HORTENSIA GONZALEZ GÓMEZ

A mis padres por su inmesurable apoyo.

A la memoria de:

Don Enrique Castaingts, un Hidrocalido nacido en Francia.

Margarita, está linda la mar,
y el viento
lleva esencia sutil de azahar;
yo siento
en el alma una alondra cantar:
tu acento.
Margarita, te voy a contar
un cuento.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco muy especialmente al M en C. Rafael Godinez Fernández por haberme dado la oportunidad de haber trabajado con él, por haberme enseñado un mundo de conocimiento pero sobre todo, por la infinita paciencia y dedicación que me brindó a lo largo de la elaboración de este trabajo. Definitivamente, el persistente apoyo y entusiasmo que me dió Rafael fué la clave de esta tesis, razón por la cual le estoy infinitamente agradecida.

Al M en C. Miguel Cadena Mendez le agradezco su constante apoyo académico así como su motivación para la realización de este proyecto.

La coreografía del Ing. Jorge Zinser fué la que me sacó adelante en los momentos de angustia más difíciles, gracias a ella se pudo terminar esta tesis. Muchas gracias Zinser.

A mis sinodales

M en C. Rafael Godinez Fernández
M en C. Miguel Cadena Mendez.
M en C. Carolina Campos Muñiz.
Dra. Hortensia Gonzalez Gómez.

por sus consejos, comentarios, críticas al trabajo, pero sobre todo por su comprensión y enorme calidad humana les estaré siempre agradecida.

Agradezco al Laboratorio de Neurofisiología por haberme brindado un espacio para la realización de esta tesis, así como el agradable ambiente de trabajo con el que se me recibió.

A mis padres por estar siempre a mí lado y , por haber aguantado mi "dulce" carácter durante la realización de éste, su esfuerzo.

INDICE

	Pág
INTRODUCCIÓN	1
MATERIAL Y MÉTODOS	9
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	28
APÉNDICE A	35
APÉNDICE B	54
APÉNDICE C	73
APÉNDICE D	80
APÉNDICE E	92
BIBLIOGRAFÍA	97

INTRODUCCION

A principios del siglo, el histólogo español Santiago Ramón y Cajal, usando el microscopio óptico y la técnica de impregnación argéntica de Golgi, mostró que las células del tejido nervioso se teñían como unidades independientes. La discontinuidad de las neuronas se estableció con la llegada del microscopio electrónico en la década de los años cuarenta.

La neurona (del griego neuron: célula nerviosa) es la unidad fundamental del sistema nervioso; desde un punto de vista clásico, es la unidad de procesamiento simple que recibe y combina señales provenientes de otras neuronas. Las neuronas están compuestas por el soma (del griego some: cuerpo), el axón y las dendritas (del griego dendron: árbol).

El soma está constituido por un núcleo y un aparato metabólico que une al axón por medio del cono axónico. Las dendritas son prolongaciones que están conectadas con el soma. Las dendritas y el axón son prolongaciones que crecen a partir del soma durante el desarrollo y en los que hay un lento, pero sostenido flujo de proteínas y otros constituyentes sintetizados en el soma. Las neuronas se comunican entre sí por medio de sinapsis que se lleva a cabo entre una terminal presináptica y una región postsináptica, no siendo una unión íntima, existe entre cada terminal un espacio conocido como la hendidura sináptica (ver Apéndice A).

El tejido nervioso se diferencia de los demás tejidos porque es capaz de generar una respuesta ante un estímulo aplicado, lo que permite que se puedan generar y transmitir señales nerviosas. Estas son tanto químicas como eléctricas y son utilizadas por el sistema nervioso para llevar a cabo todas sus funciones. Tanto en las neuronas como en otras células excitables, las señales eléctricas se transportan por corrientes iónicas y por cambios producidos en el potencial de membrana.

En el sistema nervioso existen principalmente cuatro iones involucrados en el transporte de las corrientes iónicas: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- ; el movimiento de estos iones está controlado por leyes físicas, y la fuente de energía que determina su movimiento, proviene del gradiente de concentración para cada especie iónica a través de la membrana celular; este gradiente deriva de bombas de iones, cuya energía a su vez, proviene de la hidrólisis de moléculas de ATP (adenosin trifosfato).

En las células excitables, el movimiento iónico a través de la membrana celular produce cambios en el potencial de membrana, que son los responsables del transporte de los mensajes biológicos de una célula a otra. Este movimiento de iones a través de la membrana celular se debe a la activación de proteínas integrales o proteínas intrínsecas, conocidos como canales iónicos. Dentro del grupo de transportadores (proteínas intrínsecas) se pueden catalogar la bomba $Na^+ - K^+$, la de H^+ y la de Ca^{2+} , el intercambiador $Na^+ - K^+$ entre otros. Estos

intercambiadores requieren de ATP para su funcionamiento, ya que la dirección en la que mueven a los iones se hace en dirección opuesta a su gradiente de concentración (Hille, 1992).

Los transportadores y canales iónicos, son proteínas que se encuentran inmersas en la membrana celular y constituyen la principal vía de poro iónico a través de la membrana y presentan una selectividad iónica para cada ión, es decir, permiten que pase preferentemente una sola especie iónica (Eisenman, 1961; Latone y Miller, 1983; Hille, 1992).

Los canales iónicos se pueden clasificar por el tipo de estímulo al que responden; cuando su actividad depende de la unión de un ión o neurotransmisor, se les conoce como canales dependientes de ligando (Levitan, 1988); los que responden a estímulos mecánicos, se les denominan canales dependientes de estiramiento (Morris, 1990); y finalmente, aquellos canales que operan por cambios en el voltaje transmembranal, se les conoce como canales dependientes del voltaje.

Un canal dependiente del voltaje se define por sus mecanismos de compuerta, su conductancia, su selectividad y sus propiedades farmacológicas. Participan en eventos fisiológicos como la propagación de impulsos eléctricos tanto en nervios como en músculos, en el transporte transepitelial de electrolitos, en la regulación del volumen celular, activación de la contracción, etc. En el axón nervioso se encuentran distintos tipos de canales iónicos dependientes del voltaje, los más comunes son los canales de Na^+ , y de K^+ . Estos canales fueron descritos por Hodgkin y Huxley en 1939 y por Cole y Curtis en 1940 al hacer registros sobre el axón gigante de calamar.

Hodkin y Huxley en sus trabajos realizados en los años cincuenta, sugirieron que la actividad eléctrica en el axón nervioso la membrana celular era el resultado, de los cambios de la conductancia dependientes del voltaje y del tiempo de estos canales, especialmente del canal de Na^+ y canal de K^+ (Hodgkin y Huxley, 1952 b); por medio de la técnica de fijación de voltaje, determinaron que la corriente iónica total se constituía tanto por una corriente entrante rápida de Na^+ como por una corriente lenta saliente de K^+ y que existía una diferencia entre los cursos temporales de las mismas. La corriente de Na^+ alcanzaba un valor máximo 1 ms después de que se aplicaba un pulso de despolarización, regresando posteriormente a su valor inicial, en tanto que la corriente de K^+ se incrementaba más lentamente hasta alcanzar un estado estable.

Dado que realizaron sus experimentos en axón gigante de calamar y que este presenta características electrofisiológicas más simples con respecto a las otras partes que constituyen a la neurona, solamente mostraron dos tipos de corrientes dependientes del voltaje: la de Na^+ y la de K^+ . Actualmente se sabe que en la terminal pre-sináptica, lugar en donde se lleva a cabo la liberación del

neurotransmisor en una célula, existen por lo menos dos tipos de canales, el de Ca^{2+} y el de K^+ . Esto sucede también para las dendritas, en donde los canales iónicos presentes ejercen un efecto importante en la manera como las neuronas responden a las sinápsis. En las dendritas se localizan canales de Ca^{2+} y de K^+ dependientes del voltaje, en el soma en donde se lleva a cabo la integración de todas las señales hay canales de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- .

Existen por lo tanto, diferentes tipos de corrientes iónicas a lo largo de la membrana celular. Estas se distinguen por su selectividad iónica, por sus propiedades electrofisiológicas y por su farmacología. De esta manera, se pueden distinguir corrientes de Na^+ , tanto rápidas, generadoras del potencial de acción, como lentas. Las corrientes de Na^+ se producen en el soma y axón de las neuronas, sin embargo, solamente algunas neuronas presentan corrientes de Na^+ en las terminales pre-sinápticas y en las dendritas. Las corrientes de Ca^{2+} presentan similitudes con las corrientes de Na^+ , en tanto que también son corrientes de entrada y presentan cierto grado de inactivación. Existen a su vez diferentes tipos de corrientes de Ca^{2+} , la corriente tipo *L* que se activa con despolarizaciones mayores a -10 mv; la de tipo *T* que se activa con despolarizaciones cercanas a -60 mv; la tipo *N* que presenta un umbral alto y se activa a potenciales mayores a -10 mv y finalmente, la corriente de Ca^{2+} tipo *P* que es similar a la corriente *N*, pero que podría estar involucrada en la neurotransmisión en algunas células.

Aunque no se conoce con exactitud la distribución de los canales *L*, *T*, *N*, y *P*, se sabe que las corrientes de Ca^{2+} se desarrollan en toda la célula y, se puede suponer que los canales *N* y *P*, están relacionados en la liberación rápida de los neurotransmisores (por ejemplo: glutamato y GABA) y que los canales *L* son los responsables de la liberación más lenta de los neurotransmisores, tales como neuropéptidos y catecolaminas.

Con respecto a las corrientes de K^+ , se pueden clasificar en tres rubros: aquellas que contribuyen al potencial de reposo de la célula (corrientes de K^+ de bajo umbral); las que se activan por potenciales sub-umbrales; y finalmente, las corrientes que se activan por potenciales de acción y que contribuyen a los disparos repetitivos (corrientes de K^+ de alto umbral). Las corrientes de K^+ son corrientes salientes y los canales de K^+ se localizan en toda la célula. Al canal de K^+ que se encuentra en el axón, se le conoce como rectificador tardío, ya que cambia la conductancia de la membrana con cierto retraso después de que se aplicó un pulso de voltaje (Hodgkin y col., 1949). La activación de la corriente de K^+ del rectificador tardío se caracteriza por tener una activación lenta, lo cual permitiría suponer su participación en la repolarización del potencial de acción. Esta corriente es sensible a altas concentraciones de tetraetilamonio (*TEA*).

También existe un canal de K^+ que se activa de manera transitoria en el rango subumbral de los potenciales de membrana (Hille, 1992). A esta corriente se le conoce como corriente A . Participa en la repolarización del potencial de acción y, dado que se activa rápidamente y luego se inactiva, contribuye a que las neuronas no respondan a despolarizaciones muy rápidas. Esta corriente aparece cuando la célula se despolariza cerca de los -70 mv, y se le puede separar por medio de una resta de la corriente de K^+ del rectificador tardío, ya que esta corriente se inactiva en los -40 mv. La corriente A es insensible a los efectos del *TEA* y se puede inhibir por medio de 4-aminopiridina ($A-4P$) (Hille, 1992;)

Existen también corrientes de protones donde la dependencia del voltaje para la conductancia de H^+ es sensible a los cambios internos y externos de pH y donde solo se observan corrientes salientes de H^+ . La permeabilidad de los H^+ a través de los canal de H^+ activados por voltaje se lleva a cabo por medio de mecanismos diferentes a los de la permeabilidad del H^+ a través de los canales de agua en donde la conductancia aumenta en proporción directa con la concentración de H^+ (Thomas E. y col., 1995).

Dado que los canales iónicos son los generadores de la actividad eléctrica en las células excitables, cualquier cambio que se genere sobre éstos, producirá por ende, un cambio en las propiedades eléctricas y termodinámicas de la membrana. Estos canales se pueden modular por medio de agentes químicos, se pueden abrir por el efecto de neurotransmisores, se pueden cerrar bajo la acción del ATP, pueden modificar su actividad al generarse cambios de pH, por citar algunos ejemplos.

Existen estudios que muestran que el intercambiador $Na^+ - H^+$ juega un papel importante en la regulación del volumen celular y en el control del pH citoplasmático. Para ciertos epitelios, este intercambiador es esencial para el transporte de iones a través de la membrana. Su energía proviene de la diferencia entre los gradientes de Na^+ e H^+ y no de la hidrólisis de ATP, pero puede ser modulado por diversos agentes, tales como hormonas, factores de crecimiento y otros mitógenos o agentes promotores de tumores (Grinstein y Rodhtein, 1986; Grinstein y Cohen, 1987).

Una de las maneras por las que se puede modificar el pH intracelular es utilizando inhibidores del intercambiador $Na^+ - H^+$, como la amilorida (Grinstein y col., 1984; Mei-Lin y col., 1994), aumentando la concentración extracelular de H^+ o bien, utilizando fármacos, como el dinitrofenol (DNP), que actúan sobre el pH intracelular.

En la actualidad se sabe que existe una relación entre el pH intracelular y el potencial de membrana. Cuando la célula se despolariza, se incrementa la permeabilidad a H^+ aunque esté por demostrarse, que este incremento sea por

canales iónicos voltaje dependientes selectivos a H^+ . (Joachim y col., 1995; Meech y Thomas, 1987).

Se sabe que el DNP actúa como ionóforo en la membrana mitocondrial por lo que disipa el gradiente de protones. La disipación de este gradiente en la membrana de las mitocondrias contribuye al desacoplamiento entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, por lo que se impide que se realice la fosforilación del ADP al ATP (Mitchell, 1966). El DNP al actuar como un ionóforo, en la membrana mitocondrial, disminuye o elimina la energía metabólica disponible para el transporte de H^+ y disminuye la capacidad de generar gradientes de H^+ a través de la membrana mitocondrial (López y col., 1984; Rocher y col., 1990).

El efecto del DNP también se ve reflejado sobre la actividad eléctrica de las células. Hodgkin y Keynes (1955) mostraron que la entrada de iones de K^+ disminuía drásticamente bajo el efecto del DNP con respecto al efecto mínimo que causaba el DNP sobre la entrada del Na^+ . De la misma manera, mostraron que el DNP actuaba muy poco sobre el flujo de salida de los iones de K^+ . El efecto del DNP también se puede ver sobre la actividad de ciertos canales, en donde se observa que después de haber expuesto la droga, aparece un aumento en la actividad del canal. De la misma manera, se observó que la amplitud de la corriente iónica disminuía bajo el efecto del DNP (Allard y col., 1994).

En estudios anteriores realizados sobre el órgano-x de acocil, se mostró la existencia de un canal de K^+ dependiente de ATP, K_{ATP} (Onetti y col., 1992). Al disminuir los niveles de ATP se abre el canal, aumenta la conductancia al K^+ por lo que disminuye la resistencia de la membrana. Con el fin de observar la modulación de este canal con respecto a los niveles de ATP realizamos una serie de experimentos en donde se aplicó al medio extracelular DNP, de tal manera que se dejara de producir ATP. Los resultados obtenidos mostraron que, bajo el efecto del DNP, la resistencia de la membrana aumentaba y que también se generaba un incremento en la amplitud de los potenciales de acción (figura 1) por lo que el DNP no actuaba sobre el canal de K_{ATP} , disminuyendo la resistencia de la membrana, como era de esperarse, al abrirse el canal de K_{ATP} .

A raíz de estos resultados contradictorios, se decidió estudiar en este trabajo los cambios producidos en la acidificación del medio intracelular sobre las características eléctricas de la membrana celular, ya que otras de las acciones descritas para el DNP es la de acidificar el medio intracelular (Mei-Lin y col., 1994). Los registros se realizaron en un principio, utilizando la técnica de fijación de voltaje en su conformación de célula completa. Los valores de pH intracelular que se utilizaron fueron 7.2, 7.0, 6.5 y 6.14. Por medio de esta técnica se obtuvieron los registros de las corrientes de I_K , I_A y las corrientes del estado estable. Posteriormente, se utilizó la técnica de fijación de corriente para observar, al aplicar DNP en el medio extracelular, el comportamiento eléctrico de la membrana

celular. Los registros se realizaron en las neuronas peptidérgicas del sistema neurosecretor órgano-x glándula sinusal (OX-GS) del acocil.

La mayoría de los estudios sobre canales iónicos se han realizado sobre células de animales invertebrados tomando como base la escala evolutiva, sin embargo, han servido de modelo biológico, ya que esas células presentan un sistema nervioso más sencillo y, aunque en comparación con los mamíferos, exista una gran diferencia en la escala filogenética, a nivel celular existe una gran similitud.

Los sistemas neurosecretores, de forma muy general, se componen de un conjunto de neuronas peptidérgicas, cuyas fibras axónicas forman un tracto que llega a una estructura terminal organizada, denominada órgano neurohemal; en este sitio las terminales nerviosas vierten las sustancias de secreción a la circulación. Las neuronas peptidérgicas tienen características comunes a otras neuronas (motoneuronas, interneuronas y neuronas sensoriales) en cuanto a su apariencia morfológica (Adiyodi y Bern., 1968) y a su actividad eléctrica, como la generación y propagación de impulsos eléctricos (Cross y col., 1975).

Las células nerviosas que liberan neurotransmisores los sintetizan y los reciclan en la terminal presináptica del axón (Klein., 1982), a diferencia de las neuronas peptidérgicas que sintetizan los péptidos en el soma, los empaquetan en gránulos y los transportan a los sitios de liberación (Almers., 1990).

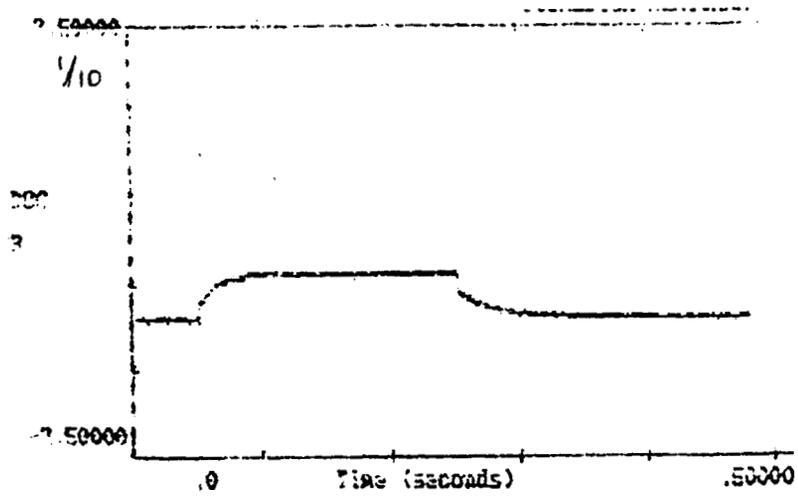
El sistema neurosecretor más importante de los vertebrados es el eje hipotálamo-neurohipófisis, en el que los cuerpos neuronales se localizan en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, sus axones pasan por la parte interna de la eminencia media y terminan en la neurohipófisis, cerca de una red de vasos capilares. En los insectos un sistema importante es el "Corpus cardiacum". En los crustáceos es el sistema OX-GS. Estos tres sistemas son equivalentes morfológica y funcionalmente en cuanto a que existe un conjunto de neuronas cuya función no es la de llevar a cabo un contacto sináptico con otras neuronas o con órganos efectores sino la de producir neuropéptidos que se vierten en el torrente circulatorio para ejercer su acción hormonal.

El sistema OX-GS del acocil está constituido por un grupo de 150 neuronas, cada soma tiene un axón amielínico que envía colaterales axónicas al neuropilo de la médula terminal, los axones principales forman el tracto OX-GS que asciende superficialmente en sentido longitudinal al eje del tallo óptico, llegando al nivel del segundo quiasma, entre las médulas interna y externa, para que el conjunto de las terminales y los vasos capilares formen el órgano neurohemal llamado glándula sinusal.

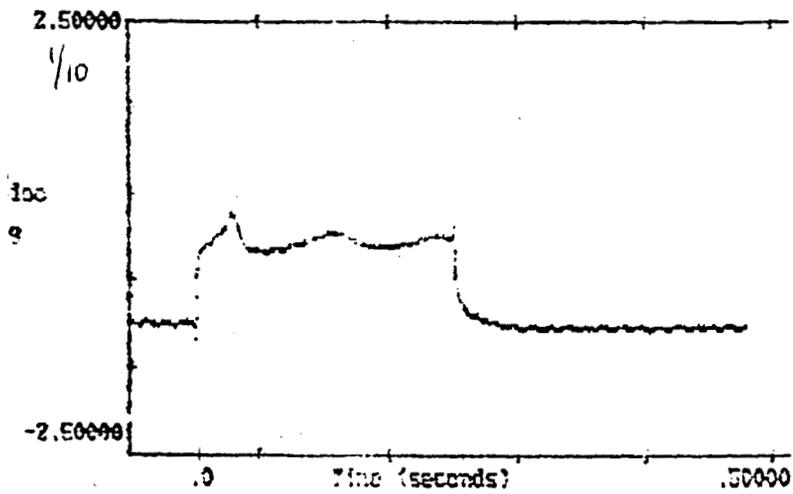
Se ha propuesto que el sistema OX-GS de los crustáceos regula varias de sus funciones fisiológicas mediante la liberación de neurohormonas; la mayoría de éstas se han obtenido de extractos de tallo ocular, lo que explica que a éste se le atribuyan diversas funciones endócrinas.

Las neuronas del sistema OX-GS de crustáceo tienen actividad eléctrica espontánea (tónica o en forma de ráfagas) o pueden responder a estímulos externos. Los registros de corrientes iónicas en neuronas axotomizadas, empleando técnicas de fijación de voltaje, muestran que la corriente entrante en los somas de neuronas del OX es acarreada por Ca^{2+} (Cooke y col., 1989; Onetti y col., 1990) y no presentan corriente de Na^{+} sensible a tetrodoxina (TTX). Se describieron dos corrientes de K^{+} , una semejante a la del rectificador tardío, registrada inicialmente en el axón gigante de calamar (Hodkin y Huxley, 1952a), que se activa a potenciales de membrana de -40 mv con un curso temporal sigmoidal, y con una ligera relajación, esta corriente se bloquea con tetraetilamonio (TEA); la otra corriente tiene características parecidas a la corriente A que se registró por primera vez en neuronas de molusco (Hagiwara y col., 1961) y se bloquea con 5mM de 4-aminopiridina (García., 1991; Onetti y col., 1990).

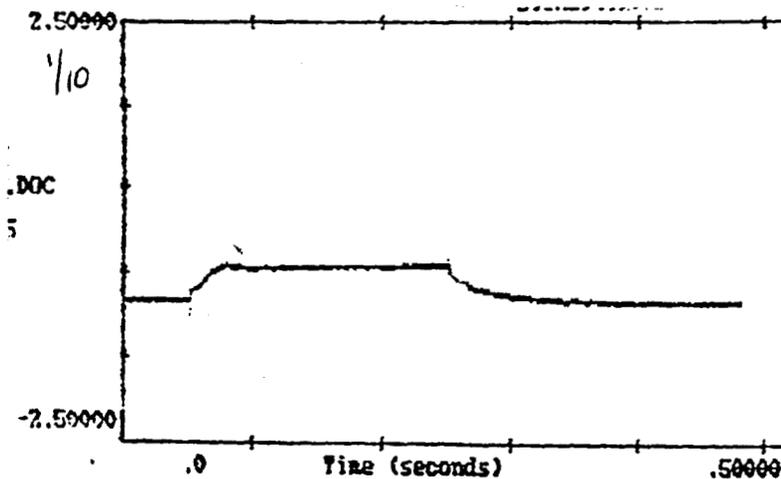
Figura 1.



gistro control.
 aplicó un pulso de fijación de corriente
 0.1 nA con una duración de 0.2seg. No
 observan potenciales de acción de Ca^{2+} .



ambio la solución extracelular de Van-
 eveland normal por una solución con DNP
 aplicó un pulso de fijación de corriente
 .1 nA con una duración de 0.2seg. Se
 rva que se genere un potencial de
 ón de Ca^{2+} y que la resistencia de la
 brana aumenta.



el DNP. Se aplicó un pulso de fijación
 it de 0.1 nA con una duración de 0.2seg.
 ño fué reversible.

MATERIAL Y MÉTODOS

I.- Material

a) Disección

Los registros se realizaron en crustáceos adultos de acocil *Procambarus clarkii* de ambos sexos. Para la disección se cortó, en un principio, el rostrum del acocil, se quitó el pedúnculo ocular que se colocó en una cámara de microdisección, manteniéndolo en solución salina para crustáceo (Sol.1). Se utilizaron alfileres de acero inoxidable para detener al tejido, uno se colocó sobre la retina y el otro, sobre el segmento del nervio óptico. Posteriormente, con material de microdisección y bajo un microscopio estereoscópico, se quitó el tejido conectivo que se encuentra rodeando al tallo, se hicieron cortes radiales de manera que sólo quedara la parte interna del tallo. De esta forma se pudieron observar bajo el microscopio, la médula terminal, el órgano-x, gran parte del tracto y la glándula sinusal. El órgano-x se reconoce por su coloración más blanca comparada con el resto del tejido y por su localización en la médula terminal, cerca del cuerpo hemielipsoidal (figura 2).

La mayor parte de los experimentos se realizaron en un grupo de células localizadas en la capa superficial del órgano-x en la orilla ventro medial de la médula terminal. También se hicieron experimentos realizando axotomías, es decir, haciendo un corte sobre el tracto OX-GS entre el cuerpo hemielipsoidal y el OX.

La preparación se perfundió durante 30 minutos con solución salina normal (Sol. 1) antes de iniciar los experimentos. Todos los experimentos se realizaron en perfusión continua, que se implementó al colocar una bomba situada al extremo opuesto de la cámara que, por medio de vacío, permitía realizar el intercambio de la solución. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.



Figura 2. Sistema neurosecretor órgano-x glándula sinusal. Esquema del tallo ocular del acocil, se distinguen las estructuras anatómicas que lo forman: r es la retina; lg, *Lamina ganglionaris*; me, *Medulla externa*; mi, *Medulla interna*; sg, glándula sinusal; Xo, órgano-x; mt, *Medulla terminal*. (Fuente: Tesis J.J.García, 1991).

b) Microelectrodos

Se utilizaron capilares de borosilicato de 1.2mm. de diámetro interno y 4mm. de diámetro externo para los electrodos empleados en la técnica de fijación de voltaje y de 1mm. de diámetro interno y 3mm. de diámetro externo para los de fijación de corriente (World Precision Instruments Inc.)

Los microelectrodos se forjaron en un estirador, modelo P-97 de Flaming-Brown (Sutter Instrument). El contacto eléctrico con la solución del microelectrodo se hizo utilizando un alambre de plata. Este alambre se cloruró junto con el electrodo de referencia, también de plata, en una solución de *cloralex*. Durante el proceso de clorurado, ambos electrodos se cortocircuitaron durante una hora antes de la realización del experimento, con el fin de no generar una diferencia de potencial entre sus extremos. Se observó que entre más tiempo se mantenían los electrodos clorurándose, se disminuía el posible *DC* proveniente de esta fuente.

Las resistencias de los microelectrodos para los registros de fijación de corriente, variaron entre 20 y 40 $M\Omega$. Las resistencias para los microelectrodos empleados en la técnica de fijación de voltaje, fué de 1 $M\Omega$ una vez pulidos.

c) Soluciones

Las soluciones que se emplearon se muestran en las tablas I y II. Las soluciones externas se aplicaron directamente a la solución del baño. La solución con dinitrofenol (Sol. 2) se preparó el mismo día del experimento, ajustando el pH al valor deseado. Todas las soluciones internas se filtraron a través de filtros de 0.2 μm (Millex, Millipore) y se introdujeron en los microelectrodos por medio de presión a través de una jeringa, en cuyo extremo se hallaba una cánula muy fina. En los registros de fijación de voltaje, el pH de las soluciones extracelulares se ajustó con *NaOH* y se midió antes de realizar los experimentos para aquellas soluciones que ya estaban preparadas con anterioridad al día del experimento. A las soluciones intracelulares se les ajustó el pH con *KOH* y se midió al final del experimento para verificar su constancia. La composición de Ca^{2+} de la solución intracelular se diseñó de manera que la concentración intracelular de Ca^{2+} fuera de, aproximadamente, 10^{-9}M . En los registros de fijación de corriente se utilizó una concentración 3M de *KCl*.

Los pH de las soluciones que se almacenaban, se midieron antes de realizar los experimentos, ya que se podían generar variaciones en estos pH, debido al pK del amortiguador que se estaba utilizando que, en este caso, fué de 7.0.

Tabla I
Tabla de Soluciones Externas

	Solución 1 (Normal) mM	Solución 2 (DNP) mM
NaCl	198	198
KCl	5.4	5.4
CaCl ₂	13.5	13.5
MgCl ₂	2.6	2.6
HEPES	10	10
DNP (Sigma)	-	0.2
pH	7.4	7.2

Tabla II
Tabla de soluciones Internas

	Solución 3 mM
KCl	217
CaCl ₂	0.25
MgCl ₂	2
EGTA	5
HEPES	10
pH	7.2 - 7.0 - 6.5 - 6.14

d) Estimulación y Adquisición

Las señales se adquirieron a través de la tarjeta de conversión D/A DIGIDATA 1200 (Axon Instruments) y se almacenaron, para su análisis posterior, en el disco duro de una computadora personal con procesador 80286 a 33mhz. Para la obtención de los registros de fijación de voltaje, se utilizó el amplificador AXOPATCH 200 A PATCH CLAMP (Axon, Instruments Inc). El amplificador con el cual se obtuvieron los registros de fijación de corriente, se fabricó en nuestro laboratorio junto con los circuitos de inyección de corriente y balance del puente (Ver Apéndice E). Las señales se procesaron y se analizaron con el paquete de cómputo Pclamp, versión 6, de Axon Instruments.

Para los registros de las corrientes iónicas se realizaron tres tipos de protocolos:

- Al inicio de la ruptura de la membrana, que se efectuó por succión, se aplicó un protocolo de 10 rampas de fijación de voltaje de 2 segundos de duración, con un intervalo de 1 segundo de duración entre cada una de ellas. Al romperse la membrana, el potencial de membrana era de 0mv; al aplicar la rampa, el potencial se polarizaba a -90mv hasta alcanzar un valor de 50mv en un tiempo de 2 segundos. Este protocolo se realizó con el fin de observar el comportamiento inicial y la evolución en el tiempo de las corrientes del estado estable, al modificar el pH intracelular y perfundirse el interior celular con la solución de la micropipeta.

- Posteriormente a la aplicación del protocolo de rampas, se aplicó un potencial de mantenimiento, cuyos valores fueron de -70mv, -40mv y -45mv.

- Se aplicó un pulso de 50ms de duración para realizar la resta de las corrientes capacitivas y la compensación de la resistencia en serie (la cual fué del 90% en la mayoría de los casos). Finalmente se aplicaron pulsos de fijación de voltaje con incrementos de 10mv en número variable, con una duración de 500ms y utilizando la secuencia P/3. Este protocolo consistió en aplicar tres pulsos hiperpolarizantes, que no evocan corrientes iónicas activadas por voltaje, con una amplitud igual a un tercio del pulso despolarizante o pulso de prueba. De esta manera, el resultado del protocolo de P/3, fué restar los componentes capacitivos lineales y de la corriente de fuga. Otra manera como se realizó la resta de estos componentes, fué aplicando un pulso negativo hiperpolarizante, el cual era escalado para restarlo a los puntos despolarizantes. Dado que las respuestas obtenidas bajo estos dos protocolos no presentan grandes diferencias, los resultados que se muestran, corresponden a aquellos obtenidos bajo un protocolo P/3. Las señales se filtraron a una frecuencia de corte de 5KHz. Este protocolo de pulsos permitió observar las corrientes correspondientes a la parte no lineal.

II.- Métodos.

a) Fijación de corriente

Este método consistió en conectar un microelectrodo a un amplificador (con una resistencia de entrada mucho mayor que la resistencia del microelectrodo y que la resistencia de entrada de la célula). Es el método tradicional que se emplea para medir los potenciales intracelulares, mandar pulsos de corriente constantes y registrar los potenciales generados por la célula.

Si se conecta en la entrada del amplificador una fuente de corriente, esta fluirá hacia el microelectrodo y por ende, hacia la célula. La fuente de corriente se puede utilizar tanto para mandar pulsos de corriente para estimular a la célula como para mandar una corriente de *DC* para despolarizar o hiperpolarizar a la célula.

En la figura 4 se muestra un esquema del circuito de fijación de corriente que se utilizó para obtener la adquisición de los registros. Por medio de la salida 0 out de la tarjeta DIGIDATA, se mandaron los pulsos de estimulación hacia la entrada del circuito que permite la inyección de corriente y posteriormente, hacia la entrada Current in del amplificador. La salida XIOUT del amplificador manda a la entrada E1, del circuito para balancear el puente, una señal que está compuesta tanto por la respuesta de la célula como por el voltaje que se genera a través del microelectrodo. Por otro lado, la salida Balance out del amplificador manda a la entrada E2, del circuito para el balance del puente, una señal correspondiente al voltaje que se genera en el microelectrodo. En la salida S1 de este mismo circuito se obtiene la señal proporcionada únicamente por la célula. Esta señal se manda tanto al canal 2, c2 del osciloscopio, como a la entrada 0 in de la tarjeta de adquisición y, posteriormente, hacia la computadora.

La medición de las resistencias de las pipetas para los registros intracelulares se realizó de la siguiente manera:

- se sumergió la pipeta en la solución del baño, lo cual se corroboraba al aparecer sobre la pantalla del osciloscopio la línea de base. Con el interruptor BAL OUT del amplificador se generaban pulsos de corriente rectangulares observándose los cambios en el voltaje, cuyos trazos eran similares a los de la corriente de estimulación, pero sin los componentes de alta frecuencia debido a las capacitancias parásitas. Estos se ajustaron de tal manera que se obtuviese un pulso rectangular y de esta manera, compensar el efecto de las capacitancias parásitas que, junto con la resistencia de la pipeta actúa como un

filtro pasabajas. La resistencia de la pipeta se podía obtener mediante la relación $10\text{mV}/\text{M}\Omega$. Una vez obtenido el valor de la resistencia de la pipeta, se colocaba el interruptor BAL OUT en su posición inicial y se hacía el ajuste de DC.

Finalmente, se aplicó un pulso de estimulación de 50 ms de duración para hacer el balance del puente. Todos los procesos se pudieron observar tanto en la pantalla del osciloscopio como en el monitor de la computadora. Una vez realizados estos procedimientos, se pudo comenzar a realizar los registros intracelulares.

Al final del experimento, después de sacar la pipeta de la célula, pero no del baño, se medía el potencial de punta del microelectrodo. Sólo se conservaron aquellos experimentos en donde el potencial de punta fué menor a los 5mv.

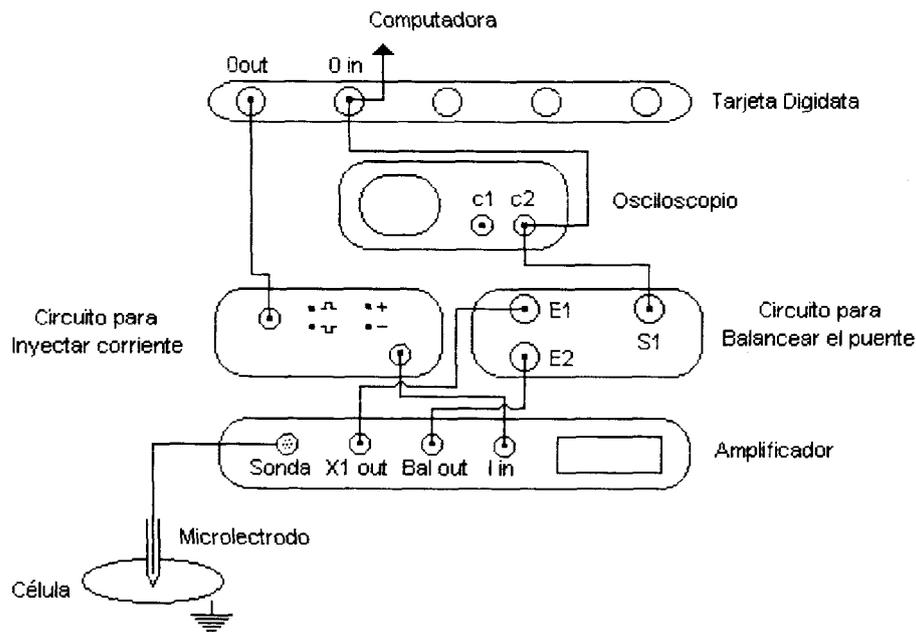


Figura 4. Esquema para adquirir registros con la técnica de fijación de corriente.

II.- Fijación de voltaje.

La técnica de fijación de voltaje consiste en registrar los flujos iónicos a través de la membrana celular como corrientes eléctricas, mientras que el potencial de membrana se mantiene constante. Los primeros en desarrollar este método fueron Cole en 1949, y Hodgkin, Huxley y Katz en 1952 en trabajos realizados sobre axón gigante de calamar. Este método permite por un lado, separar las corrientes capacitivas y las corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana y por otro lado, permite tener una mayor información sobre el comportamiento de un canal iónico cuando se mantiene el potencial de membrana constante. En la práctica se fuerza al potencial de membrana a seguir el potencial del pulso de estimulación (comando), por medio de un amplificador de retroalimentación negativa que pasa la corriente necesaria a través de la membrana, para que el potencial de membrana sea igual en magnitud al del pulso comando.

Cuando se aplica un pulso rectangular de fijación de voltaje, se produce una corriente de membrana que está constituida por una corriente que carga la capacitancia de la membrana y por una corriente iónica. La corriente capacitiva sólo aparece al inicio y final del pulso del voltaje, por lo que la corriente que se observa en el resto de la duración del pulso, es únicamente iónica.

La técnica de fijación de voltaje se puede representar con el siguiente circuito:

Circuito eléctrico de Fijación de voltaje con dos electrodos

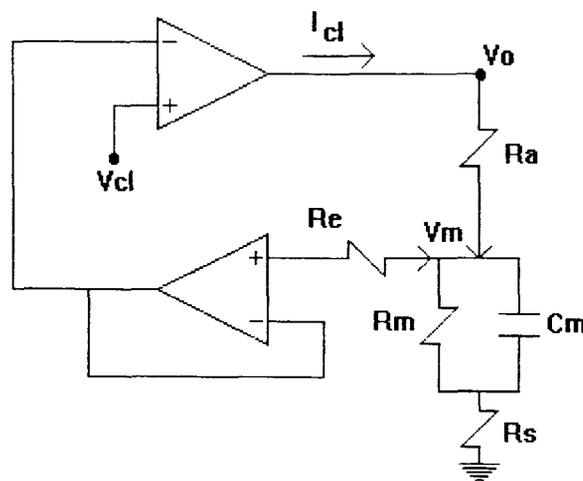


Figura 5. Circuito eléctrico de fijación de voltaje utilizando dos microelectrodos.

El primer electrodo R_e se conecta directamente a un seguidor, el pre-amplificador, el cual a su vez, está conectado a la entrada inversora de un amplificador ideal. La salida de este amplificador se conecta a la célula por medio de un segundo electrodo R_a . En la entrada positiva del amplificador se aplica el voltaje V_{cl} , de fijación.

La salida del amplificador de fijación está dada por:

$$V_o = A(V_{cl} - V_m) \quad (1)$$

$$V_m = V_o - I_{cl} \cdot R_a \quad (2)$$

$$V_m = A(V_{cl} - V_m) - I_{cl} \cdot R_a \quad (3)$$

$$V_m = AV_{cl} - AV_m - I_{cl} \cdot R_a \quad (4)$$

$$V_m + AV_m = AV_{cl} - I_{cl} \cdot R_a \quad (5)$$

$$V_m = \left(\frac{A}{1+A} \right) V_{cl} - \frac{I_{cl} \cdot R_a}{1+A} \quad (6)$$

Si se considera que la ganancia A del amplificador de fijación es muy grande, entonces:

$$V_m \approx V_{cl} \quad (7)$$

de esta manera, al aumentar la ganancia del amplificador de fijación, el potencial de membrana se acerca más al potencial de comando y disminuye el efecto de la resistencia R_a .

Sin embargo, en la práctica existe una resistencia en serie con la membrana y los electrodos de registro. Esta resistencia está representada por medio de R_s . Cuando la corriente fluye a través de la membrana se genera una diferencia de potencial entre el potencial que se mide, y el potencial del pulso comando (V_{cl}) debido al efecto producido por R_s . El error está dado por $I_{cl} \cdot R_s$ de tal manera que este error puede ser bastante considerable cuando la corriente que fluye es grande. Con el fin de reducir los efectos causados por R_s se suma al voltaje de fijación, un voltaje proporcional a la corriente de membrana.

$$V_m = \left(\frac{A}{1+A} \right) V_{cl} - \frac{I_{cl} \cdot R_a}{1+A} - I_{cl} \cdot R_s \quad (8)$$

cuando la ganancia A es muy grande,

$$V_m = V_{cl} - I_{cl} \cdot R_s \quad (9)$$

Hamill y col., (1981), diseñaron una nueva técnica para el registro de canales iónicos que presenta varias ventajas con respecto a las técnicas ya establecidas, sobre todo si se está trabajando con células pequeñas. Este método conocido como registro de "célula completa", consiste en romper una área pequeña de membrana por medio de un pequeño pulso de succión después de que se formó un sello entre el electrodo y la membrana. El método se puede utilizar para modificar la solución interna de la célula.

Para llevar a cabo registros de célula completa, los microelectrodos se deben de llenar con una solución con bajo $[Ca^{2+}]$. Se coloca el microelectrodo sobre la superficie de la membrana y se ejerce presión negativa, de tal manera que se forme un sello muy grande (gigaseal) entre el microelectrodo y el área de contacto con la membrana. Se aplican después, pulsos de voltaje repetitivos con una amplitud de algunos milivolts de tal manera que el potencial de membrana se hace negativo. En primera instancia, se debe de hacer un ajuste de las capacitancias para eliminar los transientes que se generan por las capacitancias de las paredes del microelectrodo. Posteriormente, se aplica succión en el interior del microelectrodo hasta que se observa un incremento en el tamaño de los transientes capacitivos que indica que el pedazo de membrana que se encuentra entre la punta del microelectrodo se ha roto.

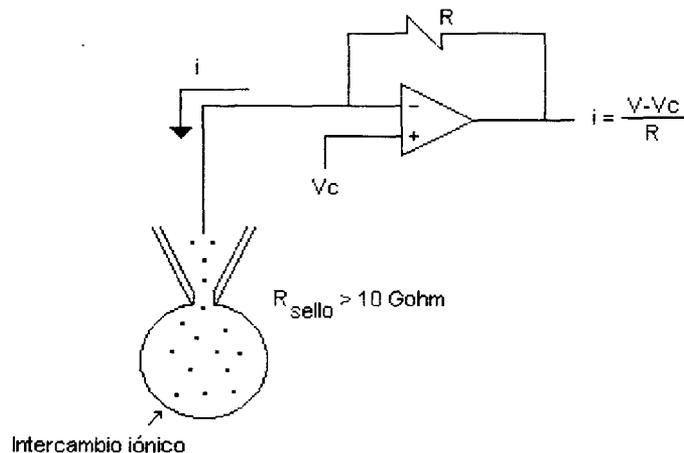


Figura 5. Circuito de fijación de voltaje en la configuración de célula completa utilizando un microelectrodo.

Los microelectrodos que se utilizan para los registros de célula completa deben tener una resistencia entre $1-2 M\Omega$. Los microelectrodos se deben pulir antes de ser utilizados con el fin de que sus puntas sean más suaves y no

rompan la membrana celular, para eliminar partículas contaminantes que se encuentran en la punta del microelectrodo y también, para formar mejores sellos con la membrana. El procedimiento para pulir se lleva a cabo por medio de calor.

