UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

Caracterización del receptor colinérgico de la placa motora de la rana

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Carmen Bravo Valdes

DIRECTOR:

José Andrés Sobrino Montalbán

Madrid, 2015

© Carmen Bravo Valdes, 1981

5309861372
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TP
1983
130

X-53-00909-2

Carmen Bravo Valdés

CARACTERIZACION DEL RECEPTOR COLINERGICO DE LA PLACA MOTORA DE LA RANA

Departamento de Fisiología Humana
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
1983

BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 130/83

© Carmen Bravo Valdés
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-18058-1983

CARMEN BRAVO VALDES

CARACTERIZACION DEL RECEPTOR COLINERGICO DE LA PLACA MOTORA DE LA RANA

DIRECTOR: PROF. J.A. SOBRINO MONTALBAN
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA HUMANA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
AÑO 1981.

JOSÉ ANDRES SOBRINO MONTALBAN
PROFESOR AGREGADO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
CIUDAD UNIVERSITARIA MADRID-3

D. JOSE ANDRES SOBRINO MONTALBAN, Profesor Agregado del Departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

HACE CONSTAR: Que el trabajo titulado "Caracterización del receptor colinérgico de la placa motora de la rana" ha sido realizado por Dña. Carmen Bravo Valdés bajo mi dirección y reúne las condiciones necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral.

Madrid, 30 de agosto de 1981

Dr. J.A. Sobrino

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de una beca de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. Proyecto Nº 4307-89 y 2799.

AGRADECIMIENTOS

Toda tarea humana debe remontar el pasado, superar el presente y escribir el futuro. Sin embargo, antes de alejarnos definitivamente del límite que nos separa del pasado es necesario por razón y por afecto apreciar en su más honda dimensión el camino recorrido.

Iniciar un trabajo de investigación en el ámbito universitario actual es tarea ardua y difícil. Conlleva en principio la aceptación de una situación de inestabilidad laboral. De esta forma, la tarea investigadora debe compaginarse con una difícil pirueta por la subsistencia vital básica. Muy frecuentemente se añade a ésto la escasez de medios económicos para realizar un trabajo con medios y técnicas actualizadas.

Estos factores negativos, sin embargo, se vieron en gran parte compensados hace cuatro años, cuando comencé este trabajo, por una singular situación: tuve oportunidad de iniciar mi camino en el terreno de la investigación al lado de un maestro dispuesto a enseñar y compartir los avatares del largo recorrido que hoy nos lleva a concluir esta tesis. Por ello mi gratitud sincera al profesor J.A. Sobrino.

A mis amigos, con ellos he compartido en estos años lo bueno y lo malo, lo importante y lo irrelevante, lo sustancial y lo accidental; en definitiva, todo aquello que conforma el curso vital de una existencia y hace posible el logro de una meta. A ellos también mi gratitud.

INDICE Pag.

I JUSTIFICACION 1
II INTRODUCCION 5
A)- MORFOLOGIA DE LA PLACA MOTORA 6
1.- Evolución histórica y concepto actual 7
2.- Patrón de inervación del músculo sartorio de la rana 23
3.- Distribución topográfica de las placas motoras en el músculo sartorio de la rana... 31
B)- BASES DE LA EXCITABILIDAD 34
1.- Potencial de membrana 35
2.- Propiedades pasivas de la membrana 42
3.- Conceptos y formulaciones básicas de la teoría de cable: 43
a) Resistencia input 43
b) Constante de espacio de la membrana ... 46
c) Constante de tiempo de la membrana 49
C)- TRANSMISION NEUROMUSCULAR 52
1.- El potencial de placa motora 55
2.- Características generales del cambio de permeabilidad producido por la acetilcolina 56
3.- Modelo eléctrico de membrana y transmisión sináptica 63
4.- Aspectos presinápticos de la transmisión neuromuscular 66
5.- Liberación subcuantal del transmisor 69
6.- Liberación no cuantal del transmisor 70

pag.

D)- DROGAS 71
1.- Concepto de droga 72
2.- Teorías sobre la acción de las drogas.. 77
a) Teoría de la ocupación 77
b) Eficacia 78
c) Modelo de dos estados 81
d) Cooperatividad 84
3.- Recapitulación 87
4.- Desensibilización de los receptores ... 89
E)- EL RECEPTOR COLINERGICO 91
1.- El receptor colinérgico 92
2.- Naturaleza proteica del receptor colinérgico 99
3.- Grupos SH y receptores 102

III OBJETIVOS Y PLAN GENERAL DE TRABAJO 112

IV MATERIAL Y METODOS 115

A)- REGISTROS INTRACELULARES 116
B)- MEDIDA DE LAS CONSTANTES ELECTRICAS DE LA MEMBRANA DE UNA CELULA EXCITABLE 119
C)- MICROIONTOFORESIS 122
1.- Principios básicos de la microiontoforesis 122
2.- Liberación espontánea de la sustancia desde la punta de la micropipeta 124
3.- Limitación del flujo espontáneo por corrientes de freno 131
4.- Liberación de sustancias ionizadas por un pulso de corriente electroforética.. 135
5.- Electroosmosis 142
6.- Flujo electroforético total 144

pag.

7.- Realización práctica de la técnica de microiontoforesis 146

D)- SOLUCIONES 149

E)- DROGAS 151

F)- MICROPIPETAS 151

G)- ANIMALES DE EXPERIMENTACION 152

H)- CONTROL DE TEMPERATURA 153

I)- CAMARA DE EXPERIMENTACION 153

V RESULTADOS 154

A)- ESTUDIO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA DE LAS FIBRAS MUSCULARES DEL SARTORIO DE LA RANA 156

1.- a pH 7 156

2.- a pH 6 157

3.- a pH 8 157

4.- Influencia del potasio extracelular en el potencial de membrana 158

B)- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES PASIVAS DE LA MEMBRANA DE LA FIBRA MUSCULAR DEL SARTORIO DE LA RANA 165

1.- Determinación de las propiedades pasivas de la membrana a pH 7 166

2.- Determinación de las propiedades pasivas de la membrana a pH 8 176

3.- Determinación de las propiedades pasivas de la membrana a pH 6 177

C)- MICROIONTOFORESIS CON AGENTES COLINERGICOS Y REACTIVOS SULFHIDRILICOS 180

1.- Iontoforesis con reactivos sulfhidrílicos oxidantes 183

a) Microiontoforesis con ortoiodosobenzoato (OIB) 183

pag.

- iontoforesis con pipeta simple ... 184
- estudio de las despolarizaciones fásicas a distinto pH de LEC 185
- estudio de la interacción OIB-Carbacol 191

b) Microiontoforesis con Ditibis nitrobenzoato (DTNB) 211
- aplicación electroosmótica de etanol 212
- estudio de las despolarizaciones fásicas a distintos pH de LEC 214
- estudio de la interacción DTNB-Carbacol 218

2.- Iontoforesis con reactivos sulfhidrílicos reductores 236

a) Iontoforesis con Ditiotreitol (DTT). 236
- iontoforesis con pipeta simple ... 236
- estudio de las despolarizaciones fásicas a distinto pH de LEC 237
- estudio de la interacción DTT-Carbacol 240

b) Iontoforesis con 2 mercapto etanol (2ME) 257
- iontoforesis con pipeta simple ... 257
- estudio de las despolarizaciones fásicas a distinto pH de LEC 258
- estudio de la interacción 2 ME-Carbacol 260

D)- ACCION DEL CURARE SOBRE LAS RESPUESTAS DE LA MEMBRANA POSTSINAPTICA A LA APLICACION ELECTROFORETICA DE REACTIVOS SULFHIDRILICOS 270

pag.

E)- ACCION DE LA BETA BUNGAROTOXINA SOBRE LAS RESPUESTAS DE LA MEMBRANA POSTSINAPTICA A LA APLICACION ELECTROFORETICA DE REACTIVOS SULFHIDRILICOS 281

VI DISCUSION 285

A)- VALORACION GLOBAL DE LOS RESULTADOS 286

B)- MECANISMO DE ACCION DE LOS REDUCTORES 294

C)- MECANISMO DE ACCION DE LOS OXIDANTES 296

D)- ACCION DEL CURARE 304

E)- INTERACCION CARBACOL REACTIVOS SULFHIDRILICOS .. 308

F)- RECAPITULACION 321

VII CONCLUSIONES 325

VIII BIBLIOGRAFIA 329

I - JUSTIFICACION

El estudio sistematizado de la unión neuromuscular se inició hace ya más de un siglo con los trabajos sobre la morfología de la placa motora de VALENTIN y EMMERT (1836).

Desde entonces, la evolución en el conocimiento de la estructura y función de la placa motora se ha visto enriquecida por la aportación científica de una pléyade de investigadores. Los hitos más destacados en esta evolución han sido:

- desde el punto de vista de la morfología, la clarificación de la estructura de la unión neuromuscular.
- desde el punto de vista de la función, el establecimiento de la doctrina de la transmisión sináptica, extrapolable a la unión neuromuscular.

Es, sin duda, la base morfológica-funcional de la transmisión de información desde una célula excitable a otra, uno de los campos más atractivos de la investigación neurofisiológica. El interés que suscita este terreno se vió enriquecido con el advenimiento a mediados de este siglo de las técnicas de registro intracelulares mediante la utilización de microelectrodos.

Paralelamente se desarrollaron otras técnicas que abrieron nuevos cauces en el estudio de la transmisión sináptica. Una de estas técnicas fué ideada por NASTUK (1953) y permitió por iontoforesis, "simular", dentro de ciertos límites, la acción de los neurotransmisores naturales y también permitió la aplicación de drogas "foráneas" a nivel de zonas muy localizadas de la membrana celular.

En el terreno de la farmacología, se ha descrito en las últimas décadas el mecanismo de acción de las drogas y desde otra vertiente, complementaria con la anterior, se abordó la caracterización de los receptores sinápticos.

Estudios multidisciplinarios confluyeron en determinar la naturaleza proteica del receptor colinérgico. Sin embargo, la exacta caracterización de la proteína receptora no ha sido lograda ya que en la actualidad nos encontramos con dos concepciones sobre la estructura proteica del receptor.

Por una parte, el grupo de trabajo de DEL CASTILLO, ha constatado que la aplicación iontoforética de reactivos de grupos SH a nivel de la placa motora de la rana y a nivel de la sinapsis colinérgica de la electroplaca, da origen a despolarizaciones fásicas similares a las producidas por la acetilcolina. La sensibilidad de la proteína receptora a los agentes oxidantes sugiere la presencia en el receptor de grupos SH libres, cuya oxidación podría estar implicada directamente en el proceso de activación.

Por otra parte, el grupo de trabajo de KARLIN, sugiere la presencia de un puente disulfuro cerca del sitio activo del receptor. Este grupo puede ser reducido y reoxidado in situ, pero la importancia de este enlace sería solamente estructural; ya que según esta línea de trabajo, el puente disulfuro no sufriría alteración alguna durante la activación natural del receptor.

Ambas tendencias han aportado abundante apoyo experimental a sus hipótesis si bién los métodos empleados en sus trabajos han sido diferentes.

El Profesor J.A. SOBRINO, inició en el Laboratorio de Neurobiología de la Universidad de Puerto Rico, una línea de trabajo encaminada a abordar la caracterización del receptor colinérgico a nivel de la placa motora de la rana a la luz de las dos hipótesis existentes. Esta tesis nace fundamentalmente del deseo de continuar esta línea de trabajo y representa el inicio de una tarea que nos proponemos continuar en el futuro.

La justificación primera de este trabajo radica en la todavía existente discrepancia sobre la exacta naturaleza del receptor colinérgico y, su justificación última viene representada por el empeño de establecer una línea de trabajo encaminada al estudio de los receptores sinápticos mediante la utilización de técnicas electrofisiológicas actuales.

II - INTRODUCCION

A - MORFOLOGIA DE LA PLACA MOTORA

1) EVOLUCION HISTORICA Y CONCEPTO ACTUAL

El primer intento de describir la morfología de la unión neuro muscular data del año 1836. En este año, VALENTIN y EMMERT describen la U.N.M. como una formación de tipo arciforme donde las terminales motoras se dividían en ramas que, reunidas nuevamente, formaban el componente aferente al sistema nervioso central.

Esta concepción de la morfología de la U.N.M. fue aceptada hasta el año 1840, cuando DOYERE habla por primera vez de una interrupción de la fibra motora a nivel de la fibra muscular. Según DOYERE, la fibra motora se unía a la fibra muscular en una zona poco definida y formando a este nivel una eminencia en forma de cono, "eminencia de Doyere". La descripción fue hecha en el milnesium tardigardum.

En 1862, KÜHNE publica su primer trabajo sobre la estructura de la U.N.M. Según KÜHNE, la fibra nerviosa se ramificaba y formaba una arborización terminal después de penetrar en el sarcolema. En su trayecto, la fibra conservaba la cubierta de Henle que se fusionaba con el sarcolema para formar terminaciones hipolemales. Por primera vez, KÜHNE describe la U.N.M. de la rana y en su descripción queda patente que en este animal no se aprecia la "eminencia de Doyere". En la rana, las terminaciones motoras, -endbüschel-, aparecían como filamentos relativamente largos dispuestos sobre la superficie de las fibras musculares.

En el mismo año, ROUGET (1862), reconoce la presencia de una zona especializada en forma de material granuloso a nivel de la terminación de la fibra motora en los músculos estriados de los reptiles, aves y pájaros. A esta zona, él la denomina "Placa Terminal".

KRAUSE (1863), fue el primero en utilizar el término de "Placa

Motora" como referido a la zona que relaciona la terminación de la fibra motora con la superficie muscular subyacente. Sus observaciones fueron llevadas a cabo en los músculos del ojo del gato.

En la época clásica del estudio de la morfología de la U.N.M., que abarca desde 1836 hasta 1947, se utilizaron como métodos de tinción el Cloruro de Oro, el Nitrato de Plata y el Azul de Metileno. El aspecto morfológico de la arborización terminal variaba según el método empleado y ello fue la razón de la diversidad de pareceres a la hora de interpretar las imágenes. Algunos de los resultados obtenidos con los diferentes métodos son los siguientes:

Tinción con Cloruro de Oro

Utilizado, entre otros, por KÜHNE. Este autor describió dos componentes básicos de la unión neuromuscular:

- los terminales nerviosos que él llamó Axialbaum y
- el estroma. Esta zona rodea a la anterior.

KÜHNE(1883), observó que el estroma no era homogéneo y que su periferia aparecía más granular. El denominó esta área "borstensaum". Hizo sus estudios en reptiles y consideró que el "borstensaum" era una estructura dentro o sobre la membrana que cubría la U.N.M.

Impregnación Argéntica

Fue utilizado, entre otros, por CAJAL (1904,1925); TELLO (1905, 1917,1944).

Este método permite visualizar las neurofibrililas. La zona que aparecía sin teñir, rodeando los filamentos nerviosos fue interpretada por CAJAL como una capa de axoplasma libre de neurofilamentos.

Este método también puso de manifiesto la presencia de gránulos, que eran muy abundantes a nivel de la terminal nerviosa.

Azul de Metileno

Con este método, el axon y su ramificación terminal se tiñen de azul oscuro. El resto de las estructuras se tiñen de azul pálido, DOGIEL (1890); FEIST (1890); KULCHITSKI (1924); TIEGS(1932); TELLO (1944) y COUTEAUX (1947).

Ni la tinción con oro ni la tinción con plata o azul de metileno permitía afirmar si las terminaciones yacían sobre el sarcolema y eran por tanto, epilemales o si las terminales nerviosas penetraban la membrana superficial muscular y eran hipolemales.

A favor de la teoría epilemal estaban autores como KRAUSE y RETZIUS.

A favor de la teoría hipolemal se situaron autores como KÜHNE, TIEGS y CAJAL.

Desde que se comenzó a estudiar la morfología de la U.N.M., llamó la atención la diversidad estructural de la misma, dependiendo de la especie animal que se estudiara HINSEY (1934). Dentro de la diversidad morfológica, los autores distinguieron los siguientes grupos:

- terminaciones "en plaque", en placa de forma oval. Son las terminaciones típicas de las fibras musculares de los mamíferos y reptiles.
- terminaciones "en grappe", en racimo. Son terminaciones alargadas que acaban en una estructura en forma de racimo. Se encuentran en reptiles y, ocasionalmente en músculos de rana. Para algunos autores serían

formas evolutivas inmaduras (ZACKS, SHEFF y SAITO, 1973).

- terminaciones "en ligne", alargadas. Son las terminaciones típicas de las fibras musculares de la rana.
- terminaciones "ultraterminales". Se trata de fibras amielínicas que, naciendo de la misma arborización terminal se dirigen hacia otra zona de la misma fibra o hacia otra fibra vecina para formar otra arborización terminal.

Respecto a la estructura de la unión neuromuscular propiamente dicha, los diversos autores distinguieron los siguientes componentes básicos de la misma.

- la fibra terminal que pierde su vaina de mielina al aproximarse al sarcoplasma.
- cubierta de Henle y Vaina de Schwann.
- una zona de sarcoplasma modificado que en algunas especies forma la llamada "eminencia de Doyere".
- núcleos de la U.N.M. Se distinguieron desde el principio dos grandes grupos:
  - núcleos que se visualizaban en el sarcoplasma, en la míofibrilla, y
  - núcleos de las cubiertas, correspondientes a los núcleos de la cubierta de Henle y de la vaina de Schwann.

CAJAL (1881, 1952), distingue además los núcleos de la arborización. Se trata de elementos extremadamente pálidos de forma elíptica y finamente granulosos. Su eje mayor es paralelo al haz muscular y están situados al lado de o sobre los filamentos pálidos.

Según su posición respecto a la arborización terminal se distinguèn dos variedades:

- núcleos de las divisiones y
- núcleos de la continuidad de los tallos terminales.

ARBORIZACION TERMINAL

Según CAJAL (1881, 1952), en el conjunto de la distribución nerviosa se pueden distinguir:

- ramas madres: son tubos gruesos de mielina. Cada fibra muscular recibe una rama madre.. Podría haber también dos o más fibras originadas de distintos cordones nerviosos. En este caso, la terminación nerviosa sería múltiple ya que cada rama madre posee una distribución independiente sobre la misma fibra.

  Las ramas madres están cubiertas por la vaina de Schwann y más exteriormente por la cubierta de Henle.

  En general, toda fibra nerviosa mielínica próxima a su terminación, se aparta del haz del que formaba parte llevándose consigo una hojuela homogénea continuada con la vaina laminosa (perineuro) y destinada a reforzar la vaina de Schwann. Esta fina cubierta adventicia yace a distancia de la vaina de Schwann y ha sido designada por Ranvier "vaina de Henle". En su espesor contiene de trecho en trecho unos núcleos alargados.

- ramas hijas: son fibras más delgadas y pálidas. Tienen cubierta de Henle y vaina de Schwann, pero no siempre presentan cubierta de mielina.

- fibras pálidas o arborización terminal: constituyen las últimas ramificaciones de las ramas hijas y son filamentos despro

vistos de mielina. Para CAJAL, estas fibras pálidas constituyen la verdadera terminación nerviosa de los músculos estriados y se corresponde con los "tallos pálidos" de Ranvier y la "placa terminal motora" de Krause.

Cajal distingue, en la rana, cuatro tipos principales de terminaciones:

- digitoformes
- ramificadas
- reticulares
- penniformes

Por lo que respecta a la situación de la arborización terminal, los distintos autores sostuvieron diversas opiniones. Para algunos, Koelliker y Krause entre otros, las fibras pálidas yacían por encima del sarcolema. Para otros autores, Ranvier, Kühne y Cajal entre otros, las fibras pálidas yacían por debajo del sarcolema. En efecto, en opinión de CAJAL, había "contacto inmediato entre la materia contráctil y los elementos de la arborización". Apoyaba su hipótesis en los siguientes presupuestos:

- en las placas motoras de los mamíferos, la arborización terminal era infrasarcolémica.
- las ramas pálidas de la arborización eran fijas, "indislocables".
- examinadas en estado fresco, las ramas pálidas eran invisibles, lo cual acreditaba para CAJAL, su posición profunda, hipolemal.
- la arborización terminal se teñía poco con el nitrato de plata, como si éste hubiera de vencer obstáculos en

su camino hasta las fibras.

Con el método de impregnación argéntica las extremidades de las fibras pálidas se visualizaban como terminando a la manera de un cabo redondeado.

CUBIERTA DE HENLE

Según opinión de la mayoría de los autores de la época, la cubierta de Henle se prolongaba envolviendo a la fibra terminal y acababa uniéndose con el sarcolema. El punto de fusión no aparecía, sin embargo, tan claro. Para CAJAL, la cubierta de Henle se unía al sarcolema en el punto donde el tallo pálido terminal parecía estrecharse. Para otros autores la unión se verificaría a nivel de la estructura en "empalizada" descrita inicialmente por KÜHNE y que este autor denominó "estroma".

TERMINACION DE LA MIELINA Y DE LA VAINA DE SCHWANN

La terminación de la mielina se verifica de un modo brusco en el punto inicial de las ramas pálidas.

La terminación de la vaina de Schwann era sin embargo más dificil de objetivar. Para la mayoría de los autores parecía probable que la vaina de Schwann se prolongase aplicándose a la superficie de las ramas terminales, más allá del punto donde cesaba la mielina. Algunos autores, entre ellos TIEGS (1953), sostenían que de existir un componente glial a nivel de la U.N.M. éste debía corresponderse con el "estroma" descrito por KUHNE.

En opinión de CAJAL, era probable que la vaina de Schwann acabase confundiéndose con el cilindroeje.

EMINENCIA DE DOYERE

A nivel de la U.N.M., en el sarcoplasma, se observó una zona que se distinguía como un acúmulo local de protoplasma. A este nivel se veía abundante material granuloso y núcleos.

Esta zona podía ser muy prominente y formaba entonces la llamada "eminencia de Doyere". Esto ocurre en las uniones neuromusculares de los mamíferos.

Por otra parte, también se describieron uniones neuromusculares donde esta agregación de material granuloso era prácticamente inexistente. Esto se objetivaba en las uniones neuromusculares de la rana.

Entre ambos extremos se describieron todo tipo de situaciones intermedias. En todo caso, quedó claro que la U.N.M. era una estructura morfológicamente circunscrita a una zona muy determinada de la fibra muscular.

La era moderna del conocimiento de la morfología de la placa motora comienza con los trabajos de COUTEAUX (1947). En este año, COUTEAUX identifica y describe el aparato subneural utilizando como método de tinción el verde jano. Este autor pensó que la estructura en empalizada que delimitaba la arborización terminal motora, representaba la superficie postsináptica de la U.N.M.. Su razonamiento fue más bien de tipo intuitivo ya que los métodos de resolución de la época no le permitían objetivar su hipótesis.

En realidad, ya en 1887, KÜHNE había observado el aparato subneural, pero creyó que la estructura en empalizada que veía era parte del axón terminal y la denominó "estroma" o "neuroplasma".

COUTEAUX fue el primero en identificar el aparato subneural como una zona modificada de la superficie de la fibra muscular en la zo-

na que corresponde precisamente a la U.N.M.. En efecto, para COUTEAUX el "aparato subneural" estaba conformado por pliegues o surcos donde yacían las arborizaciones nerviosas; la unión entre la terminal nerviosa motora y la fibra muscular sería de tipo epilemal.

Quedaba pues establecido, que la U.N.M. está formada por tres componentes principales:

- una rama nerviosa terminal, motora.
- cubierta de Henle y vaina de Schwann
- una zona de sarcoplasma modificado en la zona subyacente a la terminal nerviosa.

Se había logrado establecer las relaciones básicas pero aún quedaban muchas preguntas sin respuesta. Entre otras, quedaba todavía pendiente la demostración fehaciente de la existencia o no de una "separación" entre el elemento nervioso y el elemento muscular a nivel de la placa motora.

Con el advenimiento de la microscopía electrónica se demostró la existencia de un límite de separación entre el axoplasma y el sarcoplasma; PALADE (1954); ROBERTSON (1956); REGER (1958); ANDERSON y CEDERGREN (1959); de HARVEN y COERS (1959); BIRKS, HUXLEY y KATZ (1960) y COERS (1967).

Con la microscopía electrónica y los métodos histoquímicos para la colinesterasa, se confirmó, más allá de toda duda, la discontinuidad entre nervio y músculo. De esta forma quedaba superada la antigua disputa entre los que abogaban por terminaciones de tipo hipolemales y los que favorecían las terminaciones de tipo epilemales. Finalmente, la microscopía electrónica demostró que el aspecto en empalizada del aparato subneural era debido a un plegamiento profuso de la membrana sarcoplásmica.

ESTRUCTURA DE LA UNION NEUROMUSCULAR ESTUDIADA CON MICROSCOPIA ELECTRONICA

VAINA DE HENLE Y CUBIERTA DE SCHWANN

La fibra terminal motora pierde su vaina de mielina a nivel del último nodo de Ranvier y yace sobre surcos o depresiones en la superficie de la fibra muscular. Finas expansiones del citoplasma de la célula de Schwann cubren las terminales nerviosas; ROBERTSON (1956, 1960); REGER (1958); ZACKS y BLUMBERG (1961a); BROWN (1961) y LESTER (1977). Las proyecciones del citoplasma de la célula de Schwann se extienden a lo largo del axon y cubren la terminal nerviosa. Siempre se encuentra una hendidura de aproximadamente unos 500 Å entre el citoplasma de la célula de Schwann y la membrana de la fibra muscular.

Los elementos terminales de la vaina de Henle o "epitelio perineural" forman unas proyecciones celulares extremadamente finas situadas por fuera de las expansiones de la célula de Schwann. El "epitelio perineural" raramente llega a la región de la U.N.M.

Los elementos "perisinápticos", cubierta de Schwann y epitelio perineural, forman una especie de cubierta sobre las terminales nerviosas. El citoplasma de estos elementos perisinápticos no se inserta entre el axoplasma y el sarcoplasma. A este nivel, la membrana sarcoplásmica que subyace a las terminales, se diferencia para formar el aparato subneural.

ARBORIZACION TERMINAL

Con ayuda de la microscopía electrónica se ha podido ver que las terminaciones nerviosas motoras se encuentran situadas en una depresión poco profunda, forma de surco, sobre la superficie de la célula muscular. Las membranas respectivas de la terminación nerviosa

y de la célula muscular están separadas, unos 500 Å, por una hendidura llena de líquido. Esta hendidura recibe el nombre de "hendidura sináptica primaria".

Estructura del axon: el axoplasma está limitado por una membrana llamada AXOLEMA. En el axoplasma no son visibles los neurofilamentos que eran tan típicos de las tinciones clásicas con plata. Sin embargo, con fijaciones adecuadas, se han podido observar filamentos muy finos, de unos 50 Å aproximadamente.

A este nivel, todos los autores han observado gran riqueza de mitocondrias. El diámetro de las mismas oscila entre 0.25 micras y 0.5 micras y tienen una longitud de 1 micra.

DE ROBERTIS y BENNETT (1954, 1955) describen por primera vez las vesículas sinápticas a nivel de las terminales axónicas motoras. Estas vesículas tienen un diámetro de 300 Å aproximadamente.

Utilizando una técnica de doble fijación con glutaraldehido y osmio se ha demostrado que la membrana de las vesículas sinápticas está compuesta por unidades globulares.

Dentro de la terminal axónica, las diferentes partículas no están distribuidas al azar sino que lo hacen con un cierto orden. De esta forma se puede dividir la porción terminal del axon en dos compartimentos; (LESTER, 1977):

- una región mitocondrial, adyacente a la vaina de Schwann.
- una región de vesículas que se encuentran en unas zonas especializadas llamadas "zonas activas" y que se encuentran en la porción de la terminal axónica que "mira" hacia la membrana de la célula muscular precisamente hacia los llamados pliegues de unión.

La membrana de las vesículas está compuesta de unidades globulares de 40-45 Å y por unidades globulares "ovales" de 60-90 Å. Las unidades globulares están unidas entre sí por gránulos osmiofílicos. La superficie de la membrana de las vesículas aparece como un mosaico compuesto de estructuras poliédricas hexagonales.

DE ROBERTIS y BENNETT (1955) y PALAY (1956) postulan que las vesículas sinápticas representan el sustrato morfológico del almacenamiento del transmisor químico.

APARATO SUBNEURAL

En la membrana de la fibra muscular, precisamente en la zona que subyace a las terminales motoras, se encuentran unas invaginaciones profundas, llamadas pliegues de unión. Estos pliegues de unión limitan entre sí unas hendiduras, las hendiduras sinápticas secundarias, que desembocan en la hendidura sináptica primaria.

Todo este complejo sistema de diferenciación de la membrana de la célula muscular es el aparato subneural.

Las hendiduras sinápticas primarias y secundarias están rellenas de un material granular de baja densidad electrónica. Para COERS (1967) se trata de un material basal que supone es el resultado de la fusión de las membranas basales axoplásmicas y sarcoplásmicas. ZACKS, SHEFF y SAITO (1973) denominan a este material amorfo y homogéneo que rellena las hendiduras sinápticas, LAMINA EXTERNA.

