

(25) *25/2/81*

**"CORRIENTES DE COMPUERTA EN LA MEMBRANA CELULAR"**

**TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER  
EL TITULO DE FISICO PRESENTA  
AURORA GUTIERREZ TORRES**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MEXICO, D.F.**

**1981**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

AL FIN...

I N D I C E

	<u>Página</u>
PROLOGO - a	
<u>CAPITULO 1.</u>	
1.1 INTRODUCCION	1
1.2 ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA	5
1.3 PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS FIBRAS NERVIOSAS	9
1.3.1 PROPIEDADES ELECTRICAS PASIVAS DE LAS FIBRAS NERVIOSAS	10
1.3.2 PROPIEDADES ELECTRICAS ACTIVAS DE LAS FIBRAS NERVIOSAS	25
1.4 ORIGENES DE LOS POTENCIALES DE MEMBRANA	32
1.4.1 POTENCIAL ELECTROQUIMICO	33
1.4.2 INTEGRACION DE LAS ECUACIONES DE FLUJO	37
1.4.3 ECUACION DE NERNST	43
1.4.4 EQUILIBRIO DE GIBBS-DONNAN	45
1.4.5 LEY DE OHM PARA ELECTROLITOS	46
1.4.6 FLUJOS IONICOS	49
1.5 ORIGEN DE LOS POTENCIALES DE MEMBRANA	51
1.5.1 POTENCIAL DE REPOSO	51
1.5.2 POTENCIAL DE ACCION	53

<u>CAPITULO 2.</u>	<u>Página</u>
2.1 INTRODUCCION	55
2.2 TECNICAS	56
2.2.1 FIJACION DE VOLTAJE	56
2.2.2 USO DE MODIFICADORES, DROGAS, ETC.	62
2.3 PERMEABILIDADES Y FLUJOS	67
2.4 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA EXCITACION NERVIOSA	68
2.5 BOMBA DE SODIO, VOLUMEN CELULAR Y pH INTRACELULAR	69

<u>CAPITULO 3.</u>	<u>EL MODELO DE HH</u>	<u>Página</u>
3.1	INTRODUCCION	72
3.2	PRINCIPIO DE INDEPENDENCIA	73
3.3	CONDUCTANCIAS DEL SODIO Y DEL POTASIO	77
3.4	CINETICA DE LAS CONDUCTANCIAS	80
3.4.1	CONDUCTANCIA DEL POTASIO	81
3.4.2	CONDUCTANCIA DEL SODIO	85
3.5	RECONSTRUCCION DEL POTENCIAL DE ACCION Y CALCULO DE LA VELOCIDAD DE PROPAGACION	92
3.5.1	INTRODUCCION	92
3.5.2	CALCULO DE LA VELOCIDAD DE PROPAGACION EN BASE A LA TEORIA DEL CABLE	94

<u>CAPITULO 4. CANALES DE SODIO Y DE POTASIO</u>		<u>Página</u>
4.1	INTRODUCCION	96
4.2	CANALES	97
4.2.1	SELECTIVIDAD	98
4.2.1.a.1	TEORIA DE EYRING	103
4.2.1.a.2	DIFUSION LIBRE	104
4.2.1.a.3	DIFUSION EN FILA	105
4.2.1.a.4	MODELO DE LA TEORIA DE REACCION	106
4.2.1.2.5	APLICACION DE LA TEORIA DE REACCION	108
4.3	ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO DE LOS CANALES DE SODIO Y POTASIO	112



<u>CAPITULO 5. CORRIENTES DE COMPUERTA</u>		<u>Página</u>
5.1	INTRODUCCION	121
5.2	TECNICA USADA PARA MEDIR LA CORRIENTE DE COMPUERTA	124
5.3	ANALISIS DE LA CORRIENTE DE COMPUERTA	127
5.4	INTERPRETACION TEORICA DE LA CORRIENTE DE COMPUERTA RELACIONADA CON LA ACTIVACION DEL SODIO	133
5.5	COMPORTAMIENTO DE LAS CARGAS O PARTICULAS MOVILES CONFINADAS EN LA MEMBRANA	139
5.6	DINAMICA DE UN CANAL DE SODIO	147
5.6.1	MODELO DE ARMSTRONG Y BEZANILLA	147
5.6.2	MODELO 'INSERCIÓN-AGREGACIÓN'	153

CAPITULO 6.

Página

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

154

BIBLIOGRAFIA

160

## P R O L O G O

El estudio de las membranas de las fibras nerviosas ha ido adquiriendo gran importancia dentro del estudio de la Biofísica, ya que en ellas es donde residen los fenómenos de excitación nerviosa.

Este trabajo sólo es una recopilación de datos y estudios presentados en algunos libros y publicaciones recientes, de los que tomo partes que considero de mayor importancia para el estudio de las corrientes de compuerta, que explico en el quinto capítulo.

El fenómeno de excitación de las células irritables depende de la distribución desigual de iones a cada lado de las membranas celulares. Se observan flujos iónicos a través de las membranas de las fibras nerviosas, principalmente de sodio y potasio. Estos iones cruzan dichas membranas por medio de canales que presentan una compuerta. Por cada canal pasa una especie iónica determinada por lo que se les ha denominado canales de sodio y canales de potasio. Estos canales se abren y se cierran por la influencia de un campo eléctrico de la membrana que tenderá a orientar algunas partículas cargadas que se encuentran en la región dieléctrica de la membrana. Esta orientación de las partículas estructurará o formará la boca de los canales por donde pasará sodio o potasio.

En el primer capítulo se tratarán las ideas principales vinculadas con los orígenes de las diferencias de concentración y potencial. Luego serán desarrollados, paso a paso, los conceptos sobre el origen de estas diferencias de concentración y potencial a través de la membrana y, hasta donde se considere necesario, se describirán brevemente los principios físicos fundamentales de estos mecanismos.

En el siguiente capítulo se presentan algunos resultados experimentales que se han aplicado al estudio de las membranas de las fibras nerviosas. La mayor parte de los resultados fueron obtenidos de fibras nerviosas de gran tamaño (hasta de un milímetro de diámetro) que se encuentran en ciertas especies de invertebrados, en especial en axones gigantes de calamar.

En el Capítulo 3, se expone un modelo de excitación nerviosa, el modelo de Hodgkin y Huxley, que desde 1952 se usa ampliamente en la descripción e interpretación de resultados experimentales.

En el cuarto capítulo se presenta el funcionamiento de los canales de sodio y de potasio de un axón gigante de calamar, y algunas características como son: Posibles estructuras, funcionamiento, selectividad, permeabilidad.

En el quinto capítulo de esta tesis presento, ya en sí, el funcionamiento de apertura y cerradura de los canales iónicos (objeto de este trabajo), por medio del movimiento de partícu

las cargadas que se encuentran en la región dieléctrica de la membrana. A este movimiento de partículas se les llama corrientes de compuerta de los canales iónicos. Por facilidad de estudio sólo se conocen las corrientes de compuerta de los canales de sodio.

Finalmente, en el capítulo 6 expongo los resultados y conclusiones del conocimiento de las corrientes de compuerta de los canales de sodio y algunas críticas que podrían ayudar a penetrarnos más en el estudio de dichas corrientes.

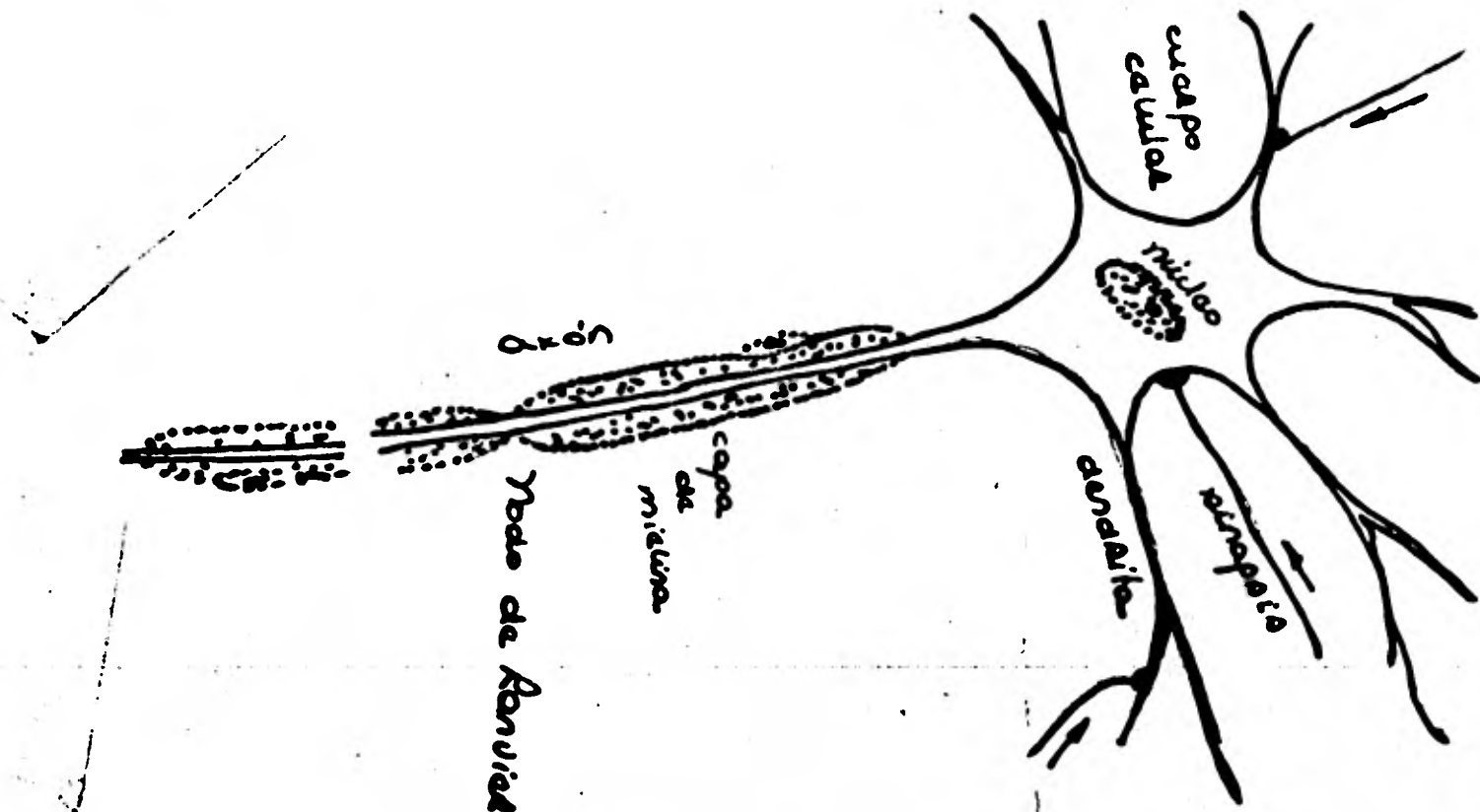
## CAPITULO 1.

### 1.1 INTRODUCCION

Las células nerviosas (neuronas) y las células musculares son capaces de transmitir impulsos electroquímicos. A estas células se les llama excitables, pues una modificación del medio, llamado estímulo, puede ocasionar un cambio transitorio del potencial de membrana, llamado impulso nervioso o potencial de acción, que se propaga alejándose del sitio donde se originó.

En la figura 1, se presenta una neurona. La unión de una neurona a la siguiente o a una célula muscular recibe el nombre de sinapsis. La célula nerviosa está compuesta de tres partes principales: El soma o cuerpo celular, el axón que es una prolongación del soma cuya función eferente es la de llevar los impulsos hacia afuera del cuerpo principal de la neurona y las dendritas que son prolongaciones muy ramificadas relativamente cortas del soma, que acarrean los impulsos nerviosos hacia el cuerpo celular, función aferente, pero que también tienen función eferente de alcance corto.

Figura 1. - Esquema de una neurona.



De acuerdo a su apariencia microscópica, las fibras nerviosas se dividen en dos clases: Mielínicas y amielínicas. - Las fibras nerviosas mielínicas se encuentran en los vertebrados; el axón de estas fibras está envuelto por una capa de mielina, sustancia lipóidea que presenta discontinuidades espaciadas de modo regular, llamadas nodos de Ranvier. En las fibras amielínicas, esta capa no existe y la fibra presenta la forma de un cilindro de protoplasma separado del medio externo por una membrana de aproximadamente 100 Å de espesor.

La membrana celular actúa como frontera física permitiendo a cada célula efectuar sus funciones vitales, facilita la integración fisiológica junto con otros grupos celulares, permi-

tiendo así a cada célula, operar como una unidad.

Las diferencias entre los líquidos intracelular y extracelular a las que me referiré principalmente, son dos:

- 1) Las concentraciones iónicas son notablemente desiguales; Las de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y cloro ( $\text{Cl}^-$ ) son más elevadas en el líquido externo que en el intracelular; la situación es opuesta para el potasio ( $\text{K}^+$ ). Como ejemplo, a continuación presento una tabla (Tabla 1) para el caso de un axón de calamar (25).

Tabla 1. EXPLICACION

<u>SUSTANCIA</u>	<u>MEDIO INTRACELULAR</u> (mM/l)	<u>MEDIO EXTRACELULAR</u> (mM/l)	<u>AGUA DE MAR</u> (mM/l)
K (potasio)	400	20	10
Na (sodio)	50	440	460
Ca (calcio)	0.4	10	10
Mg (magnesio)	10	54	10
Cl (cloro)	40 a 50	560	540
Aniones:			
Isentonato	250	0	0
Aspartato	75	0	0
Glutamato	12	0	0

- 2) Existe una diferencia de potencial eléctrico entre los líquidos intracelular y extracelular; el interior es negativo con respecto al exterior.



La membrana celular es la principal responsable de las diferencias de concentración y de potencial que han sido observadas.

Los iones difunden a través de la membrana a un ritmo menor que aquel con el cual lo hacen en el agua. Esta barrera de difusión iónica deriva, probablemente, de la estructura de la membrana (sección 1.2). En la mayoría de las membranas celulares, el ritmo de difusión del  $\text{Na}^+$  es mucho más bajo - que los de  $\text{K}^+$  y del  $\text{Cl}^-$ .

La energía derivada de los procesos metabólicos es utilizada por las células para transportar el  $\text{Na}^+$  hacia fuera y el  $\text{K}^+$  hacia dentro de la célula. Estos movimientos iónicos balancean la difusión extracelular de  $\text{Na}^+$  y la intracelular de  $\text{K}^+$ . Este transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  mantiene bajas las concentraciones intracelulares de  $\text{Na}^+$  y altas las correspondientes al  $\text{K}^+$ .

Debido a su movimiento al azar, las moléculas de una sustancia en solución están continuamente entremezclándose (difusión). Si la concentración (Peso/Volumen) (mM/l) de la sustancia disuelta es más alta en una región que en la otra adyacente, las moléculas se desplazarán en ambas direcciones, aunque existirá una tendencia para que la sustancia se difunda desde la región de mayor concentración hacia la de concentración más baja. De esta manera, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  tienden a difundirse hacia el interior de las células, mientras que el  $\text{K}^+$  y  $\text{A}^-$  lo hacen hacia el exterior. La difusión no sólo depende de la diferencia de concentración sino también de la fa

cilidad con que atraviesen la membrana.

Si la sustancia está ionizada, la diferencia de potencial eléctrico entre los dos líquidos (intracelular y extracelular), también influye sobre el ritmo de difusión. La diferencia de potencial entre dos puntos es el trabajo necesario para llevar la unidad de carga positiva de un punto a otro contra las fuerzas eléctricas. Las cargas separadas de la membrana (interior negativo; exterior, positivo) ejercen fuerzas sobre los iones. Esta fuerza tiende a llevar cationes (+) hacia el interior de la célula y aniones (-) hacia el exterior.

La conductividad ( $k = gl/A$  donde  $A$  es el área de los electrodos;  $l$ , la distancia de separación entre ambos y  $g$  es la conductancia del electrolito) del medio interno es menor que la del medio externo (sección 1.5). La movilidad (sección 1.4) de los cationes (iones de carga positiva) es aproximadamente el 80% de su movilidad en el exterior. La baja movilidad que presentan los cationes divalentes en el medio intracelular (citoplasma), comparada con la del medio externo, es interpretada en el sentido de que estos iones son retardados por moléculas del citoplasma.

## 1.2 ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA

La estructura de la membrana ha sido analizada en gran medida gracias a la aplicación de la microscopía electrónica. Inicialmente dicha técnica confirmó la universalidad de la "mem

brana unitaria", es decir, la existencia constante de organización en forma de bicapa en las membranas biológicas en general, ésto es, al hacer un corte transversal de la membrana, ésta presenta dos líneas oscuras de aproximadamente 45 Å (17) de espesor. Estas líneas se presentan a cada lado de una zona más clara, formando así una estructura trilaminar comúnmente referida como unidad de membrana. Este tipo de membrana puede encontrarse dentro de la célula o como frontera entre los medios interno y externo. Su grosor va de 75 a 100 Å.

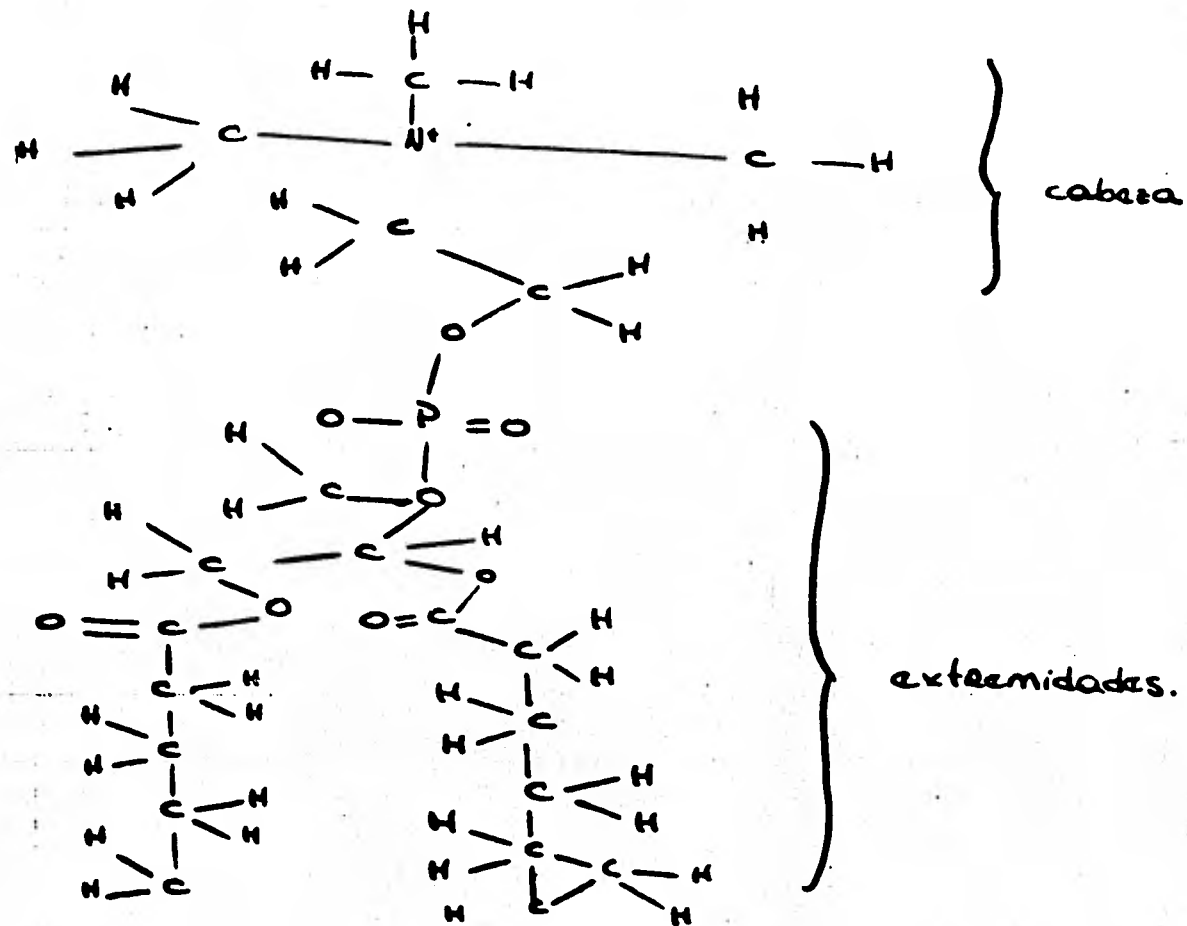
Los principales constituyentes de la membrana son los fosfolípidos (75%) y proteínas y en menores cantidades se encuentran los carbohidratos y RNA. (Esta relación varía de acuerdo a las funciones más o menos complicadas que realiza la membrana). Los fosfolípidos se encuentran formando dos capas, por lo que esta estructura bimolecular tiene una polaridad definida.

Los lípidos forman un grupo heterogéneo de moléculas que tienen pocas características comunes, excepto que tienen insolubilidad marcada en el agua. Tienen importancia en la arquitectura de las membranas biológicas, dos tipos principales: Los lípidos y los esteroides. Los lípidos tienen dos cadenas de hidrocarburos cuyo enlace covalente hace que sean insolubles al agua (figura 2).

El grupo fosfato de los lípidos es un grupo ionizable y por lo tanto tiene cargas electrostáticas en soluciones acuosas, por lo que esta parte es soluble en el agua. Los fosfolípidos, pues, presentan un extremo soluble al agua (hidrófilo) y otro

insoluble (extremo hidrófobo) (Figura 2).

Figura 2. Estructura molecular de un fosfolípido.

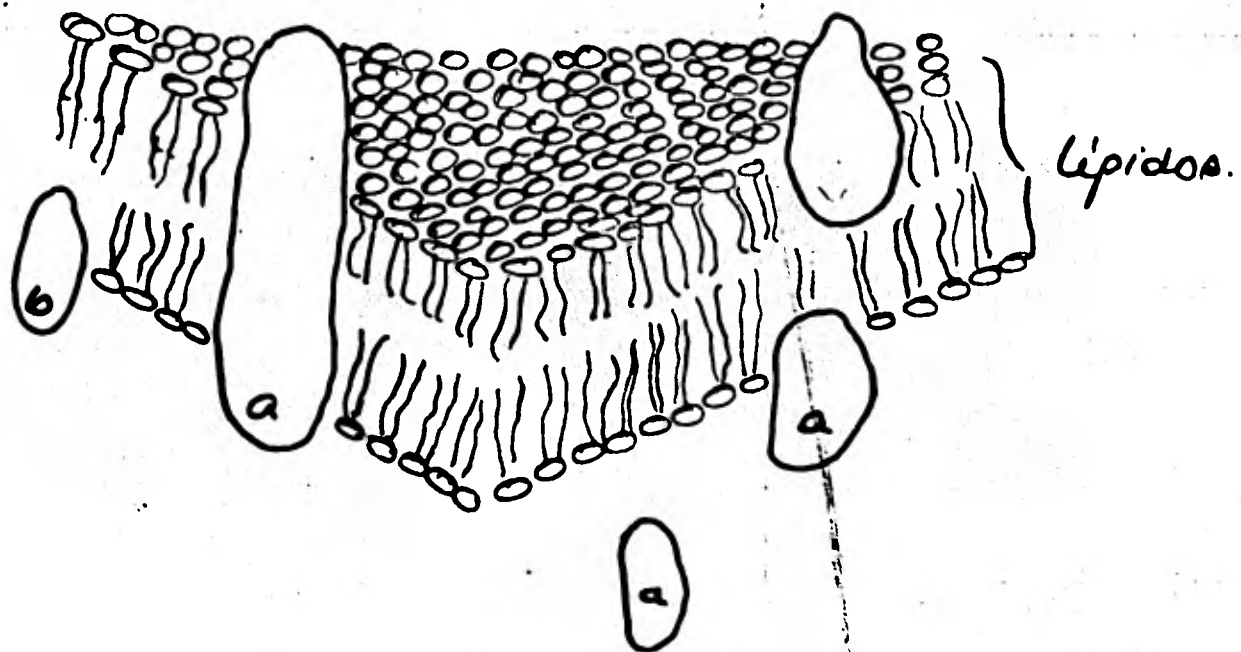


Las proteínas de la membrana se encuentran a cada lado de las capas de fosfolípidos y "sumergidas" en ellas; algunos investigadores sugieren que la doble capa lipóidea pudiera actuar como soporte, al cual se fijan las proteínas globulares. La presencia de las proteínas en la membrana, contribuyen a la

estabilidad e integridad de la misma (17, 20). También pueden hallarse dentro de la membrana formando parte de otras estructuras de la membrana como son los poros (capítulo 4) o pueden actuar como enzimas (ATPasa) (que separa uno de los grupos fosfato del ATP).

En la figura 3. se presenta la estructura de una membrana biológica.

Figura 3. Estructura de una membrana biológica.



a - proteínas

En la actualidad con la aplicación de técnicas de citoquímica estructural, se reconocen tres niveles de organización de la membrana plasmática: Uno, externo, constituido fundamentalmente por carbohidratos de glucoproteínas y glucolípidos: un plano medio en el que se encuentra la capa de lípidos y pro-

teínas asociadas laxamente a la bicapa (proteínas periféricas) o bien, proteínas ancladas en el espesor de la bicapa (proteínas intrínsecas); un tercer plano, citoplásmico, de terminado por la convergencia de microtúbulos y microfilamentos .

El conocimiento de la organización supramolecular de la membrana plasmática ha avanzado considerablemente con la introducción de otra técnica (criofractura). Gracias a ella se logran visualizar componentes integrales de la membrana, muy posiblemente proteínas integrales que aparecen en forma de partículas intramembranales, que adoptan disposiciones especiales y que determinan varias funciones en los tejidos organizados.

En la actualidad, los estudios sobre los componentes membranales que determinan la permeabilidad están dirigidos a analizar las corrientes de compuerta en las membranas de las neuronas.

### 1.3 PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS FIBRAS NERVIOSAS

La descripción de las propiedades eléctricas de la membrana es un punto de partida útil en la fisiología. El intercambio de sustancias desprovistas de carga eléctrica) no es considerada en este trabajo.

Las propiedades eléctricas pasivas y activas de las células nerviosas y musculares son imprescindibles para la comprensión

de un amplio grupo de fenómenos biológicos, tales como:

- a) La actividad eléctrica de las células musculares y nerviosas y el proceso de la transmisión sináptica.
- b) La distribución de los iones a cada lado de la membrana.
- c) El transporte iónico activo (en los procesos de secreción y absorción).

### 1.3.1 PROPIEDADES ELECTRICAS PASIVAS DE LAS FIBRAS NERVIOSAS

La membrana se encuentra entre dos medios conductores (uno en el exterior y el axoplasma en el interior); como se ha mencionado en la sección anterior. Esta estructura de dos medios conductores separados por un medio aislante actúa como un condensador eléctrico. Los iones pueden moverse con mayor o menor facilidad a través de dicho medio aislante por lo que el condensador no es perfecto. La geometría cilíndrica de la membrana de las fibras nerviosas tiene un comportamiento semejante al de un cable submarino.

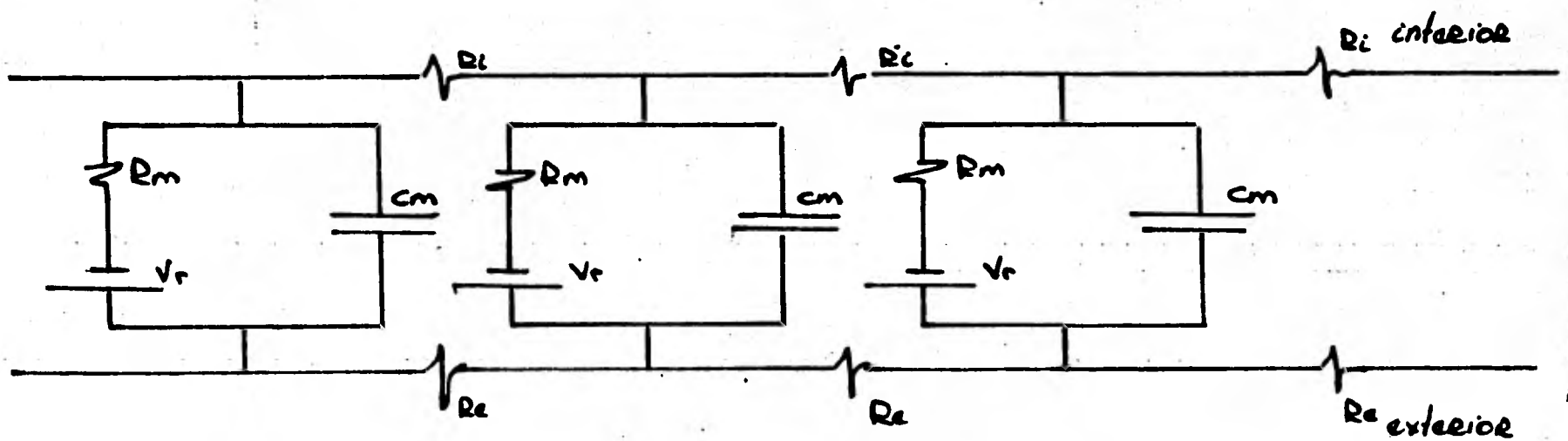
En el siglo pasado, Lord Kelvin estudió la propagación de señales a lo largo de cables submarinos, los resultados que obtuvo son aplicables a las fibras nerviosas y constituyen lo que se llama el modelo de cable.

El modelo eléctrico de un cable aplicado al axón, se muestra en la figura 4. En ella se presentan secciones de "membrana" que consisten en una resistencia ( $R_m$ ), una capacitancia ( $C_m$ ) y un potencial de reposo ( $V_r$ ). Estas secciones están conecta-

das entre sí por resistencias internas ( $R_i$ ). Las variables  $R_m$ ,  $R_i$  y  $C_m$  son variables distribuidas uniformemente a lo largo del cable y estos parámetros se reportan para cada centímetro de longitud.

La capacidad ( $C_m$ ) representa el almacenador de carga de la membrana (aislante), la resistencia ( $R_m$ ) representa la limitada posibilidad de los iones para atravesar la membrana y  $V_r$ , el potencial de reposo, representa una batería. Las baterías y las resistencias están dispuestas en serie y la capacidad de la membrana en paralelo. La capacidad de la membrana está cargada por iones (principalmente de  $K^+$  y  $Cl^-$ ) que pasan a través de la resistencia ( $R_m$ ) debido a los gradientes de concentración.

Figura 4. Modelo de un cable submarino.



Para un axón inmerso en un gran volumen de fluido conductor, la resistencia externa puede ser ignorada y el potencial externo se considera constante.

La ventaja de hacer un diagrama de circuito equivalente para un axón es que la conducta de este tipo de circuito es suscep-

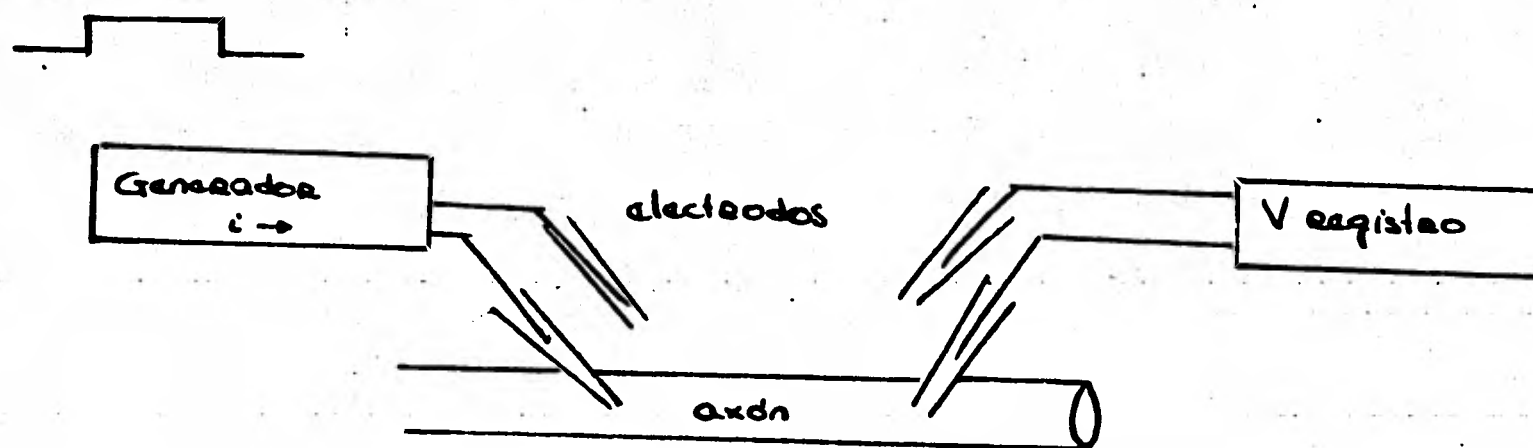


tible de análisis matemático. Dicho análisis permite el estudio de:

- 1) La constante de tiempo ( $\tau$ ), que es una medida de retardo en el tiempo de los cambios de voltaje.
- 2) La constante de espacio ( $\lambda$ ), una medida del ritmo al que decae el voltaje con la distancia.

Un experimento que aporta información sustancial consiste en inyectar (mediante microelectrodos), pulsos cuadrados de corriente y registrar simultáneamente el potencial eléctrico a través de la membrana. Este experimento puede realizarse con relativa facilidad en el axón gigante del calamar. En la figura 5 visualizamos el montaje necesario para tal experimento.

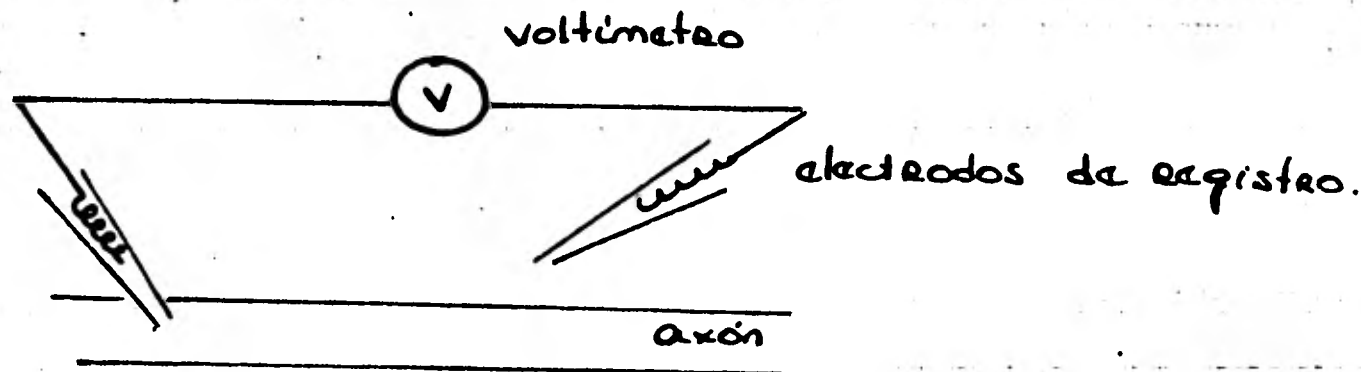
Figura 5. Aplicación de pulsos cuadrados de corriente y registro del potencial eléctrico a través de la membrana.



Al introducir un microelectrodo al interior del axón y al mantener otro en el líquido extracelular (figura 6), se presenta una diferencia de potencial llamada potencial de reposo,  $V_r$ , con un valor aproximado de  $-60\text{mV}$  (el signo negativo se debe a que el interior está cargado negativamente respecto al exterior). Para poder medir el potencial de reposo  $V_r$ , hay que eliminar los potenciales de electrodo y de polarización. El campo eléctrico de las membranas celulares ha de ser del orden de  $10^8$  volt/m para poder resistir esa diferencia de potencial.

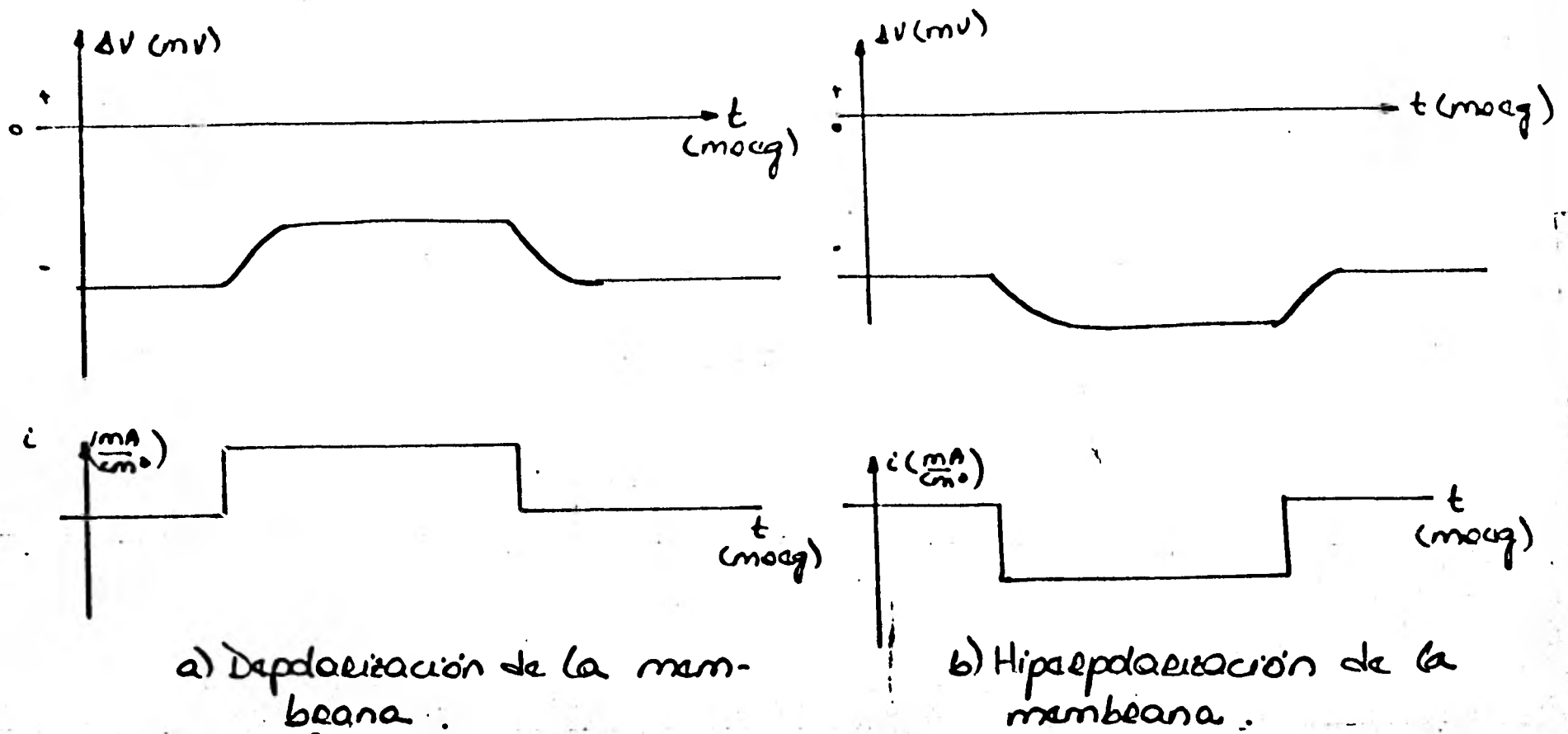
Todos los estímulos producen una variación del potencial local en el sitio que se aplican, originando una respuesta local que puede detectarse sólo en puntos muy cercanos al de estimulación. La magnitud de la respuesta local depende de la intensidad del estímulo por lo que también se llama respuesta graduada.

Figura 6. Aplicación de los electrodos de registro en un axón de calamar.



Si a la membrana de un axón se le aplican pulsos de corriente débiles, se registra una forma característica para el voltaje de membrana, como el que se esquematiza en la figura 7.

Figura 7. Aplicación de pulsos cuadrados de corriente en un axón de calamar.



Aplicación de pulsos cuadrados de corriente con sus respectivas formas de voltaje registradas a través de una membrana de una fibra nerviosa excitable.

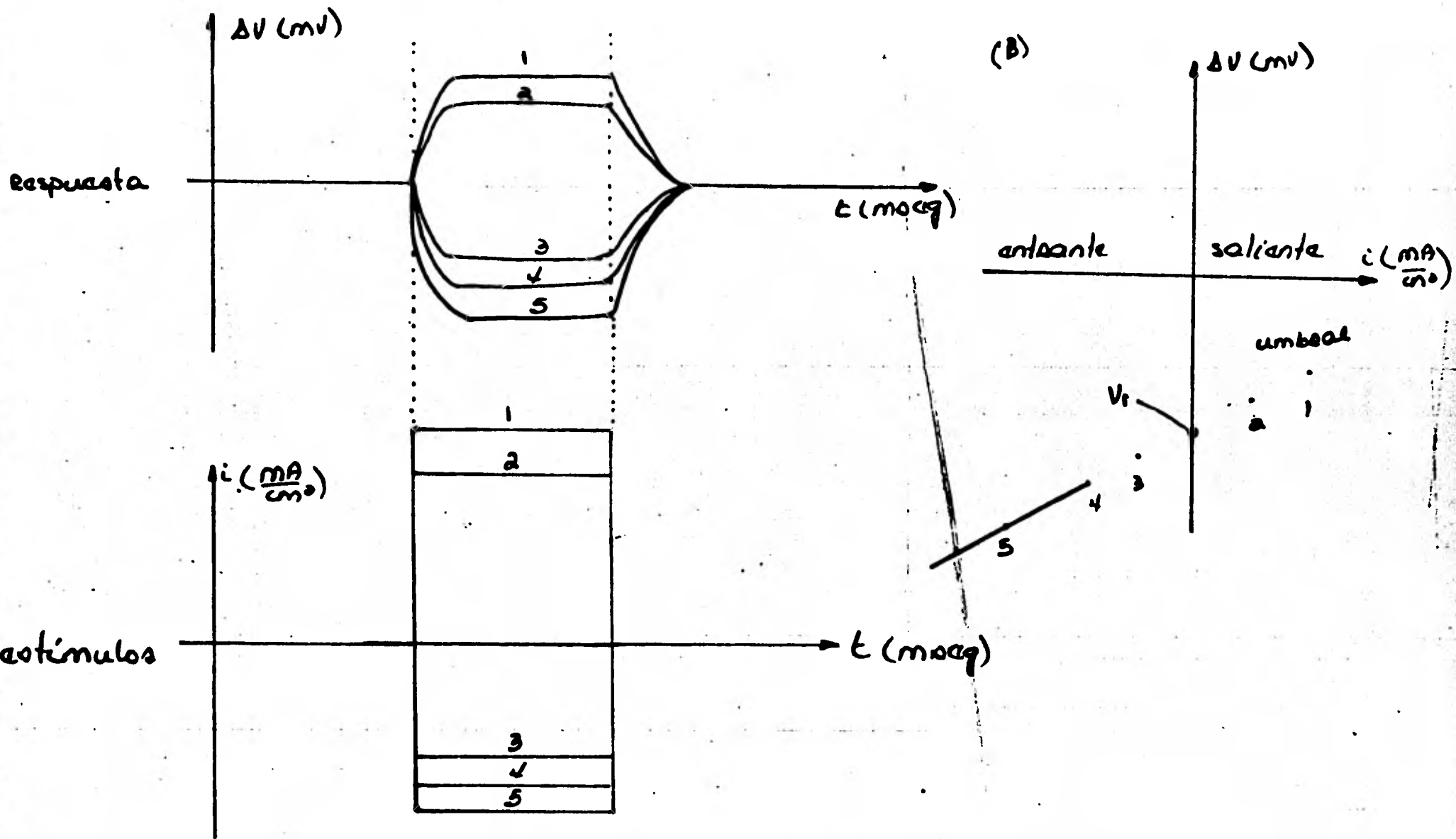
Con estos pulsos de corriente de distinta intensidad (si son suficientemente débiles) y distinto sentido, obtenemos diferentes valores de voltajes estacionarios de membrana, que al graficarlos ( $V$  vs  $i$ ) se obtiene una recta como la que se muestra en la figura 8, con la ecuación correspondiente:

$$\Delta V = -V_r + R_m i$$

siendo la pendiente de la curva, el valor de la resistencia dado por la ley de Ohm (figura 8).

