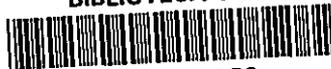


BIBLIOTECA UCM



5306065673

T 591.18
ARA
CAR

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



**CARACTERÍSTICAS Y FUNCIÓN DE LOS CANALES IÓNICOS
DE MEMBRANA DEL MÚSCULO DEL CANGREJO DE RÍO**

ALFONSO ARAQUE ALMENDROS

INSTITUTO CAJAL
C.S.I.C.

Tesis Doctoral
Julio, 1993

R. 22.506



Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INSTITUTO CAJAL

Avenida Doctor Arce, 37. 28002 Madrid, España

~~TEL: 91 586 47 40 FAX: 91 586 47 47~~

WASHINGTON BUÑO BUCETA, Doctor en Medicina, Profesor de Investigación del Consejo Superior de investigaciones Científicas

CERTIFICA: Que D. Alfonso Araque Almendros ha realizado bajo su dirección, en el Instituto de Neurobiología "Santiago Ramón y Cajal" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada "CARACTERISTICAS Y FUNCION DE LOS CANALES IONICOS DE MEMBRANA DEL MUSCULO DEL CANGREJO DE RIO" para alcanzar el Grado de Doctor, y queda conforme con su presentación para que sea juzgada.

Y para que así conste, firma el presente en Madrid, a dos de Junio de mil novecientos noventa y tres.

AUTOR DE TESIS Fdo.: Washington Buño

Fdo. Alfonso Araque Almendros.

A mis padres, Antonio y Araceli

A mis hermanos

A Maica, Chiquilla de mis sueños

...el espíritu humano revelaba su participación en el universo mediante teoremas exactos...

"Memorias de Adriano", Marguerite Yourcenar.



"Mafalda 1", Quino.

... Y en tanto que él iba de aquella manera menudeando tragos, no se le acordaba de ninguna promesa que su amo le hubiese hecho, ni tenía por ningún trabajo, sino por mucho descanso, andar buscando las aventuras, por peligrosas que fuesen.

"El Ingenioso Hidalgo Don Quijote de la Mancha",
Miguel de Cervantes.

A MODO DE AGRADECIMIENTOS

Muchos son quienes han contribuido, aun sin saberlo, a que haya llegado hasta aquí. De todos debo y quiero acordarme ahora.

Washington Buño, mi maestro. Que me enseñó electrofisiología (lo de menos), el gusto y el entusiasmo por la Ciencia. Y más, que no todo en la vida es Ciencia. Trabajar con él siempre es un privilegio y un placer. Mi mayor admiración, respeto y afecto.

Juan Lerma, quien primero me ayudó en esto. Riguroso, a veces severo, pero siempre a mano y dispuesto para cualquier ayuda. Aún recuerdo mi primer día, que me invitó a comer, y un café que apenas pude terminar, y es que el cangrejo siempre ha mandado.

Luis Barrio, el tercero que me acogió en el viejo edificio, afable y espléndido, a quien debo muchos buenos consejos.

La calidad científica y humana de ellos tres ha sido y es referente de mi esfuerzo.

Benjamín Fernández, que quiso enviarme al Instituto Cajal, casi sin conocerme, con una confianza en mí inestimable.

José María Velasco, un torrente de aire fresco, que me conoció antes que yo a él.

Omar Macadar, en un verano inolvidable. Gran maestro. Privilegio de haberle conocido, por su hablar y su escuchar. Es difícil aprender tanto, de tanto, en tan poco tiempo. Además traía cerezas, y la pasamos bien, muy bien.

También los franceses. Sobre todo, Daniel Cattaert y François Clarac. Y Marsella.

Mis amigos del laboratorio. Antonia García, que siempre me ha escuchado, que no es poco, y a quien debo más de lo que imagina. Paco Peláez, que me enseñó a tomar sidra y, aunque no es del atleti, siempre me ayuda. Cristián Bonansco, que no sé, pero que está. Michel Borde, con quien me gusta discutir, que aprendo mucho, y que además juega al fútbol. Y los que serán. Espero.

Mis amigos de fuera. Todos. Ellos se saben. Y Miguel, compañero de viaje. Y Jesús y Montse, que siempre están a un fin de semana de Venecia.

Mi familia, y, sobre todo Maica, porque quiere y porque quiero. Ayuda, estímulo y comprensión. Que mucho de mí es de ellos.

También la reina de Africa y el hombre tranquilo, el adagietto, los alfiles, los trenes, Atenea.

Quiero agradecer a la Caja de Madrid, la beca.

A los agraviados, si los hay, que los habrá: gracias por la benevolencia.

He aprendido mucho y disfrutado más, pero lo mejor, sin duda, es haberlos conocido.

INDICE



I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

| | |
|---|----|
| I.1. INTRODUCCION | 2 |
| I.2. INTRODUCCION AL PREPARADO EXPERIMENTAL | 7 |
| 2.I. AFERENCIAS Y SINAPSIS | 7 |
| IA. Características morfológicas | 7 |
| IB. Características fisiológicas | 8 |
| 2.II. FIBRA MUSCULAR | 11 |
| IIA. Características morfológicas | 11 |
| IIB. Características fisiológicas | 11 |
| 2.III. ANATOMIA | 12 |
| I.3. OBJETIVOS | 14 |

II. MATERIALES Y METODOS

| | |
|--|----|
| II.1. DISECCION | 18 |
| II.2. ESTIMULACION AFERENTE | 19 |
| II.3. MICROELECTRODOS | 20 |
| II.4. REGISTRO INTRACELULAR | 21 |
| 4.I. FIJACION DE CORRIENTE CON DOS ELECTRODOS | 23 |
| 4.II. FIJACION DE VOLTAJE CON DOS ELECTRODOS | 24 |
| 4.III. CONDICIONES DE REGISTRO | |
| o CRITERIOS DE BONDAD DE REGISTRO | 27 |
| IIIA. Fijación temporal de V_m | 27 |
| IIIB. Fijación espacial de V_m | 28 |
| II.5. SOLUCIONES DE PERFUSION | 30 |
| II.6. APLICACION LOCALIZADA EXTRACELULAR | 31 |
| II.7. INYECCION INTRACELULAR | 31 |
| II.8. PROCESAMIENTO DE RESULTADOS | 32 |
| 8.I. SUBSTRACCION DE CORRIENTES LINEALES | 32 |
| 8.II. AJUSTES EXPONENCIALES A CORRIENTES | 33 |
| 8.III. ESTADISTICA | 33 |

III. RESULTADOS

| | |
|---|-----|
| III.1. ACTIVIDAD ELECTRICA: POTENCIAL Y CORRIENTES TOTALES DE MEMBRANA. | |
| 1.I. RESUMEN | 36 |
| 1.II. INTRODUCCION | 37 |
| 1.III. METODOS | 38 |
| 1.IV. RESULTADOS | 39 |
| 1.V. DISCUSION | 45 |
| III.2. CARACTERIZACION DE LA CORRIENTE INSTANTANEA DE PERDIDA (I_p). | |
| 2.I. RESUMEN | 47 |
| 2.II. INTRODUCCION | 48 |
| 2.III. METODOS | 50 |
| 2.IV. RESULTADOS | 51 |
| IVA. Caracterización general | 51 |
| IVB. Efecto de distintos iones sobre I_p | 54 |
| 2.V. DISCUSION | 56 |
| III.3. CARACTERIZACION DE LA CORRIENTE ACTIVADA POR HIPERPOLARIZACION (I_{AB}). | |
| 3.I. RESUMEN | 63 |
| 3.II. INTRODUCCION | 64 |
| 3.III. METODOS | 66 |
| 3.IV. RESULTADOS | 69 |
| IVA. Relación I-V instantánea de I_{AB} | 71 |
| IVB. Dependencia de voltaje de G_{AB} | 72 |
| IVC. Dependencia de tiempo de I_{AB} | 74 |
| IVD. Naturaleza iónica de I_{AB} . Efecto de iones fisiológicos | 76 |
| IVDa. Iones Na^+ | 77 |
| IVDb. Iones Ca^{2+} y Mg^{2+} | 77 |
| IVDc. Iones Cl^- | 77 |
| IVDd. Iones K^+ | 80 |
| IVE. Efecto de iones no fisiológicos | 84 |
| IVEa. Cationes monovalentes (Cs^+ y Rb^+) | 84 |
| IVEb. Cationes divalentes (Ba^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+}) | 86 |
| 3.V. DISCUSION | 86 |
| III.4. CARACTERIZACION DEL BLOQUEO DE I_{AB} POR Cd^{2+} Y Zn^{2+}. | |
| 4.I. RESUMEN | 91 |
| 4.II. INTRODUCCION | 92 |
| 4.III. METODOS | 93 |
| 4.IV. RESULTADOS | 94 |
| 4.V. DISCUSION | 105 |

| | |
|--|-----|
| III.5. CARACTERIZACION DE LA CORRIENTE DE ENTRADA ACTIVADA POR DESPOLARIZACION (I_{Ca}). | |
| 5.I. RESUMEN | 110 |
| 5.II. INTRODUCCION | 111 |
| 5.III. METODOS | 115 |
| 5.IV. RESULTADOS | 119 |
| IVA. Naturaleza iónica de I_{Ca} | 119 |
| IVB. Propiedades generales | 119 |
| IVC. Efecto de cationes divalentes | 127 |
| IVCa. Cationes bloqueantes | 127 |
| IVCb. Cationes permeantes | 127 |
| IVD. Dependencia de voltaje de I_{Ca} | 130 |
| IVDa. Activación | 130 |
| IVDb. Inactivación | 132 |
| IVE. Dependencia de tiempo de I_{Ca} | 135 |
| IVEa. Activación | 135 |
| IVEb. Inactivación | 138 |
| IVF. Corriente de Ventana | 141 |
| IVG. Farmacología | 143 |
| 5.V. DISCUSION | 146 |
| | |
| III.6. CARACTERIZACION DE LA CORRIENTE DE SALIDA RETRASADA ACTIVADA POR DESPOLARIZACION (I_K). | |
| 6.I. RESUMEN | 151 |
| 6.II. INTRODUCCION | 152 |
| 6.III. METODOS | 153 |
| 6.IV. RESULTADOS | 154 |
| IVA. Relación I-V instantánea de I_K | 156 |
| IVB. Naturaleza iónica de I_K | 158 |
| IVC. Dependencia de voltaje de I_K | 158 |
| IVD. Dependencia de tiempo de I_K | 160 |
| IVE. Efecto de TEA | 164 |
| IVF. Efecto de Ba^{2+} extracelular | 164 |
| 6.V. DISCUSION | 166 |
| | |
| III.7. CARACTERIZACION DE LA CORRIENTE DE SALIDA INICIAL ($I_{K(Ca)}$). | |
| 7.I. RESUMEN | 169 |
| 7.II. INTRODUCCION | 170 |
| 7.III. METODOS | 172 |
| 7.IV. RESULTADOS | 172 |
| IVA. Naturaleza iónica de $I_{K(Ca)}$ | 175 |
| IVB. Efecto de iones que modifican I_{Ca} | 176 |
| IVC. Efecto de quelantes de Ca^{2+} intracelulares | 176 |
| IVCa. EGTA | 176 |
| IVCb. BAPTA | 178 |
| IVD. Dependencia de tiempo de $I_{K(Ca)}$ | 182 |
| IVE. Efecto de TEA | 183 |
| 7.V. DISCUSION | 183 |

**III.8. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS CORRIENTES ACTIVADAS POR
DESPOLARIZACION.**

| | |
|------------------------------|-----|
| 8.I. RESUMEN | 188 |
| 8.II. INTRODUCCION | 189 |
| 8.III. METODOS | 192 |
| 8.IV. RESULTADOS | 194 |
| 8.V. DISCUSION | 206 |

IV. CONCLUSIONES

| | |
|--|-----|
| IV.1. DE LAS CARACTERISTICAS DE LOS CANALES IONICOS DE MEMBRANA | 214 |
| IV.2. DE LA FUNCION DE LOS CANALES IONICOS DE MEMBRANA | 216 |

| | |
|---|-----|
| V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 217 |
|---|-----|

ABREVIATURAS

- BAPTA: Acido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N'N'-tetraacético.
- CCVD: Canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes.
- CEPS: Corriente excitadora postsináptica.
- CIPS: Corriente inhibidora postsináptica.
- DHP: Dihidropiridina.
- E-C: Excitación-contracción.
- EGTA: Acido etilenglicol-bis-(β-aminoetileter)N,N,N'N'-tetraacético.
- GABA: Acido γ-aminobutírico.
- Glu: Acido L-Glutámico.
- ips: impulsos por segundo.
- LCIC: Liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺.
- PAS: Potencial de acción simulado.
- PEPS: Potencial excitador postsináptico.
- PIPS: Potencial inhibidor postsináptico.
- TEA: Cloruro de tetraetilamonio.
- TTX: Tetrodotoxina.
- V_m: Potencial de membrana.
- V_r: Potencial de membrana en reposo.
- [n⁺]_i: Concentración intracelular del ión n.
- [n⁺]_o: Concentración extracelular del ión n.

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

I.1. INTRODUCCION

El Sistema Nervioso es un conjunto organizado de células interconectadas mediante sinapsis. Funcionalmente, se comporta como un procesador de la información que recibe del medio ambiente, a través de estructuras especializadas en órganos sensoriales, y de su propia actividad, y con la que elabora respuestas biológicamente adecuadas. La descripción de las operaciones y la caracterización de los mecanismos subyacentes a la integración de información, considerada ésta como la síntesis de información procedente de diferentes entradas y la elaboración de la respuesta en función de ellas, es uno de los principales objetivos perseguidos por la Neurofisiología.

La integración de información por el SN es un proceso que tiene lugar en todos sus sucesivos niveles de complejidad, desde niveles neuronales y subneuronales hasta niveles de circuitos neuronales jerarquizados de complejidad creciente. En todos ellos, la integración de información viene determinada tanto por las propiedades estructurales, morfológicas y conectivas del sistema como por las íntimas operaciones que realiza, estableciendo la función de relación entre la información aferente y la información eferente.

Considerada la integración de información a nivel neuronal, donde la información aferente es aportada por la actividad sináptica, la integración neuronal resulta de la interacción de las aferencias sinápticas y de las propiedades intrínsecas de la membrana neuronal, siendo determinantes en tal interacción las propiedades estructurales, morfológicas y topológicas de sus

elementos, v. gr., la morfología celular, y en especial de la membrana extracelular, la topología de las aferencias sinápticas, la distribución espacial de los canales de membrana quimio- y voltaje-dependientes, el grado de compartimentación intracelular, la distribución iónica intra y extracelular, etc.

Las propiedades intrínsecas de la membrana neuronal son determinadas por la permeabilidad selectiva de la membrana a diferentes iones (generándose así una diferencia de potencial eléctrico o voltaje a través de la membrana), por la variación de dicha permeabilidad en función del voltaje de membrana y del tiempo (mediante la activación de conductancias de membrana dependientes de voltaje y de tiempo) y por la interacción de tales conductancias entre sí y con aquellas quimio-dependientes.

Todas las células, y en particular las células excitables (células nerviosas, musculares y endocrinas, fundamentalmente) presentan una diferencia de potencial eléctrico a través de su membrana como consecuencia de la distribución iónica asimétrica que ella separa y de su permeabilidad iónica selectiva. Asimismo, las células excitables pueden presentar variaciones del potencial de membrana (V_m), mediadas por la activación de conductancias de membrana quimio-dependientes y/o voltaje-dependientes, como resultado de la variación de su permeabilidad iónica. Variaciones específicas de V_m constituyen el substrato físico de la fisiología, en cuanto que funcionamiento, del SN a nivel neuronal. Así, tales variaciones de V_m , que corresponden a la actividad eléctrica celular, son, directa o indirectamente, responsables de la transducción de información, de la conducción y codificación de la información, y de la transferencia de

información pre-postsináptica mediante la liberación de neurotransmisores resultante en la excitación e inhibición neuronal.

En tanto que las conductancias quimio-dependientes median la transducción de la información pre-postsináptica, las conductancias voltaje-dependientes son las responsables de las propiedades intrínsecas neuronales involucradas en la conducción e integración neuronal de información.

Para la comprensión de los fenómenos complejos que ocurren a nivel del Sistema Nervioso Central se ha recurrido al análisis de sistemas de mayor simplicidad que posibiliten y faciliten su estudio. Este sistema sencillo puede servir como un modelo a partir del cual pueden inferirse leyes generales aplicables a sistemas más complejos. Así, el sistema ideal de mayor simplicidad para el estudio de la integración neuronal lo constituiría aquél que, recibiendo escasas y controlables aferencias sinápticas, posea un relativamente reducido número de conductancias de membrana responsables de sus propiedades intrínsecas que, a su vez, determinen una eferencia simple y cognoscible del sistema.

Las células musculares de invertebrados pueden recibir múltiples aferencias sinápticas, tanto de carácter excitador como inhibitorio, y poseen diferentes conductancias voltaje-dependientes responsables de la eferencia del sistema manifestada en la contracción muscular. Así, a diferencia de lo que ocurre en vertebrados, parte de la integración en invertebrados se realiza en las propias células musculares.

Según ello, un modelo extraordinariamente simple para el

estudio de la integración neuronal lo constituye el sistema neuromuscular del músculo abductor de la pinza de la primera pata marchadora del cangrejo de río. Cada fibra de este músculo está inervada por un único axón excitador y un único axón inhibitor, que utilizan como neurotransmisores en sus respectivas sinapsis, ácido L-glutámico (Glu) y ácido γ -aminobutírico (GABA). Por otra parte, la membrana de las fibras de este músculo presenta propiedades eléctricas características y diferenciadas. En efecto, la despolarización de la membrana de estas fibras musculares no provoca la generación de potenciales de acción "todo o nada", sino la aparición de potenciales graduados de amplitud creciente en función del grado de despolarización. Asimismo, la hiperpolarización de la membrana induce una disminución retardada de la resistencia de membrana. La contracción muscular, esto es la eferencia del sistema, es graduada y función del grado de despolarización alcanzado por la fibra muscular. De este modo, el músculo abductor constituye un sistema excelente para el estudio de la integración sináptica en cuanto que la aferencia de información, constituida por las escasas aferencias sinápticas, es experimentalmente controlable; en cuanto que las propiedades intrínsecas de membrana, esto es, la actividad eléctrica de su membrana y los canales iónicos responsables de ella, son experimentalmente determinables, dada la relativa simplicidad de aquélla y el escaso número de éstos; y en cuanto que la señal eferente y la eferencia del sistema, es decir, el influjo de Ca^{2+} y la contracción muscular, respectivamente, son cognoscibles y fácilmente determinables.

Así, si como ha quedado expuesto, el SN se caracteriza

funcionalmente por la integración de información aferente y elaboración de respuestas eferentes, a diferencia de lo que ocurre en vertebrados, las fibras musculares del músculo abductor no se comportan como meras células efectoras sino que, actuando como verdaderos elementos del SN, esto es como verdaderas neuronas, son capaces de "pensar", en tanto que ellas mismas son responsables de la integración de información procedente de distintas aferencias sinápticas y, de acuerdo a sus propiedades intrínsecas de membrana reflejadas en su actividad eléctrica, ellas mismas elaboran una respuesta eferente que conduce a su propia contracción muscular.

Este sistema cumple, por tanto, las condiciones ideales buscadas en un sistema simple, para poder inferir leyes generales a partir de él. Además, este sistema es especialmente atractivo, pues dentro de su simplicidad reproduce de manera análoga los procesos de integración neuronal de sistemas complejos.

I.2. INTRODUCCION AL PREPARADO EXPERIMENTAL

Las extremidades torácicas, o pereiópodos, de los crustáceos decápodos están divididas en 6 segmentos que, de parte proximal a distal, reciben el nombre de protopodito, isquiopodito, meropodito, carpopodito, propodito y dactilopodito.

El propodito aloja los dos músculos responsables de la apertura y cierre de la pinza, a saber, el músculo abductor en posición dorsal y el músculo aductor en posición ventral.

El sistema neuromuscular del músculo abductor de la pinza de la primera pata marchadora del cangrejo de río (en adelante, músculo abductor hará referencia a este músculo) está constituido por un conjunto de fibras musculares que reciben inervación eferente excitadora e inhibidora proveniente de la cadena ganglionar del Sistema Nervioso Central.

2.I. AFERENCIAS Y SINAPSIS

IA. Características Morfológicas

Como ha quedado dicho, las fibras musculares de invertebrados pueden recibir inervación múltiple de axones procedentes de distintas neuronas, tanto motoneuronas como neuronas inhibitoras. Las fibras del músculo abductor reciben aferencias motoras a través de un único axón excitador. Por tanto, los potenciales excitadores postsinápticos (PEPS) generados en la fibra muscular son de carácter unitario, entendiéndose por tal aquellos potenciales postsinápticos generados por un único axón. Paralelamente, un único axón inhibitor inerva las fibras musculares generando potenciales inhibidores postsinápticos (PIPS) unitarios.

El axón excitador tiene su origen en una motoneurona situada

en el hemiganglio ipsilateral del 2º ganglio torácico y discurre a lo largo de la pata inmerso en el nervio periférico. En el propodito, emite sucesivas colaterales que, siguiendo un patrón en forma de Y respecto al eje proximal-distal, da lugar a ramas secundarias, terciarias, etc. Estas finalizan en numerosos botones terminales presinápticos (entre 40 y 50) (Bittner y Swell, 1976) distribuidos sobre las fibras musculares a lo largo de toda su longitud, inervando así a modo de rosario la fibra muscular en su conjunto.

Por su parte, el axón inhibitor discurre paralelamente al axón excitador y de manera semejante emite sucesivas colaterales que finalizan en una serie de botones terminales que forman sinapsis inhibitoras sobre la fibra muscular adyacentes a las sinapsis excitadoras. Previamente, cada una de las colaterales da lugar a una nueva colateral que forma sinapsis inhibitora con la terminal presináptica excitadora a escasas micras del lugar de liberación del neurotransmisor excitador (Atwood y Morin, 1970; Jahromi y Atwood, 1974). Ambas sinapsis constituyen la base morfológica de la inhibición postsináptica y presináptica, respectivamente, presentes en este sistema neuromuscular (Dudel y Kuffler, 1961b; Dudel, 1965a,b; Takeuchi y Takeuchi, 1966a,b). La morfología ultraestructural de estas sinapsis, tanto la excitadora como las inhibitoras, es muy semejante a la descrita para muchas de las sinapsis del Sistema Nervioso Central de vertebrados y de invertebrados (Peters et al., 1970; Atwood, 1982; Keller y White, 1987).

IB. Características Fisiológicas

El axón excitador del músculo abductor es de carácter

tónico, esto es, conduce potenciales de acción a baja frecuencia durante largos períodos de tiempo, en contraposición a aquellos axones fásicos que permaneciendo usualmente silentes, eventualmente conducen potenciales de acción a alta frecuencia (Govind y Atwood, 1982).

Por otra parte, el control inhibitor se muestra más intenso en aquellas fibras musculares que presentan características más tónicas. Si bien el papel funcional de esta organización diferenciada de la inhibición es desconocido, se ha especulado con la posibilidad de que se permitiese así aumentar la velocidad de respuesta del músculo cuando ambas entradas sinápticas, excitadora e inhibitora, están simultáneamente activadas (Bush, 1962; Atwood y Bittner, 1971; Govind y Atwood, 1982).

El neurotransmisor utilizado por el axón excitador es Glu (Takeuchi y Takeuchi, 1964; Onodera y Takeuchi, 1975; Kawagoe et al., 1981). Este, tras su unión a receptores específicos de la membrana postsináptica provoca la apertura de un canal de membrana catiónico que aumenta la permeabilidad de la membrana postsináptica a Na^+ , y posiblemente Ca^{2+} , provocando la despolarización transitoria de la membrana postsináptica en forma de potenciales excitadores postsinápticos (PEPS), cuyo potencial de inversión se sitúa en torno a 20 mV (Takeuchi y Takeuchi, 1964; Dudel, 1974; Onodera y Takeuchi, 1975). Las respuestas del músculo abductor a la aplicación de Glu presentan una acusada desensibilización del complejo canal-receptor de ácido glutámico, del cual se han distinguido cuatro tipos diferenciados según su velocidad de desensibilización (Takeuchi y Takeuchi, 1964; Gershenfeld, 1973; Dudel et al., 1990).

Por otra parte, tanto la inhibición presináptica como postsináptica están mediadas por GABA (Boistel y Fatt, 1958; Takeuchi y Takeuchi, 1965; Takeuchi y Takeuchi, 1966a,b). La unión de este neurotransmisor a receptores postsinápticos específicos, tanto de la membrana muscular como de la terminal presináptica excitadora, provoca la generación de potenciales inhibidores postsinápticos (PIPS) como consecuencia de la apertura de un canal específico aniónico y el consiguiente incremento de la permeabilidad a los iones Cl^- (Boistel y Fatt, 1958; Dudel, 1965a,b; Takeuchi y Takeuchi, 1966a,b). El potencial de inversión de los PIPS, asociado al potencial de equilibrio de Cl^- , está próximo al potencial de membrana en reposo (V_r) de la fibra muscular, es decir entre -50 y -80 mV (Boistel y Fatt, 1958). El complejo canal-receptor de GABA del músculo abductor y el de la terminal presináptica excitadora pertenecen a dos de los cuatro tipos diferentes de complejos canal-receptor de GABA que, en función del grado de desensibilización y de la sensibilidad al ácido β -guanidinopropiónico, han sido descritos en crustáceos (véase Atwood, 1982). Así, aun cuando ambos presentan escasa desensibilización (Dudel y Hatt, 1976), éste es sensible al ácido β -guanidinopropiónico en tanto que aquél no lo es (Gershenfeld, 1973; Atwood, 1982). Ambos presentan, además, una estrecha similitud con el canal de GABA tipo A descrito en vertebrados (véase Hille, 1992).

Tanto la sinapsis excitadora como inhibidora presentan propiedades relevantes, tales como la sumación y la facilitación temporales. En tanto que aquélla es consecuencia de las características eléctricas pasivas de la membrana postsináptica,

el mecanismo subyacente a ésta permanece aún controvertido.

2.II. FIBRA MUSCULAR

IIA. Características morfológicas

Las fibras musculares son plurinucleadas y resultan de la fusión de varios mioblastos. Su tamaño varía entre 0.1 y 1 mm de longitud y 40 y 500 μm de diámetro dependiendo de su posición en el músculo y de la edad y tamaño del individuo (Bittner, 1989).

El citoplasma de las fibras musculares de crustáceos está rodeado por un sarcolema compuesto por una membrana plasmática compleja y por fibras de colágeno. La superficie de la fibra muscular está frecuentemente interrumpida por profundas y largas invaginaciones transversales y longitudinales de la membrana plasmática, que, a su vez, pueden estar interrumpidas por sucesivas invaginaciones de menor tamaño, de tal suerte que todo el citoplasma de la fibra muscular se halla próximo al espacio extracelular (Brandt et al., 1965; Chapple, 1982). Asimismo, a partir de la membrana plasmática y de sus invaginaciones, surgen unos sistemas de túbulos denominados Sistemas de Túbulos T o Transversos (STT) que dirigiéndose bien hacia la banda H en el centro del sarcómero, bien hacia la parte lateral de la banda A, hacen contacto a este nivel con el retículo sarcoplásmico a través de estructuras discontinuas electrón-densas, formando así díadas o tríadas características (Franzini-Armstrong, 1973; Chapple, 1982; Franzini-Armstrong et al., 1986).

IIB. Características fisiológicas

Desde un punto de vista funcional y atendiendo a las propiedades eléctricas de membrana, la longitud de los sarcómeros, la velocidad de desarrollo de tensión isométrica y

la tensión máxima desarrollada, las fibras musculares de crustáceos han sido clasificadas en: a) fibras musculares fásicas, generadoras de potenciales de acción "todo o nada" o respuestas graduadas de gran amplitud, sarcómeros cortos ($<4 \mu\text{m}$), rápido desarrollo de tensión isométrica y baja tensión máxima; b) fibras musculares tónicas, que no producen potenciales de acción "todo o nada" sino respuestas graduadas de baja amplitud, que poseen largos sarcómeros ($>6 \mu\text{m}$) y que presentan un desarrollo de tensión isométrica lento y una alta tensión máxima; c) fibras musculares intermedias, cuyas características son intermedias de aquéllas que presentan a) y b) (Atwood, 1973; Govind y Atwood, 1982). Aun cuando ciertos músculos poseen fibras musculares con características uniformes, es común que aquéllos posean fibras musculares de diversos tipos (Govind y Atwood, 1982).

Las fibras musculares del músculo abductor se catalogan como fibras musculares tónicas o intermedias. Así, no generan potenciales de acción "todo o nada", sino que presentan despolarizaciones graduadas dependiendo de la intensidad de estimulación (véase Govind y Atwood, 1982). Producen además contracciones lentas y mantenidas que son función monotónica creciente del grado de despolarización generado por los PEPS (Orkand, 1962; Bittner, 1968; Bittner, 1989).

2.III. ANATOMIA

Cada uno de los dos hemiganglios del 2º ganglio torácico emite ipsilateralmente tres raíces nerviosas secundarias y una raíz nerviosa principal. Esta última se prolonga en un gran nervio periférico por donde discurren la totalidad de fibras

nerviosas, tanto aferentes como eferentes, que inervan la primera pata marchadora. La organización topológica de los axones dentro del nervio es extraordinariamente precisa, formando haces nerviosos definidos que incluyen el conjunto de axones motores inervantes del mismo músculo, el conjunto de axones motores inervantes de músculos agonistas, y el conjunto de axones inhibidores de músculos antagonistas. Así, los axones excitador e inhibidor que inervan cada fibra muscular corren por haces nerviosos distintos. Ello facilita el aislamiento, identificación y estimulación independiente de los axones excitador e inhibidor del músculo abductor. El nervio periférico, que discurre emitiendo numerosas ramas en cada uno de los segmentos, se sitúa ventralmente en el meropodito y asciende a niveles mediales en el propodito, donde corre a través del conjuntivo que separa los músculos abductor y aductor.

El músculo abductor, de menor tamaño que el músculo aductor, ocupa una posición dorsal en el propodito.

I.3. OBJETIVOS

Los canales iónicos de membrana voltaje-dependientes constituyen un elemento determinante de las propiedades intrínsecas de membrana. Así, el análisis de éstas como elemento fundamental en la integración de información requiere el conocimiento y caracterización de los canales iónicos, y en particular de aquéllos responsables de las corrientes activadas por despolarización que median los potenciales de acción de la célula postsináptica. Por tanto, el primer objetivo es:

1. CARACTERIZACION ELECTROFISIOLOGICA DE LOS CANALES VOLTAJE-DEPENDIENTES ACTIVADOS POR DESPOLARIZACION PRESENTES EN EL MUSCULO DEL CANGREJO DE RIO.

Si bien las corrientes activadas por despolarización han recibido tradicionalmente mayor atención en su estudio, como responsables de la conducción y codificación de la información neuronal, a medida que aumenta el conocimiento sobre las corrientes activadas por hiperpolarización se extiende la idea de su relevancia en la modulación de la información aferente y, en último extremo, en su contribución a las propiedades integradoras neuronales. Por tanto, el segundo objetivo es:

2. CARACTERIZACION ELECTROFISIOLOGICA DE LOS CANALES VOLTAJE-DEPENDIENTES ACTIVADOS POR HIPERPOLARIZACION PRESENTES EN EL MUSCULO DEL CANGREJO DE RIO.

Si bien desde un punto de vista eléctrico, las interacciones de corrientes voltaje-dependientes son de carácter lineal, debido a las características eléctricas de la membrana de las células excitables (v. gr., su naturaleza de condensador eléctrico y su acción como filtro pasa-bajo), tales interacciones se ven

reflejadas en variaciones no lineales de V_m , debidas a los cambios de conductancia que los acompañan. Puesto que, en último término, la base física de la información a nivel neuronal reside en V_m , interesa el conocimiento de la interacción de las corrientes voltaje-dependientes y su expresión en términos de V_m . Además, las condiciones reales y fisiológicas de funcionamiento de la membrana celular son de carácter dinámico, es decir, la actividad eléctrica de la célula excitable se corresponde con variaciones en el tiempo de V_m . Interesa, pues, conocer cómo es la evolución dinámica de las corrientes de membrana y de la suma de ellas cuando V_m está variando, y cómo esta evolución dinámica de V_m es responsable de la actividad eléctrica de la membrana muscular. Tal conocimiento permitirá así establecer el significado funcional de los canales involucrados en las corrientes voltaje-dependientes que median los potenciales de acción de la célula postsináptica. Por tanto, el tercer objetivo es:

3. ESTUDIO DE LA INTERACCION DE LAS CORRIENTES IONICAS ACTIVADAS POR DESPOLARIZACION.

La metodología experimental que se utilizará para la consecución de los dos primeros objetivos corresponderá a la establecida en la caracterización electrofisiológica de canales voltaje-dependientes. Así, se determinará: a) el ión o iones que median las distintas corrientes iónicas; b) las características de dependencia de tiempo y de voltaje de la activación de los canales así como de su inactivación; c) la capacidad de permeación de iones no fisiológicos a través de los distintos canales; d) la sensibilidad de los canales a distintos iones no

fisiológicos y diferentes compuestos orgánicos. Asimismo, se estudiarán los mecanismos de bloqueo de los canales como método de conocimiento de sus características biofísicas (mecanismos de activación e inactivación, mecanismos de permeación, selectividad iónica, etc.).

Para la consecución del tercer objetivo se estudiarán las respuestas en voltaje a la inyección de pulsos de corriente en condiciones control y tras la supresión de determinadas corrientes voltaje-dependientes. La supresión de una corriente se llevará a cabo mediante la adición de bloqueantes específicos o la supresión de los iones transportadores de la corriente. Para establecer la dinámica de las corrientes de membrana activadas durante el potencial de acción se procederá a la variación experimental de V_m , en condiciones control y tras la supresión de determinadas corrientes voltaje-dependientes, mediante potenciales de acción simulados que reproduzcan estrechamente la variación de V_m durante el potencial de acción de la fibra muscular.

II. MATERIALES Y METODOS

Los resultados experimentales presentados están basados en el estudio de más de 320 fibras musculares de la primera pata marchadora, tanto izquierda como derecha (en proporción semejante), de más de 250 cangrejos diferentes, de uno u otro sexo (en similar proporción) y cuyo tamaño varió entre 3 y 8 cm.

II.1. DISECCION

Una vez seccionada la primera pata marchadora a nivel del isquiopodito, fue colocada en una cámara de disección y bañada constantemente en solución fisiológica (Van Harreveld, 1936) a temperatura ambiente (20-23°C). El aislamiento del músculo abductor y del haz nervioso que incluía el axón excitador se realizó con material de microcirugía y se utilizó una lupa de disección (Nikon, x80) y una fuente de luz fría.

El aislamiento del haz excitador del músculo abductor se realizó en la región distal del meropodito. El haz excitador fue separado del resto con la ayuda de un capilar estirado; posteriormente, los distintos haces nerviosos fueron cortados. La identificación del haz así aislado se realizó mediante su estimulación extracelular (tal como luego quedará descrito) con trenes de pulsos (400 a 600 ms de duración del tren y 40 a 80 ips de frecuencia de los pulsos), que provocaron, en su caso, la contracción del músculo abductor (y generalmente aquella de músculos agonistas) con la consiguiente apertura de la pinza. Una similar estimulación conjunta del resto de haces nerviosos provocó la contracción del músculo aductor (así como de músculos agonistas en numerosos casos) y el cierre de la pinza, indicando la presencia del axón inhibitor del músculo abductor.

Colocada la región dorsal de la pata hacia la parte inferior, la parte ventral de la cutícula del propodito fue cortada y separada del resto, dejando al descubierto el músculo aductor. Una vez levantado éste, el músculo abductor quedó expuesto al exterior y accesible desde él. La parte distal de la pata desde el carpopodito, que incluía los haces nerviosos, fue separada del resto y trasladada a una cámara de perfusión continua de 2 ml de volumen. Esta estuvo colocada sobre una mesa pesada con un dispositivo neumático de amortiguación que posibilitaba un registro duradero impidiendo la transmisión de las vibraciones ambientales a la preparación.

La preparación fue iluminada desde abajo, observándose por transparencia, a través de la cutícula dorsal, las fibras musculares, que fueron penetradas con dos micropipetas movidas por sendos micromanipuladores (Zeiss-Jena).

Los experimentos se realizaron a la temperatura ambiente (20-23°C).

II.2. ESTIMULACION AFERENTE

La estimulación del haz excitador e inhibidor se realizó independientemente mediante sendos electrodos de succión conectados a través de sendas unidades aisladas de estimulación (Isolation Unit MOD-100) a un doble generador de pulsos digital (Cibertec-Stimulator CS 220). Los parámetros de estimulación variaron en cada caso pero se mantuvieron entre los siguientes límites:

- Frecuencia del pulso: 5-200 ips.
- Duración del pulso: 30-300 μ s.

- Intensidad del pulso: 10-100 mA.

La estimulación se realizó de manera continua o por trenes de pulsos.



II.3. MICROELECTRODOS

Para el registro y estimulación intracelular de la fibra muscular se utilizaron micropipetas constituidas por capilares de vidrio llenos de solución salina con un electrodo en su interior. Se emplearon capilares de 2 y 1.16 mm de diámetros externo e interno, respectivamente, con fibra de vidrio en su interior (A-M Systems, Inc.) y fueron estirados con un estirador (Brown-Flaming Micropipette Puller, Model P-80, Sutter Instruments Co.). Para satisfacer las condiciones necesarias para un óptimo registro y estimulación intracelular (muy baja resistencia y capacidad de los electrodos, que permitiesen el flujo instantáneo de grandes cantidades de corriente y evitasen la aparición de oscilaciones en la fijación de voltaje) el diámetro de la punta fue de 2-3 μm y la longitud de la región estirada menor de 5 mm. La solución salina generalmente utilizada para su llenado fue KCl 1 M. Ocasionalmente, se utilizó en su lugar acetato potásico 3 M, especialmente en aquellos experimentos que incluían el análisis de PIPS, CIPS o respuestas a GABA, con el fin de evitar posibles alteraciones de $[\text{Cl}^-]_i$. La forma y llenado de las micropipetas fue controlada bajo microscopio (Nikon, x400). El electrodo interior fue de Ag-AgCl. Los electrodos así obtenidos presentaron una impedancia de entre 0.5 y 5 M Ω y un comportamiento óhmico. Como electrodo de referencia se empleó un electrodo indiferente de Ag-AgCl de baja

resistencia, en comunicación con la solución de perfusión a través de un puente salino con agar (KCl 1 M; Agar 2%).

Para reducir la capacidad del condensador producido por la proximidad de ambas micropipetas se procedió al blindaje de uno de los electrodos; así, el electrodo utilizado como registrador de voltaje (electrodo de voltaje) fue cubierto hasta aproximadamente 1 mm de su extremo con pintura de plata conductora, que fue conectada a tierra a través del electrodo indiferente. Sobre ella, y para evitar su contacto con el líquido de perfusión y la consiguiente aparición de corrientes indeseables en el baño de registro, se extendió una capa de esmalte aislante.

II.4. REGISTRO INTRACELULAR

El empalamiento unicelular con dos microelectrodos permitió tanto el registro del voltaje de membrana (técnica de fijación de corriente) como el registro de las corrientes iónicas de membrana (técnica de fijación de voltaje con dos electrodos). Para ello se utilizó un amplificador Axoclamp-2A (Axon Instruments, Inc.). Se utilizaron dos puntas de prueba, cuyas respectivas impedancias de entrada fueron 10^{11} y $10^{10} \Omega$, para los electrodos de voltaje y corriente, respectivamente. La baja impedancia del preamplificador para el electrodo de corriente hizo posible la inyección de altas intensidades de corriente (hasta $10 \mu\text{A}$). Los estímulos de corriente y voltaje y las correspondientes respuestas de voltaje y corriente de membrana en condiciones de fijación de corriente o voltaje, respectivamente, fueron continuamente supervisados en un

osciloscopio analógico con persistencia (Tektronix D13) y almacenados en un grabador de cinta de FM (0-1250 Hz bandwidth; Hewlett-Packard, Modelo 3964a). Asimismo, de forma simultánea generalmente, y ocasionalmente a partir del grabador de cinta, los registros fueron almacenados en un ordenador personal (PC/AT, IBM). El almacenamiento de los registros en el ordenador implica tres procesos sucesivos:

a) La amplificación o atenuación de la señal, ajustando su amplitud para que, sin exceder al rango del nivel de entrada del ordenador, sea al menos el 20% de este rango.

b) La digitalización o muestreo de la señal, que consiste en la toma de valores de la señal original a intervalos fijos de tiempo definidos por la inversa de la frecuencia de muestreo. Para que un proceso digital (es decir, discontinuo según valores discretos de tiempo) reproduzca el proceso analógico original (es decir, continuo en el tiempo), se debe verificar el "Criterio de Nyquist", según el cual la frecuencia de muestreo de la digitalización debe ser superior al doble de la frecuencia máxima del proceso analógico original. Asimismo, para que aquél sea visualmente identificable con éste, aquélla frecuencia de muestreo debe ser cinco veces superior a ésta. Según ello, la frecuencia de muestreo utilizada para la digitalización de los registros no fue nunca inferior a 2 KHz, y la frecuencia máxima utilizada fue de 0.5 MHz., pudiéndose así analizar todos aquellos fenómenos cuya dinámica fue superior a 2 μ s.

c) El almacenamiento propiamente dicho, para lo cual se empleó el programa de ordenador "Clampex", perteneciente al conjunto de programas "Pclamp" (versión 5.0; Axon Instruments,

Inc.).

La amplificación o atenuación de la señal y su digitalización se realizó mediante un conversor analógico-digital fabricado por J.M. Ibarz, ingeniero del Depto. de Investigación del Hospital "Ramón y Cajal" de Madrid, que utiliza una tarjeta de conversión Lab Master TM-40 (Scientific Solutions Inc.).

El programa "Clampex" fue asimismo utilizado para la generación de pulsos de voltaje que, tras su transformación digital-analógica por el citado conversor analógico-digital, fueron introducidos en el amplificador y sirvieron como estímulos de corriente o voltaje intracelulares.

En ocasiones, bien fuese previamente a su almacenamiento o en su posterior procesamiento, los registros fueron filtrados con frecuencias de corte nunca inferiores a 1 KHz, utilizándose un filtro activo (Ithaco, Modelo 4212), de forma que la dinámica de los fenómenos estudiados no fuese distorsionada (véase más arriba).

4.I. FIJACION DE CORRIENTE CON DOS ELECTRODOS.

Desde un punto de vista eléctrico, las membranas biológicas pueden ser consideradas como un conjunto de resistencias y condensadores en paralelo que forman un circuito eléctrico que comunica el espacio intra y extracelular (Hodgkin y Huxley, 1952d).

Como ha quedado dicho, el registro de V_m se realiza clásicamente mediante la técnica de fijación de corriente. Esta se basa en el empalamiento celular con un microelectrodo que registra la diferencia de potencial existente entre él y un electrodo de referencia localizado en el baño de registro, o lo

que es lo mismo, entre el interior y el exterior celular, respectivamente. La metodología de estudio se fundamenta en el análisis de las variaciones de potencial producidas por diferentes estímulos como la activación de aferencias sinápticas, la aplicación de sustancias neuroactivas y, fundamentalmente, la inyección de corriente intracelular. Esta última provoca el flujo local de corriente a través de la membrana en forma de corriente iónica y capacitiva que se extiende radialmente a lo largo de la membrana, decreciendo su amplitud exponencialmente con la distancia (véase más abajo). La penetración de la misma célula con un segundo microelectrodo presenta notables ventajas experimentales. Así, el registro simultáneo de V_m en diferentes lugares de la célula permite el conocimiento preciso de las características pasivas de la membrana celular (resistencia de entrada y constantes de espacio y tiempo) y de la difusión electrotónica de los potenciales de membrana, hecho éste extraordinariamente relevante en el estudio de los potenciales sinápticos. La posibilidad de efectuar inyecciones de corriente intracelular a través de un microelectrodo diferente al utilizado para el registro de V_m representa una ventaja añadida, pues evita que pequeñas variaciones de la resistencia del microelectrodo de registro durante la inyección de corriente a su través conlleven a una falsa medida de V_m , de la resistencia de entrada y de la constante de tiempo de la membrana.

4.II. FIJACION DE VOLTAJE CON DOS ELECTRODOS

Frente a la técnica de fijación de corriente, que registra las variaciones de V_m y utiliza generalmente la inyección de corriente como estímulo, la técnica de fijación de voltaje

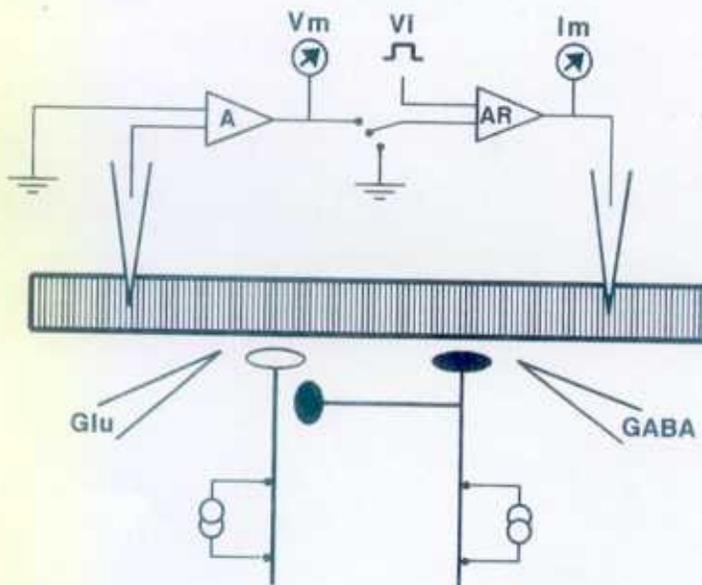


Ilustración introductoria. Representación esquemática de la preparación neuromuscular del músculo abductor del cangrejo de río. Se indican las aferencias excitadora e inhibitoras (terminales vacíos y llenos, respectivamente). A, amplificador; AR, amplificador de retroalimentación; V_m , potencial de membrana; V_i , potencial impuesto; I_m , corriente de membrana.

pretende el análisis de la corriente iónica de membrana mediante el control de V_m , manteniéndolo fijo en los valores deseados.

La Ilustración introductoria muestra una representación esquemática de la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos. El electrodo intracelular (denominado de voltaje) que registra V_m está conectado a un amplificador de retroalimentación de alta frecuencia de respuesta capaz de comparar el potencial registrado de la membrana con aquél impuesto por el experimentador. Las diferencias encontradas entre ambos voltajes son inyectadas intracelularmente por el amplificador en forma de corriente a través de un segundo electrodo (denominado de corriente), de esta manera se establece un circuito de retroalimentación negativa en el cual las corrientes inyectadas tienen el valor y signo adecuado para reducir las diferencias existentes entre los voltajes comparados, es decir para impedir la variación espontánea de V_m . La determinación de la magnitud de la corriente de inyección permite conocer la magnitud de la corriente que fluye a través de la membrana, puesto que aquélla es igual y de signo contrario a ésta.

La aparición de una variación en el voltaje de membrana implica un flujo de corriente capacitiva (I_c) en los condensadores y transmembrana (I_i) a través de las resistencias de membrana, de manera tal que la corriente total de membrana es la suma de las corrientes capacitivas y transmembrana. I_c se define como

$$I_c = C (dV/dt)$$

donde C es la capacidad del condensador (esto es, una constante definida por sus características físicas de coeficiente

dieléctrico, longitud y superficie), y dV/dt es la derivada del voltaje en función del tiempo. Así, en la medida que dV/dt tiende a cero, I_c también tiende a cero, y, por tanto, la corriente total es igual a I_i , quedando así aisladas las corrientes iónicas transmembrana objeto de nuestro interés.

4.III. CONDICIONES DE REGISTRO o CRITERIOS DE BONDAD DE REGISTRO

Dos son las principales limitaciones técnicas y experimentales que condicionan el registro idóneo del voltaje y de la corriente iónica de membrana, a saber, las condiciones de fijación de voltaje y corriente temporales y espaciales. Si bien tales condiciones son importantes en los registros obtenidos mediante fijación de corriente, ellos son extremadamente relevantes en condiciones de fijación de voltaje. Puesto que en ambos casos la naturaleza de los condicionantes es idéntica, haremos referencia a ellos exclusivamente en condiciones de fijación de voltaje, donde resultan decisivos, haciendo notar que los problemas y soluciones discutidos son válidos para los registros en condiciones de fijación de corriente.

IIIA. Fijación Temporal de V_m

La aplicación de un pulso de voltaje a la membrana provoca una variación de V_m , y durante el tiempo que tarde V_m en pasar de su valor inicial al final, I_c será distinta de cero y se sumará a I_i . Así, sólo quedarán las corrientes transmembrana cuya cinética sea más lenta que el tiempo consumido en las variaciones de voltaje. Por tanto, es condición indispensable para la obtención de registros de corriente transmembrana idóneos que la velocidad de variación del voltaje de membrana sea superior a la cinética de las corrientes transmembrana objeto de estudio. Las

características de los microelectrodos utilizados (forma y resistencia) y el blindaje empleado permitió que el tiempo máximo necesario para alcanzar el voltaje deseado fuese menor de 0.5 ms y que no existiesen variaciones de voltaje indeseadas (como consecuencia, por ejemplo, de la aparición de corrientes capacitivas entre ambos electrodos que provocasen variaciones en el voltaje fijado). Estos dos fueron los criterios seguidos para considerar que la fijación de voltaje temporal fue aceptablemente adecuada.

IIIB. Fijación espacial de V_m

La amplitud de una variación de voltaje en un punto determinado de la membrana celular (x_0) es función decreciente de la distancia de acuerdo a la ecuación:

$$V_{m(x)} = V_0 e^{-x/\lambda}$$

donde $V_{m(x)}$, es la amplitud de V_m en función de la distancia x alrededor de x_0 , V_0 es la amplitud de V_m en x_0 y λ es un parámetro denominado constante de espacio, definido por la raíz cuadrada del cociente entre la resistencia de membrana y la resistencia citoplasmática. De la anterior ecuación se puede deducir que λ representa la distancia entre x_0 y el punto en el cual V_m ha decrecido un 63% respecto a V_0 . Así pues, en condiciones de fijación de voltaje con dos electrodos sólo se tendrá un buen control del potencial de toda la membrana celular si la célula es suficientemente pequeña o si λ es suficientemente grande. En general, las medidas de corrientes generadas 0.1 veces λ más allá del punto de fijación de voltaje están sujetas a errores significativos.

La constante de espacio de las fibras musculares de

crustáceos en general, y en particular del músculo abductor (Bittner, 1989), es muy superior a la longitud de éstas. En efecto, el valor de λ varía entre 1 y 3 mm (Dudel y Kuffler, 1961a; Orkand, 1962; Bittner, 1968). Además, con el fin de verificar unas condiciones idóneas de control de V_m a lo largo de toda la fibra muscular, se escogieron para su estudio aquellos individuos cuyo tamaño fue menor de 8 cm y aquellas de sus fibras musculares cuya longitud fue menor de 400 μm . Así, considerando la longitud de la fibras musculares utilizadas y su constante de espacio, se puede esperar que, habiéndose satisfecho las condiciones necesarias para obtener una fijación de voltaje espacial idóneo, la fijación de voltaje a lo largo de toda la fibra muscular fue aceptablemente homogénea.

Más allá de estas consideraciones teóricas, dos son los criterios seguidos para la comprobación experimental de la bondad y homogeneidad de la fijación espacial de voltaje, a saber, el control efectivo de las corrientes de entrada activadas por despolarización, manifestado en la obtención de corrientes cuya amplitud y cinética de activación crecen y decrecen respectivamente con el incremento de la despolarización, y la ausencia de oscilaciones posteriores a la generación de aquellas corrientes. En efecto, la presencia de tales oscilaciones y/o la aparición de corrientes de entrada activadas por despolarización que presentan una activación rápida pero con un considerable retraso respecto a la despolarización, retardo que decrece con la despolarización sin ser acompañado de variaciones en la cinética de activación, y cuya amplitud no es función creciente del voltaje sino que es máxima a partir de una despolarización

umbral, indican que la condiciones de fijación de voltaje no son adecuadas (Mounier y Vassort, 1975b).

Aquellos fibras (en número menor del 20%) que no cumplieron los criterios considerados sobre la bondad de la fijación de voltaje, tanto espacial como temporal, no fueron consideradas.

II.5. SOLUCIONES DE PERFUSION

Con el fin de caracterizar las corrientes de membrana y los canales de membrana responsables de ellas, se trató de elucidar la naturaleza iónica de las corrientes de membrana, la susceptibilidad de distintos iones para permear a través de los canales de membrana y la susceptibilidad de éstos para ser bloqueados por distintos iones o moléculas orgánicas. Para ello se procedió a la perfusión extracelular con distintas soluciones obtenidas por modificación (equimolar, salvo indicación contraria) de una solución fisiológica, denominada Solución Normal. Esta resultó de la modificación de aquella descrita por Van Harreveld (1936). La composición de las distintas soluciones fue (en concentración mM):

Solución Normal: NaCl, 210; KCl, 5.4; CaCl₂, 13.5; MgCl₂, 2.6; tampón TRIS, 10; pH = 7.2 ajustado con HCl.

Solución sin Na⁺ extracelular (0 mM Na⁺): NaCl fue intercambiado por LiCl, cloruro de colina o Tris valorado con HCl.

Solución de n-veces [K⁺] normal: KCl fue añadido sin compensación de osmolaridad o bien reemplazando a NaCl (o el respectivo substituyente en solución 0 mM Na⁺).

Solución sin Ca²⁺ extracelular (0 mM Ca²⁺): CaCl₂ fue substituido por MgCl₂.

Solución sin Ca^{2+} extracelular y con EGTA extracelular (EGTA): solución idéntica a la anterior a la cual se añadió EGTA (5 mM) sin compensación de la osmolaridad.

Solución sin Cl^- extracelular (0 mM Cl^-): todas las sales de cloruro fueron reemplazadas por las correspondientes sales de metanosulfonato.

Solución con TEA extracelular (TEA): Cloruro de tetraetilamonio (TEA) (100 mM) fue añadido reemplazando a NaCl (o al respectivo substituyente en solución 0 mM Na^+).

Solución con cationes monovalentes no fisiológicos (X^+): sales de cloruro de éstos fueron añadidos reemplazando a NaCl (o al respectivo substituyente en solución 0 mM Na^+).

Solución con cationes divalentes no fisiológicos (Y^{2+}): sales de cloruro de éstos fueron añadidos reemplazando a CaCl_2 (o a MgCl_2 , en solución 0 mM Ca^{2+}).

II.6. APLICACION LOCALIZADA EXTRACELULAR

Por otra parte, se utilizó el sistema de pulsos de presión de aire (Picospritzer II, General Valve Corporation) para la aplicación extracelular de diferentes soluciones iónicas y sustancias neuroactivas. Para ello, se fabricó una micropipeta (a partir de un capilar de vidrio con el estirador arriba citado) que, una vez llena con la solución deseada, se localizó próxima a la fibra muscular registrada mediante el uso de un micromanipulador.

II.7. INYECCION INTRACELULAR

En determinados experimentos, el electrodo de corriente fue

substituido, tras un registro control, por un nuevo electrodo lleno con EGTA 0.7 M neutralizado con KOH (pH = 7.2), con BAPTA 160 mM neutralizado con KOH (pH = 7.2) o/y con TEA 1 M. Estas sustancias fueron ionofóricamente inyectadas intracelularmente con pulsos de corriente negativa (para aquéllas) y positiva (para ésta) de 100 nA y 500 ms de duración, durante 15 min.

II.8. PROCESAMIENTO DE RESULTADOS

"Clampfit" y "Clampan" fueron los programas, pertenecientes al arriba citado conjunto de programas "pClamp", que se utilizaron para la presentación gráfica y el análisis de los registros. Los programas de ordenador "Sigmaplot" (versiones 3.1 y 5.0; Jandel Scientific) y "Minsq" (versión 2.3; MicroMath Inc.) se utilizaron para la representación en gráficas cartesianas y el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos de los análisis.

8.I. SUBSTRACCION DE CORRIENTES LINEALES

Para el aislamiento de las corrientes dependientes de voltaje se procedió a la substracción de las corrientes lineales, a saber, las corrientes capacitivas y la corriente de pérdida (sobre la linealidad de ésta última, véase capítulo III.2). Para ello se procedió de la siguiente manera: inmediatamente antes de la aplicación de cada serie de pulsos del protocolo de test, se aplicaron 15 series idénticas entre sí y semejantes a aquélla pero cuya amplitud fue 15 veces menor, de manera que no activaron ninguna conductancia dependiente de voltaje; el ordenador personal efectuó la suma de las corrientes obtenidas por cada una de las series y su substracción de la corriente total generada

por la serie del protocolo de test.

8.II. AJUSTES EXPONENCIALES

Salvo indicación expresa contraria, para la determinación de las constantes de tiempo de las corrientes dependientes de voltaje se procedió al ajuste a ellas de curvas exponenciales utilizando para ello el programa de ordenador Clampfit. Las curvas exponenciales de ajuste pudieron presentar varios términos, siendo la curva exponencial general de la forma:

$$y = K + A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + \dots$$

donde K es el valor de y en el tiempo 0, A_n es la amplitud de la exponencial y τ_n es su constante de tiempo. El procedimiento de ajuste utilizó algoritmos que minimizaron de modo iterativo la suma de los cuadrados de las diferencias entre los puntos de la curva experimental y los de la curva de ajuste. El proceso se interrumpió cuando la variación de la constante de tiempo entre dos iteraciones sucesivas fue menor de 10 partes por millón.

8.III. ESTADISTICA

Los valores experimentales se ajustaron a ecuaciones siguiendo el algoritmo de Marquardt-Levenberg que determinó los parámetros que minimizaban la suma de cuadrados de las diferencias entre la variable dependiente de la ecuación y la del valor experimental. La bondad de este ajuste se cuantificó a partir del coeficiente de determinación, habiéndose utilizado el símbolo r para representarlo.

Se ha expresado la media y el error estándar de los datos, ya sean éstos valores experimentales o parámetros de ajuste.

Salvo indicación expresa contraria, para la comparación de medias de valores experimentales o de parámetros de ajuste se

utilizó el test t de Student, estableciéndose que las diferencias son significativas, muy significativas o altamente significativas según el parámetro t encontrado sea mayor que el teórico con una $p \leq 0.1$, $p \leq 0.05$ o $p \leq 0.01$, respectivamente. En caso contrario, se consideró que no existían diferencias significativas.

III. RESULTADOS

III.1. ACTIVIDAD ELECTRICA: POTENCIAL Y CORRIENTES TOTALES DE MEMBRANA

1.I. RESUMEN

El potencial de membrana en reposo medio de las fibras musculares es -64.8 ± 5.8 mV y su resistencia de entrada en V_r es 0.24 ± 0.17 M Ω (n = 31).

La estimulación aferente excitadora provoca una despolarización postsináptica, función creciente de la frecuencia de estimulación, que a partir de un nivel umbral genera potenciales de acción graduados dependientes de la frecuencia de estimulación.

La inyección de pulsos de corriente despolarizante provoca, a partir de un nivel umbral, potenciales de acción graduados que se asemejan a los generados por estimulación sináptica.

La presencia de una Rectificación Anómala o de Entrada es puesta de manifiesto por la aplicación de pulsos de corriente hiperpolarizante.

Las corrientes de membrana subyacentes a esta actividad eléctrica de las fibras musculares consisten en:

a) una corriente instantánea que es función lineal de V_m , que denominamos I_p .

b) una corriente de entrada sensible a la hiperpolarización, que llamamos I_{AB} .

c) tres corrientes sensibles a la despolarización: una inicial de entrada, de rápida activación y transitoria (que denominamos I_{ca}); una inicial de salida, de rápida activación y también transitoria (que llamamos $I_{K(ca)}$); una de salida, retrasada

respecto a aquéllas y de más lenta activación y sostenida (que denominamos I_K).

El patrón de actividad eléctrica y de las corrientes de membrana fueron substancialmente idénticos en todas las fibras musculares analizadas, independientemente de su localización, tamaño y pertenencia a la pata derecha o izquierda, y del sexo, edad y tamaño de los cangrejos utilizados.

1.II. INTRODUCCION.

La actividad eléctrica de las células excitables, considerada como la capacidad para presentar variaciones de su potencial de membrana, está determinada por la variación de la permeabilidad iónica de membrana mediada por la activación de conductancias quimio-dependientes y/o voltaje-dependientes. Así, la presencia selectiva de diferentes conductancias de membrana en las diferentes células excitables es un factor esencial y determinante de las distintas actividades eléctricas que ellas presentan. La actividad eléctrica puede ser considerada como un conjunto temporalmente ordenado de fenómenos eléctricos especializados. Estos pueden agruparse en a) breves señales voltaje-dependientes de gran amplitud denominados potenciales de acción, b) lentas respuestas voltaje-dependientes y c) señales de baja amplitud resultantes de la acción sináptica.