No se aprecia conexión entre el aparato subneural y las miofibrillas. Las hendiduras sinápticas secundarias quedan separadas de las miofibrillas por una capa de sarcoplasma que contiene gran número de mitocondrias.

Dentro de las laminillas de sarcoplasma que se situan entre las

hendiduras sinápticas secundarias se aprecian vacuolas. Estas vacuolas son de mayor tamaño que las vesículas sinápticas y probablemente son parte del retículo endoplasmático del músculo (de HARVEN y COERS, 1959).

El aparato subneural se puede visualizar con los métodos histoquímicos para la colinesterasa ya que a este nivel hay una elevada concentración de este enzima. A nivel de la U.N.M., la función de la colinesterasa consiste en hidrolizar la acetilcolina liberada desde la terminal motora.

Los métodos histoquímicos se han convertido en el procedimiento de elección para estudiar la morfología del aparato subneural. Entre otros, los más utilizados son los métodos de la tiocolina y el método de Karnovsky. Con estas técnicas se ha demostrado que la actividad colinesterásica se localiza preferentemente a nivel de las hendiduras sinápticas primarias y secundarias. A nivel de las terminales nerviosas motoras no se ha evidenciado actividad colinesterásica.

Los primeros resultados indicaron que la actividad colinesterásica era mayor en las proximidades de la membrana sarcoplásmica (LEHRER y ORNSTEIN, 1959) y BARRNETT1962). De esta forma se generalizó la idea de que la colinesterasa estaba en relación con la membrana postsináptica. Sin embargo, HALL y KELLY (1971) demostraron que un leve tratamiento proteásico del músculo esquelético intacto,liberaba colinesterasa activa al medio sin daño aparente de la membrana sarcoplásmica. De aquí surgió la posibilidad que la colinesterasa podría estar asociada con la lámina basal (lámina externa de Zacks, membrana basal de Robertson) que ocupa las hendiduras sinápticas primarias y secundarias. Esta idea recibió apoyo al conocerse que una subunidad de la colinesterasa de los órganos eléctricos de "las rayas" tiene varias propiedades en común con el colá

geno, proteína que es uno de los principales componentes de las láminas basales.

Más recientemente, en 1978, M^{C} MAHAN, SANES y MARSHALL, han demostrado que la actividad colinesterásica está en relación con la lámina basal de la U.N.M.. Su técnica ha consistido en quitar los componentes celulares de la U.N.M. "in vivo". Para ello, han denervado el músculo pectoral cutáneo de la rana cortando una porción relativamente amplia del nervio. De esta forma, las expansiones citoplasmáticas de las células de Schwann se retraen del área sináptica. Posteriormente, los músculos son dañados mecánicamente ocasionando, de esta forma, la ruptura de las fibras musculares. Los animales de experimentación son irradiados con rayos Roentgen para prevenir la regeneración de los tejidos. El objetivo de esta técnica es el de aislar la lámina basal de los elementos que la rodean. Una vez logrado ésto, se emplean los métodos histoquímicos para la colinesterasa a nivel de la lámina basal aislada. Los resultados han demostrado que utilizando los métodos histoquímicos para la colinesterasa aparecen bandas teñidas que se corresponden en tamaño, forma y disposición a las arborizaciones terminales que aparecen esbozadas por el método de la colinesterasa en el músculo intacto.

En la preparación de M^{C} MAHAN, SANES y MARSHALL, se puede, además visualizar una subestructura que corresponde a los pliegues de unión.

En resumen, quedaba claro que por lo menos una parte de la actividad colinesterásica en la U.N.M. de la rana está contenida en, o ligada de alguna forma, a la lamina basal de las hendiduras sinápticas primarias y secundarias.

También se observó que la intensidad de la tinción se reducía cuando se aplicaba BW 284C51, un inhibidor específico de la acetilcolinesterasa. Por tanto, la colinesterasa a este nivel es acetilcolinesterasa.

PARTICULARIDADES MORFOLOGICAS DE LA U.N.M. DEL MUSCULO ESQUELETICO DE LA RANA

Los elementos fundamentales y las relaciones que éstos guardan entre sí son, en líneas generales, iguales en las diversas U.N.M. La característica diferencial distintiva a nivel del músculo esquelético de la rana es la carencia de una arborización terminal propiamente dicha. A este nivel, las terminales motoras amielínicas forman los llamados "endbüschel" o "fascículos terminales", que son terminaciones alargadas que corren paralelas al eje mayor de la fibra muscular. Estas terminaciones alargadas pueden medir hasta varios cientos de micras y yacen en surcos poco profundos sobre la superficie de la célula muscular.

En la U.N.M. de los músculos esqueléticos de la rana, los pliegues de unión son menos profusos que en otras uniones neuromusculares, como por ejemplo en la de los músculos esqueléticos de los mamíferos. No obstante, los pliegues de unión existen y guardan las mismas relaciones fundamentales de todas las uniones neuromusculares.

El espaciamiento longitudinal de los pliegues de unión es regular. Hay, aproximadamente, de tres a cuatro pliegues por sarcómero y el ancho de los pliegues de unión varía entre 500 y 1000 Å.

En la U.N.M. de la rana las hendiduras sinápticas primarias y secundarias también se encuentran llenas de lámina basal.

M^{C} MAHAN, SPITZER y PEPER (1972) visualizan las terminales motoras amielínicas del músculo esquelético de la rana "in vivo". Lo hacen en músculos aislados y sin teñir. Para ello utilizan el sistema óptico Zeiss Nomarski.

Los resultados demuestran que las finas ramas amielínicas tienen

un diámetro aproximado de 1-3 micras y que corren longitudinalmente a lo largo de la fibra muscular por una distancia de hasta 300 Micras.

Con la técnica de Nomarski los bordes de las terminales amielínicas aparecen como formando crestas o cordoncillos.

Para confirmar que la imagen obtenida con la técnica de Nomarski corresponde a una U.N.M. se utilizan técnicas y métodos complementarios que mejoran la visualización de determinados elementos. Así se emplea en la misma preparación el método de Karnovsky para la colinesterasa y los terminales axónicos se tiñen con osmio. Además, para visualizar la célula de Schwann y sus expansiones citoplasmáticas se les inyecta electroforéticamente un colorante fluorescente, el amarillo procion.

Todos los métodos y técnicas complementarias anteriormente citadas confirman la imagen obtenida con el sistema Zeiss Nomarski.

La ulterior observación de la misma preparación con el microscopio electrónico demuestra que las expansiones de la célula de Schwann forman indentaciones en las terminales nerviosas, de forma tal que éstas aparecen, periódicamente, con varicosidades en su superficie. Precisamente a nivel de estas varicosidades se objetiva gran densidad de vesículas sinápticas. Algunas de estas vesículas se concentran en zonas especiales, llamadas zonas activas, que se sitúan justamente enfrente de los pliegues de unión, (LESTER 1977).

2)-PATRON DE INERVACION DEL MUSCULO SARTORIO DE LA RANA

El músculo sartorio de la rana es un músculo muy delgado de fibras largas y paralelas. El nervio motor del sartorio se divide en dos ramas justo antes de entrar en el músculo. La entrada del nervio se verifica en el tercio medio o tercio inferior del músculo y las ramas principales son:

- la rama pélvica
- la rama tibial

Los extremos del músculo están desprovistos de inervación motora en una superficie de varios milímetros.

Cada fibra muscular recibe por lo menos una terminal motora ya que en su ausencia la fibra degenera (TIEGS,1953). Por otra parte, las fibras musculares son más numerosas que las fibras nerviosas. LUFF y PROSKE (1976) encuentran un promedio de 620 fibras musculares en el sartorio de la rana Litoria Aurea y un promedio de 12 axones como contingente nervioso motor para el mismo músculo. Por tanto, las fibras nerviosas se ramifican copiosamente y esto se expresa en el concepto de unidad motora. De esta forma, el músculo y su nervio pueden conceptuarse como un ensamblaje aditivo de unidades motoras; entendiendo por unidad motora una fibra nerviosa y las fibras musculares que inerva.

Un aspecto distintivo de la organización de las unidades motoras del músculo sartorio de la rana es la presencia de varias terminales motoras -varias placas motoras- en la mayoría de las fibras musculares.

El estudio de la inervación múltiple del músculo sartorio de la rana comienza con los trabajos de SANDMANN, quien en 1885 comprueba

histologicamente la existencia de una inervación múltiple en las fibras musculares del sartorio.

SANDMANN, estudió la distribución de los nervios motores en los músculos estriados de la rana aislando las fibras musculares y conservando las terminaciones nerviosas. Utilizó el método del ácido sulfúrico para aislar las fibras musculares y como método de tinción para visualizar las placas motoras empleó el cloruro áurico.

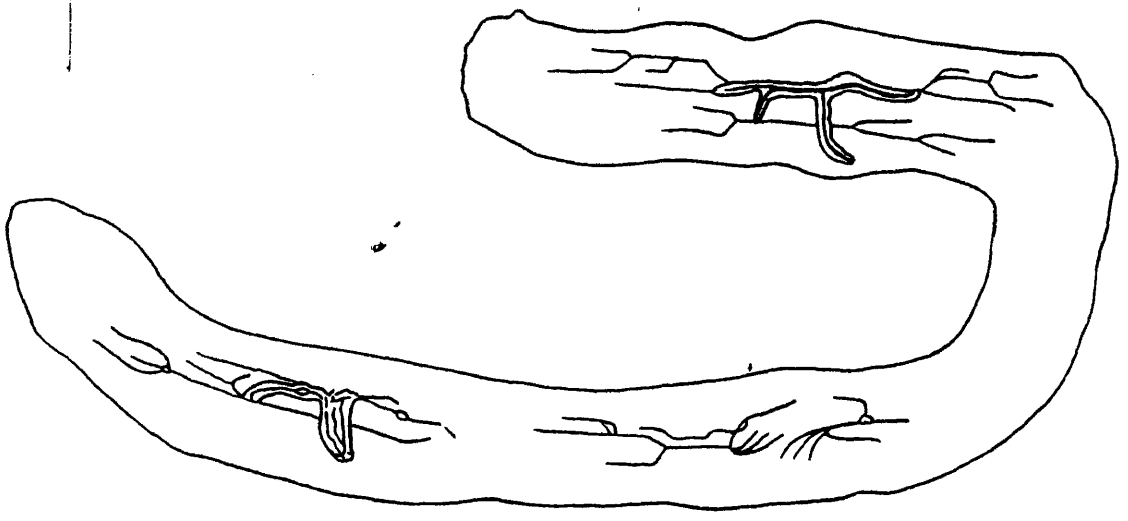
Usando estos métodos, SANDMANN estudió la distribución de las terminaciones nerviosas motoras en los músculos esqueléticos de los mamíferos y en los músculos esqueléticos de la rana.

SANDMANN comprobó, histológicamente, que en el sartorio de la rana casi todas las fibras tenían dos o tres placas motoras y encontró algunas que tenían hasta seis placas motoras. Según descripción hecha por él mismo, estas placas presentaban diversas formas, algunas "muy poco desarrolladas y otras muy grandes y como en empalizada". Muy raramente aparecían fibras con una sola terminación nerviosa motora.

La evidencia neurofisiológica de la inervación múltiple de las fibras musculares del sartorio de la rana fue aportada por KATZ y KUFFLER en 1941. Estos autores llevaron a cabo sus trabajos experimentales en el músculo sartorio de la rana Hyla Aurea y observaron que cuando estimulaban el nervio, antes de su división en rama pélvica y tibial, registraban a nivel del extremo pélvico del músculo una respuesta en forma de espiga simple en lugar de un potencial de acción prolongado y complejo como cabría esperar.

En efecto, considerando que:

- el músculo sartorio de la rana consiste fundamentalmente de fibras largas que se extienden de extremo a extremo del músculo.



INERVACION MULTIPLE DE LAS FIBRAS MUSCULARES DEL SARTORIO DE LA RANA

tomado de: Ueber die vertheilung der motorischen nerven-endapparate in den quergestreiften muskeln der wirbelthiere (Sandmann 1885)

- las terminaciones motoras se encuentran dispersas sobre una superficie de dos centímetros cuadrados y
- los impulsos musculares se propagan a una velocidad de dos metros por segundo.

En condiciones fisiológicas se esperaría obtener una respuesta muy compleja, formada por ondas individuales originadas en diversas zonas de inervación motora y que llegarían sucesivamente a los extremos pélvicos del músculo. Sin embargo, la respuesta obtenida era la de una espiga simple con una latencia de unos 2 msec., una amplitud de 50-60mV y con una duración de 4-5 msec.

Se obtenía una respuesta similar cuando se registraba a nivel del extremo tibial del músculo.

En estas condiciones experimentales se observó que la forma del potencial de acción podía variar de un músculo a otro y de una zona a otra en la misma preparación, pero la ausencia de potenciales de acción retardados era constante. Parecía lógico suponer que una posible explicación para este fenómeno podría ser la presencia, en la mayoría de las fibras musculares, de múltiples terminaciones nerviosas motoras concentradas en "zonas neurales" determinadas. De esta forma, los impulsos generados en zonas distales al electrodo de registro colisionarían durante su conducción con aquellos procedentes de las zonas proximales y por tanto no podían ser registrados.

Esta hipótesis fue demostrada experimentalmente por KATZ y KUFFLER (1941). Para ello, seccionaron la rama pélvica del nervio motor del sartorio y repitiendo las condiciones experimentales previas, observaron que al estimular el nervio se registraba un potencial retardado, habiendo desaparecido el potencial de acción previamente registrado. Este potencial retardado se registraba en el ex-

tremo pélvico y presentaba una latencia de 7 msec.

Quedaba claro que los impulsos generados en la zona tibial del músculo, inervada por la rama nerviosa intacta y, que previamente habían sido bloqueados por colisión con los impulsos procedentes de la zona pélvica del músculo, eran ahora capaces de propagarse sin obstáculo hacia el extremo pélvico del sartorio.

Los potenciales retardados alcanzan una amplitud de 20-35 mV. Esto equivale a un 50-70% de la amplitud del potencial de acción temprano. El efecto puede ser atribuído a un aumento de la dispersión temporal.

La diferencia entre las latencias del potencial registrado antes y después de la sección de la rama pélvica del nervio, oscila entre 5 y 7 msec.. Teniendo en cuenta que los impulsos musculares se propagan con una velocidad de conducción de 2 a 2,5 m/seg., parece claro que muchas de las fibras musculares se encuentran inervadas, por ambas ramas nerviosas, en dos zonas discretas separadas por una distancia de 12 a 15 mm. aproximadamente.

Los potenciales retardados aparecen siempre que la colisión de los impulsos es impedida o por lo menos es reducida. Esto puede lograrse de varias maneras. La primera forma es seccionando una de las ramas principales del nervio del sartorio. Otros procedimientos experimentales dirigidos al mismo fin son:

- estimulación del nervio motor con bajas intensidades de estímulo; en estas condiciones la aparición de un potencial retardado depende principalmente de la presencia de fibras musculares que estén inervadas en dos zonas distintas por axones diferentes y de distinta excitabilidad.
- curarización parcial del músculo; de esta forma se consigue un bloqueo neuromuscular incompleto de forma tal que en algu

nas fibras musculares una U.N.M. se bloquea mientras la otra sigue funcionando. El resultado es que muchos impulsos pueden propagarse de un extremo a otro de la fibra sin colisionar.

Estos experimentos demuestranla existencia de una inervación múltiple de las fibras musculares del sartorio. Faltaba conocer el número de terminaciones motoras en cada fibra y la posición exacta de esta inervación en las fibras. KATZ y KUFFLER (1941), abordaron este problema experimentalmente. Para ello obtuvieron registros eléctricos del sartorio, estimulando el nervio, y variando la posición del electrodo de tierra con respecto al electrodo de registro que se mantenía en el extremo pélvico del músculo en una posición fija. En estas condiciones el retardo en alcanzar el punto máximo del potencial variaba con la distancia a que se encontraba el electrodo de tierra con respecto al electrodo de registro. La posición del valor máximo de potencial depende no tanto de la presencia de terminales nerviosas diseminadas como de la llegada de un impulso sincrónico a determinada zona del músculo. Los resultados obtenidos demostraron que en la mayoría de los músculos existen dos zonas de inervación principales, cerca de la entrada del nervio, y se puede concluir que mientras algunas terminales motoras están distribuidas a lo largo de las fibras de manera dispersa, hay sin embargo una concentración de "zonas neurales" en lugares discretos del músculo.

El cuadro no es siempre tan definido y en algunos músculos aparecen varias "zonas" o "centros" de inervación.

Estas observaciones han sido confirmadas con los registros intracelulares con microelectrodos de potenciales de placa motora. En efecto, los E.P.P. sólo se registran en zonas "neurales" restringidas y discretas.

Por otra parte, debido a que la mayoría de las fibras musculares del ~~sartorio~~ recorren el músculo en toda su longitud (SANDMANN, 1885), se puede concluir que prácticamente todas las fibras del músculo poseen una inervación múltiple.

Establecida la existencia de una inervación múltiple de las fibras del sartorio quedaba finalmente, por estudiar el origen de dicha inervación. LUFF y PROSKE (1976), han estudiado este aspecto de la inervación del sartorio en la rana Hyla Aurea. Con este fin distinguen:

- La inervación polineuronal; la inervación múltiple motora de una fibra muscular proviene de diferentes axones.
- la inervación multiterminal; la fibra muscular recibe su inervación múltiple de ramas procedentes de un único axon.

Los autores citados comprueban experimentalmente la existencia de ambos tipos de inervación múltiple en el sartorio de la rana. Para ello, aislan unidades motoras del músculo disecando el nervio motor en filamentos hasta que cada filamento corresponda funcionalmente a un axon. Una vez realizado esto, el procedimiento de elección para el estudio de la inervación polineuronal consiste en comparar las tensiones tetánicas desarrolladas por un par de unidades motoras, cuando cada unidad es estimulada independientemente y cuando ambas son estimuladas simultáneamente. Cualquier diferencia entre la tensión efectiva desarrollada durante la estimulación combinada de ambas unidades motoras y la tensión esperada por cálculo previo de suma aritmética de las tensiones desarrolladas por cada unidad motora individualmente, indicaría la existencia de imbricación en la inervación de las dos unidades motoras. En efecto, se comprobó que la tensión desarrollada por estimulación simultánea de ambas unidades motoras era menor que la suma de las tensiones

desarrolladas por cada unidad motora separadamente. De esta forma, se evidenció una imbricación en la inervación de las unidades motoras y se puso de manifiesto experimentalmente la existencia de una inervación polineuronal en el músculo sartorio de la rana.

La inervación múltiple de tipo multiterminal fue puesta de manifiesto por LUFF y PROSKE (1976). Para ello compararon la tensión desarrollada por el músculo al estimular el nervio motor intacto con la tensión producida al estimular el cabo seccionado de una de las ramas del nervio. En este último caso, la tensión se expresaba en tanto por ciento referido a la tensión desarrollada cuando se estimulaba el nervio intacto. Los resultados obtenidos en tres músculos fueron de 62%, 90% y 95% con respecto a la tensión desarrollada estimulando el nervio sin seccionar. Se puede concluir, que la mayoría de los axones se ramifican. En general, la ramificación acaece cerca del punto donde el nervio se bifurca en dos ramas principales.

Quedaba demostrada la presencia de inervación polineuronal y multiterminal en el músculo sartorio de la rana. Ambos tipos de inervación son expresión de la existencia de una inervación múltiple a nivel de las fibras musculares del sartorio de la rana.

3)- DISTRIBUCION TOPOGRAFICA DE LAS PLACAS MOTORAS EN EL MUSCULO SARTORIO DE LA RANA

CARPENTER (1974) utiliza el método de Karnovsky para la colinesterasa con el fin de realizar un estudio sobre la distribución de las placas motoras en la superficie interior del músculo sartorio de la rana.

El nervio motor del sartorio penetra en el músculo por su borde medial a nivel de su tercio medio o tercio inferior. Antes de penetrar, la rama principal se divide en una rama ascendente, rama pélvica, y en una rama descendente, tibial.

La rama descendente sigue un curso oblicuo y se dirige hacia el borde lateral o externo del músculo. Esta rama desaparece de la superficie interior cerca de la región central del músculo. En su trayecto da colaterales que invariablemente terminan cerca del borde externo del sartorio.

La rama ascendente principal atraviesa el músculo siguiendo una dirección oblicua y dà múltiples colaterales antes de llegar a la zona central del músculo. El patrón de distribuciones de las ramificaciones de la rama ascendente es el siguiente:

- una rama que se dirige hacia el borde medial. El origen de esta ramificación se encuentra muy próximo al lugar de entrada del nervio principal.
- una rama que se dirige transversalmente hacia el borde externo del músculo, hundiéndose entre las fibras musculares antes de alcanzar este borde.
- dos ramas ascendentes de curso paralelo que desaparecen de la superficie del músculo para volver a aparecer en zonas más proximales, cerca del extremo pélvico del músculo. Una de estas

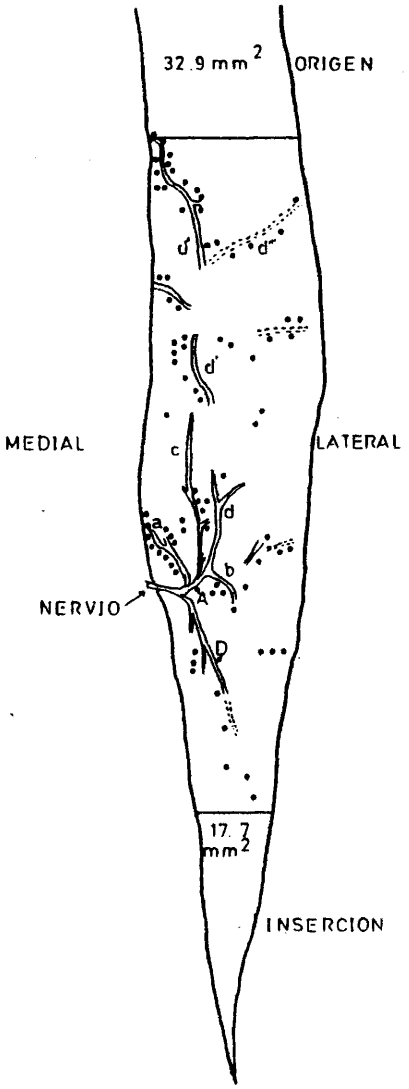
se dirige hacia el borde medial del sartorio y la otra se dirige hacia zonas más proximales que la anterior, bifurcándose finalmente en una rama medial y en otra rama externa, lateral.

Las placas motoras, visualizadas con el método de Karnovsky, se distribuyen cerca de las áreas que corresponden al curso de las fibras nerviosas mielínicas antes mencionadas. Una característica distintiva de la distribución es su predominante aparición en "grupos". Estos grupos corresponden a las "zonas neurales" funcionales descritas por KATZ y KUFFLER (1941). Estas agrupaciones de placas motoras se hacen más evidentes en las proximidades de las ramas nerviosas de mayor diámetro.

Se constata, también la presencia de placas motoras aisladas y distribuidas de manera dispersa pero asociadas con algunas de las ramas colaterales de las ramas nerviosas principales. Sin embargo, en ocasiones se visualizan placas motoras aisladas en regiones donde no se había podido objetivar la presencia de ramas nerviosas en su proximidad. Una posible explicación para este hecho es que se trataría de terminaciones nerviosas motoras de ramas que previamente se habían "hundido" entre las fibras musculares recorriendo un trayecto por debajo de la superficie interior del músculo sartorio. Estas ramas reaparecerían nuevamente, después de un trayecto variable y formarían una terminación nerviosa motora a nivel de una fibra muscular de la superficie interna del sartorio.

La densidad de placas motoras es mayor en la mitad medial del músculo. Esto puede ser debido a que esta zona muscular posee una inervación más rica que la zona lateral del sartorio.

En los extremos proximales y distales del músculo existen zonas libres de placas motoras. En efecto, en un área de varios milímetros no se constata la presencia de placas motoras ni cerca del origen del músculo ni en las proximidades de su inserción.



- las ramas nerviosas visibles por debajo de la superficie muscular se indican con líneas punteadas.
- las ramas principales ascendentes y descendentes se indican con las letras D y A respectivamente.
- las ramas colaterales de A, se representan como a, b, c y d.
- los puntos negros indican la presencia de placas motoras.
- las áreas indicadas en el origen y en la inserción del músculo, son las áreas que carecen de placas motoras.
- la superficie muscular total es de 214.1 mm^2

DIBUJO A ESCALA DE LA SUPERFICIE INTERIOR DEL MUSCULO SARTORIO DERECHO DE LA RANA. (Tomado de: Distribution and configuration of surface myoneural junctions in the frog sartorius muscle. D.B. Carpenter 1974.A.J. Anat. p.571

B)- BASES DE LA EXCITABILIDAD

1)-El funcionamiento del sistema nervioso se basa en la excitabilidad. Entendemos por excitabilidad la capacidad que tienen las células de responder de manera coordinada y adecuada a estímulos del medio externo.

En última instancia, la excitabilidad radica en la posibilidad que tienen las células de: (KATZ, 1966)

- almacenar energía en forma de energía eléctrica
- ceder esta energía parcialmente y de forma controlada.

Para comprender cómo y por qué las células almacenan energía eléctrica es condición necesaria conocer la composición iónica del líquido intracelular y la composición iónica del líquido extracelular.

La mayor parte del medio intracelular está formado por agua que se encuentra en equilibrio osmótico con los líquidos circundantes. Sin embargo, la composición iónica del medio intracelular difiere notablemente de la composición iónica del medio interno. Es éste un rasgo común de las células excitables.

En la fibra muscular del sartorio de la rana nos encontramos con la siguiente distribución (KATZ 1966):

	LEC mM/l	LIC mM/l
sodio	120	9.2
potasio	2.5	140
cloro	120	3-4
		Aniones

Sentado este rasgo común de todos los tejidos excitables, podemos abordar el estudio del potencial de membrana.

BERNSTEIN (1902), propone la primera hipótesis satisfactoria pero no concluyente, para explicar el origen del potencial de membra

na. BERNSTEIN conocía la desigual composición iónica del LEC y LIC. Destacó para su hipótesis la elevada concentración de potasio en el interior de la célula y la presencia en el interior de la misma de aniones, para los cuales la célula no es permeable. Asimismo, asumió que la membrana celular en reposo era impermeable al sodio.

Sobre estas premisas, BERNSTEIN propuso que la diferencia de potencial existente entre el interior y el exterior de la célula era creada por una distribución desigual del ión potasio entre el interior y el exterior de la misma. De forma que el potencial de membrana podía ser expresado por la ecuación de NERNST, según la cual se desarrolla una diferencia de potencial a través de una membrana que es permeable a un ión cuando las concentraciones de ese ión son distintas a ambos lados de la membrana:

$$E = RT/F \ln Ao/Ai$$

Ao= concentración del ión en el compartimento "o"
Ai= concentración del ión en el compartimento "i"

La derivación original de la ecuación de Nernst, se basa en principios termodinámicos que determinan la condición de equilibrio electroquímico, entre el trabajo eléctrico requerido para desplazar iones a través de un determinado límite en una dirección, y el trabajo osmótico necesario para desplazar la misma cantidad de iones en una dirección opuesta:

- el trabajo eléctrico realizado, por mol, para llevar iones desde un potencial Vo a un potencial Vi, viene dado por:

$$W = z F (Vi - Vo)$$

W= trabajo
(Vi-Vo)= diferencia de potencial
z: valencia (negativa o positiva)
F: constante de FARADAY (Coulombios por mol)

- el trabajo osmótico requerido para desplazar un mol de un determinado ión desde una concentración Ao a una concentración Ai, diez veces mayor, viene determinado por:

$$W = \int_{Vo}^{Vi} P\,dV$$

ya que de acuerdo a la teoría cinética ésto es estrictamente análogo a la compresión de un gas.

P: presión

V: volumen

- sabemos que: $P.V = RT$

R: constante de los gases

T: temperatura absoluta

Por tanto: $P = \frac{RT}{V}$

y:

$$W = -\int_{Vo}^{Vi} P\,dV = -\int_{Vo}^{Vi} RT\,dV/V = RT\,\ln(Vo - Vi) = RT\,\ln\,Vo/Vi$$

de donde:

$$W_{osmótico} = -RT\,\ln\,Ao/Ai$$

Ao y Ai se refieren a las concentraciones iónicas fuera y dentro de la célula respectivamente.

La condición de equilibrio viene dada por la igualdad entre el trabajo osmótico y el trabajo eléctrico:

$$zF(Vi - Vo) = RT\,\ln\,Ao/Ai$$

$$(Vi - Vo) = RT/zF\,\ln\,Ao/Ai$$

que es la ecuación de Nernst.

Esta ecuación expresa la condición de equilibrio donde para una determinada diferencia de potencial, el flujo neto del ión determi

nado es cero.

Según esta ecuación se desarrollará una diferencia de potencial a través de una membrana que es permeable a un ión, cuando las concentraciones de ese ión son distintas a ambos lados de la membrana.

