

9
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA

DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CORRIENTES IONICAS GENERADAS A TRAVES DE LA MEMBRANA DE UNA
NEURONA RESULTANTES DE LA INHIBICION DE LA BOMBA DE Na^+/K^+ Y
SU RELACION CON LOS MECANISMOS DE MANTENIMIENTO Y REGULACION
DEL VOLUMEN CELULAR**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

JULIO ALTAMIRANO BARRERA

MEXICO, D.F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE
NEUROBIOLOGIA DE LA DIVISION DE NEUROCIENCIAS DEL
INSTITUTO MEXICANO DE PSIQUIATRIA, BAJO LA DIRECCION
DEL Dr. FRANCISCO JAVIER ALVAREZ LEEFMANS
Y DEL M. en C. HUMBERTO CRUZBLANCA HERNANDEZ**

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

a	Actividad
$d[Na^+]/dt$	Tasa inicial de aumento de la concentración intracelular de Na^+ (mM/min)
E	Potencial de DONNAN
E_c	Potencial comando
E_H	Potencial de fijación o mantenimiento
E_{ion}	Potencial de equilibrio electroquímico para un ión difusible (v.g.: E_{Na} ; para el caso del Na^+)
E_m	Potencial de membrana
$E_{Na/Ca}$	Potencial de equilibrio del intercambiador Na^+/Ca^{2+}
F	Constante de FARADAY (96480 C/mol)
γ	Coefficiente de actividad
h	Cociente volumen/área de la célula (cm)
I_m	Corriente de membrana (nA)
$\Delta\pi$	Diferencia de presión osmótica
$\Delta\pi=0$	Equilibrio osmótico
Φ_{Na+}	Flujo neto de Na^+ (pmoles/cm ² ·s)
$q_m(t)$	Carga eléctrica (C) con respecto al tiempo
R	Constante universal de los gases (8.314 V·C/K·mol)
RN	Solución Ringer Normal
T	Temperatura absoluta (°K)
τ	Constante de tiempo
TEA	Tetraetilamonio
TMA ⁺	Tetrametilamonio
VCA	Volumen celular acuoso
z	Valencia de un ión
4-AP	4 aminopiridina
$[Na^+]_i$	Concentración intracelular libre de una especie ionica (en este caso del Na^+)
$[Na^+]_o$	Concentración extracelular libre de una especie ionica (en este caso del Na^+)

INDICE

1 OBJETIVOS	1
2 INTRODUCCION	
2.1 Resumen.....	2
2.2 Marco teórico	
2.2.1 Equilibrio de GIBBS-DONNAN.....	5
2.2.2 Hipótesis de TOSTESON y HOFFMAN.....	10
2.3 Antecedentes.....	14
2.4 Hipótesis de trabajo.....	16
3 METODOS	
3.1 Material biológico.....	17
3.1.1 Preparación del material biológico.....	18
3.2 Técnica de fijación de voltaje.....	21
3.3 Dispositivo experimental.....	25
3.4 Soluciones.....	26
4 RESULTADOS	
4.1 Corrientes iónicas resultantes de la inhibición de la bomba de Na ⁺ con ouabaina.....	29
4.2 Efecto de bloqueadores de canales de K ⁺ sobre las corrientes iónicas resultantes de la inhibición de la bomba de Na ⁺	32
4.3 Efecto del cadmio sobre las corrientes iónicas resultantes de la inhibición de la bomba de Na ⁺	35

4.4 Estimación de la tasa inicial de aumento en la concentración intracelular de Na^+ y del flujo neto de Na^+ a partir de las corrientes iónicas resultantes de la inhibición de la bomba de Na^+	38
---	----

5 DISCUSION

5.1 Corriente entrante.....	44
5.2 Relajación de la corriente entrante.....	46
5.2.1 Posibles consecuencias de la inversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	48
5.3 Corriente saliente.....	49
5.4 Correlación entre movimientos iónicos y cambios de volumen celular acuoso a consecuencia de la inhibición de la bomba de Na^+	51
5.4.1 ¿Puede explicarse el incremento transitorio de volumen con base en la hipótesis de TOSTESON y HOFFMAN?.....	51
5.4.2 ¿Es suficiente el eflujo de K^+ , acompañado por un anión y agua, para explicar la disminución en el volumen celular?.....	52
5.4.3 Posible relación de los resultados experimentales con los fenómenos patológicos que ocurren durante la anoxia en el tejido nervioso.....	53

6 CONCLUSIONES.....	55
---------------------	----

7 REFERENCIAS.....	57
--------------------	----

1 OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo fue: contribuir al conocimiento de los mecanismos iónicos que subyacen a los cambios en el volumen celular acuoso que ocurren en neuronas del caracol terrestre *Helix aspersa* a consecuencia de la inhibición de la bomba de Na^+ .

Los objetivos específicos fueron:

a) Registrar las corrientes iónicas resultantes de la inhibición farmacológica de la bomba de Na^+ con el glucósido ouabaína.

b) Identificar los tipos de iones que generan las corrientes que fluyen a través de la membrana plasmática durante la inhibición de la bomba de Na^+ .

c) Correlacionar dichos movimientos iónicos con los cambios de volumen que se ha descrito, ocurren en respuesta a la misma maniobra experimental en neuronas de *H. aspersa*.

2 INTRODUCCION

2.1 Resumen

Una necesidad esencial para la vida de las células es la de mantener su volumen constante en condiciones fisiológicas. Esta propiedad es un ejemplo, a escala celular, de un principio fundamental de la fisiología, postulado inicialmente por CLAUDE BERNARD (1813-1878), conocido como homeostasis. De acuerdo con este postulado, una condición indispensable para la vida, es el mantenimiento del medio interno del organismo, independientemente de los cambios que ocurren en el exterior del mismo.

Las células animales, en condiciones fisiológicas, se encuentran en equilibrio osmótico con el fluido extracelular. Es decir, no existe diferencia de presión osmótica ($\Delta\pi$) a través de la membrana plasmática, a pesar de que en el citosol se encuentran macromoléculas impermeantes cargadas negativamente (v.g.: proteínas), las cuales generan un gradiente de presión coloidosmótica dirigido hacia el interior celular. De acuerdo con la teoría de GIBBS-DONNAN (véase adelante), este desbalance induce la entrada de cationes difusibles a través de la membrana plasmática. A esto debe agregarse que el gradiente electroquímico del Na^+ está dirigido hacia el interior celular. Por lo tanto, hay una tendencia a la entrada de Na^+ acompañado por un anión, generalmente el Cl^- . Si estos iones alcanzaran el equilibrio de GIBBS-DONNAN, su flujo neto se acompañaría de un flujo neto de agua

al interior celular hasta alcanzar un nuevo equilibrio osmótico ($\Delta\pi=0$). Dado que la membrana plasmática es distensible, el nuevo estado de equilibrio se lograría a expensas de un aumento del volumen celular acuoso, es decir, un aumento en el contenido de agua intracelular que actúa como solvente (VCA). El hecho de que ésto no ocurra, demuestra que el equilibrio osmótico de las células con el fluido extracelular, se mantiene en contra de fuerzas fisicoquímicas bien establecidas. ¿Cuáles son los mecanismos que contrarrestan el gradiente de presión coloidosmótica en condiciones fisiológicas?

Comunmente se acepta que la tendencia del agua y de los iones difusibles a entrar a las células animales, es contrarrestada por la actividad de la bomba de Na^+/K^+ , o simplemente bomba de Na^+ (TOSTESON y HOFFMAN, 1960). Este postulado conocido como "hipótesis de la bomba y de la fuga", establece que la entrada de Na^+ , se contrarresta por la expulsión activa de este catión. De manera que, la membrana plasmática se comporta como si fuese impermeable al Na^+ , evitando que se alcance el equilibrio de GIBBS-DONNAN. Como corolario de esta hipótesis, se acepta que el bloqueo de la bomba de Na^+ , propiciaría un aumento en el VCA y eventualmente, lisis celular osmótica. Sin embargo, en estudios realizados en neuronas de *Helix aspersa* (ALVAREZ-LEEFMANS, GAMIÑO y REUSS, 1992), se ha demostrado que la respuesta principal durante la inhibición de la bomba de Na^+ , contrario a lo postulado por esta hipótesis, es una disminución en el VCA, que sólo en ocasiones es precedido por un aumento transitorio del mismo, a pesar de que al

inhibir la bomba de Na^+ se produce un aumento en el Na^+ intracelular (CRUZBLANCA y cols., 1992). Esto sugiere, que las neuronas cuentan con mecanismos independientes de la bomba de Na^+ que permiten la salida de partículas osmóticamente activas y agua, llevando a la restauración e incluso a la disminución del VCA.

Entonces cabe preguntarse: ¿Cuál o cuáles pueden ser estos mecanismos?, ¿cuál puede ser la señal que los activa y cuáles pueden ser las partículas osmóticamente activas involucradas en esta respuesta celular?

Por otro lado, ¿es suficiente la tasa de aumento del Na^+ intracelular cuando se inhibe la bomba de Na^+ para explicar el incremento transitorio en el VCA?

Para responder a estas preguntas y alcanzar los objetivos planteados, se utilizó como modelo experimental a las neuronas identificadas del caracol terrestre *Helix aspersa*. Los flujos iónicos que resultan de la inhibición de la bomba de Na^+ , se midieron como una corriente iónica, mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Equilibrio de GIBBS-DONNAN

Para entender el comportamiento osmótico de una célula en un medio isosmótico. Es necesario, comprender primero cómo se genera la distribución de las diferentes especies iónicas en ambos lados de una membrana semipermeable, en un sistema físico simple. El modelo de la figura 1 se compone de dos compartimientos separados por una membrana permeable al agua, al Na^+ y al Cl^- , pero impermeable al anión monovalente P^- . Ambos compartimientos están cerrados a la atmósfera y sus paredes son rígidas. Al tiempo cero (t_0), en el compartimiento o se coloca una solución de NaCl y en el compartimiento i, una solución de la sal NaP . Esta última se disocia en el catión Na^+ y en el anión P^- . Al inicio, la concentración libre de Na^+ , es igual en ambos lados de la membrana, pero como en el compartimiento i no hay Cl^- , este último difundirá de o a i siguiendo su gradiente de concentración.

* En este trabajo se usa "concentración libre", pero estrictamente debería usarse "actividad", ya que esta última se refiere a la concentración termodinámica efectiva, es decir, representa la fracción de los iones que potencialmente pueden participar en cualquier reacción o equilibrio químico. El concepto de actividad considera las interacciones que ocurren entre los iones presentes en la solución, así como las que ocurren entre los iones y las moléculas de agua. Estas interacciones reducen la concentración efectiva de una especie iónica en particular. En soluciones infinitamente diluidas esas interacciones son insignificantes y la concentración es equivalente a la actividad. Comúnmente en biología se emplea concentración en lugar de la actividad. Para ello, se supone que la fuerza iónica en el interior celular es constante y que el coeficiente de actividad de una especie iónica es el mismo en el interior que en el exterior celular. Operacionalmente, la actividad (a), se expresa como $a=\gamma c$, donde γ es el coeficiente de actividad, éste es un factor de corrección que nos permite conocer la concentración (c) a partir de la actividad o viceversa.

Sin embargo, de acuerdo con el principio de electroneutralidad, todo movimiento de Cl^- , se acompañará de un movimiento equivalente de Na^+ . Es decir, macroscópicamente no existirá una separación neta de carga a través de la membrana.

En todo momento:

$$[\text{Na}^+]_o = [\text{Cl}^-]_o \quad (1)$$

mientras que:

$$[\text{Na}^+]_i = [\text{Cl}^-]_i + [\text{P}^-]_i \quad (2)$$

Donde: $[\text{Na}^+]_o$, $[\text{Cl}^-]_o$, $[\text{Na}^+]_i$, $[\text{Cl}^-]_i$ y $[\text{P}^-]_i$, son las concentraciones libres de Na^+ , Cl^- y P^- respectivamente. Los subíndices indican el compartimiento donde se encuentra cada especie iónica.

La distribución asimétrica de los iones difusibles a través de la membrana, tendrá como consecuencia el establecimiento de una diferencia de potencial eléctrico a través de la misma.