Junto a los potenciales de acción de Na^+ , rápidos y breves mediados por el sistema clásico descrito por Hodgkin y Huxley en el axón gigante de calamar (Hodgkin y Huxley, 1952a,d), la presencia de potenciales de acción debidos al incremento de la permeabilidad de membrana a Ca^{2+} ha sido demostrada en numerosas células excitables (véase Hille, 1992). Específicamente, las

fibras musculares de invertebrados, que no presentan potenciales de acción de Na^+ rápidos, generan potenciales de acción mediados por Ca^{2+} (Fatt y Katz, 1953; Fatt y Ginsborg, 1958; Hagiwara y Naka, 1964). A pesar de presentar esta característica común, la actividad eléctrica de ellas es altamente variable dependiendo de la especie y el músculo considerados.

En el presente capítulo se estudian las características de la actividad eléctrica de las fibras musculares del músculo abductor, considerando sus propiedades pasivas, esto es, potencial de membrana en reposo (V_r) y resistencia de membrana en reposo, y los fenómenos eléctricos generados por despolarización e hiperpolarización de la membrana. Se consideran asimismo las corrientes de membrana involucradas en esta actividad eléctrica.

1.III. METODOS.

Se han empleado las técnicas de fijación de corriente y voltaje con dos electrodos.

Usualmente, la estimulación a alta frecuencia de la fibra excitadora provoca la contracción del músculo abductor en general y de la fibra registrada en particular, con el consiguiente daño de ésta (reflejado en la disminución de la resistencia de entrada de la fibra) y/o expulsión de los electrodos de registro de ella. Sin embargo, a pesar de la contracción generalizada del músculo, en varias ocasiones se ha podido mantener un registro idóneo durante la estimulación a altas frecuencias. La razón de ello nos es desconocida y dependería de condiciones experimentales no controladas, como por ejemplo, la posición de la fibra muscular (que quizá experimentase una aparente contracción isométrica).

1.IV. RESULTADOS

A partir de una muestra representativa de 31 fibras musculares, el potencial de membrana en reposo medio es de -64.8 ± 5.8 y la resistencia de entrada media de $0.24 \pm 0.17 \text{ M}\Omega$.

La estimulación del axón excitador provoca la despolarización transitoria de la membrana de la fibra muscular. Esta despolarización, denominada potencial excitador postsináptico (PEPS), es consecuencia de la activación de receptores postsinápticos de glutámico (Glu) (Takeuchi y Takeuchi, 1964; Kawagoe et al., 1981) que provocan el aumento de la permeabilidad de la membrana postsináptica fundamentalmente a Na^+ , y, en menor medida a Ca^{2+} , estando su potencial de inversión alrededor de 20 mV (Dudel, 1974; Onodera y Takeuchi, 1975). Por otra parte, la estimulación del axón inhibitor produce la activación de receptores postsinápticos de GABA, similares a los tipo A descritos en vertebrados, y el consiguiente incremento de la permeabilidad de la membrana postsináptica a Cl^- , cuyo potencial de equilibrio es próximo a V_r (Boistel y Fatt, 1958; Takeuchi y Takeuchi, 1965). Así, el potencial inhibitor postsináptico (PIPS) puede ser despolarizante o hiperpolarizante en función del signo de la fuerza electromotriz de Cl^- (esto es, la diferencia existente entre V_m y el potencial de equilibrio de éste).

La Figura 1.1 A muestra las respuestas postsinápticas a trenes de estimulación del axón excitador a tres diferentes frecuencias. Cuando se estimula a una frecuencia de 50 ips, la amplitud de los PEPS crece exponencialmente a lo largo del tren (Araque et al., 1989; Araque et al., 1992). Este fenómeno,

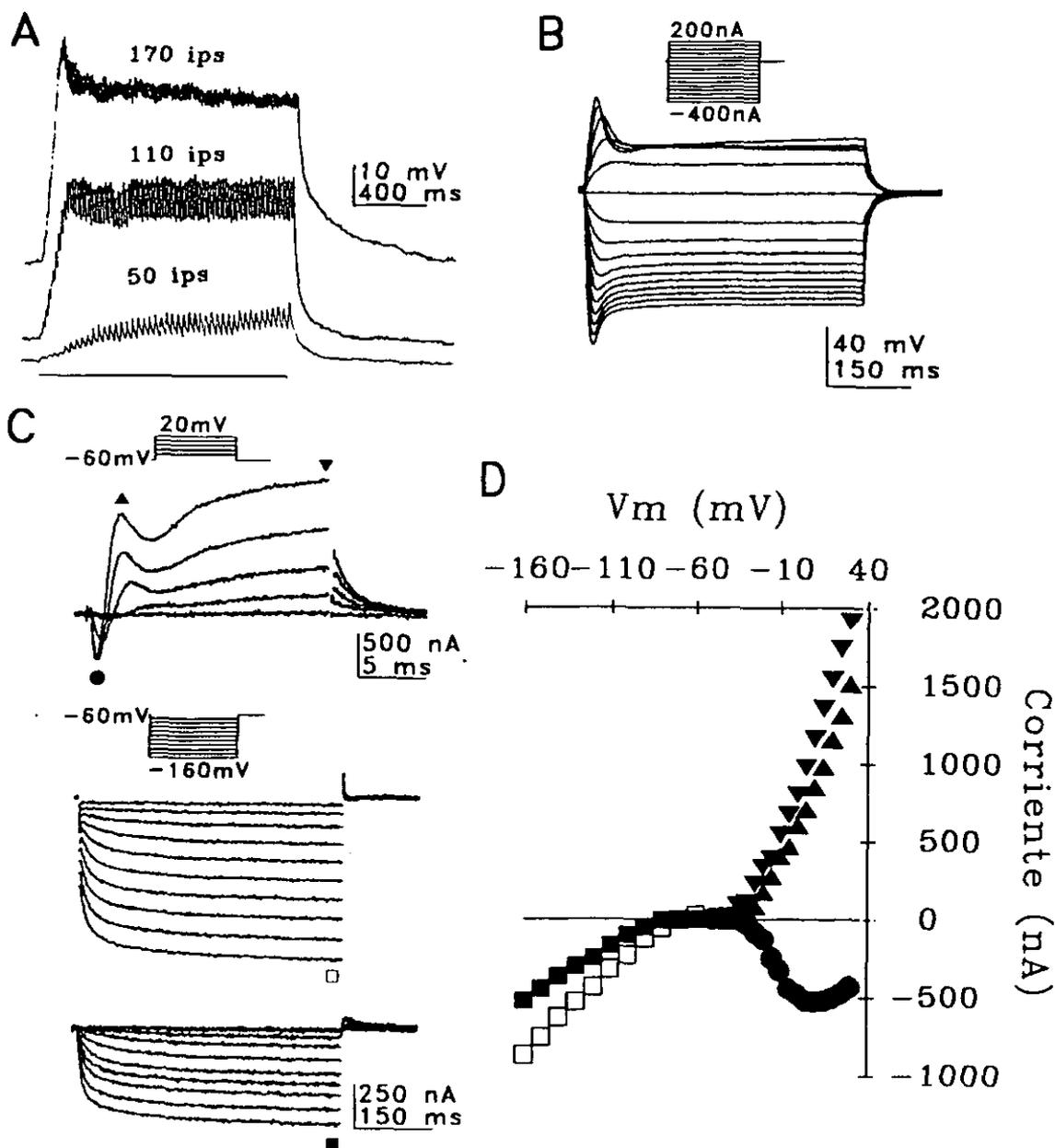


Figura 1.1. Actividad eléctrica de las fibras musculares. A, respuestas postsinápticas a la estimulación del axón excitador por trenes (línea horizontal inferior) a 50, 110 y 170 ips. B, respuestas de V_m en solución normal a pulsos de corriente en condiciones de fijación de corriente; el potencial de reposo impuesto es -65 mV. C, parte superior, corrientes activadas por despolarización en solución normal; las corrientes capacitiva y de pérdida han sido substraidas; parte central, corrientes totales activadas por hiperpolarización; parte inferior, como en parte central tras substracción de las corrientes capacitiva y de pérdida. D, relación I-V de las corrientes mostradas en C.

presente en la mayoría de las sinapsis químicas y llamado facilitación sináptica, es en el músculo abductor de reconocida naturaleza presináptica (véase Zucker, 1977; Atwood, 1982; Araque et al., 1989; Araque et al., 1992). Asimismo, el tren de estimulación provoca una gradual despolarización que se desarrolla en el tiempo hasta alcanzar un máximo que dura tanto como dura el tren. Una vez finalizado éste, la membrana se repolariza de acuerdo a sus características pasivas. Este fenómeno, conocido con el nombre de sumación sináptica, es de naturaleza postsináptica. En efecto, puesto que la fase de repolarización de cada PEPS ocurre con una constante de tiempo que depende de las características pasivas de la membrana postsináptica, la ocurrencia de un nuevo PEPS durante esta fase de descenso provoca la sumación de la amplitud de éste último con la despolarización remanente del anterior.

Tanto la facilitación como la sumación sinápticas son función creciente de la frecuencia de estimulación (compárense las respuestas a 50 y 110 ips en la Figura 1.1 A), considerando un determinado rango de ésta. Sin embargo, la amplitud de los PEPS generados por estimulación a 170 ips es menor que a 110 ips debido al incremento de la conductancia de membrana y a la disminución de la fuerza electromotriz de los PEPS (véase Martin, 1955).

En tanto que la estimulación a 50 ips genera PEPS que provocan una despolarización lenta hacia un máximo persistente, los PEPS generados a 110 ips provocan una despolarización mayor y más rápida que, tras alcanzar un máximo, disminuye hasta un valor estacionario persistente. Esta respuesta se hace más

acusada para mayores frecuencias de estimulación. Así, a 170 ips la despolarización, mayor y más rápida que a 110 ips, alcanza un máximo inicial para disminuir posteriormente hacia un valor estacionario persistente. Este comportamiento complejo en respuesta a la despolarización provocada por los PEPS generados a 110 y 170 ips es consecuencia de las propiedades activas de la membrana postsináptica y refleja la actividad eléctrica de ésta generada por despolarización. En resumen, en tanto que a bajas frecuencias de estimulación, la respuesta de la membrana postsináptica generada por los PEPS consiste en una despolarización graduada y dependiente de la frecuencia de estimulación, a mayores frecuencias de estimulación, dicha respuesta presenta un patrón temporal complejo constituido por una despolarización inicial rápida y transitoria seguida por una despolarización de menor amplitud, estacionaria y persistente, siendo ambas dependientes de la frecuencia de estimulación.

La Figura 1.1 B muestra la actividad eléctrica de la membrana del músculo en respuesta a la despolarización e hiperpolarización mediante la inyección de pulsos de corriente en solución normal. En tanto que los pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes de menor intensidad generan despolarizaciones e hiperpolarizaciones, respectivamente, debidas a las características pasivas de la membrana, los pulsos despolarizantes de mayor intensidad provocan la aparición de respuestas activas complejas (que denominamos potenciales de acción) consistentes en una despolarización inicial seguida por una repolarización hasta un nivel persistente de despolarización que dura cuanto dura el pulso. La amplitud de la despolarización

transitoria inicial es graduada y función no lineal de la intensidad del pulso, sugiriendo la presencia de un fenómeno voltaje-dependiente. Igualmente, la amplitud de la despolarización estacionaria, persistente, más tardía, también es función no lineal de la intensidad del pulso, de nuevo sugiriendo la presencia de un mecanismo voltaje-dependiente que se desarrolla y mantiene a lo largo del pulso. Esta última no linealidad fue descrita originariamente en el axón gigante de calamar y recibe el nombre de Rectificación Retardada (Hodgkin et al., 1949). La existencia de un umbral de generación de las respuestas activas también indica la presencia de mecanismos voltaje-dependientes.

La estrecha similitud entre la actividad eléctrica generada por la despolarización provocada mediante estimulación sináptica y mediante pulsos de corriente sugiere que los mecanismos subyacentes en ambos casos son idénticos.

Por otra parte, pulsos hiperpolarizantes de intensidad creciente generan hiperpolarizaciones que presentan un máximo inicial transitorio seguido por un componente sostenido de menor amplitud que dura tanto como el pulso. Este fenómeno es conocido con el nombre de Rectificación de Entrada (por ser provocada por pulsos hiperpolarizantes o de entrada) o Anómala (en contraposición a la rectificación retardada "normal" descrita para pulsos despolarizantes). En tanto que la amplitud máxima de las hiperpolarizaciones es función lineal de la intensidad de los pulsos (incluyendo aquéllos de menor amplitud), la amplitud de la hiperpolarización estacionaria es función no lineal de ella. Esto sugiere la presencia de un mecanismo voltaje y

tiempo-dependiente.

La Figura 1.1 C, *parte superior*, muestra las corrientes voltaje-dependientes activadas por despolarización. Estas consisten en una corriente de entrada inicial de muy rápida activación (I_{ca}), seguida de una corriente inicial, rápida y de salida ($I_{k(ca)}$) que, tras disminuir rápidamente, da paso a una nueva corriente de salida (I_k) más retrasada que se desarrolla más lentamente en el tiempo hasta alcanzar un máximo durante los primeros 50 ms y que se mantiene en él de forma sostenida.

Por otra parte, las corrientes totales activadas por hiperpolarización se ilustran en la Figura 1.1 C, *parte central*. Los pulsos de voltaje hiperpolarizantes generan una corriente instantánea (que denominamos I_p), seguida por una corriente de entrada que se desarrolla en el tiempo hasta alcanzar un máximo estacionario durante los primeros 500 ms. En tanto que la corriente instantánea es función lineal de V_m , la amplitud de la corriente en el estado estacionario es función no lineal de éste, sugiriendo de nuevo la presencia de una corriente voltaje-dependiente sensible a la hiperpolarización que denominamos I_{AB} y que sería responsable de la rectificación anómala observada en condiciones de fijación de voltaje. Esta corriente puede ser observada aisladamente mediante substracción de la corriente lineal instantánea, tal como aparece en la Figura 1.1 C, *parte inferior*.

Las relaciones I-V de las corrientes voltaje-dependientes se muestran en la Figura 1.1 D. La relación I-V de la corriente de entrada inicial (*círculos llenos*) es claramente función no lineal del voltaje (indicando su dependencia de voltaje), presentando

una región de pendiente negativa que sería responsable de un mecanismo de acción autorregenerativo, tal como ha sido descrito para la corriente de Na^+ que media el potencial de acción rápido de Na^+ (Hodgkin y Huxley, 1952a,b,d.). Asimismo, las relaciones I-V del resto de corrientes también muestran la dependencia de voltaje de éstas, haciendo evidentes los fenómenos de rectificación retardada y anómala (aquella para despolarizaciones y ésta para hiperpolarizaciones). Debe hacerse notar que el umbral de generación de las tres corrientes activadas por despolarización presenta un valor muy semejante.

No se han observado diferencias substanciales en el patrón de actividad eléctrica y de las corrientes de membrana en las más de 320 fibras musculares registradas de más de 250 cangrejos diferentes, independientemente de la localización o tamaño de la fibra muscular, de su pertenencia a la pata derecha o izquierda, y del sexo, edad o tamaño del cangrejo escogido.

1.V. DISCUSION

Los resultados presentados muestran que la estimulación aferente excitadora provoca una despolarización graduada y sostenida que es función creciente de la frecuencia de estimulación. Más aún, cuando esta despolarización supera un nivel umbral aparecen respuestas activas complejas consistentes en una despolarización transitoria inicial que desciende hacia un nivel sostenido de despolarización. La amplitud de ambos componentes de la respuesta también depende de la frecuencia de estimulación. Esta actividad eléctrica es intrínseca a la membrana de la fibra muscular y puede ser desencadenada mediante su estimulación eléctrica por pulsos de corriente,

independientemente de la existencia de actividad sináptica. Asimismo, la estimulación mediante pulsos de corriente hiperpolarizantes pone de manifiesto la existencia de rectificación anómala en las fibras musculares. Este comportamiento puede ser igualmente desencadenado de manera fisiológica por la aferencia inhibitoria, cuya estimulación provoca PIPS hiperpolarizantes en gran número de fibras.

Mediante la técnica de fijación de voltaje, se han analizado las corrientes de membrana, que son responsables de la actividad eléctrica. Estas consisten en a) una corriente instantánea, función lineal de V_m (I_p); b) una corriente de entrada sensible a la hiperpolarización (I_{AB}); y c) tres corrientes sensibles a la despolarización, a saber, una inicial de entrada, de rápida activación y transitoria (I_{Ca}), una inicial de salida, de rápida activación y también transitoria ($I_{K(Ca)}$) y otra de salida, retrasada respecto a aquéllas y de más lenta activación y sostenida (I_K).

Las características de las diferentes corrientes de membrana así como sus implicaciones funcionales en la fisiología del músculo abductor son consideradas en los siguientes capítulos.

III.2. CARACTERIZACION DE LA CORRIENTE INSTANTANEA DE PERDIDA (I_p)

2.I. RESUMEN

La corriente iónica instantánea, que denominamos I_p , es objeto de estudio en el presente capítulo.

La relación I-V de I_p puede ser aceptablemente ajustada ($r > 0.99$) a una regresión de primer orden, demostrando la independencia de voltaje de la conductancia subyacente a I_p (G_p) y, por tanto, que el músculo abductor no presenta rectificación anómala instantánea. La independencia de tiempo y de voltaje de I_p permiten considerarla como la corriente de pérdida de la membrana del músculo abductor.

El valor medio de G_p es $5.77 \pm 1.43 \mu S$ ($n = 27$).

La aplicación extracelular de Cd^{2+} reduce I_p sin modificar su potencial de inversión, lo cual indica que este ión ejerce un efecto bloqueante sobre G_p .

G_p es bloqueada reversiblemente y de forma dependiente de concentración por Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} o Ni^{2+} extracelular. G_p es insensible a la aplicación extracelular de Ba^{2+} , Mg^{2+} o Mn^{2+} .

El bloqueo de G_p por Cd^{2+} no es total, saturándose a concentraciones entre 5 y 10 mM, y puede ser aceptablemente descrito ($r > 0.95$) por la ecuación de Hill.

La constante de disociación aparente de Cd^{2+} extracelular por el sitio de unión para ejercer el bloqueo de G_p es 0.024 ± 0.022 mM y el coeficiente de Hill es 0.18 ± 0.05 ($n = 9$), lo cual sugiere que cada ión Cd^{2+} se une a más de un sitio receptor con una alta afinidad por él (en el rango micromolar).

El bloqueo de G_p por Cd^{2+} no es dependiente de voltaje.

Se discuten la identidad entre la corriente de pérdida e I_p y el verdadero bloqueo de ésta por Cd^{2+} . Se concluye la existencia de una conductancia de pérdida de naturaleza propia y diferenciada del resto de conductancias de membrana, que es caracterizada por su sensibilidad a distintos iones bloqueantes.

2.II. INTRODUCCION

En una serie de trabajos clásicos sobre las corrientes de membrana presentes en el axón gigante de calamar responsables de la generación de potenciales de acción, Hodgkin y Huxley (1952a,b,d) establecieron que la corriente iónica total estaba constituida por tres corrientes, a saber, una transportada por Na^+ , una transportada por K^+ y una pequeña corriente de pérdida o fuga (en inglés "leakage", y que aquí abreviaremos como I_p) transportada por Cl^- y otros iones. A partir de estos y posteriores trabajos referentes al análisis de las corrientes de membrana, la conductancia de membrana que media la corriente de pérdida ha sido definida como una conductancia de fondo, voltaje-independiente y de selectividad iónica indeterminada (véase por ejemplo Hille, 1992). Si bien experimentalmente la existencia de esta corriente ha sido demostrada y, teóricamente, es considerada necesaria para explicar el comportamiento eléctrico de la membrana, la naturaleza de esta corriente en los distintos sistemas así como de los supuestos (de acuerdo a lo propuesto por Hodgkin y Huxley) canales iónicos de membrana que la median es obscura. En efecto, en tanto que las corrientes y los propios canales de membrana quimio y voltaje-dependientes han sido exhaustivamente caracterizados, fundamentalmente a raíz de

la introducción de técnicas de análisis de ruido (Katz y Miledi, 1970; Katz y Miledi, 1972; Anderson y Stevens, 1973) y, especialmente, de la técnica de registro de regiones de membrana (en inglés, "patch-clamp") (Neher y Sakmann, 1976; Hamill et al., 1981), dificultades de índole técnica imposibilitan tal caracterización respecto a la corriente de pérdida y a los supuestos canales involucrados. Así, la definición y naturaleza de ellos permanece laxa y difusa. Tan sólo su carácter voltaje-independiente y su estado de continua apertura (son, pues tiempo-independientes) pueden ser las propiedades comunes que presenten los distintos canales responsables de las distintas corrientes de pérdida de los distintos sistemas.

Generalmente, la corriente de pérdida se asocia a la corriente instantánea por ser tiempo y voltaje-independiente. Sin embargo, la corriente instantánea de las fibras musculares esqueléticas de vertebrados y de numerosas neuronas de vertebrados e invertebrados es voltaje-dependiente debido a la presencia de una corriente rectificadora instantánea (véase capítulo III.3). No obstante la existencia de una corriente de pérdida puede ser demostrada en cuanto que la corriente instantánea para valores despolarizados es función lineal de V_m .

Distintos son los significados funcionales que se atribuyen a la conductancia de pérdida en los diferentes sistemas estudiados. En el modelo descrito por Hodgkin y Huxley en el axón gigante de calamar (1952d) sería responsable del cierre del circuito de membrana. En sistemas cuyo V_r es estable, ésta es un elemento responsable de él (junto con otras conductancias voltaje-dependientes activadas en V_r), en cuanto que su

permeabilidad iónica (más o menos selectiva) participa en la definición de V_r . Debido a su carácter de única y continua activación, contribuye fundamentalmente a la conductancia de membrana en reposo. Estas dos funciones son de relevada importancia en la actividad eléctrica de las células. Así, la conductancia de membrana en reposo interviene directamente en el control postsináptico de la eficacia sináptica y en la amplitud y duración de los fenómenos eléctricos de la membrana. Por ejemplo, ha sido demostrado que la repolarización del potencial de acción en los nodos de Ranvier de axones de rana y en algunos de axones de mamíferos es fundamentalmente debida a la conductancia de pérdida (Schmidt y Stämpfli, 1966; Hille, 1992), y que ésta puede ser responsable de la despolarización marcapasos en algunos sistemas, tal como ocurre en los modelos del axón gigante del calamar y de neuronas de *Anisodoris* (Connor y Stevens, 1971c; Hille, 1992).

En el presente capítulo se estudia la corriente instantánea de las fibras del músculo abductor y su sensibilidad a distintos bloqueantes, discutiéndose su definición como corriente de pérdida.

2.III. METODOS.

Similar metodología e idénticos materiales a los descritos en II. *MATERIALES Y METODOS* han sido empleados para el estudio de I_p . Las particularidades específicas seguidas en este estudio han consistido en la utilización de pulsos de voltaje de breve duración (<10 ms), con el fin de conseguir una alta frecuencia de muestreo que permita observar adecuadamente la corriente iónica instantánea, y en la utilización como solución control de

solución 0 mM Ca^{2+} , TEA, donde las corrientes activadas por despolarización han sido eliminadas o considerablemente reducidas (véanse Capítulos III.5, III.6 y III.7), con objeto de evitar posibles errores introducidos por la presencia de ellas.

2.IV. RESULTADOS.

IVA. Caracterización general

La Figura 2.1 A, *Control*, muestra las corrientes totales de membrana generadas por pulsos de voltaje de breve duración en solución normal. Para pulsos despolarizantes y pulsos hiperpolarizantes de baja amplitud, éstas consisten en una súbita corriente transitoria de salida o entrada, respectivamente, que varía en el tiempo hasta alcanzar un nivel estacionario en menos de 5 ms desde el inicio del pulso. Para pulsos hiperpolarizantes de mayor amplitud, la corriente transitoria de entrada disminuye hasta alcanzar un mínimo a partir del cual vuelve a crecer lentamente. La súbita corriente transitoria corresponde a la corriente capacitiva, que finaliza dentro de los 5 primeros milisegundos del pulso y cuya amplitud es función lineal de la amplitud del pulso de voltaje (si bien la amplitud máxima no es visible en la Figura 2.1 A, tal linealidad es apreciable inmediatamente después de aquélla, por ejemplo, 1 ms posterior al inicio del pulso). Esta linealidad de la corriente capacitiva permite su adecuada substracción de las corrientes totales de membrana, posibilitando así el aislamiento de las corrientes voltaje-dependientes. Por otra parte, la corriente de entrada más lenta que, generada por pulsos hiperpolarizantes de mayor amplitud, se desarrolla en el tiempo corresponde a una corriente activada por hiperpolarización denominada I_{AB} que es objeto de

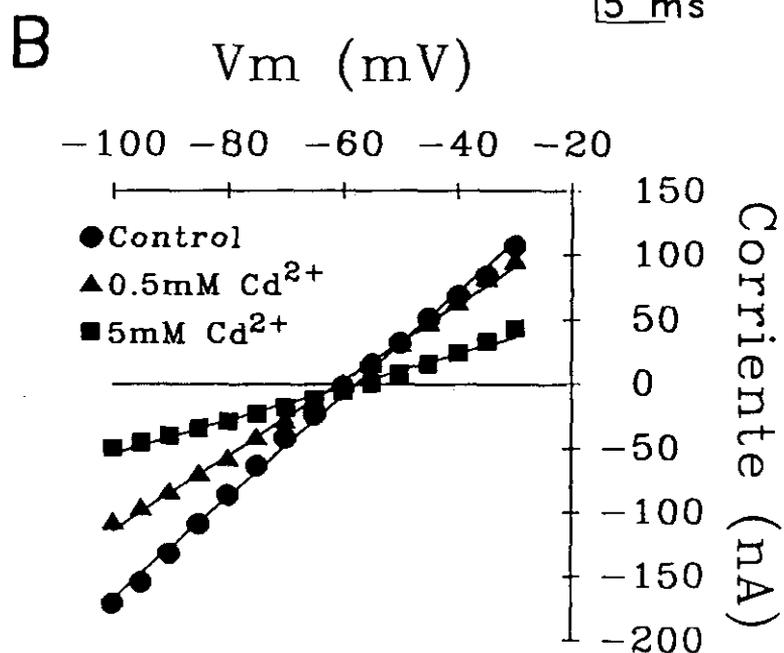
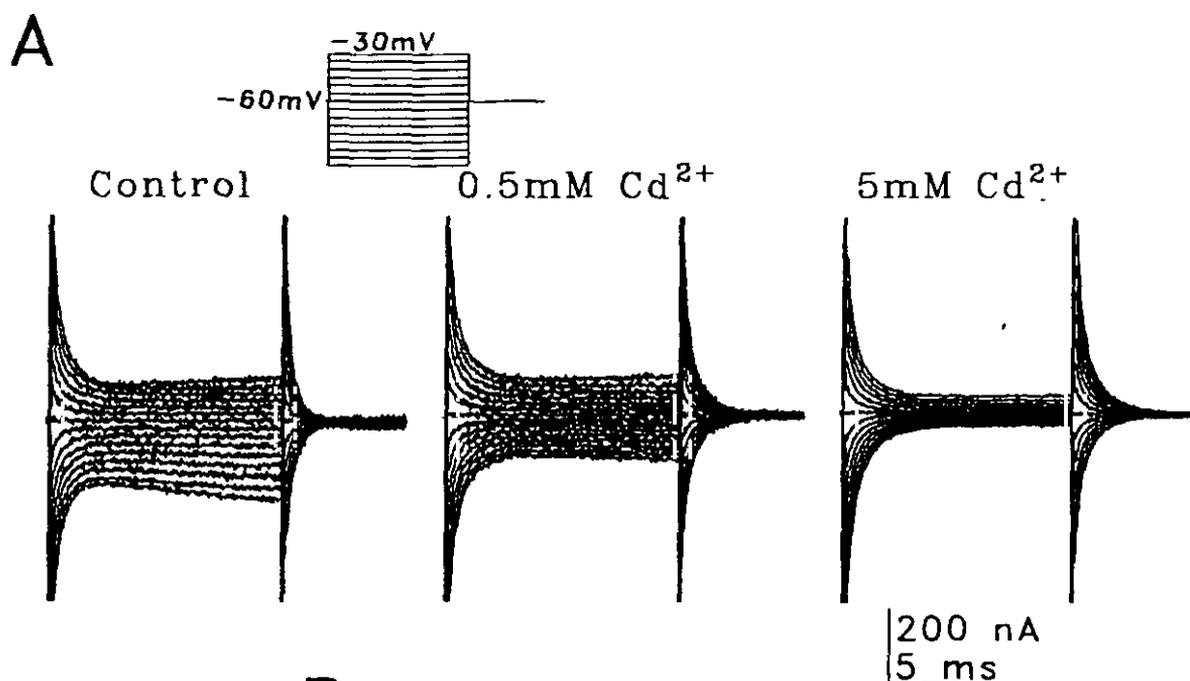


Figura 2.1. Efecto de Cd²⁺ sobre I_p. A, corrientes totales registradas en solución normal (Control), en solución 0.5 mM Cd²⁺ y en solución 5 mM Cd²⁺. B, relaciones I-V de la corriente instantánea medida a los 5 ms del pulso en Control (●), 0.5 mM Cd²⁺ (▲) y 5 mM Cd²⁺ (■).

estudio en el capítulo III.3.

A los 5 ms del inicio del pulso, esto es, una vez que la corriente total ha alcanzado el estado estacionario para pulsos despolarizantes y pulsos hiperpolarizantes de baja amplitud y, por tanto, una vez finalizada la corriente capacitiva y cuando el grado de activación de I_{AB} es despreciable (véase Capítulo III.3), la corriente total es función lineal de V_m , tal como muestra la relación I-V de la Figura 2.1 B, círculos, donde los valores experimentales de corriente han sido aceptablemente ajustados ($r > 0.99$) a una regresión lineal de primer orden cuya pendiente es $3.98 \mu S$. En una muestra representativa de 27 fibras en solución normal, la pendiente media de las regresiones lineales de primer orden ajustadas ($r > 0.99$) es $5.77 \pm 1.43 \mu S$. Esta linearidad de la relación I-V de la corriente lineal instantánea ("sensu stricto" corriente iónica instantánea, que denominamos I_p) indica que la membrana no posee rectificación anómala instantánea, que I_p cumple la ley de Ohm y que, por tanto, ésta verifica la ecuación:

$$I_p = G_p (V_m - E_p), \quad (2.1)$$

donde G_p y E_p son la conductancia y el potencial de inversión de I_p , respectivamente.

La linearidad de I_p demuestra que la conductancia subyacente a ella (G_p) es una constante, es decir, es independiente de voltaje, y que, por tanto, la membrana de las fibras del músculo abductor no presenta rectificación instantánea, a diferencia de las fibras musculares esqueléticas de vertebrados. Según ello, puesto que I_p es tiempo y voltaje-independiente y puesto que su potencial de equilibrio corresponde con V_r (como, por otra parte,

no podía ser de otra manera al ser V_r estable) puede ser definida como la corriente de pérdida de la membrana de la fibra muscular.

IVB. Efecto de distintos iones sobre I_p

Los potenciales de reposo medios de 12 fibras musculares representativas medidos en solución control y en presencia de diferentes concentraciones de Cd^{2+} (variable entre 0.5 y 10 mM) son -62.6 ± 6.6 y -65.1 ± 5.9 , respectivamente, no mostrando diferencias significativas entre ellos.

La Figura 2.1 A muestra las corrientes totales generadas en solución control y en presencia de Cd^{2+} 0.5 y 5 mM. La relación I-V de I_p , que es lineal en el control ($r > 0.99$), permanece lineal en presencia de Cd^{2+} ($r > 0.95$) (Figura 2.1 B). Sin embargo, la pendiente de la regresión de primer orden de esta relación, es decir la conductancia de I_p (G_p), se reduce desde $3.98 \mu S$ en control a $2.93 \mu S$ y $1.29 \mu S$ en Cd^{2+} 0.5 y 5 mM, respectivamente, indicando que el efecto de Cd^{2+} sobre G_p es dependiente de la concentración extracelular de este ión, acentuándose a medida que ésta aumenta.

Además, la reducción de G_p se produce sin ser acompañada de variaciones significativas en el potencial de equilibrio de I_p (E_p), estimado a partir del punto de intersección de la regresión de primer orden de la relación I-V de I_p con el eje de abscisas (véase ec. (2.1)), lo cual sugiere que Cd^{2+} no modifica la permeabilidad selectiva de los canales subyacentes a I_p , sino que los bloquea actuando sobre ellos.

Si bien el bloqueo de G_p es dependiente de $[Cd^{2+}]$, éste nunca es total sino que presenta una saturación entre 5 y 10 mM Cd^{2+} (Figura 2.2 A). Sin embargo, el grado de bloqueo es muy

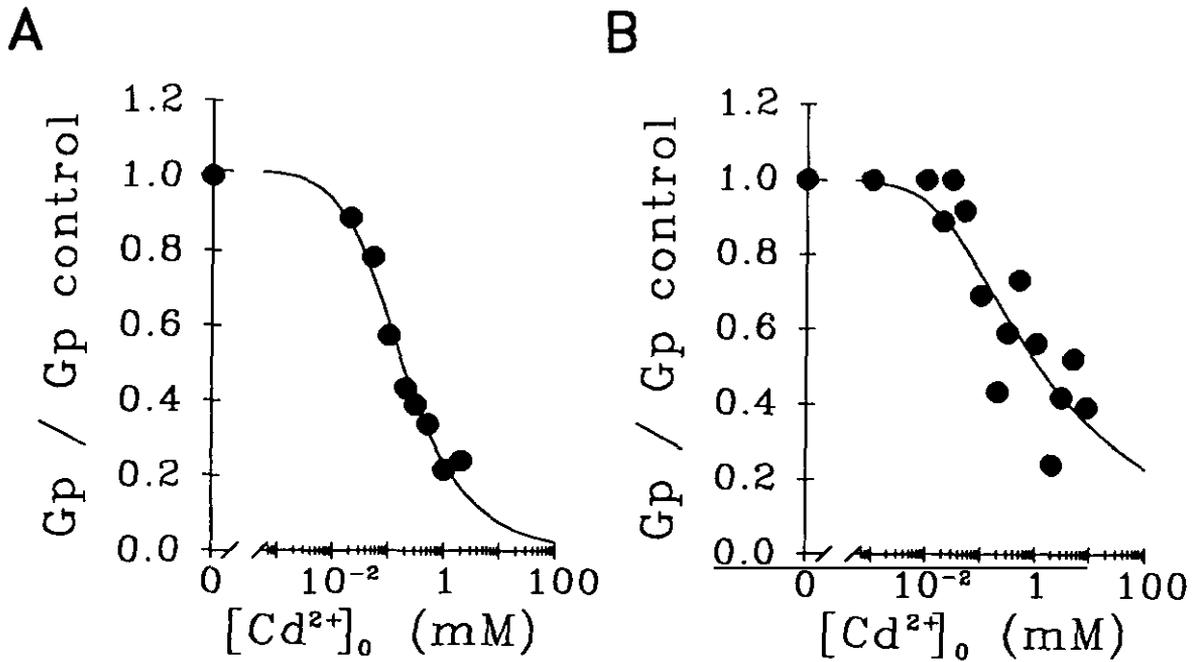


Figura 2.2. Relación concentración-efecto de $[Cd^{2+}]_0$ sobre G_p . A, relación entre G_p en diferentes $[Cd^{2+}]_0$ y G_p control en una única fibra. B, valores medios ($n = 9$) de la relación entre G_p en diferentes $[Cd^{2+}]_0$ y G_p control. Los valores experimentales han sido ajustados a la ec. (2.2) (línea continua).

variable entre las diferentes fibras estudiadas así como la propia G_p , por lo que una descripción general y cuantitativa del bloqueo de G_p por Cd^{2+} debe ser acogido con razonables reservas. No obstante, la Figura 2.2 B muestra la relación concentración-efecto del bloqueo de G_p por Cd^{2+} , en la cual los valores medios obtenidos a partir de 9 fibras distintas del bloqueo de G_p por diferentes $[Cd^{2+}]_o$ se ajustan aceptablemente ($r > 0.99$) a la ecuación

$$L = L_{max} [1 + (Cd/IC_{50})]^{-n}, \quad (2.2)$$

deducida de la ecuación de Hill, donde L es la relación entre G_p en presencia de Cd^{2+} y ésta en el control, L_{max} es el máximo valor de L, Cd es $[Cd^{2+}]_o$, IC_{50} es $[Cd^{2+}]_o$ a la cual $L = \frac{1}{2}L_{max}$ y n es el coeficiente de Hill. Los parámetros de ajuste obtenidos son $IC_{50} = 0.024 \pm 0.022$ mM y $n = 0.18 \pm 0.05$. Estos valores sugieren que cada ión Cd^{2+} se une a más de un sitio receptor con una alta afinidad por él (en el rango micromolar) para llevar a cabo el bloqueo de G_p .

Otros cationes divalentes próximos a Cd^{2+} en la tabla periódica, a saber, Co^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} , ejercen un efecto bloqueante sobre I_p de características idénticas al llevado a cabo por Cd^{2+} . No así otros cationes divalentes como Mg^{2+} , Ba^{2+} o Mn^{2+} ni cationes monovalentes como el Cs^+ .

2.V. DISCUSION

A diferencia de lo que ocurre en músculo de vertebrados, donde la conductancia de membrana es mayor durante la hiperpolarización que durante la despolarización debido a la presencia de una corriente rectificadora instantánea (véase capítulo III.3 sobre sus características y Capítulo III.4 sobre

los mecanismos de activación), la membrana de las fibras musculares del músculo abductor no presenta rectificación instantánea, siendo la corriente instantánea generada por pulsos de voltaje función lineal de éstos. Si esta característica es particular del músculo abductor del cangrejo de río o general del músculo de invertebrados, es una pregunta aún por dilucidar y cuya respuesta presenta un notable interés por sus connotaciones evolutivas, funcionales y fisiológicas.

Las propiedades de independencia de tiempo y voltaje que presenta esta corriente permiten considerarla como la corriente de pérdida de la membrana de estas fibras. Si tal consideración es correcta, como parece desprenderse de los resultados obtenidos y de la discusión que de ellos seguidamente se hace, es altamente interesante la sensibilidad que ella presenta para ser bloqueada por diferentes iones.

En efecto, el efecto bloqueante de G_p por Cd^{2+} es, por su originalidad, ciertamente sorprendente y cuestionable. Aun cuando la reducción de la conductancia instantánea ha sido descrita por numerosos autores en distintos sistemas, ha sido comúnmente argumentado que en tal conductancia participaban en distinto grado diferentes corrientes dependientes de voltaje (véase, por ejemplo, Halliwell y Adams, 1982); así, la corriente instantánea sería resultado de la suma de la corriente de pérdida y de diferentes corrientes dependientes de voltaje parcialmente activadas en V_r , de tal manera que constituirían lo que se ha dado en llamar "corriente de fondo". El bloqueo de la corriente instantánea, manifestación de la corriente de fondo, es aceptado como un bloqueo de aquéllas corrientes dependientes de voltaje

que contribuyen a la corriente de fondo y no como un bloqueo específico de la propia corriente de pérdida. Sin embargo, éste no parece ser el caso del bloqueo de la corriente instantánea por Cd^{2+} , sino que efectivamente este ión parece actuar directamente sobre I_p , según se deduce de los resultados presentados, y que se pueden resumir en: a) el bloqueo de I_p por Cd^{2+} es igualmente observado en solución 0 mM Ca^{2+} o solución Mn^{2+} , donde I_{Ca} no existe o está bloqueada (véase capítulo III.5), y donde, por tanto, tampoco existe $I_{\text{K(Ca)}}$ (véase capítulo III.7); b) I_{K} no es modificada por Cd^{2+} (al menos hasta 10 mM), e igual bloqueo de I_p se observa aun cuando esta corriente se halla previamente bloqueada con TEA (véase capítulo III.6); c) si bien I_{AB} es también sensible a Cd^{2+} , el grado de activación de I_{AB} en el potencial de reposo impuesto es de por sí despreciable (y por tanto la contribución de I_{AB} a I_p), no pudiéndose explicar el grado de bloqueo de I_p por Cd^{2+} como un bloqueo de la mínimamente activada I_{AB} (véase capítulo III.3).

No obstante, la imposibilidad de suprimir I_{AB} sin modificar I_p , y viceversa, parece ser el argumento más sólido contra un verdadero bloqueo por Cd^{2+} (u otros iones bloqueantes) de la corriente de pérdida. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que cada ión Cd^{2+} se une a más de un sitio receptor para llevar a cabo el bloqueo de G_p con mayor afinidad (superior al doble) de como lo hace al sitio receptor para el bloqueo de G_{AB} (véase capítulo III.3). Si bien, como ya se ha dicho, estos resultados deben ser tomados con las debidas precauciones por la variabilidad encontrada en el bloqueo de G_p por Cd^{2+} , es digno de destacarse que, por ejemplo, en una misma fibra, en tanto que el

bloqueo de G_{AB} (siendo el coeficiente de correlación entre el ajuste a la ec. (3.6) y los valores experimentales >0.99) sugiere que cada ión Cd^{2+} se une reversiblemente a un único sitio receptor con una constante de disociación aparente de 0.163 ± 0.012 mM, el bloqueo de G_p (mostrando también una alta correlación entre el ajuste a la ec. (2.2) y los valores experimentales, $r >0.99$) indica que cada ión Cd^{2+} se une a dos sitios receptores (pues $n = 0.54 \pm 0.092$) con una constante de disociación aparente de 0.057 ± 0.022 mM. Además, en otra misma fibra, el desarrollo temporal del bloqueo de G_p y G_{AB} ocurrido durante la perfusión de 0.5 mM Cd^{2+} fue exponencial con constantes de tiempo de 108.80 ± 3.48 s y 241.01 ± 5.71 s. Estos resultados sugieren una mayor afinidad de Cd^{2+} por el sitio receptor para el bloqueo de G_p que por aquél para el de G_{AB} , aunque bien podrían ser interpretados de diferente manera, argumentando que los sitios de unión de Cd^{2+} para el bloqueo de G_p y G_{AB} están localizados en diferentes lugares de la membrana (con diferente accesibilidad de la solución de perfusión), v. gr., en la superficie externa de la membrana y en el sistema de túbulos transversos (donde están localizados los canales rectificadores anómalos en el músculo esquelético de vertebrados), respectivamente. En todo caso, las evidencias hasta aquí presentadas argumentan en favor de la existencia de dos entidades diferentes de canales de I_p e I_{AB} , los cuales son bloqueados reversiblemente por bajas concentraciones de Cd^{2+} extracelular.

Que G_p nunca pierda su carácter voltaje-independiente cuando es bloqueada por determinados cationes divalente es un fenómeno

que merece una especial consideración. Los canales de membrana responsables de G_p deben tener, por definición (véase apdo. II de este capítulo) una probabilidad conjunta de apertura uniforme, y así se ve reflejado en las características de I_p . El bloqueo iónico de estos canales debería así ejercerse sobre el mecanismo de permeación iónica a su través, y no sobre otros mecanismos responsables de esta permeación, como son, por ejemplo, los mecanismos de compuerta (en inglés "gating") presentes en la mayoría de canales voltaje-dependientes. Los fenómenos de bloqueo iónico del mecanismo de permeación iónica a través de un canal abierto descritos hasta el momento presentan un carácter voltaje-dependiente. Así ocurre, por ejemplo, con el bloqueo intracelular llevado a cabo por Mg^{2+} sobre el canal que media la rectificación anómala instantánea dotándole de esta característica rectificadora (Matsuda et al., 1987; Matsuda, 1991; véase además capítulo III.3), aquél ejercido extracelularmente por Cs^+ sobre este mismo canal (Gay y Stanfield, 1977; véase también capítulo III.3) o el bloqueo ejercido por Mg^{2+} extracelular sobre el canal de N-metil-D-Aspartato (Nowak et al., 1984). Por el contrario, no se observa voltaje-dependencia en el bloqueo ejercido por Cd^{2+} sobre los canales que median G_p (al menos en el rango de voltaje estudiado), en el cual la fuerza electrostática debida al potencial de membrana puede ser lo suficientemente grande como para impedir el abandono de los cationes divalentes del sitio de unión a la membrana desde donde ejercen su efecto bloqueante. Así, puede esperarse que para mayores despolarizaciones, donde la fuerza electrostática disminuiría e incluso se invertiría, el

bloqueo sí se apreciaría como voltaje-dependiente, confirmando un bloqueo por Cd^{2+} de canal abierto. Cabe considerar también la posibilidad de la existencia de fuerzas electrostáticas relativamente constantes en el lugar de unión de estos cationes para ejercer su bloqueo. Para la elucidación de estos mecanismos de bloqueo, que aquí sólo podemos plantear hipotéticamente, se hace necesario un profundo estudio biofísico de sus características apoyado en nuevas técnicas de análisis (fundamentalmente registro de regiones de membrana y canales unitarios). A este respecto, es interesante destacar el hecho de que el bloqueo de G_p es ejercido por un grupo de cationes divalentes (Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+}) pertenecientes a los elementos de transición y localizados próximamente entre sí en una región específica de la Tabla Periódica de los Elementos (y, por tanto con características físicas muy similares), en tanto que otros cationes divalentes (Mg^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+}) de localización dispersa en ella (y, por tanto, con características físicas diferentes entre sí) no afectan a G_p . Asimismo, la sensibilidad de G_p a Co^{2+} y no a Mn^{2+} a pesar de su proximidad en la Tabla Periódica de los Elementos, sugiere una gran especificidad en el mecanismo de bloqueo.

Finalmente, otros argumentos de carácter físico pueden ser esgrimidos contra la existencia de un verdadero bloqueo de I_p , a saber, el aumento de la rigidez de la membrana por la presencia de Cd^{2+} y el aumento de la resistencia de membrana como consecuencia del mejoramiento de los sellos establecidos entre ésta y los microelectrodos. En efecto, las cargas negativas pertenecientes a glucoproteínas y fosfolípidos y presentes en la

superficie externa de la membrana interactúan con los iones divalentes presentes en el medio extracelular, de manera que pueden aumentar la rigidez de la membrana, en cuanto que imposibilitan el libre movimiento de estos constituyentes en la membrana (véase Hille, 1992). Igualmente, los cationes divalentes podrían aumentar la unión entre los microelectrodos y la membrana por interacción de los iones con el vidrio de los microelectrodos y con la membrana adyacente. Sin embargo, en los experimentos aquí presentados no existe variación de la concentración de iones divalentes, pues el aumento de $[Cd^{2+}]$ va acompañada de la disminución equimolar de la concentración extracelular de los iones divalentes de la solución control (ya sean Mg^{2+} o Mn^{2+}). Por tanto, no parece ser este el caso, aun cuando Cd^{2+} sea más electronegativo que los iones presentes en la solución control, pues los efectos esperables de tal variación de electronegatividad no parecen ser de la suficiente magnitud como para explicar la drástica disminución de G_p .

Así pues, podemos concluir la existencia en la membrana de las fibras musculares de una conductancia de pérdida de naturaleza propia y diferenciada del resto de conductancias de membrana, y que puede ser caracterizada por su específica sensibilidad a distintos iones bloqueantes.

III.3. CARACTERIZACION DE LA CORRIENTE ACTIVADA POR HIPERPOLARIZACION (I_{AB}).

3.1. RESUMEN

Se estudia la corriente iónica responsable de la rectificación anómala o de entrada presente en las fibras musculares del músculo abductor mediante la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos. La hiperpolarización de la membrana mediante pulsos de voltaje desde un potencial impuesto de -60 mV provoca la aparición de dos corrientes sucesivas en el tiempo. La primera corriente, instantánea lineal y no dependiente de voltaje (I_p), es seguida por una corriente de entrada (I_{AB}) cuya amplitud es dependiente de tiempo y de voltaje, que alcanza un estado estacionario antes de llegar a los 500 ms, y que no muestra inactivación, al menos durante 2 s.

El potencial de inversión de I_{AB} (E_{AB}) se ha estimado a partir de las corrientes de cola. El valor medio de E_{AB} es -61.8 mV cuando $[K^+]_o$ es 5.4 mM. E_{AB} cambia 50.8 mV por cada orden de magnitud que varía $[K^+]_o$.

La conductancia subyacente a I_{AB} (G_{AB}) es una función sigmoidea de V_m , comenzando su activación entorno a V_r , incrementando su valor a medida que aumenta la hiperpolarización y saturándose en un valor máximo ($G_{AB,max}$) en torno a -140 mV. El potencial medio en el cual G_{AB} es la mitad de $G_{AB,max}$ es de -94.4 mV. Si bien $G_{AB,max}$ no es afectada, la curva de activación de G_{AB} se desplaza 53.6 mV hacia valores positivos por cada orden de magnitud de incremento de $[K^+]_o$.

Las cinéticas de activación y desactivación de I_{AB} se

corresponden con sendas funciones exponenciales, cuyas constantes de tiempo, relativamente rápidas (<100 ms), son similares.

Ni I_{AB} ni ninguno de los parámetros que la definen, esto es, ni su curso temporal ni G_{AB} ni E_{AB} se ven alterados por las siguientes condiciones: 1) ausencia de Na^+ o Ca^{2+} en el medio extracelular; 2) presencia intracelular de EGTA; 3) presencia extra (100 mM) o intracelular de TEA; 4) variación de $[Mg^{2+}]$. (entre 0 y 20 mM); 5) presencia extracelular de Cs^+ (hasta 50 mM), Rb^+ (hasta 10 mM), Ba^{2+} (13.5 mM) o Mn^{2+} (13.5 mM).

Sin embargo, bajas concentraciones extracelulares (<5 mM) de Cd^{2+} o Zn^{2+} producen una acusada y reversible reducción de I_{AB} .

Según todo ello, concluimos que la rectificación anómala presente en este músculo está generada por una corriente de entrada de K^+ , que denominamos I_{AB} , dependiente de tiempo y de voltaje. Esta corriente, presenta características farmacológicas y electrofisiológicas que la diferencian de aquellas corrientes activadas por hiperpolarización o que subyacen a la rectificación anómala descritas en otros sistemas.

3.II. INTRODUCCION

En 1949, Katz encontró que la membrana del músculo esquelético de rana presentaba una menor resistencia cuando era hiperpolarizada que cuando era despolarizada por pulsos de corriente de entrada o salida, respectivamente. Este comportamiento no lineal de la membrana, fue denominado rectificación de entrada o anómala, en contraposición a la rectificación "normal" descrita en el axón gigante de calamar. Similar comportamiento fue posteriormente encontrado en otros sistemas donde presentó diferentes características.

La rectificación anómala clásica descrita por Katz (1949), y posteriormente encontrada en músculo cardíaco (Hall, Hutter y Noble, 1963; Sakmann y Trube, 1984), células gigantes metacerebrales de crustáceos (Kandel y Tauc, 1966), oocitos marinos (Hagiwara y Takahashi, 1974), embriones de tunicados (Miyazaki et al., 1974) y neuronas de vertebrados (Constanti y Galván, 1983; Kaneko y Tachibana, 1985; Stanfield et al., 1985; Williams et al., 1988), está mediada por una corriente de entrada de K^+ que presenta dos componentes dependientes de voltaje, uno de activación instantánea y otro de activación rápida dependiente de tiempo. La conductancia subyacente depende de $[K^+]_o$ y su curva de activación es función de la diferencia entre V_m y E_K . Debido a su activación y desactivación instantánea, que permite la entrada de K^+ a la célula pero no su salida de ella, es decir, a su comportamiento rectificador, esta corriente ha sido llamada corriente rectificadora.

Otra clase de corriente, transportada por Na^+ y K^+ y subyacente a un segundo tipo de rectificación anómala, fue encontrada en músculo cardíaco (Yanagihara e Irisawa, 1980; Brown y DiFrancesco, 1980), en células piramidales de hipocampo (Halliwell y Adams, 1982) y en el receptor tónico de estiramiento de crustáceos (Edman et al., 1987). Esta corriente, denominada I_h , I_r o I_q , que presenta un desarrollo temporal lento sin activación instantánea y cuya activación es independiente de $[K^+]_o$, fue posteriormente encontrada en numerosas neuronas de vertebrados, donde también se le llamó I_{IR} o I_{AR} (Mayer y Westbrook, 1983; Spain et al., 1987; Takahashi, 1990). Sin embargo, para diferenciarla de la corriente rectificadora, es

generalmente denominada como corriente activada por hiperpolarización.

Un tercer tipo de rectificación anómala, en este caso mediada por una corriente de Cl^- , fue encontrada en neuronas de *Aplysia* (Chesnoy-Marchais, 1983), neuronas de hipocampo (Madison et al., 1986) y oocitos de anfibios (Parker y Miledi, 1988).

Por último, utilizando la técnica de fijación de corriente con un electrodo, Fatt y Ginsborg (1958) describieron una disminución de la resistencia de las fibras musculares del músculo abductor del cangrejo de río. Sin embargo, la conductancia subyacente a este fenómeno no ha sido caracterizada. Es más, si bien la rectificación anómala presente en neuronas de vertebrados e invertebrados y en músculo de vertebrados ha sido exhaustivamente estudiada, aquella de músculo de invertebrados permanece aún oscura en cuanto a su existencia y caracterización. En el presente capítulo se trata la caracterización electrofisiológica y farmacológica de la corriente responsable de la rectificación anómala en las fibras del músculo abductor.

3.III. METODOS

La membrana se mantuvo a un potencial impuesto (H) próximo a V_r con el fin de reducir la corriente estacionaria. Así, H fue -60 mV, excepto cuando se incrementó $[\text{K}^+]_o$, en cuyo caso H tomó valores próximos a V_r alcanzado por la fibra. Se utilizaron dos tipos distintos de protocolos P1 y P2. Los protocolos consistieron en un pulso de voltaje desde H hasta un voltaje inicial (V), seguido por otro pulso a un voltaje final (F). En P1, V fue variable y F constante. En P2, V fue constante y F variable. Ocasionalmente, al final de cada serie de pulsos, se

añadió uno hiperpolarizante de escasa amplitud (generalmente, 5 mV) con el fin de comprobar la constancia de las corrientes capacitiva y de pérdida así como, en su caso, su correcta substracción de la corriente total. La Figura 3.1 muestra las corrientes provocadas por un protocolo típico, así como las convenciones y medidas de corriente utilizadas: a) todas las corrientes fueron medidas tomando como referencia el valor cero real de corriente; b) la corriente estacionaria en H es $I_{(H)}$; c) el pulso desde H a V generó una corriente instantánea ($I^{\circ}_{(V)}$, que corresponde a I_p) seguida por una corriente que se desarrolla en el tiempo hasta alcanzar el estado estacionario ($I^*_{(V)}$); d) el pulso desde V a F generó una corriente instantánea ($I^{\circ}_{(F)}$) seguida por una corriente dependiente de tiempo que finalmente alcanza el estado estacionario ($I^*_{(F)}$); e) sea cual fuese el voltaje, la diferencia entre la corriente en cualquier instante y la corriente instantánea se correspondió con I_{AB} , esto es, las diferencias $I^*_{(V)} - I^{\circ}_{(V)}$ e $I^{\circ}_{(F)} - I^*_{(F)}$ correspondieron a la activación y desactivación de I_{AB} en V y F, respectivamente; f) la corriente entre $I^{\circ}_{(F)}$ e $I^*_{(F)}$ correspondió a las corrientes de cola (I_{cola}) de I_{AB} . La corriente total se midió al final de V del protocolo P1. Las corrientes instantáneas al inicio de V y F de los protocolos P1 y P2, respectivamente, se midieron entre 3 y 10 ms después del respectivo pulso, una vez que las corrientes capacitivas han finalizado y cuando la activación o desactivación de I_{AB} es aún despreciable; por tanto, la conductancia de membrana al inicio del pulso F es idéntica a aquélla al final del pulso V precedente.

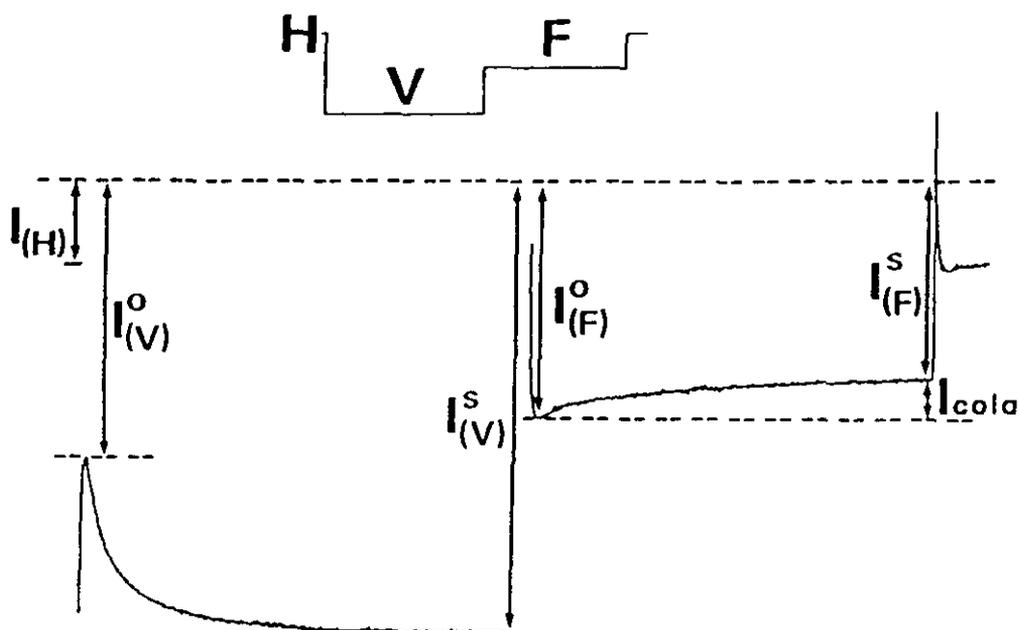


Figura 3.1. Convenciones y parámetros medidos en condiciones de fijación de voltaje. Corrientes activadas por un doble pulso desde V_m impuesto (H) a un voltaje inicial (V) y a un voltaje final (F). Las corrientes en H, V y F son $I_{(H)}$, $I_{(V)}$ e $I_{(F)}$, respectivamente, y son medidas desde el valor de corriente cero (línea interrumpida superior). Para cada corriente, los superíndices 0 y s indican los valores inicial y estacionarios, respectivamente. La amplitud de I_{cola} es la diferencia entre $I_{(V)}^0$ e $I_{(F)}^s$.

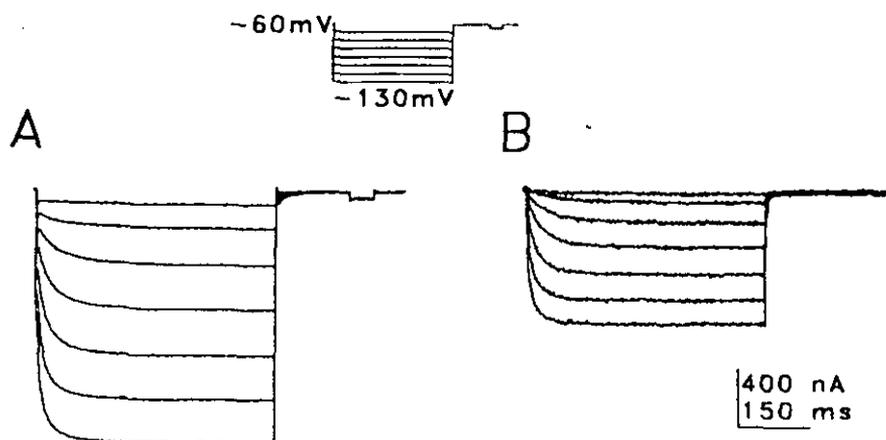


Figura 3.2. Corrientes activadas por hiperpolarización. A, corrientes activadas por pulsos hiperpolarizantes en solución normal. B, como en A, pero tras substracción de las corrientes capacitiva y de pérdida.

3.IV. RESULTADOS

La Figura 3.2 A muestra las corrientes generadas por un protocolo hiperpolarizante P1, en el cual $F = H$. Se aprecia un salto instantáneo de corriente ($I^{\circ}_{(v)}$) seguido por una corriente de entrada que se desarrolla en el tiempo (es decir, es dependiente de tiempo) y que alcanza su estado estacionario antes de llegar a los 500 ms. Ambas corrientes crecen con la hiperpolarización, pero mientras aquélla lo hace linealmente, ésta no lo hace así (es por tanto una corriente dependiente de voltaje). De acuerdo a la ley de Ohm, el salto de corriente instantánea (ΔI) es proporcional a la amplitud del pulso de voltaje (ΔV_m) y a la conductancia de membrana (G):

$$\Delta I = G \Delta V_m. \quad (3.1)$$

Así, puesto que para un pulso determinado ΔV_m es constante, la variación de ΔI durante el pulso implica una variación de G . Puesto que $I^{\circ}_{(v)}$ es menor que $I^{\circ}_{(F)}$ (excepto para aquellos pulsos de escasa amplitud), podemos concluir que la corriente de entrada dependiente de tiempo y de voltaje está asociada a un aumento de G . Esta corriente de entrada activada por hiperpolarización (que denominaremos I_{AB}) se muestra en la Figura 3.2 B aislada, por substracción, de los componentes lineales (I_p e I_c).