Como fuente de calor se utiliza un alambre de platino-iridio que se encuentra conectado, por medio de cables, a una fuente que proporciona una corriente de 1.5A. Tanto el alambre platino-iridio como el microelectrodo, se colocan sobre micromanipuladores independientes. El microelectrodo se acerca al alambre de iridio a una distancia igual al ancho del alambre. Se aplica calor hasta que se observa, bajo microscopio, que la punta ha sido pulida.

Los sistemas de registro para célula completa deben tener sistemas que permitan eliminar los transientes capacitivos. Se debe tener una primera constante de tiempo, pequeña, con el fin de eliminar las capacitancias generadas por el microelectrodo y una segunda constante de tiempo en el rango de $10\ \mu\text{s}$ a 1ms para eliminar las capacitancias generadas por la membrana celular. Estos ajustes deben realizarse ya que, de lo contrario, el amplificador de entrada se puede saturar y distorsionar el curso temporal de los registros de las corrientes.

Para medir la resistencia del microelectrodo, se sumerge el microelectrodo en la solución extracelular que se traduce por la aparición de un pulso rectangular en la pantalla del osciloscopio. La resistencia de la membrana se determina por la relación $5\text{nA}/\text{M}\Omega$.

Cuando se acerca la pipeta a la célula se le debe aplicar una presión positiva para que no se tape la pipeta al aproximarse a la célula. Una vez colocada la punta de la pipeta sobre la superficie de la célula, se aplica la succión por la cual, la resistencia aumenta, lo que se traduce en una disminución del pulso de corriente. Con la segunda succión, aparecen los transitorios capacitivos generados por la célula al inicio y al final del pulso. Cuando esto sucede, es que ya se ha realizado la ruptura de la membrana con el consiguiente acceso eléctrico y difusión de la solución de la micropipeta al interior celular. En ese momento se aplican las rampas para observar el comportamiento de las corrientes del estado estable.

RESULTADOS

Al aplicar un estímulo umbral a una célula excitable se genera una respuesta activa conocida como potencial de acción (ver Apendice A). Los potenciales de acción tienen como función la de transmitir la información a lo largo de grandes distancias en el nervio y también permiten controlar la activación de los canales iónicos. Estos potenciales se desarrollan en el cono axónico y se trasladan, a lo largo del axón, mediante las propiedades no lineales y de cable de la célula hasta la terminal pre-sináptica. Son el resultado de la activación de las corrientes de Na^+ y de K^+ (Hodking y Huxley, 1952b).

La figura 8 muestra un potencial de acción que fue tomado mediante la técnica de fijación de corriente. La solución extracelular fue la No. 1 de la Tabla I y se utilizó una solución de KCl 3M como solución para el microelectrodo. El potencial de membrana para el OX intacto, fue de 59.7 ± 9.9787 (promedio \pm stv) que se midió una vez que se introdujo el microelectrodo a la célula. Se aplicaron 15 pulsos de estimulación de corriente con una duración de 600ms y con incrementos de 0.1nA. El primer pulso que se aplicó fue de -0.5nA. Los pulsos hyperpolarizantes muestran el comportamiento de la resistencia de la membrana celular que, al hyperpolarizarse, mantuvo un comportamiento lineal regresando a la línea basal al final del pulso (n=10). La resistencia de la membrana fue de $31M\Omega$. En este caso, al aplicar una corriente de 0.3nA, se alcanzó el umbral y se dispararon los potenciales de acción en ráfagas. Estos potenciales tuvieron una duración de 7ms y una amplitud de 29,4nA. Con los siguientes pulsos de despolarización, la frecuencia de disparo de los potenciales de acción aumentó. En este caso sus amplitudes disminuyeron y la duración del potencial de acción aumentó a lo largo del pulso de estimulación.

Como se mencionó, los potenciales de acción que se generan en el axón son el resultado de la activación de las corrientes de Na^+ y de K^+ . Cuando se realizó la axotomía al conjunto de neuronas del OX y se estimuló con inyección de corriente, se obtuvieron los trazos mostrados en la figura 9, que son el resultado de la activación de los canales de Ca^{2+} . Estos canales son de alto umbral, ya que se activan con despolarizaciones cercanas a los -10mv.

La resistencia de la membrana se midió con los pulsos hyperpolarizantes. En este caso la resistencia fue de $1302M\Omega$ y para los primeros pulsos hiperpolarizantes no hubo un regreso a la línea basal (n=3). Los potenciales de acción se disparaban al inicio del pulso, al aplicar un estímulo de 0.03nA y tenían una amplitud de 25,4mv y una duración de 36ms. Tenían una frecuencia de disparo menor que la de los potenciales de acción que se generaron en células no axotomizadas y, tendían a desaparecer a lo largo del pulso de estimulación. Con las siguientes despolarizaciones aumento la frecuencia de disparo y la amplitud de los potenciales de acción (datos no mostrados).

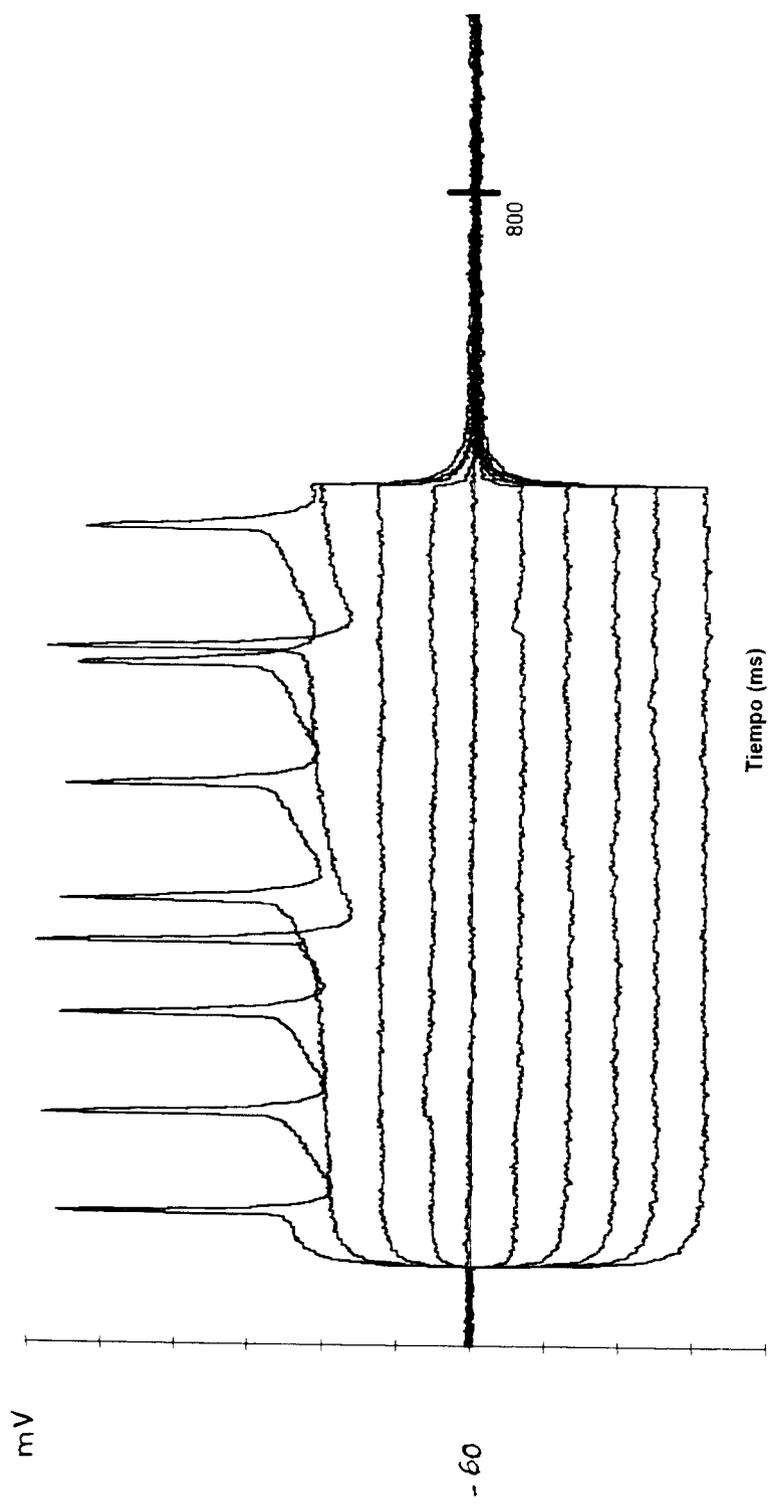


Figura 8. Potenciales de acción generados al aplicar 10 pulsos de estimulación de corriente con un incremento de 0.1 nA entre cada uno de ellos y con una duración de 600 ms, sobre neuronas del organo X de acocil. El primer pulso de estimulación que se aplico fué de -0.5nA. El potencial de membrana fué de -60mv. Se utilizó la solución extracelular no.1 (tabla I) y la solución con KCl 3M en el microelectrodo.

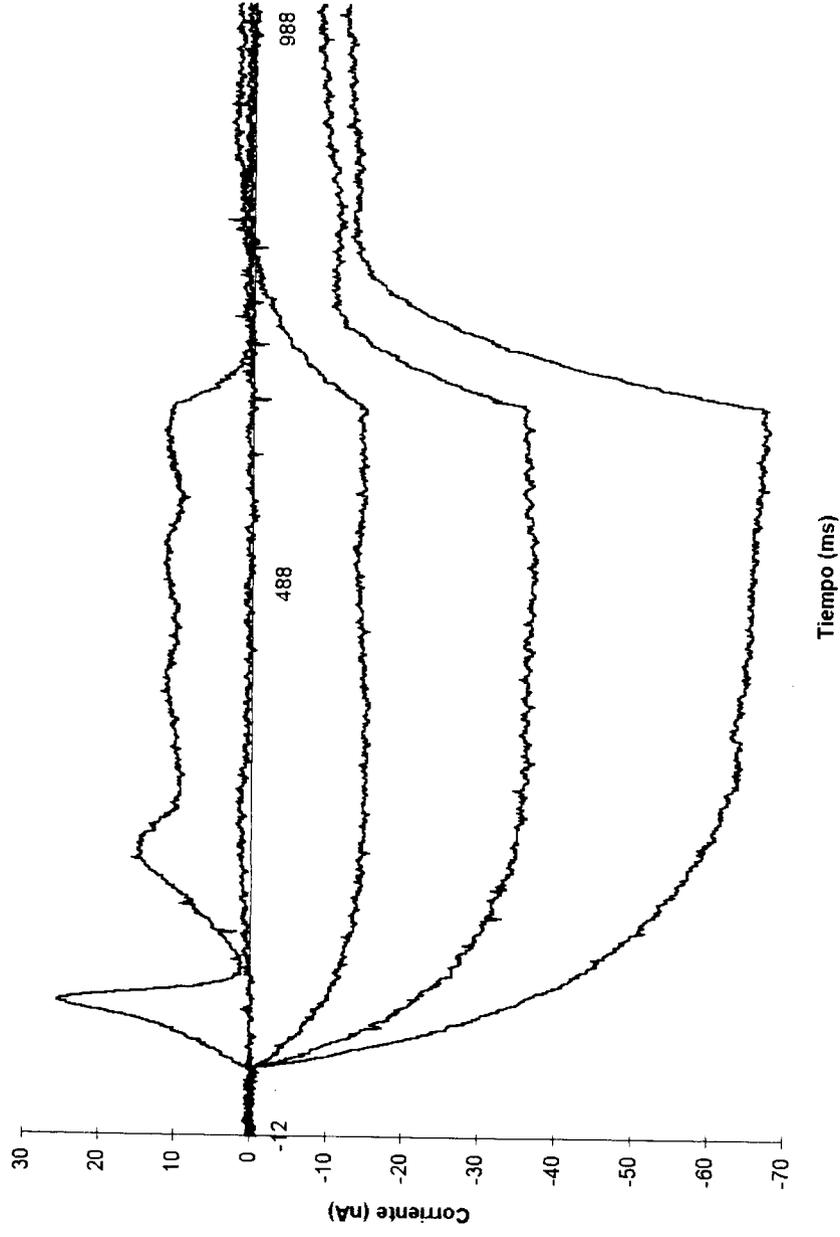


Figura 9. Potenciales de acción de Ca^{2+} en neuronas axotomizadas de acocil al aplicar pulsos de corriente con duración de 600ms y con incrementos de 0.02nA entre cada pulso. El primer pulso fué de -0.05nA. El potencial de membrana de la célula fué de -40mv, se inyectó corriente negativa. Se utilizó la solución extracelular no. 1 y una solución de KCl 3M en el microelectrodo.

Como se mencionó, en la membrana plasmática de las células excitables se encuentran presentes varios tipos de canales iónicos. Al hacer el registro de las corrientes iónicas sobre una área grande de la membrana celular, la corriente resultante da como resultado la suma del flujo iónico a través de varios canales. Para su análisis, estas corrientes se pueden separar por diferentes técnicas, ya sea por el tiempo en el que se miden, por sustitución iónica, utilizando fármacos que bloquean de manera específica ciertos canales o por voltaje (Hille; 1992). Estudios preliminares mostraron que en neuronas axotomizadas, empleando la técnica de fijación de voltaje, la corriente entrante en los somas en neuronas del órgano-x es acarreada por Ca^{2+} (Onetti y col; 1990) y no presentan corrientes de Na^+ sensibles a tetrodoxina (TTX). Existen dos tipos de corrientes de K^+ una muy parecida a la del rectificador tardío que aparece en el axón gigante de calamar (Hodgkin y Huxley, 1952a) que se observa a potenciales de mantenimiento de -40 mv y otra corriente que tiene características similares a la corriente A que se registró inicialmente en neuronas de molusco (Hagiwara y col; 1961) y que se observa a potenciales de mantenimiento de -70mv.

Las corrientes iónicas transmembranales se registraron utilizando la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa (Hamill, Sakmann, y Sigworth; 1981). A continuación se muestran las corrientes de prueba con un potencial de mantenimiento de -70mv y -40mv que se utilizaron como controles con el fin de observar la corriente de K^+ del rectificador tardío, I_K y la corriente A, I_A . Se empleó una solución intracelular a pH de 7.2 y la solución extracelular a un pH de 7.4 (Sol.1 y 3).

Los canales de I_A se activaron cuando se despolarizó a la célula después de un potencial de hiperpolarización. La corriente que se generó a un potencial de mantenimiento de -70mv se obtuvo al aplicar pulsos despolarizantes de -60mv a 40mv con incrementos de 10mv (n=3). Se obtuvo una corriente compuesta tanto de la corriente A, I_A , como de la corriente del rectificador tardío, I_K .

En la figura 10 se observa una pequeña corriente entrante rápida de Ca^{2+} seguida de una corriente saliente I_A . La corriente saliente es lenta y tiene un comportamiento en forma de sigmoide en los primeros pulsos de despolarización. Al irse despolarizando la membrana, esta corriente, presenta al inicio, un componente transitorio rápido que se incrementa con las despolarizaciones y que se inactiva posteriormente, de manera parcial.

La corriente entrante se incrementó con las despolarizaciones, sobre todo a partir de que se generó el componente transitorio rápido de la corriente saliente.

En la curva de corriente-voltaje se muestra la dependencia de la corriente con respecto al voltaje. Los datos de la curva se obtuvieron con respecto a la corriente al pico durante los 10 primeros milisegundos, ya que la corriente I_A se

Figura 10

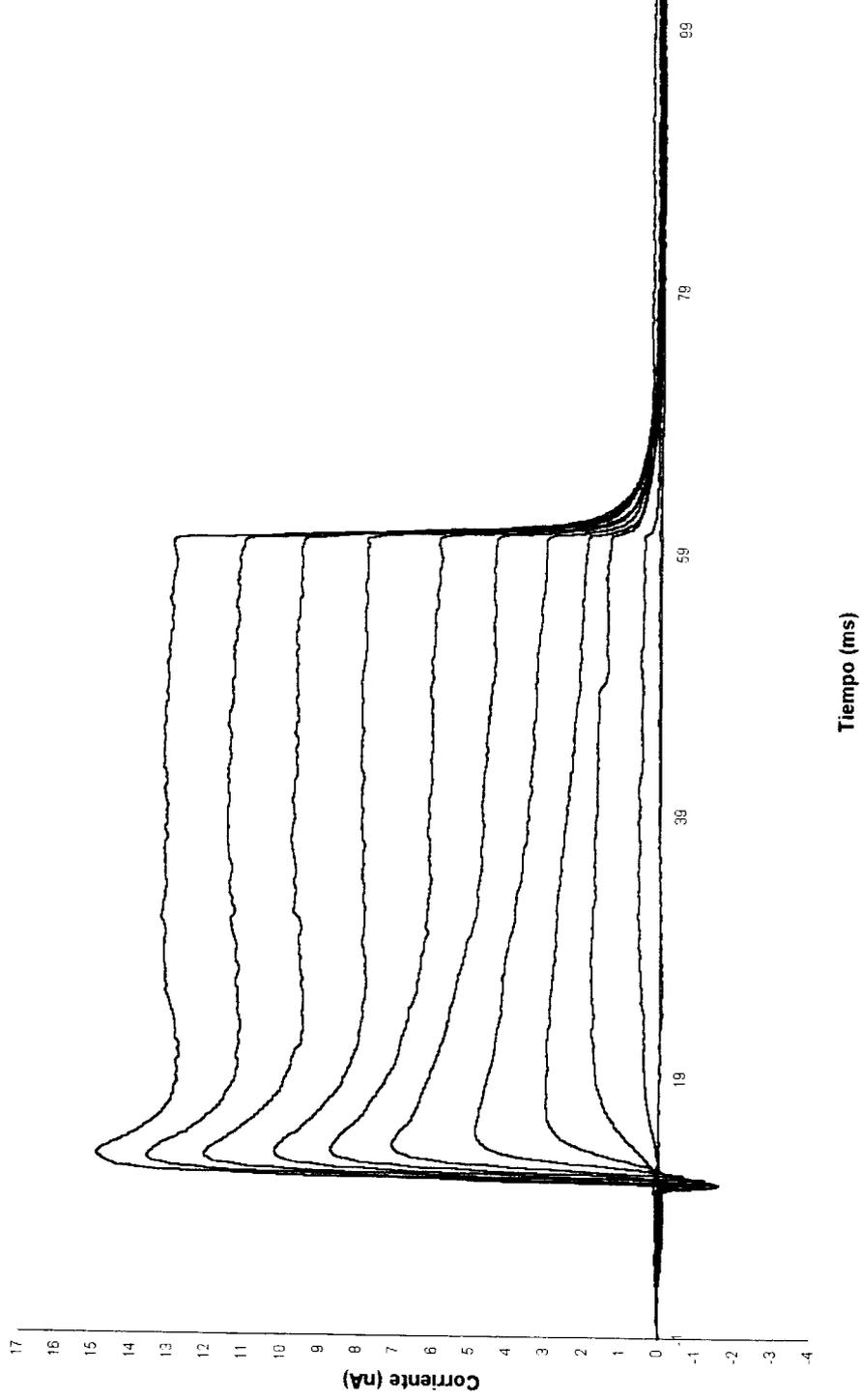


Figura 10. Corrientes generadas al llevar a la célula a un potencial de mantenimiento de -70mV aplicando 11 pulsos de fijación de voltaje inicialmente de -60mV a 40mV con incrementos de 10mV . pH extracelular 7.4, pH intracelular 7.2. La solución extracelular que se utilizó fue la no. 1 y la solución intracelular fue la no. 3 (Tabla I y II). Las corrientes negativas corresponden a las corrientes entrantes y las corrientes positivas a las corrientes salientes.

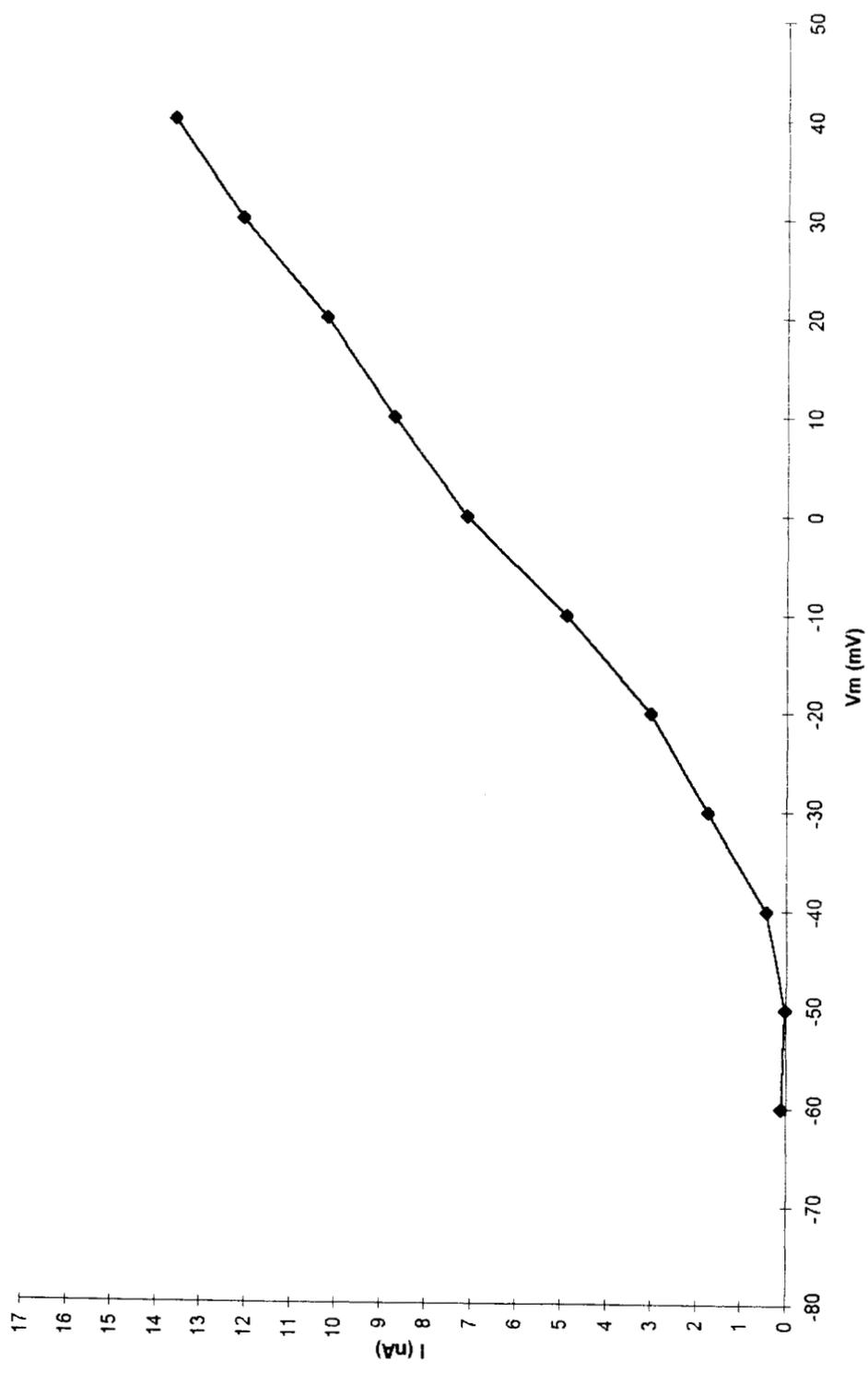
manifiesta en ese intervalo de tiempo en todos los trazos con una contaminación insignificante de I_K . En la gráfica 1 se muestra que la corriente se empieza a observar a partir de un potencial de membrana de -40mv y los incrementos son mayores en el rango de los -20 a 0 mv de V_m . A partir de los 10 mv, el incremento en la corriente se vuelve constante.

Cuando se aplicó a la célula un potencial de mantenimiento de -40mv y se mandaron pulsos de estimulación desde -30mv hasta 90mv con incrementos de 10mv ($n=3$), se obtuvieron las corrientes que se muestran en la figura 11. En esta figura se observan corrientes entrantes seguidas de corrientes salientes I_K , que tienen un comportamiento en forma de sigmoide. Las corrientes entrantes tienen una duración mayor en los primeros pulsos de despolarización pero su duración disminuye conforme se despolariza. La amplitud de esta corriente se incrementa hasta que las despolarizaciones alcanzan los 30mv, posteriormente el incremento en la amplitud disminuye. Las corrientes salientes se comportan como una sigmoide, no hay inactivación pero, no regresan completamente sobre la línea basal al terminar el pulso de fijación de voltaje. La curva I-V (gráfica 2), muestra que las corrientes se empiezan a manifestar discretamente, a partir de los -20mv de V_m , hay un mayor incremento entre 0 y 30mv de V_m y, cuando se alcanzan los 40mv de V_m , el incremento en la corriente se mantiene aproximadamente constante.

El componente correspondiente a I_A de la corriente saliente total se pudo separar al manipular el potencial de mantenimiento. Cuando se llevo a la célula a un potencial de mantenimiento de -40mv (figura 11), se observo la corriente saliente del rectificador tardío, I_K y, al llevar a la célula a un potencial de mantenimiento de -70mv (figura10), se obtuvo una corriente compuesta tanto por I_K como por I_A . Para observar el comportamiento de la corriente I_A , se restaron para un mismo potencial de membrana, la corriente obtenida para un potencial de mantenimiento de -70mv y, la corriente obtenida para un potencial de mantenimiento de -40mv, lo cual se ejemplifica en la figura 12a. En esta figura se observa que la corriente I_A es una corriente saliente que tiene un componente rápido al inicio y que, posteriormente, se inactiva de manera parcial; no se observan corrientes entrantes. La figura 12b, muestra la evolución de la corriente I_A , al aplicar varios pulsos de fijación de voltaje. Se observa que en los primeros pulsos de despolarización no aparece el componente transitorio rápido. Este se hace evidente conforme la membrana se va despolarizando.

De la misma manera, la inactivación parcial se hizo manifiesta cuando las despolarizaciones fueron mayores. Las corrientes de cola rebasaron la línea basal a mayores despolarizaciones.

Las corrientes del estado estable se caracterizan por ser corrientes que no dependen del voltaje. Se obtuvieron al aplicar una serie de pulsos en forma de rampa inmediatamente después de que se elimino el área de membrana que se



Gráfica 1. Curva I-V tomada a la corriente pico de la figura 10 (intervalo de 10 ms iniciales).

Figura 11

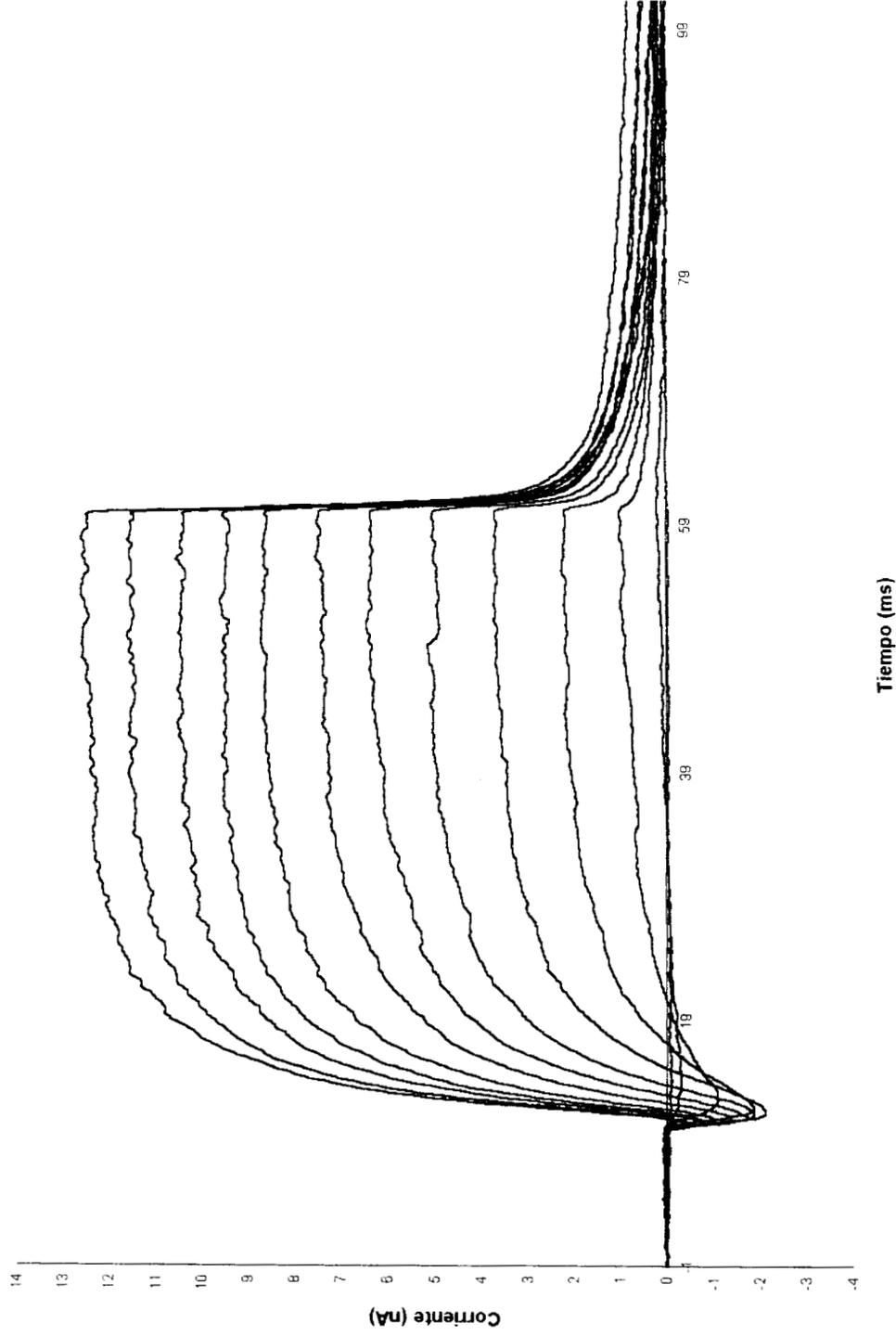
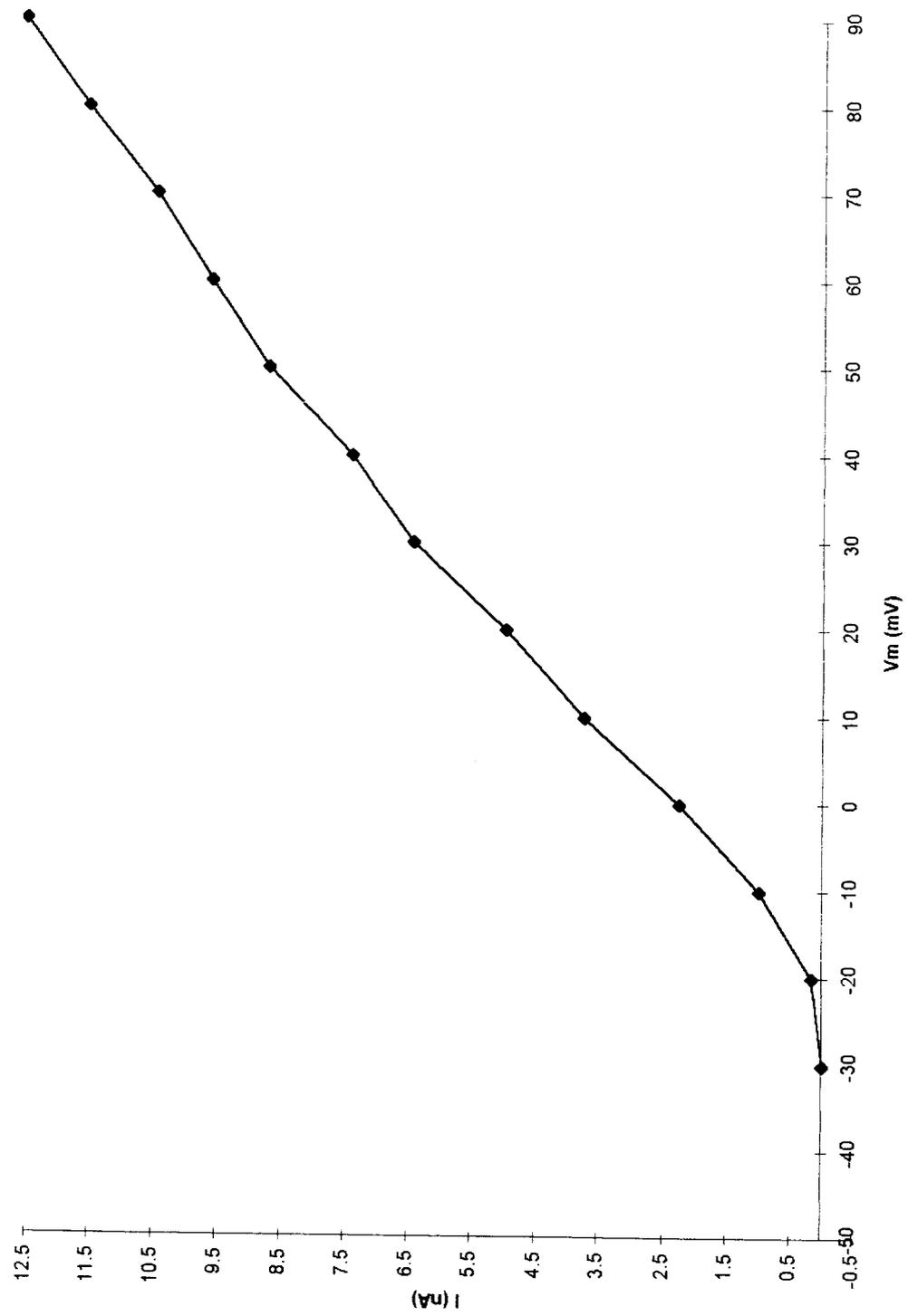


Figura 11. Corrientes generadas al llevar a la célula a un potencial de mantenimiento de -40 mv. Se aplicaron 13 pulsos de fijación de voltaje entre -30 mv y 90 mV con incrementos de 10 mv. pH extracelular 7.4, pH intracelular 7.2. La solución extracelular que se utilizó fue la no.1 y la solución intracelular fue la no.3 (Tabla I y II).



Gráfica 2. Curva I-V tomada a la corriente pico de la figura 11.

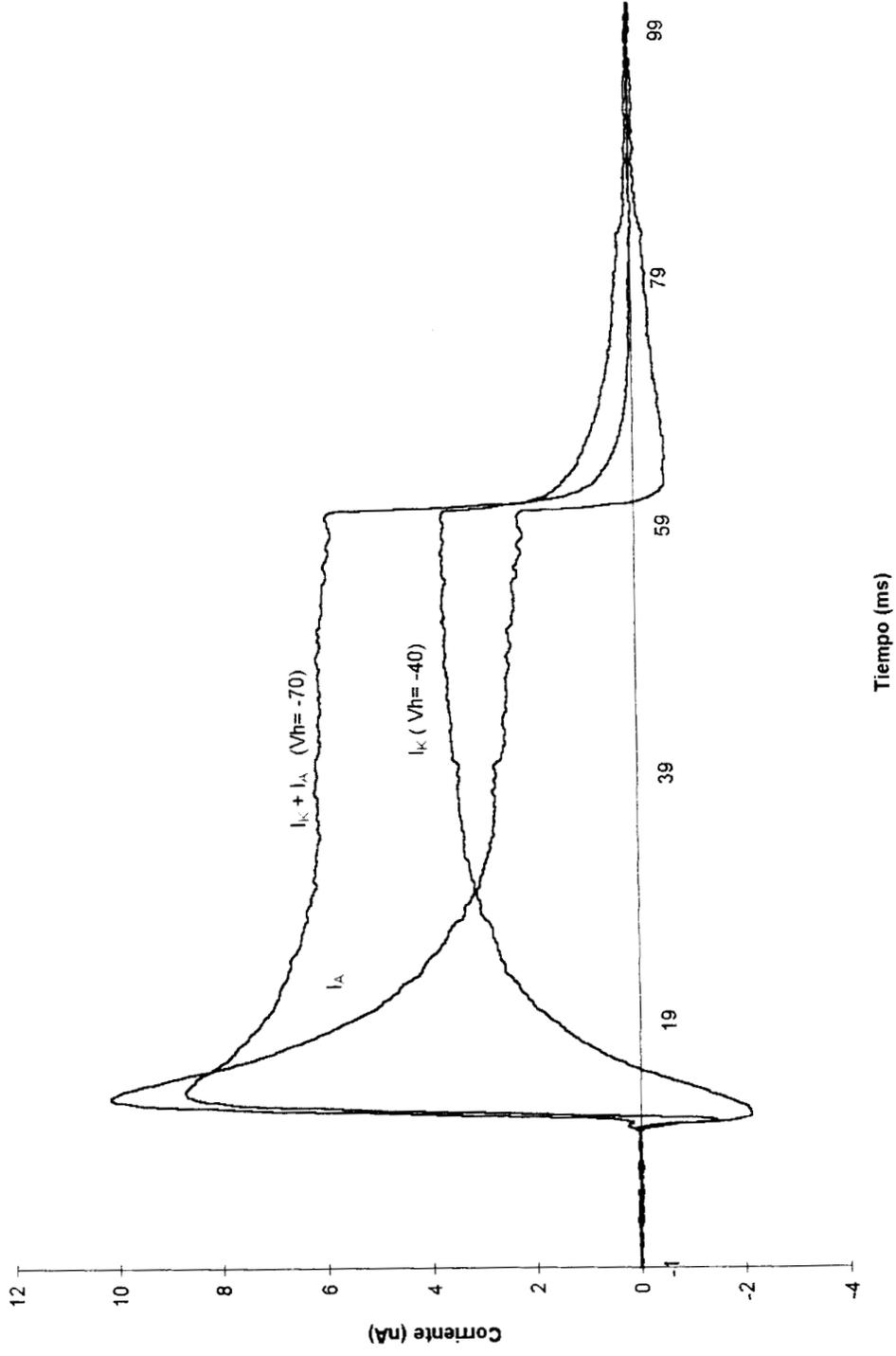


Figura 12a. Separación de I_A al manipular el potencial de mantenimiento. I_A es el resultado de la resta de la corriente llevada a un potencial de mantenimiento de -70 mv con una corriente llevada a un potencial de mantenimiento de -40 mv. pH extracelular 7.4, pH intracelular 7.2. La solución extracelular que se utilizó fue la no.1 y la solución intracelular fue la no.4 (Tabla I y II).

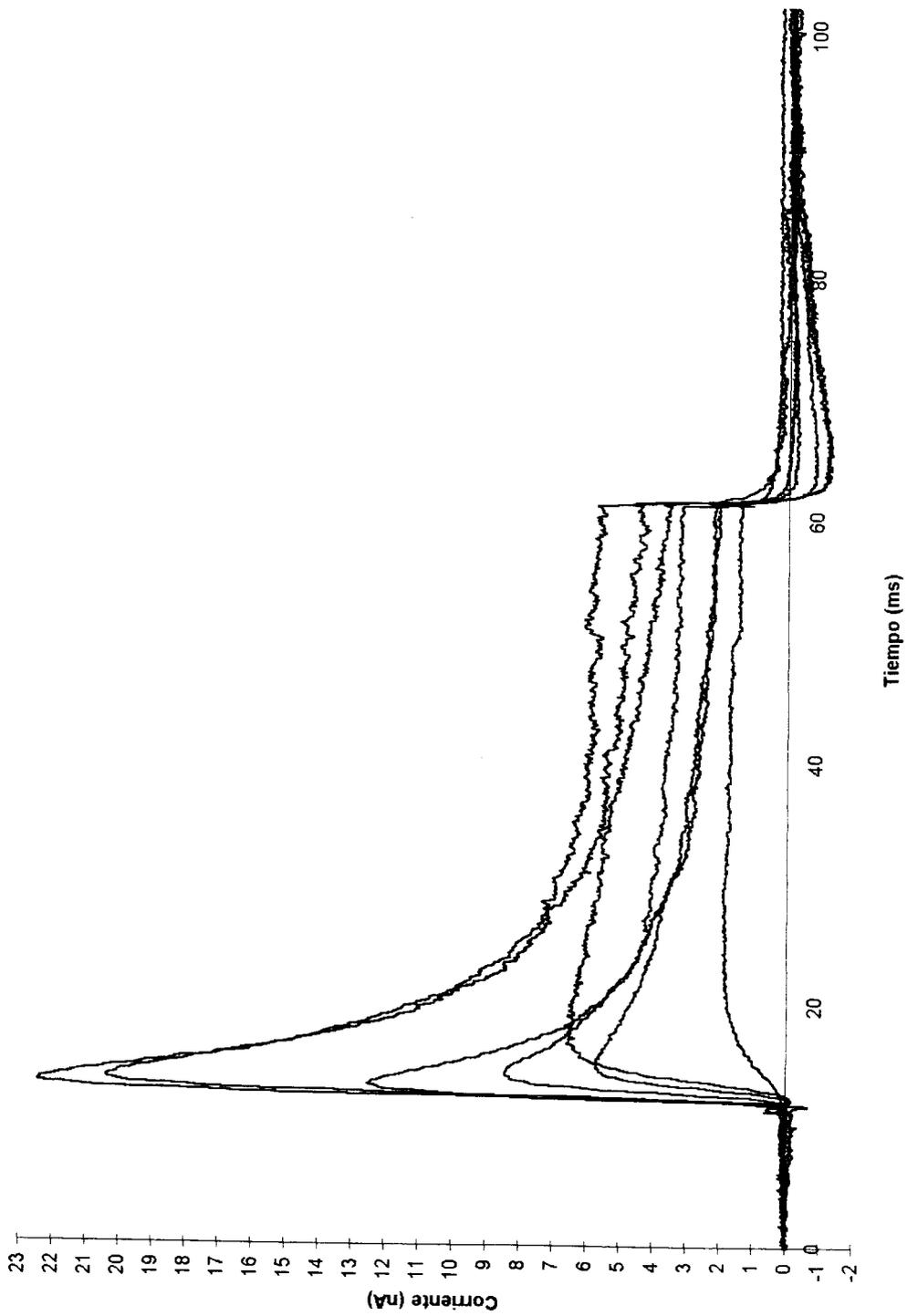


Figura 12b. Corrientes IA al aplicar varios pulsos de fijación de voltaje. pH extracelular 7.4, pH intracelular 7.2. La solución extracelular que se utilizó fue la no. 1 y la solución intracelular fue la no.4 (Tabla I y II).

encuentra entre el microelectrodo y la membrana celular. El protocolo de rampas permite inactivar las corrientes dependientes del voltaje de tal manera que solo se observa el comportamiento correspondiente a las corrientes del estado estable.

En la gráfica 3 se muestra la relación corriente de voltaje de las corrientes del estado estable para un pH de 7.2. (n=3) Se observa que no existe una variación significativa en el tiempo para la parte lineal que va desde -87mv. a -37mv. En la parte no lineal aparecen variaciones, con respecto al tiempo, que se manifiestan por una variación pequeña en su magnitud y un pequeño corrimiento de la curva hacia la izquierda.

Efectos de la disminución del pH intracelular sobre la corriente I_{A+} de I_K y del estado estable.

