

# ***El Potencial de acción***

***Secuencia de experimentos que establecieron las bases de la excitabilidad nerviosa***

***Simulación en Excel***



**Guillermo Alvarez de Toledo  
María Angeles Montes y Elisa Durán  
Departamento de Fisiología Médica y Biofísica  
Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla**



# Contenido

1. Introducción.....	2
2. El potencial de acción.....	4
2.1. Bases iónicas de la conducción nerviosa.....	4
2.1.1. Experimento 1: <i>Efecto del aumento de la concentración de <math>K_e</math> sobre el potencial de membrana</i> .....	6
2.1.2. Experimento 2: <i>Efecto del aumento de la concentración de <math>Na_e</math> sobre el potencial de membrana</i> .....	7
2.1.3. Experimento 3: <i>Perfusión interna del axón. Efecto de la disminución de la concentración de <math>K_i</math></i> .....	10
2.2. Características todo o nada del potencial de acción: Umbral y periodo refractario.....	12
2.2.1. Experimento 4: <i>Umbral de excitación</i> .....	12
2.2.2. Experimento 5: <i>Periodo refractario</i> .....	14
2.3. Análisis cuantitativo de la excitación nerviosa.....	16
2.3.1. Experimento 6: <i>Las corrientes iónicas del axón gigante del calamar</i> .....	17
2.3.2. Experimento 7: <i>Disección de las corrientes iónicas de sodio y potasio</i> .....	20
2.3.3. Experimento 8: <i>Cálculo de la conductancia para los iones de sodio y potasio</i> .....	23
2.3.4. Experimento 9: <i>Medida de los parámetros cinéticos de las compuertas "n,m y h" de Hodgkin y Huxley</i> .....	25
2.3.5. Experimento 10: <i>Determinación de la "m" infinito</i> .....	26
2.3.6. Experimento 11: <i>Determinación de la "h" infinito</i> .....	29
3. Bibliografía.....	31
4. Lista de experimentos.....	32

## 1. Introducción

Aprender Fisiología es un proceso que requiere de la dedicación intensa y la atención continua del estudiante. La Fisiología es una disciplina experimental en la que los conceptos y las hipótesis de funcionamiento del organismo están en continuo cambio. Hacer experimentos, modificar situaciones experimentales, sacar las propias conclusiones y sintetizar los conceptos es una tarea fundamental y, por tanto, una labor que debe aprender el estudiante de Fisiología cuando cursa la asignatura.

Somos conscientes de que el estudiante necesita una guía para el aprendizaje. Asimismo, somos conscientes de que la Fisiología, si quiere entenderse en su justa dimensión, no puede aprenderse de forma parcelada, aislada o estática, sino que debe entenderse mediante la integración de todos los sistemas que pone en marcha el organismo para mantener el "equilibrio". Es pues, una labor que requiere tiempo, que el estudiante marque su propio ritmo de aprendizaje y sobre todo, que se encuentre satisfecho con el nivel alcanzado cada vez que realice algunos de los ejercicios planteados en este libro. El aprendizaje es una labor sin límites. Siempre hay tiempo para aprender y cada vez que vuelva sobre los tópicos que ha estudiado anteriormente, se dará cuenta de aspectos nuevos que habían pasado desapercibido y que en ese momento aparecen con mayor claridad. Ser consciente de conocer mejor un sistema cada vez que se vuelve sobre él, es signo de aprendizaje.

Este libro de prácticas está organizado de forma que el estudiante reproduzca mediante simulaciones por ordenador en Excel (ver programa POTAC) algunos experimentos clásicos o actuales de la Fisiología. Además, la forma de reproducir estos experimentos se ha planteado según el orden cronológico en como se realizaron. Así pues, dentro de un mismo tópico, cada experimento supone el próximo planteamiento experimental al que llegaron los Fisiólogos que los ejecutaron para seguir avanzando en el conocimiento de la Fisiología. Será una norma en muchos aspectos de este libro el presentar primero, los datos experimentales reales que fueron publicados por Cole, Hodgkin y Huxley, para luego mediante el uso de la simulación, que el estudiante reproduzca dichos resultados experimentales. Existen muchas formas de reproducir los experimentos, ya que las simulaciones son modelos matemáticos basados en los resultados experimentales. En este libro el estudiante, si sigue los pasos indicados, podrá realizar los mismos experimentos, proponer los mismos planteamientos e incluso llegar a las mismas

conclusiones a la que llegaron los grandes fisiólogos. Este sería el máximo nivel de aprovechamiento, sin embargo existen muchas etapas en esa escala que pueden ir superándose mediante el análisis y el estudio de los experimentos planteados. De la mera observación y descripción teórica de un hecho experimental, a poder plantear nuevos experimentos que ayuden a profundizar en el fenómeno que subyace a cada protocolo experimental. Pensamos, que esta forma de organizar los experimentos es la más lógica, o al menos la que siguieron grandes científicos para llegar al conocimiento actual de los fenómenos fisiológicos.

## 2. El Potencial de acción

En esta primera simulación de procesos fisiológicos, trataremos de mostrar experimentos clásicos de excitabilidad nerviosa mediante la simulación del potencial acción nervioso registrado en el axón gigante del calamar. Nuestro planteamiento será el de reproducir los experimentos que Alan Hodgkin y Andrew Huxley realizaron entre 1945 y 1951, para establecer su modelo de excitabilidad nerviosa. En una segunda parte, nos dedicaremos a la formalización de las ecuaciones que ellos derivaron para explicar sus resultados experimentales y establecer las bases de los modelos cinéticos de la actividad de canales iónicos.

El modelo experimental del axón gigante del calamar se utilizó extensamente a partir de 1930 para el estudio de las bases iónicas de la excitabilidad nerviosa. Dos laboratorios marinos ubicados en Inglaterra (Plymouth) y Estados Unidos (Woods Hole) fueron los sitios donde se realizaron los experimentos más relevantes. En la actualidad, el modelo del axón gigante del calamar se sigue empleando para el estudio de las bases moleculares de la excitabilidad, aunque después de la introducción de la técnica de “patch clamp” en 1981, por Erwin Neher y Bert Sakmann, el estudio molecular de los canales iónicos y de la excitabilidad celular ha podido aplicarse a células de mamíferos, y es en éstas preparaciones donde se realizan la mayor parte de los experimentos en la actualidad. Simulaciones relacionadas con la actividad de canales iónicos se presentarán en el siguiente capítulo. En este capítulo nos centraremos en reproducir mediante simulaciones ejecutadas en el programa Excel de Microsoft, los experimentos que llevaron a Alan Hodgkin y Andrew Huxley a establecer las bases del potencial de acción.

Cargue el archivo Excel titulado “Potencial de Acción” del disco adjunto. En este archivo se muestra el dispositivo experimental que Hodgkin y Huxley utilizaron para el registro del potencial acción del axón y la corrientes iónicas subyacentes al utilizar la técnica de fijación de voltaje (“voltaje-clamp”). Reproduciremos algunos de los experimentos que Alan Hodgkin realizó para estudiar las bases iónicas del potencial de acción y que incluyó en su discurso de entrega del Premio Nobel de Medicina o Fisiología el 11 de diciembre de 1963 en Estocolmo.

### 2.1. Bases iónicas de la conducción nerviosa

Para establecer las bases iónicas del potencial de acción fue crítico el disponer de una preparación que en la que pudiera introducirse un electrodo en su espacio intracelular para registrar el potencial de membrana. El axón gigante, por su tamaño, ofrecía unas condiciones inmejorables para este abordaje

experimental. Hodgkin, en el verano de 1938, viajó al laboratorio marino de Woods Hole, donde Kenneth Cole y Curtis habían desarrollado la preparación del axón gigante del calamar y aprendió su uso para el estudio de la excitabilidad. Esta preparación era mucho mejor que la del cangrejo de mar, que había utilizado anteriormente Hodgkin y que disponía de un diámetro de 30 micrómetros. Un esquema de la preparación del axón gigante se muestra en la Figura 1.

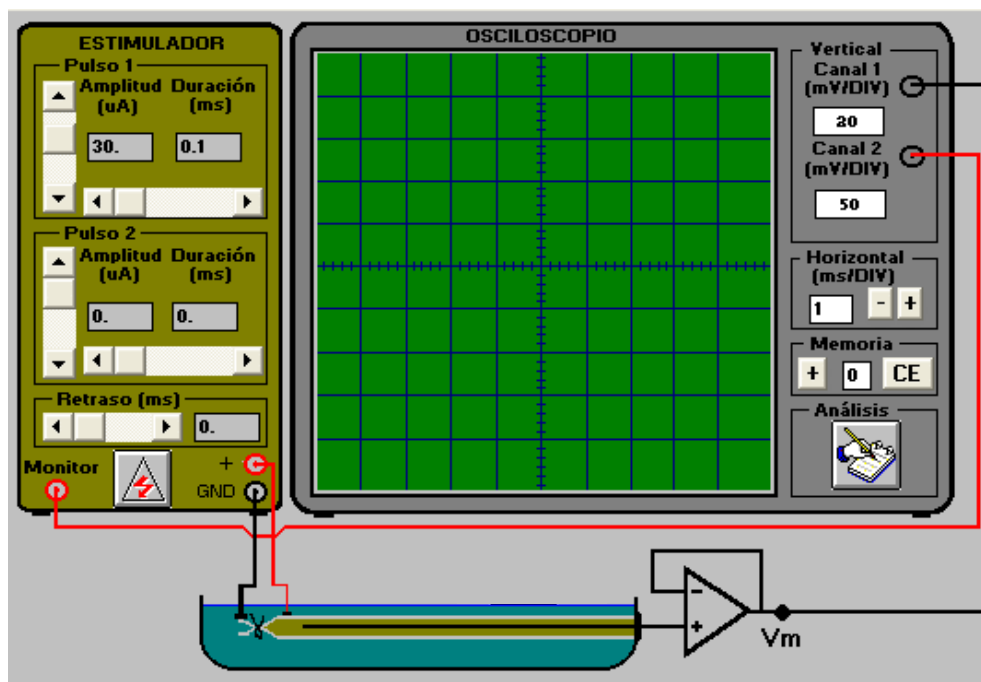


Figura 1. Esquema del dispositivo experimental para el registro del potencial de nervio en el axón gigante del calamar.

Con este dispositivo Hodgkin y Huxley observaron que el potencial de acción alcanzaba valores positivos. Esta observación fue crítica para demostrar si se producía el “membrane break down” (rotura de la membrana durante el potencial de acción) anteriormente propuesto por la teoría de Berstein y Lillie, y medido por Cole y Curtis en forma de los cambios de conductancia durante la generación del potencial de acción. Si el potencial de acción se debe a una rotura temporal de permeabilidad no selectiva, la amplitud máxima del potencial de acción no debería ser positiva, ya que se anularía el potencial de membrana, siendo su valor de cero cuando se producía el potencial de acción. Otra observación inicial del potencial de acción es que cuando se incrementaba la concentración de potasio extracelular hasta la misma concentración intracelular, el potencial de reposo se anulaba (Cole, 1938). Dicho de otra manera, la membrana del axón se comporta en reposo como un electrodo de

potasio, ya que es el gradiente químico de este ión el que determina la negatividad del potencial de membrana.

Dos hechos cruciales en las bases iónicas del potencial de acción:

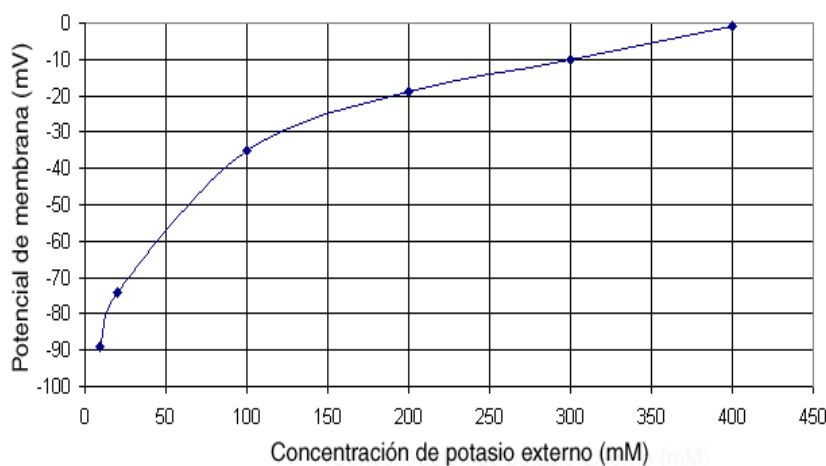
A). El incremento de la concentración de potasio extracelular ( $K_e$ ) hace que el potencial de membrana se despolarice. Si la concentración de  $K_e$  es similar a la concentración intracelular el potencial de membrana tiene un valor de 0 mV.