- para el potasio:

$$Ek = RT/zF \ln Ko/Ki$$

Ek: potencial de membrana donde no hay flujo neto de potasio de un lado a otro de la membrana; el sistema está en equilibrio.

a 20°C $Ek = 58 \ln Ko/Ki$

Ek es negativo cuando Ko y Ki caen dentro de los márgenes fisiológicos.

BERNSTEIN, no pudo comprobar su hipótesis pues las condiciones técnicas requeridas para ello eran deficitarias. Se obtuvo no obstante, una aproximación experimental con los "potenciales de lesión" y, dentro de ciertos límites, BERNSTEIN encontró un ajuste entre Ek y el potencial de membrana, y concluyó afirmando que el potencial de membrana representa un potencial de difusión para el potasio.

HODGKIN y HOROWICZ (1959), intentaron comprobar experimentalmente la hipótesis de BERNSTEIN.

El diseño experimental de HODGKIN y HOROWICZ, consistía en hacer variar las concentraciones externas de potasio en el Ringer que bañaba la preparación de fibras musculares. Para eliminar cualquier posible interferencia del cloro, éste era sustituído por soluciones sulfatadas. En estas condiciones se procede a medir el potencial

de membrana correspondiente a cada concentración de Ko.

Según la hipótesis de BERNSTEIN, en esta situación experimental, se obtendría una línea recta con una pendiente de 58 mv; cuando Ko es variado por un factor de 10, el potencial de membrana debería variar en 58 mv. a 20ºC. Sin embargo, HODGKIN y HOROWICZ, observaron que:

- existe un ajuste teórico-experimental para concentraciones de potasio superiores a 10 mM
- para concentraciones de potasio inferiores a 10 mM, la línea experimental se desvía de la línea teórica.

Era evidente, que el potencial de membrana no era un potencial de difusión para el potasio. Se pasó entonces a involucrar otros iones en la génesis del mismo; fundamentalmente, el sodio. En efecto, se sabía por estudios con trazadores marcados que la célula en reposo no era impermeable del todo al sodio (LEVI, USSING, 1948); (HARRIS, BURN, 1949); (KEYNES, 1954). Era plausible suponer que este factor contribuyese a generar el potencial de membrana, más aún, teniendo presente que el gradiente electroquímico es favorable a la entrada de sodio al interior de la célula.

Los experimentos con trazadores marcados, mostraron también que la entrada de sodio a la célula en reposo, es de muy escasa cuantía. Ello es debido, a que en estas condiciones la PERMEABILIDAD para el sodio es muy baja.

De esto se desprende, que en la génesis del potencial de membrana deben considerarse dos factores más:

- el influjo de sodio a la célula en reposo y
- el factor "permeabilidad" de la membrana para los distintos iones.

Teniendo en cuenta estos factores, GOLDMAN (1943) y HODGKIN y KATZ (1949) desarrollaron la teoría de campo constante, que supone una aproximación muy útil al problema que estamos considerando.

La teoría de campo constante, básicamente asume que los iones se desplazan bajo la influencia de campos eléctricos y gradientes de concentración; que las concentraciones iónicas en los bordes de la membrana, son proporcionales a aquellas de las soluciones acuosas en contacto con la misma, y que el gradiente eléctrico a través de la membrana es constante. Sobre estas premisas, es posible demostrar que -cuando no hay flujo de corriente a través de la membrana- el potencial de membrana viene dado por:

$$Vm = RT/zF \ln \frac{Pk(K)_o + PNa(Na)_o}{Pk(K)i + PNa(Na)i}$$

Pk, PNa: coeficientes de permeabilidad

$$Vm = RT/zF \ln \frac{PK/PK(K)_o + PNa/PK(Na)_o}{PK/PK(K)i + PNa/PK(Na)i}$$

$$Vm = RT/zF \ln \frac{(K)_o + PNa/PK(Na)_o}{(K)i + PNa/PK(Na)i}$$

$PNa/PK = \alpha = 0.01$

$PK \gg PNa$ en la celula en reposo

$$Vm = RT/zF \ln \frac{(K)_o + \alpha (Na)_o}{(K)i + \alpha (Na)i}$$

El potencial de membrana teórico calculado a partir de esta ecuación, se aproxima con un error de solamente $\pm$ 1mv al potencial de membrana -de la fibra muscular- medido experimentalmente.

Papel del cloro en la génesis del potencial de membrana de la fibra muscular:

En las células musculares, el cloro se distribuye pasivamente; su distribución no interviene en la génesis del potencial de membrana, sino que depende de él (BOYLE, CONWAY, 1941),(HODGKIN, 1958), (CONWAY, 1957).

Papel de la bomba de sodio:

Mantiene el potencial de membrana; no lo crea. Evita que el potencial de membrana disminuya, debido a la entrada constante de sodio. El eflujo se hace contra un gradiente electroquímico. Se trata de un proceso activo (HODGKIN, KEYNES 1955a).

Podemos concluir afirmando, que los factores que básicamente intervienen en la génesis del potencial de membrana son:

- los gradientes químicos y eléctricos que actuan sobre determinados iones y
- la permeabilidad selectiva de la membrana.

En última instancia, la excitabilidad está basada en la posibilidad de cambiar las permeabilidades para el sodio, potasio y en ciertos sistemas para el cloro.

2) PROPIEDADES PASIVAS DE LA MEMBRANA

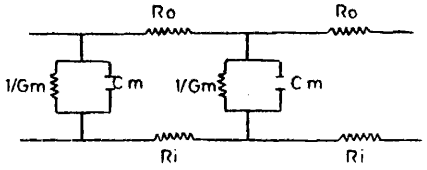
La célula muscular puede ser concebida como un cable conductor uniforme y de longitud infinita.

Este postulado básico permite aplicar la teoría de cable de HODGKIN y RUSHTON a la fibra muscular.

Los postulados fundamentales de la teoría de cable son (HODGKIN, RUSHTON, 1946):

- se considera la célula como un cilindro de longitud infinita, con un medio interno conductor que ofrece cierta resistencia al flujo de corriente.
- la membrana celular se concibe compuesta por una capacidad y una resistencia en paralelo por unidad de área. La membrana, ofrece una resistencia eléctrica alta al flujo de corriente. Es de destacar que la membrana se comporta como un aislante imperfecto.
- el medio interno (citoplasma), y el medio externo (LEC) se comportan como resistencias ónmicas puras, no dependientes de voltaje, ni tiempo.

Sobre estas bases se puede construir un modelo eléctrico de membrana:



Este modelo es una simplificación del problema ya que:

- la membrana es en realidad una estructura contínua y no una

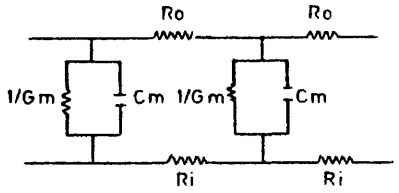
serie discontínua de elementos y

- el potencial de membrana no se representa en este modelo con la batería correspondiente. En la teoría de cable, el potencial de membrana se ignora.

3) CONCEPTOS Y FORMULACIONES BASICAS DE LA TEORIA DE CABLE

a) Resistencia input

Resistencia input es la resistencia efectiva entre el interior el exterior del cable. El valor de esta resistencia será igual en cualquier punto del cable.



Gm= gmΔx

Cm= cmΔx

Ri= riΔx

Ro= roΔx

Rm= rm/Δx

gm, cm, ri, ro: conductancia, capacidad y resistencia, dentro y fuera por unidad de longitud de cable.

rm: resistencia de la membrana por unidad de longitud.

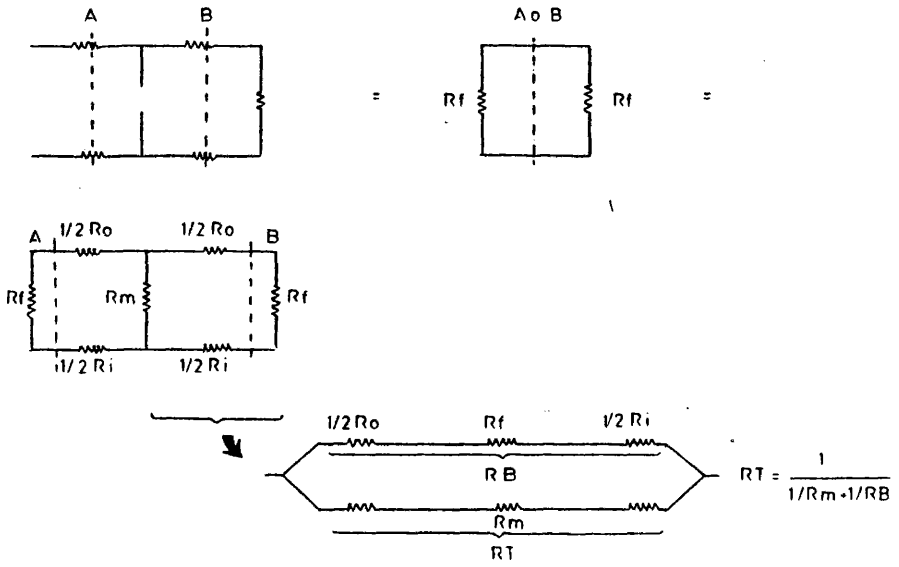
Si a este sistema se le aplica un pulso de corriente entre el interior y el exterior, cuando dV/dt sea igual a cero, se puede ignorar el efecto que tendría la capacidad de la membrana en la respuesta del sistema.

Por otra parte, si se supone que la longitud del cable es infinita, la respuesta a la aplicación del pulso de corriente será independiente del lugar donde se aplica dicho pulso.

La resistencia efectiva se puede considerar compuesta de dos partes: una a cada lado del lugar donde se aplica la corriente.

Se llama Rf a la resistencia efectiva a cada lado del lugar donde se aplica la corriente, y la resistencia input será igual a 1/2 Rf.

Circuito equivalente al modelo eléctrico de membrana, prescindiendo de Cm (dV/dt=0) (HUBBARD, LLINAS, QUASTEL, 1969)



Este circuito puede escindirse por el plano A o por el plano B. A cada lado del plano de escisión, la resistencia será igual a Rf.

Por tanto:

$$Rf = 1/2\,Ro + 1/2\,Ri + \frac{1}{1/Rm + \dfrac{1}{1/2\,Ro + Rf + 1/2\,Ri}}$$

$$Rf = 1/2\,(Ro + Ri) + \frac{1}{\dfrac{Rf + 1/2\,Ro + 1/2\,Ri + Rm}{Rm\,(Rf + 1/2\,Ro + 1/2\,Ri)}}$$

$$Rf = 1/2\,(Ro + Ri) + \frac{Rm\,(Rf + 1/2\,Ro + 1/2\,Ri)}{Rm + Rf + 1/2\,(Ro + Ri)}$$

$$Rf\,(Rm + Rf + 1/2\,(Ro + Ri)) = 1/2\,(Ro + Ri)\left[Rm + Rf + 1/2\,(Ro + Ri)\right] + Rm\,(Rf + 1/2\,Ro + 1/2\,Ri)$$

$$= 1/2\,RoRm + 1/2\,RiRm + 1/2\,RoRf + 1/2\,RiRf + 1/4\,(Ro + Ri)^2 +$$

$$+ RmRf + 1/2\,RmRo + 1/2\,RmRi$$

$$RmRf + Rf^2 + 1/2\,Rf\,(RoRi) = 1/2\,Rf\,(Ro + Ri + 2Rm) + Rm\,(Ro + Ri) + 1/4\,(Ro + Ri)^2$$

$$Rf^2 = Rm\,(Ro + Ri) + 1/4\,(Ro + Ri)^2$$

$$Rf^2 = rm/\Delta x\;(ro + ri)\,\Delta x + 1/4\,(ro + ri)^2\,\Delta x^2$$

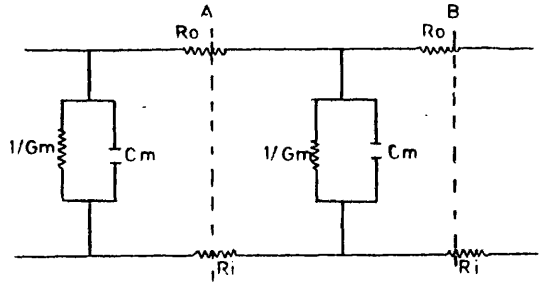
cuando Δx es muy pequeño $1/4\,(ro + ri)^2\,\Delta x^2 = 0$

y por tanto: Resistencia input $= 1/2\,Rf = 1/2\,\sqrt{\dfrac{rm}{\Delta x}}\;(ro+ri)\;\Delta x$

Resistencia input $= 1/2\;\sqrt{rm\;(ro+ri)}$

ro se desprecia por ser muy pequeña comparativamente

b) CONSTANTE DE ESPACIO DE LA MEMBRANA



Si en este sistema consideramos dos puntos; uno fuera y otro dentro con un potencial de Vo y Vi respectivamente, y ambos a una distancia x del lugar donde se aplica el pulso de corriente, tenemos:

Un gradiente de potencial en el exterior a una distancia x:

$$\frac{dVo}{dx} = ro\, i$$

i = corriente longitudinal

y también un gradiente de potencial en el interior, que viene dado por:

$$\frac{dVi}{dx} = -ri\, i .$$

Las corrientes internas y externas son iguales pero de dirección opuesta.

Por otra parte:

$$i = \frac{(Vi - Vo)}{Rf}$$

de donde:

$$\frac{d(Vi - Vo)}{dx} = \frac{dVi}{dx} - \frac{dVo}{dx}$$

$$\frac{d(Vi - Vo)}{dx} = - ri\, i - ro\, i$$

$$\frac{d(Vi - Vo)}{dx} = -(ri + ro)\frac{(Vi - Vo)}{Rf}$$

$$\frac{1}{(Vi - Vo)} \quad \frac{d(Vi - Vo)}{dx} = \frac{-(ri + ro)}{Rf}$$

Integrando:

$$\int \frac{1}{(Vi - Vo)} \quad \frac{d(Vi - Vo)}{dx} dx = - \int \frac{(ri + ro)}{Rf} dx$$

$$\ln(Vi - Vo) = \frac{-(ri + ro)}{Rf} x + K$$

$$Vi - Vo = K \exp^{\frac{-(ri + ro)x}{Rf}} = K \exp^{\frac{-x(ri + ro)}{Rf}}$$

Para $x = 0 \rightarrow e^0 = 1$

y por tanto:

$$Vi - Vo = K = IR_1 = Vm$$

$$Vm, x = IR_1 \exp^{-x/\lambda}$$

λ= lambda es la constante de espacio de la membrana y viene definida por:

$$\lambda = \frac{Rf}{ri+ro} = \frac{\sqrt{rm(ro+ri)}}{(ri+ro)} = \sqrt{\frac{rm}{ro+ri}}$$

$$\lambda = \sqrt{\frac{rm}{ro+ri}}$$

Estas formulaciones están de acuerdo con el hecho de considerar que el potencial, en un conductor como el que corresponde al modelo eléctrico de membrana, cae exponencialmente desde un compartimento del modelo a otro.

c) CONSTANTE DE TIEMPO DE LA MEMBRANA

Para conocer el curso temporal de la respuesta a la aplicación de un pulso de corriente entre el interior y el exterior del sistema considerado, hay que tener en cuenta la CAPACIDAD de la membrana.

La corriente en cualquier punto es igual a:

$$im = -\frac{di}{dx}$$

Sabemos que:

$$\frac{dVm}{dx} = -(ri + ro)i$$

Diferenciando:

$$\frac{d^2Vm}{d^2x} = -(ri + ro)\frac{di}{dx}$$

Sustituyendo:

$$\frac{d^2Vm}{d^2x} = (ri + ro)im$$

La corriente -im- por unidad de longitud puede ahora subdividirse en sus dos componentes:

- la corriente iónica= ii
- la corriente capacitativa= ic

Por tanto tenemos que:

$$im = ic + ii$$

$$im = C\frac{dVm}{dt} + ii$$

Teniendo en cuenta:

$$\frac{d^2Vm}{d^2x} = (ri + ro)\,im$$

y sustituyendo im

$$\frac{d^2Vm}{d^2x} = (ri + ro)\left(C\ \frac{dVm}{dt} + ii\right)$$

$$\frac{1}{(ri + ro)}\ \frac{d^2Vm}{d^2x} = C\ \frac{dVm}{dt} + ii$$

Esta ecuación describe el potencial de membrana en función de x y t, en todas condiciones, incluso en aquellas donde las conductancias iónicas no se comportan linealmente.

Sin embargo, si se asume un comportamiento lineal de la conductancia, y una geometría sencilla del sistema, la ecuación se simplifica a (HODGKIN, RUSHTON, 1946):

$$\lambda^2\ \frac{d^2Vm}{d^2x} = \tau m\ \frac{dVm}{dt} + Vm$$

donde: lambda $\lambda = \sqrt{\frac{rm}{ri + ro}}$ Constante de espacio

y donde τ tau= rm.cm Constante de tiempo de la membrana

Con la finalidad de esquematizar los conceptos básicos y más habitualmente manejados en la terminología de las propiedades pasivas de la membrana, exponemos a continuación su simbología, significado y unidades de expresión:

rm: resistencia de la membrana por unidad de longitud (Ωcm)
Rm: resistencia de la membrana por unidad de área (Ωcm^2)
cm: capacidad de la membrana por unidad de longitud (μF/cm)
Cm: capacidad de la membrana por unidad de área ($\mu F/cm^2$)
Ri: resistividad específica del citoplasma (Ωcm)
λ: constante de espacio (mm)
τ: constante de tiempo (msec)

La relevancia de las propiedades pasivas de las membranas de las células excitables viene dada por el hecho de que constituyen (KATZ, 1966):

- una primera aproximación para caracterizar una determinada preparación desde el punto de vista bioeléctrico.
- la base de la transmisión de impulsos desde una zona a otra de una célula.
- la base de procesos integrativos, allí donde los haya.
- la base de la propagación de los potenciales locales.

En suma, el conocimiento de las propiedades pasivas de una célula, constituye un instrumento necesario a la hora de querer caracterizar una preparación celular y a la hora de interpretar, con cierto rigor, las señales bioeléctricas de la membrana celular.

C- TRANSMISION NEUROMUSCULAR

Entendemos por transmisión neuromuscular la serie de fenómenos que acaecen entre la llegada de un potencial de acción al pie terminal de una fibra nerviosa motora y el inicio de la contracción a nivel de la fibra muscular.

La base morfológica de la transmisión neuromuscular es la placa motora. La placa motora se conceptúa como una zona de contacto funcional entre una célula nerviosa y una célula muscular (KATZ, 1966). Los citoplasmas de ambas células están rodeados por membranas celulares independientes. Esta zona se caracteriza por funcionar a modo de un transductor; en efecto, la transducción de energía química en energía eléctrica es la base operativa de las sinapsis químicas y, por ende, de la unión neuromuscular.

La secuencia de fenómenos que conforman la transmisión neuromuscular es ampliamente conocida y constituye actualmente una realidad objetivable aceptada en su conjunto. Puede resumirse de la siguiente manera (BARRET y MAGLEBY, 1976):

- las corrientes asociadas al potencial de acción de la fibra nerviosa despolarizan el terminal presináptico.
- esta despolarización conlleva un aumento de permeabilidad de la membrana presináptica para el calcio.
- el calcio entra dentro del terminal presináptico a favor de un gradiente electroquímico.
- mediante un mecanismo todavía desconocidc, el calcio aumenta la probabilidad de liberación del transmisor.
- aproximadamente, 200 vesículas sinápticas liberan su contenido en ACh hacia la hendidura sináptica.
- La ACh que alcanza la hendidura sináptica puede:
    - alejarse de la placa por difusión

  - ser hidrolizada por acetilcolinesterasa en acetato y colina
  - interaccionar con el receptor postsináptico con ulterior hidrólisis y/o difusión de la misma.

- la interacción ACh-receptor, conlleva un cambio conformacional de los receptores, lo cual, a su vez, produce la apertura de canales iónicos para el sodio y el potasio y, por ende, un aumento de permeabilidad y conductancia de la membrana postsináptica para estos iones.
- se produce subsiguientemente una despolarización umbral de la membrana p stsináptica; lo cual, a su vez, da paso al potencial de acción de la célula muscular y a la ulterior contracción de la fibra.

Nuestro objetivo inmediato es la descripción, somera, de los aspectos más relevantes de esta sucesión fenomenológica, haciendo hincapié en los aspectos más controvertidos de la misma.

1)- EL POTENCIAL DE LA PLACA MOTORA

Los pioneros en la descripción y reconocimientc de la existencia de una variación del potencial de membrana en la zona de la placa motora subsiguiente a la estimulación del nervio motor fueron GOEPFERT y SCHAEFER (1938) y ECCLES Y O'CONNOR (1939). La variación del potencial de membrana descrita como lènta y restringida a la zona de placa motora fue denominada POTENCIAL DE PLACA MOTORA.

Estos estudios electrofisiológicos se complementaron con los estudios farmacológicos iniciados por DALE, FELDBERG y VOGT (1936) y COWAN (1936). Estos autores establecieron que era la ACh el neurotransmisor liberado desde los terminales presinápticos, cuando éstos eran estimulados adecuadamente y que, la aplicación de ACh podía ocasionar una variación similar al potencial de placa motora cuando era añadida al líquido extracelular de ciertas preparaciones.

De esta forma quedaban establecidos los postulados básicos de la transmisión neuromuscular.

FATT y KATZ (1951), realizan el primer estudio electrofisiológico del potencial de placa motora con microelectrodos. Postularon que el potencial de placa motora -P.P.M.-, era una despolarización restringida a la zona de la unión neuromuscular y que la ACh, actuaba aumentando la permeabilidad iónica de manera inespecífica a este nivel, de forma tal, que se cortocircuitaba el potencial de membrana en esta zona.

Sentadas las premisas básicas de la transmisión neuromuscular, se comenzó el estudio de los cambios de permeabilidad originados por el neurotransmisor.

2)- CARACTERISTICAS GENERALES DEL CAMBIO DE PERMEABILIDAD PRODUCIDO POR LA ACETILCOLINA

DEL CASTILLO y KATZ (1954 b), mediante la realización de experimentos de colisión, demostraron que la ACh tiende a llevar el potencial de membrana hacia un valor de -15 mV. A este valor de potencial de membrana se le denominó potencial de inversión para la ACh. Su determinación, tuvo relevancia ya que señalaba experimentalmente que el aumento de permeabilidad iónica debido a la ACh no tendía a llevar el potencial de membrana ni hacia ENa ni hacia EK. Esto llevó a concluir:

- que el aumento de conductancia implicaba a más de un tipo iónico.
- que el sodio estaba involucrado en el proceso, ya que el potasio y el cloro tienen potenciales de equilibrio más negativos que el valor de -15mV. En efecto, el potencial de equilibrio de estos iones se encuentra muy próximo al potencial de membrana.

El papel del potasio en el cambio de permeabilidad originado por la ACh fue puesto de manifiesto por DEL CASTILLO y KATZ (1955 b). Estos autores demostraron, que la aplicación electroforética de ACh a nivel de la placa motora, aumenta la conductancia de la membrana postsináptica cuando el líquido extracelular de la preparación contiene sólo una solución sulfatada de potasio. Este hecho, sugirió que el ión potasio jugaba cierto papel en el cambio iónico mediado por la ACh.

El análisis del cambio de permeabilidad originado por la acetilcolina, se completó con los trabajos iniciados por TAKEUCHI y TAKEUCHI (1959, 1960) utilizando la técnica de fijación de voltaje

con el objeto de medir la corriente sináptica en soluciones extracelulares de diversa composición iónica. De estos trabajos básicamente se concluyó:

- el P.P.M. consta de una breve fase activa de corriente entrante con un potencial de inversión próximo a -15mV
- ΔI es mayor a medida que la membrana se hiperpolariza y la relación entre la corriente sináptica y el potencial de membrana es lineal (MAGLEBY y STEVENS, 1972):

$$\Delta I = \Delta g (Vm - Vr) \qquad Vr = \text{potencial de inversión}$$

- si el potencial de membrana se fija en un valor menos negativo que el potencial de inversión, el resultado se traduce en la generación de una corriente saliente y una tendencia a la repolarización en el potencial de membrana.
- variaciones de potasio y sodio extracelulares originan variaciones en el potencial de inversión, mientras que las variaciones en el cloro extracelular no tienen efecto alguno sobre el citado potencial; se concluye, por tanto, que los iones implicados en el cambio de permeabilidad son sodio y potasio fundamentalmente; aunque en determinadas circunstancias se puede producir un aumento de conductancia, discreto, para ciertos iones divalentes, calcio en especial (TAKEUCHI, 1963 b).
- el aumento de conductancia para el sodio y potasio se produce de manera simultánea, ya que el trazado de corriente sináptica es monofásico para todos los valores de potencial de membrana, (MAGLEBY y STEVENS, 1972 a).

En suma, si la acetilcolina produce un aumento en las conductancias iónicas del sodio y potasio, la corriente sináptica, Is, viene dada por:

$$Is = \Delta gNa(Vm - ENa) + \Delta g(Vm - EK)$$

donde:

$$ENa = RT/F \ \ln(Na)o/(Na)i$$

$$EK = RT/F \ \ln(K)o/(K)i$$

por tanto Vr viene dado por

$$Vr = \frac{RT}{F}\left(\ln\frac{(K)o}{(K)i} + \frac{\Delta gNa}{\Delta gK}\ln\frac{(Na)o}{(Na)i}\right)\Bigg/\left(1 + \frac{\Delta gNa}{\Delta gK}\right)$$

Para cuantificar el aumento de permeabilidad que se produce a nivel de placa motora como consecuencia de la interacción ACh-receptor, se parte de las siguientes ecuaciones básicas, (KUFFLER y NICHOLLS, 1977):

$$\Delta INa = \Delta gNa(Vm - ENa)$$

$$\Delta IK = \Delta gK(Vm - EK)$$

En el potencial de inversión:

$$Vm = -15\,mV$$

$$\Delta INa = -\Delta IK$$

Por tanto:

$$\frac{\Delta gNa}{\Delta gK} = \frac{EK - Vm}{Vm - ENa} = \frac{-99 + 15}{-15 - 50} = 1.29$$

De aquí se deduce, que la membrana postsináptica es algo más permeable para el sodio que para el potasio durante la génesis de la corriente sináptica.

TAKEUCHI (1963a) estudió la respuesta de la membrana postsináptica a la aplicación de ACh variando las concentraciones extracelula-

res de potasio y sodio y encontró que:

- al aumentar considerablemente la concentración de potasio extracelular $\Delta g_{Na}/\Delta g_K$ cae a 0.66

- $\Delta g_{Na}/\Delta g_K$ permanece constante a pesar de efectuar grandes variaciones en la concentración de sodio extracelular.

Las implicaciones de estos últimos resultados aún no han podido ser explicadas satisfactoriamente. Sin embargo, lo que si resulta evidente, es que los canales iónicos controlados por la ACh son distintos y diferenciables de los canales iónicos de las membranas eléctricamente excitables. Es así, que la tetrodotoxina no tiene efecto alguno sobre la acción fisiológica de la ACh a nivel de la unión neuromuscular (FURUKAWA et al. 1959), (ELMQUIST y FELDMAN 1965 a), (KATZ y MILEDI 1967). Tampoco tiene efecto alguno a este nivel el tetraetilamonio (RANG, 1975).

Establecidas las especies iónicas involucradas en el cambio de permeabilidad producido por la acetilcolina a nivel de la unión neuromuscular, se cuestionó el carácter único o dual de los canales iónicos controlados por el neurotransmisor. Para aclarar este punto, se siguió en principio un razonamiento análogo con respecto a lo que ocurre en las membranas eléctricamente excitables y se intentó bloquear por procedimientos farmacológicos los canales de sodio y potasio a nivel de la placa motora.

En esta línea de trabajo, MAENO (1966), sugiere la existencia de mecanismos separados en el control de las permeabilidades de sodio y potasio a nivel de la placa motora. Basa su afirmación en el efecto que tiene la procaína sobre el P.M.M.: prolongación del curso temporal del mismo con aparición de una meseta en el registro de variación de potencial. Para MAENO, este efecto sería debido a una

acción específica del anestésico sobre los canales de sodio. Esto, a su vez, involucraría cursos temporales diferentes para las dos corrientes iónicas y consiguientemente una operatividad independiente de los canales.

Esta línea de pensamiento no ha encontrado apoyo en la mayoría de los trabajos posteriores, entre otros, STEINBACH (1968) y KORDAS (1970, 1972).

STEINBACH, estudiando la acción de los anestésicos locales sobre la placa motora, llegó a la conclusión de que el efecto observado por MAENO, era debido fundamentalmente a la acción de estas drogas sobre el curso temporal de inactivación de los canales iónicos, y propuso que el factor básico involucrado en el fenómeno observado era el valor de potencial de membrana: para valores de potencial de membrana próximos a EK, la procaína prolonga el P.P.M. debido a que para este valor de potencial la "unión de la droga al canal activado" se ve favorecida. En efecto, estudios posteriores demostraron que cuando se fija el potencial de membrana a valores próximos del potencial de equilibrio para el potasio, se observa un efecto similar al producido por la procaína aún en ausencia de la droga, (GAGE y ARMSTRONG (1968).

