Universidad de Sevilla
Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

Asignatura Fisiología Genera.
Primer Curso del Grado de Medicina.

Sesión de Laboratorio I:
Simulación del potencial de acción

POTAC

El programa "POTAC" simula las propiedades electrofisiológicas del axón gigante de calamar, preparación utilizada por Huxley, Hodgkin, Goldman para llevar a cabo los experimentos que les permitieron desarrollar las bases teóricas de los potenciales de acción de las neuronas. El programa ha sido realizado por el Prof. Álvarez de Toledo, Catedrático de Fisiología de nuestro Departamento, y puede descargarse de la siguiente URL:

http://www.guillermoalvarezdetoledo.com/index.php/es/estudiantes/descarga/simulaciones-en-fisiologia.html

El programa utiliza las ecuaciones que establecieron los mencionados autores para predecir los cambios en los potenciales de membrana en distintas situaciones, así como simular las corrientes iónicas en situación de fijación de voltaje. Podrá ver 3 hojas de Excel: *Dispositivo Experimental*, *Potencial de Acción* y *Corrientes iónicas*.

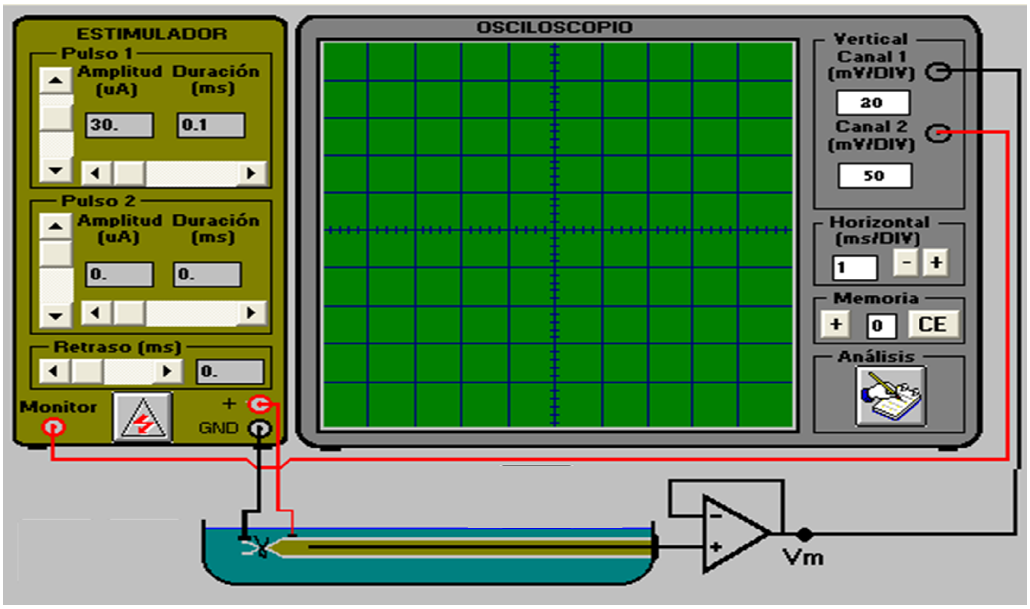


Figura 1: Dispositivo experimental para el registro de potencial de acción.

1.- La preparación (*dispositivo experimental*)

En la parte inferior de la pantalla se observa un esquema de la preparación experimental. Un axón gigante de calamar sumergido en una cubeta con una solución salina fisiológica. En el interior del axón se ha introducido un electrodo metálico, mientras que otro electrodo se encuentra en la solución extracelular. Cada uno de estos electrodos está a un lado de la membrana y servirán, por tanto, para el registro del potencial de membrana. La diferencia de potencial entre los dos electrodos se lleva al *Amplificador de registro* (seguidor de voltaje) para registrar Vm. En el lado izquierdo del dispositivo se encuentran los electrodos de estimulación (+, GND), conectados al *Estimulador de Pulsos*. En el *Osciloscopio* se monitoriza tanto el estímulo aplicado (pulso cuadrado) como los cambios de potencial de membrana (respuesta pasiva o potencial de acción). El electrodo de referencia en ambos casos es, en realidad, un electrodo de toma de tierra (GND).