Figura 8.

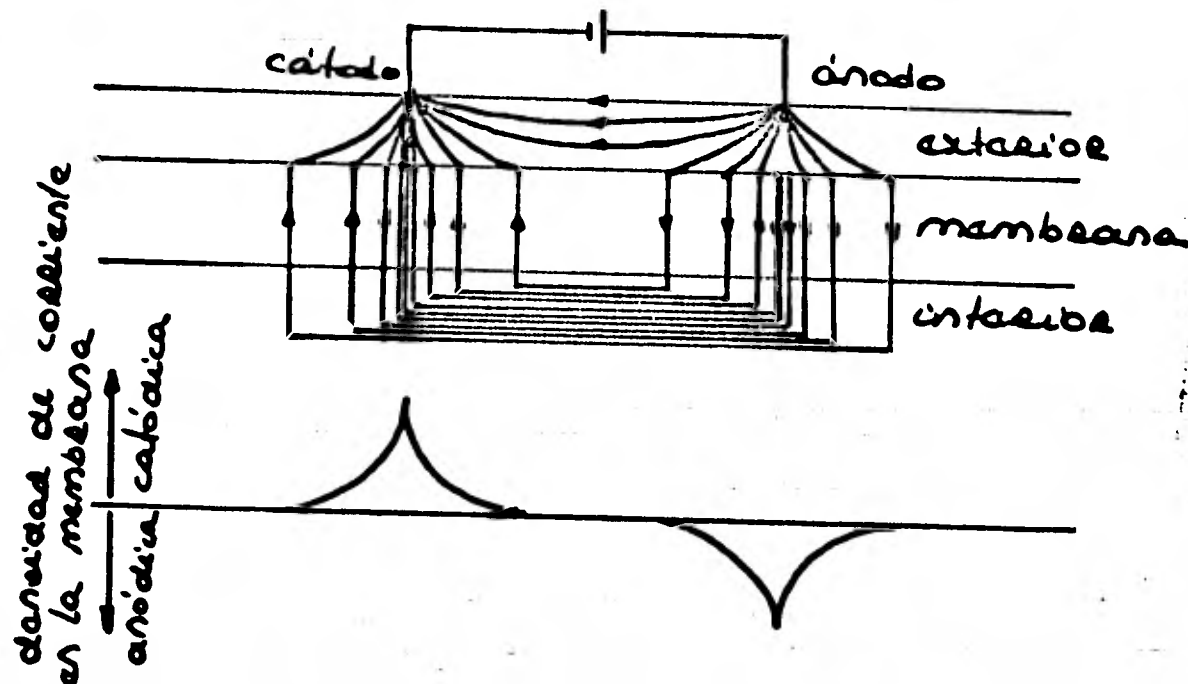
- A) Pulsos cuadrados de corriente de distinta magnitud y distinto sentido con sus respectivas formas de voltaje.
- B) Gráfica de  $V$  vs  $i$  (ecuación de la recta  $V = -V_r + R_m i$  con pendiente  $R_m$  (resistencia de la membrana) y ordenada al origen  $-V_r$  (potencial de reposo)).



En la figura 8B, la ordenada al origen corresponde a la fuerza electromotriz de la membrana ( $V_r$ ) dada por el potencial de reposo, mientras que la pendiente de esa recta, corresponde a la resistencia de membrana  $R_m$ . El axoplasma y el fluido extracelular se comportan como resistencias óhmicas.

Gran parte de esta corriente (figura 8C) fluye del ánodo hacia el cátodo en el fluido exterior de baja resistencia que rodea a la fibra y afecta indirectamente el potencial de membrana. Una porción de corriente fluye a través de la membrana. La densidad de flujo de corriente es máxima, respectivamente, debajo del ánodo y del cátodo. La corriente que fluye a través de la membrana tiene un efecto pronunciado sobre  $V_m$ , porque dicha estructura tiene resistencia (caída de potencial). En el cátodo, donde la corriente fluye hacia afuera, la caída de potencial (interior positivo; exterior negativo) posee signo opuesto a  $V_r$ , y por consiguiente lo disminuye (depolarización). A nivel del ánodo, la corriente fluye hacia adentro, de forma que  $V_m$  aumenta; la membrana está hiperpolarizada.

Figura 8C. Diagrama de la distribución de corriente.



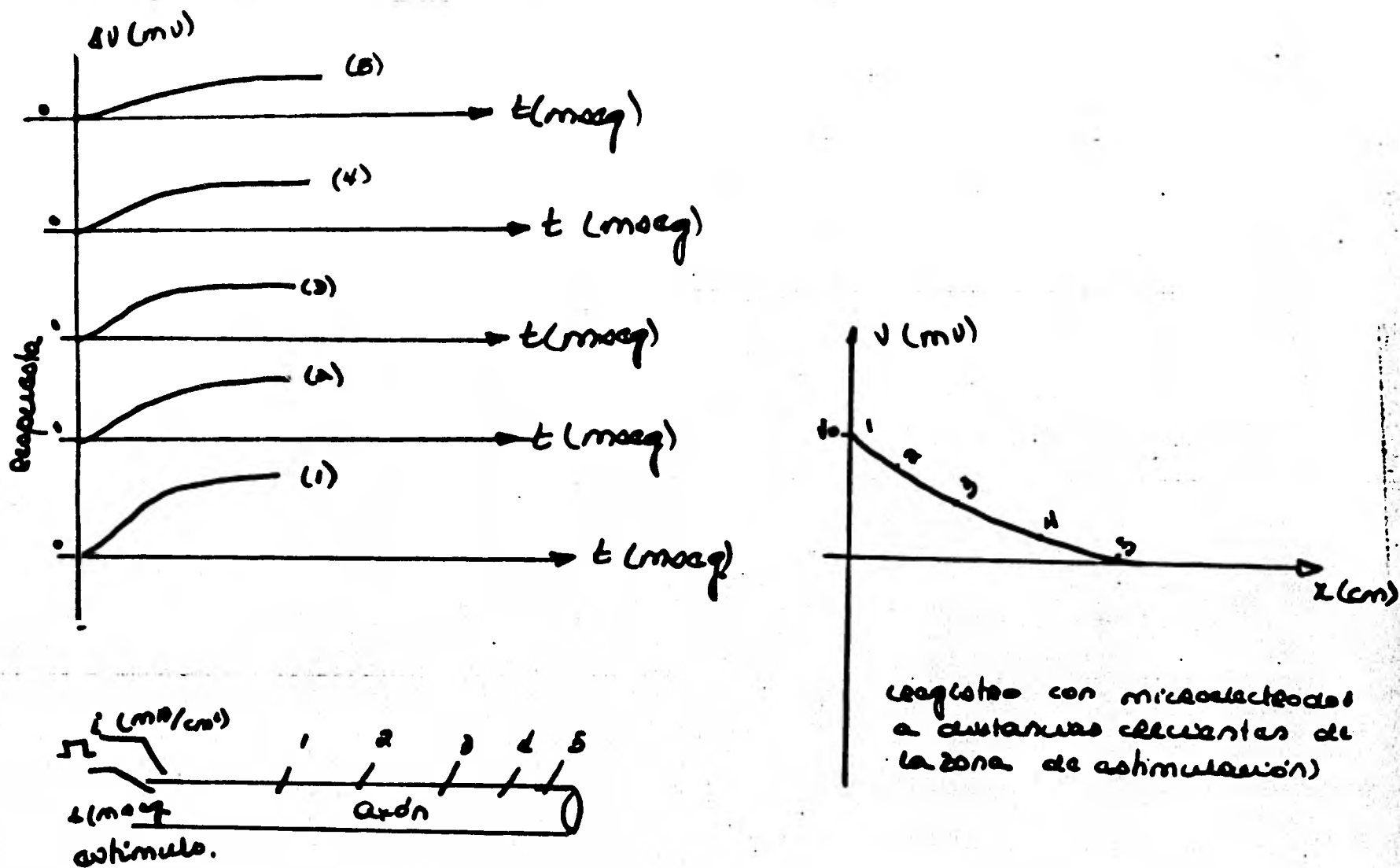
Supongamos que se le aplica una señal eléctrica cuya amplitud es  $V_0$  (diferencia de potencial a través de la membrana) a un punto del axón. La cantidad de corriente longitudinal que fluye a lo largo de la parte central es:

$$i_{long} = - \frac{1}{r_i} \frac{dV}{dx} \quad (1.3.1)$$

Se ha observado que la corriente longitudinal va disminuyendo conforme aumenta la distancia  $x$ , a lo largo del axón (figura 9), pues parte de ella se fuga hacia afuera a través de la resistencia de la membrana ( $r_m$ ), por lo que podemos establecer la ecuación:

$$- \frac{di_{long}}{dx} = i_m = \frac{V}{r_m} \quad (1.3.2)$$

Figura 9. Registro con microelectrodos a distancias crecientes de la zona de estimulación.



La figura 9 presenta el cambio máximo, final, del voltaje a través de la membrana, que se produce cuando se varía la distancia respecto del electrodo que aplica la corriente y el que lo registra. El retardo de los cambios de potencial es consecuencia de la capacidad de la membrana; la disminución del cambio con la distancia es el resultado de las resistencias del axoplasma y la membrana a los flujos de corriente.

Derivando la ecuación (1.3.1) e igualándola con la (1.3.2), se tiene:

$$- \frac{d}{dx} i_{long} = - \frac{d}{dx} \left( - \frac{1}{r_i} \frac{dV}{dx} \right) \quad (\text{ley de Ohm})$$

$$- \frac{d}{dx} i_{long} = \frac{1}{r_i} \frac{d^2V}{dx^2} = \frac{V}{r_m}$$

$$\therefore \frac{r_m}{r_i} \frac{d^2V}{dx^2} = V \quad (1.3.3)$$

cuya solución es:

$$V = A \exp\left(\frac{-x}{\sqrt{r_m/r_i}}\right) + B \exp\left(\frac{x}{\sqrt{r_m/r_i}}\right)$$

Al considerar las condiciones de frontera, tenemos que si  $V = 0$  en  $x = \infty$  tenemos el valor para el coeficiente  $B = 0$ ; si  $V = V_0$  en  $x = 0$ , tenemos la solución particular:

$$V = V_0 \exp\left(-\frac{x}{\sqrt{r_m/r_i}}\right)$$

cuya gráfica ( $V$  vs  $x$ ) se muestra en la figura 10. Es decir, el voltaje decrece de modo exponencial a medida que se aleja del sitio de estimulación, i.e., decae como exponencial con una constante de longitud de  $\sqrt{r_m/r_i}$ .

Como se espera, entre mayor es la resistencia de la membrana ( $r_m$ ) y menor la  $r_i$ , la señal se propaga más lejos. Los valo-



res de  $r_m$  y  $r_i$  varían inversamente con el tamaño de la fibra. La relación de las resistencias específicas por  $\text{cm}^2$  de la membrana ( $R_m$ ) y  $\text{cm}^3$  del axoplasma  $R_i$  son:

$$r_m = \frac{R_m}{2\pi a} \qquad r_i = \frac{R_i}{\pi a^2}$$

donde 'a' es el radio de la fibra. Por lo que la constante de longitud ( $\lambda$ ) es:

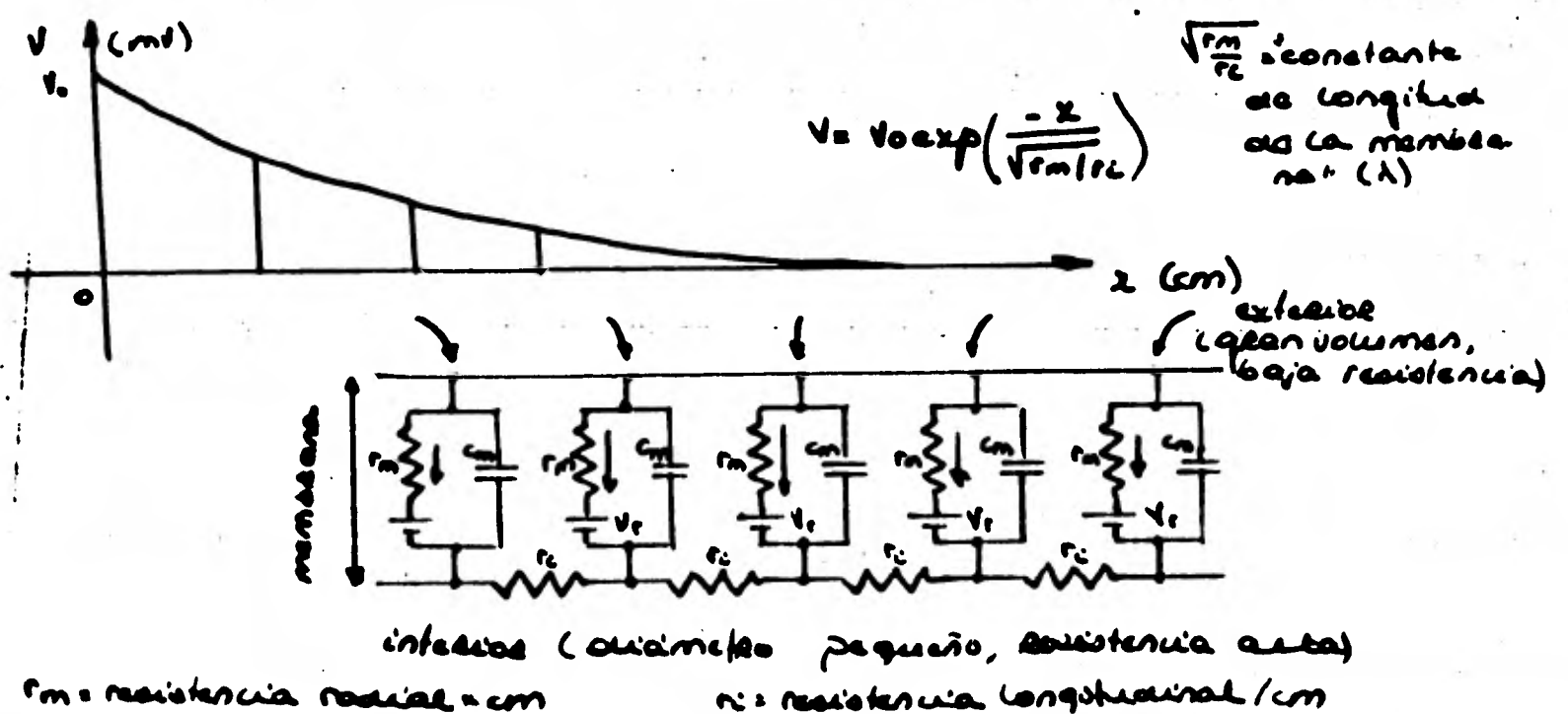
$$\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_i}} = \sqrt{\frac{R_m / 2\pi a}{R_i / \pi a^2}}$$

$$\lambda = \sqrt{\frac{R_m \pi a^2}{2\pi a R_i}} = \sqrt{\frac{a R_m}{2 R_i}}$$

es decir, varía con la raíz cuadrada del tamaño de la fibra.

La resistencia de la membrana es constante cuando la densidad de corriente a través de la misma es pequeña.

Figura 10. Gráfica de la diferencia de potencial registrada a distancias crecientes de la zona de estimulación.



Cada porción de la membrana puede representarse como una resistencia y un condensador en paralelo (figura 4); al estar sujetas a la misma diferencia de potencial la corriente de membrana se divide en dos:

$$i_m = i_{iónica} + i_c \quad (1.3.4)$$

donde  $i_{iónica}$  representa la corriente de la membrana que pasa por la resistencia,  $i_c$  es la corriente que se almacena en el condensador.

Cada unidad de superficie de la membrana acumula cierta carga,  $Q$ , dada por  $Q = CV$ , donde  $C$  es la capacitancia y  $V$  es la diferencia de potencial a través de la membrana. De esta ecuación obtenemos:

$$\frac{dQ}{dt} = C \frac{dV}{dt} = i_c$$

donde  $i_c$  es la densidad de corriente capacitativa.

El voltaje es proporcional a la carga en un condensador, una corriente que fluye hacia afuera a través de la membrana a nivel del cátodo, debe neutralizar parte de las cargas de membrana para reducir el voltaje. La corriente consiste en un flujo de cargas eléctricas ( $Q$ ), de modo que se requiere cierto tiempo para modificar la carga de la membrana; el condensador actúa haciendo más lentos los cambios de carga sobre la membrana inducidos por el flujo de corriente que atraviesa en cualquier punto de la fibra ( $i_m$ ).

En la ecuación (1.3.4) tenemos:

$$i_m = i_{iónica} + C_m \frac{dV}{dt}$$

Si sustituimos (1.3.3)  $\frac{1}{r_i} \frac{d^2V}{dx^2} = \frac{V}{r_m}$  como:

$$i_m = \frac{1}{r_i} \frac{d^2V}{dx^2}$$

Reemplazando en la ecuación (1.3.4) llegamos a:

$$i_m = \frac{1}{r_i} \frac{d^2V}{dx^2} = i_{iónica} + C_m \frac{dV}{dt}$$

Para obtener la corriente por unidad de área,  $I_m$ , se divide  $i_m$  entre el parámetro  $2 \pi a$ , donde  $a$  es el radio de la fibra:

$$I_m = \frac{i_m}{2\pi a} \quad i_m = 2\pi a I_m$$

Sustituyendo estos valores en  $i_m$ , obtenemos:

$$2\pi a I_m = \frac{1}{r_i} \frac{d^2V}{dx^2} = i_{iónica} + C_m \frac{dV}{dt}$$

Despejando:

$$I_m = \frac{1}{2\pi a r_i} \frac{d^2V}{dx^2} = \frac{i_{iónica}}{2\pi a} + \frac{C_m}{2\pi a} \frac{dV}{dt} \quad (1.3.5)$$

Para la capacitancia por unidad de superficie tenemos:

$$C_m = \frac{c_m}{2 \pi a}$$

Y para la resistencia específica interna:

$$\pi a^2 r_i = R_i \quad \frac{1}{r_i} = \frac{\pi a^2}{R_i}$$

Sustituyendo en la ecuación (1.3.5) tenemos:

$$I_m = \frac{a}{2R_i} \frac{d^2V}{dx^2} = I_{iónica} + C_m \frac{dV}{dt} \\ = I_{iónica} + I_c$$

donde:

$$I_{iónica} = \frac{i_{iónica}}{2\pi a} \quad I_c = C_m \frac{dV}{dt} \quad R_i = \pi a^2 r_i$$

Esta ecuación de  $I_m$  no se puede resolver, a menos que se especifique la relación de  $I_{iónica}$  con el potencial. Se supo-

ne el caso más simple que ocurre al variar ligeramente el potencial de la fibra  $V$ ; la membrana puede representarse simplemente como un solo elemento resistivo lineal. De la ley de Ohm:

$$I_{\text{iónica}} = \frac{V}{r_m}$$

donde  $r_m$  es la resistencia de la membrana por unidad de longitud. Por lo que tenemos:

$$i_m = I_{\text{iónica}} + C_m \frac{dV}{dt} = \frac{1}{r_i} \frac{d^2V}{dx^2}$$

$$i_m = \frac{1}{r_i} \frac{d^2V}{dx^2} = \frac{V}{r_m} + C_m \frac{dV}{dt}$$

De aquí se sigue que cuando

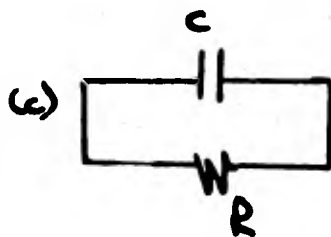
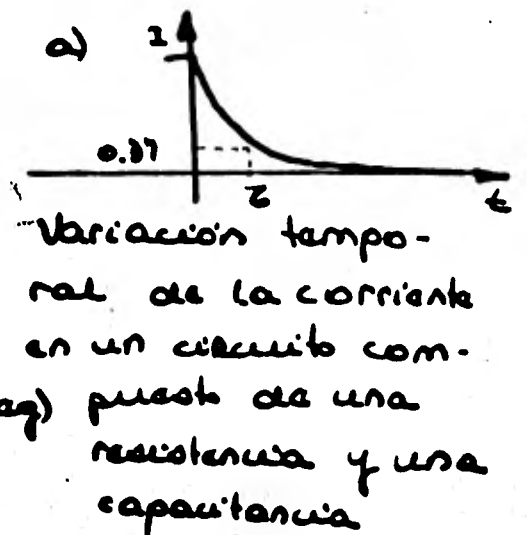
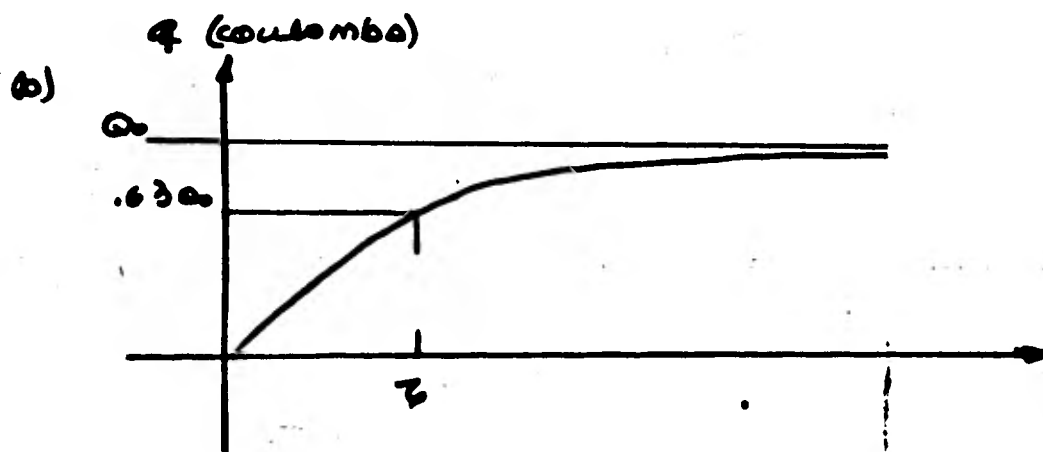
$$\frac{d^2V}{dx^2} = 0$$

$$V = V_0 e^{-t/\tau}$$

$$\tau = r_m C_m$$

Figura 11.

- A) Variación temporal de la corriente en un circuito compuesto de una resistencia y una capacitancia (c).
- A y B) Cargas y corriente en un circuito RC, la carga disminuye en el transcurso del tiempo RC con un factor  $1/\exp$
- B) Tiempo que se carga una superficie del capacitor en un circuito RC.



Las propiedades eléctricas observadas a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  en un axón de calamar se presentan en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2.

Diámetro de la fibra:	500 micras
Constante de longitud:	$\sqrt{r_m/r_i} = 5 \text{ mm}$
Constante de tiempo:	0.7 mseg
Resistencia de la membrana:	700 ohm-cm <sup>2</sup>
Capacidad de la membrana:	1 microfarad/cm <sup>2</sup>
Resistividad del interior celular:	30 ohm-cm
Resistividad del medio externo:	22 ohm-cm.

### 1.3.2 PROPIEDADES ELECTRICAS ACTIVAS DE LAS FIBRAS NERVIOSAS

Las células nerviosas son capaces de generar fuerzas electro-motrices. Un nervio en reposo tiene una diferencia de potencial entre su parte interna y el medio que lo rodea. El potencial intracelular en células no excitadas se llama potencial de reposo. El potencial intracelular o de membrana,  $V_m$ , ya expuesto, es la diferencia de potencial eléctrico que se mide entre un electrodo colocado dentro de la célula y otro fuera. A esta diferencia de potencial se le denomina potencial de reposo ( $V_r$ ), definido como la diferencia entre el voltaje interior y el exterior. El potencial de reposo, que va de -50mV a -70mV, tiene dos componentes:

- A) Una que es dependiente de los gradientes iónicos y permeabilidades y
- B) Otra, dependiente de la temperatura y actividad metabólica (35). Este potencial coincide con el potencial de reposo cuando la fibra no se ha estimulado. El valor del potencial

de membrana en estado de reposo depende de la relación entre  $P_{Na}$  y  $P_K$  (permeabilidades del sodio y potasio, respectivamente) (35).

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

Si a la membrana se le suministran pulsos de corriente, su potencial  $V_m$  cambia. Es decir, si se le inyecta carga positiva la magnitud del potencial de membrana disminuye, ocurriendo un fenómeno que en lo sucesivo llamaremos depolarización; en caso contrario, es decir, si dicha magnitud del potencial aumenta, hay hiperpolarización (figura 7).

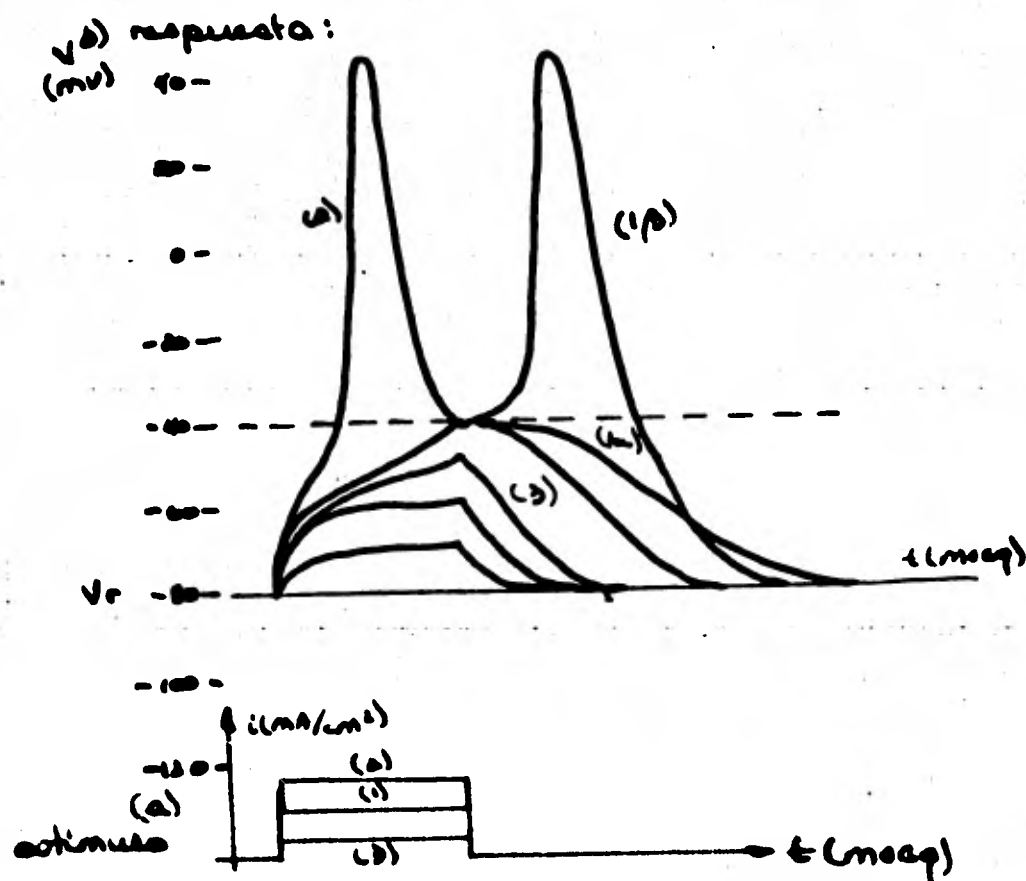
El potencial de acción se inicia en el instante en que el potencial de membrana llega a un punto de inestabilidad eléctrica llamado umbral, la membrana se depolariza y ya no se comporta conforme a la ley de Ohm. El potencial se dispara, figura 12.

Si la aplicación de la corriente depolarizante se hace un poco más grande que el umbral, se observa un movimiento neto de cationes hacia el interior de la fibra. Estas cargas reducen  $V_m$  al neutralizar los aniones acumulados en la superficie interior de la membrana. El decremento de  $V_m$  produce un aumento de  $P_{Na}$ , a su vez, éste causa depolarización adicional. Esto continúa hasta que  $P_{Na}$  alcanza su máximo y luego decae durante la inactivación (capítulo 3).

FIGURA 12.- Iniciación de un impulso debido a una depolarización local.

A) Pulsos cuadrados de corriente de duración fija pero de tamaño variable, su polarización causa variaciones del potencial de membrana (B).

B) Las corrientes depolarizantes de cualquier intensidad producen cambios de  $V_m$  (curva 3); la corriente de intensidad, exactamente umbral, producirá una de estas dos respuestas: o el valor del potencial de membrana retorna a su valor estable después de un intervalo ( $1\alpha$ ), o se genera un potencial de acción con su típica elevación y caída ( $1\beta$ ). Cualquier estímulo más intenso (2) genera también un potencial de acción, pero progresivamente se requiere de tiempos menores para depolarizar la membrana hasta el umbral.





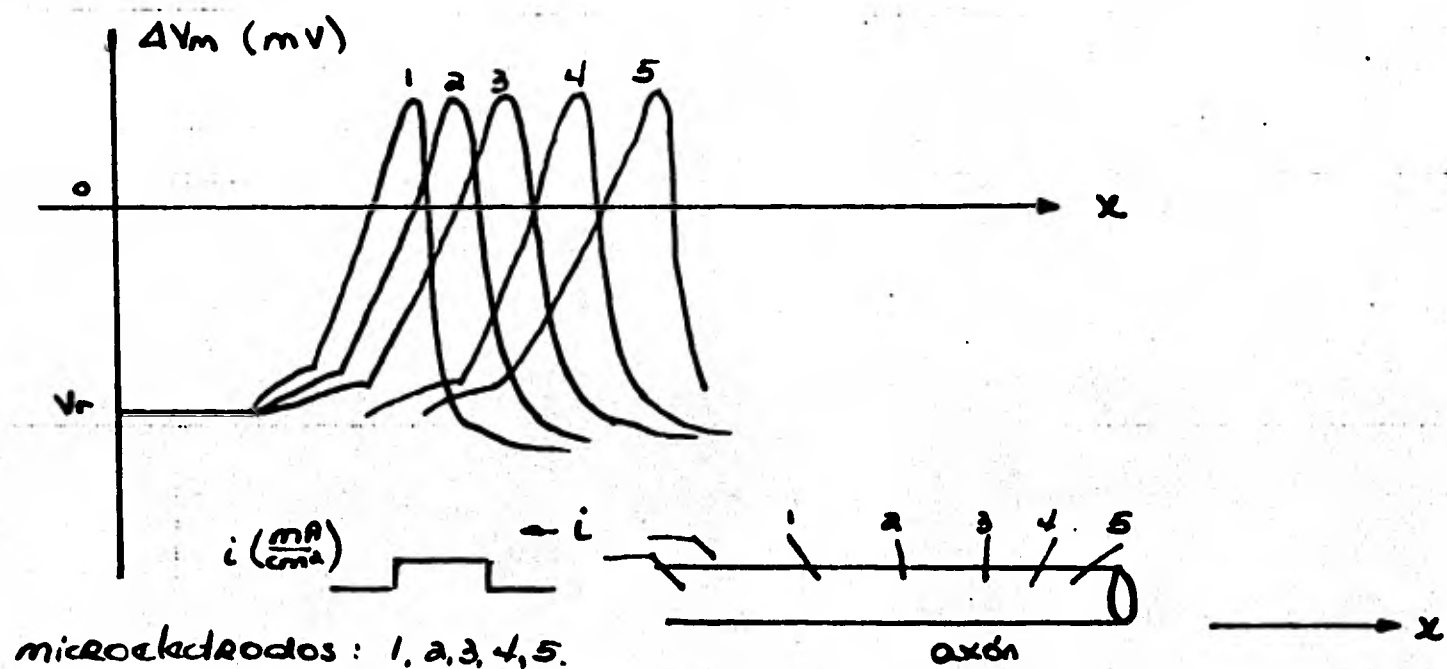
Si el pulso depolarizante que se le suministra a la membrana es débil, el potencial de membrana no llegará al valor crítico o umbral por lo que no se generará un potencial de acción; si este pulso depolarizante es de suficiente magnitud, el potencial de membrana sobrepasará el punto de inestabilidad y se generará un potencial de acción, constituyéndose así una respuesta del tipo "todo o nada". Esta respuesta no sufre atenuación alguna, es decir, no disminuye al aumentar la distancia de separación entre la zona de estímulo y la de registro (figura 13). Este potencial se regenera en cada punto, por lo que la velocidad de conducción  $\Theta$  se mantiene constante tomando un valor aproximado de 20 m/seg, para el caso de un axón de callamar. En los vertebrados, la mielina permite a la fibra nerviosa tener un buen aislamiento eléctrico alrededor del axón. La membrana eléctrica está en contacto efectivo con el líquido externo solamente a nivel de los nodos de Ranvier. Se ha comprobado que el flujo de corriente se hace desde un nodo de Ranvier hacia el siguiente. En consecuencia, los impulsos saltan a lo largo de la fibra de un nodo a otro, lo que se conoce como conducción saltatoria. Una consecuencia de la conducción saltatoria es que la velocidad de propagación es mayor.

Inmediatamente después de ocurrido un potencial de acción hay un tiempo en que la fibra no es capaz de producir un segundo potencial de acción, aunque se aumente la magnitud del estímulo aplicado. Este intervalo se llama período refractario absoluto. Este es seguido por un período refractario relativo que

es de duración mayor, durante el cual se requiere de un estímulo mayor (por encima del valor umbral normal) para producir un potencial de acción (generalmente de menor amplitud que la normal). La espiga del potencial de acción se alcanza después de 0.5 mseg de que ha sido estimulada la célula.

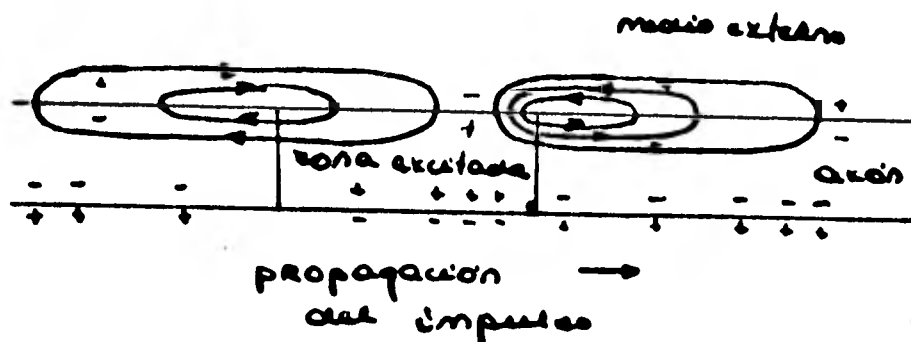
Figura 13. Potencial de Acción.

El potencial de acción se conduce sin decremento a lo largo de la fibra nerviosa.



El hecho de que durante el potencial de acción se invierta la polaridad eléctrica de la membrana, permite comprender la forma en que se produce la propagación del estado excitatorio. En efecto, entre la zona excitada (con polaridad invertida) y la zona de reposo con polaridad normal, se producirá la circulación de corriente eléctrica y esta corriente, que es saliente, estimulará a dicha zona (figura 14).

Figura 14. Dirección de propagación de un impulso nervioso.



La resistencia del medio interno ( $r_i = R_i / \pi a^2$ ) varía proporcionalmente a  $1/a^2$ . (a es el radio de la fibra nerviosa), mientras que la capacidad ( $c_m = 2\pi a C_m$ ) es directamente proporcional a "a", es decir, al aumentar el diámetro del axón, la resistencia interna cae mucho más rápidamente que lo que aumenta la capacidad de la membrana; por consiguiente, un circuito local dado es capaz de depolarizar regiones del axón cada vez más alejadas de la región activa, es decir, en cuanto mayor sea el diámetro de la fibra, mayor será la velocidad de conducción.

La diferencia de potencial a través de la membrana se mantiene por el consumo de energía metabólica disponible de la célula. Si se impide a la célula renovar o utilizar sus provisiones de energía, la diferencia de potencial se reduce gradualmente a cero. En el estado de reposo, las concentraciones de sodio y potasio a ambos lados de la membrana son distintas. La membrana es poco permeable a los iones potasio, y mucho menos permeable a los iones sodio. (Hay presentes otros iones, pero parece que éstos desempeñan un papel de menor importancia en el comportamiento eléctrico de los nervios). Hay más iones potasio

dentro que fuera de la membrana; su tendencia a difundirse hacia afuera a través de la membrana bajo la acción del gradiente de concentración es contrarrestada por el campo eléctrico creado a través de ella. Por el contrario, en el caso del sodio, hay más iones fuera que dentro, y cabría esperar una difusión neta hacia adentro bajo la acción conjunta del gradiente de concentración y del campo. Los iones intentan hacerlo, pero son expulsados de nuevo por un proceso que exige energía denominado transporte activo. Hay pruebas firmes de que este proceso implica una reacción acoplada en el cual los iones de potasio son transportados hacia dentro cuando los de sodio son expulsados hacia afuera. La inhibición del mecanismo no sólo impide el mantenimiento del correcto equilibrio del sodio, sino que produce también un cambio en las concentraciones de potasio; y la eliminación de los iones potasio del líquido extracelular hace cesar la expulsión de iones de sodio.

Las neuronas obtienen su energía metabólica a partir del ATP (trifosfato de adenosina), liberándose la energía al separarse uno o dos de los grupos fosfato. Una enzima que se encuentra en la membrana, separa uno de los grupos del ATP. El equilibrio dinámico conseguido en el axón en reposo, entre el mecanismo de transporte activo, y los procesos de difusión normal, produce un ligero exceso de carga negativa dentro de la membrana celular. La diferencia de potencial resultante sólo se altera lentamente con el tiempo si se inhibe el transporte activo. La inhibición puede conseguirse inyectando dentro de la célula una sustancia que bloquee la producción de ATP. Lo que modifica notablemente el ritmo de trabajo del mecanismo de trans-

porte activo es una inyección rápida de iones sodio en el líquido interior de la membrana.

#### 1.4 ORIGENES DE LOS POTENCIALES DE MEMBRANA.

Desde 1935, los trabajos de Teorell, Meyer y Sievers han servido de base a diversas teorías que tratan sobre los potenciales de membranas cargadas; estos investigadores han obtenido expresiones matemáticas para el potencial a través de la membrana (intercambiadora de cationes), por medio de la integración de la ecuación de Nernst-Planck (sección 1.4.2) y con la ayuda de las ecuaciones de equilibrio de Donnan (sección 1.4.1) (41). Para la gran mayoría de los tratamientos teóricos de los fenómenos ocurridos en la membrana, se emplean variables y funciones termodinámicas de la Termodinámica de Procesos Irreversibles (25).

La diferencia de potencial energético total por mol de ión es llamado potencial electroquímico y es la suma de las diferencias energéticas de concentración y eléctrica a través de la membrana para ese ión. En la siguiente sección analizaré qué es un potencial electroquímico.

#### 1.4.1 POTENCIAL ELECTROQUIMICO.

Supongamos que tenemos un sistema aislado, descrito por cierto conjunto de variables:  $U$  (energía interna),  $S$  (entropía),  $V$  (volumen),  $T$  (temperatura),  $n_1, \dots, n_r$  (número de moles  $n = m/M$ , donde  $m$  representa la masa y  $M$  el peso molecular). Nos interesa saber, cuál será el cambio en la energía de dicho sistema al introducir en él,  $dn_i$  moles de la  $i$ -ésima componente, manteniendo el volumen  $V$  y las restantes  $n_{j \neq i}$  constantes.

Figura



Unimos al sistema (1), " $r$ " pequeños subsistemas, también aislados, que contendrán " $r$ " distintas sustancias, con  $dn_i$  moles de sustancia pura en cada uno, de tal manera que el sistema (1) y estos subsistemas queden separados sólo por una membrana permeable (selectiva a la componente  $n_i$ ). Además, cada subsistema consta de un pistón que se utiliza para introducir las  $dn_i$  moles en el sistema (1).

Introduciendo una por una las " $r$ " sustancias. Analizando lo que sucedería si tuviéramos una de ellas,  $n_i$ .

Cada sistema (1 y 2) tiene sus propiedades termodinámicas bien definidas. La energía total de todo el sistema será la suma de las energías de cada uno de ellos. Por lo que introduciremos

la hipótesis de aditividad de U.

$$U_{1+2} = U_1 + U_2$$

Llamaremos  $u_i = U_i/n_i$ ,  $v_i = V_i/n_i$  y  $s_i = S_i/n_i$  a la energía vo lumen y entropía molares de la sustancia i.

Durante la inyección:

$$dU_i^{(a)} = dW = p v_i dn_i = p dv$$

$$dU_i^{(r)} = u_i dn_i + p v_i dn_i = (u_i + p v_i) dn_i$$

$$dU^{(r)} = \sum_{i=1}^r (u_i + p v_i) dn_i$$

Cuando el sistema no está aislado de sus alrededores, se toma en cuenta el término de energía transferida en forma de calor y el trabajo total realizado (pdV, Hdm, etc.), por lo tanto:

$$dU = dQ + dW + \sum_{i=1}^r (u_i + p v_i) dn_i$$

(Primera ley de la termodinámica para sistemas abiertos - única mente válida en sistemas que satisfacen la aditividad para sus variables extensivas).