KORDAS (1970, 1972) y MAGLEBY y STEVENS (1972 a), han confirmado los hallazgos de STEINBACH, GAGE y ARMSTRONG, ya que, empleando la técnica de fijación de voltaje no encontraron para ningún valor de potencial de membrana, una corriente sináptica difásica. Estos autores concluyeron, que el efecto del potencial de membrana sobre el curso temporal de la respuesta sináptica, no era debido a cursos temporales diferentes de los componentes iónicos de la misma, sino a otra causa; verbigracia:

- a un efecto del potencial de membrana sobre la velocidad de

difusión de la ACh.

- a un efecto del potencial de membrana sobre la estabilidad del complejo ACh-receptor.
- a un efecto del potencial de membrana sobre el curso temporal de la inactivación de los canales iónicos.

Trabajos posteriores de MAGLEBY y STEVENS (1972 b) favorecen la última hipótesis.

MAENO, EDWARDS y HASHISUMURA (1971) insisten, sin embargo, en el carácter dual e independiente de los canales iónicos sinápticos. Estos autores han obtenido registros bifásicos de corriente sináptica para valores de potencial próximos al potencial de inversión. Por otra parte, en esta misma línea de pensamiento, MALLART y TRAUTMANN (1973) demostraron que el potencial de inversión para la ACh en la placa motora de la rana, es extremadamente sensible a las variaciones del pH del medio extracelular, pasando del valor de -15mV a pH7 al valor de -45mV para un pH de 8.5. Concomitantemente, en estas condiciones, se observó que la razón $\frac{\Delta gNa}{\Delta gK}$ variaba de 1.29 a 0.60 con el cambio de pH. MALLART y TRAUTMANN, interpretaban estcs hallazgos postulando que los canales iónicos para el sodio y potasio estarían regulados por grupos ionizables independientes y con diferentes pK.

Sin embargo, en el sentir de RANG (1975), no es necesario invocar una dualidad e independencia de los canales iónicos para explicar los efectos observados con relación a la variación de pH del medio extracelular, ya que sería perfectamente factible que un canal único cambie sus permeabilidades relativas para el sodio y el potasio como resultado de un cambio en la ionización.

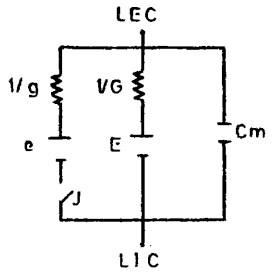
En la actualidad, la mayoría de los autores tienden a aceptar

la existencia de un canal iónico único a nivel de la placa motora, ya que en contraste con lo que ocurre en las membranas eléctricamente excitables, no hay, hasta la fecha, evidencia experimental rotunda a favor de la dualidad e independencia de los canales iónicos sinápticos.

3)- MODELO ELECTRICO DE MEMBRANA Y TRANSMISION SINAPTICA

La acetilcolina liberada desde los terminales presinápticos tiene el efecto de cortocircuitar eléctricamente la membrana a nivel de la unión neuromuscular. En efecto, la resistencia input de la membrana de la fibra muscular del sartorio de la rana, se reduce desde el valor de 200.000 ohmios, a 20.000 ohmios aproximadamente, bajo la acción de la ACh.

Se puede esbozar un circuito eléctrico equivalente de la membrana postsináptica de una sinapsis química, (FATT y KATZ 1951):



G: conductancia de la membrana de superficie

g: conductancia de la membrana postsináptica

El potencial de reposo se representa como una batería"E"en serie con 1/G. Los receptores sinápticos se representan por un interruptor"J"en serie con la resistencia de los canales sinápticos. En ausencia del transmisor químico,"J"se encuentra abierto; por tanto, el potencial que se registra en estas condiciones a través de la membrana es igual a "E".

La llegada del transmisor, produce el cierre de "J" y se abren los canales iónicos para el sodio y potasio a nivel de la membrana postsináptica; el potencial de membrana, es entonces cortocircuitado por 1/g. La apertura de estos canales crea la condición necesaria para la variación de potencial en el sentido de una despolarización y ulterior excitación de la célula postsináptica.

La ACh, por tanto, crea una vía adicional para el flujo de corriente, lo que en última instancia resulta en una variación de potencial.

El curso temporal de la variación de potencial viene dado por GINSBORG y JENKINSON (1976):

$$(\Delta V)t = \frac{g}{g+G} \; Vo \left\{1 - \exp^{(-t/\varphi)}\right\}$$

donde:

$Vo = e - E$

$\varphi = Cm/(g+G)$

t = tiempo desde el cierre de J

cuando $t \gg \varphi$ la despolarización llega a un valor estable:

$$\Delta V = \frac{g}{g+G} \cdot Vo$$

Si la acción de la ACh finaliza abruptamente (apertura de "J"), la despolarización declina desde su valor inicial $(\Delta V)o$ con un curso temporal que viene dado por:

$$(\Delta V)t = (\Delta V)o \exp^{(-t/\phi)}$$

t: tiempo desde la apertura del interruptor

ϕ: C/G

Estas ecuaciones exponenciales representan una simplificación necesaria. En efecto, los cambios de potencial debidos a la acción de la ACh tienen un curso temporal más complejo que los descritos por estas ecuaciones (FATT y KATZ, 1951). A pesar de ello, su utilidad práctica es innegable y por ello son ampliamente aceptadas por los neurofisiólogos. Sin embargo, en este sentido queremos destacar que la despolarización de la membrana postsináptica debida a la acción del neurotransmisor está relacionada con la conductancia:

$$\Delta V = \frac{g}{g + Go} \cdot Vo \quad \Longrightarrow \quad g = \frac{\Delta V}{Vo - \Delta V} \cdot Go$$

GO: conductancia input de la fibra

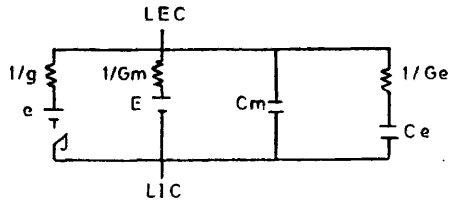
Esta ecuación es en realidad idéntica a:

$$\Delta V = \frac{g}{g + G} \; Vo$$

y ambas implican que la despolarización ΔV no aumenta linealmente con el cambio de conductancia excepto cuando $g \ll Go$

Este hecho tiene importancia cuando se quiere utilizar la amplitud del P.P.M. como medida de la liberación del transmisor (MARTIN 1955).

Una limitación importante del modelo eléctrico descrito, es que excluye la existencia del sistema tubular sarcoplasmático. Este sistéma, contribuye sustancialmente a determinar las características eléctricas de la fibra muscular, muy en especial, en lo que respecta a los altos valores de capacidad,- 6-8 microfaradios/cm^2 de la membrana de la fibra muscular. Por tanto, teniendo presente este hecho un modelo eléctrico más aproximado a la realidad sería (GINSBORG y JENKINSON 1976):



Ge: conductancia del sistema tubular

Ce: capacidad del sistema tubular

Gm y Cm: conductancia y capacidad de la membrana de superficie

g: conductancia de la membrana postsináptica

4)- ASPECTOS PRESINAPTICOS DE LA TRANSMISION NEUROMUSCULAR

La placa motora se caracteriza funcionalmente, no sólo por su capacidad para responder a la estimulación del nervio motor, sino también por presentar descargas eléctricas espontáneas que son denominadas POTENCIALES MINIATURA (M.E.P.P. (FATT y KATZ, 1952).

Los M.E.P.P.s son variaciones del potencial de membrana restringidas a la zona de la unión neuromuscular; su amplitud aumenta con la aplicación de anticolinesterasas y disminuye en presencia de tubocurarina. En efecto, es un hecho aceptado que los M.E.P.P.s son debidos a la liberación de paquet s multimoleculares, -cuantos-, de ACh. No se ha determinado con exactitud el número de moléculas que componen un cuanto: un límite superior sería el de 10^5, por analogía con la variación de potencial obtenida por aplicación electroforética de ACh y que más se asemeja al M.E.P.P.. El límite inferior vendría representado por la cifra de 10^3, cifra obtenida por estudio de las despolarizaciones elementales debidas a la acción ejercida por moléculas de acetilcolina a nivel de la placa motora (KATZ y MILEDI, 1972).

Las características principales de las descargas espontáneas o M.E.P.P.s en la placa motora de la rana fueron descritas por FATT y KATZ (1952). Desde entonces, se han manejado fundamentalmente dos parámetros en su caracterización:

- amplitud de los M.E.P.P.s; función de factores postsinápticos.
- frecuencia de M.E.P.P.s; en relación con factores presinápticos.

Amplitud de los M.E.P.P.s

La amplitud media es función de la resistencia input de la fi-

bra muscular. Presenta valores de 0.1-0.5 mV con una desviación standard de 0.25.

Frecuencia de los M.E.P.P.s

Presentan una frecuencia media de 1-10 Hz

La frecuencia aumenta con:

- la despolarización de la terminal nerviosa motora
- el aumento de presión osmótica
- el aumento de temperatura
- ciertas drogas como las diamidas (WERMAN et al 1971) y el orto-iodosobenzoato (SOBRINO y DEL CASTILLO, 1972).

La frecuencia de descarga de M.E.P.P.s no se ve afectada por la concentración extracelular de calcio, en contraste con lo que ocurre con las respuestas evocadas por estimulación del nervio motor.

FATT y KATZ, sugieren que el contenido de ACh de los cuanto permanece inalterable. Más aún, postulan que no sólo es cuantal la descarga espontánea, sino también, la liberación de ACh inducida por estimulación del terminal motor; la transmisión neuromuscular fisiológica sería cuantal y el número de cuantos liberados por impulso nervioso sería de 300 (GINSBORG y JENKINSON 1976). Las variaciones en la cantidad de transmisor liberado se harían a expensas de variaciones en el número de cuantos.

Los postulados de FATT y KATZ sobre el contenido cuantal de la respuesta evocada y de las descargas espontáneas y, el análisis cuantal subsiguiente han sido ampliamente aceptados y en general, constituyen una realidad objetivable. Existe, sin embargo, un aspecto que debe ser puesto de manifiesto en lo que respecta a las diferencias existentes entre las descargas espontáneas y las respuestas evocadas por estimulación nerviosa: (GINSBORG y JENKINSON, 1976)

- la liberación evocada de ACh es fácilmente abolible por aumento de magnesio extracelular. En estas condiciones, los M.E.P.P.s persisten.
- el aumento de presión osmótica no tiene apenas efecto sobre las respuestas evocadas.
- la entrada de calcio dentro del terminal nervioso no parece ser una condición necesaria para la presencia de M.E.P.P.s.

Una hipótesis atractiva para explicar la naturaleza cuantal de la liberación del transmisor, fue elaborada por DEL CASTILLO y KATZ (1956), en el sentido de establecer una relación morfológica-funcional entre las vesículas sinápticas y la liberación cuantal. Según esta hipótesis, los M.E.P.P.s serían el resultado de colisiones ocasionales entre la vesícula sináptica y la membrana del terminal presináptico que conllevarían la liberación de ACh a la hendidura sináptica.

Desde un punto de vista cuantitativo, la hipótesis es plausible ya que, aunque no hay determinadas cifras exactas, un valor aproximado de 10^4 moléculas de acetilcolina por vesícula y por "cuanto" (KUFFLER y YOSHIKAMI, 1975) podrían ser responsables de las descargas espontáneas. Estas aproximaciones cuantitativas caen dentro de lo razonable y fisiológico (GINSBORG y JENKINSON, 1976).

Desde un punto de vista estadístico, los histogramas de amplitud de las despolarizaciones espontáneas pueden ser descritos por una curva de Gauss única, y, consecuentemente, fueron consideradas como debidas a la liberación de la cantidad más pequeña posible, mínima, de transmisor. La unidad era representada por "el cuanto" y la liberación evocada ocurriría en forma de múltiplos de estos "cuantos" (DEL CASTILLO y KATZ 1954b, FATT y KATZ 1950, 1952).

5) - LIBERACION SUBCUANTAL DEL TRANSMISOR

La naturaleza exacta del "cuanto" aún es incierta. En efecto, los análisis basados en la hipótesis cuantal usando métodos estadísticos (DEL CASTILLO y KATZ, 1954 b) no proveen evidencia ni a favor ni en contra de la hipótesis cuantal, ya que los mismos resultados se pueden obtener suponiendo la liberación del neurotransmisor desde una fuente citoplasmática no vesicular.

KRIEBEL, LLADOS y MATTESON (1976), encuentran que los histogramas de amplitud de los potenciales miniatura, muestran un número de picos en la zona izquierda de la curva de Gauss correspondiente, que clasifican como potenciales subminiaturas. Estos potenciales subminiaturas, corresponderían a subunidades que conformarían "los cuanto".

WERNING y STIRNER (1977), sugieren un mecanismo sincronizador de subunidades. Proponen, mediante aplicación de métodos estadísticos, que cada "cuanto" estaría formado por 2 a 15 subunidades y que el "cuanto" sería originado, en última instancia, por la liberación simultánea de cantidades variables de transmisor a nivel de lugares determinados llamados "zonas activas".

Se postula que la zona activa sería la unidad funcional de liberación del transmisor. WERNING y STIRNER, proponen que la activación de la zona activa produce la descarga simultánea de vesículas alineadas a su nivel: esto originaría un "cuanto".

6)- LIBERACION NO CUANTAL DEL TRANSMISOR

POTTER (1970) y KATZ y MILEDI (1977), sostienen que existe acetilcolina en solución dentro del terminal presináptico y que sólo parte de la liberación espontánea del neurotransmisor sería cuantal.

KATZ y MILEDI demuestran, experimentalmente, su hipótesis mediante aplicación de técnicas electrofisiológicas. En efecto, estos autores comprueban que la aplicación iontoforética de una dosis masiva de tubocurarina, provoca una hiperpolarización pequeña y localizada de 40 microvoltios de amplitud media. Esta respuesta H en realidad estaría poniendo de manifiesto una despolarización de fondo, continuada, producida por el "goteo" no cuantal de ACh desde el citoplasma del terminal nervioso.

Para KATZ y MILEDI, la placa motora es un detector muy sensible para la ACh liberada instantáneamente desde una fuente puntual situada a nivel presináptica; pero, es un detector muy poco eficiente si la misma cantidad de acetilcolina se distribuye espacialmente sobre toda la arborización terminal y temporalmente, por un periodo de tiempo que sobrepase con mucho la duración de la corriente de los M.E.P.P.s.

En la actualidad, la liberación, parcial, de acetilcolina en forma no cuantal es un hecho aceptado y objetivable. A pesar de ello, la mayoría de los autores concuerdan en que este tipo de liberación no produce cambios facilmente detectables en el potencial de membrana, ni por su amplitud, ni por su curso temporal (GINSBORG y JENKINSON, 1976).

D)- D R O G A S

1)- CONCEPTO DE DROGA

Bajo el concepto de droga se agrupa un amplio y variado conjunto de moléculas con características tan heterogéneas que no es posible aunarlas bajo determinada estructura o propiedad fisico-química. Ni siquiera podemos utilizar un criterio común para todas ellas en lo que respecta a la acción que ejercen sobre los sistemas biológicos (DEL CASTILLO, 1971).

Ante la imposibilidad de definición exacta de droga, debemos conformarnos con explicar para qué utilizamos una droga, de qué nos sirve una droga. Desde esta perspectiva, podemos afirmar que drogas son aquellas moléculas que nos permiten estudiar y, eventualmente, averiguar algo nuevo sobre las funciones y propiedades de las células, tejidos u organismos vivientes. Es ésta por tanto, una concepción "instrumental" del vocablo "droga".

Desde un punto de vista más amplio, en medicina, una droga es cualquier sustancia que puede ser empleada como medio diagnóstico, preventivo o terapeútico.

La acción farmacológica de una droga viene definida por el hecho de que la adición, ingestión o inyección de la misma en un sistema viviente va seguida, por lo general, de un cambio cuantitativo en algunas de las funciones o parámetros fisiológicos del sistema; cuando estos parámetros aumentan se dice que la droga es un agente estimulador, si disminuyen hablamos de un agente inhibidor, depresor o bloqueador.

La acción farmacológica de una droga puede ser:

- medida
- cuantificada

- puesta en relación con la dosis; esto se denomina relación dosis respuesta.

La relación dosis respuesta, expresada en una gráfica o como simples valores numéricos, forma, junto con las gráficas o números que expresan la dosis tóxica de la misma sustancia, la base del empleo empírico de una droga en terapeútica.

Ahora bien, para comprender en toda su extensión por qué la droga actúa, no basta con la enumeración y medida de sus acciones farmacológicas, sino que además hay que explicar y describir el mecanismo de su acción farmacológica. Ello implica describir sucesivamente la célula, el órgano o sistema orgánico sobre el que la droga actúa y, ulteriormente, los constituyentes o sustratos celulares por los que la droga presenta afinidad particular. En última instancia hay que intentar explicar por qué la interacción droga-sustrato se traduce en un cambio cuantitativo de algún parámetro de la fisiológía celular.

En realidad, hay tantos mecanismos de acción farmacológica como drogas, pero es posible clasificarlos genéricamente en determinados grupos (DEL CASTILLO, 1971):

- de acuerdo con la definición "médica" de droga, tenemos un primer grupo que incluye aquellas que actúan reemplazando o sustituyendo a moléculas que normalmente se encuentran presentes en la economía corporal. Ej. vitaminas
- un segundo grupo estaría constituído por aquellas drogas que en lugar de reemplazar componentes orgánicos, los sustituyen por moléculas semejantes pero no adecuadas por entero para cumplir su misión fisiológica. Se trata en este caso de una suplantación química. Ej. acción de sulfamidas.

- un tercer grupo lo forman aquellas drogas que se combinan directamente con diversos iones en la intimidad de los tejidos, pero por fuera de la propia célula. El resultado es la neutralización. Ej. los alcalinos.
- hay otro grupo de drogas que actúa disolviéndose en ciertas fases celulares pero sin combinarse químicamente con ellas; de forma que su mera presencia modifica las propiedades fisico-químicas de los mecanismos moleculares incluídos en tales estructuras. Ej. los anestésicos generales.
- por último existe un grupo de drogas cuyas moléculas parecen combinarse de forma específica; es decir, de una manera altamente selectiva desde un punto de vista químico, con ciertas áreas o "sitios"de la célula. Estas áreas juegan un papel relevante en la fisiología celular y corresponden a los llamados RECEPTORES.

Las drogas que se combinan con los receptores sinápticos lo hacen en concentraciones muy pequeñas. Esto se debe a la gran afinidad química de la droga por los receptores y a una gran actividad intrínseca de la propia droga. Actividad intrínseca de una droga es su posibilidad de inducir la actividad del receptor como consecuencia de su interacción química con él (DEL CASTILLO, SOBRINO, 1973).

Los criterios fundamentales para poder afirmar que una droga actúa combinándose de forma selectiva con un receptor celular según DEL CASTILLO (1971) son:

- su gran potencia: la droga actúa en dosis mínimas.
- la alta especificidad estructural que poseen las drogas: existe una correlación estrecha entre la configuración mole-

cular de la droga y su actividad farmacológica.

- la estereoespecificidad: a veces sólo uno de los posibles isómeros de la droga es farmacológicamente activo.
- la existencia de antogonistas frente a drogas que poseen las características anteriores.

La gran potencia de las drogas y su alta especificidad estructural sugiere la existencia de una zona específica a nivel celular, a cuyo nivel la droga actuaría combinándose de alguna forma. Esta zona específica debe poseer una estructura química que de alguna forma complementa la configuración de la droga. Es precisamente esta zona específica la que se denomina RECEPTOR o QUIMIORECEPTOR.

Resulta difícil separar la evolución histórica del concepto de droga de la evolución histórica del concepto de receptor. Subyace a esta dificultad el hecho de que los esfuerzos encaminados a obtener datos sobre los mecanismos de acción de las drogas, no pueden ser separados tajantemente del estudio de la naturaleza química de los receptores y los mecanismos moleculares, merced a los cuales, las drogas se combinan con los receptores resultando éstos activados o inhibidos por las mismas.

Sentada esta premisa, es nuestro propósito comenzar por describir los mecanismos de acción de las drogas, sin olvidar, la lógica y natural imbricación de este tema con el concepto de receptor.

Teniendo lo anterior presente, es de destacar que los introductores del concepto de receptor en biología fueron EHRLICH (1910) y LANGLEY (1905, 1907). CLARK (1933), tomó las ideas de EHRLICH y LANGLEY para transformar la farmacología en una disciplina cuantitativa.

En efecto, CLARK desarrolló la teoría de la ocupación que exami

naremos con más detalle en otro apartado; bástenos por ahora indicar que CLARK estudió las relaciones cuantitativas entre la dosis de la droga y el efecto biológico obtenido; y que su teoría de la ocupación, básicamente postula que el efecto de una droga sobre un sistema biológico, es directamente proporcional a la fracción de receptores ocupados por la droga en un momento dado. Desde un punto de vista dinámico, su hipótesis básica es que las drogas se combinan con los receptores a una velocidad proporcional a la concentración de la droga y al número de receptores-fracción de receptores-, disponibles, -no ocupados-, para la acción de la droga.

Nos ocuparemos a continuación de analizar someramente las diferentes teorías sobre los mecanismos de acción de las drogas que han ocupado el pensamiento farmacológico y fisiológico desde los tiempos de CLARK hasta los momentos actuales.

2)- TEORIAS SOBRE LA ACCION DE LAS DROGAS

Las diversas teorías sobre el modo de acción de las drogas han surgido del intento de aclarar de una manera lógica y consecuente el mecanismo básico de interacción droga-receptor. Fundamentalmente se ha perseguido la obtención de un modelo teórico que se ajuste a las observaciones experimentales en el sentido de que explique cómo la interacción droga-receptor conlleva un cambio cuantitativo en algunas de las funciones o parámetros fisiológicos de los diversos sistemas estudiados.

a)- Teoría de la ocupación

Ha surgido de estudios farmacológicos cuantitativos llevados a cabo con drogas y receptores.

El primer y más simple modelo de interacción droga-receptor fue elaborado por CLARK (1933). Este autor postuló que los receptores para una determinada droga son idénticos entre sí y que no interaccionan entre sí. Quiere esto decir, que la ocupación de un determinado receptor no influye en la posible combinación o interacción de las moléculas de las drogas con otros receptores. Estos postulados conducen a la curva de saturación de Langmuir (RANG, 1975):

$$Pa = \frac{Xa}{Xa+Ka}$$

o bien:

$$Pa = \frac{Ca}{Ca+1}$$

donde: $Ca = \frac{Xa}{Ka}$ relaciona la ocupancia fraccional del receptor en el equilibrio: Pa, con la concentración de la droga: Xa, y la constante de equilibrio: Ka.

Ca, es la concentración normalizada de A.

Para comprobar la validez de esta ecuación en las interacciones droga-receptor, se intentó ver si las curvas droga-efecto observado se ajustaban a la ecuación de Langmuir. Para ello, se asumió que el efecto E era directamente proporcional a Pa. Esto se verificó ocasionalmente en alguna preparación, pero más frecuentemente no se obtuvo un ajuste entre el terreno experimental y la ecuación de Langmuir.

En todo caso, actualmente se acepta que no se puede estudiar la interacción droga-receptor cuantificando la respuesta biológica y que no es plausible asumir una proporcionalidad entre el número de receptores ocupados y el efecto biológico (STEPHENSON 1956),(RANG 1971).

Por otra parte, si se estudia la relación concentración de droga y efecto biológico en determinados tipos de respuestas fisiológicas, es más factible asumir una relación simple entre la interacción droga-receptor y el cambio originado en el parámetro que se estudia. En esta línea se estudiaron efectos biológicos del tipo de despolarizaciones, cambios de conductancia... (TAKEUCHI, TAKEUCHI 1969); (CHANGEUX, PODLESKI 1968); (KASAI, CHANGEUX 1971) JENKINSON, TERRAR 1973). A pesar de ello, en estas condiciones no se obtiene un ajuste con la ecuación de Langmuir. La desviación que más frecuentemente se obtiene de ella es que la curva concentración-efecto es sigmoide.

Antes de proseguir con la descripción de otros modelos de acción de las drogas, es conveniente introducir y aclarar el significado del término EFICACIA.

b)- Eficacia

Uno de los mayores problemas con que se enfrentan el farmacólogo y el fisiólogo es la comprensión cabal del proceso de activación

de un receptor por una molécula de agonista; el proceso que subyace al cambio cualitativo y cuantitativo del parámetro del sistema estudiado. Un ejemplo relativamente sencillo estaría representado por la disminución de resistencia eléctrica y aumento de conductancia iónica que tiene lugar a nivel de la placa motora durante la interacción acetilcolina-receptor.

Por otra parte, desde hace algún tiempo se sabe que las diferentes drogas difieren entre sí en cuanto a capacidad para activar los receptores. Más aún, sabemos que la capacidad de activar un receptor es una propiedad distinta y diferenciable de la propiedad de afinidad que poseen ciertas drogas por los receptores (STEPHENSON, 1956). Tal es así, que hay muchos ejemplos de series de drogas relacionadas que muestran una gradación en su actividad biológica. Desde este punto de vista se pueden clasificar las drogas (STEPHENSON, 1956):

- agonistas completos: capaces de inducir una respuesta máxima del sistema estudiado.
- agonistas parciales: son capaces de producir una activación de los receptores pero su efecto máximo cae por debajo de la respuesta máxima posible del sistema que se estudia.
- antagonistas: drogas que ocupan los receptores pero no producen activación.

Para aclarar este problema, STEPHENSON (1956), introdujo el concepto de EFICACIA; entendiendo por tal la capacidad que tiene una droga para inducir la activación del receptor.

STEPHENSON (1956), argumentó que el estímulo "S" que se hace incidir sobre determinado sistema biológico es directamente proporcio

nal a la ocupancia producida por la droga:

$$Sa = e_a . Pa$$

donde: e_a es la eficacia de la droga A
Pa: ocupancia producida por una droga

La relación entre el estímulo y la respuesta E del sistema es indeterminada, pero se asume que viene caracterizada por las propiedades fisiológicas del tejido:

$$Ea = f (Sa)$$

Con la finalidad de cuantificar, S se hace igual a 1, para una respuesta que corresponde al 50% de la respuesta máxima del sistema.

En general, esta formulación teórica básica muestra una buena concordancia con los resultados experimentales (STEPHENSON, 1956).

Estos hechos, hacen surgir de inmediato el problema de cómo se puede conceptuar la eficacia en términos moleculares; ¿por qué la ocupación de un determinado número de receptores, por una determinada droga trae consigo una respuesta máxima o casi máxima del sistema biológico estudiado; mientras que, el mismo grado de ocupancia obtenido con la aplicación de otra droga produce pequeñas respuestas muy por debajo del máximo o en ocasiones no se produce respuesta?.

En la teoría de la ocupación se encuentra implícita la idea de que cuando el receptor es ocupado, éste sufre algún tipo de cambio conformacional que -en última instancia- es el que media la posibilidad de obtener una respuesta. También según la teoría de la ocupación, en cuanto se disocia la molécula de droga, el receptor vuelve a su conformación inactiva. En definitiva, según esta teoría, para que las moléculas de drogas tengan eficacias diferentes, sería

necesario que se produjesen múltiples cambios conformacionales y de diversa naturaleza (RANG, 1975).

c)- Modelo de dos estados

Una alternativa al punto de vista que concibe la eficacia sobre la base de cambios conformacionales que difieren en su naturaleza, consiste en suponer que el estado activo del receptor es idéntico para todas las drogas.

En este caso, la diferencia entre agonistas de baja y alta eficacia estribaría en la fracción-número de receptores ocupados que adoptarían el estado de conformación activa. Esto presupone un equilibrio entre la conformación activa e inactiva del receptor, siendo además, ambas conformaciones compatibles con la ocupación del receptor. De esta forma, el estado de ocupación no corresponde indefectiblemente con el estado de activación y, no se puede hablar de una teoría de la ocupación (RANG, 1975).

A esta alternativa se le conoce como MODELO DE DOS ESTADOS por que considera que sólo existen dos estados en el receptor:

- estado activo
- estado inactivo

Por otra parte, este modelo postula que la ocupación de los receptores por las moléculas de drogas conlleva un desplazamiento del equilibrio conformacional entre los dos estados, y no por una creación de diferentes estados conformacionales en el receptor, según la droga que se aplique, como postula la teoría de la ocupación.

Un tipo de modelo de dos estados que se ha propuesto como una alternativa a la teoría de la ocupación es análogo al mecanismo alostérico sugerido por MONOD, WYMAN y CHANGEUX (1965). Este modelo es conocido por las siglas MWC y, en principio, fue concebido para ex-

plicar ciertas propiedades de los enzimas alostéricos. Ciertos aspectos de este modelo pueden aplicarse al problema que ahora nos ocupa.