B). La amplitud del potencial de acción es muy superior al valor del potencial de membrana.

Comprobemos estos dos hallazgos mediante la realización de estos experimentos en la simulación Excel del potencial de acción.

### ***Experimento 1. Efecto del aumento de la concentración de $K_e$ sobre el potencial de membrana.***

Seleccione la pestaña para acceder a la hoja de cálculo titulada “Potencial de Acción”. Introduzca el valor de 0 para la duración del estímulo 1 en la ventana superior. Modifique la concentración de K extracelular hasta el valor de 440 mM, que es el mismo valor que la concentración de K intracelular y pulse el botón de Estimular Axón. Tenga en cuenta que en este caso no se aplica estímulo en realidad pero si se registra el potencial de membrana del axón gigante. Observe que el potencial de membrana se estabiliza a 0 mV. Repita el experimento a distintas concentraciones de  $K_e$ . Obtendrá un gráfico similar al que se muestra en la Figura 2.



*Figura 2. Dependencia del potencial de membrana a concentraciones crecientes de potasio extracelular. Observe cómo se produce una despolarización progresiva hasta que el potencial de membrana se anula cuando la  $K_e$  y  $K_i$  son iguales*



Observe que el comportamiento no es una línea recta, si no que parece una función potencial. Aunque la descripción inicial de Cole y Curtis indica que el potencial de membrana se comporta como un electrodo de potasio, su comportamiento no lineal indica que otros iones también participan en la generación del potencial de membrana en el axón gigante del calamar. Sin embargo, como Cole y Curtis indicaron, el potasio es el principal ión responsable del potencial de membrana.

**Experimento P1:** Pruebe cómo afecta al potencial de membrana las modificaciones en las concentraciones de iones de Na y Cl. Pruebe en primer lugar a modificar sólo la concentración de  $\text{Na}_e$  y observe si el valor de potencial de membrana alcanzado se modifica. Repita el experimento para distintas concentraciones de  $\text{K}_e$ .

Claramente, la conclusión más importante de estos experimentos es que el potencial de membrana en reposo se debe a la diferencia de concentración de los iones de K. No obstante, el valor alcanzado de  $-90 \text{ mV}$ , es ligeramente menos negativo que el valor del potencial de equilibrio para este ión, que es de  $-96 \text{ mV}$ .

**Experimento 2. Efecto del aumento de la concentración de  $\text{Na}_e$  sobre el potencial de membrana.**

La segunda observación crítica en el establecimiento de las bases iónicas del potencial de acción fue que durante el potencial de acción no se produce un "break down" de la membrana. Cole y Curtis, que habían logrado medir los cambios de conductancia durante el potencial de acción, no habían podido determinar la amplitud del potencial de acción al no disponer de un sistema de medida de potencial en DC (Direct Current o corriente continua).

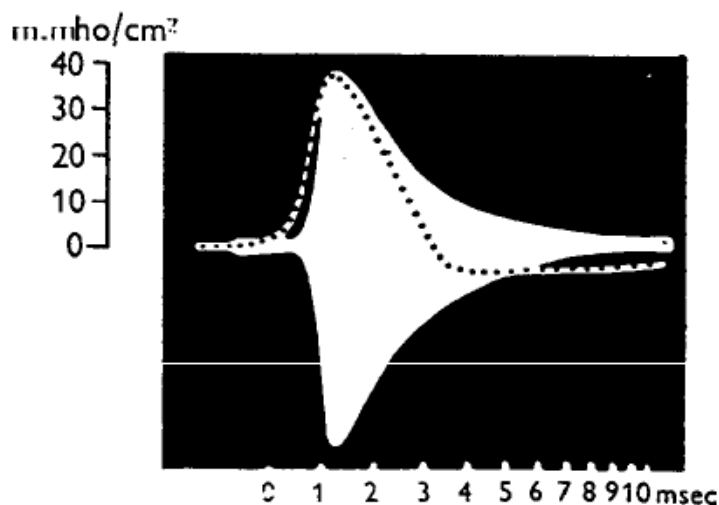


Figura 3. Registro de los cambios de conductancia durante el potencial de acción (línea de puntos) K.S. Cole y H.J. Curtis, *Journal of General Physiology* 22, 649 (1939).

Hodgkin y Huxley cuantificaron la amplitud del potencial de acción. Observaron que su amplitud era superior a los  $-90$  mV y que por tanto superaba el valor de  $0$  mV, el cuál sería el valor máximo alcanzado del potencial de acción si la membrana se volviera no selectiva a los iones.

Genere un potencial de acción y mida el valor al pico desde el potencial de reposo, del potencial de acción. Desde el potencial de  $-90$  mV, se alcanzan  $+32,9$  mV, con lo cual la amplitud desde el potencial de reposo es de  $122,9$  mV.

Esta primera observación llevó a Hodgkin y Huxley a realizar experimentos de la dependencia del sodio extracelular del potencial de acción, cuyos resultados se muestran en la Figura 4.

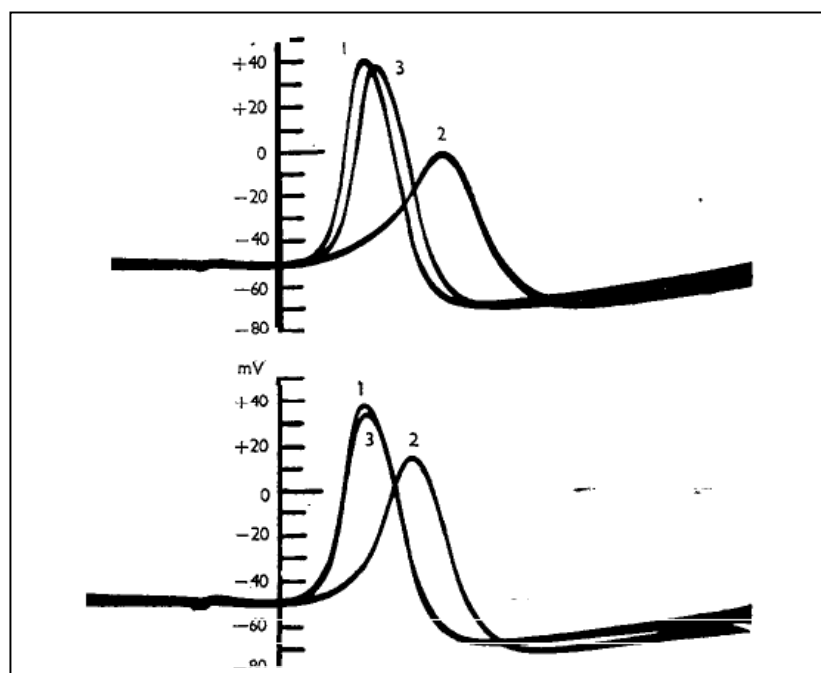


Figura 4. Registro del potencial en distintas concentraciones de sodio extracelular. Arriba, trazos 1 y 3 en agua del mar. Trazo 2 con 33% de agua de mar y 66% de dextrosa isotónica. Abajo, trazos 1 y 3 en agua de mar y trazo 2 con 50% de agua de mar y 50% de extrosa isotónica. A. L. Hodgkin y B. Katz. *J. Physiol.* 108, 37 (1949).

Para llevar a cabo la simulación de este experimento, modifique la concentración extracelular de sodio al 33% y 50% respectivamente. Observe que cuando disminuye la concentración de  $440$  mM a  $145$  mM, el estímulo que anteriormente generaba un potencial de acción, al disminuir la concentración de  $\text{Na}_e$ , ahora no lo genera, tornándose el axón menos excitable. Este hecho puede solventarlo al incrementar la amplitud del estímulo 1. Incremente la amplitud hasta  $51$   $\mu\text{A}$ . Ha tenido que incrementar el estímulo más del doble para poder desencadenar un potencial de acción. Una vez identificado el valor que necesita para conseguir un potencial de acción, vuelva a realizar el experimento control con la concentración basal de Na. Ejecute un nuevo estímulo y esta vez pulse el botón

de “Grabar Barrido”. Modifique la concentración de sodio a 145 mM y estimule de nuevo. Guarde el barrido presionando nuevamente “Grabar Barrido”. Vuelva a restablecer la concentración de sodio próximo a los 400 mM. Habrá obtenido una figura similar a la que se muestra en la Figura 5, y que es muy parecida a la que Hodgkin y Huxley obtuvieron para demostrar la dependencia del sodio extracelular en el potencial de acción.

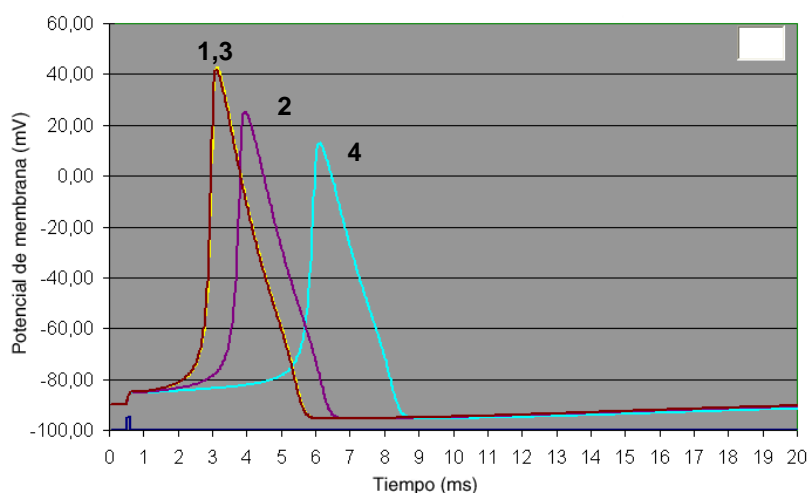


Figura 5. Simulación del efecto de la disminución de la concentración extracelular de sodio sobre el potencial de acción según el modelo de excitabilidad nerviosa de Hodgkin y Huxley. Trazos 1 y 3, en agua del mar (440 mM de  $ClNa$ ). Trazos 2 y 4 realizados en 220 y 145 mM de  $Na$  respectivamente.

Este experimento fue crucial para determinar que la amplitud del potencial de acción depende de la concentración de sodio y que por tanto el “break down” de la membrana es cierto, pues se produce un incremento en la conductancia de la membrana, pero éste es selectivo para los iones de sodio. Alan Hodgkin y Andrew Huxley, para dar un paso más, y como se muestra en la Figura 5, de la Lección magistral que impartió en Suecia el 11 de diciembre de 1963, mostró un experimento donde añadió al agua de mar (medio extracelular usado en sus experimentos, 1,56 veces más de sodio. Observó que la espiga del potencial de acción llegaba, en lugar de los 41,45 mV, superaba los 53 mV.

**Experimento P2:** Modifique la concentración de sodio extracelular 1,56 veces, por encima de la  $Na_e$  del agua del mar. Anote el potencial alcanzado durante la espiga. Compare estos valores a distintas concentraciones de  $Na_e$  y compárelos con el potencial de equilibrio para  $Na$  según la ecuación de Nernst.

Como consecuencia de estos experimentos, quedó demostrado que el potencial de membrana depende de los iones de potasio, la espiga del potencial de acción de los iones de sodio y que durante el “break down” de la membrana durante el potencial de acción existe un incremento a la permeabilidad a los iones de sodio.

Más recientemente y para asentar aún más las conclusiones de Hodgkin y Huxley, se han hecho experimentos mediante la perfusión interna del axón gigante del calamar. Este maniobra es posible realizarse en la preparación del axón gigante del calamar por sus dimensiones (cientos de micrómetros) que permiten el relleno con soluciones de distinta composición, así como la introducción de electrodos metálicos para el registro de potencial y, como más adelante se comentará, para realizar la técnica de fijación de voltaje (“voltage clamp”).