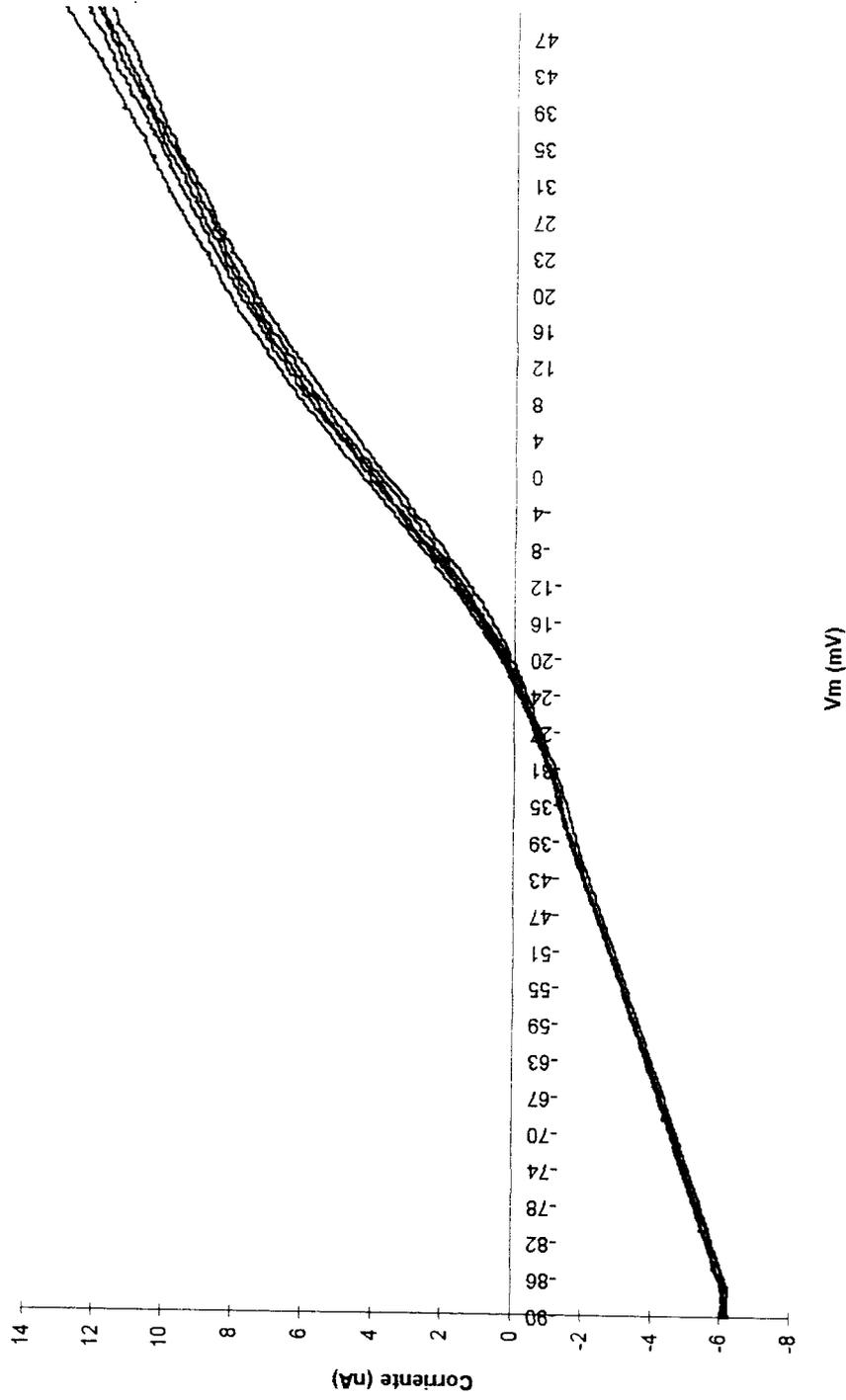
I.- Resultados obtenidos a pH 7.0.

a.- Sobre las corrientes del estado estable.

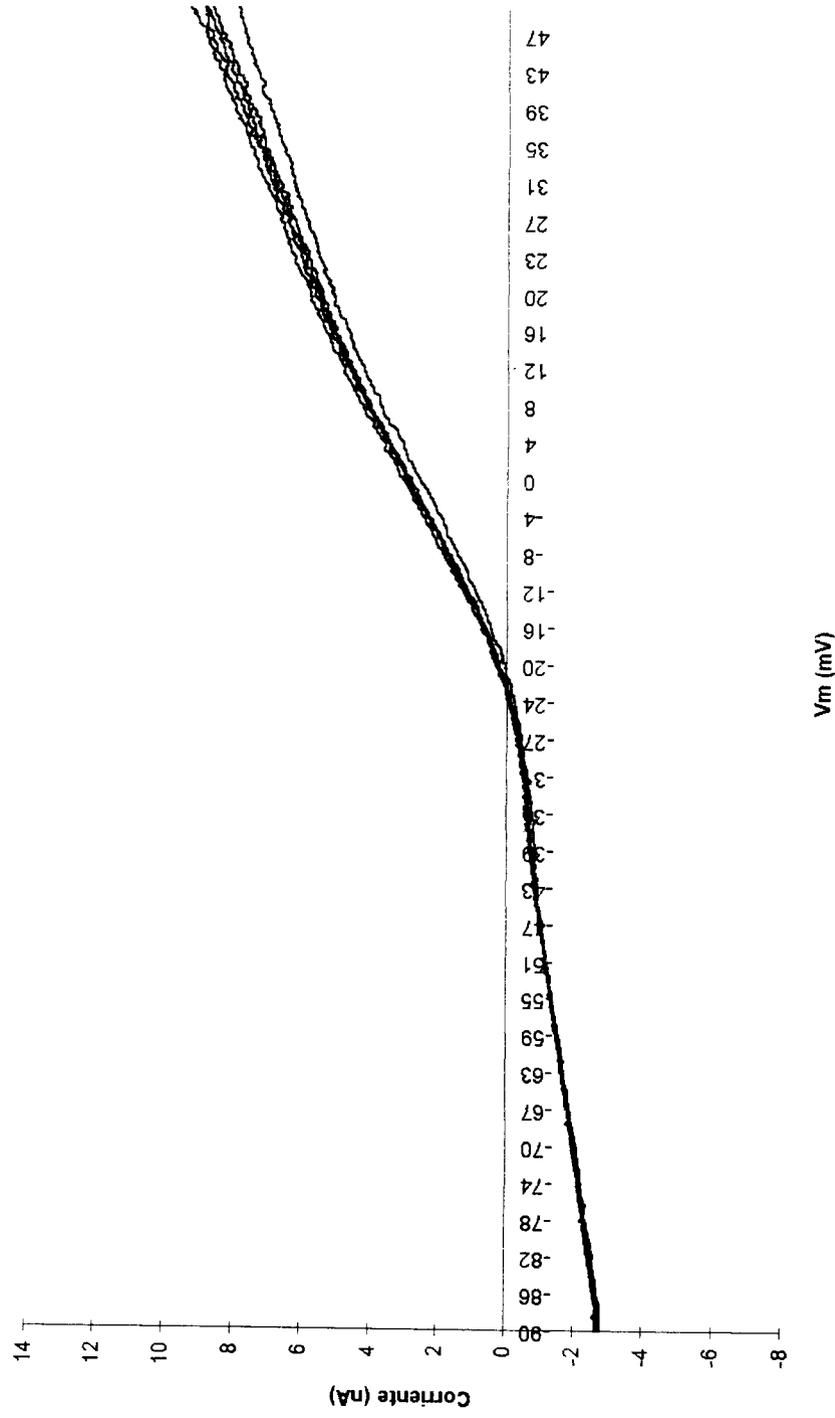
Estos resultados se obtuvieron al aplicar 10 rampas de fijación de voltaje. El pH de la solución intracelular (Sol. 3) fué de 7.0 y el de la solución extracelular (Sol. 1) de 7.4; la gráfica 4 muestra la relación corriente-voltaje para las corrientes del estado estable (n=2). Se observa que, para la parte lineal no se generaron variaciones en el tiempo. En la region no lineal, las corrientes salientes presentaron variaciones en el tiempo, desplazandose con un corrimiento hacia la izquierda en el voltaje. La magnitud de este desplazamiento fué significativa entre la primera y la segunda rampa. La magnitud de los desplazamientos posteriores fué menor y se mantuvo aproximadamente constante.

b.- Sobre la corriente I_{A+} .

Cuando se llevó a la célula a un potencial de mantenimiento de -70mv (n=2). (figura 13) y, al aplicar pulsos de voltaje desde -60mv a 0mv en incrementos de 10mv, se observó que al inicio del pulso, aparecían corrientes entrantes rápidas, cuya amplitud se incrementaba al despolarizarse la membrana. Estas corrientes iban seguidas por una corriente saliente. En los primeros pulsos de despolarización, la corriente saliente tenía una forma sigmoide, sin embargo, conforme la membrana se iba despolarizando, aparecía al inicio de las corrientes salientes, un componente transitorio rápido, seguido de una inactivación parcial lenta. Las corrientes de cola regresaban a la línea basal al terminar el pulso de fijación de voltaje y deactivaban rápidamente.



Gráfica 3. Curvas I-V de las corrientes del estado estable, generadas al aplicar un protocolo de 10 rampas de -90 mv a 50 mv durante 2seg con intervalos de tiempo de 1seg (solo se muestran 5 rampas). La parte correspondiente al comportamiento lineal se muestra a potenciales negativos, en tanto que la parte correspondiente a la parte no lineal, se observa a potenciales positivos. En este caso la parte lineal va de -87 mv a -22mv. La solución extracelular que se utilizó fue la no.1 y la solución intracelular fue la no.3 (Tabla I y II).



Gráfica 4. Curvas I-V de las corrientes del estado estable, generadas al aplicar un protocolo de 10 rampas de -90 mv a 50 mv durante 2seg con intervalos de tiempo de 1seg (sólo se muestran 5 rampas). La parte correspondiente al comportamiento lineal se muestra a potenciales negativos en el rango de -90 mv a -20 mv aproximadamente y no presenta variaciones en el tiempo, La parte no lineal muestra variaciones en el tiempo generadas por un corrimiento hacia la izquierda que aumenta de manera significativa entre el primer y el segundo trazo y luego se mantiene constante. pH extracelular 7.4; pH intracelular 7.0. La solución extracelular que se utilizó fue la no.1 y la solución intracelular fue la no.3 (Tabla I y II).

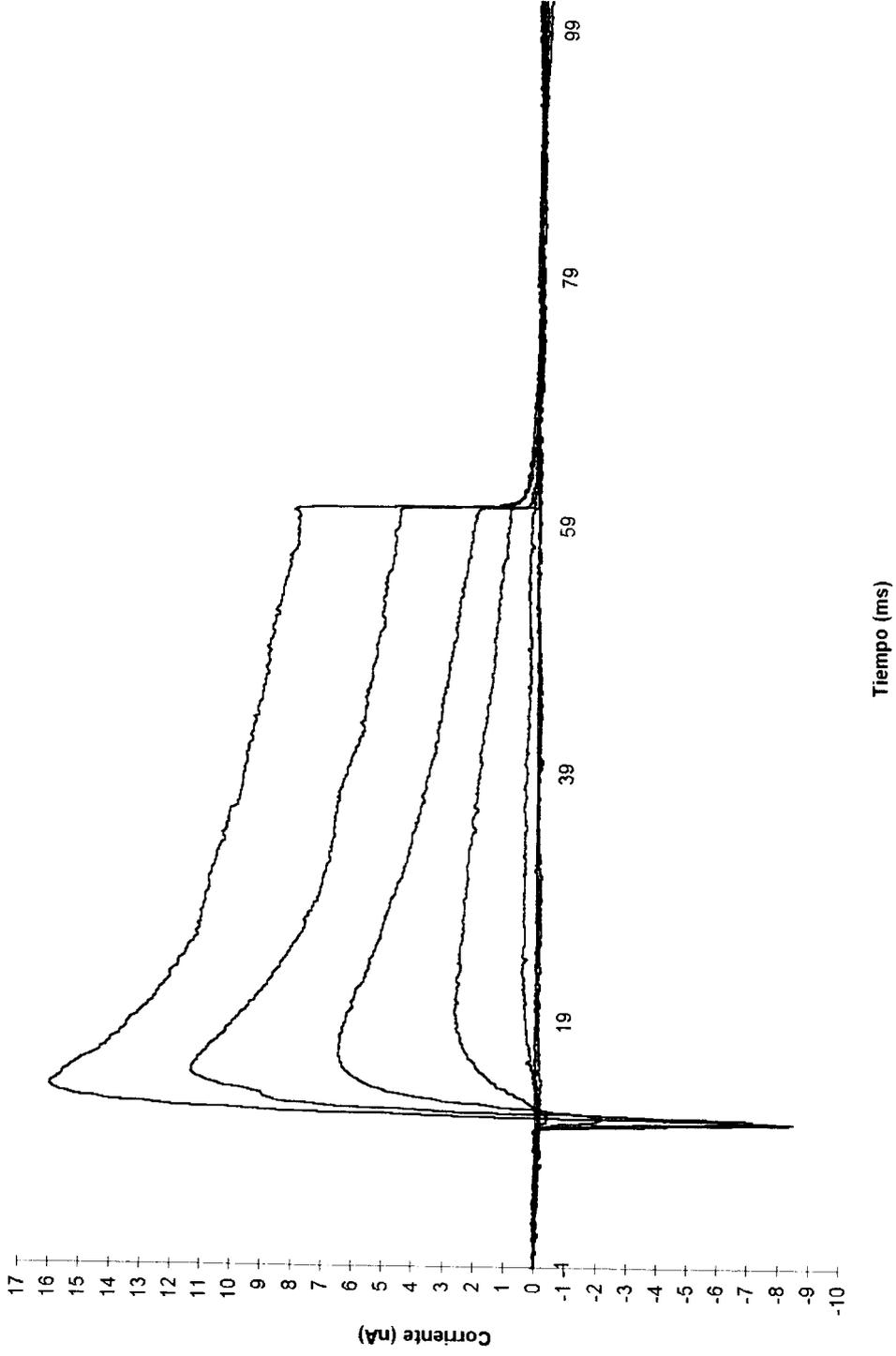


Figura 13. Corrientes generadas al llevar a la célula a un potencial de mantenimiento de -70 mv y aplicando 7 pulsos de fijación de voltaje desde -60 mv a 0 mv con incrementos de 10 mv. pH extracelular 7.4; pH intracelular 7.0. La solución extracelular que se utilizó fue la no.1 y la solución intracelular fue la no.3 (Tabla I y II).

La gráfica 5 muestra la relación corriente-voltaje de la figura 13. Se observa que la corriente se empieza a notar a partir de -40mv de V_m . A partir de los -20mv. de V_m el incremento en la corriente se volvió constante.

c.- Sobre la corriente I_{K^+} .

La figura 14 muestra las corrientes que se obtuvieron al llevar a la célula a un potencial de mantenimiento de -45mv y al aplicarle pulsos de voltaje de -35mv a 25mv con incrementos de 10mv (n=2). Se observa que, al inicio del pulso, aparecen corrientes entrantes cuya duración es mayor en las primeras despolarizaciones. Al despolarizar a la membrana en -5mv, la corriente entrante alcanza su mayor amplitud; con los pulsos despolarizantes siguientes, tanto la amplitud como la duración de estas corrientes, disminuyen.

Las corrientes entrantes van seguidas de unas corrientes salientes, cuyo comportamiento es el de una sigmoide. No presentan inactivación y las corrientes de cola, para mayores despolarizaciones, regresan lentamente a la línea basal después de la aplicación del pulso de fijación de voltaje.

La gráfica 6 muestra el comportamiento de las corrientes con respecto al voltaje de la figura 14. Las corrientes aparecen a partir de los -15mv de V_m ., incrementándose hasta los -5mv a partir de donde el incremento en la corriente se hace constante.

II.- Resultados obtenidos a pH 6.5

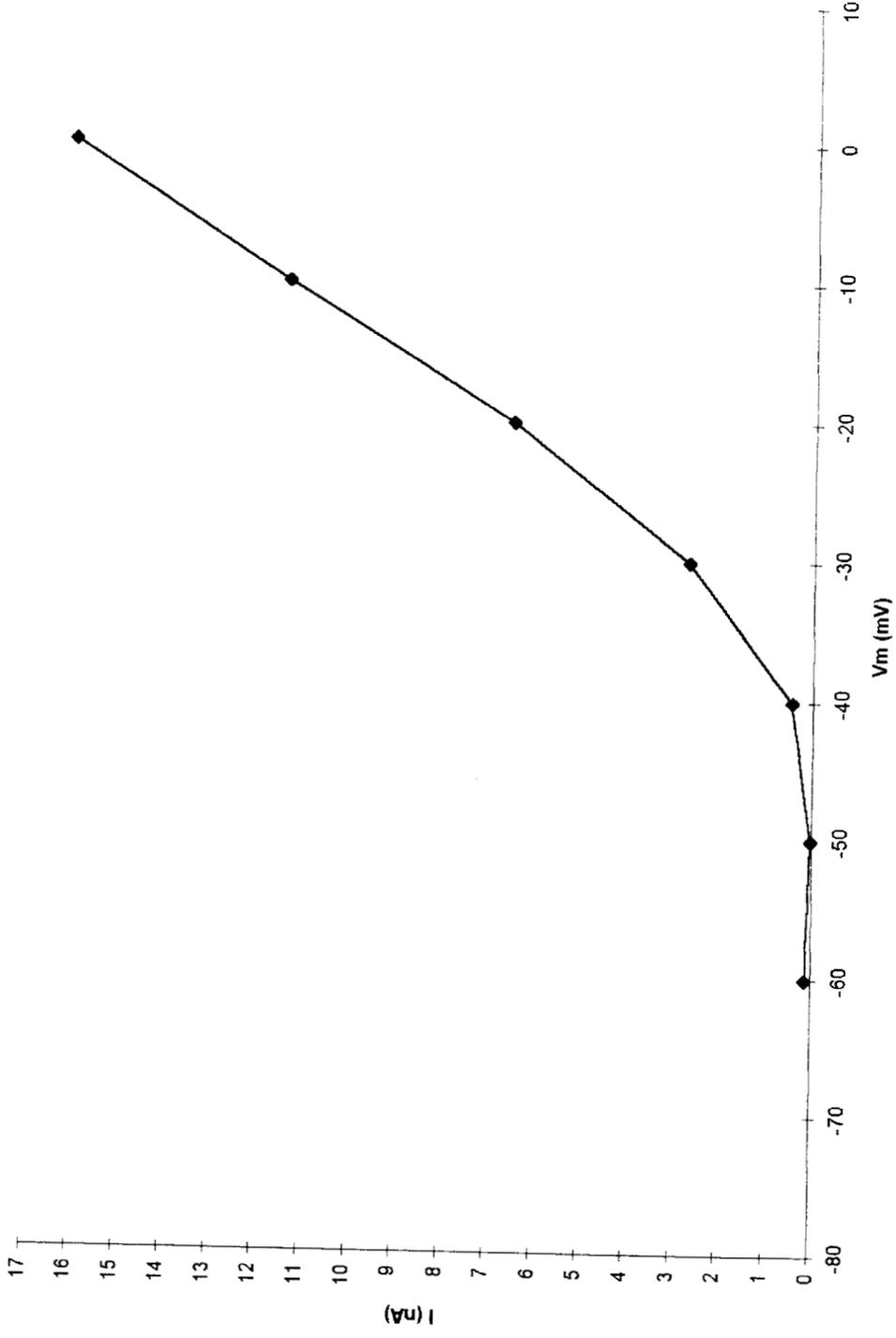
a.- Sobre las corrientes del estado estable.

Los resultados se obtuvieron al aplicar una solución extracelular a pH 7.4 (Sol.1) y una solución intracelular (Sol. 3) ajustada a un pH 6.5 y al aplicar rampas de fijación de voltaje (n=5).

La gráfica 7 muestra la relación corriente-voltaje de las corrientes del estado estable. Se observó que, en la parte lineal, que va desde -90mv a -28mv, hay una variación en el tiempo que se muestra por un corrimiento de las curvas hacia la izquierda. Por el contrario, en la región no lineal ($V_m > -28mv$) la corriente saliente incrementa en magnitud.

b.- Sobre la corriente I_{A^+} .

Cuando se llevó a la célula a un potencial de mantenimiento de -70mv y se le aplicaron pulsos de fijación de voltaje desde -60mv a 80mv con incrementos de 10mv se obtuvieron las corrientes de la figura 15 (n=5). Al inicio del pulso, aparecieron corrientes entrantes, cuya duración disminuyó y cuya amplitud se incrementó al despolarizarse la membrana.



Gráfica 5. Curva I-V generada a partir de la figura 13 tomada con respecto a la corriente pico en un intervalo de 10 ms del inicio del trazo.

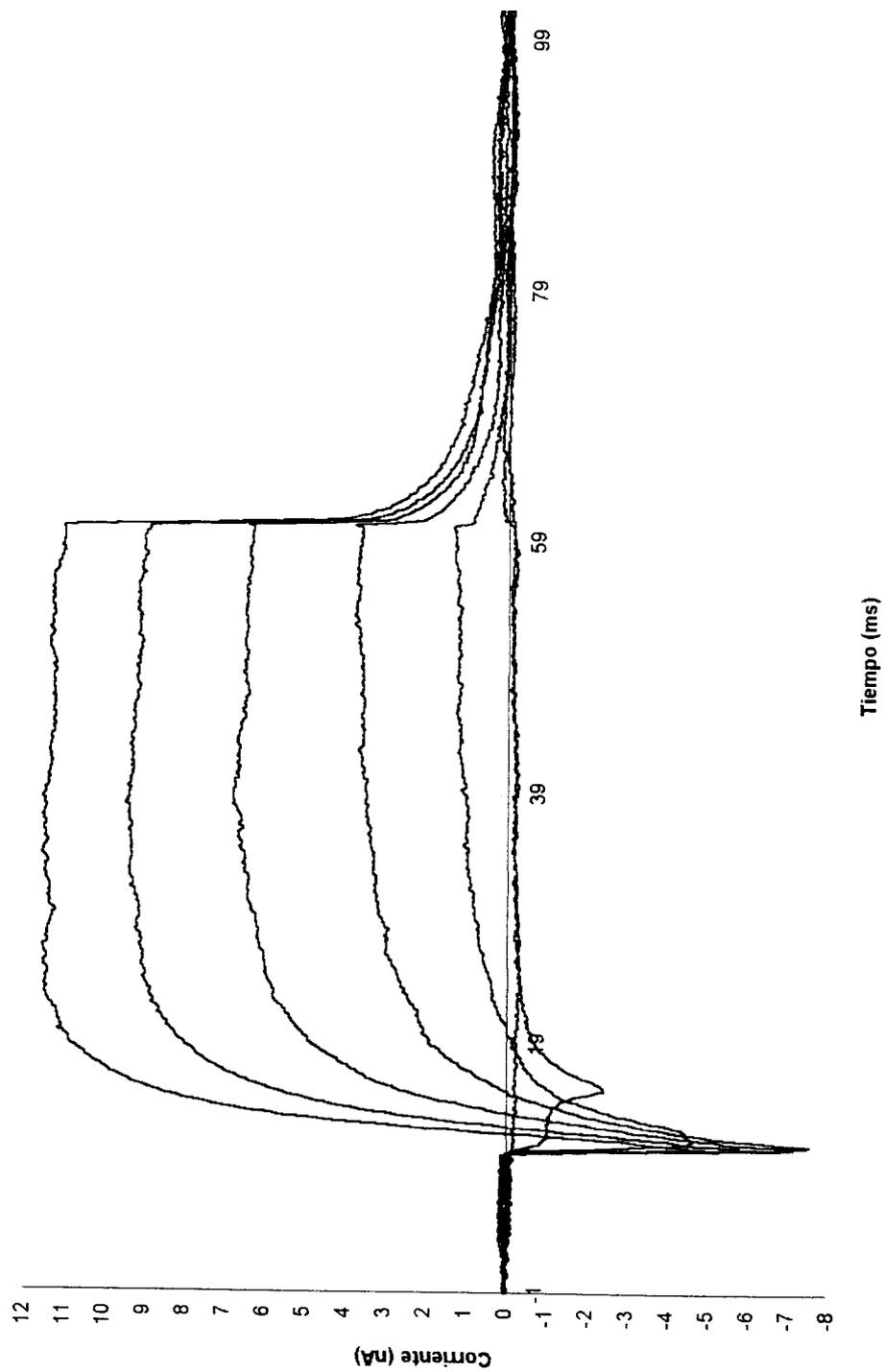
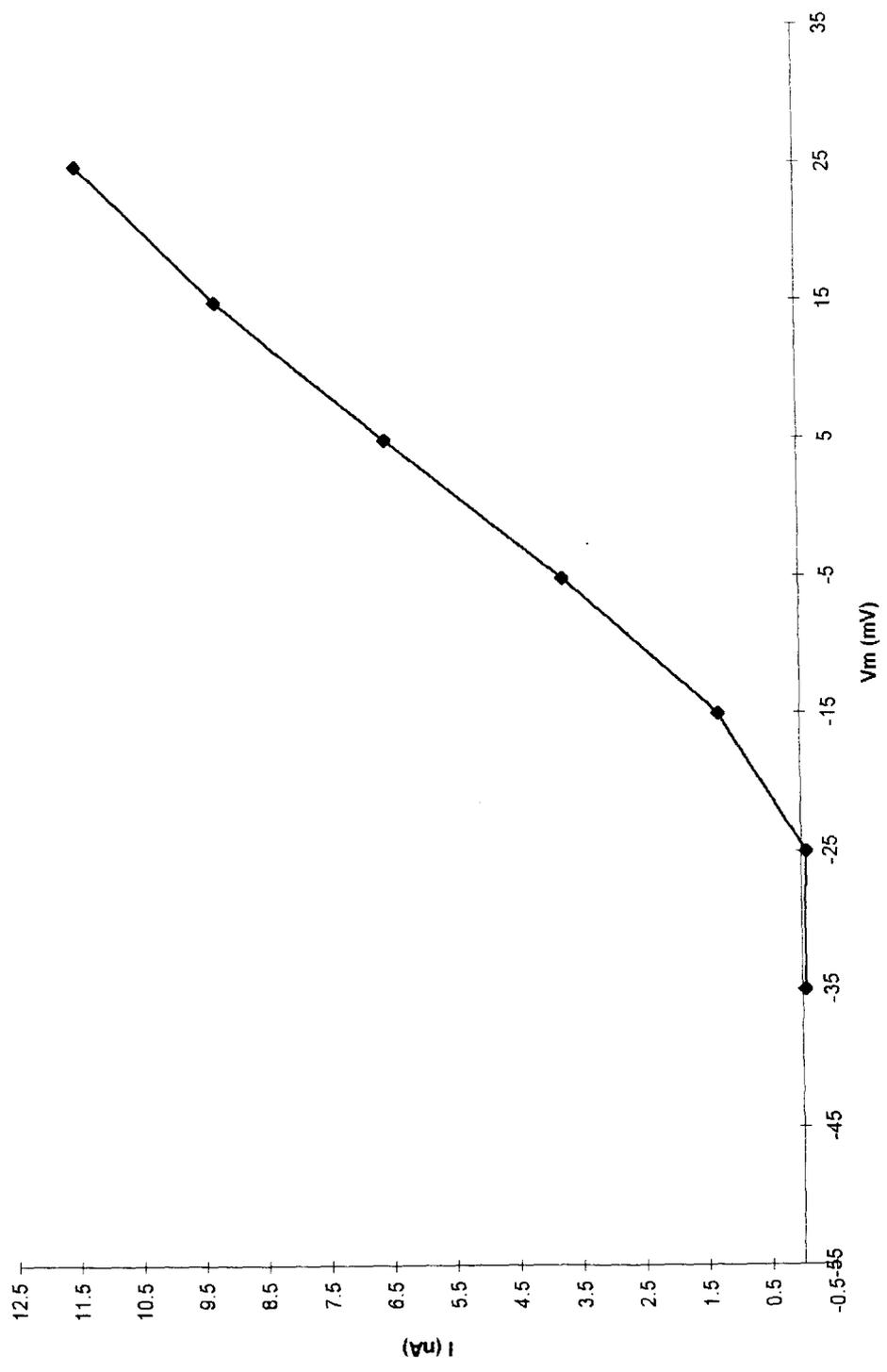
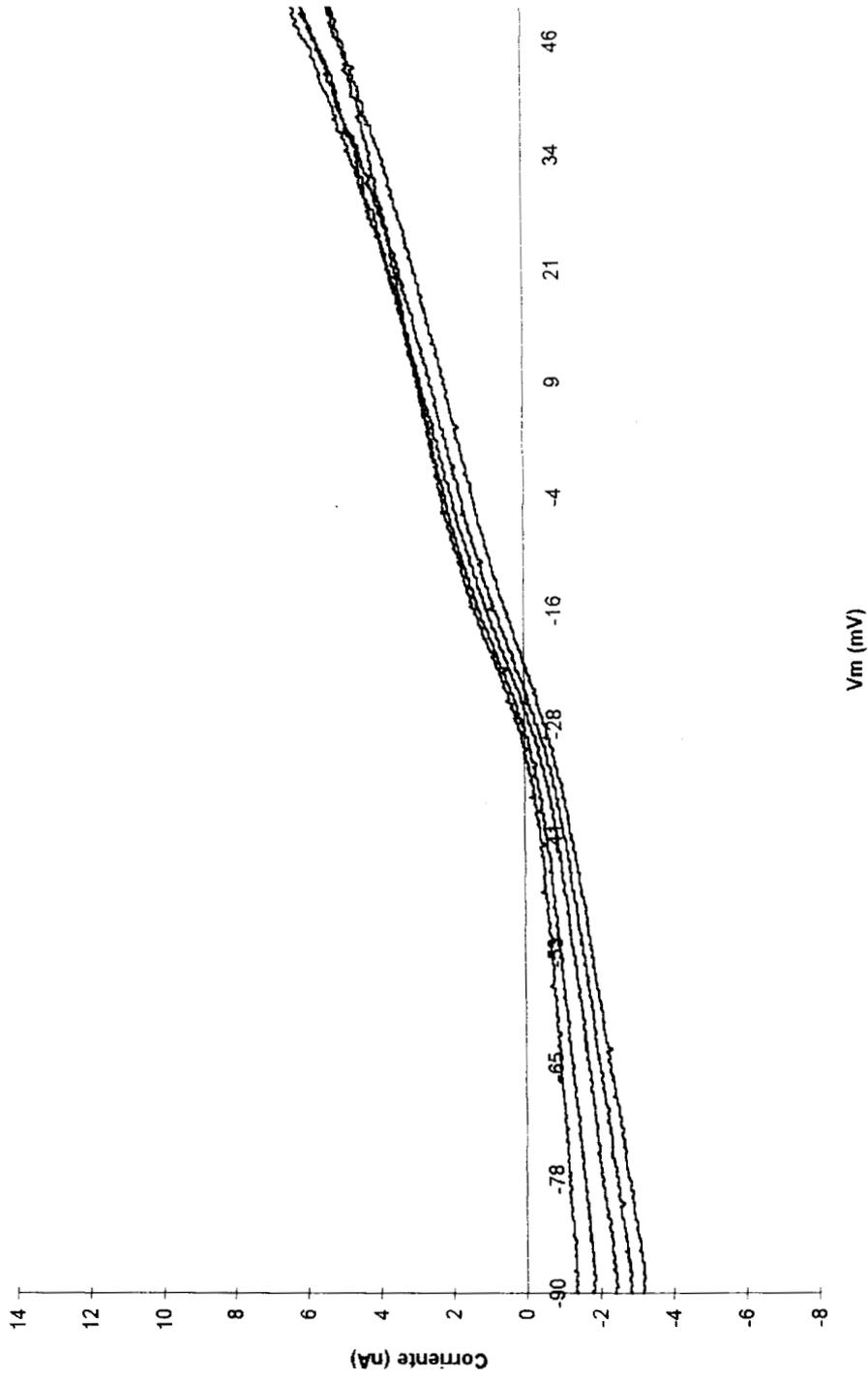


Figura 14. Corrientes obtenidas al llevar a la célula a un potencial de mantenimiento de -45 mv y aplicando 7 pulsos de fijación de voltaje de -35 mv a 25 mV con incrementos de 10 mv. pH extracelular 7.4; pH intracelular 7.0. La solución extracelular que se utilizó fue la no. 1 y la solución intracelular fue la no.3 (Tabla I y II).



Gráfica 6. Curva I-V resultante de la figura 14 tomada con respecto a la corriente pico.



Gráfica 7. Curvas I-V de las corrientes del estado estable, al aplicar un protocolo de rampas de 10 de -90 mv a 50 mv durante 2seg con intervalos de tiempo de 1seg (sólo se muestran 5 rampas). La parte lineal (entre -90 mv y -27 mv) y no lineal muestran una variación en el tiempo que se traduce por un corrimiento de la curva hacia la izquierda y variación en su magnitud. pH extracelular 7.4; pH intracelular 6.5. La solución extracelular que se utilizó fué la no.1 y la solución intracelular fué la no.3 (Tabla I y II).

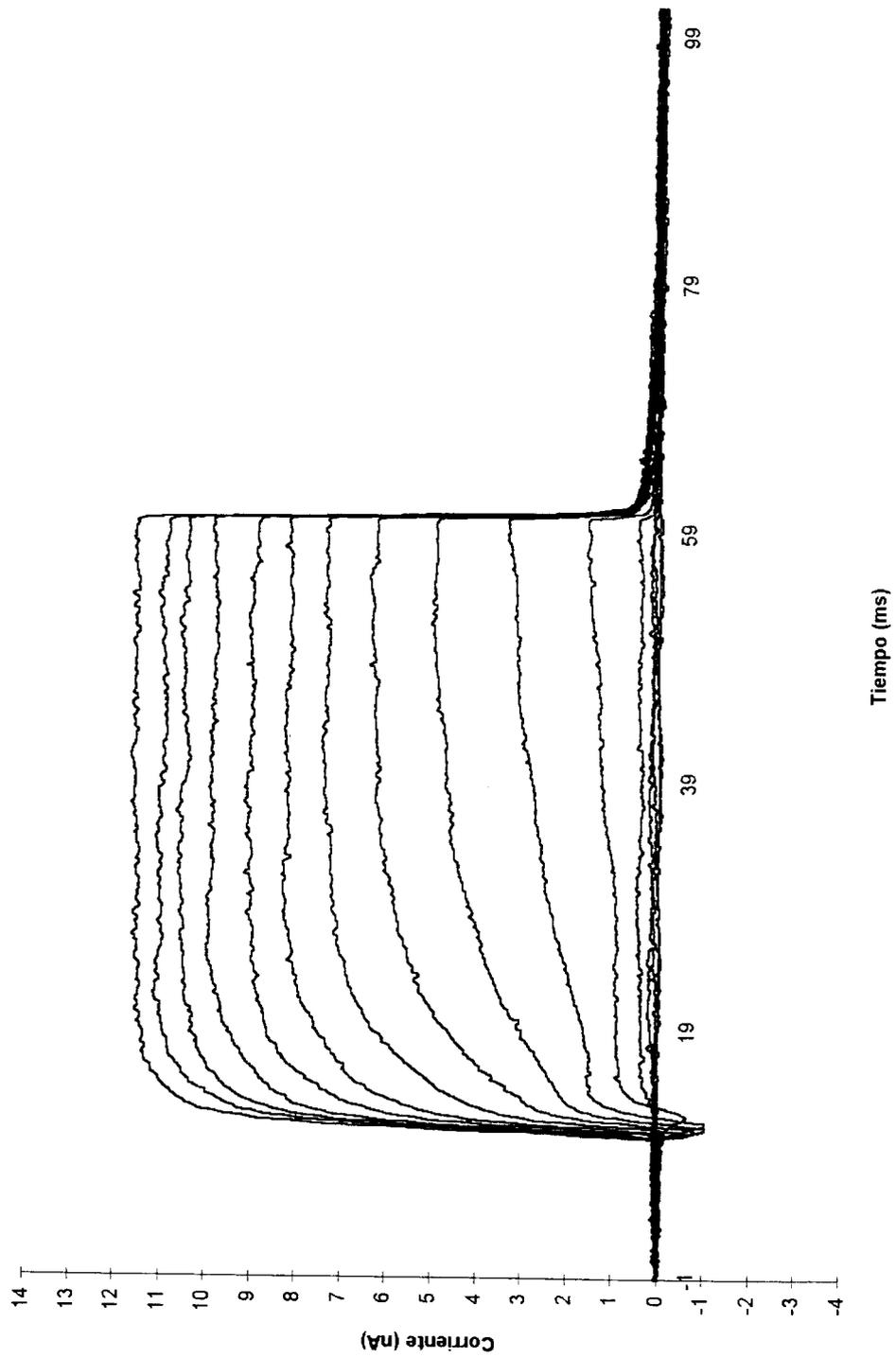


Figura 15. Corrientes generadas al llevar a la célula a un potencial de mantenimiento de -70 mv y al aplicar pulsos de fijación de voltaje desde -60 mv a 80 mv con incrementos de 10 mv. pH extracelular 7.4; pH intracelular 6.5. La solución extracelular que se utilizó fue la no. 1 y la solución intracelular fue la no. 3 (Tabla I y II).

Para despolarizaciones de -20mv, -10mv y 0mv., estas corrientes presentaron al inicio de la aplicación del pulso de fijación de voltaje, un pequeño componente transitorio rápido que, posteriormente, se incrementó de manera más lenta, en forma de sigmoide, y que no generó inactivación. Con las siguientes despolarizaciones de la membrana, este componente transitorio rápido desapareció y las corrientes resultantes, presentaron un comportamiento en forma de sigmoide. Al final del pulso de fijación de voltaje, las corrientes de cola, regresaron a la línea basal.

En la gráfica 8 se observa la relación corriente-voltaje correspondiente a la Figura 15. Se puede ver que la corriente empieza a distinguirse de manera discreta, a partir de -40mv de V_m ., incrementándose de manera sigmoidal hasta los 50mv. de V_m ., a partir de donde el incremento, posterior, en la corriente se vuelve constante.

c.- Sobre la corriente I_{K-}

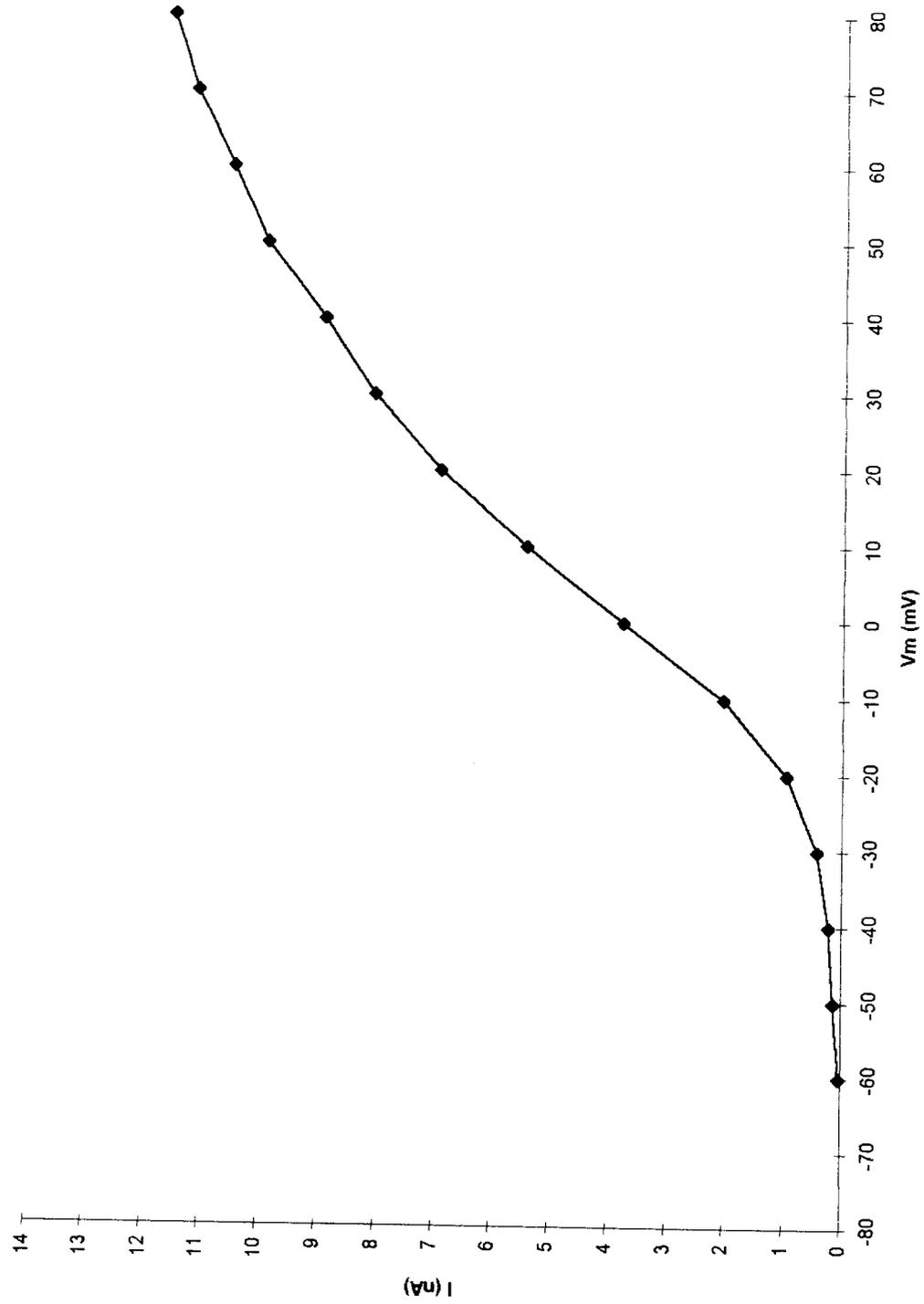
Cuando se llevo a la célula un potencial de mantenimiento de -45mv. y se aplicaron pulsos de estimulación desde -35mv a 35mv con incrementos de 10mv, se obtuvieron una corrientes entrantes de gran duración, seguidas por unas corrientes salientes que no inactivaron (figura 16, n=5).

La duración de las corrientes entrantes disminuyo al irse despolarizando la membrana. La amplitud máxima se alcanzó para una despolarización de -5mv. a partir de donde, para las siguientes despolarizaciones, la amplitud disminuyó. Las corrientes salientes mostraron un comportamiento en forma de sigmoide, no inactivaron y, su regreso a la línea basal, después de la aplicación del pulso de fijación de voltaje, se realizó lentamente. La curva I-V (gráfica 9), muestra que la corriente empezó a hacerse visible a partir de los -25mv de V_m , pero, no fué sino hasta los -15mv. de V_m ., que se hizo patente. Se incrementó hasta los 5mv de V_m y, a partir de ahí, el incremento en la corriente se volvió aproximadamente constante.

III.- Resultados obtenidos a pH 6.14

a.- Sobre las corrientes del estado estable.

Estos resultados (n=3) se obtuvieron con una solución intracelular ajustada a un pH 6.14 (Sol.3) y una solución extracelular a pH 7.4 (Sol.1). Se aplicaron rampas de fijación de voltaje. En la gráfica 10 se observó que la parte lineal se llevó a cabo en un rango de -87mv. a -16mv. En este rango hubo una variación en el tiempo que se muestra en la curva por un corrimiento y una disminución en su magnitud a la izquierda con respecto al primer trazo. Los mayores desplazamientos se observaron entre el primer trazo y el segundo y, entre el penúltimo y el último. En la parte no lineal también hubo una variación en el tiempo, sin embargo, la



Gráfica 8. Curva I-V resultante de las corrientes generadas en la figura 15 tomada con respecto a la corriente pico.