La ecuación de Nernst describe la magnitud del potencial eléctrico necesario para que el flujo neto de cada uno de los iones difusibles sea cero, de acuerdo con su gradiente de concentración. Para el caso particular del Na^+ , ésta sería la siguiente:

$$E_{\text{Na}} = RT/zF \ln[\text{Na}^+]_o/[\text{Na}^+]_i \quad (3)$$

Donde E_{Na} es la diferencia de potencial eléctrico al cual el flujo neto de Na^+ a través de la membrana es cero.

R es la constante universal de los gases (8.314 V·C/K·mol).

T es la temperatura absoluta (°K), z es la valencia del ión. F es la constante de FARADAY (96480 C/mol).

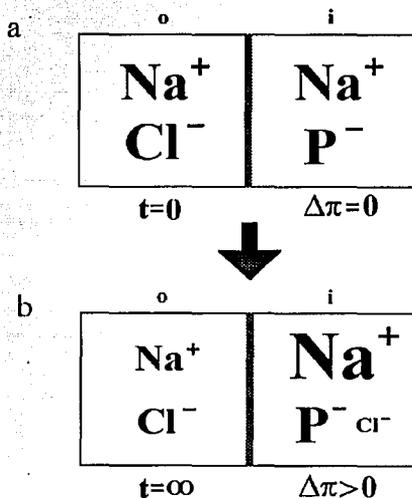


Figura 1. EQUILIBRIO DE GIBBS-DONNAN. En esta figura se ilustra la distribución de los iones en un sistema fisicoquímico compuesto por dos compartimientos cerrados a la atmósfera y separados entre sí por una membrana permeable al agua, al Na⁺ y al Cl⁻ e impermeable al anión P. Al inicio (t=0), el compartimiento o contiene una solución de NaCl y el compartimiento i contiene una solución de la sal NaP, ("A"). A medida que transcurre el tiempo, una fracción de Cl⁻ difundirá del compartimiento o al compartimiento i acompañado por una cantidad equivalente de Na⁺ para mantener la electroneutralidad del sistema. Esto da como resultado que en el estado de equilibrio ("B"), se presente una distribución iónica asimétrica, donde el compartimiento i tiene una cantidad mayor de iones, es decir, un mayor número de partículas osmóticamente activas que generan un gradiente de presión osmótica entre ambos compartimientos. Esta distribución se conoce como equilibrio de GIBBS-DONNAN y está dada por la siguiente igualdad: [Na⁺]_o [Cl⁻]_o = [Na⁺]_i [Cl⁻]_i. Aunado a lo anterior, la distribución asimétrica de los iones, genera una diferencia de potencial eléctrico entre ambos compartimientos, conocido como potencial de DONNAN (E), siendo el compartimiento i negativo con respecto al compartimiento o.

Sin embargo, no importa cuantos tipos de iones difusibles haya en solución, en el equilibrio al tiempo t_n ($n \rightarrow \infty$), un sólo valor de potencial eléctrico a través de la membrana, conocido como potencial de DONNAN, satisface simultaneamente la distribución de todos los iones difusibles, en este caso del Na^+ y del Cl^- , es decir:

$$E = RT/zF \ln[\text{Na}^+]_o/[\text{Na}^+]_i = RT/zF \ln[\text{Cl}^-]_i/[\text{Cl}^-]_o \quad (4)$$

Donde E es el potencial de DONNAN.

De la ecuación 4 resulta que:

$$[\text{Na}^+]_o/[\text{Na}^+]_i = [\text{Cl}^-]_i/[\text{Cl}^-]_o \quad (5)$$

El estado de equilibrio para un sistema como éste, está dado por la siguiente igualdad, conocida como ecuación de GIBBS-DONNAN:

$$[\text{Na}^+]_o \cdot [\text{Cl}^-]_o = [\text{Na}^+]_i \cdot [\text{Cl}^-]_i \quad (6)$$

Esta ecuación establece que en el estado de equilibrio, el producto de las concentraciones de los iones difusibles en el compartimiento o, será igual al producto de las concentraciones de los iones difusibles del compartimiento i.

En estas condiciones:

$$[\text{Na}^+]_i > [\text{Na}^+]_o \quad (7)$$

De igual manera:

$$[\text{Cl}^-]_i < [\text{Cl}^-]_o \quad (8)$$

Entonces:

$$[\text{Na}^+]_i + [\text{Cl}^-]_i + [\text{P}]_i > [\text{Na}^+]_o + [\text{Cl}^-]_o \quad (9)$$

Por lo tanto, en el estado de equilibrio, la cantidad de partículas osmóticamente activas en el compartimiento *i*, es mayor que en el compartimiento *o*.

En conclusión, la presencia de los aniones no difusibles (P) en *i*, resulta en una desigualdad de la distribución de los iones difusibles (Na⁺ y Cl⁻). Cuando este sistema alcanza el estado de equilibrio predicho por la teoría de GIBBS-DONNAN, entre ambos compartimientos existe una $\Delta\pi$. Dada la permeabilidad de la membrana al agua, la $\Delta\pi$ favorece el flujo neto del solvente hacia el compartimiento *i*. Es decir, el agua tiende a moverse hacia el compartimiento donde su actividad química es menor. Sin embargo, dado que las paredes del compartimiento *i* son rígidas, no hay flujo neto de agua. Por lo tanto, el compartimiento *i* no aumenta de volumen.

El equilibrio osmótico de una célula, cuya membrana plasmática es permeable al agua, a iones inorgánicos como el Na⁺, el K⁺ y el

Cl⁻, pero impermeable a las macromoléculas orgánicas que se encuentran en el citosol, como las proteínas, las cuales debido al pH intracelular (7.2-7.4) están cargadas negativamente, requeriría que los iones difusibles se distribuyesen de acuerdo con las predicciones de la teoría de GIBBS-DONNAN. Sin embargo, si se alcanzara este equilibrio, se generaría un gradiente de presión coloidosmótico dirigido hacia el interior celular. Considerando la alta distensibilidad de la membrana plasmática, el influjo osmótico de agua tendría como consecuencia que la célula aumentara su volumen en un medio isosmótico, incluso hasta la eventual citólisis osmótica.

Sin embargo, en condiciones fisiológicas, el gradiente de presión osmótica entre el medio intracelular y el extracelular, es virtualmente inexistente.

En la siguiente sección se explica el mecanismo que se acepta como responsable del mantenimiento del volumen celular.

2.2.2 Hipótesis de TOSTESON y HOFFMAN

Dado que el gradiente electroquímico del Na⁺ está dirigido al interior celular, este catión continuamente se filtra hacia el citosol a través de diversas vías, cuya naturaleza no se conoce completamente, pero que incluyen canales iónicos y sistemas de transporte secundario. Estos últimos acoplan el movimiento de otros iones o metabolitos, con la entrada de Na⁺. Por ejemplo, el intercambiador Na⁺/Ca²⁺, el intercambiador Na⁺/H⁺, los

cotransportadores $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ y $\text{Na}^+\text{-glucosa}$. Finalmente, la actividad eléctrica (potenciales de acción) de las células nerviosas, también contribuye a la entrada de Na^+ . El influjo continuo de Na^+ , es seguido por la entrada de Cl^- para mantener la electroneutralidad del sistema. Sin embargo, el Na^+ intracelular no aumenta indefinidamente, de lo contrario traería cambios en la osmolalidad intracelular, que se reflejarían en un aumento del volumen celular. Se acepta que la bomba de Na^+ es el mecanismo que mantiene constantes los gradientes de Na^+ y K^+ , conservando la isosmolalidad transcelular y, por ende, el volumen celular en condiciones fisiológicas (TOSTESON y HOFFMAN, 1960).

La bomba de Na^+ es una enzima localizada en la membrana plasmática de todas las células animales. Esta proteína expulsa tres iones Na^+ e introduce dos iones K^+ por cada ciclo, mediante la hidrólisis de una molécula de ATP. Dada su estequiometría, la bomba de Na^+ consigue la expulsión neta de una partícula osmóticamente activa y una carga positiva por cada ciclo. La salida neta de un ión positivo, contribuye al potencial de reposo de la célula, haciéndolo más negativo, de ahí que la bomba de Na^+ sea electrogénica (THOMAS, 1972a; THOMAS, 1972b; STEIN, 1990).

En la figura 2 se ilustra un modelo esquemático de la secuencia de cambios conformacionales de la bomba de Na^+ , para llevar a cabo el transporte activo de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática. De acuerdo con este modelo, cada ciclo de la

bomba de Na^+ se realiza de la siguiente manera: el primer paso, es la unión de tres iones Na^+ a la cara intracelular de la bomba, esto favorece la unión de una molécula de ATP, lo cual a su vez da lugar a un cambio conformacional de la molécula. Este cambio, permite el transporte del Na^+ al exterior celular y simultaneamente expone el sitio de unión para el K^+ . La unión de dos iones K^+ determina la hidrólisis del ATP (fosforilación), liberando ADP y P^+ inorgánico. Finalmente, la bomba retorna a su conformación original, introduciendo así al K^+ (ALBERTS y cols., 1989).

Si la eliminación de partículas osmóticamente activas (Na^+), por la bomba de Na^+ , es el mecanismo que permite a la célula mantener el equilibrio osmótico en condiciones fisiológicas, entonces, la predicción fundamental de esta hipótesis sería que, la inhibición de la bomba de Na^+ , por disminución de ATP o por cualquier otro medio, debería de provocar un aumento en el volumen celular. Este aumento sería proporcional a la entrada de Na^+ acompañado por una cantidad equivalente de Cl^- u otro anión y de agua (MACKNIGHT y LEAF, 1977).

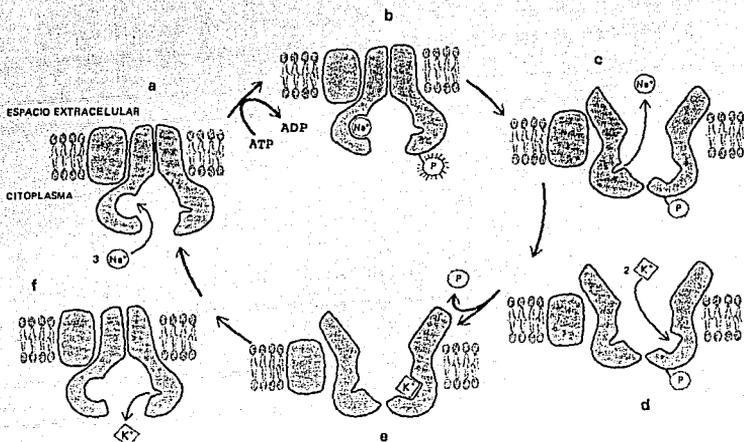


Figura 2. MODELO ESQUEMATICO DEL FUNCIONAMIENTO DE LA BOMBA DE Na⁺. Se ilustra como la bomba de Na⁺ transporta los iones a través de la membrana plasmática. Este mecanismo se realiza como a continuación se describe: (a) La unión de tres iones Na⁺ favorece (b) la captura de una molécula de ATP en la cara intracelular de la bomba y esta última induce (c) un cambio conformacional en la proteína, liberando el Na⁺ en el medio extracelular y (d) exponiendo a su vez el sitio de unión para dos iones K⁺, esto favorece (e) la hidrólisis del ATP e induce (f) el retorno a la conformación original, liberando el K⁺ al medio intracelular (modificado de ALBERTS y cols., 1989).

2.3 Antecedentes

En la figura 3 se ilustran los resultados de estudios realizados en neuronas identificadas de *H. aspersa*, utilizando una técnica electrofisiológica para registrar de manera continua cambios relativos en el VCA y en el potencial de membrana (E_m)^{*} (ALVAREZ-LEEFMANS, GAMIÑO y REUSS, 1992). En estos experimentos se encontró que, contrariamente a lo que predice la hipótesis de TOSTESON y HOFFMAN (1960), la inhibición de la bomba de Na^+ con ouabaína (1mM), produjo una reducción en el VCA en el 70% de las neuronas estudiadas. Sólo en el 35% de estas células, la disminución fue precedida por una fase de incremento transitorio del VCA. Mientras que en el 20% de las neuronas no se registró cambio alguno.

En otros experimentos realizados con microelectrodos selectivos al Na^+ , se verificó la inhibición de la bomba de Na^+ por el incremento en la $[Na^+]_i$. La tasa de aumento de la $[Na^+]_i$ fue de 0.42 ± 0.05 mM/min ($n=27$), a partir de una concentración inicial de 6.17 ± 0.6 mM. Esto representa un aumento en la concentración intracelular de Na^+ del 6.8% (ALTAMIRANO y cols., 1992; CRUZBLANCA y cols., 1992; CRUZBLANCA y cols., 1993).