**Experimento 3. Perfusión interna del axón. Efecto de la disminución de la concentración de  $K_i$ .**

Un aspecto crítico de que los iones son los únicos responsables de la excitabilidad nerviosa, es el que se muestra en este experimento realizado por Baker, Hodgkin y Shaw (1961). Un axón literalmente exprimido, donde se ha eliminado el citoplasma y relleno con una solución de iones de K isotónica puede generar hasta 300000 impulsos, sin que la morfología del potencial de acción se deteriore. En esta preparación, asimismo, se puede estudiar cómo se afecta el potencial de membrana al disminuir progresivamente la  $K_i$ .

Utilice el programa Excel para reproducir este experimento. Obtendrá un gráfico similar al que se observa en la Figura 6.

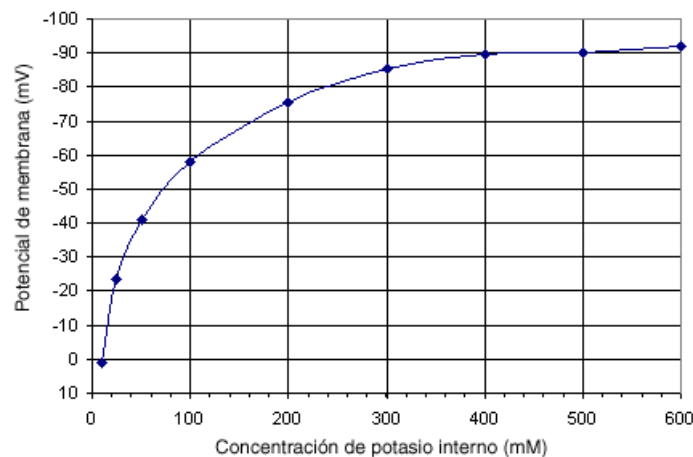
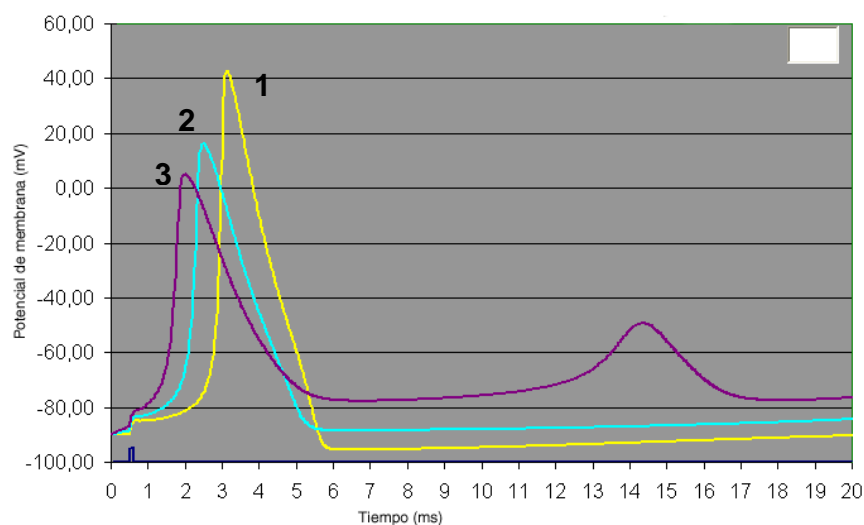


Figura 6. Reproducción del experimento del efecto sobre el potencial de membrana de la disminución progresiva de la concentración de potasio interno. La disminución de potasio interno se ha contrarrestado con ClNa hasta hacer isotónica la solución interna de perfusión (Baker, Hodgkin y Shaw. *Nature* 190, 885 (1961)).

Observe que, de nuevo, al igual que ocurría cuando se incrementaba la concentración de potasio externo, el potencial de membrana se despolariza progresivamente. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a esta dependencia. En esta situación, a medida que se despolariza, el potencial de

membrana depende más críticamente de la concentración de potasio que cuando éste se incrementa (ver Figura 2). Observe que el axón se despolariza y que por tanto es más excitable, en el sentido de que se alcanza el valor umbral para una misma intensidad del estímulo.

La dependencia que tiene la concentración de potasio interna sobre la excitabilidad del axón se puede mostrar con la simulación del programa Excel. Realice un experimento en el que estimula el axón con  $50 \mu\text{A}$  y ha disminuido la concentración de  $K_i$  el 25% y 50% del  $K_i$  por sodio para mantener la isotonicidad del medio interno del axón. Obtendrá un registro similar al que se muestra en la figura 7.



*Figura 7. Reproducción del experimento del efecto sobre el potencial de acción de la disminución progresiva de la concentración de potasio interno. La disminución de potasio interno se ha contrarrestado con  $\text{ClNa}$  hasta hacer isotónica la solución interna de perfusión (Baker, Hodgkin y Shaw. Nature 190, 885, 1961). Trazo 1, control. Trazo 2, experimento realizado en 330 mM K, 160 Na. Trazo 3, en 220 mM K y 270 mM de Na. Observe cómo disminuye la amplitud de la espiga del potencial de acción por la disminución del gradiente de sodio, pero al mismo tiempo el periodo de latencia disminuye entre la aplicación del estímulo y la generación del potencial.*

Este registro es similar cualitativamente al que publicaron Baker, Hodgkin y Shaw (1961). Sin embargo existen diferencias cualitativas con relación al registro presentado por Alan Hodgkin en la disertación de concesión del premio Nobel en 1963 en su figura 8. Piense qué diferencias existen y a qué pueden ser debidas.

## **2.2. Características todo o nada del potencial de acción. Umbral y periodo refractario.**

El potencial de acción tiene dos características fundamentales. Una, que se produce de forma todo o nada y dos, que tiene que haberse completado todo el proceso del potencial para que tenga lugar un nuevo potencial de acción. Estas características indican de un proceso que se regenera así mismo, y que una vez disparado, se desarrolla por completo. Hodgkin y Huxley ya observaron estas dos características y realizaron experimentos para mostrarlas y dar una explicación.

### ***Experimento 4: Umbral de excitación.***

El potencial de acción requiere para que se produzca de un estímulo eléctrico (o mecánico o de otra naturaleza) que despolarice parcialmente la membrana. Esa despolarización, si tiene la amplitud suficiente, desencadena un fenómeno que se regenera a sí mismo y que determina la despolarización progresiva del potencial de membrana dando lugar al potencial de acción. Así pues, el alcanzar un nivel umbral (ahora se verá de qué) es crítico para la generación de un potencial de acción. La despolarización provocada por la estimulación, en realidad lo que determina es un incremento de la permeabilidad al sodio, la cual, a su vez, produce una despolarización de la membrana debida a la entrada de cargas positivas al interior del axón. Se genera pues, un sistema de realimentación positiva que progresivamente va despolarizando la membrana hasta completar el potencial de acción. El hecho de que se produzca potencial de acción o no depende de si la activación inicial de la corriente de sodio es suficiente para despolarizar la membrana, ya que en todo momento existe una corriente de potasio en dirección opuesta que contrarresta a la de sodio.

En nuestro experimento, trataremos de ilustrar que tras el estímulo eléctrico, si la corriente de sodio generada, supera a la corriente de potasio, se producirá de forma inexorable un potencial por haber entrado en un sistema de realimentación positiva.

Abra el programa Excel de potencial de acción y genere un potencial de acción pulsando sobre el botón titulado de "Estimular axón". Grabe el registro. A continuación disminuya la intensidad del Estímulo 1 al hacer un clic en el botón que indica la dirección hacia abajo. Observará que en esta situación el estímulo se reduce de 24 a 23,99  $\mu\text{A}$ . Estimule el axón de nuevo. Observará en esta ocasión que la disminución de 0,01  $\mu\text{A}$  es suficiente para que en esta ocasión no se genere un potencial de acción. ¿Qué ha determinado un cambio tan drástico en comportamiento del axón ?

La figura 8 muestra el registro que ilustra el concepto de umbral de excitación. Veamos cuál es la base de este comportamiento.

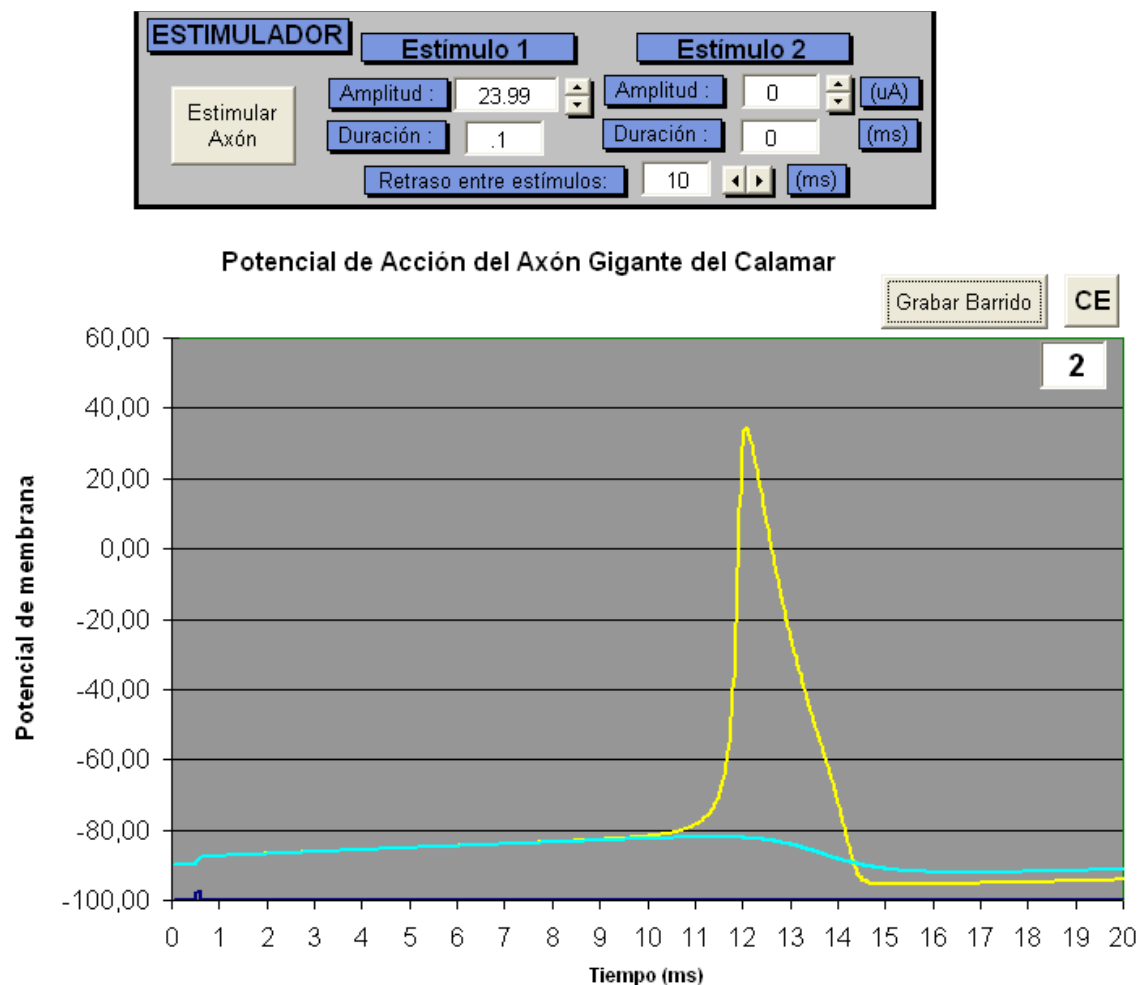


Figura 8. Registros obtenidos con 24  $\mu\text{A}$  (trazo amarillo) y 23,99  $\mu\text{A}$  (trazo celeste) de estimulación. Un cambio de sólo 0,01  $\mu\text{A}$  determina la presencia o no de un potencial de acción.