El cambio en la entropía, al introducir  $dn_i$  moles de la sustan cia i,  $S_T = S_1 + S_2$   $s_1 = S_1/n_1$   $dS_2 = s_1 dn_1$

Durante un proceso adiabático, el cambio en la entropía para este proceso es cero:  $dS_2 = 0$  y el cambio total en la entropía será únicamente:  $dS_2$ .

Para las "r" componentes:

$$dS_2 = \sum_{i=1}^r s_i dn_i$$

Al permitir intercambio de energía en forma de calor, el incremento total de entropía es el cambio en la entropía debido al intercambio de energía más el cambio de entropía por la introducción de la componente  $i$ :

$$dS = \frac{dQ_{rev}}{T} + \sum_{i=1}^r s_i dn_i$$

(Segunda ley de la termodinámica para sistemas abiertos).

$$\therefore dQ_{rev} = TdS - \sum_{i=1}^r s_i dn_i$$

Al considerar sólo trabajo  $p dV$  e introduciendo la ecuación que representa la segunda ley para sistemas abiertos en la ecuación para la primera ley, tenemos:

$$du = Tds - p dV + \sum_{i=1}^r (\mu_i + p_i v_i - T s_i) dn_i$$

siendo el cambio de energía para sistemas abiertos.

La generalización de la ecuación fundamental de la termodinámica es:

$$du = Tds - p dV + \sum_j \mu_j dn_j$$

donde

$$\mu_j = \left( \frac{\partial U}{\partial n_j} \right)_{V, S, n_{i \neq j}}$$

Al definir:

$$\mu_i = \mu_i + p_i v_i - T s_i$$

si se define la función de energía libre de Gibbs como:

$$G = U - TS + pV$$

y comparándola con la ecuación anterior, vemos que el coeficiente  $\mu_i$  no es otra cosa más que el potencial de Gibbs por mol de la especie  $i$ .

$$\mu_i = \frac{G_i}{n_i},$$

llamado potencial químico.



Puesto que:

$$G = \sum_i \mu_i dn_i = U + pV - TS$$

y

$$dG = \sum_i \mu_i dn_i + \sum_i n_i d\mu_i$$

$$dG = du + p dV + V dp - T ds - S dT$$

y como:

$$du = T ds - p dV + \sum_i \mu_i dn_i$$

igualando las ecuaciones:

$$dG = T ds - p dV + \sum_i \mu_i dn_i + p dV + V dp - T ds - S dT$$

$$dG = \sum_i \mu_i dn_i + \sum_i n_i d\mu_i$$

obtenemos:

$$\sum_i n_i d\mu_i = V dp - S dT$$

(ecuación de Gibbs-Duhem) siendo la ecuación fundamental para sistemas abiertos.

Utilizando el teorema de Euler, se demuestra que:

$$\mu_i = \left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T, p, n_j \neq i}$$

llamado potencial electroquímico.

Se define la fugacidad parcial del componente i en la mezcla,

como:  $\ln f_i = \frac{1}{RT} d\mu_i$  (1.4.2)

donde R (=PV/nT) es la constante universal de los gases (8.31 joules/°K mol), T es la temperatura absoluta.

La actividad  $a_i$  de un ión o fugacidad relativa a un sistema standard se define como:

$$a_i = \frac{f_i}{f_i^{\circ}}$$

donde  $f_i$  es la fugacidad del ión,  $f_i^{\circ}$  es la fugacidad de la sustancia en un estado standard.

La actividad ( $a_i$ ) el ión i está relacionada con la concentración de dicho ión en la solución por medio de un coeficiente de actividad

$$a_i = \gamma_i c_i$$

donde  $c_i$  es la concentración molar del ión  $i$  (moles por litro de solución).

De la ecuación (1.4.2):

$$du_i = RT \ln f_i$$

integrando:  $RT \ln \frac{f_i}{f_i^{(0)}} = \mu_i - \mu_i^{(0)}$  (1.4.3)

donde  $\mu_i^{(0)}$  es el potencial químico de referencia del sistema.

Introduciendo la ecuación (1.4.3) tenemos:

$$\mu_i - \mu_i^{(0)} = RT \ln a_i$$

$$\mu_i - \mu_i^{(0)} = RT \ln \gamma_i c_i$$

El valor del potencial químico es completamente arbitrario, por lo que se ha aceptado un patrón arbitrario, para ello haremos referencia al concepto de fracción molar de una sustancia A, como la fracción de fase compuesta por esta sustancia. Es evidente que cuando una fase está constituida por una única sustancia pura, su fracción molar es igual a la unidad. El potencial químico de esa sustancia pura, es el patrón arbitrario que toman los termodinámicos para medir el potencial de la misma sustancia en solución. Este potencial químico patrón se representa por medio de  $\mu_i^{(0)}$ .

#### 1.4.2 INTEGRACION DE LAS ECUACIONES DE FLUJO

Estudiando las membranas en el año de 1943, Goldman dedujo una serie de ecuaciones que relacionan el flujo a través de la membrana y la diferencia de potencial eléctrico entre sus dos caras, con las concentraciones iónicas en las interfases (25).

Estudió dos casos:

- a) Membranas con carga fija.
- b) Membranas sin carga fija.

Para el caso a), Goldman obtuvo ecuaciones bastante complicadas, mientras que para el caso b), éstas son sencillas por lo que los electrofisiólogos las adaptaron para sus estudios.

Las ecuaciones de Goldman son conocidas como las ecuaciones de "campo constante", pues una de las suposiciones empleadas, es el tomar como constante el campo eléctrico dentro de la membrana, es decir:

$$\nabla E = 0$$

en una dimensión:  $\frac{d\bar{E}}{dx} = 0$

$$V_m = \frac{\Delta V}{\delta} x \quad 0 \leq x \leq \delta$$

i.e., el potencial varía linealmente dentro de la membrana. ( $\bar{E}$  es el campo eléctrico dentro de la membrana;  $V_m$  es el potencial eléctrico a través de la misma,  $V$  es la diferencia de potencial).

Goldman, en su análisis, parte de la ecuación de Nernst-Planck para el caso unidimensional:

$$J_i = - D_i \left\{ \frac{dc_i}{dx} + \frac{z_i}{RT} c_i \frac{dV_m}{dx} \right\}$$

Si suponemos que las movilidades iónicas son constantes y que el sistema se encuentra en un estado estacionario, tenemos:

$$\frac{\partial J_i}{\partial x} = \frac{\partial J_i}{\partial t} = 0$$

Empleando la suposición de campo constante, y como el gradiente negativo del potencial es igual al campo eléctrico:

$$E = -\frac{\partial V_m}{\partial x}$$

Sustituyendo:

$$J_i = -D_i \left( \frac{d(c_i)}{dx} + \frac{z_i}{RT} (c_i) \frac{dV_m}{dx} \right)$$

$$J_i = -D_i \left( \frac{d(c_i)}{dx} - \frac{z_i}{RT} (c_i) E \right)$$

$$\frac{J_i}{-D_i} = \frac{dc_i}{dx} - \frac{z_i}{RT} (c_i) E$$

Para poder integrar esta ecuación, multiplicamos por el factor,

$$\exp \left\{ -\int_0^+ \frac{z_i}{RT} E dx \right\} = \exp \left\{ -\frac{z_i}{RT} E x \right\}$$

ambos miembros:

$$\frac{J_i}{-D_i} \exp \frac{-z_i E x}{RT} = \left( \exp \frac{-z_i E x}{RT} \right) \frac{d(c_i)}{dx} + \frac{z_i}{RT} (-E) x (c_i) \exp \frac{-z_i E x}{RT}$$

$$\frac{J_i}{-D_i} \int_0^{\delta} \exp \frac{-z_i E x}{RT} dx = \left[ \frac{\delta(c_i)_i}{\delta(c_i)_0} \exp \frac{-z_i E x}{RT} (c_i) \right]$$

donde los subíndices indican, i, para el interior y o para el exterior:

$$\frac{J_i}{-D_i} \left( \frac{-RT}{z_i E} \exp \frac{-z_i E x}{RT} \right) \Big|_0^{\delta} = \exp \frac{-z_i E x}{RT} (c_i) \Big|_0^{\delta}$$

$$\frac{J_i}{D_i} \frac{RT}{z_i E} \left( \exp \frac{-z_i E \delta}{RT} - 1 \right) = \exp \frac{-z_i E \delta}{RT} (c_i)_i - (c_i)_0$$

$$J_i = \frac{D_i z_i E}{RT} \frac{\exp \frac{-z_i E \delta}{RT} (c_i)_i - (c_i)_0}{\exp \frac{-z_i E \delta}{RT} - 1}$$

multiplicamos y dividimos por el factor  $\exp \frac{-z_i E \delta}{RT}$

$$J_i = \frac{D_i z_i E}{RT} \frac{C_{i1} - C_{i0} \exp \frac{z_i E \delta}{RT}}{1 - \exp \frac{z_i E \delta}{RT}}$$

pero:  $E = - \frac{V_m}{\delta}$

$$J_i = \frac{-D_i z_i V_m}{RT \delta} \frac{C_{i1} - C_{i0} \exp \frac{-z_i V_m}{RT}}{1 - \exp \frac{-z_i V_m}{RT}}$$

La relación  $D_i/\delta$  es llamada permeabilidad de la membrana con respecto a una sustancia  $i$  ( $P_i$ ) (cm/seg).  $P_i$  depende solamente de las propiedades específicas de la membrana y de la sustancia. La permeabilidad es una medida de la facilidad con la cual una sustancia puede atravesar la membrana; es decir, cuanto mayor sea la permeabilidad, menor será la fuerza retardante de la fricción ejercida por la membrana sobre  $i$ .

$$P_i = \frac{D_i}{\delta} = \frac{u_i RT}{\delta}$$

donde  $D_i$  es el coeficiente de difusión y  $T$  es la temperatura absoluta,  $R$  es la constante universal de los gases,  $\delta$  es el grosor de la membrana y  $Z_i$  es la valencia del ión  $i$ .

La ecuación de flujo se puede expresar como:

$$J_i = \frac{-P_i z_i V_m}{RT} \frac{C_{i1} - C_{i0} \exp \frac{-z_i V_m}{RT}}{1 - \exp \frac{-z_i V_m}{RT}}$$

llamada ecuación de flujo de Goldman-Hodgkin y Katz.

Estudiemos como ejemplo una membrana de neurona, ésta se encuentra entre dos medios de diferentes concentraciones ióni

cas de sodio, potasio y cloro (tabla 1); calcularemos en lo sucesivo: Flujo, permeabilidad, potenciales electroquímicos, etc., de esos iones, pues son los que más nos interesan.

Para el potasio, tenemos  $z_K = +1$ :

$$J_K = \frac{-P_K \bar{\gamma} V_m}{RT} \frac{[K]_i - [K]_o \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}}{1 - \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}}$$

De manera análoga para el sodio; para el cloro,  $z_{Cl} = -1$ , la ecuación de flujo:

$$J_{Cl} = P_{Cl} \frac{\bar{\gamma} V_m}{RT} \frac{[Cl]_i - [Cl]_o \exp \frac{\bar{\gamma} V_m}{RT}}{1 - \exp \frac{\bar{\gamma} V_m}{RT}}$$

Suponemos que la corriente total que atraviesa la membrana es cero, i.e. nos estamos refiriendo a un estado estacionario:

$$J_K + J_{Na} + J_{Cl} = 0$$

Efectuando la suma:

$$\begin{aligned} & -P_K \frac{\bar{\gamma} V_m}{RT} \frac{[K]_i - [K]_o \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}}{1 - \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}} - P_{Na} \frac{\bar{\gamma} V_m}{RT} \frac{[Na]_i - [Na]_o \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}}{1 - \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}} \\ & + P_{Cl} \frac{\bar{\gamma} V_m}{RT} \frac{[Cl]_o - [Cl]_i \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}}{\exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}} = 0 \\ & -P_K \frac{\bar{\gamma} V_m}{RT} \frac{[K]_i - [K]_o \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}}{1 - \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}} - P_{Na} \frac{\bar{\gamma} V_m}{RT} \frac{[Na]_i - [Na]_o \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}}{1 - \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}} \\ & + P_{Cl} \frac{\bar{\gamma} V_m}{RT} \frac{[Cl]_o - [Cl]_i \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}}{\exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}} = 0 \\ & -P_K \frac{\bar{\gamma} V_m}{RT} \frac{[K]_i - [K]_o \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}}{1 - \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}} - P_{Na} \frac{\bar{\gamma} V_m}{RT} \frac{[Na]_i - [Na]_o \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}}{1 - \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}} \\ & - P_{Cl} \frac{\bar{\gamma} V_m}{RT} \frac{[Cl]_o - [Cl]_i \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}}{1 - \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}} = 0 \\ & P_K ([K]_i - [K]_o \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}) + P_{Na} ([Na]_i - [Na]_o \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}) \\ & + P_{Cl} ([Cl]_o - [Cl]_i \exp \frac{-\bar{\gamma} V_m}{RT}) = 0 \end{aligned}$$

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

$$P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_o = \exp \frac{-\delta V_m}{RT} (P_K [K]_o +$$
$$+ P_{Na} [Na]_o + P_{Cl} [Cl]_i)$$

$$\exp \frac{-\delta V_m}{RT} = \frac{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_o}{P_K [K]_o + P_{Na} [Na]_o + P_{Cl} [Cl]_i}$$

Sacando logaritmos natural llegamos a:

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

Llamada ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz para el potencial, es decir, el potencial de membrana está en función de las permeabilidades y concentraciones externas e internas del sodio, potasio y cloro.

### 1.4.3 ECUACION DE NERNST

En el caso en que hay una sola especie iónica capaz de atravesar la membrana, a través de ésta se desarrolla una diferencia de potencial eléctrico descrita por la ecuación de Nernst. Esta ecuación resulta de la condición de que la especie iónica tenga el mismo potencial electroquímico a cada lado de la membrana, esta condición puede expresarse simbólicamente como:

$$\mu_i^{(o)} + RT \ln (\gamma_i [C_i]_o + z_i \delta V_o) = \mu_i^{(i)} + RT \ln (\gamma_i [C_i]_i + z_i \delta V_i)$$

en donde:  $V_i - V_o = V = \frac{z_i RT}{\delta} \ln \frac{(C_i)_o \gamma_o}{(C_i)_i \gamma_i}$

que se reduce a la ecuación de Nernst, si los coeficientes de actividad son iguales en ambos lados de la membrana:

$$V = \frac{z_i RT}{\delta} \ln \frac{(C_i)_o}{(C_i)_i}$$

Con la ecuación de Nernst se define el potencial de equilibrio de un ión con una distribución dada.

Con las distintas concentraciones de los iones presentes en cada lado de la membrana, dadas en la tabla 1, se calcula el



potencial de equilibrio para cada uno de ellos como:

$$V_K = -75 \text{ mV}$$

$$V_{Na} = 54 \text{ mV}$$

$$V_{Cl} = -65 \text{ mV}$$

$$V_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{20}{400}$$

$$V_{Na} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{440}{50}$$

$$V_{Cl} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{40}{560}$$

$$T = 293^\circ\text{K} = 20^\circ\text{C}$$

Observamos que el valor de  $V_K$  es cercano al de  $V_r$ , i.e., el gradiente de concentración para el  $K^+$  es ampliamente contrarrestado por el gradiente de voltaje de la membrana, es decir, que se necesita escasa energía para transportar 1 mol de  $K^+$  a través de la membrana.

En el caso de  $V_{Cl}$ , éste tiene un valor semejante al de  $V_r$ , es decir, la distribución de iones  $Cl^-$  se halla en equilibrio con el voltaje de membrana. Los iones  $Cl^-$  poseen carga negativa, de modo que el campo eléctrico de la membrana conduce hacia fuera a estos iones y la célula mantiene así una concentración interna baja.

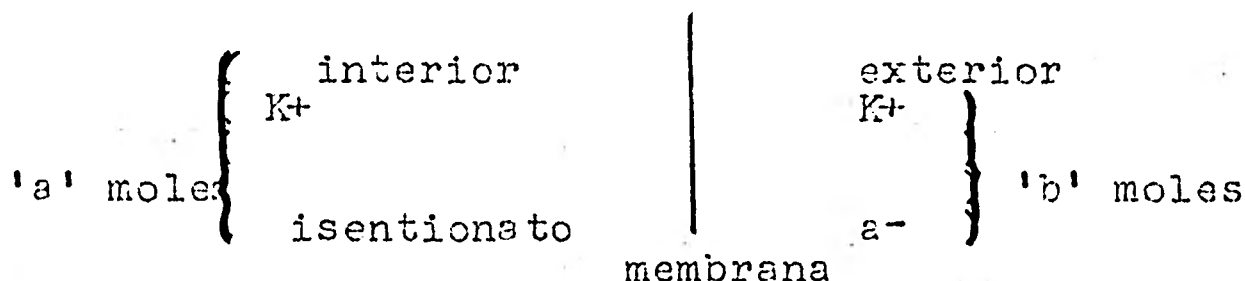
El  $V_{Na}$  es un caso especial. Tanto las altas concentraciones externas de  $Na^+$  como las bajas del interior de la célula están fuera de equilibrio con el voltaje de membrana. En este caso, tanto el gradiente de concentración como el de voltaje actúan transportando el  $Na^+$  hacia el interior de la célula, por lo que se requiere de otro mecanismo para balancear los flujos, es decir, es necesario postular otra fuerza para extraer  $Na^+$  de la célula con el mismo ritmo con que ingresa en forma pasiva en la célula (transporte activo o bomba de  $Na^+$ ).

(El término "transporte activo" da a entender que el proceso de transporte requiere un abastecimiento continuo de energía).

#### 1.4.4 EQUILIBRIO DE GIBBS-DONNAN

Si dos soluciones están separadas por una membrana y algunos iones no son permeables a ella, se establecen diferencias de potencial, de presión osmótica, y de concentraciones iónicas entre las dos soluciones.

Figura 15. Membrana permeable a  $K^+$  y  $Cl^-$  (20).



Así los iones  $K^+$  y  $Cl^-$  atravesarán la membrana hasta alcanzar un estado de equilibrio dinámico. Si el isentionato que se encuentra en el interior no puede atravesar la membrana, una cantidad equivalente del catión potasio queda retenida dentro de la célula debido a la fuerza electrostática. (Figura 15).

Supongamos que  $x$  moles de  $KCl$  difunden a través de la membrana quedarán  $(b + x)$  moles en el exterior. El movimiento general de iones que difunden continuará hasta que el número de iones que se acerque a la membrana desde el exterior esté equilibrado por el número de iones que se acerquen desde el interior durante un tiempo dado, en otras palabras, hasta que los potenciales electroquímicos de ambos lados se igualen, es

decir, los iones que difunden están en equilibrio dinámico:

$$\mu_k^i + \mu_{cl}^i = \mu_k^o + \mu_{cl}^o$$

i.e.:

	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	:	K <sup>+</sup>	Isentio nato	Cl <sup>-</sup>	concentración ini- cial
	a	a	:	b	b	o	←
interior	a-x	a-x	:	b+x	b	x	← concentración du- exterior ante el equilibrio diná- mico.

$$\mu_k^{(o)} + RT \ln (a-x)_{K^+} + \mu_{cl}^{(o)} + RT \ln (a-x)_{Cl^-} = \mu_k^o + RT \ln (b+x)_{K^+} + \mu_{cl}^o + RT \ln (x)_{Cl^-}$$

$$(a-x)(a-x) = (b+x) x$$

$$a^2 - 2ax + x^2 = bx + x^2$$

$$a^2 - 2ax - bx = 0$$

$$x(-2a - b) = -a^2$$

$$x = \frac{-a^2}{-2a - b} = \frac{a^2}{2a + b}$$

La fracción x/a representa el KCl inicial que se difunde a través de la membrana hacia la solución que contiene el anión impermeable (sentionato).

Al sustituir en la ecuación de Nernst, la cantidad de iones que difunden obtendremos un valor del potencial eléctrico a través de la membrana:

$$V_m = \frac{RT}{z} \ln \frac{(K)_o}{(K)_i} = - \frac{RT}{z} \ln \frac{(Cl)_o}{(Cl)_i}$$

#### 1.4.5 LEY DE OHM PARA LOS ELECTROLITOS

El paso de corriente eléctrica a través de disoluciones de sales y de ácidos va acompañada del desprendimiento de las partes componentes de algunas sustancias en los electrodos que se encuentran insertos líquidos. Esta clase de conductores que se disocian al pasar por ellos una corriente eléc

trica se denominan electrolitos, y su conducción, conducción electrolítica.

La conducción electrolítica es debida a la existencia de iones en la solución, es decir, de átomos o moléculas cargados. El movimiento de los iones bajo la acción de un campo eléctrico crea una corriente eléctrica en el electrolito.

La densidad de corriente  $I$  ( $\text{mA}/\text{cm}^2$ ) se define como la cantidad de carga (en Coulombs) que fluye por una sección transversal en un segundo por  $\text{cm}^2$ . En un electrolito, la corriente es la suma de las corrientes transportadas por cada especie iónica.

La densidad de corriente está asociada con la densidad de flujo por medio de la ecuación:

$$I_i = z_i \gamma J_i$$

$I = \sum_i I_i$ , es decir, la densidad de corriente total es la suma de las densidades de corrientes para cada ión.

Tomando la ecuación de flujo de Nernst-Planck para el caso en que la concentración sea constante, tenemos:

$$\frac{dc_i}{dx} = 0$$

$$J_i = - u_i c_i z_i \gamma \frac{d}{dx} V$$

pero:

$$\bar{E} = - \frac{dV}{dx}$$

por lo que:  $J_i = z_i u_i c_i \mathcal{F} \bar{E}$

La densidad de corriente eléctrica para cada ión resulta:

$$I_i = \bar{E} \mathcal{F}^2 u_i c_i z_i^2 = g_i \bar{E}$$

Resumiendo, la densidad de corriente es proporcional al flujo (a la velocidad y a la concentración de los iones). La velocidad iónica es proporcional al campo eléctrico y éste es proporcional al voltaje aplicado. De esta manera, el flujo de corriente es proporcional al voltaje aplicado. Esta es la ley de Ohm.

$$g_i = \mathcal{F}^2 u_i c_i z_i^2$$

con ella se puede calcular la conductividad debida a cada ión.

Para calcular la conductividad total se toma:

$$\sum g_i = g$$

Se define el número de transporte del ión  $t_i$  como:

$$t_i = \frac{g_i}{g} = \frac{\mathcal{F}^2 u_i c_i z_i^2}{\sum_i \mathcal{F}^2 u_i c_i z_i^2}$$

que representa la fracción de la corriente eléctrica acarreada por cada tipo de iones.

La conductancia de un sistema es el recíproco de la resistencia:

Reemplazando en la ley de Ohm:  $RI = V$        $I = gV$

Si  $g$  es una constante, la curva de corriente contra voltaje es una recta. Estas ecuaciones las podemos aplicar al comportamiento de una fibra nerviosa excitable.

#### 1.4.6 FLUJOS IONICOS

La fuerza eléctrica también afecta la velocidad con la cual se mueven los iones al atravesar una membrana o solución. Para una sustancia no cargada en una solución en reposo, la única fuerza pasiva que puede determinar un movimiento neto del soluto es su gradiente de concentración. Si las partículas están cargadas eléctricamente, su difusión puede también estar influenciada por fuerzas eléctricas, a su inversa, la difusión de estas partículas cargadas puede generar una diferencia de potencial. Por lo tanto, los gradientes de voltaje y de concentración generan fuerzas sobre partículas cargadas en una solución.

En una solución, donde la concentración de una sustancia varía de una región a otra (y no hay diferencia de potencial), se observa un movimiento de partículas (flujo:  $J$ ) desde la región de mayor concentración hacia otra donde ella es más baja.

Cada ión tiene un coeficiente de difusión dado como:  $D_i = RTu_i$  donde  $R$  es la constante universal de los gases,  $T$  es la temperatura absoluta;  $u_i = (v)/(F)$  es la movilidad mecánica del ión  $i$  (velocidad por unidad de fuerza); y  $D_i$  es el coeficiente de difusión para cada ión  $i$ , llamado coeficiente de Einstein.

La movilidad de cada ión depende de su capa de hidratación, entre mayor sea la capa de hidratación, menor será su capacidad

de movimiento; a continuación se presenta una tabla (tabla 3), de los radios de los iones hidratados.

Tabla 3. Radio de iones hidratados.

<u>ION</u>	<u>RADIO CRISTALINO DEL ION SIN HIDRATAR (A)</u>	<u>RADIO DEL ION HIDRATADO (A)</u>	<u>NUMERO PROMEDIO DE MOLECULAS DE H<sub>2</sub>O ADHERIDAS AL ION</u>
K <sup>+</sup>	1.33	3.8	5.4
Na <sup>+</sup>	0.98	5.6	8.0
Cl <sup>-</sup>	1.80	3.6	4.0

Vemos que entre más pequeño es el ión, tiene una mayor capacidad de que se les adhieran moléculas de agua y por lo tanto mayor es su capa de hidratación (tabla 3). La velocidad de penetración de un ión a través de la membrana depende de las propiedades de la misma y de los gradientes de concentración del ión con respecto a la membrana.

$$J_i = - D_i \text{ grad } c_i = -D_i \nabla c_i$$

Cuando las partículas de la solución están cargadas y en ausencia de presión hidrostática, el flujo será:

$$J_i = -D_i \left( \nabla c_i + \frac{c_i z_i \bar{v}}{RT} \nabla V_m \right)$$

Si trabajamos sólo en una dimensión i.e., si consideramos una membrana plana, con grosor  $\delta$ , orientada perpendicularmente al eje  $x$ , en  $x = 0$  y  $x = \delta$ , tenemos que el operador gradiente se reduce a  $d/dx$ , por lo que la ecuación del flujo es de la forma:

$$J_i = - RTu_i \frac{dc_i}{dx} - u_i c_i z_i \frac{d}{dx} V_m$$

(ecuación de flujo de Nernst-Planck para el caso unidimensional).

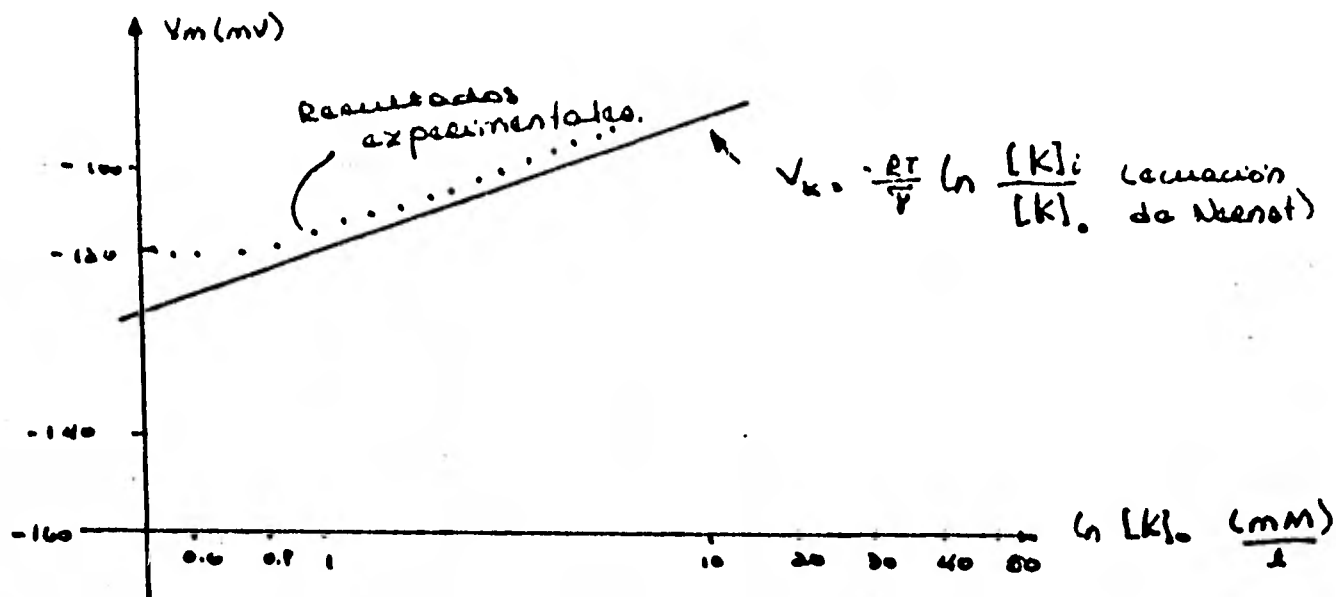
## 1.5 ORIGEN DE LOS POTENCIALES DE LAS FIBRAS NERVIOSAS

### 1.5.1 POTENCIAL DE REPOSO

Cuando se grafica el potencial de reposo de un nervio,  $V_m$ , contra la concentración externa del potasio,  $(K)_o$ ,  $V_m$  vs  $\ln (K)_o$ , se obtiene una gráfica como la que se presenta en la figura 16 (20).



Figura 16. Gráfica de  $V_m$  (potencial de membrana) contra  $\ln (K)_o$ .



donde  $(K)_i$  es la concentración interna del potasio que se mantiene constante y  $(K)_o$  es la externa.

Los puntos llenos indican el potencial de membrana medido para diferentes valores de  $(K^+)_o$ , siendo el último dispuesto en escala logarítmica; la línea gruesa señala la relación entre  $V_K$  y  $(K^+)$  o calculada de acuerdo con la ecuación de Nernst.

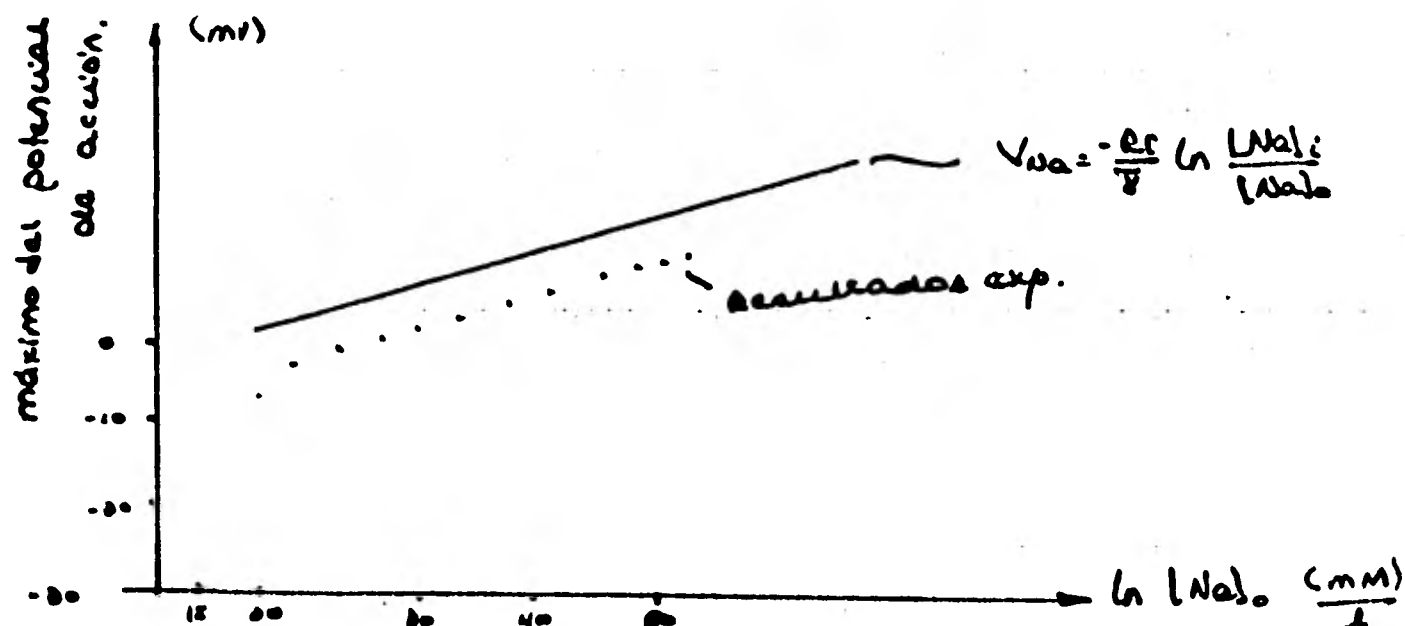
En la figura 16 se observan los efectos de la concentración externa de potasio sobre el potencial de reposo. Un diagrama de  $V_r$  vs  $\ln (K^+)_o$  dará una línea recta con la pendiente de un valor de  $-RT/F$ . En concordancia con esta hipótesis, el potencial de membrana disminuye a medida que la  $(K^+)_o$  aumenta; y cuando la  $(K^+)_o = (K^+)_i$ , el potencial de membrana es cero. El potencial de reposo varía linealmente en concordancia con la ecuación de Nernst. Para valores bajos de la  $(K^+)_o$  (cerca de los valores normales para el líquido extracelular) la curva se desvía de la recta, de forma que incre-

mentos menores de la  $(K^+)_o$  causan cambios menores que los esperados en el potencial. Esta desviación de los valores observados con respecto a los valores calculados refleja el efecto sobre el potencial de otros iones.

### 1.5.2 POTENCIAL DE ACCION.

Una dependencia del potencial de acción de la  $(Na^+)_o$  se encuentra en casi todos los tipos de tejidos excitables. La figura 17 muestra los cambios de amplitud del potencial de acción cuando varía  $(Na^+)_o$ . Para comparación se presenta también el valor del potencial de equilibrio de  $Na^+$  como es calculado a partir de la ecuación de Nernst. Vemos que en el máximo del potencial de acción, el potencial de membrana predicho por la ecuación de Nernst para el caso del sodio, es algo mayor que el potencial de acción, Hodgkin y Katz lo interpretaron, como una evidencia de que las contribuciones de otros iones no son despreciables (20).

Figura 17. Gráfica de  $V_m$  (potencial de membrana) vs  $\ln (Na)_o$



En 1949, Hodgkin y Katz enunciaron por primera vez la idea de que la espiga del potencial de acción en el axón gigante de calamar, es debida a un cambio de permeabilidad selectivo al ión sodio y no podía estar de acuerdo con un cambio general de la permeabilidad a todos los iones, como había sido postulado por Bernstein. Esta hipótesis fué apoyada por los primeros, con el hecho de que la altura de la espiga se comportaba aproximadamente igual que el potencial desarrollado por un electrodo de sodio; es decir, la máxima pendiente de subida dependía estrechamente de los cambios en la concentración del sodio extracelular.

## CAPITULO 2. RESULTADOS EXPERIMENTALES

### 2.1 INTRODUCCION

Algunas propiedades de las membranas fueron descritas por Hodgkin y Huxley en sus clásicos estudios sobre la conducta del axón gigante del calamar; en una serie de estudios, el potencial de membrana se mantenía constante por la técnica denominada fijación de voltaje.

Una propiedad de las células excitables es el incremento de las permeabilidades del sodio ( $P_{Na}$ ) y del potasio ( $P_K$ ) durante una depolarización rápida (reducción del voltaje de la membrana. Esto se observa dentro de ciertos límites, cuanto mayor sea la depolarización mayor serán los incrementos de  $P_{Na}$  y  $P_K$ .

El incremento de la permeabilidad del sodio es transitorio, aun cuando el potencial de membrana se mantenga a un determinado valor. Esta permeabilidad decae en algunos milisegundos. La caída de la permeabilidad del sodio se llama inactivación.

Como se verá con detalle en el capítulo 3, la permeabilidad de las membranas se describen, en el modelo de Hodgkin y Huxley, por medio de las ecuaciones:

$$P_{Na} = \bar{P}_{Na} m^3 h \quad P_K = \bar{P}_K n^4$$

(para un axón de calamar), donde  $P_{Na}$  es la permeabilidad de la membrana al sodio y  $P_K$  es la del potasio.  $\bar{P}_{Na}$  y  $\bar{P}_K$  son las permeabilidades máximas,  $m$  y  $n$  son los factores de activación del sodio y potasio respectivamente y  $h$  es el factor de inactivación del sodio.

Los métodos para estudiar los cambios en la permeabilidad iónica durante la actividad de las células son:

- 1) Observación de los efectos producidos por los cambios de las concentraciones externas e internas sobre el potencial de acción.
- 2) Estudios realizados con radioisótopos en los flujos netos y unidireccionales de los iones durante la actividad.
- 3) Uso de modificadores, drogas, etc.
- 4) Técnica de fijación de voltaje, se mantiene el potencial de membrana constante durante un tiempo que se puede pre-fijar.

Los tres primeros métodos los explicaré a lo largo de este trabajo, no muy detalladamente, incluyéndolos en algunos incisos. La técnica de fijación de voltaje la expondré a continuación ya que hace posible un análisis cuantitativo detallado de las conductancias en el tiempo.

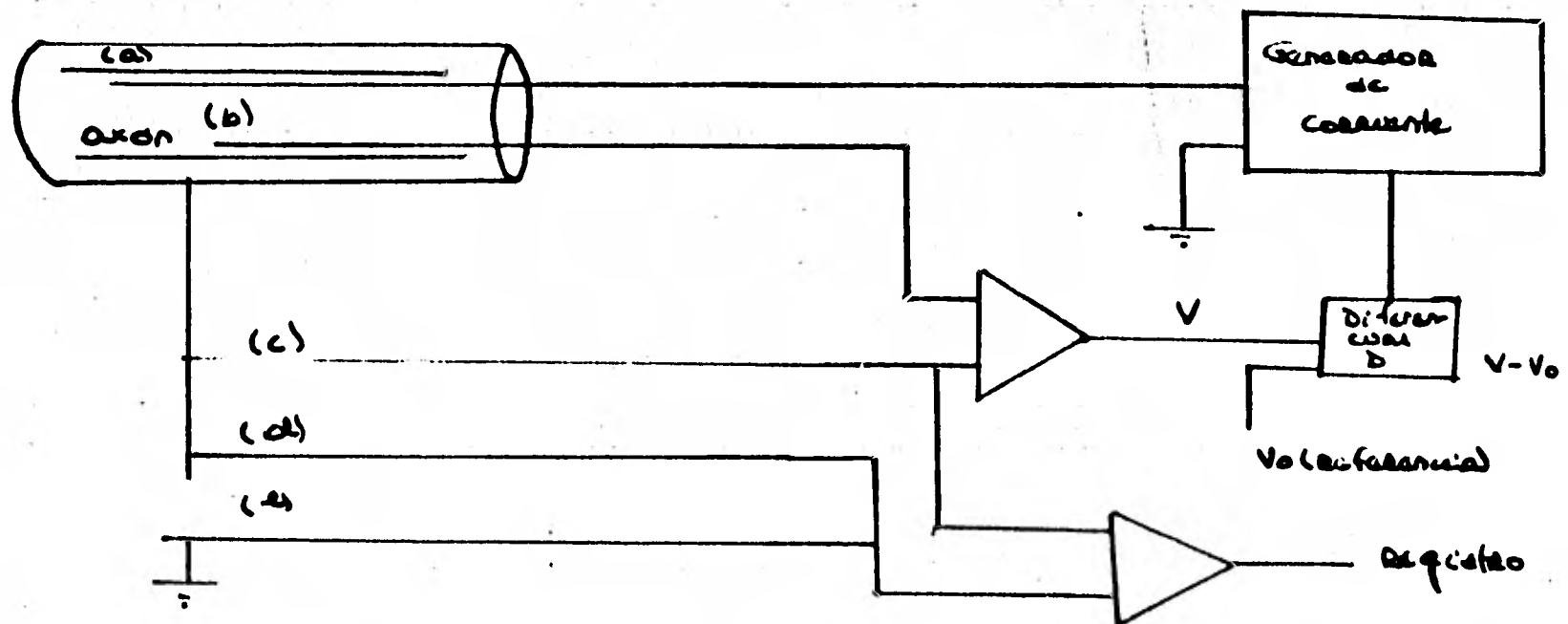
## 2.2 TECNICAS

### 2.2.1 FIJACION DE VOLTAJE

La técnica de fijación de voltaje ha sido de gran utilidad para poder distinguir los efectos que siguen la cinética de los cambios en la permeabilidad de la membrana, de aquellos que siguen la cinética de los campos eléctricos y de las corrientes de la misma. Con esta técnica, la cantidad de corriente que se requiere para mantener  $V_m$  constante es abastecida automáticamente por una fuente exterior (retroalimentador). Este proceso es equivalente a conectar una batería entre el in-

terior y el exterior de la célula, de manera que el potencial de membrana debe ser igual al voltaje de la batería. Si  $V_m$  no está cambiando con el tiempo ( $dV/dt = 0$ ) toda la corriente de la membrana será a través de la misma. Si la fijación de voltaje se hace en un solo punto, como consecuencia de las propiedades de cable del nervio, parte de la corriente abastecida por la fuente exterior se propagará más allá de dicho punto a lo largo del axón. La fijación de voltaje requiere que  $V_m$  se mantenga constante a lo largo de la fibra. Si  $V_m$  no cambia con la distancia, no fluirá corriente alguna de una región a otra, y todas las corrientes aplicadas fluirán normalmente a través de la membrana. En la figura 18 se representa el diagrama esquemático del dispositivo experimental para llevar a cabo la técnica de fijación de voltaje, en un axón de calamar.

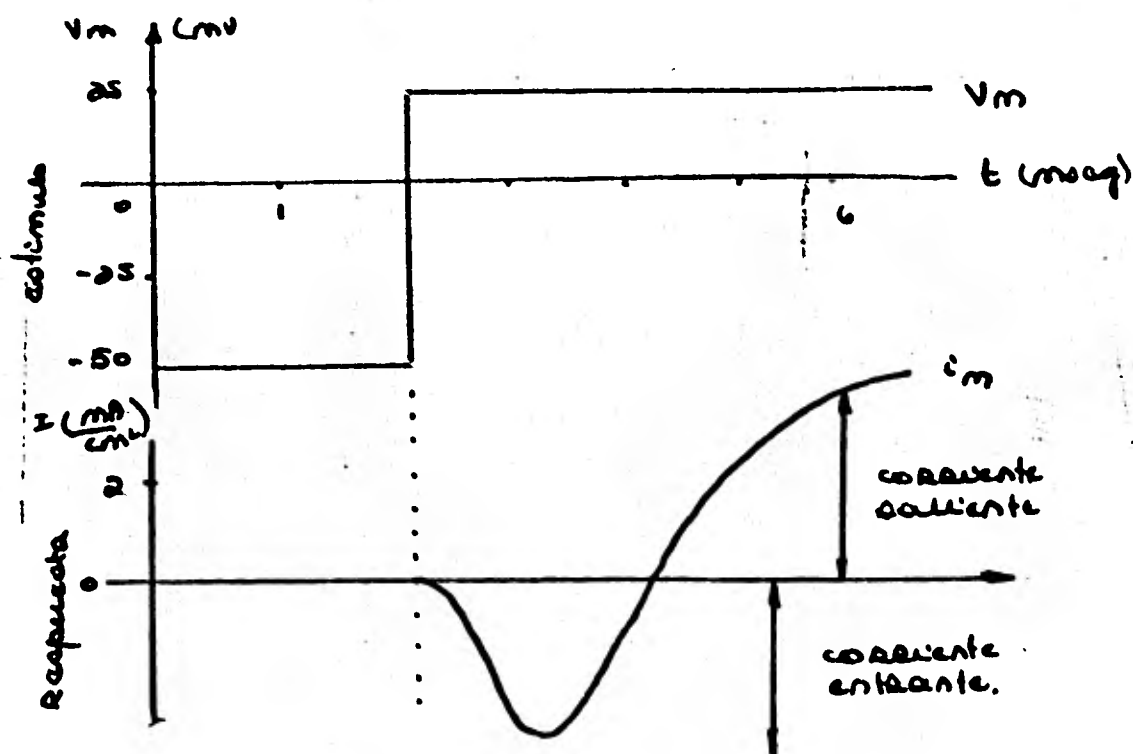
Figura 18. Aparato de fijación de voltaje.