* Esta técnica consiste en introducir a la célula un marcador del VCA, por ejemplo, el ión tetrametilamonio (TMA^+). Una vez en el citosol, el TMA^+ no puede escapar al medio extracelular, ni es compartamentalizado o metabolizado, de tal forma que la cantidad de partículas de TMA^+ (n_{TMA}), permanece constante a través del tiempo. Con microelectrodos intracelulares selectivos al TMA^+ , se puede registrar la actividad de este catión (a_{TMA}). El VCA se relaciona con a_{TMA} de acuerdo con la siguiente ecuación: $VCA = n_{TMA}/a_{TMA}$. Dado que n_{TMA} es constante, los cambios en el VCA, producen cambios recíprocos en a_{TMA} .

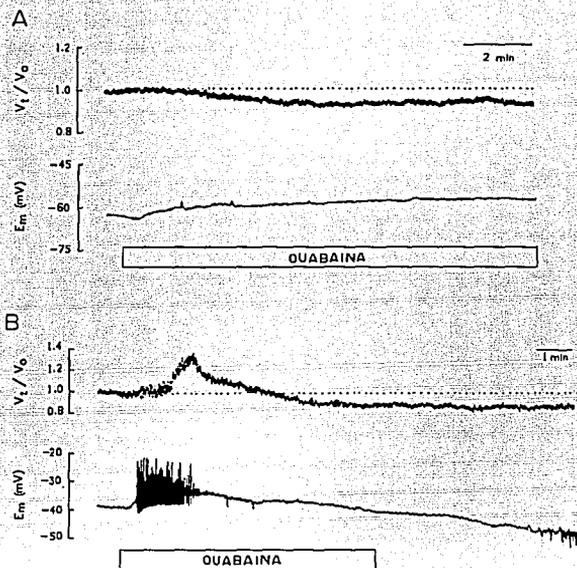


Figura 3. EFECTO DE LA INHIBICION DE LA BOMBA DE Na^+ SOBRE EL VOLUMEN CELULAR ACUOSO EN DOS NEURONAS. A) neurona 77F y B) neurona 1F. En cada panel el trazo superior es el registro del volumen celular relativo (V_i/V_o) y el trazo inferior es el registro simultaneo del potencial de membrana (E_m). La barra horizontal indica el tiempo de aplicación de la ouabaína (1mM). En A se muestra un ejemplo de los cambios que, con mayor frecuencia, se observaron. Nótese que V_i/V_o disminuyó durante la inhibición de la bomba de Na^+ . En B la disminución de V_i/V_o fue precedida por un incremento rápido y transitorio del mismo (modificado de ALVAREZ-LIEFMANS, GAMIÑO y REUSS, 1992).

De acuerdo con la hipótesis de TOSTESON y HOFFMAN (1960), este aumento en la $[\text{Na}^+]_i$, junto con el incremento concomitante en la $[\text{Cl}^-]_i$ (u otro anión) y la entrada de agua, debería producir un aumento en el VCA.

Entonces, ¿por qué la mayoría de las neuronas, responde con una disminución en el VCA? ¿cuáles pueden ser los mecanismos que subyacen estos cambios en el volumen celular y cuál puede ser la señal que los activa? Finalmente, ¿cuáles pueden ser las partículas osmóticamente activas involucradas en esta respuesta celular?

2.4 Hipótesis de trabajo

Dado que la respuesta más frecuente a la inhibición de la bomba de Na^+ en las neuronas de *H. aspersa* consiste de una disminución del VCA, ésto sugiere que hay una pérdida neta de partículas osmóticamente activas y agua. Dado que el K^+ es el catión intracelular más abundante y que su gradiente electroquímico se dirige hacia el exterior, en el presente trabajo se postula que este catión, acompañado por Cl^- o algún otro anión y agua, es el responsable de dicha respuesta. De ser así, cambios en la concentración intracelular de ciertos iones (v.g.: Ca^{2+}) podrían ser la señal que activa la liberación de partículas osmóticamente activas.

En condiciones de fijación de voltaje, el flujo de iones que ocurre a través de la membrana plasmática durante la inhibición de la bomba de Na^+ , debería ser registrado como una corriente eléctrica. Si este es el caso, a partir de esa corriente se pueden estimar cambios en la osmolalidad intracelular y éstos pueden ser correlacionados con los cambios de volumen celular descritos.

3 METODOS

3.1 Material biológico.

Desde 1959, HAGIWARA y SAITO demostraron la utilidad de los cuerpos de las neuronas de molusco, como modelo experimental para la investigación en neurobiología utilizando la técnica de fijación de voltaje. El éxito de la preparación biológica, se debe a que estas neuronas presentan las siguientes características: a) son unipolares y sus somas se disponen en una capa superficial en cada uno de los ganglios que forman el sistema nervioso de estos animales; b) el soma es prácticamente esférico, en promedio el diámetro de las células de caracol aquí utilizadas fue de $160 \pm 5 \mu\text{m}$ ($n=31$), mientras que el diámetro del soma de la mayoría de las neuronas del cerebro, de la médula espinal y de la retina de los vertebrados, es menor de $20 \mu\text{m}$. Por esta razón, las neuronas de molusco son accesibles a la penetración intracelular, con uno o más microelectrodos, sin alterar de manera irreversible sus propiedades eléctricas y permiten la obtención de registros electrofisiológicos por varias horas; c) su posición anatómica, tamaño y propiedades eléctricas son similares de un animal a otro; d) los sistemas de transporte de solutos (canales, bombas y acarreadores) que se encuentran en la membrana plasmática de estas células, son similares a los que se encuentran en las neuronas de vertebrados, incluyendo al hombre, como lo demuestran estudios comparativos de las propiedades biofísicas y moleculares de estas proteínas de membrana en diversos *phila* (HILLE, 1992). Esto permite la

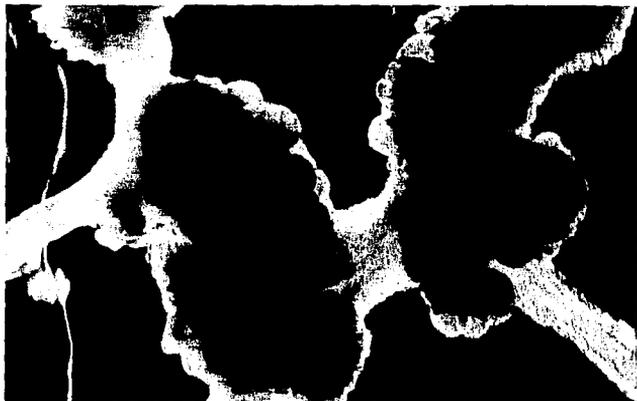
posibilidad de extrapolar a otros *phila* los estudios que en ellas se realizan. Finalmente; e) en las neuronas aquí utilizadas se conocen las concentraciones intracelulares de iones inorgánicos como el Ca^{2+} (170 nM) (ALVAREZ-LEEFMANS, RINK y TSIEN, 1981), el Mg^{2+} (0.8 mM), el K^+ (91 mM) (ALVAREZ-LEEFMANS, GAMIÑO y RINK, 1984), el Na^+ (6.17 mM) (CRUZBLANCA y cols., 1993) y el Cl^- (10 mM) (THOMAS, 1980).

En el presente trabajo se utilizaron las neuronas identificadas del caracol terrestre *H. aspersa*. Por ser las células más grandes, se seleccionaron las neuronas 1F y 77F del ganglio parietal derecho (KERKUT y cols., 1975). En la figura 4 se muestra una fotografía de los ganglios nerviosos y el esquema utilizado para la identificación de las neuronas.

3.1.1 Preparación del material biológico

Los animales se mantuvieron en cajas de plástico y fueron alimentados con lechuga una vez por semana. Los ganglios periesofágicos se disecaron de acuerdo con el siguiente procedimiento: con unas tijeras se quitó la concha al caracol y éste se fijó con alfileres a una tabla de corcho. Se hizo un corte a lo largo de la línea sagital dorsal, poniendo al descubierto el esófago y algunos de los ganglios que lo rodean. Posteriormente, se cortó el esófago y se identificaron los ganglios y los nervios que de ellos emergen.

A



B

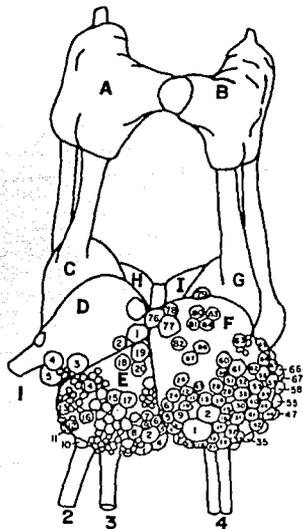
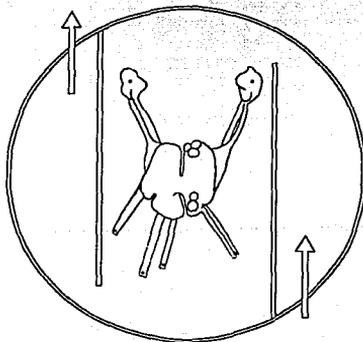


Figura 4. GANGLIOS NERVIOSOS DEL CARACOL TERRESTRE *Helix aspersa*. En "A" se observa una fotografía de los ganglios nerviosos D, E, y F vistos con un microscopio de contraste de fases. La identificación de los ganglios y las neuronas se realizó a partir del esquema inferior ("B") tomado del trabajo de KERRUT y cols. 1975. Los experimentos se realizaron en las neuronas 1F y 77F.

Con la ayuda de pinzas y tijeras se extrajo la masa ganglionar y se sumergió en una solución Ringer normal de caracol (RN) contenida en una caja de Petri, cuyo piso es de un polímero flexible ("Sylgard", Down Corning Corporation, E.U.A), que permite la fijación de los nervios con alfileres entomológicos. Con pinzas y tijeras de microdissección se eliminó el tejido conectivo que cubre a los ganglios. Por último, para facilitar la remoción de la cápsula más delgada y finamente adosada a las neuronas, ésta se reblandeció con proteasa "tipo XIV" (1.3 mg/ml), (Sigma, E.U.A) durante 4 ó 5 min. Una vez terminada la microdissección, la preparación fue transferida a la cámara de registro intracelular, que es una caja de Petri de 0.5 ml de volumen, con piso de Sylgard y con dos divisiones de vidrio para dirigir el flujo de la solución durante el experimento, (Figura 5).

Figura 5. CAMARA DE REGISTRO INTRACELULAR. Consiste en una caja de Petri de plástico de un volumen de 0.5 ml. Tiene dos divisiones internas de vidrio y piso de Sylgard. La preparación biológica se coloca en la parte central de la cámara y se fija con alfileres entomológicos al piso de la misma. Las divisiones internas sirven para dirigir el flujo de la solución de perfusión y conseguir un recambio uniforme en toda la cámara. Las flechas indican la circulación de la solución de perfusión dentro de la cámara. La tasa de circulación fue de 5 ml/min.



3.2 Técnica de fijación de voltaje.

La fijación de voltaje, con sus múltiples variantes, ha sido por cuatro décadas la técnica electrofisiológica que ha permitido los mayores avances en el estudio de las propiedades biofísicas de los canales iónicos. Esta técnica fue ideada originalmente a finales de los años cuarenta (COLE, 1949; MARMONT, 1949) y mejorada poco tiempo después (HODGKIN, HUXLEY y KATZ, 1952). El objetivo de esta técnica consiste en imponer de manera uniforme, distintos niveles de potencial eléctrico sobre un área de membrana, mantener constante este potencial y simultáneamente medir el flujo de corriente iónica a través de dicha área. *La corriente eléctrica registrada, se utiliza para cuantificar los cambios en la conductancia de la membrana, la cual es una medida eléctrica de su permeabilidad a los iones.*

En el presente trabajo se utilizó la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos. Con esta técnica, el control del potencial de transmembrana se consigue con un par de microelectrodos intracelulares, uno de ellos conectado a un amplificador de alta impedancia de entrada y de ganancia unitaria, que registra el potencial de transmembrana (E_m), es decir, la diferencia de potencial eléctrico que existe entre el interior de la célula con respecto al potencial exterior registrado por un electrodo de referencia (puente de agar preparado con KCl 3M) colocado en la solución extracelular. En el circuito de fijación de voltaje, el E_m alimenta la entrada negativa de un amplificador

diferencial comparador de alta ganancia y alta frecuencia de respuesta. El potencial que se desea imponer a la membrana, conocido como potencial de mantenimiento (E_H) o el potencial comando (E_c), alimenta la entrada positiva del mismo amplificador. Este amplificador realiza una suma algebraica de ambas señales y si existe una diferencia de voltaje entre sus entradas negativa y positiva, es decir cuando E_m y E_H (o E_c) difieren entre sí, esta diferencia conocida como señal de "error", es detectada y amplificada instantáneamente. La señal de "error" activa a una fuente que inyecta corriente a la célula a través del segundo microelectrodo intracelular. Esta corriente, es proporcional a la señal de "error" y tiene la magnitud y signo adecuados para conseguir que E_m se mantenga a un valor igual a E_H (o E_c). Dado que la velocidad de respuesta del servosistema electrónico es extremadamente rápida, E_m prácticamente nunca se desvía de E_H o E_c , siendo el reajuste de la corriente de membrana continuo y automático (Figura 6).