En esencia el modelo MWC postula que:

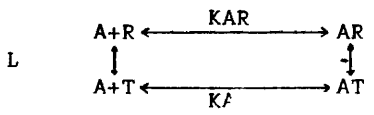
- las proteínas alostéricas constan de oligómeros de subunidades idénticas.
- la conformación de cada subunidad se encuentra forzada por su asociación con otras subunidades, de forma que todas las subunidades, en un momento dado, adoptan la misma conformación.
- el número de conformaciones posibles para el oligómero es pequeño: dos en el caso más sencillo.
- asociado al cambio conformacional de la subunidad se encuentra un cambio en la afinidad para pequeñas moléculas en uno o dos lugares de "enlace" en la subunidad.

Haciendo extensible este modelo al comportamiento de los receptores, se observan dos rasgos característicos que lo distinguen de la teoría de la ocupación (RANG, 1975):

- las conformaciones que corresponden a los estados activo e inactivo del receptor, se encuentran predeterminados y no varían en función del tipo de droga que interaccionan con él. La eficacia de una droga en particular dependerá solamente de su afinidad relativa por estos dos estados conformacionales.
- la interacción de las subunidades, por medio de la cual están todas forzadas a adoptar la misma configuración, capacita al sistema para funcionar con COOPERATIVIDAD: existe una relación sigmoide y no hiperbólica entre la fracción de

receptores activados y la concentración de la droga. En contraste, en la teoría de la ocupación, el estímulo (directamente proporcional a la ocupancia) es una función hiperbólica de la concentración.

Pasemos ahora a considerar el modelo de dos estados más sencillo que podría ser aplicado a los receptores. En este modelo los receptores se conceptúan como monómeros de dos estados y no presentan interacciones entre ellos (RANG, 1975), (COLQUHOUN, 1975):



T: estado inactivo

R: estado activo

Las constantes de equilibrio KAR y KAT, son diferentes para las dos conformaciones.

En ausencia de droga la distribución de R y T depende de la constante de isomerización L.

La constante de equilibrio de la transición AR ⟷ AT, es igual a: LM

siendo $M = \frac{KAR}{KAT}$

M representa la selectividad de la droga por uno u otro estado conformacional:

M será menor que 1: agonista completo

M será = 1: la droga no discrimina entre los dos estados conformacionales y se mantiene el equilibrio R⟷T

M será mayor que 1: antagonistas

En este modelo de dos estados, la función de estado es la relación existente entre el número de receptores en conformación R, ac

tiva, y la concentración de la droga. La función de estado viene dada por:

$$Pr = \frac{Ca + 1}{Ca + 1 + L(MCa + 1)}$$

siendo:

Pr: receptores en conformación activa

Ca: Xa / KAT

Por otra parte, la función de ocupación (ocupancia) que es la relación entre los receptores ocupados (Pa) con la concentración de la droga viene dada por:

$$Pa = \frac{Ca(LM + 1)}{Ca + 1 + L(MCa + 1)}$$

La principal diferencia entre la función de estado y la ecuación de Langmuir es que en la primera -Pr- no es cero en ausencia de droga.

El aspecto más importante del modelo de dos estados, es que confiere un significado físico al término de eficacia.

d)- Cooperatividad

El modelo descrito anteriormente muestra una relación hiperbólica entre la función de estado (número de receptores en conformación R) y concentración de la droga.

Sin embargo, aparte de funciones tan conocidas como la relación hemoglobina-sustrato que muestra una relación sigmoidea, hay cierta evidencia de que el aumento de conductancia a nivel de placa motora (que se asume como directamente proporcional a la función de estado), y la concentración de la droga, muestran una relación sigmoide, cooperativa (KATZ, THESLEFF, 1957); (COLQUHOUN, 1973).

La cooperatividad, supone que el efecto observado y cuantificado muestra una relación con la concentración de droga que se expresa como una función sigmoide.

Interpretración teórica de la cooperatividad.- El primer modelo teórico que incluye una función de cooperatividad fue propuesto por KARLIN (1967).

El postulado de KARLIN, sostiene que los receptores están agrupados en oligómeros, dentro de los cuales todas las subunidades se ven forzadas a tener la misma configuración. Cada conformación tiene una afinidad distinta para las moléculas de drogas y es, en definitiva, el acoplamiento entre ellas lo que posibilita la cooperatividad.

El comportamiento en equilibrio de este sistema viene definido por dos ecuaciones:

- si el número de subunidades es n,

Función de estado: relaciona la fracción de oligómeros en estado -PR- y -PT- con la concentración de la droga:

$$PR = \frac{(1+Ca)^n}{L(1+Ma\,Ca)^n+(1+Ca)^n}$$

PR :receptores activos
PT: " inactivos

Función de ocupancia: relaciona el número total de sitios ocupados -PA- con la concentración de la droga:

$$PA = \frac{Ca(1+Ca)^{n-1}+LMa\,Ca(1+Ma\,Ca)^{n-1}}{L(1+Ma\,Ca)^n+(1+Ca)^n}$$

Ambas funciones muestran cooperatividad.

Este modelo teórico particular no tiene aún un apoyo experimen-

tal concluyente. Sin embargo, la mayoría de las observaciones experimentales (KATZ y THESLEFF, 1957), (JENKINSON, 1960), (JENKINSON y TERRAR, 1973) y RANG, 1971,1973) tienden a demostrar la existencia de una acción cooperativa a nivel de la interacción droga-receptor colinérgico. Esta acción cooperativa puede conceptuarse desde una doble vertiente:

- la interacción de una molécula de acetilcolina con el receptor, aumenta la probabilidad y facilita la unión de otras moléculas de acetilcolina con los receptores.
- la interacción de una droga agonista con el receptor desplaza el equilibrio conformacional de los receptores hacia la forma activa y este desplazamiento facilita a su vez el cambio conformacional de otros receptores vecinos hacia la forma "abierta" -que presenta mayor afinidad por el agonista- involucrando en ello un mecanismo de tipo cooperativo.

3)- RECAPITULACION

El receptor colinérgico es una estructura unida estrechamente a la membrana celular que presenta una alta especificidad por la acetilcolina y otros agentes colinérgicos.

Se ha visto también, que se puede establecer una analogía entre el mecanismo operativo del receptor y un proceso enzimático; de forma que, se puede concebir el mecanismo de activación del receptor como un proceso de cambio conformacional de la molécula del mismo. Este cambio conformacional exige la interacción previa receptor-droga o transmisor. A su vez, el cambio conformacional conlleva la apertura de canales iónicos a través de la membrana postsináptica.

Un modelo operativo de interacción droga-receptor, aplicable a la unión neuromuscular de la rana es el siguiente (BARRET y MAGLEBY 1976):

$$nACh+R \underset{K2}{\overset{k1}{\rightleftharpoons}} AChnR \underset{\alpha}{\overset{\beta}{\rightleftharpoons}} AChnR'$$

donde:

R, molécula de receptor

n, número de moléculas de ACh

AChnR, complejo AChnR inactivo

AChnR', complejo AChnR activo

K1 y K2, constantes de velocidad: K1, unión de ACh
K2, liberación de ACh

β α, constantes de velocidad: β apertura de canales
α cierre de canales

Se asume que el sistema funciona de acuerdo al modelo de dos estados.

Este modelo particular predice que la conductancia de un canal único debe ser independiente de la droga utilizada para "abrir" el canal. Sin embargo, COLQUHOUN, DIONNE, STEINBACK y STEVENS (1975) han demostrado, mediante la técnica de análisis de ruido, que la conductancia de un único canal varia de acuerdo con la droga utilizada. Esto podría ser debido a que las diferentes drogas inducen diferentes cambios conformacionales (teoría de la ocupación); o bien, se podría asumir que el receptor posee más de un sitio de interacción (ALBUQUERQUE et. al. 1974), KUBA, ALBUQUERQUE, BARNARD, 1973). En este sentido, se podría postular que algunas drogas interaccionarían en "sitios" secundarios a nivel del receptor o bien en "sitios" cuyo efecto sería modulatorio en lo que respecta a la conductancia del canal iónico.

En suma, la eficiencia de una droga "A" agonista a nivel del receptor depende:

- de la facilidad de interacción con el receptor (k1, K2)
- de la velocidad de apertura del canal cerrado (beta)
- de la conductancia del canal abierto y de su vida media (1/alfa)
- K1, K2, beta y alfa, serían función de la droga en particular.

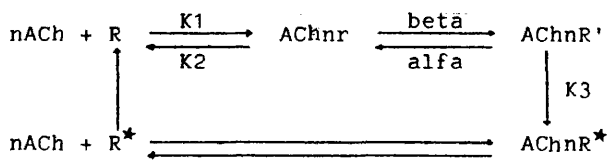
4)- DESENSIBILIZACION DE LOS RECEPTORES

Experimentalmente se ha demostrado que la amplitud de la depolarización producida por la aplicación de ACh u otro agonista a nivel de la placa motora, disminuye con el tiempo, aún en presencia de una concentración constante de la droga (KATZ, THESLEFF, 1957); (NASTUK, PARSONS, 1970); (MAGAZANIK, VYSKOCIL 1970); (JENKINSON, TERRAR, 1973). Se postula que esta desensibilización-disminución de la capacidad de la membrana postsináptica para responder a agonistas-, es debida a que los receptores se "transforman" de alguna manera en una conformación desensibilizada ante la presencia continuada de agonistas (KATZ, THESLEFF 1957), RANG, RITTER, 1970 a,b).

La cinética de la desensibilización depende de la forma de aplicación de las drogas: si se aplica por iontoforesis, la desensibilización se desarrolla y recupera con una constante de tiempo de segundos (KATZ, THESLEFF, 1957); si la droga se añade al baño, la constante de tiempo es del orden de minutos (THESLEFF, 1955);(RANG, RITTER, 1970 a); (JENKINSON, TERRAR, 1973).

Esta diferencia en las constantes de tiempo, sugiere que puede haber dos procesos diferentes involucrados en la mecánica de la desensibilización (RANG, RITTER, 1970a).

Un modelo operativo para explicar cualitativamente las propiedades de la desensibilización es el propuesto por BARRET y MAGLEBY, (1976):



Según esta hipótesis, el complejo receptor-canal puede existir en tres formas básicas:

- desensibilizado y cerrado: $R^{\star}$
- efectivo y cerrado: R
- efectivo y abierto R'

La ACh puede combinarse con $R^{\star}$ o R, pero la interacción ACh-receptor desensibilizado no puede abrir un canal.

K3 y K4 son muy lentas en comparación con las demás constantes del modelo (KATZ, THESLEFF 1957).

En este modelo, la desensibilización no es una consecuencia necesaria de la apertura de canales, ya que sólo una fracción de los canales abiertos se desensibiliza.

El significado funcional de la desensibilización no está del todo claro, ya que el mecanismo fisiológico básico que protege a los receptores de una prolongada exposición a ACh es la AChE.

E)- EL RECEPTOR COLINERGICO

1)- EL RECEPTOR COLINERGICO

PAUL EHRLICH (1910,1913) y LANGLEY (1905,1907), suelen ser considerados como los introductores del concepto de receptor en biología. En 1900, EHRLICH escribió: "el protoplasma está provisto de ciertas agrupaciones atómicas cuya función consiste en unirse a ciertos metabolitos esenciales a la célula. Siguiendo la nomenclatura de la química orgánica, podemos denominar a tales agrupaciones CADENAS LATERALES. Podemos asumir también que la disposición de los átomos en tales cadenas laterales corresponde a la estructura de los mismos metabolitos; cada grupo de éstos, se uniría a un grupo correspondiente de la cadena lateral. La relación entre tales grupos complementarios de los metabolitos y la célula debe ser específica."

El concepto de cadena lateral fue extendido por EHRLICH a la farmacología. El razonamiento del citado autor, propugnaba que la acción de una droga sobre determinada materia viva requería la combinación previa de dicha droga con grupos químicos o cadenas laterales presentes en la superficie celular.

LANGLEY (1905,1907,1909), llegó a conclusiones similares analizando la acción de determinadas drogas sobre diferentes clases de tejidos. Entre otros hallazgos, destacamos que LANGLEY demostró la existencia de contracciones musculares subsiguientes a la aplicación local de nicotina y acetilcolina a nivel de la unión neuromuscular de los mamíferos. El pensamiento de LANGLEY concreta que para que una droga actue sobre determinados tejidos, es preciso que los tejidos posean una sustancia receptora específica para la molécula de la droga.

La idea primera de LANGLEY postulando la existencia de "sustan-

cias receptivas" fue recogida por DALE, FELDBERG y VOGT (1936), quienes establecieron que la neurotransmisión estaría mediada por la interacción de la ACh -liberada desde el terminal presináptico- con lugares receptores específicos para la ACh a nivel de la membrana muscular.

Durante muchos años la idea de quimioreceptor fue utilizada de forma empírica. Los receptores eran concebidos como una superficie o zona celular cuya topografía química complementaba la configuración de la molécula de la droga. Esta concepción abrió paso a una etapa de estudio del receptor colinérgico desde el punto de vista farmacológico: la superficie receptora era explorada minuciosamente determinando la actividad de cada uno de los miembros de series de compuestos homólogos, en los que la configuración de la molécula de un fármaco es transformada o distorsionada paso a paso. Este abordaje aportó algunos datos al estudio de los receptores, pero globalmente no esclareció el problema de la naturaleza química del receptor ni tampoco el de su localización.

Un avance notable en el estudio de la caracterización de los receptores fue posible gracias a la aplicación de técnicas biofísicas a problemas farmacológicos y neurofisiológicos. Esta novel imagen de los receptores (DEL CASTILLO, 1971); FATT y KATZ, 1951); (DEL CASTILLO y KATZ, 1955a), puede resumirse:

- la sensibilidad química específica de ciertas sustancias de la membrana celular a la acción de transmisores químicos o drogas aplicadas desde el exterior, es debida a la existencia, a su nivel, de receptores específicos. Estos receptores se pueden concebir como entidades microestructurales.
- se cree que sólo parte de la superficie total del receptor se combina con el transmisor químico o con la droga: esta

zona es denominada superficie aceptora del receptor.

- la superficie aceptora estaría situada en la interfase que separa la membrana celular del líquido extracelular: puede conceptuarse como un elemento "flotante" a modo de un iceberg, parte de cuya superficie emerge del medio en que está contenida quedando el resto sumergido y fijado-enraizado- de alguna manera en la membrana. Al clarificarse posteriormente la naturáleza de los receptores, esta concepción coincidiría con el modelo de membrana de SINGER y NICOLSON (1972).

- la superficie aceptora se encuentra exclusivamente en la cara externa de la membrana. Desde el punto de vista de su sensibilidad para el transmisor, la membrana es asimétrica: sólo es sensible a nivel de su superficie externa.

- se cree que, por lo menos durante periodos determinados, los receptores ocupan posiciones fijas en la membrana y existen en número constante a nivel de la misma.

- debido a la característica topográfica química de la superficie aceptora, los receptores poseen un alto grado de especificidad química. Quiere esto decir, que se combinan o reaccionan con moléculas que poseen una configuración y distribución de cargas que se complementa con las existentes a nivel de la superficie aceptora.

- por la razón anteriormente expuesta, la interacción entre un receptor y una molécula de droga o transmisor da lugar a la formación de un complejo en el cual las funciones químicas y cargas complementarias de sus dos mitades se unen por enlaces relativamente débiles, lábiles y reversibles.

- como resultado de la formación del complejo droga receptor, ocurre un cambio estérico de algún tipo en el receptor y/o en las estructuras circundantes. Consecuencia de ello es la apertura -a nivel de la membrana postsináptica- de canales permeables a determinados iones. Esto conlleva una disminución de la resistencia eléctrica de la membrana a este nivel.

Esta imagen de los quimioreceptores concebidos como válvulas iónicas y como mecanismos transmutadores y amplificadores de energía, representa un gran avance en la comprensión y estudio del receptor sináptico. A pesar de ello, la información obtenida con las técnicas biofísicas es insuficiente pues no llega al fondo del problema, esto es: la completa caracterización de la naturaleza química de los receptores y los mecanismos operativos que subyacen a su actuación como "válvulas iónicas".

Complementa y completa el enfoque anterior el estudio del receptor colinérgico desde el punto de vista BIOQUIMICO. En esta línea de trabajo, WASER (1960-67) -utilizando la técnica de la autoradiografía-, empleó curare y decametonio radiactivo para intentar calcular el número de receptores colinérgicos en la U.N.M. de los mamíferos. Este tipo de experimento distó mucho de aportar datos significativos, ya que parte de las drogas eran retenidas a nivel extrasináptico (WASER, 1966).

Fue el descubrimiento de la alfa bungarotoxina por CHANG y LEE (1963), lo que marcó un hito en el estudio del receptor colinérgico desde el enfoque bioquímico. En efecto, la alfaBUTX constituyó el medio ideal para realizar análisis farmacológicos y ultraestructurales de los receptores colinérgicos. Esto es así porque la alfa BUTX constituye un ligando altamente específico y prácticamen

te irreversible del receptor colinérgico nicotínico (CHANGEUX, KASAI y LEE, 1970). Con este método, MILEDI y POTTER (1971) determinaron que a nivel de la placa motora de la rana el número de moléculas de toxina que se unían era de 10^9. Sin embargo, se observó que también la alfa BUTX se unía en regiones extrasinápticas de una manera difusa. Este tipo de unión era mayor a medida que aumentaba la concentración de alfa BUTX. POTTER (1973), sugiere que los sitios extrasinápticos de unión podrían ser subunidades de "reconocimiento" del receptor que no estarían acopladas al ionoforo de la macromolécula receptora.

Junto a este tipo de estudios se ha realizado también intentos de aislamiento del receptor colinérgico utilizando diversos procedimientos bioquímicos entre otros (O'BRIEN, ELDEFRAWI, ELDEFRAWI, 1972). Sin embargo, en el sentir de algunos, entre otros (DEL CASTILLO, 1971; COHEN, 1975) la homogeneización de células y tejidos con la finalidad de aislar y purificar la sustancia receptora no han resultado del todo concluyentes. Ello es debido a que en realidad la función de los receptores de membrana está unida tan íntimamente a las estructuras celulares circundantes que en el momento en que éstas se destruyen, no es posible asegurar que las fracciones de membrana aisladas contienen o no la sustancia receptora. El hecho de que haya sustancias en estas fracciones que se combinan con el transmisor o con drogas no permite aseverar la existencia de sustancias receptoras en dichas fracciones.

En suma, y recogiendo los criterios de DE ROBERTIS (1971), la identificación y el aislamiento de una sustancia presumiblemente receptora debe cumplir las siguientes premisas:

- el receptor debe ser una macromolécula localizada esencialmente a nivel de la membrana subsináptica.

- debe ser una macromolécula embebida íntimamente en la estructura lipoproteica de la membrana.
- debe presentar alta y específica afinidad por los transmisores endógenos naturales.
- las macromoléculas deben ser capaces de sufrir un cambio conformacional reversible cuando interaccionan con el transmisor. Este cambio subyace al cambio de conductancia y respuesta bioeléctrica de la membrana postsináptica.

CHANGEUX, PODLESKI y MEUNIER (1969), han elaborado un modelo hipotético de receptor que conceptuamos como una primera aproximación al problema de la caracterización del receptor colinérgico nicotínico. Fundamentalmente este modelo supone la existencia a nivel de la membrana subsináptica de un "PROTOMERO DE ACETILCOLINA".

El protómero constaría de dos entidades estructurales:

- el receptor macromolecular de ACh que tendría la capacidad de reconocer específicamente la molécula neurotransmisora,y
- el ionoforo: estructura involucrada en el trasiego de iones consecutivo a la interacción ACh-receptor.

Estudios más recientes apoyan esta hipótesis, ya que en la electroplaca del Torpedo ha sido aislada una proteína con capacidad de unirse a la ACh (EDELSTEIN, BEYER y ELDEFRAWI, 1975), y otra macromolécula que ha sido denominada "modulador de conductancia iónica" (M.C.I.) (ELDEFRAWI et al. 1977). El M.C.I. podría corresponder al ionoforo del modelo de CHANGEUX, PODLESKI y MEUNIER.

En la actualidad se utiliza un enfoque multidisciplinario-bioquímico, farmacológico, electrofisiológico, inmunológico y morfológico para intentar establecer la base morfológica de la excitabilidad química y de la electrogénesis. Aunando estos métodos y enfoques

diversos, RASH, HUDSON y ELLISMAN (1978), proponen que el receptor colinérgico nicotínico funcional a nivel de la placa motora del mamífero sería un complejo RECEPTOR ACh M.C.I.. Este complejo constituiría un agregado multimolecular formado por ocho o nueve subunidades periféricas. Estas subunidades periféricas funcionarían como lugares de reconocimiento del transmisor y estarían situadas en torno a una subunidad central aún poco definida pero que podría constituir:

- un M.C.I., u
- otra proteína receptora idéntica a las periféricas.

En efecto, en la actualidad se acepta que la macromolécula receptora es una glicoproteína (BARRETT y MAGLEBY, 1976), (FAMBROUGH 1979). El peso molecular de la glicoproteína es de 40.000-65.000 Daltons y estaría compuesta de varias subunidades.

Para llegar a esta aseveración sobre la naturaleza proteica de los receptores se ha recorrido un largo y laborioso camino en el terreno de la investigación multidisciplinaria. Es nuestro propósito hacer referencia a los momentos e hitos importantes de este recorrido. Para ello, comenzaremos por hacer una breve reseña histórica que nos permitirá apreciar con más claridad los diversos conceptos y tendencias actuales que atañen la naturaleza proteica de los receptores.

2)- NATURALEZA PROTEICA DEL RECEPTOR COLINERGICO - GRUPOS SH y RECEPTOR COLINERGICO

Para la comprensión de la historia natural de los receptores tuvieron relevancia los estudios iniciados por GINETZINSKI y SHAMARINA (1942) en Rusia, y proseguidos con técnicas más modernas por AXELSSON y THESLEFF (1959); KATZ (1962, 1966); MILEDI (1960, a,b, c, 1962) entre otros. En esencia, estos trabajos demostraron que los receptores no son un rasgo fijo e inmutable de la membrana celular, sino que por el contrario están en continuo crecimiento y renovación. Los receptores parecen ser entidades químicas que son sintetizadas por el citoplasma pasando luego a ocupar su posición a nivel de la membrana celular. Su distribución en la superficie celular está bajo el control de las terminales nerviosas presinápticas, que posiblemente liberan una o varias sustancias de naturaleza proteica que regulan la síntesis de los receptores en el citoplasma o bien su estado de funcionalidad en la superficie celular. Es un hecho que si estas influencias se eliminan, -por destrucción de las terminales presinápticas-, los receptores proliferan y se extienden por casi la totalidad de la superficie celular.

Establecido este carácter de renovación y crecimiento de los receptores, y conocido el hecho de su regulación por sustancias liberadas desde el terminal presináptico, se intentó abordar la caracterización química de los receptores sinápticos. Se sabe que -para cumplir su función-, los receptores deben ser capaces de reconocer las moléculas del transmisor. Este reconocimiento debe ir seguido de un cambio ultraestructural que resulte en un cambio de permeabilidad iónica de la membrana subsináptica. Para cumplir esta función, las proteínas fueron las primeras sustancias que se concibieron como capaces de realizarla.

En efecto, las moléculas proteicas serían sumamente adecuadas para servir de receptores. Por un lado, poseen un alto grado de especificidad química: sirvan de ejemplo los enzimas y los anticuerpos. Por otra parte, son capaces de sufrir cambios estéricos que en casos extremos tiene como consecuencia el acortamiento de toda la célula, como sucede en las fibras musculares. En la línea de un razonamiento lógico, cabe por tanto, la posibilidad de que los receptores postsinápticos fuesen moléculas proteicas integrantes de la propia membrana postsináptica con capacidad para reconocer al transmisor químico y con capacidad a su vez de interaccionar con él de alguna forma que condujese ulteriormente al cambio conformacional de la molécula proteica. Este cambio conformacional permitiría el flujo de iones entre el medio intracelular y el medio extracelular.

Siguiendo este razonamiento, NACHMANSOHN (1959), -en ausencia de evidencia bioquímica- sostiene que la interacción droga-receptor produciría la activación del receptor mediante un "plegamiento local" de un grupo proteico que desplaza un grupo amino, cargado positivamente y situado en un punto estratégico. De esta forma, se abrirían canales a través de los cuales se realizaría el flujo iónico característico de la activación.

Con este antecedente histórico y, teniendo presente las características de las reacciones antígeno-anticuerpo, se inició una línea de trabajo que intentó demostrar experimentalmente la naturaleza proteica de los receptores. Es un hecho que la combinación selectiva, específica de las proteínas con ciertas moléculas de muy diverso tamaño y la ocurrencia de cambios estéricos como consecuencia de tal combinación, son típicos de las reacciones Ag-Ac y enzima-sustrato. Estos dos tipos de interacciones son concebidas hoy como la unión relativamente forzada de dos figuras tridimensio

nales que no llegan a encajár perfectamente y no meramente como un fácil acoplamiento entre dos estructuras moleculares complementarias (DEL CASTILLO, 1971).

Por otra parte, se ha demostrado que el volumen, actividad óptica y número de grupos sulfidrilos expuestos de la molécula de anticuerpo, cambian profundamente cuando ésta se combina con el antígeno correspondiente, específico. Igualmente se cree que la formación del complejo enzima-sustrato va acompañado por un cambio en la configuración de la proteína catalítica. Este cambio sería necesario para la precisa orientación y disposición de las funciones y grupos químicos que integran el sitio activo del enzima (DEL CASTILLO, 1971).

En esta línea de pensamiento, la hipótesis que sostenía la naturaleza proteica de los receptores sinápticos encontró apoyo experimental con los trabajos realizados por ALONSO DE FLORIDA, DEL CASTILLO, GARCIA, y GIJON (1968). Estos autores demostraron que las moléculas de diferentes anticuerpos, adsorbidas o incorporadas en la membrana del músculo diafragmático denervado de cobaya, funcionan como receptores específicos para los antígenos homólogos correspondientes.

La combinación de los Ag. con las moléculas de Ac. fijas a la membrana da lugar a un marcado cambio en la resistencia eléctrica de la membrana y, como consecuencia, varía el potencial de membrana. Esto demuestra, que los anticuerpos presentes en la membrana funcionan, desde un punto de vista biofísico, de igual forma que los receptores sinápticos. Los resultados de estos trabajos fueron importantes porque hicieron más plausible la idea de que los receptores de la membrana postsináptica puedan ser moléculas proteicas que comparten ciertos rasgos funcionales con los anticuerpos y enzimas.

3)- GRUPOS SH Y RECEPTORES

Más recientemente, el problema de la naturaleza proteica de los receptores colinérgicos ha sido reexaminado por varios autores, siguiendo una táctica iniciada por el fisiólogo ruso KOSHTOJANZ (1950). Esta consiste esencialmente, en explorar los efectos farmacológicos de reactivos que interaccionan específicamente con algunos de los grupos funcionales de las moléculas proteicas. En efecto, la utilización de reactivos de este tipo provee información, parcial, pero sin duda más específica en lo que respecta a la identificación química del receptor (O'BRIEN, EDELFRAWI y EDELFRAWI, 1972).

KOSHTOJANZ (1950), sugirió que los grupos sulfidrilos de las proteínas musculares jugaban un papel importante en la transmisión de impulsos del nervio al músculo. Su idea se basaba en los resultados de experimentos donde estudió el efecto de inhibidores metabólicos sobre las contracciones producidas por estimulación indirecta del músculo. Este autor demostró que al exponer una preparación neuromuscular al maleato sódico, se producía una disminución brusca de la amplitud de las contracciones. En estas condiciones se creaba un estado parecido a la fatiga muscular profunda producida por estimulación prolongada del nervio motor. KOSHTOJANZ, pensó que tal efecto podría ser debido a que el maleato sódico se combinaba específicamente con los grupos SH. En efecto, experimentos posteriores demostraron que los reactivos que atacan a tales grupos bloquean la Transmisión neuromuscular. El efecto inhibitorio del maleato sódico podía invertirse tratando la preparación con cisteína.

Los conocimientos que se tenían sobre la transmisión sináptica en la época de los trabajos de KOSHTOJANZ eran insuficientes para asignar una función definida a los grupos SH de las proteinas en la

misma. Por ello su obra no alcanzó relieve dentro del pensamiento neurofisiológico, quedando relegada en un nivel bioquímico a una afirmación empírica.

En tiempos posteriores, se ha vuelto sobre el camino iniciado por KOSHTOJANZ, pero utilizando las técnicas y conceptos de la electrofisiología actual. En este terreno lo que se ha hecho es investigar el efecto de reactivos que atacan específicamente a los grupos SH de las proteinas.

En esta línea de trabajo, los experimentos de KARLIN y BARTELS (1966) y KARLIN y WINNIK (1968), demostraron la presencia de un puente disulfuro a nivel del receptor colinérgico de la sinapsis de la electroplaca. MITTAG y TORMAY (1970), llegaron a la misma conclusión trabajando en la unión neuromuscular de la rana.