Como verá, los dos trazos han seguido casi un mismo curso temporal desde la estimulación hasta el milisegundo 10 aproximadamente. Después aparentemente, el trazo amarillo, obtenido con estimulación de 24  $\mu\text{A}$  continuó con una despolarización progresiva, mientras que el trazo celeste (23,99  $\mu\text{A}$ ) no alcanzó el potencial de membrana basal. La respuesta está en la corriente de membrana que se produce en ambas situaciones. Si hace "Scroll" en la pantalla de Excel hacia abajo, observará que aparece un gráfico donde están representadas todas las corrientes que tienen lugar durante el potencial de acción. Tres corrientes son las que determinan el potencial de acción.  $I_{\text{Na}}$ ,  $I_{\text{k}}$  y  $I_{\text{L}}$ . Las corrientes de  $I_{\text{k}}$  e  $I_{\text{L}}$  tienden a repolarizar el potencial de membrana (Observe sus potenciales de equilibrio de  $-86$  y  $-96$  mV), mientras que la corriente  $I_{\text{Na}}$  tiende a despolarizar la membrana. Normalmente, la suma de las corrientes repolarizantes es superior a la corriente despolarizante de Na. Este hecho determina el valor del potencial de membrana en reposo. Sin embargo, la aplicación del estímulo hace que la corriente  $I_{\text{Na}}$  despolarizante se incremente por un cierto valor debido a la propia despolarización inducida por el estímulo. Lo

que tiene lugar entre el milisegundo 0,5 y el 10 es una lucha a ver quién puede más, aunque determinado su curso desde el comienzo. Si la corriente  $I_{Na}$  supera a la suma de  $I_k$  y  $I_L$  se producirá un potencial de acción. Si no lo consigue, las corrientes hiperpolarizantes llevarán el potencial al valor de reposo.

Si  $I_{Na} > I_k \text{ y } I_L$

Habrà potencial de acción

Si  $I_{Na} < I_k \text{ y } I_L$

NO Habrà potencial de acción

Este hecho lo puede observar de forma más detenida realizando un barrido sin estimulación del axón y observando cómo varían las corrientes de membrana en reposo. Cuando comience a aplicar un estímulo de muy baja intensidad observará como se va produciendo el desbalance de las corrientes antes mencionado y cómo éste da lugar a la producción de un potencial de acción.

**Experimento P3:** Modifique la amplitud del estímulo hasta conseguir el mínimo cambio en la amplitud del estímulo que determina o no potencial de acción. Observará cómo el axón puede detectar cambios de estimulación de nanoAmperios. Una guía de protocolo lo puede encontrar al final de este capítulo.

### **Experimento 5: Periodo refractario.**

La segunda característica importante del potencial de acción es que se produce de forma completa (todo o nada) y que mientras se genera el potencial, no puede volver a producirse otro hasta pasado cierto tiempo. Este es el periodo refractario. Andrew Huxley, disertó sobre este aspecto de la excitabilidad en su Conferencia con motivo de la entrega del Premio Nobel en 1963.

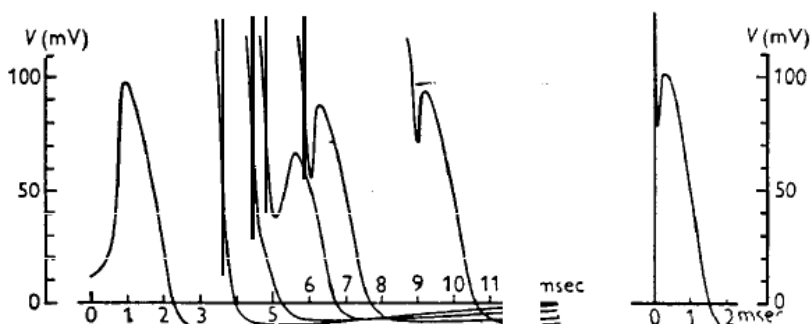
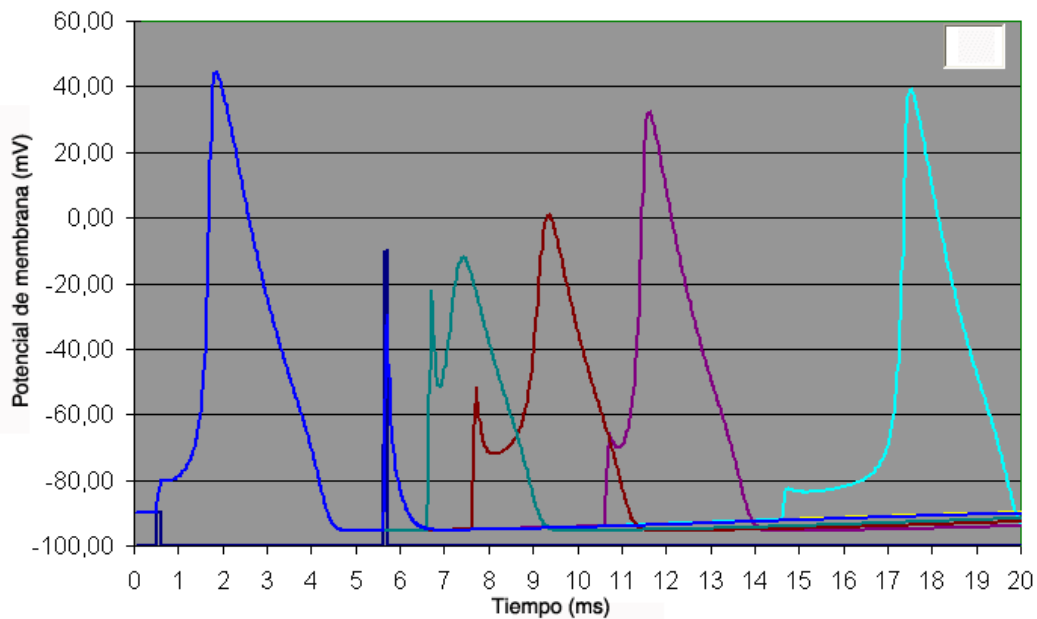


Figura 9. Registro del periodo refractario en el axón gigante del calamar. Hodgkin y Huxley, *J. Physiol* 117,300 (1952)



La figura 9 muestra este registro, el cual trataremos de reproducir en la simulación de su modelo en Excel. Utilice amplitudes del primer estímulo de  $100\mu\text{A}$ , y para el segundo amplitudes superiores  $500\mu\text{A}$ . Vaya aproximando el segundo estímulo al primero reduciendo el retraso entre estímulos, según se indica en la caja de texto de "Retraso entre estímulos". Obtendrá una figura similar a la que aparece en la Figura 10.



*Figura 10. Registros obtenidos tras la aplicación de dos estímulos sucesivos y separados entre sí del axón gigante del calamar según el modelo de Hodgkin y Huxley. Observe que a la temperatura en la que se realizan los experimentos ( $6.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) el segundo estímulo no provoca un potencial de acción cuando se encuentra a 6 milisegundos del primer estímulo.*

Este experimento muestra que la maquinaria responsable de la generación del potencial de acción no está lista para recibir un nuevo estímulo tras varios milisegundos (6 en este caso aproximadamente). Puede modificar la temperatura de la preparación y observar que este periodo refractario se reduce a temperaturas superiores. Asimismo podrá observar que si incrementa la amplitud del estímulo en los retrasos más cortos (6 ms) puede aún conseguir un potencial de acción de pequeña amplitud. Este periodo se conoce como periodo refractario relativo. Otro hecho llamativo que tiene lugar en esta preparación es que la amplitud del potencial de acción no es constante. A medida que se aproximan los estímulos, la amplitud disminuye. Es como si los canales a través de los cuales penetra el sodio no estuviesen listos para recibir el segundo estímulo, y por eso por lo que la amplitud del potencial es menor.

**El potencial de acción, aunque se produce de forma todo o nada, la amplitud de la espiga no es constante y depende de las concentraciones para iones de sodio y del grado de activación de los canales a través de los que permea este ión**

### 2.3. Análisis cuantitativo de la excitación nerviosa.

Esta segunda parte experimental se va a centrar en el estudio cuantitativo del potencial de acción y en el modelo que Hodgkin y Huxley desarrollaron para explicar sus observaciones experimentales. Al igual que se hizo en la parte anterior, seguiremos un orden cronológico de cómo se sucedieron los experimentos, y cómo éstos fueron dando lugar a la elaboración del modelo actual de excitabilidad nerviosa.

El análisis cuantitativo del potencial pudo hacerse gracias a la utilización de la técnica fijación de voltaje (“voltaje clamp”). El dispositivo experimental para realizar esta técnica en el axón, consiste en la introducción de dos electrodos en el interior del axón, además del electrodo que se sitúa en el baño como electrodo de referencia. De los dos electrodos alojados en el interior del axón, uno se utiliza para medir el potencial de membrana, y el segundo para pasar la corriente necesaria para mantener el potencial constante. Esta técnica, fue desarrollada por Kenneth Cole. Un esquema de la técnica de fijación de voltaje se muestra en la figura 8.

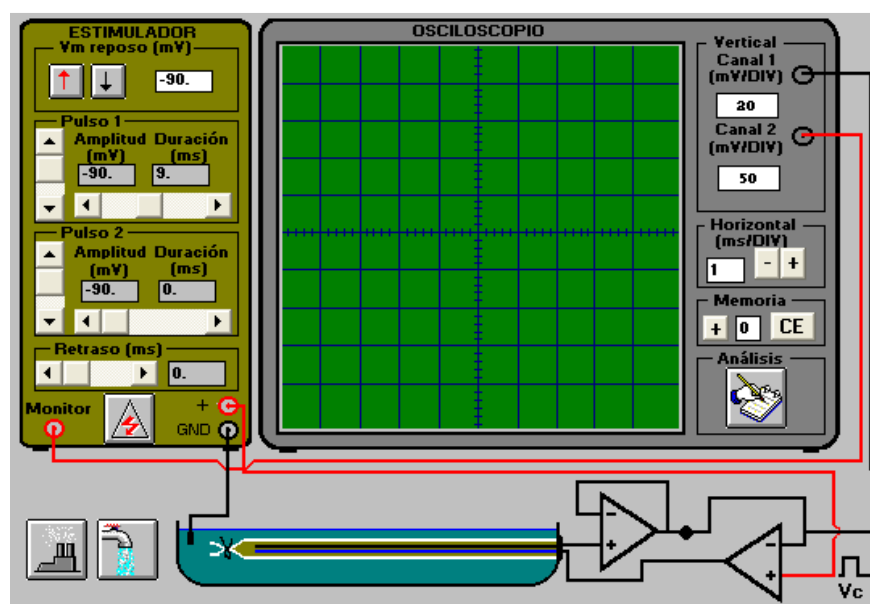


Figura 11. Dispositivo experimental para realizar experimentos de fijación de voltaje (“voltaje clamp”) en el axón gigante del calamar. Más detalles sobre esta técnica se muestran en el apéndice 1.

Explicar el concepto de la técnica de fijación de voltaje es difícil, pues intuitivamente tendemos a pensar en la consecuencia de la fijación de voltaje, es decir, el hecho de que no cambie el potencial de membrana. Sin embargo la información proviene de la cantidad de corriente que hace falta inyectar para precisamente mantener ese voltaje constante. Esa corriente es la que ha provocado la desviación del potencial de membrana original y por tanto, la

responsable de llevar la corriente durante el potencial de acción. Como puede observar en la parte baja del osciloscopio de la figura 8, son amplificadores operacionales los que se utilizan para fijar el voltaje en el interior del axón. Una breve descripción de cómo funciona el primer amplificador operacional (que mide potencial) y el segundo amplificador (que inyecta corriente dependiente de la diferencia del potencial al que se quiere fijar el axón y el medido en el interior del axón) se muestra en Apéndice 1. Este Apéndice es un buen punto de partida para introducirse en el campo de la Instrumentación Médica relacionada con la electrofisiología.

### Experimento 6. Las corrientes iónicas del axón gigante del calamar

Utilizando la técnica de fijación se puede medir el curso temporal de las corrientes iónicas que se generan durante el potencial de acción. En realidad, son éstas corrientes las que modifican el potencial de membrana y dan la morfología típica del potencial de acción.

Hodgkin y Huxley registraron las corrientes del axón a distintos potenciales, como se muestra en la figura 12.