En condiciones de fijación de voltaje, cualquier estímulo que active o inactive a los sistemas de transporte iónico, modificará el flujo de iones a través de la membrana, lo cual tendería a modificar al E_m . Por lo que, la corriente eléctrica necesaria para que E_m sea igual a E_H o E_c , es una medida directa de la corriente iónica que fluye a través de la membrana (I_m) sujeta a fijación de voltaje.

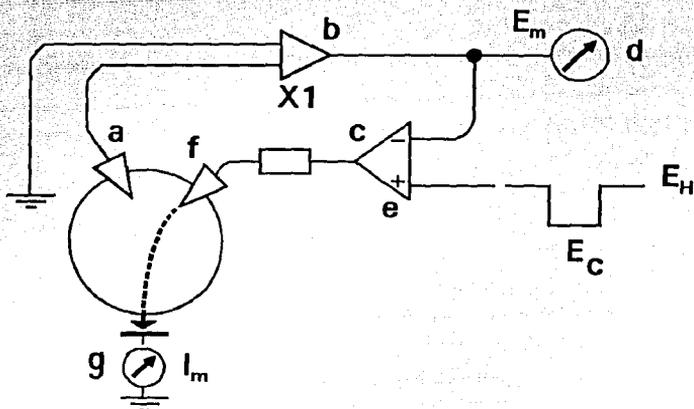


Figura 6. ESQUEMA SIMPLIFICADO DEL CIRCUITO DE FIJACIÓN DE VOLTAJE CON DOS MICROELECTRODOS. La neurona se penetra con dos microelectrodos, el primero (a), se conecta a un amplificador de ganancia unitaria (b) para registrar el potencial de membrana (E_m). La salida de este amplificador alimenta la entrada negativa del amplificador de fijación de voltaje (c). La señal del E_m se registra en un osciloscopio, un polígrafo, un voltímetro y, mediante un convertidor analógico digital, en una computadora (d). En la entrada positiva del amplificador de fijación de voltaje (e) se conecta la fuente de potencial, mediante el cual se imponen distintos voltajes a la membrana plasmática. Estos voltajes son: el voltaje de sostenimiento (E_H), cuyo valor fue de -50 ó -60 mV y el voltaje comando (E_c), el cual consistió en una hiperpolarización respecto a E_H . Cualquier diferencia entre E_m y E_H o E_c , es detectada por este amplificador y su voltaje de salida es proporcional a la cantidad de corriente que se inyecta a la célula a través del electrodo de corriente (f) para que E_m sea igual a E_H o E_c . La corriente que fluye a través de toda la superficie de la neurona (I_m) es colectada por un electrodo extracelular conectado a un amplificador convertidor corriente-voltaje. Esta señal a su vez se registra con el osciloscopio, el polígrafo y la computadora (g).

Esta corriente, es de la misma magnitud pero de sentido inverso a la generada por el movimiento de los iones a través de la membrana plasmática (HODGKIN, HUXLEY y KATZ, 1952). I_m se registra con un electrodo de referencia extracelular, conectado a un conversor corriente voltaje.

Con la finalidad de que I_m en la fase de control tuviese un valor cercano a cero, el potencial de fijación al que se realizaron los experimentos fue de -50 ó -60 mV, valores cercanos al E_m en reposo de las neuronas utilizadas en este proyecto (-52 ± 2 mV; $n=34$).

Sólo fueron utilizadas aquellas células que durante la fase preliminar del experimento presentaron un valor constante en el registro de I_m .

Por convención, las corrientes de transmembrana por arriba de la línea basal, representan las corrientes iónicas que salen de la célula, por lo que se denominan "corrientes salientes". Estas pueden ser debidas al eflujo de cationes o al influjo de aniones y tienden a hiperpolarizar a la membrana plasmática. Las corrientes de transmembrana por debajo de la basal, representan las corrientes iónicas que entran a la célula y se deben a un influjo de cationes o a un eflujo de aniones, y tienden a despolarizar a la membrana plasmática (KUFFLER, NICHOLLS y MARTIN, 1984).

Con la finalidad de normalizar los valores de las corrientes iónicas registradas en las diferentes células, en el presente trabajo, éstas se expresan como densidad de corriente, es decir, nanoamperios por unidad de área de membrana (nA/cm^2).

Para integrar las corrientes de transmembrana con respecto al tiempo a partir de los registros de I_m (véase adelante), se utilizó

el programa "Sigmaplot" versión 5.0 (Jandel Scientific, E.U.A).

El diámetro del cuerpo celular de cada neurona, se midió antes de cada experimento, con una reglilla colocada en el ocular de un microscópio óptico, ("Optiphot", Nikon, Japón). A partir de éste, se estimaron el área y el volumen celular (considerando que el cuerpo celular es esférico y suponiendo que no tiene plegamientos).

Todos los resultados, del presente trabajo, se expresan como la media \pm el error estandar de la media. Se utilizó la prueba t de student para determinar si las medias obtenidas en diferentes condiciones experimentales diferían significativamente ($p < 0.05$) con la obtenida en la condición control (RN + ouabaína).

3.3 Dispositivo experimental

Los ganglios nerviosos se colocaron en la cámara de registro intracelular y se iluminaron con un condensador de campo oscuro (Leitz Wetslar, Alemania) y una lámpara de luz fría ("MKII Fiber optic light", E P O I., E.U.A). La penetración intracelular se realizó utilizando dos micromanipuladores hidráulicos ("WR-88", Narishige, Japón) y todos los movimientos se realizaron bajo control visual con un microscopio estereoscópico ("SMZ-10", Nikon, Japón). El recambio de la solución fisiológica se consiguió utilizando un equipo de válvulas electrónicas y una trampa de vacío. La velocidad de recambio de ésta fue de 5ml/min. Todo el equipo óptico y mecánico se colocó dentro de una campana de Faraday

con la finalidad de evitar señales eléctricas espurias.

La fijación de voltaje se realizó con un circuito "DAGAN 8500" (Dagan, E.U.A.). Por medio de una computadora se programó el protocolo de pulsos eléctricos, utilizando el programa "Clampex" versión 4.05 (Axon Instruments, E.U.A), que sería ejecutado por el circuito de fijación de voltaje. E_m y I_m fueron registrados simultáneamente en un osciloscopio de dos canales ("Tectronix 5113", Tectronix, E.U.A.), en un polígrafo de dos canales ("2400S", Gould, E.U.A.), en un voltímetro digital y para su posterior análisis, fueron convertidas en señales numéricas mediante un conversor analógico digital ("Labmaster DMA", Scientific Solutions, E.U.A) y fueron almacenadas en el disco duro de una segunda computadora utilizando el programa "Asyst" versión 2.01 (Asyst Software Technologies, E.U.A.). La frecuencia de muestreo de las señales fue de 10 Hertz y la resolución de conversión fue de 16 bits.

3.4 Soluciones

En la tabla 1 se muestra la composición química de la solución Ringer normal (RN). Esta es igual a la utilizada por ALVAREZ-LEEFMANS y cols. (1992). En su elaboración se utilizó agua tridestilada y desionizada con una resistividad $<18.5 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, obtenida con un sistema de resinas de intercambio iónico "Milli-Q" (Water purification system, Millipore, E.U.A).

La osmolalidad de la solución, determinada por depresión de la presión de vapor en un osmómetro ("510C Vapor pressure osmometer", Wescor, E.U.A), fue aproximadamente 200 mosmoles/kg de agua.

Tabla 1. COMPOSICION QUIMICA DE LA SOLUCION RINGER NORMAL (RN).

Compuesto	Concentración (mM)	Procedencia
NaCl	82.5	Merck, México
KCl	4	Merck, México
CaCl ₂	7	Sigma, E.U.A.
MgCl ₂	5	J. T. Baker, México
HEPES*	5	Sigma, E.U.A.
Glucosa	5	Sigma, E.U.A.

*Acido N-2-Hydroxyethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico.

El pH se ajustó a 7.5 con NaOH 1M.

Al RN se le adicionó ouabaína ("G-Strophanthin"; Sigma, E.U.A.) a una concentración final de 1 mM. Para conseguir la completa disolución de la ouabaína, la solución se agitó durante aproximadamente 20 min protegida de la luz.

Las modificaciones realizadas al RN para los diferentes protocolos experimentales, consistieron en el primer caso, en substituir equimolarmente parte del NaCl del RN, por cloruro de tetraetilamonio (TEACL, 10 mM) y 4 aminopiridina (4-AP, 5 mM) para conservar la osmolalidad de la solución. En otros experimentos al RN se le agregó directamente CdCl₂ a una concentración final de 400 μM.

4 RESULTADOS

4.1 Corrientes iónicas resultantes de la inhibición de la bomba de Na^+ con ouabaína.

La figura 7 muestra registros típicos de las corrientes de transmembrana (I_m) resultantes de la inhibición de la bomba de Na^+ con el glucósido ouabaína (1 mM), en dos tipos distintos de neuronas: 1F y 77F. Nótese que, en respuesta a la inhibición sostenida de la bomba de Na^+ (15-20 min), se registró un patrón complejo de I_m . Primero se presentó una I_m entrante, la cual después de alcanzar un valor máximo, comenzó a relajarse disminuyendo de amplitud, retornando hacia la línea basal. En el 70% (7 de 10 células), la relajación de la I_m entrante fue seguida por una I_m saliente, esta última se relajó parcialmente con el tiempo sin llegar a la línea basal, incluso varios minutos (aproximadamente 20 min) después de eliminar la ouabaína de la solución de perfusión. En la mayoría de los casos, el desarrollo de la I_m entrante, desde su inicio hasta su valor máximo, tuvo un curso sigmoideal. La parte inicial de la sigmoide, probablemente, refleja el tiempo de recambio del fluido de la cámara de registro, que requiere de unos 18 segundos (s) para completarse. Además, alrededor de la superficie neuronal, existen barreras difusionales (capas no agitadas) que evitan un recambio rápido y efectivo de la solución, en la vecindad de la membrana plasmática.

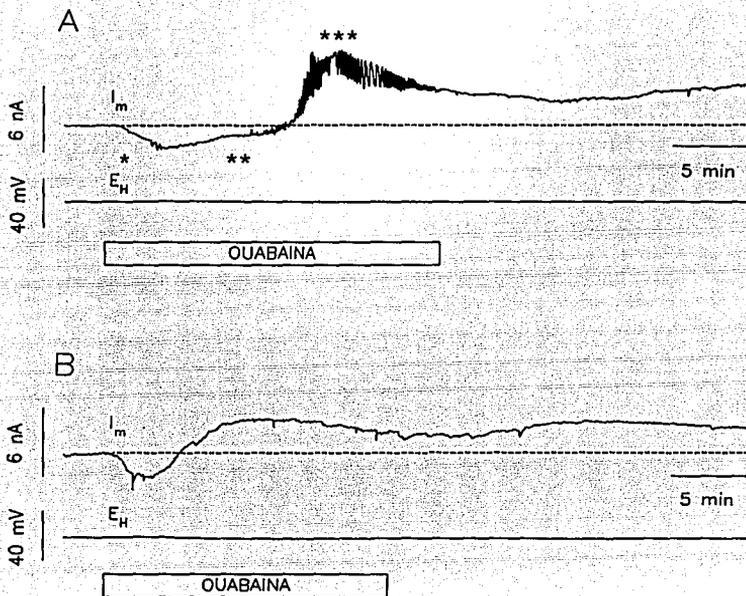


Figura 7. CORRIENTES IONICAS DE TRANSMEMBRANA RESULTANTES DE LA INHIBICION DE LA BOMBA DE Na^+ EN DOS NEURONAS SUJETAS A FIJACION DE VOLTAJE. A) neurona 1F y B) neurona 77F. El trazo superior de cada panel es el registro de la corriente de transmembrana (I_m). Por debajo de la linea basal, la corriente es entrante y por arriba de la misma, es saliente. El trazo inferior es el registro continuo del potencial de fijación ($E_H = -50$ mV). El tiempo de aplicación de la ouabaina (1mM) se representa por la barra. Nótese que el registro de I_m consiste en una corriente entrante rápida y transitoria (*). La corriente entrante se relaja retornando a la linea basal (**). Esta última, es seguida de una corriente saliente sostenida (***), que persiste aún después de remover la ouabaina de la solución de perfusión.