En este esquema, el electrodo (a), inserto en el axoplasma puede inyectar corriente junto con el electrodo (e). Los electrodos (b) y (c) miden el voltaje prefijado. Se trata de reducir al mínimo la señal de error ( $V-V_0$ ) (44).

A continuación se muestra un esquema (figura 19) donde se aplica la técnica de fijación de voltaje (44).

Figura 19. Flujo de corriente observado después de una repentina depolarización de la membrana (de  $-50$  a  $+25$  mV) (20).



La corriente temprana hacia el interior desaparece cuando  $V_m$  toma un valor de aproximadamente 135 mV y después aparece una curva de corriente hacia el exterior. El  $V_m$  puede calcularse mediante mediciones de  $(N_a^+)_{i}$  y  $(N_a^+)_{o}$ . Dichos análisis demuestran que la corriente entrante es la corriente de sodio (altura de la espiga del potencial de acción depende de la concentración extracelular de sodio).

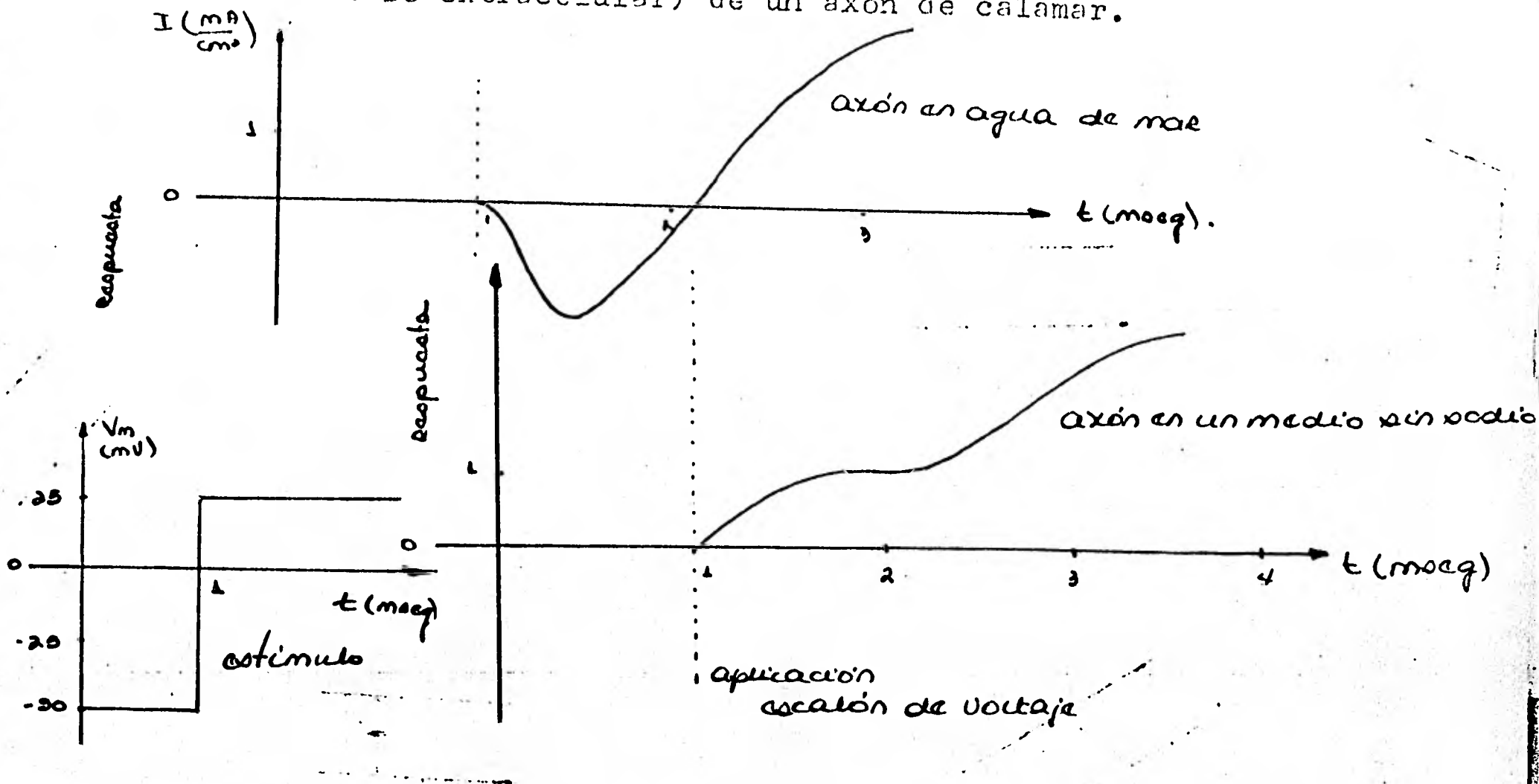
La corriente sostenida tardía hacia afuera parece ser fundamentalmente un flujo de  $K^+$ . No se ha obtenido evidencia directa para esta conclusión porque  $[K^+]_i$  no puede modificarse convenientemente de manera experimental. La membrana debe ser depolarizada para producir esta corriente y tal depolarización tiende a impulsar  $K^+$  hacia el exterior de la célula. Estudios con  $K^+$  radiactivo han demostrado que la depolarización aumenta el flujo de  $K^+$ .

La corriente saliente es la corriente de potasio en base a que la fase máxima de repolarización del potencial de acción aumenta al eliminar el potasio del medio extracelular.

Es posible separar la corriente total de membrana en corrientes de  $Na^+$  ( $I_{Na}$ ) y de  $K^+$  ( $I_K$ ). Si el sodio de la solución externa se sustituye por colina (44), se tiene como resultado que la corriente entrante es eliminada (figura 20).



Figura 20. Gráficas de la corriente de membrana vs tiempo en agua de mar y en una solución que no contiene sodio (como medio extracelular) de un axón de calamar.



La corriente iónica está compuesta principalmente por iones de sodio y de potasio, se puede obtener la corriente de potasio en la siguiente forma:

- 1) Se fija el potencial a una magnitud igual a 56 mV (figuras 21 y 22) (47).
- 2) Se reduce la concentración externa del sodio a un valor tal que se observe la corriente saliente. La corriente de sodio se encontrará en equilibrio por lo que sólo habrá movimiento de potasio.

Figura 21. Flujo de corriente a través de la membrana en función del tiempo después de un brusco cambio de  $V_m$ .

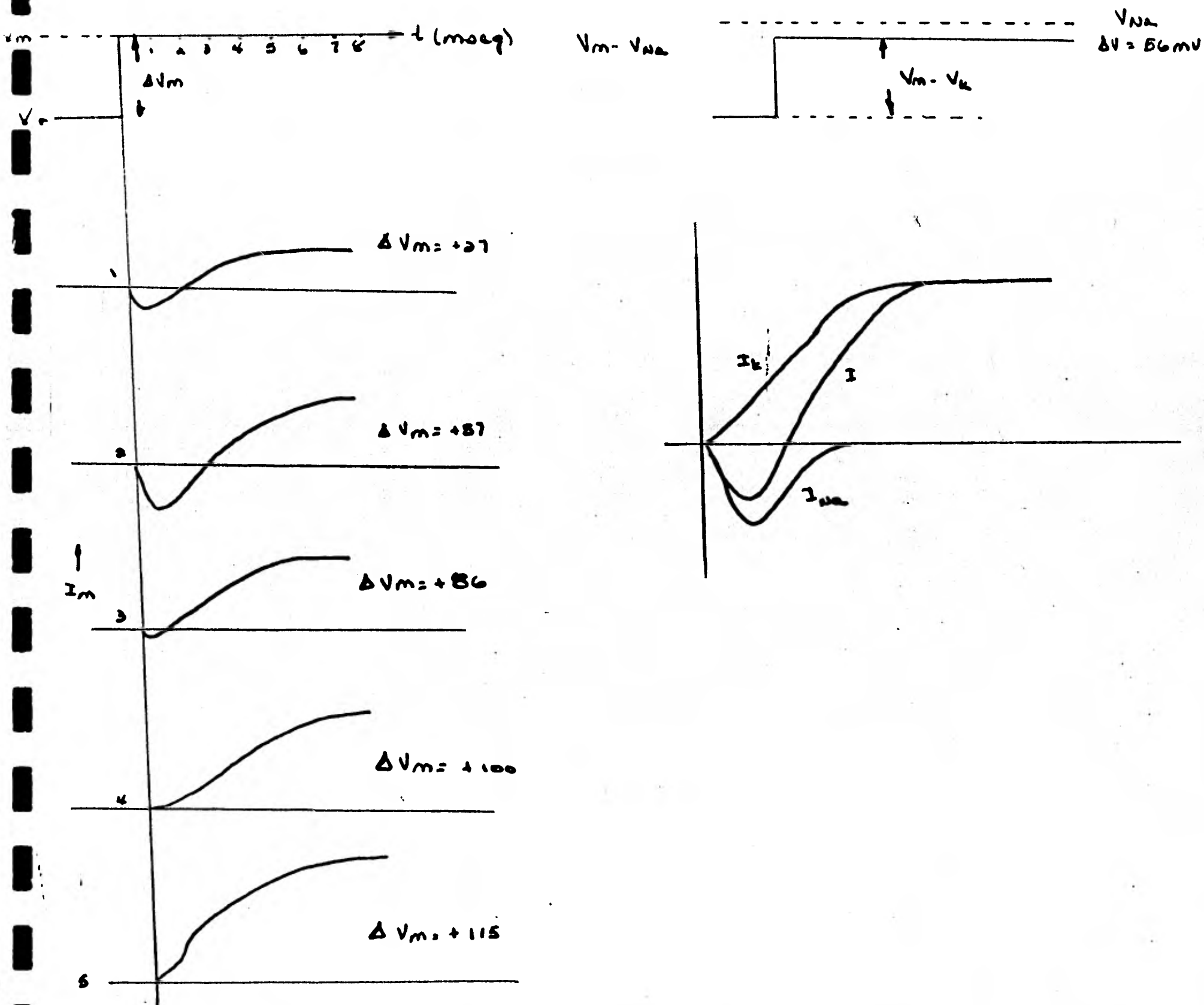


Figura 22.- Gráficas de corriente vs voltaje (47). Curvas de la corriente de potasio (en un axón de calamar en condiciones normales, ver tabla 1).

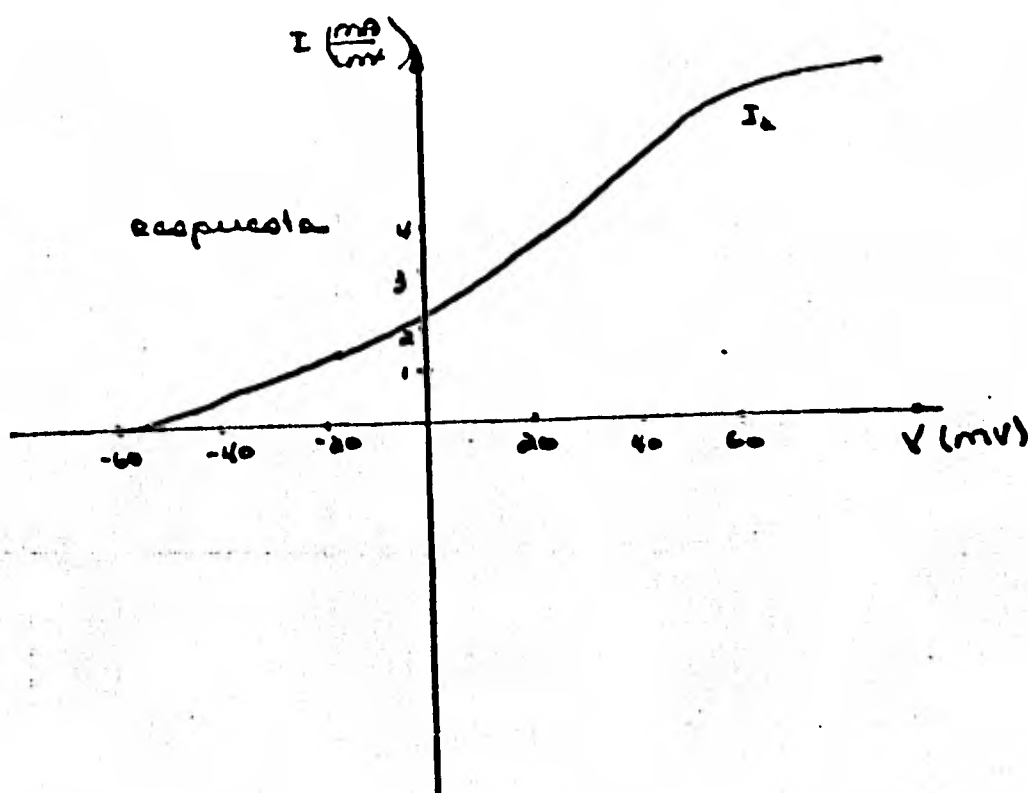
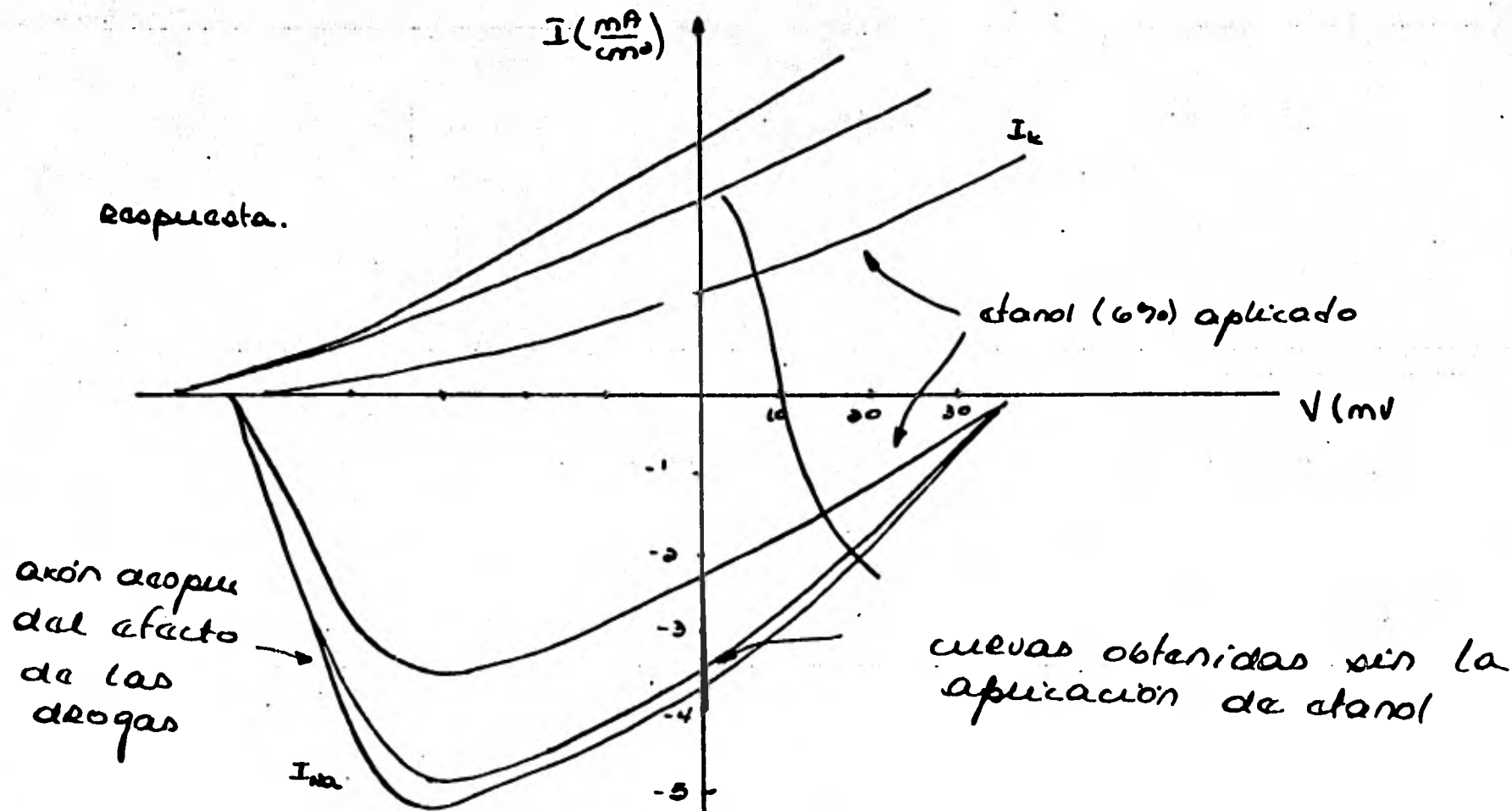


Figura 22. Gráfica de corriente vs voltaje (47). Curva de la corriente de potasio. (Axón de calamar en condiciones normales, ver tabla 1).

### 2.2.2 USO DE MODIFICADORES, DROGAS, ETC.

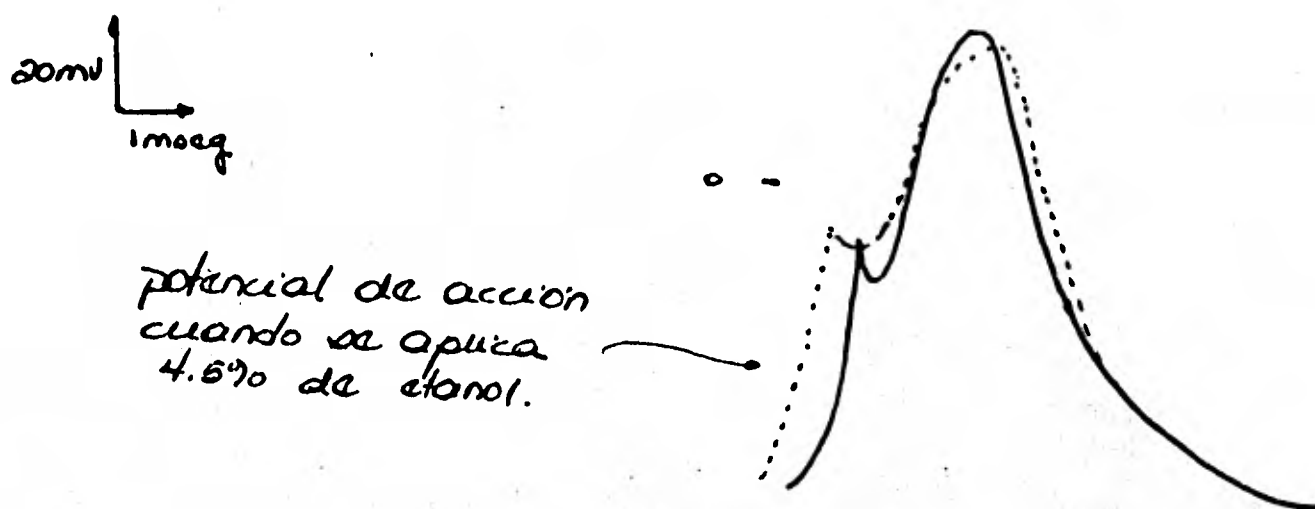
Las curvas (figura 23) (47) obtenidas al graficar corriente contra voltaje son alteradas cuando el axón se tiene bajo el efecto de algunas drogas o por modificación de algunos constituyentes iónicos tanto del medio externo como del axo plasma. También la curva del potencial de acción cambia (figura 24), por ejemplo tenemos cuando el axón se encuentra bajo el efecto de etanol (4,5%).

Figura 23. Curvas de corriente vs voltaje.



La procaína al 0.1% disminuye la actividad de la membrana (sin afectar el potencial de reposo de la misma); se observa que  $I_K$  disminuye ligeramente, mientras que la corriente de sodio es bloqueada casi por completo (47).

Figura 24. Curva del potencial de acción, gráfica de voltaje (mV) contra el tiempo (mseg).



Con muy poca procaína (0.1 mM), aplicada en un axón de calamar puede reducirse la permeabilidad al sodio (7). También se provoca una ligera hiperpolarización de la membrana cuando se agrega a cualquiera de los medios interno y/o externo. Disminuye tanto la corriente de sodio transitoria como la corriente de potasio estacionaria, teniendo mayor efecto sobre esta última, cuando se aplica al medio interno.

Cuando la corriente depolarizante es lenta se produce inactivación (capítulo 3). La aplicación de corriente no es el único método, muchos otros medios pueden ser empleados. Un incremento de la concentración externa de potasio es un

fenómeno que conduce a la depolarización, pero ocasionará un bloqueo de la conducción de un impulso. Lo mismo ocurre cuando se llega a bloquear la actividad de la bomba de sodio-potasio. Los anestésicos locales ocasionan bloqueo por aumento de la inactivación sin producir alteración de  $V_m$ . Si se hiperpolariza la membrana suficientemente, también se bloquea la conducción de impulsos. El bloqueo se produce cuando  $V_m$  se ha hecho tan grande que el flujo de circuito local desde la región hiperpolarizada hasta una región activa cercana es insuficiente para depolarizar la región hiperpolarizada hasta el umbral.

Podemos decir que, el sistema de sodio, es decir, por donde pasa la corriente de sodio es afectado por tetrodotoxina (TTX) y veratridina, sin producir cambios en el potencial de reposo. La TTX impide la corriente transitoria, mientras que la veratridina y el DDT (diclorodifeniltricloreutano) actúa en el factor de inactivación.

Con estos resultados es conveniente considerar que la membrana del axón de calamar tiene sistemas (poros o canales) de sodio y de potasio principalmente. El sistema de sodio se caracteriza por la corriente de sodio y el potasio por la corriente de potasio (capítulo 4). La TTX sólo tapa los canales y la veratridina sólo impide que se cierren los canales de sodio, capítulos 4 y 5.

La saxitoxina actúa como la TTX, cuando se agrega en pequeñas cantidades a la solución externa. La saxitoxina y TTX son utilizadas para estimar el número de canales de sodio por unidad de superficie (con la suposición de que cada molécula bloquea un canal). Levinson (1975) utilizando TTX tritiada, observó que la densidad de los canales era de  $550 \mu\text{m}^{-2}$ .

En los axones de calamar, el tetraetilamonio (TEA) es efectivo sólo cuando se aplica internamente, dando la impresión de que estos iones actúan como válvulas sobre la parte interna de cada canal o poro de potasio (15) por lo que así se elimina casi por completo la corriente de potasio.

Cuando un axón se encuentra en un medio que contiene iones Tris y se perfunde internamente con fluoruro de cesio, las corrientes iónicas principales (la de sodio y potasio) son eliminadas por completo, por lo que se afirma que estos iones son impermeables tanto a los canales de sodio como de potasio.

Un potente bloqueador de los canales de potasio es un derivado de TEA, llamado ión nonitrietilamonio ( $\text{C}_9$ ). Sus radicales estructurales son importantes: El grupo etil alrededor de un nitrógeno cargado tiene un diámetro molecular de aproximadamente  $8 \text{ \AA}$  (este tiene un tamaño mayor que el ión potasio parcialmente hidratado). Si este grupo es sustitui

do por otro metílico, el compuesto resultante (octiltrimetilamonio) no es efectivo como bloqueador de los canales de potasio. El segundo radical es una cadena de nueve carbonos hidrófilos hidratados. Cuando el axón está perfundiéndose internamente con  $C_9$ , la corriente de potasio decae más rápido que cuando lo hace normalmente.

Las enzimas influyen sobre las propiedades de las fibras gigantes de calamar, las enzimas proteolíticas no tienen acción sobre los axones cuando sólo son aplicadas externamente, pero tienen gran efecto cuando son agregadas al líquido interno (25), impidiendo al axón producir potenciales de acción (9). Las lipasas reducen la diferencia de potencial a través de la membrana y la fibra nerviosa pierde su capacidad de excitación (9). La tripsina, cuando es aplicada internamente, el axón pierde su excitabilidad. La enzima fosfolipasa C ataca los fosfolípidos, bloquea irreversiblemente la excitabilidad de la membrana, al ser aplicada tanto interna como externamente, de allí la importancia de los fosfolípidos en la determinación de las propiedades de las membranas celulares (25).



### 2.3 PERMEABILIDADES Y FLUJOS

Cuando un nervio es excitado y se genera un potencial de acción, la permeabilidad de la membrana se modifica (39).

Si a través de la membrana existen diferencias de concentración de una determinada sustancia, se origina una diferencia de potencial electroquímico entre ambos lados de la membrana. Esta diferencia se puede manifestar por el flujo de partículas de esa sustancia, desde el lado en que se halla a mayor concentración hacia el lado en que ésta es menor.

Flujo es el número de moles que atraviesan la membrana por unidad de superficie cada segundo. En estado de reposo, la membrana presenta un eflujo de potasio, cuya magnitud es de  $2 \times 10^{-2}$  moles por  $\text{cm}^2$  para un axón de calamar (44); mientras que el influjo de sodio es aproximadamente de la misma magnitud. Los influjos de calcio (Ca) y cloro (Cl) son de  $1/20$  y  $1/10$  con respecto al sodio. El eflujo de fluór (F) es menor que  $1/10$  comparado con los flujos de los cationes univalentes, de allí que se deduce que la membrana es intercambiadora de cationes (20). Cuando no existe una corriente eléctrica que atraviese la membrana, se tiene: (40)

$$J_K + J_{Na} + 2J_{Ca} = J_{Cl} - J_F = 0$$

Refiriéndonos a la permeabilidad del sodio y del potasio de un axón de calamar, éstas son dependientes del voltaje: La permeabilidad del sodio es menor que la del potasio cuando

la membrana se encuentra en estado de reposo y aumentan rápidamente cuando se depolariza (32). Este aumento de la permeabilidad involucra el movimiento de cargas estructurales de la membrana que cambian de posición como respuesta a una alteración del campo eléctrico de la misma (32).

Los sistemas de sodio y de potasio tienen distinta selectividad iónica, se denomina sistema de sodio (o canales de sodio) al conjunto de regiones con mayor selectividad al sodio que al potasio; y sistemas de potasio (o canales de potasio) al conjunto de regiones selectivas al potasio (25). Se ha encontrado en una membrana no excitada, la permeabilidad relativa en el sistema de sodio es:  $P_{Na}/P_K = 1/20$  (25).

#### 2.4 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA EXCITACION NERVIOSA

Cuando se aíslan fibras nerviosas, la temperatura a la que se encuentra la preparación influye en sus propiedades. Cuando se encuentran en soluciones con temperaturas bajas, es decir, menores de  $-5^{\circ}\text{C}$ , la magnitud del potencial de membrana es pequeño, en valor absoluto y la resistencia de la membrana disminuye; aun cuando a la fibra se le apliquen pulsos depolarizantes, no se observa ninguna respuesta. A temperaturas un poco más altas que la normal, se obtienen potenciales de acción prolongados, estimulados por pulsos supraumbrales (con respecto a las condiciones normales), en los que el potencial sube y baja lentamente. Si la temperatura se hace descender bruscamente, este estímulo es capaz de excitar la fibra nerviosa (43).

El proceso de excitación de las fibras nerviosas se acompaña de un intercambio calórico entre el medio y la neurona. Este intercambio tiene tres fases (25):

- 1) Fase exotérmica: De cinética rápida y coincide con la fase ascendente del potencial de acción.
- 2) Fase endotérmica: También de cinética rápida y coincide con la fase descendente del potencial de acción.
- 3) Fase exotérmica: De cinética lenta (cuya duración es de 300 mseg). Algunos investigadores la asocian con el aumento de metabolismo del nervio.

## 2.5 BOMBA DE SODIO, VOLUMEN CELULAR Y pH INTRACELULAR

Los factores más importantes que afectan los flujos iónicos pasivos ya han sido analizados en las páginas anteriores.

Ahora es necesario recalcar porqué se mantienen las diferencias de concentraciones a través de la membrana.

La bomba de sodio-potasio es la encargada de mantener la distribución desigual iónica de los dos medios que rodean la membrana (tabla 1).

El mecanismo de la bomba de sodio-potasio requiere energía metabólica para transportar  $\text{Na}^+$  hacia el exterior de la célula. Hodgkin y Keynes estudiaron cuidadosamente los desplazamientos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en axones gigantes de calamar. Los datos que aportaron son los siguientes:

- 1) El eflujo de  $\text{Na}^+$  es proporcional a la concentración interna de sodio.
- 2) El eflujo de  $\text{Na}^+$  puede ser disminuído hasta valores próximos a cero, por la adición (en adecuadas concentraciones) de un inhibidor metabólico en el medio de perfusión. Los inhibidores metabólicos son sustancias que bloquean en algún punto el ciclo metabólico (sección 2.3).
- 3) El influjo de  $\text{K}^+$  también se reduce grandemente por la acción de inhibidores metabólicos.
- 4) El eflujo de  $\text{Na}^+$  disminuye intensamente (no se anula) cuando el  $\text{K}^+$  es eliminado del medio externo y se incrementa - cuando aumenta la concentración externa del potasio.
- 5) El eflujo de  $\text{Na}^+$  y el influjo de  $\text{K}^+$  dependen mucho de la temperatura; las disminuciones de la temperatura los reducen acentuadamente ( $Q_{10}$  de 3 a 4, i.e. un descenso de  $10^\circ\text{C}$  reduce los flujos a  $1/3$  ó  $1/4$  de sus valores originales). En cambio, el influjo de  $\text{Na}^+$  y eflujo de  $\text{K}^+$  son, por lo general, relativamente insensibles a los cambios de temperatura.

La dependencia de la extrusión de  $\text{Na}^+$  de la concentración externa de potasio hace suponer un intercambio uno por uno entre el ión sodio y el ión potasio. De donde se supondrá que todo bombeo se acompaña de un ingreso concomitante de  $\text{K}^+$ .

Una salida de  $\text{NaCl}$  produce una concomitante disminución del volumen de la célula. Puesto que la cantidad total de  $\text{A}^-$  de

una célula es relativamente fija, los cambios del volumen celular reflejan variaciones en la  $(Cl^-)_o$ , la cual a su vez depende del  $V_r$ . Por lo tanto, se requiere una reducción más bien amplia del  $V_r$  para aumentar el volumen celular de manera apreciable. Puede hacerse destacar que el bombeo sódico-potásico no sólo mantiene las diferencias de concentración iónica y de potencial a través de la membrana, sino que también previene la distención y el estallido de las células.

Las concentraciones de  $H^+$  y  $HCO_3^-$  en el interior celular no están en equilibrio con el  $V_r$ . Con electrodos de vidrio se ha medido directamente el pH intracelular (por definición:  $pH = -\log (H^+)$ ). Nada se conoce sobre el mecanismo íntimo del transporte de estas sustancias, se supone que  $H^+$  fluye hacia afuera y el  $HCO_3^-$ , hacia adentro. Una simple hipótesis para explicar el transporte de  $H^+$  es la de suponer - que este ión tiene alguna afinidad con la sustancia transportadora de  $Na^+$ , y así este complejo,  $H^+$  y la sustancia transportadora puede atravesar la membrana. Un descenso de  $pH_i$  puede, eventualmente, disminuir el volumen celular.

### CAPITULO 3. EL MODELO DE HODGKIN Y HUXLEY

#### 3.1 INTRODUCCION

El modelo de Hodgkin y Huxley es básicamente una descripción cuantitativa de la cinética de las corrientes iónicas entrante y saliente a través de la membrana nerviosa.

Como se mencionó en el capítulo 2, la corriente que atraviesa la membrana (corriente de membrana,  $I_m$ ) cuando se le aplica un pulso de voltaje, tiene dos componentes: Una capacitiva ( $i_c = C \, dV/dt$ ) y otra iónica. Eliminando la corriente capacitiva, fijando el voltaje en el tiempo ( $dV/dt = 0$ ), se logró medir la corriente iónica de la membrana. Ya en 1942, Cole et al obtuvieron los primeros registros de  $I_m$  como una corriente inicial entrante y otra saliente tardía.

En el modelo de Hodgkin y Huxley (1952) se proponen una serie de ecuaciones diferenciales, las cuales, sirven para la descripción de características de células excitables (25).

Estas ecuaciones se basan en los siguientes principios:

- 1) La fibra nerviosa o axón no presenta ramificaciones.
- 2) Las propiedades eléctricas de la membrana son uniformes a lo largo de toda su superficie.
- 3) La resistencia eléctrica del medio extracelular se considera muy baja.

El análisis teórico permitió la reconstrucción satisfactoria del potencial de acción. Las ecuaciones basadas en los datos de fijación de voltaje, reproducen con gran fidelidad -

los cambios de potencial de membrana en respuesta a un estímulo ya sea umbral o subumbral. Sin embargo, es necesario puntualizar que sus datos experimentales pueden analizarse de distintas maneras a como ellos lo hicieron, con resultados igualmente satisfactorios. Estas ecuaciones deben considerarse "...una descripción del curso temporal de los cambios de permeabilidad al sodio y al potasio"; pero es indudable que éstas son capaces de predecir prácticamente casi todas las propiedades eléctricas de la membrana del axón gigante como son: La forma, amplitud, curso temporal y velocidad del potencial de acción; forma de las respuestas subumbrales y los movimientos netos de sodio y potasio durante un impulso nervioso.

Las ecuaciones de Hodgkin y Huxley constituyen esencialmente un modelo matemático de comportamiento de la membrana del axón.

### 3.2 PRINCIPIO DE INDEPENDENCIA

Hodgkin y Huxley proponen una completa independencia en los flujos de cada especie iónica; en el caso del sodio, el influjo del ión dependerá sólo de su concentración en el exterior siempre y cuando el potencial a través de la membrana (V) se mantenga constante. Para investigar experimentalmente el principio de independencia, Hodgkin y Huxley calcularon la dependencia de las corrientes de sodio respecto a las concentraciones, bajo el supuesto de que la corriente de sodio es independiente de cualquiera otra y compararon este cálculo con los datos experimentales.

Si ambos flujos (eflujo y aflujo) son iguales, se establece una condición de equilibrio y para ello, consideremos una concentración particular de sodio extracelular  $(Na)^+$ , ésto es:

$$J_i = K_1 (Na)_o \quad J_i - \text{influjo iónico}$$

$$J_a = K_2 (Na)_i \quad J_a - \text{eflujo iónico}$$

$$\frac{J_i}{J_a} = \frac{K_1 (Na)_o}{K_2 (Na)_i}$$

$$\text{para } (Na)_i = (Na)^+_o \quad J_i = J_a$$

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{(Na)^+_o}{(Na)_i}$$

$$(J_i = J_a = K_1 (Na)^+_o)$$

$$\text{como: } \frac{J_i}{J_a} = \frac{K_1 (Na)_o}{K_2 (Na)_i} = \frac{(Na)_i (Na)_o}{(Na)^+_o (Na)_i} = \frac{(Na)_o}{(Na)^+_o}$$

Como se ha establecido la condición de equilibrio, aplicaremos la ecuación de Nernst:

$$V_{Na} = \frac{RT}{\gamma} \ln \frac{(Na)_o}{(Na)_i}$$

Para el caso de la concentración particular  $(Na)^+_o$  ya que justamente  $(Na)^+_o$  hace que se cumpla esta condición.

$$V = \frac{RT}{\gamma} \ln \frac{(Na)^+_o}{(Na)_i}$$

$$\text{donde } (Na)^+_o = (Na)_i \exp \left( V \frac{\gamma}{RT} \right)$$

Con otra concentración  $(Na)_o$ , llamaremos al potencial de equilibrio  $V^+$  como:

$$\text{donde: } (Na)_o = (Na)_i \exp \left( V^+ \frac{\gamma}{RT} \right)$$



Combinando  $\frac{(N_a)_o}{(N_a)^+_o} = \frac{\text{Exp}(V^+ \frac{\gamma}{RT})}{\text{Exp}(V \frac{\gamma}{RT})} = \exp(V^+ - V) \frac{\gamma}{RT}$

Sustituyendo en:  $\frac{J_1}{J_2} = \frac{(N_a)_o}{(N_a)^+_o} = \exp(V^+ - V) \frac{\gamma}{RT}$

Al considerar la corriente de sodio como el único flujo neto a través de la membrana:

$$I_{Na} = J_{1Na} - J_{2Na}$$

La relación entre corrientes para dos concentraciones extracelulares diferentes será:

$$\frac{I'_{Na}}{I_{Na}} = \frac{J'_{1Na} - J'_{2Na}}{J_{1Na} - J_{2Na}}$$

Tomando en cuenta los flujos:

$$J_1 = K_1 (N_a)_o$$

$$\frac{J'_{Na}}{J_{Na1}} = \frac{(N_a)'_o}{(N_a)_o}$$

$$J_2 = K_2 (N_a)_i$$

$$J'_{Na2} = J_{Na2}$$

Sustituyendo:

$$\frac{I_{Na}}{I'_{Na}} = \frac{J'_{Na1} - J'_{2Na}}{J_{Na1} - J_{1Na}} = \frac{(N_a)_o}{(N_a)'_o} - \frac{J_{2Na}}{J_{Na1}}$$

$$\frac{J_{Na1} - J_{2Na}}{J_{Na1} - J_{1Na}} = 1 - \frac{J_{2Na}}{J_{1Na}}$$

Además:

$$\frac{J_1}{J_2} = \exp(V^+ - V) \frac{\gamma}{RT}$$

Por lo que:

$$\frac{J_2}{J_1} = \exp(V - V^+) \frac{\gamma}{RT}$$

$$\frac{I'_{Na}}{I_{Na}} = \frac{(N_a)'_o}{(N_a)_o} - \frac{\exp(V - V^+) \frac{\gamma}{RT}}{1 - \exp(V - V^+) \frac{\gamma}{RT}}$$

Multiplicando por  $(\exp (V-V^+) \bar{\gamma} / RT)^{-1}$

Se tiene:

$$\frac{I'_{Na}}{I_{Na}} = \frac{(Na)'_o}{(Na)_o} \frac{\exp (V^+ - V) \bar{\gamma} / RT - 1}{\exp (V^+ - V) \bar{\gamma} / RT - 1}$$

Si se establece la condición de equilibrio:

$$V^+ = V_{Na}$$

tenemos:

$$\frac{I'_{Na}}{I_{Na}} = \frac{(Na)'_o}{(Na)_o} \frac{\exp (V_{Na} - V) - 1}{\exp (V_{Na} - V) \bar{\gamma} / RT - 1}$$

Esa ecuación fue deducida de la suposición de que la corriente de sodio es independiente de las otras. Los resultados de Hodgkin y Huxley tienen un error del 20%, atribuyéndolo a pequeñas discrepancias en la variación del potencial de reposo producido al cambiar la concentración extracelular del sodio (41) y de potasio.

### 3.3 CONDUCTANCIAS DEL SODIO Y DEL POTASIO

En el artículo de (1952 b), Hodgkin y Huxley proponen que los cambios de la permeabilidad de la membrana son originados a partir de los cambios del potencial. La conductancia de la membrana a los iones de sodio y potasio se obtienen de la ley de Ohm, con las expresiones siguientes (capítulo 1):

$$I_{Na} = g_{Na} (V - V_{Na}) \quad I_K = g_K (V - V_K)$$

donde  $I_{Na}$  es la corriente de sodio,  $g_{Na}$  es la conductancia del sodio,  $V$  es el potencial de membrana,  $V_{Na}$  es el potencial de equilibrio del sodio,  $I_K$  es la corriente de potasio,  $g_K$  es la conductancia del potasio y  $V_K$  es el potencial de equilibrio del potasio.

Estas expresiones son la aplicación de la ley de Ohm a las corrientes de sodio y potasio; su validez se basa en el hecho de que la relación entre el voltaje y la corriente son lineales. Esto también fue demostrado por Hodgkin y Huxley (1952 b) quienes lo verificaron aplicando dos pulsos de fijación de voltaje al axón; el primero tenía como propósito activar a la membrana depolarizándola, mientras que el segundo fijaba su potencial a otro valor. Si se grafica el valor de la corriente de membrana justo en el inicio del segundo pulso, con respecto al valor del potencial fijado, se encuentra que esta relación queda descrita por la ecuación de una recta cuya pendiente es la conductancia instantánea (capítulo 1, figura 21).