Ocasionalmente, hiperpolarizaciones a $V_m > -140$ mV provocaron la aparición de corrientes de entrada muy lentas y de larga duración (varios centenares de ms) que acaso se debieron a rupturas de la membrana y que no parecen estar relacionadas con I_{AB} , como queda demostrado por la saturación de su curva de activación. Así, hiperpolarizaciones de tan alta magnitud se provocaron sólo cuando este tipo de corriente estaba ausente.

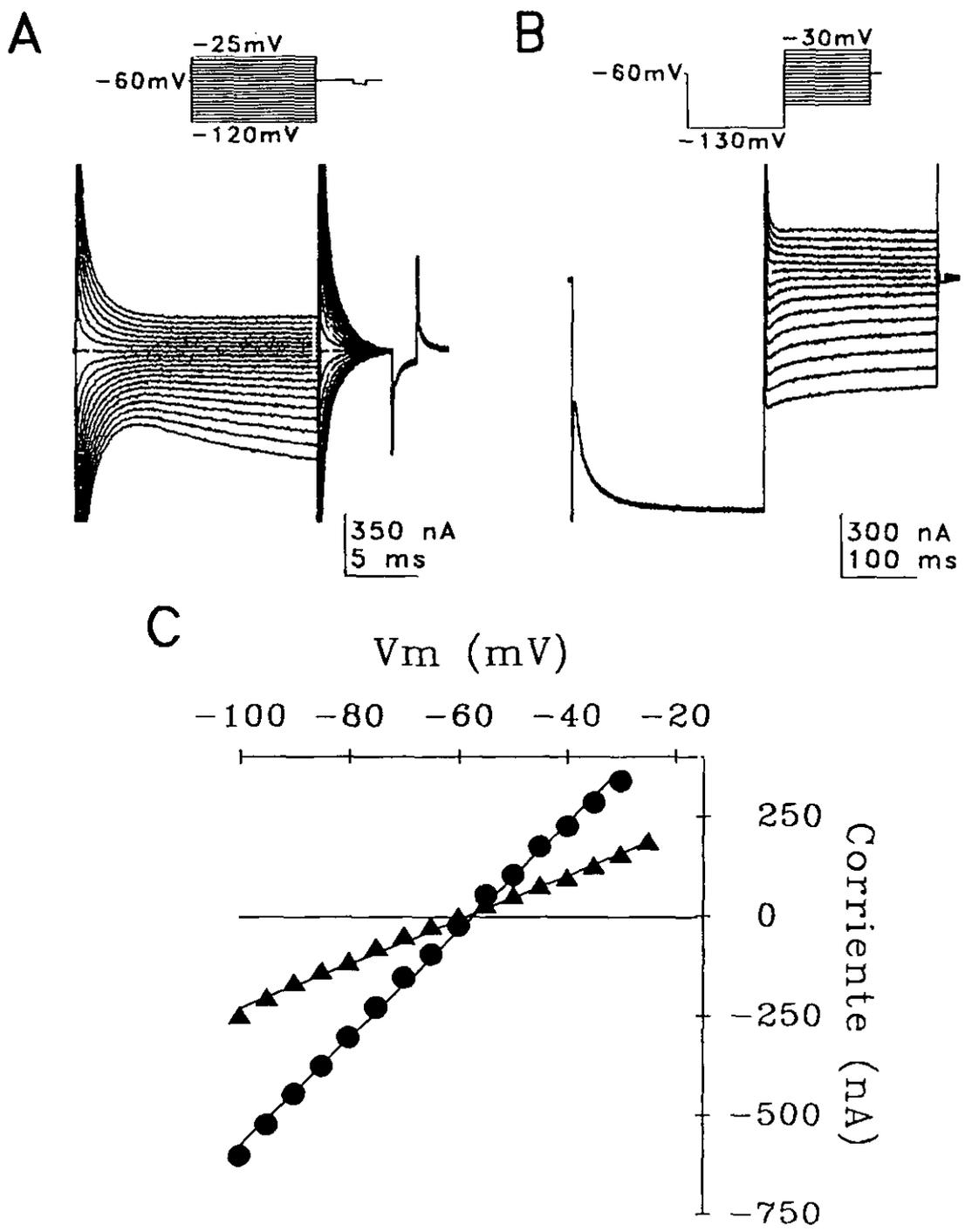


Figura 3.3. Corrientes instantáneas en solución 0 mM Ca^{2+} , TEA. A, corrientes totales generadas por el protocolo P1. B, corriente total provocada por el protocolo P2. C, relaciones I-V de $I^o_{(v)}$ (\blacktriangle) e $I^o_{(r)}$ (\bullet) ajustadas a regresiones de primer orden (líneas continuas).

IVA. Relación I-V instantánea de I_{AB}

La Figura 3.3 A y B muestra las corrientes generadas por los protocolos P1 y P2, respectivamente. Las curvas I-V de las corrientes instantáneas se representan en la Figura 3.3 C. Como queda indicado en el capítulo III.2, la relación I-V de $I^{\circ}_{(V)}$ (que corresponde a I_p) (Figura 3.3 C, triángulos) es lineal ($r > 0.99$), indicando que la membrana no posee rectificación anómala instantánea. Igualmente, la relación I-V de $I^{\circ}_{(F)}$, cuando I_{AB} ha sido activada por un pulso $V = -130$, es lineal ($r > 0.99$), indicando que la corriente total es óhmica. Considerando que $I^{\circ}_{(V)}$ e $I^{\circ}_{(F)}$ se comportan según la ley de Ohm, los canales que median I_{AB} no rectifican y, por tanto, I_{AB} cumple la ley de Ohm, verificando así la ecuación:

$$I_{AB} = G_{AB} (V_m - E_{AB}), \quad (3.2)$$

donde G_{AB} y E_{AB} son la conductancia y el potencial de inversión de I_{AB} , respectivamente. Por tanto, la corriente iónica total generada por hiperpolarización (I_{total}) se ajusta a la ecuación:

$$I_{total} = I_p + I_{AB} = G_p (V_m - E_p) + G_{AB} (V_m - E_{AB}), \quad (3.3)$$

y, por tanto, I_{AB} (y cualquier otra corriente dependiente de voltaje) puede ser aislada a partir de la corriente total mediante substracción de I_p .

Por otra parte, las pendientes de las regresiones lineales de las relaciones I-V de $I^{\circ}_{(V)}$ e $I^{\circ}_{(F)}$, que representan la conductancia de reposo y ésta más G_{AB} a -130 mV, respectivamente, son 5.5 y $13.5 \mu S$, respectivamente, confirmando la existencia de un incremento de la conductancia de membrana que subyace a la presencia de I_{AB} . Se puede deducir de la ec. (3.3) que el punto de intersección de ambas regresiones lineales es E_{AB} ,

certificando el valor de E_{AB} estimado a partir de I_{cola} . En efecto, el valor de aquél en la Figura 3.3 C ($E_{AB} = -56.5$ mV) es muy semejante al de éste ($E_{AB} = -53.2$ mV) obtenido en la misma fibra (Fig. 3.5 C).

IVB. Dependencia de voltaje de G_{AB}

La dependencia de voltaje de G_{AB} ha sido caracterizada por un parámetro adimensional de activación (N_{∞}), similar a los parámetros n y m definidos por Hodgkin y Huxley (1952d). N_{∞} , que varía entre cero y uno según G_{AB} varía entre cero y $G_{AB, \text{max}}$, representa la probabilidad conjunta en el estado estacionario de activación de los canales que median I_{AB} . N_{∞} ha sido calculado a partir de las corrientes generadas por el protocolo P1 (Figura 3.4 A) en el cual V es variable (generalmente, entre -40 y -160 mV) y F es constante (usualmente, -110 mV). Considerando que G_{AB} al final de V es idéntica a G_{AB} al inicio de F , y puesto que F , E_{AB} , E_p y G_p son constantes, la ec. (3.3) se puede reescribir como:

$$I^{\circ}_{(F)} = G_p (F - E_p) + G_{AB} (F - E_{AB}) = \alpha + \beta G_{AB}, \quad (3.4)$$

donde α y β son constantes, y, por tanto, cualquier cambio en G_{AB} se ve reflejado en $I^{\circ}_{(F)}$. Esta toma valores entre un mínimo ($I^{\circ}_{(F), \text{min}}$) y un máximo ($I^{\circ}_{(F), \text{max}}$) según G_{AB} varía entre cero y $G_{AB, \text{max}}$. Así,

$$N_{\infty} = (I^{\circ}_{(F)} - I^{\circ}_{(F), \text{min}}) / (I^{\circ}_{(F), \text{max}} - I^{\circ}_{(F), \text{min}}). \quad (3.5)$$

La Figura 3.4 C muestra la curva de activación de I_{AB} , esto es, la relación entre N_{∞} y V_m . Los valores se han ajustado a la ecuación:

$$N_{\infty} = \tilde{N}_{\infty} [1 + \exp(V - V_0/S)]^{-1}, \quad (3.6)$$

deducida de la ecuación de Boltzman, en la que \tilde{N}_{∞} es el máximo

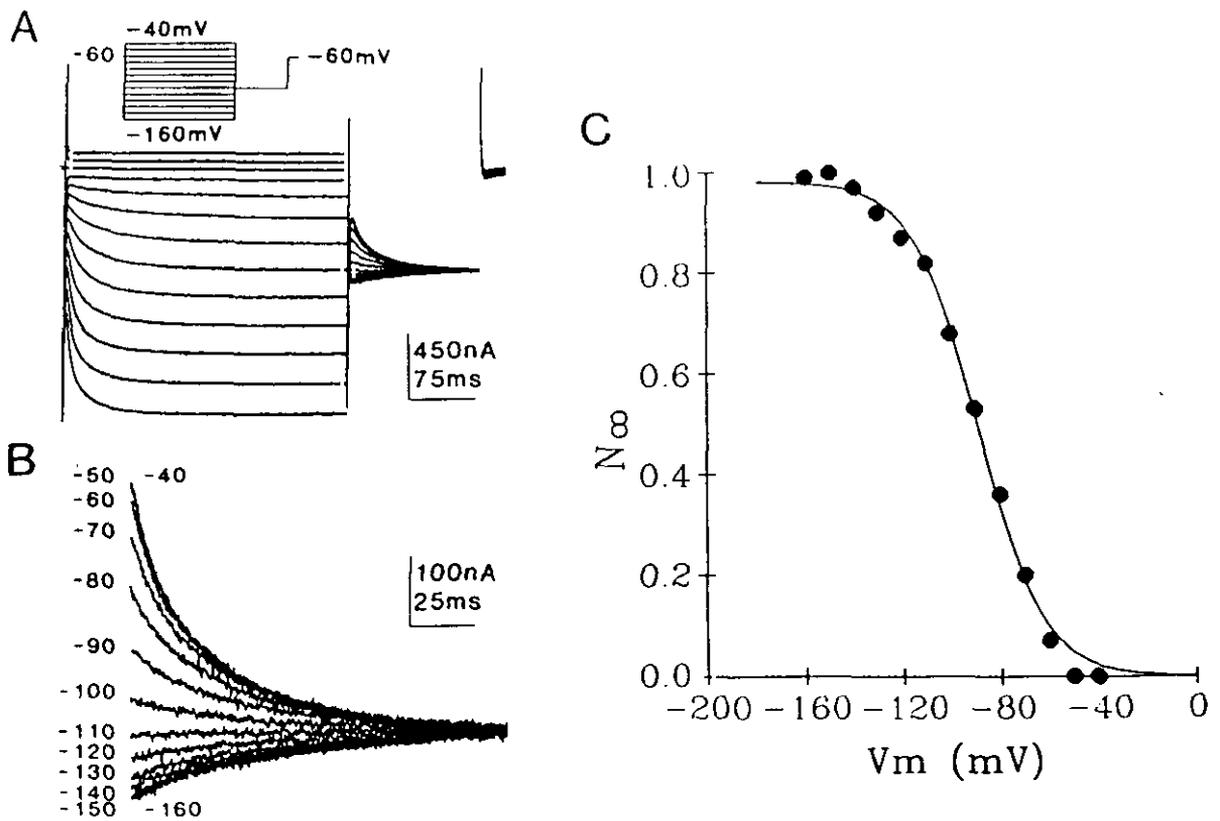


Figura 3.4. Dependencia de voltaje de G_{AB} . A, corrientes totales provocadas por el protocolo P1. B, registro expandido de las corrientes de cola. C, curva de activación de G_{AB} , donde los valores de N_8 han sido calculados a partir de la ec. (3.5) y ajustados a la ec. (3.6) (línea continua).

valor de N_{∞} (usualmente 1), V_0 es el voltaje al cual G_{AB} está medio activada y S es un parámetro que define la pendiente de la curva.

Alternativamente, la dependencia de voltaje de G_{AB} ha sido caracterizada directamente a partir de la relación entre G_{AB} y V_m . Así, asumiendo que $I_{(F),min}^{\circ} = G_p (F - E_p)$ (suposición sostenida por la saturación que presenta $I_{(F),min}^{\circ}$ y por la linealidad de I_p respecto a V_m), a partir de la ec. (3.4) se obtiene:

$$G_{AB} = (I_{(F)}^{\circ} - I_{(F),min}^{\circ}) / (F - E_{AB}). \quad (3.7)$$

Los resultados obtenidos en condiciones normales a partir de 17 fibras musculares representativas indican que la activación de G_{AB} aumenta con la hiperpolarización de forma sigmoidea y de acuerdo a la ecuación de Boltzman ($r > 0.99$; indicando que la probabilidad de apertura de un canal es independiente del resto), comenzando en valores próximos a V_r y saturándose alrededor de -140 mV. La dependencia de voltaje de G_{AB} muestra además una activación media a $-94.4 \text{ mV} \pm 7.1 \text{ mV}$, una pendiente S de 12.4 ± 2.7 y una $G_{AB,max}$ de $7.8 \pm 3.6 \mu S$.

IVC. Dependencia de tiempo de I_{AB}

El curso temporal de la activación y desactivación de I_{AB} (es decir, durante los pulsos V y F ; Figura 3.5 A y B, respectivamente) se ajusta a sendas funciones exponenciales de la forma:

$$I_{AB}(V) = a + b \exp(-t/\tau_{act}) \quad (3.8)$$

$$I_{AB}(F) = c + d \exp(-t/\tau_{des}) \quad (3.9)$$

donde a , b , c y d son constantes y τ_{act} y τ_{des} son las respectivas constantes de tiempo de la activación y desactivación de I_{AB} . Ambas constantes de tiempo son funciones exponenciales de V_m

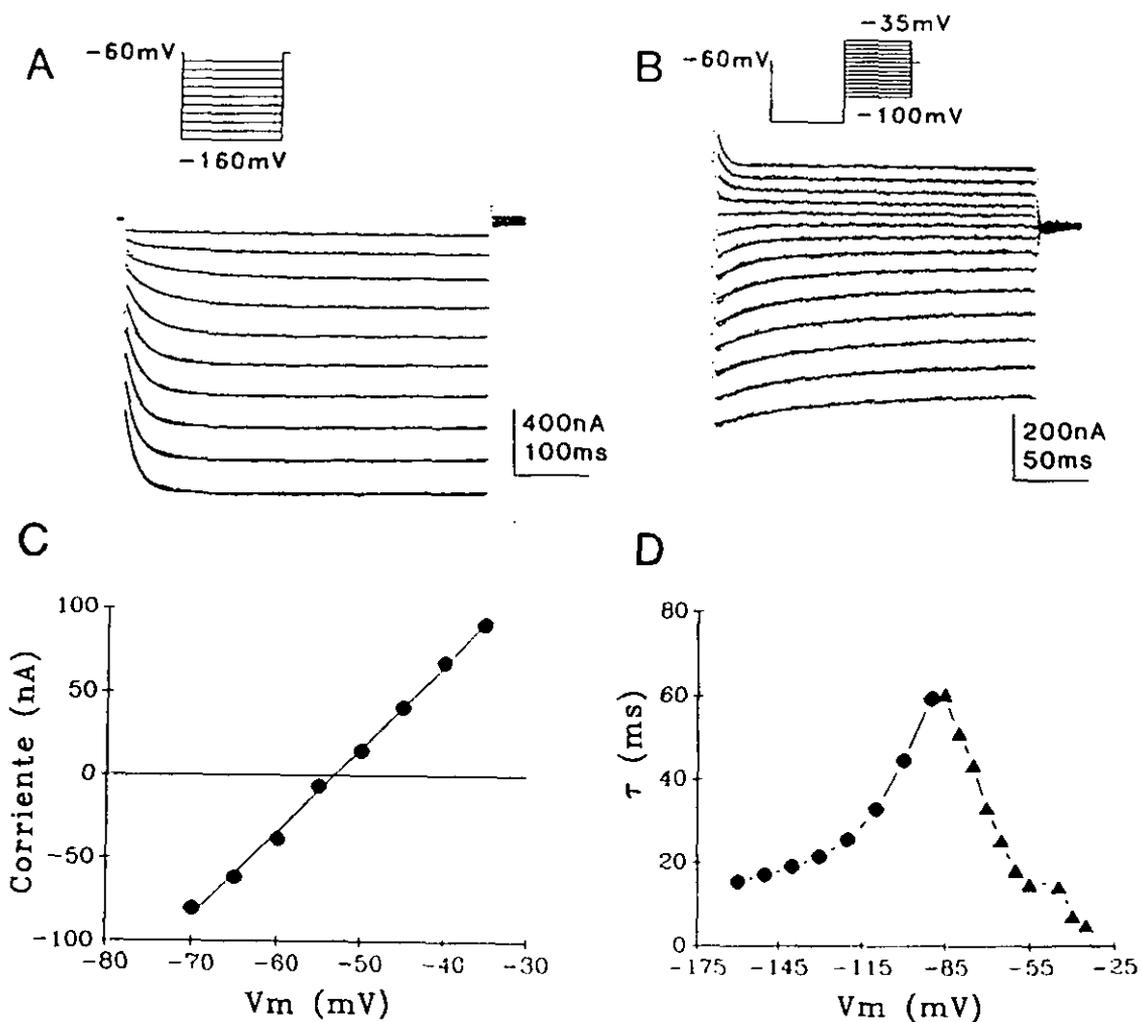


Figura 3.5. Potencial de inversión y curso temporal de I_{AB} . **A**, corrientes totales (*líneas punteadas*) generadas por el protocolo P1 y ajustadas cada una de ellas la ec. (3.8) (*líneas continuas*). **B**, I_{col} generadas por el protocolo P2 y ajustadas cada una de ellas a la ec. (3.9) (*líneas continuas*). **C**, relación I-V de la amplitud de las corrientes de cola de I_{AB} ajustada a una regresión de primer orden (*línea continua*). **D**, relación τ -V de las constantes de tiempo de la activación (\bullet) y desactivación (\blacktriangle) de I_{AB} .

(Figura 3.5 D). En efecto, τ_{act} decrece e-veces cada 23.6 mV de hiperpolarización, en tanto que τ_{des} decrece e-veces cada 31.7 mV de despolarización. La similitud de las magnitudes de τ_{act} y τ_{des} sugiere que la cinética de activación y desactivación de I_{AB} puede ser descrita por una única constante de tiempo (τ_{AB}). Arbitrariamente, τ_{AB} se ha hecho corresponder con τ_{act} para las hiperpolarizaciones de relativa mayor amplitud y con τ_{des} para el resto de voltajes. De acuerdo a lo expuesto por Hodgkin y Huxley (1952d), la constante de tiempo de una corriente dependiente de tiempo cuya curva de activación sea semejante a aquella mostrada por I_{AB} , debe ser una función acampanada de V_m cuyo pico corresponda a la activación media. La Figura 3.5 D muestra que, en efecto, τ_{AB} es una función acampanada de V_m cuyo pico coincide con V_0 (compárese con la Figura 3.4 perteneciente a la misma fibra).

IVD. Naturaleza iónica de I_{AB} . Efecto de iones fisiológicos

E_{AB} se ha estimado a partir de I_{cola} generadas por el protocolo P2. La Figura 3.5 B muestra un registro expandido de aquellas representativas ilustradas en la Figura 3.3 B. Puesto que los canales que median I_{AB} no rectifican e I_{AB} es dependiente de tiempo:

$$I_{cola} = I_{(F)}^o - I_{(F)}^s = \Delta G_{(F)} (F - E_{AB}), \quad (3.10)$$

donde $\Delta G_{(F)}$ es la diferencia entre la conductancia al principio y al final de F. $G_{(F)}$ al principio de F es igual a $G_{(V)}$ al final de V y, por tanto, constante y >0 (pues V es constante e igual a -130 mV). Así, I_{cola} es cero cuando $\Delta G_{(F)}$ es cero (esto es, cuando $V = F$) o cuando $F = E_{AB}$. La Figura 3.5 C muestra la relación I-V de las corrientes de cola mostradas en la Figura 3.5 B y la

regresión de primer orden a la que han sido ajustadas ($r > 0.99$). El valor de E_{AB} obtenido por interpolación es de -53.2 mV. El valor medio de E_{AB} así obtenido en 28 fibras representativas es de -61.8 ± 6.3 mV, que no difiere significativamente del promedio de V_r (véase capítulo III.1).

IVDa. Iones Na^+

La total substitución de Na^+ extracelular por TRIS, colina o Li^+ no provoca ninguna modificación en I_{AB} ni en ninguno de los parámetros que la definen, indicando que Na^+ no contribuye a I_{AB} .

IVDb. Iones Ca^{2+} y Mg^{2+}

I_{AB} ni ninguno de sus parámetros característicos se modifican en ausencia de Ca^{2+} extracelular ni en presencia de EGTA intracelular. Por tanto, podemos concluir que Ca^{2+} , intra o extracelular, no está involucrado en la generación de I_{AB} . Igualmente, la variación de $[Mg^{2+}]_o$ (entre 0 y 20 mM) no modifica I_{AB} , sugiriendo que estos iones no influyen sobre I_{AB} .

IVDc. Iones Cl^-

Puesto que las fibras musculares presentan receptores de GABA que median una conductancia de Cl^- (véase II. MATERIALES Y METODOS), E_{Cl} puede ser estimado a partir del potencial de inversión de las corrientes postsinápticas provocadas por aplicación extracelular de GABA. Este potencial de inversión corresponde al punto de intersección de las regresiones lineales de primer orden ($r > 0.99$) de las relación I-V de $I^o_{(v)}$, generadas por el protocolo P1 en el control y en el pico de la corriente postsináptica inducida por GABA.

Cuando los iones Cl^- extracelulares son totalmente reemplazados por iones metanosulfonato, que son incapaces de

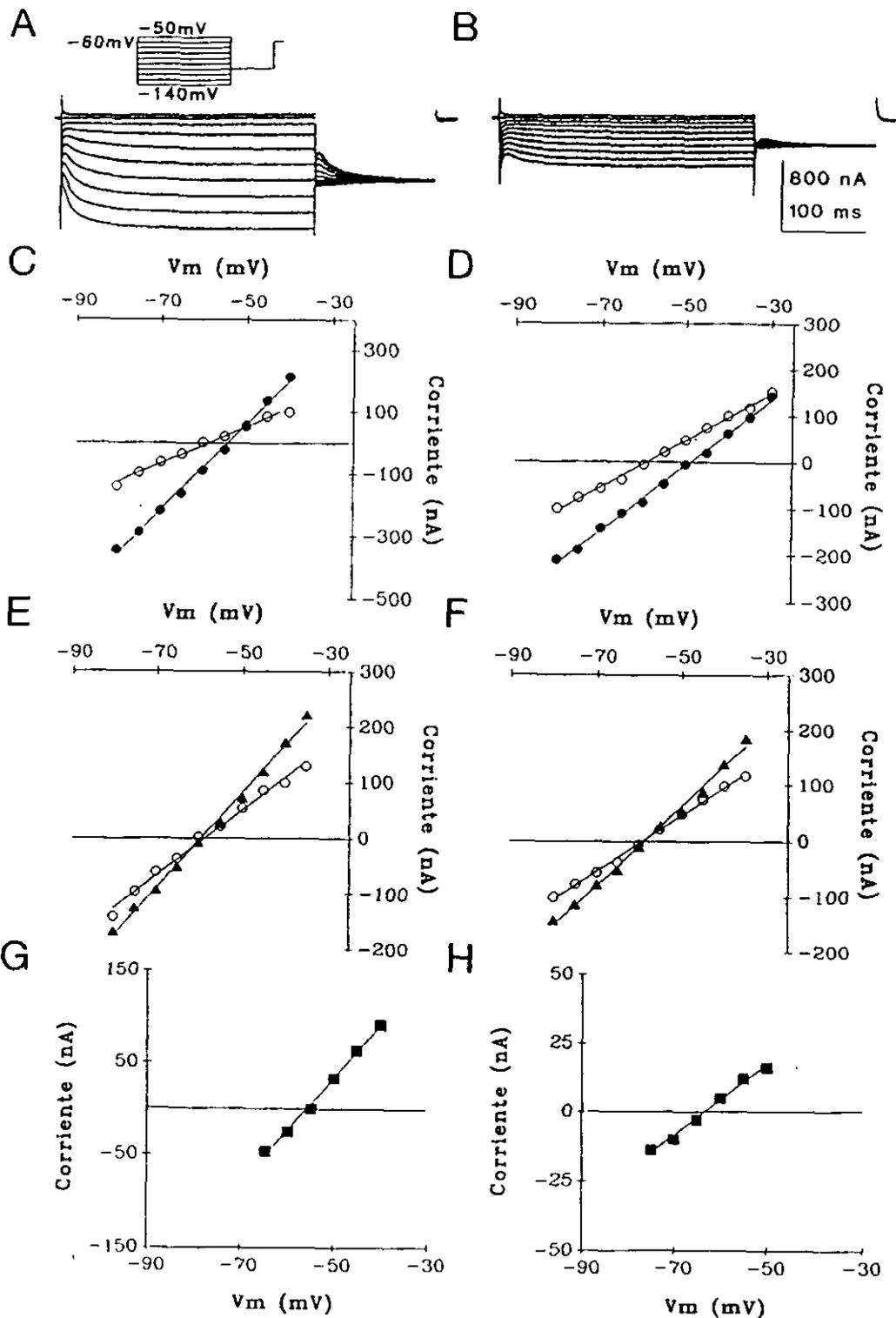


Figura 3.6. Efecto de Cl^- sobre I_{AB} . A y B, corrientes totales generadas en solución normal y en solución 0 mM Cl^- , respectivamente. C y D, relaciones $I-V$ de I_{ov}^0 , en Control (O) y en presencia de GABA (●) en solución normal y en solución 0 mM Cl^- , respectivamente. E y F, relaciones $I-V$ de I_{ov}^0 (O) e I_{or}^0 (▲) en solución normal y en solución 0 mM Cl^- , respectivamente; I_{or}^0 ha sido generada por el protocolo P1 donde $H = -60 \text{ mV}$, $V = 10 \text{ mV}$ y F variable entre -35 y -80 mV . G y H, relación $I-V$ de la amplitud de I_{colis} de I_{AB} en solución normal y en solución 0 mM Cl^- , respectivamente. Los valores han sido ajustados a regresiones de primer orden (líneas continuas).

permeable por los canales de Cl^- , I_{AB} es drásticamente reducida (Figura 3.6 A y B) y de forma reversible (no mostrado). Boistel y Fatt (1958) mostraron que en el músculo abductor el potencial de inversión de los PIPS, y por ende E_{Cl} , variaba 30 mV hacia potenciales positivos tras la perfusión con solución 0 mM Cl^- . La Figura 3.6 C y D muestra que E_{Cl} cambia desde -51.1 a -22.0 mV en solución 0 mM Cl^- , indicando que la redistribución de iones Cl^- a través de la membrana en esta condición es mínima (al menos dentro de los 15 primeros minutos, puesto que la respuesta a GABA se mantiene) y sugiriendo, por tanto, que I_{AB} no es transportada por Cl^- , pues en caso de que sí lo fuese, en solución 0 mM Cl^- , donde Cl^- intracelular no sufre una rápida redistribución, I_{AB} debería incrementarse respecto al control debido al aumento de la fuerza electromotriz de Cl^- , lo cual está en contradicción con lo observado. Además, E_{K} , estimado a partir de I_{K} (véase capítulo III.6), y E_{AB} no se modifican significativamente en estas condiciones. En efecto, E_{K} , estimado a partir del punto de intersección de las regresiones lineales ($r > 0.99$) de las relaciones I-V de $I_{\text{K}}^{\text{(V)}}$ e $I_{\text{K}}^{\text{(F)}}$ (para I_{K}), es -61.4 y -58.0 mV (Figura 3.6 E y F) y E_{AB} es -56.1 y -63.4 mV (Figura 3.6 G y H), en solución control y en solución 0 mM Cl^- , respectivamente. Estos valores de E_{K} , que en principio parecen sorprendentemente despolarizados, no son inesperados, de acuerdo a similares resultados obtenidos en otros músculos de crustáceos (véase, por ejemplo, Mounier y Vassort, 1975b; Hencsek et al., 1978).

A pesar de todo lo expuesto, la desaparición de I_{AB} en ausencia de Cl^- extracelular parecería indicar que ésta está mediada por Cl^- . Sin embargo, la corriente activada por

hiperpolarización presente en neuronas de los ganglios sensoriales (Mayer y Wetbrook, 1983) y en motoneuronas espinales (Takahashi, 1990) es también suprimida cuando Cl^- extracelular es substituido por aniones no permeantes, lo cual ha llevado a sugerir que la presencia de Cl^- extracelular es esencial para el funcionamiento de esta corriente (Mayer y Wetbrook, 1983; Takahashi, 1990).

Podemos por tanto concluir que los iones Cl^- no contribuyen a I_{AB} y que ésta o bien es bloqueada por aniones impermeantes o bien necesita de la presencia de Cl^- extracelular.

IVDd. Iones K^+

Los efectos de la variación de $[\text{K}^+]_o$ se resumen en la Figura 3.7. Las corrientes generadas por el protocolo P1 en soluciones EGTA, TEA con 5.4 y 10.8 mM K^+ se muestran en la Figura 3.7 A y B, respectivamente. De acuerdo a la variación de V_r producida por el incremento de $[\text{K}^+]_o$, la relación I-V de la corriente total se desplaza hacia valores despolarizados en soluciones con alta $[\text{K}^+]_o$. (Figura 3.7 C). Igualmente varían las corrientes instantáneas $I_{(v)}^o$ e $I_{(p)}^o$ (Figura 3.7 D, *símbolos vacíos y llenos*, respectivamente), sin dejar de ser lineales. Además, la pendiente de la relación I-V de $I_{(v)}^o$ (es decir, la conductancia en V_r) aumenta 1.4 ± 0.1 ($n = 7$) cuando se dobla $[\text{K}^+]_o$, sin que $G_{\text{AB,max}}$ varíe significativamente. La Figura 3.7 E muestra de qué modo se ve afectada la dependencia de voltaje de G_{AB} por $[\text{K}^+]_o$. En tanto que la pendiente de la curva S apenas cambia desde 16.4 a 17.0, V_o varía desde -100.0 a -81.9 mV en 5.4 (*círculos*) y 10.8 mM K^+ (*triángulos*), respectivamente. Igualmente, y tal como es esperable por la variación de la curva de activación de G_{AB} ,

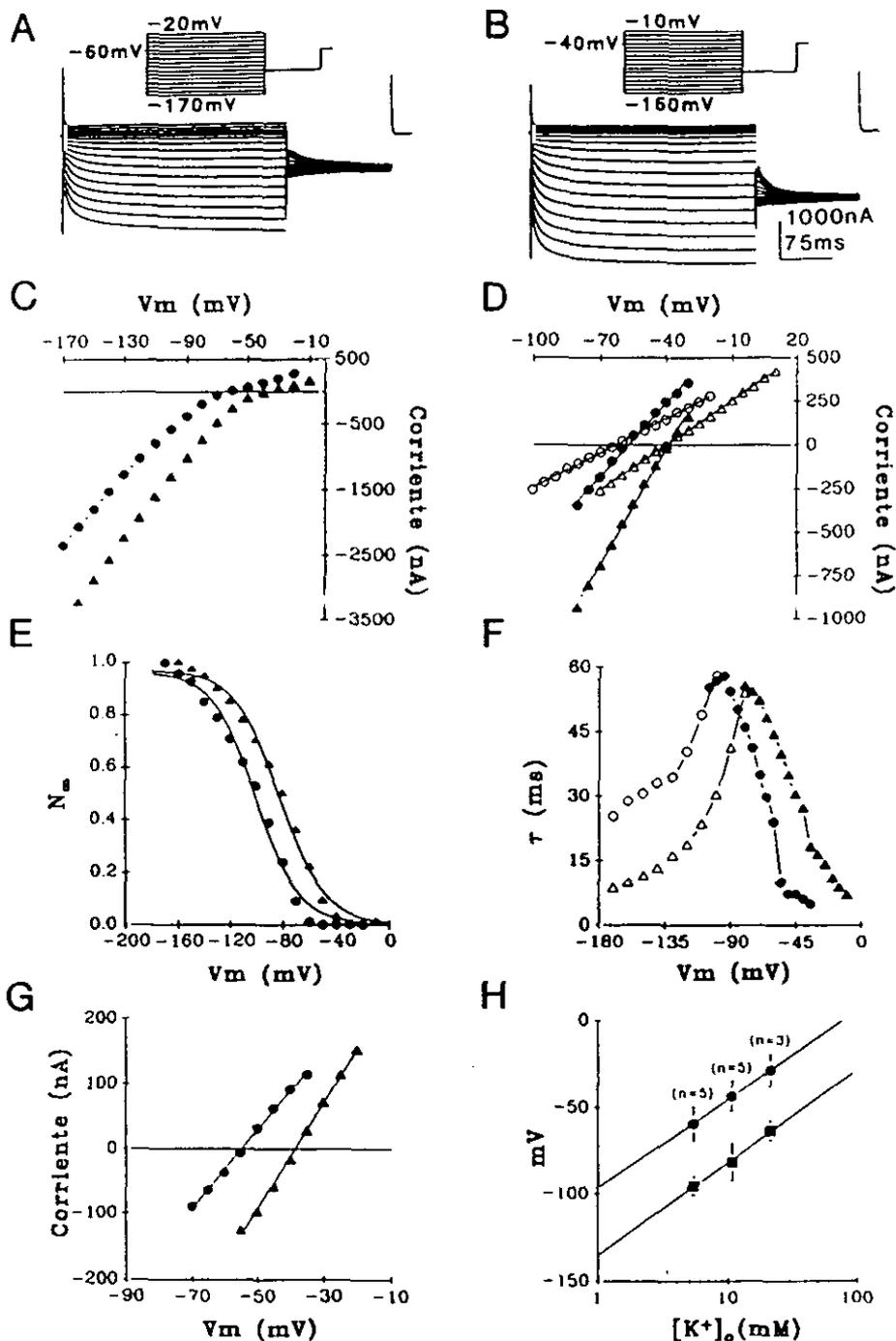


Figura 3.7. Efectos de $[K^+]_o$ sobre I_{AB} . A y B, corrientes totales generadas en 5.4 mM y $10.8 \text{ mM } K^+$, respectivamente, por el protocolo P1, donde $H = -60 \text{ mV}$ y $H = -40$, respectivamente. En las gráficas C a G, los círculos y los triángulos corresponden a 5.4 y $10.8 \text{ mM } K^+$, respectivamente. C, relaciones I-V de $I_{AB(v)}$. D, relaciones I-V de $I_{AB(v)}$ e $I_{AB(f)}$ (símbolos vacíos y llenos, respectivamente) ajustadas a regresiones de primer orden (líneas continuas). E, curvas de activación de G_{AB} , donde los valores de N_m obtenidos a partir de la ec. (3.5) se han ajustado a la ec. (3.6) (líneas continuas). F, relaciones τ -V de la activación y la desactivación de I_{AB} (símbolos vacíos y llenos, respectivamente). G, relaciones I-V de la amplitud de I_{colla} de I_{AB} . H, gráfica semilogarítmica de los valores medios de E_{AB} (●) y de la activación media de G_{AB} (■) en función de $[K^+]_o$, ajustados a regresiones de primer orden (líneas continuas).

cuando se incrementa $[K^+]_o$. la relación τ -V de τ_{AB} se desplaza hacia valores despolarizados sin que se vea afectada la magnitud de τ_{AB} (Figura 3.7 F). En efecto, aun cuando el pico de la curva acampanada se desplaza 18 mV hacia valores positivos, su amplitud no varía significativamente. Por último, el incremento de $[K^+]_o$ desde 5.4 hasta 10.8 mM (Figura 3.7 G, círculos y triángulos, respectivamente), provoca que E_{AB} varíe desde -54.7 hasta -38.6 mV (tal como varía el punto de intersección de las regresiones lineales de $I^o_{(V)}$ e $I^o_{(F)}$ en la Figura 3.7 D). En promedio, E_{AB} varía desde -59.2 ± 9.8 (n = 5) a -43.5 ± 8.6 (n = 5) y -28.7 ± 9.3 (n = 3) en 5.4, 10.8 y 21.6 mM K^+ (Figura 3.7 H, círculos).

En conclusión, V_o y E_{AB} se desplazan en promedio 53.6 y 50.8 mV por cada orden de magnitud que se incrementa $[K^+]_o$. (Figura 3.7 H, cuadrados y círculos, respectivamente; el coeficiente de correlación de las regresiones lineales es >0.99), lo que representa una variación próxima a la variación de E_K según la ecuación de Nernst (asumiendo constante $[K^+]_i$). Podemos pues concluir que I_{AB} es selectivamente transportada por K^+ y que su curva de activación depende de la diferencia $V_m - E_K$.

Aunque es bien conocido que la alteración de $[K^+]_o$ resulta en un rápida redistribución de los iones Cl^- a través de la membrana celular en numerosos sistemas (Boyle y Conway, 1941; Hille, 1992), Boistel y Fatt (1958) mostraron que E_{Cl} no cambia substancialmente cuando se incrementa $[K^+]_o$ en fibras del músculo abductor. Estas observaciones estuvieron basadas en medidas de la amplitud de los PIPS realizadas durante los 15 primeros minutos tras el cambio de solución, sin considerar modificaciones ulteriores. La Figura 3.8 muestra los efectos del incremento de

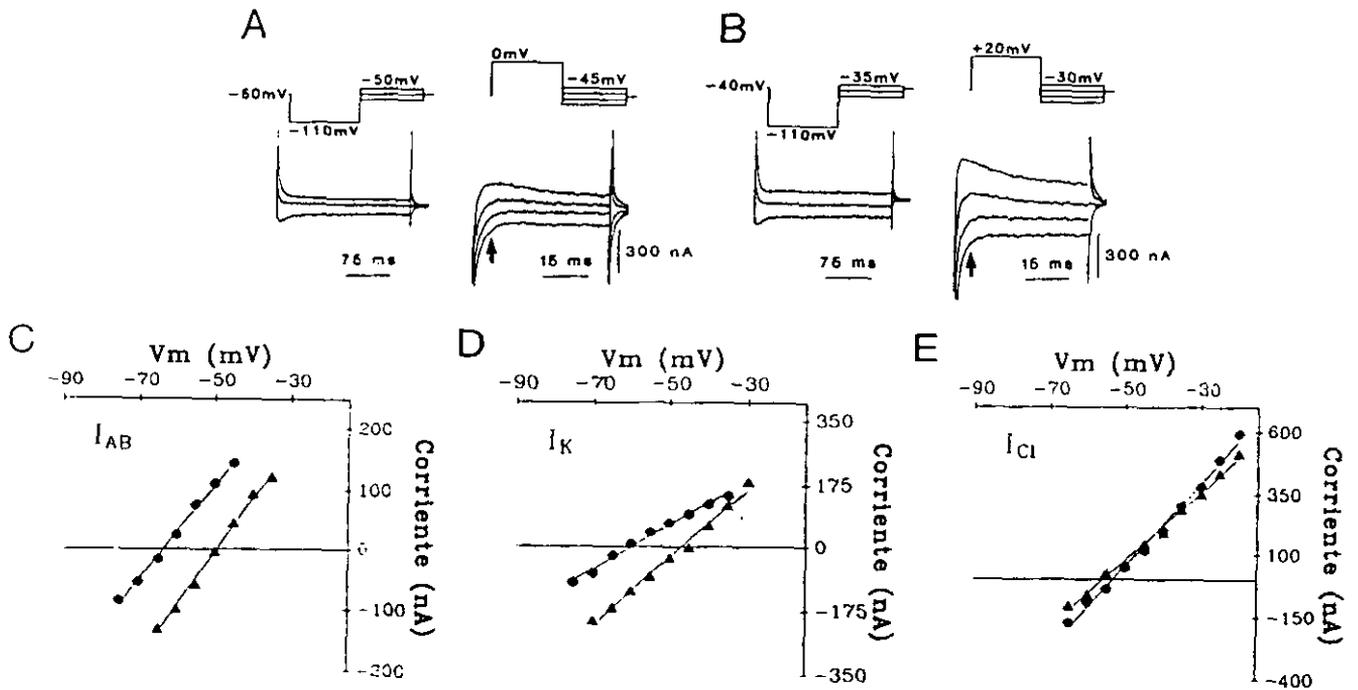


Figura 3.8. Efecto de $[K^+]_o$ sobre E_{AB} , E_K y E_{Cl} . A y B, I_{co1a} de I_{AB} (izda.) e I_K (dcha.) en 5.4 y 10.8 mM K^+ , respectivamente. Las flechas indican $I_{(r)}$. En las gráficas C a E, los círculos y triángulos corresponden a 5.4 y 10.8 mM K^+ , respectivamente; los valores han sido ajustados a regresiones de primer orden (líneas continuas). C, relaciones I-V de la amplitud de I_{co1a} de I_{AB} . D, relaciones I-V de la amplitud de I_{co1a} de I_K . E, relaciones I-V de las diferencias entre $I_{(v)}$, en ausencia y presencia de GABA.

[K⁺]. sobre E_{AB}, E_K y E_{Cl} medidos durante los primeros 15 min de perfusión con la nueva solución. Mientras E_K y E_{AB} varían desde -60.1 y -63.5 a -46.5 y -49.4 mV, respectivamente, E_{Cl} (considerado como el punto de intersección de la relación I-V de la diferencia entre I_{o(v)}, en presencia y ausencia de GABA) no cambia significativamente (desde -53.3 a -55.8 mV), por el incremento de [K⁺]. desde 5.4 a 10.8 mM, respectivamente (círculos y triángulos, respectivamente). Estos resultados confirman aquéllos encontrados por Boistel y Fatt (1958), en cuanto que indican una mínima o extremadamente lenta redistribución de Cl⁻ tras la variación de [K⁺].

Podemos por tanto concluir que los efectos producidos por el incremento de [K⁺]. no son debidos a redistribución de Cl⁻, sino que éstos son efectivamente debidos a la variación de [K⁺]. y que I_{AB} es selectivamente transportada por K⁺.

IVE. Efecto de iones no fisiológicos

IVEa. Cationes monovalentes (Cs⁺ y Rb⁺)

Tanto la corriente rectificadora anómala como las corrientes activadas por hiperpolarización son bloqueadas por bajas concentraciones de Cs⁺ extracelular (Hagiwara et al., 1976; Gay y Stanfield, 1977; DiFrancesco y Ojeda, 1980; Halliwell y Adams, 1982; Mayer y Westbrook, 1983). No así I_{AB}, que no se ve afectada por [Cs⁺]. (hasta 50 mM). Por otra parte, Rb⁺ interactúa con numerosos canales de K⁺ de diferentes tejidos, incluyendo ambos tipos de rectificadores anómalos, a los cuales bloquea a concentraciones extracelulares inferiores a 10 mM (Hagiwara y Takahashi, 1974; Standen y Stanfield, 1980; DiFrancesco, 1982). Sin embargo, la adición extracelular de 10 mM Rb⁺ no modifica I_{AB}.

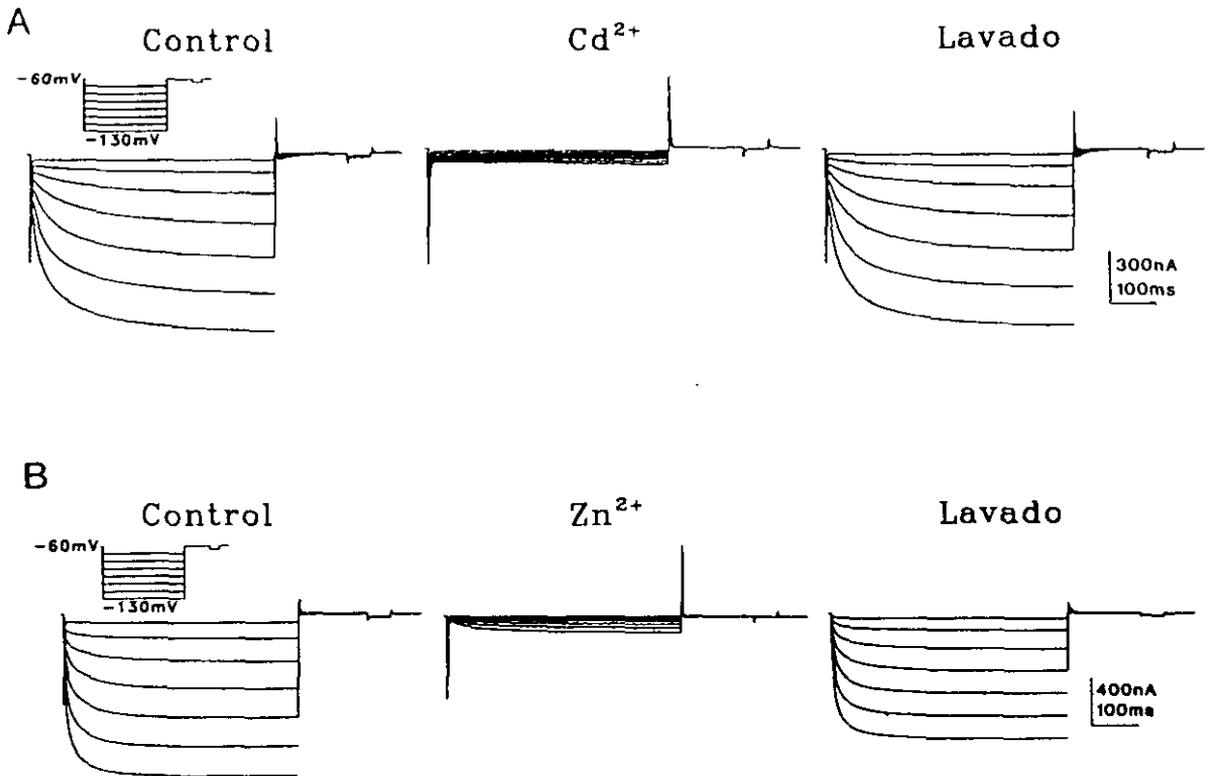


Figura 3.9. Efecto de Cd^{2+} y Zn^{2+} sobre I_{AB} . A, corrientes totales generadas en solución normal (Control), en solución 5 mM Cd^{2+} y tras lavado de ésta en solución normal. B, corrientes totales generadas con solución normal (Control), en solución 5 mM Zn^{2+} y tras lavado de ésta con solución normal.

IVeB. Cationes divalentes (Ba^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+})

Ba^{2+} extracelular (a concentraciones <1 mM) suprime la corriente rectificadora anómala (Hagiwara et al., 1978), pero no modifica las corrientes activadas por hiperpolarización (Yanagihara e Irisawa, 1980; Halliwell y Adams, 1982; Mayer y Westbrook, 1983). En soluciones en las cuales Ba^{2+} reemplaza a Ca^{2+} , I_{AB} no se modifica, ni tampoco lo hace cuando éste es substituido por Mn^{2+} .

Contrariamente a ello, la presencia de bajas concentraciones extracelulares (<5 mM) de Cd^{2+} o Zn^{2+} en el medio extracelular provocan una drástica y reversible reducción de I_{AB} (Figura 3.9 A y B, respectivamente). Es ocioso subrayar que la rectificación anómala observada en condiciones de fijación de corriente es también suprimida en estas condiciones.

3.V. DISCUSION

Los experimentos descritos en el presente capítulo demuestran la existencia de una corriente activada por hiperpolarización, I_{AB} , que es dependiente de tiempo y de voltaje y que es responsable de la rectificación anómala o de entrada de las fibras del músculo abductor. Aunque esta corriente presenta características comunes tanto a la corriente rectificadora anómala como a las corrientes activadas por hiperpolarización, muchas de sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas son privativas de ella.

La corriente rectificadora anómala se caracteriza por ser transportada por K^+ (Hagiwara y Takahashi, 1974; Constanti y Galvan, 1983), por presentar una activación instantánea y un posterior curso temporal rápido (Hagiwara y Takahashi, 1974;

Constanti y Galvan, 1983), por depender su activación de la diferencia $V_m - E_K$ (Hagiwara y Yoshii, 1979; Leech y Stanfield, 1981) y por ser bloqueada extracelularmente tanto por Cs^+ y Rb^+ como por Ba^{2+} (Hagiwara y Takahashi, 1974; Hagiwara et al., 1976; Gay y Stanfield, 1977; Hagiwara et al., 1978; Standen y Stanfield, 1980). Las corrientes activadas por hiperpolarización son transportadas por Na^+ y K^+ (DiFrancesco, 1981; Halliwell y Adams, 1982; Mayer y Westbrook, 1983), no presentan activación instantánea sino un desarrollo temporal lento, su activación es independiente de $[K^+]$. (Halliwell y Adams, 1982; Mayer y Westbrook, 1983; Spain et al., 1987) y, siendo bloqueadas por Cs^+ y Rb^+ (DiFrancesco y Ojeda, 1980; Halliwell y Adams, 1982; DiFrancesco, 1982; Mayer y Westbrook, 1983), son insensibles a Ba^{2+} (Yanagihara e Irisawa, 1980; Brown y DiFrancesco, 1980; Halliwell y Adams, 1982; Edman et al., 1987).

Dos son los mecanismos propuestos para explicar ambas corrientes. Las corrientes activadas por hiperpolarización serían debidas a la activación de canales mediante mecanismos de compuerta intrínsecos a ellos y sensibles al voltaje, que harían óhmico el comportamiento del canal abierto (Edamn et al., 1987; Edman y Gramp, 1989). Por su parte, el componente de activación y desactivación instantáneo de la corriente rectificadora se debería a la propiedad rectificadora de los propios canales sin que mecanismos de compuerta intrínsecos estuvieran involucrados (Sakmann y Trube, 1984). Existen evidencias experimentales que apoyan esta idea, demostrando que Mg^{2+} intracelular a concentraciones fisiológicas ejerce un bloqueo dependiente de voltaje que transforma los canales abiertos en rectificadores,

cuando de otro modo serían óhmicos (Matsuda et al., 1987; Matsuda, 1991). Mecanismos de compuerta, sin embargo, serían responsables del componente dependiente de tiempo de esta corriente (Hagiwara et al., 1976; Hagiwara y Yoshii, 1979; Leech y Stanfield, 1981). No obstante, es objeto actual de discusión si tales mecanismos de compuerta serían capaces de explicar la rectificación instantánea (Ishihara et al., 1989; Silver y DeCoursey, 1990; Mitra y Morad, 1991; Matsuda, 1991).

Contrariamente a lo que ocurre en músculo de vertebrados, en el músculo abductor la corriente instantánea es independiente de V_m y muestra un comportamiento óhmico que permite identificarla con la corriente de pérdida. Asimismo, la corriente que subyace a la rectificación anómala en este músculo (I_{AB}) no presenta un componente de activación instantánea característico de la corriente rectificadora del músculo de vertebrados. En efecto, la activación y desactivación de I_{AB} es dependiente de tiempo, lo cual sugiere que la rectificación es debida a las características cinéticas de los canales subyacentes y que existen mecanismos de compuerta responsables de su activación. Además, la rectificación no es debida a las propiedades de los canales abiertos, en cuanto que a cualquier grado de activación, I_{AB} verifica la ley de Ohm y, por tanto, una vez abiertos aquéllos también verifican la ley de Ohm.

Considerando que la cinética de activación y desactivación de I_{AB} son similares, y dado el comportamiento óhmico de los canales abiertos y la existencia de mecanismos de compuerta, la representación más simple capaz de explicar el comportamiento de I_{AB} sería un modelo de canal con dos estados, abierto y cerrado,

tal como ha sido propuesto para explicar la rectificación anómala mediada por Cl^- en *Aplysia* (Chesnoy-Marchais, 1983).

I_{AB} es transportada por K^+ y su dependencia de voltaje es función de la diferencia $V_m - E_K$, asemejándose a la corriente rectificadora y diferenciándose de las corrientes activadas por hiperpolarización. Ahora bien, la conductancia de aquélla es proporcional a la raíz cuadrada de $[\text{K}^+]_o$ y, sin embargo, G_{AB} es independiente de $[\text{K}^+]_o$, tal como lo es también la conductancia de la corriente activada por hiperpolarización de motoneuronas espinales de rata (Takahashi, 1990), aunque en otros sistemas sí depende de $[\text{K}^+]_o$. (Mayer y Westbrook, 1983; Spain et al., 1987).

Por tanto, I_{AB} comparte numerosas características electrofisiológicas con los dos tipos de corrientes catiónicas mediadoras de la rectificación anómala, que, por tanto, no permiten adscribirla a ninguno de ellos. No obstante, son sus características farmacológicas, en cuanto a su sensibilidad a diferentes iones extracelulares, las que la diferencian netamente de aquéllas. En efecto, I_{AB} no se modifica ni por Cs^+ extracelular, que bloquea a bajas concentraciones tanto la corriente rectificadora anómala (0.5-1mM, Hagiwara et al., 1976; 2.5 mM, Gay y Stanfield, 1977) como las corrientes activadas por hiperpolarización (20 mM, DiFrancesco y Ojeda, 1980; 0.5-3 mM, Halliwell y Adams, 1982; 1-10 mM, Mayer y Westbrook, 1983; 2 mM, Takahashi, 1990) ni por Rb^+ , que también bloquea ambos tipos de corrientes a concentraciones extracelulares inferiores a 10 mM (Hagiwara y Takahashi, 1974; Standen y Stanfield, 1980; DiFrancesco, 1982), y entre 50 mM y 10 mM, respectivamente. I_{AB} tampoco se ve alterada por Ba^{2+} extracelular, bloqueante a bajas

concentraciones de la corriente rectificadora anómala (0.01-5 mM, Standen y Stanfield, 1978; 10-100 μ M, Hagiwara et al., 1978; 0.5 mM, Constanti y Galvan, 1983). Sin embargo, I_{AB} es bloqueada por bajas concentraciones extracelulares (<5mM) de Cd^{2+} y Zn^{2+} .

En conclusión, los resultados expuestos demuestran la existencia en el músculo abductor de una nueva corriente activada por hiperpolarización, que denominamos I_{AB} , que es transportada por iones K^+ , cuya conductancia es dependiente de tiempo y de voltaje e independiente de $[K^+]_o$, cuya dependencia de voltaje es función de $V_m - E_K$ (asumiendo $[K^+]_i$ constante) y que es insensible a Cs^+ , Rb^+ y Ba^{2+} pero es bloqueada por Cd^{2+} o Zn^{2+} .

III.4. CARACTERIZACION DEL BLOQUEO DE I_{AB} POR Cd^{2+} Y Zn^{2+}

4.1. RESUMEN

Se estudia el efecto bloqueante de Cd^{2+} y Zn^{2+} sobre I_{AB} .

I_{AB} se reduce de forma reversible en presencia de Cd^{2+} extracelular, sin que varíe E_{AB} .

La presencia de Cd^{2+} extracelular provoca la disminución de $G_{AB,max}$ y el desplazamiento de la curva de activación de G_{AB} hacia valores más hiperpolarizados. Sin embargo, la pendiente de la curva de activación de G_{AB} no es modificada por Cd^{2+} .

Los efectos de Cd^{2+} son independientes de $[K^+]_o$, y los efectos de la variación de $[K^+]_o$ sobre I_{AB} no se modifican por la presencia de Cd^{2+} .

Cd^{2+} enlentece la cinética de activación de I_{AB} sin modificar su cinética de desactivación.

Los efectos de Cd^{2+} sobre I_{AB} son dependientes de su concentración extracelular. El bloqueo de $G_{AB,max}$ por diferente $[Cd^{2+}]_o$ se ajusta aceptablemente a la ecuación de Hill, comienza en torno a $10 \mu M$ y alcanza la saturación alrededor de $10 mM$. La constante de disociación aparente de Cd^{2+} por el sitio de unión para ejercer el bloqueo de I_{AB} es $0.452 \pm 0.045 mM$, siendo el coeficiente de Hill 1 ($n = 10$), lo cual sugiere que cada ión Cd^{2+} se une un único lugar de bloqueo. El desplazamiento de la curva de activación de G_{AB} por Cd^{2+} depende de $[Cd^{2+}]_o$ de forma semejante a como lo hace la reducción de $G_{AB,max}$.

La presencia de Zn^{2+} extracelular produce efectos similares sobre I_{AB} que los provocados por Cd^{2+} .

De todo ello se concluye que a) el bloqueo de I_{AB} por Cd^{2+} es

dependiente de $[Cd^{2+}]$, y es aceptablemente descrito por la ecuación de Hill, asumiendo que cada ión Cd^{2+} se une reversiblemente a un único sitio receptor con una constante de disociación aparente de 0.452 mM; b) Cd^{2+} no modifica la permeabilidad selectiva de los canales que median I_{AB} ; c) el lugar receptor de Cd^{2+} para bloquear es diferente del lugar receptor de K^+ para permear; d) el bloqueo de I_{AB} por Cd^{2+} no es dependiente de voltaje; e) los canales de I_{AB} presentan dos distintos mecanismos de compuerta responsables de su apertura y cierre, y de entidad diferenciada por su sensibilidad a Cd^{2+} .

4.II. INTRODUCCION

Gran parte del conocimiento actual acerca de la naturaleza de los canales subyacentes a las corrientes de membrana proviene de la caracterización del bloqueo que diferentes sustancias ejercen sobre ellos. La caracterización del bloqueo y del hipotético mecanismo responsable de él permite extraer conclusiones en cuanto a la estructura y el funcionamiento de los canales, habiéndose así progresado considerablemente en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la permeación iónica y en la selectividad iónica, en la estructura del filtro selectivo y del vestíbulo y en los mecanismos de compuerta de apertura y cierre de los canales (véase Hille, 1992).

Los efectos bloqueantes de diferentes iones sobre distintas corrientes de membrana muestran una gran diversidad en sus características (véase Hille, 1992). Numerosos agentes bloqueantes ejercen un bloqueo dependiente de voltaje en cuanto que el grado de bloqueo se ve alterado por V_m ; tal es el caso del bloqueo de los canales de Na^+ por H^+ extracelular (Woodhull,

1973; Campbell y Hille, 1976) y de K^+ por TEA intracelular (Armstrong, 1975; Stanfield, 1983). El bloqueo, y desbloqueo, puede ser dependiente de uso (Courtney, 1975), de manera que el grado de bloqueo es variable en función del estado del canal (activado, inactivado o desinactivado); así es el que ejercen los anestésicos locales polares (como lidocaína, procaína, QX-314 y GEA 968) sobre los canales de Na^+ (Strichartz, 1973; Courtney, 1975; Hille, 1977a,b; Schwarz et al., 1977). Inversamente, la unión del bloqueante a su sitio receptor puede implicar la modificación de los mecanismos de compuerta que regulan el estado del canal; tal como ocurre con los anestésicos locales (Courtney, 1975; Hille, 1977a,b). Algunos agentes, que en ocasiones no son verdaderos bloqueantes, provocan variaciones en la dependencia de voltaje del canal o bien en su selectividad iónica; ejemplos de aquéllos son los cationes divalentes extracelulares sobre prácticamente todos los canales dependientes de voltaje (Frankenhaeuser y Hodgkin, 1957; véase Hille, 1992), y de éstos la Aconitina y Veratridina sobre los canales de Na^+ (Mozhayeva et al., 1977). Por último, existen agentes que bloquean los canales de membrana sin mostrar dependencia de voltaje en su acción, ni afectar a los mecanismos de compuerta, ni verse afectados por ellos; tales son la Tetrodotoxina (TTX) y la Saxitoxina (véase Hille, 1992).

4.III. METODOS.

La metodología experimental seguida para la caracterización del bloqueo de I_{AB} por Cd^{2+} y Zn^{2+} ha sido semejante a aquélla empleada en la caracterización de I_{AB} (Capítulo III.3). Con objeto de evitar interacciones con las corrientes activadas por

despolarización, la solución control empleada ha sido 0 mM Ca^{2+} , TEA, de manera que éstas han sido eliminadas o considerablemente reducidas (véanse Capítulos III.5 y III.6).

4.IV. RESULTADOS.