En el caso de estas neuronas dichas barreras difusionales se deben probablemente, a la presencia de células satélites adosadas a la superficie de la membrana plasmática (ADAMS, SMITH y THOMPSON, 1980).

Ignorando la parte inicial de la sigmoide, la cual representó los primeros 25.2 ± 6.8 s ($n=10$), contados a partir del inicio de la I_m entrante, la tasa de aumento de la parte más rápida de esta corriente, que siguió en la mayoría de los casos un curso lineal, fue de -26.6 ± 2.6 nA/cm²·s ($n=10$; rango -14.0 a -39.1). La latencia del máximo de la I_m entrante (el punto en donde $dI_m/dt=0$), fue de 144.6 ± 16.8 s y su amplitud máxima fue de -2.2 ± 0.3 μ A/cm² ($n=10$). La I_m entrante duró 55.3 ± 6.9 s. La relajación de la I_m entrante siguió un curso exponencial simple, con una constante de tiempo (τ) de 162.0 ± 34.7 s ($n=10$; rango 23.1 a 334.4).

La I_m saliente alcanzó su valor máximo 13.4 ± 1.5 min después del inicio de la I_m entrante. Esta corriente en las células 1F, se caracterizó por presentar oscilaciones pronunciadas. La forma y curso temporal de la relajación de la I_m saliente en los diferentes tipos celulares fue muy variable, por lo cual no fue posible hacer una descripción cuantitativa.

El patrón de I_m que resulta de la inhibición de la bomba de Na^+ , sugiere la participación de más de un tipo de corrientes iónicas. La I_m entrante inicial, probablemente es una corriente de la misma magnitud, pero en sentido inverso a la corriente que en condiciones de reposo, genera la bomba de Na^+ ("inversa de la

corriente de la bomba"; véase adelante). Sin embargo, la relajación de la I_m entrante así como la I_m saliente, no pueden explicarse con base en la inhibición de la bomba de Na^+ , sino que probablemente, involucran otros sistemas de transporte de iones a través de la membrana plasmática.

En las secciones subsecuentes, se describen los experimentos realizados para identificar a las diferentes especies iónicas, cuyo flujo subyace a las corrientes de transmembrana aquí descritas.

4.2 Efecto de bloqueadores de canales de K^+ sobre las corrientes iónicas resultantes de la inhibición de la bomba de Na^+ .

La relajación de la I_m entrante y la I_m saliente, pueden deberse a un eflujo de K^+ o a un influjo de Cl^- . Sin embargo, dado que el potencial electroquímico de este último es de -20 mV, al potencial de fijación (-50 ó -60 mV) se favorece su entrada (NANI, MARQUEZ-BALTAZAR y ALVAREZ-LEEFMANS, observaciones no publicadas).

Con el objeto de probar la validez de la primera hipótesis, se estudió el efecto de agentes bloqueadores de canales de K^+ sobre las corrientes iónicas inducidas por la ouabaína.

En el soma de las neuronas de molusco se han descrito, por lo menos, cuatro tipos de canales iónicos selectivos para el K^+ (excluyendo aquellos activados por neurotransmisores). Dos de estos canales, se activan por cambios en el voltaje de transmembrana: uno es el descrito por HODGKIN y cols. (1952),

conocido como el "rectificador tardío".

El otro canal activado por cambios en el voltaje de transmembrana, es el canal de K^+ tipo A. Este se caracteriza por ser de rápida activación y rápida inactivación. Además, existen dos tipos de canales de K^+ que se activan por un aumento en la $[Ca^{2+}]$, (LATORRE y cols., 1989). Estos cuatro tipos de canales de K^+ pueden bloquearse por el TEA. En los experimentos que a continuación se describen, se estudió el efecto que tienen 10 mM de TEA y 5 mM de 4-AP sobre la I_m resultante de la inhibición de la bomba de Na^+ . La preparación se perfundió con esta solución durante todo el experimento y a la misma se le adicionó 1 mM de ouabaína.

En la figura 8 se muestra un ejemplo del efecto de estos bloqueadores de canales de K^+ sobre I_m . En 8 experimentos se abolió la I_m saliente. La amplitud máxima de la I_m entrante fue de $-3.1 \pm 0.4 \mu A/cm^2$ (no hubo diferencia estadísticamente significativa con la observada en RN; $p < 0.05$). No se afectó la parte lineal de la I_m entrante; $-27 \pm 9 nA/cm^2 \cdot s$ y finalmente, tampoco se afectó la relajación de la I_m entrante; $\tau = 153 \pm 32 s$.

Estos resultados sugieren que la I_m saliente, representa un eflujo de K^+ via canales selectivos a este catión. Por otro lado, la persistencia de la relajación de la I_m entrante, sugiere que no está relacionada con la activación de canales de K^+ (véase adelante), sino que representa un flujo iónico a través de otro sistema de transporte, por ejemplo: el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (véase adelante).

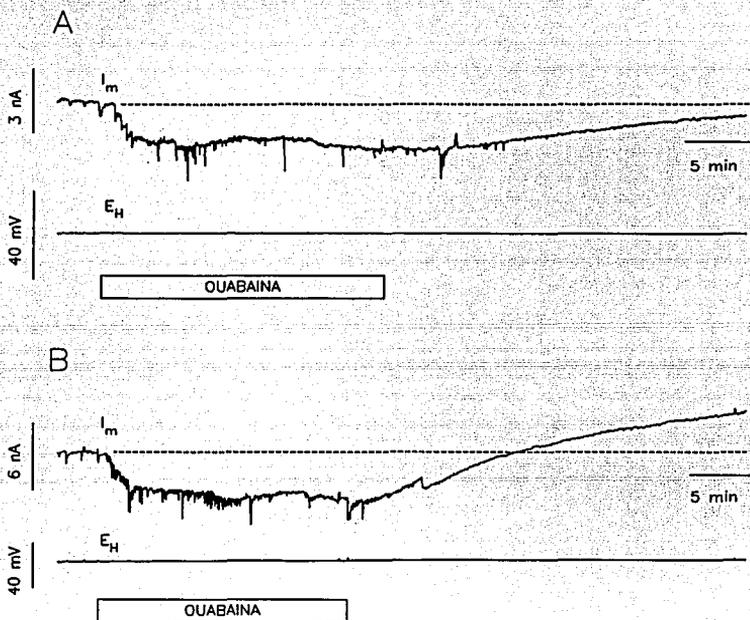


Figura 8. EFECTO DEL TEA Y 4-AP SOBRE LAS CORRIENTES DE TRANSMEMBRANA GENERADAS POR LA INHIBICION DE LA BOMBA DE Na^+ EN DOS NEURONAS SUJETAS A FIJACION DE VOLTAJE. A) Neurona 1F. B) Neurona 77F. La nomenclatura es similar a la de la figura anterior. La solución con TEA (10 mM) y 4-AP (5 mM) perfundió la preparación durante todo el experimento. Obsérvese que la corriente saliente fue abolida por los bloqueadores de los canales de K^+ durante la exposición a la ouabaina. La presencia del TEA y 4-AP provocaron oscilaciones irregulares en la I_m que probablemente son debidas a corrientes sinápticas.

4.3 Efecto del cadmio sobre las corrientes iónicas resultantes de la inhibición de la bomba de Na^+ .

Los siguientes experimentos se realizaron para demostrar cuál es el tipo de canal de K^+ implicado en la I_m saliente y el mecanismo que determina su activación.

Se sabe que el "rectificador tardío" se activa a potenciales de transmembrana de -30 a $+20$ mV. Dado que las células se mantuvieron a -50 ó -60 mV, este canal debió permanecer "cerrado". Por otro lado, el canal de K^+ tipo A, se activa a potenciales cercanos al potencial de reposo (-50 mV), sin embargo su inactivación en estado estacionario es máxima a valores cercanos al potencial de reposo (RUDY, 1988). El estrecho rango dinámico de voltaje en que operan los canales tipo A, sugiere que, en condiciones de fijación de voltaje (a -50 ó -60 mV), no contribuyen a la generación de la I_m saliente.

Por lo tanto, los canales de K^+ que, probablemente, contribuyen en mayor proporción a la I_m saliente, son los que se activan por el Ca^{2+} intracelular. Si esta hipótesis es correcta, el bloqueo de la entrada de Ca^{2+} debe eliminar la I_m saliente. El Cd^{2+} es un agente bloqueante de la entrada de Ca^{2+} al interior celular, tanto a través de canales de Ca^{2+} activados por el voltaje de transmembrana, como a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (TROSPER y PHILIPSON, 1983.). Además el Cd^{2+} es 100 veces menos efectivo que el Ca^{2+} para activar a los canales de K^+ (LATORRE y cols., 1989). Para evaluar la participación de la entrada de Ca^{2+}

extracelular hacia el citosol, como agente activador de la corriente de K^+ , la preparación se perfundi6 con RN al que se le adicion6 $CdCl_2$ a una concentraci6n de $400 \mu M$. La aplicaci6n continua del Cd^{2+} , durante la inhibici6n de la bomba de Na^+ en 12 c6lulas diferentes, tuvo cinco efectos principales sobre las corrientes i6nicas:

a) enlenteci6 significativamente ($p < 0.05$) la tasa de aumento del componente lineal de la I_m entrante, de $-26.6 \pm 2.6 \text{ nA/cm}^2 \cdot \text{s}$ a $-10.9 \pm 2.1 \text{ nA/cm}^2 \cdot \text{s}$.

b) redujo ligeramente la amplitud m6xima de la I_m entrante de $-2.2 \pm 0.3 \mu A/cm^2$ a $-1.7 \pm 0.3 \mu A/cm^2$ (estadisticamente no significativo, $p > 0.05$).

c) en el 60% de los casos (7 de 12 c6lulas), enlenteci6 significativamente la relajaci6n de la I_m entrante, de $\tau = 2.70 \pm 0.58 \text{ min}$ a $21.60 \pm 6.96 \text{ min}$.

d) en el 40% de los casos (5 de 12 c6lulas) bloque6 la relajaci6n de la I_m entrante.

e) En el 100% de los casos bloque6 la I_m saliente.

Estos resultados se ilustran en la figura 9. Dado que en presencia de Ca^{2+} se aboli6 la I_m saliente, se sugiere que para la activaci6n de 6sta, se requiere la entrada previa de Ca^{2+} . Por lo tanto, esta I_m saliente representa un eflujo de K^+ activado por el Ca^{2+} intracelular.