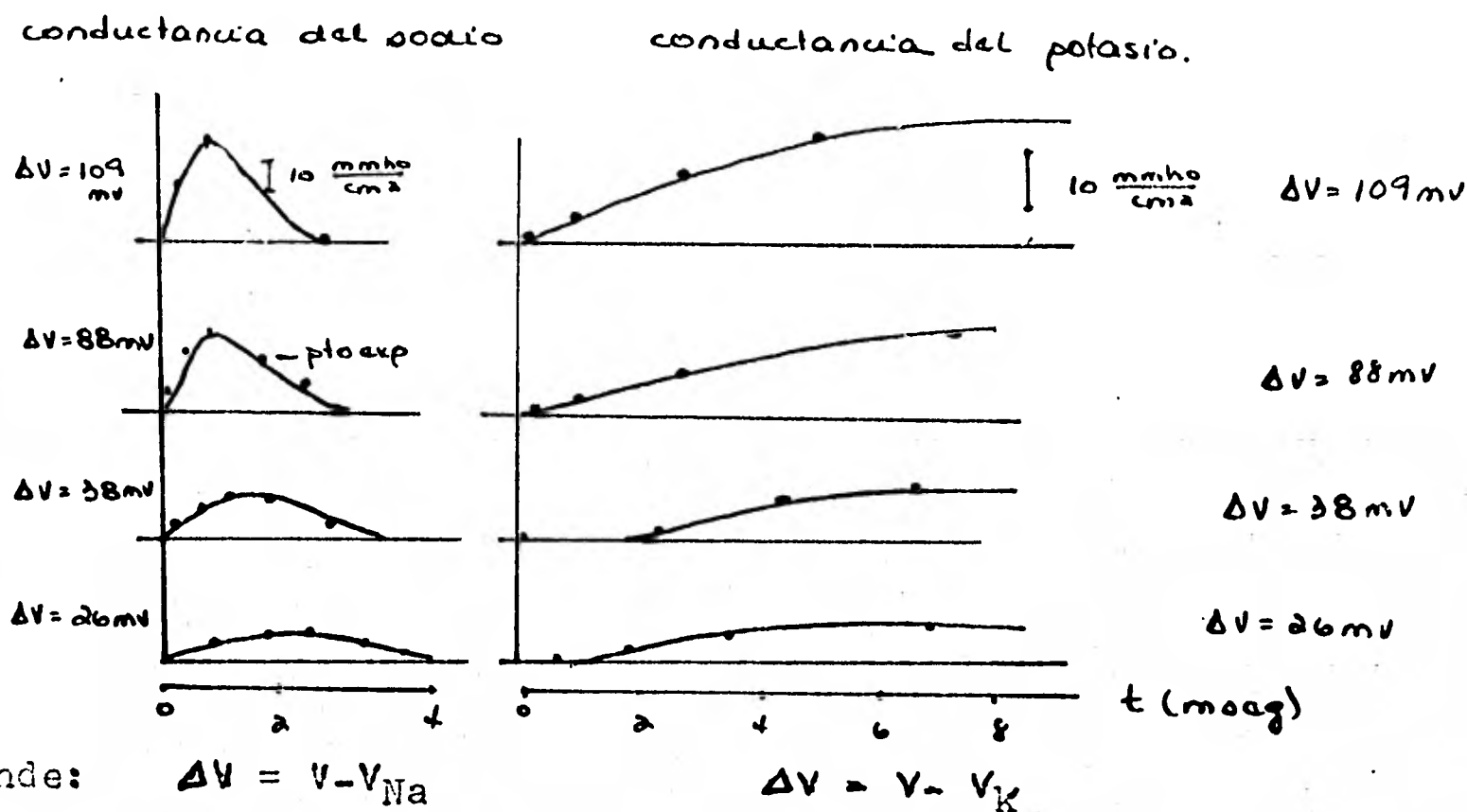
Una vez establecido este hecho, se puede entonces calcular los valores de las conductancias al sodio y al potasio directamente, ya que bajo la condición de fijación de voltaje ( $V-V_{Na}$ ) y ( $V-V_K$ ) son constantes, por lo que:

$$g_{Na} = \frac{I_{Na}}{V-V_{Na}} \quad g_K = \frac{I_K}{V-V_K}$$

Estas expresiones permiten evaluar de manera directa las variaciones de ambas conductancias.

Hodgkin y Huxley (1952 b) encontraron que, tanto la conductancia al sodio como al potasio son funciones continuas del tiempo; aumentan cuando la membrana es depolarizada; la de sodio decrece después de cierto tiempo de aplicado el escalón de potencial, mientras que la de potasio se mantiene constante (figura 25).

Figura 25. Gráfica de las conductancias a diferentes depolarizaciones (30).



Las curvas continuas (marcadas en la gráfica) son la aplicación de las ecuaciones. Como se observa, las conductancias crecen entre 0 y 2 mseg y luego decae la de sodio exponencialmente y la de potasio se mantiene. Cada conductancia es cinéticamente diferente por lo que se supone que tanto el sodio como el potasio atraviesan la membrana por distintos sitios o canales (capítulo 4).

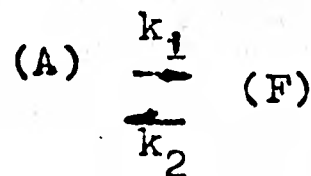
Como resultado del incremento del flujo hacia afuera del  $\text{K}^+$  y el decrecimiento del flujo de  $\text{Na}^+$  hacia adentro se produce la repolarización. Este cambio de voltaje a su vez disminuye la  $g_{\text{Na}}$  y después de un intervalo, la  $g_{\text{K}}$ . A consecuencia de esto, la  $g_{\text{K}}$  se mantiene por encima de lo normal aun cuando la repolarización se ha completado, y la membrana se hiperpolariza, esto es, el potencial de membrana se coloca más cerca de  $V_{\text{K}}$

que de  $V_r$ . De allí en adelante, la  $g_{Na}$  y  $V_m$  caen lentamente regresando a sus valores de reposo.

### 3.4 CINÉTICA DE LAS CONDUCTANCIAS.

Hodgkin y Huxley (1952 d) supusieron que los cambios en la conductancia tanto al sodio como al potasio, dependen de la posición que guarden ciertas partículas de la membrana del axón. Se postula que su movimiento u orientación dependerá del campo eléctrico a través de la membrana. En el modelo se establece que la conductancia puede aumentar cuando estas partículas se encuentran en cierta posición o estado y disminuyen en caso contrario.

Hodgkin y Huxley (1952 d) suponen que cada canal está formado por moléculas o partículas que se desplazan independientemente una de otra hasta situarse en cierta posición que estructuran al poro o canal. La porción de partículas en la posición que formarán el canal, la llamaremos A y la porción de partículas que no se alinien en A, estarán en F:



donde  $k_1$  y  $k_2$  son constantes de transición dependientes del voltaje.

Durante la depolarización, la reacción se supone que predomina hacia la izquierda; su curso temporal es  $(1 - \exp(-k_2 t))$ .

En la repolarización, las moléculas o partículas regresan a la posición F con un curso temporal exponencial:  $(\exp -k_1 t)$ .

Para que un canal iónico, de sodio o de potasio se active, es necesario un número mínimo de partículas colocadas en la posición correcta. Para representar matemáticamente estas ideas, Hodgkin y Huxley definieron los parámetros "m" y "h" que describen la activación e inactivación de las conductancias del sodio, respectivamente, y "n" representa la activación de la conductancia del potasio. Tanto m, h y n pueden considerarse como factores de probabilidad, por ello toman valores entre cero y uno.

### 3.4.1 CONDUCTANCIA DEL POTASIO

Como se ha mencionado, el parámetro "n" describe la activación de la conductancia de la membrana a los iones de potasio y representa la fracción de las partículas de la membrana que se mueven para formar el canal de potasio y  $1-n$  representa la porción o fracción de partículas que no se mueven, por lo que:

$$n \frac{\alpha_n}{\beta_n} \quad 1-n$$

donde  $n$  es la constante de transición de la posición F a A; y  $\beta_n$  es la otra constante que va en sentido contrario o inverso; éstas son dependientes del voltaje y de la temperatura a la que se encuentra el axón. La variación temporal de la apertura de los canales, dependen de la proporción neta -

de las partículas que se activen en cada momento (en forma lineal), es decir, se considera una cinética de primer orden:

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

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

que es la forma general:

$$\frac{dy}{dx} = ly + b$$

siendo l y b constantes,

$$\frac{1}{l} \frac{dy}{dt} = y + \frac{b}{l}$$

Agrupando en cada miembro cada variable,

$$\frac{1}{l} \frac{dy}{dt} = y + \frac{b}{l} \qquad \frac{1}{l} \frac{dy}{y + \frac{b}{l}} = dx$$

$$\frac{dy}{y + \frac{b}{l}} = l dx$$

como b/l es constante:

$$dy = d \left( y + \frac{b}{l} \right)$$

podemos escribir:

$$\frac{dy}{y + \frac{b}{l}} = \frac{d \left( y + \frac{b}{l} \right)}{y + \frac{b}{l}} = l dx$$

Ahora ya agrupados, podemos integrar:

$$\int \frac{d \left( y + \frac{b}{l} \right)}{y + \frac{b}{l}} = \int l dx \qquad \ln \left( y + \frac{b}{l} \right) = lx + c$$

dónde c es una constante de integración.



Al aplicar a ambos miembros la función exponencial:

$$y + \frac{b}{l} = e^{lx + c} = e^{lx} e^c$$

Ahora llamando:

$$\Lambda = e^c$$
$$y + \frac{b}{l} = \Lambda e^{lx}$$

despejando:

$$y = \Lambda e^{lx} - \frac{b}{l}$$

Aplicando esto a la ecuación que teníamos anteriormente:

$$\frac{dn}{dt} = (-\alpha n - \beta n)n + \alpha n$$

donde llamamos:

$$l = -\alpha n - \beta n \quad b = \alpha n \quad x = t$$

tenemos como solución:

$$n = \Lambda e^{(-\alpha n - \beta n)t} - \frac{\alpha n}{-\alpha n - \beta n} = \Lambda e^{(\alpha n - \beta n)t} + \frac{\alpha n}{\alpha n + \beta n}$$

donde A es una constante de integración. Cuando t tiende al infinito:

$$n \rightarrow \frac{\alpha n}{\beta n + \alpha n}$$

llamándolo  $n_{\infty}$

$$\therefore n = \Lambda e^{(-\alpha n - \beta n)t} + n_{\infty}$$

Cuando t tiende a cero, llamemos  $n = n_0$ , se tiene:

$$n_0 = \Lambda + \frac{\alpha n}{\alpha n + \beta n}$$

con las condiciones frontera:

$$n_0 = \Lambda + n_{\infty}$$

sustituyendo obtenemos:

$$n = (n_0 - n_{\infty}) \exp(-\alpha n - \beta n)t + n_{\infty}$$

Podemos llamar:

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n}$$

al sustituirlo:

$$n = n_{\infty} - (n_{\infty} - n_0) \exp(-t/\tau_n)$$

esta ecuación representa la fracción de partículas que se activan en cada momento abriendo así el canal de potasio;  $n_{\infty}$ ,  $n_0$  y  $\tau_n$  dependen de  $\alpha_n$  y  $\beta_n$  éstas a su vez del potencial, por lo que  $n_{\infty}$ ,  $n_0$  y  $\tau_n$  son funciones de  $V$ .

Hodgkin y Huxley (30) calcularon  $\alpha_n$  y  $\beta_n$  para diferentes valores de potencial y a partir de datos experimentales obtuvieron una función que se ajusta con:

$$\alpha_n = \frac{0.1 (V+10)}{\exp(V+10) - 1}$$

$$\beta_n = 0.125 \exp\left(\frac{V}{80}\right)$$

Estas últimas relaciones nos muestran el comportamiento de  $\alpha_n$  y  $\beta_n$  en función del voltaje (figuras 26a, b).

La variación de la conductancia del potasio ( $g_K$ ) durante un pulso de voltaje se describe empíricamente con la ecuación:

$$g_K = \bar{g}_K n^4 \quad 0 \leq n \leq 1$$

Sustituyendo el valor de  $n$  en  $g_K$ :

$$g_K = \bar{g}_K (n_{\infty} - (n_{\infty} - n_0) \exp(-t/\tau_n))^4$$

donde  $\bar{g}_K$  es la conductancia máxima del potasio.

Cuando  $t = 0$ :

$$g_K = (\bar{g}_K n_0 - \bar{g}_K n_{\infty} - \bar{g}_K n_0) \}^4 = \bar{g}_K n_0^4$$

i.e.,  $g_K$  toma el valor  $\bar{g}_K n_0^4$  en el instante 0.

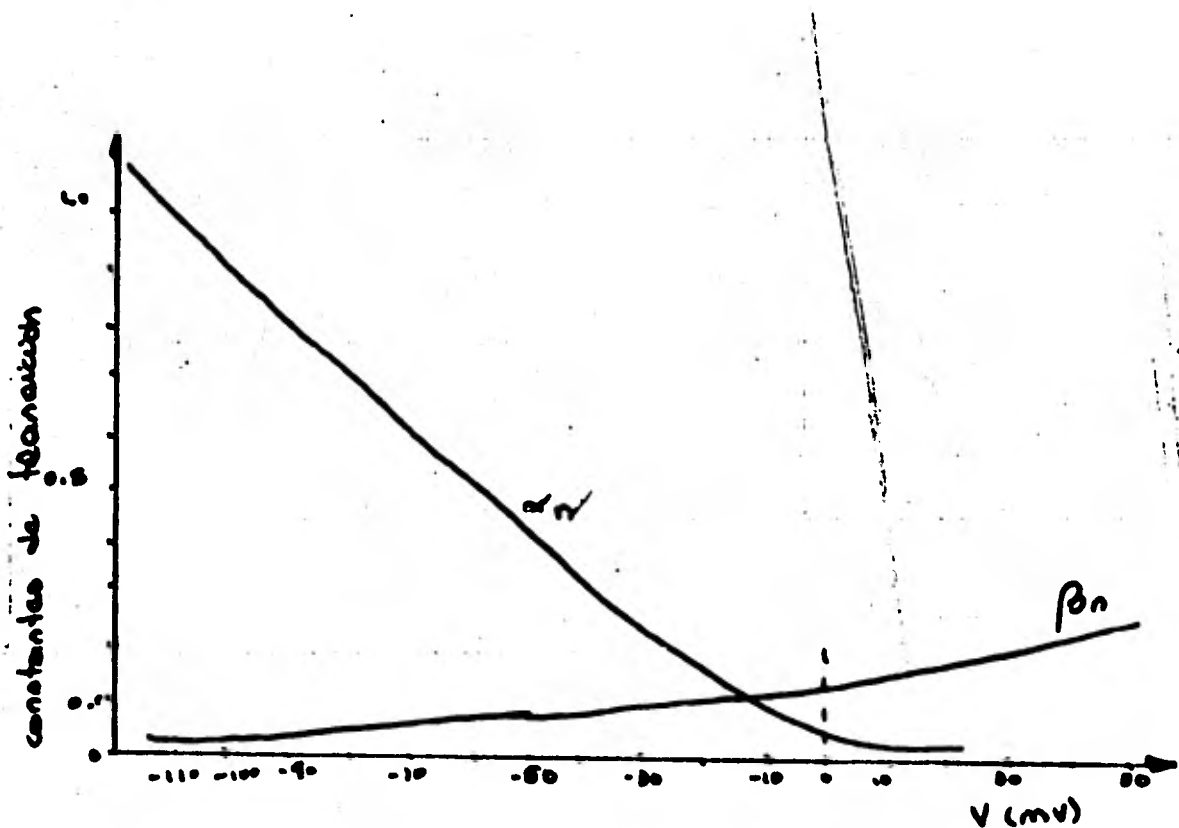
Para tiempos prolongados, tenemos:

$$g_K = \bar{g}_K \quad n_{\infty} = \bar{g}_K n_{00}^4$$

$g_{K\infty}$  está definido como  $\bar{g}_K n_{\infty}^4$  que representa el valor de la conductancia para un tiempo infinito. El número 4 lo asociaron con el número de partículas que abren cada poro de potasio.

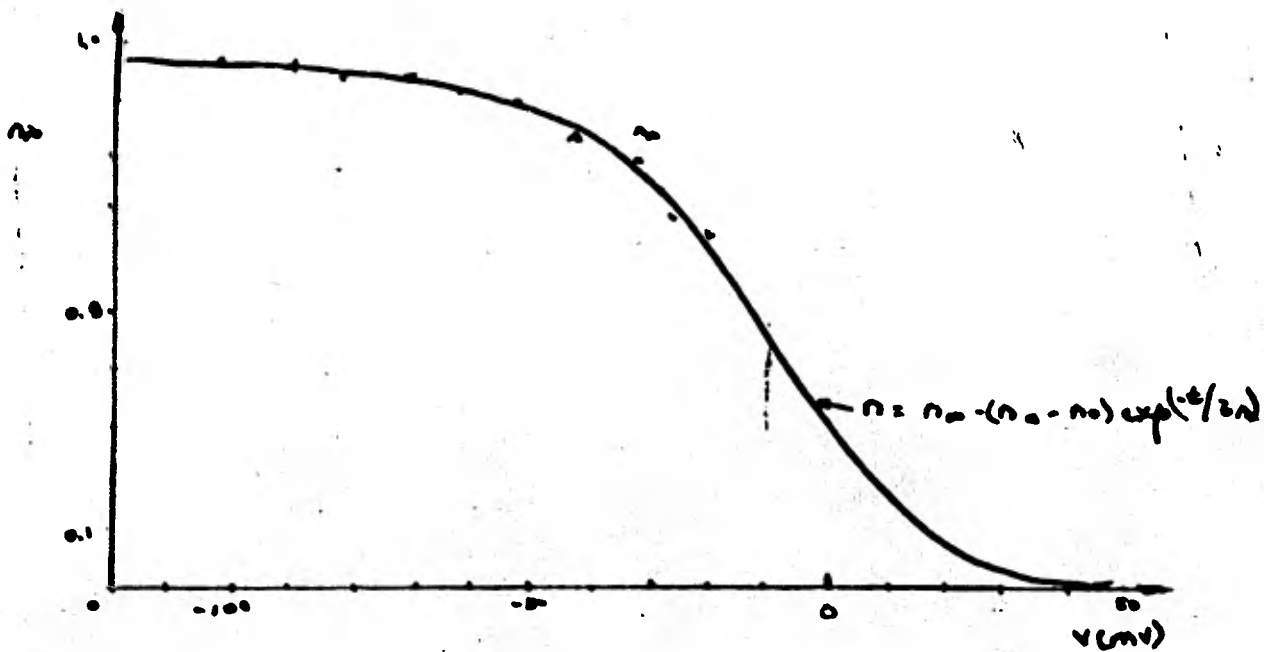
Figura 26. Gráficas de las constantes de transición  $\alpha_n$  y  $\beta_n$  de la conductancia del potasio. Cuando  $V > 0$  se observa como declina la conductancia del potasio cuando la membrana se repolariza hasta su potencial de reposo.

a)



La abscisa de ambas gráficas representa el potencial de membrana menos el potencial de reposo. La ordenada de la figura b) representa las medidas experimentales ( $\Delta$ ) de  $n$  calculadas de la conductancia del potasio, por medio de la relación:  $n_{\infty} = \sqrt{\frac{g_{K_{\infty}}}{\bar{g}_K}}$  donde  $\bar{g}_K$  representa la conductancia máxima para el potasio  $\bar{g}_K$

b)



### 3.4.2 CONDUCTANCIA DEL SODIO

En forma análoga que para el caso de la conductancia del potasio, tenemos el caso del sodio, con los parámetros  $m$  y  $h$  para describir la activación e inactivación de esta conductancia. El parámetro  $m$  representa la fracción de partículas orientadas de tal manera que favorecen la apertura, por lo que:

$$m = \frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m} \cdot (1 - m)$$

Se considera una cinética de primer orden:

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

cuya solución es:

$$m = (m_0 - m_\infty) \exp(-t/\tau_m) + m_\infty$$

Esta función expresa la variación temporal de las partículas durante la activación de los canales de sodio: la dependencia con el potencial está contenida en los parámetros  $m_0$ ,  $m_\infty$   $\tau_m$  que dependen a su vez de  $\alpha_m$  y  $\beta_m$  como se da a continuación (figuras 27, 28):

$$m_\infty = \frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m} \quad \tau_m = \frac{1}{\alpha_m + \beta_m}$$

Figura 27. Gráfica de las constantes de transición,  $\alpha_m$  y  $\beta_m$  representan los cambios iniciales de la conductancia del sodio ( $g_{Na}$ ). El valor en  $V = 0$ , es cuando la conductancia del sodio declina durante la repolarización (30). (Curvas trazadas en base a datos experimentales).

$$\alpha_m = 0.1 (V + 25) / \exp \left\{ \frac{V+25}{10} - 1 \right\}$$

$$\beta_m = 4 \exp (V/18)$$

$$T \in (276^\circ\text{K}, 287^\circ\text{K})$$

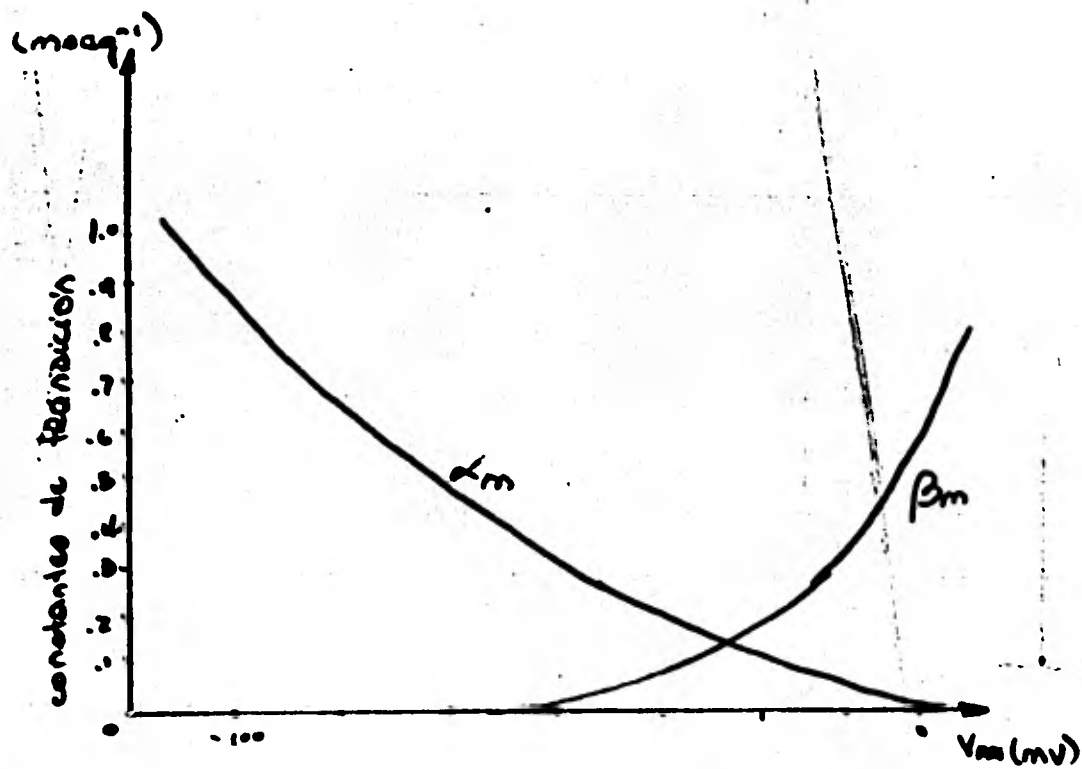
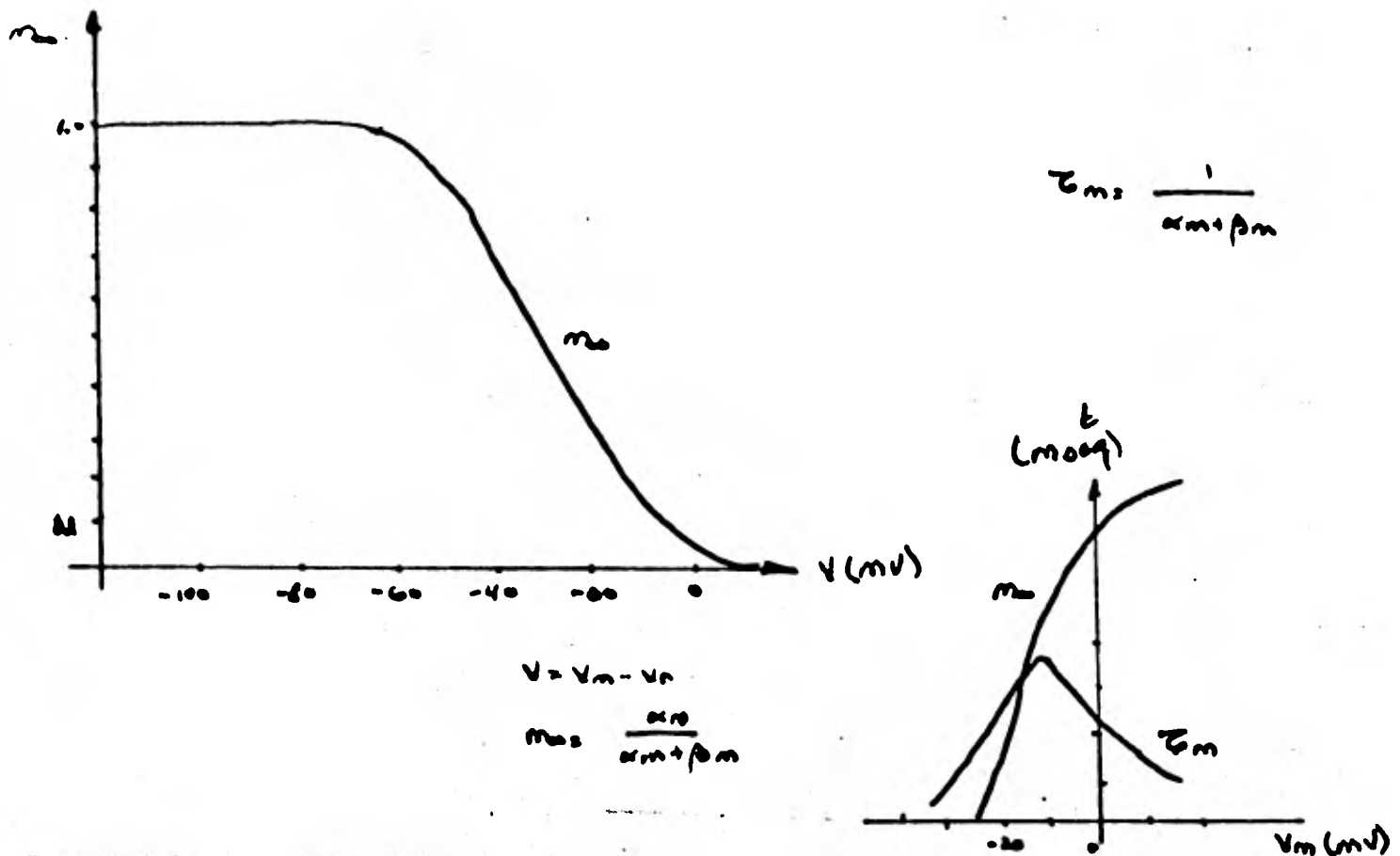


Figura 28. Gráficas de  $(m - V)$  y de  $(t - V_m)$ . (30).

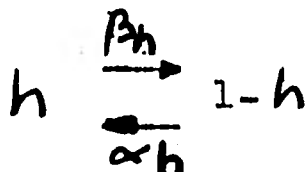


La separación de la corriente iónica de membrana en dos componentes, de sodio y potasio, permite observar un fenómeno interesante que presenta la corriente de sodio: Inicialmente, durante un pulso depolarizante, esta corriente aumenta, pero en lugar de tender a estabilizarse, como ocurre con la corriente de potasio, alcanza en cambio, un valor máximo a partir del cual disminuye, a pesar de que se mantenga la depolarización. Este fenómeno fue denominado inactivación por Hodgkin y Huxley (1952 c) quienes postularon que el potencial de membrana influye sobre dos mecanismos independientes que

son el de activación e inactivación de la conductancia del sodio (1952 c, d). Tanto la inactivación como la activación dependen no sólo del potencial de membrana sino también del tiempo. Para analizar la inactivación, Hodgkin y Huxley aplicaron dos pulsos de fijación a la fibra, el primero (pulso condicionante) era de intensidad variable; mientras que el segundo (pulso de prueba) se mantenía constante).

La inactivación comienza cuando la membrana se depolariza; cuanto mayor sea la depolarización, más rápido será el ritmo de inactivación. La depolarización rápida de la membrana tiene dos efectos que se relacionan con  $g_{Na}$ : La conductancia aumenta rápidamente y el ritmo al cual se efectúa la inactivación también aumenta. La repolarización de la membrana tiene los efectos opuestos. Hay una importante diferencia entre el decremento en la  $g_{Na}$  debida a la inactivación y la debida a la polarización de la membrana. Se requiere de cierto tiempo para reactivar la  $g_{Na}$  inactivada, mientras que el decaimiento ocasionado por la repolarización, la actividad retorna inmediatamente i.e., una depolarización que sigue muy de cerca a una repolarización causará aumento en la  $g_{Na}$ . La inactivación en la  $g_{Na}$  es la causa principal del periodo refractario.

La inactivación, se puede pensar, como debida al movimiento de cargas negativas que bloquean el flujo de iones de sodio, cuando éstas se mueven del exterior al interior de la membrana:





con la cinética de primer orden:

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

cuya solución es:

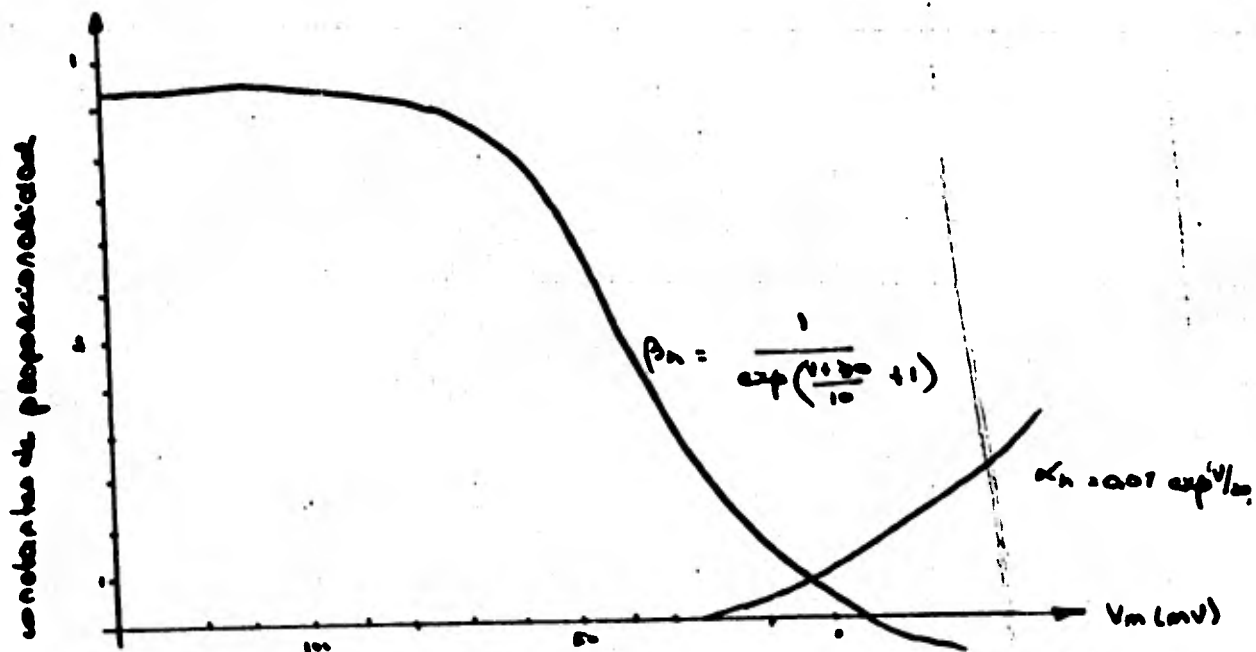
$$h = h_{\infty} - (h_{\infty} - h_0) \exp(-t/\tau_h)$$

con:

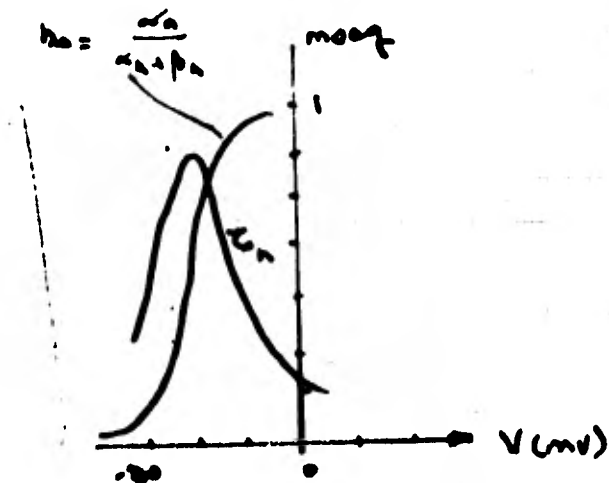
$$h_{\infty} = \frac{\alpha_h}{\alpha_h + \beta_h} \quad \tau_h = \frac{1}{\alpha_h + \beta_h}$$

Figura 30. Gráficas de  $\alpha_h$ ,  $\beta_h$ ,  $\tau_h$  y  $h_{\infty}$  en función de  $V_m$ .

a) Gráfica de las constantes de proporcionalidad en función del potencial de membrana ( $V_m$ ) (20).



b) Gráficas de  $\tau_h$  y  $h_{\infty}$  en función del potencial de membrana.



Por las gráficas vemos que este parámetro de inactivación tiene una cinética contraria a 'm'.

Ya han sido analizados cada uno de los parámetros que involucran la conductancia al sodio y ésta viene determinada por dos variables m y h con la cinética de primer orden (1952).

La siguiente expresión es, pues, la ecuación de la conductancia del sodio:  $g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h$

donde  $\bar{g}_{Na}$  es el valor máximo de conductancia, m y h son los factores de activación e inactivación. En el modelo de Hodgkin y Huxley se consideran la inactivación y activación como procesos independientes. Los exponentes uno y tres fueron encontrados del ajuste de sus datos experimentales, éstos representan el número de partículas que cambian de posición para abrir un canal de sodio. En un estado de reposo, la conductancia es muy pequeña comparada con los valores obtenidos cuando ocurren largas depolarizaciones, por lo que Hodgkin y Huxley despreciaron el valor de  $m_0$ . La inactivación h también es despreciable cuando el potencial es menor de 10 - 30 mV, por lo que la conductancia queda expresada como:

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h_0 (1 - \exp(-t/\tau_m))^3 \exp(-t/\tau_h)$$

en resumen, la dependencia de las conductancias con el potencial sugiere que el campo eléctrico aplicado a la membrana cambia la distribución de moléculas cargadas en la misma, se distribuyen de tal manera que dejan el paso de iones a través de ella (principalmente de sodio y potasio).

### 3.5 RECONSTRUCCION DEL POTENCIAL DE ACCION Y CALCULO DE LA VELOCIDAD DE PROPAGACION.

---

#### 3.5.1 INTRODUCCION

En el trabajo de Hodgkin y Huxley de 1952 (1952 d) se analiza el origen del potencial de acción y sus propiedades en base a las corrientes iónicas. Para ello hicieron una determinación cuantitativa de las conductancias de la membrana como funciones del potencial y del tiempo. Con esta teoría, se permitió la reconstrucción satisfactoria del potencial de acción. Sus ecuaciones, como ya se ha visto, están basadas en datos obtenidos por medio de la fijación del voltaje, reproduciendo con gran fidelidad los cambios de potencial de membrana en respuesta a un estímulo. Hodgkin y Huxley fueron capaces de reconstruir teóricamente, la forma, amplitud, curso temporal, velocidad, periodo refractario y umbral del potencial de acción; también la existencia y la forma de las respuestas subumbrales y el movimiento neto de sodio y de potasio durante un impulso nervioso.

En base a los resultados obtenidos por Hodgkin y Huxley, la corriente de membrana puede expresarse como:

$$I_m = C_m \frac{dV}{dt} + I_{Na} + I_k + I_l$$

donde  $I_l$  representa una componente muy pequeña de la corriente iónica llamada corriente de fuga, que es debida probablemente al movimiento de iones cloro o de algunos otros que todavía no se han cuantificado.

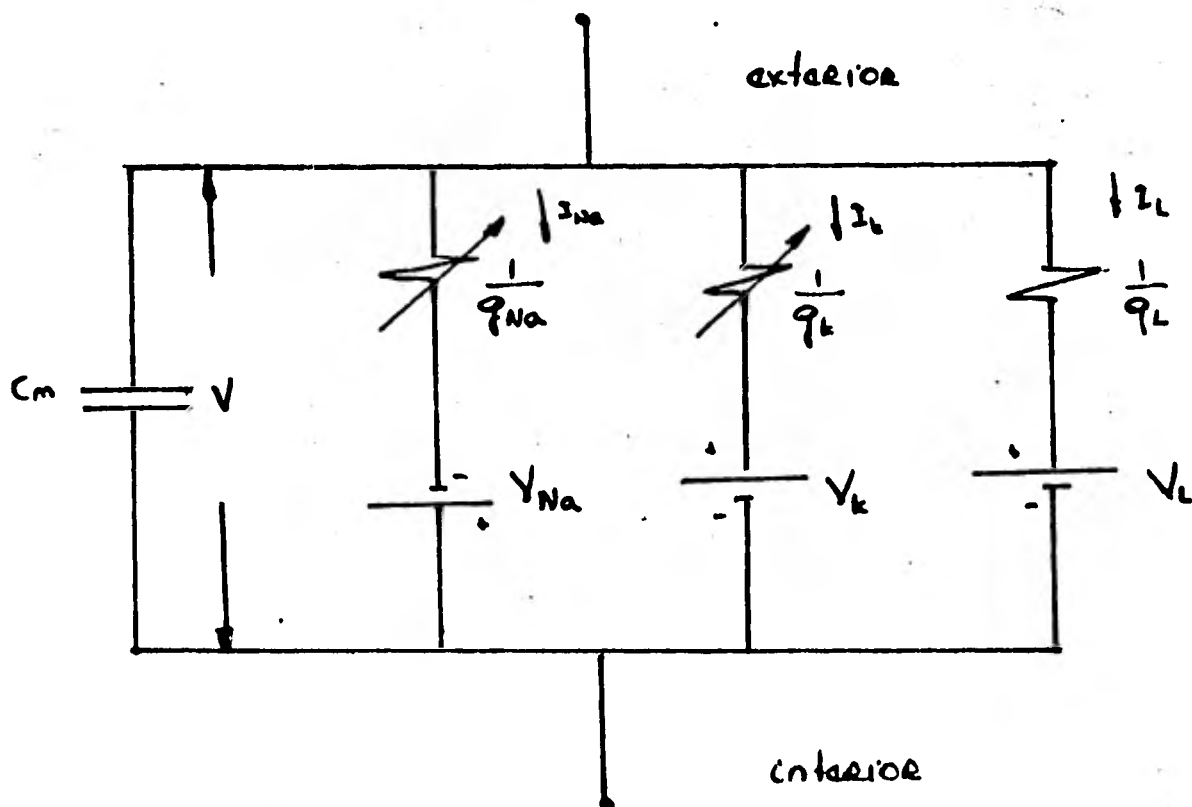
El comportamiento de esta corriente también es iónico por lo que se expresa como:

$$I_1 = \bar{g}_1 (V - V_1)$$

donde  $\bar{g}_1$  es una constante y  $V_1$  representa el potencial de equilibrio de esos iones.

En la figura 31, se presenta un modelo eléctrico de membrana (Hodgkin y Huxley 1952 d), donde cada canal tiene una fuerza electromotriz característica (potencial de equilibrio de cada ión particular).

Figura 31. Modelo eléctrico de membrana (30). Circuito eléctrico que representa a una membrana:  $R_{Na} = 1/g_{Na}$ ,  $R_K = 1/g_K$ ,  $R_l = 1/g_l$ ;  $R_{Na}$  y  $R_K$  varían con el tiempo y el potencial de membrana. Las otras componentes son constantes.



Del análisis descrito anteriormente, podemos expresar la corriente de membrana como:

$$I_m = C_m \frac{dV}{dt} + \bar{g}_{Na} m^3 h (V - V_{Na}) + \bar{g}_K n^4 (V - V_K) + \bar{g}_L (V - V_L)$$

3.5.2 Cálculo de la velocidad de propagación en base a la teoría del cable.

Sabemos que si un fenómeno se propaga con una velocidad constante, entonces:  $V = f(x - \theta t)$

donde  $\theta$  representa la velocidad de propagación (considerando la constante),  $t$  es el tiempo;  $x$ , la distancia;  $V$  es el valor del potencial que se propaga.

Haciendo un cambio de variable:  $w = x - \theta t$   
 $v = f(w)$

derivando:  $\frac{\partial v}{\partial x} = \frac{\partial v}{\partial w} \frac{\partial w}{\partial x}$

$$\frac{\partial w}{\partial x} = \frac{\partial}{\partial x} (x - \theta t) = \frac{\partial x}{\partial x} - \theta = 1$$

por lo que:  $\frac{\partial v}{\partial w} = \frac{\partial v}{\partial x}$        $\frac{\partial^2 v}{\partial w^2} = \frac{\partial^2 v}{\partial x^2}$

por otro lado:  $\frac{\partial v}{\partial t} = \frac{\partial v}{\partial w} \frac{\partial w}{\partial t}$

$$\frac{\partial w}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t} (x - \theta t) = 0 - \theta = -\theta$$

sustituyendo:  $\frac{\partial v}{\partial t} = \frac{\partial v}{\partial w} (-\theta)$

$$\frac{\partial v}{\partial w} = -\frac{1}{\theta} \frac{\partial v}{\partial t} \quad \frac{\partial^2 v}{\partial w^2} = \frac{1}{\theta^2} \frac{\partial^2 v}{\partial t^2} = \frac{\partial^2 v}{\partial x^2}$$

De la teoría del cable, se obtuvo la corriente de membrana

como: 
$$I_m = \frac{a}{2R_i} \frac{\partial^2 v}{\partial x^2}$$

donde  $a$  es el radio del axón,  $R_i$  es la resistencia interna debida al axoplasma.

Hodgkin y Huxley supusieron que el potencial de acción se propaga con velocidad constante, por lo que:

$$I_m = \frac{a}{2R_i \theta^2} \frac{\partial^2 v}{\partial t^2}$$

donde  $\theta$  representa la velocidad de propagación, considerándola constante.

Tenemos ahora: 
$$I_m = \frac{a}{2R_i \theta^2} \frac{\partial^2 v}{\partial t^2} = C_m \frac{\partial v}{\partial t} + \bar{g}_{Na} m^3 h (V - V_{Na}) + \bar{g}_K n^4 (V - V_K) + \bar{g}_l (V - V_l)$$

Es decir, aplicando la teoría de cable y la expresión correspondiente para las conductancias al sodio y al potasio, se llega a una ecuación diferencial que expresa la segunda variación del potencial de membrana con respecto al tiempo (gráfica de un potencial de acción).

El valor de la velocidad de propagación se ajusta de tal forma que el potencial de membrana regrese a su valor de reposo, ya que si el valor de  $\theta$  es demasiado grande, el potencial de membrana crecerá indefinidamente y, por el contrario, si es demasiado pequeño, entonces decrece también indefinidamente. Esto acota el valor necesario para que el potencial regrese a su valor de reposo. Hodgkin y Huxley encontraron que el valor real de 18.8 m/seg sería el más satisfactorio.

## CAPITULO 4. CANALES DE SODIO Y DE POTASIO

### 4.1 INTRODUCCION

Los resultados obtenidos por Hodgkin y Huxley, no sólo son importantes porque trazaron una línea nueva en el estudio de los fenómenos excitables, sino que marcaron toda una nueva perspectiva en la identificación de los mecanismos causantes de los cambios de conductancia descritos. Ya en 1952, Hodgkin y Huxley (1952 d) habían señalado la importancia de los cambios de la permeabilidad iónica como dependientes de alguna manera del movimiento de alguna componente de la membrana que se comporta como si poseyera una gran carga o momento dipolar.