2.- El estimulador para el registro del Potencial de Acción

El estimulador permite aplicar uno o dos pulsos de estimulación (*Pulsos 1* y *2*) de la *Amplitud* (μA) y la *Duración* (ms) deseada. Se puede controlar el *Retraso* (ms), o inérvalo, entre los Pulsos 1 y 2.

3.- El registro del potencial de acción

El *Osciloscopio* tiene dos canales. El Canal 1 monitoriza el potencial de membrana y el Canal 2 los estímulos aplicados. La escala temporal se puede controlar. Los registros (barridos) se pueden grabar. Estos datos se podrán analizar en las gráficas inferiores. Para borrar los datos almacenados basta con pulsar *CE* en el osciloscopio.

Para comprobar el funcionamiento del programa, en *Potencial de Acción*, se procederá a la estimulación de la preparación con un solo pulso de 30 μA de intensidad y 0.1 ms de duración. En estas condiciones, se produce un potencial de acción. Almacene el registro. En los gráficos inferiores aparecerá *las corrientes iónicas, las conductancias iónicas, y el estado de las compuertas de canales de Na+ y K+* antes, durante y después del potencial). Utilice el cursor para leer los valores en cada instante del experimento.

Ejercicios sobre el Potencial de Acción:

1. Estímulos subumbral, umbral y supraumbral

Uno de los primeros pasos para caracterizar funcionalmente una membrana neuronal es determinar su **umbral de excitabilidad**. Aplique un pulso de corriente despolarizante de 1 μA y 1 ms al axón y observe el cambio en Vm. Grabe el registro. Incremente poco a poco la amplitud del pulso sin cambiar la duración hasta que se produzca un potencial de acción. Grabe el registro. Anote el tiempo en el que se produce el pico. Aplique un estímulo supraumbral, por ejemplo, del doble de intensidad que el estímulo umbral, mida de nuevo en qué momento se produce el pico y anótelo en la Tabla I.

2.- Curva de excitabilidad.

El objetivo de este experimento es ver la importancia de la intensidad y la duración de los estímulos en la producción del potencial de acción. Hay que encontrar el menor estímulo que para cada intensidad y duración produzca un potencial de acción. Es recomendable comenzar por un estímulo de muy baja intensidad y muy larga duración, por ejemplo, 0.1 μA y 10 ms. Si no se obtuviera potencial de acción, aumente la intensidad en intervalos de 0.1 (o de menos, si se quiere afinar más) hasta que aparezca. Anótense los datos en la Tabla II de *Resultados*. Cuando consiga un potencial de acción represente en la gráfica ese punto. Repita el experimento con un pulso de 8 ms y encuentre la intensidad mínima que produce un potencial de acción. Represéntelo en la gráfica. Repita los pasos anteriores con pulsos de 6, 4, 2, y 1 ms.

3.- Periodo refractario.

Durante e inmediatamente después del desarrollo de un potencial de acción, la membrana permanece no excitable durante un corto intervalo de tiempo: el periodo refractario. Para determinar el de esta preparación, se aplicaran 2 estímulos de 30 μA de intensidad y de 1 ms de duración, con un retraso entre ambos de 5 ms. Si no se obtiene un segundo potencial de acción, aumente el retraso entre ambos estímulos hasta que se obtenga un potencial de acción características similares al primero. Cuando se haya conseguido, intente disminuir el periodo refractario con un segundo estímulo de mayor intensidad y la misma duración que el primero.

4.- Efecto de los bloqueantes de los canales iónicos sobre el potencial de acción.

Los cambios en el potencial de membrana, que ha tenido la oportunidad de explorar en los apartados anteriores, están producidos por modificaciones en las corrientes iónicas como consecuencia de la alteración de la conductancia de los canales de sodio y de potasio.