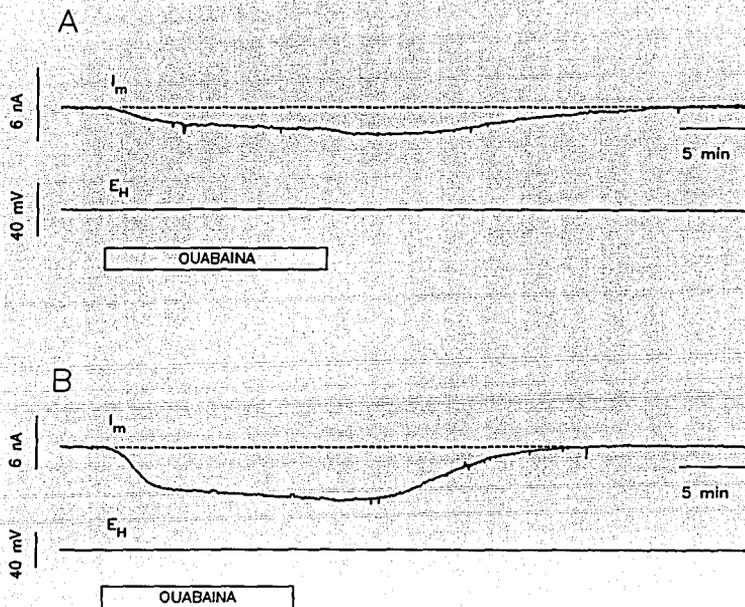


Figura 9. EFECTO DEL Cd^{2+} SOBRE LAS CORRIENTES DE TRANSMEMBRANA GENERADAS POR LA INHIBICION DE LA BOMBA DE Na^+ EN DOS NEURONAS SUJETAS A FIJACION DE VOLTAJE. El Cd^{2+} ($400 \mu M$) estuvo presente durante todo el experimento. A) Célula 1F. B) Célula 77F. El Cd^{2+} tuvo varios efectos sobre las corrientes de membrana (véase el texto), sin embargo lo más sobresaliente es que la corriente saliente se abolió durante toda la exposición a la ouabaina.

4.4 Estimación de la tasa inicial de aumento en la $[Na^+]_i$ y del flujo neto de Na^+ a partir de las corrientes iónicas resultantes de la inhibición de la bomba de Na^+ .

En condiciones de reposo, el influjo pasivo de Na^+ es equivalente a su eflujo activo. Es decir, el flujo neto de Na^+ a través de la membrana plasmática es cero. Por lo tanto, cuando se inhibe la bomba de Na^+ , se espera un aumento en la $[Na^+]_i$. Para evaluar si el aumento transitorio en el VCA, que algunas veces se presenta cuando se inhibe la bomba de Na^+ , puede atribuirse al aumento de la $[Na^+]_i$, se estimó la tasa inicial de aumento de la concentración intracelular de Na^+ ($d[Na^+]_i/dt$; en mM/min) a partir de los registros de la I_m entrante, en tres condiciones experimentales + ouabaína: a) RN, b) RN + 400 μ M de Cd^{2+} y c) RN + 10 mM de TEA + 5 mM de 4-AP.

Para estimar $d[Na^+]_i/dt$, primero se integró la I_m entrante con respecto al tiempo durante el primer minuto de inhibición de la bomba, para así obtener la transferencia de carga eléctrica neta a través de la membrana plasmática.

En la figura 10 se ilustra el procedimiento de integración de I_m , que consistió en calcular el área por arriba de la curva circunscrita por el trazo de I_m con respecto al tiempo, como se muestra a continuación:

$$q_m(t) = \int_0^t I_m \cdot dt \quad (10)$$

Donde $q_m(t)$ es la carga eléctrica con respecto al tiempo (t), t_0 indica el tiempo de inicio de la I_m entrante y t_1 , el segundo 60 de dicha corriente.

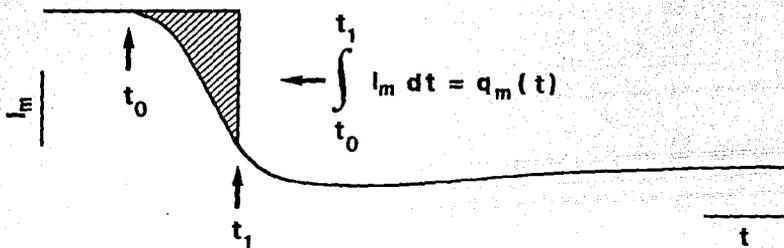


Figura 10. INTEGRACION DE LA CORRIENTE DE TRANSMEMBRANA. Procedimiento empleado para estimar la transferencia de carga neta a través de la membrana en respuesta a la inhibición de la bomba de Na^+ . Para estimar $q_m(t)$, la cantidad de carga eléctrica que entra a la célula en función del tiempo, se integró la corriente entrante de transmembra (I_m) con respecto al tiempo, tomando como límites de integración t_0 y t_1 , donde t_0 indica el tiempo al cual I_m empezó a cambiar y t_1 , el segundo 60 posterior al inicio de dicho cambio.

En la tabla 2 se muestran los valores estimados de $q_m(t)$ para la I_m registrada en las condiciones mencionadas.

Tabla 2. VALORES DE $q_m(t)$ ESTIMADOS A PARTIR DE LA INTEGRACION DE LA I_m ENTRANTE RESULTANTE DE LA INHIBICION DE LA BOMBA DE Na^+ EN TRES CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Condición experimental + ouabaína	$q_m(t)$ (C/cm ²)	n	Rango
RN	$3.36 \times 10^{-8} \pm 6.66 \times 10^{-9}$	10	1.09×10^{-8} a 7.77×10^{-8}
TEA + 4-AP	$5.43 \times 10^{-8} \pm 1.15 \times 10^{-8}$	7	1.64×10^{-8} a 1.01×10^{-7}
Cd ²⁺	$1.84 \times 10^{-8} \pm 2.68 \times 10^{-9}$	12	8.62×10^{-9} a 3.88×10^{-8}

los valores representan la media \pm el error estandar de la media

La $q_m(t)$ se utilizó para estimar $d[Na^+]_i/dt$, como a continuación se describe. De acuerdo con la estequiometría de la bomba de Na^+ , $q_m(t)$ corresponde a 1/3 de la cantidad total de Na^+ que entra a la célula. Por lo tanto, para estimar $d[Na^+]_i/dt$, se utilizó la siguiente expresión:

$$d[Na^+]_i/dt = \frac{3q_m(t)}{Fv} = \frac{3}{Fv} \int_0^t I_m \cdot dt \quad (11)$$

Donde v es el volumen celular total en litros (l) y F ya se definió.

En la tabla 3 se muestran los valores estimados de $d[\text{Na}^+]_i/dt$ en tres condiciones diferentes.

Tabla 3. VALORES DE $d[\text{Na}^+]_i/dt$ ESTIMADOS A PARTIR DE LA I_m ENTRANTE RESULTANTE DE LA INHIBICION DE LA BOMBA DE Na^+ EN TRES CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Condición experimental + ouabaina	$d[\text{Na}^+]_i/dt$ (mM/min)	n	Rango
RN	0.48 ± 0.05	10	0.24 a 0.85
TEA + 4-AP	0.71 ± 0.17	7	0.12 a 1.30
Cd^{2+}	0.27 ± 0.04	12	0.15 a 0.61

los valores representan la media \pm el error estandar de la media

Para esta estimación se consideró que el Na^+ que entra al citosol se diluye en el volumen total de la célula. Sin embargo, se sabe que de éste, sólo una fracción es osmóticamente activa. Por esta razón, el valor de $d[\text{Na}^+]_i/dt$ así obtenido es una subestimación. Sería más adecuado considerar la dilución del Na^+ ganado por la célula, únicamente en la fracción del volumen acuoso osmóticamente activo. Para el soma neuronal no existen medidas de esta fracción, sin embargo, la media de 16 estimaciones realizadas en 11 tipos celulares diferentes de invertebrados y vertebrados (DICK, 1965; HAUSER y FREEMAN, 1980), es de 0.7 (rango: 0.5 a 0.8).

De acuerdo con lo anterior, en la tabla 4 se muestran los valores estimados para $d[\text{Na}^+]_i/dt$ en las tres condiciones ya mencionadas.

Tabla 4. VALORES ESTIMADOS PARA $d[\text{Na}^+]_i/dt$, CONSIDERANDO UNA FRACCION DEL VOLUMEN ACUOSO OSMOTICAMENTE ACTIVO DE 0.7.

Condición experimental + ouabaina	$d[\text{Na}^+]_i/dt$ (mM/min)	n	Rango
RN	0.69 ± 0.08	10	0.34 a 1.22
TEA + 4-AP	1.02 ± 0.24 -	7	1.84 a 7.14
Cd^{2+}	0.38 ± 0.06 *	12	0.21 a 0.87

los valores representan la media \pm el error estandar de la media

- no hay diferencia estadísticamente significativa con RN

* si hay diferencia estadísticamente significativa con RN

Dado que durante el primer minuto de inhibición de la bomba no hay cambios significativos de volumen (ALVAREZ-LEEFMANS, GAMIÑO y REUSS, 1992), se utilizó el área calculada a partir del diámetro celular, para estimar el flujo neto de Na^+ (ϕ_{Na^+} ; pmoles/cm²·s), es decir la cantidad de iones Na^+ que se mueven por unidad de área de membrana plasmática, por unidad de tiempo.

Para ello se usó la siguiente expresión:

$$\Phi_{Na^+} = h \cdot d [Na^+]_i / dt \quad (12)$$

Donde h es el cociente volumen/área de la célula (cm).

En la tabla 5 se muestran los valores estimados para Φ_{Na^+} en las tres condiciones experimentales.

Tabla 5. VALORES PARA EL Φ_{Na^+} ESTIMADOS A PARTIR DE LA I_m ENTRANTE QUE RESULTA DE LA INHIBICION DE LA BOMBA DE Na^+ EN TRES CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Condición experimental + ouabaina	Φ_{Na^+} (pmoles/cm ² ·s)	n	Rango
RN	30.0 ± 1.7	10	15.0 a 48.5
TEA + 4-AP	44.4 ± 10.1 -	7	9.9 a 84.7
cd ²⁺	16.0 ± 2.0 *	12	9.2 a 26.4

los valores representan la media ± el error estandar de la media

- no hay diferencia estadísticamente significativa con RN

* si hay diferencia estadísticamente significativa con RN

5 DISCUSION

En el presente trabajo se estudiaron los movimientos de iones que ocurren a través de la membrana plasmática, subsecuentes a la inhibición de la bomba de Na^+ en neuronas de *H. aspersa*. Del análisis de las corrientes iónicas, se estimaron los flujos de Na^+ y K^+ con el objeto de conocer el balance osmótico de la célula, para correlacionarlos con las alteraciones en el volumen celular acuoso, previamente observadas (ALVAREZ-LEEFMANS, GAMIÑO y REUSS, 1992).

5.1 Corriente entrante

Dada la estequiometría de la bomba de Na^+ ($3\text{Na}^+:2\text{K}^+$), ésta expulsa una carga positiva neta por cada ciclo. En condiciones normales genera una corriente saliente continua. Cuando la bomba de Na^+ se inhibe, se suspende dicha corriente saliente. En ausencia de otras corrientes de transmembrana, la supresión de la corriente saliente, se manifiesta como una corriente entrante de la misma magnitud pero en sentido inverso a la corriente de la bomba de Na^+ (DE WEER y RAKOWSKI, 1984).

La I_m entrante descrita en el presente trabajo corresponde, efectivamente, al inverso de la corriente de la bomba de Na^+ . Esta depende del Na^+ extracelular, ya que cuando el Na^+ se sustituye totalmente por TEA^+ y se bloquea la bomba de Na^+ , la I_m entrante se abole (CRUZBLANCA y cols., 1993).

Las vías que subyacen a la permeabilidad del Na^+ de la membrana plasmática en reposo no se conocen completamente, sin embargo en el presente trabajo, se encontró que el Cd^{2+} redujo significativamente ($p < 0.05$) la $d[\text{Na}^+]/dt$ y el ϕ_{Na^+} . Además redujo aproximadamente un 20% la amplitud máxima de la I_m entrante. Las posibles vías que explicarían la fracción de la I_m entrante sensible al Cd^{2+} , podrían ser: canales de Ca^{2+} activos a potenciales de -50 ó -60 mV, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, canales catiónicos inespecíficos (CAN) o canales de Na^+ de lenta inactivación, como los "canales umbral" descritos por GILLY y ARMSTRONG (1984) en neuronas de calamar. La primera posibilidad se descarta dado que los experimentos se realizaron a -50 y -60 mV, potenciales a los cuales no se activan los canales de Ca^{2+} que se encuentran en estas neuronas. Estos se activan a potenciales que van de -10 a +10 mV (CARBONE Y LUX, 1987). Por otro lado, de acuerdo con el modelo teórico de ALVAREZ-LEEFMANS y cols., (1993), el potencial de equilibrio del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, en las neuronas de *H. aspersa*, es de -54 mV. En las condiciones iniciales de los experimentos aquí descritos, dicho intercambiador, si acaso generaría una corriente saliente de Na^+ . Si esto es correcto, el bloqueo del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con Cd^{2+} , se manifestaría como una I_m entrante, lo cual no fue el caso.