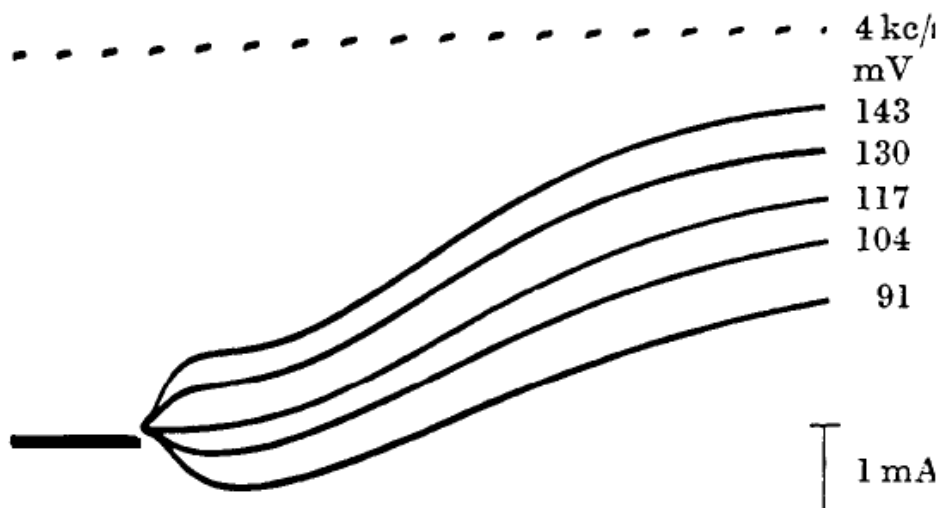


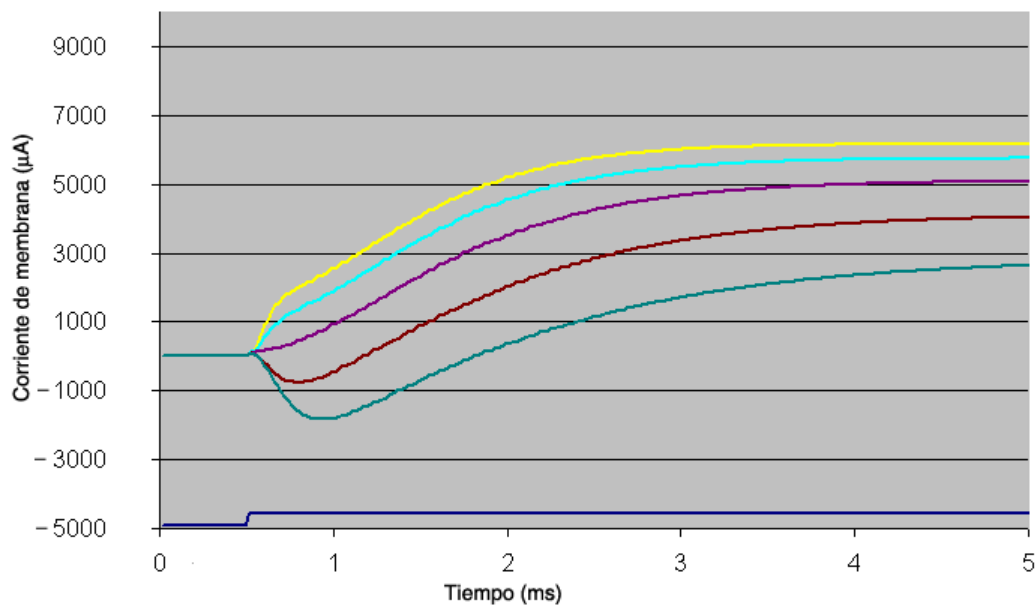
Figura 12. Corrientes registradas en el axón gigante del calamar ocasionadas por estímulos de voltaje (según se indica). Cuando se despolariza 91 mV, desde el potencial de membrana de  $-90$  mV se observa una corriente de entrada (hacia abajo) de sodio y posteriormente una corriente de salida de potasio (hacia arriba). Al potencial de 117 mV, sólo se observa la corriente de salida de potasio, ya que a ese potencial se está probablemente cerca al potencial de equilibrio del sodio.

La primera observación es que la corriente inicial después de aplicar el pulso de fijación de voltaje es de entrada (indicado por la deflexión hacia abajo) y es llevada por los iones de sodio cuando penetran al interior del axón. Posteriormente la corriente se torna de salida (hacia arriba), siendo ésta de potasio. Si progresivamente se incrementa el potencial al que se mantiene el axón, progresivamente la corriente de entrada se anula (a 117mV) o se transforma en corriente de salida (joroba), cuando el estímulo es de 130 ó 143

mV. Esta joroba indica que el sodio sale de la célula porque se ha superado el potencial de equilibrio para este ión y la tendencia ahora es al revés.

Del análisis de la cinética de estas corrientes, Hodgkin y Huxley obtuvieron los parámetros del comportamiento de los “canales” para sodio y potasio. A partir de estos valores realizaron el modelo de simulación de excitabilidad nerviosa.

Reproduzca este experimento en el programa Excel. Los resultados se muestran en la figura 13.



*Figura 13. Corrientes registradas en el axón gigante del calamar ocasionadas por estímulos de voltaje (90, 120, 144, 160 y 180 mV). Cuando se despolariza 90 mV, desde el potencial de membrana de -90 mV se observa una corriente de entrada (hacia abajo) de sodio y posteriormente una corriente de salida de potasio (hacia arriba). Al potencial de 144 mV, sólo se observa la corriente de salida de potasio, ya que a ese potencial se está probablemente al potencial de equilibrio del sodio.*

Para realizar este experimento y que se parezca lo más posible al realizado por Hodgkin y Huxley, debe modificar la base de tiempos a 5 ms y modificar la escala en el eje de las Y tal y como se muestra en la figura. Asimismo los potenciales escogidos deben ser acordes al potencial de equilibrio para el sodio (54 mV) para que no se observe corriente de sodio.

**Experimento P4:** Modifique la amplitud del estímulo en pasos de 10 en 10 mV. Mida la amplitud de la corriente en el pico ( $I_{Na}$ ) y al final del pulso ( $I_K$ ). Construya un gráfico VI para observar la dependencia del voltaje de las corrientes iónicas

Este tipo de registros permite medir la dependencia del voltaje de las corrientes iónicas. La corriente medida al final del pulso, siempre hacia fuera, corresponde con la corriente de potasio ( $I_K$ ). La corriente de sodio ( $I_{Na}$ ), medida durante el pico de la corriente (hacia dentro) o durante la joroba (hacia fuera) cuando el potencial supera al potencial de equilibrio para los iones de sodio, tiene una polaridad doble debido al cambio del gradiente eléctrico para el sodio (Figura 14).

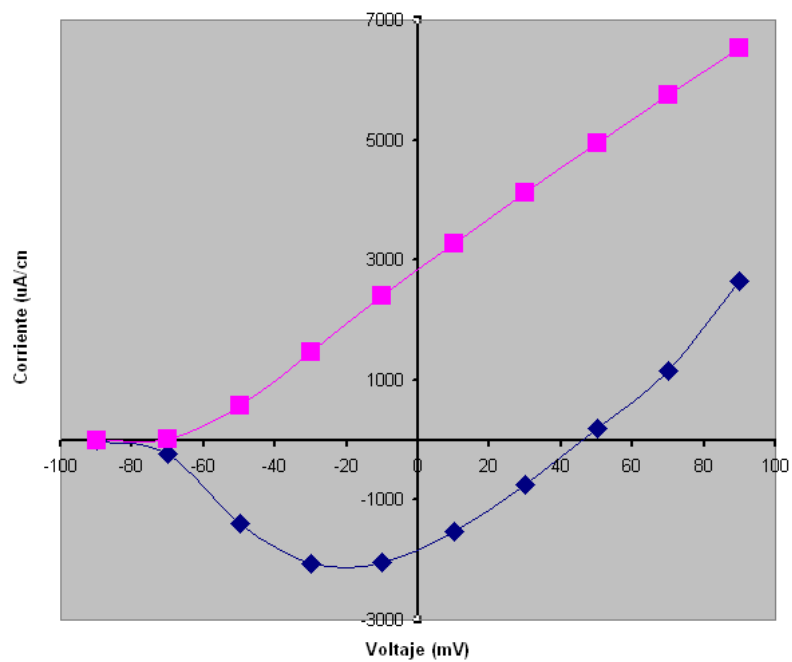


Figura 14. Curva corriente voltaje ( $I_V$ ) de las corrientes iónicas del axón gigante del calamar. Cuadros, Corriente de K medida al final de puls. Rombos, corriente de Na medida en el pico o joroba de la corriente. Pulsos aplicados de  $-90$  a  $+90$   $mV$  en solución de agua mar normal. Datos obtenidos en la simulación de Excel del potencial de acción y corrientes iónicas.

### Experimento 7. Disección de las corrientes iónicas de sodio y potasio del axón gigante del calamar

Como habrá podido observar, Hodgkin y Huxley ya sabían por los experimentos de registro de potencial y por los experimentos de sustitución iónica anteriormente realizados, que la fase de ascenso se debe a los iones de sodio, mientras que el potencial de membrana y la fase de repolarización se debían a los iones de potasio. Estos datos fueron muy importantes para asignar, a primera vista, que la corriente hacia dentro (por debajo del nivel cero en el trazo de corriente) es de sodio y la corriente hacia fuera (por encima del nivel cero en el trazo) era de potasio.

En la época en la que se realizaron estos experimentos, aún no se conocían drogas que bloqueasen los canales de sodio o potasio (tetrodotoxina o TEA). Es lógico, ni siquiera el término canal iónico se conocía y tampoco el camino en la membrana a través del cuál se producía el flujo de iones. Por tanto, la disección farmacológica de las corrientes totales mostradas en la figura 13, Hodgkin y Huxley la realizaron mediante la sustitución iónica, eliminando la corriente de sodio al sustituir el sodio por un catión que no es permeable a la membrana celular (cloruro de colina) y que mantuviese la osmolaridad del medio externo.

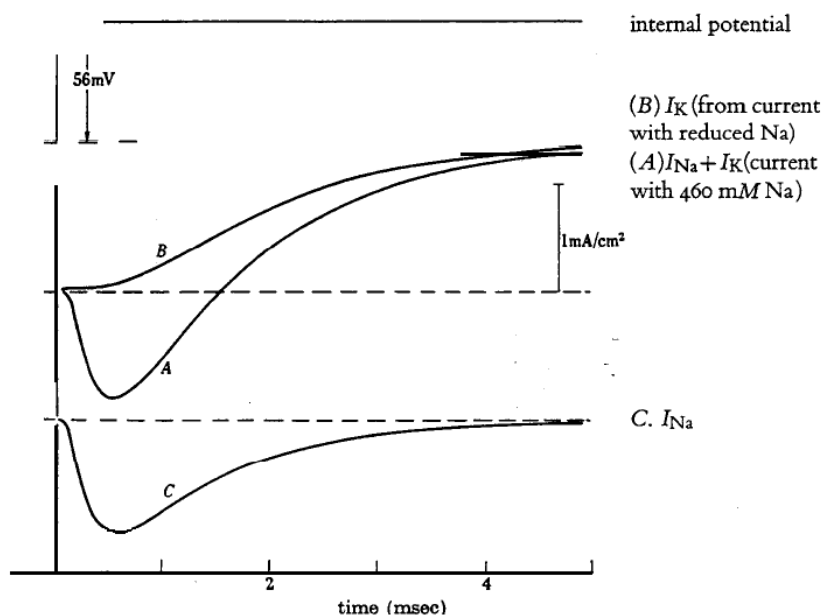


Figura 15. A. Registro de la corriente total ( $I_{Na} + I_K$ ) en una solución con 460 mM de Na. B. Registro de la corriente total obtenida haber reducido a unos pocos mM la concentración de Na. C, registro obtenido al sustraer el trazo A del B. El trazo B muestra corriente pura de K, el trazo C representa la  $I_{Na}$  al haberle sido sustraída la  $I_K$  al trazo A. Hodgkin, Huxley y Katz. *J Physiol.* 116, 424 (1952).

Utilice el programa Excel en su hoja de "Corrientes Iónicas" para hacer este experimento. Tenga en cuenta que en este experimento para obtener la corriente de potasio pura, no debe haber gradiente electroquímico favorable para el sodio. Puede jugar con las concentraciones de sodio y con la amplitud del pulso de despolarización para anular el gradiente químico para el sodio. En la figura original de Hodgkin, Huxley y Katz el pulso de despolarización fue de 56 mV. Es decir, si  $V_d$  parte de un potencial de membrana de  $-90$  mV, el potencial alcanzado será de  $-34$  mV. Debe fijar la concentración de sodio externa a un valor para la cuál el potencial de equilibrio para el sodio sea de  $-34$  mV.