KARLIN (1969), sostiene que en la sinapsis de la electroplaca, el receptor colinérgico cabe conceptuarse como una proteína que contiene por lo menos un grupo disulfuro en su molécula. Este grupo puede ser reducido y reoxidado in situ. Los citados autores llegaron a la conclusión de que al menos una de las uniones disulfuro del receptor colinérgico que se reducen rompiéndose cuando se trata la preparación con tioles, modificándose así la sensibilidad química del receptor, está a una distancia de aproximadamente 10 Å del subsitio aniónico de la superficie aceptora; es decir, del lugar donde -merced a una atracción electrostática- se combina el nitrógeno cuaternario de las drogas colinérgicas. Esta aseveración fue posible debido a que el receptor reducido tiene la capacidad de unirse de modo covalente -por medio de enlaces químicos de alta energía- a varias maleimidas, proceso que se conoce como alquilación.

Los resultados obtenidos por la escuela de KARLIN pueden resu-

mirse:

- ciertos compuestos agonistas (ACh y otros compuestos monocuaternarios) normalmente efectivos a nivel del receptor colinérgico, se tornan en inefectivos en el receptor con grupos SH reducidos.
- por el contrario, ciertos compuestos normalmente antagonistas (hexametonio), se comportan como agonistas en el receptor reducido. Esto indicaría que la reducción del receptor no sólo lo inactiva sino que de alguna manera cambia su estructura de una manera específica (ZAIMIS, 1976). Este comportamiento particular del receptor reducido no se ha podido constatar a nivel de la unión neuromuscular de la rana (BEN HAIM et al. 1973)
- ciertos derivados maleimídicos con un nitrógeno cuaternario en su molécula, interaccionan en dos subsitios diferentes localizados a nivel del receptor:
    - subsitio aniónico: afinidad por el nitrógeno cuaternario y
    - subsitio representado por el grupo SH (reducido previamente por la aplicación de un agente reductor: DTT). A este nivel interacciona el grupo maleimídico.

  La efectividad de estos derivados maleimídicos es función de la longitud de su molécula, siendo inefectivos los derivados de alquilación cuya longitud molecular es mayor.

Para KARLIN, una posible interpretación de estos hallazgos es que el sitio alquilado del receptor queda unido por un puente, que

es la molécula en cuestión, con el sitio aniónico negativo del receptor y, que la longitud del puente determinaría bien una nueva conformación activa o una conformación inactiva. La distancia se ha estimado en 9 Å para la conformación activa y 12 Å ó más para la inactiva. De modo que las drogas que mantienen estos dos puntos a una distancia de aproximadamente 9 Å se comportan como agonistas o activadoras. Por el contrario, si la droga al combinarse con ambos subsitios, los separa hasta una distancia de 12 Å ó más, se comporta como un agente antagonista o agente bloqueador.

Intentos para demostrar lo anteriormente expuesto a nivel de la unión neuromuscular de la rana, han resultado infructuosos (LINDSTROM, SINGER y LENNOX, 1973). Sin embargo, en otra línea de trabajo que presentaremos más adelante, se ha podido demostrar la proximidad de ambos subsitios en la placa motora de la rana (DEL CASTILLO y SOBRINO, 1974).

En el caso de los receptores colinérgicos de la electroplaca, NO tratados previamente con agentes reductores, las posiciones relativas de sus puntos de unión con la droga no han podido determinarse con precisión, pero KARLIN opina, que en el receptor activo la distancia entre el subsitio aniónico y el segundo enlace, -posiblemente de naturaleza hidrofóbica-, es menor que en el receptor que se encuentra en estado de reposo o bajo la influencia de drogas bloqueadoras. Es de destacar, que KARLIN sostiene que los activadores no covalentes como la ACh, tienden a formar a modo de puentes entre la zona activa aniónica y la zona activa hidrofóbica. Esta segunda unión, sin embargo, en el sentir de KARLIN, NO ES NECESARIA NI SUFICIENTE para la activación del receptor. De forma que este autor conceptúa el puente disulfuro como una entidad estrictamente estructural. Este grupo no se reduciría espontáneamente ni durante la activación del receptor (KARLIN, 1973).

Un hecho a resaltar en el pensamiento de KARLIN es que para este autor, el receptor en estado reducido se combina a la ACh o carbacol, peor; es decir, que la unión receptor reducido-carbacol se traduce en un cambio de permeabilidad menos eficiente y que la posible cooperatividad entre el lugar activo aniónico y el subsitio hidrofóbico disminuye en el receptor reducido; todo ello en comparación con la interacción receptor oxidado-carbacol.

Resultados similares a los de KARLIN han sido obtenidos en otras preparaciones: en el músculo de la rana (MITTAG y TORMAY, 1970); (BEN HAIM et al. 1973); músculo del pollo (RANG y RITTER, 1971) y músculo de la sanguijuela (ROSS y TRIGGLE, 1972).

En el esfuerzo por dilucidar la exacta naturaleza química y caracterización del receptor colinérgico, una segunda línea de trabajo viene representada por la escuela de DEL CASTILLO. En esta línea, varios autores han demostrado experimentalmente que los receptores colinérgicos, o al menos una parte importante del denominado "sistema de permeabilidad controlado por la ACh", es una proteína cuyas características se parecen mucho a las de los enzimas que poseen grupos SH en su molécula; de forma que, el cambio en el potencial de membrana producido por una dosis constante de ACh o carbacol parece ser una función del GRADO DE REDUCCION DE LOS GRUPOS SH del receptor.

Esta línea de trabajo tiene su arranque en los experimentos realizados por DEL CASTILLO, ESCOBAR y GIJON (1971) y proseguidos después por SOBRINO y DEL CASTILLO (1972); DEL CASTILLO, BARTELS y SOBRINO (1972); DEL CASTILLO y SOBRINO (1973) y DEL CASTILLO y SOBRINO (1974). Estos autores, investigando los efectos de la aplicación electroforética de reactivos específicos para grupos SH a nivel de los receptores colinérgicos, no sólo ha confirmado la naturaleza proteica del receptor -o por lo menos parte importante del

mismo-, sino que además han evidenciado que este receptor no sólo puede ser activado por las drogas colinérgicas usuales, sino también por la aplicación rápida de OXIDANTES DE GRUPOS SULFIDRILOS que da lugar a cambios de potencial muy semejantes a los inducidos por la ACh y el carbacol. Sin embargo, la aplicación de los mismos a zonas extrasinápticas no va seguida de efectos apreciables.

En lo que respecta al estudio de los agentes reductores, esta línea de trabajo coincidió en parte con la de KARLIN pues encontraron que:

- el DTT (reductor potente de grupos sulfidrilos), inhibe la acción despolarizante del carbacol; sin embargo,
- otras drogas más debilmente reductoras como el 2ME potencia la acción del carbacol.

El grupo de trabajo de DEL CASTILLO, evidenció, por otra parte, la acción de los metales pesados y mercuriales orgánicos a nivel del receptor sináptico aplicados electroforéticamente. En efecto, cuando se aplican iones de metales pesados a los receptores, es posible obtener "potenciales" que son muy similares a los potenciales de ACh que se obtienen utilizando la técnica electroforética. Estos iones se combinarían con los grupos SH de la proteína receptora formando mercáptidos dobles a modo de puentes. Esta es una reacción parecida a la de oxidación que probablemente produce una distorsión o deformación de la molécula proteica.

Los mercuriales orgánicos constituyen otro grupo de reactivos específicos para los grupos SH de las proteínas. Con ellos también se puede lograr la activación de los receptores colinérgicos. En este proceso, el Hg funciona como ión monovalente. El p-cloro mercurio benzoato, -uno de los mercuriales orgánicos investigados- no solamente activa los receptores, sino que además, ejerce un efec

to potenciador muy marcado sobre la acción despolarizante de las drogas colinérgicas.

La aplicación de cualquiera de estos reactivos, -aún a grandes dosis-, a nivel de regiones extrasinápticas, carece de efectos. En suma, estos experimentos demostraron que:

- los receptores se comportan como enzimas sulfidrílicos y su sensibilidad a la ACh y carbacol aumenta cuando se exponen a ciertos agentes reductores como el 2 ME.
- habría un antagonismo entre ciertos agentes reductores: especificamente entre DTT y 2ME.
- los agentes oxidantes despolarizan la membrana postsináptica. Esto sugiere que la activación inducida por drogas específicas, involucra una oxidación transitoria de los grupos SH.
- la acción despolarizante de iones metálicos y mercuriales orgánicos demuestra que quizá la oxidación no es un imperativo y que la activación del receptor probablemente ocurre siempre que los grupos SH son forzados a abandonar su condición de grupos libres.
- las despolarizaciones obtenidas por aplicación electroforética directa de drogas que interaccionan a nivel del subsitio hidrofóbico, son inhibidas por el curare. Esto sugiere que los grupos SH del receptor se encuentran muy próximos al sitio aniónico (SOBRINO y DEL CASTILLO 1972); (DEL CASTILLO y SOBRINO, 1974).

Los trabajos del grupo de DEL CASTILLO y del grupo de KARLIN, han confirmado la hipótesis de que los receptores sinápticos -y los colinérgicos en particular-, son de naturaleza proteica. Además,

han suministrado suficiente información para permitir una cierta especulación sobre los aspectos moleculares del fenómeno de activación de tales receptores por transmisores químicos y drogas.

En la actualidad, nos encontramos con dos formas diferentes de concebir el receptor colinérgico.

El grupo de trabajo de KARLIN, sostiene -básicamente-, que el receptor colinérgico es una estructura proteica que posee, en reposo, un grupo disulfuro, por lo menos. La transición al estado activo involucraría un cambio conformacional de la proteína que conllevaría fundamentalmente una disminución de la distancia entre el subsitio aniónico y el subsitio hidrofóbico del receptor, con la formación de un puente que interacciona en ambos subsitios.

Para KARLIN, el receptor en estado de reposo y con "potencialidad" de activación, sería la proteína con grupos SH OXIDADOS.

En contraste con lo anterior, el grupo de trabajo de DEL CASTILLO postula que el proceso de activación depende fundamental y principalmente del hecho de que los grupos SH del receptor en reposo, abandonen su estado libre. Apoyan su hipótesis en la posibilidad de activación de los receptores colinérgicos por la aplicación electroforética de reactivos específicos para los grupos SH: iones metálicos, mercuriales orgánicos y, muy especificamente agentes oxidantes. Concluyen afirmando que el proceso de activación requiere la presencia de grupos SH LIBRES en la proteína receptora.

La hipótesis de KARLIN ha recibido abundante apoyo experimental (CHANG, LU, WANG y CHUANG, 1970);(LAMBERT, 1973);(BEN HAIM, LANDAU y SILMAN, 1973); (LINDSTROM, SINGER y LENNOX, 1973); (BEN HAIM, DREYER y PEPER, 1975); (HARVEY y DRYDEN, 1974); (MARQUIS y MAUTNER 1974); (BREGETOVSKI et al. 1977); (TERRAR, 1978). Los resultados experimentales en esta línea de trabajo son homogéneos. Queremos

destacar que el método utilizado en estos estudios es el de aplicación de la droga problema al baño (Ringer) de la preparación.

La hipótesis del DEL CASTILLO, ha sido objeto de numerosas críticas. Entre otros, RANG (1975), sostiene que los iones de metales pesados y los mercuriales forman enlaces muy estables con los grupos sulfidrilos de las proteínas y que estas uniones difícilmente podrían resultar en activaciones FASICAS como las observadas por el grupo de DEL CASTILLO cuando se aplican estas sustancias iontoforéticamente al receptor colinérgico. Esta crítica también se aplica a las despolarizaciones fásicas obtenidas por la aplicación de agentes oxidantes a nivel de la placa, ya que en estas condiciones, se crearían asimismo enlaces covalentes estables (RANG, 1975).

El antagonismo observado por el grupo de DEL CASTILLO entre los efectos del DTT y 2ME (ambos agentes reductores de los grupos SH), también es objeto de crítica (RANG, 1975). DEL CASTILLO, atribuye este antagonismo a la diferente potencia reductora de ambos: el DTT, al ser un poderoso reductor, mantendría los grupos SH completamente reducidos y esta condición no sería operativa para el cambio conformacional indispensable en el proceso de activación. Sin embargo, no se observa un estado de "supersensibilidad" subsiguiente a la aplicación de DTT después de un intervalo de tiempo que permita la difusión del reductor, como sería de esperar si se acepta la citada explicación de DEL CASTILLO, (RANG, 1975).

Podemos añadir a estas críticas la demostración por parte de CHANG, LU, WANG y CHUANG (1970), que el OIB (agente oxidante de grupos SH), inhibe la respuesta contráctil a la estimulación directa e indirecta del músculo sartorio de la rana. Esto contrasta vivamente con las respuestas despolarizantes obtenidas con este mismo reactivo y otros oxidantes por el grupo de trabajo de DEL CASTILLO.

Por último, destacamos la falta de homogeneidad de ciertos resultados experimentales obtenidos por DEL CASTILLO, ESCOBAR y GIJON: ocasionales e irrepetibles despolarizaciones obtenidas por la aplicación de DTT a nivel de receptor y la presencia de un antagonismo transitorio entre el 2 ME y carbacol. Precisamente ésto da lugar a una crítica sobreañadida en lo que al método electroforético se refiere, ya que se ha invocado un efecto "succión" entre los compartimentos de las pipetas dobles. Esto restaría credibilidad a la técnica empleada e introduce un nuevo factor de inestabilidad a los procedimientos empleados en algunos trabajos electrofisiológicos pasados y actuales.

Subyace a estas críticas el diferente concepto de receptor colinérgico que -como hipótesis de trabajo- sostienen el grupo de trabajo de KARLIN por una parte y el de DEL CASTILLO por otra.

En el terreno teórico, es evidente el antagonismo existente entre ambas concepciones.

En el terreno experimental no se encuentran datos -hasta la fecha- que apoyen indefectiblemente a una u otra hipótesis, ya que cada una de ellas cuenta con un amplio sustento de evidencia experimental.

Podría aducirse que los diferentes resultados obtenidos por las dos escuelas serían debidos al hecho de trabajar en preparaciones diferentes. Este razonamiento no puede aceptarse ya que el grupo de DEL CASTILLO, ha obtenido resultados similares no sólo a nivel de la placa motora de la rana, sino también en la sinápsis colinérgica de la electroplaca, (DEL CASTILLO, BARTELS y SOBRINO, 1972).

Cabe preguntarse si las discrepancias observadas por ambas tendencias obedecen a la distinta metodología seguida por cada una de ellas: aplicación electroforética en un caso y aplicación de drogas al baño en el otro.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
BIBLIOTECA

III - OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Establecer los parámetros bioeléctricos convencionales de la preparación del músculo sartorio de la rana; potencial de membrana y propiedades pasivas de la fibra muscular.
- Intentar esclarecer la existencia o no de grupos SH reactivos en la membrana postsináptica de la U.N.M. de la rana.
- Si existen, intentar aclarar si juegan un papel primario o secundario en la activación del receptor.
- Valorar nuestros resultados a la luz de las dos hipótesis existentes sobre la localización de puentes disulfuro en la proteína receptora.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Medida del potencial de membrana y propiedades pasivas a pH 6, 7 y 8 del L.E.C., y evaluar posteriores resultados sobre la base de estos datos previos, ya que se estudiará la actividad de los reactivos sulfhidrílicos a estos pH de L.E.C.
- Microiontoforesis con agentes colinérgicos y reactivos sulfhidrílicos:
  - para valorar la sensibilidad de nuestra preparación al carbacol como prototipo de agente colinérgico.
  - a nivel de la placa motora y en regiones alejadas de la misma para evaluar la especificidad o no de los reactivos sulfhidrílicos por los receptores sinápticos.
  - con pipetas simples de reactivos sulfidrílicos para descartar cualquier efecto atribuible a la utilización de pipetas dobles en la técnica iontoforética.

- con pipetas dobles con agentes colinérgicos y reactivos de grupos SH, con la finalidad de estudiar la posible interacción entre ambos grupos de drogas, y asegurar la aplicación electroforética sobre la zona de los receptores.
- a distintos pH del líquido extracelular, para obviar cualquier interpretación sobre generación de cambios locales de pH durante la realización de la técnica iontoforética.
- en presencia de Beta-Bungarotoxina, para obviar la posibilidad de salida del transmisor por efecto del paso de corriente electroforética.
- evaluar, si es posible, el grado de oxidación y reducción de los grupos SH de la proteína receptora con los diferentes pH extracelulares y su posible repercusión sobre las respuestas a los agentes sulfhidrílicos si las hubiere.

- Estudiar la sensibilidad de la placa motora a los agentes sulfhidrílicos y valorar la eficacia de las drogas utilizadas.
- Determinar el lugar de acción de los agentes sulfhidrílicos, valorando para ello:
  - la sensibilidad sináptica y extrasináptica si la hubiere.
  - la acción del curare sobre las respuestas a los agentes sulfhidrílicos oxidantes y reductores.

IV - MATERIAL Y METODOS

A)- REGISTROS INTRACELULARES

Hemos empleado la técnica de registros intracelulares con microelectrodos que se insertan en el interior de la célula a estudiar (LING y GERARD, 1949), (NASTUK y HODGKIN, 1950) y(FATT y KATZ, 1951). Para ello, y con la finalidad de medir y registrar la magnitud de la variable en cuestión, señal bioeléctrica correspondiente al potencial de membrana y sus fluctuaciones, utilizamos como sistema de visualización un osciloscopio Hewlett Packard 1201 B, al que se aplica la señal recogida por los electrodos de registro y baño mediante un preamplificador M.P.A. 6 Transydine de corriente contínua, con compensador de capacidad y con una ganancia de 10 que funciona como acoplador de impedancias y que tiene un dispositivo de estabilización D.C. que permite llevar a cero la diferencia de potencial que pueda establecerse entre los electrodos de registro y baño.

Previo a su visualización, la señal de salida del preamplificador se lleva a:

- un voltímetro digital Tektronix DM 502 para la monitorización contínua del potencial de membrana durante el experimento.
- una fuente de D.C. que provee el voltaje necesario para mantener la señal centrada en la pantalla del osciloscopio en registro de corriente contínua.
- un amplificador diferencial Tektronix AM 502.

Almacenamiento y reproducción de las señales registradas

Desde el amplificador diferencial Tektronix AM 502, la señal, amplificada por un factor de 5, es enviada simultáneamente a un osci

loscopio Tektronix 5112 para su visualización y a la cinta magnética Hewlett Packard 3964 A, para su almacenamiento.

La señal almacenada se monitoriza mediante visualización de la señal de salida de la cinta magnética, en un osciloscopio Tektronix 5112.

La reproducción gráfica de las señales almacenadas se efectúa con un transcriptor X-Y Hewlett Packard 7015 B mediante la utilización de combinaciones apropiadas de la velocidad de la cinta y del transcriptor, y teniendo en cuenta que en este estudio no era factor importante el estudio del curso temporal de las respuestas, que evidentemente resulta muy deteriorado con este tipo de reproducción gráfica.

La técnica de registro intracelular descrita permite realizar una medida extremadamente correcta de la señal bioeléctrica en estudio. Sin embargo, la exactitud de la misma puede verse afectada por determinados factores que deben ser obviados durante la realización experimental:

- daño celular al penetrar el microelectrodo al interior de la célula. Puede ser evitado controlando minuciosamente la impedancia de los electrodos a emplear y puede ser detectado si se monitoriza permanentemente el potencial de membrana, ya que una pérdida de negatividad del mismo es indicativo de lesión celular. En este sentido, nosotros hemos controlado la impedancia del electrodo de registro antes y durante el experimento, desechando aquellos electrodos con una impedancia inferior a 10 Megaohmios. Simultáneamente y para trabajar con un alto factor de seguridad, hemos monitorizado de forma contínua el potencial de membrana, suspendiendo el experimento si se observaba una pérdida de la negatividad del mismo.

- potenciales de "punta": puede crearse una diferencia de potencial entre la punta del microelectrodo y los líquidos circundantes. Esta diferencia de potencial puede aumentar al penetrar el microelectrodo al interior de la célula, de forma que la medida del potencial de membrana puede resultar inexacta. Nosotros hemos obviado este problema, controlando la diferencia de potencial entre los electrodos de registro y baño, antes y después de la penetración de la célula.

B)- MEDIDA DE LAS CONSTANTES ELECTRICAS DE LA MEMBRANA DE UNA CELULA EXCITABLE

FATT y KATZ (1951), describieron un método para medir las constantes eléctricas pasivas de una fibra muscular utilizando microelectrodos intracelulares. Dos electrodos son necesarios para tal fin:

- uno para registrar la diferencia de potencial y
- otro para aplicar pulsos calibrados de corriente al interior de la célula.

La ecuación básica de esta técnica fue derivada de la teoría de cable de HODGKIN y RUSHTON (1946):

$$Vx = \frac{I}{2}\sqrt{rm\ ri}\quad \exp\left[\frac{-x}{\sqrt{rm/ri}}\right]$$

donde: Vx es el potencial registrado a una distancia x del electrodo que inyecta la corriente

I es una corriente contínua y constante inyectada en el punto 0.

$1/2\ \sqrt{rm\ ri}$ es la resistencia input de la fibra

Valores idénticos de resistencia efectiva pueden conseguirse con diferentes combinaciones de rm y ri. Por ello, es necesario otro término que dé la relación entre rm y ri. Este término es lambda; es decir, la constante de espacio de la membrana que se define como:

$$\lambda = \sqrt{rm/ri}$$

Medida directa de la resistencia input de la membrana

Se logra registrando a la vez la corriente inyectada en la fibra y la variación de potencial producida cuando los dos microelectrodos (de registro y de polarización) están separados por una distancia no mayor del diámetro de la fibra.

Para obtener pulsos de corriente calibrados nos hemos valido del programador de microiontoforesis W.P.I. 160 de corriente constante, de un generador de intervalos W.P.I. 830, y de un generador de pulsos W.P.I. 831. Las características de este sistema se detallarán en el siguiente apartado.

Hemos aplicado pulsos de 10,20,30,40,50,60 y 70 nanoamperios de polaridad positiva y negativa, a fin de obtener despolarizaciones e hiperpolarizaciones.

La duración de los pulsos debe ser tal, que la membrana se cargue o descargue totalmente, de modo que, la modificación de voltaje alcance su valor asintótico.

Los valores de corriente inyectada y la diferencia de potencial registrado se llevan a una gráfica; en abscisas, intensidad de corriente en nanoamperios y en ordenadas, diferencia de potencial en milivoltios.

El valor de la resistencia input es la pendiente de la recta y se expresa en Ohmios.

Medida de la constante de tiempo de la membrana

La constante de tiempo, tau, viene definida por:

$$tau = Rm \cdot Cm$$

En la práctica consideramos que tau es el tiempo en que se consigue alcanzar 2/3 de la variación total de voltaje. El valor se expresa en milisegundos.

Cálculo de la capacidad de la membrana

La capacidad de la membrana viene definida por:

$$Cm = tau / Rm$$

Para conocer Rm, debemos conocer el diámetro de la fibra y la resistencia interna Ri de la misma. En nuestro cálculo hemos tomado valores medios de estos parámetros (FATT, y KATZ, 1951):

- diámetro de la fibra; $\pm$ 130 Micras
- Ri; 250 ohm. cm.

Con estos datos previos se puede calcular la capacidad de la membrana de la siguiente manera:

$$Ro = \frac{1}{\pi} \frac{Rm\, Ri}{d^3}$$

Ro; resistencia input. Se expresa en Ohmios

d; $\pm$ 130 Micras

Ri; 250 Ohm. cm

$$Rm = \frac{Ro^2 \pi^2 d^3}{Ri} = \pm 4000 \Omega cm^2$$

Conocidos Rm y tau, podemos calcular Cm.

La capacidad de la membrana se expresa en Microfaradios/cm^2

C)- MICROIONTOFORESIS

La microiontoforesis es una técnica que permite aplicar sustancias ionizadas de forma localizada y selectiva a nivel del espacio extracelular, en las proximidades de la membrana celular y/o en el espacio intracelular. La "inyección" de las sustancias ionizadas puede ser controlada con relativa facilidad, mediante la aplicación de una corriente de adecuada intensidad y correcta polaridad, a través de una micropipeta de vidrio. Esta micropipeta contiene en su interior la sustancia ionizada que se desea aplicar; de esta forma, la microiontoforesis es una técnica que, globalmente, permite aplicar sustancias ionizadas de manera localizada y selectiva sobre una gran gama de preparaciones biológicas. La microiontoforesis es, además, una técnica de gran utilidad, ya que en ella, los parámetros tiempo y espacio pueden ser convenientemente controlados.

1) Principios básicos de la microiontoforesis

La técnica fue descrita por NASTUK en 1953. En 1964, CURTIS introduce el término de microelectroforesis. Desde entonces, se restringe el uso del término "iontoforesis" al movimiento de partículas ionizadas producido por la aplicación de una corriente de polaridad adecuada a través de la micropipeta que contiene en su interior una solución concentrada de la sustancia en forma ionizada. El uso del término de microelectroforesis para describir esta técnica es, en rigor, más correcto, ya que deja paso a la posibilidad de que no toda la sustancia se libera desde la pipeta en forma ionizada. En efecto, siempre existe un componente de electroosmosis cuando se utiliza esta técnica, pero,como en todo caso, una gran proporción de la sustancia contenida en la pipeta

sale en forma ionizada cuando se aplica una corriente de signo adecuado, el término de microiontoforesis se ha generalizado para designar esta técnica.

El principio básico de la técnica, radica en la aplicación de una corriente a través de la micropipeta para ocasionar la salida de la sustancia contenida en su interior en forma ionizada. De esta forma, se produce la salida de cationes cuando la corriente que se aplica al interior de la pipeta es positiva; equivale a hacer el interior de la pipeta positivo con respecto al medio exterior. Inversamente, la aplicación de una corriente de signo negativo origina la salida de aniones desde la punta de la pipeta hacia el exterior. A esta corriente se le denomina "corriente de eyección" o "corriente electroforética", o "corriente de pulso electroforético".

Para prevenir el flujo de iones desde la punta de la micropipeta cuando ésta no se utiliza o entre pulso y pulso electroforético, se aplica una corriente contínua de polaridad opuesta a la corriente de eyección. A esta corriente se le denomina "corriente de retención" o "corriente de freno".

En el estudio de la técnica de microiontoforesis, hay que considerar varios aspectos de la misma. Entre éstos, los más importantes son:

- liberación espontánea de la sustancia desde la micropipeta
- corriente de freno
- pulso de eyección electroforético
- componente electroosmótico

2)-Liberación espontánea, eflujo espontáneo, de la sustancia desde la punta de la micropipeta

En la práctica, el eflujo espontáneo puede reducirse aplicando una corriente de freno adecuada. Sin embargo, no se puede suprimir del todo con ningún valor finito de corriente de freno y, además estas corrientes "vacían" la punta de la pipeta de su contenido de sustancia activa. Sólo creando una solución extremadamente diluída inmediatamente dentro de la punta del electrodo, puede la corriente de freno contrarrestar el flujo contínuo y espontáneo desde la punta de la micropipeta (BRADSHAW y SZABADI, 1974).

Aunque, en general, la existencia de un "pool" de líquido inerte dentro de la punta del microelectrodo no tiene mayores consecuencias, en ciertas condiciones experimentales puede ser demasiado grande y consecuentemente se ve reducida la cantidad de iones activos que pueden ser liberados por la aplicación de una corriente electroforética (BRADSHAW,et al.(1973)

El eflujo espontáneo de sustancia desde las micropipetas es debido a dos factores:

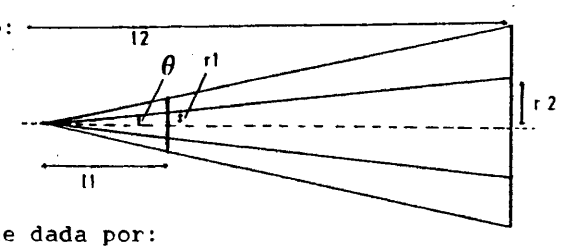
- difusión de la sustancia desde el interior hacia el exterior
- flujo masivo de la sustancia debido a la presión hidrostática creada por la columna vertical de fluído contenida en en interior del microelectrodo.

El estudio teórico de ambos factores fue abordado por KRNJEVIC, MITCHELL y SZERB (1963).

Difusión

Se asume que la porción más estrecha de la micropipeta tiene la

forma de un cono:



la difusión viene dada por:

$$\dot{Q}_D = D\,\pi\,r^2 dc/dl$$

$\dot{Q}_D$: difusión en moles/sec.