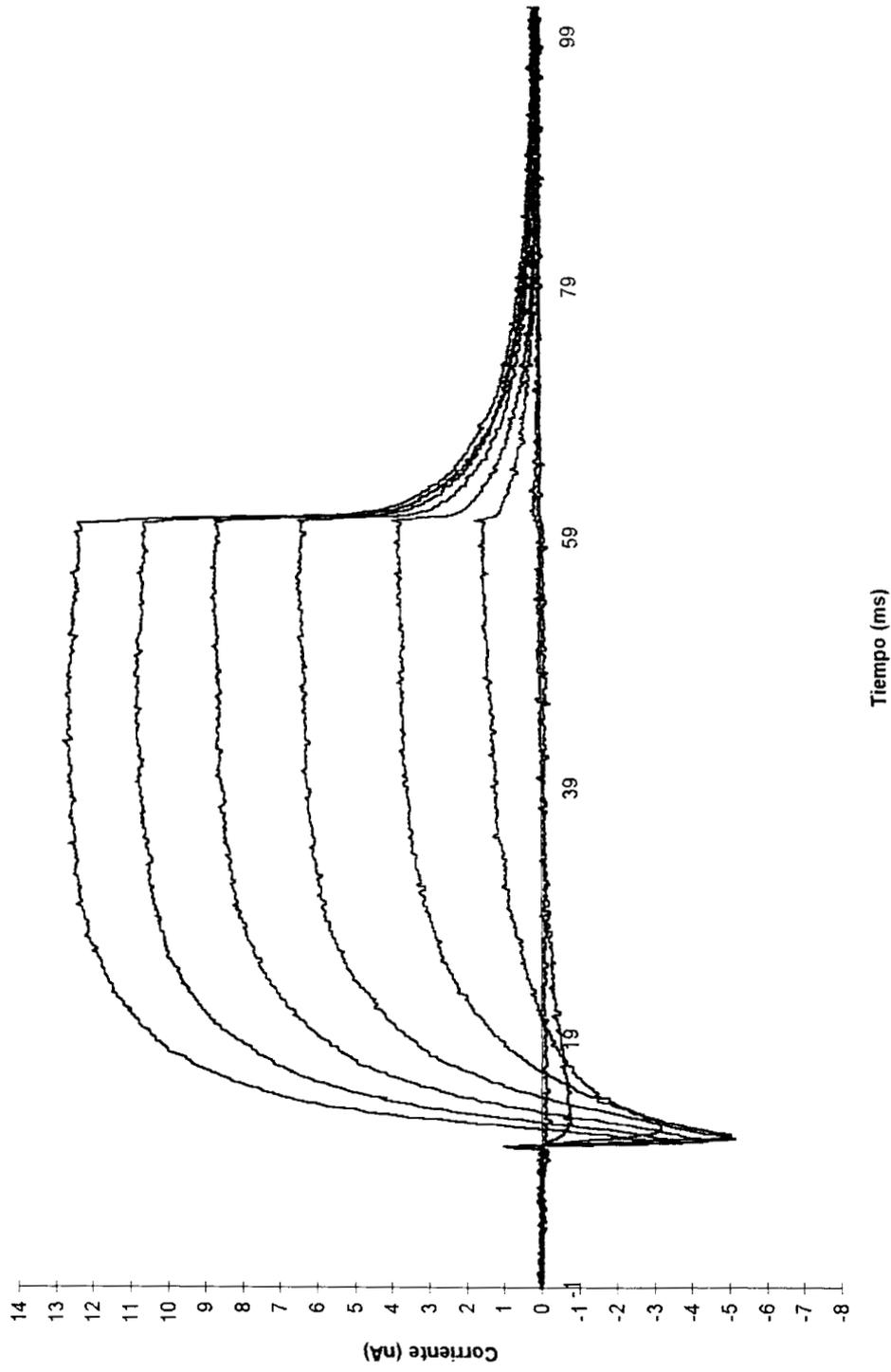
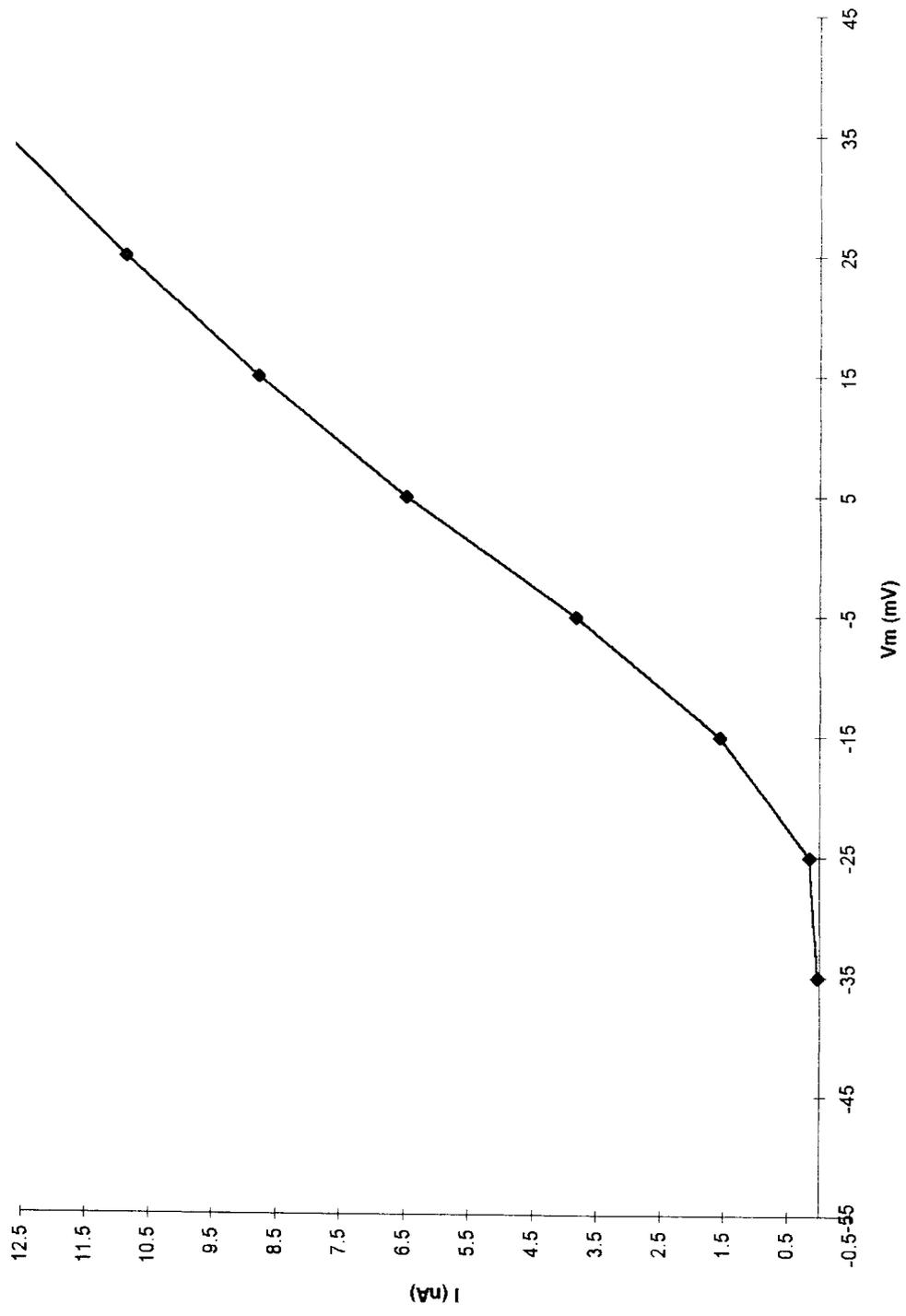
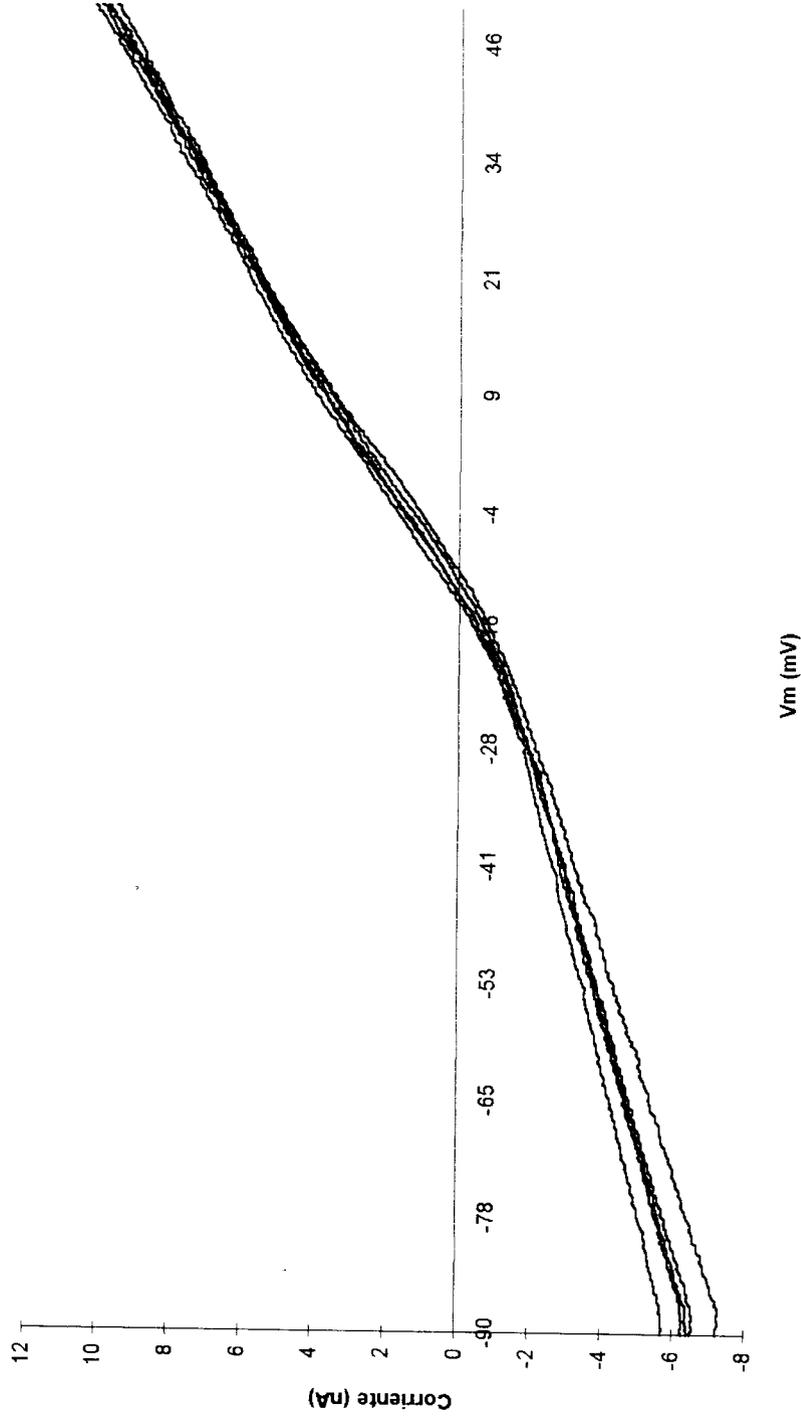


Figura 16. Corrientes generadas al aplicar un potencial de mantenimiento de -45 mV y al aplicar pulsos de fijación de voltaje de -35mV a 35 mV con incrementos de 10 mV. pH extracelular 7.4; pH intracelular 6.5. La solución extracelular que se utilizó fue la no.1 y la solución intracelular fue la no.3 (Tabla I y II).



Gráfica 9. Curva I-V resultante de las corrientes generadas en la figura 16 tomada con respecto a la corriente pico.



Gráfica 10. Curvas I-V de las corrientes del estado estable generadas al aplicar un protocolo de rampas de 10 de -90 mv a 50 mv durante 2seg con intervalos de tiempo de 1seg (solo se muestran 5). La parte lineal se encuentra en un rango de -87 mv a -35 mv. Se observan variaciones en el tiempo en la parte lineal representadas, por un corrimiento de las curvas hacia la izquierda y disminución en su magnitud. La parte no lineal también presenta cambios en el tiempo sin embargo la magnitud de la variación es menor con respecto a la de la parte lineal. pH extracelular 7.4; pH intracelular 6.14. La solución extracelular que se utilizó fue la no.1 y la solución intracelular fue la no.3 (Tabla I y II).

variación en la magnitud fué menor que la que se muestra en la parte no lineal además de ver un aumento en la corriente saliente.

b.- Sobre la corriente I_{A} .

Cuando se llevo a la célula a un potencial de mantenimiento de -70mv. y, al aplicarle pulsos de fijacion de voltaje desde -60mv. a 80mv. en incrementos de 10mv. (n=3), se obsevaron corrientes entrantes pequeñas y lentas, seguidas de unas corrientes salientes (figura 17). A diferencia de las corrientes que se observaron en la figura 10, éstas últimas tienen un comportamiento en forma de sigmoide y no se observa el componente transitorio rápido al inicio de las corrientes salientes para ninguna despolarización. Las corrientes de cola alcanzaron la línea basal, al final del pulso de fijacion de voltaje, lentamente.

En la gráfica 11 se muestra la dependencia del voltaje con respecto a la corriente. Se observa que la corriente aparece a partir de -20mv. de V_m , y se incrementa más rápidamente hasta los 40mv de V_m .

c.- Sobre la corriente I_K .

Cuando se aplicaron pulsos de fijacion de voltaje desde -35mv a 75mv en incrementos 10mv y se llevó a la célula a un potencial de mantenimiento de -45mv. (figura 18), se observaron una corrientes entrantes de mayor duración que las que se observaron al llevar a la célula a un potencial de mantenimiento de -70 (mismo pH), seguidas por unas corrientes salientes que no inactivaron (n=3). Las corrientes de cola regresaron a la línea basal, al final del pulso de fijacion de voltaje, de manera muy lenta conforme la membrana se iba despolarizando.

La gráfica 12 muestra la dependencia de la corriente con respecto al voltaje para las corrientes que se muestran en la figura 18. Se observa que la corriente se empieza a manifestar a partir de un potencial de membrana de -25mv. A partir de 15mv de V_m el incremento en la amplitud se hace mayor.

IV.- Variacion de la cinética de activación las corrientes de I_A e I_K con respecto a los cambios de pH.

Para observar la cinética de activación de las corrientes bajo el efecto del pH, se hizo un ajuste con 2 exponenciales para un mismo potencial de membrana, tanto para los resultados que se obtuvieron al llevar a la célula a un potencial de

mantenimiento de -70mv como para aquellos resultantes de la aplicación de un potencial de mantenimiento de -45mv. Los resultados de las variaciones en las constantes de tiempo se muestran en la Tabla III y el ajuste de las curvas aparece en las figuras 19 y 20.

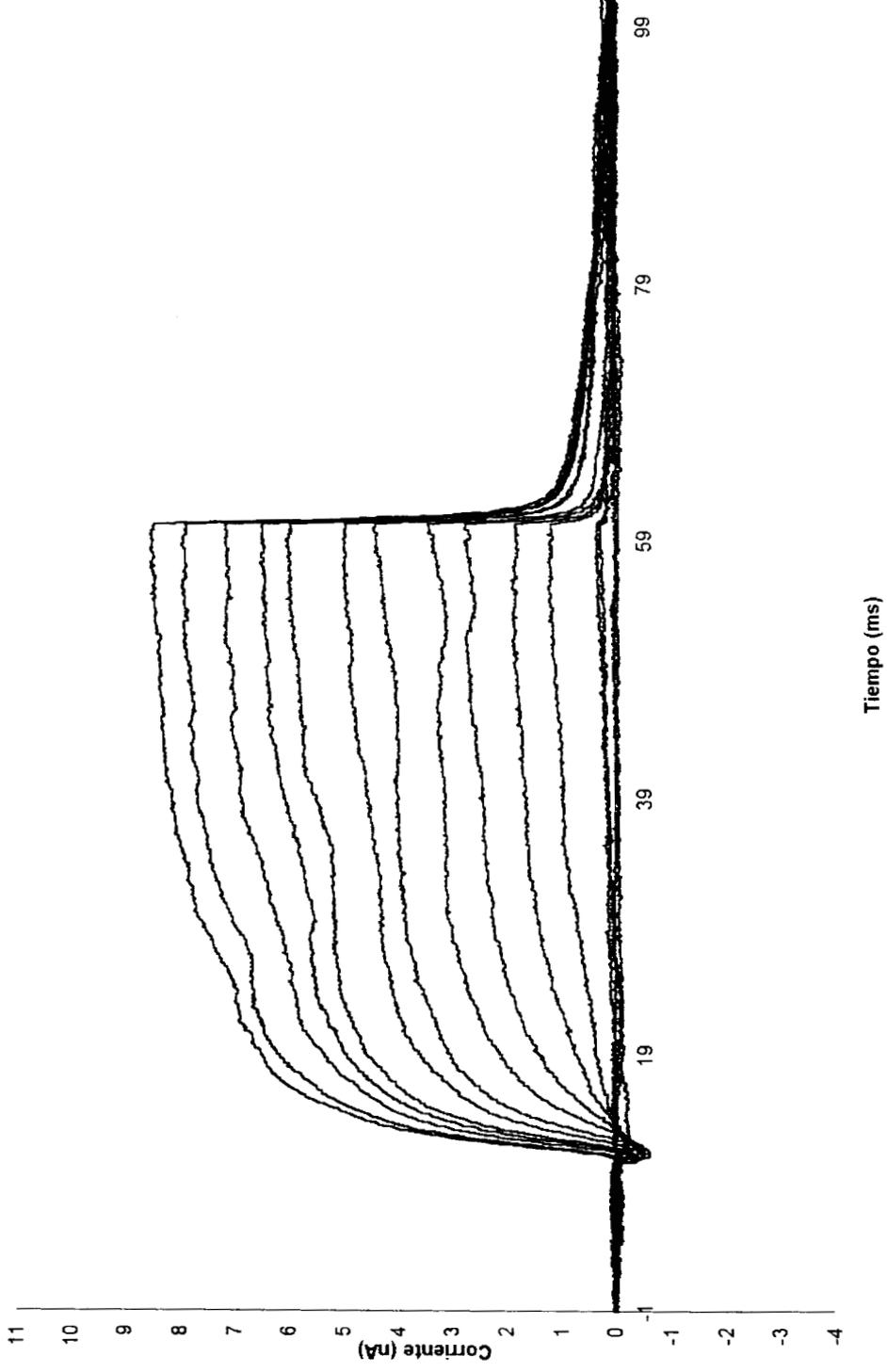
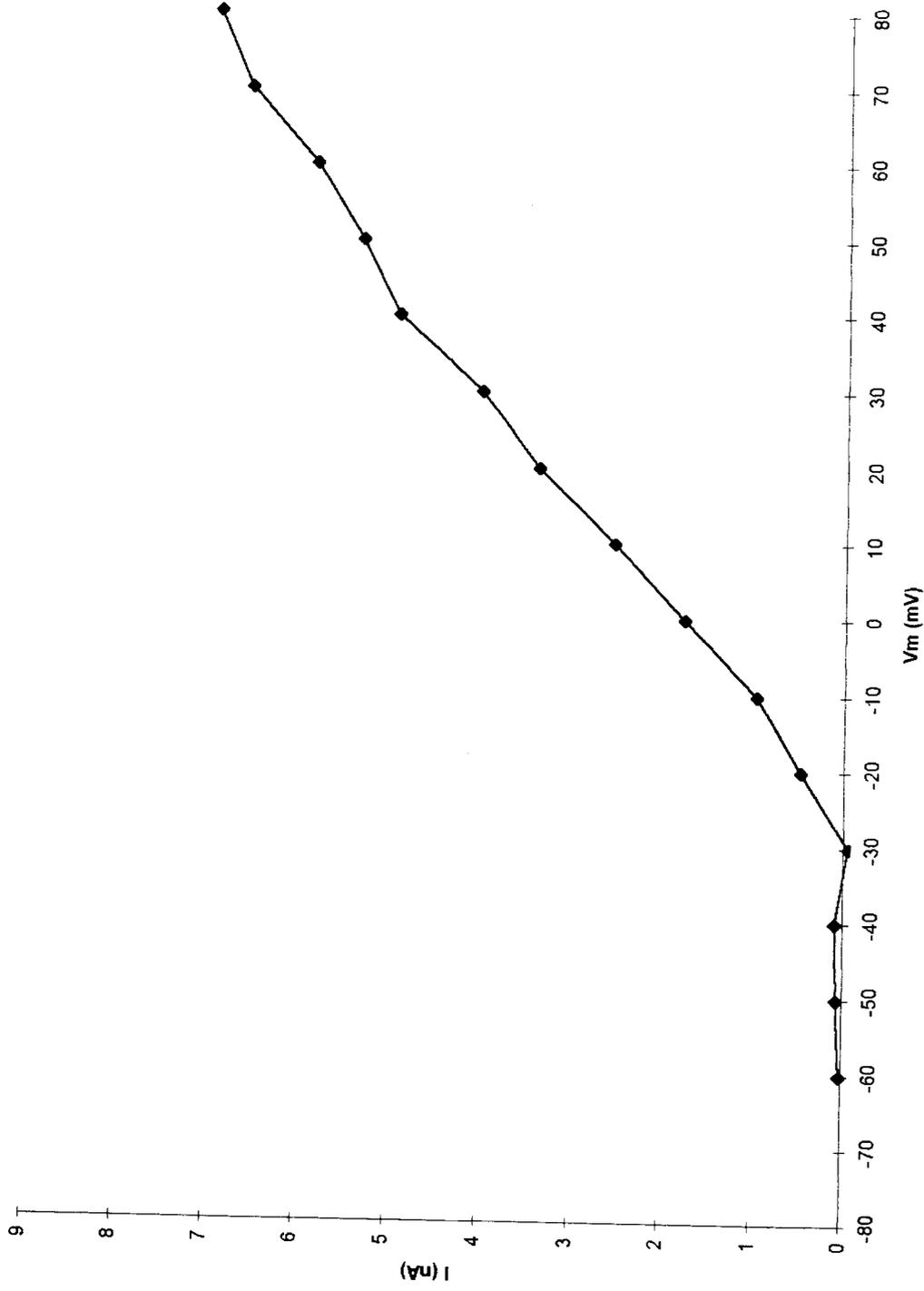


Figura 17. Corrientes generadas al llevar a la célula a un potencial de mantenimiento de -70 mv y al aplicarle 8 pulsos de fijación de corriente desde -60mv a 80mv con incrementos de 10 mv. pH extracelular 7.4; pH intracelular 6.14. La solución extracelular que se utilizó fue la no.1 y la solución intracelular fue la no.3 (Tabla I y II).



Gráfica 11. Curva I-V resultante de la figura 17 tomada a la corriente pico en un intervalo de 10 ms.

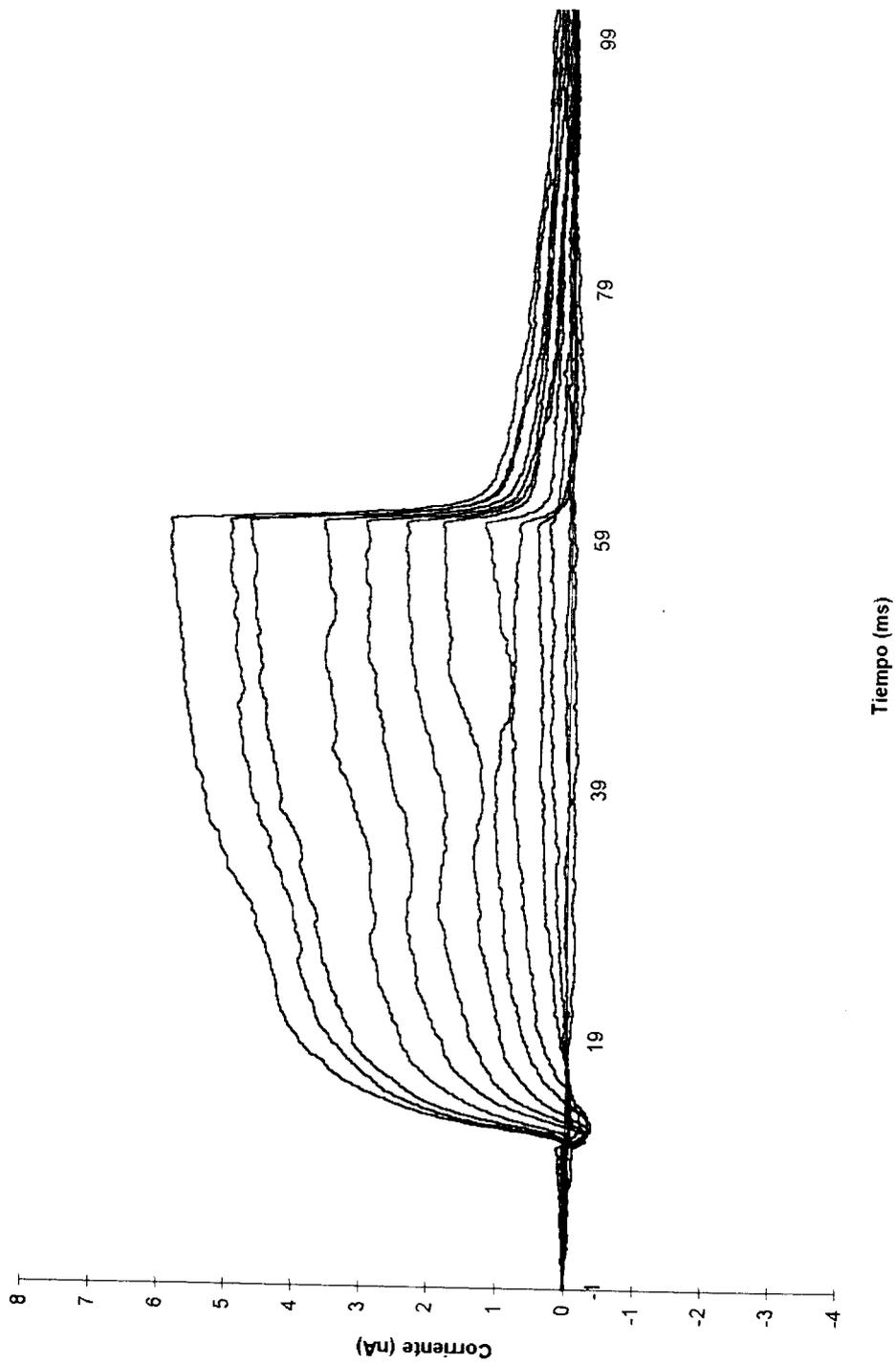
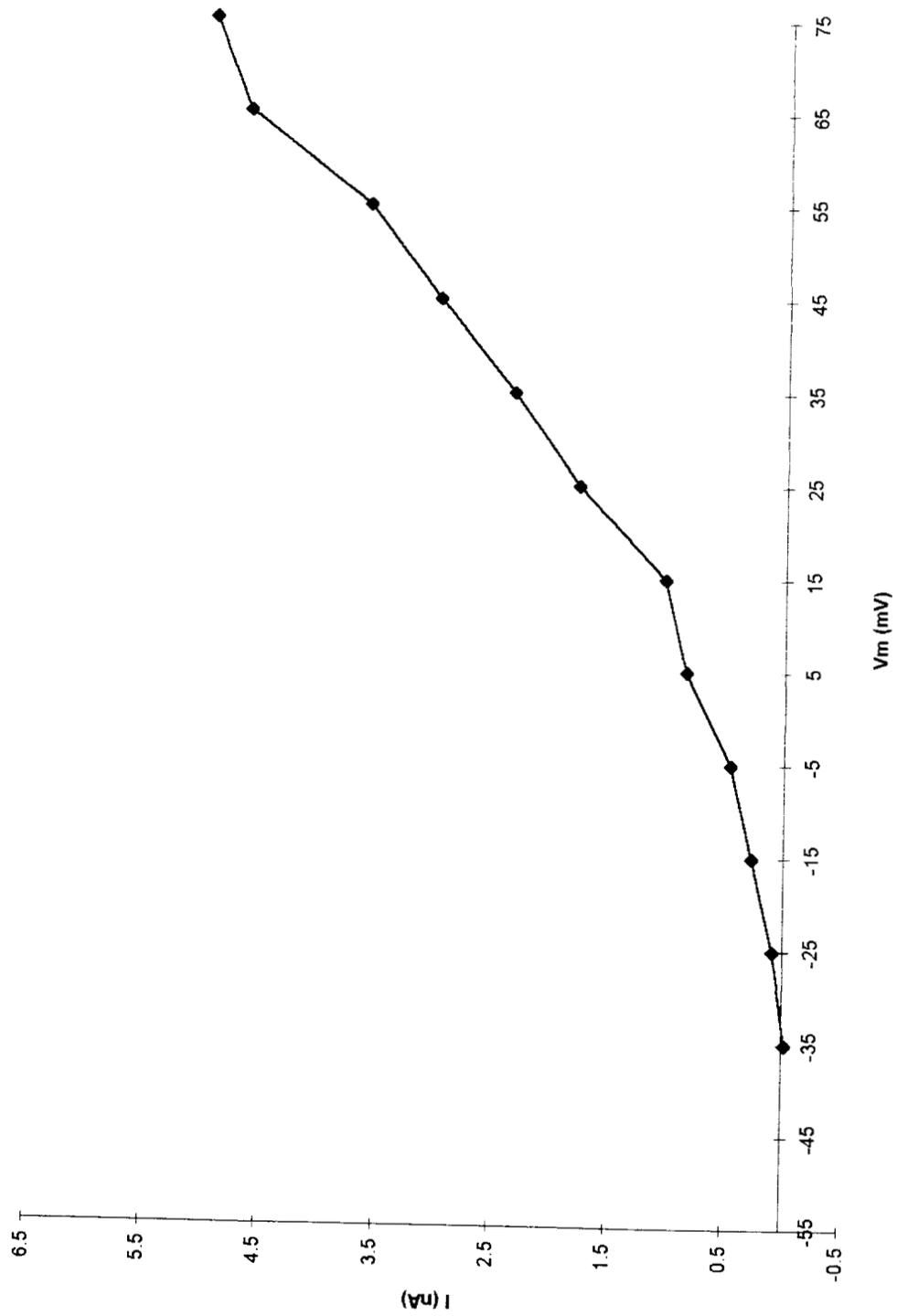


Figura 18. Corrientes generadas al aplicar un potencial de mantenimiento de -45 mv y al aplicar pulsos de fijación de voltaje de -35mv a 75 mv con incrementos de 10 mv. pH extracelular 7.4; pH intracelular 6.14. La solución extracelular que se utilizó fue la no.1 y la solución intracelular fue la no.3 (Tabla I y II).



Gráfica 12. Potencial de mantenimiento de -45mV. Curva I-V resultante de la figura 18.

Tabla III
Constantes de tiempo a diferentes pH

pH	Vh = -45mv		Vh = -70mv	
	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2
7.2	15.85	3.040	0.476	0.344
7.0	-6.818	2.442	0.662	0.0586
6.5	6.383	1.66	12.489	0.485
6.14	-8.244	3.714	-29.532	5.946

V.- Resultados obtenidos con la técnica de fijación de corriente al aplicar DNP en el medio extracelular.

Los registros que se muestran a continuación, se obtuvieron al aplicar 10 pulsos de fijación de corriente de 600ms de duración con un incremento de 0.1nA entre cada uno de ellos. El primer pulso que se aplicó fué de -0.3nA. El potencial de membrana fué de -50mv. A continuación solo se muestran los registros resultantes de aplicar un pulso de fijación de corriente de 0.5nA.

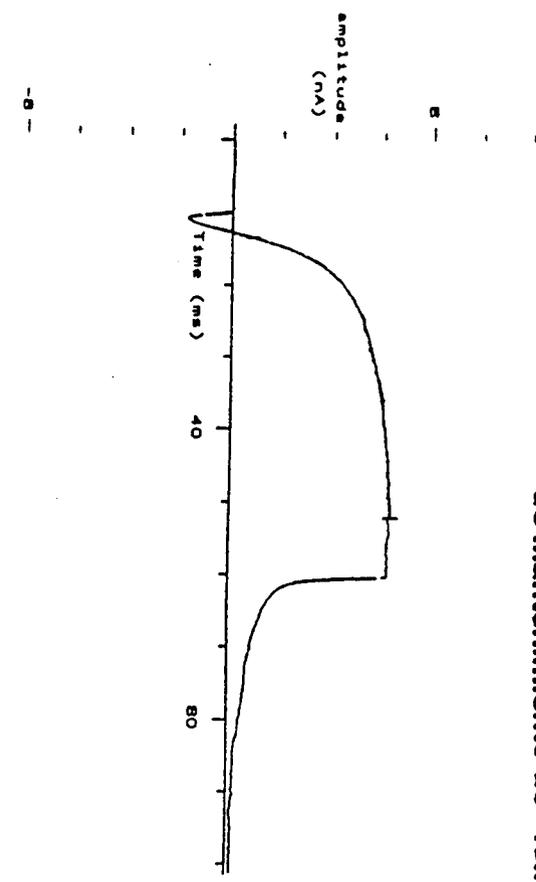
a.- Resultados del registro control.

En la figura 21a, se observan los potenciales de acción que se obtuvieron como controles de nuestros experimentos. Se utilizó la solución extracelular no.1 de la tabla y, una solución de KCl 3M en el microelectrodo. En este caso, el primer potencial de acción tuvo una amplitud de 61,1mv y una duración de 8ms. Se observó que a lo largo del pulso, la amplitud de los potenciales de acción, que se generaron en ráfagas, disminuyó gradualmente en tanto que su duración aumentó. Al finalizar el pulso de inyección de corriente la corriente de cola sobrepasó ligeramente la línea basal. Posteriormente se observaron unos potenciales de acción espontáneos.

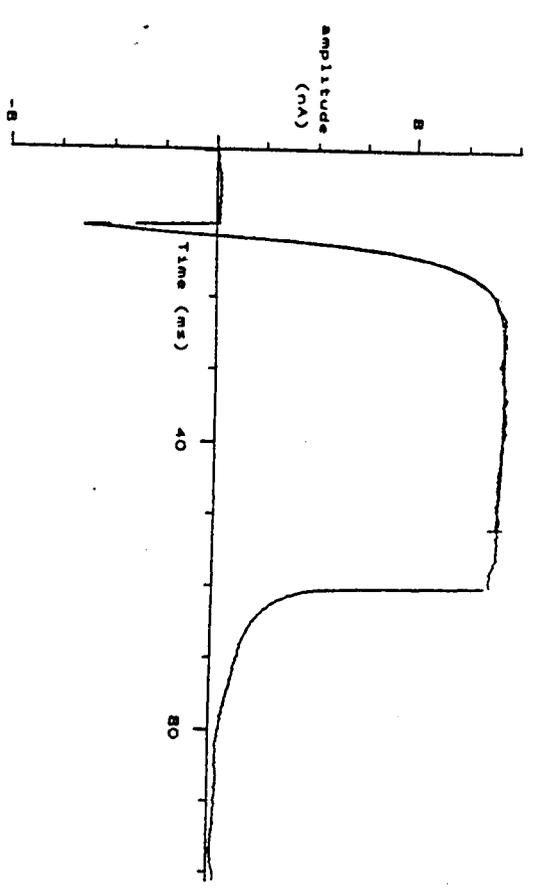
b.- Resultados obtenidos bajo la aplicación del DNP.

A los 4:30 min de que se obtuvo el registro control, se cambió la solución extracelular por la sol.2 (Tabla I). Al aplicar nuevamente un pulso de fijación de corriente, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 21b en donde se observó, que la amplitud de los potenciales de acción disminuyó ligeramente (59.91mv) y que al igual que para el registro control, sus duraciones aumentaron a lo largo del pulso de estimulación. Sin embargo, a diferencia del registro control, apareció una disminución en la magnitud de la repolarización que sigue a cada potencial de acción y, la corriente de cola, sobrepasó de manera más notoria la línea basal.

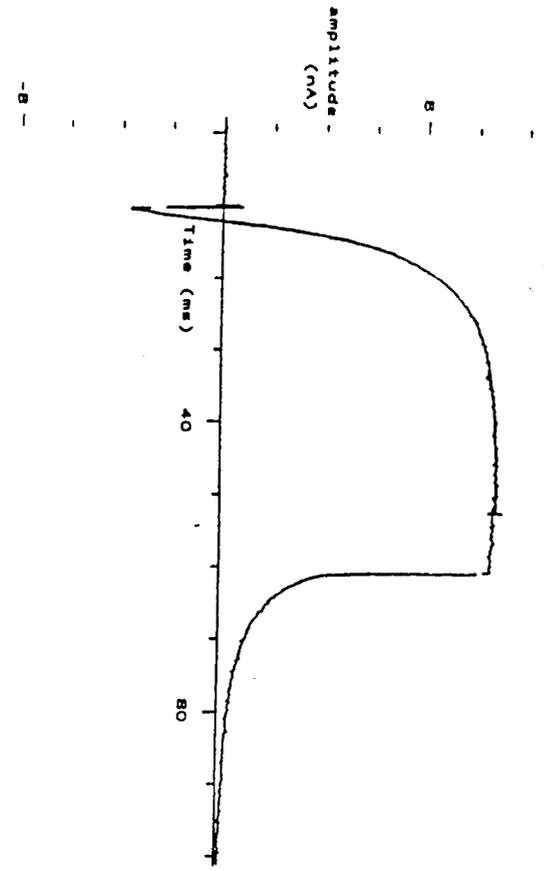
Figura 19. Cinética de activación para las corrientes llevadas a un potencial de mantenimiento de -45mv



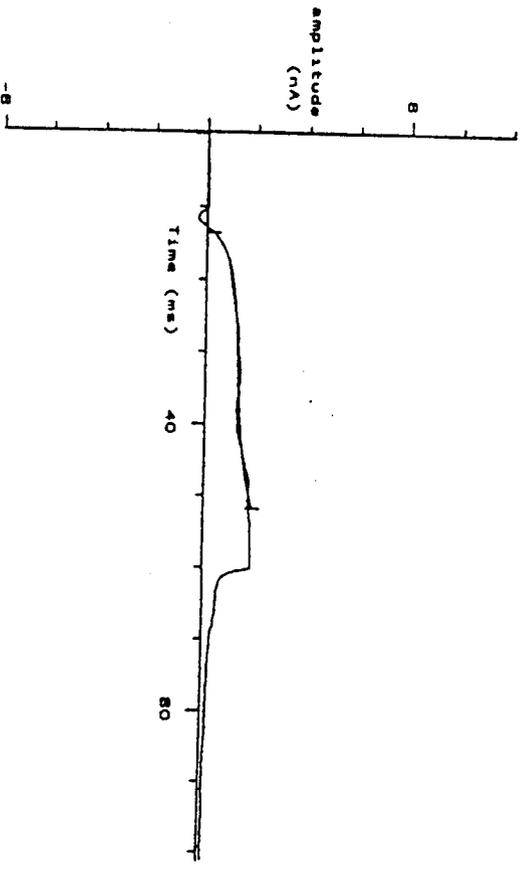
96730C09 BUO 1996/09/04 19:29:26 [00:00:00]
 Cinética de activación para un Vh=-45 y un pH de 7.2



96815C10 BUO 1996/09/04 19:54:06 [00:00:00]
 Cinética de activación para un Vh=-45 y un pH de 7.0

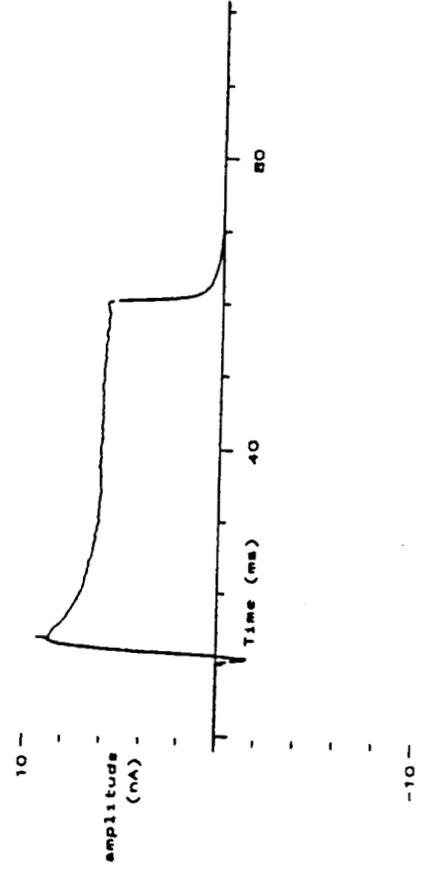


96731C23 BUO 1996/08/26 22:40:56 [00:00:00]
 Cinética de activación para un Vh=-45mv y un pH de 6.5

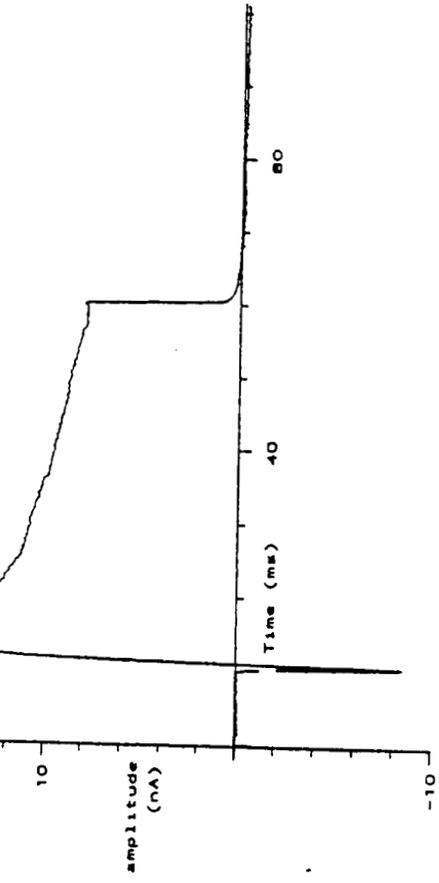


96815C28 BUO 1996/09/04 19:43:04 [00:00:00]
 Cinética de activación para un Vh=-45mv y un pH de 6.14

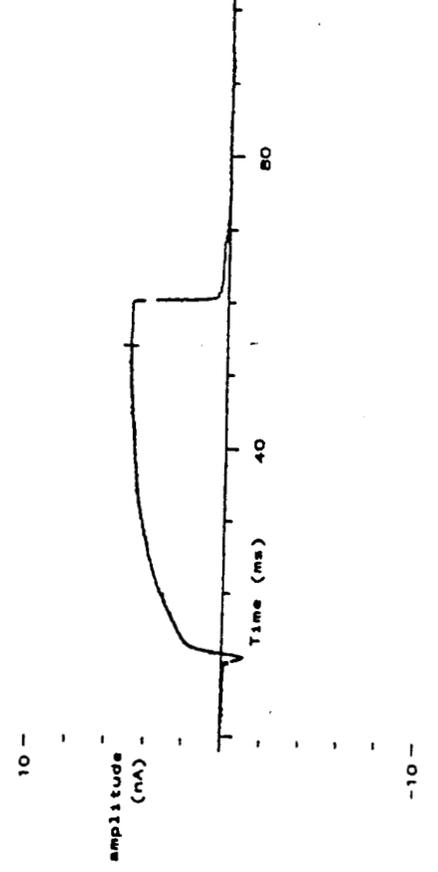
Figura 20. Cinética de activación para las corrientes llevadas a un potencial de mantenimiento de -70mv



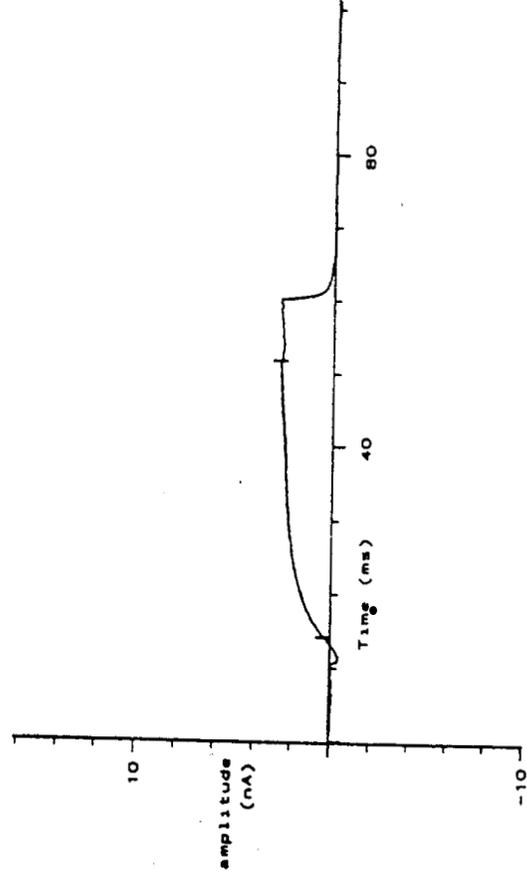
96730C10.BUO 1996/09/04 19:18:44 [00:00:00]
 Cinética de activación para un $v_h = -70\text{mv}$ y un pH de 7.2



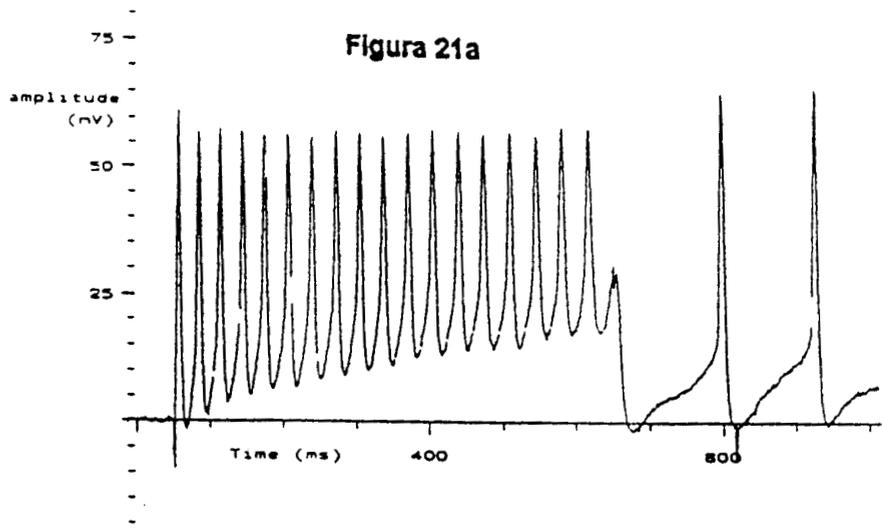
96815C39.BUO 1996/09/04 20:21:46 [00:00:00]
 Cinética de activación para un $v_h = -70\text{mv}$ y un pH de 7.0



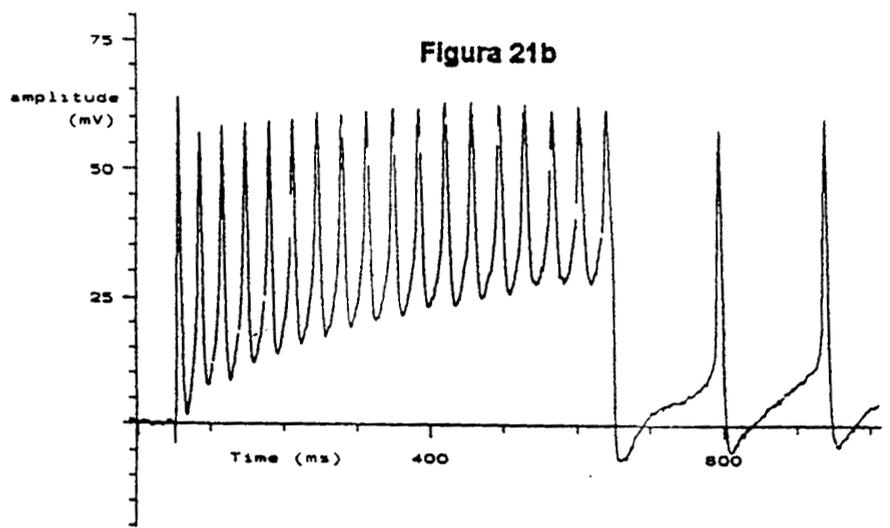
96731C05.BUO 1996/09/04 20:13:44 [00:00:00]
 Cinética de activación para un $v_h = -70\text{mv}$ y un pH de 6.5



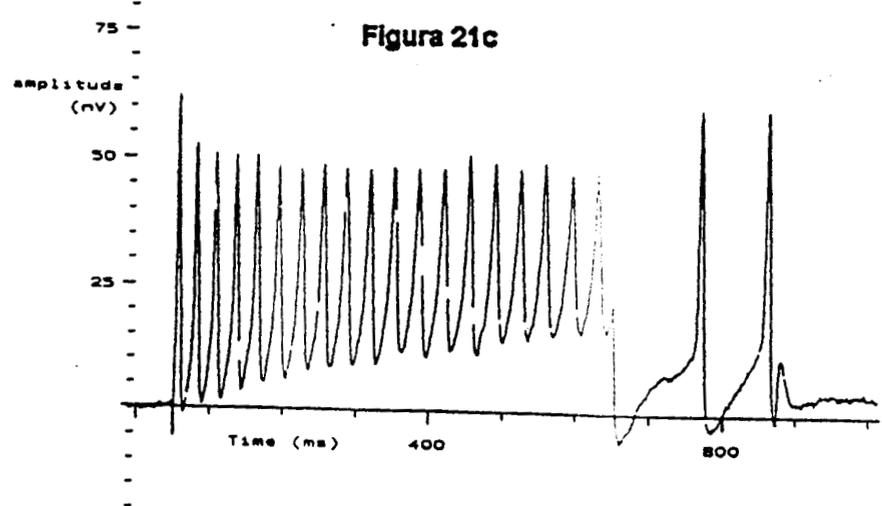
96815C27.BUO 1996/09/04 20:07:32 [00:00:00]
 Cinética de activación para un $v_h = -70\text{mv}$ y un pH de 6.14



96D12C12.DAT 1996/12/12 04:57:07 [02:19:48]
 Registro de prueba tomado antes de aplicar el DNP.