Obtendrá una figura similar a la mostrada en la figura 16. La resultante de restar el primer trazo obtenido (corriente total, suma de  $I_{Na} + I_K$ ) del segundo, obtenido en ausencia de flujo de iones de sodio se ha mostrado superpuesto a los trazos reales de corriente.

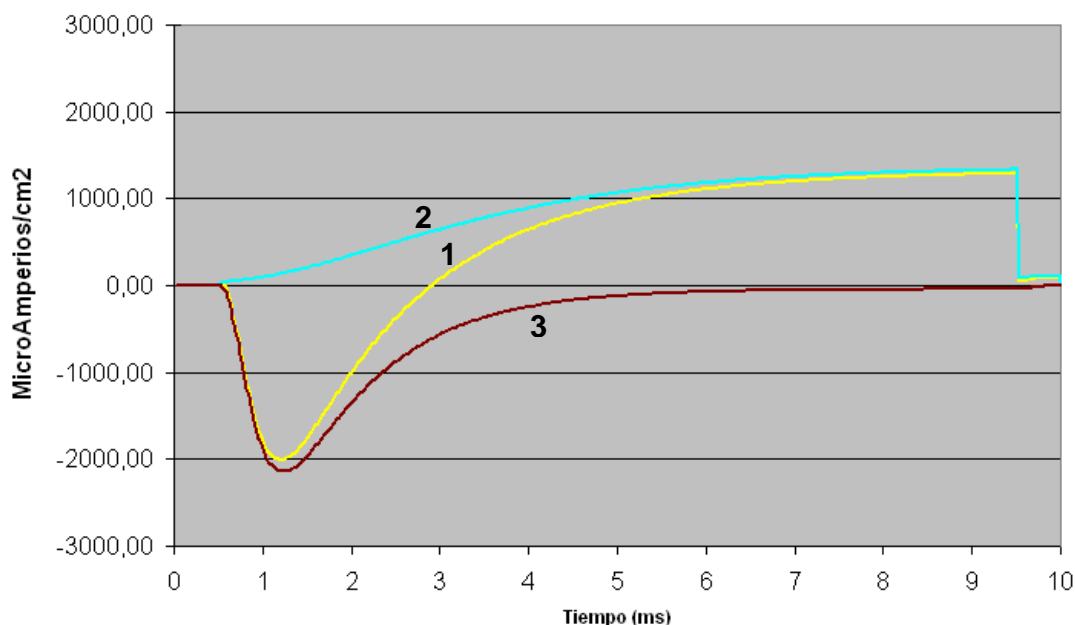


Figura 16. 1. Registro simulados de la corriente total ( $I_{Na} + I_K$ ) en una solución con 440 mM de Na. 2. Registro de la corriente total obtenida haber reducido a 13 mM la concentración de Na. Ambos registros se obtuvieron al despolarizar la membrana desde  $-90$  a  $-34$  mV. 3, registro obtenido al sustraer el trazo A del B. Según el modelo de Hodgkin y Huxley. Programa realizado en Excel de Microsoft Office.

Para que el cálculo de la corriente  $I_{Na}$  sea exacta es preciso que el potencial al que despolariza la membrana coincida con el potencial de equilibrio existente para los iones de sodio. Es obvio que en nuestra simulación de Excel es fácil conseguirlo por tanteo, sin embargo cuando estos experimentos se hacen en la realidad, el determinar la concentración es más laborioso. Una buena guía es cuando al despolarizar, se observa el curso temporal de la corriente de potasio y que éste se ajusta a una curva sigmoidea, sin jorobas o cambios en su curso.

Pruebe en la simulación a realizar despolarizaciones que no se ajusten al potencial de equilibrio para el sodio.

El curso temporal de las corrientes sigue un patrón característico. La activación de la corriente de Na y de K sigue un curso sigmoideo. Siendo más sigmoidea en el caso de la  $I_K$  que en el de la  $I_{Na}$ . El curso de activación de la  $I_K$  se puede ajustar bien a un proceso de cuarto orden. Es decir, si un proceso sigue una cinética de primer orden y se debe a la transición de una compuerta "n", la activación de la  $I_K$  se ajusta a un proceso  $n^4$ . Es como si hiciera falta pasar por cuatro transiciones antes de que el canal permita el paso de iones de potasio. Si sólo se requiriera una transición, entonces la forma de activación de la corriente sería exponencial pura y no sigmoidea. Para la  $I_{Na}$ , el proceso se activa de forma sigmoidea, pero donde la transición que se produce es de sólo tres estados. Hodgkin y Huxley definieron un parámetro m, cuyo valor había que elevar al cubo ( $m^3$ ) para que se ajustase a la activación de la corriente. La corriente de sodio, además sufre inactivación, a pesar de mantenerse elevado el potencial de membrana. El curso temporal de la inactivación es exponencial simple. Hodgkin y Huxley explicaron el curso completo de la  $I_{Na}$  mediante la expresión  $m^3h$ , donde  $m^3$  es la compuerta de activación y h la de inactivación.

En la actualidad, y desde el descubrimiento de drogas específicas que bloquean los canales iónicos, es posible realizar esta disección de corrientes de forma farmacológica. La tetrodotoxina (TTX) es una droga muy selectiva que bloquea los canales de sodio. Conocido su efecto tóxico desde hace siglos, no se purificó por vez primera hasta 1950 (Furham). En electrofisiología se utilizó ampliamente desde 1970. El tetra-etil-amonio (TEA) es un agente que bloquea los canales de potasio.

**Experimento P5:** Utilice la TTX y el TEA para disecar farmacológicamente las corrientes iónicas. Compruebe si existen diferencias en la forma de bloquear farmacológicamente las corriente iónicas. Realice curvas dosis respuesta del bloqueo ejercido por la TTX y el TEA, sobre canales de sodio y potasio respectivamente.



### Experimento 8. Cálculo de la conductancia para los iones de Na y K en el axón gigante del calamar.

La disección de las corrientes iónicas permite calcular las conductancias para los iones de sodio y potasio. Este es un cálculo muy importante que Hodgkin y Huxley realizaron y que les ofreció la oportunidad de comenzar a establecer numéricamente la amplitud y el curso temporal de las conductancias para estos dos iones.

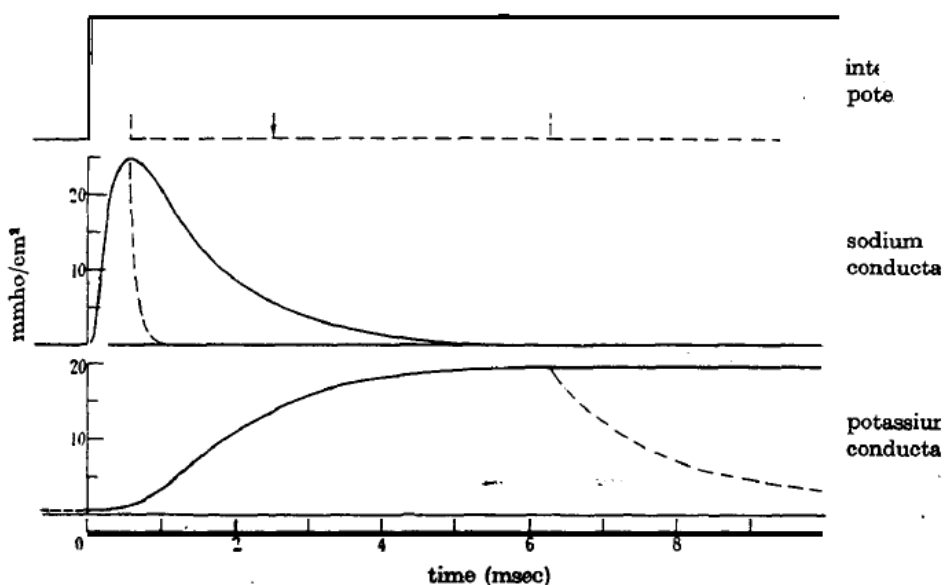


Figura 17. 1. Curso temporal de las conductancias a Na y K con un pulso de despolarización de  $-56$  mV. Las líneas discontinuas muestran el curso temporal de las conductancias cuando se interrumpe el pulso despolarizante. Hodgkin y Huxley, *J. Physiol.* 117, 300 (1952).

Para realizar el cálculo de la conductancia sólo se requiere dividir la corriente por el voltaje de despolarización, ya que la conductancia es la inversa de la resistencia.

$$G = \frac{I}{V}, \quad G_{Na} = \frac{I_{Na}}{V_m}, \quad G_K = \frac{I_K}{V_m}$$

Los trazos de conductancia obtenidos en la figura 18, proceden de los trazos de corriente presentados en la figura 16. Observe en la figura 17 que los trazos discontinuos se han obtenido al interrumpir el pulso despolarizante a 0,5 y 6 ms respectivamente. Estas interrupciones del pulso se han realizado para observar el curso temporal de la conductancia para el sodio antes de que ésta comience a

inactivarse. La principal diferencia de la corriente de sodio y de potasio es que la corriente de sodio se inactiva a pesar de que se mantiene el pulso de despolarización. Observe que cuando el pulso se interrumpe a 0,5 ms, antes de que comience a inactivarse, el curso temporal de la conductancia para sodio es más rápido que el de su inactivación. Este tipo de comportamiento de las conductancias dieron pie a Hodgkin y a Huxley a proponer modelos diferentes para los “canales” de sodio y potasio.

Utilice la simulación de Excel para obtener el curso temporal de las conductancias para sodio y potasio. En esta ocasión utilice el bloqueo farmacológico para obtener las corrientes de  $I_{Na}$  e  $I_K$ . Observe en el cuadro de Farmacología que puede aplicar a la simulación tetrodotoxina (TTX) y TEA para el bloqueo de la  $I_{Na}$  e  $I_K$  respectivamente. Use una alta concentración de TEA (60 mM) para obtener el curso temporal de  $I_{Na}$ , ya que con esta cantidad está bloqueado casi el 100 % de la corriente de K. Aplique pulsos de 9 y 0,7 ms, para obtener el curso temporal de la conductancia de Na cuando ya ha ocurrido la inactivación (9 ms) y cuando no (0,7 ms), ya que a este tiempo se alcanza aproximadamente el pico de la  $I_{Na}$ . Repita la operación pero en esta ocasión bloqueando la  $I_{Na}$  con TTX. Utilice una concentración que bloquee el 100 % de la  $I_{Na}$ , para obtener la  $I_K$  pura. En la parte inferior de la hoja de cálculo observará gráficos de los cursos temporales de las conductancias para los dos iones (Figura 18).

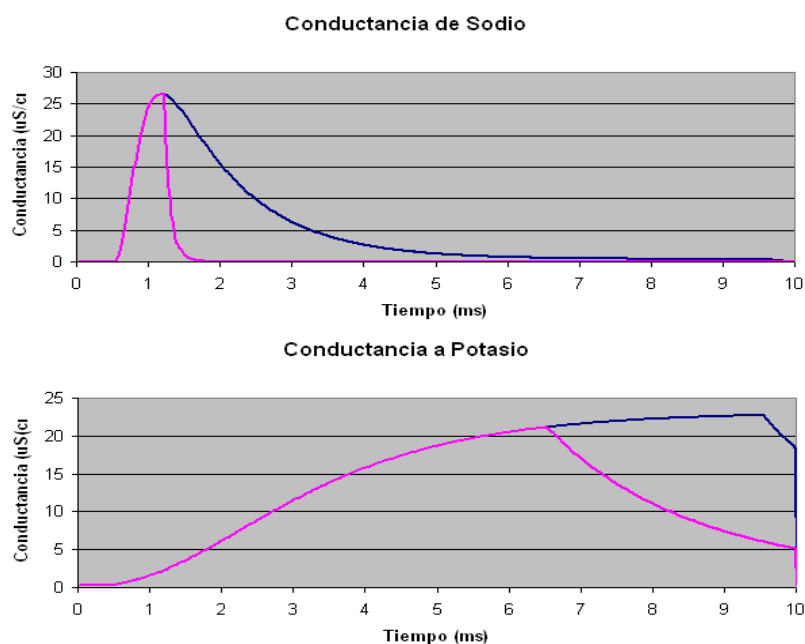


Figura 18. 1. Curso temporal de las conductancias a Na ( $G_{Na}$ ) y K ( $G_K$ ) con pulsos de despolarización de  $-60$  mV de distinta duración. Arriba, curso temporal de la  $G_{Na}$  obtenido en presencia de TEA con dos pulsos de distinta duración (9 y 07 ms). El pulso de 0,7 ms cesa en el pico de la  $I_{Na}$ . Observe que el curso temporal de la inactivación mientras se aplica el pulso de 9 ms es más lento. La  $G_K$ , obtenida en presencia de TTX disminuye aumento de forma sigmoide, mientras que al cesar el pulso lo hace de manera exponencial simple.