D: coeficiente de difusión

r: radio interno de la pipeta

dc/dl: gradiente de concentración dentro de la pipeta

El radio r y la longitud l están relacionados de forma que:

$$\tan\theta = \frac{\operatorname{sen}\theta}{\cos\theta} = \frac{r/h}{l/h} = r/l \Rightarrow l = r/\operatorname{tg}\theta$$

$$dl = dr/\operatorname{tg}\theta$$

h: hipotenusa del triángulo rectángulo cuyos catetos son r y l

θ: ángulo formado entre el eje de la pipeta y su pared interna

sustituyendo

$$\dot{Q}_D = D\,\pi\,r^2\,dc/dr/\operatorname{tg}\theta$$

$$\dot{Q}_D = D\,\pi\,r^2\,\operatorname{tg}\theta\,dc/dr \Rightarrow dc/dr = \frac{\dot{Q}D\,dr}{D\,\pi\,r^2\,\operatorname{tg}\theta}$$

integrando entre los límites $r1$ y $r2$

$$C = \int_{r1}^{r2} \frac{\dot{Q}D\,dr}{D\pi r^2 \operatorname{tg}\theta} = \frac{\dot{Q}D}{D\pi\operatorname{tg}\theta}\int_{r1}^{r2}\frac{dr}{r^2} = \frac{\dot{Q}D}{D\pi\operatorname{tg}\theta}\left[-\frac{1}{r}\right]_{r1}^{r2}$$

$$C = \frac{\dot{Q}D}{D\pi\operatorname{tg}\theta}\left[-\frac{1}{r2} + \frac{1}{r1}\right]$$

$$C = \frac{\dot{Q}D}{D\pi tg\theta}\left[\frac{1}{r1} - \frac{1}{r2}\right]$$

$$\dot{Q}_D = \frac{C\,D\,\pi\,tg\,\theta}{1/r1 - 1/r2}$$

r1 : radio interno de la punta

r2 : radio interno del extremo opuesto a la punta

como:

$$r2 >> r1$$

$$1/r2 << 1/r1$$

y $1/r2 \Rightarrow 0$

$$\dot{Q}D = \frac{C\,D\,\pi\,tg\,\theta}{1/r1}$$

$$\dot{Q}D = C\,D\,\pi\,tg\,\theta\,r1$$

Flujo masivo

La importancia del flujo masivo -eflujo espontáneo ocasionado por la presión hidrostática-, fue realzada por KRNJEVIC, MITCHELL y SZERB (1963). Estos autores observaron que en ausencia de una corriente de freno, el eflujo espontáneo de la sustancia contenida dentro de la micropipeta, estaba en relación con la resistencia de los electrodos.

Los resultados experimentales de KRNJEVIC, se ajustan con una curva teórica que relaciona la liberación espontánea con sólo dos parámetros:

- la concentración de la sustancia en el microelectrodo

- la "forma física" de las puntas de los microelectrodos.

Sobre esta base se sugirió que el eflujo espontáneo de la sustancia activa -acetilcolina en los estudios de KRNJEVIC, MITCHELL y SZERB-, desde un microelectrodo, no era solamente debido a una difusión de iones desde la solución concentrada en el interior de la micropipeta hacia el medio externo, sino que también era el resultado de un flujo masivo debido a la presión hidrostática existente en el interior del microelectrodo.

El estudio téorico y experimental del flujo masivo fue realizado por KRNJEVIC, MITCHELL y SZERB (1963).

El flujo masivo viene dado por:

$$\dot{V} = \frac{\pi r^4}{8\eta} \, dp/dl$$

$\dot{V}$: flujo masivo en ml/sec

η : coeficiente de viscosidad

dp/dl: gradiente de presión

teniendo en cuenta que:

$$tg\,\theta = sen\,\theta / cos\,\theta = r/l$$

$$l = r/tg\,\theta$$

$$dl = dr/tg\,\theta$$

$tg\,\theta\ (dp/dr)$ se puede sustituir por dp/dl y tenemos:

$$\dot{V} = \frac{\pi r^4}{8\eta} \, tg\,\theta \, \frac{dp}{dr}$$

$$dp = \frac{\dot{V} dr}{tg\,\theta} \, \frac{8\eta}{\pi r^4}$$

$$dp = \frac{\dot{V}\, 8\, \eta}{tg\,\theta\, \pi\, r^4} \, dr$$

$$p = \int_{r1}^{r2} \frac{\dot{V}\, 8\, \eta\, dr}{tg\theta\, \pi\, r^4}$$

$$p = \frac{8\,\eta\,\dot{V}}{tg\theta\pi} \int_{r1}^{r2} \frac{dr}{r^4} = \frac{8\,\eta\,\dot{V}}{tg\theta\,\pi} \int_{r1}^{r2} (r^4)^{-1}\, dr$$

Integrando:

$$p = \frac{8\,\eta\,\dot{V}}{tg\theta\,\pi} \int_{r1}^{r2} r^{-4}\, dr = \frac{8\,\eta\,\dot{V}}{tg\theta\,\pi} \left[\frac{r^{-3}}{-3}\right]_{r1}^{r2} = \frac{8\,\eta\,\dot{V}}{tg\theta\,\pi} \left[\frac{r2^{-3}}{-3} - \frac{r1^{-3}}{-3}\right]$$

$$p = \frac{8\,\eta\,\dot{V}}{tg\theta\,\pi} \left[\frac{r2^{-3}}{-3} - \frac{r1^{-3}}{-3}\right]$$

$$\dot{V} = \frac{p\ tg\,\theta\ \pi}{8\eta \left[\frac{r2^{-3}}{-3} + \frac{r1^{-3}}{+3}\right]}$$

$$\dot{V} = \frac{p\ tg\,\theta\ \pi}{8\eta \frac{1}{3} \left[\frac{1}{r_1^3} - \frac{1}{r_2^3}\right]}$$

$$\dot{V} = \frac{3p\ tg\,\theta\ \pi}{8\eta \left[\frac{1}{r_1^3} - \frac{1}{r_2^3}\right]}$$

Teniendo en cuenta que la cantidad de sustancia que se libera desde la punta de la micropipeta por flujo masivo es:

$$Qfl = \dot{V} \cdot C$$

Qfl : Cantidad de ACh liberada por flujo masivo en moles.

V : flujo masivo en ml/sec.

C : Concentración de ACh.

el flujo espontáneo total será:

$$\dot{Q} = Q \text{ flujo masivo} + Q \text{ difusión}$$

$$\dot{Q} = Qfl + QD = \pi \, tg\theta \, Ci \left(Dr1 + \frac{3p \, r1^3}{8\eta} \right)$$

$$\dot{Q} = \pi \, tg\theta \, Ci \left(Dr1 + \frac{3p \, r1^3}{8\eta} \right)$$

y: $$\frac{Qfl}{QD} = \frac{3p\,r1^2}{8\,\eta D}$$

Por tanto, la liberación espontánea total es función del diámetro de la punta de la micropipeta.

En la práctica, el radio interno de la punta de la micropipeta no se puede medir con exactitud a menos que la punta sea excesivamente grande. Sin embargo, r_1 se puede estimar si se conoce la resistencia eléctrica de la micropipeta (KRNJEVIC, MITCHELL y SZERB, 1963).

Si se considera la pipeta como un cono hueco, la resistencia de un segmento de longitud dl, viene dada por:

$$Ri = \frac{\rho i \, dl}{\pi r^2}$$

ρi : resistencia específica de la solución interna (se asume que es constante).

Ri : resistencia de la pipeta en $M\Omega$

si se sustituye $dr/\tan\theta$ por dl:

$$Ri = \frac{\rho i \, dr/tg\,\theta}{\pi r^2}$$

la resistencia total es:

$$Ri = \frac{\rho i \, dr}{\pi \, tg\,\theta \; r^2}$$

$$Ri = \int_{r1}^{r2} \frac{\rho i \, dr}{\pi \, tg\,\theta \; r^2}$$

$$Ri = \frac{\rho i}{\pi tg\theta} \int_{r1}^{r2} \frac{dr}{dr^2}$$

$$Ri = \frac{\rho i}{\pi \, tg\,\theta} \left[-\frac{1}{r} \right]_{r1}^{r2} = \frac{\rho i}{\pi \, tg\,\theta} \left[-\frac{1}{r2} + \frac{1}{r1} \right]$$

$$Ri = \frac{\rho i}{\pi tg\theta} \left[\frac{1}{r1} - \frac{1}{r2} \right]$$

como $r2 >> r1$

$$Ri = \frac{\rho i}{\pi \, tg\,\theta \; r1}$$

$$Ri = \rho i (\pi \, tg\,\theta \, r1)^{-1}$$

Cuando se sustituyen ρi y θ por sus valores reales en micropipetas con ACh 3M., la ecuación anterior se simplifica a:

$$r_1 = 3.09\ (R)^{-1}$$

r_1: radio interno de la punta de la pipeta
R : resistencia de la pipeta

Por tanto, en el terreno teórico y experimental, el eflujo espontáneo de material desde las micropipetas, aumenta considerablemente a medida que aumenta el radio interno de la punta.

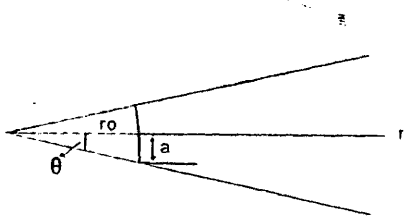
Según KRNJEVIC, MITCHELL y SZERB, cuando el radio interno es mayor de 0.125 Micras, el flujo masivo es mayor que el flujo por difusión y cuando la punta del electrodo es mayor de 0.4 Micras, el flujo masivo representa el 90% de la totalidad de la liberación espontánea.

3) Limitación del flujo espontáneo por corriente de freno

Como postulado básico hay que destacar que ningún valor finito de corriente de freno puede suprimir completamente el flujo espontáneo. Por otra parte, es importante tener en cuenta que la corriente de freno es un proceso tiempo dependiente, y la noción de corriente de freno "precisa y adecuada" que fue introducida por CURTIS en 1963 es un concepto que debe someterse a revisión.

Para CURTIS, cualquier valor de corriente de freno, aunque de poca intensidad, con el tiempo debería suprimir completamente la liberación espontánea. Este postulado de CURTIS, no se ajusta a la realidad, ni a la naturaleza física del proceso de difusión.

PURVES (1977), abordó el problema de la corriente de freno desde un punto de vista teórico. Se considera la pipeta como un cono truncado:



En estas condiciones, el flujo q para una corriente aplicada I es:

$$q = \frac{I}{2zF\left(\exp\left[I/2\pi zFDCo\,\theta a\right]-1\right)} \qquad 1$$

El flujo por difusión cuando I=0 es:

$$qD = \pi\, DCo\,\theta\, a \qquad 2$$

q: flujo de ACh

I: intensidad de corriente aplicada

z: valencia

F: constante de Faraday

D: coeficiente de difusión

C_o: concentración de ACh

θ_a: ángulo formado entre el eje de la pipeta y la superficie interna

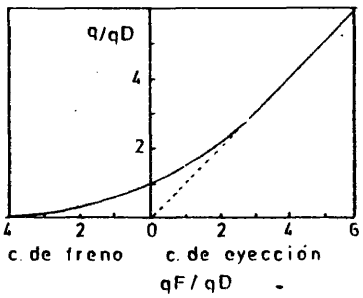
Si el equivalente de Faraday -considerando un número de transporte de 0.5-, de la corriente aplicada es:

$$qF = \frac{I}{2zF} \qquad 3$$

la ecuación 1 toma la siguiente forma:

$$q = \frac{qF}{\exp\left[qF/qD\right]-1} \qquad 4$$

Los resultados de la ecuación 4 se ilustran en la siguiente gráfica:



tomado de: The release of drugs from iontophoretic pipettes (Purves 1977)

Por tanto:

- en la región de bajas intensidades de corriente la relación no es lineal
- el eflujo disminuye ASINTOTICAMENTE hacia cero a medida que se aumenta la intensidad de la corriente de freno
- a medida que se aumenta la intensidad de la corriente de eyección, hay una aproximación asintótica hacia el equivalente de Faraday

En la práctica, el eflujo espontáneo puede reducirse notablemente si se utilizan micropipetas con diámetros de punta del orden del mínimo compatible con la liberación de sustancias ionizadas durante la microiontoforesis. Este "mínimo compatible", sólo puede establecerse en el curso de la experimentación y varía de acuerdo con las propiedades físicas de cada pipeta. Si sobreañadido a es-

te factor de "diámetro mínimo compatible" se aplica una corriente de freno, la liberación espontánea puede reducirse a un mínimo; mínimo, que a su vez, debe ser compatible con la liberación de sustancias ionizadas desde la micropipeta. Este último factor es importante, ya que hay que tener presente que la aplicación de una corriente de freno muy intensa puede "vaciar" completamente la punta de la micropipeta de sustancia activa.

KELLY (1975), ha abordado el estudio de la corriente de freno desde otro punto de vista. Este autor considera que inmediatamente después de la inmersión de la punta de la micropipeta en el medio externo acuoso, se establece un gradiente de concentración entre la solución contenida en el interior del electrodo y dicho medio externo. En estas condiciones, la liberación espontánea debida a difusión, se verá en parte, contrarrestada por la entrada de agua dentro de la punta de la micropipeta. Esta entrada de agua, se realiza a favor de la alta presión osmótica que se establece en la solución concentrada que se encuentra contenida en el interior del electrodo. El resultado inmediato de esta entrada de agua, es la dilución de la solución contenida en la punta de la pipeta y ésto a su vez produce una disminución en la cantidad de sustancia activa liberada espontáneamente por difusión y flujo masivo. En estas condiciones, la aplicación de una corriente de freno, aún si es de mínima intensidad, reucirá aún más la concentración de sustancia activa en la punta del electrodo. De esta forma, el efecto de la corriente de freno es crear una interfase de solución diluída dentro de la punta de la micropipeta que delimita la solución contenida en el interior del electrodo y el medio externo. La magnitud de esta interfase dependerá de dos parámetros:

- amplitud de la corriente de freno y

- duración de la corriente de freno.

Con el tiempo, la punta del microelectrodo puede llegar a vaciarse de material activo, y la liberación espontánea disminuirá notablemente en sus dos vertientes:

- liberación espontánea por flujo masivo y
- liberación espontánea por difusión

Una de las consecuencias de la corriente de freno, por tanto, es el vaciamiento de la punta del electrodo de sustancia activa. De esta forma, aunque persista la liberación espontánea por flujo masivo, ésta resultará en una liberación inactiva, libre de material activo.

La dilución de la solución contenida dentro de la punta del electrodo es un mal necesario. Es necesario, ya que de esta forma se evita la liberación espontánea de sustancia activa. Es un mal, ya que retrasa la liberación de sustancia activa durante un pulso electroforético subsiguiente y además produce la disminución global de sustancia activa liberada durante la aplicación de un pulso electroforético.

4) Liberación de sustancias ionizadas durante la aplicación de un pulso de corriente electroforética

La aplicación de una corriente electroforética de adecuada duración y polaridad, a través de una micropipeta, produce la liberación de iones desde la punta del electrodo. El grado de liberación de sustancias ionizadas viene determinado, en parte, por la intensidad I de la corriente aplicada. Simplificando, se puede por tanto establecer que, aparentemente, la cantidad total de iones que sale de la pipeta obedece la ley de Faraday:

$$Q = It \quad (F)^{-1}$$

Q= Microculombios

I= nanoamperios

t= segundos

F= constante de Faraday= 96500

En la práctica, sin embargo, se ha visto que el flujo iónico debido a la aplicación de una corriente de pulso electroforético no se ajusta a esta ecuación y por ello se introduce el concepto de "número de transporte" como primer factor de corrección. El número de transporte de un ión representa la proporción de la carga total que pasa a través de un microelectrodo durante la aplicación de una corriente electroforética. Esta proporción es la parte de la carga total que es transportada por un ión determinado y viene dado por:

- Número de transporte= n F/Q

n; cantidad de sustancia ionizada liberada desde la micropipeta

F; Faraday

Q; Culombios

KRNJEVIC, MITCHELL y SZERB (1963) y CURTIS (1964), determinaron experimentalmente el número de transporte de la acetilcolina; KRNJEVIC, encontró un valor de 0.4 y CURTIS un valor de 0.5.

Estos resultados sugerían que la liberación de acetilcolina desde micropipetas que contenían una solución concentrada de esta sustancia en forma ionizada era muy eficaz, ya que el número de transporte de la ACh estaba muy cerca del valor óptimo de 0.5. Sin embargo, estos resultados que habían sido obtenidos in vitro, distaban mucho de la situación real que se manejaba durante la experimentación con una preparación biológica. KELLY (1975), destaca, que aún utilizando micropipetas en condiciones óptimas, se obser

va que el número de transporte para una misma sustancia varía de un microelectrodo a otro de una manera totalmente impredecible. Esta incapacidad de predecir la cantidad real de sustancia ionizada liberada a través de un microelectrodo y en respuesta a la aplicación de un pulso de corriente dado, ha determinado que en la práctica las dosis utilizadas en microiontoforesis se expresen en Microculombios o en nanoamperios y segundos. Esto equivale a expresar la dosis de sustancia ionizada en términos de carga total que pasa a través del microelectrodo. Esta aproximación, encubre las dificultades inherentes a la técnica, pero tiene un valor práctico y por ello se ha hecho habitual.

Los primeros estudios (CURTIS, 1964), (KRNJEVIC, MITCHELL y SZERB, 1963), establecieron que existía una relación lineal entre la intensidad de corriente de pulso electroforético aplicada y la cantidad de sustancia ionizada liberada desde la pipeta. Esto equivale a establecer una relación de proporcionalidad directa entre la amplitud de la corriente de eyección y la cantidad de sustancia activa liberada. CLARKE, HILL y SIMMONDS (1973) y PURVES (1977), han demostrado que esto es una simplificación extrema del problema y que no existe una relación lineal entre ambos factores, excepto en aquellas situaciones experimentales en que se utilizan grandes intensidades de corriente electroforética.

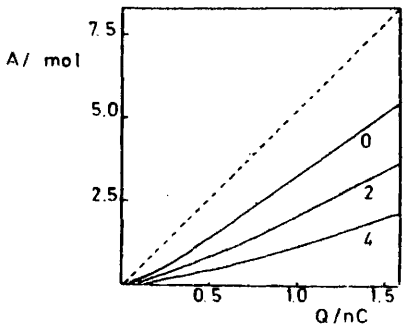
PURVES (1977) abordó el problema desde un punto de vista teórico experimental. Como una primera aproximación, supone, que tras la aplicación de un pulso electroforético, se libera el equivalente de Faraday Q/2zF (para un número de transporte= 0.5). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la punta de la pipeta se ha vaciado de sustancia ionizada, debido a la liberación espontánea y por el efecto de la corriente de freno. Por ésto, la cantidad de sustancia activa A, que se libera por aplicación de un pulso elec

troforético, será casi siempre menor que el equivalente de Faraday Q/2zF. El valor de A, viene dado por la siguiente ecuación:

$$A = Co\varphi \int_{ro}^{r} \frac{r^2\left\{\exp\left[\frac{qF(r-ro)}{qDr}\right]-1\right\}}{\exp\left[qF/qD\right]-1}\, dr$$

A: cantidad de sustancia activa liberada
φ: ángulo sólido
Co: concentración de la solución
qF: equivalencia de Faraday
qD: flujo por difusión
r: radio interno de la pipeta
ro: radio de la esfera que trunca la pipeta
θ: ángulo formado entre el eje y la superficie interna de la pipeta

La siguiente figura ilustra A en función de Q, para una pipeta típica con $2\theta = 8^{\circ}$, diámetro de punta 2a= 0.5 Micras y Co= 0.5 M. La relación no es lineal y muestra una curvatura positiva en la región de pulsos electroforéticos de poca amplitud. Las corrientes de freno de gran amplitud, disminuyen la liberación de sustancia activa durante un pulso electroforético:



----- equivalente de Faraday

tomado de: The release of drugs from iontophoretic pipettes (Purves 1977)

Experimentalmente, CLARKE, HILL y SIMMONDS (1973) y PURVES (1977), demuestran que la liberación de la sustancia ionizada no ocurre de manera inmediata tras la aplicación de un pulso electroforético. Cuando los pulsos son de poca amplitud, el retardo entre la aplicación del mismo y el comienzo de liberación de sustancia ionizada se incrementa considerablemente. De esta forma, si además se utilizan pulsos electroforéticos de corta duración, la cantidad total de sustancia ionizada se verá también reducida. Este efecto puede, en parte, ser compensado reduciendo la intensidad de la corriente de freno.

También es importante la duración de la corriente de freno, pues corrientes de freno excesivamente prolongadas pueden retrasar el inicio de la liberación de la sustancia activa. Las corrientes de freno de poca intensidad, también producen este efec

to si se aplican durante intervalos excesivamente largos.

Al inicio de la corriente electroforética, sólo una fracción del flujo de corriente, es llevada por la sustancia activa ionizada que se libera desde la micropipeta hacia el medic. El resto del flujo de corriente ocasiona la inversión de la situación de dilución en la punta del electrodo. Esta dilución es debida a la aplicación de la corriente de freno.

Todo esto sugiere, la importancia de adecuar correctamente la amplitud y duración de la corriente de freno y la amplitud y duración de la corriente electroforética. Esto sólo se logra en el terreno experimental y depende de las propiedades físicas de la pipeta que se utiliza y de la preparación biológica que se emplea.

HOFFER, NEFF y SIGGINS (1971), describen la existencia de micropipetas que permiten el paso de corriente, pero no liberan sustancia activa ionizada al medio. Los mismos autores, establecen que estas pipetas pueden ser reconocidas durante el trabajo experimental porque se trata de pipetas muy "ruidosas". En efecto, estas pipetas producen un aumento notable de un ruido de alta frecuencia que es recogido en los registros eléctricos realizados desde un canal adyacente del mismo electrodo.

Este hecho debe ser tenido en cuenta, pues micropipetas adecuadas en cuanto a tamaño de punta, resistencia y capacidad para pasar corriente pueden resultar ineficaces al no liberar sustancia activa desde su interior.

KRNJEVIC, MITCHELL y SZERB (1963) y HOFFER y NEFF y SIGGINS, (1971), sugieren que las puntas de las citadas pipetas, podían estar bloqueadas por una membrana semipermeable que permite el paso de sólo una fracción de iones presentes en la solución acuosa contenida en el interior de la micropipeta, pero que no permite el

paso de la sustancia activa. Estas membranas se formarían muy frecuentemente en los electrodos.

Por otra parte, KRNJEVIC, MITCHELL y SZERB (1963), sugieren que la corriente puede fluir por "conductancia de superficie" a lo largo de la superficie interior del vidrio aun cuando la punta de la pipeta está obstruída. Este flujo de corriente por conductancia de superficie, puede estar mediado por iones como el sodio y el potasio, que se encuentran como cargas fijas en la superficie del vidrio.

5) ELECTROOSMOSIS

Durante la inyección electroforética de una sustancia desde una micropipeta de vidrio, se produce -además de la iontoforesis- el fenómeno de electroosmosis.

La electroosmosis, es el movimiento de solvente que arrastra consigo partículas o sustancias disueltas. Este movimiento de solvente, es una consecuencia de la presencia de cargas fijas en la superficie interior del vidrio de la micropipeta. De forma que cuando se aplica una corriente a través del microelectrodo se produce un movimiento iontoforético y un fenómeno de electroosmosis. En una solucion salina concentrada, las partículas se mueven fundamentalmente por iontoforesis. La electroosmosis es más evidente cuando la pipeta contiene una solución de baja fuerza iónica, poco concentrada.

Generalmente, el vidrio está cargado negativamente y por ello se produce un flujo dirigido hacia el exterior cuando se aplica una corriente positiva a través de la micropipeta. Este flujo, es significativo sólo cuando la punta del electrodo es extremadamente pequeña y cuando el número de cationes presentes en la solución contenida en la pipeta es muy bajo.

El flujo electroosmótico viene dado por:

$$v = \frac{\varphi \, r^2 \, \varepsilon \, E}{4 \, \eta \, l \, (300)^2}$$

v(ml); volumen de líquido transportado por segundo a través de un tubo de longitud l y de radio r, cuando se aplica un potencial de E voltios

φ(voltios); potencial electrocinético o potencial zeta

ε ; constante dieléctrica del solvente

η ; coeficiente de viscosidad de la solución

Esta ecuación se simplifica a:

$$v = \frac{\pi r^2 \mu E}{l}$$

μ(cm. por voltio/seg.)= movilidad electroosmótica

Si se considera que la porción terminal de la pipeta es cilíndrica, esta ecuación se puede simplificar aún más:

$$v = \mu i \rho$$

ρ = resistencia específica de la solución

por tanto,

$$Mo = \frac{C \mu i \rho}{10^3}$$

M = moles/seg; flujo electroosmótico

C = moles/litro; concentración de la solución en el interior de la micropipeta

6)-FLUJO ELECTROFORETICO TOTAL

Como el flujo electroforético total es la suma del flujo iónico y flujo electroosmótico, el flujo total será:

$$M = Mi + Mo$$

Mi; flujo iontoforético

Mo; flujo electroosmótico

En un caso ideal el flujo iontoforético viene dado por:

$$Mi = \frac{ni}{zF}$$

M; moles/seg. (flujo iónico)

n; número de transporte

i; intensidad de corriente

F; cte. de Faraday

Por tanto, el flujo electroforético total será:

$$M = Mi + Mo = \frac{ni}{zF} \cdot \frac{C\mu i\rho}{10^3}$$

Las concentraciones de sustancia ionizada liberada que se alcanzan en la proximidad de la punta del electrodo cuando se aplica un pulso electroforético a través de la micropipeta, dependen de la cantidad de sustancia liberada, de la naturaleza del medio externo y de la presencia de barreras de difusión en este medio. En la práctica, este problema se puede enfocar de manera sencilla si se asume que toda la cantidad de sustancia activa se libera instantaneamente desde la punta del microelectrodo. De esta forma, es posible aproximarse a la determinación de la concentración de la sustancia activa liberada en un punto situado a una distancia variable de la punta del electrodo.

La concentración de la sustancia a una distancia r de la punta del electrodo está en función del tiempo y de la distancia y viene dado por (DEL CASTILLO y KATZ, 1955):

$$[C] = \frac{Q}{8(\pi K t)^{1.5}} \exp(-r^2/4Kt) \qquad 1$$

$[C]$; concentración de la sustancia activa liberada desde la punta del microelectrodo

Q; cantidad de sustancia liberada

t= 0 tiempo

r= 0 distancia entre la punta de la pipeta y un punto x ideal

K; coeficiente de difusión de ACh ($8x10^{-6}$ cm^2 seg^{-1})

Los cambios de concentración tienen la forma de una onda monofásica (ecuación 1). La concentración máxima alcanzada a la distancia r, viene dada por:

$$[C]max = \frac{Q\exp(-1.5)}{8r^3(\pi/6)^{1.5}}$$

Esta C max. ocurre a un tiempo determinado, T máximo

$$Tmax = \frac{r^2}{6K}$$

Experimentalmente, DEL CASTILLO y KATZ (1955), demostraron que los cambios en amplitud y curso temporal del potencial de ACh que se observan cuando se varía la distancia entre la punta del electrodo y los receptores, se ajustan de una manera general, con los principios de difusión. Esta teoría simplificada, excluye muchos factores pero tiene el valor real de demostrar la validez de las ecuaciones de difusión en la técnica de la microiontoforesis. DEL CASTILLO y KATZ, llevaron a cabo sus experimentos en las fibras musculares del músculo sartorio de la rana.

7)-REALIZACION PRACTICA DE LA TECNICA DE MICROIONTOFORESIS

Durante la realización práctica de la técnica de microiontoforesis, se encuentran desviaciones de los resultados predichos por los estudios teóricos del problema. En apartados anteriores nos hemos referido a estas desviaciones y hemos hecho referencia a casi todos los problemas inherentes a la microiontoforesis. Nuestro propósito, es ahora describir cómo hemos realizado la técnica, resaltando nuestra particular manera de obviar o reducir los defectos inherentes a la misma.

Concentración de sustancia activa

No se puede cuantificar con exactitud la concentración de sustancia activa que se obtiene a determinada distancia de la punta de la micropipeta. Por ello, la dosis se expresa en función de la intensidad y amplitud de la corriente de pulso electroforético en mv/nC. Teniendo esto presente, nosotros hemos realizado una curva o gráfica de sensibilidad para cada una de las drogas utilizadas iontoforéticamente en la preparación biológica.

Control de difusión y flujo espontáneo

Para evitar una difusión de sustancia activa en exceso o pérdida contínua de la misma por flujo masivo, hemos trabajado teniendo en cuenta dos factores:

- las pipetas se han llenado con soluciones diluídas de la droga problema, con concentraciones de sustancia activa del orden de $3x10^{-3}$ Molar. En efecto, para la mayoría de los autores (CURTIS, 1964); BRADSHAW y SZABADI, 1974), ésta es la forma más eficaz de prevenir una pérdida excesiva y continuada de sustancia activa.

- la impedancia de las pipetas utilizadas ha sido del orden de la máxima compatible con la eyección de sustancia activa. En este sentido, hemos valorado como referencia la respuesta de la membrana post-sináptica al carbacol.

Se ha añadido otro factor de seguridad referente a la edad de las pipetas, utilizando aquellas que no sobrepasaban las 72 horas desde el momento de su llenado.

Evitación de vaciamiento de la punta de la pipeta de sustancia activa

Con esta finalidad, hemos utilizado una corriente de freno mínima compatible con la técnica, valorando para ello la estabilidad del potencial de membrana y del potencial electroforético durante el experimento. Además, entre cada experimento, quitamos la corriente de freno para evitar una acción demasiado continuada de la misma, que podría vaciar la punta del electrodo de su contenido en sustancia activa.