Como ya sabe, el canal de sodio tiene dos compuertas, una de activación llamada *m* y otra de inactivación, denominada *h*. La primera es una compuerta activada por voltaje, mientras que la segunda se cierra transcurrida una pequeña fracción de tiempo desde que se abrió la primera. El canal de sodio activado por voltaje se puede bloquear selectivamente mediante la utilización de un veneno conocido como tetrodotoxina (*TTX*), extraído de las gónadas del pez globo. A su vez, el canal de potasio activado por voltaje puede ser bloqueado selectivamente por tetraetilamonio (*TEA*). Además de estos canales activados por voltaje, la membrana del axón posee canales catiónicos pasivos

que permanecen continuamente abiertos y que son responsables de las corrientes de salida continuas de potasio (*leak*). Esta corriente de salida es la que, junto con la pequeña corriente de entrada de sodio, estabiliza el potencial de membrana en reposo.

El programa permite incorporar a la preparación experimental, tanto TTX como TEA, con el fin de bloquear los canales de Na^+ y K^+, respectivamente. El objetivo de este apartado de la práctica es que compruebe cuales son los efectos del bloqueo total o parcial de los canales de sodio y de potasio sobre la amplitud del potencial de acción y las conductancias para ambos iones.

Antes de añadir los correspondientes venenos deberá realizar una estimación control, aplicando un estímulo único de 30 μA durante 0.5 ms. Analice las características del potencial de acción producido y anote en la Tabla III los resultados correspondientes a la amplitud del potencial de acción, y la conductancia máxima para el sodio y para el potasio. Ahora ya está en condiciones de comparar los resultados producidos por adicción de TTX (Fig. 2).

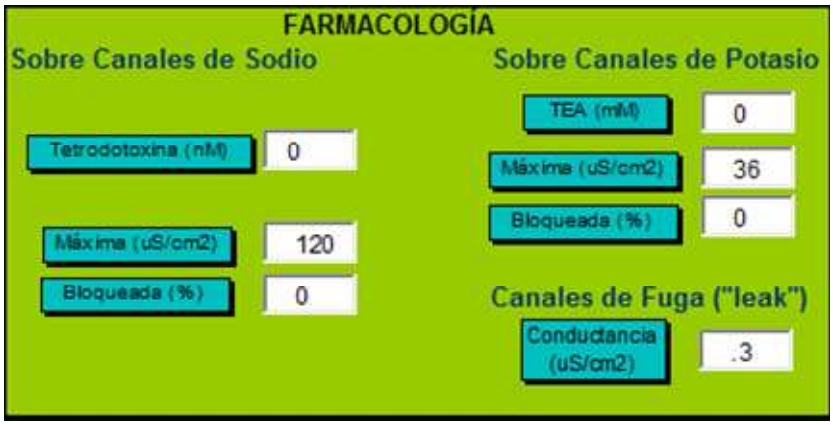


Figura 2: Menú de farmacología que le permitirá bloquear los canales de sodio y potasio.

Primero elija una concentración de TTX tal que bloquee el 50% de los canales de sodio. Una vez añadida esta sustancia, vuelva al menú principal y estimule una sola vez con una corriente de las mismas características que las de la estimulación control. Determine los mismos parámetros que en el caso anterior. A continuación añada TTX hasta conseguir un bloqueo del 99% y prosiga como en los casos anteriores.

Para estudiar los efectos del bloqueo de los canales de potasio activados por voltaje deberá proceder del mismo modo que para los canales de sodio, con la única diferencia de que deberá añadir TEA en vez de TTX. Anote los resultados en la Tabla III.

5.- Efectos de los cambios de concentraciones iónicas extracelulares sobre el potencial de acción.

Tanto el potencial de membrana en reposo como el potencial de acción se ven modificados al cambiar las concentraciones de Na^+ y de K^+ a ambos lados de la membrana neuronal. A las concentraciones habituales en los tejidos vivos, el K^+, por gradiente electroquímico, tiende a salir de la célula, mientras que el sodio tiende a entrar. Sin embargo, si se alteran sus concentraciones extracelulares, estas tendencias pueden verse modificadas significativamente.