### Experimento 9. Medida de los parámetros cinéticos de las compuertas “n, m, y h” de Hodgkin y Huxley en función del voltaje.

Para la confección del modelo matemático del potencial de acción, Hodgkin y Huxley habían utilizado tres parámetros simples. El parámetro n, para describir el curso temporal de la  $I_K$ , y los parámetros m y h para describir el comportamiento de la  $I_{Na}$ . Sin embargo, estos parámetros modifican su valor en función del voltaje, ya que a voltajes cada vez más despolarizados, la  $I_K$  se hace progresivamente más rápida. Algo parecido ocurre con la corriente de sodio.

Para poder medir los parámetros de activación n y m, y el inactivación h, hace falta desarrollar protocolos que permitan medir a distintos potenciales la amplitud de la conductancia y la constante de tiempo de activación o inactivación. No es suficiente medir la amplitud de la corriente de Na o K, ya que ésta está influenciada por el gradiente electroquímico para cada ión. Recuerde:

$$I_{Na} = G_{Na} \cdot (E - E_{Na}) \qquad I_K = G_K \cdot (E - E_K)$$

Para obtener el curso temporal independiente del gradiente electroquímico, lo mejor es calcular la conductancia para cada ión a distintos potenciales de membrana, al igual que se hizo en el Experimento 7. Al dividir la corriente por el voltaje aplicado en cada momento para obtener el valor de conductancia.

Utilice el modelo de simulación en Excel y registre la corriente de potasio. Bien por el método de sustitución iónica de Hodgkin y Huxley o por medio del uso de la TTX. Piense qué diferencia hay entre usar un método u otro y cuál es más sencillo. Aplique un protocolo de pulsos de despolarización de 20 en 20 mV y grabe los trazos en memoria. Observe el gráfico de  $G_K$  desplazándose hacia abajo en la pantalla. Verá que la  $G_K$  evoluciona cómo se muestra en la figura 19.

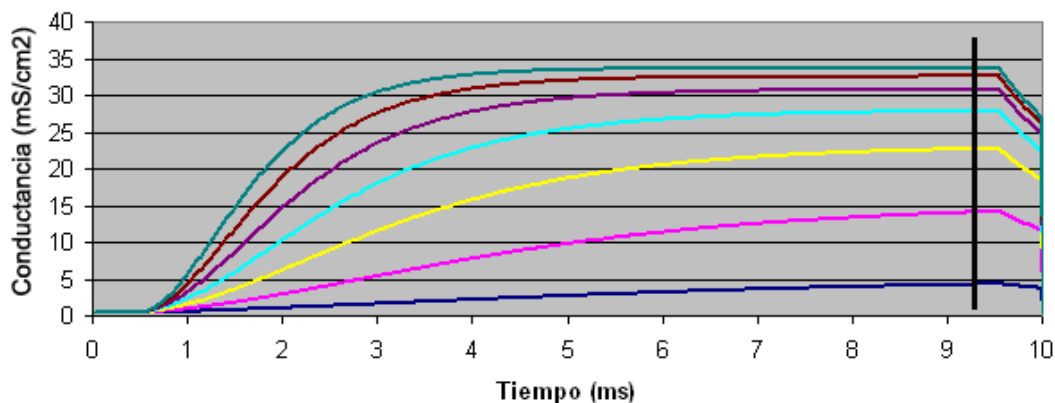


Figura 19. Registro e la conductancia a potasio con pulsos de despolarización de  $-70$ ,  $-50$ ,  $-30$ ,  $-10$ ,  $+10$ ,  $+30$  y  $+50$  mV. La línea negra indica el valor medido de máxima conductancia.

La representación de los valores de conductancia medidos al final del pulso (línea vertical) en función del potencial de membrana que la ha generado nos da directamente la dependencia del voltaje de la activación de la conductancia al potasio, es decir el valor del parámetro “n” de Hodgkin y Huxley. Para obtener n simplemente hay que normalizar el gráfico al máximo valor de conductancia medido. De la misma forma, si se mide la constante de tiempo en cada uno de los trazos de la GK a distintos potenciales, obtendremos cómo evoluciona la constante de tiempo de activación del mismo parámetro n. Es decir, se han obtenido los parámetros  $n_{\infty}$  y  $\tau_n$  para la dependencia del voltaje de los canales de potasio. La dependencia del voltaje de estos parámetros se muestra en la figura 20.

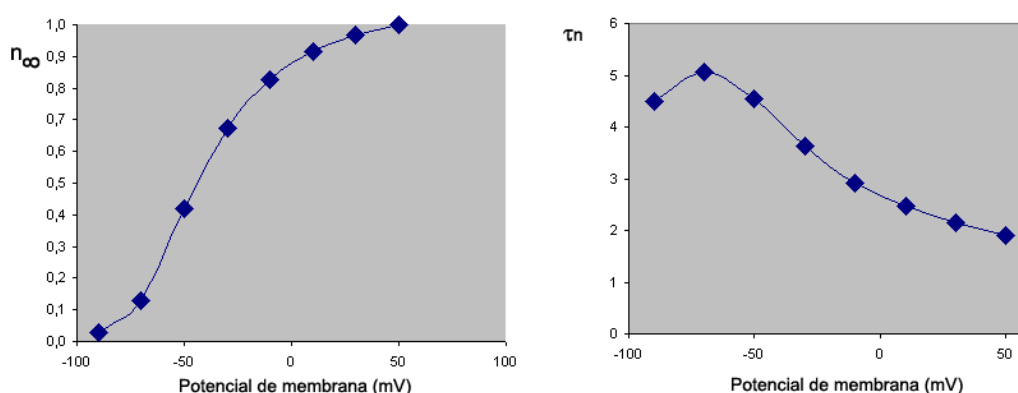


Figura 20. Media de la dependencia del voltaje de la activación de la compuerta n, así como de la evolución de su constante de tiempo en función del voltaje. Medidas realizadas sobre los trazos de la figura 18, por la línea negra (n) y el valor en que cada trazo alcanza el 63,2% de su valor (constante de tiempo  $\tau$ ).

## Experimento 10. Cálculo de la m infinito

Para los parámetros que determinan el comportamiento de la conductancia a sodio se realizan dos experimentos. Para obtener la dependencia de voltaje del parámetro m hay que hacer una curva corriente voltaje y medir el pico de la conductancia a sodio y su constante de tiempo de activación, al igual que se ha hecho anteriormente para n.

Haga una curva corriente voltaje en la simulación en pulsos de 20 mV, desde -70 a +50 mV. Haga el experimento en presencia de TEA y grabe las corrientes. Haga las medidas del pico de la conductancia a sodio. Recuerde que debe medir en el gráfico de conductancia para así evitar la disminución de la corriente por el menor gradiente electroquímico a medida que se despolariza más. Obtendrá unos gráficos similares a los observados en la figura 21. El gráfico superior es el de la INa. Observe cómo se va activando con más rapidez a medida que el voltaje de despolarización es mayor. El registro de conductancia, abajo, indica

este fenómeno. El trazo amarillo (-70 mV) es el que se desarrolla más lentamente, mientras que el trazo rojo (+70 mV) es el que se desarrolla con más rapidez. Mida la constante de tiempo haciendo uso del programa Excel y el cursor que aparece encima de cada gráfico al situar el ratón sobre él.

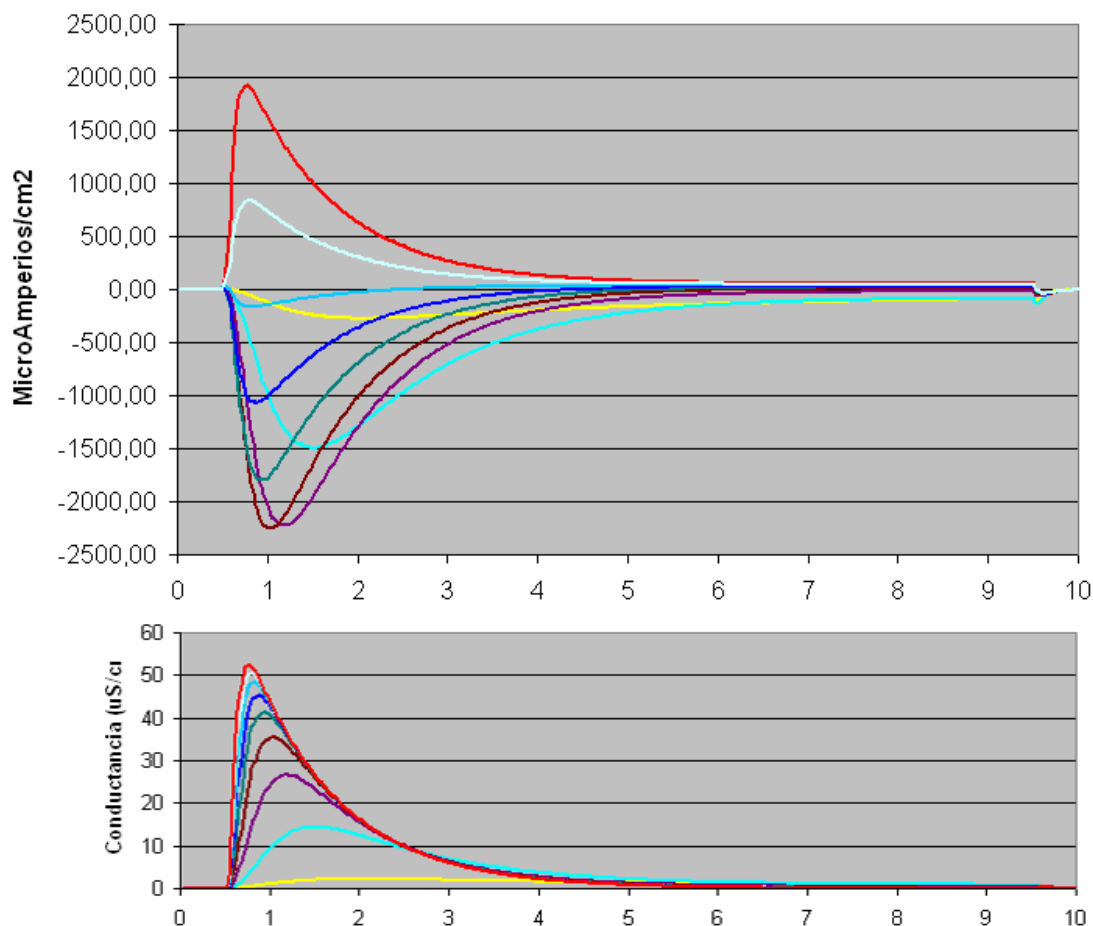


Figura 21. Simulación de corrientes de sodio (arriba) y cálculo de la conductancia (abajo) en pulsos despolarizantes de  $-70$ ,  $-50$ ,  $-30$ ,  $-10$ ,  $+10$ ,  $+30$ ,  $+50$  y  $+70$  mV. De la medida de la amplitud de la conductancia al sodio se mide la dependencia del voltaje.

Obtendrá un gráfico que indica el curso temporal puro de la corriente de sodio. Sin embargo y debido a la compuerta de activación m y h, la corriente crece para luego decrecer. Este hecho quiere decir que en todo momento del desarrollo de la corriente está afectado por las dos compuertas. Para obtener los parámetros puros de la compuerta m o h, hace falta eliminar la acción de una de ellas. Hodgkin y Huxley utilizaron un protocolo de pulsos en los que habían eliminado la inactivación. Es decir la compuerta h estaba eliminada. Sin embargo en nuestro experimento utilizaremos un protocolo farmacológico descrito por C.M. Armstrong (1965) en el que elimina la compuerta h al profundir el interior del axón con un enzima proteolítico, la pronasa. Con esta maniobra se elimina la compuerta h y por tanto se mide directamente en una curva corriente voltaje la

activación de la compuerta m, de la misma forma que se hizo anteriormente con la compuerta n.