La Figura 4.1 muestra las corrientes totales generadas por el protocolo P1 en control, en presencia de 5 mM Cd^{2+} y tras el lavado de éste. En Cd^{2+} , en tanto que la corriente estacionaria a -60 mV no se modifica, la corriente total sufre una drástica reducción (superior al 90% a -170 mV) y su relación I-V se transforma en una relación aproximadamente lineal, indicando que en tales condiciones I_{AB} queda prácticamente abolida.

Los efectos de Cd^{2+} sobre I_{AB} son dependientes de la concentración extracelular de este ión, acentuándose a medida que ésta aumenta. Los efectos de una menor $[\text{Cd}^{2+}]$ (0.5 mM) sobre I_{AB} se representan en la Figura 4.2. La relación I-V de la corriente total (Figura 4.2 B) muestra que la corriente total es bloqueada en todo el rango de voltaje explorado, pero en grado desigual según V_m sea mayor o menor que -60 mV. En efecto, si bien las corrientes totales generadas por voltajes más positivos que -60 mV son reducidas por Cd^{2+} , tal como cabe esperar por el efecto de éste sobre I_p (véase capítulo III.2), la reducción de la corriente total es más prominente para valores de $V_m < -60$ mV, debido a la adición del bloqueo de I_{AB} al bloqueo de I_p . Debe hacerse notar que, contrastando con lo acaecido en 5 mM Cd^{2+} , la relación I-V de la corriente total en presencia de 0.5 mM Cd^{2+} mantiene su carácter no lineal, sugiriendo que I_{AB} no es totalmente bloqueada en estas condiciones (puesto que el bloqueo de I_p por Cd^{2+} no es voltaje-dependiente; véase capítulo III.2)

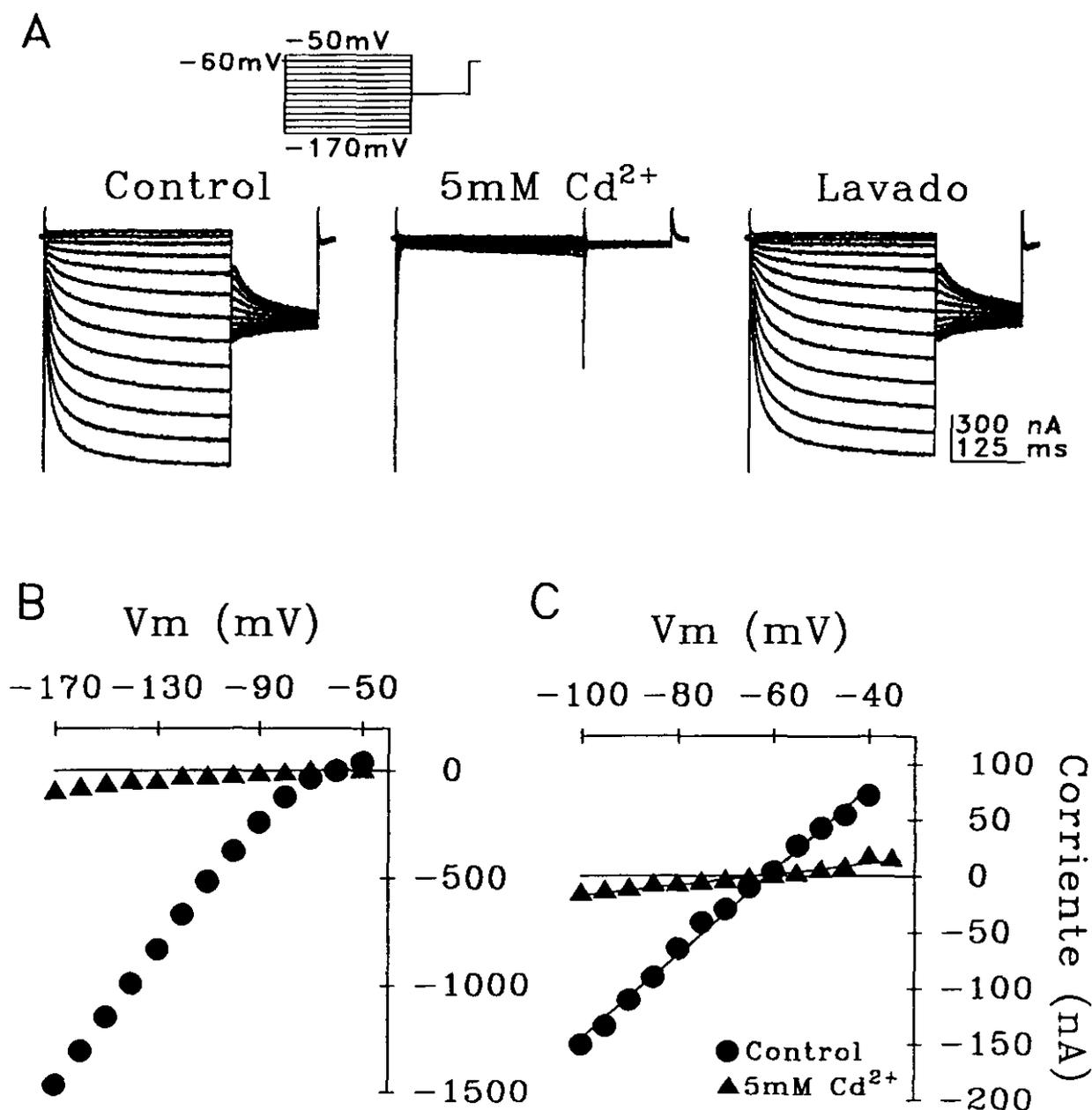


Figura 4.1. Efecto de 5 mM Cd²⁺ sobre I_{AB}. A, corrientes totales en solución normal (Control), en solución 5 mM Cd²⁺ y tras lavado de ésta con solución normal. B y C, relaciones I-V de I_(v)^{*} e I_(v)⁰, respectivamente, en solución normal (●) y en solución 5 mM Cd²⁺ (▲). Los valores en C han sido ajustados a regresiones de primer orden (líneas continuas).

y que el efecto de Cd^{2+} sobre I_{AB} es, por tanto, dependiente de concentración.

Las relaciones I-V instantáneas de I_p y de I_{AB} se muestran en la Figura 4.2 C (símbolos llenos y vacíos, respectivamente). G_p , al igual que en presencia de 5 mM Cd^{2+} , es lineal ($r > 0.99$) tanto en el control como en presencia de 0.5 mM Cd^{2+} y varía de 5.7 a 4.5 μS , respectivamente, es decir, G_p se reduce un 22.0% por 0.5 mM Cd^{2+} frente al 85.0% que lo hace en 5 mM Cd^{2+} , indicando que la reducción de I_p es dependiente de $[\text{Cd}^{2+}]$. (véase capítulo III.2). Por otra parte, la relación I-V instantánea de I_{AB} , que es lineal ($r > 0.99$) en el control y en 0.5 mM Cd^{2+} , reduce un 32% su pendiente en presencia de 0.5 mM Cd^{2+} , variando de 10.9 μS en el control a 7.4 μS . Por tanto, podemos concluir que el bloqueo de I_{AB} por Cd^{2+} es dependiente de $[\text{Cd}^{2+}]$, y que éste no es dependiente de voltaje, o lo que es lo mismo, que Cd^{2+} no bloquea los canales de I_{AB} de manera dependiente de voltaje interfiriendo con el flujo iónico a través de los canales abiertos de I_{AB} .

De la Figura 4.2 C se puede también deducir que E_p no es modificado por Cd^{2+} (como queda dicho en el capítulo III.2) y que tampoco lo es E_{AB} , como se desprende de los puntos de intersección de las regresiones de primer orden de las corrientes instantáneas (-56.4 mV en el control, y -59.8 mV en 0.5 mM Cd^{2+}), que no varían substancialmente. En efecto, tampoco se aprecian cambios significativos en E_{AB} cuando éste es estimado a partir de las corrientes de cola (no mostrado). De todo ello se deduce que, al igual que ocurre con I_p , la permeabilidad selectiva de los canales de I_{AB} no se ve modificada por la presencia de Cd^{2+} , lo

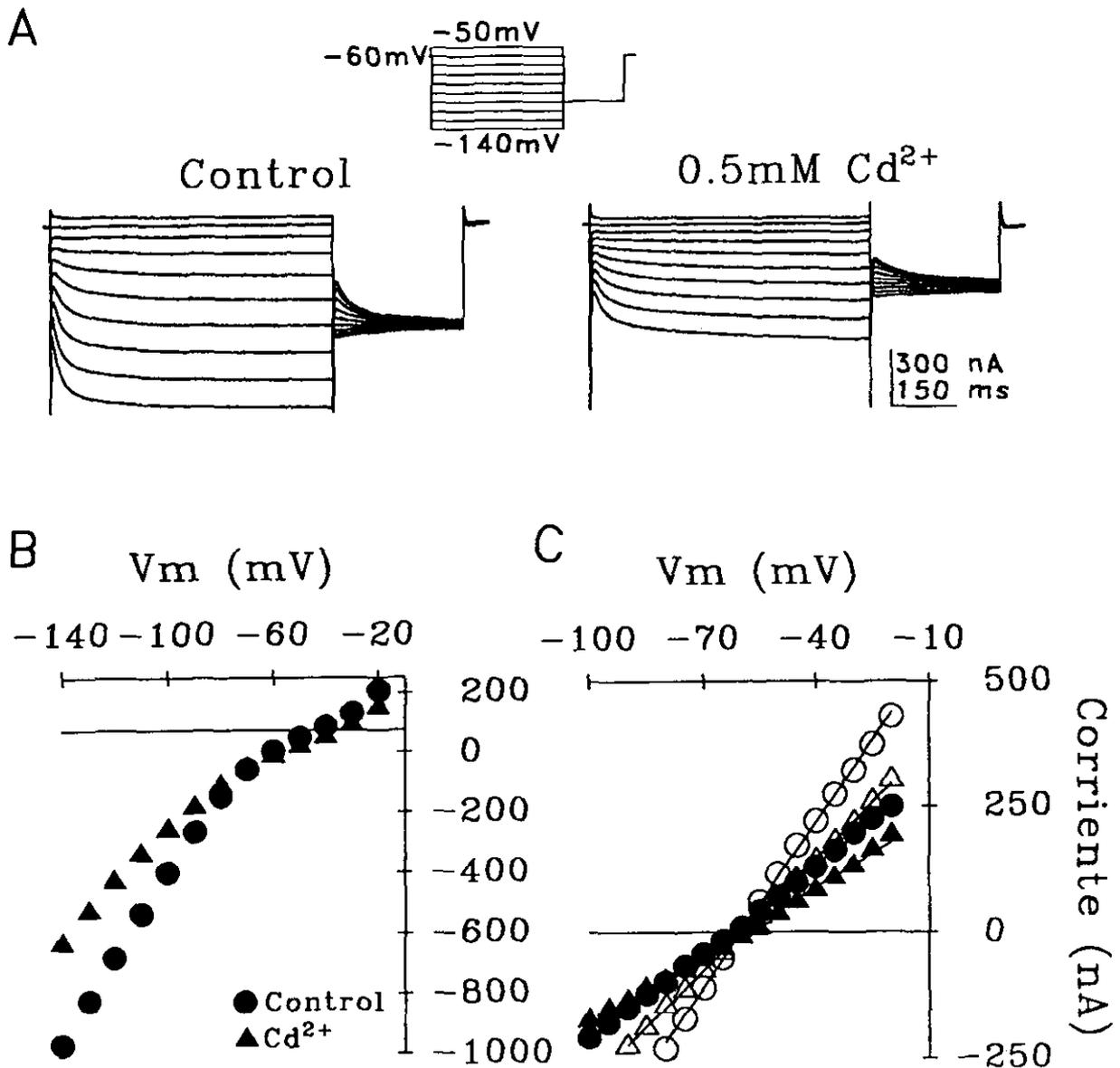


Figura 4.2. Efecto de 0.5 mM Cd²⁺ sobre I_{AB}. A, corrientes totales en solución normal (Control) y en solución 0.5 mM Cd²⁺. B, relaciones I-V de I^v, en solución normal (●) y en solución 0.5 mM Cd²⁺ (▲). C, relaciones I-V de I^v, e I^r, (símbolos llenos y vacíos, respectivamente) en solución normal y en solución 0.5 mM Cd²⁺ (círculos y triángulos, respectivamente); los valores han sido ajustados a regresiones de primer orden (líneas continuas).

cual sugiere un diferente mecanismo de acción de bloqueo de los canales de I_{AB} por Cd^{2+} .

Que efectivamente Cd^{2+} no ejerce su bloqueo uniéndose a un lugar involucrado en el mecanismo de permeación, puede ser corroborado mediante el análisis de los efectos de Cd^{2+} en presencia de diferente $[K^+]_o$, habida cuenta de que K^+ es el ión transportador de I_{AB} (véase capítulo III.3). La Figura 4.3 A y B muestra las corrientes totales en 5.4 y 10.8 mM K^+ , respectivamente, en ausencia y presencia de 0.5 mM Cd^{2+} . Cuando $[K^+]_o$ se incrementa desde 5.4 a 10.8 mM (Figura 4.3 C, símbolos llenos y vacíos, respectivamente), las relaciones I-V de la corriente total se desplazan 17 mV hacia valores positivos en el eje de abscisas, tanto en ausencia como en presencia de Cd^{2+} (círculos y triángulos, respectivamente). Asimismo, el grado de bloqueo de la corriente total por Cd^{2+} , considerando el desplazamiento de la relación I-V, es similar en ambas $[K^+]_o$. En efecto, la reducción de la corriente total por 0.5 mM Cd^{2+} en 5.4 y 10.8 mM K^+ es del 56% a -140 mV y del 55% a -120 mV, respectivamente. Así, la independencia del grado de bloqueo respecto de $[K^+]_o$ corrobora la idea de que el lugar de unión de Cd^{2+} al canal para ejercer su bloqueo es diferente a aquél o aquéllos de unión de K^+ involucrados en la permeación de éste. Por otra parte, el hecho de que Cd^{2+} no modifique E_{AB} en una u otra $[K^+]_o$ (Figura 4.4 A), confirma que la permeabilidad selectiva de los canales de I_{AB} no se ve afectada por Cd^{2+} .

El efecto de Cd^{2+} sobre G_{AB} y su dependencia de voltaje en ambas $[K^+]_o$ está reflejado en la Figura 4.4 B. $G_{AB,max}$ se reduce en presencia de 0.5 mM Cd^{2+} (triángulos), tal como es esperado por

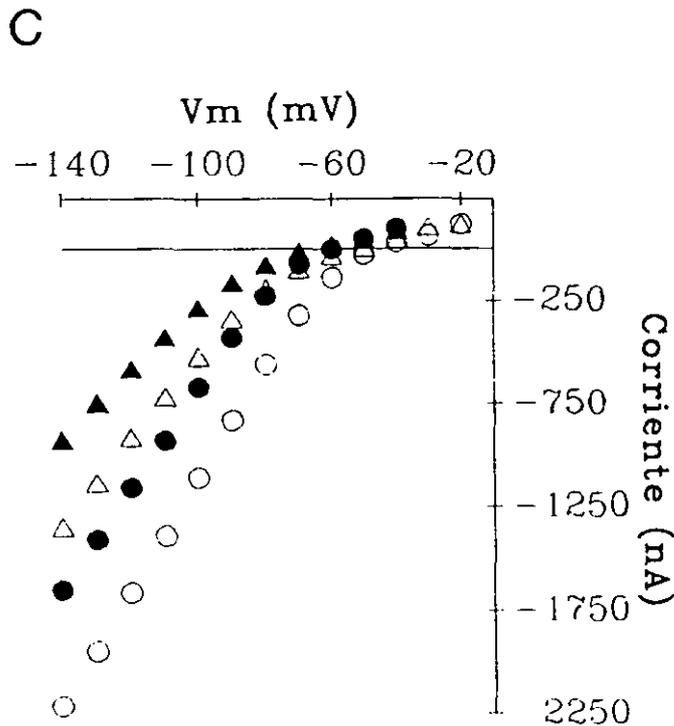
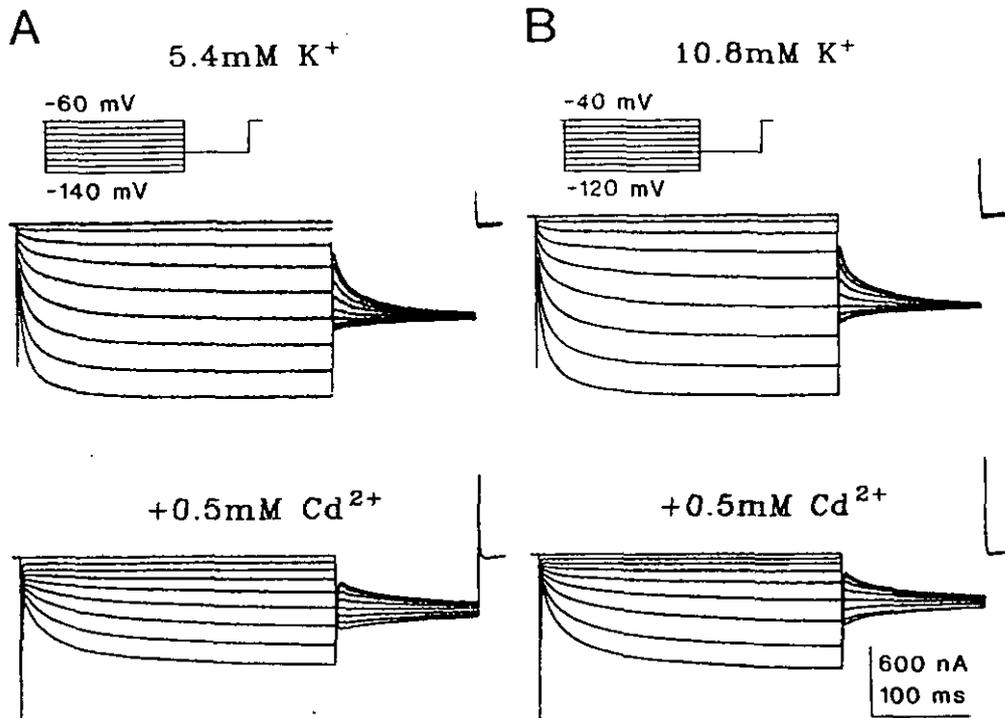


Figura 4.3. Efecto de Cd^{2+} sobre I_{AB} en diferente $[\text{K}^+]$. A y B, corrientes totales en 5.4 y 10.8 mM K^+ , respectivamente, en presencia y ausencia de 0.5 mM Cd^{2+} (trazos superiores e inferiores, respectivamente). C, relación I-V de $I_{(v)}$, en 5.4 y 10.8 mM K^+ (símbolos llenos y vacíos, respectivamente), en presencia y ausencia de 0.5 mM Cd^{2+} (círculos y triángulos, respectivamente).

el efecto bloqueante de Cd^{2+} , y lo hace de manera similar en 5.4 y 10.8 mM K^+ (símbolos llenos y vacíos, respectivamente), disminuyendo respecto al control (círculos) un 58.5% y un 59.7%, respectivamente, lo cual sugiere de nuevo que, puesto que no existe competencia entre Cd^{2+} para bloquear y K^+ para permear, éstos ejercen su acción en lugares diferentes. En presencia de Cd^{2+} , la curva de activación de G_{AB} se desplaza hacia valores más negativos en el eje de abscisas, y de manera similar en 5.4 y 10.8 mM K^+ , considerando el desplazamiento que $[\text{K}^+]_o$ produce en la curva de activación de G_{AB} (véase apdo. IV Dd del capítulo III.3). En efecto, la diferencia entre V_o en presencia y ausencia de 0.5 mM Cd^{2+} es -26.2 y -21.8 mV, en 5.4 y 10.8 mM K^+ , respectivamente. Tal desplazamiento de la curva de activación se produce sin que se vea acompañado en ningún caso de variación significativa en su pendiente S . Así pues, el efecto de Cd^{2+} sobre la curva de activación de G_{AB} tampoco es modificado por $[\text{K}^+]_o$, lo cual indica de nuevo que Cd^{2+} no compite con K^+ para llevar a cabo su efecto.

La cinética de I_{AB} también se ve afectada por Cd^{2+} , tal como se refleja en la Figura 4.4 C, donde se muestran las relaciones τ - V de I_{AB} en 5.4 y 10.8 mM K^+ (símbolos llenos y vacíos, respectivamente) en ausencia y presencia de 0.5 mM Cd^{2+} (círculos y triángulos, respectivamente). La dependencia de voltaje de τ_{AB} de las distintas soluciones se desplaza sobre el eje de abscisas, tal como cabe esperar de las respectivas variaciones de la curva de activación de G_{AB} (véase más arriba y capítulo III.3). A potenciales más positivos que V_o , τ_{AB} no se ve alterada por Cd^{2+} (nótese que la disminución aparente de τ_{AB} es consecuencia del

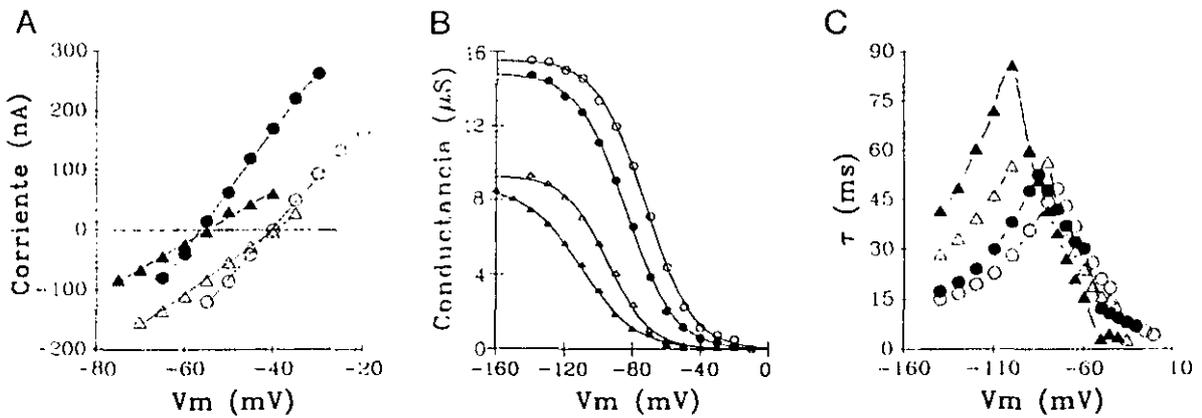


Figura 4.4. Efecto de Cd^{2+} sobre E_{AB} , G_{AB} y τ_{AB} en diferente $[\text{K}^+]_o$. Símbolos llenos y vacíos corresponden a 5.4 y 10.8 mM K^+ , respectivamente; círculos y triángulos corresponden a la presencia y ausencia de 0.5 mM Cd^{2+} , respectivamente. A, amplitud de I_{cola} de I_{AB} ajustadas a regresiones de primer orden (líneas continuas). B, dependencia de voltaje de G_{AB} ; los valores obtenidos a partir de la ec. (3.7) han sido ajustados a la ec. (3.6) (líneas continuas). En ausencia de Cd^{2+} , en 5.4 mM K^+ : $G_{AB,\text{max}} = 14.83 \pm 0.12$, $V_o = -84.14 \pm 0.42$ y $S = 13.92 \pm 0.33$; en 10.8 mM K^+ : $G_{AB,\text{max}} = 15.54 \pm 0.10$, $V_o = -72.92 \pm 0.40$ y $S = 13.72 \pm 0.33$. En presencia de 0.5 mM Cd^{2+} , en 5.4 mM K^+ : $G_{AB,\text{max}} = 8.68 \pm 0.12$, $V_o = -110.35 \pm 0.76$ y $S = 16.03 \pm 0.54$; en 10.8 mM K^+ : $G_{AB,\text{max}} = 9.28 \pm 0.19$, $V_o = -94.76 \pm 0.92$ y $S = 12.39 \pm 0.70$. C, relación τ -V de τ_{AB} .

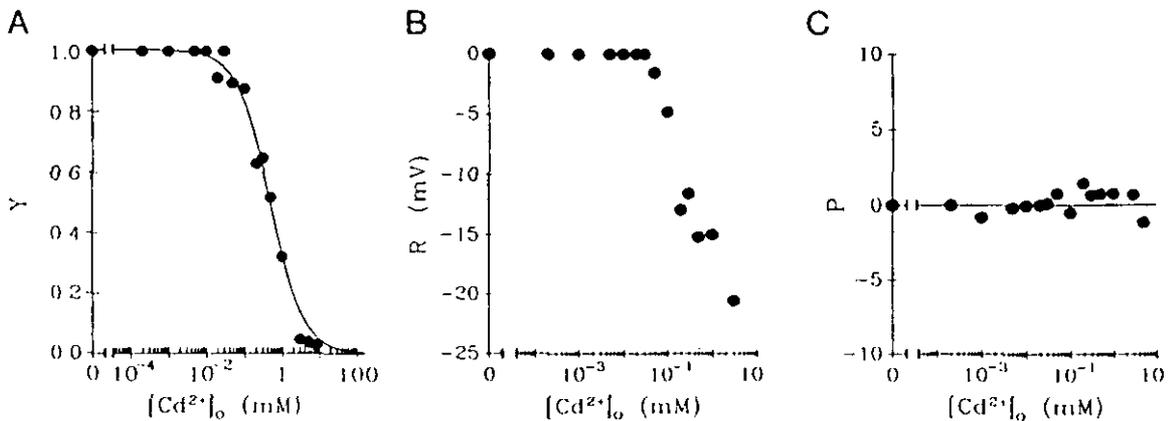


Figura 4.5. Relación concentración-efecto de $[\text{Cd}^{2+}]_o$ sobre la dependencia de voltaje de G_{AB} . Valores medios ($n = 10$) en función de $[\text{Cd}^{2+}]_o$ de: A, la relación (γ) entre $G_{AB,\text{max}}$ en Cd^{2+} respecto al control ajustada a la ec. (4.1) (línea continua); B, la diferencia (R) entre V_o en Cd^{2+} y en el control; C, la diferencia entre el parámetro de pendiente S en Cd^{2+} y en el control.

desplazamiento de la curva de activación). Por el contrario, a potenciales más negativos que V_0 , τ_{AB} está claramente aumentada por la presencia de Cd^{2+} ; por ejemplo, a potenciales 30 mV más hiperpolarizados que los respectivos V_0 en 5.4 y 10.8 mM K^+ , τ_{AB} es 1.5 y 1.4 veces mayor, respectivamente, en presencia de Cd^{2+} que en el control.

Por tanto, puesto que el bloqueo por Cd^{2+} no es afectado en ninguna de sus manifestaciones por $[K^+]_o$, podemos concluir que el Cd^{2+} no compite en ningún caso con K^+ por su lugar de unión para el bloqueo de los canales de I_{AB} y, por ende, que el lugar de unión de Cd^{2+} para ejercer tal bloqueo es diferente a aquél del K^+ para transportar I_{AB} .

El mayor grado de bloqueo de I_{AB} presente en 5 mM que 0.5 mM Cd^{2+} (Figuras 4.1 y 4.2), permite suponer que el efecto de Cd^{2+} es dependiente de su concentración extracelular. Los resultados obtenidos a partir de 10 fibras sobre el efecto de diferentes $[Cd^{2+}]_o$ sobre G_{AB} y su dependencia de voltaje se representan en la Figura 4.5 como relaciones concentración-efecto. La Figura 4.5 A muestra la relación concentración-efecto sobre $G_{AB,max}$, donde los símbolos representan los valores medios de la relación (Y) de $G_{AB,max}$ en presencia de Cd^{2+} respecto a $G_{AB,max}$ en el control, es decir, la función opuesta al grado de bloqueo. El grado de bloqueo es función de $[Cd^{2+}]_o$, aumentando a medida que aumenta ésta. Así, los valores medios de Y se pueden ajustar a la ecuación:

$$Y = Y_{max} [1 + (Cd/IC_{50})]^{-1} \quad (4.1)$$

deducida de la ecuación de Hill, donde Y_{max} es el valor máximo de Y, Cd es $[Cd^{2+}]_o$, IC_{50} es la constante de disociación aparente (es

decir, la $[Cd^{2+}]_0$, en la cual $Y = \frac{1}{2} Y_{max}$), y en la cual el coeficiente de Hill (representado por el valor absoluto del exponente) es 1. Los parámetros de mejor ajuste obtenidos son $Y_{max} = 1.01 \pm 0.02$ e $IC_{50} = 0.452 \pm 0.045$ mM. Del análisis estadístico de tal ajuste ($r > 0.99$) se deduce a) que el efecto de Cd^{2+} sobre G_{AB} es dependiente de su concentración extracelular de manera que aparece a partir de $10 \mu M$, aumenta según ésta se incrementa, toma un valor medio alrededor de 0.45 mM, y alcanza la saturación por bloqueo total de G_{AB} alrededor de 10 mM; b) que tal efecto se ajusta muy aceptablemente a la ecuación de Hill en la cual el coeficiente de Hill es 1, lo cual sugiere que la proporción de iones unidos a lugares específicos de bloqueo es 1:1, es decir, cada ión bloqueante se halla unido a un único lugar de bloqueo.

Por otra parte, la Figura 4.5 B ilustra la relación concentración-efecto de $[Cd^{2+}]_0$ sobre el desplazamiento de la curva de activación de G_{AB} , cuantificada a partir del efecto de $[Cd^{2+}]_0$ sobre V_0 . Así, se representan las diferencias medias (R) entre V_0 en presencia de diferentes $[Cd^{2+}]_0$ y V_0 en la solución control, frente a $[Cd^{2+}]_0$. $[Cd^{2+}]_0$ superiores a 5 mM producen un bloqueo de G_{AB} tan acusado que impide un ajuste fiable de su curva de activación a la ecuación de Boltzman (véase apdo. IVB del capítulo III.3) y, así, una determinación válida de V_0 , y, por tanto, la obtención de una esperable saturación de R para altas $[Cd^{2+}]_0$. Además, cuando $G_{AB,max} = 0$, V_0 es matemáticamente indeterminado. No obstante, los valores se ajustan razonablemente ($r > 0.95$; no mostrado) a la ecuación

$$R = R_{min} [1 - (1 + (Cd/IC_{50})^{-1})^{-1}], \quad (4.2)$$

también deducida de la ecuación de Hill, asumiendo que el

coeficiente de Hill es 1 y donde R_{\min} es el mínimo valor de R. Los parámetros de mejor ajuste son $R_{\min} = -21.8 \pm 1.8$ mV e $IC_{50} = 0.270 \pm 0.066$ mM. En todo caso, la relación concentración-efecto de $[Cd^{2+}]_0$ sobre V_0 se asemeja enormemente a aquella sobre $G_{AB, \max}$, sugiriendo que los efectos de Cd^{2+} sobre $G_{AB, \max}$ y V_0 pueden tener un origen común. En efecto, el efecto de $[Cd^{2+}]_0$ sobre V_0 también se hace aparente a partir de $10 \mu M$ Cd^{2+} , crece según se incrementa $[Cd^{2+}]_0$ con idéntica pendiente (asumiendo que el coeficiente de Hill es 1) y alcanza un valor de efecto medio alrededor de 0.270 mM (que no difiere significativamente de aquél sobre $G_{AB, \max}$). Una vez más, la bondad de ajuste de los valores experimentales a la ec. (4.2) cuyo coeficiente de Hill es 1 argumenta en favor de la conjeturada unión 1:1 de iones bloqueantes y lugares receptores para el bloqueo. Asimismo, la relación entre R e Y es lineal ($r > 0.95$), siendo su pendiente 23.8 mV (que se traduce en un cambio de -12.4 mV por cada 50% de bloqueo de $G_{AB, \max}$) (no mostrado), lo cual también sugiere que los fenómenos de bloqueo de G_{AB} y de desplazamiento de V_0 son consecuencia de un efecto común.

Por último, la relación concentración-efecto de $[Cd^{2+}]_0$ sobre S se muestra en la Figura 4.5 C, donde se representan las diferencias medias (P) entre el valor del parámetro S en diferentes $[Cd^{2+}]_0$ y aquél en control. No existen diferencias significativas entre el valor medio de S en solución control y éste en diferentes $[Cd^{2+}]_0$. En efecto, el coeficiente de correlación entre S y $[Cd^{2+}]_0$ no es significativamente diferente de cero.

Idénticos efectos a los descritos por Cd^{2+} son ejercidos por

Zn^{2+} , en un rango de concentración igual al de aquél (no mostrado, pero véase Figura 3.9).

4.V. DISCUSION

Los resultados presentados hasta aquí sobre el bloqueo de G_{AB} por Cd^{2+} extracelular permiten concluir que: a) el referido bloqueo es dependiente de $[Cd^{2+}]$, y puede ser aceptablemente descrito por la ecuación de Hill, asumiendo que cada ión Cd^{2+} se une reversiblemente a un único sitio receptor con una constante de disociación aparente media de 0.452 mM; b) no existe competencia entre Cd^{2+} para unirse al sitio receptor para bloquear I_{AB} y K^+ para unirse al sitio receptor para permear a través de la membrana y transportar así I_{AB} , es decir, Cd^{2+} , no compitiendo con K^+ , no se une al sitio de permeabilidad de éste; c) Cd^{2+} no modifica la permeabilidad selectiva para K^+ de los canales de I_{AB} , pues no modifica E_{AB} ; d) el bloqueo de G_{AB} por Cd^{2+} no es dependiente de voltaje; e) Cd^{2+} desplaza la curva de activación de G_{AB} hacia valores más hiperpolarizados; f) Cd^{2+} modifica la constante de tiempo de activación de I_{AB} pero no la constante de tiempo de desactivación.

Si las características electrofisiológicas y farmacológicas de I_{AB} la diferencian de las corrientes mediadoras del resto de rectificaciones anómalas (véase capítulo III.3), las características del bloqueo de G_{AB} por Cd^{2+} también son diferentes a aquéllas del bloqueo de dichas corrientes por diferentes iones.

En efecto, Cs^+ bloquea todas las corrientes de rectificación anómala distintas de I_{AB} de manera independiente de tiempo y dependiente de voltaje. Como explicación de la dependencia de voltaje en el bloqueo de distintas corrientes por diferentes

iones, se ha propuesto un mecanismo general de acción según el cual los iones bloqueantes son atraídos hacia el canal por el campo eléctrico de la membrana y allí interactúan con sitios de unión del propio canal (Woodhull, 1973; Gay y Stanfield, 1977; Standen y Stanfield, 1978). Variaciones en el campo eléctrico de la membrana conducirían bien al aumento del bloqueo por aumento de la fuerza de atracción, bien a su disminución por la disminución de ésta, o bien al desbloqueo por la aparición de una fuerza de repulsión. Similar mecanismo parece ser responsable del componente instantáneo de la corriente rectificadora anómala (véase capítulo III.3). Por otra parte, las características del bloqueo dependiente de tiempo y de voltaje de la corriente rectificadora anómala por Ba^{2+} extracelular (Standen y Stanfield, 1978), entre las que cabe destacar la competencia existente entre Ba^{2+} y K^+ por el sitio de unión, parecen indicar que en ella el mecanismo de permeación está garantizado por un canal que posee un sitio de unión capaz de unir 2 iones K^+ (que permearían a través del canal) o un ión Ba^{2+} (que, incapaz de permear por el canal, lo bloquearía). Aunque el bloqueo por Cd^{2+} de I_{AB} presenta ciertas similitudes con el de la corriente rectificadora anómala por Ba^{2+} , v. gr., el rango de concentración de Cd^{2+} en el cual ejerce su bloqueo y la idea de que un único ión se une a un único sitio receptor, ciertas características de aquél difieren notablemente de las características de éste, a saber, el bloqueo de I_{AB} por Cd^{2+} no es dependiente de uso, no es dependiente de voltaje y no muestra que exista competencia entre Cd^{2+} y K^+ .

De todo ello se deduce que la acción de Cd^{2+} ocurre por unión de este ión a un sitio receptor que no está involucrado en

el mecanismo de permeación de K^+ .

Un segundo mecanismo responsable de la modificación de las corrientes dependientes de voltaje por distintos iones es aquél que produce la variación de la dependencia de voltaje de estas corrientes sin que se vea acompañada de otras variaciones en los parámetros que las definen. Frankenhaeuser y Hodgkin (1957) encontraron que variaciones de $[Ca^{2+}]_o$ resultaban en la modificación de la dependencia de voltaje de las corrientes de Na^+ y de K^+ presentes en el axón gigante de calamar. Estos autores propusieron que la interacción de iones Ca^{2+} extracelulares con las cargas negativas presentes en la superficie externa de la membrana del axón altera el campo eléctrico existente a través de la membrana, o traducido de sus propias palabras: "los iones calcio pueden ser adsorbidos por el límite externo de la membrana y así crear un campo eléctrico dentro de la membrana que se suma a aquél dado por el potencial de reposo". Tal interacción, que se hace extensiva a otros cationes divalentes (y, en menor grado, a los cationes monovalentes), no implica necesariamente la existencia de sitios de unión para los cationes divalentes, bastando la creación de una atmósfera aniónica en la superficie exterior de la membrana para que la presencia de cationes en el medio extracelular provoque variaciones del potencial superficial de la membrana y, con ello, del potencial interno de la membrana. Similares resultados a aquéllos obtenidos por Frankenhaeuser y Hodgkin (1957) han sido descritos para el resto de corrientes dependientes de voltaje, excepto para la corriente rectificadora anómala y para las corrientes activadas por hiperpolarización,

demostrándose que el incremento de la concentración extracelular de cationes divalentes produce un desplazamiento de la curva de activación de las corrientes hacia potenciales más despolarizados (véase Hille, 1992).

Obviamente, el efecto bloqueante de Cd^{2+} sobre I_{AB} no se corresponde con tales mecanismos de acción de los cationes divalentes, pues el desplazamiento de la curva de activación de G_{AB} provocado por Cd^{2+} es hacia potenciales más hiperpolarizados, la concentración extracelular de iones divalentes en ningún caso se ha variado (véase 6.III y 6.VA), y la presencia de Ba^{2+} o Mn^{2+} extracelular (substituyendo equimolarmente a Ca^{2+} o Mg^{2+}) no se traduce en un bloqueo de G_{AB} .

Los mecanismos de compuerta (en inglés "gating") son, de acuerdo al modelo de Hodgkin y Huxley sobre la generación y conducción del potencial de acción (Hodgkin y Huxley, 1952d), los mecanismos responsables de la transición entre sus diferentes estados de los canales voltaje-dependientes. Las propiedades de estos mecanismos de compuerta son usualmente definidas a partir de la probabilidad de los posibles estados del canal (apertura, inactivación, cierre, etc.) en función del voltaje y en función del tiempo (véase por ejemplo Edman et al., 1987; Edman y Grampp, 1989). Así, las propiedades de compuerta de I_{AB} pueden ser definidas a partir de las relaciones $N_{\infty}-V_m$ y $G_{\text{AB}}-V_m$.

Los resultados presentados muestran que la curva de activación de G_{AB} es modificada por Cd^{2+} , lo cual indica que su efecto bloqueante es debido a su acción sobre los mecanismos de compuerta de los canales que median esta corriente. Además, la modificación llevada a cabo por Cd^{2+} sobre la constante de tiempo

de activación y no sobre la de desactivación sugiere la existencia de dos mecanismos de compuerta, de entidad diferenciada por su sensibilidad a Cd^{2+} , responsables de la apertura y cierre de los canales, y de los cuales tan sólo sería afectado por Cd^{2+} el mecanismo de compuerta de la apertura y no el del cierre de estos canales. Estos resultados son coherentes con la idea sugerida en el capítulo *III.3*, según la cual los canales que median I_{ab} presentarían dos únicos estados, abierto y cerrado, con sus correspondientes mecanismos de compuerta diferenciados.

III.5. CARACTERIZACION DE LA CORRIENTE DE ENTRADA ACTIVADA POR DESPOLARIZACION (I_{Ca})

5.1. RESUMEN

Se estudia la corriente inicial de entrada, transitoria y de rápida activación por despolarización (I_{Ca}) presente en el músculo abductor.

I_{Ca} no se modifica en ausencia de Na^+ extracelular o en presencia de TTX y es suprimida en ausencia de Ca^{2+} extracelular o en presencia de distintos cationes divalentes, indicando que I_{Ca} es transportada por iones Ca^{2+} .

En presencia de TEA, I_{Ca} presenta una incompleta inactivación por tiempo, indicando que I_{Ca} no es transitoria sino que su verdadero carácter persistente se ve truncado y enmascarado por las corrientes de salida.

La relación I-V de I_{Ca} presenta una región de pendiente negativa, desde un umbral en torno a -40 mV hasta un máximo alrededor de 0 mV, y una región de pendiente positiva llegando a cruzar el eje de abscisas para valores superiores a 30 mV. La existencia de dos únicas pendientes en la relación I-V de I_{Ca} , la identidad en la forma de esta relación para el máximo y para el estado estacionario de I_{Ca} y el hecho de que la inactivación por tiempo ocurra según una única exponencial indican la existencia de un único tipo de canal de Ca^{2+} voltaje-dependiente (CCVD).

La substitución de Ca^{2+} por Ba^{2+} produce un notable aumento de la amplitud de I_{Ca} (ahora I_{Ba}), sin que sea modificada la forma de su relación I-V, indicando que los CCVD que median I_{Ca} presentan mayor permeabilidad a Ba^{2+} que a Ca^{2+} .

La conductancia subyacente a I_{Ca} (G_{Ca}) aumenta con la despolarización de forma sigmoidea y de acuerdo a la ecuación de Boltzman con una pendiente S de 6.77 ± 1.43 , comenzando su activación a partir de -40 mV, alcanzando un valor medio a -17.14 ± 3.13 mV y siendo máxima para $V_m > 10$ mV ($n = 17$).

La inactivación por voltaje de G_{Ca} aumenta con la despolarización según la ecuación de Boltzman con una pendiente de 3.31 ± 1.01 , comenzando en torno a -40 mV, presentando un valor medio a -33.65 ± 4.13 y siendo máxima a partir de -15 mV ($n = 7$).

I_{Ca} alcanza su máxima activación entre 4 y 2 ms desde el inicio del pulso; I_{Ba} tarda entre 7 y 2 ms en alcanzar su máximo. El tiempo necesario para alcanzar la máxima activación es función exponencial decreciente de V_m .

La inactivación por tiempo de I_{Ca} sigue un curso temporal exponencial, con constantes de tiempo variables entre 5 y 15 ms. Esta inactivación no es total y presenta una ligera dependencia de voltaje. La inactivación por tiempo de I_{Ba} es, al menos, dos veces más lenta que la de I_{Ca} y su dependencia de voltaje más acusada, indicando que la inactivación por tiempo de I_{Ca} es dependiente de Ca^{2+} y de voltaje, y que la dependencia de Ca^{2+} es el factor limitante.

I_{Ca} es sensible a dihidropiridinas y no a FTX, sugiriendo que el CCVD que media I_{Ca} es de tipo L.

5.II. INTRODUCCION

El flujo de iones Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (CCVD) hacia el interior celular es de extremada relevancia en la fisiología celular. Los fenómenos

desencadenados por este influjo de Ca^{2+} son de doble naturaleza. Por una parte, el paso de Ca^{2+} , como ión transportador de carga, a través de la membrana produce su despolarización, participando así en la generación de actividad eléctrica. Por otra parte, el flujo de Ca^{2+} produce un aumento transitorio de su concentración intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), que sirve como señal química intracelular para el control, directo o indirecto, de numerosos procesos celulares, tales como activación de determinados canales iónicos de membrana (véase por ejemplo el capítulo III.7), activación enzimática, metabolismo, expresión génica, liberación de transmisor, etc. (véanse las revisiones Miller 1987; Tsien et al., 1988).

Los CCVD se clasificaron inicialmente en tres tipos diferentes, a saber, CCVD tipo L, tipo N y tipo T (Nowycky et al., 1985; véanse también las revisiones Tsien et al., 1988; Carbone y Swandulla, 1989) a los que posteriormente se ha añadido un nuevo tipo descrito en las neuronas de Purkinje del cerebelo conocido como canal P (Llinás y Sugimori, 1989). Aun cuando todos ellos presentan una cinética de activación rápida pero más lenta que el canal clásico rápido de Na^+ , se distinguen entre ellos por su cinética de inactivación, dependencia de voltaje y farmacología. Además, su distribución en la membrana celular está bien definida, existiendo evidencias que indican una segregación de funciones llevadas a cabo por cada uno de los diferentes tipos. Existe, sin embargo, controversia respecto a la similitud de los CCVD tipo L, N y T en distintos tipos celulares.

El CCVD tipo L está presente en neuronas y fibras musculares de vertebrados e invertebrados y en células cardíacas de

vertebrados, su activación ocurre a potenciales muy despolarizados (en torno a -40 mV), siendo llamado, por tanto, de alto umbral, y su inactivación por tiempo es lenta, de ahí su denominación (del inglés "long lasting") (véase Carbone y Swandulla, 1989). Farmacológicamente, es sensible a dihidropiridinas (DHP) como, por ejemplo, BAY K 8644 (abreviadamente BAY K) y nifedipina, que actúan como agonista y antagonista, respectivamente (Nowycky et al., 1985; Reuter et al., 1985; Tsien et al., 1988; Carbone y Swandulla, 1989). No obstante, existen canales con propiedades electrofisiológicas semejantes que sin embargo son insensibles a ellas (Mogul y Fox, 1991); además neuronas hipotalámicas de rata (Akaike et al., 1989) y neuronas del ganglio de la raíz dorsal de embriones de ratón (Richard et al., 1991) poseen canales sensibles a DHP pero cuyas características electrofisiológicas los hacen asimilables al tipo T. Entre otros tipos de respuesta, los canales L generan potenciales de acción lentos de alto umbral que a su vez provocan la aparición de ráfagas de potenciales de acción rápidos de Na⁺ (Schwartzkroin y Slawsky, 1977; Janhsen y Llinás, 1984). Además, parecen estar involucrados en la liberación de neurotransmisores y neurohormonas, tales como Substancia P por neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (Perney et al., 1986; Cazalis et al., 1987) y catecolaminas por células cromafines (Ceña et al., 1983). Asimismo, juegan un papel crucial en los mecanismos de acoplamiento de la excitación-contracción (E-C) de las fibras musculares esqueléticas, tanto de vertebrados como de invertebrados (Ríos y Brum, 1987; Miller 1987; Tanabe et al., 1988; Tanabe et al., 1990a,b; Ashley et al., 1991; Györke y

Palade, 1992).

El CCVD tipo N es también de alto umbral. Se diferencia sin embargo del CCVD tipo L por su insensibilidad a DHP (Nowycky et al., 1985), aunque ambos son, sin embargo, bloqueables por el péptido ω -conotoxina (ω -CgTX) (McCleskey et al., 1987; Carbone y Swandulla, 1989). El CCVD tipo N parece intervenir en los procesos de liberación de neurotransmisor desde la terminal presináptica de neuronas simpáticas (Hirning et al., 1988).

El CCVD tipo T presenta una cinética de inactivación por tiempo relativamente rápida (de donde proviene su denominación, del inglés "transient") y su activación ocurre para valores poco despolarizados (en torno a -80 mV) y, por tanto, se dice de bajo umbral (Nowycky et al., 1985). Farmacológicamente, es fácilmente diferenciable del resto, puesto que es insensible a DHP y a ω -CgTX. El canal T es responsable de la generación de potenciales de acción lentos de bajo umbral descritos originalmente por Llinás y Yarom (1981) en neuronas de la oliva inferior.

El CCVD tipo P presenta un umbral de activación intermedio, es insensible a DHP y ω -CgTX y es específicamente bloqueado por una fracción de bajo peso molecular del veneno de la araña *Agelenopsis aperta* (FTX) (Llinás et al., 1989). Está involucrado en la liberación de neurotransmisor en la sinapsis gigante del calamar (Llinás et al., 1989), en la sinapsis neuromuscular de mamíferos (Uchitel et al., 1992) y en la sinapsis neuromuscular, tanto excitadora como inhibidora, de invertebrados (Araque et al., 1993).

Como ha quedado puesto de manifiesto en el capítulo III.1, la corriente de entrada presente en la membrana de las fibras

musculares del músculo abductor presenta una gran similitud con las corrientes de Ca^{2+} descritas en otros músculos de invertebrados (Mounier y Vassort, 1975; Hencsek y Zachar, 1977). Los resultados que ahora se presentan muestran que, efectivamente, la corriente de entrada de las fibras del músculo abductor (que denominamos I_{Ca}) está transportada por iones Ca^{2+} . El presente capítulo pretende además la caracterización electrofisiológica y farmacológica de los CCVD que median I_{Ca} , y su implicación funcional como desencadenantes de los procesos conducentes a la contracción muscular.

5.III. METODOS.

Similar metodología e idénticos materiales a los descritos en II. MATERIALES Y METODOS y en capítulos precedentes han sido empleados para el estudio de I_{Ca} . Se hará aquí, por tanto, sólo referencia a las particularidades específicas seguidas en este estudio.

En solución normal, la despolarización de la fibra muscular durante relativamente largo tiempo conduce generalmente a su contracción, con el consiguiente daño de la fibra (manifestada por un aumento de la conductancia de pérdida) y/o la expulsión de los electrodos. Sin embargo, la aplicación de pulsos despolarizantes de corta duración (inferior a 25 ms) no llega a desencadenar, en la mayoría de los casos, contracción manifiesta, permitiendo el registro estable de las corrientes activadas por despolarización. Por tanto, la aplicación en solución normal de pulsos de duración superior a 25 ms ha sido usualmente evitada, no representando ello un serio problema experimental dada la cinética extremadamente rápida de la activación e inactivación

de las corrientes activadas por despolarización.

No obstante, en condiciones de fijación de corriente se han usado pulsos de corriente despolarizante de mayor duración que, si bien ocasionalmente conducen a la contracción de la fibra muscular, ésta no es generalmente manifiesta debido a la rápida repolarización siguiente al máximo de despolarización (véase capítulo III.1). Véanse además las consideraciones expuestas al respecto en el apdo. III del capítulo III.1.

Las corrientes de salida activadas por despolarización son relativamente poco sensibles a TEA extracelular (Hencek et al., 1978), necesitándose altas concentraciones (superiores a 50 mM) para obtener una eficaz supresión de estas corrientes. Tan altas concentraciones de TEA provocan la despolarización de las fibras musculares conduciendo a su contracción espontánea, con el consiguiente movimiento de la preparación e imposibilidad de obtención de registros estables. Sin embargo, tales inconvenientes pueden ser soslayados mediante la inyección intracelular de TEA. En efecto, en estas condiciones en que sólo la fibra registrada se ve afectada por TEA, la fijación de V_m en valores subumbrales (siempre inferiores a -60 mV) evita la contracción inducida por TEA de esta fibra.

El mecanismo de acoplamiento de la E-C de los músculos de invertebrados necesita de la presencia de Ca^{2+} extracelular (Zacharova y Zachar, 1967; Hidalgo et al., 1979). Así, la sustitución total y equimolar de Ca^{2+} extracelular por Ba^{2+} permite tanto la aplicación de pulsos de larga duración como la presencia de TEA extracelular, sin riesgo de una posible contracción muscular.

Debido al carácter relativamente hidrófobo de las DHP, el etanol ha sido el solvente utilizado para conseguir una concentración 1 mM, a partir de la cual se han obtenido las distintas concentraciones de ellas, por adición de distintos volúmenes de esta solución a la solución control. El etanol, a las concentraciones utilizadas ($\leq 1\%$), no tiene efecto por sí mismo sobre las corrientes voltaje-dependientes. Los experimentos realizados con DHP han sido llevados a cabo en condiciones de escasa iluminación debido a la inactivación fotosensible de estas sustancias, por transformación del enantiómero activo en el inactivo.

La dependencia de voltaje de la activación de I_{ca} ha sido caracterizada a partir de la conductancia de I_{ca} (G_{ca}) según la ecuación deducida de la ley de Ohm:

$$G_{ca} = I_{ca}/(V_m - E_{ca}), \quad (5.1)$$

Así, para la cuantificación de G_{ca} ha sido necesario el conocimiento de E_{ca} , que tan sólo puede ser estimado a partir del punto de intersección de I_{ca} con el eje de abscisas en la relación I-V, con el consiguiente error experimental introducido. Además, E_{ca} puede ser infravalorado por la presencia de corrientes de salida. Sin embargo, debido a la dependencia de tiempo de I_{ca} , y, por tanto a la variación del intervalo de tiempo (al que llamaremos tiempo al pico) existente entre el inicio del pulso despolarizante y el pico de la corriente de entrada, la aplicación del método experimental descrito en el capítulo III.3 para el conocimiento de G_{ca} en el máximo, se hace excesivamente complejo, de forma que este es el único método, por sencillo, técnicamente aplicable en nuestras condiciones. En

efecto, el cálculo teórico de E_{Ca} basado en el conocimiento de las concentraciones intra y extracelulares de Ca^{2+} , amén de ser discutible la identidad entre el potencial de equilibrio de Ca^{2+} y el potencial de inversión de I_{Ca} (véase Hagiwara y Byerly, 1981; Hille, 1992), es experimentalmente complejo. En cualquier caso, el error introducido en la estimación de E_{Ca} no parece ser de la suficiente magnitud como para alterar substancialmente el comportamiento de G_{Ca} en función de V_m .

No obstante, en solución TEA, Ba^{2+} , puede utilizarse un método alternativo (similar al descrito en el apdo. IVB del capítulo III.3), que permite definir la dependencia de voltaje a partir de las corrientes de cola. En efecto, en estas condiciones, la corriente de entrada presenta un estado estacionario directamente proporcional al pico de ésta (véase apdo. IV), y, por tanto, de acuerdo a la ley de Ohm, la conductancia en el estado estacionario es directamente proporcional a la conductancia máxima en el pico, puesto que V_m es constante durante el pulso. Así, se verifica la ecuación

$$G_{Ca}/G_{Ca,max} = (I - I_{min}) / (I_{max} - I_{min}), \quad (5.2)$$

donde $G_{Ca}/G_{Ca,max}$ es la conductancia relativa al máximo (sea en el pico, sea en el estado estacionario) e I la amplitud de la corriente de cola que varía entre un mínimo (I_{min}) y un máximo (I_{max}) según G_{Ca} varíe entre un mínimo (activación nula) o un máximo (máxima activación de G_{Ca}).

La dependencia de voltaje de I_{Ba} determinada por la aplicación de uno u otro método en solución TEA, Ba^{2+} no es significativamente diferente (véanse RESULTADOS).

5.IV. RESULTADOS

IVA. Naturaleza iónica de I_{Ca}

La Figura 5.1 A muestra registros típicos de las corrientes voltaje-dependientes activadas por pulsos despolarizantes de 7 ms de duración desde -60 mV a -35, -25, -15 y 10 mV obtenidas en solución normal y solución 0 mM Ca^{2+} . Mientras que la corriente tardía de salida no es modificada por la ausencia de Ca^{2+} extracelular, tanto la corriente inicial transitoria de entrada como la corriente inicial transitoria de salida observadas en solución normal desaparecen en ausencia de Ca^{2+} extracelular, indicando que ambas corrientes son dependientes de Ca^{2+} . (La corriente inicial de salida y su dependencia de Ca^{2+} son analizadas en el capítulo III.7, haciéndose aquí referencia exclusiva a la corriente inicial de entrada).

Similares resultados a los descritos en ausencia de Ca^{2+} extracelular se obtienen en presencia de bajas concentraciones (inferiores a milimolar) de Cd^{2+} extracelular (Figura 5.1 B), un reconocido bloqueante de los CCVD (Hille, 1992). Sin embargo, ninguna de las corrientes se ve modificada en solución 0 mM Na^+ o por adición de TTX, un bloqueante específico de las corrientes de Na^+ voltaje-dependientes (Hille, 1992) (no mostrado).

Podemos concluir, por tanto, que la corriente inicial de entrada activada por despolarización (I_{Ca}) es transportada por iones Ca^{2+} .

IVB. Propiedades generales

La amplitud del pico de I_{Ca} aumenta a medida que se incrementa la despolarización (Figura 5.1 A, Control). Además, en la Figura 5.1 B se observa que la amplitud del pico de la

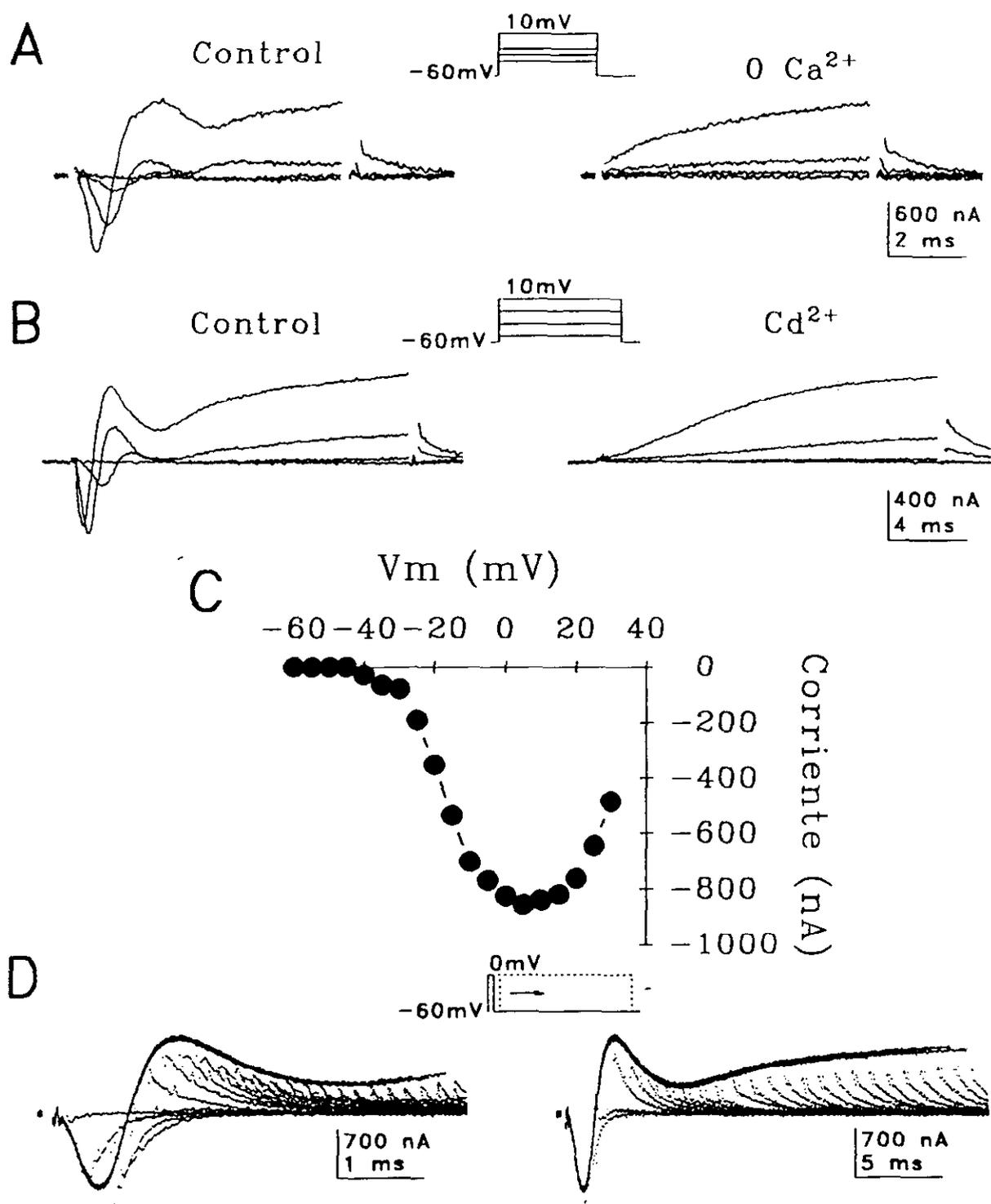


Figura 5.1. Corrientes activadas por despolarización. A, corrientes en solución normal (Control) y en solución 0 mM Ca^{2+} . B, corrientes en solución normal (Control) y en presencia de 5 mM Cd^{2+} . C, relación I-V del pico de la corriente de entrada en solución normal mostrado en A. D, corrientes activadas en solución normal por un pulso despolarizante cuya duración crece cada vez 0.2 ms desde 0.2 a 4.8 ms (izda.) y 1 ms desde 1 a 24 ms (dcha.). Como en el resto de figuras del presente capítulo, las corrientes de pérdida y capacitivas han sido substraidas.

corriente de entrada generada por despolarización a -10 es mayor que a -30 mV y, sin embargo, menor que a 10 mV. En efecto, la relación I-V del pico de I_{Ca} en solución normal (Figura 5.1 C) muestra que ésta es función no lineal de V_m , presentando un umbral de activación alrededor de -40 mV y una pendiente inicialmente negativa que tras alcanzar un máximo en torno a 0 mV se hace positiva para llegar a cruzar el eje de abscisas en un potencial de inversión superior a 40 mV (tal como es esperado para E_{Ca}). Podemos así afirmar que la activación de I_{Ca} es dependiente de voltaje.