La formulación de Hodgkin y Huxley suponía la independencia en las corrientes de sodio y de potasio. La idea de la presencia de sitios diferentes en la membrana, causantes de los cambios de conductancia, ha sido fuertemente apoyada por observaciones de fuentes diversas, como son: Electrofisiológicas, farmacológicas, bioquímicas, etc.

La independencia en las corrientes de sodio y de potasio se vio apoyada fortuitamente, al encontrarse sustancias que bloquean selectivamente las corrientes de sodio y de potasio. Como ejemplos tenemos: La TTX (tetrodotoxina) (capítulo 2) que actúa sobre la corriente de sodio; el TEA (tetraetilamonio) (sal de amonio cuaternaria) y  $C_9$  (nonetrietilamonio) - que actúan sobre la corriente de potasio (sin que la del sodio sea afectada).

La existencia de "canales" de sodio en la membrana del axón gigante de calamar se puso de manifiesto con los resultados de Moore, Blaustein, Anderson y Narahashi (1967) (41) quienes demostraron que el efecto como bloqueador de la tetrodotoxina era específico sobre la corriente temprana del axón, independientemente que ésta fuera de sodio o de otros cationes. Concluyeron en sus experimentos que las vías de conducción para la corriente inicial y la tardía en el axón gigante de calamar, puede constituir entidades físicamente diferentes. (Capítulo 2).

La evidencia de canales diferentes de sodio y potasio también ha sido fortalecida por Armstrong y Bezanilla y Keynes y Rojas quienes describieron en sus experimentos que la proteasa (mezcla de varias enzimas proteolíticas) aplicada por perfusión interna en el axón de calamar hacía desaparecer la inactivación al sodio sin afectar la conductancia al potasio. Es tos experimentos se han continuado hasta ahora.

Más recientemente se ha logrado aislar en membranas artificiales las entidades identificadas como canales de sodio - (Villegas R. et al (1977)).

#### 4.2 CANALES

Las propiedades básicas que caracterizan los canales (Hille 1976) son por un lado, la excitabilidad, es decir, su capacidad de reaccionar a cambios en el potencial de membrana y por otro lado, su permeabilidad, o sea, su capacidad de permeabilidad.



mitir el paso de iones a través de la membrana discriminando entre diversas especies. La cinética de apertura y cierre del canal ante cambios en el potencial de membrana y su selectividad al paso de iones son características de cada canal.

#### 4.2.1 SELECTIVIDAD

El problema de la selectividad no fue contemplado en toda su importancia en un principio, lo que dió lugar a algunas confusiones. Nuevos datos parecían contradecir las principales conclusiones de Hodgkin y Huxley (1952.d). Así por ejemplo, Tasaki, Lerman y Watanabe (41) describieron en 1969 el efecto de los cationes divalentes sobre la excitación del axón de calamar. Encontraron que en una solución sin sodio, el axón es capaz aún de presentar potenciales de acción; con ello resulta que el proceso de excitación en los axones no depende de una sola especie iónica específica (41). Se observa en las curvas obtenidas al graficar voltaje vs tiempo, que el máximo de la corriente entrante en estas condiciones es alrededor de  $15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , mientras que con sodio es de  $1 \text{mA}/\text{cm}^2$ .

La membrana tiene regiones de distinta selectividad iónica. Se denomina sistema de sodio (o canales de sodio) al conjunto de regiones con mayor selectividad al sodio que al potasio y otros iones; y sistema de potasio (o canales de potasio) al conjunto de regiones selectivas al potasio y otros iones.

Conocido el potencial de membrana por medio de la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz,

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K(K)_o + P_{Na}(Na)_o + P_a(Cl)_i}{P_K(K)_i + P_{Na}(Na)_i + P_a(Cl)_o}$$

al reducir las concentraciones interna de sodio y la externa de potasio a cero, y al considerar la membrana impermeable al cloro ( $P_{Cl} = 0$ ) la ecuación del potencial de membrana queda reducida a:

$$V = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na}(Na)_o}{P_K(K)_i}$$

Con los valores de las concentraciones externa de sodio e interna de potasio, dados en la tabla 1, el cociente  $P_K/P_{Na}$  toma un valor de 1/12 para los axones de calamar.

En algunas fibras nerviosas, como las mielinizadas, donde la perfusión interna no se realiza fácilmente, la permeabilidad de un ión  $x$  con respecto a la de sodio, se obtiene de la diferencia del potencial de equilibrio del ión  $x$  ( $V_x$ ) (catión monovalente) menos el potencial de equilibrio del sodio ( $V_{Na}$ ), esto es:

$$V_x = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_x(X^+)_o}{P_{Na}(Na)_i}$$

$$V_{Na} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na}(Na)_o}{P_{Na}(Na)_i}$$

$$V_x - V_{Na} = \frac{RT}{F} \left[ \ln \frac{P_x(X^+)_o}{P_{Na}(Na)_i} - \frac{P_{xNa}(X^+)_o}{P_{Na}(Na)_i} \right]$$

$$= \frac{RT}{F} \ln \frac{P_x(X^+)_o P_{Na}(Na)_i}{P_{Na}(Na)_i P_{Na}(Na)_o}$$

$$V_x - V_{Na} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_x(X^+)_o}{P_{Na}(Na)_o}$$

En base al 'principio de independencia' (un ión atraviesa la membrana independientemente de la presencia de otros iones) también puede calcularse  $P_x/P_{Na}$  para cationes monovalentes,

con:

$$\frac{I_x}{I_{Na}} = \frac{P_x(X^+)_o - (X^+)_i \exp \frac{VF}{RT}}{P_{Na}(Na^+)_o - (Na^+)_i \exp \frac{VF}{RT}}$$

En la tabla siguiente (tabla 4) se presentan los valores para las permeabilidades relativas de los canales de sodio a varios iones en un axón de calamar.

Tabla 4. Permeabilidades relativas de cationes monovalentes y de aniones, calculadas por medio de  $P_x/P_{Na}$ , en los canales de sodio.

<u>ION</u>	<u><math>P_x/P_{Na}</math></u>
Na	1
Li	1.1
Amonio	0.27
Guanidio	0.25
Potasio	0.083
Cs	0.016
Rb	0.025
Colina.	0.014
Tl	0.33

En esta tabla se observa que los iones de sodio pueden pasar a través de la membrana con una permeabilidad relativamente alta sobre otros iones por medio de los canales de sodio.

La permeabilidad del canal de sodio no es constante, está en función de la concentración interna del potasio: cuando se reduce la concentración interna del potasio, la permeabilidad disminuye (5). Hille (29) observó experimentalmente que si a los cationes permeantes a los canales de sodio se les agrega el radical  $-CH_3$ , éstos se tornarán impermeantes, pues es debido a que aumentan de tamaño (por lo menos de ión no hidratado).

La permeabilidad relativa de los canales de sodio de la membrana de un axón de calamar, determinada por  $P_{Na}/P_K$  decrece cuando la concentración interna del potasio se reduce. Los cambios de la permeabilidad relativa dependen de la concentración interna del ión permeante (16).

De manera análoga a como es calculada la selectividad (permeabilidad relativa) de los canales de sodio, Hille (29) calculó la de los de potasio. Estos canales, en condiciones normales, presentan una mayor permeabilidad relativa que los de sodio. El canal de potasio presenta las permeabilidades relativas mostradas en la tabla 5.

Tabla 5. Permeabilidades relativas de un ión x con respecto a la de potasio para los canales de potasio.

<u>ION</u>	<u>P<sub>x</sub>/P<sub>K</sub></u>
Li	0.018
Na	0.01
K	1
Tl	2.3
Amonio	0.13
Cs	0.077
Metilamonio	0.021

Si observamos las tablas 4 y 5, vemos que el potasio, talio y Rb son bastante permeables a los canales de sodio, como a los de potasio. Algunos cationes interfieren con el movimiento de  $K^+$  a través de los canales de potasio.

Cuando el axón se le perfunde internamente con 100mM de  $Na^+$ , la corriente de potasio ( $I_K$ ) se reduce a aproximadamente la mitad de su amplitud, en condiciones normales. Al sustituir el  $K^+$  del interior por  $Rb^+$ , la  $I_K$  no se reduce tan pronunciadamente como con el  $Na^+$ . El  $Cs^+$  perfundido reduce también la  $I_K$ . El  $Cs^+$  es impermeante a los canales K. El  $Li^+$  tiene el mismo efecto que  $Na^+$  u  $Cs^+$ , cuando se perfunde a una concentración de 100mM.

El canal de potasio es muy permeable al sodio, cuando el potencial de membrana se eleva a más de 160mV. Se cree que - ésto sea debido a una distorsión estructural reversible del

Filtro selectivo. Otra posibilidad estriba en que esa energía eléctrica es suficiente para deshidratar al  $\text{Na}^+$  y como consecuencia podrá pasar libremente a través del canal de K (23).

Algunos modelos sobre la permeabilidad relativa de un canal se han derivado de la teoría de Eyring, por lo que los analizaremos en la siguiente sección.

#### 4.2.1. a.1 TEORIA DE EYRING

Como ya se ha visto en secciones anteriores, la representación eléctrica de la permeabilidad pasiva de iones es un circuito óhmico. Este circuito equivalente ha sido muy útil en el estudio de las propiedades de cable y del análisis de respuestas eléctricas en las células excitables. Pero esta representación no es suficiente para aclarar todos los mecanismos de permeabilidad. Se necesita otro marco teórico que pueda describir el movimiento iónico en términos de la estructura que podrían presentar los canales iónicos.

Las membranas excitables, como ya se ha mencionado contienen diversos tipos de canales iónicos, y se cree que cada uno tiene una formación característica. Estos canales permiten el paso a través de la membrana a varios millones de iones por segundo y presentan una selectividad iónica debido a la carga y/o tamaño de cada ión permeable. Los flujos iónicos se basan en dos tipos de teorías:

- a) Difusión libre (cuando los iones se mueven continuamente a través de un medio sin estructuras).
- b) Teoría de reacción (cuando los iones se transportan pasando por una serie de barreras energéticas discretas).  
Con ayuda de esta teoría de reacción se da una visión estructural y un modelo dinámico molecular más realista.

#### 4.2.1 a.2 DIFUSION LIBRE

Dentro de esta teoría, el movimiento iónico es continuo e incluye propiedades temporales; éste se describe por medio de las ecuaciones de Nernst-Planck. La fuerza iónica se expresa como el gradiente del potencial electroquímico. La razón de flujos unidireccionales de un ión 's', es igual al cociente de las actividades electroquímicas de ese ión, i.e.:

$$\frac{J_s}{J_s} = \frac{(A_s)_i}{(A_s)_o} \exp \frac{zVF}{RT}$$

donde  $A_s$  representa la actividad iónica de S, i y o se refieren a interior y exterior; V es el potencial de membrana; z, la valencia del ión; R, la constante universal de los gases; T, la temperatura absoluta y F, la constante de Faraday.

Algunos sistemas de difusión libre satisfacen el principio de independencia (sección 3.2). Esta condición se establece para membranas de grosor menor a 10nm. Las membranas se postulan homogéneas y el campo eléctrico dentro de ella, de lado a lado, constante. Con estas suposiciones, los flujos iónicos

se pueden calcular con la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz.

Para el caso de  $\text{Na}^+$ :

$$I_{\text{Na}} = V \frac{F^2}{RT} P_{\text{Na}} \frac{(\text{Na})_o - (\text{Na})_i \exp VF/RT}{1 - \exp VF/RT}$$

Cuando dos iones concursan por el mismo canal iónico, su permeabilidad relativa ( $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$ ) se determina:

$$V_r = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\text{Na}} (\text{Na})_o + P_{\text{K}} (\text{K})_o}{P_{\text{Na}} (\text{Na})_i + P_{\text{K}} (\text{K})_i}$$

donde las P's no se consideran constantes.

Estas dos últimas ecuaciones han sido utilizadas por bioquímicos desde hace aproximadamente 30 años.

#### 4.2.1 a3 DIFUSION EN FILA

La teoría de difusión libre es inadecuada para la descripción de los flujos iónicos a través de la membrana biológica. Hodgkin y Keynes (29) encontraron en 1955, que la razón de flujos (difusión libre), no incluía al caso del potasio. La ecuación que lo describía se veía afectada por un exponente i.e.:

$$\frac{\bar{J}_k}{\bar{J}_k} = \left\{ \frac{(S)_i}{(S)_o} \exp \frac{(VF)}{(RT)} \right\}^{n'}$$

donde  $n' = 2.5$

Para sistemas donde  $n' > 1$ , se supone que el movimiento iónico se hace por medio de paquetes multimoleculares, donde  $n'$  representará un valor promedio aproximado.

El canal iónico se considera formado por sitios de unión iónica que son capaces de saturarse. Esto se presenta clara-



mente en los canales de K, cuando se cambian las concentraciones interna y/o externa (sección 4.2.1) o cuando el potencial de membrana es muy elevado (sección 4.2.1).

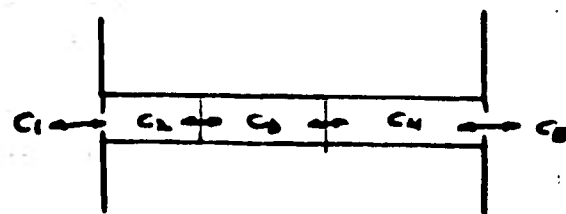
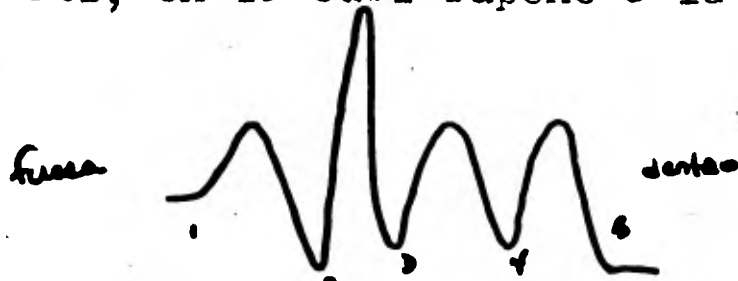
#### 4.2.1 a.4 MODELO DE LA TEORIA DE REACCION

Danielli fué el primero en describir la permeabilidad de la membrana por medio de una serie de barreras energéticas. La teoría de reacción química presenta constantes de reacción (k) en términos de los cambios de energía potencial de los reactantes.

El concepto fundamental de la teoría de Arrhenius, estriba en que los reactantes atraviesan una barrera de alta energía potencial (estado de transición), reaccionan, obteniéndose así los productos. La constante de reacción 'k' se obtiene como:  $k = Q \exp (-\Delta G_{\ddagger}^{\dagger} / RT)$

donde Q representa un factor de frecuencia relacionado con la frecuencia de vibraciones atómicas y  $\Delta G_{\ddagger}^{\dagger}$  es la energía libre de activación.

Eyring formalizó estos conceptos, aplicándolos a varios procesos como: Bioluminiscencia, difusión, etc. Postuló en 1949, una ecuación similar a la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz, en la cual supone a la membrana formada por



donde C's denota la concentración de la partícula que se difunde.

Eyring incluye en la ecuación de la constante de reacción 'k', el efecto del campo eléctrico de la membrana en cada barrera energética, añadiendo el potencial electrostático del ión, i.e. la 'k' se postula dependiente del voltaje en la siguiente forma:

$$k_i = b_i \exp ( - \alpha_i z V \bar{V} / RT )$$

donde  $b_i$  representa una constante, cuando  $V = 0$ ;  $\alpha_i \neq 0$  es la diferencia de potencial  $V$  que experimenta cada ión cuando cambia de estado (de transición).

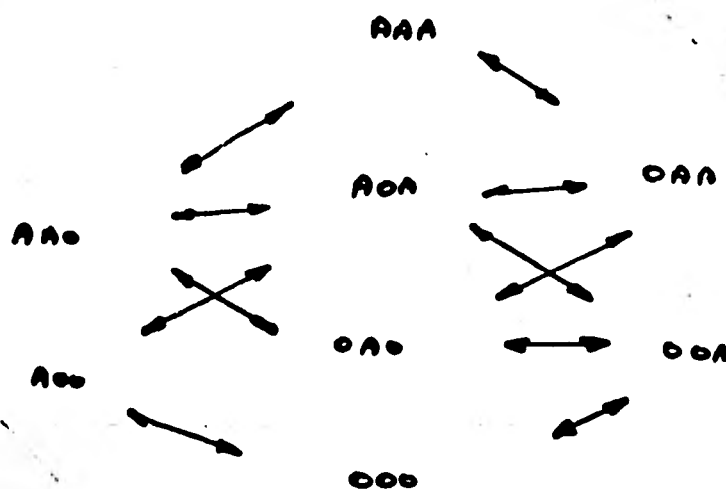
Eyring postula:

- 1) Una serie de ecuaciones lineales aplicadas a las canales de  $N_a$ ,
- 2) La idea de que un poro pueda tener sitios de unión localizados en la parte interna de la membrana,
- 3) Cada canal puede aceptar más de un ión.

Hille (29) propone un modelo para el canal de  $N_a$  en el que supone tres sitios de unión ión-poro y ocho estados, por lo tanto hay  $2^4$  constantes de reacción (no todas independientes). (Figura 32).

Figura 32. Modelo Cinético para un canal de sodio.

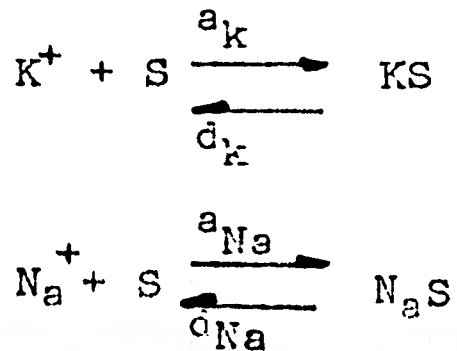
El canal de sodio presenta tres sitios donde un ión puede unirse al canal. Cuando el canal está desocupado, se representa con la letra O y cuando se ocupa por un ión, con la letra A. Las flechas representan las transiciones posibles entre cada estado del canal de Na. Para este modelo se requiere gran simetría en las concentraciones internas y externas.



#### 4.2.1. a.5 APLICACION DE LA TEORIA DE REACCION

Es posible distinguir conceptualmente algunos tipos de mecanismos de permeabilidad relativa en base a la cinética que se presenta.

Suponiendo que los iones de  $K^+$  y  $Na^+$  pretenden ocupar el mismo sitio de unión (S) de un canal, podemos escribir la ecuación química siguiente:



donde  $a$  y  $\bar{d}$  representan las constantes de transición (reacción) de asociación y disociación, respectivamente. Los subíndices indican cuando se trata de Na y K.

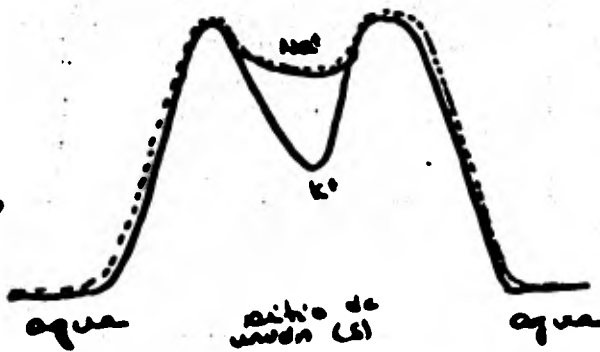
Bezanilla y Armstrong (13) definen la razón de cada ión ( $K^+$  y  $Na^+$ ) colocados en el sitio de unión (s) como:

$$\frac{(KS)}{(NaS)} = \frac{(K) a_k d_{Na}}{(Na^+) a_{Na} \bar{d}_k}$$

Al analizar esta ecuación, se presentan dos casos:

- a) Un caso límite de la selectividad de  $K^+$  es cuando  $a_K = a_{Na}$  con  $d_{Na} > d_K$ ; a este caso lo llaman selectividad de enlace. El diagrama de energía potencial que corresponde a este caso se presenta en la figura 33.

Figura 33. Diagrama de la energía potencial de la selectividad iónica.



Al suponer que  $(Na^+) = (K^+)$  en ambos lados de la membrana, la ecuación se reduce a:

$$\frac{(KS)}{(NaS)} = \frac{d_{Na}}{d_K}$$

$$J_K = (KS) d_K t$$

$$J_{Na} = (NaS) d_{Na} t$$

donde  $J_K$  y  $J_{Na}$  representan los flujos de potasio y sodio a través de la membrana y  $t$ , el tiempo que tardan  $K^+$  y  $Na^+$  en atravesarla después de que se han separado del sitio de unión (S).

Al suponer a 't' igual para el caso de ambos iones y al combinar las tres ecuaciones arriba mencionadas, tenemos:

$$(KS) = \frac{J_K}{d_K}$$

$$(NaS) = \frac{J_{Na}}{d_{Na}}$$

$$\frac{J_K/d_K}{J_{Na}/d_{Na}} = \frac{d_{Na}}{d_K}$$

$$\frac{J_K d_{Na}}{J_{Na} d_K} = \frac{d_{Na}}{d_K}$$

$$\frac{J_K}{J_{Na}} = \frac{d_{Na} d_K}{d_K d_{Na}} = 1$$

$$J_K = J_{Na}$$

i.e. cuando la disociación del  $K^+$  al sitio de unión es muy lenta, ésta está compensada por un mayor número de sitios ocupados por  $K^+$ . Según Armstrong (13) este tipo de selectividad no es muy apropiado para representar un mecanismo selectivo para un poro.

b) Otro caso límite: Cuando  $d_K = d_{Na}$  y  $a_{Na} \neq a_K$ . A este caso Armstrong (13) le llama de exclusión selectiva.

El diagrama de energía potencial se presenta en la siguiente figura (figura 34).

Figura 34. Diagrama de energía potencial. (Explicación dentro del texto).



Las energías utilizadas para las disociaciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  son iguales y las constantes de asociación para cada ión son diferentes; como el  $\text{Na}^+$  tiene que vencer una mayor barrera energética para llegar a 'S', entonces este ión se excluye del poro (exclusión selectiva).

Las ecuaciones correspondientes a este caso (exclusión selectiva) son:

$$\frac{(KS)}{(NaS)} = \frac{(K^+) a_k d_{Na}}{(Na^+) a_{Na} d_t}$$

con  $(Na^+) = (K^+)$

$$\frac{(KS)}{(NaS)} = \frac{a_k}{a_{Na}} \quad \text{y} \quad \frac{J_k}{J_{Na}} = \frac{(KS) d_k t}{(Na) d_{Na} t} = \frac{a_k}{a_{Na}}$$

i.e. cuando las constantes de disociación son iguales para ambos iones, la razón de flujos está determinada por el coeficiente de las constantes de asociación.

De los dos casos, Armstrong (13) concluye que el mecanismo de selectividad de un canal requiere de un filtro que debe trabajar por exclusión selectiva.

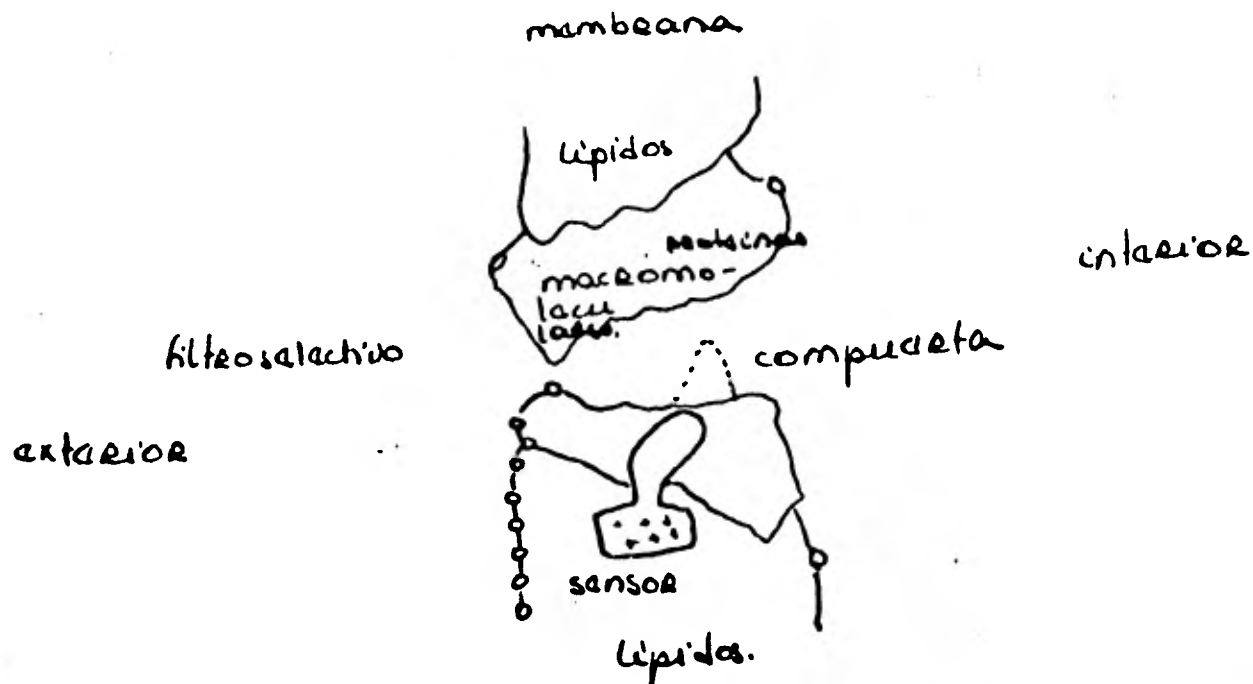
#### 4.3 ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO DE LOS CANALES DE SODIO Y POTASIO.

Se supone que los iones atraviesan la membrana por medio de canales de estructura fija. Estos canales probablemente es tén formados de proteínas principalmente. Un canal presenta una sección estrecha llamada filtro selectivo, localizada en la parte externa de la membrana. Este filtro, según Armstrong (31) presenta un mecanismo de exclusión selectiva (sección 4.2.1. a.5) que discrimina entre las distintas especies iónicas.

Un estímulo aplicado a un sistema excitable ocasiona cambios en su formación estructural. Estas conformaciones que se mueven se les llama 'compuertas', pues son las que abren o cierran cada poro. Esta compuerta se supone que se localiza en la parte interna de la membrana. Se cree que al moverse las cargas superficiales de la membrana modifican el campo eléctrico. La compuerta se mueve debido a la existencia de un sensor de voltaje (probablemente  $Ca^{++}$ ).

En la figura 35 se presenta un modelo de la posible estructura de un canal (26) cuyas dimensiones y forma todavía no se conocen.

Figura 35. Estructural de un canal.



En este modelo, los sitios de unión de los canales tienen una alta concentración de carga negativa.

La interpretación cinética de un filtro selectivo para un canal de sodio, la propone Hille (44) quien presenta un diagrama de difusión compuesto por cuatro barreras energéticas. El modelo de Hille está basado en la teoría cinética multicompartamental de Eyring et al.

En este modelo, cada canal tiene cuatro barreras energéticas. El filtro se representa por la barrera energética de mayor altura (barrera 2-3) (figura 36).



Figura 36. Perfil de cuatro barreras energéticas de un canal de sodio. Los números corresponden a las posiciones que toma cada ión (con respecto a la figura 37). En particular, el pozo 2 es el sitio de unión (del ión con el canal) y la barrera 2-3 representa el filtro selectivo (44).

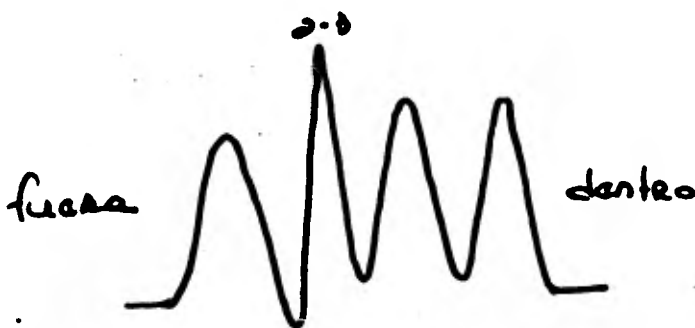
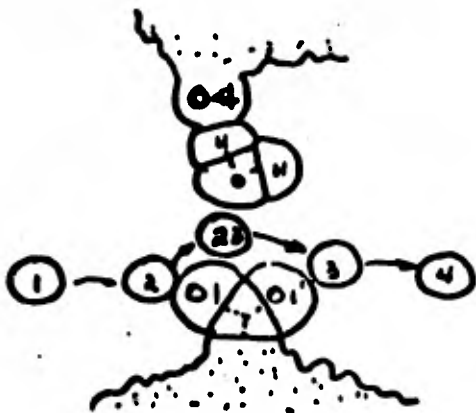


Figura 37. Interpretación molecular de los sitios de unión (ión permeable con el canal) y el filtro selectivo. El ión (crystal de  $\text{Na}^+$ ) representado por un círculo avanza de la posición 1 a la 4. El filtro contiene oxígenos en  $\text{O}1$ ,  $\text{O}1'$  y  $\text{O}4$ . Una molécula de agua ( $\text{HOH}$ ) se une a  $\text{O}4$  formando un enlace  $-\text{H}$ .



Hille supone que un canal está formado por ocho oxígenos colocados en las paredes del canal; seis de los cuales se encuentran en un mismo plano. En la figura 37 se presenta el aspecto lateral de un filtro selectivo con sólo tres oxígenos ( $O_1$ ,  $O_1'$  y  $O_4$ ) de los ocho.  $O_1$  y  $O_1'$  pertenecen a un grupo carboxilo.  $O_1$  representa un sitio aniónico de gran fuerza eléctrica.

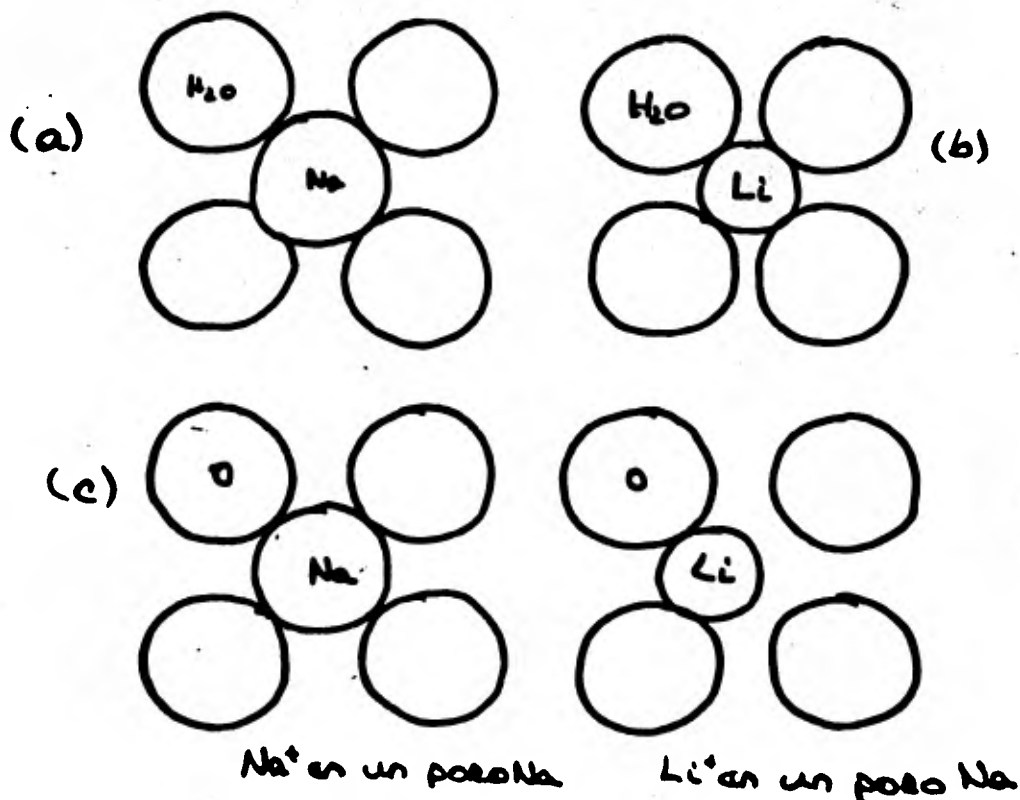
La interpretación física de la hipótesis de Hille es la siguiente:

Cuando un cristal del tamaño del  $Na^+$  hidratado avanza de la posición externa a la interna, una de las moléculas de agua que hidratan al ión formará un enlace hidrógeno en  $O_4$  (figura 37). En la posición 1, el ión se encuentra hidratado, a medida que se acerca a  $O_1$  (oxígeno del ácido carboxilo), se deshidrata parcialmente. En la posición 2, se restablece energéticamente (el ión se une a la carga negativa de  $O_1$ ). El  $Na^+$  todavía en contacto con  $O_1$ , pasa a la región estrecha del filtro (2-3), cediendo más moléculas de agua. En la posición 2-3 se forma un complejo altamente energético. La energía de este complejo depende de cada ión que pueda atravesar el canal. A medida que avanza, el catión recupera un poco de agua cuando ya ha atravesado la parte estrecha del filtro selectivo. Así llega el ión al interior celular, pasando por otras barreras energéticas no tan altas como la 2-3.

Para calcular el tamaño del filtro de selección, se tomó en cuenta el diámetro del ión parcialmente hidratado que pueda atravesar la membrana. Se propone el tamaño del filtro selectivo para los canales de sodio aproximadamente de  $3.1 \times 5.1 \text{ \AA}$ .

Por otro lado, Mullins propone que cada canal de sodio debe estar formado por cuatro subunidades (figura 38). Para que un canal pueda abrirse, el ión debe interaccionar con cada una de las estructuras del canal. Si alguna subunidad del canal no interacciona con el ión, éste permanecerá cerrado; la figura 38 b, cuando el litio y el sodio (figura 38 c) intentan atravesar dicho canal (10).

Figura 38. Interacción de los iones de Na y Li en un canal de sodio.



Los iones de sodio son 17 veces menos permeables que el  $K^+$  en los canales de potasio (13) y el  $Cs^+$  casi no es permeable. Estos resultados llevan a la conclusión de que los poros de  $K^+$  tienen una boca interna ancha y no muy selectiva, que admiten  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Cs^+$  y  $TEA^+$  y otros iones (13).

El diámetro interno de la boca de un canal de potasio se cree que es de 18 Å aproximadamente, siendo del tamaño del ión TEA. Como el  $K^+$  es de menor tamaño, probablemente cuando se encuentre en la boca del canal, éste esté totalmente hidratado para que pueda interaccionar con sus paredes.

La boca de un canal de potasio se supone que se prolonga hacia un orificio más estrecho, de 2.6 a 3.0 Å aproximadamente de diámetro. Este diámetro es suficientemente ancho para que los iones  $K^+$  y  $Rb^+$  transiten, y muy pequeño para poder interaccionar con todas las paredes del canal.

Para los canales de potasio, Mullins (29) propone un filtro selectivo constituido por oxígenos en las paredes. Este filtro tiene un diámetro de 3.0 a 3.3 Å en su parte interna y más pequeño que el de los canales de sodio. Como consecuencia, el filtro selectivo presenta una mayor selectividad que la boca del mismo canal.

Los oxígenos del filtro selectivo de los canales de potasio se encuentran fijos en las paredes rígidas, por lo que es imposible que admitan iones más pequeños como Na y Li; éstos últimos encuentran una gran barrera energética al no interaccionar con todos los oxígenos.

El  $K^+$  parcialmente deshidratado interacciona con los oxígenos del filtro selectivo; con esta interacción, los iones  $K^+$  logran atravesar la membrana a través de los canales de K. Basado en la teoría de Eyring, Armstrong (1975) propone una serie de diagramas donde muestra el comportamiento de la energía potencial de los iones Na y K en los filtros selectivos de los canales (Figura 39). El potasio se une al poro (figura 39 (1) y 39 (3) ); en cambio en la 39 (2), los iones de sodio se unen al sitio (s). Las constantes de transición (asociación) se indican con las letras  $a_K$  y  $a_{Na}$  para el caso de potasio y sodio, respectivamente; para las constantes de disociación se indican con la letra 'd'; estas constantes indican la rapidez con la que un ión llega o sale de S (2).

Figura 39. Perfiles energéticos de los iones Na y K en tres poros hipotéticos, cada poro tiene su sitio de unión (S).



Muy poco es lo que se sabe sobre el funcionamiento y estructura de las compuertas. En el modelo de Hodgkin y Huxley, las conductancias del sodio y del potasio se ajustan como:

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h \quad g_K = \bar{g}_K n^4$$

donde  $\bar{g}_{Na}$  y  $\bar{g}_K$  son los máximos valores para las conductancias del sodio y del potasio, respectivamente; 'm' y 'h' son los factores de activación e inactivación para los canales de sodio y 'n' es el factor de activación para los canales de potasio (capítulo 3).

Existen dos tipos de compuertas, las de activación y las de inactivación. Ambas compuertas deben estar abiertas para que el canal conduzca (22). La compuerta de activación tiene una cinética muy rápida (para abrirse y cerrarse). Se encuentra cerrada cuando la membrana está en reposo; se abre rápidamente cuando se aplica un pulso depolarizante a la membrana; es así como se aumenta la permeabilidad de la membrana. Esta compuerta de activación se cierra cuando ocurre la repolarización.

La compuerta de inactivación es más lenta y su dependencia con el voltaje es contraria a la de activación. La inactivación ocurre después de cierto tiempo que se ha iniciado la depolarización de la membrana.

Hodgkin y Huxley postularon que estas compuertas de activación e inactivación funcionan independientemente. Cuando al axón se le perfunde internamente con alguna droga, sólo el funcionamiento de alguna compuerta es inhibido. Podemos citar, a la prona, cuando se le perfunde, inhibe la inactivación del sodio; esto hace suponer que existe independencia en el funcionamiento de las compuertas.

Hoyt (44) sugiere que las compuertas presentan un posible acoplamiento fisiológico; esto es sugerido del hecho de que cuando el axón se hiperpolariza, ninguna de las dos compuertas funciona. Se supone que primero debe ocurrir la activación (depolarización) para observar la inactivación (capítulo 3).

Como ya se ha visto, las compuertas se mueven bajo la acción de un campo eléctrico y su movimiento originará que el canal quede abierto o cerrado. Se cree que las compuertas se encuentran cerca de la superficie de la membrana que tiene contacto con el axoplasma.

## CAPITULO 5. CORRIENTES DE COMPUERTA

### 5.1 INTRODUCCION

Todos los datos recopilados en el capítulo 4, en conjunto, apoyan la idea de la existencia posible de los canales iónicos de sodio y potasio en las membranas. Keynes y Rojas (1973 y 1974) por un lado y Armstrong y Bezanilla (1975 y 1977), por otro, han encontrado, con la ayuda de la técnica de fijación de voltaje, que existen corrientes confinadas dentro de la membrana, cuyo comportamiento es no lineal y su naturaleza no parece ser de iones libres. Estas corrientes llamadas corrientes de compuerta han sido asociadas a los cambios de las conductancias de la membrana al sodio. Las corrientes de compuerta se llegan a observar cuando se bloquean las corrientes iónicas de sodio y potasio, con TTX y Cs, respectivamente. Se cree que las corrientes de compuerta no son corrientes ni de sodio ni de potasio. Pero el argumento quizá más importante sea el hallazgo de que una cierta cantidad de carga desplazada durante un pulso breve (menor de 1 mseg) siempre permanece constante, es decir, al integrar la curva de corriente vs tiempo obtenida durante el suministro del pulso, el área bajo la curva representa la carga; esta área es similar a la obtenida cuando se termina el pulso. Esto desde luego no ocurre con las corrientes iónicas de sodio y potasio que se desplazan de acuerdo a su gradiente electroquímico. Estos resultados han sido interpretados por ambos grupos de investigadores como cargas confinadas en la membrana del axón.



Cuando la concentración de Na del medio externo se reduce al 5% de su valor normal, la corriente de sodio ( $I_{Na}$ ) se reduce. La  $I_{Na}$  y la corriente de compuerta ( $I_g$ ) están relacionadas. Esto es cuando  $Zn^{++}$  se aplica al líquido de perfusión o al líquido externo. La  $I_{Na}$  e  $I_g$  decrecen en proporción cuando  $Zn^{++}$  se aplica al líquido de perfusión y desaparecen completamente después de varios minutos. Cuando al interior del axón se le quita el  $Zn^{++}$ , ambas corrientes se recuperan casi al mismo tiempo y por completo, sólo la activación del sodio se retrasa o nunca aparece.

Cuando el  $Zn^{++}$  (10mM  $ZnCl_2$ ) se aplica externamente, ambas corrientes ( $I_{Na}$  e  $I_g$ ) se retrasan pero no se eliminan.

Meves (1974) ha reportado que el glutaraldehído disminuye las corrientes de compuerta, al igual que lo hace con la corriente de sodio.

Toda esta evidencia hace prometedor el estudio de estas corrientes aun cuando su papel de compuertas no ha podido ser definitivamente establecido.

Tampoco se trata de corrientes capacitativas lineales, ya que se obtienen promediando pulsos positivos y negativos de voltaje. De hecho, se observan cuando tanto los elementos iónicos como los capacitivos lineales son eliminados. La amplitud máxima de la corriente de compuerta es pequeña ( $10 \mu A/cm^2$ ), mientras que la de sodio toma un valor de  $1 mA/cm^2$ . Cuando la co

rriente de sodio se reduce, se observa que el máximo de la corriente de compuerta le precede.

Se ha observado que la capacidad de la membrana del axón de calamar tiene una gran dependencia del voltaje. La capacidad de la membrana se mide cuando se integra la corriente producida por un escalón de voltaje. Para un capacitor ideal en paralelo con una resistencia, la integral del escalón aplicado es la suma de la componente capacitativa y una corriente estacionaria. Si el capacitor es imperfecto, la corriente capacitiva se prolonga debido a la lenta polarización del dieléctrico. La pendiente de la curva decrece progresivamente a medida que la capacidad de la membrana decae, es decir, cuando la corriente de compuerta declina. Se cree que esa lenta polarización de la membrana se deba a las componentes dieléctricas que se relacionan con estructuras que originan la corriente de compuerta.

La capacidad de la membrana aumenta de  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  a los  $-70\text{mV}$  a un valor aproximadamente de  $1.35 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  cerca de los  $-20\text{mV}$  y decrece cuando los valores del voltaje son positivos. Cerca de los  $-30\text{mV}$ ; la capacidad de la membrana tiene su valor máximo.

El gran interés que han despertado dichas corrientes, se debe a que quizás sean el resultado del movimiento de "dipolos de la membrana", postulados por Hodgkin y Huxley (1952 d) para explicar el origen de los cambios de las conductancias.

Algunos aspectos de la cinética de estas corrientes de compuerta son comparables a la activación e inactivación del sodio, propuesta por Hodgkin y Huxley, además su curso temporal y los valores del potencial en los cuales se detectan, las hacen comparables con dichos mecanismos.