Abra el programa de Excel y simule corrientes de sodio en presencia de pronasa (ventana de Farmacología). Aplique pronasa hasta que el 100% de la corriente se observe que no tiene inactivación. (300  $\mu\text{M}$ ). Haga una curva IV. Obtendrá un gráfico similar al de la figura 22.

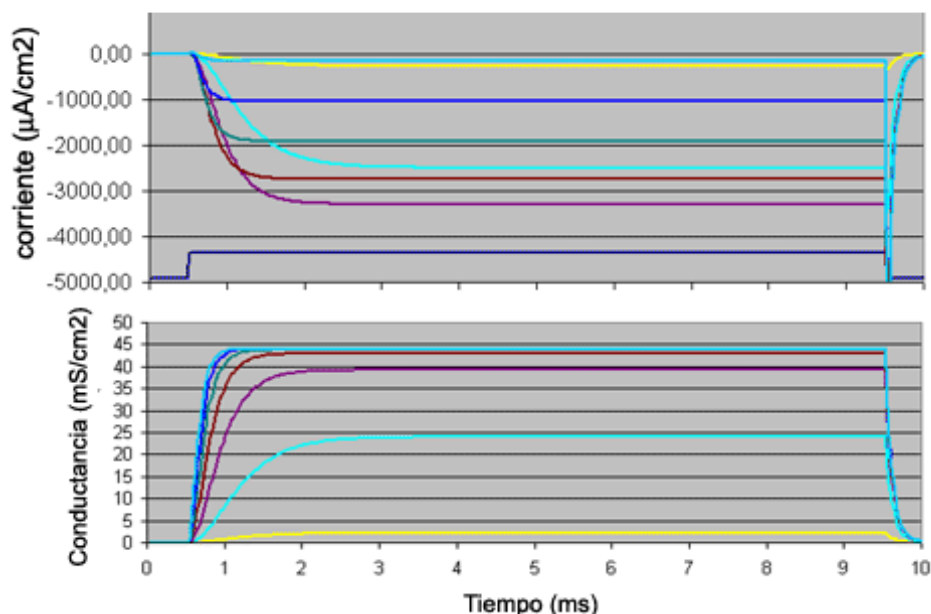


Figura 22. Simulación de corrientes de sodio (arriba) en presencia de pronasa (300  $\mu\text{M}$ ) y cálculo de la conductancia (abajo) en pulsos despolarizantes de  $-70$ ,  $-50$ ,  $-30$ ,  $-10$ ,  $+10$ ,  $+30$ ,  $+50$  y  $+70$  mV. De la medida de la amplitud de la conductancia al sodio se mide la dependencia del voltaje de la compuerta m. (Armstrong, C.M. J. Gen. Physiol. 1965).

La medida del valor normalizado de la conductancia al final del pulso dará una idea del grado de activación de la compuerta m y, por tanto, del grado de activación de los canales de sodio. Asimismo, si se mide la constante de tiempo de la conductancia, se tendrá una medida directa de la dependencia del voltaje de la constante de tiempo de activación ( $\tau_m$ ). La figura 23 muestra la dependencia del voltaje de la compuerta m y de su constante de activación.

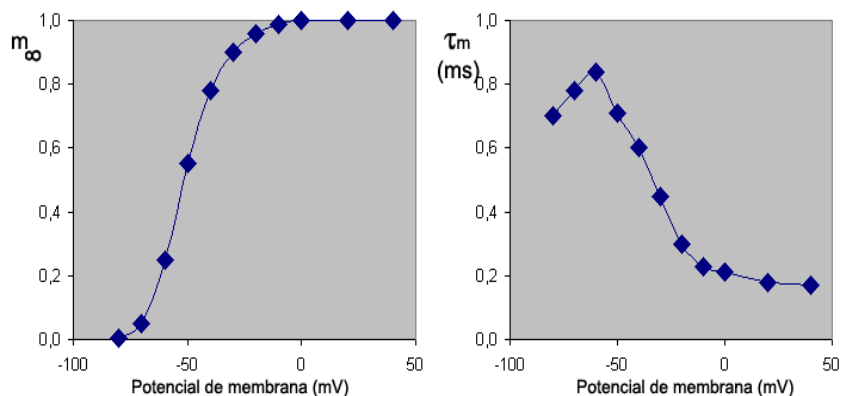


Figura 23. Medida de la dependencia del voltaje de la activación de la compuerta m, así como de la evolución de su constante de tiempo en función del voltaje  $\tau_m$ . Medidas realizadas sobre los trazos de la figura 22, por la línea negra (n) y el valor en que cada trazo alcanza el 63,2% de su valor (constante de tiempo  $\tau$ ).

## Experimento 11. Cálculo de la h infinito

Para determinar la compuerta  $h$  de inactivación vamos a realizar el experimento de Hodgkin y Huxley, conocido como  $h$  infinito. Para lograr esta dependencia del voltaje, hay que someter al axón a distintos voltajes durante cierto tiempo para que se produzca el efecto de la compuerta de inactivación. Es decir, si se somete al axón durante decenas de milisegundos a un potencial de 0 mV, la corriente de sodio estará parcialmente inactivada y por tanto la máxima cantidad de corriente que puede pasar por la membrana debida a sodio limitada. A voltajes negativos (-100 mV) los canales de sodio estarán en la mejor condición para ser activados, lo que quiere decir que la compuerta de inactivación  $h$  no está ejerciendo su acción.

Haga el experimento en Excel. También dispone de experimentos pregrabados en la Grabadora de Windows con el nombre de "h infinito". Mida el pico de la conductancia a sodio con este protocolo. Observará que a medida que el pre pulso es más despolariza la amplitud de la corriente es menor. De la misma forma puede medir la constante de tiempo de la compuerta  $h$  al medir la constante de tiempo de la inactivación de la corriente.

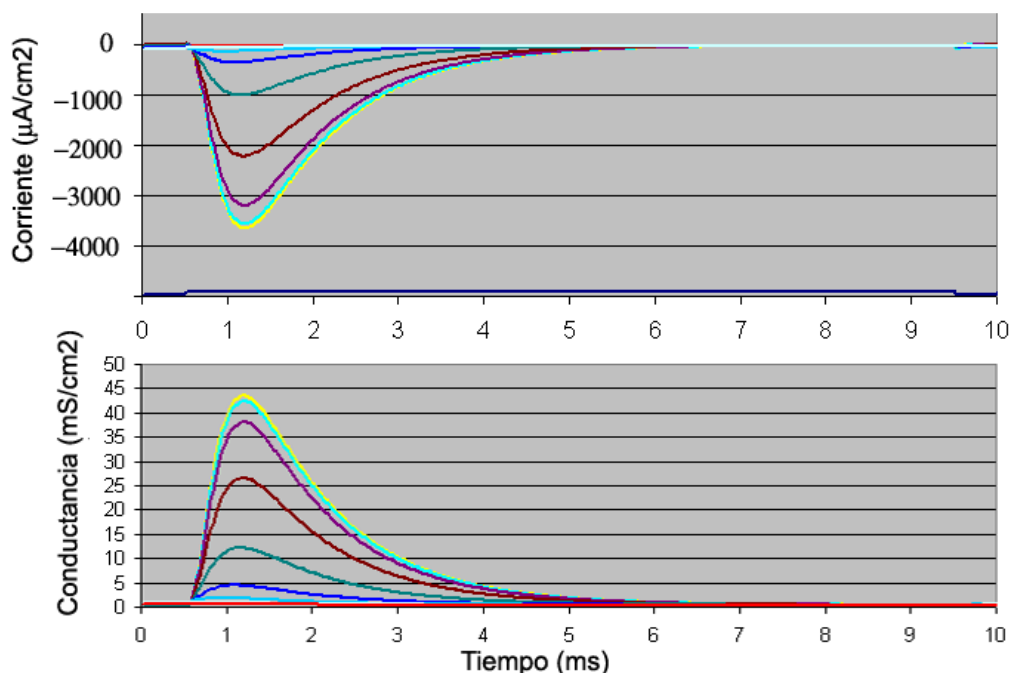


Figura 24. Simulación de corrientes de sodio (arriba) para la medida del  $h$  infinito de Hodgkin y Huxley. Se aplican prepulsos de amplitud creciente (-120 hasta -60 mV) seguidos de un pulso test que evoca la corriente de sodio. Observe que el curso temporal de la corriente de sodio es idéntico en todos los casos.

Sin embargo la amplitud de la corriente varía en función del grado de inactivación por la compuerta h. Este protocolo se utilizó para medir la dependencia del voltaje de la compuerta h y su constante de tiempo.

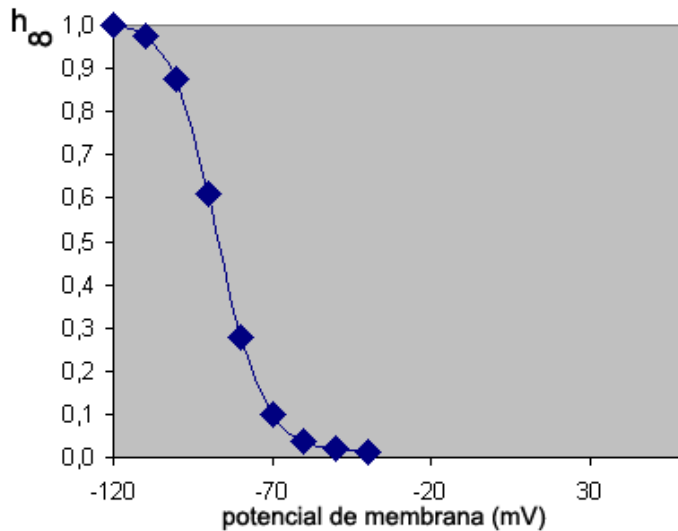


Figura 25. Medida del  $h_{\infty}$  para estimar la dependencia del voltaje de la compuerta h. Los puntos experimentales se obtuvieron en la simulación de Excel con prepulsos de  $-120$  hasta  $-40$  mV y con la aplicación de un pulso test hasta  $-30$  mV. A  $-30$  mV es donde se obtiene el máximo de corriente de sodio (ver Figura 14)

### 3. Bibliografía

1. P. F. Baker, A. L. Hodgkin and T. I. Shaw, Nature, 190 (1961) 885; J. Physiol. (London), 164 (1962) 330,355.
2. K. S. Cole and H. J. Curtis, J. Gen. Physiol., 22(1939)649.
3. H. J. Curtis and K. S. Cole, J. Gen. Physiol., 21(1938) 757.
4. A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, Nature, 144(1939)710.
5. A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, J. Physiol. (London), 104(1945)176.
6. A. L. Hodgkin and B. Katz, J. Physiol. (London), 108 (1949) 37.
7. Alan Loyd Hodgkin. 1963. The ionic basis of nervous conduction. Nobel Lecture.
8. Andrew F. Huxley. 1963. The quantitative analysis excitation and conduction in nerve. Nobel Lecture.
9. A. L. Hodgkin, A. F. Huxley and B. Katz, J. Physiol. (London), 116 (1952) 424





## 4. Lista de experimentos

En el programa Excel Vd puede realizar todos los experimentos descritos anteriormente. Puede tener acceso a los valores numéricos de cada trazo a partir de las columnas AN hasta la EJ. Puede almacenar hasta 10 barridos, ya que no hace falta más para realizar las demostraciones descritas con anterioridad. Puede crear nuevas hojas de cálculo para almacenar sus propios experimentos.

1. Efecto del sodio externo
2. Efecto del potasio interno
3. Umbral de excitación
4. Periodo refractario
5. Curva corriente voltaje
6. Disección iónica de la  $I_{Na}$  e  $I_K$
7. Cálculo de la conductancia para  $Na$
8. Cálculo de la conductancia para  $K$
9. Medida del  $n$  infinito
10. Medida del  $m$  infinito
11. Medida del  $h$  infinito