96D12C13.DAT 1996/12/12 05:01:36 [02:24:17]
 Registro tomado al aplicar 0.2mM de DNP.



96D12C17.DAT 1996/12/12 05:43:11 [03:05:52]
 Registro tomado cuando se lavó el DNP.

c.- Resultados obtenidos al lavar el DNP.

Con el fin de observar si el efecto del DNP era reversible, se volvió a aplicar nuevamente en el medio extracelular una solución de Van Harreveld normal (sol. 1 Tabla Y). Pasados los 42min se aplicó un pulso de estimulación de corriente y se observó que el efecto fué reversible con respecto a la magnitud de las repolarizaciones pero no con respecto a la amplitud de los potenciales de acción (58,81mv) y de la corriente de cola.

DISCUSIÓN

El estudio de los efectos del pH intracelular sobre la actividad eléctrica de las neuronas, ha sido estudiado en diversas especies (Allard y col., 1995; Meech y col., 1987).

Sin embargo, las técnicas que se han utilizado para generar los cambios del pH intracelular, no siempre han sido las más adecuadas. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Deitmer y Hans Peter Schneider sobre células gliales de sanguijuela (1995), se utilizaron técnicas de fijación de voltaje con dos microelectrodos; esta técnica no permite tener un control adecuado del contenido iónico intracelular debido al tamaño de las neuronas; en estos tipos de neuronas no se utilizó la técnica de fijación de voltaje en su variedad de célula completa, debido al gran diámetro de las neuronas, lo cual a su vez, no permite que se genere una buena fijación de voltaje.

El pH intracelular se puede modificar al utilizar fármacos que se aplican en el medio extracelular, como el cloruro de amonio, el DNP o el acetato, entre otros, ya que el problema que se presenta cuando se utilizan ácidos fuertes como el NH_4Cl o acetato en el medio extracelular, es que debe conocerse de antemano la magnitud exacta y curso temporal de la acidificación que se desea producir (Moody., 1984).

De la misma manera, se pueden utilizar fármacos, por ejemplo la amilorida, que afectan a los dos principales mecanismos de regulación del pH intracelular a nivel de la membrana celular, como es el caso del intercambiador $Na^+ - H^+$ y $Cl^- - HCO_3^-$ igualmente dependiente del gradiente de Na^+ . Otra técnica alternativa para modificar el pH intracelular es la inyección de protones a través de un microelectrodo.

Las técnicas mencionadas anteriormente no permiten tener un buen control del pH intracelular, por lo que es necesaria la inserción en la célula, de un microelectrodo que contenga una resina sensible a protones, de manera que se pueda controlar el valor del pH intracelular. Estos problemas se minimizan con la técnica de diálisis intracelular, en la cual, la solución intracelular utilizada contiene los iones y el pH deseados.

Para células pequeñas, la técnica de "patch clamp", en su configuración de célula completa, es la más adecuada para eliminar los problemas descritos anteriormente. Sin embargo, la técnica de diálisis intracelular también se puede implementar en otro tipo celular, como es el caso de la fibra muscular esquelética; en este caso se utiliza la técnica de la fibra cortada, diseñada por Hille (1990), en la cual, al hacer un corte en ambos extremos de la fibra, se puede perfundir el interior celular con la solución intracelular.

Uno de los problemas que se presentan al aplicar la técnica de fijación de voltaje en neuronas, es la pobre fijación de voltaje que se genera debido a la ausencia de simetría radial que hay en una neurona típica. Existen grupos de neuronas cuyos árboles dendríticos y axones se localizan en un mismo polo, emergiendo del soma, como un tronco común. Cuando se realiza un corte en este tronco, las neuronas se aproximan a una morfología esférica. Las neuronas del órgano-x de acocil, pertenecen a este grupo morfológico que, al realizarles el corte que hemos denominado como axotomía, se elimina el axón y la porción dendrítica, de tal manera que se obtiene una adecuada fijación de voltaje en el soma. Onetti y col., (1992), han descrito estos resultados y, utilizando la técnica de fijación de voltaje, revelaron la existencia en el soma de dos tipos de corrientes entrantes. Una corriente rápida mediada por iones Ca^{2+} y, una corriente lenta insensible a tetrodoxina (TTX) mediada por iones de Na^+ ; también observaron dos tipos de corrientes salientes mediadas por iones de K^+ . Una de ellas es similar a la descrita para el rectificador tardío que se bloquea con tetraetilamonio (TEA) y la otra que da origen a la corriente de I_A que es insensible a TEA pero que se bloquea con 4-aminopiridina (4-AP).

Nuestros resultados de prueba obtenidos para las corrientes de I_A y de I_K , son similares a los descritos en la literatura (Onetti y col., 1990) para una solución intracelular que tiene una concentración $9.08 \cdot 10^{-9} M$ de Ca^{2+} .

Una técnica que se utiliza ampliamente para la separación de corrientes iónicas, es la de separación por voltaje (conocida también como resta). Nuestros resultados muestran que a un potencial de mantenimiento de -70mv se obtuvieron las corrientes de I_A y de I_K , sin embargo, al despolarizar a la célula a un potencial de mantenimiento de -40mv sólo apareció la corriente de I_K , puesto que la corriente de I_A estaba inactivada.

Onetti y col. (1990), mostraron que las corrientes de I_A se inactivan a un potencial de mantenimiento de $\pm 50mv$, por lo que la magnitud y curso temporal de I_A se puede obtener al restar la corriente obtenida a un potencial de mantenimiento de -70mv con la corriente obtenida a un potencial de mantenimiento de -40mv, lo cual se ilustra en las figuras 12a y 12b.

Las corrientes de cola que se observaron cuando se llevó a la célula a un potencial de mantenimiento de -70mv y -40mv también presentan ciertas diferencias (figuras 11 y 12b) entre ellas. La deactivación para la corriente de I_K , es más lenta con respecto a la de I_A .

En el caso de la deactivación en I_A también se observa una corriente de cola entrante. Estas diferencias se pueden explicar por 2 factores:

- La deactivación más rápida de la corriente de cola de I_A se puede explicar por la inactivación de los canales que dan origen a la corriente de I_A , de tal manera que al final del pulso de fijación de voltaje, la proporción de canales abiertos es menor con respecto a la proporción de canales que se abrieron al inicio del pulso.

- El potencial de mantenimiento a -70mv , con el cual se puede observar I_A , está más cercano al potencial de equilibrio del K^+ que fué aproximadamente de -90mv bajo nuestras condiciones experimentales. Esto hace que la fuerza impulsora para un potencial de mantenimiento de -70mv sea menor con respecto a la fuerza impulsora para un potencial de mantenimiento de -40mv .

Sin embargo, lo anterior, no explica la corriente de cola entrante; ésta posiblemente esté mediada por la corriente de Na^+ . Cuando se llevó a la célula a un potencial de mantenimiento de -40mv , no se observaron corrientes de cola entrantes debido, probablemente, por la suma algebraica de la corriente entrante lenta de Na^+ y la corriente saliente de K^+ .

Para un potencial de mantenimiento de -70mv se observaron corrientes de Ca^{2+} pequeñas y con un curso temporal menos rápido que las corrientes de Ca^{2+} que aparecieron para un potencial de mantenimiento de -45mv (comparando figuras 10 y 11). El comportamiento que se observó en la corriente entrante para diferentes potenciales de mantenimiento, no es generado por una dependencia de los canales de Ca^{2+} para diferentes potenciales de mantenimiento, ya que los canales de Ca^{2+} inician su activación a potenciales más despolarizantes. Esto se puede deber a un mayor enmascaramiento de la corriente de Ca^{2+} por la corriente rápida de I_A a -70mv .

La relación corriente-voltaje (I-V) para las corrientes del estado estable en nuestros registros, se puede observar al aplicar rampas de fijación de voltaje, las cuales eliminan las corrientes transitorias dependientes del voltaje, como es el caso de las corrientes de Ca^{2+} , la corriente lenta de Na^+ y, la corriente de I_A . Al aplicar una rampa de -90mv a 50mv durante 2 segundos, se observó en nuestros registros de prueba (pH intracelular 7.2; pH extracelular 7.4) un comportamiento lineal para potenciales negativos (alrededor de -20mv). Sin embargo, para potenciales despolarizantes, no se conservaba una relación lineal en la curva I-V (ver gráfica 3). Este efecto se puede explicar por la activación de la corriente de I_K , ya que inicia su activación entre -20 y -10mv . La rampa de fijación de voltaje no logra eliminar esta corriente, puesto que la corriente de I_K no se inactiva por voltaje.

Por medio de la técnica de registro intracelular, al utilizar una solución extracelular Van Harreveld normal para la obtención de nuestros registros de prueba, se obtuvieron registros de potenciales de acción similares a los descritos por Onetti y col. (1990), tanto en células no axotomizadas como en células axotomizadas. En el caso de las células que no se axotomizaron, los potenciales de acción se generaron por la activación de los canales de Na^+ y de K^+ , que se encuentran en el cono axónico y en el axón. En el caso de las neuronas que se axotomizaron, los potenciales de acción se disparan por la activación de canales de K^+ y de Ca^{2+} , ya que estos últimos son insensibles a TTX y desaparecen en presencia de cadmio el cual, se sabe, bloquea todos los tipos de canales de Ca^{2+} que se conocen.

El pH intracelular es amortiguado por mecanismos que se encuentran en la membrana celular, como los intercambiadores $Na^+ - H^+$ y $Cl - HCO_3^-$, siendo este último también dependiente del Na^+ .

A nivel intracelular existen mecanismos de bombeo de protones como es el caso de las mitocondrias, las cuales utilizan la energía metabólica para bombear protones en su interior, en contra de su gradiente. El interior celular también cuenta con proteínas que unen protones de manera análoga a lo que sucede con los iones de H^+ . Todos estos mecanismos actúan en paralelo con el fin de mantener el pH intracelular constante debido a los efectos que ejerce su modificación en las células (Moody, 1984). También se ha postulado la existencia de un canal selectivo a H^+ , activado por voltaje (DeCoursey y col., 1995) que también participa en la regulación del pH intracelular.

A pesar de lo mencionado anteriormente, se ha observado que existen en condiciones fisiológicas variaciones en el pH intracelular que pueden fluctuar entre valores de pH de 6.1 a 8.0 (Pan, 1988; Moody, 1984). Estas alteraciones pueden ser resultantes del metabolismo celular (Pan, 1988), de la modulación de la actividad de los mecanismos de bombeo de H^+ (Mei-Lin Wu y col., 1994; Grinstein, 1981) o bien, pueden ser alterados en condiciones patológicas como en el caso de la hipoxia (Biscoe y col., 1990). También se han postulado alteraciones en el pH intracelular, localizadas en la vecindad inmediata de la membrana celular (lado interno), las cuales serían ocasionadas por corrientes de protones durante la generación de potenciales de acción (DeCoursey, 1995). Así mismo, éstas se pueden reflejar disminuyendo la actividad de los transportadores de H^+ a nivel de la membrana celular, lo cual podría ejercer profundos efectos sobre las propiedades eléctricas de las células excitables, como los descritos debido al efecto del pH ácido en otras preparaciones (Mei-Lin Wu, 1994; Allard, 1995; Meech, 1987) y los observados en el trabajo que se presenta.

La acción del pH ácido puede ser ocasionada por medio de dos mecanismos: mediante la acción directa de los protones sobre los canales iónicos (como lo que se describe en este trabajo) o bien, alterando la concentración de

Ca^{2+} intracelular, al desplazar los protones al Ca^{2+} de las proteínas que lo amortiguan.

En el trabajo que se presenta se intentó estudiar inicialmente, el efecto de la disminución de ATP intracelular sobre la actividad eléctrica de las neuronas del órgano-x por medio de la técnica de registro intracelular. Dado que Cole y Kenneth habían descrito un canal de K^+ que se abre cuando disminuyen los niveles de ATP intracelular en forma análoga a los que se han estudiado en otros tipos celulares, como es el caso de las células β del páncreas y fibras musculares esqueléticas (Hille, 1992). Para disminuir los niveles del ATP se utilizó el DNP, el cual se aplicó al medio extracelular a una concentración que, se sabe, desacopla la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria. El efecto que se esperaba observar era el de una disminución de la resistencia de la membrana celular, debido a una apertura de canales de K^+ ; sin embargo, como se muestra en las figuras 1a, 1b, y 1c, aparece el efecto opuesto en donde el cambio en la resistencia de la membrana viene acompañado de potenciales de Ca^{2+} de mayor amplitud. Este potencial se puede explicar debido al incremento en la resistencia de la membrana resultante de la aplicación del DNP, dado que ante una corriente entrante de la misma amplitud, el cambio de voltaje es de mayor magnitud al aumentar la resistencia de la membrana. La figura 1c, muestra que la acción del DNP es reversible al quitar el fármaco.

Este resultado inesperado, nos llevó a estudiar en la literatura las otras posibles fuentes de acción del DNP en el medio intracelular. Se encontró que actuaba acidificando el medio intracelular, lo cual se explica debido a que el DNP actúa como ionóforo de protones a nivel de la membrana mitocondrial, al penetrar en la célula. El mecanismo de desacople del DNP se describe por su acción ionófora abatiendo el gradiente de H^+ que se utiliza para la producción de ATP. De esta manera, la fuga de protones de las mitocondrias, acidifica el medio intracelular (Mitchell, 1966). Estos resultados nos llevaron a estudiar el efecto del pH ácido (dentro del rango fisiológico) sobre las corrientes de K^+ que dan origen a la resistencia de la membrana en estado estable y a la repolarización cuando se lleva a cabo un potencial de acción.

Nuestros resultados indican de manera análoga a lo ya descrito por otros autores, que hay un efecto del pH ácido sobre las corrientes de K^+ de I_1 , el cual disminuye la amplitud de las corrientes, modifica su cinética y su dependencia del voltaje (compárese figura 10 y 17 y gráficas 1 y 11, respectivamente).

El efecto del pH ácido que se observó en los experimentos realizados, es gradual, siendo mayor para un valor de pH de 6.14 y, a penas perceptible a un pH de 7.0. A pesar de que se ha descrito también una acción del pH ácido sobre las corrientes del rectificador tardío en algunos tipos celulares (Moody, 1984) como es el caso del axón gigante de calamar (Wanke y col., 1979), en neuronas de *Helix*

(Meech, 1979) y en músculo de crustáceo (Moody, 1980), en nuestros resultados no se observaron alteraciones significativas como las descritas por esos autores.

Al estudiar las corrientes del estado estable que dan origen al potencial de reposo, mediante la aplicación de rampas de fijación de voltaje desde el inicio del rompimiento de una área de la membrana, a un tiempo de decenas de segundos posterior, es decir, a un tiempo en donde ya se generó un estado estable en cuanto a la difusión de la solución intracelular de la micropipeta hacia el interior celular, se observó en nuestros registros que se generaba una disminución de la corriente entrante a potenciales de membrana negativos (región lineal) con un desplazamiento de la curva I-V hacia la izquierda. Este efecto se observó más claramente para pH de 6.5 y 6.14, en tanto que, para pH de 7.0 y 7.2, el desplazamiento no se realizó.

La disminución de la corriente entrante para pH de 6.5 y 6.14 no fue gradual como en el caso de la corriente de I_A , ya que se esperaba obtener una acentuada disminución en la corriente entrante y un mayor corrimiento hacia la izquierda de la curva I-V para pH más ácidos. Esto se puede explicar por un lado, al hecho de que exista una diferente sensibilidad a la concentración de H^+ entre las poblaciones de las neuronas del órgano-x o bien, que el efecto que se observa sea gradual con respecto a la concentración de H^+ y que, debido a la presencia de corriente de fuga que se genera entre la pipeta y la membrana celular (la corriente de fuga puede variar dependiendo de la calidad del sello que se forme) se quede enmascarando el efecto de la concentración de protones sobre los canales que dan origen a la corriente del estado estable. Para este caso, a diferencia de los registros con I_A , no es posible aplicar el protocolo de resta de la corriente de fuga.

Con respecto a la porción no lineal de la relación corriente-voltaje de las corrientes del estado estable, es posible que ésta última esté mediada por los canales del rectificador tardío, ya que éstos no presentan una inactivación. Además, en todos los casos, independientemente del valor del pH, la corriente se incrementaba en el tiempo.

La concentración de Ca^{2+} normal es de aproximadamente $10^{-7}M$ (García, 1993). En nuestras preparaciones la concentración de Ca^{2+} que se utilizó fué de menor magnitud con el fin de evitar la interferencia de los iones de Ca^{2+} . Por lo tanto, es posible que el efecto que se observa en la corriente saliente se deba a una disminución de los niveles de Ca^{2+} , ya que se ha descrito (Moody, 1984) que en algunos tipos celulares el incremento de Ca^{2+} puede afectar la corriente de K^+ de I_K disminuyéndola.

Basándonos en los resultados obtenidos por medio de la técnica de fijación de voltaje con respecto a la corriente I_A , la cual sabemos, se encarga tanto de repolarizar a la célula después de cada potencial de acción, como de retardar el disparo del siguiente potencial generado por una corriente entrante, se utilizó

posteriormente, la técnica de registro intracelular y se aplicó DNP en el medio extracelular con el fin de acidificar el interior celular.

En la figura 21b se observa que el DNP genera una disminución en la magnitud de la repolarización que sigue a cada potencial de acción. Este efecto es reversible pero con respecto a la amplitud de los potenciales de acción, no hay reversibilidad.

Los resultados obtenidos sobre la actividad eléctrica bajo los efectos del pH ácido, sugieren que existe en este tipo de neuronas un agente modulador de la actividad eléctrica mediado por variaciones en el pH intracelular que, al tornarse ácido en la vecindad inmediata de la membrana del lado interno, incrementaría su resistencia haciéndola más susceptible al disparo de potenciales de acción inducidos por la actividad sináptica y su acción sobre la corriente de I_A , incrementaría su excitabilidad, una vez evocados los potenciales de acción.

Las neuronas del órgano-x, presentan un patrón eléctrico variado (Onetti y col., 1992) en donde las neuronas pueden encontrarse en estado silente y sólo evocar potenciales de acción, cuando se inyecta corriente a través de un microelectrodo; pueden disparar potenciales de acción espontáneos aislados o en ráfagas. Tanto los cambios del pH intracelular generados por la modulación de los agentes que lo controlan, como son los factores metabólicos, podrían ser los causantes de estos diferentes patrones de actividad eléctrica, quedando esto último por demostrarse.

Los mecanismos de acción propuestos para explicar los efectos de los H^+ sobre los canales iónicos son los siguientes: por un lado, la unión del H^+ a un sitio del canal de tal manera que lo bloquea y por otro lado, debido a mecanismos alostéricos.

Existen varias teorías que explican la acción de los protones sobre los canales iónicos. La teoría de activación postula que los H^+ no disminuyen la conductancia en sí del canal sino que alteran su cinética de apertura. La teoría del potencial de superficie sugiere que los H^+ , podrían unirse a sitios cercanos al canal, del lado interno, apantallando cargas y, por lo tanto, afectando el potencial de superficie. La tercera teoría, la del grupo ácido, indica que los H^+ podrían actuar sobre un grupo ácido localizado en el interior del canal, de tal modo que se disminuye su conductancia. La teoría de activación ha sido eliminada con los trabajos presentados por Sigworth (1980b). A pesar de que los H^+ pueden alterar el potencial de superficie, la tercer teoría es la que se describe como más probable (Hille, 1990).

APENDICE A

CARACTERÍSTICAS DE LA MEMBRANA CELULAR

1.- Propiedades eléctricas de la membrana celular.

La membrana celular está constituida por una bicapa lipídica en la cual se encuentran inmersas, ya sea de manera parcial o completa, moléculas proteicas. A esta organización se le conoce como el modelo del mosaico fluido. Las proteínas que se encuentran en la membrana, juegan diversas funciones tales como canales iónicos, diversos transportadores, bombas de membrana, moléculas receptoras o moléculas de reconocimiento.

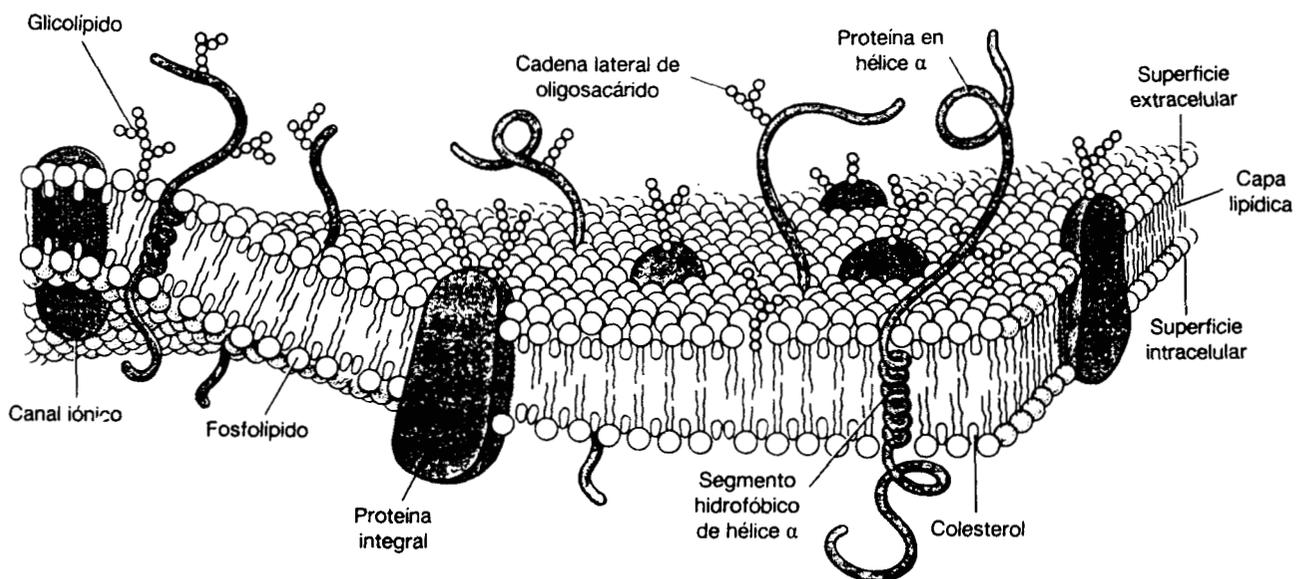


Figura 1.- Diagrama tridimensional del modelo de mosaico fluido de la membrana de Singer-Nicolson, MOSTRANDO LAS PROTEÍNAS globulares integrales en bebidas en la bicapa lipídica. Algunas de estas se muestran como canales iónicos; otras como glicoproteínas que llevan cadenas laterales de oligosacáridos, esenciales para el reconocimiento celular y la comunicación (Fuente R. Eckert et al; 1990 p70)

La bicapa lipídica de la membrana, es impermeable a los iones y puede separar cargas presentes bajo la forma de iones. Esta bicapa lipídica aporta a la membrana la propiedad de capacitancia de membrana. La capacitancia tiene la característica de almacenar cargas eléctricas cuando se aplica un voltaje a través de sus terminales. La bicapa lipídica es impermeable a los iones pero la carga eléctrica puede, de todas maneras, moverse de manera transitoria, a través de ésta bicapa lipídica, sin que los iones crucen realmente la membrana. Este movimiento de carga se produce debido a que los campos eléctricos de los iones pueden extenderse a lo largo de distancias cortas a través de una capa fina de material aislante y pueden, por lo tanto, interactuar a través de la membrana. Este movimiento de carga constituye una corriente capacitiva transitoria, aunque físicamente las cargas no crucen la membrana celular.

Ciertas proteínas actúan como canales iónicos y proporcionan una vía por medio de la cual los iones inorgánicos transportan cargas a través de la membrana. Los canales son proteínas que se encuentran colocadas en la bicapa lipídica de la membrana, se encuentran sujetos a otras proteínas o a elementos del citoesqueleto. Son moléculas grandes compuestas por aminoácidos los cuales se encuentran colocados en una o varias cadenas polipéptidas. Estos canales aportan la propiedad de conductancia de la membrana celular. La conductancia es una medida de la permeabilidad de la membrana para ciertos iones. Cuanto más grande sea la conductancia más cargas iónicas cruzarán la membrana por la vía de los canales iónicos por unidad de tiempo (bajo una fuerza eléctrica dada).

La membrana celular se puede representar por medio de un circuito eléctrico equivalente

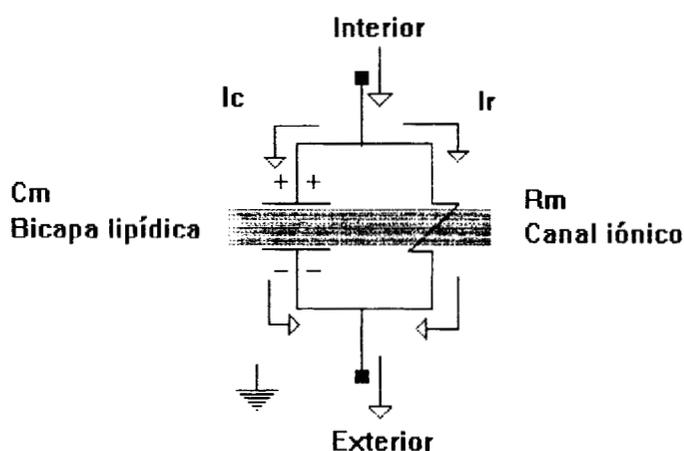


Figura 2.- Circuito eléctrico equivalente de la membrana celular mostrando la capacitancia de la membrana, C_m , y la resistencia R_m . Las flechas indican el flujo de la corriente capacitiva, I_c , y la corriente resistiva, I_r . (Fuente R. Eckert et al; 1990 p 106)

donde:

C_m = capacitancia de la membrana.

R_m = resistencia de la membrana.

I_c = Corriente capacitiva.

I_r = Corriente resistiva.

Si se aplica un pulso de voltaje constante a través de la membrana, entonces se puede despreciar el efecto producido por la capacitancia de la membrana, de tal manera que sólo se observa el efecto generado por la corriente iónica. Si se varia el voltaje, se generan corrientes capacitivas que se suman a la respuesta. La carga almacenada en la capacitancia de la membrana acompaña al potencial de reposo y cualquier cambio producido en el potencial a través de la membrana es acompañado por un cambio en la carga almacenada. Por lo tanto, si se aplica un pulso de corriente a la membrana, primero se carga la capacitancia y luego se modifica el voltaje de la misma.

Las propiedades de capacitancia y conductancia se pueden mostrar con el siguiente circuito:

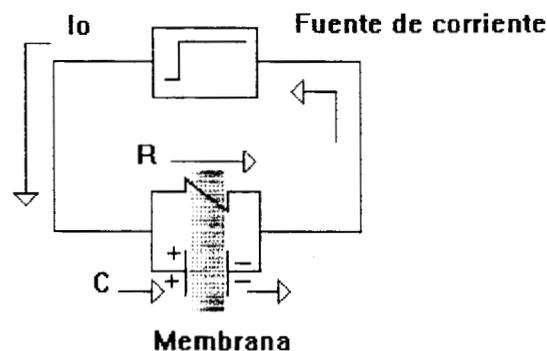


Figura 3.- Circuito equivalente de una membrana celular a través de la que pasa un pulso de corriente constante. (Fuente R. Eckert et al; 1990 p 109)

Este circuito representa una membrana celular a través de la cual se hace pasar un pulso de corriente constante. Haciendo el análisis del circuito se tiene (ver apéndice A):

$$I_0 = C \frac{dv}{dt} + \frac{v}{R} \quad (2)$$

$$v = I_0 R + e^{-\frac{t}{RC}} \quad (3)$$

Cuando $t = RC$ entonces

$$Vt = 0.63V_0 \quad (4)$$

El valor de t (s) que iguala a RC se conoce como la constante de tiempo τ del proceso (tiempo de carga del capacitor). Esta constante es independiente del valor de V y de la intensidad de la corriente y representa el tiempo requerido para que el voltaje, a través de un condensador cargado, alcance el 63% del valor asintótico V . Para las membranas biológicas el producto $R_M \cdot C_M$ de la capacitancia y la resistencia de la membrana respectivamente, se conoce como la constante de tiempo τ_M .

2.- Potencial de reposo.

Julio Bernstein (1902,1912) propuso que las células excitables estaban rodeadas por medio de una membrana permeable a los iones K^+ durante el reposo y que, durante la excitación, la permeabilidad de la membrana aumentaba con otras especies iónicas. Esta hipótesis de membrana explica la teoría del potencial de reposo.

El potencial de reposo de la célula se define como la diferencia de potencial que existe entre el interior de la membrana celular con respecto al exterior de la misma. Este potencial describe una condición en estado estable de la membrana, en donde no hay flujo de corriente a través de ésta. Está determinado por las concentraciones intracelulares y extracelulares de ciertos iones, a los cuales la membrana celular es permeable, y también está determinado por sus respectivas permeabilidades. Si una especie iónica es dominante, el potencial de reposo de la célula, estará cerca del potencial determinado por la ecuación de Nerst para dicho ion (ver apéndice A). En estado de reposo la membrana celular es muy permeable al K^+ , por lo que el potencial de reposo de la membrana se acerca mucho más al potencial del K^+ .

Al colocar un electrodo en el líquido intracelular y otro en el líquido extracelular, se puede registrar un potencial eléctrico a través de la membrana celular, el potencial de reposo. Si se define el potencial extracelular como cero, entonces un potencial negativo estacionario registrado por la punta de un electrodo (después de su entrada en el citoplasma) determinará el potencial de reposo de la membrana celular. Este potencial varía según el tipo de célula y puede alcanzar los -100mv . Existen dos factores que actúan sobre el potencial de reposo:

- la distribución desigual de los iones inorgánicos entre el interior y el exterior celular originados por el transporte activo en las bombas de la membrana y por la distribución de Donnan, y

- la presencia de canales iónicos abiertos en la membrana celular que son permeables a algunas especies iónicas presentes.

La facilidad con la que los distintos iones pueden cruzar la membrana, es la que determina sus contribuciones relativas al potencial que producen al difundir a través de la membrana. La probabilidad de que los iones de una especie crucen la membrana será proporcional al producto de su concentración a cada lado de la membrana y a la permeabilidad de la membrana para cada especie iónica en cuestión. Por medio de la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz se puede determinar el potencial de membrana de una célula (ver apéndice A). Esta ecuación está relacionada con la ecuación de Nerst y toma en cuenta la permeabilidad relativa de cada especie iónica.

(1)

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o}$$

- Ec. de Goldman-Hodgkin-Katz

donde R = constante de los gases.

T = temperatura.

F = constante de Faraday.

P = permeabilidad.

$[x]_i$ = concentración interna.

$[x]_o$ = concentración externa.

En esta ecuación se supone que el gradiente a través de la membrana y los coeficientes de difusión de los iones, son constantes. La permeabilidad de la membrana se determina como la facilidad que tienen los iones para atravesar la membrana celular.

Las membranas dejan pasar en grado diverso todos los iones inorgánicos, por lo que las células deben de poseer un modo de mantener sus iones inorgánicos a las concentraciones apropiadas. Esto se hace mediante el transporte activo (transporte que requiere de energía metabólica) de ciertos iones de manera que se contrarreste el movimiento a favor del gradiente generado por las diferentes concentraciones iónicas.

El transporte activo también contribuye directamente al potencial de reposo de algunas células. Esto se debe a que la cantidad de Na^+ expulsado de la célula por unidad de tiempo excede (3:2) la tasa de captación de K^+ por la bomba $Na^+ - K^+$. A causa de la relación de intercambio $3Na^+ : 2K^+$ la bomba $Na^+ - K^+$ contribuye directamente al potencial de reposo, eliminando cargas positivas del interior celular. Al mantener una concentración interna de K^+ elevada, la bomba contribuye indirectamente al potencial de reposo. Una fracción del potencial de reposo se debe a la elevada permeabilidad para el K^+ , además de que se lleva a cabo un bombeo de cargas positivas hacia el exterior celular.

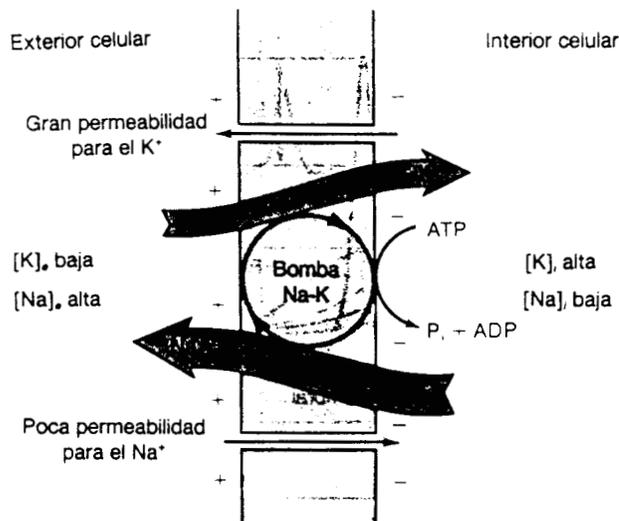


Figura 4 Esquema cinético para el transporte activo de Na^+ y K^+ mediante la bomba Na^+-K^+ . A causa de la relación de intercambio $3Na^+:2K^+$, la bomba puede contribuir directamente al potencial de reposo eliminando cargas positivas del interior celular. (Fuente R. Eckert et al; 1990 p 115)

3.- Potencial de acción.

La membrana de la célula tiene un potencial umbral mas allá del cual, la membrana produce una fuerte respuesta activa: el potencial de acción. El potencial de acción se genera por la activación de los canales de membrana permeables al Na^+ . Estos canales se pueden activar (abrir) al reducir la diferencia de potencial entre los dos lados de la membrana celular. Se observan dos tipos de respuestas:

- una respuesta eléctrica pasiva, cuando el cambio en el potencial de membrana se produce por una corriente de cualquier origen que fluye a través de la membrana celular. La corriente iónica que produce respuestas eléctricas pasivas a través de canales no excitables permite el paso de iones K^+ . Los canales de K^+ en reposo se encuentran abiertos en la membrana, y

- una respuesta eléctrica activa que depende de la actividad sobre las compuertas de los canales iónicos en respuesta a un estímulo. El estímulo se puede generar por medio de electricidad: se hace pasar corriente a través de la membrana, lo cual produce una despolarización en ésta y, si la duración y magnitud del estímulo es suficiente, puede dar lugar a un potencial de acción. También se puede generar un estímulo por medio de hormonas, por calor (receptores a la temperatura en la piel), por medio de agentes mecánicos (desplazamientos de las capas superficiales del corpúsculo de Pacini ó las células ciliales auditivas), por radiaciones electromagnéticas (bastones retinianos) y por substancia químicas.

La mayoría de los canales excitables presentan cierto grado de selectividad iónica, es decir, permiten que una especie iónica pase con mucha más facilidad que otra a través de la membrana celular.

El término "umbral", se utiliza para indicar la magnitud de la despolarización, a partir del potencial de reposo, que se requiere para iniciar un potencial de acción. Si el estímulo generado es subumbral, la respuesta se manifiesta como una excitación incompleta, ya que no se propaga a lo largo de la célula excitable y sólo se manifiesta a corta distancia del punto de estímulo y por lo tanto, no se genera un potencial de acción. A esta respuesta se le conoce como "respuesta local". Las respuestas locales se pueden observar en cualquier tipo de células, ya que esas respuestas dependen únicamente de la resistencia y de la capacitancia de la membrana celular.

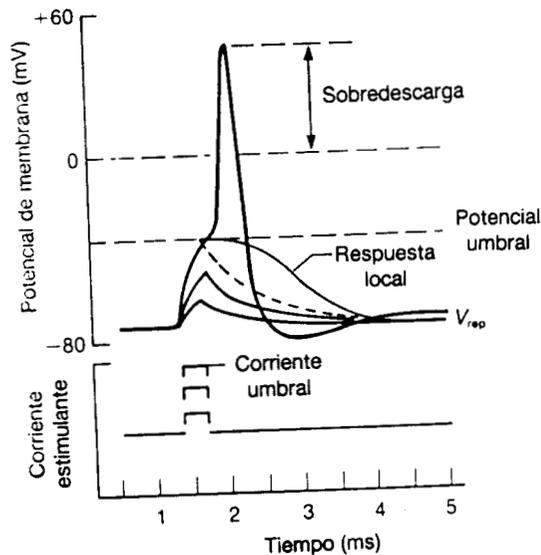


Figura 5.- Potencial de acción producido por la membrana de una célula nerviosa en respuesta a un estímulo despolarizante. (Fuente R. Eckert et al; 1990 p 115)

Una vez que se alcanza o se sobrepasa el umbral, característico para cada tipo de célula, se desencadena un potencial de acción. La fase de subida del potencial de acción es regeneradora debido a que el interior de la célula continúa ganando iones positivos. Al ganar iones positivos, el potencial de la célula se hace positivo hasta exceder el nivel del cero. A la parte del potencial de acción que se encuentra en la zona positiva, por encima del cero, se le llama sobredescarga. Como no existe un estado intermedio entre una respuesta local y el desencadenamiento de un potencial de acción, se dice que el potencial de acción cumple la ley del todo o nada.

Cuando se aplican dos estímulos subumbrales consecutivos, la respuesta local despolarizante del segundo estímulo se suma a la respuesta local del primero, de tal manera que la suma total de la despolarización alcanza el umbral y se produce la excitación. A este fenómeno se le conoce como suma.

Una característica del potencial de acción es la rápida repolarización que se produce a partir del pico de la sobredescarga. Si se aplica otro estímulo durante el período de despolarización (subida rápida del potencial de acción), cualquiera que sea su intensidad, la membrana no podrá generar otra respuesta. A este período se le conoce como período refractario absoluto. El período refractario absoluto se presenta durante un corto tiempo después del potencial de acción. Después de este período, la membrana de la célula entra al período refractario relativo. Durante este período es posible obtener potenciales de acción pero la intensidad del estímulo debe ser mayor, ya que el umbral de la membrana durante ese lapso aumenta y, el potencial de acción resultante presenta una amplitud menor.