El objetivo de esta parte de la práctica es el de comprobar cuales son los efectos que produce el cambio de las concentraciones extracelulares de Na^+ y de K^+ sobre el

potencia de acción y el potencial de membrana en reposo. Comenzaremos realizando una estimulación control con una corriente única de 30 μA durante 0.5 ms. Anote en la tabla III los resultados de amplitud máxima del potencial de acción, conductancias para el Na^+ y K^+, potencial de membrana en reposo y potenciales de equilibrio para el Na^+ y K^+. A continuación reduzca al 75% la concentración inicial de sodio (Fig. 5) y estimule el axón. Anote los resultados del mismo modo que lo hizo para la estimulación control. Continúe reduciendo la concentración de sodio al 25% y proceda del mismo modo. Finalizado el análisis de la contribución del sodio extracelular, ahora deberá cambiar las concentraciones de potasio. Vuelva a la concentración inicial de sodio, aumente la concentración de potasio hasta un 200% del valor inicial y anote los resultados. Posteriormente repita la misma operación, pero con un nivel de potasio extracelular aumentado hasta un 400% de su valor inicial.

Figura 3: Menú de modificación de la composición iónica.

Ejercicios sobre Corrientes iónicas:

6.- La técnica de fijación de voltaje sirve para estudiar los canales iónicos

Al contrario que la técnica que se utilizan para registrar el potencial de membrana y el potencial de acción (denominada *Registro intracelular con microelectrodos*), en la técnica de *Fijación de voltaje* se registran las corrientes iónicas a voltajes de membrana fijos. En este caso, se obtiene información sobre, por ejemplo, la amplitud de la corriente (cuantos canales se abren y cuanto conduce cada uno de ellos), la dirección de la corriente (entrada o salida de carga), o la cinética (la velocidad con que los canales se abren o se cierran).

Vaya a la hoja de Excel *Corrientes Iónicas*. Partiendo de un potencial de membrana de reposo de -90 mV en todos los casos, aplique un pulso de fijación de voltaje a -80 mV, durante 10 ms, para despolarizar Vm 10 mV. Grabe el registro y mida la amplitud de la corriente máxima producida. Represente el valor obtenido en la Gráfica 1 para el voltaje aplicado. Repita el protocolo aumentando los pulsos despolarizantes de 10 en 10 mV, hasta llegar a +60 mV. Construirá así la curva I/V total.

Vuelva a hacer el experimento pero bloqueando los canales de Na+ para obtener la curva I/V de K+. Finalmente, elimine la TTX y bloquee los canales de K+ con TEA. Obtenga del mismo modo la curva I/V para los canales de Na+.