Por otra parte, I_{Ca} se desarrolla rápidamente en el tiempo alcanzando un máximo dentro de los 2 primeros milisegundos desde el inicio del pulso despolarizante. Además, el intervalo de tiempo (al que llamamos tiempo al pico) entre el inicio del pulso despolarizante y el pico de I_{Ca} disminuye progresivamente con la despolarización (Figuras 5.1 A y B). Todo ello indica que la activación de I_{Ca} es dependiente de tiempo y que esta dependencia de tiempo es, a su vez, dependiente de voltaje.

Las corrientes registradas en condiciones de fijación de voltaje con dos electrodos en grandes fibras musculares presentan oscilaciones como consecuencia de un control de voltaje no uniforme a lo largo de la fibra (Mounier y Vassort, 1975b). No es éste, sin embargo, el caso de la oscilación que se observa en las corrientes activadas por despolarización. En efecto, esta oscilación es debida a la sumación lineal de las tres corrientes descritas en el capítulo III.1, como se desprende de la Figura 5.1 D, donde se muestran 24 registros superpuestos de las corrientes provocadas por un pulso despolarizante desde -60 a 0

mV y de duración creciente desde 0.2 a 4.8 ms (Figura 5.1 D, izquierda) y desde 1 a 24 ms (Figura 5.1 D, derecha). Debido a la bondad de la fijación temporal de V_m , puede asumirse que en los pocos microsegundos consumidos en la variación de V_m la inactivación de las conductancias es prácticamente inexistente (véase apdo. *IVEb* del presente capítulo y los capítulos *III.6* y *III.7*) y que, por tanto, la conductancia al final del pulso es prácticamente igual a la del inicio de la repolarización. Las corrientes de cola obtenidas por pulsos cortos interrumpidos durante la corriente de entrada son asimismo de entrada y de mayor amplitud que la propia corriente de entrada durante el pulso, tal como cabe esperar por el incremento de la fuerza electromotriz de Ca^{2+} al repolarizar a -60 mV desde 0 mV. Sin embargo, la corriente de cola cambia de sentido al hacerlo la corriente generada al final del pulso, siendo la amplitud de aquélla menor a la de ésta, de acuerdo a lo esperable por la disminución de la fuerza electromotriz de la corriente de salida al repolarizar (en los capítulos *III.6* y *III.7* se pondrá de manifiesto que estas corrientes de salida están transportadas por K^+ , cuyo potencial de equilibrio es próximo a -60 mV). Por otra parte, la amplitud de la corriente de cola es proporcional a la corriente existente al final del pulso, sugiriendo que estas corrientes están mediadas por canales de membrana que, en su estado abierto, presentan un comportamiento óhmico (véanse las consideraciones hechas al respecto en los capítulos *III.2* y *III.3*). Por otra parte, el hecho de que en presencia de TEA ésta oscilación desaparezca (véase más abajo) habla asimismo en favor de la existencia de verdaderas corrientes de salida de K^+ y no de

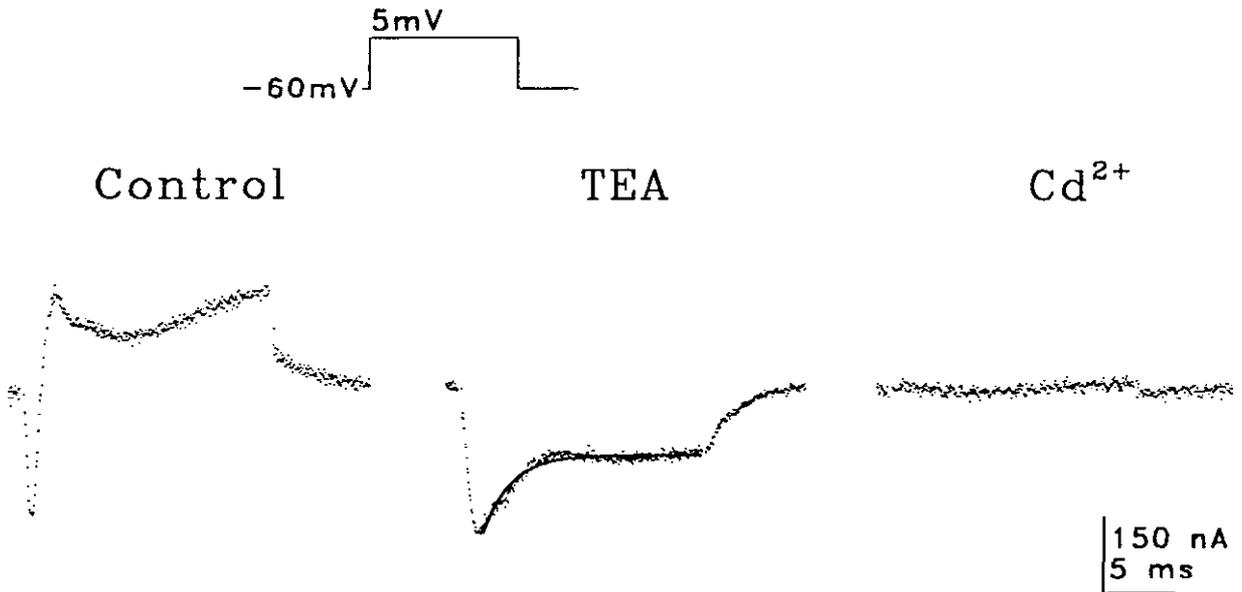


Figura 5.2. Efecto de TEA intracelular. Corrientes activadas por despolarización desde -60 a 5 mV en solución normal (Control), tras inyección intracelular de TEA y en solución 5 mM Cd²⁺. En TEA, la corriente (línea punteada) ha sido ajustada a una única función exponencial (línea continua).

oscilaciones de la corriente debidas a una falta de uniformidad espacial del voltaje impuesto.

I_{Ca} puede ser aislada del resto de corrientes activadas por despolarización mediante la inyección intracelular de TEA, un bloqueante de numerosas corrientes de K^+ (Hille, 1992). La Figura 5.2 muestra la corriente activada por un pulso despolarizante desde -60 mV a 5 mV en solución normal, en presencia de TEA intracelular y tras la posterior adición de 5 mM Cd^{2+} . En solución normal, la corriente total sigue el patrón típico consistente en una corriente inicial de entrada seguida por una corriente inicial transitoria de salida que se continúa con una corriente retrasada de salida; en presencia de TEA, la corriente de entrada crece rápidamente en el tiempo hasta un máximo para después decrecer exponencialmente con una constante de tiempo de 1.99 ms ($r > 0.95$) hasta alcanzar un estado estacionario que se mantiene a lo largo del pulso. La adición posterior de Cd^{2+} muestra que la corriente de entrada sostenida registrada en TEA es prácticamente pura de Ca^{2+} , pues sólo es apreciable una pequeña corriente de salida al final del pulso. Se pone así de manifiesto que el carácter transitorio de I_{Ca} no lo es tal, sino que su verdadero carácter persistente tras una primera e incompleta inactivación se ve truncado y enmascarado por las corrientes inicial y retrasada de salida. Se explica así el incremento observado en la amplitud del pico de I_{Ca} y en el tiempo en que éste ocurre, en TEA respecto al control (véase apdo. IVEa).

La Figura 5.3 A muestra las corrientes activadas por despolarización en TEA y solución Ba^{2+} , donde las corrientes de

salida están prácticamente bloqueadas (véase capítulo III.6). En estas condiciones, los únicos posibles iones transportadores de la corriente de entrada son iones Ba^{2+} , demostrándose que, al igual que en otros sistemas (véase más abajo), éstos son capaces de permear por los CCVD del músculo abductor. Se hará, por tanto, referencia a I_{Ba} , sin olvidar que ésta está mediada por idénticos canales de membrana que I_{Ca} y que, con ciertas restricciones, existe una estrecha relación entre la naturaleza de ambas. Se observa que I_{Ba} se desarrolla en el tiempo hasta alcanzar un máximo a partir del cual decrece lentamente, que el máximo de corriente ocurre tanto más rápidamente cuanto mayor es el pulso despolarizante y que el lento decrecimiento de la corriente a partir de su máximo varía con la amplitud del pulso, todo lo cual indica que I_{Ba} (y, por tanto, I_{Ca}) es una corriente cuya activación e inactivación es dependiente de tiempo y que esta dependencia de tiempo es, a su vez, dependiente de voltaje.

La relación I-V del pico de I_{Ba} (Figura 5.3 B) es muy similar a la descrita para I_{Ca} (Figura 5.1 C), mostrando un crecimiento con pendiente negativa a partir de un umbral próximo a -40 mV, un máximo en torno a -15 mV y un decrecimiento con pendiente positiva.

Por otra parte, la forma de la relación I-V (que presenta dos únicas pendientes), la identidad en la forma de la relación I-V en el pico y en el estado estacionario de I_{Ba} (no mostrado) y el hecho de que la inactivación de I_{Ba} ocurra según una única función exponencial (véase apdo. IVEb), permite afirmar la existencia de un único tipo de CCVD responsable de la corriente de entrada.

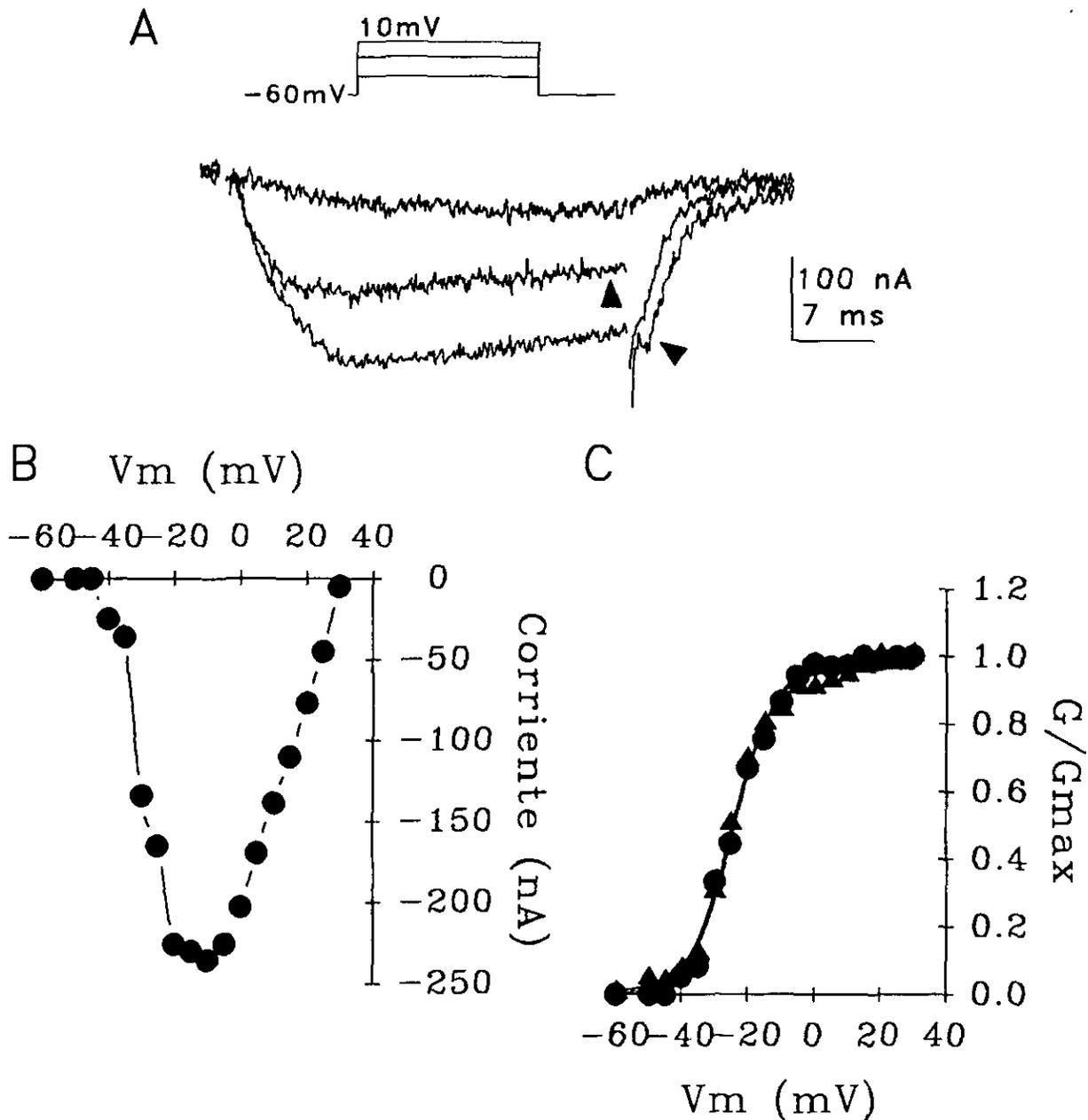


Figura 5.3. I_{Ba} y su dependencia de voltaje. A, corrientes activadas por despolarización en solución Ba^{2+} y TEA intracelular; las cabezas de flecha indican la corriente durante el pulso a 10 mV y su correspondiente corriente de cola. B, relación I-V del pico de la corriente de entrada. C, conductancia relativa de I_{Ba} calculada a partir de la relación I-V (●) y de las corrientes de cola (▲), según las ec. (5.1) y (5.2), respectivamente. Los valores se han ajustado a la ec. (5.3) (líneas continuas), donde los parámetros de ajuste son: para ●, $V_o = -23.88 \pm 0.46$ mV y $S = 6.28 \pm 0.40$; para ▲, $V_o = -25.02 \pm 0.44$ mV y $S = 6.16 \pm 0.40$.

De todo lo expuesto se puede concluir que la corriente de entrada del músculo abductor está mediada por un único tipo de CCVD cuya activación es dependiente de tiempo y de voltaje y cuya inactivación es dependiente de tiempo.

IVC. Efecto de cationes divalentes

IVCa. Cationes bloqueantes

Ha sido demostrado en numerosas preparaciones que, en concentración milimolar, los cationes divalentes pertenecientes al grupo de los metales de transición, tales como Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} , son potentes bloqueantes de los distintos CCVD (véase la revisión Hagiwara y Byerly, 1982). I_{Ca} del músculo abductor es totalmente suprimida por la presencia en el medio extracelular de concentraciones entre 1 y 5 mM de estos cationes divalentes (véase por ejemplo la Figura 5.1 B), bien sea por sustitución equimolar de Ca^{2+} o por adición sin compensación.

IVCb. Cationes permeantes

Los CCVD, además de ser permeables a Ca^{2+} , también lo son, aunque en diferente grado a Ba^{2+} . Así, en tanto que los CCVD tipo T son igualmente permeables a Ca^{2+} y Ba^{2+} , los CCVD tipo N y tipo L presentan mayor permeabilidad a Ba^{2+} que a Ca^{2+} (Hille, 1992). Así, los iones Ba^{2+} pueden substituir, y aun mejorar, a los iones Ca^{2+} como transportadores de corriente, en ocasiones haciendo una inconspicua corriente de Ca^{2+} lo suficientemente grande como para ser susceptible de estudio. Sin embargo, los iones Ba^{2+} son incapaces de reemplazar a los iones Ca^{2+} como desencadenantes de numerosos procesos de relevada importancia, v. gr., liberación de neurotransmisor, acoplamiento de la E-C en invertebrados, liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, y, de

especial importancia en nuestro caso, activación e inactivación de canales iónicos de membrana (véase Hille, 1992).

El efecto de Ba^{2+} sobre las corrientes activadas por despolarización se analiza en la Figura 5.4. El patrón típico de las corrientes en solución normal (Figura 5.4 A, Control) se transforma, en solución Ba^{2+} , en una corriente de entrada de mayor amplitud que en el control y que disminuye lentamente en el tiempo sin llegar a hacerse de salida en los 18 ms que dura el pulso. Tras la posterior adición de 5 mM Cd^{2+} , la corriente de entrada desaparece, quedando tan sólo una pequeña corriente retrasada de salida, y de menor amplitud que la obtenida en solución normal. I_{Ba} puede ser aislada a partir de la corriente obtenida en solución Ba^{2+} por substracción de la corriente registrada tras adición de 5 mM Cd^{2+} .

Además de los posibles efectos de Ba^{2+} sobre la corriente retrasada de salida (que son analizados en el capítulo III.6) y de la ausencia de corriente inicial transitoria de salida cuando el ión transportador de la corriente de entrada es Ba^{2+} y no Ca^{2+} (lo cual sugiere que aquélla es una corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} , tal como se demuestra en el capítulo III.7), varias son las diferencias encontradas en las corrientes registradas en solución normal y solución Ba^{2+} . En efecto, el tiempo al pico de la corriente de entrada es mayor para I_{Ba} que para I_{Ca} , el decrecimiento temporal de I_{Ba} es más lento que el de I_{Ca} y la amplitud de I_{Ba} es mayor que la de I_{Ca} . Las dos primeras diferencias son consideradas en los apdos. *IVEa* y *IVEb*, respectivamente, haciéndose aquí sólo referencia a la tercera de ellas.

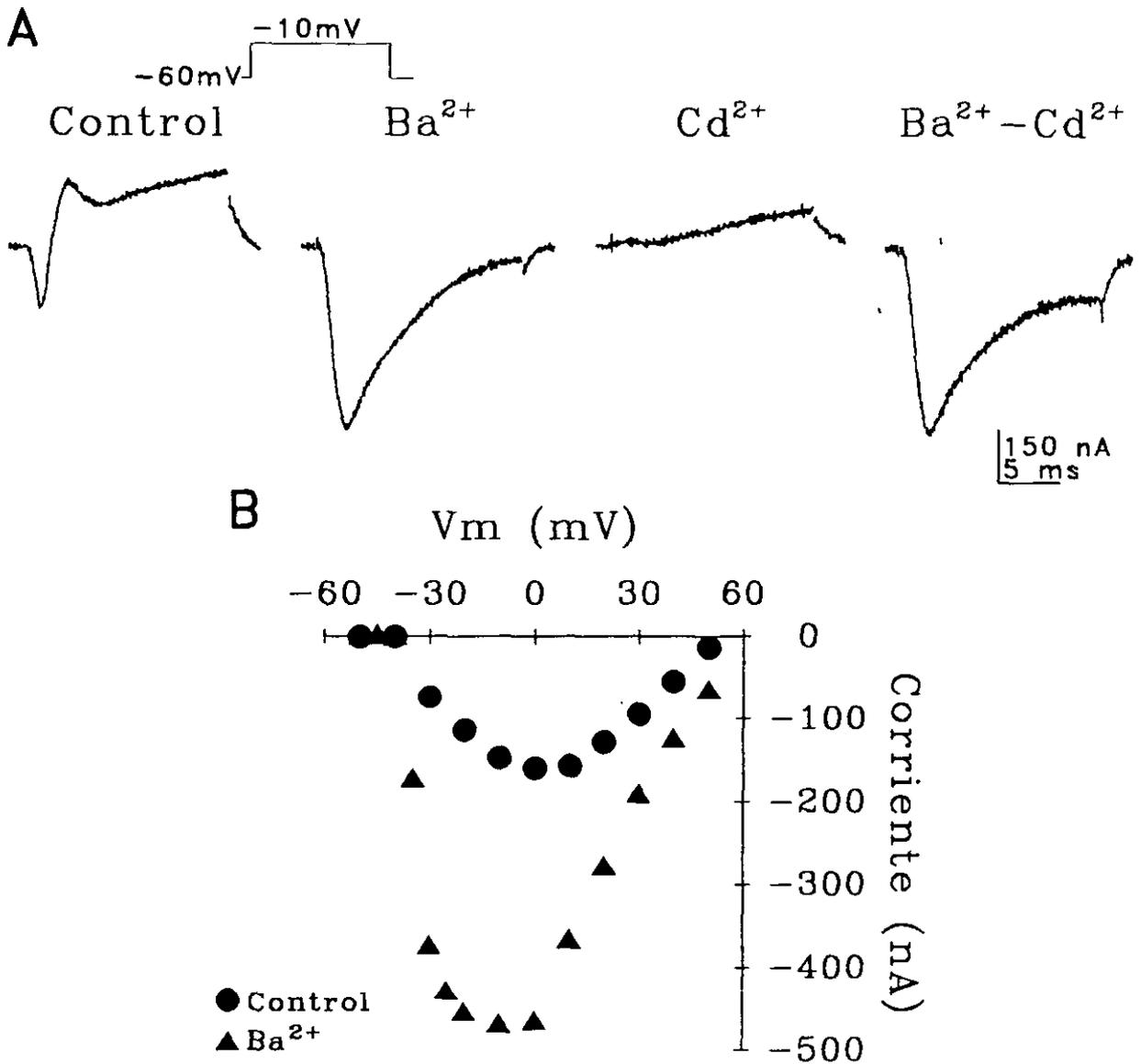


Figura 5.4. Efecto de Ba^{2+} sobre las corrientes activadas por despolarización. A, corrientes activadas por despolarización en solución normal (Control), solución Ba^{2+} y tras adición de 5 mM Cd^{2+} . I_{Ba} se ha aislado por sustracción de la corriente registrada en solución Ba^{2+} de la registrada tras adición de 5 mM Cd^{2+} ($Ba^{2+}-Cd^{2+}$). B, relación I-V del pico de I_{Ca} (●) e I_{Ba} (▲).

Si bien la amplitud de I_{Ba} es mayor que la de I_{Ca} , la forma de su relación I-V no difiere substancialmente de la de I_{Ca} (Figura 5.4 B), presentando ambas un mismo umbral de generación y un próximo potencial de inversión de la corriente, todo lo cual indica que la conductancia de los CCVD que median la corriente de entrada es mayor en Ba^{2+} que en Ca^{2+} y/o que la verdadera magnitud del pico de I_{Ca} está enmascarada por la presencia de corriente de salida. Ambos fenómenos parecen tener efectivamente lugar, pues si bien el bloqueo de las corrientes de salida por TEA produce un aumento de la amplitud del pico de I_{Ca} (véase Figura 5.2), apoyando la idea de una disminución de I_{Ca} por las corrientes de salida, éste nunca es de tan alta magnitud; además, la amplitud de I_{Ba} es también mayor que la de I_{Ca} aun cuando las corrientes de salida se hallan bloqueadas por TEA (véase Figura 5.7 A). Todo ello permite concluir que I_{Ca} se ve truncada y enmascarada por las corrientes de salida y que los CCVD que median I_{Ca} presentan una mayor permeabilidad a Ba^{2+} que a Ca^{2+} .

IVD. Dependencia de voltaje de I_{Ca}

IVDa. Activación

La dependencia de voltaje de I_{Ba} determinada a partir de la relación I-V del pico de I_{Ba} de acuerdo a la ecuación (5.1) y a partir de la amplitud de las corrientes de cola según la ecuación (5.2) se muestra en la Figura 5.3 C (*circulos y triángulos*, respectivamente). Cada conjunto de valores experimentales se ajusta aceptablemente ($r > 0.99$) a la función

$$G_{Ba}/G_{Ba,max} = [1 + \exp(V_0 - V/S)]^{-1}, \quad (5.3)$$

deducida de la ecuación de Boltzman, en la que $G_{Ba,max}$ es el máximo valor de G_{Ba} , V_0 es el voltaje al cual G_{Ba} está medio activada y

S es un parámetro que define la pendiente de la curva. El análisis de la función de ajuste a los valores experimentales obtenidos a partir de la amplitud de las corrientes de cola indica que la dependencia de voltaje de la activación de G_{Ba} puede ser descrita por la ecuación de Boltzman (indicando que la probabilidad de apertura de un canal es independiente del resto), que G_{Ba} presenta un umbral de activación en torno a -40 mV y que crece sigmoideamente con V_m con un factor S de 6.16 ± 0.41 , alcanzando una activación media a -25.02 ± 0.44 mV y saturándose para valores superiores a 0 mV. Muy similares parámetros de ajuste de la función se obtienen a partir de los valores experimentales deducidos de la relación I-V de I_{Ba} . En efecto, la dependencia de voltaje de la activación de G_{Ba} así determinada también puede ser aceptablemente ($r > 0.99$) descrita por la ecuación (5.3), indicando que, en tales condiciones, el umbral de activación de G_{Ba} se sitúa alrededor de -40 mV, que G_{Ba} alcanza un valor medio a -23.88 ± 0.46 mV y máximo a partir de 0 mV, y que el parámetro S es 6.28 ± 0.40 . Por tanto, puesto que no existen diferencias significativas entre la dependencia de voltaje de la activación de G_{Ba} determinada por uno u otro método, la activación de G_{Ba} en el pico es idéntica a la del estado estacionario. Cabe suponer además que la irrelevancia del método utilizado es extrapolable a la determinación de la dependencia de voltaje de la activación de G_{Ca} .

Los resultados obtenidos en solución normal a partir de 17 fibras musculares representativas (véase por ejemplo la Figura 5.8) indican que la activación de G_{Ca} crece con la despolarización de forma sigmoidea y de acuerdo a la ecuación de

Boltzman ($r > 0.99$; indicando que la probabilidad de apertura de un canal es independiente del resto) con una pendiente S de 6.77 ± 1.43 , comenzando en valores próximos a -40 mV, alcanzando un valor medio a -17.14 ± 3.13 mV y saturándose en torno a 10 mV.

IVDb. Inactivación

La Figura 5.5 A pone de manifiesto cómo la aplicación previa de sucesivos prepulsos despolarizantes a -30 , -25 y -20 mV modifican la corriente de Ca^{2+} generada por un postpulso constante desde -60 a -20 mV. Debido a la activación de corrientes de salida durante la aplicación del prepulso, la amplitud del pico de I_{Ca} es considerada como la amplitud entre la corriente existente al inicio del postpulso y el mínimo de corriente generada por el postpulso. La drástica disminución observada en la amplitud del pico de I_{Ca} generado por el postpulso a medida que se incrementa la amplitud del prepulso indica la acusada inactivación dependiente de voltaje que muestra I_{Ca} . Evidencia a favor de la exclusiva dependencia de voltaje en estas condiciones se presenta más abajo, en solución Ba^{2+} , en la cual la inactivación por Ca^{2+} no está presente.

La relación entre el valor de V_m durante el prepulso y la amplitud relativa al máximo del pico de I_{Ca} generado por el postpulso caracteriza la dependencia de voltaje de la inactivación de I_{Ca} (Figura 5.5 B, círculos). Es interesante destacar que la aplicación de prepulsos de baja amplitud, lejos de disminuir la amplitud del pico de I_{Ca} por inactivación, aumentan la amplitud de ésta (véanse los tres valores correspondientes a $V_m < -45$ mV). Este fenómeno, al que llamaremos potenciación de I_{Ca} , ha sido consistentemente encontrado en todas

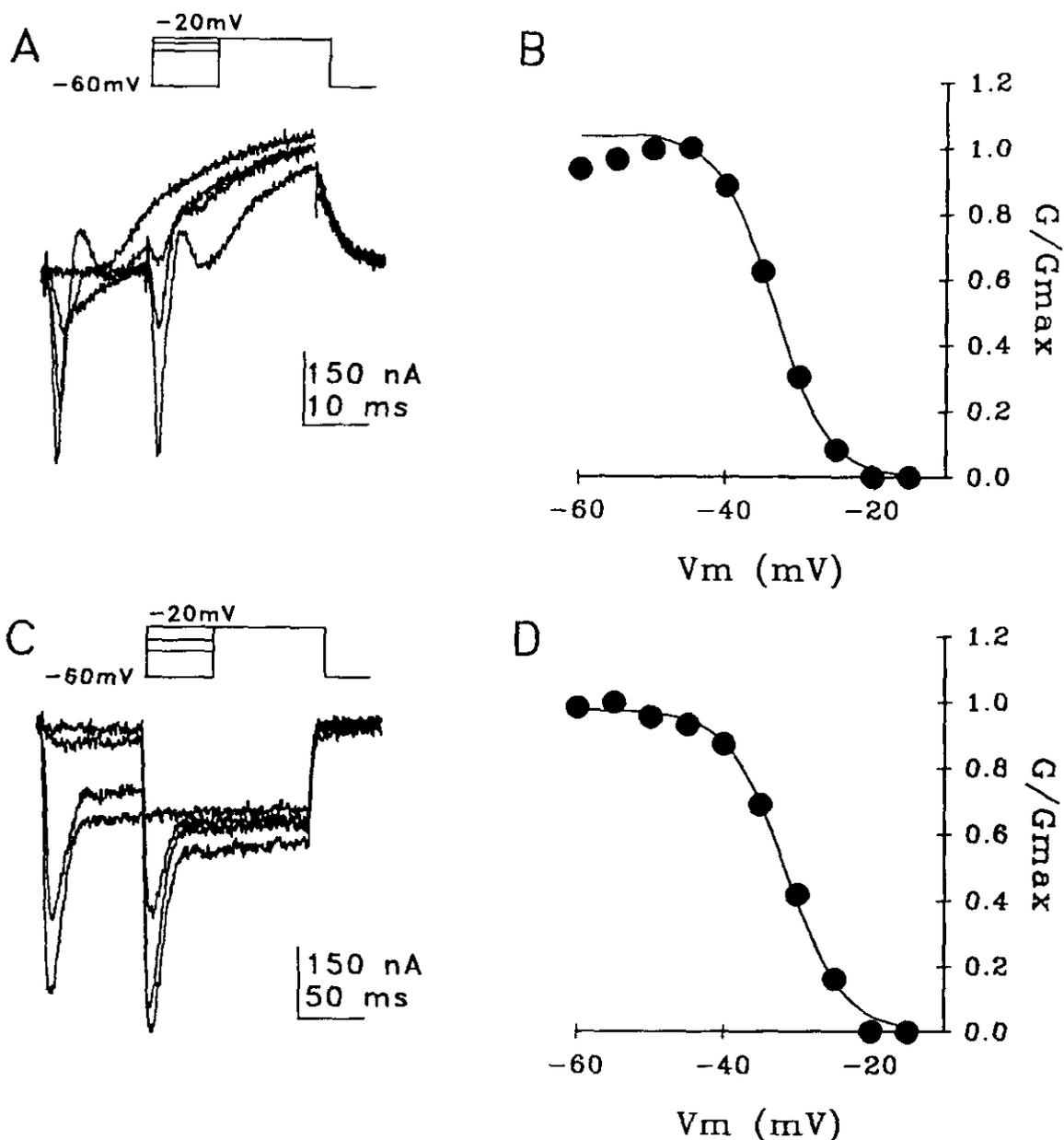


Figura 5.5. Dependencia de voltaje de la inactivación de I_{Ca} e I_{Ba} . A, corrientes registradas en solución normal por despolarización desde -60 a -20 mV en ausencia y presencia de prepulsos a -30, -25 y -20 mV. B, conductancia relativa del pico de I_{Ca} del postpulso en función de V_m del prepulso; los valores se han ajustado a la ec. (5.4) (línea continua), excepto los tres correspondientes a $V_m < -45$ mV (véase texto); los parámetros de ajuste son: $V_0 = -33.39 \pm 0.27$ mV y $S = 3.61 \pm 0.20$. C, corrientes registradas en solución Ba^{2+} y TEA intracelular por despolarización desde -60 a -20 mV en ausencia y presencia de prepulsos a -40, -30 y -20 mV. D, conductancia relativa del pico de I_{Ba} respecto a V_m del prepulso; los valores se han ajustado a la ec. (5.4) (línea continua) donde los parámetros de ajuste son: $V_0 = -31.42 \pm 0.31$ mV y $S = 3.90 \pm 0.26$.

las fibras analizadas en solución normal ($n = 7$).

Puesto que V_m del postpulso permanece constante, de acuerdo a la ecuación (5.1), $I_{Ca}/I_{Ca,max} = G_{Ca}/G_{Ca,max}$. Los valores experimentales así obtenidos, y de los cuales no se consideran los correspondientes a prepulsos de baja amplitud que no inactivan sino potencian I_{Ca} , se pueden ajustar a la función

$$G_{Ca}/G_{Ca,max} = [1 + \exp(V-V_0/S)]^{-1}, \quad (5.4)$$

deducida de la ecuación de Boltzman, semejante a la ecuación (5.3) y donde los parámetros tiene igual significado. El análisis de la función de ajuste indica que la dependencia de voltaje de la inactivación por voltaje de I_{Ca} es aceptablemente descrita ($r > 0.99$) por la ecuación de Boltzman. La inactivación por voltaje de I_{Ca} comienza en torno a -35 mV, alcanzando un valor medio a -33.39 ± 0.27 mV, aumentando con una pendiente de 3.61 ± 0.20 y haciéndose máxima por encima de -15 mV. Del análisis de 7 fibras diferentes en solución normal podemos concluir que la inactivación por voltaje de G_{Ca} aumenta de forma sigmoidea con la despolarización de acuerdo a la ecuación de Boltzman (indicando que la probabilidad de inactivación de un canal es independiente del resto) con un factor de pendiente S de 3.31 ± 1.01 , comenzando en torno a -40 mV, alcanzando un valor medio para -33.65 ± 4.13 y siendo máxima a partir de -15 mV.

En solución TEA, Ba^{2+} (Figura 5.5 C), en la cual I_{Ba} es prácticamente pura por el considerable bloqueo de las corrientes de salida, se aprecia que, en tanto el pico de I_{Ba} generado por el postpulso disminuye notablemente hasta desaparecer al aumentar la amplitud del prepulso, el componente estacionario de I_{Ba} apenas se ve modificado, reduciéndose como máximo hasta un 70%

y sin correlación evidente con la amplitud del prepulso. En este sentido, cabe destacar que el pico de I_{Ba} generado por el postpulso es de mayor amplitud que el generado por un prepulso idéntico a aquél, y que esta diferencia es de igual magnitud a la observada en el estado estacionario.

La dependencia de voltaje de la inactivación del pico de I_{Ba} en estas condiciones, se muestra en la Figura 5.5 D, en la cual los valores experimentales se ajustan aceptablemente ($r > 0.99$) a la ecuación (5.4) (donde ahora G_{Ca} es G_{Ba}). La inactivación de G_{Ba} , que es mínima para valores inferiores a -40 mV y máxima por encima de -15 mV, presenta un valor medio a -31.42 ± 0.31 y una pendiente S de 3.90 ± 0.26 . La estrecha similitud entre estos valores y los encontrados para I_{Ca} indican que la dependencia de voltaje de la inactivación de G_{Ba} es igual a la de G_{Ca} , y que, por tanto, los resultados obtenidos no se ven distorsionados por la presencia de corrientes de salida y/o presencia de una supuesta inactivación por Ca^{2+} sino que, efectivamente, corresponden a la verdadera dependencia de voltaje de la inactivación de G_{Ca} .

IVE. Dependencia de tiempo de I_{Ca}

IVEa. Activación

En el apdo. *IVB* se ha puesto de manifiesto que la activación de I_{Ca} es dependiente de tiempo y que esta dependencia de tiempo es, a su vez, dependiente de V_m . En efecto, el pico de I_{Ca} en solución normal ocurre tanto más rápidamente cuanto mayor es la amplitud del pulso despolarizante y siempre dentro de los dos primeros milisegundos del pulso, tal como muestra la Figura 5.7 A, *circulos*, donde se representa una típica relación entre el tiempo al pico de I_{Ca} y el valor del pulso despolarizante en

solución normal (*círculos*). Los valores experimentales se ajustan aceptablemente ($r > 0.99$) a la ecuación exponencial decreciente

$$t = m[\exp(-V/\tau)] + b, \quad (5.5)$$

donde t es el tiempo al pico de I_{Ca} , m es la amplitud entre la asíntota y el punto de corte con el eje de ordenadas, V es V_m , τ es la constante de tiempo de la exponencial y b es la asíntota. Del análisis de la función de ajuste podemos concluir que la dependencia de tiempo de la activación de I_{Ca} en solución normal es función exponencial decreciente de V_m , disminuyendo e-veces por cada 19.44 ± 1.40 mV de despolarización, tomando m un valor de 0.09 ± 0.01 y tendiendo asintóticamente a 0.56 ± 0.03 ms.

Sin embargo, tras la inyección intracelular de TEA (Figura 5.6 A, *triángulos*) el tiempo al pico de I_{Ca} es aproximadamente el doble de éste en solución normal, variando aproximadamente entre 5 y 1 ms. La función de ajuste a los valores experimentales indica que, en estas condiciones, la dependencia de tiempo de la activación de I_{Ca} es también función exponencial decreciente de V_m ($r > 0.99$), disminuyendo e-veces por cada 11.97 ± 0.79 mV de despolarización, siendo $m = 0.09 \pm 0.01$ y presentando una asíntota a 1.17 ± 0.04 ms.

Por tanto, podemos concluir que la dependencia de voltaje de la dependencia de tiempo de la activación de I_{Ca} es idéntica en solución normal y en TEA. No obstante, el tiempo al pico de I_{Ca} es 2 veces mayor en TEA que en solución normal, sugiriendo de nuevo que I_{Ca} se ve truncada por la activación de las corrientes de salida, puesto que un efecto directo de TEA sobre la activación de I_{Ca} parece muy improbable, dada su especificidad por las corrientes de K^+ (Hille, 1992).

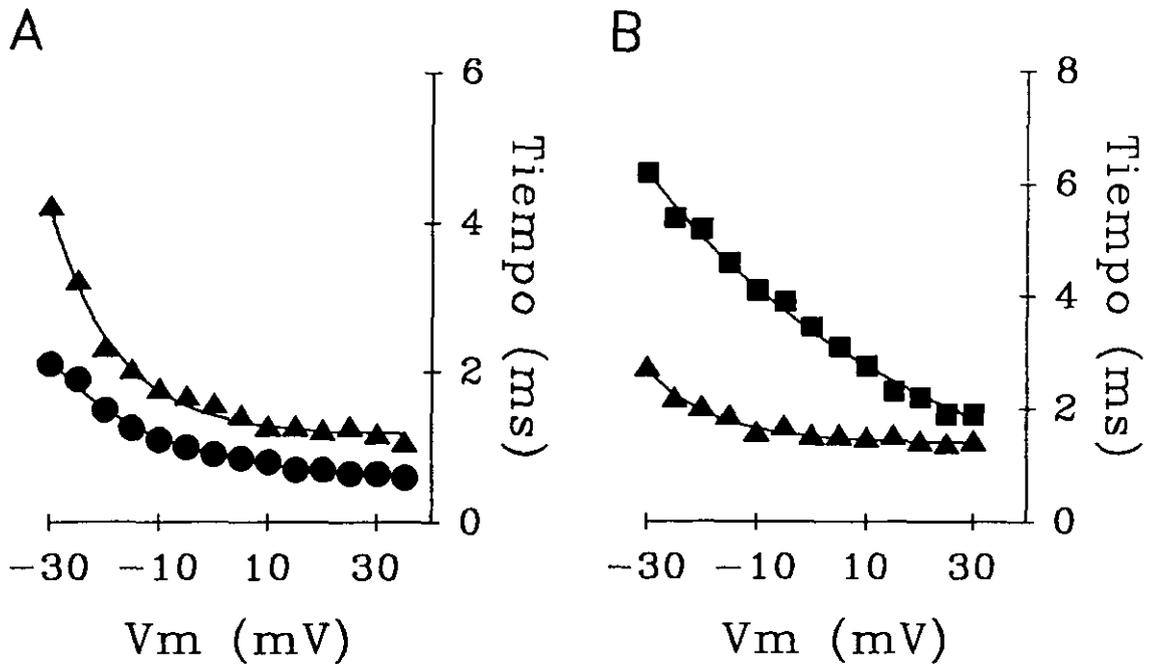


Figura 5.6. Dependencia de tiempo de la activación de I_{Ca} e I_{Ba} . A, relación entre V_m y el tiempo al pico de I_{Ca} en solución normal (●) y en TEA intracelular (▲). Los valores se han ajustado a la ec. (5.5) (líneas continuas) y los parámetros de ajuste son: en solución normal, $m = 0.12 \pm 0.01$ ms, $b = 0.56 \pm 0.03$ ms y $\tau = 19.44 \pm 1.40$; en TEA, $m = 0.09 \pm 0.01$ ms, $b = 1.17 \pm 0.04$ ms y $\tau = 11.96 \pm 0.79$. B, relación entre V_m y el tiempo al pico de I_{Ca} e I_{Ba} en TEA intracelular (▲) y tras perfusión con solución Ba^{2+} (■), respectivamente. La línea continua representa el ajuste de la ec. (5.5) a los valores experimentales. Los parámetros de ajuste son: en TEA, $m = 0.04 \pm 0.01$ ms, $b = 1.40 \pm 0.04$ ms y $\tau = 12.59 \pm 1.52$; tras perfusión con solución Ba^{2+} , $m = 1.24 \pm 0.02$ ms, $b = 0.00 \pm 0.57$ ms y $\tau = 49.16 \pm 7.78$.

La Figura 5.6 B compara, en una misma fibra, el tiempo al pico de I_{Ca} en TEA (triángulos) y el tiempo al pico de I_{Ba} en TEA y solución Ba^{2+} (cuadrados). Se aprecia el notable incremento del tiempo al pico de I_{Ba} respecto al de I_{Ca} . En ambos casos, la dependencia de voltaje de la dependencia de tiempo de la activación decrece exponencialmente ($r > 0.99$) de acuerdo a la ecuación (5.5). En TEA, m es igual a 0.04 ± 0.01 y el grado de decrecimiento es e-veces por cada 12.59 ± 1.52 mV de despolarización tendiendo asintóticamente hacia 1.40 ± 0.04 ms (nótese la similitud entre el valor de estos parámetros y el de los encontrados para la fibra muscular representada en la Figura 5.6 A también en TEA). Por su parte, el tiempo al pico de I_{Ba} decrece e-veces por cada 49.16 ± 7.78 mV, tendiendo asintóticamente hacia 0.00 ± 0.57 ms, con un valor de $m = 1.24 \pm 0.22$.

IVEb. Inactivación

Debido a la presencia de corrientes de salida que truncan y enmascaran I_{Ca} , la inactivación por tiempo de I_{Ca} sólo es apreciable en TEA y/o TEA, Ba^{2+} . La variación de I_{Ca} e I_{Ba} en el tiempo a partir del pico de corriente sigue un curso temporal exponencial decreciente ($r > 0.99$) alcanzando un estado estacionario que dura cuanto dura el pulso (Figura 5.7 A y C). La dependencia de tiempo de la inactivación de I_{Ca} , cuantificada a partir de la constante de tiempo de la función exponencial que se ajusta a su curso temporal, se representa en la Figura 5.7 B. En TEA, la relación entre la dependencia de tiempo de la inactivación y V_m (Figura 5.7 B, círculos) muestra que la inactivación de I_{Ca} es muy rápida, con constantes de tiempo

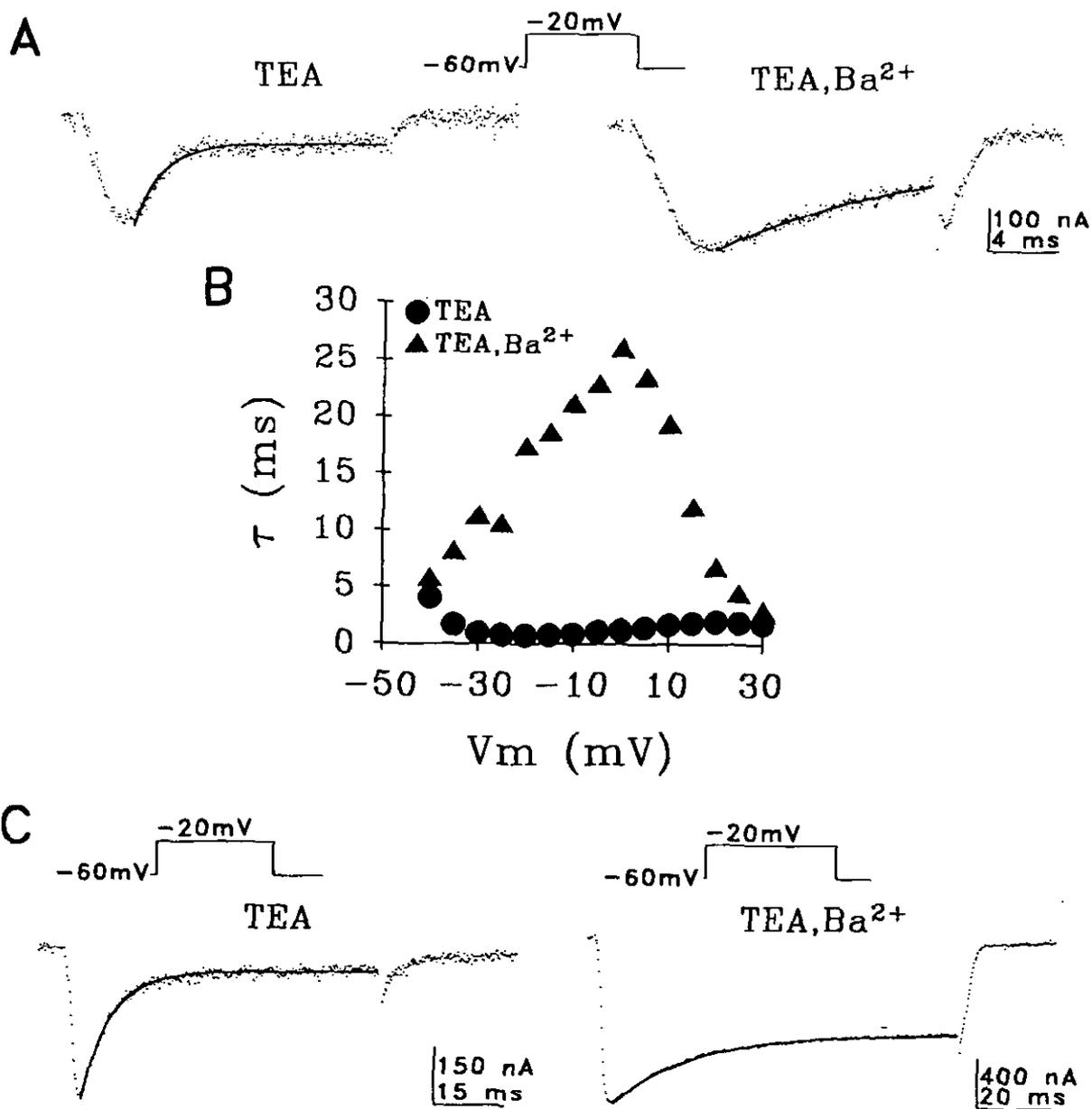


Figura 5.7. Dependencia de tiempo de la inactivación de I_{Ca} e I_{Ba} . A, corrientes activadas por despolarización (líneas punteadas) en TEA y tras perfusión con solución Ba²⁺ (TEA, Ba²⁺), ajustadas a sendas funciones exponenciales (líneas continuas). B, relación τ -V de la constante de tiempo de inactivación en TEA (●) y TEA, Ba²⁺ (▲); misma célula que A. C, corrientes activadas por pulsos despolarizantes de larga duración (líneas punteadas) en TEA y TEA, Ba²⁺, en dos células distintas, ajustadas a sendas funciones exponenciales (líneas continuas), cuyas constantes de tiempo son 6.41 ms (TEA) y 21.75 ms (TEA, Ba²⁺).

inferiores a 5 ms, y muy poco variable en el rango de voltaje explorado. Sin embargo, en TEA, Ba^{2+} en la misma fibra (Figura 5.7 B, triángulos), la inactivación de I_{Ba} es considerablemente más lenta y presenta una clara dependencia de voltaje, siguiendo una curva en forma de campana cuyo máximo ocurre para valores de voltaje próximos al voltaje de activación media de la corriente (véase apdo. *IVDa*), tal como cabe esperar para corrientes voltaje-dependientes (véase apdo. *IVC* del capítulo *III.3*). En ocasiones, la constante de tiempo en TEA es algo mayor (véase por ejemplo la Figura 5.7 C, TEA), aunque siempre inferior a 15 ms, mostrando una ligera dependencia de voltaje, pero nunca tan acusada como en Ba^{2+} . Quizá estas diferencias encontradas en diferentes fibras en TEA sean debidas a un mayor o menor grado de bloqueo de las corrientes de salida, en función de una distinta concentración de TEA intracelular alcanzada en las diferentes fibras; sin embargo, el hecho de que la inactivación por tiempo siempre sea según una única exponencial indica que las corrientes de salida están significativamente reducidas, no obstante, la mínima presencia de ellas puede inducir una mayor velocidad en la inactivación de I_{Ca} registrada.

En cualquier caso, la inactivación de I_{Ba} fue siempre mayor que I_{Ca} (siendo la constante de tiempo máxima de I_{Ba} el doble, al menos, que la de I_{Ca}) y su dependencia de voltaje consistentemente más acusada. Podemos así concluir que la inactivación de I_{Ca} en el tiempo presenta una doble dependencia, a saber, una dependencia de Ca^{2+} (en cuanto que la inactivación de I_{Ca} es más rápida que la de I_{Ba}) y una dependencia de voltaje (en cuanto que la constante de tiempo de la inactivación de I_{Ba}

es función de V_m). Además, el hecho de que esta dependencia de voltaje sea más acusada para I_{ba} que para I_{ca} (donde en ocasiones sólo se manifiesta levemente) sugiere que la dependencia de Ca^{2+} y no de V_m es el factor limitante de la inactivación por tiempo de I_{ca} .

IVF. Corriente de Ventana

En la Figura 5.8 se representa la dependencia de voltaje de la activación (*círculos*) y de la inactivación (*triángulos*) de I_{ca} para una fibra típica en solución normal. Tanto los valores experimentales de la activación como de la inactivación por voltaje de I_{ca} se ajustan aceptablemente ($r > 0.99$) a las ecuaciones (5.3) y (5.4), respectivamente. La intersección de las curvas de ajuste que definen la dependencia de voltaje de la activación e inactivación ocurre para un valor de $V_m = -28.43$ mV, para el cual la conductancia relativa de I_{ca} es mayor que cero. Así, en un determinado intervalo de V_m , la activación e inactivación de I_{ca} se superponen, definiendo en el plano x-y un espacio delimitado por el eje $y = 0$ y las curvas de activación e inactivación de I_{ca} . La corriente incluida en esta región de V_m recibe el nombre de corriente de ventana (en inglés "window current"). La corriente de ventana de los CCVD del músculo abductor se sitúa entre -40 y -20 mV, que corresponde al rango de despolarización sostenida que tiene lugar tras la generación de un potencial de acción graduado por estimulación sináptica (véase Figura 1.1 A) o por inyección de un pulso de corriente despolarizante de larga duración (véase la Figura 1.1 B).

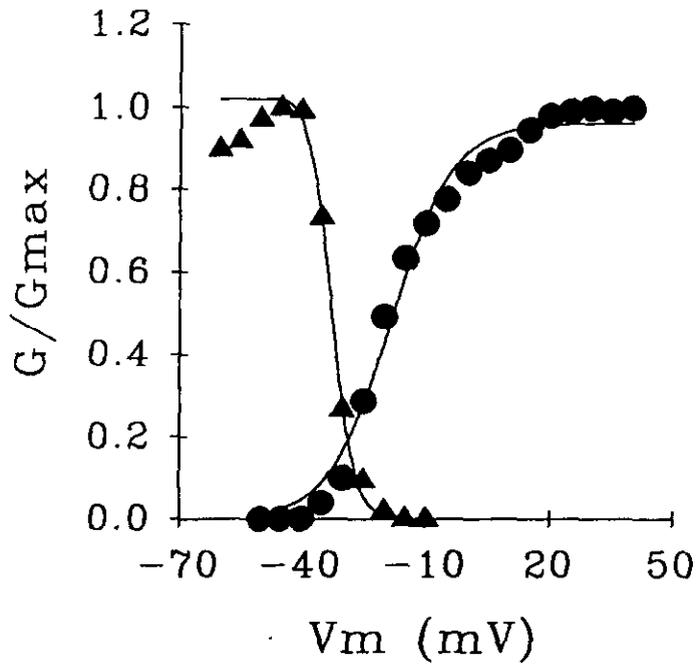


Figura 5.8. Corriente de Ventana de I_{ca} . La dependencia de voltaje de la activación (●) y de la inactivación (▲) de I_{ca} se han ajustado a las ec. (5.3) y (5.4), respectivamente. No se han considerado los puntos de la inactivación por voltaje correspondientes a $V_m < -45$ mV (véase texto). El punto de intersección de ambas curvas ocurre en $V_m = -28.43$ mV.

IVG. Farmacología

Los distintos CCVD, además de diferir en sus características electrofisiológicas (en cuanto que poseen distinta cinética, dependencia de voltaje, dependencia de Ca^{2+} , selectividad iónica, regulación metabólica y/o conductancia unitaria), presentan notables diferencias en su farmacología. Así, las DHP actúan específicamente, bien como agonistas o como antagonistas (por ejemplo, BAY K o nifedipina, respectivamente), sobre los CCVD tipo L (Nowycky et al., 1985). La toxina peptídica ω -conotoxina (ω -CgTX) contenida en el veneno del gasterópodo marino *Conus geographus* inhibe los CCVD de alto umbral, esto es, los tipo L y tipo N (Nowycky et al., 1985; McCleskey et al., 1987; Carbone y Swandulla, 1989). El CCVD tipo P es específicamente bloqueado por el péptido ω -Aga-IVA (Mintz et al., 1992) y por una toxina no peptídica de bajo peso molecular (denominada FTX) (Llinás et al., 1989) presentes en el veneno de la araña *Agelenopsis aperta*. Por último, no se ha demostrado sensibilidad alguna del canal tipo T a ninguna de las citadas toxinas.

La adición a la solución extracelular de 1 μM Nifedipina produce una notable reducción en la amplitud de I_{Ba} en solución TEA, Ba^{2+} (Figura 5.9). Esta reducción, que se acentúa al aumentar la concentración extracelular de Nifedipina (a 10 μM), y que por tanto sugiere un efecto dependiente de concentración, no se ve acompañada de variaciones en el umbral de activación de I_{Ba} ni en su potencial de inversión, tal como se muestra en la relación I-V de la amplitud del pico de I_{Ba} (Figura 5.9 B).

En efecto, en tanto que la forma de esta relación no se ve alterada por nifedipina 1 ó 10 μM , la amplitud máxima de I_{Ba} es

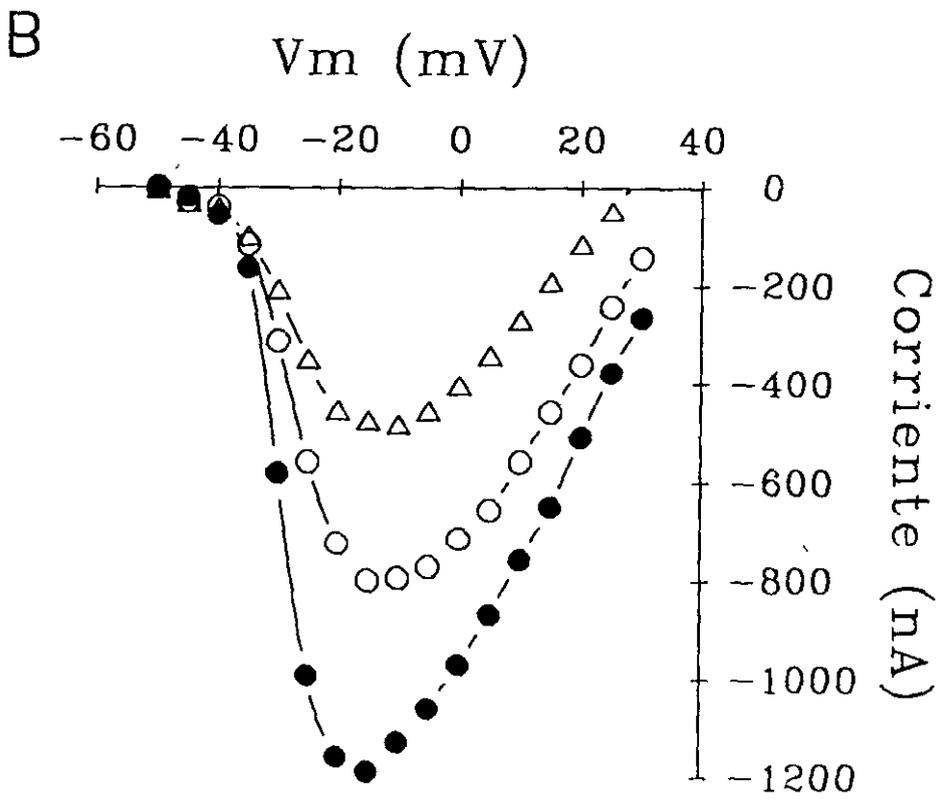
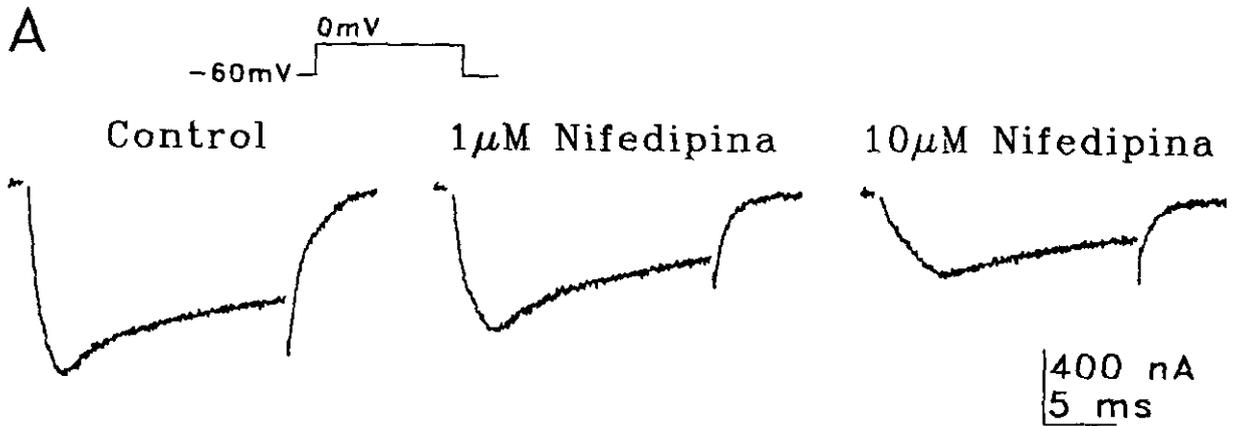


Figura 5.9. Efecto de Nifedipina sobre I_{Ba} . A, corrientes activadas por despolarización en solución TEA, Ba^{2+} (Control) y tras adición sin compensación de 1 y 10 μM Nifedipina. B, relación I-V del pico de I_{Ba} en solución TEA, Ba^{2+} (●) y en presencia de 1 y 10 μM Nifedipina (○ y Δ, respectivamente).

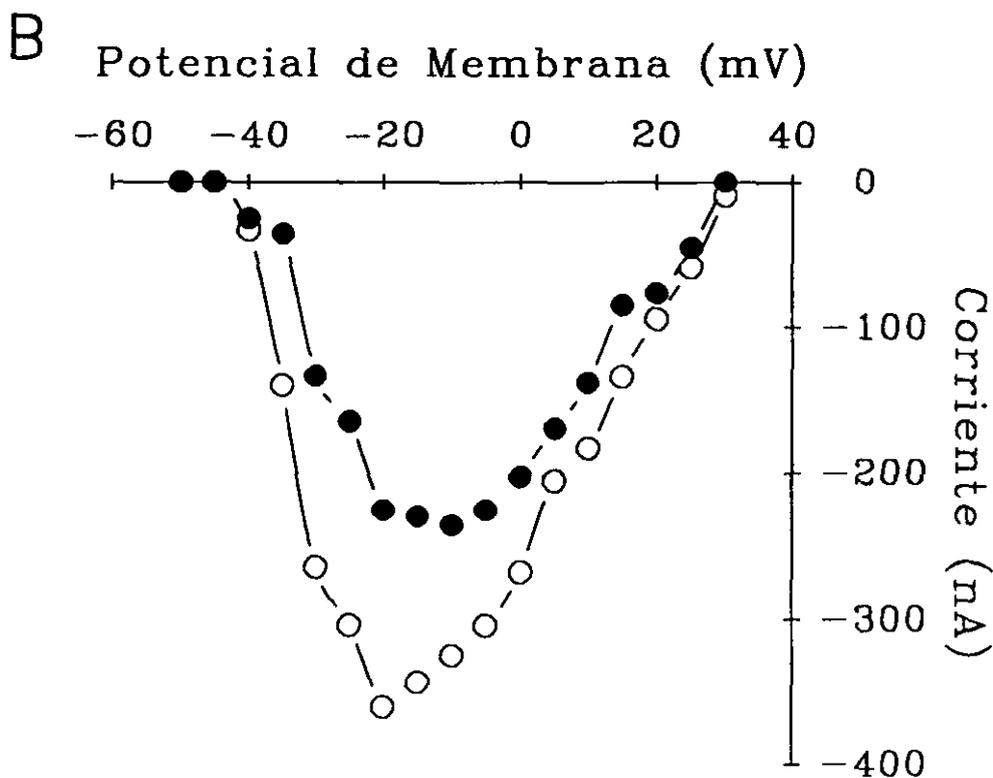
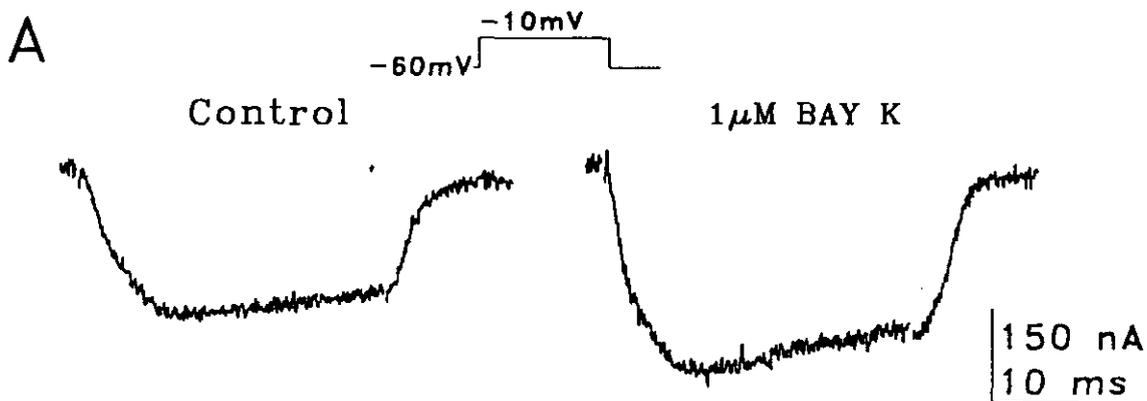


Figura 5.10. Efecto de BAY K sobre I_{Ba} . A, corrientes activadas por despolarización en solución TEA, Ba^{2+} (Control) y tras adición sin compensación de $1 \mu M$ BAY K. B, relación I-V del pico de I_{Ba} en solución TEA, Ba^{2+} (●) y en presencia de $1 \mu M$ BAY K (○).