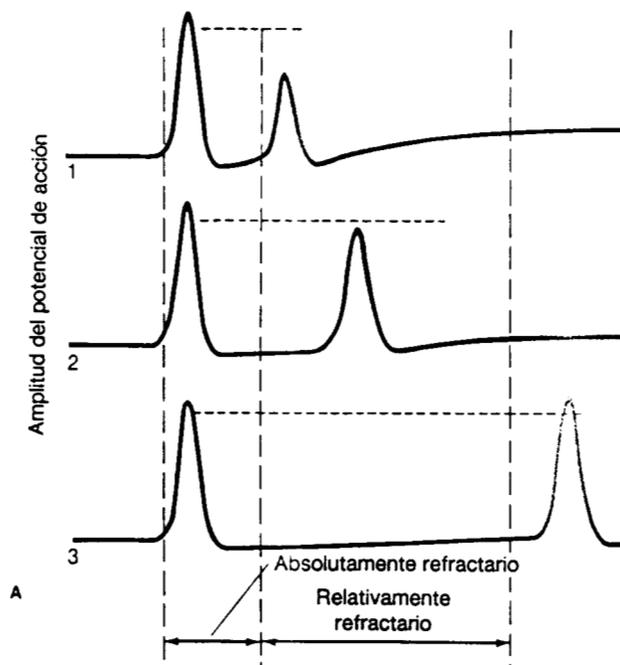


Figura 6.- A- Período refractario que sigue un potencial de acción. Se aplicaron 3 estímulos con intervalos crecientes entre ellos. Durante el período refractario relativo, trazos 1 y 2, el segundo potencial de acción fué menor y se tuvo que aplicar estímulos más intensos para alcanzar el umbral. El trazo 3 muestra que los estímulos que se aplicaron durante el período refractario absoluto no desencadenaron potenciales de acción (Fuente R. Eckert et al; 1990 p 116)

4.- Modelo de Hodgkin y Huxley:

La corriente eléctrica pasa a través de la membrana celular, ya sea cargando el capacitor de la membrana o, por el movimiento de iones a través de las resistencias que se encuentran en paralelo con el capacitor.

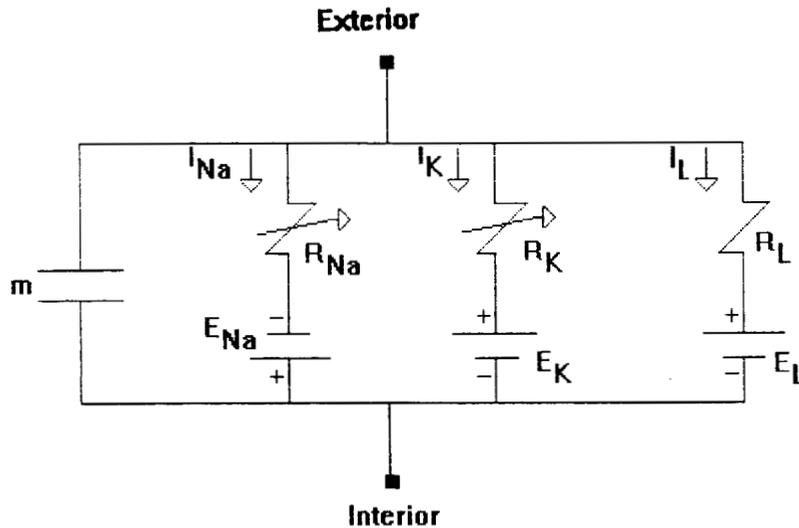


Figura 5 Circuito eléctrico que representa a la membrana celular. $R_{Na}=1/G_{Na}$; $R_K = 1/G_K$; $R_L=1/G_L$. R_{Na} y R_K varían en el tiempo, los otros componentes se mantienen constantes (Fuente Hodgkin y Huxley; 1952 p 501)

Hodgkin y Huxley (1952) separaron la corriente iónica en tres componentes: la corriente transportada por medio de iones de Na^+ , de iones de K^+ y una pequeña corriente de fuga I_L transportada por diversos iones. Cada componente de la corriente iónica se puede determinar por medio de una diferencia de potencial y un coeficiente de permeabilidad (cuyas dimensiones corresponden a la de la conductancia G). Hodgkin y Huxley sugirieron que G_{Na} , G_K eran funciones del tiempo y del potencial de membrana y que E_{Na} , E_K , E_L y C_m se mantenían como unas variables constantes.

Los efectos del potencial de membrana sobre la permeabilidad de la misma, se pueden resumir de la siguiente manera:

- primero se produce una despolarización, ésta genera un aumento en la conductancia al Na^+ y un pequeño incremento mantenido en la conductancia al K^+ .
- después estos cambios se pueden invertir al repolarizar a la membrana.

El resultado de mayor relevancia en los experimentos de Hodgkin y Huxley, muestra que existe una diferencia entre las constantes de tiempo de las corrientes de Na^+ y de K^+ . Las corrientes se pueden clasificar en una corriente de entrada temprana de Na^+ y una corriente de salida tardía de K^+ . La corriente de entrada temprana es seguida por la corriente de salida tardía la cual presenta una evolución más lenta. Con la corriente de entrada temprana, se observó que había una entrada de cargas positivas al interior de la célula, lo cual se puede relacionar con la subida del potencial de acción que se creía relacionada al flujo de entrada

de iones de Na^+ a través de la membrana. Por lo tanto, se puede suponer que la corriente de entrada temprana es transportada por iones de Na^+ .

La corriente de salida tardía corresponde a un flujo de salida de cargas positivas que ayuda a que el potencial de membrana vuelva al nivel del potencial de reposo. La corriente de salida tardía es transportada a través de la membrana por medio de iones de K^+ .

Durante una despolarización, la conductancia al Na^+ , aumenta rápidamente en un período de tiempo muy corto, alcanza un máximo y decae a un valor más bajo: se produce una activación rápida seguida de una inactivación más lenta (el incremento en la conductancia para una especie iónica causado por una despolarización se conoce como activación y su regreso al nivel de base, dependiente del tiempo, se conoce como inactivación). Si el potencial de membrana regresa al nivel del potencial de reposo durante el período de mayor conductancia al Na^+ , entonces, la conductancia al Na^+ cae rápidamente de manera exponencial. La conductancia al K^+ es más lenta que la del Na^+ , manteniéndose en un nivel estable sin activación durante los primeros 10ms que siguen a la despolarización. El incremento retardado en la conductancia de la membrana para el K^+ en respuesta a la despolarización, surge de la activación retardada de los canales iónicos selectivos para el K^+ . Cuando el potencial vuelve al potencial de reposo, la conductancia al potasio cae lentamente de manera exponencial.

En resumen, durante la despolarización, la permeabilidad de la membrana hacia los iones Na^+ se activa rápidamente y luego se inactiva, en tanto que la permeabilidad de la membrana hacia el K^+ , se activa después de cierto tiempo pero no se inactiva. Entre más grande sea la despolarización, más grandes y más rápidos serán los cambios en las conductancias al Na^+ y al K^+ .

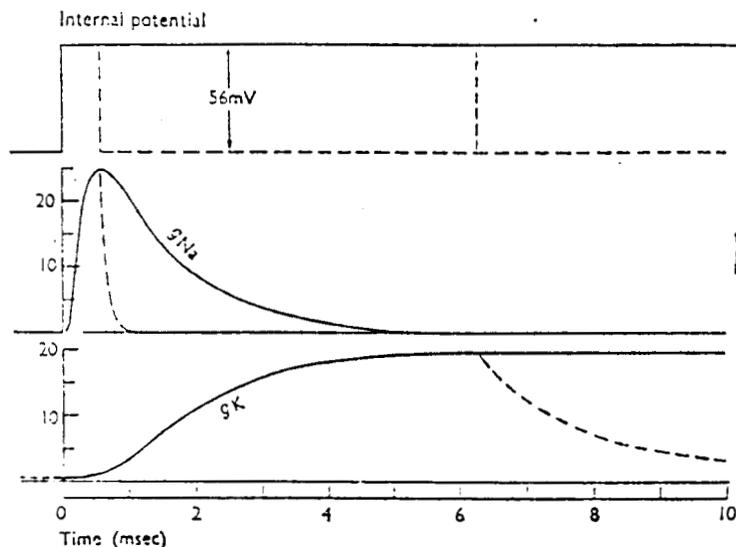


Figura 8.- Curso temporal de la conductancia al Na y al K al aplicar pulsos de -65 mv a -9mv en el axón gigante de calamar. Los trazos continuos muestran una despolarización continua. Los trazos muestran el regreso al potencial de reposo. La conductancia está en $\mu\text{mho.cm}^2$ Temperatura 8.5 °C (Fuente Hodgking y Huxley; 1952a, b)

Los cambios en la permeabilidad de la membrana se deben sobre todo, a los cambios producidos por el potencial de membrana y no a la corriente de membrana. El potencial de membrana es la variable que controla a la permeabilidad, lo cual se puede corroborar por el hecho de que la restauración del potencial normal de membrana hace que la conductancia del Na^+ y del K^+ decaigan a un valor muy pequeño en cualquier estado de la respuesta.

La dependencia en la conductividad de la membrana, permite suponer que la permeabilidad aumenta por el efecto eléctrico en la distribución u orientación de moléculas con carga o momento dipolar. Pequeños cambios en el potencial de membrana pueden causar alteraciones en el estado de la membrana, la cual está constituida completamente por moléculas eléctricas neutras.

El movimiento de los iones de Na^+ depende de la distribución de las partículas cargadas que no actúan como transportadores, pero que permiten que el Na^+ pase a través de la membrana, cuando estas partículas ocupan un lugar especial en la membrana. La velocidad del movimiento de las partículas que permiten la activación, determina la velocidad a la cual la conductancia del Na^+ alcanza su valor máximo. También se podría suponer que la disminución de la

conductancia del Na^+ se deba a un movimiento lento de otra partícula que bloquea el flujo de los iones de Na^+ cuando ésta partícula alcanza cierta posición en la membrana.

Para el caso del K^+ se puede suponer que existe un sistema completamente independiente y que difiere del mecanismo del Na^+ . En el caso del K^+ , las partículas en cuestión, tienen una afinidad hacia el K^+ y no hacia el Na^+ . El movimiento de estas partículas es más lento y éstas no se bloquean o no se inactivan.

1.-Modelo matemático de Hudgkin y Huxley para la conductancia del K^+ y del Na^+ .

a.- Conductancia al potasio.

Los iones de K^+ atraviesan la membrana sólo cuando 4 partículas ocupan una posición específica en ella (ver apéndice A). La probabilidad de que las partículas estén correctamente posicionadas es n^4 . Se asume que cada partícula se mueve de un estado permisible a uno no permisible. n representa la porción de partículas que se encuentran en una determinada posición (por ejemplo, en el interior de la membrana) y $1-n$ representa la porción de partículas que se encuentran en otra posición (por ejemplo, en el exterior de la membrana). α_n representa la velocidad de transferencia de fuera hacia adentro de la membrana mientras que β_n determina la velocidad de transferencia en la dirección opuesta.

La conductancia al K^+ está determinada por la relación:

$$G_K = \bar{G}_K \cdot n^4 \quad (5)$$

donde \bar{G}_K es la conductancia máxima del K^+ , n está determinada por la ecuación de primer orden:

$$1-n \xleftarrow{\beta_n} \xrightarrow{\alpha_n} n$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n \cdot (1-n) - n \cdot \beta_n \quad (6)$$

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_\infty - n}{\tau_n} \quad (7)$$

α_n y β_n son las constantes de velocidad (t^{-1}) y dependen solamente del voltaje. En estado de reposo $V = 0$, por lo que n está determinado por:

$$n = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n} \quad (8)$$

Los cambios de n en el tiempo se pueden calcular al resolver la ecuación (7).

$$\therefore n = n_{\infty} - (n_{\infty} - n_0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \quad (9)$$

donde n_0 es el valor de n para $t = 0$, τ_n y n_{∞} están dadas por:

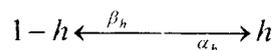
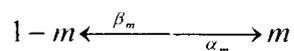
$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n} \quad \text{y} \quad n_{\infty} = \frac{\alpha_n}{(\alpha_n + \beta_n)} \quad (10,11)$$

a partir de las ecuaciones (10,11) se puede obtener el valor α_n y β_n

$$\alpha_n = \frac{n_{\infty}}{\tau_n} \quad \beta_n = \frac{(1 - n_{\infty})}{\tau_n} \quad (12,13)$$

b.- Conductancia al sodio.

Para determinar los cambios en la conductancia al Na^+ se supone que el Na^+ , está sujeto a dos variables, cada una de las cuales obedece a una ecuación de primer orden entre un estado permisible y uno no permisible para poder controlar al canal de Na^+ . La conductancia al Na^+ se considera proporcional al número de estados dentro de la membrana que ocupan de manera simultánea 3 partículas de activación y, que no están bloqueadas por una partícula de inactivación (ver apéndice A). m representa la cantidad de partículas que activan y que están en el interior de la membrana y $1 - m$ representa la cantidad de partículas que se encuentran al exterior. h es la cantidad de partículas que inactivan en el exterior de la membrana y $1 - h$ la cantidad de partículas en el interior. α_m , β_m , α_h , β_h , determinan las constantes de velocidad para pasar de un estado a otro. Estas constantes dependen del voltaje y no del tiempo.



$$G_{Na} = m^3 \cdot h \cdot \bar{G}_{Na} \quad (14)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m \cdot (1 - m) - m \cdot \beta_m \quad (15)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h \cdot (1 - h) - h \cdot \beta_h \quad (16)$$

donde $\overline{G_{Na}}$ representa la conductancia máxima del Na^+ . Para determinar los valores de m y de h se sigue el mismo procedimiento matemático que para la conductancia al K^+ . De esta forma se tiene que:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{m_\infty - m}{\tau_m} \quad (17)$$

$$\frac{dh}{dt} = \frac{h_\infty - h}{\tau_h} \quad (18)$$

donde
$$\tau_m = \frac{1}{\alpha_m + \beta_m} \quad m_\infty = \frac{\alpha_m}{\alpha_m - \beta_m} \quad (19,20)$$

$$\tau_h = \frac{1}{\alpha_h + \beta_h} \quad h_\infty = \frac{\alpha_h}{\alpha_h - \beta_h} \quad (21,22)$$

Por lo tanto:

$$\therefore m = m_\infty - (m_\infty - m_0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_m}\right) \quad (23)$$

$$\therefore h = h_\infty - (h_\infty - h_0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_h}\right) \quad (24)$$

donde m_0 y h_0 son los valores de m y h para $t = 0$. A partir de las ecuaciones (19,20,21,22) se pueden obtener los valores de α_m , β_m , α_h , β_h .

$$\alpha_m = \frac{m_\infty}{\tau_m} \quad \beta_m = \frac{(1 - m_\infty)}{\tau_m} \quad (25,26)$$

$$\alpha_h = \frac{h_\infty}{\tau_h} \quad \beta_h = \frac{(1 - h_\infty)}{\tau_h} \quad (27,28)$$

I.- Características de los tejidos.

a.- El tejido nervioso.

El sistema nervioso está constituido por células llamadas neuronas y una matriz de soporte formada por células llamadas neuroglías. Las neuronas se comunican entre si por medio de sinápsis a través de la hendidura sináptica.

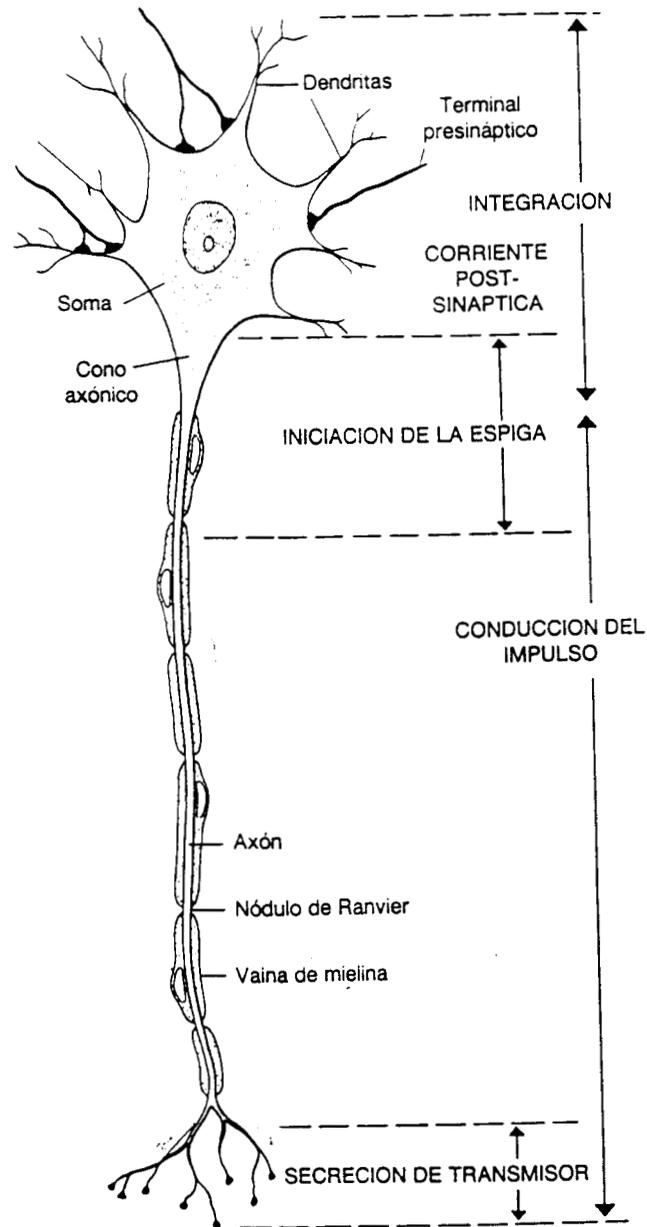


Figura 9.- Diagrama de una motoneurona

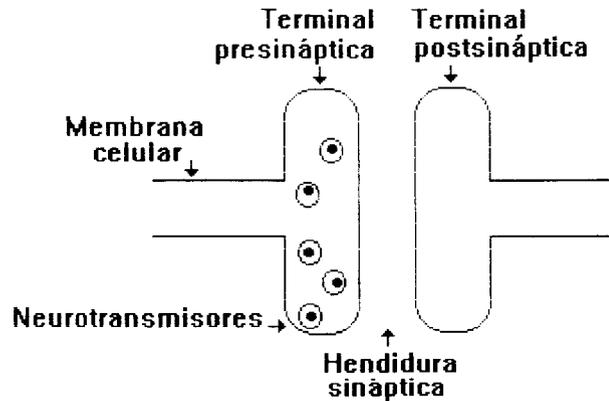


Figura 10.- Diagrama de una sinápsis

El comportamiento de una neurona depende de su forma anatómica y de las propiedades de la membrana superficial. Los canales iónicos no están uniformemente distribuidos sobre la superficie de la neurona. Se encuentran localizados en regiones diferentes que tienen funciones especializadas diversas. La membrana que se encuentra a lo largo del axón contiene los canales de Na^+ , dependientes del voltaje, y permite la conducción de impulsos. Los terminales neuronales contienen canales de Ca^+ , dependientes del voltaje, para la secreción de sustancias transmisoras (neurotransmisores) hacia la hendidura sináptica. La membrana de la dendrita y la del soma contienen canales que son activados por las sustancias transmisoras liberadas por los terminales de otras neuronas.

El tejido nervioso se caracteriza de los demás tejidos porque es capaz de generar una respuesta ante un estímulo aplicado. Existen varios mecanismos por medio de los cuales se puede generar un estímulo, por ejemplo, la luz actúa sobre los fotorreceptores en el ojo, los cambios en las sustancias químicas en el organismo actúan sobre las concentraciones intracelulares y extracelulares lo cual, a su vez, puede modificar el potencial de membrana y así desencadenar una respuesta eléctrica entre otros. La transmisión de la información entre células, se puede llevar a cabo ya sea por medio de sinapsis eléctricas o por sinapsis químicas.

La mayoría de las sinapsis en el sistema nervioso se lleva a cabo por medio de sinapsis química, es decir, que la neurona presináptica se comunica con la neurona postsináptica por medio de la liberación de una sustancia química denominada neurotransmisor.

Cada neurona integra las distintas señales sinápticas excitatorias e inhibitorias que recibe. La densidad y sensibilidad de los canales de Na^+ y K^+ determinan el umbral y la tasa de disparo producida en respuesta a una despolarización sináptica determinada. El potencial sináptico excitador que se genera en una dendrita, se propaga electrotonicamente (es decir que el flujo de

corriente se hace por atracción de signos) y se va haciendo menor según las propiedades de cable de la neurona. La densidad de los canales de Na^+ determina el umbral para generar el potencial de acción. De esta manera, aunque el potencial sináptico se hace menor conforme se va acercando al axón, el potencial de acción se origina en la zona del cono axónico en donde la densidad de los canales de Na^+ es mayor y por lo tanto, el umbral de descarga es menor.

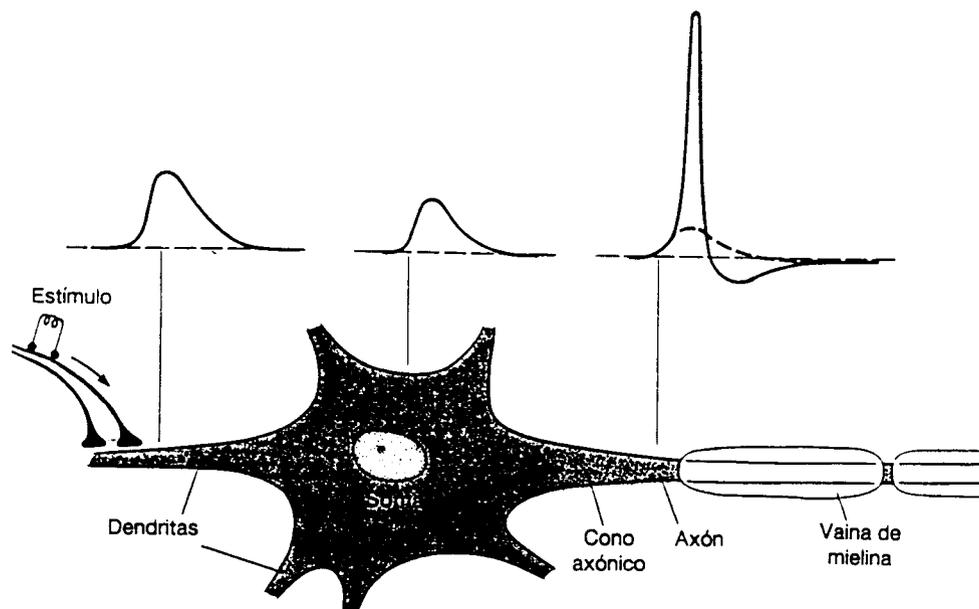


Figura 11.- Decaimiento espacial del potencial sináptico e iniciación del impulso. Un potencial sináptico excitador se origina en una dendrita, se propaga electrotonicamente y se hace menor con la distancia (Fuente R. Eket; 1990 p 165)

Al aplicar un estímulo se modifica el potencial de membrana, lo cual provoca un cambio en las concentraciones intra y extracelulares de la célula. Si el estímulo alcanza el umbral, se produce un potencial de acción que nace en la región del cono axónico y se desplaza a lo largo del axón hasta las terminales axónicas. En la sinapsis química la despolarización activa los canales de Ca^{2+} . El Ca^{2+} entra y actúa sobre las vesículas que contienen a los neurotransmisores. Estos son liberados, atraviesan la hendidura sináptica y se unen a moléculas receptoras que se encuentran localizadas en la membrana postsináptica de otra neurona. La unión de un transmisor activa canales iónicos asociados con las moléculas receptoras lo que permite que los iones, a los que se ha hecho permeable la membrana, transporten una corriente postsináptica. La corriente postsináptica genera un potencial postsináptico. Si el cambio de potencial sobrepasa el umbral, entonces se inicia otro potencial de acción.

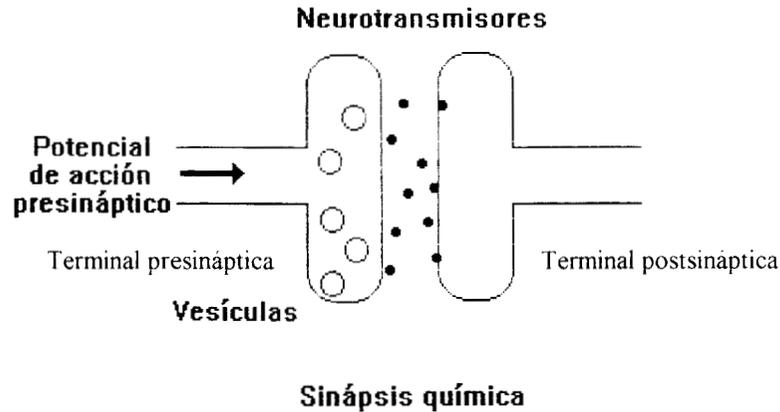


Figura 12.- La célula nerviosa presináptica segrega una señal química (neurotransmisor) que difunde a través de la hendidura sináptica y llega hasta la superficie de la célula postsináptica (Fuente R. Ecket; 1990 p 165)

En una sinapsis eléctrica, las membranas pre y postsinápticas forman uniones hendidas a través de las cuales la corriente puede fluir de un lado a otro de la célula. Puesto que la corriente puede fluir a través de las uniones hendidas, una señal eléctrica en la célula presináptica produce una señal similar, pero ligeramente atenuada, en la célula postsináptica debido a la conducción simple a través de la unión. Así, en una sinápsis eléctrica, la transferencia de información se lleva a cabo por medio de mecanismos puramente eléctricos sin intervención de un transmisor químico.

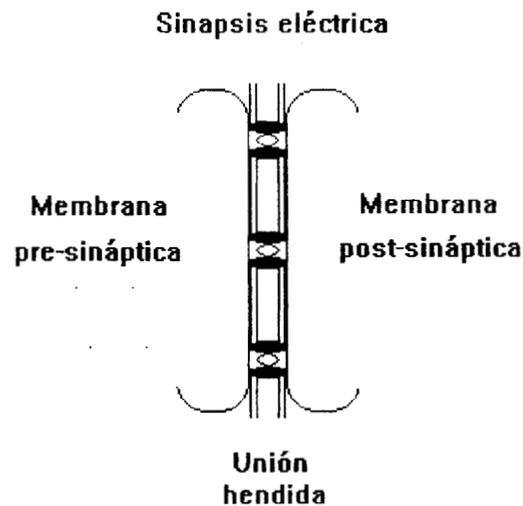


Figura 13.- Sinápsis eléctrica. Las uniones hendidas entre las membranas pre y postsinápticas permiten el flujo de corriente a través de canales intercelulares finos. La corriente procedente de la célula presináptica fluye hacia la célula postsináptica, despolarizándola.

Para la elaboración de este apéndice se utilizó la siguiente bibliografía:

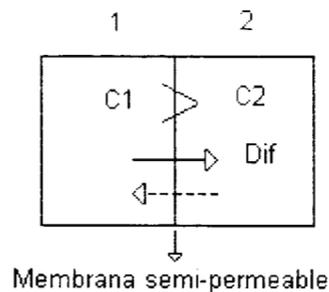
3; 5; 11; 13; 14; 20; 25; 26; 30; 33; 35.

APENDICE B

1.- Movimiento ionico a través de la membrana celular.

En condiciones fisiológicas el movimiento ionico a través de la membrana celular está relacionado tanto por el campo eléctrico, como por los gradientes de concentración. Esto se debe a que las concentraciones ionicas extracelulares e intracelulares son diferentes y además, porque el campo eléctrico, dentro de la membrana, es cero debido a la separación de cargas.

Supongamos que se tiene un compartimento separado por medio de una membrana semi-permeable. Cada compartimento tiene portadores de cargas eléctricas. Si la concentración C_1 de los portadores eléctricos es mayor que la concentración C_2 en el otro compartimento entonces aparecerá una corriente de difusión:



Por la ley de Fick para la difusión:

$$i_{DIF} = D \frac{dC}{dx} \quad (1)$$

donde

D = constante de difusión.

$\frac{dC}{dx}$ = gradiente de concentración.

Debido a la acumulación de cargas en uno de los compartimentos, se genera una corriente en sentido opuesto:

$$i_{DP} = \mu C \frac{dV}{dx} \quad (2)$$

donde

μ = movilidad de los portadores.

C = concentración de los portadores.

$\frac{dV}{dx}$ = potencial creado por la corriente de difusión.

Por medio de la ecuación de Nerst-Planck, se puede determinar el flujo de corriente iónica generada por los gradientes electroquímicos (gradiente de concentraciones y campo eléctrico):

$$J = \text{gradiente de difusión} + \text{gradiente por campo eléctrico}$$

de las ecuaciones (1,2) se obtiene la ecuación de Nerst-Planck para el flujo iónico:

$$J = -D \frac{dC}{dx} + \mu \cdot C \cdot \frac{dV}{dx} \quad (3)$$

por la relación de Einstein entre la movilidad y la difusión:

$$D = \mu \cdot \frac{k \cdot T}{q} \quad (4)$$

donde

μ = movilidad de los portadores.

T = temperatura (t + 273)

$k = \frac{R(\text{constante de los gases})}{N(\text{numero de avogadro})} = \text{constante de Boltzmann}$

despejando de la ecuación (4) el término de la movilidad y substituyendo el valor de k se tiene:

$$\mu = \frac{D \cdot q}{kT} = \frac{D \cdot q}{\frac{R}{N} \cdot T} = D \frac{q \cdot N}{RT} = D \frac{F \cdot Z}{R \cdot T} \quad (5)$$

donde

Nq es la carga eléctrica de un mol de sustancia = $F \cdot Z$

F = constante de Faraday.

Z = valencia.

al substituir la ecuación (5) en la ecuación (3) se obtiene el valor del flujo:

$$J = -D \frac{dC}{dx} + D \cdot C \cdot \frac{F \cdot Z}{R \cdot T} \cdot \frac{dV}{dx} = -D \cdot \left(\frac{dC}{dx} - C \cdot \frac{F \cdot Z}{R \cdot T} \cdot \frac{dV}{dx} \right)$$

$$J = -D \cdot \left(\frac{dC}{dx} - C \cdot \frac{F \cdot Z}{R \cdot T} \cdot \frac{dV}{dx} \right) \quad \text{Ecuación de Nerst-Planck (6)}$$

en condiciones de equilibrio: $J = 0$

$$J = -D \left(\frac{dC}{dx} - C \cdot \frac{F \cdot Z}{R \cdot T} \cdot \frac{dV}{dx} \right) = 0$$

$$D \frac{dC}{dx} = D \cdot C \cdot \frac{F \cdot Z}{R \cdot T} \cdot \frac{dV}{dx} \quad (7)$$

cuando se tienen soluciones electrolíticas con iones monovalentes (como iones de K^+ o Na^+), $Z=1$, integrando la ec.(7):

$$\int_{C_1}^{C_2} \frac{dC}{C} = \frac{F}{R \cdot T} \int_{V_1}^{V_2} dV \quad (8)$$

$$\ln \frac{C_2}{C_1} = \frac{F}{R \cdot T} (V_2 - V_1) = \Delta V \cdot \frac{F}{R \cdot T} \quad (9)$$

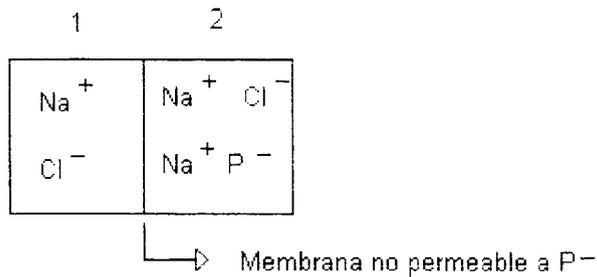
$$\Delta V = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{C_2}{C_1} \quad (10)$$

$$\Delta V = 0.058 \log \frac{C_2}{C_1} \text{ volts} \quad \text{Ecuación de Nerst} \quad (11)$$

La relación entre las concentraciones y el potencial de membrana fué deducida por W.Nerst a partir de las leyes de los gases y establece que la relación entre el potencial de equilibrio para un ion en particular, es proporcional al logaritmo de la relación de concentraciones de este ion entre dos compartimentos. Sin embargo, la ecuación de Nerst solo es válida para sistemas en estado estable.

La membrana celular en estado de reposo es mucho más permeable al K^+ que al Na^+ . Estas diferencias en la permeabilidad generan un gradiente de concentración iónico. Dado que esta distribución de los iones no requiere del consumo de energía, se le conoce como una distribución pasiva. Si la membrana celular es permeable a varias especies iónicas y si estos iones no presentan transporte activo se dice que los iones están distribuidos de forma pasiva y el potencial de membrana para esa célula está dado por la ecuación de Goldman-Hodgkin y Katz.

A partir de la ec. de Nerst se puede determinar la distribución pasiva de iones y el equilibrio de Donnan. Esta ecuación establece que la distribución de solutos difusibles separados por medio de una membrana semipermeable se distribuye de manera desigual.



A partir de la ecuación de Nerst:

$$\Delta V = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl^-]_2}{[Cl^-]_1} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na^+]_1}{[Na^+]_2} \quad (12)$$

$$[Cl^-]_2 * [Na^+]_2 = [Na^+]_1 * [Cl^-]_1 \quad (13)$$

Distribución de Donnan

Por medio de la ecuación de Nerst-Planck se puede estudiar el comportamiento del movimiento iónico a través y dentro de la membrana celular, lo cual proporciona el modelo establecido por Goldman-Hodgkin-Katz. Este modelo está basado en tres postulados:

- el movimiento iónico a través de la membrana obedece a la ecuación de Nerst-Planck.
- los iones se mueven a través de la membrana de manera independiente.
- el campo eléctrico E en la membrana es constante, es decir $E = -\frac{dV}{dx} = \frac{E}{d}$

donde E es el potencial transmembranal y d es el espesor de la membrana.

substituyendo el valor de E en la ecuación (6) se tiene:

$$J = -D \cdot \left(\frac{dC}{dx} - C \cdot \frac{F \cdot Z \cdot E}{R \cdot T \cdot d} \right)$$

$$\frac{dC}{dx} = -\frac{J}{D} + \frac{E \cdot F}{R \cdot T \cdot d} \cdot C \quad (14)$$

$$dx = \frac{dC}{-\frac{J}{D} + \frac{E \cdot F}{R \cdot T \cdot d} \cdot C} \quad (15)$$

integrando la ecuación (15) de d hasta 0:

$$\int_0^d dx = \int_0^d \frac{dC}{-\frac{J}{D} + \frac{E.F}{R.T.d} \cdot C} \quad (16)$$

$$d = \frac{R.T.d}{E.F} \ln \frac{\frac{E.F}{R.T.d} \cdot C_d - \frac{J}{D}}{\frac{E.F}{R.T.d} \cdot C_0 - \frac{J}{D}} \quad (17)$$

$$\ln \frac{\frac{E.F}{R.T.d} \cdot C_d - \frac{J}{D}}{\frac{E.F}{R.T.d} \cdot C_0 - \frac{J}{D}} = \frac{E.F}{R.T} \quad (18)$$

$$\frac{\frac{E.F}{R.T.d} \cdot C_d - \frac{J}{D}}{\frac{E.F}{R.T.d} \cdot C_0 - \frac{J}{D}} = e^{\left(\frac{E.F}{R.T}\right)} \quad (19)$$

$$\frac{\frac{D}{J} \left(\frac{E.F}{R.T.d} \cdot C_d - \frac{J}{D} \right)}{\frac{D}{J} \left(\frac{E.F}{R.T.d} \cdot C_0 - \frac{J}{D} \right)} = \frac{\frac{E.F.D}{J.R.T.d} \cdot C_d - 1}{\frac{E.F.D}{J.R.T.d} \cdot C_0 - 1} = e^{\left(\frac{E.F}{R.T}\right)} \quad (20)$$

$$\frac{E.F.D}{J.R.T.d} \cdot C_d - 1 = e^{\left(\frac{E.F}{R.T}\right)} \cdot \left(\frac{E.F.D}{J.R.T.d} \cdot C_0 - 1 \right) \quad (21)$$

$$\frac{E.F.D}{J.R.T.d} \cdot C_d - \frac{E.F.D}{J.R.T.d} \cdot C_0 e^{\left(\frac{E.F}{R.T}\right)} = 1 - e^{\left(\frac{E.F}{R.T}\right)} \quad (22)$$

$$\frac{E.F.D}{J.R.T.d} \cdot \left(C_d - C_0 e^{\left(\frac{E.F}{R.T}\right)} \right) = 1 - e^{\left(\frac{E.F}{R.T}\right)} \quad (23)$$

$$J = \frac{E.F.D}{R.T.d} \cdot \frac{C_d - C_0 e^{\left(\frac{E.F}{R.T}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{E.F}{R.T}\right)}} \quad (24)$$

La ecuación (24) determina la ecuación en su forma general para el flujo iónico en la membrana celular.

El flujo molar se puede determinar como:

$$J = -P\Delta[C] \quad (25)$$

donde J = flujo molar ($\text{mol} / \text{cm}^2 \cdot \text{sec}$).

P = permeabilidad de la membrana.

Si se considera en la ley de Fick para la difusión ($i_{\text{DIF}} = D \frac{dC}{dx}$) que C se comporta de manera lineal con respecto a x entonces, $\frac{dC}{dx}$ se puede escribir como

$\frac{\Delta[C]}{d} \cdot \beta$ donde d y β son el coeficiente de partición y el espesor de la membrana respectivamente. Si consideramos $D = D^*$ (donde D^* es el coeficiente de difusión) y sustituimos estas variables en la ecuación (25)

$$J = \frac{\Delta[C] \beta D^*}{d} \quad \text{donde} \quad P = \frac{D^* \beta}{d} \quad (26,27)$$

substituyendo la ecuación (4) en la ecuación (27) se obtiene la permeabilidad:

$$P = \frac{\beta \cdot \mu^* \cdot R \cdot T}{d \cdot F} \quad (28)$$

La corriente iónica está relacionada con el flujo por medio de la ecuación:

$$I = F \cdot J \quad (29)$$

substituyendo las ecuaciones (24,27) en la ecuación (29) y considerando que las concentraciones iónicas en la membrana son proporcionales a las concentraciones internas y externas se obtiene la ecuación general para la corriente:

$$I = \frac{P \cdot E \cdot F^2}{R \cdot T} \cdot \frac{C_o - C_i \cdot e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}} \quad (30)$$

Por lo tanto las corrientes de K^+ , Na^+ , y de Cl^- , están determinadas respectivamente como:

$$I_K = \frac{P_K \cdot E \cdot F^2}{R \cdot T} \cdot \frac{[K]_o - [K]_i \cdot e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}} \quad (31)$$

$$I_{Na} = \frac{P_{Na} \cdot E \cdot F^2}{R \cdot T} \cdot \frac{[Na]_o - [Na]_i \cdot e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}} \quad (32)$$

$$I_{Cl} = \frac{P_{Cl} \cdot E \cdot F^2}{R \cdot T} \cdot \frac{[Cl]_i - [Cl]_o \cdot e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}} \quad (33)$$

para una célula que es permeable a los iones de K^+ , Na^+ , y de Cl^- , la corriente total está dada por:

$$I = I_K + I_{Na} + I_{Cl} \quad (34)$$

$$I = \frac{P_K \cdot E \cdot F^2}{R \cdot T} \cdot \frac{[K]_o - [K]_i \cdot e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}} + \frac{P_{Na} \cdot E \cdot F^2}{R \cdot T} \cdot \frac{[Na]_o - [Na]_i \cdot e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}} + \frac{P_{Cl} \cdot E \cdot F^2}{R \cdot T} \cdot \frac{[Cl]_i - [Cl]_o \cdot e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}} \quad (35)$$

en estado estable $I = 0$

$$I = \frac{E \cdot F^2}{R \cdot T} \left[\frac{P_K \left([K]_o - [K]_i \cdot e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)} \right)}{1 - e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}} + \frac{P_{Na} \left([Na]_o - [Na]_i \cdot e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)} \right)}{1 - e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}} + \frac{P_{Cl} \left([Cl]_i - [Cl]_o \cdot e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)} \right)}{1 - e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)}} \right] = 0 \quad (36)$$

$$e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)} \cdot (P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_o) = P_K [K]_o + P_{Na} [Na]_o + P_{Cl} [Cl]_i \quad (37)$$

$$e^{\left(\frac{E \cdot F}{R \cdot T}\right)} = \frac{P_K [K]_o + P_{Na} [Na]_o + P_{Cl} [Cl]_i}{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_o} \quad (38)$$

*

$$\frac{E.F}{R.T} = \ln \frac{P_K[K]_o + P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_o} \quad (39)$$

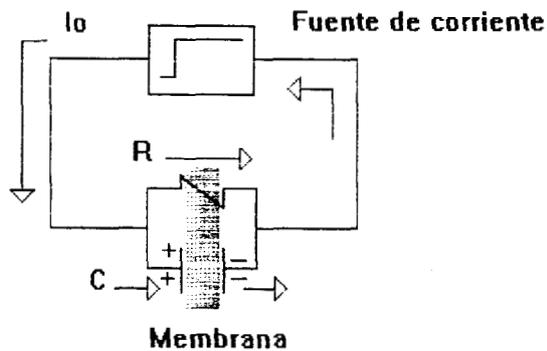
$$Vm = \frac{R.T}{F} \ln \frac{P_K[K]_o + P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_o} \quad (40)$$

Ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz

La ecuación 40 es la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz para el voltaje y determina el potencial de membrana celular en reposo.

2.- Circuito equivalente de la membrana celular.

Este circuito representa una membrana celular a través de la cual se hace pasar un pulso de corriente constante. Haciendo el análisis del circuito se tiene:



$$I_0 = C \cdot \frac{dv}{dt} + \frac{1}{R} \cdot v \quad (1)$$

$$\frac{dv}{dt} + \frac{1}{RC} \cdot v = \frac{I_0}{C} \quad (2)$$

$$\frac{1}{RC} \cdot v = \frac{I_0}{C} - \frac{dv}{dt} \quad (3)$$

$$\frac{1}{RC} \cdot v - \frac{I_0}{C} = - \frac{dv}{dt} \quad (4)$$

$$\frac{dv}{dt} = - \left(\frac{1}{RC} \cdot v - \frac{I_0}{C} \right) \quad (5)$$

$$\frac{dv}{dt} = -\frac{v - I_0 R}{RC} \quad (6)$$

$$\int \frac{dv}{v - I_0 R} = -\int \frac{dt}{RC} + k \quad (7)$$

$$\ln(v - I_0 R) = -\frac{t}{RC} + k \quad (8)$$

$$v - I_0 R = e^{\left(-\frac{t}{RC} + k\right)} \quad (9)$$

cuando $t \rightarrow \infty$ entonces $v = I_0 \cdot R$

para $t = 0$, $v = 0$, substituyendo estas condiciones en la ecuación (9) se tiene

$$0 - I_0 \cdot R = e^0 \cdot e^k \Rightarrow e^k = -I_0 \cdot R \quad (10)$$

$$v = I_0 \cdot R + \left(e^{-\frac{t}{RC}} - I_0 \cdot R \right) \quad (11)$$

$$\therefore v = I_0 \cdot R \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{RC}} \right) \quad (12)$$

Cuando $t = RC$ entonces

$$Vt = 0.63V_0 \quad (11)$$

3.-Corriente iónica total que circula a través de la membrana celular.

La energía eléctrica almacenada a través de la membrana por la actividad de las bombas metabólicas, se puede liberar selectivamente bajo la forma de corrientes iónicas para producir señales eléctricas de los tejidos excitables.

La corriente iónica es proporcional a :

- la fuerza electromotriz (fem, es decir el voltaje) que actúa sobre los transportadores de carga, y
- la conductancia de la membrana para la corriente iónica en cuestión (determinada por el número y conductancias de los canales iónicos abiertos).

$$fem(x) = Vm - Eix \quad (1)$$

donde

V_m = potencial de membrana.
 E_x = potencial de equilibrio de x

El potencial de equilibrio de x está determinado por la ecuación de Nerst:

$$E_x = 0.058 \log \left(\frac{[X]_i}{[X]_o} \right) \quad (2)$$

donde:

$[X]_i$ = concentración de iones x en el interior de la membrana.
 $[X]_o$ = concentración de iones x en el exterior de la membrana

Definiendo la corriente:

$$I_x = G_x \cdot \text{fem}(x) \quad (3)$$

donde, G_x es la conductancia para una especie iónica x determinada.