Se ha estado estudiando la cinética y el estado estacionario de las conductancias de las membranas excitables. El estado estacionario de las conductancias es semejante en todas las membranas excitables de nervio y músculo. La cinética es distinta en cada una y sólo bajo condiciones apropiadas, que las describiré más adelante, las membranas se comportan como el esquema de Hodgkin y Huxley (capítulo 3).

## 5.2 TECNICA USADA PARA MEDIR LA CORRIENTE DE COMPUERTA

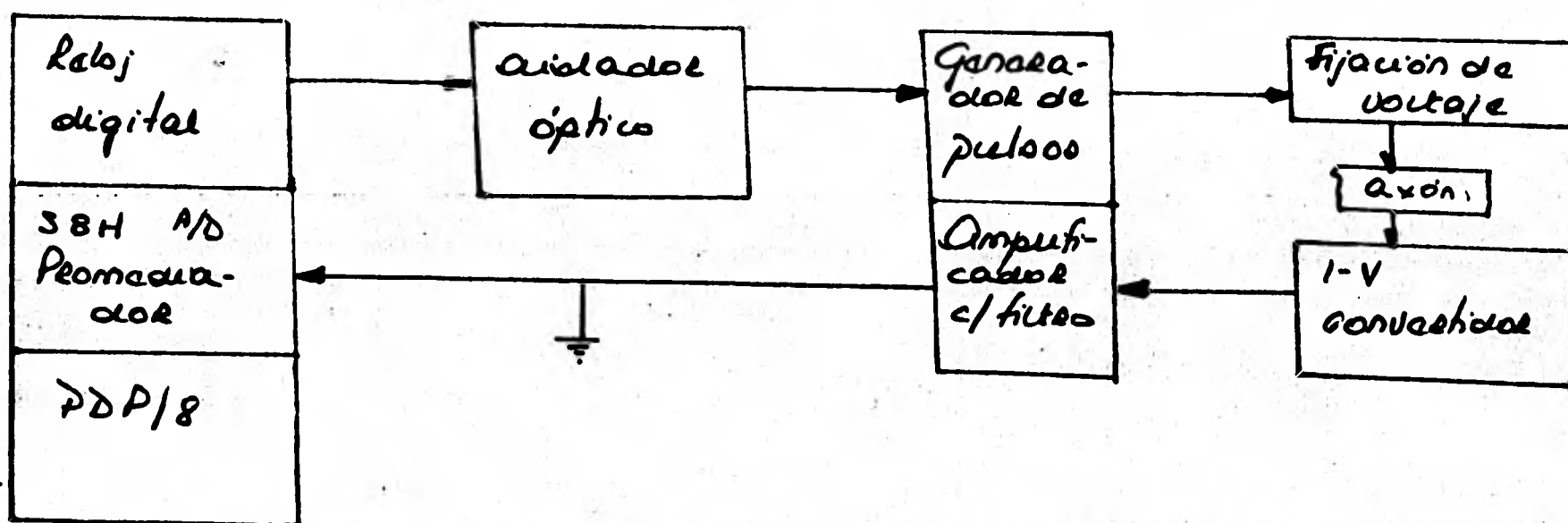
Los elementos esenciales de la técnica para poder medir la corriente de compuerta son:

- a) Eliminar los iones permeables ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) de ambas soluciones (externa e interna).
- b) Sustraer la porción lineal de la corriente capacitiva.
- c) Promediar las medidas obtenidas para mejorar la razón señal-ruido.

El aparato montado para poder medir la corriente de compuerta se presenta en la figura 40. La parte digital y la eléctrica están unidas por un aislador óptico. La corriente registrada del axón de calamar se digitaliza, se promedia y se registra en una cinta magnética de la computadora PDP/8. Las gráficas se obtienen de 128 puntos registrados con un intervalo de 5 microsegundos y de otros 128 puntos cada 50 microsegundos.

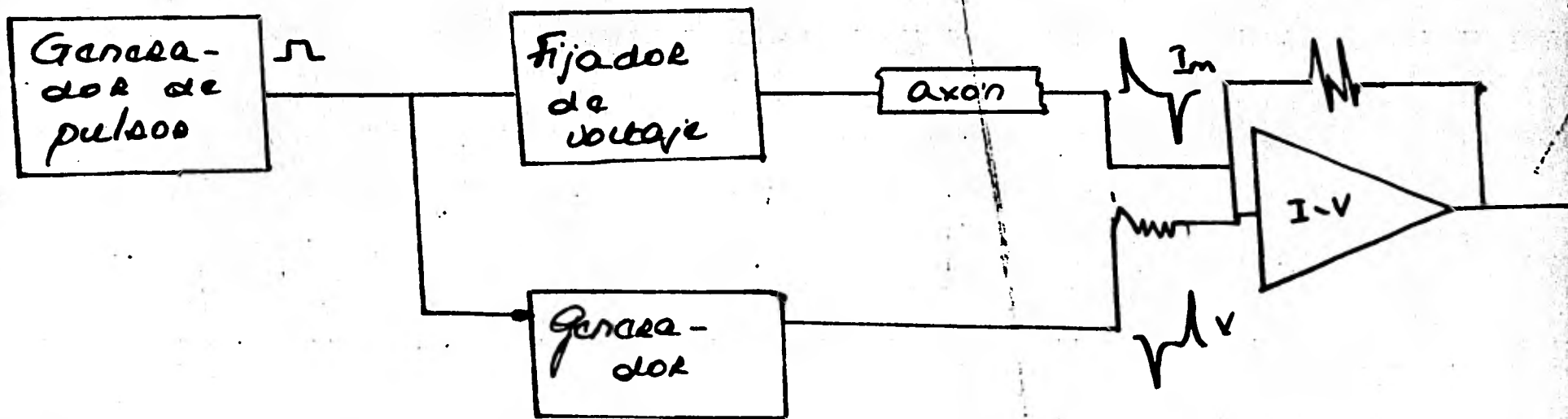
Como medida preventiva contra la saturación del convertidor A/D, se eliminan los primeros puntos registrados entre los 20 y 50 microsegundos que se suceden cuando se imprime el escalón depolarizante.

Figura 40. Diagrama del aparato montado para registrar la corriente de compuerta.



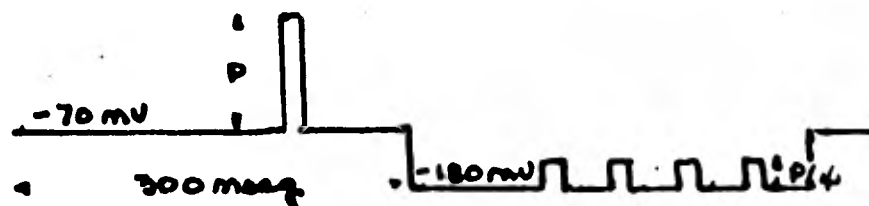
Este aparato consta de un generador de transitorios (circuito RC y amplificadores operacionales) para poder producir una corriente similar (según Armstrong) a la que procede del nervio, pero de signo contrario. Las dos corrientes (la del nervio y la del generador) se suman en el convertidor I-V (corriente voltaje). El voltaje de salida del nervio nunca satura el convertidor A/D. La salida de voltaje del generador está en función (lineal) con el de entrada.

Figura 41. Generador.



Otra ventaja de esta técnica, consiste en cancelar una cantidad significativa de ruido sobre la señal.

La secuencia de pulsos que se aplican para medir la corriente de compuerta es la siguiente:



La corriente de los cuatro pulsos de magnitud  $P/4$  se resta digitalmente del pulso positivo de corriente (P).

La sustracción digital de la señal de la corriente permite el uso cíclico de la misma secuencia de pulsos.

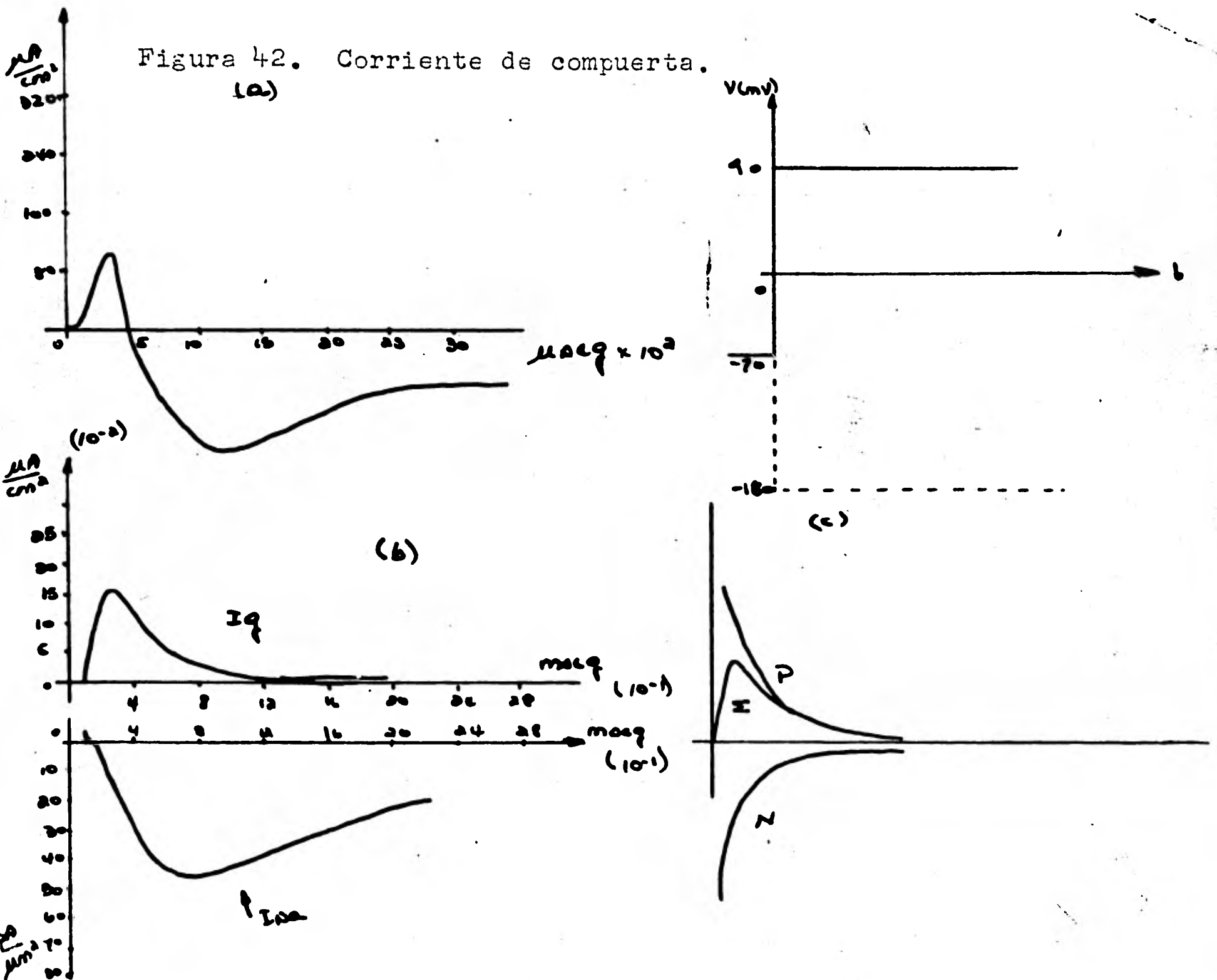
### 5.3 ANALISIS DE LA CORRIENTE DE COMPUERTA

Como ya se ha visto, en todo sistema excitable, por lo menos - un tipo de canal cambia su formación molecular estructural como respuesta a un 'estímulo' fisiológico como el de un campo eléctrico, transmisor químico o algún otro agente. Específicamente, en los canales de sodio y de potasio, se abren y se cierran como respuesta a los cambios de voltaje en la membrana. Se puede suponer que ciertas partes estructurales de la membrana tienen carga y al ser aplicado un campo eléctrico, és-

tas se mueven cambiando de posición (30). Este movimiento es a lo que se llama corriente de compuerta.

En la figura 42 (45) se presenta la corriente de compuerta ( $I_g$ ), cuando la membrana es depolarizada, eliminando las corrientes iónicas por medio de drogas (capítulo 2), y la corriente capacitativa lineal (promediando pulsos positivos y negativos de voltaje).

Figura 42. Corriente de compuerta.



- A) Corriente de compuerta ( $I_g$ ) y corriente de sodio ( $I_{Na}$ ) de un axón perfundido internamente con 290 mM-CsF sacarosa. La solución externa contiene sólo el 5% de la concentración de  $Na^+$  normal, el 95% es sustituido por Tris. La corriente total es la suma de cinco pulsos positivos y cinco negativos de 110 mV a 2°C.
- B) El trazo superior representa la corriente de compuerta, registrada con agua de mar Tris, con 550 mM-Cs en la parte interna a 3.5°C. El trazo inferior representa la corriente de sodio registrada en el mismo axón.
- C) Reconstrucción teórica de la corriente de compuerta registrada en la parte B), M es la corriente registrada durante los pulsos negativos, P es la corriente registrada durante los pulsos P; representa la suma (2).

Al eliminar las corrientes iónicas y la corriente capacitiva lineal, puede decirse que la corriente de compuerta ( $I_g$ ) es una componente asimétrica relativamente lenta y amplitud pequeña de la corriente capacitiva. En teoría, cualquier proceso de compuerta dependiente del voltaje, originará una corriente de compuerta, en las ecuaciones de Hodgkin y Huxley hay tres factores dependientes del voltaje: 'm' relacionada con la activación de los canales de sodio, 'h' relacionada con el factor de inactivación; 'n' con la activación de los canales de potasio. 'h' y 'n' tienen cinética lenta.

La corriente de compuerta ( $I_g$ ) se relaciona con la corriente de sodio.



La fase ascendente de la corriente de compuerta no es fácilmente observada, pues la corriente capacitiva simétrica es de gran tamaño y desaparece al prevenir que se sature el convertidor A/D (por un lapso de 50 microsegundos después de depolarizada la membrana. Pero con la técnica anteriormente descrita (patrón P/4) ha sido posible registrar esta fase ascendente.

La corriente de compuerta ( $I_g$ ) tiene las siguientes subcomponentes (7):

- A) Componente "Fast on", relacionada con la activación del sodio. Esta componente decrece cuando ocurre la inactivación.
- B) Componente "Slow on". Aún cuando esté relacionada con la inactivación, ésta no es afectada por la enzima pronasa, que destruye la inactivación.
- C) Componente "Fast off". Durante esta componente, las estructuras cargadas no se inmovilizan, por lo que probablemente está relacionada con la activación. Es de cinética rápida y es seguida por la componente "Slow off".
- D) Componente "Slow off". Tiene una cinética lenta. Cuando ocurre  $I_g$  slow off, se lleva a cabo la inmovilización de la carga ocurrida durante la inactivación (sección 5.4).

Cada una de estas fases (componentes) de la corriente de compuerta dura cierto tiempo por lo que se relacionan con unas constantes temporales llamadas  $\tau_{fast\ on}$ ,  $\tau_{fast\ off}$ ,  $\tau_{slow\ on}$  y  $\tau_{slow\ off}$ .

Experimentalmente se ha observado que las corrientes de tiempo están relacionadas de la siguiente manera:

$$\tau_{on} = \tau_{fast\ on} + \tau_{slow\ on} \text{ y } \tau_{off} = \tau_{fast\ off} + \tau_{slow\ off}.$$

$\tau_{on}$  varía sistemáticamente con el tamaño del pulso que le es suministrado a la membrana, siendo independiente de cualquier valor que tenga el potencial de membrana (33); en cambio  $\tau_{off}$  es dependiente del potencial de membrana (33); ambas constantes temporales son inversamente proporcionales a la temperatura del medio en donde se encuentra el axón.

En la figura 43 se presenta una gráfica de la corriente de compuerta ( $I_g$ ). Esta corriente es una exponencial cuando el pulso de voltaje dura 0.5 mseg; pero si es de duración mayor de 10 mseg, la amplitud inicial de la corriente se reduce y la componente slow off destaca (figura 44).

Figura 43. Corrientes de compuertas.

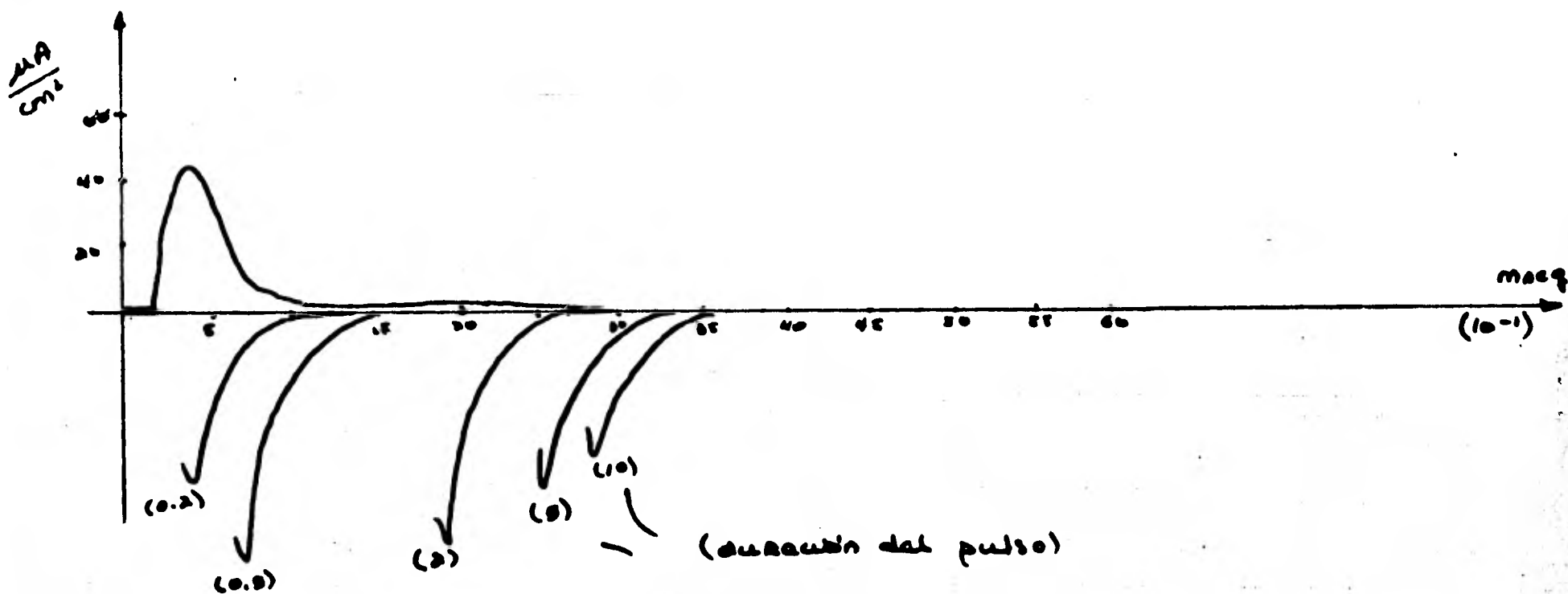
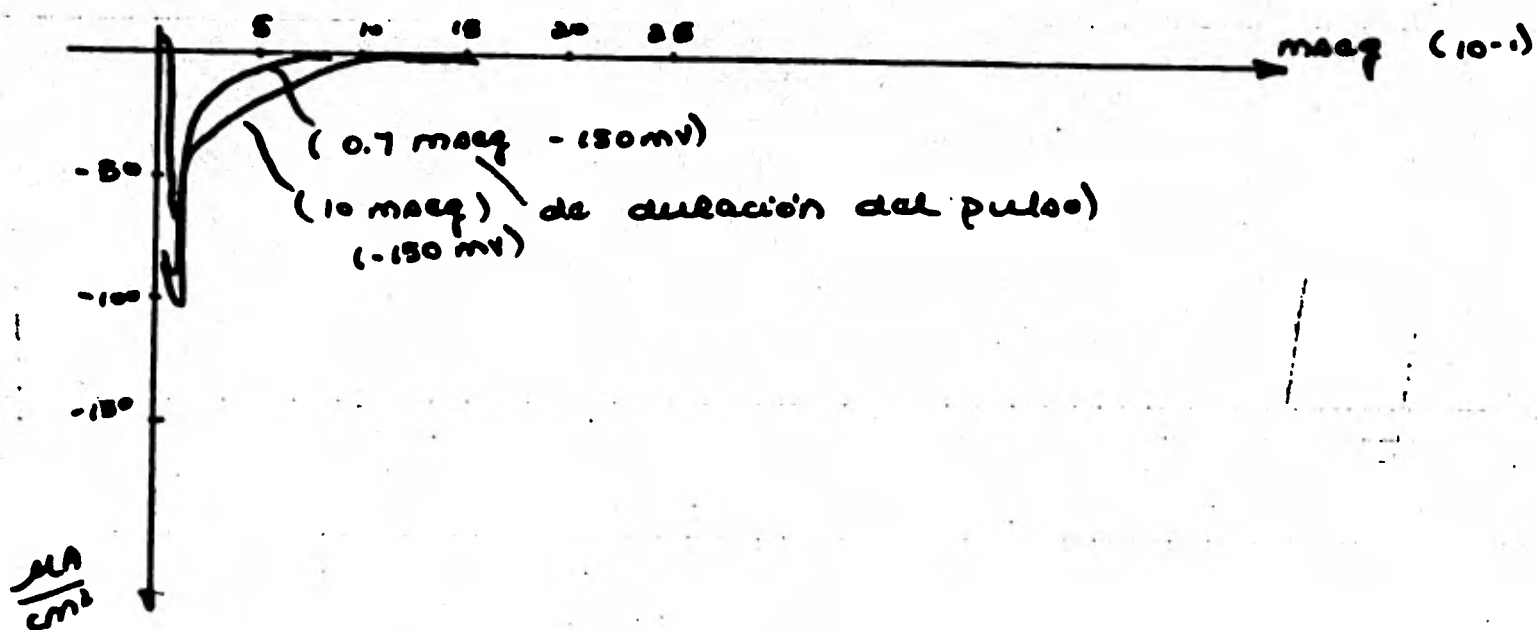


Figure 44. Componente  $I_g$  slow off a los -150mV.



La componente  $I_g$  slow off no es notoria y la inactivación del sodio no llega a observarse cuando los pulsos depolarizantes son muy cortos. Esta componente registrada sólo

a los -140 mV ó -150 mV dura aproximadamente igual al proceso de inactivación del sodio ( $\tau_h = \tau_{I_g \text{ slow off}}$ ).

#### 5.4 INTERPRETACION TEORICA DE LA CORRIENTE DE COMPUERTA RELACIONADA CON LA ACTIVACION DEL SODIO.

En un axón de calamar, las corrientes capacitivas asimétricas que fluyen a través de la membrana son debidas a la presencia de partículas móviles cargadas que forman la membrana. Esta corriente se satura cuando el potencial interno de la membrana alcanza un cierto valor positivo, a cualquier temperatura.

Existe una concordancia entre las propiedades de  $I_g$  y las de la conductancia del sodio, tratadas ambas como un sistema que obedece la cinética  $m^3$  del esquema de Hodgkin y Huxley. Se suponen tres partículas 'm' localizadas en la membrana (8); éstas se mueven para formar o abrir un canal de sodio. Estas partículas o cargas se desplazan del interior al exterior de la membrana cuando es depolarizada ( $Q_{on}$ ) y regresan a su posición inicial durante la repolarización ( $Q_{off}$ ). La carga máxima desplazada será  $Q_{max}$ , es decir, cuando 'm' toma un valor igual a la unidad (saturación). Cuando relacionemos la corriente de compuerta ( $I_g$ ) con la activación 'm' la llamaremos  $I_{g,m}$ ; esta  $I_{g,m}$  se supone que acarrea una fracción de 'm' partículas durante cierto tiempo, por lo que tenemos

$$(8): \quad I_{gm} = Q_{max} \frac{dm}{dt} \\ = Q_{max} \frac{1}{\tau_m} (m_{\infty} - m_0) \exp(-t/\tau_m)$$

Para calcular el total de cargas o partículas que se desplazan dentro de la membrana, basta con integrar el área bajo la curva obtenida al graficar I vs t, es decir, si

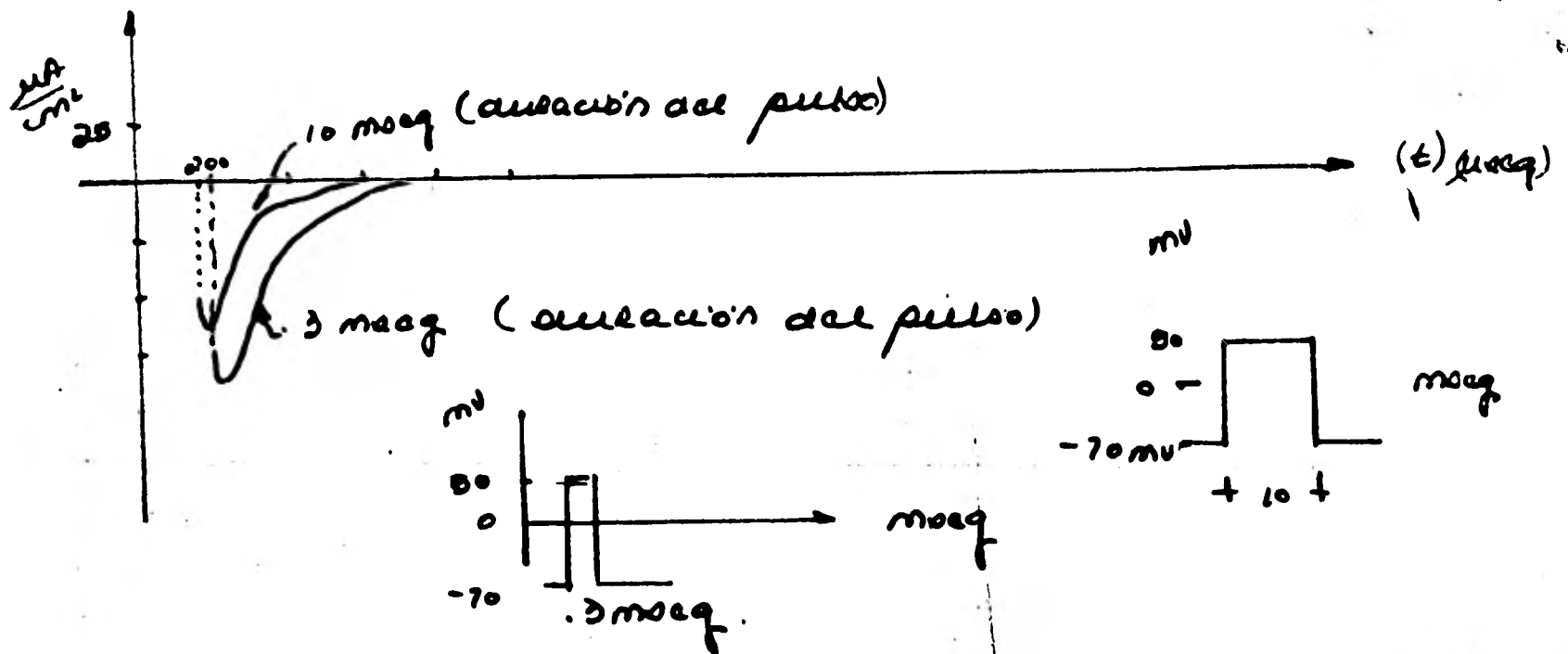
$$I = \frac{dQ}{dt} \quad \int dQ = \int I dt = Q$$

La inactivación inmoviliza 2/3 partes de la carga de compuerta. Para cuantificar esta inmovilización de cargas, se divide  $Q_{off}$  entre  $Q_{on}$ . El cociente  $Q_{off}/Q_{on}$  es aproximadamente la unidad cuando la depolarización de membrana es breve; y se reduce a 1/3 cuando los pulsos son mayores de 1 mseg.

En la siguiente figura (figura 45), los trazos superiores representan la  $I_{g\ on}$ ; al integrar el área bajo esta curva obtenemos  $Q_{on}$ ; para calcular  $Q_{off}$ , se integra  $I_{g\ off}$  (trazos inferiores).

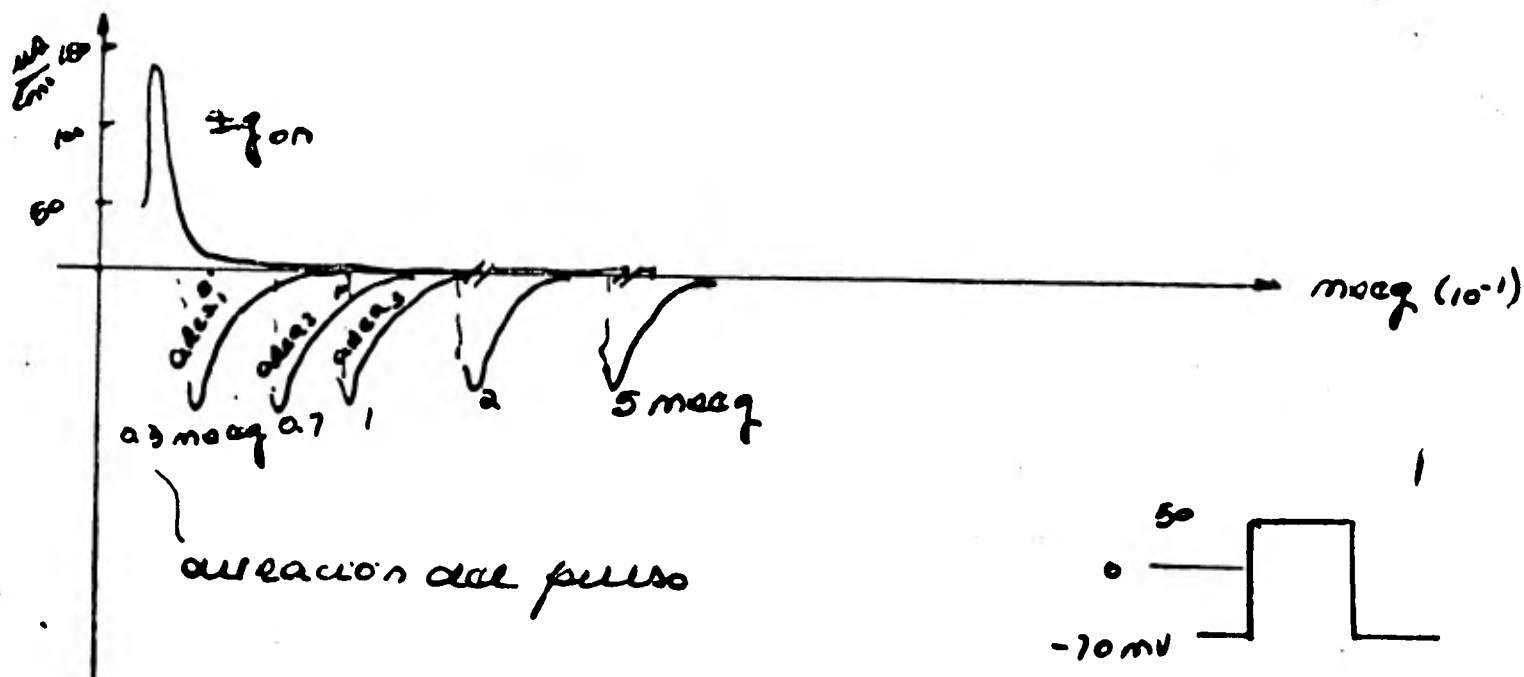
Figura 45. Corriente de compuerta.

Durante el escalón depolarizante de + 50 mV (10 mseg) se observa  $I_{g\ on}$ ; mientras que  $I_{g\ off}$  es observada cuando se repolariza la membrana a -70mV.

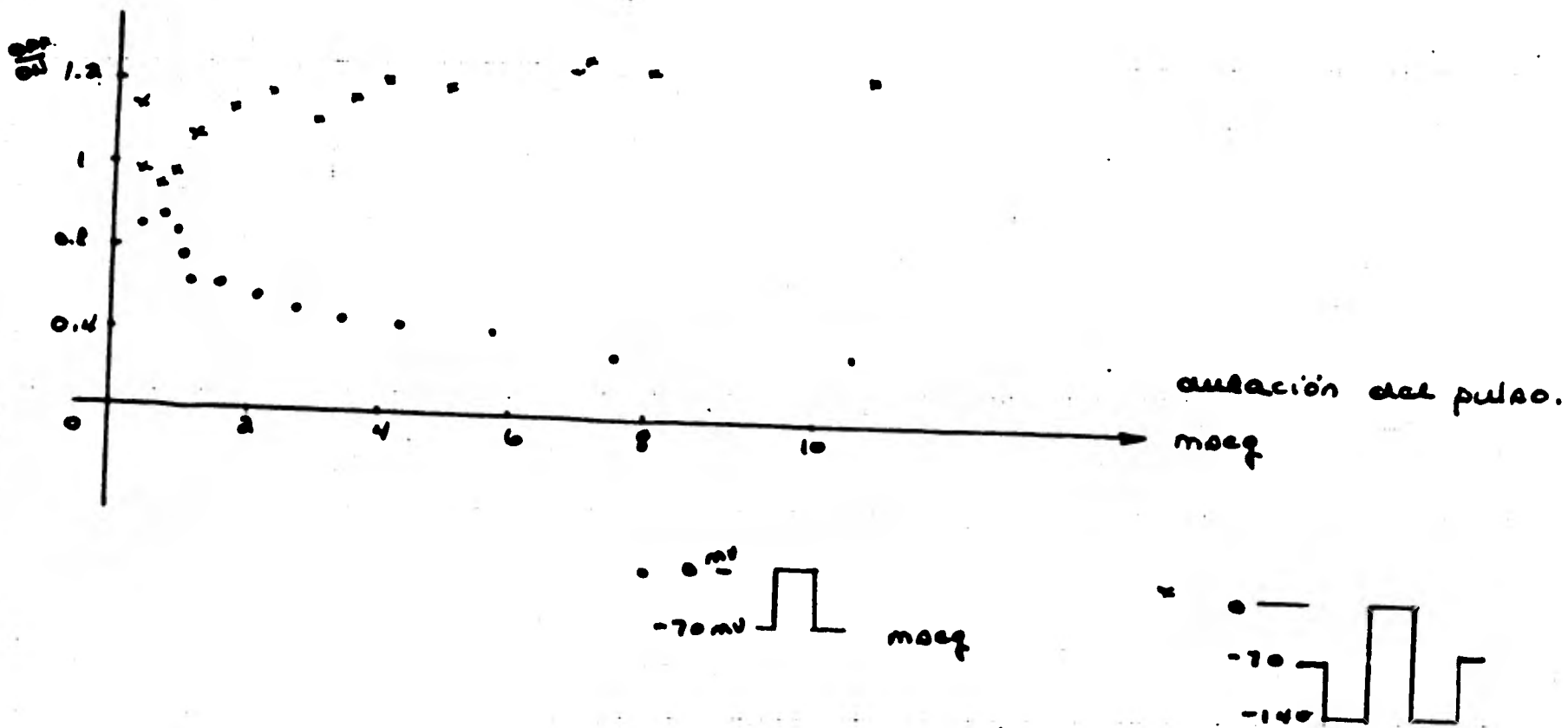


En la figura 46 se hace la comparación de  $Q_{off}$  medida durante un pulso de voltaje de 120 mV de duración menor de 1 mseg (área 1); y  $Q_{off}$  medida con un pulso igual en magnitud y duración mayor de 1 mseg (área 2).

Figura 46 a. Gráficas de  $I_g$  cuando se varía la duración del pulso.



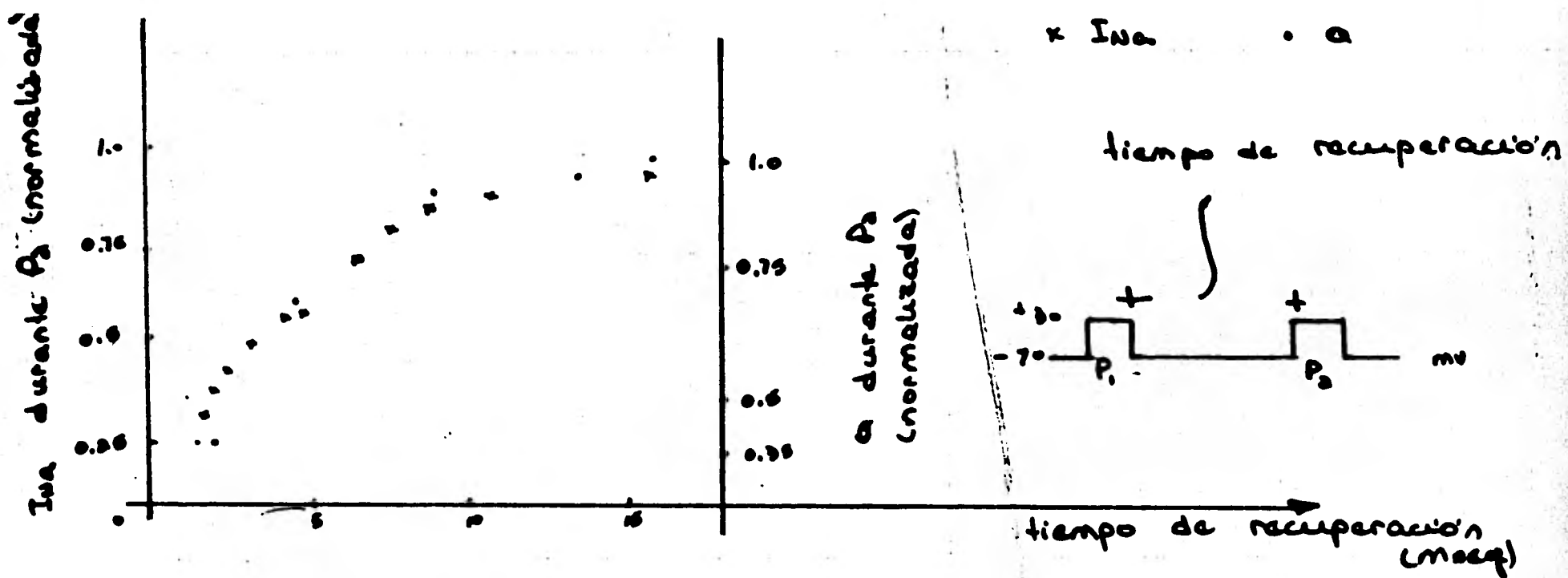
b). Gráfica  $Q_{\text{on}}/Q_{\text{off}}$  vs duración del pulso.



Existe una serie de correlaciones experimentales entre la inactivación e inmovilización de la carga (7), entre ellas:

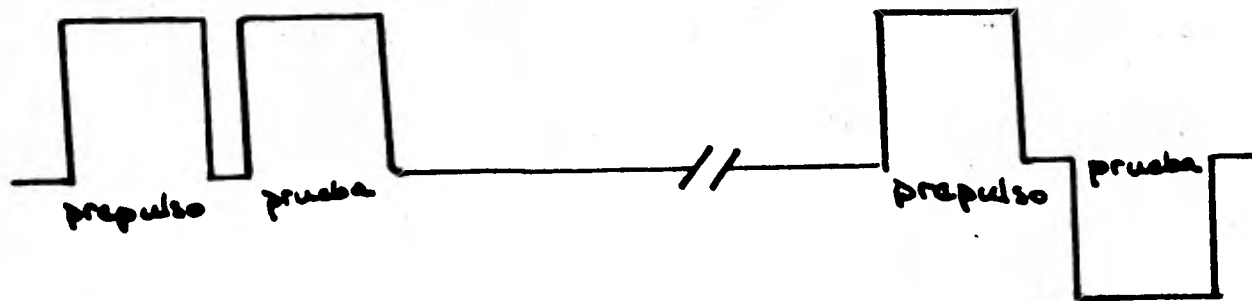
- 1) Las constantes temporales de la inmovilización de la carga y la inactivación son aproximadamente iguales.
- 2) También lo son los tiempos de recuperación de la inactivación y del movimiento de carga (figura 47).

Figura 47. La inactivación del sodio y el movimiento de carga se recuperan aproximadamente al mismo tiempo durante  $P_2$ .





- 3) La carga inmovilizada es aproximadamente igual a la cuantificada durante  $I_{g \text{ slow off}}$ , i.e. la carga inmovilizada y la inactivación son manifestaciones del mismo fenómeno.
- 4) Un prepulso positivo de voltaje reduce la corriente de compuerta.
- 5) El movimiento de carga durante el pulso prueba es dependiente del intervalo de recuperación. A los 0.5 mseg, el movimiento de carga es aproximadamente el 40% y se completa a los 12 mseg.
- 6) Un prepulso de voltaje aparentemente inmoviliza más de la mitad de la carga de compuerta.



5.5 COMPORTAMIENTO DE LAS CARGAS O PARTICULAS MOVILES CONFINADAS EN LA MEMBRANA (33).

Si el número total de partículas cercanas al interior de la membrana la consideramos como  $N_1$  y las del exterior como  $N_2$ , aplicando el principio de Boltzmann:

$$\frac{N_1}{N_2} = \exp \left( \frac{-z'e}{KT} (V-V_0) \right)$$

donde  $z'$  es la valencia efectiva de la partícula;  $e$  es el valor de la carga de un electrón;  $k$  es la constante de Boltzmann;  $T$  es la temperatura absoluta y  $V_0$  es la magnitud del pulso prefijado.

Si consideramos ' $m$ ' como la fracción de partículas que se encuentran en el interior de la membrana y  $1-m$ , la fracción en la parte externa de la membrana, se tiene:

$$m = \frac{N_1}{N_1 + N_2}$$

$$1-m = \frac{N_2}{N_1 + N_2}$$

$$\frac{m}{1-m} = \exp \left( \frac{-z'e}{KT} (V-V_0) \right)$$

$$m = \frac{\exp \frac{-z'e}{KT} (V-V_0)}{1 + \exp \frac{-z'e}{KT} (V-V_0)}$$

$$z = \frac{1}{\alpha + \beta}$$

$$\frac{dN_1}{dt} = \alpha N_2 - \beta N_1$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha(1-m) + \beta m$$

Considerando que las cargas móviles de la membrana se comportan de acuerdo con la distribución de Boltzmann con dos configuraciones permitidas cuyas energías son:  $E_1$  y  $E_2$  (cuando es aplicado un escalón depolarizante). El rearrreglo de car-

gas se efectúa hasta llegar a una nueva distribución equilibrada, siguiendo un curso temporal exponencial. Las constantes de reacción son:

$$\alpha = \theta \exp \frac{E_1 - E_b}{KT}$$

$$\beta = \theta \exp \frac{E_2 - E_b}{kT}$$

$E_b$  es la energía de la máxima barrera energética en función del voltaje;  $E_1$  es la energía cuando la partícula se encuentra en el exterior y  $E_2$ , cuando está en el interior.  $\theta$  es sólo una constante.