También se descarta a los canales CAN, ya que cuando se sustituye al Na^+ por TEA^+ , la I_m entrante se abole por completo (CRUZBLANCA y cols., 1993), a pesar de que el TEA^+ perméa a través de estos canales (MÜLLER, SWANDULLA y LUX, 1989).

Finalmente, dado que los canales de Na^+ , conocidos como "canales umbral", pueden estar activos al potencial de transmembrana de reposo (GILLY y ARMSTRONG, 1984; JONES, 1987) y dado que estos canales se bloquean con Cd^{2+} (JONES, 1987; RAVINDRAN, SCHILD Y MOCZYDLOWKI, 1991), es posible que la fracción de la I_m entrante, sensible al Cd^{2+} , represente el influjo de Na^+ a través de este tipo de canales. Esto explicaría porqué la $d[\text{Na}^+]_i/dt$, el Φ_{Na^+} y el máximo de la I_m entrante, disminuyen en presencia de Cd^{2+} . Sin embargo, se desconoce si este tipo de canales de Na^+ , está presente en las neuronas de *H. aspersa*.

5.2 Relajación de la corriente entrante

Después de que la I_m entrante alcanzó su valor máximo, se relajó retornando a la línea basal y fue seguida de una I_m saliente (Figura 7). Estos componentes tardíos de la I_m , no constituyen la respuesta esperada para la inhibición de la bomba de Na^+ electrogénica, suponiendo que las corrientes de transmembrana fuesen llevadas exclusivamente por Na^+ . Es posible que los componentes tardíos representen un efecto secundario de la inhibición de la bomba de Na^+ sobre otros sistemas de transporte.

Dado que la relajación de la I_m entrante y la I_m saliente, se acompañan de un aumento en la conductancia de la membrana, éstas no pueden deberse a la inhibición de una I_m entrante (ALVAREZ-LEEFMANS, MEREDIZ y FERNANDEZ, 1993). Tampoco puede deberse a una corriente saliente de Cl^- ya que el potencial de equilibrio de este

anión, calculado a partir de registros realizados con microelectrodos selectivos al Cl⁻ en estas neuronas, es de alrededor de -20 mV (NANI, MARQUEZ-BALTAZAR y ALVAREZ-LEEFMANS, observaciones no publicadas).

Se descarta la posibilidad de que la relajación de la I_m entrante se deba a una corriente de K^+ , por lo menos en la etapas iniciales de la relajación, dado que la τ no se afectó con el TEA⁺ y la 4-AP, aunque bien podría ser un componente remanente de la corriente de K^+ no bloqueado por TEA⁺ y la 4-AP. Otra posibilidad es que la relajación de la I_m entrante, se deba a la actividad electrogénica del intercambiador Na^+/Ca^{2+} trabajando de modo inverso como se discute a continuación.

El intercambiador Na^+/Ca^{2+} es un sistema de transporte secundario que regula la $[Ca^{2+}]_i$ y se localiza en la membrana plasmática. Para su funcionamiento, utiliza la energía del gradiente electroquímico del Na^+ . Cuando el potencial de equilibrio del intercambiador ($E_{Na/Ca}$) es más negativo que el E_m , el intercambiador Na^+/Ca^{2+} , expulsa Ca^{2+} acoplado con la entrada de Na^+ , con una estequiometría de $3Na^+:Ca^{2+}$ (BERS, 1991). Sin embargo, como todo sistema de transporte por medio de acarreadores, el sentido en que mueve ambas especies iónicas es reversible, y depende de la magnitud y sentido del gradiente de las especies transportadas. En este caso del Na^+ y del Ca^{2+} . Además por ser electrogénico, también depende del E_m (MULLINS, 1979).

Puede predecirse que un aumento modesto en la $[Na^+]_i$, es suficiente para invertir el sentido del intercambiador Na^+/Ca^{2+} . Por esta razón, el aumento en la $[Na^+]_i$ a consecuencia de la inhibición de la bomba de Na^+ en neuronas de *H. aspersa*, es suficiente para invertirlo (ALVAREZ-LEEFMANS, MEREDIZ y FERNANDEZ, 1993). En tales condiciones el intercambiador funcionaría introduciendo Ca^{2+} y expulsando Na^+ . El resultado sería, la expulsión neta de una carga positiva (de Na^+) por cada ciclo. Incluso bajo condiciones de fijación de voltaje, el aumento en la $[Na^+]_i$, per se, sería suficiente para invertirlo. Dado que la relajación de la I_m entrante también se afectó con Cd^{2+} , es probable que se deba a la inhibición del intercambiador Na^+/Ca^{2+} por este catión. Esto se manifestaría como una I_m saliente, que sumada algebraicamente a la corriente de la bomba, resultaría en la relajación de la I_m entrante.

5.2.1 Posibles consecuencias de la inversión del intercambiador Na^+/Ca^{2+} .

La teoría predice que la inversión del intercambiador Na^+/Ca^{2+} ocasionaría un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, alcanzando valores micromolares (ALVAREZ-LEEFMANS y cols., 1993). En neuronas de *H. aspersa* inyectadas con el indicador fluorescente de Ca^{2+} , Fura-2, se encontró que la $[Ca^{2+}]_i$, efectivamente aumenta al inhibir la bomba de Na^+ . Este aumento se suprime cuando se elimina el Ca^{2+} externo, sugiriendo que dicho catión proviene del medio extracelular (GAMIÑO y cols., 1993). Aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ a

consecuencia de la inhibición de la bomba de Na^+ también se han reportado en las neuronas de sanguijuela (DEITMER y SCHLUE, 1983), aunque esos experimentos no se realizaron en condiciones de fijación de voltaje y se hicieron con microelectrodos selectivos a Ca^{2+} que tienen una alta interferencia por Na^+ .

Finalmente, dado que los experimentos del presente trabajo⁶, se realizaron a potenciales de -50 y -60 mV, se sugiere que la relajación de la I_m entrante y el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se deben principalmente a la inversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Sin embargo, para obtener una evidencia directa que compruebe la participación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y en la relajación de la I_m entrante, sería conveniente evaluar el efecto que tiene el Benzamil y la amilorida, los cuales son conocidos inhibidores de este transportador (BERS, 1991), sobre las corrientes iónicas inducidas por la ouabaína.

5.3 Corriente saliente

A la relajación de la I_m entrante, siguió una prominente y sostenida I_m saliente. Esta I_m saliente se bloqueó con TEA^+ y 4-AP, sugiriendo que se debe a un eflujo de K^+ a través de canales iónicos selectivos a este catión. Dado que el Cd^{2+} también suprime esta corriente, se sugiere que para la activación de estos canales, se requiere del aumento previo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

En las neuronas de *H. aspersa* hay por lo menos dos tipos de canales de K^+ activados por el Ca^{2+} , el de baja conductancia (SK) y el de alta conductancia (BK). Estos se diferencian entre sí, además por su farmacología y dependencia del voltaje. El SK tiene una conductancia ≤ 80 pS, mientras que la del BK, es de 130 a 300 pS (LATORRE y cols., 1989). El canal BK es ligeramente dependiente del voltaje, mientras que el SK no lo es. Ambos se bloquean con caribdotoxina, pero sólo el SK se bloquea con apamin (CASTLE, HAYLETT y JENKINSON, 1989). El canal SK, es más sensible al Ca^{2+} y se activa a concentraciones de 10 a 100 nM (RUDY, 1988; LATORRE y cols., 1989), mientras que el BK se activa a concentraciones de 10 a 100 μ M (RUDY, 1988). En neuronas de *Helix sp.*, se sugiere que los canales de K^+ sensibles al Ca^{2+} , se activan desde concentraciones submicromolares (0.1 a 0.9 μ M), (MEECH, 1974; LATORRE y cols., 1989), hasta concentraciones entre 50 y 100 μ M (GOLA y CREST, 1993).

El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ por la inversión del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , sería suficiente para activar ambos tipos de canales de K^+ en las neuronas de *H. aspersa*.

Finalmente, dado que la I_m saliente se bloquea con 10 nM de apamin (CRUZBLANCA y cols., 1993), se puede afirmar que la I_m saliente se debe a la activación de canales del tipo SK.

5.4 Correlación entre movimientos iónicos y cambios de volumen celular acuoso a consecuencia de la inhibición de la bomba de Na^+ .

Dado que la hipótesis de TOSTESON y HOFFMAN (1960), predice que el bloqueo de la bomba de Na^+ , resulta en un aumento en el volumen celular, proporcional al aumento intracelular de cationes, aniones y agua, se estimaron los cambios en la osmolalidad intracelular a partir de los flujos de Na^+ y K^+ , para determinar si hay alguna relación con los cambios en el volumen descritos previamente (figura 3) (ALVAREZ-LEEFMANS y cols., 1992).

5.4.1 ¿Puede explicarse el incremento transitorio de volumen con base en la hipótesis de TOSTESON y HOFFMAN?.

ALVAREZ-LEEFMANS y cols. (1992), encontraron que en el 35% de las neuronas estudiadas, la inhibición de la bomba de Na^+ produjo un incremento transitorio y rápido del volumen celular acuoso con una tasa inicial aproximadamente del 20%/min. La tasa máxima de aumento del Na^+ intracelular estimada a partir de la I_m entrante fue mayor a la obtenida previamente con microelectrodos selectivos al Na^+ (CRUZBLANCA y cols., 1992), sin embargo, ésta no fue mayor de 1.1 mM/min. Si consideramos que la osmolalidad del medio intracelular y del extracelular son similares (aproximadamente 200 mosmol/Kg de agua), entonces la entrada de Na^+ acompañada por una cantidad equivalente de Cl^- (u otro anión), explicaría una tasa de aumento en la osmolalidad aproximadamente de 2 mosmol/kg de agua·min. Si la célula se comportase como un osmómetro,

produciría un incremento en su volumen a una tasa ≤ 1.1 %/min. Este valor está muy por debajo del mencionado cambio de volumen observado experimentalmente.

Lo anterior sugiere que, el aumento en la $[Na^+]_i$, *per se*, no puede producir el aumento de volumen celular previamente observado.

Un mecanismo alternativo para explicar este resultado, involucraría al Ca^{2+} como estímulo inductor en la formación o liberación intracelular de partículas osmóticamente activas, por ejemplo, el Ca^{2+} podría activar una enzima que fraccionara a un polímero intracelular (CHAMBERLIN y STRANGE, 1989).

5.4.2 *¿Es suficiente el eflujo de K^+ , acompañado por un anión y agua, para explicar la disminución en el volumen celular?*

Los resultados aquí presentados sugieren que el eflujo de K^+ , a través de canales de K^+ activados por Ca^{2+} , acompañado por una cantidad equivalente de un anión y agua, podría contribuir a la disminución del volumen en las neuronas durante la inhibición de la bomba de Na^+ . En conjunto, su salida debería sobrepasar a la entrada inicial de Na^+ , Cl^- y agua al citosol.

Para probar esta hipótesis, se siguió una metodología similar a la usada para el caso del Na^+ . Se estimó la tasa de disminución del K^+ intracelular durante el máximo de la I_m saliente. Esta fue 2.7 ± 0.3 mM/min. La tasa de cambio en la osmolalidad producida por un eflujo de K^+ y un anión acompañante, sería entonces aproximadamente de 5.4 mosmol/kg de agua·min.

Para obtener el balance neto de partículas osmóticamente activas cuando se abren los canales de K^+ , se sustrae la tasa de cambio en la osmolalidad intracelular estimada a partir de la entrada de Na^+ y Cl^- que es aproximadamente 2 mosmol/kg de agua·min.

Dando una pérdida neta de solutos aproximadamente 3.4 mosmol/kg de agua·min. Esto produciría una disminución del volumen aproximadamente del 1.7%/min, cifra cercana a la experimentalmente observada del $2.7 \pm 1.0\%/min$ (ALVAREZ-LEEFMANS y cols. 1992).

Finalmente, el anión acompañante del K^+ , no puede ser el Cl^- , ya que resultados preliminares muestran que, la $[Cl^-]$, no cambia sensiblemente durante la inhibición de la bomba de Na^+ (NANI, MARQUEZ-BALTAZAR y ALVAREZ-LEEFMANS, observaciones no publicadas).