Por lo tanto substituyendo la ecuación (1) en la ecuación (3):

$$I_x = G_x (V_m - E_x) \quad (4)$$

El cambio en las conductancias depende solamente del voltaje y del tiempo y nó en las concentraciones de los iones en cuestión, en la dirección o en la magnitud del flujo de corriente.

Los cambios en el valor de la conductancia iónica G_x , son los responsables de la modulación de la corriente transportada por la especie iónica x . De esta forma, los cambios en las conductancias, son los que controlan las corrientes eléctricas transportadas a través de las membranas biológicas.

La corriente de la membrana se puede descomponer en varios componentes: la corriente transportada por iones Na^+ (I_{Na}), por iones K^+ (I_K) y la corriente de fuga compuesta por otros iones (I_l). Por lo tanto:

$$I_i = I_{Na} + I_K + I_l \quad (5)$$

Si substituímos en la ecuación (4) cada componente de la corriente, tenemos que las corrientes de Na^+ , K^+ y Cl^- se pueden expresar de manera individual como:

$$\begin{aligned} I_{Na} &= G_{Na} \cdot (V_m - E_{Na}), \\ I_K &= G_K \cdot (V_m - E_K), \\ I_l &= \bar{G}_l \cdot (V_m - E_l), \end{aligned}$$

donde E_{Na} y E_K son los potenciales de equilibrio para los iones de Na^+ y K^+ respectivamente. I_l es el potencial al cual la corriente de fuga a los otros iones es cero. Estas ecuaciones se pueden reescribir como:

$$I_K = G_{Na} \cdot (Vm - V_{Na}) \quad (6)$$

$$I_K = G_K \cdot (Vm - V_K), \quad (7)$$

$$I_l = \bar{G}_l \cdot (Vm - V_l) \quad (8)$$

Como se constató anteriormente, la corriente total que fluye a través de la membrana se puede dividir en una corriente capacitiva y una corriente iónica. De este modo se tiene:

$$I = C_M \frac{dV}{dT} + I_i \quad (9)$$

donde

I = corriente total de la membrana.

C_M = capacitancia de la membrana por unidad de área.

V = cambio del potencial de membrana con respecto al valor del potencial de reposo.

T = tiempo.

I_i = corriente iónica.

substituyendo la ecuación (5) por las ecuaciones (6,7,8) se tiene el valor de la corriente en función del voltaje y de las conductancias para cada ion:

$$I_i = G_{Na} \cdot (Vm - V_{Na}) + G_K \cdot (Vm - V_K) + \bar{G}_l \cdot (Vm - V_l) \quad (10)$$

substituyendo en la ecuación anterior las ecuaciones para las conductancias del Na^+ ($G_{Na} = \bar{G}_{Na} \cdot m^3 \cdot h$) y del K^+ ($G_K = \bar{G}_K \cdot n^4$), se obtiene el valor total de la corriente ionica que fluye a través de la membrana celular:

$$I = C_M \cdot \frac{dV}{dt} + \bar{G}_K \cdot n^4 \cdot (Vm - V_K) + \bar{G}_{Na} \cdot m^3 \cdot h \cdot (Vm - V_{Na}) + \bar{G}_l \cdot (Vm - V_l) \quad (11)$$

4.- Modelo de Hodgkin y Huxley.

La conductancia al potasio está determinada por la relación:

$$G_K = \bar{G}_K \cdot n^4 \quad (1)$$

donde \bar{G}_K es la conductancia máxima del potasio y n está determinada por la ecuación de primer orden:

$$1 - n \xleftarrow{\beta_n} \xrightarrow{\alpha_n} n$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1 - n) - n\beta_n \quad (2)$$

α_n y β_n son las constantes de velocidad (t^{-1}) y dependen solamente del voltaje. la ecuación (2) se puede reescribir como:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n - n \cdot \alpha_n - n \cdot \beta_n \quad (3)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n - n \cdot (\alpha_n + \beta_n) \quad (4)$$

En el estado de reposo $V = 0$, n tiene un valor determinado por:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n - n \cdot (\alpha_n + \beta_n) = 0 \quad (5)$$

$$\alpha_n - n \cdot (\alpha_n + \beta_n) = 0 \quad (6)$$

$$\alpha_n = n \cdot (\alpha_n + \beta_n) \quad (7)$$

$$n = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n} \quad (8)$$

reescribiendo la ecuación (4):

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n - n \cdot (\alpha_n + \beta_n) \quad (9)$$

multiplicamos (9) por $\frac{\alpha_n + \beta_n}{\alpha_n + \beta_n}$

$$\frac{dn}{dt} = (\alpha_n - n \cdot (\alpha_n + \beta_n)) \cdot \frac{\alpha_n + \beta_n}{\alpha_n + \beta_n} \quad (10)$$

$$\frac{dn}{dt} = \frac{\alpha_n \cdot (\alpha_n + \beta_n)}{(\alpha_n + \beta_n)} - \frac{n \cdot (\alpha_n + \beta_n) \cdot (\alpha_n + \beta_n)}{(\alpha_n + \beta_n)} \quad (11)$$

$$\frac{dn}{dt} = \frac{\alpha_n (\alpha_n + \beta_n)}{(\alpha_n + \beta_n)} - n (\alpha_n + \beta_n) \quad (12)$$

$$\frac{dn}{dt} = (\alpha_n + \beta_n) \left(\frac{\alpha_n}{(\alpha_n + \beta_n)} - n \right) \quad (13)$$

$$\frac{dn}{dt} = \frac{\left(\frac{\alpha_n}{(\alpha_n + \beta_n)} - n \right)}{\frac{1}{(\alpha_n + \beta_n)}} = \frac{n_x - n}{\tau_n} \quad (14)$$

donde $\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n}$ y $n_x = \frac{\alpha_n}{(\alpha_n + \beta_n)}$ (15,16)

Los cambios de n en el tiempo se pueden calcular al resolver la ec (14).

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_x - n}{\tau_n}$$

$$\frac{dn}{n_x - n} = \frac{dt}{\tau_n} \quad (17)$$

$$\int \frac{dn}{n_x - n} = \int \frac{dt}{\tau_n} \quad (18)$$

$$\therefore n = n_x - (n_x - n_0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \quad (19)$$

donde n_0 es el valor de n para $t = 0$.

a partir de las ec (15,16) se puede obtener el valor α_n y β_n

$$\alpha_n = \frac{n_x}{\tau_n} \quad (20)$$

$$\beta_n = \frac{(1 - n_x)}{\tau_n} \quad (21)$$

Hudgkin y Huxley hicieron una estimación para determinar la cantidad de partículas que se necesitaban para abrir un solo canal de sodio. Supusieron que la conductancia al sodio era proporcional al número de estas partículas en el interior de la membrana pero no en el exterior.

$$G_{Na} = \bar{G}_{Na} P_i \quad (22)$$

$$P_i + P_o = 1 \quad (23)$$

donde P_i es la cantidad de partículas que se encuentran en el interior de la membrana y P_o es la cantidad de partículas que se encuentran en el exterior.

Si estas partículas se mueven de manera independiente, su arreglo dentro de la membrana seguirá una distribución de Boltzmann:

$$\frac{P_i}{P_o} = e^{-\left[\frac{W + zeE}{kT}\right]} \quad (24)$$

donde W es el trabajo que se necesita para que una partícula atraviese la membrana cuando $E = 0$ y $\frac{kT}{e} = 25\text{mV}$ a, 20°C . Combinando las dos ecuaciones se tiene que:

$$P_i = \frac{1}{1 + \exp\left[-\left(\frac{W + zeE}{kT}\right)\right]} = \frac{\exp\left[-\left(\frac{W + zeE}{kT}\right)\right]}{1 + \exp\left[-\left(\frac{W + zeE}{kT}\right)\right]} \quad (25)$$

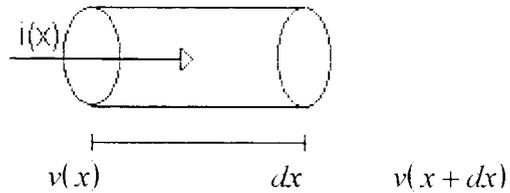
$$G_{Na} \approx \bar{G}_{Na} \exp\left[\frac{zeE}{kT}\right] = \exp\left(\frac{zE}{25}\right) \quad (26)$$

Cuando E es muy grande y es negativo, entonces $\exp\left[\left(\frac{W + zeE}{kT}\right)\right] \ll 1$

$$G_{Na} \propto \exp\left(\frac{E}{4}\right) \quad (27)$$

5.- Propagación del potencial de acción.

Considérese el siguiente modelo:



la corriente está dada como:

$$i = \frac{\Delta V}{R} \text{ y } R = r_i \cdot dx \quad (1)$$

donde i = corriente.

V = voltaje.

R = resistencia.

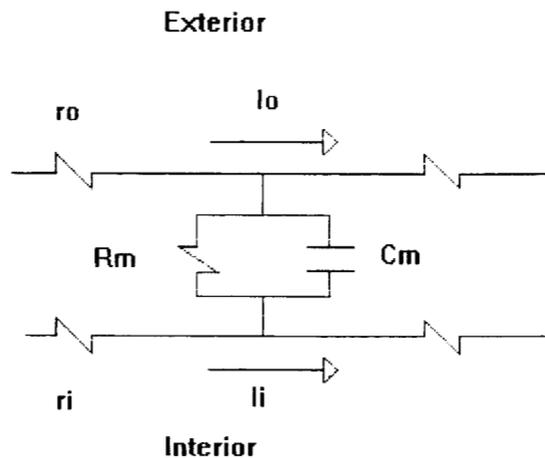
$$i(x) = \frac{1}{r_i \cdot dx} \cdot [v(x) - v(x + dx)] \quad (2)$$

según la definición de la derivada:

$$\frac{dv}{dx} = \lim_{dx \rightarrow 0} \left[\frac{v(x + dx) - v(x)}{dx} \right] \quad (3)$$

$$\therefore i(x) = \frac{1}{r_i} \cdot \frac{dv}{dx} \quad (4)$$

Considérese el modelo de membrana:



$$i_o = -\frac{1}{r_o} \cdot \frac{\partial V_o}{\partial x} \quad (5)$$

$$i_i = -\frac{1}{r_i} \cdot \frac{\partial V_i}{\partial x} \quad (6)$$

$$V_m = V_o - V_i \quad (7)$$

$$\frac{\partial V_m}{\partial x} = \frac{\partial V_o}{\partial x} - \frac{\partial V_i}{\partial x} \quad (8)$$

despejando $\frac{\partial V_o}{\partial x}$ y $\frac{\partial V_i}{\partial x}$ de las ecuaciones (5,6) respectivamente y substituyendo en la ecuación (8) se tiene:

$$\frac{\partial V_m}{\partial x} = i_i \cdot r_i - i_o \cdot r_o \quad (9)$$

sacando la segunda derivada:

$$\frac{\partial^2 V_m}{\partial x^2} = r_i \cdot \frac{\partial i_i}{\partial x} - r_o \cdot \frac{\partial i_o}{\partial x} \quad (10)$$

Por la primera ley de Kirchoff de conservación de la corriente:

$$i_m = i_o + i_i \quad (11)$$

$$i_m = i_i = -i_o \quad (12)$$

substituyendo i_i y $-i_o$ por sus respectivas derivadas:

$$i_m = \frac{\partial \hat{a}_i}{\partial x} = -\frac{\partial \hat{a}_0}{\partial x} \quad (13)$$

substituimos la ecuación (13) en la ecuación (10)

$$\frac{\partial^2 Vm}{\partial x^2} = i_m \cdot r_i - (-r_0 \cdot i_m) = i_m \cdot (r_i + r_0) \quad (14)$$

Por lo tanto:

$$i_m = \frac{1}{r_i + r_0} \cdot \frac{\partial^2 Vm}{\partial x^2} \quad (15)$$

donde

- r_i = resistencia interna.
- r_0 = resistencia externa.
- x = distancia.

Para un axón que se encuentra sumergido en líquido conductor, se puede despreciar a r_0 , por lo tanto:

$$i_m = \frac{1}{r_i} \cdot \frac{\partial^2 Vm}{\partial x^2} \quad (16)$$

si definimos la densidad de corriente y la resistencia específica respectivamente como:

$$I = \frac{i}{2 \cdot \pi \cdot a} \quad \text{y} \quad r_i = \frac{R_i}{\pi \cdot a^2} \quad (17,18)$$

donde

- a = área.
- I = densidad de corriente de la membrana.
- R_i = resistencia específica del axoplasma.

substituyendo las ecuaciones (17,18) en la ecuación (16):

$$I \cdot 2 \cdot \pi \cdot a = \frac{1}{\frac{R_i}{\pi \cdot a^2}} \cdot \frac{\partial^2 Vm}{\partial x^2} \quad (19)$$

$$I = \frac{a^2}{2 \cdot R_i} \cdot \frac{\partial^2 Vm}{\partial x^2} \quad (20)$$

substituyendo la ecuación (20) en la ecuación que determina la corriente total que fluye a través de la membrana:

$$I = C_M \cdot \frac{dV}{dt} + \bar{G}_K \cdot n^4 \cdot (Vm - V_K) + \bar{G}_{Na} \cdot m^3 \cdot h \cdot (Vm - V_{Na}) + \bar{G}_l \cdot (Vm - V_l)$$

$$\frac{a}{2 \cdot R_i} \cdot \frac{\partial^2 Vm}{\partial x^2} = C_M \cdot \frac{dV}{dt} + \bar{G}_K \cdot n^4 \cdot (Vm - V_K) + \bar{G}_{Na} \cdot m^3 \cdot h \cdot (Vm - V_{Na}) + \bar{G}_l \cdot (Vm - V_l) \quad (21)$$

si suponemos que el potencial de acción se desplaza a lo largo del axón en forma de onda, entonces:

$$V = \text{sen}(x + \theta) \quad (22)$$

donde:

x = distancia.

θ = velocidad de propagación de la onda

$$\frac{\partial V}{\partial x} = \cos(x + \theta) \quad (23)$$

$$\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} = -\text{sen}(x + \theta) \quad (24)$$

$$\frac{\partial V}{\partial t} = \theta \cos(x + \theta) \quad (25)$$

$$\frac{\partial^2 V}{\partial t^2} = -\theta^2 \text{sen}(x + \theta) \quad (26)$$

Durante la propagación del potencial se observa que la curva V vs t para cualquier x y la curva V vs x para cualquier t son similares, por lo que:

$$\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} = \frac{\partial^2 V}{\partial t^2} = -\text{sen}(x + \theta) = -\theta^2 \text{sen}(x + \theta) \quad (27)$$

$$\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} = \frac{\partial^2 V}{\partial t^2} = 1 = -\theta^2 \quad (28)$$

$$\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} = \frac{1}{\theta^2} \frac{\partial^2 V}{\partial t^2} \quad (29)$$

Por lo tanto:

$$\frac{a}{2R_i\theta^2} \cdot \frac{d^2Vm}{dt^2} = C_{M'} \cdot \frac{dV}{dt} + \bar{G}_K \cdot n^4 \cdot (Vm - V_K) + \bar{G}_{Na} \cdot m^3 \cdot h \cdot (Vm - V_{Na}) + \bar{G}_L \cdot (Vm - V_L) \quad (30)$$

La ecuación (30) determina la ecuación de velocidad de propagación del potencial de acción a través de un axón.

APENDICE C

I.- Amplificadores.

La medición de biopotenciales está relacionada con voltajes pequeños y con valores de impedancias grandes. Para registrar estas señales, se debe tener amplificadores que generen una señal con un alto grado de fidelidad. A los sistemas que permiten registrar biopotenciales se les conoce como amplificadores de biopotenciales. Tienen como función tomar una señal pequeña, de origen biológico, y aumentar su amplitud de tal manera que ésta pueda ser posteriormente procesada. En general, estos amplificadores se presentan bajo la forma de amplificadores de voltaje.

Como se mencionó, los electrodos que se utilizan para hacer los registros de los fenómenos bioeléctricos deben cumplir con ciertas características, esto es, el diámetro de la punta debe ser pequeño, lo cual implica que la impedancia de entrada del amplificador tenga que ser mucho mayor que el valor de la resistencia del microelectrodo. Al hacer los registros, se suman a la señal ciertas capacitancias y señales de origen diverso, por lo que el amplificador no sólo debe de satisfacer las necesidades requeridas para la obtención de la señal sino que también, debe tener los circuitos necesarios para proporcionar una señal con una alta fidelidad.

En términos generales, las características que debe cumplir un amplificador, son las siguientes:

1.- Debe tener una impedancia de entrada alta. Los microelectrodos que se utilizan para registrar el voltaje a través de la membrana registran voltajes del orden de los milivolts. Representan una fuente de impedancia alta debido a su tamaño pequeño y a la pequeña área de contacto que tienen con la célula. Estas características de los electrodos son las que hacen que el amplificador deba tener una impedancia de entrada alta.

2.- Debido a la geometría del electrodo se generan ciertas capacitancias. Estas últimas afectan la respuesta en frecuencia de la señal, de tal manera que los amplificadores deben estar provistos de sistemas de retroalimentación negativa con el fin de compensar el efecto de las capacitancias parásitas.

3- Debe estar provisto de circuitos de protección para los tejidos que se van a estudiar. El daño al tejido se puede provocar de dos maneras: ya sea que por medio del estímulo se generen especies químicas tóxicas (debido a reacciones electroquímicas en la interface electrodo-electrolito) o bien, se puede hacer un daño a causa de una sobredescarga. Cualquier corriente o potencial que aparece en las terminales de entrada del amplificador, puede afectar el potencial biológico que se está estudiando. Para evitar estos problemas, el amplificador debe tener circuitos de protección y de aislamiento.

a.- el amplificador debe trabajar en el rango de frecuencias de las señales bioeléctricas. Debido al bajo nivel de estas señales, es importante limitar la banda de paso del amplificador con el fin de procesar la señal de manera adecuada.

b.- dado que la amplitud de las señales está en el rango de los milivolts, el amplificador debe tener un rango de amplificación alto, del orden de 1000 mv o mayor.

c.- debe existir un sistema para la calibración de la ganancia, es decir, tener una señal que pueda ser conectada de manera que sirva para la calibración.

1.- El pre-amplificador.

Una parte importante de todos los amplificadores corresponde a la primera etapa de amplificación, ya que el pre-amplificador es el que determina la calidad del procesamiento de la señal, el objetivo fundamental es el de registrar el voltaje entre los dos electrodos de registro, a la vez que se elimina la señal de modo común. Esta etapa debe tener poco ruido ya que la señal a la salida del pre-amplificador es posteriormente amplificada. La entrada del pre-amplificador debe estar acoplada de manera directa con los electrodos, con el fin de proporcionar una respuesta en frecuencia óptima. La impedancia de entrada del pre-amplificador es una parte crucial para el comportamiento del amplificador y debe ser lo más grande que sea posible. Con el fin de tener una impedancia de entrada alta, se utilizan circuitos con amplificadores no inversores o seguidores de voltaje.

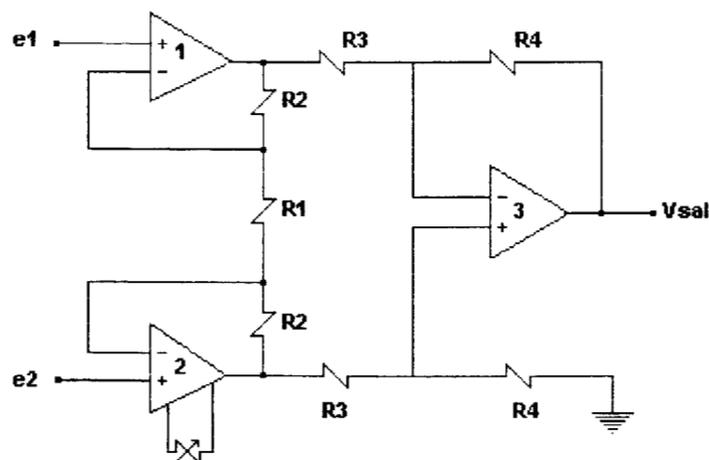


Figura 1.- Circuito clásico de un pre-amplificador.

El circuito anterior representa una configuración estándar de un pre-amplificador. Los dos amplificadores operacionales de entrada, proporcionan una ganancia diferencial alta y una ganancia de modo común unitaria. La salida diferencial de la primera etapa, proporciona una señal con un modo común muy

pequeño, de tal manera que a la salida del circuito se reduce notablemente la razón de rechazo de modo común (*CMMR*) de la señal. La (*CMMR*) nos da la relación entre una señal de modo común y la amplitud de una señal diferencial. El voltaje de salida está determinado por la relación:

$$V_{sal} = (e_2 - e_1) \frac{R_4}{R_3} \left(1 + \frac{2R_2}{R_1} \right) \quad (1)$$

2.- Circuitos de compensación.

a.- Compensación de capacitancias parásitas:

Las capacitancias provienen de fuentes diversas: la capacitancia generada a través de las paredes de vidrio del microelectrodo que está sumergido en la solución ("transmural capacitance"), las capacitancias del resto del microelectrodo cerca de las partes del circuito que están conectadas a tierra, la capacitancia parásita que viene del holder del microelectrodo y la capacitancia a tierra de la entrada al amplificador. Al conjunto de éstas capacitancias se les conoce como capacitancias parásitas.

La capacitancia de entrada y la resistencia del microelectrodo, forman un filtro pasa-bajas, haciendo que se desvíen hacia tierra señales de alta frecuencia en la punta del microelectrodo. La capacitancia de entrada se puede minimizar, lo mejor es disminuir físicamente los elementos que contribuyen a su formación. La capacitancia generada por las paredes de vidrio del microelectrodo pueden ser muy grandes, generalmente es de 1pF. Se le puede disminuir si las paredes del microelectrodo se hacen más gruesas.

Otra manera para eliminar las capacitancias parásitas es la de bajar el nivel de la solución en donde está inmerso el microelectrodo. Esto último presenta algunas dificultades ya que la tensión superficial de la solución del baño genera una inestabilidad mecánica en la parte del microelectrodo, principalmente cuando se recambia la solución del baño durante el registro del potencial de membrana.

El efecto producido por las capacitancias sobre la señal, cualquiera que sea su origen, se puede compensar por medio de sistemas de retroalimentación positiva. Para ello se utiliza un amplificador de capacitancias negativas. Por lo

general, se utiliza un transistor de efecto de campo (FET) que funciona como seguidor. La señal del microelectrodo se conecta a la terminal no inversora de un amplificador operacional A, cuya ganancia está determinada por la relación $\frac{R_2}{R_1}$

La salida se obtiene a partir de la resistencia R_s . La neutralización de las capacitancias se lleva a cabo al alimentar una parte de la salida del operacional, con la entrada en fase por medio de un capacitor, C, de acople. La cantidad de retroalimentación se controla por medio de un potenciómetro, P, colocado a la salida del operacional. Se debe tener cuidado con el ajuste de la retroalimentación ya que se pueden generar oscilaciones. Para ello, la relación entre la entrada al seguidor y la señal de retroalimentación, debe ser menor a uno.

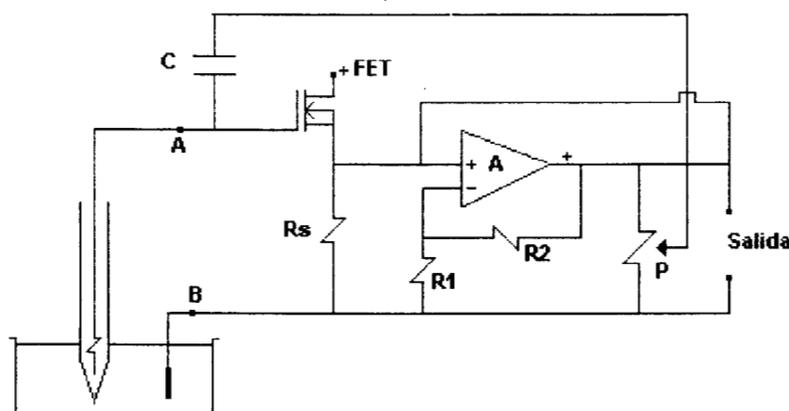


Figura 2.- Circuito para eliminar las capacitancias parásitas (Fuente L.A. Geddes, 1972 p 179)

En la práctica es difícil calcular el valor exacto necesario para hacer un ajuste preciso de la retroalimentación debido a que el valor de la resistencia del microelectrodo y el valor de las capacitancias, varían de microelectrodo a microelectrodo, por lo que es necesario hacer una prueba para su ajuste. La mejor retroalimentación es aquella que reproduce de mejor manera un pulso de voltaje cuadrado, al aplicar un pulso de corriente cuadrado en el punto A.

La frecuencia del pulso se escoge de tal manera que su período ($1/frecuencia$) sea grande con respecto al tiempo del circuito de entrada, el cual está determinado por la resistencia del microelectrodo y la capacitancia total del circuito.

b.- Circuito para compensar niveles de DC.

Otro efecto que se suma a la señal de salida del amplificador, son los potenciales de unión que se desarrollan cuando diferentes materiales conductores están en contacto entre sí. Se desarrollan en la interface entre el electrodo que está dentro del microelectrodo en contacto con la solución electrolítica que llena el microelectrodo, y la unión líquido-líquido en la punta del microelectrodo. La suma de estos potenciales de unión se puede eliminar de la señal de salida si se introduce un voltaje de DC con polaridad opuesta. Estos potenciales pueden sumar algunos milivolts.

II.- Fuentes de corriente

Una vez que se inyectó corriente a la región intracelular, se necesita tener una indicación de su magnitud y curso temporal. Las fuentes de corriente pueden tener un interruptor que, cuando no se esté suministrando corriente, permitan leer el valor del potencial de reposo. Un resultado similar se puede obtener si se hace una interrupción desde el microelectrodo, de tal forma que se pueda conectar de manera alterna a la fuente de corriente y al pre-amplificador.

La mayoría de los circuitos tienen un monitor de salida que permite leer el valor de la corriente que le está llegando a la célula. Esta corriente se puede determinar de varias maneras: ya sea por el método tradicional, por medio de un galvanómetro, por ley de ohm o bien, por el método de tierra virtual.

III.- Medición del potencial e inyección de corriente de manera simultánea.

El método mas fácil para mandar corriente y registrar el potencial es utilizando dos microelectrodos. Sin embargo, esto no es muy viable, ya que no es fácil introducir los microelectrodos en la misma célula. Por lo tanto, para dicho propósito, se utiliza un solo microelectrodo.

Al hacer estas mediciones de manera simultánea, se presenta el siguiente problema: una fuente de corriente hace pasar la corriente tanto por un microelectrodo que tiene una resistencia $R_{\mu E}$ como por la célula (representada por medio de un circuito RC en paralelo). El voltaje que se observa está compuesto de dos componentes: E_1 y E_2 . Donde E_1 es el potencial que se genera a través del microelectrodo ($IR_{\mu E}$) y E_2 es el potencial que se genera en la membrana cuando se hace pasar la corriente. Dado que E_1 no es un potencial biológico, se puede eliminar por medio de un circuito puente (el método que se utiliza más frecuentemente).

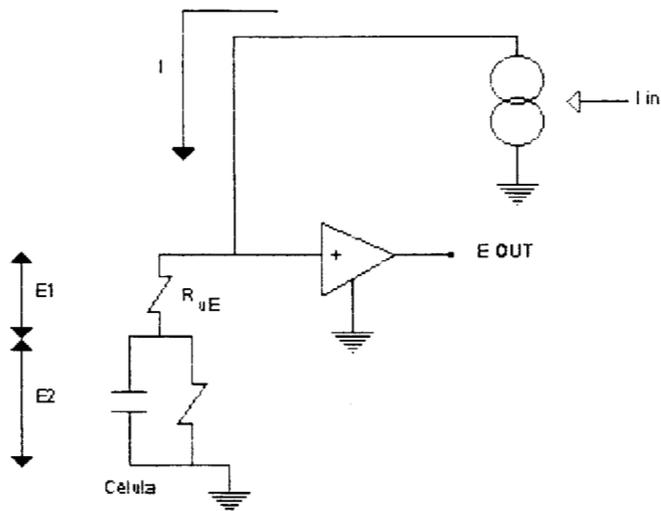


Figura 3 Circuito para la inyección de corriente y medición del potencial de manre simultánea. La señal E_{out} está formada por $E_1 = I R_{\mu E}$ y E_2 , voltaje que proviene de la célula (Fuente R.D. Purves; 1981, p 83)

El balance del puente sólo se puede hacer si la resistencia del microelectrodo es constante. La corriente que se inyecta genera un voltaje a través del microelectrodo. Con el fin de eliminar este voltaje se debe hacer un ajuste del puente. Esta técnica tiene como objetivo el de generar una señal proporcional al producto de la corriente y a la resistencia del microelectrodo (es decir, al voltaje generado en el microelectrodo). Esta señal se resta a la señal generada por el amplificador de medición del voltaje de membrana.

El componente $IR_{\mu E}$ se puede identificar debido a que, al principio de la señal, se genera un componente abrupto que coincide con la corriente que se aplicó, mientras que la señal deseada se retrasa en el tiempo a causa de la capacitancia de la membrana. El efecto final aparece como una disparidad entre el voltaje $IR_{\mu E}$ y la señal de balance. El curso del tiempo de la señal está determinado por la constante de tiempo $R_{\mu E} C_{tot}$. Para que se pueda hacer el balance del puente, esta constante de tiempo debe ser mucho menor que el tiempo de carga de la célula. Primero, se deben de ajustar las capacitancias negativas, para asegurarse que se cumpla la condición anterior. Una vez realizado el ajuste de las capacitancias, los transientes que se presentan al inicio y al final de la señal de salida, deben de aparecer como espigas verticales.

Existen varios mecanismos para ajustar el balance del puente. Una de las técnicas más utilizadas es la de aplicar pulsos repetitivos de corriente al microelectrodo mientras que se encuentra sumergido dentro del baño. El control del puente se hace hasta que se elimina la respuesta de los pulsos. En este punto el circuito se encuentra balanceado y se puede leer la resistencia del microelectrodo.

Para la elaboración de este apéndice se utilizo la siguiente bibliografía:

13; 20; 24; 26; 33; 34.

APENDICE D

I.- Electroodos intracelulares.

La conductividad eléctrica en la célula está relacionada con iones que funcionan como transportadores de carga. Cuando se trabaja con señales bioeléctricas, se interactúa con los portadores de carga y se traducen los flujos iónicos en corrientes eléctricas. Estas señales deben ser procesadas por medio de una instrumentación electrónica; la interfase entre la célula y el aparato se lleva a cabo por medio de microelectrodos. La interacción entre los electrones del metal conductor y los iones del microelectrodo puede afectar la señal fisiológica por lo que, la instrumentación necesaria para procesar estas señales, debe cumplir con ciertas características específicas.

Los registros intracelulares dan información acerca de la diferencia de potencial que existe entre el interior de la célula y un electrodo de referencia que se encuentra localizado en el líquido extracelular.

Se utilizan microelectrodos de vidrio, sin embargo, por su alta impedancia, se necesita tener amplificadores de registro con una impedancia de entrada alta (varios órdenes mayores que la de la resistencia del electrodo). La capacitancia generada por el microelectrodo debe ser compensada por un conjunto de lazos de retroalimentación que permitan medir eventos rápidos y sin distorsión.

1.- Fabricación de los electrodos.

Se pueden fabricar microelectrodos ya sea de metal o no metálicos es decir, una micropipeta de vidrio que se llena con una solución electrolítica. Los microelectrodos varían según su tipo. Los metálicos tienen una impedancia alta, se comportan como un capacitor electrolítico, para frecuencias bajas tienen una impedancia alta y para frecuencias altas tienen una impedancia baja; son buenos para medir potenciales de acción que se registran de manera extracelular. Los electrodos no metálicos tienen una impedancia alta, y una impedancia resistiva alta; son buenos para la medición de potenciales de acción y de potenciales de membrana.

Para la fabricación de estos electrodos se pueden utilizar dos tipos de vidrio, con diferencias en el diámetro del tubo, en su espesor y en el tipo del vidrio, que puede ser el borosilicato o el silicato de aluminio, éste último tiene una consistencia más dura y sólo se puede manipular a ciertas temperaturas. Es recomendable utilizar tubos con filamentos de vidrio para que se facilite el llenado de los electrodos. Se pueden obtener electrodos de borosilicato con un diámetro externo de 1mm y con un espesor de 250micras.

Las paredes de los tubos de silicato de aluminio se hacen más delgadas (con respecto al diámetro externo) durante el proceso de estiramiento, mientras que los tubos de borosilicato, mantienen una relación constante entre el diámetro y el espesor de las paredes. Debido a esto, se utiliza más el vidrio de borosilicato de aluminio cuando se desea obtener electrodos muy finos y muy rígidos. Dada su dureza, estos electrodos permiten que la penetración de la célula sea más fácil pero, son más propensos a romperse.

Los electrodos se pueden obtener con capilares largos. Se corta con una navaja con punta de vidrio de diamante, se marca el electrodo, se corta y luego se rompe. Con éste procedimiento no es necesario hacer procesos de limpieza.

Los electrodos también se pueden fabricar por medio de un estirador que es un instrumento que controla el calor, la fuerza de estiramiento, la velocidad y el tiempo. Existen dos tipos: los horizontales y los verticales. Los verticales mueven solamente una parte del electrodo, en tanto que en los horizontales se mueven por ambos extremos del tubo de vidrio en partes iguales, dejando los extremos en una posición constante en relación con el filamento de calentamiento. Para la fabricación de estos electrodos, se deben tener ciertas consideraciones, tales como:

- Se debe tener cuidado al colocar al tubo de vidrio con respecto al filamento de calentamiento, ya que se obtienen mejores resultados cuando el tubo de vidrio está completamente rodeado por el filamento de calentamiento y se mantiene una distancia constante en todas las direcciones, esto permite tener una temperatura uniforme homogénea en el vidrio.

- La distancia entre el filamento de calentamiento y el tubo de vidrio, es la que determina la distancia global de la punta.

- El ancho del filamento de calentamiento también influye en la longitud global del electrodo (entre más pequeño sea el ancho del filamento, más corto será el mango del electrodo).

- Al aumentar el calor y mantener la longitud constante se generan piezas con una punta más delgada, esto hace que la resistencia del electrodo aumente.

Finalmente, los electrodos se pueden fabricar también por medio de biselaje es decir, cortando un extremo del vidrio en forma oblicua. Este mecanismo ofrece ciertas ventajas con respecto a los anteriores ya que, la resistencia en la punta de un electrodo de este tipo puede ser menor, con la punta de estos electrodos se pueden penetrar tejidos y membranas celulares de una manera más fácil, produciéndose una distorsión mecánica menor y las puntas son menos propensas a taparse. Sin embargo, tiene la desventaja de que el aparato que se utiliza para afilar las puntas es bastante caro y que se requiere de más tiempo para la fabricación de dichos electrodos.

2.- Llenado del microelectrodo.

Por lo general, la dificultad que se presenta al llenar los microelectrodos, aumenta conforme disminuye el diámetro de los mismos. Los electrodos que se llenan y luego se almacenan, corren el riesgo de que la punta se tape ya que se forman cristales en el extremo, independientemente de que se almacenen o no dentro de una solución electrolítica. Para minimizar este problema, los electrodos se deben guardar en la obscuridad, a baja temperatura y, se debe agregar un agente bacterioestático en la solución en la que se encuentran sumergidos. Sin embargo, un almacenamiento muy prolongado no es recomendable, ya que la punta se puede llegar a dañar.

Se debe de tener mucha precaución en la limpieza de los electrodos (sobre todo si su punta tiene un diámetro menor a $5\mu\text{m}$). Los tubos que se van a utilizar se deben de limpiar cuidadosamente para evitar que quede alguna partícula en sus paredes.

La solución electrolítica que se va a emplear debe de estar completamente libre de partículas. Esta solución se debe filtrar utilizando presiones negativas.

3.- Solución a emplear.

Los electrodos se deben llenar con una solución electrolítica. El mayor ión en la solución debe parecerse al ión del compartimento en donde se va a llevar acabo el registro. Para los microelectrodos que se colocan en el líquido intracelular se utilizan soluciones de K^+ y para electrodos que se colocan en el líquido extracelular, se utilizan soluciones de Na^+ .

Los electrodos para registros intracelulares se llenan generalmente con una solución $3M$ de KCl , ya que el Cl^- y el K^+ tienen cargas unitarias, tienen una movilidad parecida, sus potenciales de unión son pequeños y constantes y, si no generan potenciales de punta, proporcionan el mejor valor del potencial de membrana.

Al llenar estos electrodos con una alta concentración de KCl $3M$ se produce una fuga de Cl^- en la punta, esta fuga sólo suele ocurrir cuando se utilizan electrodos con una resistencia relativamente baja y microelectrodos con una punta larga. Se puede determinar la cantidad de Cl^- que se está fugando si se utilizan microelectrodos de doble cañón (por un lado se tiene un sensor que determina la cantidad de Cl^- que se está fugando y por otro lado, se tiene una solución de KCl).

La fuga del Cl^- también se puede eliminar diluyendo la solución de KCl . En este caso el potencial de unión entre el citosol y el extremo del microelectrodo de KCl puede modificarse con la dilución. Otro problema que se presenta es que, al emplear soluciones que tienen una baja molaridad, se

genera un aumento en la resistencia eléctrica del microelectrodo. También se pueden utilizar otros aniones diferentes al Cl^- como: acetato de potasio 1–4 M, sulfato de potasio, citrato de potasio o, formato de sodio 1mM mezclado con 10mM KCl. Sin embargo, al utilizar estas sustancias, se pueden formar potenciales de unión, ya que la actividad del Cl^- mezclada con sulfatos, acetatos o citratos, produce ciertas interferencias.

Existen varios métodos por medio de los cuales se pueden llenar los microelectrodos, ya sea llenado de manera directa, llenado por el tallo, por ebullición, por vacío, con alcohol, con una centrífuga, por destilación o, llenado previo al estiramiento de los microelectrodos.

El método de llenado a través del tallo demuestra que es más fácil hacer pasar aire que agua a través de un tubo angosto, dado que el aire tiene una viscosidad más baja y es compresible. Se inyecta la solución por el tallo por medio de una aguja de jeringa muy fina o por medio de una cánula. La presión baja a través del menisco cerca de la punta. Es como introducir la solución a una velocidad que, al principio es muy pequeña, pero que aumenta conforme se va acercando a la punta. Tiene la ventaja de que el llenado se hace en frío, que no se desperdicia solución y que se puede aplicar para llenar microelectrodos con puntas muy pequeñas.

III.- Características de los microelectrodos.

1.- La resistencia.

Dado que la punta del electrodo se llena con una solución electrolítica, se puede decir que el microelectrodo se comporta como un conductor electrolítico con área transversal pequeña. Esta propiedad es la que le da al electrodo su alta resistencia y no la interfase electrodo-electrolito en el tallo, ya que ésta tiene una resistencia muy baja con respecto a la que hay en la punta.

La relación entre el diámetro de la punta y la resistencia eléctrica está relacionada con el ángulo de la parte cónica del microelectrodo y por la relación que hay entre el diámetro externo con respecto al diámetro interno.

La punta del microelectrodo se puede determinar al medir la conductividad de la solución con la que se está llenando el microelectrodo, al medir la conductividad del medio que se encuentra fuera de la punta y o bien, midiendo el espesor de las paredes de vidrio cerca de la punta. Sin embargo, la mejor manera para estimar el diámetro de la punta del microelectrodo es midiendo su resistencia. Entre más grande sea la resistencia, menor será el diámetro de la punta. La resistencia del microelectrodo está determinada por (ver apéndice B):

$$R = \frac{2 \cdot \lambda \cdot R_i}{\pi \cdot d^2} \quad (1)$$

donde

$$\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_i}} = \text{constante de longitud.}$$

$$r_m = \frac{R_m}{d \cdot \pi} = \text{resistencia de la membrana por unidad de longitud.}$$

$$R_m = \text{resistencia de } 1 \text{ cm}^2 \text{ de membrana.}$$

$$r_i = \frac{4 \cdot R_i}{d^2 \cdot \pi} = \text{resistencia longitudinal por unidad de longitud.}$$

$$R_i = \text{resistencia específica del material.}$$

$$d = \text{diámetro.}$$

La resistencia del microelectrodo se determina, tanto por el diámetro y ángulo de la punta del microelectrodo como por el tipo de solución electrolítica que se emplea para llenarlo. Estos parámetros determinan la característica de la impedancia de entrada de los amplificadores que se utilizan para el registro de los biopotenciales. Para obtener una medición confiable de la diferencia de potencial entre la punta del microelectrodo de medición y el electrodo de referencia, la impedancia de entrada del amplificador debe de ser mucho más grande que la resistencia del microelectrodo. Es por esto que se debe tener mucho cuidado en determinar el valor de la resistencia. Esta se puede medir de dos maneras: ya sea utilizando un voltaje constante o bien, por medio de una fuente de corriente constante.

El método de voltaje constante consiste en aplicar, en serie, un voltaje constante con el electrodo de referencia. El voltaje resultante a través de las terminales se determina al medir el voltaje que pasa a través de una resistencia colocada entre ambas terminales. En ocasiones, el pulso de voltaje que se manda sirve para calibrar la sensibilidad del sistema de medición.

Método de voltaje constante

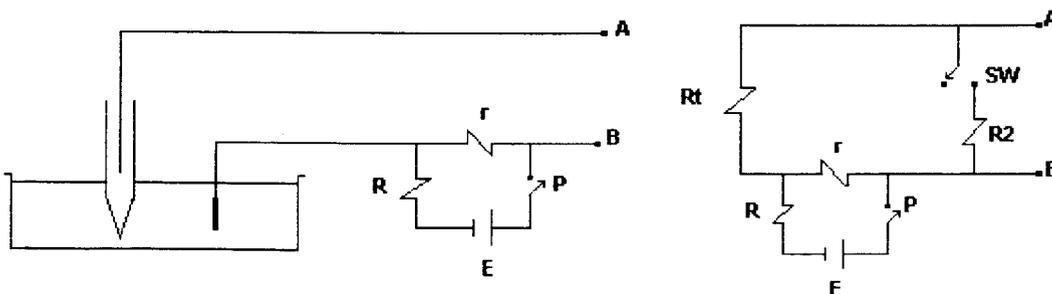


Figura 1.- Circuito Eléctrico para medir la resistencia del microelectrodo por medio del método de voltaje constante (Fuente: Geddes L.A, 1972 p175)

Cuando se cierra el interruptor P, aparece un voltaje a través de la resistencia r . Las resistencias r y R forman un divisor de voltaje que disminuye el valor del voltaje aplicado E , de tal manera que el voltaje resultante e está determinado como:

$$e = \frac{Er}{(R+r)} \quad (2)$$

El voltaje E_{AB1} aparece cuando el interruptor P está cerrado y el interruptor SW está abierto. Si la impedancia de entrada del amplificador es muy grande E_{AB1} será igual al voltaje e determinado en la ecuación (2). Cuando el interruptor SW se cierra, se suma al circuito el componente resistivo R_2 por lo que el voltaje resultante E_{AB2} es menor.

$$E_{AB2} = iR_2 = \frac{eR_2}{R_t + R_2} \quad (3)$$

donde R_t = resistencia de la punta. Si $E_{AB1} = e$, entonces

$$E_{AB2} = \frac{E_{AB1}R_2}{R_t + R_2} \quad (4)$$

despejando R_t ,

$$R_t = R_2 \left(\frac{E_{AB1}}{E_{AB2}} - 1 \right) \quad (5)$$

En este caso el valor de la resistencia de la punta se calcula despreciando la capacitancia de la punta y la impedancia del resto del microelectrodo. Este método prácticamente ya no se utiliza.