0.68 y 0.40 veces menor, respectivamente, que en el control.

En la Figura 5.10 A se muestra cómo, por el contrario, 1 μM BAY K provoca el incremento de I_{Ba} generada en solución TEA, Ba^{2+} (Control). La relación I-V del pico de I_{Ba} (Figura 5.10 B), pone de manifiesto que 1 μM BAY K aumenta un 56% la amplitud máxima de I_{Ba} en el control (círculos llenos), y que este incremento se realiza sin alteración de la forma de la relación I-V, del umbral de activación de I_{Ba} ni de su potencial de inversión.

Por otra parte, I_{Ca} no es modificada por la presencia de FTX (hasta 1 $\mu\text{l/ml}$), un reconocido bloqueante específico de los CCVD tipo P cuya constante de afinidad aparente es alrededor de 10 nl/ml (no mostrado; pero véase Araque et al., 1993).

Todo ello permite concluir que, de acuerdo a las características farmacológicas de I_{Ca} de las fibras musculares, los CCVD que median esta corriente son de tipo L.

5.V. DISCUSION

Los resultados presentados indican que la corriente de entrada activada por despolarización del músculo abductor (I_{Ca}) es una corriente transportada por iones Ca^{2+} a través de un único tipo de CCVD, cuya activación e inactivación son dependientes de voltaje y de tiempo.

Tanto las características electrofisiológicas de I_{Ca} , a saber, su alto umbral de activación (alrededor de -40 mV), su carácter persistente en el tiempo, su elevado rango de inactivación por voltaje (entre -40 y -15 mV) y la mayor conductancia de Ba^{2+} que de Ca^{2+} , como sus características farmacológicas, en cuanto que es sensible a DHP, permiten adscribir el CCVD responsable de I_{Ca} a aquéllos de tipo L.

No obstante, la cinética de activación e inactivación de I_{Ca} difiere de la de otras corrientes de Ca^{2+} mediadas por CCVD tipo L descritas en otros sistemas. En efecto, la activación de I_{Ca} es considerablemente más rápida que la de otras corrientes de Ca^{2+} , especialmente la descrita en músculo esquelético de vertebrados (Carbone y Swandulla, 1989), de acuerdo quizá al diferente mecanismo de acoplamiento de E-C. En el músculo esquelético de vertebrados se ha propuesto que el mecanismo de acoplamiento de E-C es de naturaleza mecánica y está basado en la actuación de los CCVD como sensores de voltaje, y no como verdaderos canales de Ca^{2+} , transduciendo mecánicamente la señal eléctrica a los receptores de ryanodina del retículo sarcoplásmico, que actúan como canales de Ca^{2+} permitiendo la liberación de Ca^{2+} desde este orgánulo para la contracción muscular (Schneider y Chandler, 1973; Schwartz et al., 1985; Ríos y Brum, 1987; Smith et al., 1988; Ríos y Pizarro, 1991). Sin embargo, en músculo esquelético de invertebrados (Hidalgo et al., 1979; Vergara y Verdugo, 1988; Lea y Ashley, 1989; Györke y Palade, 1992) y en músculo cardíaco (véase Bers, 1991) se ha propuesto que el mecanismo de acoplamiento de E-C es de naturaleza química y se fundamenta en la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico inducida por el Ca^{2+} (abreviadamente LCIC) que fluye a través de los CCVD desde el espacio extracelular. A este respecto es interesante hacer notar que la cinética de activación de la corriente de Ca^{2+} en músculo cardíaco es semejante a la de músculo esquelético de invertebrados y más rápida que la de músculo esquelético de vertebrados. Así, el mecanismo de LCIC es posiblemente más lento que el mecanismo mecánico, en cuanto que depende del tiempo de

difusión intracelular de Ca^{2+} para su unión al sitio receptor del retículo sarcoplásmico, y requeriría una mayor velocidad en el influjo de Ca^{2+} y, por tanto, una mayor velocidad de activación de los CCVD.

Por otra parte, en tanto que la constante de tiempo de la inactivación de I_{Ca} es inferior a 25 ms, las corrientes de Ca^{2+} mediadas por CCVD tipo L en otros sistemas es superior a 500 ms. No obstante, dado el carácter persistente de I_{Ca} , el resultado funcional de ambos tipos de corrientes puede ser idéntico.

Dignos de ser reseñados son dos fenómenos, de obscura naturaleza y consistentemente encontrados, referentes a la inactivación por voltaje, a saber, la potenciación de I_{Ca} por prepulsos de baja amplitud y la menor amplitud tanto del pico como del estado estacionario de I_{Ba} (y en igual magnitud) cuando es generado por el prepulso que cuando lo es por el postpulso (siendo ambos de igual amplitud). El hecho de que I_{Ca} y no I_{Ba} presente potenciación sugiere bien que ésta es dependiente de Ca^{2+} (y que quizá el Ca^{2+} intracelular podría facilitar la apertura de los propios CCVD) o bien que $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ (ausente en solución Ba^{2+} , aun cuando este ión permea por el mismo CCVD) se inactiva por voltaje. Que la potenciación de I_{Ca} ocurra para voltajes inferiores a la activación de I_{Ca} hablaría en favor de la segunda hipótesis, aunque no puede desecharse la idea de una baja probabilidad, pero no nula, de apertura de CCVD para voltajes inferiores al umbral de activación de una conspicua I_{Ca} . Por otra parte, dos son las posibles explicaciones al segundo fenómeno, a saber, una acumulación del grado de inactivación provocada por la sucesiva aplicación de pulsos despolarizantes

de amplitud creciente y/o una acumulación de Ba^{2+} intracelular (que no es sensible a los mecanismos fisiológicos homeostáticos de Ca^{2+} citosólico) que provocaría una disminución de la fuerza electromotriz de Ba^{2+} y, por tanto, una disminución de la amplitud de I_{Ba} . Que I_{Ca} no manifieste tal fenómeno hablaría en favor de esta última interpretación, si bien la potenciación de I_{Ca} podría enmascarar este fenómeno.

Las curvas de activación e inactivación de las corrientes de Ca^{2+} mediadas por CCVD en distintos sistemas se superponen para un determinado rango de voltaje. En fibras cardíacas, ha sido demostrada la existencia de una corriente de ventana (en inglés, "window current") durante la generación de potenciales de acción en meseta, donde el valor de V_m alcanzado se corresponde con el rango de voltaje para el cual se define la corriente de ventana (Reuter y Scholz, 1977; Brown et al., 1984; Hirano et al., 1992). En este rango de voltaje ha sido sugerida la existencia de transiciones en el estado del canal, según las cuales los canales pasarían probabilísticamente de un estado abierto a un estado inactivado y luego cerrado (de acuerdo a la curva de inactivación) desde el cual volverían a pasar a un estado abierto (de acuerdo a la curva de activación), generándose así un ciclo repetitivo de distintos estados del canal (Shorofsky y January, 1992; Hirano et al., 1992). En el músculo abductor, las curvas de activación e inactivación se superponen en una región de V_m comprendida entre -45 y -20 mV, que se corresponde con la despolarización sostenida que ocurre durante la estimulación sináptica con trenes o la inyección de pulsos de corriente de larga duración, sugiriendo la existencia de una

corriente de ventana de Ca^{2+} que contribuiría, junto con el carácter persistente de I_{Ca} , al influjo sostenido de Ca^{2+} durante tanto tiempo como dure la estimulación, explicando así el comportamiento lento y tónico de este músculo.

La existencia de un pico rápido de I_{Ca} puede explicarse como necesaria para la superación de una posible inercia del sistema, sea ésta de naturaleza mecánica y/o química. En efecto, la naturaleza viscoelástica de las fibras musculares confiere al sistema muscular un alto grado de resistencia mecánica al movimiento, que necesitaría de una contracción muscular transitoria inicial más fuerte que la estacionaria; por otra parte, puesto que la contracción muscular está mediada por Ca^{2+} liberado del retículo sarcoplásmico por un mecanismo de LCIC, podría ser necesaria la existencia de un gran influjo de Ca^{2+} que elevara los niveles de Ca^{2+} citosólico desde su nivel prácticamente nulo en reposo hasta el idóneo para desencadenar la LCIC, y una vez conseguido este supuesto nivel de Ca^{2+} citosólico, la corriente de Ca^{2+} sostenida sería un mecanismo de mantenimiento de él.

De todo lo expuesto podemos concluir que la corriente de entrada del músculo abductor es una corriente de Ca^{2+} dependiente de tiempo y de voltaje mediada por un único tipo de CCVD de tipo L, cuya activación e inactivación es dependiente de voltaje y de tiempo, presentando una rápida cinética de activación, que permite alcanzar el máximo de corriente dentro de los 7 primeros milisegundos de despolarización, y una rápida cinética de inactivación, que no es total y que hace posible el influjo sostenido de Ca^{2+} mientras dura la despolarización.

III.6. CARACTERIZACION DE LA CORRIENTE DE SALIDA RETRASADA ACTIVADA POR DESPOLARIZACION (I_K)

6.I. RESUMEN

En el presente capítulo se estudia la corriente retrasada activada por despolarización (I_K).

I_K es una corriente cuya amplitud es dependiente de tiempo y de voltaje, que alcanza un estado estacionario dentro de los primeros 100 ms y que no presenta inactivación por tiempo, al menos durante los primeros 500 ms.

El potencial de inversión de I_K (E_K) varía con $[K^+]$, aproximadamente igual a la variación esperada en el potencial de equilibrio de K^+ según la ecuación de Nernst.

La conductancia subyacente a I_K (G_K) es una función sigmoidea de V_m que, siguiendo la ecuación de Boltzman, comienza en torno a -30 mV y es máxima alrededor de 70 mV. El potencial de activación media de G_K se sitúa en torno a 10 mV.

La cinética de activación y desactivación puede ser aceptablemente descrita por la cuarta potencia de una función exponencial, cuya constante de tiempo es dependiente de V_m y siempre inferior a 5 ms.

I_K es bloqueada por TEA intracelular, por altas concentraciones de TEA extracelular (superiores a 25 mM) y por Ba^{2+} extracelular.

De todo ello, concluimos que I_K es una corriente dependiente de tiempo y de voltaje, transportada por K^+ , responsable de la rectificación retardada de salida observada en condiciones de fijación de corriente y cuyas características electrofisiológicas

y farmacológicas la asemejan notablemente a otras corrientes rectificadoras retardadas presentes en diferentes sistemas.

6.II. INTRODUCCION

Hodgkin y Huxley (1952a,d) demostraron la existencia de una corriente de K^+ involucrada en la repolarización del potencial de acción en el axón gigante de calamar. Los canales de K^+ que median esta corriente recibieron el nombre de "rectificadores retardados" por ser responsables del incremento de conductancia observado tras un pequeño período de retraso durante un pulso de voltaje despolarizante (Hodgkin et al., 1949). La presencia de rectificadores retardados fue posteriormente descrita en la inmensa mayoría de células excitables, donde mostró propiedades similares aunque no idénticas. Así, actualmente el término rectificador retardado hace referencia no a un único tipo de canal de K^+ sino a una clase de canales con propiedades electrofisiológicas y funcionales muy similares que pueden, incluso, coexistir en un mismo tipo celular (Hille, 1992).

Considerando como representativo de ellos el descrito por Hodgkin y Huxley (1952a,b,d), el rectificador retardado es un canal voltaje-dependiente que se activa por despolarización y que media selectivamente una corriente de salida de K^+ que no presenta inactivación por tiempo, al menos durante los primeros 500 ms de despolarización. La cinética de activación y de desactivación de esta corriente puede ser descrita por la cuarta potencia de una función exponencial del tiempo, cuya constante de tiempo es dependiente de voltaje y siempre inferior a 10 ms. Farmacológicamente, los rectificadores retardados son generalmente sensibles a 4-aminopiridina, Ba^{2+} extra e

intracelular y Cs^+ intracelular, aunque en diferente grado dependiendo del tipo celular (Stanfield, 1983; Hille, 1992). Igualmente, todos ellos son sensible a aminas cuaternarias, fundamentalmente TEA (Tasaki y Hagiwara, 1957; Hagiwara y Saito, 1959; Hille, 1967), habiéndose demostrado la existencia de sendos receptores diferenciados en la cara extracelular e intracelular de estos canales en numerosos sistemas (Koppenhöfer y Vogel, 1969; Armstrong y Hille, 1972, Hille, 1992). La afinidad de estos receptores por TEA, difiere considerablemente entre los distintos tipos celulares, considerándose actualmente que mientras el receptor intracelular es similar en todos los sistemas estudiados, el receptor extracelular es sin embargo variable en los distintos tipos celulares (Hille, 1992); así, en tanto que los rectificadores retardados de la mayoría de los axones de vertebrados son bloqueados por bajas concentraciones de TEA extracelular (en el rango milimolar) (Hille, 1967; Stanfield, 1970; Stanfield, 1983), los de los axones de invertebrados necesitan de mayores concentraciones de TEA extracelular (al menos dos órdenes de magnitud superiores) para ser bloqueados, aunque, incluso, tales concentraciones pueden no ser ni siquiera efectivas (Tasaki y Hagiwara, 1957; Wong y Binstock, 1980).

En el presente capítulo se estudia la corriente retrasada y sostenida de salida responsable de la rectificación retardada presente en el músculo abductor.

6.III. METODOS

El potencial de membrana impuesto ha sido de -60 mV y se han utilizado dos tipos de protocolos análogos a los descritos en el apdo. III. METODOS del capítulo III.3, con la salvedad de que,

en el protocolo P2, V no es hiperpolarizante sino despolarizante. Idénticas convenciones y medidas a las allí establecidas han sido seguidas en el presente capítulo.

6.IV. RESULTADOS

La Figura 6.1 A, *izquierda* muestra el patrón típico de corrientes activadas por despolarización en solución normal consistente en una corriente inicial rápida de entrada (que denominamos I_{Ca} y que ha sido estudiada en el capítulo III.5), una inicial rápida de salida (que llamamos $I_{K(Ca)}$ y que se estudia en el capítulo III.7) y una retrasada más lenta de salida (que denominamos I_K). Tras perfusión con solución 0 mM Ca^{2+} (Figura 6.1 A, *derecha*) o tras bloqueo de los CCVD (Figura 5.1 A y B), tanto I_{Ca} como $I_{K(Ca)}$ son suprimidas, quedando así aislada I_K . La Figura 6.1 B muestra que la relación I-V de I_K medida a los 18 ms del pulso despolarizante es idéntica en solución normal (*círculos*) y en ausencia de Ca^{2+} (*triángulos*), indicando que la corriente de salida neta observada al final del pulso despolarizante corresponde prácticamente de forma exclusiva a I_K . Por otra parte, la relación I-V de I_K es claramente no lineal, presentando un umbral de generación en torno a -30 mV. Este comportamiento no lineal de I_K frente a V_m indica que I_K es una corriente voltaje-dependiente que se activa por despolarización a partir de un umbral próximo a -30 mV, y cuya activación es responsable de la existencia de una rectificación en el comportamiento eléctrico de la membrana frente a la despolarización, que recibe el nombre de rectificación de salida o retardada (véase capítulo III.1).

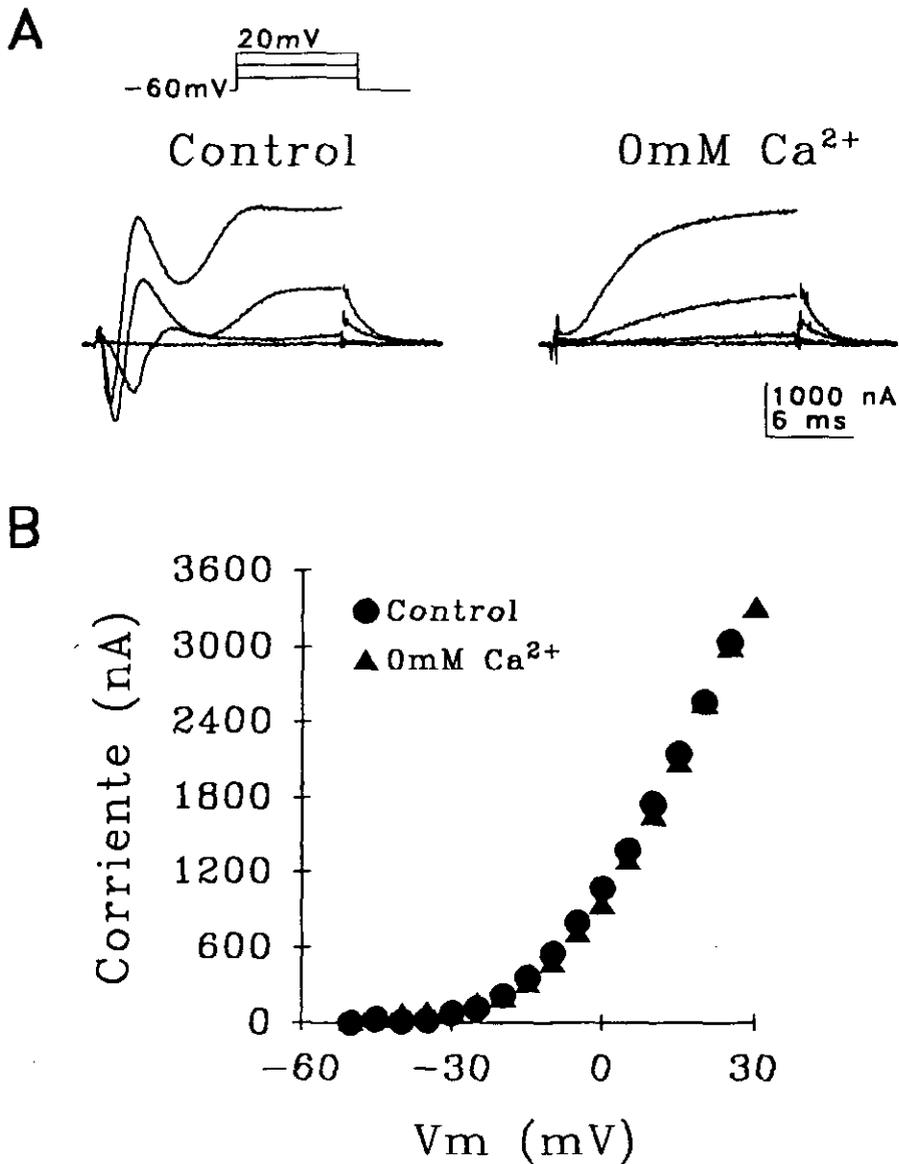


Figura 6.1. Corrientes activadas por despolarización. A, corrientes activadas por despolarización en solución normal (*Control*) y en solución 0 mM Ca^{2+} . B, relación I-V de la corriente medida a los 18 ms del pulso despolarizante en *Control* (●) y en ausencia de Ca^{2+} extracelular (▲). Las corrientes capacitiva y de pérdida han sido substraidas.

IVA. Relación I-V instantánea de I_K

La Figura 6.2 B muestra las relaciones I-V instantáneas de I_p (triángulos) e I_K (círculos) en solución 0 mM Ca^{2+} obtenidas a partir de los registros mostrados en la Figura 6.2 A y B, respectivamente. Tal como ha quedado descrito en el capítulo III.2, la relación I-V de I_p es lineal, ajustándose aceptablemente ($r > 0.99$) a una regresión de primer orden (línea continua) cuya pendiente (esto es, G_p) es igual a $5.46 \mu S$. Igualmente, la relación I-V instantánea de $I_{(r)}^0$, medida a los 3 ms del inicio del pulso F, cuando I_K ha sido activada por un pulso $V = 0$ mV, se ajusta aceptablemente ($r > 0.99$) a una regresión de primer orden. Así, puesto que I_p cumple la ley de Ohm, podemos concluir que I_K también cumple la ley de Ohm, y que, por tanto, verifica la ecuación

$$I_K = G_K (V_m - E_K), \quad (6.1)$$

donde G_K y E_K son la conductancia y el potencial de inversión de I_K , respectivamente.

Por otra parte, las pendientes de las regresiones lineales de las relaciones I-V instantáneas de I_p e $I_{(r)}^0$, que representan la conductancia de reposo y ésta más G_K a 0 mV, respectivamente, son 5.46 y $8.50 \mu S$, respectivamente, lo cual confirma la existencia de un incremento de la conductancia de membrana que subyace a la presencia de I_K , y que, por tanto, I_K es una corriente voltaje y tiempo-dependiente que se activa por despolarización.

El punto de intersección de ambas regresiones lineales es -65.89 mV y corresponde a E_K (véase la deducción análoga hecha para E_{AB} en el capítulo III.3).

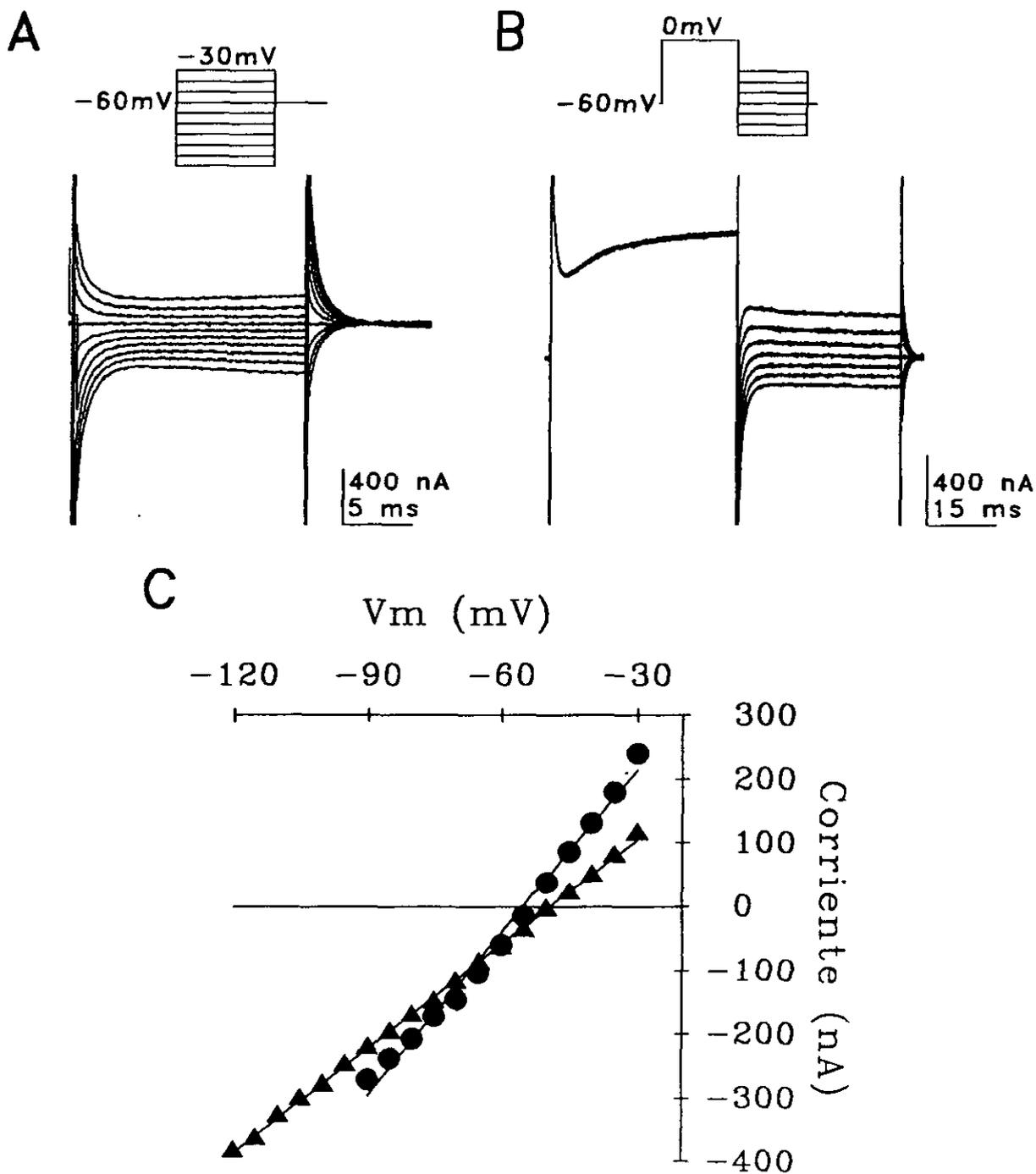


Figura 6.2. Corrientes instantáneas en solución 0 mM Ca^{2+} . A, corrientes totales generadas por el protocolo P1 desde $H = -60$ a V variable entre -30 y -120 mV y a $F = H$. B, corrientes totales generadas por el protocolo P2 desde $H = -60$ mV a $V = 0$ mV y a F variable entre -30 y -90 mV. C, relaciones I-V de $I_{(v)}$ (\blacktriangle) e $I_{(r)}$ (\bullet) ajustadas a regresiones de primer orden (líneas continuas).

IVB. Naturaleza iónica de I_K

En la Figura 3.8 se ha mostrado que E_K varía desde -60.1 a -46.5 mV en 5.4 y 10.8 mM K^+ extracelular, respectivamente, sin que existan variaciones significativas en E_{Cl} . Puesto que la variación de E_K es próxima a la esperable variación del potencial de equilibrio de K^+ según la ecuación de Nernst (asumiendo constante $[K^+]_i$), podemos por tanto concluir que I_K es selectivamente transportada por K^+ .

IVC. Dependencia de voltaje de I_K

La dependencia de voltaje de I_K , caracterizada por un parámetro adimensional de activación (n_∞) similar al parámetro definido por Hodgkin y Huxley (1952d) para el rectificador retardado presente en el axón gigante de calamar, se representa en la Figura 6.3. n_∞ representa la probabilidad conjunta en el estado estacionario de activación de los canales que median I_K y varía entre cero y uno, según G_K varía entre cero y su valor máximo ($G_{K,max}$). El parámetro n_∞ ha sido calculado a partir de las corrientes generadas por el protocolo P1 (Figura 6.3 A) en el cual V es variable y F constante.

De forma análoga a como ha quedado expuesto en el apdo. IVB del capítulo III.3 para I_{AB} , se puede demostrar que la variación de G_K es directamente proporcional a $I_{(F)}^0$, y que, por tanto, se verifica la ecuación

$$n_\infty = (I_{(F)}^0 - I_{(F),min}^0) / (I_{(F),max}^0 - I_{(F),min}^0), \quad (6.2)$$

considerando ahora que $I_{(F)}^0$ es resultado de pulsos de voltaje V despolarizantes (y no hiperpolarizantes, como en el caso de I_{AB}). La Figura 6.3 B muestra la relación entre n_∞ y V_m , es decir, la curva de activación de I_K , donde los valores experimentales se

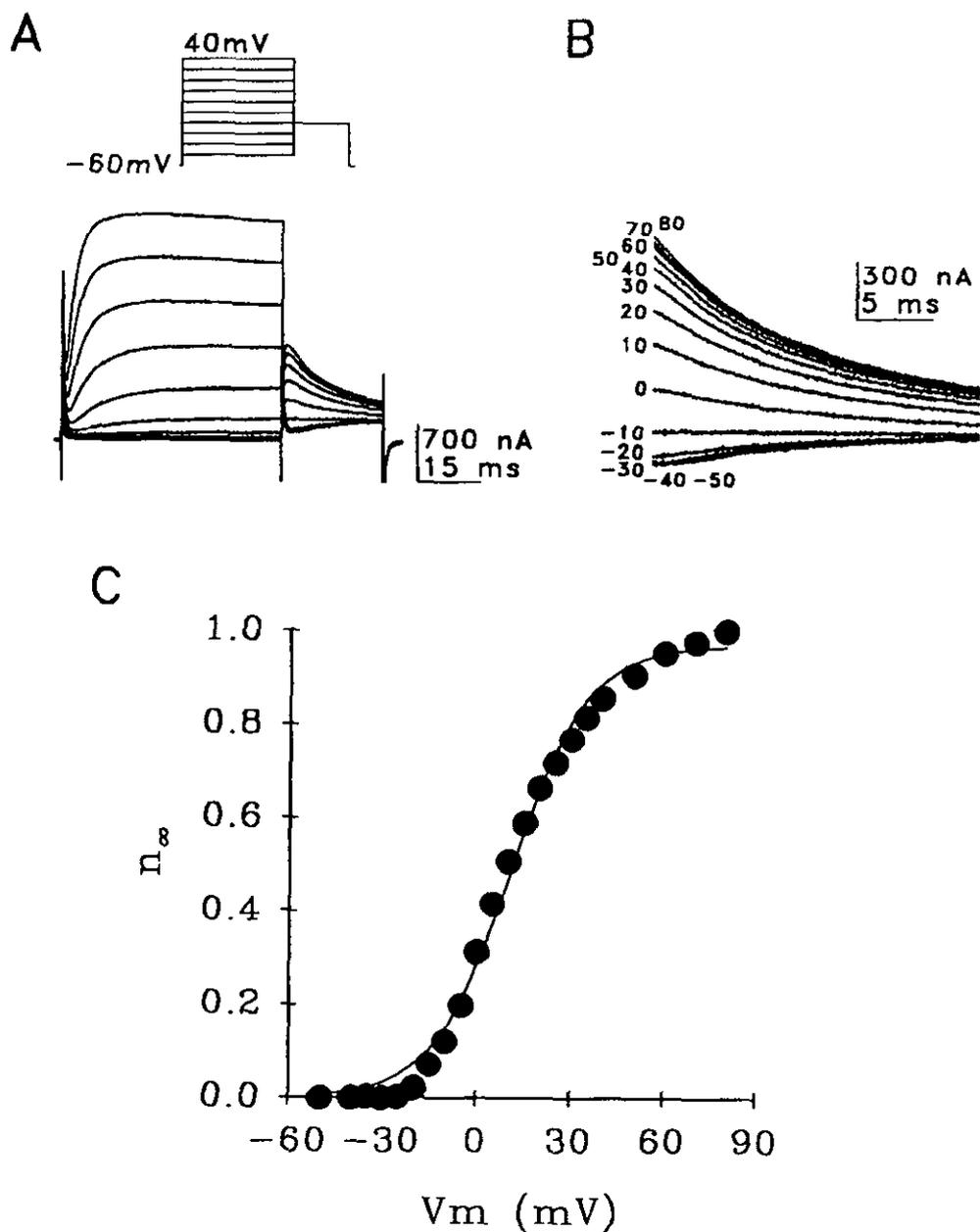


Figura 6.3. Dependencia de voltaje de G_k . A, corrientes totales provocadas por el protocolo P1 desde $H = -60\text{ mV}$ a V variable entre -50 y 40 mV y a $F = -20\text{ mV}$. B, registro expandido de las corrientes de cola; próximo a cada registro se indica el valor correspondiente de V . C, curva de activación de G_k , donde los valores de n_∞ han sido calculados a partir de la ec. (6.2) y ajustados a la ec. (6.3) (línea continua).

ajustan aceptablemente ($r > 0.99$) a la ecuación

$$n_{\infty} = \bar{n}_{\infty} [1 + \exp(V_0 - V/S)]^{-1}, \quad (6.3)$$

deducida de la ecuación de Boltzman, en la que \bar{n}_{∞} es el valor máximo de n_{∞} (generalmente 1), V_0 es V_m para el cual $n_{\infty} = \frac{1}{2}\bar{n}_{\infty}$ y S es un parámetro que define la pendiente de la curva.

Los resultados mostrados en la Figura 6.3 B indican que G_K se activa con la despolarización de forma sigmoidea de acuerdo a la ecuación de Boltzman (indicando que la probabilidad de apertura de un canal es independiente del resto) a partir de un umbral en torno a -30 mV, que está medio activada a 10.82 ± 0.90 mV, que su crecimiento se realiza según una pendiente S de 12.24 ± 0.71 , y que está máximamente activada alrededor de 70 mV.

IVD. Dependencia de tiempo de I_K

El curso temporal de la activación por despolarización de I_K sigue una curva sigmoidea, alcanza un máximo dentro de los primeros 15 ms y no presenta inactivación por tiempo (al menos durante los primeros 500 ms). Tras la repolarización de V_m , I_K se desinactiva siguiendo un curso temporal exponencial, alcanzando su máxima desinactivación a los pocos milisegundos de la repolarización (Figura 6.4 A).

El modelo más simple capaz de explicar tal comportamiento se basaría en suponer que G_K es proporcional a la cuarta potencia de una variable adimensional (n) que varía entre cero y uno, y que sigue una reacción de primer orden entre dos estados posibles (n y $n-1$), que son función de V_m y no de tiempo (Hodgkin y Huxley, 1952d). Así, la activación de G_K desde cero hasta su máximo durante un pulso de voltaje es función del tiempo (t) según la expresión $(1 - \exp(-t))^4$ (esto es, según una curva

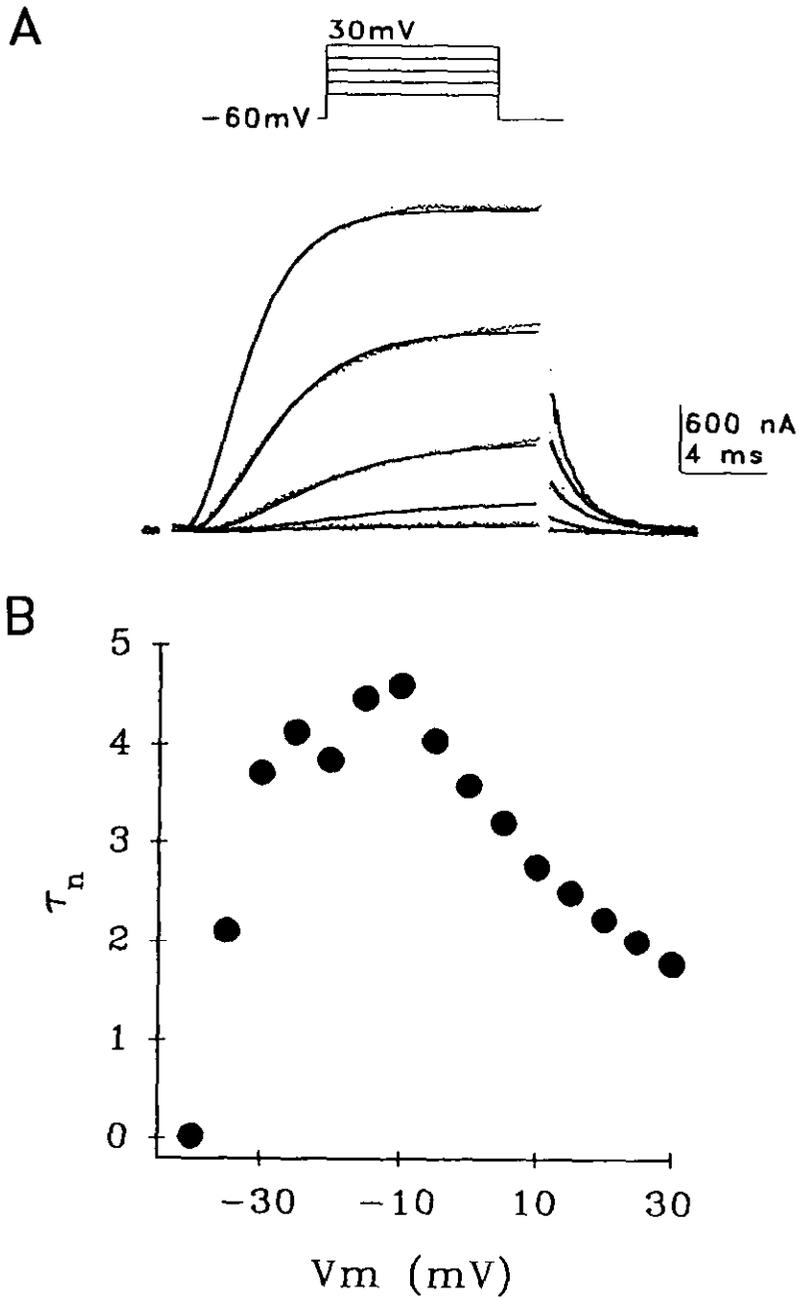


Figura 6.4. Dependencia de tiempo de I_K . A, corrientes activadas por despolarización en solución 0 mM Ca^{2+} (líneas punteadas) ajustadas a la ec. (6.9) (líneas continuas). Las corrientes capacitiva y de pérdida han sido sustraídas. B, relación τ -V de la constante de tiempo de activación de I_K (τ_n).

sigmoidea) y su desactivación es función de $\exp(-4t)$ (es decir, según una función exponencial simple). Según todo ello, se cumplirían las ecuaciones

$$I_K = n^4 I_{K,\infty} \quad (6.4)$$

y

$$dn/dt = \alpha_n(1-n) - \beta_n, \quad (6.5)$$

donde $I_{K,\infty}$ es el máximo de I_K para cada valor de V_m y donde α_n y β_n son las constantes cinéticas de la reacción de primer orden dependiente de V_m . La solución de la ecuación diferencial (6.5) que satisface las condiciones de contorno según las cuales $n = n_0$ para $t = 0$ (donde n_0 es el valor de n en el reposo) es

$$n = n_\infty - (n_\infty - n_0) \exp(-t/\tau_n), \quad (6.6)$$

siendo n_∞ el valor máximo para cada V_m de n , y donde

$$n_\infty = \alpha_n / (\alpha_n + \beta_n), \quad (6.7)$$

y

$$\tau_n = (\alpha_n + \beta_n)^{-1}, \quad (6.8)$$

De las ecuaciones (6.4) y (6.6) se puede deducir que I_K es función del tiempo según la expresión

$$I_K(t) = [(I_{K,\infty})^4 - [(I_{K,\infty})^4 - (I_{K,0})^4] \exp(-t/\tau_n)]^{1/4}, \quad (6.9)$$

donde $I_{K,0}$ es el valor de I_K para $t = 0$ y τ_n es la constante de tiempo de la exponencial.

La Figura 6.4 A muestra que la ecuación (6.9) describe aceptablemente ($r > 0.99$) el curso temporal de activación y desactivación de I_K . La constante de tiempo de activación de I_K es dependiente de V_m , como cabía esperar de la ecuación (6.8), manteniéndose siempre inferior a 5 ms y mostrando una relación τ - V en forma de campana asimétrica invertida con un máximo en torno a -10 mV (Figura 6.4 B).

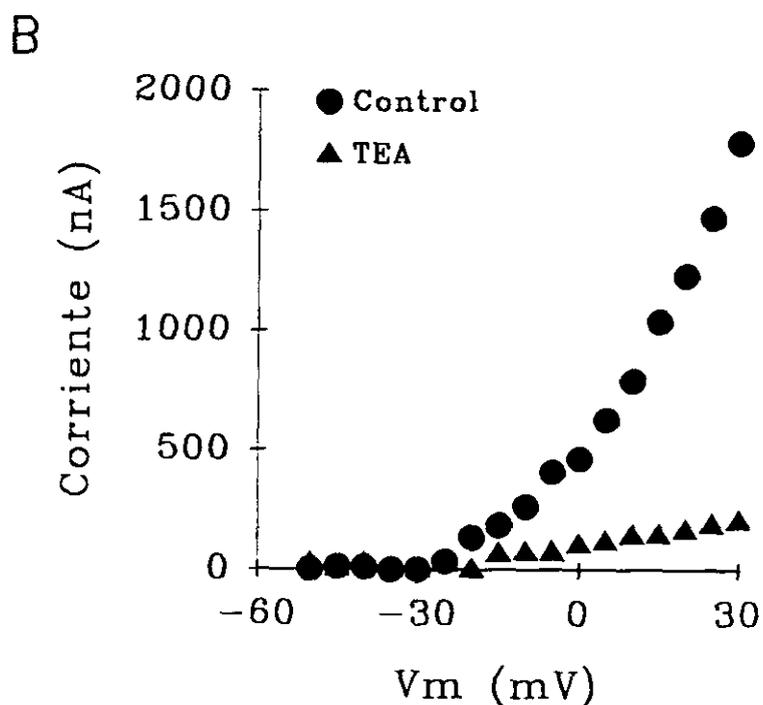
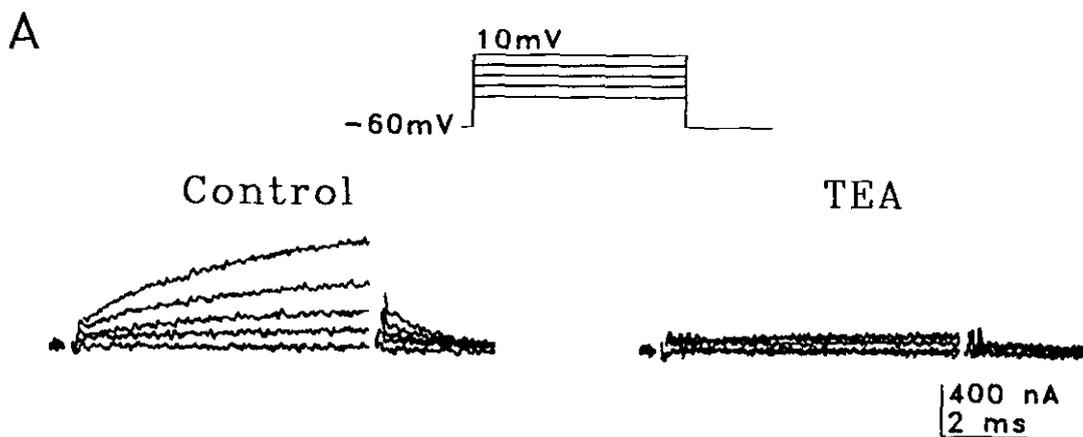


Figura 6.5. Efecto de TEA extracelular sobre I_K . A, corrientes activadas por despolarización en solución 0 mM Ca^{2+} (Control) y en solución 0 mM Ca^{2+} , 100 mM TEA (TEA). B, relación I-V de I_K medida al final del pulso despolarizante en ausencia (●) y presencia de TEA (▲). Las corrientes capacitiva y de pérdida han sido substraídas.

IVE. Efecto de TEA

La Figura 6.5 A muestra corrientes activadas por despolarización en solución 0 mM Ca^{2+} (Control) y en solución 0 mM Ca^{2+} , 100 mM TEA. La relación I-V de I_K medida al final del pulso despolarizante ilustra el notable efecto bloqueante de TEA sobre I_K . Este efecto bloqueante es dependiente de la concentración extracelular de TEA, pues menores concentraciones de TEA extracelular producen un menor bloqueo de I_K (no mostrado). Son necesarias, sin embargo, concentraciones superiores a 25 mM para provocar bloqueos apreciables de I_K , lo cual sugiere una menor afinidad de los receptores extracelulares de TEA de los canales de I_K del músculo abductor respecto a otros receptores de corrientes semejantes en distintos sistemas (véase apdo. 6.II).

Por otra parte, la inyección intracelular de TEA también produce un acusado bloqueo de I_K , en la inmensa mayoría de los casos prácticamente total (véanse las Figuras 5.2 y 5.7). Si bien la concentración intracelular alcanzada tras inyección de TEA es desconocida, la mayor rapidez observada en ejercer el bloqueo respecto a la perfusión con TEA extracelular y el alto grado de bloqueo alcanzado, sugiere que los receptores intracelulares de TEA de los canales de I_K presentan mayor afinidad que los extracelulares.

IVF. Efecto de Ba^{2+} extracelular

Los iones Ba^{2+} son reconocidos bloqueantes extracelulares de corrientes de K^+ semejantes a I_K en numerosos sistemas (Arhem, 1980; Armstrong et al., 1982; Hille, 1992). En la Figura 6.6 se muestra el efecto de la adición de 13.5 mM Ba^{2+} sobre I_K obtenida

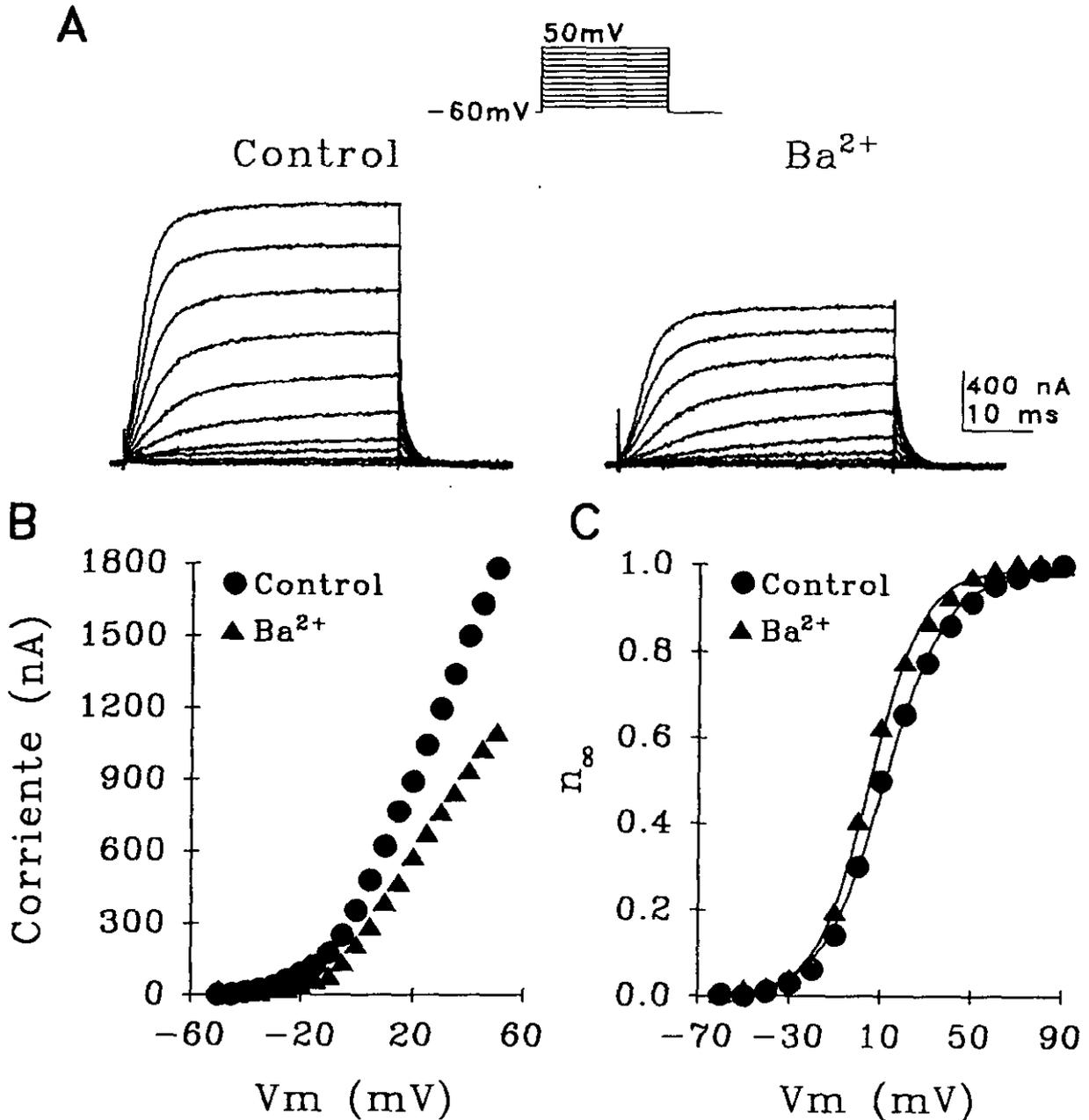


Figura 6.6. Efecto de Ba^{2+} extracelular sobre I_{κ} . **A**, corrientes activadas por despolarización en solución 5 mM Cd^{2+} (Control) y tras adición de 13.5 mM Ba^{2+} . Las corrientes capacitiva y de pérdida han sido substraidas. **B**, relación I-V de I_{κ} medida a los 40 ms del pulso despolarizante en ausencia (●) y presencia de Ba^{2+} (▲). **C**, curvas de activación de G_{κ} en ausencia (●) y presencia de Ba^{2+} (▲), donde los valores de n_{∞} calculados a partir de la ec. (6.2) han sido ajustados a la ec. (6.3) (líneas continuas). Los parámetros de ajuste son: en Control, $\bar{n}_{\infty} = 0.98 \pm 0.01$, $V_0 = 11.25 \pm 0.62$ mV, $S = 13.18 \pm 0.53$; en 13.5 mM Ba^{2+} , $\bar{n}_{\infty} = 0.99 \pm 0.01$, $V_0 = 5.14 \pm 0.48$ mV, $S = 11.35 \pm 0.41$.

en solución 5 mM Cd^{2+} (Control), donde I_{Ca} e $I_{\text{K(Ca)}}$ han sido bloqueadas, observándose que I_{K} es sensiblemente menor en Ba^{2+} que en el control. Esta disminución de I_{K} , que ocurre sin ser acompañada de variaciones en E_{K} (no mostrado) ni en el umbral de activación, es de alrededor de un 40% para los distintos pulsos de voltaje, tal como muestra la relación I-V de I_{K} medida a los 17 ms del pulso despolarizante (Figura 6.6 B). Esta constancia en el grado de disminución de I_{K} sugiere que la dependencia de voltaje de I_{K} no se ve modificada por Ba^{2+} extracelular. En efecto, la Figura 6.6 C muestra que las curvas de activación de I_{K} en presencia (triángulos) y ausencia (círculos) de Ba^{2+} , donde los valores experimentales han sido obtenidos según la ecuación (6.2) y han sido aceptablemente ajustados ($r > 0.99$) a la ecuación (6.3), no son substancialmente diferentes, lo cual indica que el efecto de Ba^{2+} sobre I_{K} no es debido al desplazamiento hacia valores despolarizados de su curva de activación, como ha sido descrito en otros sistemas para el incremento extracelular de iones divalentes (véase capítulo III.4).

Puesto que Ba^{2+} extracelular no modifica E_{K} ni la dependencia de voltaje de G_{K} , podemos concluir que Ba^{2+} extracelular ejerce un verdadero bloqueo de los canales que median I_{K} .

6.V. DISCUSION

En el presente capítulo se estudia la corriente retrasada de salida (I_{K}) activada por despolarización y responsable de la rectificación retardada de salida observada en condiciones de fijación de corriente (véase capítulo III.1).

I_{K} es una corriente transportada por K^+ dependiente de voltaje y de tiempo. La dependencia de voltaje de su activación

muestra que ésta ocurre a partir de valores próximos a -30 mV, crece con V_m de forma sigmoidea según la ecuación de Boltzman (lo cual indica que la probabilidad de apertura de un canal es independiente del resto) y encuentra su saturación en torno a 70 mV. En cuanto a la dependencia de tiempo de I_K , su curso temporal puede ser descrito por la potencia cuarta de una función exponencial, cuya constante de tiempo es inferior a 5 ms y que alcanza un estado estacionario persistente en un tiempo inferior a 15 ms. Debe hacerse notar la extremada rapidez de activación y desactivación de I_K , aun cuando se ha dado en calificarla como retrasada y lenta en relación a I_{Ca} e $I_{K(Ca)}$, que permite la pronta repolarización de V_m tras la despolarización y participa así en la imposibilidad de generación de potenciales de acción "todo o nada" (véase capítulo III.8).

Aun cuando I_K ha sido definida como persistente por no presentar inactivación por tiempo, al menos durante los primeros 500 ms, debe indicarse que, en ocasiones, durante pulsos de voltaje de mayor duración ocurre una progresiva y muy lenta reducción de I_K . Si este fenómeno es consecuencia de una parcial redistribución de K^+ a través de la membrana (Frankenhaeuser y Hodgkin, 1956), si es resultado de una muy lenta inactivación de I_K (Nakajima et al., 1962; Nakajima y Kusano, 1966; Nakajima, 1966; Adrian et al., 1970) o si es debido a la existencia de distintos componentes de I_K (Dubois, 1981; Dubois, 1983; Benoit y Dubois, 1986) nos es desconocido y su elucidación requeriría nuevos y profundos estudios que escapan a los objetivos aquí perseguidos.

Las características electrofisiológicas y farmacológicas de

I_K presentan acusadas similitudes con otros rectificadores retardados presentes en distintos sistemas. Así, por ejemplo, I_K sólo se diferencia del rectificador retardado clásico descrito en el axón gigante de calamar (Hodgkin y Huxley, 1952a,b,d) por presentar una curva de activación desplazada hacia valores más despolarizados, siendo todas sus demás características prácticamente idénticas. Estas diferencias y analogías encuentran significado a partir de las diferencias y analogías funcionales de ambos sistemas. En efecto, en ambos casos la función de ambas corrientes consiste en la repolarización de V_m tras un potencial de acción, sin embargo, el umbral de activación de I_{Ca} del músculo abductor es alrededor de 20 mV más despolarizado que el de la corriente de Na^+ del axón gigante de calamar.

Además de la función de I_K como corriente responsable de la repolarización del potencial de acción de Ca^{2+} y de la rectificación retardada, las implicaciones funcionales de I_K relativas a la generación de potenciales de acción graduados por el músculo abductor son puestas de manifiesto en el capítulo *III.8*.

III.7. CARACTERIZACION DE LA CORRIENTE DE SALIDA INICIAL ($I_{K(Ca)}$)

7.I. RESUMEN

En el presente capítulo se estudia la corriente inicial de salida presente durante la despolarización ($I_{K(Ca)}$).

$I_{K(Ca)}$ es una corriente transportada por K^+ que desaparece en ausencia de Ca^{2+} extracelular o por bloqueo de los CCVD. Es, por tanto, una corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} .

Su amplitud crece con V_m y es dependiente de tiempo, mostrando una cinética de activación extraordinariamente rápida que le permite alcanzar un máximo dentro de los primeros 5 ms de la despolarización. Mediante una rápida e incompleta inactivación, $I_{K(Ca)}$ decrece hasta alcanzar un estado estacionario dentro de los 10 primeros milisegundos, en el cual se mantiene, al menos, durante 100 ms.

Además de su dependencia de Ca^{2+} , la relación I-V de $I_{K(Ca)}$ en el estado estacionario sugiere que esta corriente es también dependiente de voltaje.

$I_{K(Ca)}$ es insensible a la inyección intracelular de EGTA, un agente quelante de Ca^{2+} , pero es totalmente suprimida por inyección intracelular de BAPTA, un agente quelante de Ca^{2+} cuya constante de afinidad por él es semejante a EGTA pero cuya cinética es varios órdenes de magnitud más rápida.

$I_{K(Ca)}$ es bloqueada extracelular e intracelularmente por TEA.

Por tanto, podemos concluir que $I_{K(Ca)}$ es una corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} , cuyas características la asemejan a otras $I_{K(Ca)}$ descritas en diferentes sistemas que son mediadas por canales de tipo BK.

7.II. INTRODUCCION

El aumento de la permeabilidad de K^+ en la membrana de eritrocitos originada por el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ fue la primera evidencia que sugería la participación del Ca^{2+} intracelular en la activación de canales iónicos de membrana (Gardos, 1958). Esta sugerencia se vio corroborada por posteriores resultados que demostraban la activación de una corriente de K^+ por inyección intracelular de Ca^{2+} en neuronas de moluscos (Meech y Strumwasser, 1970). Ulteriores trabajos han demostrado la existencia de corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} intracelular ($I_{K(Ca)}$) en gran número de células excitables (Meech, 1974; Heyer y Lux, 1976; véanse las revisiones Blatz y Magleby, 1987; Latorre et al., 1989).

Considerando su sensibilidad a Ca^{2+} , su dependencia de voltaje, sus propiedades farmacológicas y su conductancia unitaria, los canales iónicos de membrana que median las distintas $I_{K(Ca)}$ han sido clasificados en dos tipos, a saber, canales Maxi-K o BK y canales SK. Los canales BK se caracterizan por presentar una menor sensibilidad a Ca^{2+} intracelular y una mayor conductancia unitaria que los canales SK (de ahí sus nombres, del inglés "big", grande, y "small", pequeña) (Blatz y Magleby, 1987; Latorre et al., 1989) y por mostrar además dependencia de voltaje, que sin embargo no presentan los canales SK (Gorman y Thomas, 1980; Pallota et al., 1981; Moczydlowski y Latorre, 1983; Latorre et al., 1989). Farmacológicamente, ambos tipos de canales pueden ser diferenciados por su sensibilidad a distintas sustancias. Así, en tanto que los canales BK son bloqueados por bajas concentraciones (en el rango nanomolar) de

Charybdotoxina (una toxina obtenida a partir del veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus*) (Miller et al., 1985; Levene y Simonneau, 1986; Latorre et al., 1989) y TEA extracelular e intracelular (K_0 alrededor de 1 y 50 mM, respectivamente) (Blatz y Magleby, 1984; Yellen, 1984; Villarroel et al., 1988; Latorre et al., 1989), los canales SK son insensibles a estas sustancias (véase Blatz y Magleby, 1987; Latorre et al., 1989). Por otra parte, Apamina (una toxina presente en el veneno de abeja) a concentraciones en el rango nanomolar bloquea selectivamente los canales SK, sin afectar a los canales BK (Hugues et al., 1982; Blatz y Magleby, 1986; Romey y Lazdunski, 1984).

Las mayoría de las funciones que pueden realizar las distintas $I_{K(Ca)}$ en diferentes células están por elucidar, aun cuando se han realizado notables progresos en el conocimiento de algunas de ellas. Así, diferentes autores han sugerido la participación de los canales BK en la fase de repolarización del potencial de acción en neuronas del ganglio simpático de rana (Adams et al., 1982) y en células cromafines (Marty, 1983) y su intervención en la regulación de procesos de secreción en las células β del páncreas (Petersen y Maruyama, 1984) y en las células exocrinas de las glándulas salivares (Blatz y Magleby, 1987). Además, distintas $I_{K(Ca)}$ mediadas por canales BK y SK parecen ser también responsables de la generación rítmica de ráfagas de potenciales de acción en células marcapaso de moluscos (Gorman y Thomas, 1978; Gorman et al., 1981) y de la adaptación de la frecuencia de potenciales de acción en numerosas neuronas (Madison y Nicoll, 1984; Yarom et al., 1985). Por otra parte, se ha sugerido que, en músculo de vertebrados, los canales BK

podrían actuar repolarizando y estabilizando la membrana de los túbulos transversos tras un potencial de acción, y que los canales SK prolongarían la generación repetitiva de potenciales de acción al mantener V_m en valores hiperpolarizados entre cada potencial de acción, permitiendo así la desinactivación de los canales de Na^+ (Blatz y Magleby, 1987).

En músculo de invertebrados ha sido descrita una $I_{K(Ca)}$ de rápida activación y transitoria sensible a TEA extracelular (Mounier y Vassort, 1975b; Hencsek et al., 1978).

El presente capítulo pretende el estudio de $I_{K(Ca)}$ presente en el músculo abductor del cangrejo de río.

7.III. METODOS

Los métodos utilizados para el estudio contenido en el presente capítulo no presentan peculiaridades propias, habiéndose empleado aquéllos generales descritos en *II. MATERIALES Y METODOS*.