Efectuando operaciones:

$$\frac{\alpha}{\beta} = \exp \frac{E_1 - E_2}{KT} = \exp \left[ \frac{a}{KT} (V_0 - V) \right]$$

donde:

$$E_1 - E_2 = aV_0 - aV$$

esta ecuación representa una recta cuya pendiente será 'a' y  $V_0$  es el potencial cuando  $E_1$  y  $E_2$  son iguales, esta recta interseca al eje de las abscisas y  $V_0$  toma un valor de -19 mV (33).

Si la energía de la máxima barrera ( $E_b$ ) se relaciona con un nivel energético de referencia,  $E_0$ :

$$E_b = E_0 - ax (V_0 - V)$$

donde x representa una fracción determinada por la simetría

del sistema (33).  $E_1 - E_b = E_1 - E_0 + ax (V_0 - V)$

$$E_1 - E_2 = a (V_0 - V)$$

Restando ambas ecuaciones:

$$E_2 - E_b = E_1 - E_0 - a (V_0 - V) + ax (V_0 - V)$$

$$E_2 - E_b = E_1 - E_0 - a (1-x) (V_0 - V)$$

Por definición y sustituyendo los valores de  $\alpha$  y  $\beta$ :

$$\tau = \frac{1}{\alpha + \beta}$$

$$\tau = \frac{1}{\theta \exp \frac{E_1 - E_b}{KT} + \theta \exp \frac{E_2 - E_b}{KT}}$$

$$\tau = \frac{1}{\theta \left( \exp \frac{E_1 - E_0 + ax(V_0 - V)}{KT} + \exp \frac{E_1 - E_0 - a(1-x)(V_0 - V)}{KT} \right)}$$

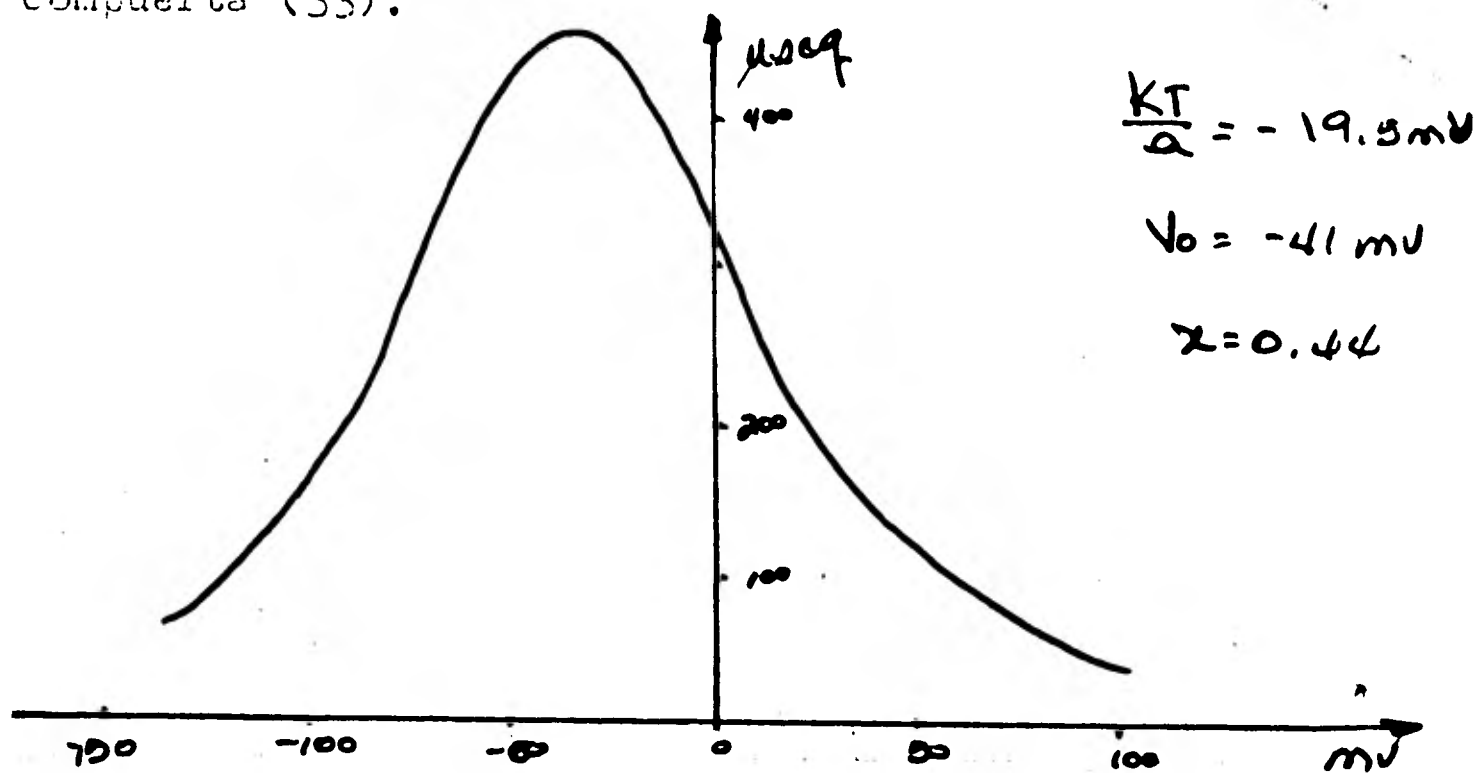
$$\tau = \frac{1}{\theta \left( \exp \frac{E_1 - E_0 + ax V_0 - axV}{KT} + \exp \frac{E_1 - E_0 - a(1-x) V_0 + a(1-x)V}{KT} \right)}$$

$$= \frac{1}{\theta \left( \exp \frac{E_1 - E_0 + ax V_0}{KT} \exp \frac{-axV}{KT} + \exp \frac{E_1 - E_0 - a(1-x)V_0}{KT} \exp \frac{a(1-x)V}{KT} \right)}$$

$$= \frac{1}{\alpha + \beta} = \left[ \theta \exp \left( \frac{E_1 - E_0 + axV_0}{KT} \right) \exp \frac{-ax}{KT} V + \theta \exp \left( \frac{E_1 - E_0 - a(1-x)V_0}{KT} \right) \exp \frac{a(1-x)}{KT} V \right]^{-1}$$

donde  $\tau$  es la constante temporal para la corriente de compuerta (figura 48).

Figura 43. Gráfica de la constante temporal de la corriente de compuerta (33).



Comparando las gráficas de  $\tau_m$  y la constante temporal de la corriente de compuerta ( $\tau$ ), ambas representan su máximo valor aproximadamente a los  $-30 \text{ mV}$  (33). Ambas concuerdan en casi todos los puntos y las discrepancias que probablemente aparecen son debidas a algunas corrientes de fuga dependientes del tiempo.

Si graficamos  $\ln(m/1-m)$  vs  $V$ , se obtiene una recta cuya pendiente es  $z'e/kT$  que concuerda con  $a/kT$ .

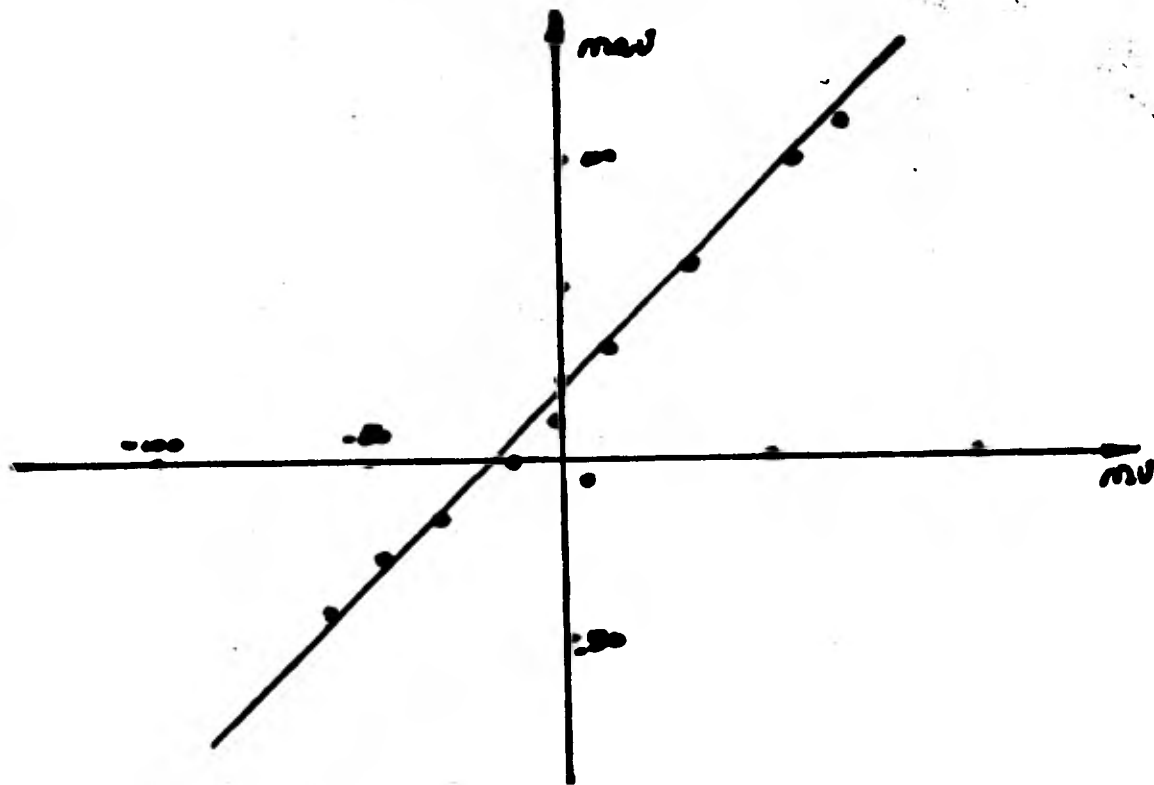
Basándose en la teoría de Eyring, Keynes y Rojas (33) analizan el arreglo molecular de las cargas móviles en términos de la distribución de Boltzmann. Ellos suponen dos configuraciones permitidas de energía ( $E_1$  y  $E_2$ ).

Cuando los valores del potencial de membrana son muy negativos, la diferencia de potencial entre estados es:

$$\Delta E = E_1 - E_2 = kT \ln \frac{m}{1-m}$$

Al graficar (figura 49) el miembro derecho de esta última ecuación vs el potencial de membrana, ésta es una recta - por lo tanto, el principio de Boltzmann sí puede ser una descripción adecuada del comportamiento de las partículas de compuerta, entre los -100 y +80 mV del potencial de membrana. La pendiente de esta recta se relaciona con la valencia efectiva de cada partícula de compuerta, teniendo un valor de -1.3 ueq.

Figura 49. Gráfica de  $\ln m/1-m$  vs  $V_m$ . El axón fue perfundido con una baja concentración de Cs y bañado con agua de mar + Tris + isentionato (en lugar de Cl).



En base a la teoría de Hodgkin y Huxley (1952 b) la cinética de la conductancia de la corriente de sodio es:

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h$$

Haciendo caso omiso de la inactivación, tenemos:  $g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3$

Al calcular la diferencial de esta última ecuación con respecto a V:

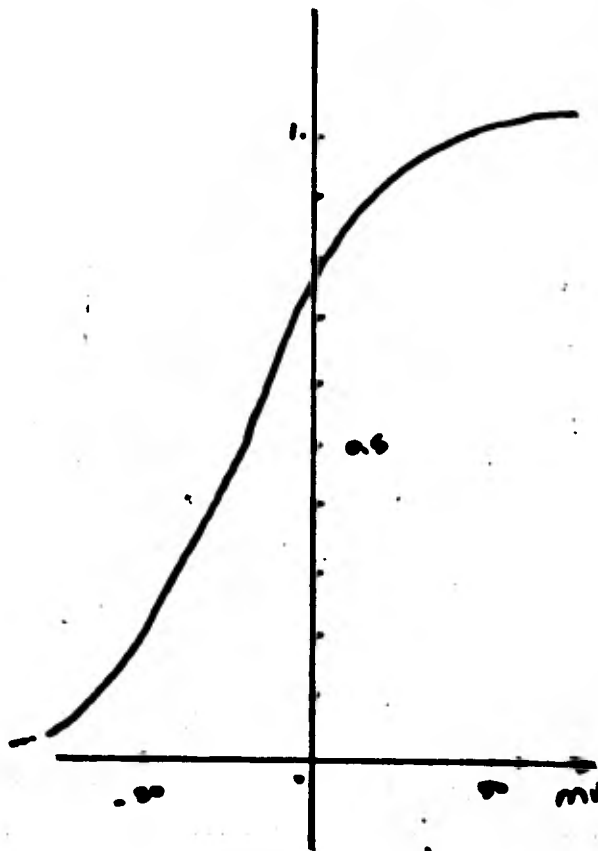
$$\frac{1}{g_{Na}} \frac{d}{dV} g_{Na} = 3m^2 \frac{d}{dV} m$$

la pendiente en escala logarítmica de  $g_{Na}-V$  es 3 veces mayor que la de 'm'. Esto concuerda con los datos experimentales. El máximo experimental obtenido para la conductancia del sodio ( $g_{Na}$ ) es aproximadamente a los 6.5 mV (33); y teóricamente toma un valor de 18.5 mV. El cociente obtenido al dividir el valor teórico entre el experimental (18.5/6.5) es de aproximadamente 2.85.

Este último valor (2.85) es aproximadamente 3 y concuerda con lo predicho.

Figura 50. Distribución del estado estacionario de las cargas móviles vs  $V_m$ :

$$\frac{kT}{a} = -18.6$$



$g_{Na}$  y  $m$  deben compararse antes de que pueda ocurrir la inactivación.

Keynes y Rojas (24) concluyen que para un sistema que obedezca la cinética  $m^3$ , existe una excelente concordancia entre las propiedades de la corriente de compuerta con las de la conductancia del sodio. Las cargas móviles que generan la corriente de compuerta se identifican como las partículas 'm' del canal de sodio.

Si el canal de sodio está controlado por tres partículas, cada una tendrá una carga de  $-1.3ueq$ . La densidad de los canales se obtiene con la relación  $Q_{max} / (-1.3 \times -3)$ . En los



axones de calamar  $C_{max}$  (carga máxima, i.e., cuando ocurre la saturación) es  $2100 \text{ ueq}/\mu\text{m}^2 / (3 \times 1.3) = 538$  canales por micra cuadrada, cuyo valor es muy cercano a aquel obtenido - cuando TTX (tetrodotoxina) se aplica a la membrana del axón ( $533/\mu\text{m}^2$ ).

Al relacionar la corriente de compuerta con la variable 'h' (gráfica  $h_{\infty} - V$ ) se ha podido estimar la valencia de las cargas móviles. La pendiente de la curva ( $h_{\infty} - V$ ) tiene un valor de 3.6 ueq, semejante al obtenido anteriormente para tres partículas 'm' ( $3 \times 1.3 \text{ ueq}$ ) ( $g_{Na} = g_{Na} m^3 h$ ), es decir, una partícula 'h' con valencia 3.6 ueq.

Casi todos los resultados anteriormente expuestos muestran una gran concordancia de  $I_{gm}$  con las pequeñas corrientes - asimétricas observadas en la membrana, es decir, con la corriente de desplazamiento de las partículas cargadas confinadas en la membrana. Se ha supuesto que cada una de las partículas 'm' se mueven con la misma velocidad con el fin de abrir un canal. Puede ocurrir que dichas partículas continúen moviéndose aun cuando el canal ya se haya abierto, eso crea una hipótesis: La existencia de múltiples transiciones de cada partícula antes y después de que el canal - quede abierto (24).

Se ha llamado a la corriente de compuerta asociada a la partícula 'h':  $I_{gh}$ ; y la asociada a las tres partículas 'm':  $I_{gm}$ . Al inicio de un pulso depolarizante:  $I_{gh} = \frac{1}{3} I_{gm}$ , es

decir, la corriente de compuerta  $I_{gh}$  tiene una amplitud igual a un cuarto de la relacionada con las tres partículas 'm' (esta no ha ocurrido en su totalidad).

El proceso de inactivación ocurre después de que ha transcurrido cierto tiempo en que se ha depolarizado la membrana. Armstrong (1977) postula un posible acoplamiento de las compuertas de activación e inactivación; la primera debe abrirse antes de que pueda ocurrir una inactivación. Esta precesión es demostrada cuando se hiperpolariza la membrana, demorando tanto la inactivación como la activación.

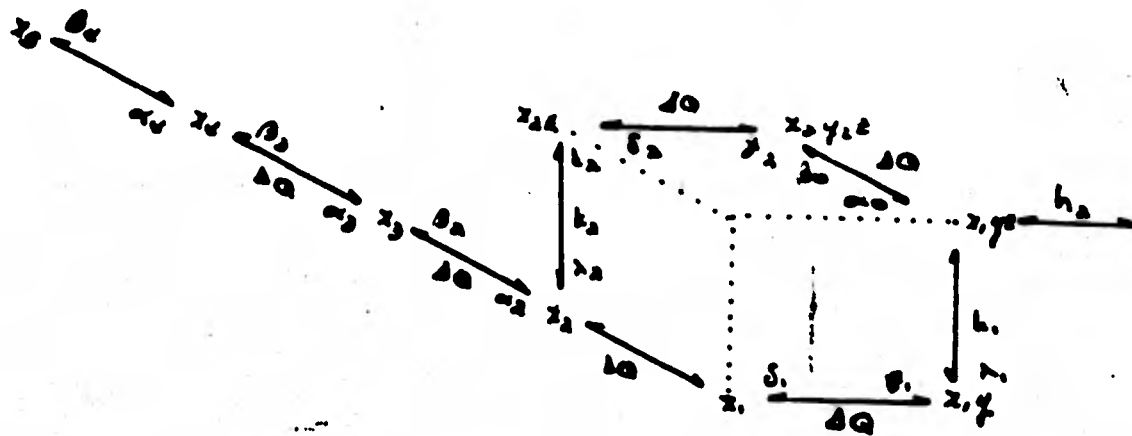
## 5.6 DINAMICA DE UN CANAL DE SODIO

### 5.6.1 MODELO DE ARMSTRONG Y BEZANILLA

Armstrong y Bezanilla (1977) (7) proponen un modelo dinámico para un canal de sodio, como se muestra en las figuras 51 a y 51 b.

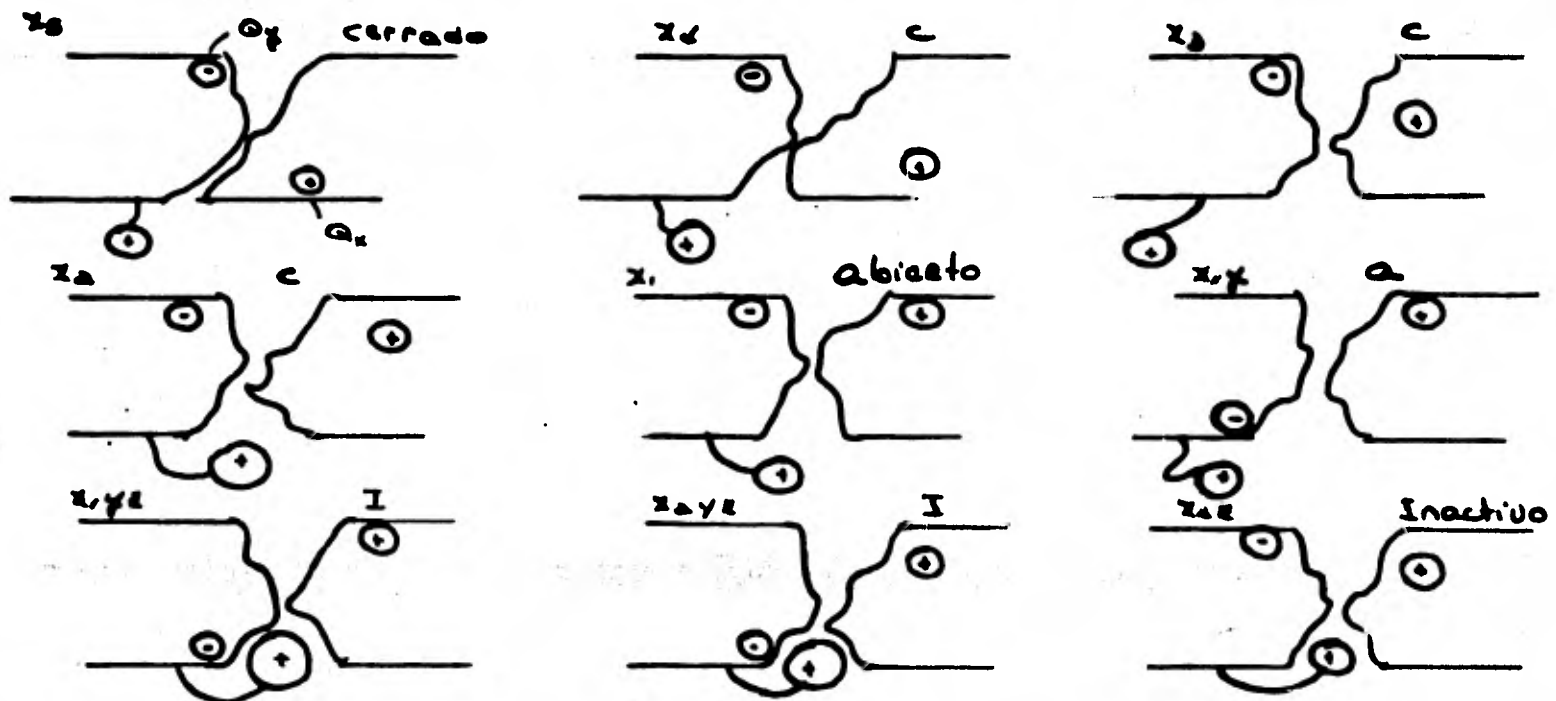
Figura 51 a. Modelo dinámico de un canal de sodio (explicación de la figura en el texto).

b. Modelo de un canal de sodio.



(Explicación de la figura en el texto).

B)



Para hacer este modelo se tomaron en cuenta:

- 1) Acoplamiento de los procesos de activación e inactivación.
- 2) La inactivación inmoviliza la carga desplazada de la membrana.
- 3) Aproximadamente  $2/3$  partes de la carga total es inmovilizada por la inactivación.
- 4) Podemos imaginar que existen en los canales de sodio, tres estados abiertos: ' $x_1$ ', ' $x_1y$ ' y ' $h_2$ '; cuatro estados cerrados:  $x_5$ ,  $x_4$ ,  $x_3$ ,  $x_2$ ; y tres inactivos:  $x_1yz$ ,  $x_2yz$ ,  $x_2z$ .
- 5) La conductancia de un estado abierto es de  $10^{-11}$  por cada canal; la de un cerrado o inactivo es cero. Existen transiciones permitidas entre cada estado, indicándose en la figura por medio de flechas; cuando hay movimiento de carga, se indica con  $Q$ .

Los estados ( $x_5$ ,  $x_4$ ,  $x_3$ ,  $x_2$ ,  $x_1$ ) a lo largo del eje de las abscisas (eje  $x$ ) (figura 51 A) representan cambios de la activación de la corriente de sodio. Estos cambios generan movimiento de carga  $Q$  ( $Q_x$ ) dentro de la membrana. Este movimiento se puede asociar con la corriente de compuerta (particularmente con  $I_g$  fast on. Esta carga estructural  $Q_x$  puede ser positiva o negativa. Si  $Q_x$  tiene una carga eléctrica positiva, se moverá como se ilustra en la figura 51 B.

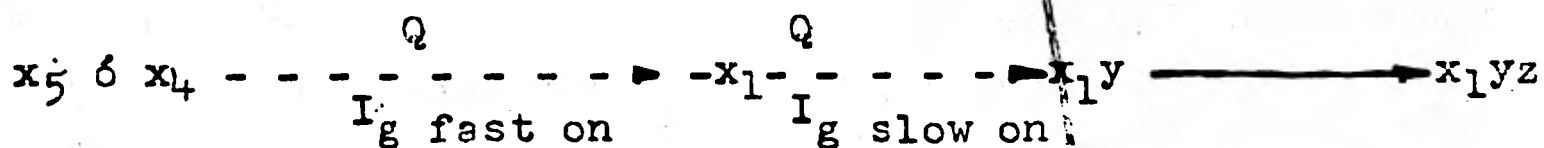
La corriente de compuerta asociada al eje ordenado (eje  $y$ ) es lenta. Sobre este eje se presenta una carga hipotética  $Q_y$ . Esta carga  $Q_y$  es la que atraerá o repelerá a los iones que atraviesan la membrana por medio de los canales.

Sobre el eje de las 'x', existe un movimiento de partículas que inactivarán interna o externamente el funcionamiento - del canal. Estas partículas o cargas no se desplazan distancias significativas dentro de la membrana, por lo que no se les asocia con ninguna componente de la corriente de compuerta.

En los estados  $x_2yz$  y  $x_2z$ , el canal se encuentra bloqueado por partículas que inactivan a los canales. La compuerta de activación permanecerá parcialmente cerrada.

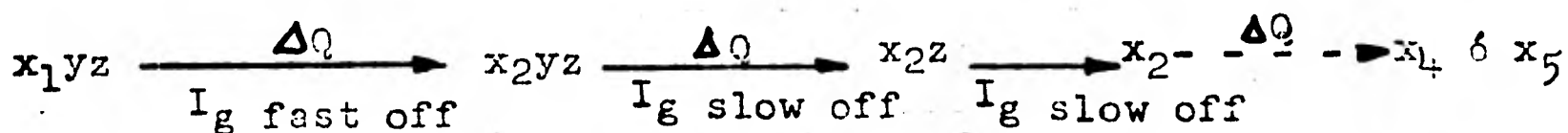
El estado  $x_2yz$  es relativamente estable, ( $Q_y$  atrae a la partícula que inactiva); el estado  $x_2z$  es inestable (el canal no permanece mucho tiempo en este estado, pasa rápidamente al estado  $x_2$ ).

Para la apertura e inactivación del canal, se asocian los siguientes estados:



Para llegar a un estado abierto (x), el canal puede presentar diversas transiciones.

Durante la repolarización de la membrana, se presentan varios estados asociados a la recuperación:



Durante los estados  $x_1yz \longrightarrow x_2yz$  hay movimiento de carga ( $\Delta Q$ ) que no se inmoviliza por la inactivación.

Los canales se cierran cuando la membrana ha sufrido una depolarización breve, sin la intervención de la inactivación

(transiciones:  $x_1y \xrightarrow{\Delta Q} x_1 - \Delta Q \longrightarrow x_4$  ó  $x_5$ )

$x_2yz \longrightarrow x_2z$  es una transición dependiente del voltaje (período de recuperación).

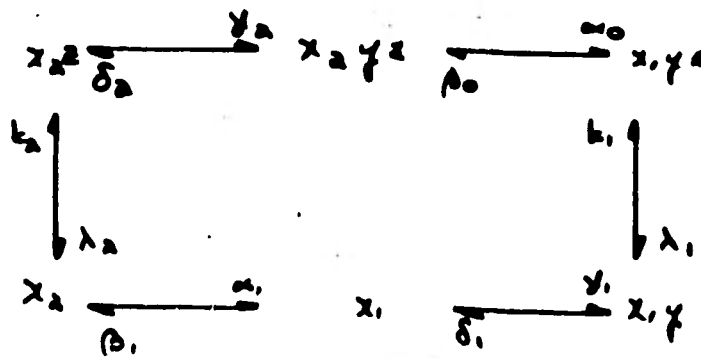
Para este modelo mecánico que representa un canal (7) se han tomado en cuenta varios resultados:

- a) Cuando la constante de reacción  $\beta_1$  es suficientemente larga, la inactivación se presenta como un proceso lento, es decir, cuando el pulso depolarizante es pequeño, la inactivación que presenta es lenta.
- b) La inactivación del sodio ( $x_1y \longrightarrow x_1yz$ ) no ocurre hasta que el canal ha pasado por los estados  $x_5$  ó  $x_4 \longrightarrow x_1yz$  (retraso de la inactivación del sodio).
- c) La inactivación que ocurre después de una depolarización, es dependiente del voltaje de membrana ( $V_m$ ). Aquella ocurre después de los estados  $x_5 - - - - \longrightarrow x_1y$ . La transición de  $x_1y \longrightarrow x_1yz$  es la más lenta y nunca tiene movilización de carga, por lo que ninguna componente de la corriente de compuerta está asociada a ella.
- d) La transición  $x_2yz \longrightarrow x_2z$  es dependiente del voltaje (repolarización).
- e) Cuando al axón se le perfunde internamente con pronasa, la transición  $x_1y \longrightarrow x_1yz$  no se observa (no ocurre la inactivación).

- f) Carga inmovilizada debido a la inactivación.
- g) La carga no inmovilizada por la inactivación se asocia a la transición  $x_1yz \longrightarrow x_2yz$ . Durante esta transición se cierra el canal.
- h) Durante las depolarizaciones breves, algunos canales alcanzan el estado  $x_1$ , pero muy pocos pueden seguir la secuencia hacia otros estados y es cuando ocurre rápidamente la repolarización.
- i) Para depolarizaciones más largas (0.7 a 1 mseg) varios canales alcanzan el estado  $x_1y$ . Ahora la repolarización es más lenta pues el canal debe presentar el estado  $x_1$ .
- j) La repolarización más común es observada cuando el canal presenta el estado  $x_1y$ . El curso temporal es largo (lento) y su ascenso ocurre en forma sinusoidal.

El esquema de las constantes de transición o reacción se presenta en la figura 52.

Figura 52. Esquema de las constantes de transición entre los diversos estados que presentan los canales de sodio (explicación de la figura en el texto).



Entre las constantes de transición, se postula una reversibilidad microscópica, es decir:

$$\alpha_1 \cdot \gamma_1 \cdot k_1 \cdot \beta_0 \cdot \delta_2 \stackrel{=}{=} k_2 \cdot \gamma_2 \cdot \alpha_0 \cdot \delta_1 \cdot \beta_0 \cdot \lambda_1$$

i.e. el producto de las constantes de reacción que van en el mismo sentido de las manecillas del reloj, es igual al producto de las que van en sentido inverso (flujo de partículas cargadas durante la depolarización es igual al de repolarización). Para que ocurran las distintas transiciones que presenta un canal de sodio, no se requiere de ninguna fuente de energía metabólica.

#### 5.6.2 MODELO 'INSERCIÓN - AGREGACIÓN'.

El modelo de Mueller tiene dos pasos a seguir:

- A) Inserción: Algunos monómeros que se encuentran en una de las superficies que forman la membrana se insertan en la región de hidrocarburos de la misma, bajo la acción de un campo eléctrico externo.
- B) Agregación: Cuando los potenciales aplicados a la membrana (superficie de la membrana) son mayores de 100 mV, la superficie de la membrana que contiene los monómeros insertados se trasladan a la otra superficie de la membrana donde se agregarán (agruparán) como oligómeros y éstos estructurarán los canales. El número de monómeros transportados a través de la membrana depende de la duración y de la amplitud del pulso de voltaje que se le imprima a la membrana.



## CAPITULO 6. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Haciendo un análisis de los resultados recopilados en este trabajo, los canales iónicos de sodio y potasio tienen compuertas que se abren y cierran (como resultado de una depolarización y repolarización de la membrana), para permitir el influjo y eflujo de sodio y el eflujo, influjo de potasio, respectivamente. El movimiento iónico de estas compuertas es a lo que se ha llamado corriente de compuerta.

Armstrong y Bezanilla han podido observar la corriente de compuerta, eliminando las corrientes iónicas de sodio y potasio (por medio de la aplicación de TTX y TEA) y la corriente capacitiva lineal (aplicando pulsos de voltaje de igual -magnitud y sentido contrario).

La corriente de compuerta presenta las siguientes características:

1. La corriente de compuerta tiene una amplitud del orden de microamperes ( $\mu A$ ).
2. Esta corriente es asimétrica y se supone que es una componente no lineal de la corriente capacitiva.
3. La corriente de compuerta es dependiente del potencial de membrana,  $V_m$ .
4. Esta corriente de compuerta es la corriente de cargas estructurales que se encuentran en la región dieléctrica - de la membrana.

5. El campo eléctrico actúa sobre las componentes de la membrana modificando su energía potencial que originará el proceso de compuerta (apertura y cierre de los canales iónicos).
6. Durante la repolarización se origina un ciclo reversible cuando los canales iónicos se cierran.
7. Cuando ocurre una repolarización, es decir, el potencial de membrana regresa a su valor inicial, ocurre una corriente en dirección opuesta, con un desarrollo en el tiempo diferente al de depolarización. Este tiempo tiene una dependencia con el potencial de membrana.
8. Todavía no ha sido posible conocer con exactitud, el lugar de la región dieléctrica de la membrana donde se encuentran las componentes de la compuerta de cada canal, ni el número exacto de partículas asociado a cada canal.
9. Empírica y teóricamente se cree que para los canales de sodio, existen tres partículas (m) cargadas que al moverse del interior al exterior abren el canal.
10. Las partículas 'm' de la membrana se ha demostrado que tienen una valencia efectiva de  $-1.3$  ueq.
11. Cada partícula 'm' atraviesa una barrera energética que está en función con el potencial de membrana.
12. Las partículas cargadas que originan la corriente de compuerta continúan moviéndose aún cuando el canal se haya abierto, lo que implica la existencia de múltiples transiciones de cada partícula 'm' ocurridas anteriores a la apertura o cierre de los canales.

13. Los cambios conformacionales ocurren estocásticamente y rápidamente en un tiempo del orden de micro a milisegundos.
14. Cuando los pulsos de voltaje son de poca duración (menores de 0.7 mseg), la carga transferida durante la depolarización de la membrana es igual a la transferida durante la repolarización.
15. Cuando los pulsos de voltaje son de mayor duración (mayores de 0.7 mseg), parte de las partículas de compuerta quedan inmovilizadas.
16. El número total de carga transferida para abrir un canal concuerda con el número total de sitios ocupados por la TTX, en los canales de sodio.
17. La activación y la inactivación del sodio, según Armstrong y Bezanilla, son procesos acoplados. La activación siempre precede a la inactivación.
18. El ión calcio tiene gran efecto sobre la corriente de compuerta, actuando, probablemente, con un sensor de voltaje. La presencia de este ión mantiene la excitabilidad de la membrana.
19. Existe una demora, después de aplicado el pulso depolarizante, para que surja la corriente de compuerta. Esta demora temporal es proporcional a la temperatura del medio que baña el axón y del pH (entre 5 y 8).
20. La corriente de compuerta contribuye al valor de la  $C_m$  (de  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  a  $1.35 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) dentro de un intervalo de -70 a +20 mV.

Desde 1970, el análisis de ruido ha venido ganando adeptos entre los fisiólogos y biofísicos que están estudiando fenómenos eléctricos relacionados con los cambios de las conductancias iónicas en la membrana.

La técnica de fijación de voltaje y el análisis de las conductancias iónicas mediante el llamado "modelo de Hodgkin y Huxley" resultaron adecuadas para explicar el curso temporal y la dependencia con el potencial de membrana y las concentraciones iónicas, del potencial de acción en el axón de calamar.

El análisis de las conductancias aportan información sobre las propiedades de la membrana, pero no permiten abordar en forma directa, el estudio de los mecanismos microscópicos subyacentes.

La noción fenomenológica de "canal iónico", desarrollada por Hodgkin y Huxley, se confirma con los estudios realizados con tetrodotoxina marcada, lo que permitió reconocer la existencia de estructuras membranales diferenciadas asociadas con la corriente de sodio.

Los estudios sobre la selectividad iónica de los canales, siempre a partir de ciertas medidas, han dado evidencia indirecta de la existencia de barreras energéticas que impiden o regulan el pasaje de los iones y también sobre el "tamaño" de la zona de permeabilidad (filtro selectivo) localizada en el canal.

la permeabilidad de cada canal es un proceso que por su característica está sometido a fluctuaciones de naturaleza estadística.

Estas fluctuaciones en la conductancia transmembranal, dan lugar a fluctuaciones de la corriente o del potencial de membrana. Las fluctuaciones que son susceptibles de ser registradas se denominan "ruido".

El ruido, por ser el producto de un mecanismo microscópico, contiene información acerca de dicho mecanismo, es decir, puede ser considerado no como un contaminante indeseable en las señales, sino como una fuente principal de información, cuando enfocamos nuestra atención a los fenómenos microscópicos.

El análisis de ruido permite medir directamente parámetros de los canales, tales como tiempos de apertura y cierre, y su dependencia con el campo eléctrico, conductancia iónica, energías de activación e inactivación, etc. (40).

BIBLIOGRAFIA

1. Adelman W. J. Jr., Scft J. P. (1966) Journal General Physiology 50, 279-293 (1966).
2. Armstrong C. M. Membranes. A series of Advances ed. G. Eisenman Vol. 3 New York Dekker.
3. Armstrong C. M. Ionic Pores, Gates and Gating Currents. Quarterly Review of Biophysics, 72 (1975).
4. Armstrong C. M. Journal General Physiology, 54; 553-575 (1969)
5. Armstrong C. M. Journal General Physiology, 58; 413-437 (1971).
6. Armstrong C. M. Biophysics 15; 932-933 (1975).
7. Armstrong C. M. Bezanilla F. Inactivation of Sodium Channel II. Gating Current Experiments. Journal General Physiology Vol. 70: 567-590 (1977).
8. Armstrong C. M., Bezanilla F. Charge Movement associated with the opening and closing of activation gates in the sodium channels. Journal General Physiology (1974).
9. Armstrong C. M., Bezanilla F. Natures Vol. 242 (1973).
10. Armstrong C. M., Bezanilla F. Currents associated with ionic gating structure in nerve membrane. Ann N.Y. Acad. Science 264: (265-277) (1975).
11. Armstrong C. M., Bezanilla F. y Rojas E. Destruction of Sodium Conductance inactivation in Scuid Axons perfused with pronasa. Journal General Physiology 62: 375 (1973).
12. Barnola F. y Villegas R. Sodium Flux through the Sodium Channels of Axon Membrane Fragments in Isolated Nerves from Lobster. Journal General Physiology Vol. 67: 81-90 (1976)

13. Bezanilla F. Armstrong C. M. Journal General Physiology 60: 588-608 (1972). Negative Conductance caused by entry of sodium and caesium ions into the Potassium Channel of Squid Axons.
14. Bezanilla F., Armstrong C. M. Inactivation of Sodium Channel I. Sodium Currents Experiments. Journal of General Physiology 70:549-566 (1977).
15. Bistock L. Permeability of Sodium Channel in Myxicola to organic cations. Journal General Physiology. 68: 551-562 (1976).
16. Cahalan M. y Begenisieh YT. Sodium Channel Selectivity Dependence on Internal Permeant Ion Concentration. Journal General Physiology 68: 111-125 (1976).
17. Capaldi R. A. A Dynamic model of cell membranes. Scientific American. March 1974.
18. Chandler W. K. Meves H., Journal General Physiology 180: 788- 820 (1965).
19. Calington Barbara. Cell Membranes, a look at how they work. Science Vol. 175 (march 24, 1972).
20. Dowben R. M. General Physiology. A Molecular Approach. A Harper Int. Ed. (1969).
21. Ebert G. S. y Goldman L. The permeability of Sodium Channel in Myxicola to Alkali cations. Journal General Physiology 68: 327-340 (1976).
22. Ehrnstein G. Ion Channels in Nerve membranes. Physiology Today 29. No. 10 (Octubre 1976).

23. French R. J. y Wells J. B. Sodium Ions as Blocking Agents and Charge carriers in Potassium Channel of Squid Giant Axon. Journal General Physiology 70: 707-724 (1977).
24. Keynes y Rojas. Gating Current in Squid Axon. Journal Physiology 255; 157-189 (1976).
25. González Beltrán C. Física de la conducción nerviosa. (Tesis 1970) UNAM.
26. Hille B. Ionic Channels in Excitable membranes. Current Problems and Biophysics Approaches. Biophysic Journal 22 (1978).
27. Hille B. J. General Physics Ion Selectivity in Na channels.
28. Hille B. J. General Physics 50, 1287 (1967).
29. Hille B. Rate Theory Models for Ion Flow in Ionic Channels of Nerve and Muscle. Membrane Transport Processes Vol. 3. Raven Press, New York (1979).
30. Hodgkin A. L. y Huxley A. F. A Cuantitative Description of Membrane Current and its application to Conduction and Excitation In Nerve. Journal Physiology 117: 500-544 (1952).
31. Hodgkin A. L. Huxley A. F. y Katz B. Ionic Currents underlying activity in Giant Axon of Squid of LOLIGO. Arch Science Physiology 3 (1949).
32. Katz B. Nerve, Muscle and Synapse. MacGraw Hill Book Co. (1966).
33. Keynes R. D. y Rojas E. Kinetics and Steady State Properties of Charged System Controlling Sodium Conductance in - Squid Axon. Journal Physiology 239:393-434 (1974).



34. Lauger P. Carrier Mediated Ion Transport. Science 178.
35. Marmor M. F. y Gorman A. L. F. Membrane Potential as Sum of Ionic and Metabolic Components (August 1969).
36. Moolenaar W. H. y Spector Llam. Membrane Currents Examined under Voltage Clamp in Cultured Neuroblastoma Cells. Science 196 (Abril 15, 1977).
37. Mueller Paul Membrane Excitation through voltage induced aggregation of channel precursors. Ann. N.Y. Acad. Science 264 (1975).
38. Physiology 63: 533-552 (1974).
39. Sánchez A. M. Aspectos Físicos de la Excitación Nerviosa. (Tesis 1977/UNAM).
40. Simposio 'Biofísica del Transporte en membranas biológicas' (Agosto 18 y 19 de 1979) Centro de Investigación del IPN.
41. Sánchez R. J. Corriente de calcio en fibras musculares esqueléticas del anfibio. (Tesis 1977).
42. Schauf G. L. Penecek T. L. y Davis F. S. Potassium Currents Kinetics In Myxicola Axons Effects of conditioning prepulses. Journal General Physiology 68: 397-403 (1976).
43. Tasaki I. Nerve Excitation. EUA Charles C. Thomas 1968.
44. Ulbricht W. Ionic Channels and Gating Currents in Excitable Membranes. Ann. Rev. Biophys. Bioeng 6: 7-31 (1977).
45. Yeh. J. Z. y Narahashi Toshio. Kinetic Analysis of Pancuronium Interaction with Sodium Channels in Scuid Membranes. Journal General Physiology. 69 (1977).
46. Yusta AA. Física para las ciencias de la vida y de la salud. Fondo Educativo Interamericano, S. A. (1978)
47. Plonsey.