Al utilizar el método de corriente constante se puede medir tanto la resistencia como la capacitancia del microelectrodo. Este procedimiento se lleva a cabo al hacer pasar una pequeña cantidad de corriente de valor constante a través del microelectrodo. Esto se hace colocando una fuente de corriente conectada al microelectrodo.

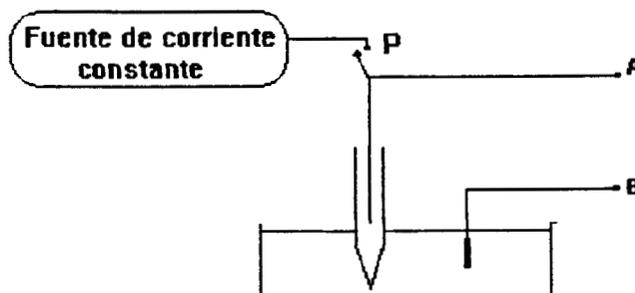


Figura 2.-Circuito que permite medir la resistencia del microelectrodo utilizando el método de fijación de corriente

Cuando el interruptor P está cerrado, se produce un cambio de voltaje dado por:

$$V = R_r \cdot i \quad (6)$$

$$R_r = \frac{V}{i} \quad (7)$$

por lo que la resistencia R_r es proporcional al voltaje medido. Es el más utilizado para medir R_r .

2.- La capacitancia.

La capacitancia está constituida por tres componentes: la capacitancia de entrada C_a del preamplificador, la capacitancia C_s , generada por el cable que une el microelectrodo al preamplificador y, la capacitancia generada por el microelectrodo en la solución C_t . La capacitancia total es importante ya que, junto con la resistencia, forman un filtro pasa bajas.

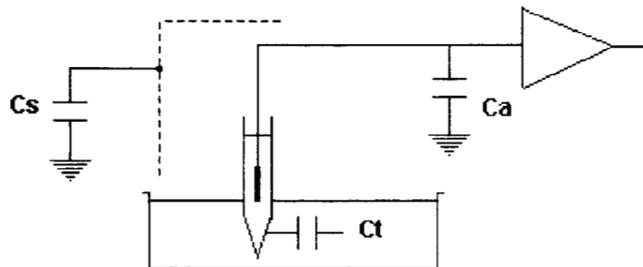


Figura 3 .-Diagrama que muestra las capacitancias que se generan al introducir un microelectrodo conectado a un amplificador y a una célula. C_a es la capacitancia de entrada al preamplificador; C_s es la capacitancia resultante del cable que une el microelectrodo al amplificador; C_t , es la capacitancia generada por el microelectrodo en la solución (fuente R.D.Purves, 1981 p32)

La capacitancia de la punta, se puede medir utilizando el método de corriente constante, descrito anteriormente. El método consiste en determinar la razón inicial de aumento en el voltaje $\frac{dE_{AB}}{dt}$ cuando el interruptor P se cierra tiene que ser al tiempo inicial ya que casi toda la corriente es capacitancia.

Se tiene que

$$i_c = C \cdot \frac{dV}{dt} \Rightarrow \frac{1}{i_c} = \frac{1}{C \cdot \frac{dV}{dt}} \quad (8)$$

$$C = \frac{i}{\frac{dV}{dt}} \quad i = \text{cst} \quad (9)$$

III.- Efecto de los electrodos en la medición del potencial de membrana.

a.- Potencial de membrana:

Microelectrodo colocado fuera de la célula

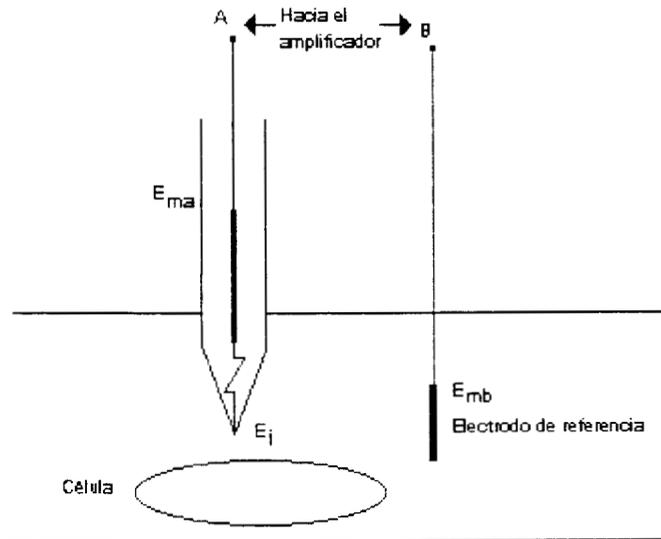


Figura 4.- Circuito de un microelectrodo colocado fuera de la célula (fuente Geddes L.A, 1972 p 165)

La diferencia de potencial entre los puntos A y B está determinada por:

- La diferencia de potencial entre el electrodo de metal y la solución electrolítica que llena el microelectrodo (E_{ma})
- Si el líquido que llena el microelectrodo es diferente al que se encuentra alrededor de la célula y, si las movilidades de los iones en cada solución son diferentes, se genera un potencial de difusión en el extremo del microelectrodo (E_j).
- Existe un potencial entre el electrodo de referencia y el líquido que lo rodea (E_{mb}).

por lo tanto, el potencial entre A y B está dado por:

$$E_{AB} = E_{ma} + E_j - E_{mb} \quad (10)$$

E_{ma} y E_{mb} dependen del tipo de metal que se está utilizando y de la actividad de los iones en las soluciones en las que los electrodos están sumergidos. E_j depende de las concentraciones de los iones y de la movilidad de cada uno de ellos en cada solución.

Cuando el microelectrodo entra en la célula aparece el potencial de membrana y el potencial de unión se modifica, ya que el microelectrodo entra en una nueva solución, el citoplasma. Por lo tanto, E_{AB} está dado por:

$$E'_{AB} = E_{ma} + E'_j + E_{mp} - E_{mb} \quad (11)$$

Si se toma al potencial de membrana como la diferencia de potencial que hay entre el interior de la célula y el exterior, se tiene:

$$\begin{aligned} Pm &= E'_{AB} - E_{AB} \\ Pm &= E_{ma} + E'_j + E_{mp} - E_{mb} - (E_{ma} + E_j + E_{mp}) \\ Pm &= E'_j - E_j + E_{mp} \end{aligned} \quad (12)$$

Entre mas pequeña sea la diferencia entre $E'_j - E_j$ se tendrá un valor más exacto del potencial de membrana.

b.- Potenciales de electrodos.

Estos potenciales de unión electrodo-electrolito dependen del tipo de metal que se está utilizando y del tipo y concentración de solución electrolítica que se está empleando. En la mayoría de los casos se utiliza una superficie de plata-cloruro de plata ($Ag - AgCl$); esta solución garantiza que el potencial medido entre las terminales del electrodo va cercano a cero.

c.-Potenciales de unión líquida.

Es importante conocer la diferencia entre $E'_j - E_j$ para poder determinar el verdadero valor del potencial de membrana y la cantidad de sobretiro de este potencial. Sin embargo, es difícil conocer esta relación, ya que se deben conocer las especies iónicas, sus actividades y sus movilidades en el citoplasma. Los resultados experimentales que se tienen muestran que, cuando la punta pasa de una solución externa a una interna, existe una diferencia de potencial de 12,4mv que acompaña al potencial de membrana.

d.- Potenciales de punta:

Este potencial se define como $E_2 - E_1$ en donde E_2 es el potencial registrado por un microelectrodo intacto y E_1 es el potencial registrado cuando al microelectrodo se le rompió la punta. El origen de estos potenciales pueden ser las propiedades que hay entre la interfase del vidrio y de la solución electrolítica. Las interfases están generalmente relacionadas con la separación de cargas y, el vidrio que se encuentra en contacto con el agua, adquiere una capa de carga negativa. A este potencial se le puede ver como un offset, de tal manera que se le puede compensar con un circuito para compensación de offset. Estos potenciales tienen las siguientes características:

- signo negativo y una magnitud de -70mv cuando el electrodo se llena con una solución $3M$ de KCl .
- se eliminan cuando las soluciones intra y extracelular son las mismas.

- son mayores en electrodos que tienen una resistencia alta.
- se pueden disminuir cuando se utilizan soluciones que tienen un pH bajo.
- se puede disminuir su tamaño o invertir su signo, al agregar pequeñas concentraciones de cationes polivalentes como el Th .

e.- Circuito equivalente:

Empezando por la terminal B (Fig. No. 5) que se encuentra conectada al electrodo de referencia (se desprecia la resistencia del alambre de conexión):

- la primera impedancia que se encuentra es la del electrodo de referencia y el líquido que rodea a la célula. Esta impedancia está representada por un circuito en paralelo formado por $R_{mb} \cdot C_{mb}$.
- otra propiedad de la interfase electrodo-electrolito, es el potencial de media celda (éste depende del tipo de metal, del tipo y concentración de la solución electrolítica con la que está haciendo contacto y de la temperatura). Este potencial se determina como E_{mb} para el electrodo de referencia.
- la resistencia de la solución (extracelular) en la cercanía de la célula R_{ext} .
- después aparece la membrana celular con su capacitancia C_m que se encuentra en paralelo con los potenciales E_K, E_{Na}, E_x y sus respectivas conductancias G_K, G_{Na}, G_x , las cuales determinan la manera por medio de la cual los canales iónicos se activan y se inactivan.
- dentro de la célula aparece la resistencia presentada por el citoplasma R_{int} .
- después aparece la punta del microelectrodo, aquí aparecen dos potenciales: el potencial de punta E_p (depende del tipo de vidrio que se está utilizando, del espesor de las paredes de vidrio en la punta y, de los componentes iónicos dentro del electrodo y el citoplasma) y, el potencial de unión E_j (depende del tipo y de la concentración del líquido que está dentro del microelectrodo y de la concentración y del tipo de iones que están en el citoplasma).
- la resistencia de la punta del microelectrodo se divide en dos partes: la resistencia que se encuentra dentro de la célula (R_{int}) y, la que se encuentra fuera de ella (R_{out}). Dado que el diámetro de la punta es muy pequeño, ambas resistencias son muy altas.

- entre el líquido que llena la punta y el que está fuera de ella, se encuentra otra capacitancia, dado que el material del microelectrodo se comporta como un dieléctrico. La capacitancia de la parte que se encuentra dentro de la célula C_{int} se puede despreciar debido a que no hay una diferencia de potencial a través de ella. La capacitancia C_{out} que se encuentra fuera de la célula es muy importante, ya que está cargada por el potencial de membrana. Ambas capacitancias están distribuidas a lo largo de la alta resistencia de la punta del microelectrodo.

- en la parte cónica del microelectrodo, la resistencia del electrolito es relativamente baja pero, en la parte del tallo, hay una impedancia electrodo-electrolito y un potencial. Como en el caso del electrodo de referencia, la impedancia electrodo-electrolito se representa por medio de un circuito en paralelo $R_{ma} \cdot C_{ma}$.

- E_{ma} es el potencial de la unión electrodo-electrolito en el tallo del microelectrodo y su magnitud depende de los mismos parámetros que el potencial E_{mb} .

- existe también una capacitancia C_w entre los cables que se utilizan para conectar el microelectrodo y el electrodo de referencia hacia el amplificador.

Se debe tener cuidado con las características del instrumento de registro que se va a utilizar para la medición de los potenciales de membrana, ya que debe tener una resistencia de entrada alta y una capacitancia de entrada baja; es preferible también, que se encuentre localizado cerca del microelectrodo de registro con el fin de disminuir el valor de C_w .

f.- Ruido.

El ruido se vuelve una consideración muy importante cuando la punta del electrodo es muy pequeña. El ruido también es grande cuando hay una amplificación muy grande para poder observar con detalle el potencial de acción y las fluctuaciones que se presentan en el potencial de membrana.

Aumenta con el movimiento aleatorio de los portadores de carga. En los electrodos este fenómeno se lleva a cabo principalmente en la interfase electrodo-electrolito, en donde una reacción espontánea puede estar desarrollándose mientras que el electrodo entra en equilibrio con su entorno. El paso de la corriente también puede causar ruido.

En un electrodo que está bien diseñado, estas fuentes de ruido pueden ser eliminadas. Sin embargo, el movimiento aleatorio de los portadores de carga en una interfase electrodo-electrolito o, dentro de una solución electrolítica, da como resultado un generador de ruido diluido al componente resistivo del microelectrodo.

Todas las resistencias a altas frecuencias son generadoras de ruido:

$$E = \sqrt{4KTR(f_a - f_{bl})} \quad (13)$$

donde:

E = voltaje.

K = constante de Boltzmann.

T = temperatura.

R = magnitud de la resistencia que genera el voltaje de ruido.

f_a y f_b = son las frecuencias de corte altas y bajas respectivamente.

Cuando se utilizan electrodos para medir los fenómenos bioeléctricos sólo se puede tener un control sobre la resistencia y la banda de paso (si éstas aumentan, el ruido también aumenta).

Para la elaboración de este apéndice se utilizó la siguiente bibliografía:

2; 17; 20; 48; 49; 55.

APENDICE E

1.- Descripción del circuito eléctrico para fijación de corriente.

a.- Inyección de corriente.

Una vez que la célula se despolarizo, alcanza un cierto potencial de membrana y por ende puede llegar a generar potenciales de acción. Sin embargo la despolarización no alcanza siempre el potencial adecuado para que la célula pueda generar una respuesta eléctrica. Con el fin de llevar a la célula a un potencial de membrana adecuado, bajo el cual se puedan generar potenciales de acción, es necesario inyectarle corriente. Ésta inyección de corriente puede ser bien ara despolarizar a la célula o para repolarizarla por lo que, se puede inyectar corriente negativa, o corriente positiva repectivamente.

La salida 0 out de la tarjeta se conecta a la entrada no inversora del seguidor de voltaje A9A. La salida del amplificador A9A se conecta tanto a una polaridad del interruptor S6 como a la entrada inversora del amplificador A9B. A9B tiene ganancia unitaria y funciona como inversor. La salida de A9B se conecta a la otra polaridad del interruptor S6. Por otro lado el interruptor S6 se conecta por medio de R4 a la entrada inversora del amplificador A9C. A ésta misma entrada se conecta el potenciómetro RP1 por medio de la resistencia R2. Éste potenciómetro permite una variación de voltaje de $\pm 1v$. De ésta manera, por medio de S6, se puede seleccionar la polaridad de la inyección de corriente a aplicar y por medio de RP1 se puede modificar el potencial de membrana de la célula. Finalmente, la salida de A9C se conecta a la entrada de corriente ,Current in del electrómetro.

b.- El amplificador.

El microelectrodo se conecta a la sonda que a su vez está conectada al amplificador éste, tiene una impedancia de entrada alta y es de bajo ruido. Se utiliza un FET (transistor de efecto de campo) en la entrada del amplificador ya que se caracteriza por tener una impedancia de entrada de $10^{10}\Omega$ y un voltaje de ruido de $2\mu v$ pp.

La señal de entrada se conecta a la entrada no inversora del amplificador AD514, que la amplifica por un factor de 5, y la salida se manda tanto a la entrada no inversora del amplificador A6A como al potenciómetro, RP13, que permite hacer el ajuste de las capacitancias parásitas. El amplificador A6A opera de manera diferencial y tiene ganancia unitaria. En la entrada inversora, de éste amplificador, está conectado el sistema para el ajuste del offset de salida. Este ajuste permite colocar la línea de base de salida en cero, cuando la entrada del amplificador se

manda a tierra. La salida del amplificador A6A se manda a un seguidor de voltaje, A6B, por medio de $R35$ y $RP15$. Con $RP15$ se hace el ajuste de la ganancia, se ajusta para tener en la salida del conector XIOUT una señal con la misma amplitud que la amplitud de la señal de entrada de la sonda.

La salida del amplificador A6B se manda tanto a un display, como a la entrada no inversora del amplificador A2B. La salida de A2B se conecta posteriormente, hacia la sonda por medio de la resistencia $R24$. Durante la inyección de corriente $R24$ proporciona un camino para que la corriente pase hacia el electrodo y durante la medición, sirve para completar un camino de retroalimentación para mantener la alta impedancia de entrada del amplificador.

El circuito de inyección de corriente está diseñado de tal manera, que pueda mandar un estímulo de corriente constante a pesar de los cambios que se producen en la impedancia del microelectrodo. La inyección de corriente se lleva a cabo al aplicar un estímulo en el conector de entrada de corriente, Current in. La señal se manda a un divisor de voltaje compuesto por las resistencias $R8$ y $R9$, las cuales reducen 0.1 veces la amplitud de la señal, con respecto a la amplitud de la señal de entrada. Esta señal se manda a la entrada inversora del amplificador A2A, que tiene ganancia unitaria. Éste amplificador proporciona una fase adecuada de la señal para mandarla posteriormente al amplificador A2B. El amplificador A2B mantiene la corriente que se inyectó al sistema a un nivel constante, esto se lleva a cabo por medio de un sistema de retroalimentación.

La señal a la salida del amplificador A2A se manda a la entrada inversora del amplificador A2B, amplificador diferencial con ganancia unitaria. A la salida de A2B, la fase de la señal, se vuelve a poner en fase con la señal de entrada. La corriente de salida de A2B se inyecta al microelectrodo por medio de $R17$ y $R24$. La corriente que pasa a través del microelectrodo genera un voltaje que pasa a su vez hacia el amplificador. Este voltaje aparece en la salida XIOUT del amplificador, en fase con la señal de entrada. La señal a la salida de XIOUT se manda después a la entrada no inversora del amplificador A2B por medio del potenciómetro $RP6$. $RP6$ se ajusta mandando la corriente de entrada a tierra, de tal manera que la salida de A2B sea exactamente igual a la señal proveniente de XIOUT. La salida de A2B está compuesta tanto por la señal de corriente de entrada como por el voltaje que se desarrolló a través de la impedancia del microelectrodo. Por lo tanto, la corriente que fluye a través de $R24$ y que va hacia el microelectrodo es igual al voltaje que hay a la salida de A2B, menos el voltaje que hay en la entrada no inversora del amplificador A2B dividido entre $R24$.

La respuesta al estímulo aplicado, se observa por medio del mismo microelectrodo por donde se inyecta la corriente. La corriente que se inyecta, se puede medir de dos formas, por medio del monitor de corriente directa, mide la corriente que se le está inyectado al microelectrodo, y por medio del monitor de corriente indirecta, mide el voltaje que se utiliza para inyectar la corriente. Este voltaje es proporcional a la corriente que se inyecta ($V = \frac{I_{inyectada}}{R24}$).

La corriente que se inyecta, pasa por la salida del amplificador A2B, por $R17$ y $R24$ y finalmente llega al microelectrodo. Cuando la corriente pasa por $R17$, se produce una diferencia de potencial. Mientras que la corriente sea pequeña ($I_{inyectada} = \frac{E_{salida} - E_{entrada}}{R24}$) entonces, la diferencia de potencial a través $R17$, será proporcionalmente pequeña ($E(R17) = I_{inyectada} \cdot R17$). El voltaje que se genera a través de $R17$ se manda al buffer A4. Las salidas de A4 se mandan al amplificador A3A, amplificador diferencial con ganancia de 10. Se hace el ajuste de la razón de rechazo de modo común ($CMMR$) con $RP11$ con el fin de aprovechar al máximo el rechazo de modo común del amplificador A3A.

La señal de salida del amplificador A3A se manda a la entrada inversora del amplificador A3B, que opera con una ganancia de 10, por medio del potenciómetro $RP10$. Éste potenciómetro permite ajustar la salida, del tal manera que se tenga a la salida de A6B, una relación de 10 mv/na. Finalmente, la salida se manda a un interruptor, $S3$, que selecciona la manera por medio de la cual se desea leer la corriente.

El monitor de corriente indirecta mide el voltaje que se utiliza para generar la corriente que se inyecta. Este voltaje es proporcional a la corriente que se inyecta. Cuando se aplica un estímulo en la entrada de corriente, Current in, éste pasa a través del divisor de voltaje $R8$ y $R9$. La señal a la salida del puente se manda a la entrada inversora del amplificador A2A y posteriormente hacia la entrada inversora de A2B. Si no se considera el circuito de retroalimentación, la señal a la salida de A2B es la misma que la señal que hay en la salida del puente. El monitor de corriente indirecta mide el voltaje que se genera a la salida del puente por medio del amplificador A1B, por lo tanto, mide el voltaje que genera la corriente que se inyectó. La salida de A1B va hacia un interruptor de selección de corriente, $S3$, manteniendo a la salida una relación de 10 mv/na.

c.- Ajuste del puente (Balance out).

La salida Balance out, se utiliza junto con el circuito de inyección de corriente. Al aplicarle corriente a la célula, se genera un voltaje a través del microelectrodo, debido a las características propias del mismo. El circuito del

Balance out permite eliminar éste voltaje, que se observa tanto en la salida XIOUT como en la respuesta de la célula. La corriente de entrada se manda tanto al divisor de voltaje ($R8$ y $R9$) como al potenciómetro de balance de DC , que se ajusta para dar cero cuando el microelectrodo está fuera de la célula. Este potenciómetro está conectado al Balance out a través del potenciómetro de balance de transientes $RP4$, que elimina los transientes que se generan después de que se hace el ajuste de DC . Con el fin de eliminar el voltaje generado por el microelectrodo, se manda una parte de la corriente de entrada, igual al voltaje generado a través del microelectrodo, hacia el Balance out.

Por un lado la salida del Balance out del amplificador es decir, el voltaje que se genera a través del microelectrodo, se manda a la entrada no inversora del seguidor de voltaje A7A. La salida de A7A se manda a la entrada inversora del amplificador A7B. El amplificador A7B tiene ganancia variable ($\times 1$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 50$, $\times 100$), para este fin se mantiene con ganancia unitaria. La fase de la señal a la salida de A7B está invertida con respecto a la fase de la señal de entrada. Esta señal se manda a un divisor de voltaje que atenúa la señal por un factor de 10. Por otro lado, la señal de salida de XIOUT es decir, la señal proporcionada por a célula mas el voltaje generado por el microelectrodo, se manda a la entrada no inversora del seguidor de voltaje A8A. La salida de A8A se manda a la entrada inversora del amplificador restador A8B de ganancia variable ($\times 1$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 50$, $\times 100$). A esta misma entrada se conecta la salida proveniente del divisor de voltaje que ésta a la salida del amplificador A7B. Dado que las dos señales están desfasadas, se restan eliminando el componente proporcionado por el voltaje que se genera a través del microelectrodo, por lo que a la salida de A8C, se tiene solamente la respuesta generada por la célula.

d.- Circuitos de prueba:

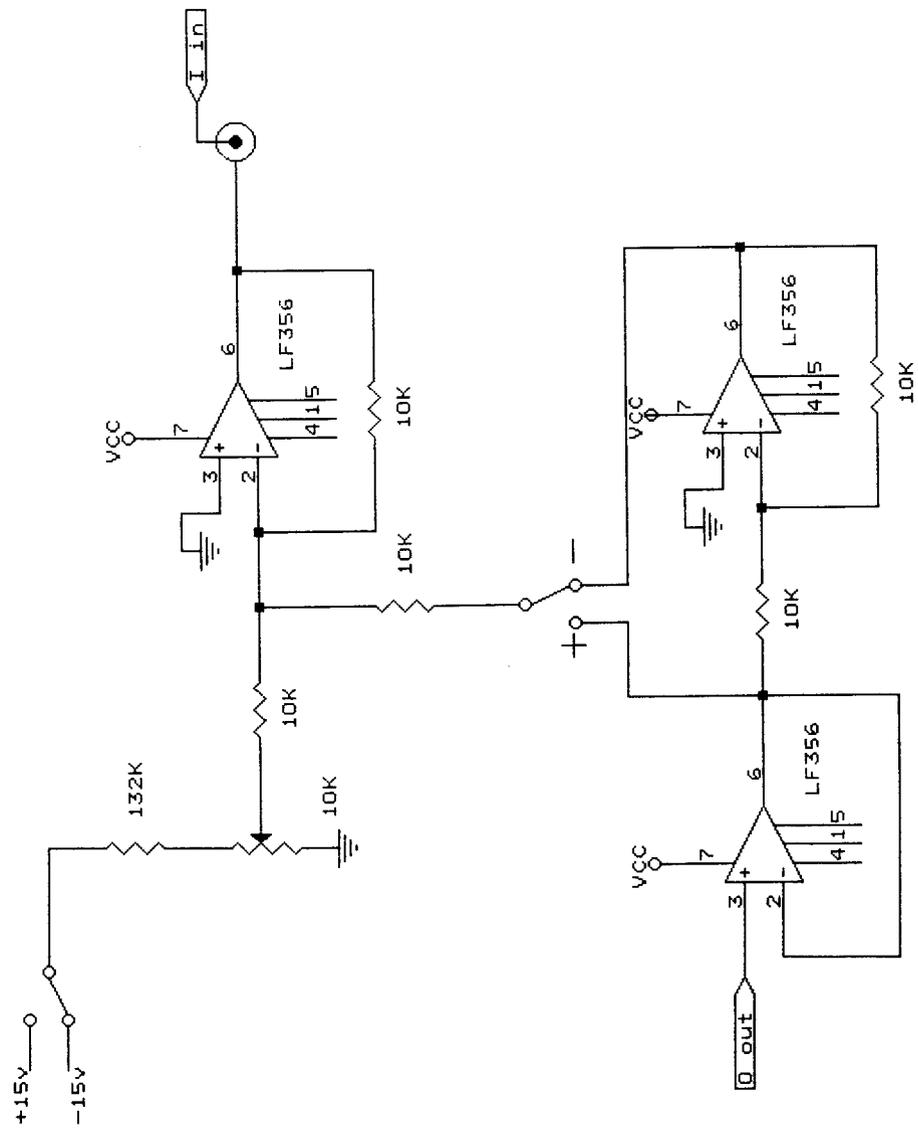
El amplificador está provisto de tres circuitos de prueba, la interna, la externa, y la de DC .

Por medio de la prueba interna del electrómetro se puede medir la resistencia del microelectrodo y hacer la compensación de las capacitancias parásitas. Está constituida por un oscilador colocado por medio de $RP1$ a una frecuencia de 500Hz. La salida se manda a la entrada inversora del amplificador A2A. La señal del oscilador pasa a través del circuito (de la misma manera en que lo hace la señal de corriente de entrada descrita anteriormente) por lo tanto, esta señal también llega al microelectrodo. La amplitud de la salida del oscilador se ajusta por medio del potenciómetro $RP2$ para dar una señal de salida en XIOUTT igual a 10 mv/M Ω de la impedancia del electrodo. El oscilador se controla a través

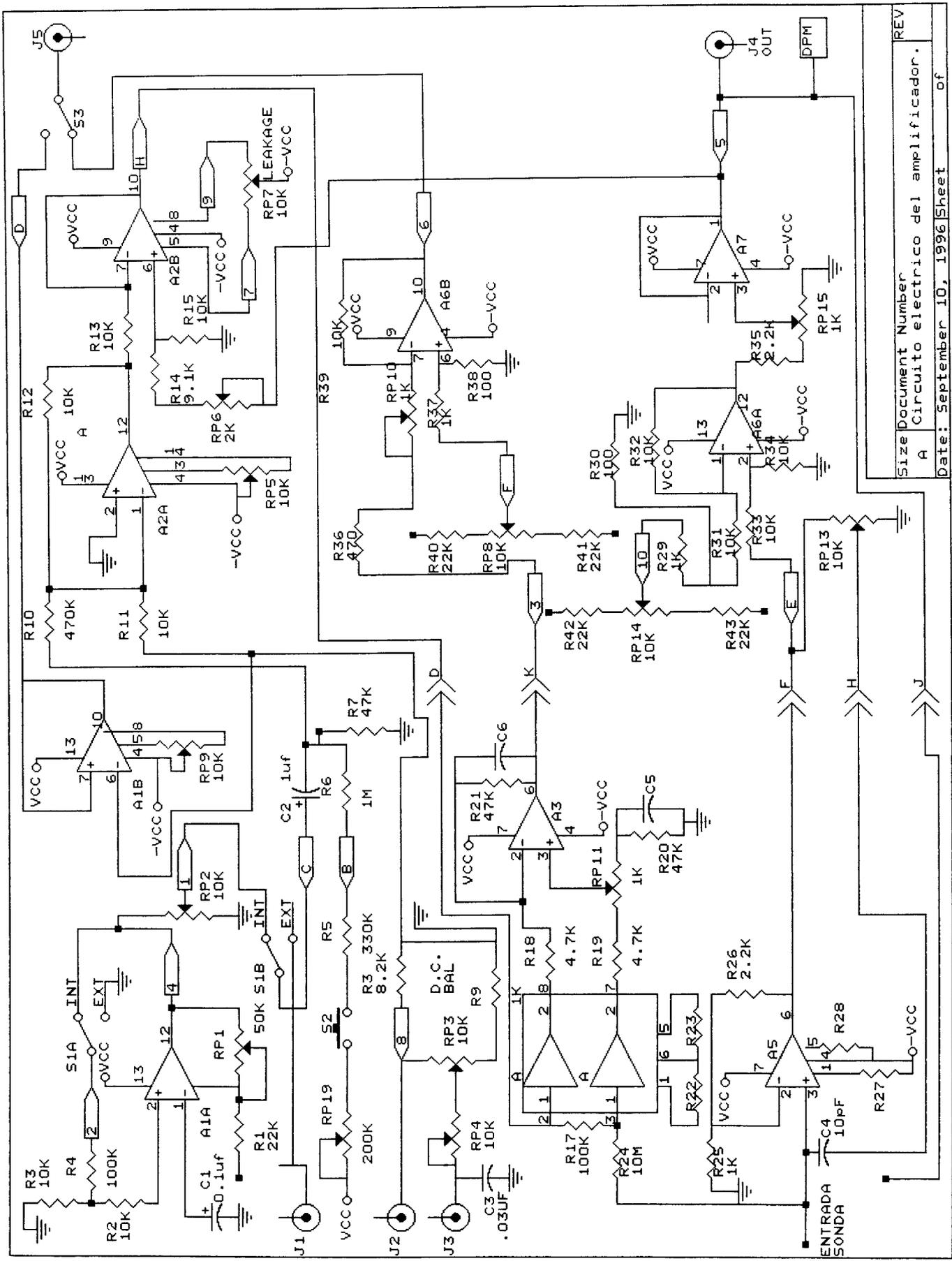
del interruptor interno-externo *S1B*. Cuando se selecciona la posición interna, el camino de la retroalimentación se cierra, y se abre un camino hacia la entrada del amplificador *A2A*. Cuando se selecciona en el interruptor la posición externa, la retroalimentación del oscilador se abre, y el camino hacia el amplificador *A2A* se cierra. Si no se está utilizando el oscilador, el interruptor debe mantenerse en la posición externa.

De la misma manera que para la prueba externa, el electrometro permite hacer una prueba por medio de una señal externa al colocar el interruptor de prueba *S1B* en la posición externa.

Finalmente, la prueba del nivel de *DC* sirve para determinar la impedancia del microelectrodo, el resultado se despliega directamente en el display. Cuando se oprime el botón de *DC*, se manda un voltaje de *DC* al circuito, de la misma manera que se manda el voltaje para las pruebas externas e internas. El voltaje de *DC* se ajusta por medio del potenciómetro *RP5* para dar a la salida *XI OUT* una salida de 10 mv/M Ω de la impedancia del microelectrodo



circuito para inyeccion de corriente	
Size	REV
Document Number	
A	
Date:	July 18, 1996
Sheet	of



Size Document Number
 A Circuito electrónico del amplificador. REV
 Date: September 10, 1996 Sheet of

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Allard Bruno, Lazdunski Michel, y Rougier Oger. "Activation of ATP-dependent K^+ channels by metabolic poisoning in adult mouse skeletal muscle: role of intracellular Mg^{2+} and pH", en la Revista Journal of Physiology, No. 485.2 (1995), p. 283 a 296.
- 2.-Alvarez-Leefmans Francisco J. "Intracellular Reference Electrodes" en el libro Practical Electrophysiological Methods. Ed. Wiley-Liss, Inc. USA 1992.
- 3.-Bezanilla Francisco, y Vergara Julio. "Properties of Excitable Membranes" en el libro Membrane Structure and Function, Vol. III, Ed. Edward Billard, 1980.
- 4.-Biscoe T.J., Duchen M.R., "Responses of type I cells dissociated from the rabbit carotid body to hypoxia". En la revista Journal of Physiology, No. 485.2 (1990), 428 pp. 39-59.
- 5.-Brazier Mary A. B. "Beginnings of Electrophysiology" en el libro A History of Neurophysiology in the 17th and 18th Centuries. Ed. Raven Press. New York, 1984, (p. 172 a 193).
- 6.-Buckler K.J. y Vaughan-Jones "Effects of the metabolic uncoupler DNP on intracellular pH and Ca^{2+} in enzymically isolated neonatal rat carotid type-I cells", en la Revista Journal of Physiology, No. 459 (1993), p. 345P.
- 7.-Cooper Gordon J. y Hunter Malcon. " Na^+ - H^+ exchange in frog early distal tubule: effect of aldosterone on the set point", en la Revista Journal of Physiology, No. 479.3 (1994), p. 423 a 432.
- 8.-De Coursey Thomas E. y Cherny Vladimir V. "Voltage-activated proton currents in membrane patches of rat alveolar epithelial cells", en la Revista Journal of Physiology, No. 489.2 (1995), p. 299 a 307.
- 9.-De Robertis., et al. "Mitocondrias y Fosforilación Oxidativa" en el libro Cell Biology. 6a. ed. Ed. W.B Saunders. Philadelphia, 1975.
- 10.-Deitmer Joachim W. y Schneider Hans-Peter. "Voltage-dependent clamp of intracellular pH of identified leech glial cells", en la Revista Journal of Physiology, No. 485.1 (1995), p. 157 a 166.
- 11.-Deutsch Sid y Deutsch Alice. Understanding the Nervous System. Ed. De IEEE Press. Nueva York, 1993.
- 12.-Dietzel I.D. , Bruns, Polder H.R., y Lux H.D. "Voltage Clamp Recording" en el libro Practical Electrophysiological Methods. Ed. Wiley-Liss, Inc. E.U., 1992.

- 13.-Durand Dominique. "Electric Stimulation of excitable Tissue" en el libro The Biomedical Engineering Handbook. Ed. De IEEE and CRC Press. E.U., 1995.
- 14.-Eckert R., Randall D., y Augustine G. Fisiología Animal. Mecanismos y adaptaciones. Ed. Interamericana. McGraw-Hill, Madrid, 1991.(Capítulos 3, 4, 5, 6, p. 35 a 176).
- 15.-Eisenman, G. (1961) On the elementary atomic origin of equilibrium ionic specificity. En: Symposium on membrane transport and metabolism. Kleinzeller, A. y Kotyk, A. eds. pp. 163-179. academic Press. New York
- 16.-García Colunga José Jesús. La Corriente de Calcio en Neuronas Peptidérgicas de Acocil Tesis para el Grado de Doctor en Ciencias, especialidad Fisiología, Centro de Investig. y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México,1991, p.1 a 33.
- 17.-Geddes L.A. "Intracellular Electrodes" en el libro Electrodes and the Measurement of Bioelectric Events. Ed. Wiley. New York, 1972 (Capítulo 4, p. 137 a 196).
- 18.-Geddes L.A. "The First Stimulators". Engineering in Medicine and Biology, Ed. De IEEE Press. Vol 13 (4), E.U., 1994, p. 532 a 542.
- 19.-Gil López Anibal, Malnic Gerhard, y Amaral Rebouças Nancy. "Dinitrophenol effect on proximal tubular acidification in the rat", en la Revista Journal of Physiology, No. 368 (1985), p. 89 a 97.
- 20.-Grill Warren M., y Mortimer J. Thomas. "Stimulus Waveforms for Selective Neural Stimulation". Engineering in Medicine and Biology, Ed. De IEEE Press. Vol. 14 (4), E.U., 1995, p. 375 a 385.
- 21.-Grinstein S., Goetz J.D., y Rothstein A. " $^{22}\text{Na}^+$ fluxes in thymic Lymphocytes", en la Revista The Journal of General Physiology, Vol. 84, (1984), p. 585 a 600.
- 22.-Grinstein Sergio, y Rothstein Aser. "Mechanism of regulation of the Na^+/H^+ exchanger", en la Revista The Journal of Membrane Biology, No. 90, (1986), p. 1 a 12.
- 23.-Grinstein Sergio, y Cohen Sara. "Cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ and Intracellular pH in Lymphocytes", en la Revista The Journal of General Physiology, Vol. 89, (1987), p. 185 a 213.
- 24.-Halliwell J.V., Plant T.D., y Standen N.B. "Voltage clamp techniques"en el libro Microelectrode techniques workshop handbook.

- 25.-Hille Bertil. "Ionic Channels in Nerve Membranes". Prog. Biophysics Molecular. Biology (1972) 21,1-32.
- 26.-Hille Bertil. Ionic Channels of Excitable Membranes. Ed. Sinauer Associates.1984. (Capítulos 1, 2, 3, 15, p 1-82; 390-423)
- 27.-
- 28.-Hinkle Peter C., y Mc. Carty Richard E. "How Cells Make ATP" en la Revista Scientific American. Marzo 1978, p104-124.
- 29.-Hodgkin A. L., y Huxley A.F.(1939) Action potentials recorded from inside a nerve fibre Nature 144: 710-711
- 30.-Hodgkin A. L., y Huxley A.F. (1952b) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. 117: 500-544.
- 31.-Hodgkin A. L., y Huxley A.F. "Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction and Excitation in Nerve", en la Revista Journal of Physiology, No. 117 (1952), p. 500 a 544.
- 32.-Hodgkin A. L., y Keynes R.D. "Active transport of cations in giant axons from sepia and loligo", en la Revista Journal of Physiology, No. 128 (1955), p. 28 a 60.
- 33.-Junge Douglas. Nerve and Muscle Excitation, Ed. Sinauer Associates Inc., 2a. edición, E.U., 1981
- 34.-Johnson David E., Hilburn John L., y Johnson Johnny R. Análisis Básico de Circuitos Eléctricos. Ed. Prentice Hall. México 1987.
- 35.-Kartalopoulos Stamatios V. "Biological Neural Networks" en el libro Understanding Neural Networks and Fuzzy Logic. Ed. IEEE Press. Nueva York, 1996 (Capítulo 1, p. 1 a 34).
- 36.-Lakshminarayanaiah N. "Impedance, Cable Theory, and Hodgkin-Huxley Equations" en el libro Equations of Membrane Biophysics. Ed. Academic Press, Inc. Londres, 1984, (Capítulo 7, p. 328 a 367).
- 37.-Latorre, R. y Miller, C. (1983) Conduction and selectivity in potassium channels. J. Membr. Biol., 71: 11-30.
- 38.-Lenhinger, Albert L. "Fosforilación oxidativa, estructura mitocondrial y compartimentación del metabolismo respiratorio" en el libro Bioquímica, 2a. edición, Ed. Omega S.A., Barcelona, 1988.

- 39.-Levitan, I.B. (1988) Modulation of ion channels in neurons and other cells. *Ann. Rev. Neurosci.* 11: 119-136.
- 40.-Marty Alain, y Neher Erwin, "Tight-seal whole-cell recording" en el libro Single Channel Recording. Ed. Plenum Press, Nueva York, 1983.
- 41.-Meech R.W., y Thomas R. C. "Voltage-dependent intracellular pH in Helix Aspersa neuronas", en la Revista *The Journal of Physiology*, No. 390, (1987), p. 433 a 452.
- 42.-Meech R.W., 1979. Membrane potential oscillations in molluscan "burster" neuronas, *J. Exp. Biol.* 81: 93-112.
- 43.-Mei-Lin Wu, y Vaughan-Jones R.D. "Effect of metabolic inhibitors and second messengers upon $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange in the sheep cardiac Purkinje fibre", en la Revista *The Journal of Physiology*, No. 478.2, (1994), p. 301 a 313.
- 44.-Mitchell Peter. "Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: natural fuel cells and solar cells", en la Revista *Federation Proceedings*, Vol. 26, No. 5 (1967), p. 1370 a 1379.
- 45.-Moody, William Jr., "effects of intracellular H^+ on the electrical properties of excitable cells.", *Ann. Rev. Neurosci.* 1984 7: 257-78.
- 46.-Moody, William Jr., "appearance of calcium action potentials in crayfish slow muscle fibres under conditions of low intracellular pH. *J. Physiol.* 302: 335-46.
- 47.-Morris, C.E. (1990) Mechanosensitive ion channels. *J. Membr. Biol.* 113: 93-107.
- 48.-Müller Christian M. "Extra- and intracellular voltage recording in the slice" en el libro Practical Electrophysiological Methods. Ed. Wiley-Liss, Inc., E.U. 1992.
- 49.-Müller Christian M. "Intracellular Microelectrodes" en el libro Practical Electrophysiological Methods. Ed. Wiley-Liss, Inc., E.U. 1992.
- 50.-Mayes, Peter.A., "Bioenergética: Función del ATP", "Oxidación Biológica" y "Cadena Respiratoria y Fosforilación Oxidativa" en el libro Biología de Harper. Ed. Manual Moderno. México D.F.,1994, (Capítulos No. 12, 13, y 14, p.127 a 156).
- 51.-Nagel Joachmin H. "Biopotential amplifiers" en el libro The Biomedical Engineering Handbook. Ed. CRC and IEEE Press. E.U. 1995, (Capítulo 72, p.1185 a 1195).

- 52.-Neuman Michael R. "Biopotential amplifiers" en el libro Medical Instrumentation Application and Design. Ed.Houghton Mifflin. E.U., 1992, (p. 288 a 353).
- 53.-Onetti Carlos G., García Ubaldo, Valdiosera René F., y Aréchiga Hugo. "Ionic currents in crustacean neurosecretory cells" en la Revista Journal of Neurophysiology, Vol. 64, No. 5, (1990), p.1514 a 1526.
- 54.-Pan J.W., Hamm J.R., Rothman D.L., Shulman R.G., "Intracellular pH in human skeletal muscle by ^1H NMR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, pp 7836-7839, November 1988.
- 55.-Purves R.D. Microelectrode Methods for Intracellular Recording and Ionophoresis. Ed. Academic Press. Inglaterra, 1981, (Capítulos 2, 3, 4 y 5, p.13 a 91).
- 56.-Redman Stephen J. "Single Electrode Voltage Clamp" en el libro Practical Electrophysiological Methods. Ed. Wiley Liss, Inc., E.U.,1992.
- 57.-Renner Eberhard L., Lake John R., Cragoe Jr. Edward J., y Scharschmidt Bruce F. "Amiloride and amiloride analogs inhibit Na^+/K^+ -transporting ATPase and Na^+ - coupled alanine transport in rat hepatocytes", en la Revista Biochimica et Biophysica Acta, No. 938, (1988), p. 386 a 394.
- 58.-Rocher, A., Obeso, A., Gonzalez, C and Herreros B., "Ionic mechanism for the transduction of acidic stimuli in rabbit carotid body glomus cells", Journal of Physiology (1991), 433, pp. 533-548.
- 59.-Roth Bradle J. "The Electrical Properties of Tissues" en el libro The Biomedical Engineering Handbook. De IEEE and CRC Press, E.U., 1995.
- 60.-Sigworth, F.J. 1980b. The conductance of sodium channels under conditions of reduced current at the node of Ranvier. J. Physiol (Lond) 307: 131-142.
- 61.-Van Harreveld, A. (1936) "A physiological solution for fresh water crustaceans". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34: 428-432.
- 62.-Wanke E. Carbone, E., Testa, P.L. 1979. "K conductance modified by a titratable group accesible to protons from the intracellular side of the squid axon membrane". Biophys. J. 26: 319-24.