7.IV. RESULTADOS

Tanto la corriente inicial de entrada como la inicial de salida son suprimidas por la presencia extracelular de distintos bloqueantes específicos de los CCVD o por la ausencia de Ca^{2+} extracelular (Figura 7.1 A), lo cual sugiere que la corriente inicial de salida es dependiente del flujo de iones Ca^{2+} al interior celular, es decir, es dependiente de Ca^{2+} . La substracción a las corrientes registradas en solución control de las obtenidas en solución 5 mM Cd^{2+} (esto es, de I_x) permite observar I_{Ca} e $I_{K(Ca)}$ conjuntamente. En la Figura 7.1 A, *Control- Cd^{2+}* se observa que tras un componente inicial de entrada seguido por otro de salida, la corriente neta estacionaria es

prácticamente nula, lo cual sugiere que $I_{K(Ca)}$ presenta un carácter sostenido, puesto que I_{Ca} es persistente (véase capítulo III.5). En efecto, en la Figura 7.1 B, correspondiente a otra fibra muscular, se aprecia que junto a los componentes iniciales de entrada y salida, la corriente total obtenida por substracción presenta un componente de salida sostenido, demostrando el carácter persistente de $I_{K(Ca)}$. Considerando además que I_{Ca} es también persistente, la amplitud de $I_{K(Ca)}$ es incluso mayor que la amplitud de la corriente neta de salida. En un 32% de las 25 fibras así estudiadas, la corriente neta en el estado estacionario es de salida (Figura 7.1 A), y en un 20% lo es de entrada, según $I_{K(Ca)}$ sea mayor o menor que I_{Ca} , respectivamente. En la mayoría de los casos (48%), como el mostrado en la Figura 7.1 A, la corriente neta es prácticamente cero, indicando que la amplitud de $I_{K(Ca)}$ es muy semejante a la de I_{Ca} (pero de signo opuesto). La relevancia funcional de la similitud de amplitudes de I_{Ca} e $I_{K(Ca)}$ en el estado estacionario se expondrá en el capítulo III.8.

La relación I-V del pico de $I_{K(Ca)}$ muestra un comportamiento no lineal (Figura 7.1 C, triángulos vacíos) que sugiere un carácter voltaje dependiente de $I_{K(Ca)}$, si bien los procesos regulados por $[Ca^{2+}]$, adquieren una dependencia de voltaje que refleja la dependencia de voltaje del influjo de Ca^{2+} a través de los CCVD (Figura 7.1 C, círculos vacíos). No obstante, la disminución del pico de I_{Ca} para valores muy despolarizados, que implica una disminución del flujo de Ca^{2+} , no se ve reflejado en una disminución paralela de $I_{K(Ca)}$, lo cual sugiere una posible dependencia de voltaje de $I_{K(Ca)}$ añadida a su dependencia de Ca^{2+} .

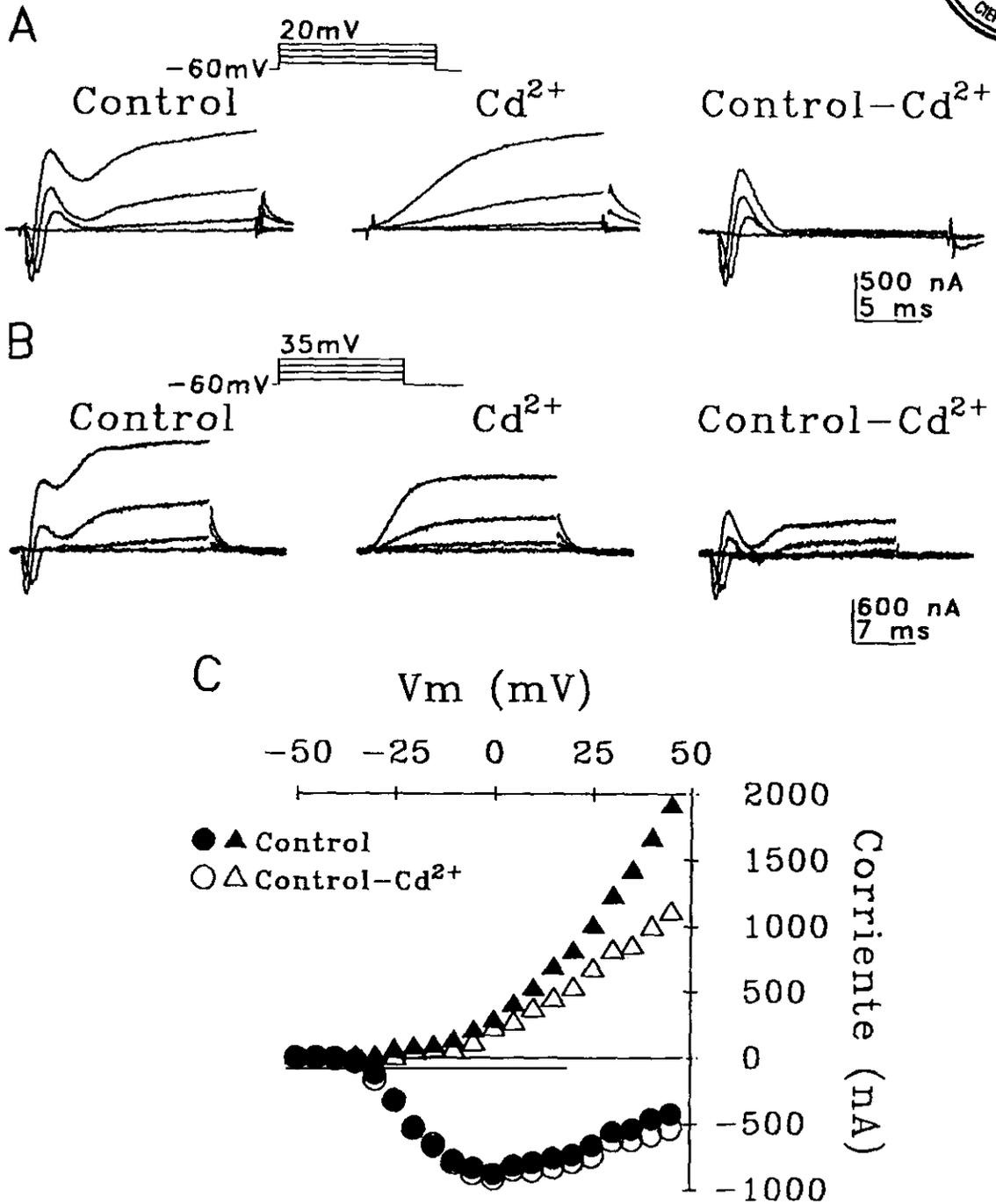


Figura 7.1. Corrientes activadas por despolarización. A y B, corrientes activadas por despolarización en solución normal (Control), en solución 5 mM Cd^{2+} , y tras substracción de éstas (Control- Cd^{2+}), en células diferentes. C, relación I-V del pico de I_{Ca} (círculos) e $I_{K(Ca)}$ (triángulos) en control (símbolos llenos) y tras substracción de la corriente en 5 mM Cd^{2+} (símbolos vacíos); misma célula que en B. Como en el resto de figuras del presente capítulo, las corrientes capacitiva y de pérdida han sido substraidas.

IVA. Naturaleza iónica de $I_{K(Ca)}$

El estudio de la naturaleza iónica de $I_{K(Ca)}$ siguiendo los métodos convencionales a partir de las corrientes de cola se enfrenta a considerables limitaciones como consecuencia de la imposibilidad de aislar $I_{K(Ca)}$ de otras corrientes. En efecto, ninguna de las sustancias utilizadas se ha revelado como bloqueante específico de $I_{K(Ca)}$, de forma que permitiese su estudio por substracción de las corrientes totales en ausencia y presencia de este bloqueante. Así, el estudio de $I_{K(Ca)}$ presenta las siguientes dificultades: a) la presencia de $I_{K(Ca)}$ implica necesariamente la existencia de I_{Ca} ; b) el incremento de $[K^+]$ produce la despolarización de la membrana (véase capítulo III.3) y la consiguiente contracción muscular.

Sin embargo, numerosas evidencias permiten concluir que $I_{K(Ca)}$ es transportada por K^+ . De la relación I-V del máximo de $I_{K(Ca)}$ se puede deducir que el potencial de inversión de $I_{K(Ca)}$ ($E_{K(Ca)}$) es inferior a -40 mV. Más aún, las corrientes de cola de salida (aun cuando estén contaminadas por las corrientes de cola de I_{Ca}) mostradas en la Figura 5.1 D indican que $E_{K(Ca)}$ es menor de -60 mV. Por tanto, considerando el potencial de equilibrio de los distintos iones, $I_{K(Ca)}$ no puede ser transportada por Na^+ ni por Ca^{2+} sino que debe serlo por K^+ o por Cl^- . Por otra parte, la sensibilidad de $I_{K(Ca)}$ a TEA (véase más abajo), un reconocido bloqueante específico de corrientes de K^+ y no de Cl^- , sugiere enérgicamente que el ión transportador de $I_{K(Ca)}$ es K^+ y no Cl^- . Por último, la invariabilidad de $I_{K(Ca)}$ en solución 0 mM Cl^- , donde sí varía E_{Cl} , constituye un argumento decisivo a favor de esta sugerencia.

Por tanto, podemos concluir que $I_{K(Ca)}$ es una corriente de salida transportada por K^+ .

IVB. Efecto de iones que modifican I_{Ca}

Cuando el Ca^{2+} extracelular es totalmente reemplazado por Ba^{2+} , la corriente inicial de entrada persiste, siendo ahora transportada por Ba^{2+} y no por Ca^{2+} (véase capítulo III.5). Sin embargo, la ausencia de $I_{K(Ca)}$ en tales condiciones (véanse Figuras 5.3 y 5.4) indica una alta especificidad de los mecanismos de activación por Ca^{2+} de los canales que median $I_{K(Ca)}$, de manera que los iones Ba^{2+} no son capaces de simular el efecto de los iones Ca^{2+} para producir la activación de $I_{K(Ca)}$, tal como ocurre para numerosos procesos dependientes de Ca^{2+} intracelular (véase capítulo III.5)

IVC. Efecto de quelantes de Ca^{2+} intracelulares

IVCa. EGTA

El compuesto EGTA es un agente quelante de Ca^{2+} cuya constante de afinidad (K_d) varía entre 10^{-6} y 10^{-7} M para valores fisiológicos de pH (alrededor de 7) (Adler et al., 1991), que, a diferencia de la del compuesto EDTA (Portzehl et al., 1964), no se ve modificada significativamente por la presencia de Mg^{2+} (incluso a concentraciones mM) debido a su baja afinidad por él (Zucker y Steinhardt, 1978; Thomas, 1982). La Figura 7.2 A muestra que la inyección intracelular de EGTA no produce modificaciones substanciales en las corrientes activadas por despolarización. Tampoco aparecen variaciones significativas en la relación I-V del pico de I_{Ca} (Figura 7.2 B) ni en el supuesto E_{Ca} , como cabría esperar por la ya de por sí baja $[Ca^{2+}]_i$, ni en la relación I-V del pico de $I_{K(Ca)}$.

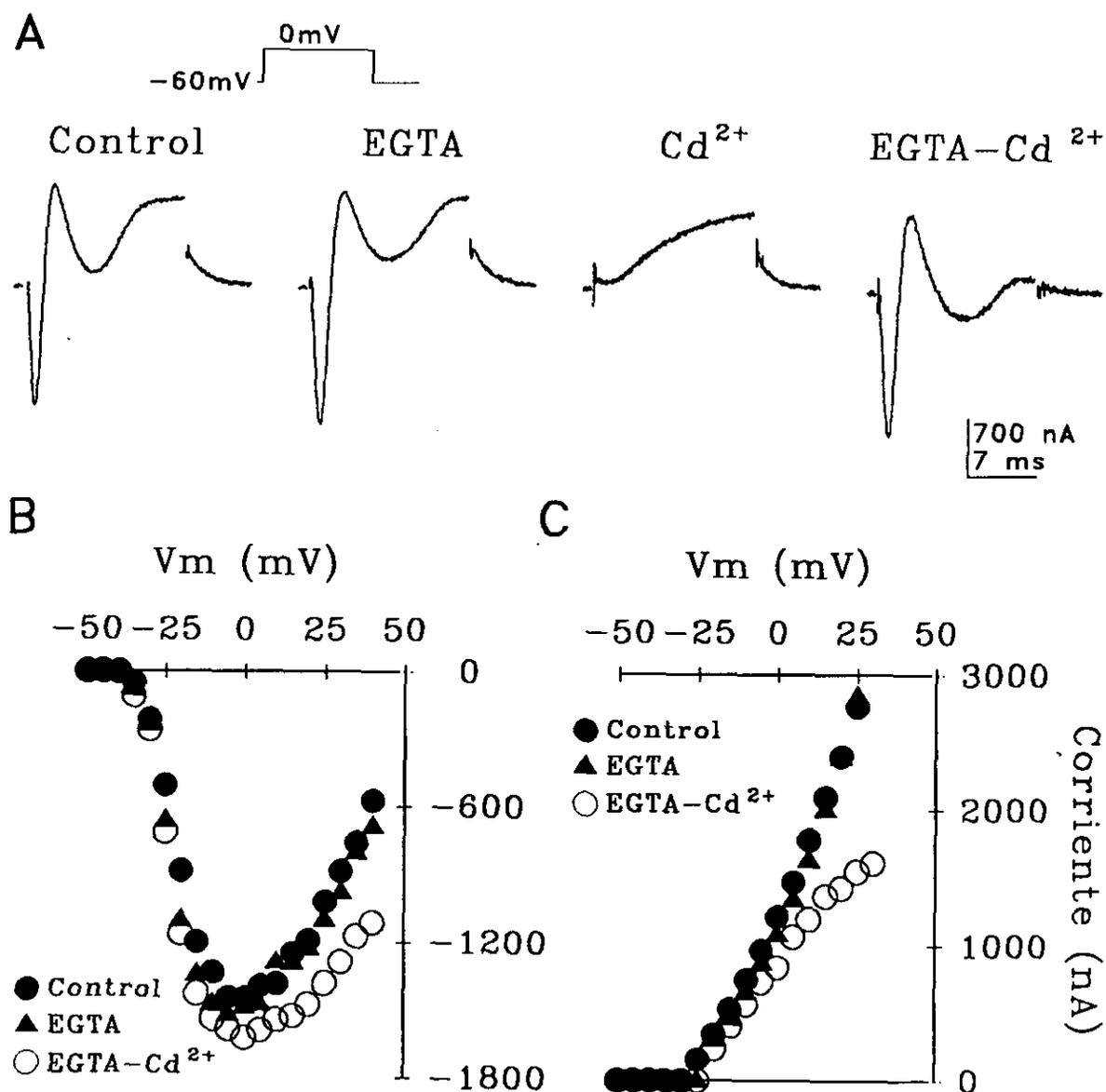


Figura 7.2. Efecto de EGTA intracelular. A, corrientes activadas por despolarización en solución normal (Control), tras inyección intracelular de EGTA, en solución 5 mM Cd²⁺ y tras substracción de estas últimas (EGTA-Cd²⁺). B y C, relaciones I-V del pico de I_{Ca} y de I_{K(Ca)}, respectivamente, en control (●), tras inyección de EGTA (▲) y tras substracción a la corriente en EGTA de la corriente en Cd²⁺ (○).

Sin embargo, es interesante hacer notar que mientras en solución normal las despolarizaciones grandes y duraderas provocaban, en la mayoría de los casos, la contracción de la fibra muscular registrada (manifestada por el aumento de la corriente de pérdida y/o por la expulsión de los electrodos), tras la inyección intracelular de EGTA no se ha observado contracción muscular en las más de cincuenta fibras registradas en estas condiciones, por grande y duradera que fuese la despolarización. La interpretación más simple y plausible de estos resultados sugiere que el Ca^{2+} liberado del retículo sarcoplásmico y responsable de la contracción muscular es quelado por EGTA, impidiéndose así la contracción muscular. Tal interpretación indica la verdadera y efectiva presencia intracelular de EGTA, aun cuando ésta no se vea reflejada en variaciones significativas de las corrientes de membrana. Podemos concluir, por tanto, que la inyección intracelular de EGTA no modifica las corrientes de membrana.

Parece resultar paradójico que $I_{K(\text{Ca})}$, siendo dependiente de Ca^{2+} intracelular, no se vea modificada por un agente quelante de Ca^{2+} . Véase, sin embargo, el apdo. siguiente y el apdo. 7.V.

IVCb. BAPTA

BAPTA es un agente quelante de Ca^{2+} cuya K_d es muy semejante a la de EGTA (alrededor de 10^{-7} M a pH fisiológico) y que, igualmente, presenta muy baja afinidad por Mg^{2+} . Sin embargo, se diferencia de éste en que la constante de tiempo de su reacción con Ca^{2+} es alrededor de 400 veces más rápida. Así, por ejemplo, ha sido demostrado que en la sinapsis gigante de calamar, para una misma concentración de quelante, la reacción entre éste y

Ca^{2+} alcanza su equilibrio en torno a 1.2 ms y 3 μs , cuando el quelante es EGTA y BAPTA, respectivamente (Adler et al., 1991).

La Figura 7.3 A muestra el efecto de la inyección intracelular de BAPTA sobre las corrientes activadas por despolarización (trazos superiores). Se observa que, tras inyección de BAPTA, la amplitud del pico de la corriente inicial de entrada aumenta respecto al control y que la corriente inicial de salida desaparece. La ulterior perfusión con solución 5 mM Cd^{2+} suprime la corriente de entrada, observándose de forma aislada I_K . Asumiendo que la inyección intracelular de BAPTA sólo modifica la constante de tiempo de inactivación por tiempo de I_{Ca} y no varía la amplitud de I_{Ca} en el estado estacionario (véase más adelante), mediante la substracción de las corrientes registradas en solución normal, tras inyección intracelular de BAPTA y en solución 5 mM Cd^{2+} se obtienen de forma conjunta I_{Ca} e $I_{K(\text{Ca})}$ (Control- Cd^{2+}), y de forma aislada I_{Ca} (BAPTA- Cd^{2+}) e $I_{K(\text{Ca})}$ (Control-BAPTA) (Figura 7.3 A, trazos inferiores).

En la Figura 7.3 B se representan las relaciones I-V del pico de I_{Ca} en solución control y en BAPTA (círculos y triángulos llenos, respectivamente) y tras la substracción de I_K obtenida en Cd^{2+} (símbolos vacíos). Cuando $I_{K(\text{Ca})}$ e I_K han sido previamente bloqueadas por TEA intracelular, la inyección intracelular de BAPTA no produce variaciones significativas en la amplitud del pico de I_{Ca} (no mostrado), lo cual sugiere que la inactivación por tiempo de I_{Ca} en el pico es prácticamente nula. Según ello, el aumento de amplitud del pico de I_{Ca} observado en presencia de BAPTA respecto al control (y cuando I_K ha sido substraída) (Figura 7.3 B, círculos y triángulos vacíos, respectivamente) es

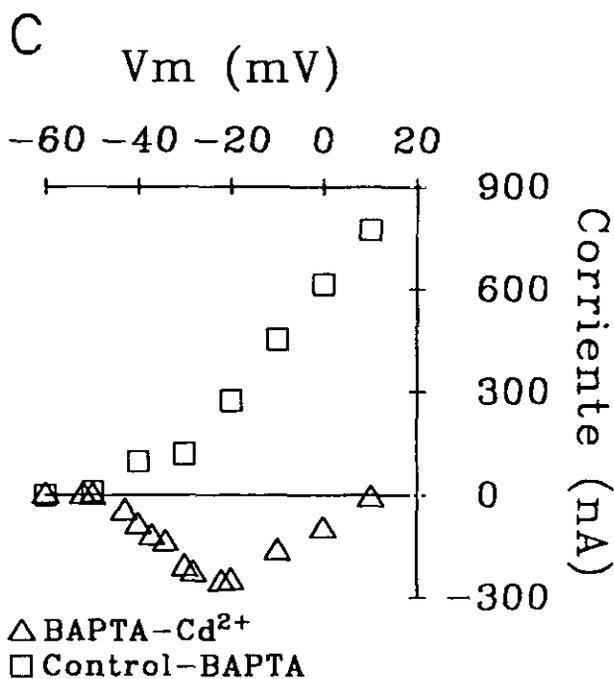
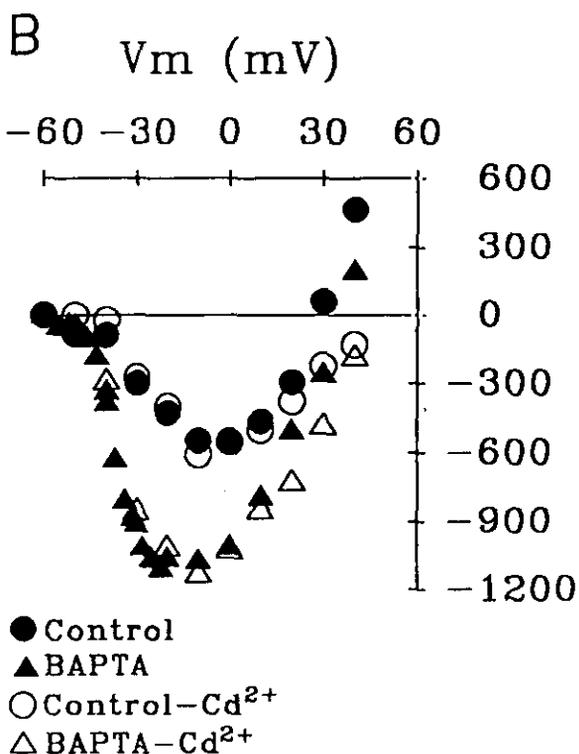
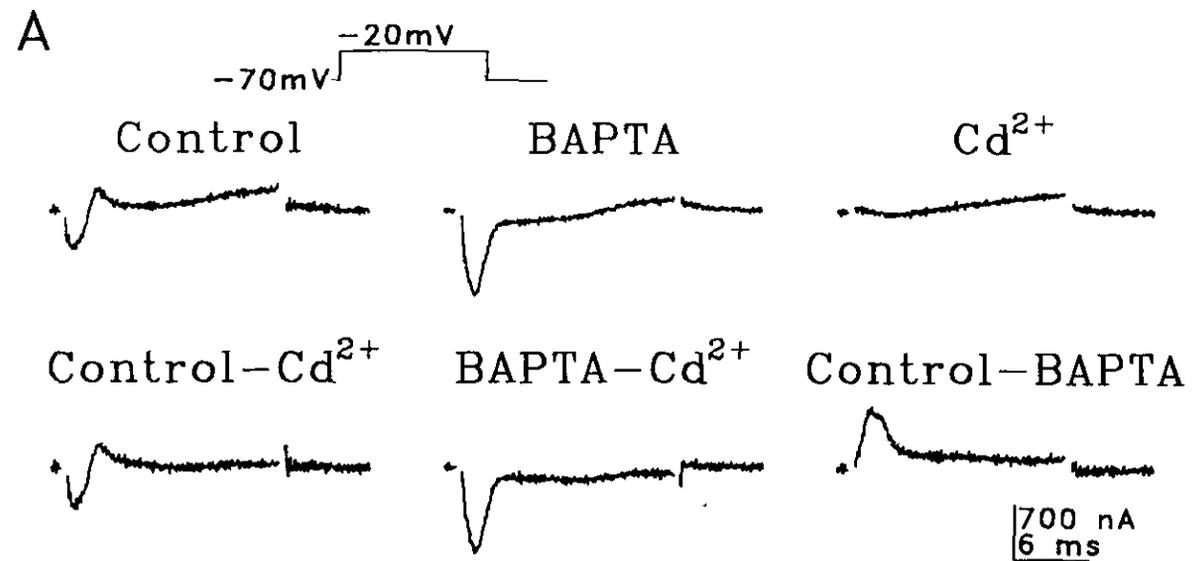


Figura 7.3. Efecto de BAPTA intracelular. A, trazos superiores, corrientes activadas por despolarización en solución normal (Control), tras inyección intracelular de BAPTA y en solución 5 mM Cd^{2+} ; trazos inferiores, substracciones de las corrientes activadas por despolarización, según se indica en la Figura. B, relación I-V del pico de I_{Ca} en control (●) y BAPTA (▲) y tras su respectiva substracción de la corriente en Cd^{2+} (○ y Δ, respectivamente). C, relación I-V de I_{Ca} (Δ) e $I_{\text{K(Ca)}}$ (□) medidas a los 36 ms del pulso despolarizante y halladas por substracción de las corrientes registradas en Control, BAPTA y Cd^{2+} , tal como se indica.

debido a la supresión de $I_{K(Ca)}$ tras inyección de BAPTA. Por tanto, la diferencia existente entre el pico de I_{Ca} en tales condiciones corresponde a $I_{K(Ca)}$ presente durante el pico de I_{Ca} y, por tanto, de la Figura 7.3 B se puede deducir que la relación I-V de $I_{K(Ca)}$ existente durante el pico de I_{Ca} refleja la dependencia de voltaje del pico de I_{Ca} , creciendo a partir de un umbral próximo al umbral de I_{Ca} y decreciendo a medida que I_{Ca} se aproxima a su potencial de inversión, confirmándose así la dependencia de Ca^{2+} de $I_{K(Ca)}$. Sin embargo, esta diferencia no representa una verdadera relación I-V de $I_{K(Ca)}$, pues el pico de I_{Ca} varía en el tiempo por la dependencia de voltaje de I_{Ca} (véase capítulo III.5) y posiblemente también la activación de $I_{K(Ca)}$ (véase más abajo).

Por la misma razón, la relación I-V de $I_{K(Ca)}$ no ha sido considerada en el pico de $I_{K(Ca)}$, sino a los 36 ms del pulso despolarizante, una vez alcanzado su estado estacionario. Así, la Figura 7.3 C muestra las relaciones I-V de I_{Ca} e $I_{K(Ca)}$ (triángulos y cuadrados, respectivamente) obtenidas por substracción y medidas a los 36 ms del pulso despolarizante, esto es, una vez alcanzado el estado estacionario (véase capítulo III.5 y apdo. IVD del presente capítulo). Se puede apreciar que, aun cuando ambas corrientes presentan un umbral de activación muy semejante, la forma de la relación I-V de $I_{K(Ca)}$ difiere de aquélla de I_{Ca} . Así, en tanto que para valores superiores a 20 mV I_{Ca} decrece con V_m al aproximarse a su potencial de inversión, $I_{K(Ca)}$ continúa creciendo con V_m , lo cual sugiere que durante la fase sostenida de $I_{K(Ca)}$, ésta presenta una dependencia de voltaje añadida a su dependencia de Ca^{2+} . En efecto, si $I_{K(Ca)}$ fuera exclusivamente dependiente de Ca^{2+} , al aumentar V_m , aun cuando su

fuerza electromotriz aumente, $I_{K(Ca)}$ debería disminuir (o alcanzar un valor constante) a medida que disminuye I_{Ca} .

Dado que BAPTA disminuye la inactivación de I_{Ca} (véase capítulo III.5), podría pensarse que $I_{K(Ca)}$ e I_{Ca} halladas por substracción podrían corresponder a un único fenómeno, a saber, el posible aumento de I_{Ca} como consecuencia de la reducción de la inactivación dependiente de Ca^{2+} , tal como parece sugerir el similar curso temporal y la semejante amplitud de ambas corrientes. Sin embargo, la diferente relación I-V de I_{Ca} e $I_{K(Ca)}$ en el estado estacionario confirma la bondad del método utilizado para su obtención.

IVD. Dependencia de tiempo de $I_{K(Ca)}$

La cuantificación de la dependencia de tiempo de $I_{K(Ca)}$ presenta notables dificultades debido a la imposibilidad de aislamiento de esta corriente (véase apdo. IVA). Sin embargo, la substracción de las corrientes generadas tras inyección intracelular de BAPTA respecto a aquéllas obtenidas en control permite obtener una fiel representación del curso temporal de $I_{K(Ca)}$. No obstante, puesto que BAPTA produce un aumento de la constante de tiempo de inactivación de I_{Ca} , la cuantificación del curso temporal de $I_{K(Ca)}$ a partir de esta substracción debe ser tomada con las debidas reservas. No obstante, de los resultados obtenidos a partir de 14 fibras musculares inyectadas con BAPTA, un ejemplo de los cuales se ilustra en la Figura 7.3, podemos deducir que $I_{K(Ca)}$ presenta un máximo dentro de los primeros 5 ms de despolarización, a partir del cual decrece rápidamente hasta alcanzar un estado estacionario dentro de los 10 primeros milisegundos de despolarización y en el cual se mantiene a lo

largo de la duración del pulso, durante al menos 100 ms (Figura 7.3 A, *Control-BAPTA*). Este comportamiento cinético de $I_{K(Ca)}$ es muy semejante al descrito para I_{Ca} (véase capítulo III.5 y Figura 7.3 A, *BAPTA-Cd²⁺*) pero con un ligero retraso (alrededor de 1 ms) respecto a éste. Las implicaciones funcionales de ello se analizan en el capítulo III.8.

IVE. Efecto de TEA

La sensibilidad a TEA es una propiedad diferenciadora de los canales SK y BK que median las distintas $I_{K(Ca)}$. Así, mientras los canales BK son bloqueados por TEA extra e intracelular (Blatz y Magleby, 1984; Yellen, 1984; Latorre et al., 1989), los canales SK son insensibles a TEA.

$I_{K(Ca)}$ del músculo abductor es bloqueada en solución TEA y/o tras inyección intracelular de TEA (véanse, por ejemplo, las Figuras 5.2 y 5.7), lo cual sugiere que los canales que median $I_{K(Ca)}$ son semejantes a los canales BK descritos en otros sistemas.

7.V. DISCUSION

En el presente capítulo se ha estudiado la corriente inicial de salida ($I_{K(Ca)}$) presente durante la despolarización de la membrana muscular. $I_{K(Ca)}$ es transportada por K^+ y está necesariamente asociada a la corriente de entrada de Ca^{2+} , lo cual permite concluir que $I_{K(Ca)}$ es una corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} .

Dos son los tipos de canales iónicos de membrana que median las distintas $I_{K(Ca)}$, descritas en diferentes sistemas, a saber, canales BK y canales SK (véase Latorre et al., 1989). Los primeros se caracterizan por tener una gran conductancia unitaria, por presentar una baja sensibilidad a Ca^{2+}

intracelular, por mostrar una dependencia de voltaje añadida a su dependencia de Ca^{2+} y por ser bloqueados por Charybdotoxina y TEA extra e intracelular. Por el contrario, los canales SK presentan una menor conductancia unitaria y una mayor sensibilidad a Ca^{2+} intracelular, no presentan dependencia de voltaje, son selectivamente bloqueados por Apamina y son insensibles a Charybdotoxina y TEA.

Los resultados obtenidos indican que la relación I-V de $I_{K(Ca)}$ difiere de la de I_{Ca} , de tal forma que para valores despolarizados aun cuando I_{Ca} disminuye al aumentar V_m , $I_{K(Ca)}$ sigue creciendo con él, lo cual sugiere que la activación de $I_{K(Ca)}$ es sensible a la despolarización. Podemos así concluir que $I_{K(Ca)}$ presenta, además de dependencia de Ca^{2+} , dependencia de voltaje.

La cinética de activación e inactivación de las distintas $I_{K(Ca)}$ presentes en diferentes células es el complejo resultado de la cinética de distintos fenómenos involucrados que incluyen la activación de los CCVD y del influjo de Ca^{2+} a través de ellos, la difusión intracelular de Ca^{2+} , la captación de Ca^{2+} intracelular en orgánulos citoplásmicos y su extrusión al medio extracelular, la reacción entre Ca^{2+} y su receptor en el canal, las propias transiciones dependientes de voltaje del canal, etc.; además de estos condicionantes cinéticos, otros de carácter estructural también están involucrados, como por ejemplo el número y la respectiva distribución topológica de los CCVD y los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} . Así, aun cuando los canales que median $I_{K(Ca)}$ parecen ser de dos únicos tipos, el comportamiento cinético de éstos en diferentes células es muy variable. No obstante, ha sido demostrada la existencia de dos

tipos de $I_{K(Ca)}$ con distinta cinética, una rápida (cuya constante de tiempo de activación e inactivación es de alrededor de 20 ms) y otra lenta (cuya constante de tiempo de inactivación es del orden de segundos) en distintas células (Barret y Barret, 1976; Pallota et al., 1981; Pennefather et al., 1985; Blatz y Magleby, 1986; Storm, 1987; Storm, 1988) En tanto que $I_{K(Ca)}$ rápida es sensible a TEA y no a Apamina (Adams et al., 1982; Blatz y Magleby, 1984; Storm, 1987), $I_{K(Ca)}$ lenta es bloqueada por Apamina pero es insensible a TEA (Barret y Barret, 1976; Hugues et al., 1982; Pennefather et al., 1985; Blatz y Magleby, 1986), lo cual sugiere que los canales que median ambas corrientes son de tipo BK y SK, respectivamente. Comparativamente, $I_{K(Ca)}$ del músculo abductor es una corriente extraordinariamente rápida, cuya constante de tiempo de activación es menor de 5 ms (tiempo en el cual ha alcanzado un máximo). No obstante, esta característica podría ser resultado no de una propiedad intrínseca de los canales que median $I_{K(Ca)}$, sino de una más rápida cinética de los procesos dependientes de Ca^{2+} que median su activación, debido a que la elevada relación superficie-volumen de la fibra muscular produce más rápidas y efectivas variaciones de $[Ca^{2+}]_i$, o de una estrecha distribución topológica de los CCVD y de los canales que median $I_{K(Ca)}$. Por otra parte, tras alcanzar un máximo, $I_{K(Ca)}$ decrece rápidamente (alcanzando un mínimo en los primeros 10 ms), pero sin llegar a inactivarse completamente. No se ha podido, sin embargo, elucidar si este comportamiento de su inactivación corresponde a una característica intrínseca del canal o es simple reflejo del comportamiento de I_{Ca} (véase capítulo III.5).

En este sentido, y considerando la distinta cinética de

quelado de Ca^{2+} por EGTA o BAPTA (véase apdo. IVC del presente capítulo), es interesante destacar la capacidad de BAPTA para suprimir $I_{K(\text{Ca})}$, en contraste con la insensibilidad de ésta a EGTA. En efecto, dada la extremada rapidez de activación de $I_{K(\text{Ca})}$, la ausencia de efecto de EGTA intracelular sobre $I_{K(\text{Ca})}$, puede ser explicada por una más lenta cinética del proceso de quelado respecto a la del proceso de activación de $I_{K(\text{Ca})}$, como ha sido sugerido en relación a $I_{K(\text{Ca})}$ de las células cromafines (Marty y Neher, 1985; Neher, 1986), por una estrecha proximidad entre los CCVD y los canales que median $I_{K(\text{Ca})}$, y/o por una baja afinidad de estos canales por Ca^{2+} , como ha sido señalado respecto a los mecanismos involucrados en la liberación de neurotransmisor en la sinapsis gigante del calamar (Adler et al., 1991). Sin embargo, puesto que BAPTA, cuya constante de afinidad es semejante a la de EGTA pero cuya cinética de quelado es al menos dos órdenes de magnitud más rápida, sí suprime $I_{K(\text{Ca})}$, la última interpretación no parece razonable.

Por otra parte, $I_{K(\text{Ca})}$ es bloqueada por TEA extra e intracelular. Puesto que la concentración intracelular de TEA alcanzada tras su inyección es desconocida, no se ha podido estimar la posible diferente sensibilidad a TEA de sus receptores extra e intracelulares.

Si bien son necesarios más profundos estudios de los canales iónicos de membrana que median $I_{K(\text{Ca})}$, basados en nuevas técnicas de análisis, que incluirían el control de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el registro unitario de estos canales mediante la técnica de registro de regiones de membrana (en inglés, "patch-clamp"), la dependencia de voltaje mostrada por $I_{K(\text{Ca})}$, y su sensibilidad a TEA hacen

pensar que estos canales son de tipo BK. Si las diferencias cinéticas encontradas entre estos canales y los mediadores de $I_{K(Ca)}$ en el músculo abductor corresponden a diferentes características intrínsecas de dos tipos diferentes de canales, o si ellas pueden ser explicadas por las características cinéticas de los CCVD y de $[Ca^{2+}]_i$, y/o por las características estructurales del músculo abductor, necesita de ulteriores estudios basados en nuevas técnicas de análisis para su elucidación.

Por último, es interesante destacar la estrecha similitud de las cinéticas de I_{Ca} e $I_{K(Ca)}$ (con un ligero retraso de ésta respecto a aquélla), de sus umbrales de activación y de sus amplitudes en el estado estacionario, por las implicaciones funcionales que de ello se derivan y que se exponen en el capítulo III.8.

III.8. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS CORRIENTES

ACTIVADAS POR DESPOLARIZACION

8.I. RESUMEN

Se estudian en condiciones de fijación de voltaje las corrientes generadas en solución normal, en presencia de BAPTA intracelular y en solución 13.5 mM Cd^{2+} por potenciales de acción simulados (PAS) que semejan los potenciales de acción registrados en condiciones de fijación de corriente en solución normal (PAS-Normal) y en presencia de BAPTA (PAS-Experimental).

La relación I-V del área de la corriente durante el pico del potencial de acción muestra la existencia de dos puntos de estabilidad de V_m , a saber, el potencial de membrana en reposo y un potencial estable en torno a 0 mV.

Este potencial estable se corresponde con el respectivo valor de V_m en el máximo del potencial de acción registrado, tanto en solución normal como en BAPTA. Este segundo potencial estable difiere en ausencia o presencia de BAPTA, pero es independiente de la forma del PAS utilizado.

En tanto que la forma del potencial de acción registrado en BAPTA es constante, en solución normal éste es variable, siendo su fase de ascenso más rápida a medida que aumenta la amplitud del pulso despolarizante.

I_{Ca} activada por PAS-Normal presenta un pico durante el pico del PAS y un componente sostenido durante la fase despolarizada del PAS.

De forma similar, $I_{K(Ca)}$ presenta un pico durante el pico del PAS-Normal y un componente sostenido durante la fase

despolarizada del potencial de acción. Este segundo componente es de similar amplitud pero de signo contrario al correspondiente en el tiempo de I_{Ca} .

Se concluye que a) el carácter persistente de I_{Ca} permite la contracción sostenida de las fibras musculares; b) $I_{K(Ca)}$ contrarresta I_{Ca} , retrasando la fase de ascenso del potencial de acción, contribuyendo así a impedir la generación de potenciales de acción "todo o nada" y permitiendo la existencia de un componente persistente de I_{Ca} sin la correspondiente despolarización de la membrana; c) I_K es responsable directo de la generación de potenciales de acción graduados y de la repolarización de V_m hasta niveles donde la corriente de ventana de I_{Ca} está presente.

Se establecen las correlaciones funcionales del comportamiento dinámico de estas tres corrientes iónicas de membrana.

8.II. INTRODUCCION

Desde los trabajos clásicos de Hodgkin y Huxley (1952a,b,c,d) en los que se determinaron las corrientes iónicas de membrana responsables del potencial de acción en el axón gigante de calamar, el método comúnmente utilizado para la caracterización de las distintas corrientes de membrana presentes en diferentes sistemas se ha basado en la aplicación de pulsos de voltaje, en condiciones de fijación de voltaje, que variaban rápidamente V_m desde un potencial de reposo impuesto a un nuevo potencial impuesto constante en el tiempo. Así, esta metodología considera el análisis de las corrientes de membrana en condiciones estáticas, esto es, cuando V_m es constante en el

tiempo, facilitando la caracterización electrofisiológica de estas corrientes. Sin embargo, las condiciones reales y fisiológicas del funcionamiento de la membrana celular son de carácter dinámico, esto es, la actividad eléctrica de la célula excitable, en cuanto que substrato de su fisiología, se corresponde con variaciones en el tiempo de V_m . Es interesante, por tanto, el conocimiento de cómo es la evolución dinámica de cada una de las corrientes de membrana y de la suma total de todas ellas cuando V_m está variando en el tiempo, y de cómo esta variación dinámica de las corrientes es responsable de la variación en el tiempo de V_m .

No obstante, utilizando pulsos de voltaje en condiciones de fijación de corriente se ha podido inferir el comportamiento dinámico de ciertas corrientes durante el potencial de acción. Así, se ha demostrado que el influjo de Ca^{2+} responsable de la liberación de neurotransmisor desde la terminal presináptica ocurre durante la fase de repolarización y, fundamentalmente, la fase de postpotencial del potencial de acción presináptico (Llinás et al., 1981; Augustine et al., 1985a,b). Tales inferencias han sido también hechas a partir de modelos matemáticos teóricos basados en el conocimiento exhaustivo de las características electrofisiológicas de los canales de membrana involucrados en la actividad eléctrica de determinadas neuronas (Hodgkin y Huxley, 1952d; Huguenard y McCormick, 1992; McCormick y Huguenard, 1992).

Sin embargo, recientemente han sido obtenidos notables resultados en condiciones de fijación de voltaje utilizando potenciales de acción previamente registrados en condiciones de

fijación de corriente como estímulos de voltaje, presentándose así evidencias directas respecto al comportamiento de las corrientes de membrana durante la actividad eléctrica celular (Llinás et al., 1982; Gola et al., 1986; Doerr et al., 1989; Spencer et al., 1989; McCobb y Beam, 1991).

Una metodología similar a esta última descrita ha sido utilizada en el presente capítulo para el esclarecimiento de cómo es la dinámica de las corrientes de membrana activadas durante el potencial de acción, de cómo éstas son responsables de la forma de éste, y del significado funcional de todo ello. Esta metodología ha consistido en la aplicación como estímulo de voltaje en condiciones de fijación de voltaje de potenciales de acción simulados (PAS) obtenidos a partir de cuatro rampas sucesivas de diferente amplitud filtradas con un filtro lineal activo. La forma de los PAS se asemeja estrechamente a la de los potenciales de acción registrados en condiciones de fijación de corriente. Merced a las características lineales del filtro empleado, este método posibilita la obtención de una familia de PAS de distinta amplitud pero idéntica forma y permite la substracción de las corrientes lineales capacitiva y de pérdida de la corriente total, todo lo cual representa una notable ventaja en la utilización de este método, frente a la utilización de potenciales de acción previamente registrados.

En el presente capítulo se estudian las corrientes generadas en solución normal, en presencia de BAPTA intracelular y en presencia de Cd^{2+} extracelular por PAS cuya forma es semejante a los potenciales de acción registrados en condiciones de fijación de corriente en solución normal y en presencia de BAPTA

intracelular (PAS-Normal y PAS-Experimental, respectivamente). Puesto que BAPTA es un agente quelante extremadamente rápido de Ca^{2+} (véase capítulo III.7) que suprime $I_{K(\text{Ca})}$, y Cd^{2+} es un ión bloqueante de los CCVD (véase capítulo III.5) que suprime I_{Ca} e $I_{K(\text{Ca})}$ (dejando inalterada y aislada I_K), el análisis de los resultados obtenidos y la comparación de éstos en las distintas condiciones permite establecer la contribución de las distintas corrientes de membrana a la forma de los potenciales de acción registrados y, por tanto, su función en la actividad eléctrica celular y en la fisiología de las fibras del músculo abductor, en cuanto que la función de éstas, esto es, su contracción, está determinada por su grado de despolarización (Orkand, 1962).

8.III. METODOS

A diferencia de lo descrito en capítulos anteriores, el protocolo de estimulación en condiciones de fijación de voltaje no ha consistido en la aplicación de pulsos de voltaje a distintos valores de V_m desde un potencial de reposo impuesto, sino en la aplicación de una forma de onda cuya forma simula el potencial de acción registrado en condiciones de fijación de corriente. Esta forma de onda, que llamamos potencial de acción simulado (PAS) en contraposición al que llamamos potencial de acción registrado que corresponde al obtenido en condiciones de fijación de corriente y que es generado por la fibra, ha sido obtenido como resultado de filtrar a través de un filtro activo lineal (Ithaco, Model 4212) cuatro rampas de voltaje sucesivas y de distinta amplitud. Gracias al carácter lineal del filtro utilizado, han podido ser obtenidos distintos PAS de diferente amplitud pero idéntica forma y ha sido posible la substracción

de las corrientes lineales capacitiva y de pérdida de las corrientes totales siguiendo el método usual (véase II. MATERIALES Y METODOS). El potencial de membrana en reposo impuesto es de -70 mV, tanto en condiciones de fijación de corriente como de voltaje.

Las condiciones experimentales escogidas para este estudio han sido: solución normal, que corresponde a las condiciones fisiológicas de funcionamiento de la membrana de la fibra muscular; inyección intracelular de BAPTA, donde $I_{K(Ca)}$ está ausente y donde I_{Ca} e I_K están prácticamente inalteradas (véase capítulo III.7); y solución 13.5 mM Cd^{2+} , donde I_{Ca} e $I_{K(Ca)}$ no están presentes y sólo existe I_K , que no ha sido modificada (véase capítulo III.6). En estas condiciones dos son los tipos de potenciales de acción registrados en condiciones de fijación de corriente y, por tanto, dos son los tipos de PAS utilizados, denominados PAS-Normal y PAS-Experimental, que semejan los potenciales de acción registrados en solución normal y en presencia de BAPTA, respectivamente.

La aplicación de un pulso despolarizante supraumbral en solución normal provoca una respuesta compleja de V_m en el tiempo. En efecto, tras la aplicación del pulso despolarizante, V_m crece hasta alcanzar un máximo desde el cual decrece hasta una fase despolarizada sostenida que dura tanto como dura el pulso (véase Figura 8.1, *Control* y 8.2 A, *Control*). Dada la complejidad de esta variación de V_m en el tiempo, para facilitar su estudio ha sido dividida en distintas fases, que han sido denominadas según la siguiente terminología: el *potencial de acción* es considerado como toda la variación de V_m durante el pulso

despolarizante supraumbral; la *fase de ascenso del potencial de acción* corresponde a la variación de V_m desde el inicio del pulso hasta el *máximo de despolarización* alcanzado; el *pico del potencial de acción* se considera la variación de V_m desde el inicio del pulso hasta el inicio de la *fase de depolarización sostenida del potencial de acción* (en la Figura 8.3 A, parte superior, izquierda, la flecha indica el fin del pico del potencial de acción y el inicio de la fase despolarizada sostenida).

8.IV. RESULTADOS

La Figura 8.1 muestra respuestas típicas de una misma fibra en condiciones de fijación de corriente a pulsos de corriente despolarizante en solución normal (Control), tras inyección de BAPTA intracelular (BAPTA) y tras perfusión con solución 13.5 mM Cd^{2+} . En solución normal, los pulsos despolarizantes generan potenciales de acción graduados, cuya amplitud máxima y el tiempo que tarda en alcanzarse ésta son función creciente de la intensidad del pulso (Figura 8.1 A). Sea cual fuere la intensidad y la duración del pulso despolarizante, éste sólo es capaz de generar un único potencial de acción (Figura 8.1 B). Tras la inyección intracelular de BAPTA, idénticos pulsos de corriente generan potenciales de acción repetitivos cuya amplitud es independiente de la intensidad del pulso, es decir, son potenciales de acción "todo o nada", y cuya frecuencia se incrementa al aumentar la intensidad del pulso (Figura 8.1 A y B), sin que tenga lugar acomodación (Figura 8.1 B), esto es, una progresiva disminución de la frecuencia de potenciales de acción durante la despolarización sostenida. En solución 13.5 mM Cd^{2+} ,

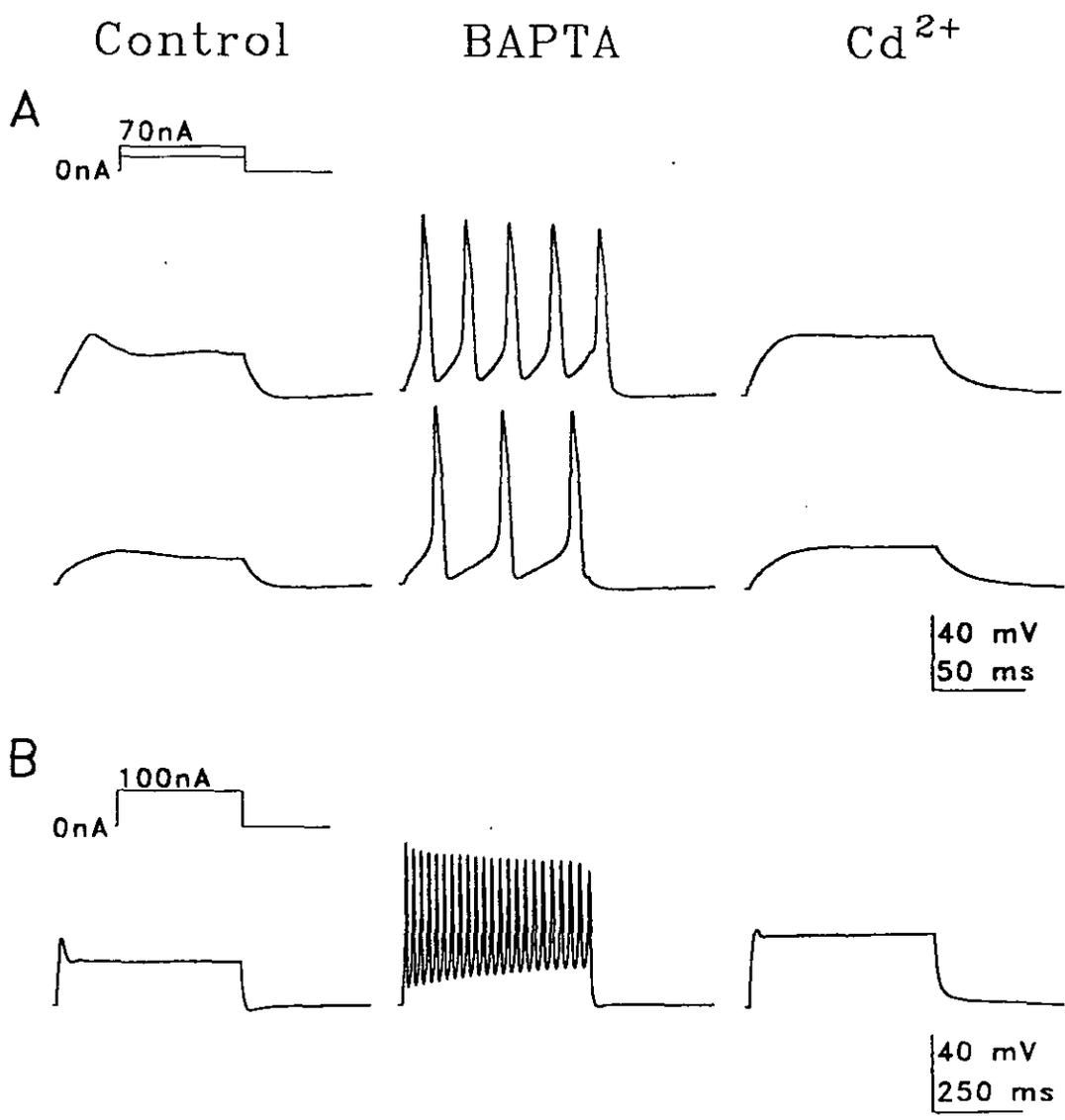


Figura 8.1. Potenciales de acción de la fibra muscular. A, respuestas en condiciones de fijación de corriente a pulsos despolarizantes de 100 ms de duración en solución normal (Control), tras inyección intracelular de BAPTA y en solución 13.5 mM Cd²⁺. B, respuestas a pulsos de 500 ms de duración en idénticas condiciones que en A.

la resistencia de entrada aumenta respecto al control (véase capítulo III.2) y los potenciales de acción desaparecen, obteniéndose, para bajas intensidades, una respuesta puramente pasiva debida al circuito RC de la membrana (Hodgkin y Huxley, 1952d) y, para mayores intensidades, una pequeña respuesta activa graduada, diferente de la obtenida en solución normal y que correspondería a la rectificación retardada de salida mediada por la activación de I_K (véase capítulo III.6).

Para el análisis de las corrientes activadas por despolarización subyacentes a los potenciales de acción registrados en solución normal y en presencia de BAPTA, PAS semejantes a ellos han sido utilizados como voltaje impuesto en condiciones de fijación de voltaje. La Figura 8.2 A muestra el potencial de acción registrado (*línea punteada*) por un pulso despolarizante de 120 nA en solución normal (Control) y en presencia de BAPTA (la respuesta total repetitiva está interrumpida y sólo se muestra el primer potencial de acción) y el correspondiente PAS (*línea continua*). Las corrientes generadas en solución normal (Control), en BAPTA y en solución 13.5 mM Cd^{2+} por el PAS-Normal (*izquierda*) y el PAS-Experimental (*derecha*) se ilustran en la Figura 8.2 B.

La Figura 8.3 A, *parte superior*, muestra tres ejemplos de PAS-Normal y PAS-Experimental (*izquierda y derecha*, respectivamente) que reflejan la identidad de la forma y la variación lineal de amplitud dentro de cada tipo de PAS. La línea horizontal discontinua indica el valor máximo de V_m al cual llega el potencial de acción registrado, y el trazado más grueso corresponde al PAS cuya amplitud es más próxima a la amplitud del

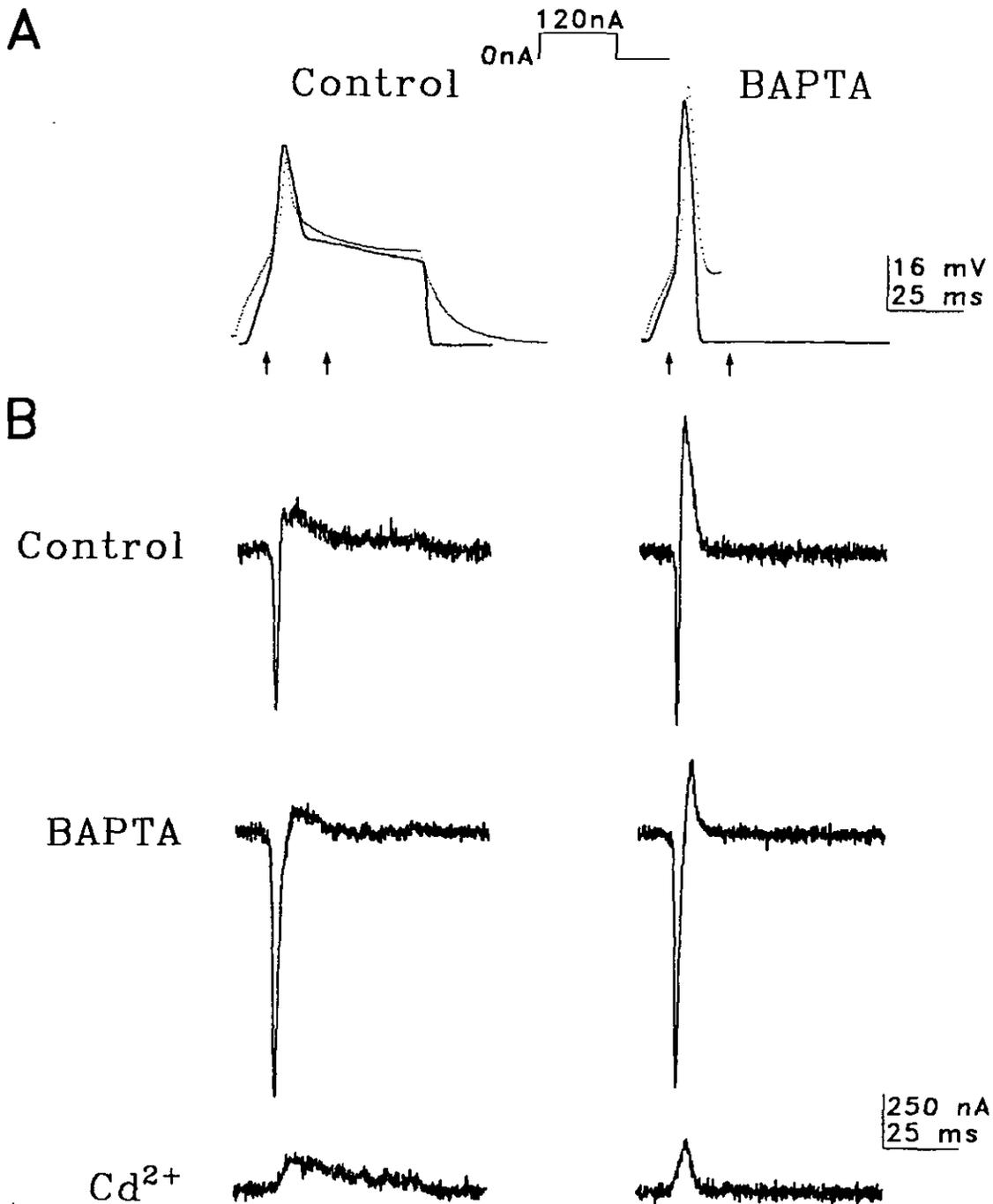


Figura 8.2. Potenciales de acción registrados, potenciales de acción simulados y corrientes generadas por éstos. A, potenciales de acción registrados (líneas punteadas) generados por despolarización en solución normal (Control) y tras inyección intracelular de BAPTA, y los correspondientes PAS (líneas continuas); la respuesta en BAPTA sólo incluye el primero de los sucesivos potenciales de acción repetitivos. B, corrientes generadas por PAS-Normal (izda.) y PAS-Experimental (dcha.) en solución normal (Control), en BAPTA y en solución 13.5 mM Cd^{2+} . Como en el resto de figuras del presente capítulo, las corrientes capacitiva y de pérdida han sido substraídas.

potencial de acción registrado, y que, por tanto se ha escogido como representativo de la familia de PAS (corresponde además al mostrado en la Figura 8.2 A). Las corrientes mostradas en la Figura 8.2 B correspondientes al entorno del máximo del potencial de acción (indicado por flechas en la Figura 8.2 A) se representan de forma expandida y superpuesta en la Figura 8.3 A, *parte inferior*.

Las corrientes activadas por el PAS-Normal (Figura 8.3 A, *parte inferior izquierda*) en solución normal (*línea punteada*) consisten en una corriente de entrada seguida por una de salida, que dura tanto como la despolarización sostenida del potencial de acción registrado (véase Figura 8.2 B, Control, *izquierda*). En BAPTA (*línea continua gruesa*), en tanto que la corriente de salida generada por el PAS-Normal es levemente menor que en el control y alcanza su máximo más tardíamente, la amplitud de la corriente de entrada es mayor. En presencia de Cd^{2+} (*línea continua delgada*), la corriente de entrada desaparece y la corriente de salida es algo mayor que en BAPTA, sugiriendo que Cd^{2+} suprime una corriente de entrada persistente a lo largo del componente de despolarización sostenida del PAS-Normal.

Por su parte, las corrientes generadas por el PAS-Experimental mostradas en la Figura 8.3 A, *parte inferior derecha*, reflejan que en solución normal (Control, *línea punteada*) la corriente de entrada se continúa con una de salida que es transitoria debido a la repolarización de PAS-Experimental, que en BAPTA la amplitud de la corriente de entrada aumenta mientras la corriente de salida disminuye y se retrasa notablemente respecto al control, y que en Cd^{2+} este

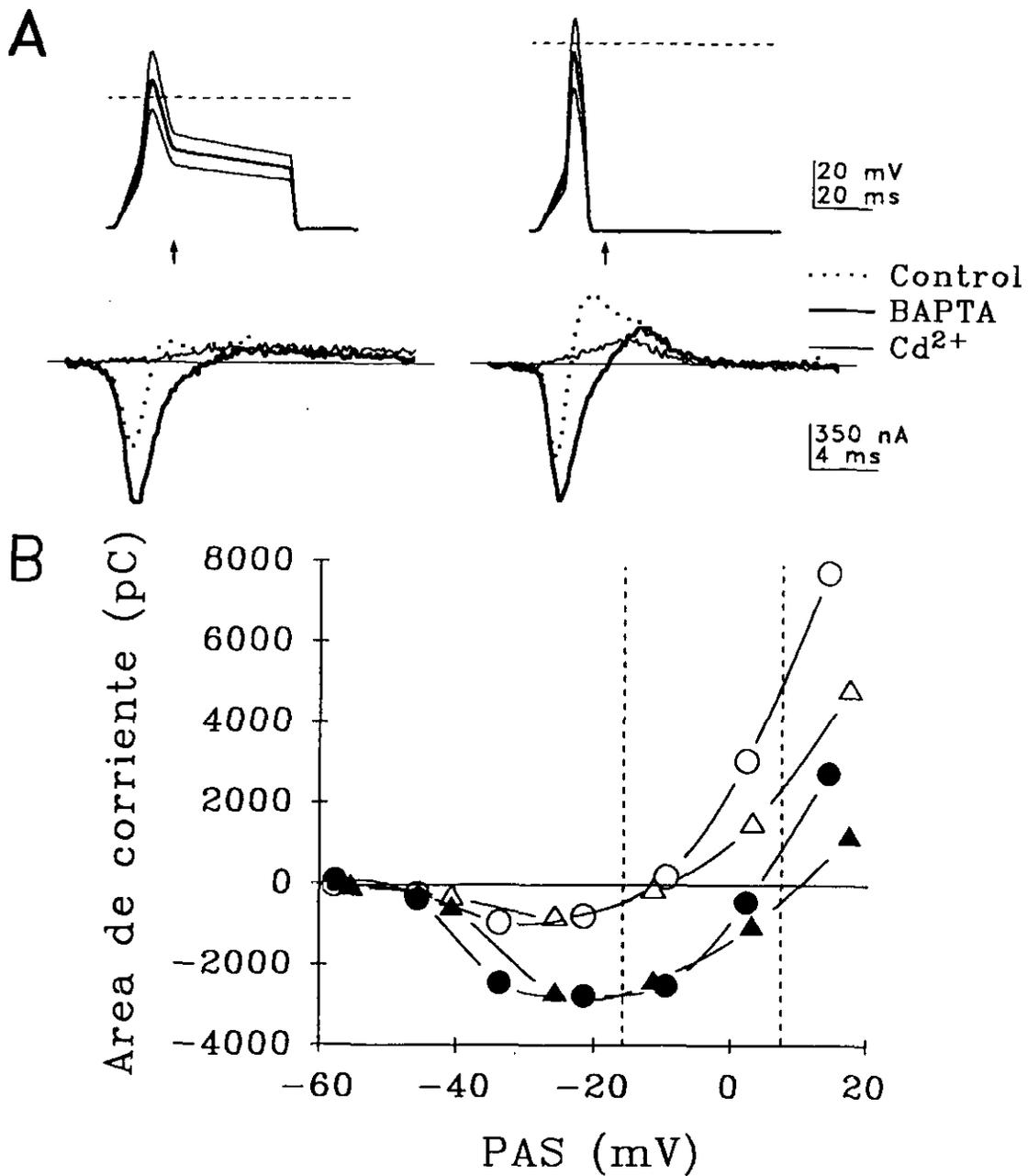


Figura 8.3. Corrientes generadas durante el pico del potencial de acción. **A**, superior, PAS representativos de PAS-Normal (izda.) y PAS-Experimental (dcha.); como en **B**, las líneas discontinuas indican el máximo del potencial de acción registrado en solución normal (izda.) y en BAPTA (dcha.); inferior, registro expandido, correspondiente al intervalo comprendido entre las flechas del PAS mostrado en la Figura 8.2, de las corrientes allí mostradas y generadas por PAS-Normal (izda.) y PAS-Experimental (dcha.) en Control (línea punteada), en BAPTA (línea continua gruesa) y en solución 13.5 mM Cd²⁺ (línea continua delgada). **B**, relación entre el máximo del PAS y el área de la corriente durante el pico del PAS-Normal (círculos) y PAS-Experimental (triángulos) en control (símbolos vacíos) y en BAPTA (símbolos llenos). El pico del PAS corresponde al intervalo de tiempo comprendido entre el inicio del PAS y el indicado por la flecha en **A**.

retraso se mantiene. (La menor amplitud de la corriente de salida en Cd^{2+} respecto a la de ésta en BAPTA indica la presencia de una pequeña fracción de $I_{K(\text{Ca})}$ en BAPTA para grandes despolarizaciones).