Resultados

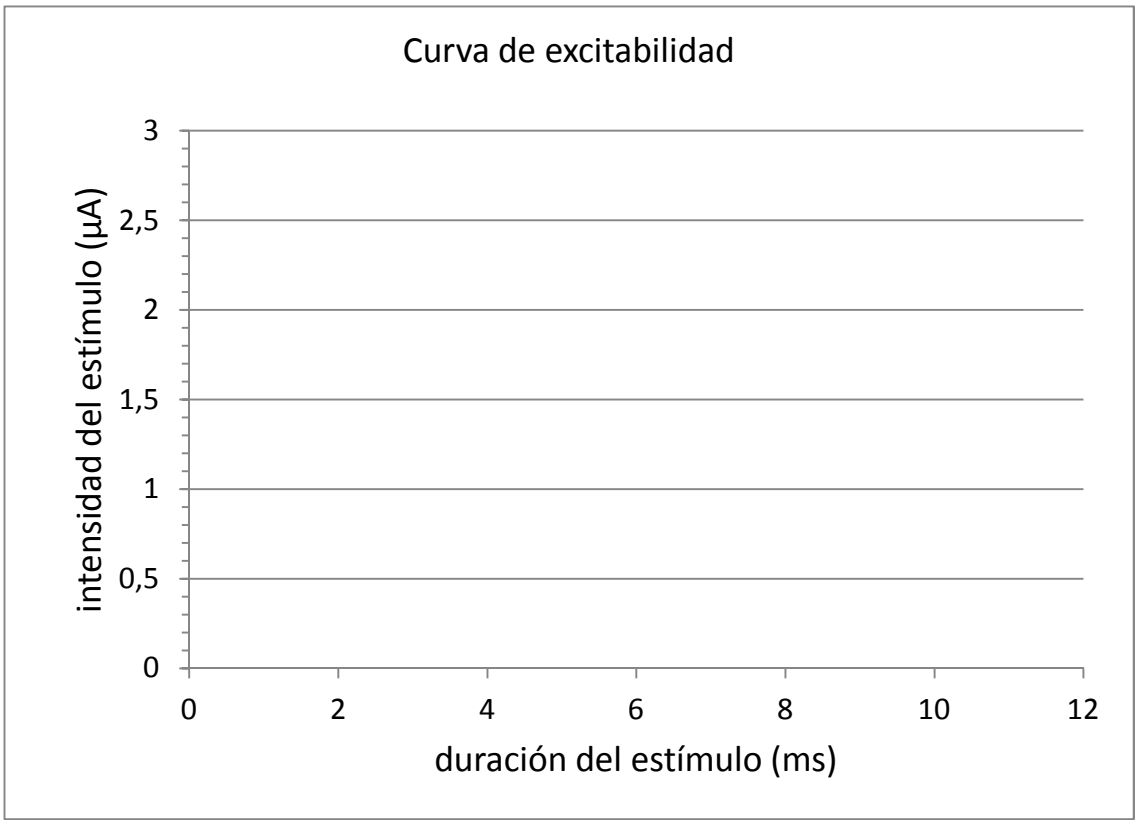
1.- Umbral de Excitabilidad

TABLA I. DATOS DE ESTÍMULOS ÚNICOS	
Int. (µA) dur (ms) t pico P.A (ms)	Int. (µA) dur (ms) t pico P.A (ms)

¿Qué conclusión podría sacar en relación a los registros obtenidos?
…….....
…….
…….

2.- Curva de Excitabilidad

TABLA II. DATOS DE ESTÍMULOS ÚNICOS	
Int. (µA) dur (ms) Amplitud pico P.A	Int. (µA) dur (ms) Amplitud pico P.A



Razone por qué el umbral de excitabilidad depende tanto de la amplitud como de la duración del estímulo:

…….
……..
……..

3.- Periodo refractario

Valor de periodo refractario absoluto: …….
Valor de periodo refractario relativo: ……..

¿A qué cree que se debe?

……..

Por qué un estímulo supraumbral puede provocar un segundo potencial de acción durante el periodo refractario relativo?
……
……
…….

4.- Bloqueo farmacológico de los canales iónicos.

Tabla III. Bloqueo de canales iónicos			
Situación	**Amplitud P.A. (mV)**	**Conductancia Na^+ ($\mu S/cm^2$)**	**Conductancia K^+ ($\mu S/cm^2$)**
Control			
TTX (50%)			
TTX (99%)			
TEA (63%)			
TEA (99%)			

¿Se ve modificada la conductancia a potasio al utilizar TTX, por qué?
……
……...