5.4.3 *Posible relación de los resultados experimentales, con los fenómenos patológicos que ocurren durante la anoxia en el tejido nervioso.*

Durante la isquemia, es decir, cuando hay suspensión parcial o total de la irrigación sanguínea en algún órgano, se produce hipoxia y aún anoxia por suspensión del aporte de O_2 a las células (ROWLAND, FINK y RUBIN, 1991). La anoxia provoca disminución de ATP, lo que trae como consecuencia que todas las funciones celulares dependientes de éste compuesto de alta energía, se inhiban, entre ellas la actividad de la bomba de Na^+ . Se acepta que la anoxia en el cerebro, culmina con el edema celular citotóxico, es decir, el aumento en el volumen de las neuronas y células gliales.

De acuerdo con la hipótesis de TOSTESON y HOFFMAN (1960), este último sería consecuencia directa de la inhibición de la bomba de Na^+ (MACKNIGHT y LEAF, 1977). Los resultados aquí presentados no apoyan esta hipótesis, ya que en ella no se considera al papel que pueden tener los canales de K^+ en el balance osmótico de la célula. En condiciones patológicas la salida de K^+ a través de este tipo de canales, probablemente aumentaría el eflujo neto de sal y agua de la célula, previniendo el edema y la lisis celular osmótica.

De esta manera, el daño celular en el tejido anóxico estaría más relacionado con la acumulación del Ca^{2+} en el citosol y la subsecuente activación de enzimas, como proteasas y lipasas que afectarían al citoesqueleto y a la membrana plasmática, iniciando un proceso degradativo que culminaría con la necrosis de la célula (ROSENBERG, 1990; CHOI, 1990; ZIVIN y CHOI, 1991).

Sin embargo, esto requiere mayores evidencias experimentales, ya que de acuerdo con experimentos realizados con fura-2, las neuronas de *H. aspersa* son capaces de amortiguar el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$; que resulta de la inhibición de la bomba de Na^+ (GAMIÑO y cols., 1993).

6 CONCLUSIONES

- 1.- La inhibición de la bomba de Na^+ de las neuronas del caracol terrestre *Helix aspersa*, en condiciones de fijación de voltaje ($E_H = -50$ ó -60 mV), genera una corriente entrante transitoria, que se relaja retornando hacia la línea basal, seguida de una corriente saliente sostenida.
- 2.- Una fracción de la corriente entrante generada por la inhibición de la bomba de Na^+ , es acarreada a través de vías de transporte sensibles al Cd^{2+} , que podrían ser canales de Na^+ .
- 3.- La corriente entrante inicial, al menos durante el primer minuto, no resultó afectada por la corriente saliente, como lo demuestra el hecho de que la $d[\text{Na}^+]_i/dt$ estimada en células bañadas en solución Ringer normal y en una solución con bloqueadores de los canales de K^+ , no presentaron diferencias significativas entre sí.
- 4.- La relajación de la corriente entrante y la corriente saliente al parecer se deben a dos mecanismos diferentes, como lo sugiere el hecho de que la primera fue abolida por el Cd^{2+} pero no por el TEA y 4-AP, mientras que la corriente saliente sí fue eliminada en ambas condiciones.

- 5.- Dado que la corriente saliente depende de la entrada previa de Ca^{2+} y que fue abolida por los bloqueadores de los canales de K^+ , se sugiere que representa una conductancia al K^+ activada por un aumento del Ca^{2+} intracelular, mientras que posiblemente la relajación de la corriente entrante, representa la actividad electrogénica del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ trabajando de modo inverso, es decir expulsando Na^+ e introduciendo Ca^{2+} a la célula.
- 6.- La tasa estimada de aumento de Na^+ intracelular posterior a la inhibición de la bomba de Na^+ , es insuficiente para explicar la fase de aumento de volumen celular transitorio previamente descrita.
- 7.- La disminución en el volumen celular secundario a la inhibición de la bomba de Na^+ , probablemente es resultado del eflujo de K^+ , un anión y agua que supera la entrada inicial de Na^+ , Cl^- y agua a la célula.

7 REFERENCIAS

- ADAMS, D. J., SMITH, S. J. y THOMPSON, S. H. 1980. Ionic currents in molluscan soma. *Ann. Rev. Neurosci.* 3:141-167.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, L., RAFF, M., ROBERTS, K. y WATSON, J. D. 1989. *Molecular biology of the cell.* Garland Publishing. E.U.A. 1216 p.
- ALTAMIRANO, J., NANI, A., CRUZBLANCA, H., FERNANDEZ CALDERON, J. R., MARQUEZ BALTAZAR, S. y ALVAREZ-LEEFMANS, F. J. 1992. Fisiopatología del daño neuronal postisquémico II: movimiento de iones a través de la membrana plasmática neuronal subyacentes a cambios de volumen celular secundarios a la inhibición de la bomba de sodio. *Anales Instituto Mexicano de Psiquiatría. México.* pp 145- 150.
- ALVAREZ-LEEFMANS, F. J., RINK, T.J. y TSIEN, R. W. 1981. Free calcium ions in neurones of *Helix aspersa* measured with ion-selective micro-electrodes. *J. Physiol.* 315:531-548.
- ALVAREZ-LEEFMANS, F. J., GAMINO, S. M. y RINK, T. J. 1984. Intracellular free magnesium in neurones of *Helix aspersa* measured with ion-selective micro-electrodes. *J. Physiol.* 354:303-317.

- ALVAREZ-LEEFMANS, F. J., GAMIÑO, S. M. y REUSS, L. 1992. Cell volume changes upon sodium pump inhibition in *Helix aspersa* neurones. *J. Physiol.* 458:603-619.
- ALVAREZ-LEEFMANS, F. J. MEREDIZ, A. G. y FERNANDEZ, J. R. Consecuencias de la inhibición de la bomba de Na⁺ en neuronas y su relevancia en la fisiopatología del daño celular producido por isquemia anóxica. *Gaceta Médica de México.* (en prensa).
- BERS, D. M. 1991. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Academic Publishers. The Netherlands. pp 71-92.
- CARBONE, E. y LUX, H. H. 1986. Single low-voltage-activated calcium channels in chick and rat sensory neurones. *J. Physiol.* 386:571-601.
- CASTLE, N. A., HAYLETT, D. G. y JENKINSON, D. H. 1989. Toxins in the characterization of potassium channels. *TINS.* 12:59-65.
- CHAD, J. E. y ECKERT, R. 1986. An enzymatic mechanism for calcium current inactivation in dialysed *Helix* neurones. *J. Physiol.* 378:31-51.

CHAMBERLIN, M. E. y STRANGE, K. 1989. Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view. *Am. J. Physiol.* 257 (Cell Physiology). 26:C159-C173.

CHOI, D. W. 1990. Cerebral hypoxia: Some new approaches and unanswered questions. *J. Neurosci.* 10: 2493-2501.

COLE, K. S. 1949. Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Arch. Sci. Physiol.* 3:253-258.

CRUZBLANCA, H., NANI, A., ALTAMIRANO, J., MEREDIZ, G. y ALVAREZ-LEEFMANS, F. J. 1992. Ion movements underlying cell volume changes following sodium pump inhibition in *Helix* neurons. *Biophysical Journal.* 61(2) p2221.

CRUZBLANCA, H., ALTAMIRANO, J., MARQUEZ BALTAZAR, S., NANI, A., GAMIÑO, S. M., REUSS, L. y ALVAREZ-LEEFMANS, F. J. (Enviado a publicación). Transmembrane ion movements elicited by sodium pump inhibition in *Helix aspersa* neurones. *J. Physiol.*

DE WEER, P. y RAKOWSKI, R. F. 1984. Current generated by Backward-running electrogenic Na pump in squid giant axons. *Nature.* 309:450-452.

DEITMER, J. W. y SCHLUE, 1983. Intracellular Na^+ and Ca^{2+} in leach *Retzius* neurones during inhibition of the Na^+ - K^+ pump. *Plügers Archiv.* 397:195-201.

DICK, D. A. T. 1966. *Cell Water*. Butterworth Inc. E.U.A. 155 p.

GAMIÑO, S. M, ALTAMIRANO, J., REUSS, L. y ALVAREZ-LEEFMANS, F. J. 1993. Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during Na^+ pump inhibition in fura-2 loaded *Helix* neurones. *Biophysical Journal.* 64:2 p A347.

GILLY, W. F. y ARMSTRONG, C. M. 1984. Threshold channels—a novel type of sodium channel in squid giant axon. *Nature.* 309:448-450.

GOLA, M. y CREST, M. 1993. Colocalization of active K_{Ca} channels and Ca^{2+} channels within Ca^{2+} domains in *Helix* neurons. *Neuron.* 10:689-699.

HAGIWARA, S. y SAITO, N. 1959. Voltage-current relation in nerve cell membrane of *Onchidium verruculatum*. *J. Physiol.* 148:161-179.

HAUSER, S. y FREEMAN, A. 1980. Volumetric properties of intracellular compartments in canine cardiac purkinje cells. *Am. J. of Phys.* 238:H561-568.

HILLE, B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc. E.U.A. 607 p

HODGKIN, A. L., HUXLEY, A. F. y KATZ, B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116:424-448.

JONES, S. W. 1987. Sodium currents in dissociated bull-frog sympathetic neurones. *J. Physiol.* 389:605-627.

KERKUT, G. A., LAMBERT, J. D. C., GAYTON, R. J., LOKER J. E. y WALKER, R. J. 1975. Mapping of nerve cells in the suboesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 50A:1-25.

KUFFLER, S. W., NICHOLLS, J. G. y MARTIN, A. R. 1984. From neuron to brain. Sinauer Associates Inc. E.U.A. 651 p.

LATORRE, A., OBERHAUSER, A., LABARCA, P. y ALVAREZ, O. 1989. Varieties of calcium-activated potassium channel. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 385-389

MACKNIGHT, A. D. C. y LEAF, A. 1977. Regulation of cellular volume. *Physiol. Rev.* 57:510-573.

- MARMONT, G. 1949. Studies on the axon membrane. I. A new method. J. Cell. comp. physiol. 34:351-382.
- MEECH, R. W. 1974. The sensitivity of *Helix aspersa* neurones to injected calcium ions. J. Physiol. 237: 259-277.
- MÜLLER, T. H., SWANDULLA, D. y LUX, H. D. 1989. Activation of three types of membrane currents by various divalent cations in identified molluscan pacemaker neurons. J. Gen. Physiol. 94:997-1014.
- MULLINS, L. J. 1979. The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. Am. J. Physiol. 236:C103-C110.
- RAVINDRAN, A., SCHILD, L. y MOCZYDLOWKI, E. 1991. Divalent cation selectivity for external blockage of voltage-dependent Na⁺ channels prolonged by batrachotoxin. J. Gen. Physiol. 97:89-115.
- ROSENBERG, G. A. 1990. Brain fluids and metabolism. Oxford University Press. E.U.A. 207 p.

ROWLAND, L. P., FINK, M. E. y RUBIN, L. 1991. Cerebrospinal fluid: Blood-Brain-Barrier, Brain Edema and Hydrocephalus. En Principles of neural sciences. Eds. KANDEL, E. R., SCHWARTZ J. H. y JESSELL, T. M. Elsevier Science Publishing Co. E.U.A. pp 1050-1060.

RUDY, B. 1988. Ubiquity and diversity of K^+ channels. Neurosciences. 25, 729-749.

STEIN, W. D. 1990. Channels, carriers, and pumps. An introduction to membrane transport, Academic Press. E.U.A. 326p

THOMAS, R. C. 1972a. Intracellular sodium activity and the sodium pump in snail neurones. J. Physiol. 220:55-71.

THOMAS, R. C. 1972b. Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. Physiol. Rev. 52:563-594.

THOMAS, R. C. 1980. Regulation of intracellular Na^+ , K^+ , and H^+ concentrations in snail neurons. En Molluscan nerve cells: From biophysics to behavior. Eds. Koestner, J. y Byrne, J. Cold Spring Harbor Laboratory. E.U.A pp 65-72.

TOSTESON, D. C. y HOFFMAN, J. F. 1960. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. J. Gen. Physiol. 44:169-194.

TROSPER, T. L. y PHILIPSON, K. D. 1983. Effects of divalent and trivalent cations on sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemal vesicles. *Biochem. Biophys. Acta.* 731:63-68.

ZIVIN, J. A. y CHOI, D. W. 1991. Stroke therapy. *Scientific American.* 265:56-63.