Por otra parte, de la comparación de las corrientes generadas en una misma condición por los distintos PAS, se deduce que en solución normal (*línea punteada*) mientras el pico de la corriente de entrada es algo mayor (1.22 veces) cuando ésta es generada por PAS-Experimental que cuando lo es por PAS-Normal (como cabría esperar por la mayor amplitud del máximo del PAS-Experimental que del PAS-Normal, teniendo en cuenta que el valor de despolarización alcanzado por ambos es menor que el pico de la relación I-V de I_{Ca} ; véase capítulo III.5), el pico de la corriente de salida generada por PAS-Experimental es 4.16 veces mayor que la generada por PAS-Normal. Esta diferencia es principalmente debida a una mayor activación de $I_{K(\text{Ca})}$ por PAS-Experimental, puesto que la activación de I_K (*línea continua delgada*) en el pico de la corriente de salida es muy similar para ambos PAS.

De acuerdo al modelo descrito por Hodgkin y Huxley (1952d) sobre la generación del potencial de acción en el axón gigante de calamar, tras una despolarización por encima de un nivel de V_m conocido como umbral, la conductancia de Na^+ se incrementa rápidamente permitiendo el influjo de Na^+ y provocando así una mayor despolarización. Como consecuencia de la dependencia de voltaje de los canales de Na^+ y de la pendiente negativa de la relación I-V de la corriente de Na^+ , la fase de ascenso del potencial de acción consiste en un fenómeno regenerativo de

retroalimentación positiva entre la conductancia de Na^+ y V_m que cesaría a medida que V_m tiende al potencial de equilibrio de Na^+ (según la pendiente positiva de la relación I-V de la corriente de Na^+). El nivel de despolarización umbral correspondería al valor límite de V_m donde el influjo de Na^+ es equilibrado por el eflujo de K^+ , por encima del cual aquél es superior a éste y, por tanto, se desencadena el proceso conducente a la fase de ascenso del potencial de acción (Hodgkin y Huxley, 1952d; Noble, 1966; MacGregor y Lewis, 1977). Idéntico mecanismo regiría la generación de potenciales de acción de Ca^{2+} , pues al igual que la corriente de Na^+ , la relación I-V de I_{Ca} también presenta una fase de pendiente negativa.

Según ello, para la comprensión de los mecanismos involucrados en las diferencias existentes entre el potencial de acción registrado en solución normal y en BAPTA, se ha cuantificado la corriente neta existente durante ambos PAS en ambas condiciones y, puesto que el potencial de acción tiene una duración finita, esta cuantificación se ha realizado no a partir del pico de corriente sino a partir del área definida por la corriente y el nivel de corriente cero (que llamamos área de la corriente) durante el pico del potencial de acción.

La Figura 8.3 B muestra la relación existente entre el máximo del PAS y el área de la corriente durante el pico del PAS (esto es, desde el inicio hasta el tiempo indicado por la flecha en la Figura 8.3 A, parte superior; no se considera, por tanto, la fase de despolarización sostenida del PAS-Normal). Las líneas discontinuas verticales corresponden al valor de V_m en el máximo del potencial de acción registrado en solución normal (izquierda)

y en BAPTA (*derecha*), que corresponden a -16.3 y 7.4 mV, respectivamente. Se observa que, en solución normal (*símbolos vacíos*), y tanto para el PAS-Normal (*círculos*) como para el PAS-Experimental (*triángulos*), el área de la corriente neta es de entrada a partir de un valor umbral de alrededor de -45 mV, crece con el voltaje según una pendiente negativa hasta un máximo alrededor de -25 mV, varía a partir de éste según una pendiente positiva y se hace de salida tras cruzar el eje de abscisas en torno a -10 mV. De manera similar, en presencia de BAPTA (*símbolos llenos*) el área de la corriente se hace de entrada a partir de un umbral en torno a -45 mV (similar al encontrado en solución normal), varía en función de V_m con pendiente negativa hasta alcanzar un máximo alrededor de -20 mV, a partir del cual crece con pendiente positiva haciéndose de salida tras cruzar el eje de abscisas en torno a 4 y 10 mV para el PAS-Normal (*círculos*) y para el PAS-Experimental (*triángulos*), respectivamente. Así pues, la relación entre el área de corriente y V_m del PAS presenta dos puntos de estabilidad (esto es, cuando la corriente neta es cero) hacia los que tiende V_m cuando se produce una perturbación en él (esto es, cuando se hace variar V_m) y que corresponden al potencial de reposo y al potencial de inversión del área de la corriente neta. Así, tras la despolarización de la membrana por encima de un umbral en torno a -45 mV, el proceso autorregenerativo (manifestado por la pendiente negativa de la relación $I-V$, que viene determinada por la de I_{Ca}) hace tender V_m hacia su nuevo punto de estabilidad (alrededor de -10 y 7 mV, en solución normal y en BAPTA, respectivamente). Obviamente, en solución Cd^{2+} , donde I_{Ca} está

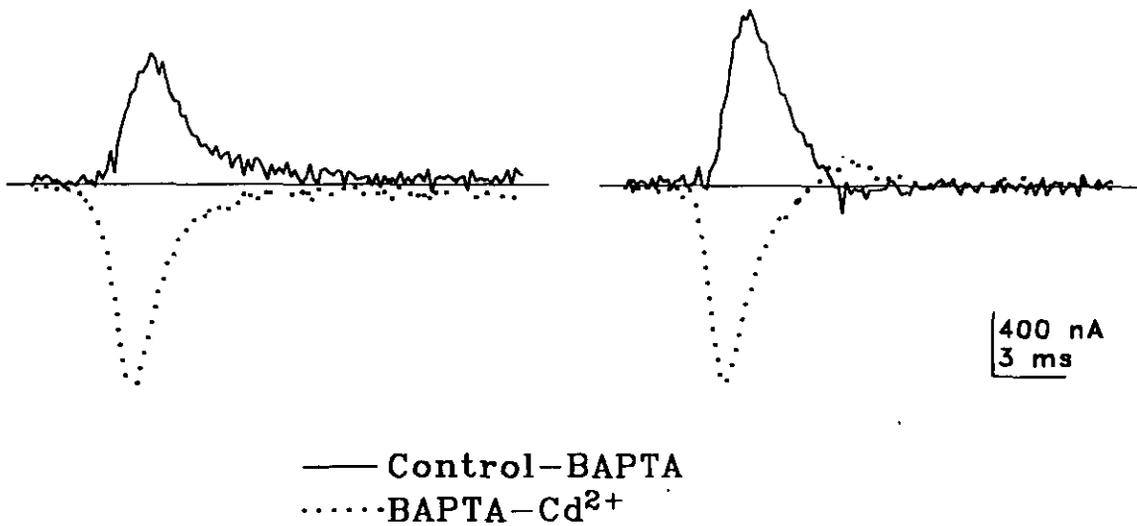


Figura 8.4. I_{Ca} e $I_{K(Ca)}$ durante el pico del potencial de acción. Registros obtenidos por sustracción, tal como se indica, de las corrientes mostradas en la Figura 8.3 A, parte inferior, y registradas en solución normal (Control), en BAPTA y en solución 13.5 mM Cd^{2+} . La línea punteada corresponde a I_{Ca} (BAPTA- Cd^{2+}) y la línea continua corresponde a $I_{K(Ca)}$ (Control-BAPTA) generadas por PAS-Normal y PAS-Experimental (izda. y dcha., respectivamente).

bloqueada, el área de corriente neta siempre es >0 (puesto que la corriente es siempre de salida) y, por tanto, sólo existe un único punto estable correspondiente al potencial de reposo. Debe hacerse notar que el segundo punto de equilibrio es independiente de la forma del PAS y sólo depende de la presencia o ausencia de BAPTA, lo cual sugiere que el aumento de la amplitud del potencial de acción registrado en BAPTA respecto al registrado en solución normal es debido a la ausencia de $I_{K(Ca)}$, es decir, en el control, $I_{K(Ca)}$ actúa contrarrestando I_{Ca} e impidiendo así una gran despolarización de V_m .

La Figura 8.4 muestra I_{Ca} (línea punteada) e $I_{K(Ca)}$ (línea continua) activadas en torno al pico del PAS-Normal (izquierda) y del PAS-Experimental (derecha) aisladas por substracción a partir de las corrientes mostradas en la Figura 8.3 A (véanse las consideraciones hechas al respecto en el capítulo III.7). El retraso observado en el pico de $I_{K(Ca)}$ respecto al de I_{Ca} es responsable de la corriente neta de entrada existente en la corriente total (véase Figura 8.3 A). Por otra parte, en tanto que la amplitud del pico de I_{Ca} es substancialmente idéntico, la amplitud del pico de $I_{K(Ca)}$ es 1.34 veces mayor para el PAS-Experimental que para el PAS-Normal, debido a la mayor fuerza electromotriz de K^+ existente en aquél.

Por otra parte, considerando la fase despolarizada sostenida del potencial de acción, se observa que tanto I_{Ca} como $I_{K(Ca)}$ generadas por PAS-Normal no desaparecen totalmente durante la fase de descenso de éste sino que persisten durante la fase despolarizada sostenida del PAS-Normal (Figura 8.4, izquierda), tal como ha sido sugerido al hacer referencia a la Figura 8.3 A,

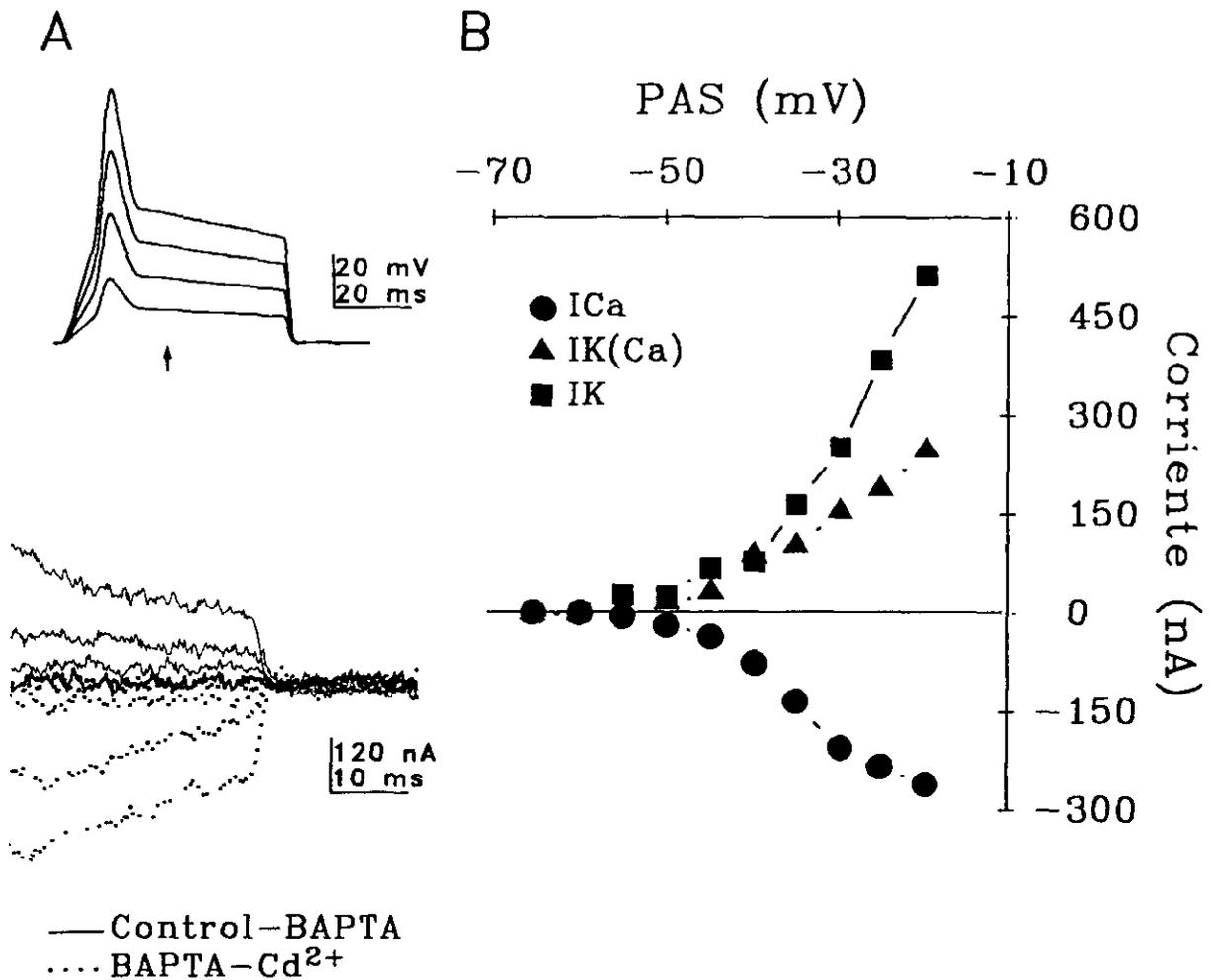


Figura 8.5. Corrientes generadas durante la fase despolarizada del potencial de acción. **A**, corrientes (parte inferior) generadas por PAS-Normal (parte superior), desde la flecha hasta el final, obtenidas por sustracción de las corrientes registradas en solución normal (Control), en BAPTA y en solución 13.5 mM Cd²⁺, tal como se indica. Las líneas punteadas y continuas corresponden a I_{Ca} e I_{K(Ca)}, respectivamente. **B**, relación I-V de I_{Ca} (●), I_{K(Ca)} (▲) e I_K (■) medidas al final de la fase despolarizada del PAS; I_{Ca} e I_{K(Ca)} se han obtenido por sustracción como se indica en **A**; I_K se ha obtenido directamente en solución 13.5 mM Cd²⁺.

parte inferior, izquierda. En efecto, la Figura 8.5 A, parte inferior, muestra que I_{Ca} (línea punteada) e $I_{K(Ca)}$ (línea continua) aisladas durante la fase despolarizada sostenida del PAS-Normal (Figura 8.5 A, parte superior; desde la flecha hasta el final) persisten durante toda esta fase, variando temporalmente de forma similar. La Figura 8.5 B muestra la relación I-V de I_{Ca} (círculos), $I_{K(Ca)}$ (triángulos) e I_K (cuadrados) al final de la fase despolarizada del PAS-Normal. I_{Ca} crece con V_m según una pendiente negativa a partir de un valor de V_m en torno a -50 mV (nótese que este valor es menor que el umbral de I_{Ca} definido mediante pulsos despolarizantes desde -60 mV; capítulo III.5). De manera similar, $I_{K(Ca)}$ crece con V_m según una pendiente positiva a partir de -50 mV. Esta simetría de las relaciones I-V de I_{Ca} e $I_{K(Ca)}$, respecto a la corriente cero indica que, aun cuando se mantiene de forma sostenida un influjo de Ca^{2+} por la presencia sostenida de I_{Ca} , ésta no se manifiesta en V_m como despolarizante debido a la presencia de $I_{K(Ca)}$, cuya amplitud es prácticamente idéntica pero de signo opuesto a ésta, de forma tal que la corriente neta resultante de ambas es prácticamente cero y, por tanto, V_m es estable. La presencia de I_K resulta en una corriente neta de salida que es responsable de la rectificación retardada observada en condiciones de fijación de corriente (véase Figura 8.1).

8.V. DISCUSION

En el presente capítulo se ha estudiado el comportamiento dinámico de las corrientes voltaje-dependientes cuando V_m está variando en el tiempo, esto es, en las condiciones reales de funcionamiento de la membrana de la fibra muscular. Para ello se

han utilizado como estímulos de voltaje impuesto en condiciones de fijación de voltaje distintas formas de onda, denominadas potenciales de acción simulados (PAS), de amplitud variable pero cuya forma semejaba estrechamente los potenciales de acción registrados en condiciones de fijación de corriente en solución normal y en presencia de BAPTA. Los resultados así obtenidos permiten sugerir los mecanismos de membrana involucrados en la generación de potenciales de acción graduados, el comportamiento dinámico de las corrientes de membrana voltaje-dependientes y las implicaciones funcionales de todo ello.

Los resultados presentados muestran que la relación entre el área de corriente y V_m del PAS presenta dos puntos de estabilidad (correspondientes al valor de V_m para el cual el área de la corriente neta es cero) hacia los que tiende V_m cuando se produce una perturbación en él. Estos puntos corresponden al potencial de reposo y al potencial de inversión del área de la corriente neta, de manera que tras la despolarización de la membrana por encima de un umbral el proceso autorregenerativo (manifestado por la pendiente negativa de la relación I-V) hace tender V_m hacia su nuevo punto de estabilidad despolarizado. En tanto que la forma en el tiempo del potencial de acción registrado en BAPTA es constante, aquél registrado en solución normal es variable, pues el tiempo necesario para alcanzar su máximo disminuye a medida que aumenta la intensidad del pulso despolarizante (véase Figura 8.1). Por tanto, mientras que en BAPTA, el grado de activación de I_{Ca} e I_K durante el pico del potencial de acción es constante, en solución normal I_{Ca} , $I_{K(Ca)}$ e I_K están diferentemente activadas durante él, lo cual se traduce

en la existencia de un único punto estable en BAPTA (cualquiera sea la despolarización supraumbral) y de diferentes puntos estables para diferentes intensidades de despolarización en solución normal. En efecto, cuanto mayor es la despolarización provocada por el pulso de corriente, más rápida es la fase de ascenso del potencial de acción y menor, por ello, la proporción de corriente de salida activada durante el potencial de acción, siendo así más despolarizado el punto estable y, por tanto, siendo mayor la despolarización alcanzada por el máximo del potencial de acción. En BAPTA, sin embargo, la fase de ascenso del potencial de acción es constante cualquiera sea la despolarización supraumbral y no se ve retrasada por la presencia de $I_{K(Ca)}$; la proporción de corriente de salida activada es, por ello, constante, como lo es, por tanto, el único punto estable y, por ende, la despolarización alcanzada por el máximo del potencial de acción. Se explica así la existencia de potenciales de acción "todo o nada" en presencia de BAPTA, y la existencia de potenciales de acción graduados en solución normal.

De todo lo cual, podemos deducir que $I_{K(Ca)}$ es responsable de la variación en el tiempo del máximo del potencial de acción, en cuanto que contrarresta la corriente de entrada, y, por tanto, es responsable último de la gradación del máximo del potencial de acción. No debe olvidarse, sin embargo, la contribución que a ello hacen la corriente de pérdida y capacitiva de la fibra muscular, aun cuando $I_{K(Ca)}$ sea, efectivamente, el factor decisivo, pues aquellas corrientes se mantienen inalteradas en presencia de BAPTA, y la única diferencia existente entre el potencial de acción registrado en solución normal y en BAPTA es la supresión

de $I_{K(Ca)}$.

Por otra parte, I_{Ca} presenta un componente persistente que dura tanto como dura la fase despolarizada sostenida del PAS-Normal, como cabía esperar por el carácter persistente de I_{Ca} . Además, la relación I-V de este componente sostenido muestra que éste aparece para valores de V_m más hiperpolarizados (alrededor de 10 mV) del umbral de activación de I_{Ca} determinado por pulsos de voltaje despolarizantes. Este comportamiento puede ser explicado por la existencia de una corriente de ventana de I_{Ca} (véase capítulo III.5). En efecto, la despolarización correspondiente al pico del potencial de acción provoca la inactivación por voltaje de los CCVD (de acuerdo a la probabilidad definida por la curva de inactivación de I_{Ca}), si esta despolarización es lo suficientemente grande, durante la despolarización sostenida subsiguiente al pico del potencial de acción, una alta proporción de CCVD se hallarían en su estado inactivado; sin embargo, la presencia de una corriente de ventana de I_{Ca} , durante la cual se ha sugerido la existencia de transiciones en los diferentes estados del canal (cerrado, abierto e inactivado) (véase capítulo III.5), contribuye, junto con el carácter persistente de I_{Ca} , a la existencia de una corriente persistente de Ca^{2+} durante esta fase de despolarización sostenida tras un pico de mayor despolarización. Así, el carácter persistente de I_{Ca} y la corriente de ventana de I_{Ca} permiten la entrada sostenida de iones Ca^{2+} durante tanto tiempo como dura la despolarización sostenida producida por la aferencia sináptica excitadora y, por ende, la contracción tónica de las fibras musculares durante tanto tiempo como dure la

excitación sináptica.

Se explica, así, la diferencia en el umbral de activación de I_{Ca} por pulsos de voltaje y el valor de V_m al cual aparece la corriente sostenida de I_{Ca} , pues en tanto que el umbral de activación ocurre por transición de los CCVD desde el estado cerrado al abierto según una probabilidad de apertura definida por la sensibilidad a V_m de ellos, el valor de V_m a partir del cual existe un componente sostenido de I_{Ca} depende de la probabilidad de transición entre los diferentes estados del canal y, por tanto, de las curvas de activación e inactivación (en definitiva, del valor de V_m en el cual ambas se solapan, esto es, de la corriente de ventana). En efecto, para un valor de V_m comprendido en la región donde ambas curvas se solapan, esto es, donde la activación de los CCVD es despreciable (es decir, donde la probabilidad de apertura desde el estado cerrado es próxima a cero) pero donde la inactivación de los CCVD no es total (es decir, donde la probabilidad de que los CCVD pasen a un estado inactivado es menor que uno), I_{Ca} no sería generada por despolarización de la membrana a ese valor de V_m desde un valor hiperpolarizado y sí lo sería, sin embargo, cuando ese valor de V_m se alcanzase por repolarización de la membrana desde un valor despolarizado que previamente provocara la apertura de los CCVD.

Por otra parte, I_{Ca} durante la fase de despolarización sostenida es dependiente de V_m , incrementándose a medida que aumenta la despolarización. Así, cuanto mayor es la despolarización, mayor es I_{Ca} y, por tanto, mayor la cantidad de Ca^{2+} liberada del retículo sarcoplásmico y, por ello, mayor el grado de contracción de la fibra muscular. Esta gradación de la

despolarización es así responsable de la gradación de la contracción muscular.

Sin embargo, el carácter autorregenerativo de I_{Ca} (debido a la pendiente negativa de su relación I-V) parecería impedir una gradación de la despolarización de acuerdo al modelo descrito para la generación del potencial de acción en el axón gigante de calamar (Hodgkin y Huxley, 1952d; Noble, 1966; MacGregor y Lewis, 1977). No obstante, la presencia de un componente sostenido de $I_{K(Ca)}$ de igual amplitud pero signo opuesto al componente sostenido de I_{Ca} , contrarresta este fenómeno autorregenerativo, haciendo la suma resultante de ambas corrientes igual a cero y, por tanto, haciendo V_m estable cualquiera sea el grado de despolarización generado por la excitación sináptica.

Podemos así concluir las implicaciones funcionales de las tres corrientes activadas por despolarización presentes en las fibras musculares del músculo abductor. El influjo de Ca^{2+} manifestado por I_{Ca} media la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico responsable de la contracción muscular (Györke y Palade, 1992). $I_{K(Ca)}$ es responsable de contrarrestar I_{Ca} , impidiendo el proceso autorregenerativo del potencial de acción (definido por la pendiente negativa de la relación I-V de I_{Ca}) y retrasando la despolarización inicial provocada por I_{Ca} , siendo así responsable última de la gradación del potencial de acción, en cuanto que este retraso permite la activación de I_K , que es, finalmente, responsable directa de esta gradación. I_K es asimismo responsable de la repolarización de V_m hasta un valor despolarizado sostenido durante la estimulación, en el cual aparece la corriente de ventana de I_{Ca} , permitiendo así el flujo

sostenido de iones Ca^{2+} durante la despolarización sostenida. Además, durante la fase despolarizada sostenida del potencial de acción, $I_{K(\text{Ca})}$ contrarresta I_{Ca} permitiendo el influjo de Ca^{2+} sin la consiguiente despolarización. Por tanto, puesto que la contracción de la fibra muscular es función directa del grado de despolarización (Orkand, 1962), la conjugación de estas corrientes produce la variación graduada de V_m , permitiendo así la gradación del influjo de Ca^{2+} y, por último, la gradación de la contracción muscular. Además, puesto que el mecanismo de contracción muscular es un mecanismo de LCIC (Györke y Palade, 1992), la conjugación de estas corrientes permite también el influjo sostenido de Ca^{2+} sin que ello conlleve una subsiguiente despolarización.

IV. CONCLUSIONES

De los resultados expuestos y de la discusión realizada de ellos establecemos las siguientes conclusiones:

IV.1. DE LAS CARACTERISTICAS DE LOS CANALES IONICOS DE MEMBRANA

1. La corriente instantánea, que denominamos I_p , y cuya conductancia es independiente de tiempo y de voltaje, puede ser considerada como la corriente de pérdida del músculo abductor. Los canales iónicos de membrana que median I_p presentan una naturaleza propia y diferenciada del resto de canales. Estos canales son bloqueados, de manera reversible y dependiente de concentración, por Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} o Ni^{2+} y son insensibles a Ba^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} . Cada ión Cd^{2+} se une a más de un sitio receptor para bloquear I_p .

2. La rectificación anómala es debida a la activación por hiperpolarización de una corriente de entrada, dependiente de tiempo y de voltaje, que denominamos I_{AB} , y que presenta características electrofisiológicas y farmacológicas propias. I_{AB} es transportada por K^+ , su conductancia es dependiente de tiempo y de voltaje e independiente de $[K^+]_o$, la dependencia de voltaje de su conductancia es función de $V_m - E_K$ (asumiendo $[K^+]_i$ constante), es insensible a Cs^+ , Rb^+ y Ba^{2+} y es bloqueada reversiblemente por Cd^{2+} o Zn^{2+} . Los canales de membrana que median I_{AB} presentan un comportamiento óhmico y poseen dos mecanismos de compuerta, de entidad diferenciada por su sensibilidad a Cd^{2+} , responsables de su apertura y cierre.

3. El bloqueo de I_{AB} por Cd^{2+} es dependiente de concentración e independiente de voltaje, y es ejercido por unión reversible

de un ión Cd^{2+} a un único sitio receptor del canal que media I_{AB} . Cd^{2+} no modifica la permeabilidad selectiva de los canales que median I_{AB} . El lugar receptor de Cd^{2+} para bloquear es diferente del lugar receptor de K^+ para permear.

4. La corriente inicial de entrada activada por despolarización (que llamamos I_{Ca}) es transportada por Ca^{2+} a través de un único tipo de CCVD tipo L, y su activación e inactivación dependen de voltaje y de tiempo. I_{Ca} presenta una activación muy rápida y una inactivación rápida e incompleta. Los CCVD que median I_{Ca} son bloqueados por Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} , y presentan un alto umbral de activación, y mayor permeabilidad a Ba^{2+} que a Ca^{2+} y sensibilidad a DHP. La inactivación por tiempo de estos canales es dependiente de Ca^{2+} y de voltaje, siendo la dependencia de Ca^{2+} el factor limitante de este proceso.

5. La corriente retrasada de salida activada por despolarización (que denominamos I_K) es transportada por K^+ , es dependiente de voltaje y de tiempo y es responsable de la rectificación retardada generada por despolarización. Los canales de membrana que median I_K son sensibles a Ba^{2+} y poseen receptores extra e intracelulares de TEA, siendo la afinidad de TEA por éstos mayor que por aquéllos.

6. La corriente inicial de salida (que llamamos $I_{K(Ca)}$) es una corriente transportada por K^+ y dependiente de Ca^{2+} . Es además, dependiente de voltaje y de tiempo, y es suprimida por BAPTA intracelular y no por EGTA. Los canales iónicos de membrana que median $I_{K(Ca)}$ son bloqueados extra e intracelularmente por TEA y poseen propiedades semejantes a los canales tipo BK descritos en otros sistemas.

IV.2. DE LA FUNCION DE LOS CANALES IONICOS DE MEMBRANA

1. I_{Ca} e $I_{K(Ca)}$ presentan un pico durante el máximo del potencial de acción, y un componente sostenido, de similar amplitud pero de signo contrario, durante su fase despolarizada, haciendo V_m estable cualquiera sea el grado de despolarización generado por la excitación sináptica.

2. El carácter persistente de I_{Ca} y la existencia de la corriente de ventana de I_{Ca} para valores correspondientes a la fase de despolarización sostenida del potencial de acción posibilitan la existencia de una corriente persistente de Ca^{2+} tras el máximo de despolarización, permitiendo, por tanto, la entrada sostenida de iones Ca^{2+} durante tanto tiempo como dura la despolarización producida por la excitación sináptica.

3. I_K es responsable directo de la generación de potenciales de acción graduados y de la repolarización de V_m hasta niveles donde la corriente de ventana de I_{Ca} está presente.

4. I_{Ca} durante la fase de despolarización sostenida es dependiente de V_m . Así, cuanto mayor es la despolarización, mayor es I_{Ca} y, por tanto, mayor la cantidad de Ca^{2+} liberada del retículo sarcoplásmico y, por ello, mayor el grado de contracción de la fibra muscular. Esta gradación de la despolarización es así responsable de la gradación de la contracción muscular.

5. La conjugación de I_{Ca} , $I_{K(Ca)}$ e I_K produce la variación graduada de V_m , permitiendo así la gradación del influjo de Ca^{2+} y, por último, la gradación de la contracción muscular. Además, permite el influjo sostenido de Ca^{2+} sin que ello conlleve una subsiguiente despolarización. Se explica así la contracción lenta y tónica llevada a cabo por el músculo abductor.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams PR, Constanti A, Brown DA, Clark RB (1982) Intracellular Ca^{2+} activates a fast voltage-sensitive K^+ current in vertebrate sympathetic neurones. *Nature* 246:746-749.
- Adler EM, Augustine GJ, Duffy SN, Charlton MP (1991) Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci* 11:1496-1507.
- Adrian RH, Chandler WK, Hodgkin AL (1970) Slow changes in potassium permeability in skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 208:645-668.
- Akaike N, Kostyuk PG, Osipchuk YV (1989) Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones. *J Physiol (Lond)* 412:181-195.
- Armstrong CM (1975) Ionic pores, gates, and gating currents. *Q Rev Biophys* 7:179-210.
- Anderson CR, Stevens CF (1973) Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end-plate current fluctuations at frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 235:655-691.
- Araque A, Lerma J, Abaira V, Buño W (1989) Facilitación en la sinapsis neuromuscular de cangrejo de río. III Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia. Resumen P13.
- Araque A, Ferreira W, Lucas S, Buño W (1992) Glutamatergic postsynaptic block by *Pamphobeteus* spider venoms in crayfish. *Brain Res* 571:109-114.
- Araque A, Clarac F, Buño B (1993) Funnel-web toxin blocks neuromuscular transmission in crayfish: P-type Ca^{2+} channels mediate synaptic transmitter release. (Enviado a publicar).
- Arhem P (1980) Effects of rubidium, caesium, strontium, barium and lanthanum on ionic currents in myelinated nerve fibers of

- Xenopus laevis*. Acta Physiol Scand 180:7-16.
- Armstrong CM, Hille B (1972) The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier. J Gen Physiol 59:388-400.
- Armstrong CM, Swenson RP, Taylor SR (1982) Block of squid axon K channels by internally and externally applied barium ions. J Gen Physiol 80:663-682.
- Ashley CC, Mulligan IP, Lea TJ (1991) Ca²⁺ and activation mechanisms in skeletal muscle. Quart Rev Biophys 24:1-73.
- Atwood HL (1973) An attempt to account for the diversity of Crustacean muscles. Am Zool 13:357-378.
- Atwood HL (1982) Synapses and Neurotransmitters. En: The Biology of Crustacea (Ed. Bliss DE), vol 3, pp 105-150. Academic Press, New York.
- Atwood HL, Bittner GD (1971) Matching of excitatory and inhibitory inputs to crustacean muscle fibers. J Neurophysiol 34:157-170.
- Atwood HL, Morin WA (1970) Neuromuscular and axo-axonal synapses of the crayfish opener muscle. J Ultrastruct Res 32:351-369.
- Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ (1985a) Calcium entry into voltage-clamped presynaptic terminals of squid. J Physiol (Lond) 367:143-162.
- Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ (1985b) Calcium entry and transmitter release at voltage-clamped nerve terminals of squid. J Physiol (Lond) 369:163-181.
- Barret EF, Barret JN (1976) Separation of two voltage-sensitive potassium currents, and demonstration of a tetrodotoxin-resistant calcium current in frog motoneurons. J Physiol

- (Lond) 55:737-774.
- Benoit E, Dubois JM (1986) Toxin I from the snake *Dendroaspis polylepis polylepis*: a highly specific blocker of one type of potassium channel in myelinated nerve fiber. *Brain Res* 377:374-377.
- Bers DM (1991) Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic, Boston.
- Bittner GD (1968) The differentiation of crayfish muscle fibres during development. *J Exp Zool* 167:439-456.
- Bittner GD (1989) Synaptic plasticity at the crayfish opener neuromuscular preparation. *J Neurobiol* 20:386-408.
- Bittner GD, Swell L (1976) Facilitation at crayfish neuromuscular junctions. *J Comp Physiol* 109:287-308.
- Blatz AL, Magleby KL (1984) Ion conductance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J Gen Physiol* 84:1-23.
- Blatz AL, Magleby KL (1986) Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 323:718-720.
- Blatz AL, Magleby KL (1987) Calcium-activated potassium channels. *Trends Neurosci* 10:463-467.
- Boistel J, Fatt P (1958) Membrane permeability change during inhibitory transmitter action in crustacean muscle. *J Physiol (Lond)* 144:176-191.
- Boyle PJ, Conway EJ (1941) Potassium accumulation in muscle and associates changes. *J Physiol (Lond)* 100:1-63.
- Brandt PW, Reuben JP, Girardier L, Grundfest H (1965) Correlated morphological and physiological studies on isolated muscle

- fibres. I. Fine structure of the crayfish muscle fibre. *J Cell Biol* 25:233-260.
- Brown HF, DiFrancesco D (1980) Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sino-atrial node. *J Physiol (Lond)* 308:335-351.
- Brown HF, Kimura J, Noble D, Noble S, Taupignon AI (1984) The slow inward current, i_{s1} , in the rabbit sino-atrial node investigated by voltage clamp and computer simulation. *Proc Royal Soc Lond (Biol)* 222:305-328.
- Bush BMH (1962) Peripheral reflex inhibition in the claw of the crab *Carcinus maeans* (L). *J Exp Biol* 39:71-88.
- Campbell DT, Hille B (1976) Kinetic and pharmacological properties of the sodium channel of frog skeletal muscle. *J Gen Physiol* 67:309-323.
- Carbone E, Swandulla D (1989) Neuronal calcium channels: kinetics, blockade and modulation. *Prog Biophys Molec Biol* 54:31-58.
- Cazalis M, Dayanithi LD, Nordmann JJ (1987) Hormone release from isolated nerve endings of the rat neurohypophysis. *J Physiol (Lond)* 390:55-70.
- Ceña V, Nicolas GP, Sánchez García P, Kirpekar SM, García AG (1983) Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience* 10:1455-1462.
- Chapple WD (1982) Muscle. En: *The Biology of Crustacea* (Ed. Bliss DE), vol 3, pp 151-184. Academic Press, New York.
- Chesnoy-Marchais D (1983) Characterization of a chloride conductance activated by hyperpolarization in *Aplysia* neurones.

- J Physiol (Lond) 342:277-308.
- Connor JA, Stevens CF (1971) Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neuron soma. J Physiol (Lond) 213:31-53.
- Constanti A, Galvan M (1983) Fast inward-rectifying current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurones. J Physiol (Lond) 335:153-178.
- Courtney KR (1975) Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA 968. J Pharmacol Exp Ther 195:225-236.
- DiFrancesco D (1981) A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibers. J Physiol (Lond) 314:377-393.
- DiFrancesco D (1982) Block and activation of the pace-maker channel in calf Purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium. J Physiol (Lond) 329:485-507.
- DiFrancesco D, Ojeda C (1980) Properties of the current i_f in the sinoatrial node of the rabbit compared with those of the current i_{K2} in Purkinje fibres. J Physiol (Lond) 308:353-367.
- Doerr T, Denger R, Trautwein W (1989) Calcium currents in single SA nodal cells of the rabbit heart studied with action potential clamp. Pflügers Arch 413:599-603.
- Dubois JM (1981) Evidence for the existence of three types of potassium channels in the frog Ranvier node membrane. J Physiol (Lond) 318:297-316.
- Dubois JM (1983) Potassium currents in the frog node of Ranvier. Prog Biophys Mol Biol 42:1-20.
- Dudel J (1965a) Presynaptic and postsynaptic effects of

- inhibitory drugs on the crayfish neuromuscular junction. Pflügers Arch 283:104-118.
- Dudel J (1965b) The mechanism of presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. Pflügers Arch 284:66-80.
- Dudel J (1974) Nonlinear voltage dependence of excitatory synaptic current in crayfish muscle. Pflügers Arch 352:227-241.
- Dudel J, Hatt H (1976) Four types of GABA receptors in crayfish leg muscles characterized by desensitization and specific antagonist. Pflügers Arch 364:217-222.
- Dudel J, Kuffler SW (1961a) The quantal nature of transmission and spontaneous miniature potentials at the crayfish neuromuscular junction. J Physiol (Lond) 155:514-529.
- Dudel J, Kuffler SW (1961b) Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. J Physiol (Lond) 155:543-562.
- Dudel J, Franke Ch, Hatt H (1990) A family of glutamatergic, excitatory channel types at the crayfish neuromuscular junction. J Com Physiol A 166:757-768.
- Edman A, Grampp W (1989) Ion permeation through hyperpolarization-activated membrane channels (Q-channels) in the lobster stretch receptor neurone. Pflügers Arch 413:249-255.
- Edman A, Gestrelus S, Grampp W (1987) Current activation by membrane hyperpolarization in the slowly adapting lobster stretch receptor neurone. J Physiol (Lond) 384:671-690.
- Fatt P, Ginsborg BL (1958) The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. J Physiol (Lond) 142:516-543.
- Fatt P, Katz B (1953) The electrical properties of crustacean muscle fibres. J Physiol (Lond) 120:171-204.

- Frankenhaeuser B, Hodgkin AL (1956) The after-effects of impulses in the giant nerve fibres of *Loligo*. *J Physiol (Lond)* 131:341-376.
- Frankenhaeuser B, Hodgkin AL (1957) The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J Physiol (Lond)* 137:218-244.
- Franzini-Armstrong C (1973) Membranous systems in muscle fiber. En: *The structure and function of muscle* (Ed. Bourne GH), vol 1, pp 352-619. Academic Press, New York.
- Franzini-Armstrong C, Eastwood AB, Peachey LD (1986) Shape and disposition of clefts, tubules and sarcoplasmic reticulum in long and short sarcomere fibres of crab and crayfish. *Cell Tissue Res* 244:9-19.
- Gardos G (1958) The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 30:653-654.
- Gay LA, Stanfield PR (1977) Cs^+ causes a voltage-dependent block of inward K currents in resting skeletal muscle fibres. *Nature* 267:169-170.
- Gershenfeld HM (1973) Chemical transmission in invertebrate central nervous system and neuromuscular junctions. *Physiol rev* 53:1-119.
- Gola M, Hussy N, Crest M, Ducreux C (1986) Time course of Ca and Ca-dependent K currents during molluscan nerve cell action potentials. *Neurosci Lett* 70:354-359.
- Györke S, Palade P (1992) Calcium-induced calcium release in crayfish skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 457:195-210.
- Gorman ALF, Thomas MV (1978) Changes in the intracellular

- concentration of free calcium ions in a pace-maker neuron, measured with the metallochromic indicator dye arsenazo III. *J Physiol (Lond)* 275:357-376.
- Gorman ALF, Thomas MV (1980) Intracellular calcium accumulation during depolarization in a molluscan neurone. *J Physiol (Lond)* 308:259-285.
- Gorman ALF, Hermann A, Thomas MV (1981) Intracellular calcium and the control of neuronal pacemaker activity. *Fed Proc* 40:2233-2239.
- Govind CK, Atwood HL (1982) Organization of neuromuscular systems. En: *The Biology of Crustacea* (Ed. Bliss DE), vol 3, pp 63-103. Academic Press, New York.
- Hagiwara S, Byerly L (1981) Calcium channel. *Annu Rev Neurosci* 4:69-125.
- Hagiwara S, Naka KI (1964) The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low intracellular Ca^{2+} . *J Gen Physiol* 48:141-161.
- Hagiwara S, Saito M (1959) Voltage-current relation in nerve cell membrane of *Onchidium verruculatum*. *J Physiol (Lond)* 148:161-179.
- Hagiwara S, Yoshii M (1979) Effects of internal potassium and sodium on the anomalous rectification of the starfish egg as examined by internal perfusion. *J Physiol (Lond)* 292:251-265.
- Hagiwara S, Takahashi K (1974) The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell. *J Membr Biol* 18:61-80.
- Hagiwara S, Miyazaki S, Rosenthal NP (1976) Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous

- rectification of the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 67:621-638.
- Hagiwara S, Miyazaki S, Moody W, Patlak J (1978) Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg. *J Physiol (Lond)* 279:167-185.
- Hall AE, Hutter OF, Noble D (1963) Current-voltage relations of Purkinje fibres in sodium-deficient solutions. *J Physiol (Lond)* 166:225-240.
- Halliwel JV, Adams PR (1982) Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res* 250:71-92.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85-100.
- Hencek M, Zachar J (1977) Calcium currents and conductances in the muscle membrane of the crayfish. *J Physiol (Lond)* 268:51-71.
- Hencek M, Zachar J, Zacharova D (1978) Membrane currents in a calcium type muscle membrane under voltage clamp. *Physiol Bohemoslov* 27:457-466.
- Heyer CB, Lux HD (1976) Control of the delayed outward potassium currents in bursting pace-maker neurons of the snail, *Helix pomatia*. *J Physiol (Lond)* 262:349-382.
- Hidalgo J, Luxoro M, Rojas E (1979) On the role of the extracellular calcium in triggering contraction in muscle fibres from barnacle under membrane potential control. *J*

- Physiol (Lond) 288:313-330.
- Hille B (1967) The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *J Gen Physiol* 50:1287-1302.
- Hille B (1977a) The pH-dependent rate of action of local anesthetics on the node of Ranvier. *J Gen Physiol* 69:475-496.
- Hille B (1977b) Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug receptor reaction. *J Gen Physiol* 69:497-515.
- Hille B (1992) *Ionic channels of excitable membranes*, 2nd. ed. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hirano Y, Moscucci A, January CT (1992) Direct measurement of L-type Ca^{2+} window current in heart cells. *Circ Res* 70:445-455.
- Hirning LD, Fox AP, McCleskey EW, Olivera BM, Thayer SA, Miller RJ, Tsien RW (1988) Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 239:57-61.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952a) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol (Lond)* 116:449-472.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952b) The components of membrane conductances in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol (Lond)* 116:473-496.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952c) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in giant axon of *Loligo*. *J Physiol (Lond)* 116:497-506.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952d) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and

- excitation in nerve. *J Physiol (Lond)* 117:500-544.
- Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B (1949) Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch Sci Physiol* 3:129-150.
- Huguenard JR, McCormick DA (1992) Simulation of the currents involved in rhythmic oscillations in thalamic relay neurons. *J Neurophysiol* 68:1373-1383.
- Hugues M, Romey G, Duval B, Vincent JP, Lazdunski M (1982) Apamin as a selective blocker of the calcium dependent potassium channel in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:1308-1312.
- Ishihara K, Mitsuiye T, Noma A, Takano M (1989) The Mg^{2+} block and gating underlying inward rectification of the K^+ current in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol (Lond)* 419:297-320.
- Jahromi SS, Atwood HL (1974) Three-dimensional ultrastructure of the crayfish neuromuscular apparatus. *J Cell Biol* 63:599-613.
- Janhsen H, Llinás R (1984) Ionic bases for the electro-responsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 349:227-247.
- Kandel ER, Tauc L (1966) Anomalous rectification in the metacerebral giant cells and its consequences for synaptic transmission. *J Physiol (Lond)* 183:287-304.
- Kaneko A, Tachibana M (1985) Effects of L-glutamate on the anomalous rectifier potassium current in horizontal cells of *Carassius auratus* retina. *J Physiol (Lond)* 358:169-182.
- Katz B (1949) Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 3:285-300.

- Katz B, Miledi R (1970) Membrane noise produced by acetylcholine. *Nature* 226:962-963.
- Katz B, Miledi R (1972) The statistical nature of acetylcholine potential and its molecular components. *J Physiol (Lond)* 224:665-700.
- Kawagoe R, Onodera K, Takeuchi A (1981) Release of glutamate from the crayfish neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 312:225-236.
- Keller A, White EL (1987) Synaptic organization in the mouse Sml cortex. *J Comp Neurol* 262:1-12.
- Koppenhöfer E, Vogel W (1969) Wirkung von tetrodotoxin und tetraäthylammoniumchlorid an der innenseite der schnürringsmembran von *Xenopus laevis*. *Pflügers Arch* 313:361-380.
- Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O (1989) Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol* 51:385-399.
- Lea TJ, Ashley CC (1989) Va-induced Ca release from the sarcoplasmic reticulum of isolated myofibrillar bundles of barnacle muscle fibres. *Pflügers Arch* 314:401-406.
- Leech Ca, Stanfield PR (1981) Inward rectification in frog skeletal muscle fibres and its dependence on membrane potential and external potassium. *J Physiol (Lond)* 319:295-309.
- Levene E, Simonneau M (1986) Scorpion venom inhibits selectively Ca²⁺-activated K⁺ channels in situ. *FEBS Lett* 209:165-168.
- Llinás R, Yarom Y (1981) Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones *in vitro*. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J Physiol (Lond)* 315:549-567.

- Llinás R, Steinberg IZ, Walton K (1981) Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J* 33:323-352.
- Llinás R, Sugimori M, Simon SM (1982) Transmission by presynaptic spike-like depolarization in the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:2415-2419.
- Llinás R, Sugimori M, Lin JW, Cherksey B (1989) Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1689-1693.
- MacGregor RJ, Lewis ER (1977) *Neural modeling*. Plenum Press, New York.
- Madison DV, Nicoll RA (1984) Control of the repetitive discharge of rat CA1 pyramidal neurones *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 354:319-331.
- Madison DV, Malenka RC, Nicoll RA (1986) Phorbol esters block a voltage-sensitive chloride current in hippocampal pyramidal cells. *Nature* 321:695-697.
- Martin AR (1955) A further study of the statistical composition of the end-plate potential. *J Physiol (Lond)* 130:114-122.
- Marty A (1981) Ca-dependent potassium channel with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* 291:497-500.
- Marty A (1983) Ca²⁺-dependent K⁺ channels with large unitary conductance. *Trends Neurosci* 6:262-265
- Marty A, Neher E (1985) Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol (Lond)* 367:117-141.
- Matsuda H (1991) Magnesium gating of the inwardly rectifying K⁺ channel. *Annu Rev Physiol* 53:289-298.

- Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H (1987) Ohmic conductance through the inwardly rectifying K⁺ channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature* 325:156-159.
- Mayer ML, Westbrook GL (1983) A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *J Physiol (Lond)* 340:19-45.
- McCleskey EW, Fox AP, Feldman DH, Cruz LJ, Olivera BM, Tsien RW, Yoshikami D (1987) ω -Conotoxin: Direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4327-4331.
- McCobb DP, Beam KG (1991) Action potential waveform voltage-clamp commands reveal striking differences in calcium entry via low and high voltage-activated calcium channels. *Neuron* 7:119-127.
- McCormick DA, Huguenard JR (1992) A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *J Neurophysiol* 68:1384-1400.
- Meech RW (1974) The sensitivity of *Helix aspersa* neurones to injected calcium ions. *J Physiol (Lond)* 237:259-277.
- Meech RW, Strumwasser F (1970) Intracellular calcium injection activates potassium conductance in *Aplysia* nerve cells. *Fed Proc* 29:834a.
- Miller RJ (1987) Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 235:46-52.
- Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M (1985) Charibdotoxin, a protein inhibitor of Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313:316-318.
- Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, Adams ME (1992) P-type calcium channels blocked by the spider toxin

ω -Aga-IVA. Nature 355:827-829.

Mitra R, Morad M (1991) Permeance of Cs⁺ and Rb⁺ through the inwardly rectifying K⁺ channel in guinea-pig ventricular myocytes. J Membr Biol 122:33-42.

Miyazaki S, Takahashi K, Tsuda K, Yoshii M (1974) Analysis of non-linearity observed in the current-voltage relation of the tunicate embryo. J Physiol (Lond) 238:55-77.

Moczydlowski E, Latorre R (1983) Gating kinetics of Ca²⁺-activated K⁺ channels from rat muscle incorporated into planar lipid bilayer: Evidence for two voltage-dependent Ca²⁺ binding reactions. J Gen Physiol 82:511-542.

Mogul DJ, Fox AP (1991) Evidence for multiple types of Ca²⁺ channels in acutely isolated hippocampal CA3 neurones of the guinea-pig. J Physiol (Lond) 433:259-281.

Mounier Y, Vassort G (1975a) Initial and delayed membrane currents in crab muscle fibre under voltage-clamp conditions. J Physiol (Lond) 251:589-608.

Mounier Y, Vassort G (1975b) Evidence for a transient potassium membrane current dependent on calcium influx in crab muscle fibre. J Physiol (Lond) 251:609-625.

Mozhayeva GN, Naumov AP, Negulyaev YA, Nosyreva ED (1977) The permeability of aconitine-modified sodium channels to univalent cations in myelinated nerve. Biochim Biophys Acta 466:461-473.

Nakajima S (1966) Analysis of K inactivation and TEA action in the supramedullary cells of puffer. J Gen Physiol 49:629-640.

Nakajima S, Kusano K (1966) Behavior of delayed current under voltage clamp in the supramedullary neurons of puffer. J Gen Physiol 49:613-628

- Nakajima S, Iwasaki S, Obata K (1962) Delayed rectification and anomalous rectification in frog's skeletal muscle membrane. *J Gen Physiol* 46:97-115.
- Neher E (1986) Concentration profiles of intracellular calcium in the presence of a diffusible chelator. *Exp Brain Res* 14:80-96.
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:779-802
- Noble D (1966) Applications of Hodgkin-Huxley equations to excitable tissues. *Physiol Rev* 46:1-50.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-465.
- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- Onodera K, Takeuchi A (1975) Ionic mechanism of the excitatory synaptic membrane of the crayfish neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 252:295-318.
- Orkand RK (1962) The relation between membrane potential and contraction in single crayfish muscle fibres. *J Physiol (Lond)* 161:143-159.
- Pallota BS, Magleby KL, Barret JN (1981) Single-channel recordings in Ca^{2+} -activated K^+ currents in rat muscle cell culture. *Nature* 293:471-474.
- Parker I, Miledi R (1988) A calcium-independent chloride current activated by hyperpolarization in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B* 223:191-199.

- Pennefather P, Lancaster B, Adams PR, Nicoll RA (1985) Two distinct Ca-dependent K currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. Proc Natl Acad Sci USA 82:3040-3044.
- Perney TM, Hirning LD, Leeman SE, Miller RJ (1986) Multiple calcium channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. Proc Natl Acad Sci USA 83:6656-6659.
- Peters A, Palay SL, Webster HF (1970) The fine structure of the nervous system. Harper & Row, New York.
- Petersen OH, Maruyama Y (1984) Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. Nature 307:693-696.
- Portzehl H, Caldwell PC, Rüegg JC (1964) The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab *Maia squinado* on the internal concentration of free calcium ions. Biochim Biophys Acta 79:581-591.
- Reuter H, Scholz H (1977) A study of the ion selectivity and the kinetic properties of the calcium dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle. J Physiol (Lond) 264:17-44.
- Reuter H, Porzig H, Kokubun S, Prod'Hom B (1985) 1,4-Dihydropyridines as tools in the study of Ca²⁺ channels. Trends Neurosci 8:396-400.
- Richard S, Diochot S, Nargeot J, Baldy-Moulinier M, Valmier J (1991) Inhibition of T-type calcium currents by dihydropyridines in mouse embryonic dorsal root ganglion neurons. Neurosci Lett 132:229-234.
- Ríos E, Brum G (1987) Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. Nature 325:717-720.
- Ríos E, Pizarro G (1991) Voltage sensor of excitation-contraction

- coupling in skeletal muscle. *Physiol Rev* 71:849-908.
- Romey G, Lazdunski M (1984) The coexistence in rat muscle cells of two distinct classes of Ca^{2+} -dependent K^+ channels with different pharmacological properties and different physiological functions. *Biochem Biophys Res Commun* 118:669-674.
- Sakmann B, Trube G (1984) Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol (Lond)* 347:641-657.
- Schneider MF, Chandler WK (1973) Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* 242:244-246.
- Schmidt H, Stämpfli R (1966) Die Wirkung von tetraäthylammoniumchlorid auf den einzelnen Ranvierschen schnürring. *Pflügers Arch* 287:311-325.
- Schwartz LM, McCleskey EW, Almers W (1985) Dihydropyridine receptors in muscle are voltage dependent, but most are not functional calcium channels. *Nature* 314:747-751.
- Schwartzkroin PA, Slawsky M (1977) Probable calcium spikes in hippocampal neurons. *Brain Res* 135:157-161.
- Schwarz W, Palade PT, Hille B (1977) Local anesthetics: Effect of pH on use-dependent block of sodium channels in frog muscle. *Biophys J* 20:343-368.
- Shorofsky SR, January CT (1992) L- and T-type Ca^{2+} channels in canine cardiac purkinje cells: Single-channel demonstration of L-type Ca^{2+} window current. *Circ Res* 70:456-464.
- Silver M, DeCoursey TE (1990) Intrinsic gating of the inward rectifier in bovine pulmonary artery endothelial cells in the

- presence or absence of internal Mg^{2+} . *J Gen Physiol* 96:109-133.
- Smith JS, Imagawa T, Ma J, Fill M, Campbell KP, Coronado R (1988) Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol* 92:1-26.
- Spain WJ, Schwandt PC, Crill WE (1987) Anomalous rectification in neurons from cat sensorimotor cortex *in vitro*. *J Neurophysiol* 57:1555-1576.
- Spencer AN, Przysieznik J, Acosta-Urquidi J, Basarsky TA (1989) Presynaptic spike broadening reduces junctional potential amplitude. *Nature* 340:636-638.
- Standen NB, Stanfield PR (1978) A potential- and time-dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle fibres by barium and strontium ions. *J Physiol (Lond)* 280:169-191.
- Standen NB, Stanfield PR (1980) Rubidium block and rubidium permeability of the inward rectifier of frog skeletal muscle fibres. *J Physiol (Lond)* 304:415-435.
- Stanfield PR (1970) The effect of tetraethylammonium ion on the delayed currents of frog skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 209:209-229.
- Stanfield PR (1983) Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 97:1-67.
- Stanfield PR, Nakajima Y, Yamaguchi K (1985) Substance P raises neuronal membrane excitability by reducing inward rectification. *Nature* 315:498-501.
- Storm JF (1987) Action potential repolarization and fast afterhyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J*

- Physiol (Lond) 385:733-759.
- Storm JF (1988) Temporal integration by slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons. Nature 336:379-381.
- Strichartz GR (1973) The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. J Gen Physiol 62:37-57.
- Takahashi T (1990) Inward rectification in neonatal rat spinal motoneurons. J Physiol (Lond) 423:47-62.
- Takeuchi A, Takeuchi N (1964) The effect on crayfish muscle of iontophoretically applied glutamate. J Physiol (Lond) 170:296-317.
- Takeuchi A, Takeuchi N (1965) Localized action of gamma-aminobutyric acid on the crayfish muscle. J Physiol (Lond) 177:225-238.
- Takeuchi A, Takeuchi N (1966a) A study of inhibitory action of γ -aminobutyric acid on the neuromuscular transmission in the crayfish. J Physiol (Lond) 183:418-432.
- Takeuchi A, Takeuchi N (1966b) On the permeability of the presynaptic terminal of the crayfish neuromuscular junction during synaptic inhibition and the action of γ -aminobutyric acid. J Physiol (Lond) 183:433-449.
- Takeuchi A, Takeuchi N (1967) Anion permeability of the inhibitory post-synaptic membrane of the crayfish neuromuscular junction. J Physiol (Lond) 191:575-590.
- Tanabe T, Beam KG, Powell JA, Numa S (1988) Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. Nature 336:134-139.

- Tanabe T, Mikami A, Numa S, Beam KG (1990a) Cardiac-type excitation-contraction coupling in dysgenic skeletal muscle injected with cardiac dihydropyridine receptor cDNA. *Nature* 344:451-453.
- Tanabe T, Beam KG, Adams A, Niidome T, Numa S (1990b) Regions of skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* 346:567-569.
- Tasaki I, Hagiwara S (1957) Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride. *J Gen Physiol* 40:859-885.
- Thomas MV (1982) *Techniques in calcium research*. Academic, London.
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 11:431-438.
- Uchitel OD, Protti DA, Sánchez V, Cherksey BD, Sugimori M, Llinás R (1992) P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3330-3333.
- Van Harreveld A (1936) A physiological solution for fresh water crustaceans. *Proc Soc Exp Biol Med* 34:428-432.
- Vergara J, Verdugo P (1988) Calcium transients in voltage clamped giant barnacle muscle fibres. *Biophys J* 53:647a.
- Williams JT, Colmers WF, Pan ZZ (1988) Voltage- and ligand-activated inwardly rectifying currents in dorsal raphe neurons *in vitro*. *J Neurosci* 8:3499-3506.
- Wong BS, Binstock L (1980) Inhibition of potassium conductance with external tetraethylammonium ion in *Myxicola* giant axons.

- Biophys J 32:1037-1042.
- Woodhull AM (1973) Ionic blockage of sodium channels in nerve. J Gen Physiol 61:687-708.
- Yanagihara K, Irisawa H (1980) Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. Pflügers Arch 385:11-19.
- Yarom Y, Sugimori M, Llinás R (1985) Ionic currents and firing patterns of mammalian vagal motoneurons *in vitro*. Neuroscience 16:719-737.
- Yellen G (1984) Ionic permeation and blockade in Ca^{2+} -activated K^+ channels of bovine chromaffin cells. J Gen Physiol 84:157-186.
- Zacharova D, Zachar J (1967) The effect of external calcium ions on the excitation-contraction coupling in single muscle fibres of the crayfish. Physiol Bohemoslov 16:191-207.
- Zucker RS (1977) Synaptic plasticity at crayfish neuromuscular junctions. En: Identified neurons and behavior of arthropods (Ed. Hoyle G), Plenum Press, New York.
- Zucker RS, Steinhardt RA (1978) Prevention of the cortical reaction in fertilized sea urchin eggs by injection of calcium-chelating ligands. Biochim Biophys Acta 541:459-466.