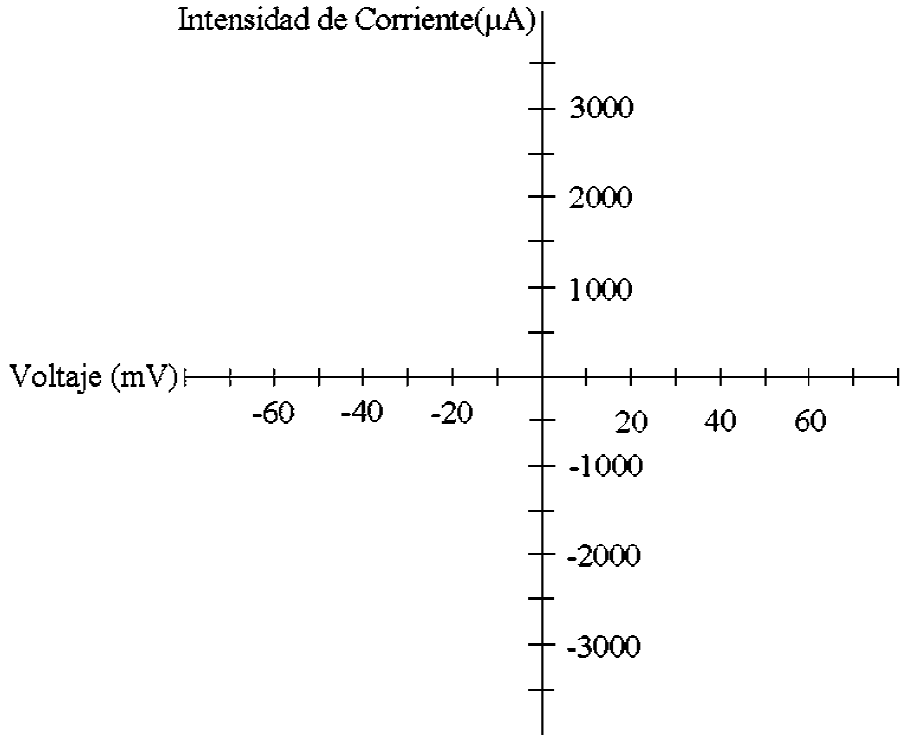
¿Cómo afecta el bloqueo del canal de potasio a la conductancia al sodio?
…….
…….

5.- Concentraciones iónicas.

Tabla III. Modificación de las concentraciones iónicas						
Situación	**Amplitud P.A. (mV)**	**Conduct. Na^+ ($\mu S/cm^2$)**	**Conduct. K^+ ($\mu S/cm^2$)**	**Pot. Memb. Reposo (mV)**	**Pot. Equil. Na^+ (mV)**	**Pot. Equil. K^+ (mV)**
Control						
Na^+ ext. (75%)						
Na^+ ext. (25%)						
K^+ ext. (200%)						
K^+ ext. (400%)						

Comente los resultados:……
……..
…….
…….
…….
…….

6. Curva I/V



Gráfica 1

¿A qué Vm se invierte la corriente de Na^+? ……

y la de K^+? ……..

¿Cuáles son las principales diferencias entre la curva I/V de Na+ y la de K+?

…….
…….
…….
…….

Apéndice: Ecuaciones básicas y de Hodgkin y Huxley.

Ley de Ohm: $I=V/R=V \bullet G$
Ley de Ohm adaptada a la membrana celular: $I_i=G_i \bullet (V_m-E_i)$

V_m: Potencial de membrana
R: Resistencia (dificultad al paso de lós iones por los canales)
I=Intensidad de corriente
G (G=1/R): Conductancia

G_i: Valor máximo de la conductancia de la membrana para un ión determinado
E_i: Potencial de equilibrio para un ión determinado (Ecuación de Nernst)
I_i: Corriente debida al flujo de un ión determinado

$I_m=I_c+I_i$

$I_c=Cm \bullet \delta V/\delta t$

$I_i=I_{Na}+ I_K + I_L$

$I_{Na}= G_{Na} \bullet m^3 \bullet h \bullet (V-E_{Na})$

$I_K= G_K \bullet n^4 \bullet (V-E_K)$

$I_L= G_L \bullet (V-E_L)$

$I_m= C_m \bullet \delta V/\delta t+G_K \bullet n^4 \bullet (V-E_K)+G_{Na} \bullet m^3 \bullet h \bullet (V-E_{Na})+G_L \bullet (V-E_L)$

I_m: Corriente iónica a través de la membrana.
I_c: Corriente capacitativa (del condensador de la membrana).
m = grado de activación de los canales de Na^+
h = grado de inactivación de los canales de Na^+
n = grado de activación de los canales de K^+
L = Cualquier otro ión participante

Si lo desea, pueden encontrar más experimentos en

La guía de El Potencial de Acción:

http://www.secf.es/docencia/