BRADSHAW, SZABADI y ROBERTS (1973) y KATZ y STEINBERG (1976), estudiaron globalmente los problemas prácticos que presentaba la técnica de iontoforesis y llegaron a la conclusión de que el curso temporal de las respuestas a una droga determinada, viene definida principalmente por los parámetros de las corrientes de freno y eyección. Se concluye, que no se pueden obtener respuestas reproducibles y rigurosas, a menos que, los parámetros de las corrientes de freno y eyección se mantengan constantes durante toda la experimentación. En la línea de este razonamiento y valoración práctica, nosotros hemos realizado la microiontoforesis, valiéndonos de un programador de microiontoforesis de corriente constante.

La única limitación experimental del sistema de corriente cons

tante utilizado en nuestro trabajo, viene definida por el límite máximo de 100 voltios que no deben ser superados como producto entre la resistencia de la pipeta y la intensidad de corriente de salida. Esta limitación provee un margen extremadamente amplio para la realización correcta de la técnica.

El programador de microiontoforesis, W.P.I. 160, consta de dos salidas de corriente constante, lo cual permite ajustar independientemente las corrientes de freno y eyección. Además, estos parámetros pueden ser monitorizados continuadamente con la ayuda de la escala graduada que con este fin posee el programador.

El pulso es visualizado en un osciloscopio Hewlett Packard 1201 B, pasándolo previamente a través de una resistencia conocida, de modo que, aplicando la ley de Ohm podemos averiguar la intensidad de la señal visualizada y contrastarla con la de la escala graduada del programador.

La entrada del módulo de programación de microiontoforesis, se conecta a un generador de pulsos W.P.I. 831 y a un generador de intervalos W.P.I. 830, de modo que los parámetros duración y retardo del pulso pueden ser prefijados convenientemente. Este factor tiene relevancia, ya que para la realización adecuada de la técnica, los pulsos de eyección deben aplicarse a intervalos regulares (BRADSHAW, SZABADI y ROBERTS 1973).

En lo que respecta a la duración de los pulsos, hemos trabajado con pulsos no superiores a 500 msec. para obviar cualquier tipo de artefacto o componente eléctrico en las respuestas a la aplicación de drogas iontoforéticamente. Con la misma finalidad, no hemos superado los 200 nA de intensidad en los pulsos de eyección.

En la realización experimental del presente trabajo, hemos utilizado dos módulos de programación de microiontoforesis W.P.I.160,

un generador de intervalos W.P.I. 830 y dos generadores de pulso W.P.I. 831.

D)- SOLUCIONES

En el estudio del potencial de membrana de la fibra muscular del sartorio y su dependencia de la concentración extracelular de potasio, utilizamos una solución Ringer convencional y una serie de soluciones Ringer isotónicas con la anterior pero libres de cloro, sulfatadas y con concentraciones de potasio de 0 a 80 mM/l (HODGKIN y HOROWICZ, 1959).

Estas soluciones tienen la siguiente composición:

Solución Ringer convencional

	mM/l
K	2.5
Cl	121
Na	120
Ca	1.8
HPO4	2.15
H2PO4	0.85

Soluciones isotónicas con el Ringer convencional, libres de cloro sulfatadas y con concentraciones de K que varían de 0 a 80 mM/l

Solución A	mM/l	Solución B	mM/l
K	0	K	80
Cl	0	Cl	0
Na	83	Na	3
Ca	8	Ca	8
HPO4	1.08	HPO4	1.08
H2PO4	0.43	H2PO4	0.43
SO4	48	SO4	48
Sacarosa	113	Sacarosa	113

Para preparar un litro de estas soluciones, se toman 797 ml de CaSO4 0.01 M y el resto de los componentes en las siguientes proporciones (HODGKIN y HOROWICZ, 1959):

Solución A	Solución B
797 ml de CaSO4 .01M	797 ml de CaSO4 .01M
80 ml de Na2SO4 .5M	80 ml de K2SO4 . 5M
10 ml de Na-P buffer .15M	10 ml de Na-P buffer .15M
113 ml de Sacarosa 1 M	113 ml de Sacarosa 1 M

Para hacer soluciones con diferentes concentraciones de potasio se mezclan las soluciones A y B en estas proporciones:

Concentración de K en mM/l	Solución B ml	Solución A ml
0.5	1	160
1	1	79
2.5	1	31
5	1	15
10	1	7
20	1	3
50	1	0.6
80	1	0

En los demás experimentos, hemos empleado un Ringer convencional (NaCl 115 mM; KCl 2 mM; CaCl 1.8 mM). El pH del mismo se ha controlado sistemáticamente, valiéndonos para ello, de un medidor digital de pH Crison.

En los experimentos de control, hemos usado un Ringer a pH6.8-7 sin tamponar. Una vez establecidos los parámetros correspondientes a las propiedades pasivas y respuestas electroforéticas a las diferentes drogas en esta solución, hemos procedido a tamponar el Ringer con Tris Maleato a pH 6, 7 y 8.

E)- DROGAS

nombre	propiedad	solubilidad en agua	concentración en el interior de la pipeta
Carbacol	agente colinérgico	xxx	0.25 M
O-iodoso benzoato	oxidante de grupos SH	x	3×10^{-3} M
Ditiobis-nitrobenzoato	"	x (I)	"
Ditiotreitol	reductor de grupos sulfhidrilos	xxx	"
2 mercapto-etanol	"	xxx	14.2 M
tubocurarina	anticolinérgico	xxx	baño: 10^{-6}M
β bungaro-toxina	bloqueador pre-sináptico	xxx	baño: 5 μgr/ml

(I) soluble en etanol

F)- MICROPIPETAS

Se han utilizado micropipetas de vidrio pyrex, de fabricación manual.

El procedimiento de llenado ha sido el de someterlas a ebullición en un sistema que permite realizar el vacio. Las pipetas de registro se han llenado de una solución de KCl 3 Molar, las pipetas de droga se llenan de agua destilada por ebullición y posteriormente se vacían por aspiración y vuelven a llenar con la solución que contiene la droga.

Las micropipetas de droga no se utilizan hasta transcurridas 24 horas desde el momento de su llenado. De esta forma, se asegura la difusión de la droga hasta la punta de la pipeta.

Todas las pipetas son sometidas a control visual bajo microscopio antes de llenarlas con KCl o solución de droga. Se desechan todas aquellas que presentan una gran desproporción de permeabilidad entre ambos canales y aquellas con punta defectuosa.

Control de impedancia de las micropipetas

Desde un generador de pulsos Tektronix P.G.505, se aplica un pulso triangular y simétrico de amplitud y duración conocidas y con una frecuencia de 1KHz a través de la pipeta. La señal se recoge y visualiza en un osciloscopio, pasándola previamente por una resistencia conocida, de modo que, midiendo la caída de voltaje y aplicando la ley de Ohm se cuantifica la impedancia de los electrodos.

La impedancia de los electrodos de registro utilizados ha sido del orden de 10 a 20 Megaohms. Se han desechado los eletrodos ruidosos.

La impedancia de las pipetas de droga empleadas, ha oscilado entre 40 y 90 Megaohms. Hemos preferido siempre aquellas que teniendo una resistencia alta se han mostrado permeables al paso de la droga durante la experimentación. Este último factor, sólo es evaluable en el curso de la iontoforesis y requiere la aparición de una respuesta electroforética para su confirmación.

G)- ANIMALES DE EXPERIMENTACION

En todos nuestros experimentos hemos utilizado la preparación del músculo sartorio, aislado o con nervio, de la rana común.

La disección se realiza bajo lupa binocular Zeiss (x10) empleando material quirúrgico de microcirugía.

Una vez disecado, el músculo se monta sobre un cilindro de plástico con su superficie interna expuesta hacia arriba. El dispositivo se lleva al baño de experimentación donde se sumerge en el Ringer adecuado.

H)- CONTROL DE TEMPERATURA

Se ha realizado por medio de un multímetro digital Tektronix D M502, con termistor sumergido en el baño de la preparación por el que circulaba agua con una temperatura controlada por un termostato y por un baño refrigerado Selecta.

La temperatura ha oscilado entre los 17 y 20 grados C. durante los experimentos.

I)- CAMARA DE EXPERIMENTACION

Consta fundamentalmente de una cámara de Faraday, el baño de la preparación y unos micromanipuladores Zeiss Jena.

Los micromanipuladores permiten, previa fijación de los electrodos, la movilización de los mismos en sentido vertical y horizontal. De esta forma, realizamos los registros intracelulares y la microiontoforesis bajo control visual mediante la utilización de una lupa binocular Nikon (20 x 4).

Hemos obviado, en gran parte, el problema de ruido mecánico con el uso de una mesa antivibratoria Micro G Backer Loring.

V- RESULTADOS

Con la finalidad de constatar la viabilidad de nuestra preparación, hemos comenzado el trabajo experimental estableciendo los parámetros bioeléctricos convencionales de las fibras musculares del sartorio de la rana; potencial de membrana y propiedades pasivas de la misma. El estudio de estos parámetros se ha realizado siguiendo líneas experimentales clásicas citadas en material y métodos.

Consideramos imprescindible este paso previo a la realización de la técnica electroforética para la correcta interpretación de ulteriores resultados. Ello es debido a que, en principio, cualquier interpretación sobre mecanismos fisiológicos sinápticos, a nuestro juicio, requiere un conocimiento previo de las propiedades básicas de la preparación.

Los resultados obtenidos en nuestra primera aproximación a los objetivos propuestos en nuestra tesis se exponen a continuación.

A)- ESTUDIO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA DE LAS FIBRAS MUSCULARES DEL SARTORIO DE LA RANA

1).- En un primer tiempo, hemos realizado un estudio del potencial de membrana en condiciones fisiológicas en lo que respecta a la composición del líquido extracelular: en Ringer convencional con una concentración extracelular de potasio del orden de 2.5 mM y a un pH del medio externo de 7.

Los resultados se expresan en la figura 1 y en la tabla 1

figura 1: en ordenadas; número de observaciones
en abscisas; amplitud de Vm en mV

tabla 1:

Vm en mV	% (sobre el número total de observaciones)
111-120	1
101-110	30
91-100	34
81-90	14
71-80	12
61-70	3
51-60	5
41-50	1

El valor medio encontrado es el de 92.6 (Desv. Stand. 10)
N = 100

obtenido y valorado este parámetro básico, procedimos al estudio del potencial de membrana en soluciones de diferentes pH en un rango comprendido entre 6 y 8:

2).- Potencial de membrana de las fibras musculares del sartorio en un medio extracelular con una concentración de potasio fisiológica de 2.5 mM a pH 6.

Los resultados de este experimento se expresan gráficamente en la figura 2 y en la tabla 2.

Figura 2: en ordenadas, número de observaciones
en abscisas, amplitud del Vm en mV

tabla 2:

Vm en mV	% (sobre el número total de observaciones)
91-100	24.4
81-90	26.5
71-80	18.3
61-70	16.3
51-60	10.2
41-50	4

El valor medio encontrado es de 77.4 (D.S. 15). Inferior al valor medio de potencial de membrana a pH 7.
N = 50

3).- Potencial de membrana de las fibras musculares del sartorio en Ringer fisiológico con una concentración extracelular de potasio de 2.5 mM y un pH del medio de 8.

Los resultados obtenidos en esta situación experimental se expresan en la figura 3 y en la tabla 3

Figura 3: en ordenadas, número de observaciones
en abscisas, amplitud del Vm en mV

Tabla 3:

Vm en mV	% (sobre el número total de observaciones
91-100	21.5
81-90	34.6
71-80	19.6
61-70	15.6
51-60	9.8
41-50	0

El valor medio corresponde a 79.26 (D.S. 13). Algo inferior también al valor medio encontrado a pH 7.

N = 50

4).- Obtenidos estos datos previos sobre el potencial de membrana de nuestra preparación a diferentes pH del líquido extracelular, nuestro objetivo inmediato fue el de verificar la influencia del ión potasio sobre la génesis del mismo. Para ello, se hicieron mediciones del potencial de membrana de las células de nuestra preparación, en soluciones extracelulares con diferentes concentraciones de potasio.

Las soluciones utilizadas fueron isotónicas con el Ringer y carecían de cloro.

Los resultados de esta fase experimental, se expresan en las figuras 1,4,5,6,7,8,9 y 10. En ellas, se contrasta el potencial de membrana a diferentes concentraciones extracelulares de potasio, que se indica al pie de la figura, frente al número total de medidas que se realizó en cada caso.

El siguiente cuadro ofrece una visión global de los resultados obtenidos en esta fase experimental:

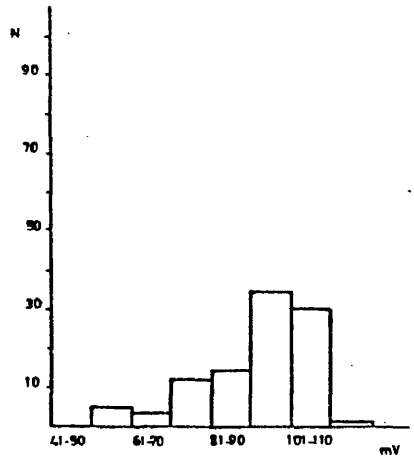
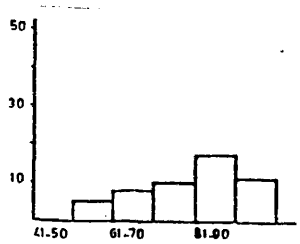
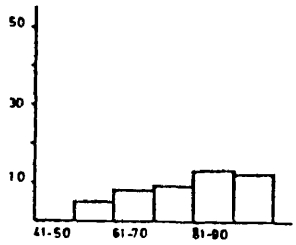


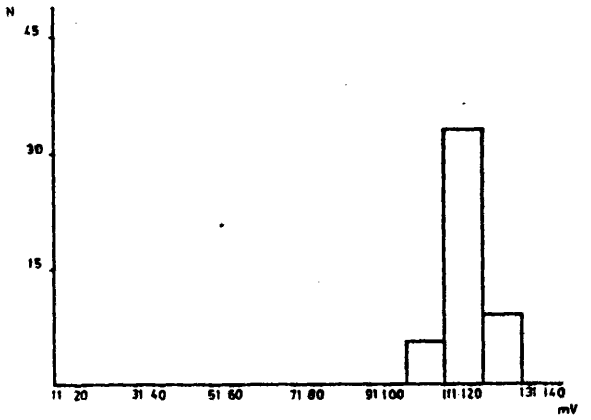
Fig 1



Vm pH 8
Fig 3

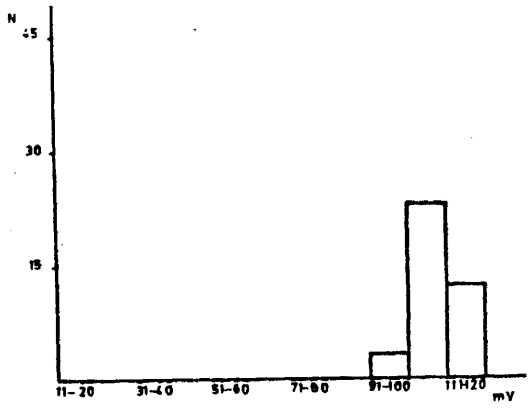


Vm pH 6
Fig 2



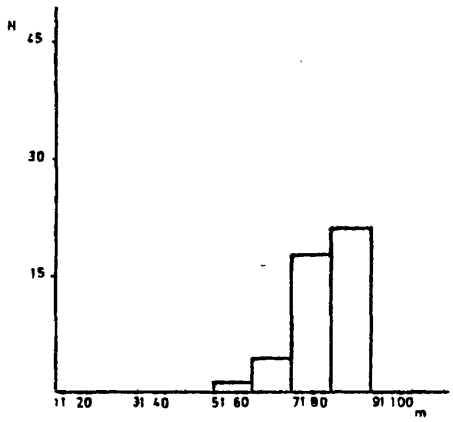
Vm a Ko 05

Fig 4



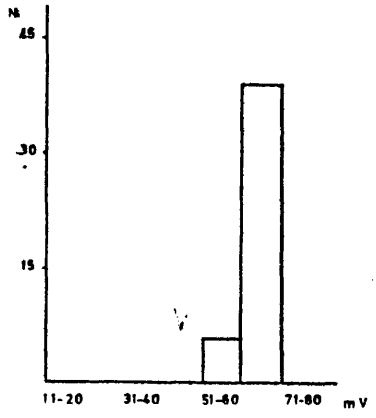
Vm a Ko 1

Fig 5



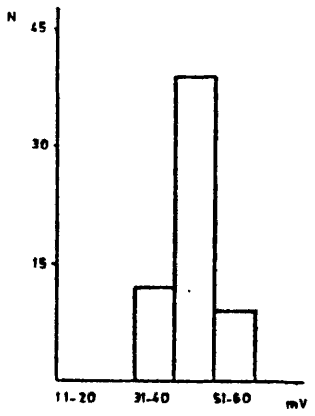
Vm a K = 5

Fig 6



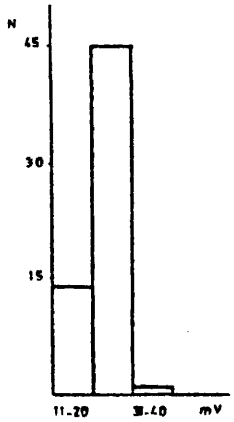
Vm a K = 10

Fig 7



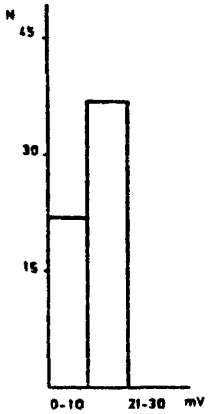
Vm a Ko 20

Fig 8



Vm a Ko 50

Fig 9



Vm a Ko 80

Fig 10

(K) O	Log. (K) O	Vm	Desv. Stand
0.5	-0.3010	118	5.9
1	0	109.6	3.2
2.5	0.3979	92.6	10
5	0.6989	79.5	7
10	1	64.7	3.6
20	1.3010	46	4.9
50	1.6980	23	4
80	1.9030	11	2.3

Los valores correspondientes al potencial de membrana obtenidos variando la concentración extracelular de potasio, se han ajustado experimentalmente a la ecuación de Nernst. Esto se expresa en la figura 11.

Figura 11: en ordenadas, valores medios de potencial de membrana medidos a diferentes concentraciones extracelulares de potasio.

en abscisas, $\text{Log.}\frac{Ki}{Ko}$, tomando como valor de referencia de Ki 140.

La línea contínua representa el potencial de equilibrio del potasio. Se observa, que los valores experimentales se ajustan a la recta teórica para valores de concentraciones extracelulares de potasio superiores a 10 mM (flecha). Para concentraciones inferiores a 10 mM, los resultados obtenidos experimentalmente se desvían de la línea teórica.

Globalmente, los resultados obtenidos en nuestro estudio experimental del potencial de membrana de las fibras musculares del sartorio de la rana, concuerdan con los postulados básicos teóricos sobre la génesis del mismo y se ajustan a lo observado experimentalmente por otros autores. Sobre este punto volveremos a insistir en la discusión de nuestro trabajo experimental.

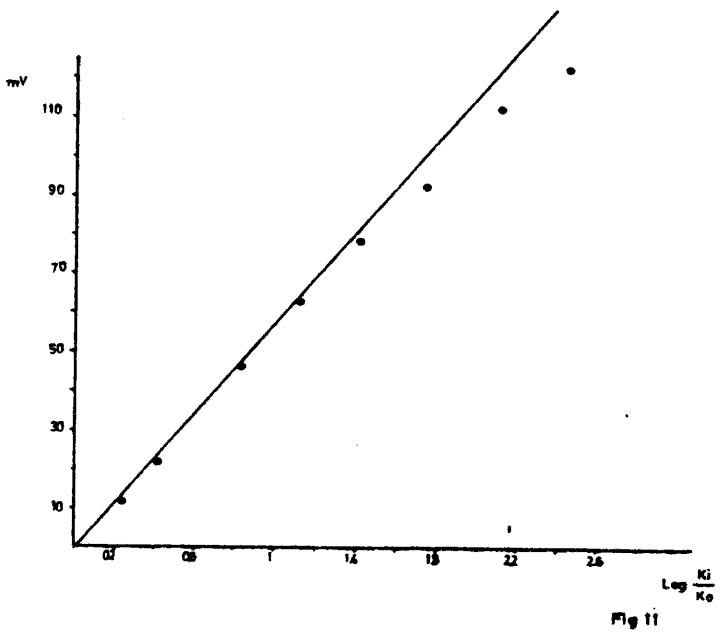


Fig 11

B)- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES PASIVAS DE LA MEMBRANA DE LA FIBRA MUSCULAR DEL SARTORIO DE LA RANA

Las propiedades pasivas constituyen, genéricamente, las bases de la excitabilidad y a su vez la excitabilidad constituye la base del funcionamiento del sistema nervioso. Este postulado explica por sí mismo, el porqué consideramos prioritario el estudio de las propiedades pasivas de nuestra preparación.

Desde un punto de vista más próximo, nuestra finalidad en esta fase del trabajo fue doble: por una parte, completar el conocimiento de los parámetros bioeléctricos convencionales de la preparación y objetivar su viabilidad, y por otra, obtener unos resultados que permitiesen evaluar resultados posteriores a la luz de estos datos previos.

Para cumplir estos objetivos, realizamos un estudio de las propiedades pasivas de las células musculares según técnica descrita con anterioridad y procedimos sistemáticamente a:

- medir la resistencia input
- medir tau
- calcular la capacidad de la membrana

Estas medidas y cálculos se realizaron en cada fibra en un total de 21 fibras estudiadas.

Para conocer el efecto del pH del medio sobre las propiedades citadas, procedimos a la determinación de las mismas a distintos pH de líquido extracelular en un rango comprendido entre 6 y 8.

Los resultados obtenidos en cada fibra y para cada situación experimental se expresan en una gráfica: en ordenadas, la amplitud del potencial electrónico en mV; en abscisas, la intensidad de

la corriente inyectada intracelularmente. De esta forma, la resistencia input viene dada directamente por la pendiente de la recta.

1). Determinación de las propiedades pasivas de la membrana a pH 7

Se realizaron determinaciones en 15 fibras, procurando que todas ellas fueran aproximadamente del mismo tamaño. Los resultados obtenidos se resumen en el siguiente cuadro y en las figuras 12-26.

Fibra Nº	Ro (Ohmios)	Tau (msec.)	Cm ($\mu F/cm^2$)	Vm
1	253846	35	6.9	90
2	251923	30	6	78
3	277364	39	6.6	85
4	259297	35	6.6	87
5	295254	38	8.7	86
6	250106	38	7.7	89
7	236726	35	7.9	90
8	210909	25	7.1	87
9	259545	35	6.6	90
10	234370	30	6.9	90
11	199824	25	7.9	94
12	202770	27	8.3	87
13	220454	28	7.3	90
14	201118	30	9.4	87
15	233454	30	7	88

De estos datos obtuvimos los siguientes valores medios:

Ro; 239131 Ohmios (D.S. 28602)

Tau; 32 msec. (D.S. 4.7)

Cm; 7.4 $\mu F/cm^2$ (D.S. 0.9)

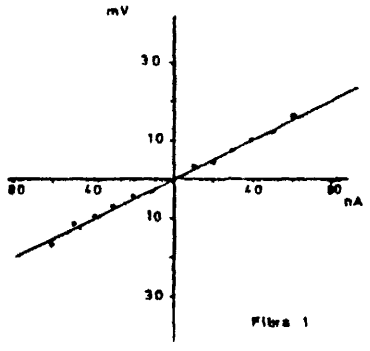
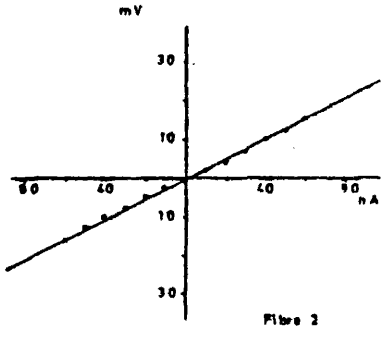
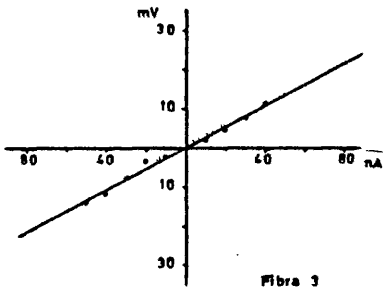


Fig 12



pH 7

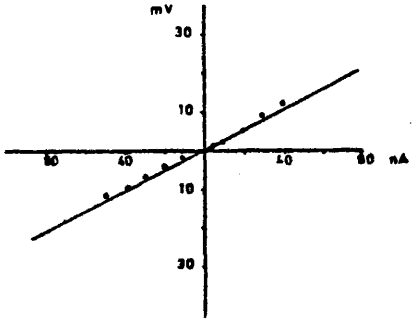
Fig 13



Fibra 3

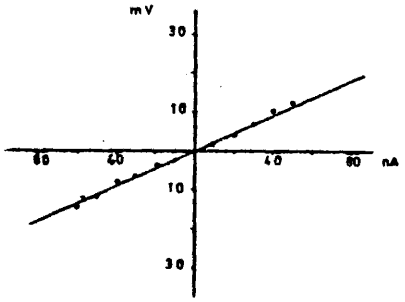
pH 7

Fig 14



Fibra 4

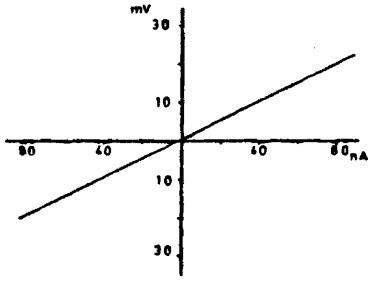
Fig 15



Fibre 5

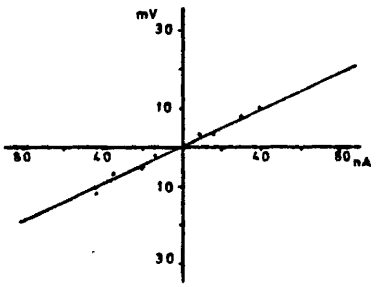
pH 7

Fig 16



Fibre 6

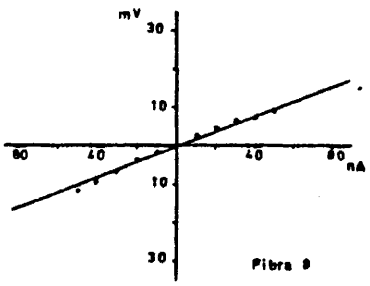
Fig 17



Fibre 7

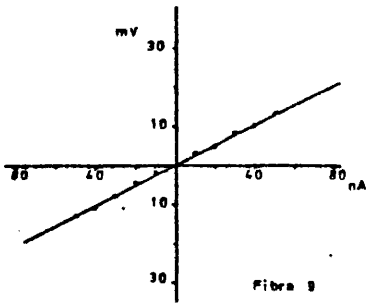
pH 7

Fig 18



Fibre 9

Fig 19



pH 7

Fig 20

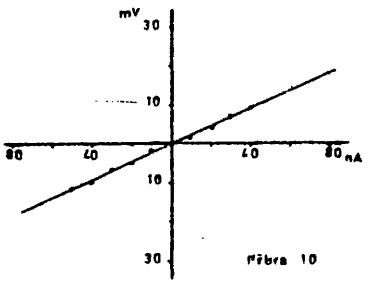
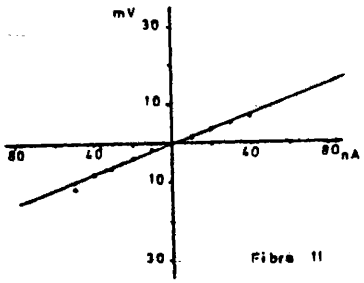


Fig 21



pH 7

Fig 22

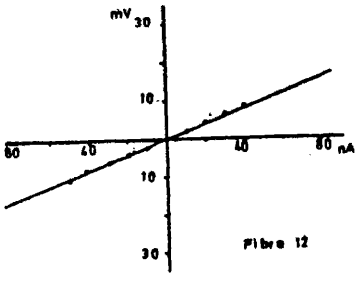
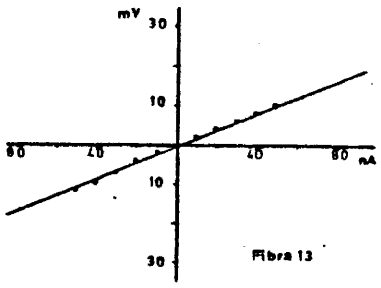


Fig 23



pH 7

Fig 24

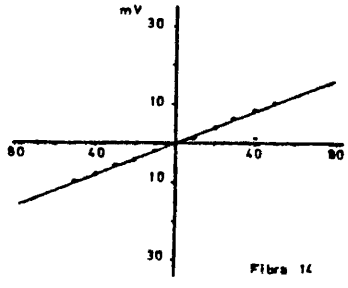
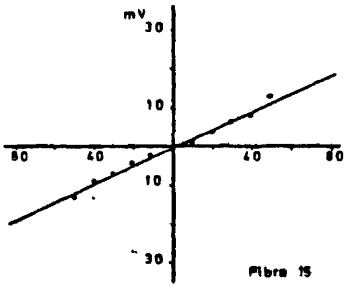
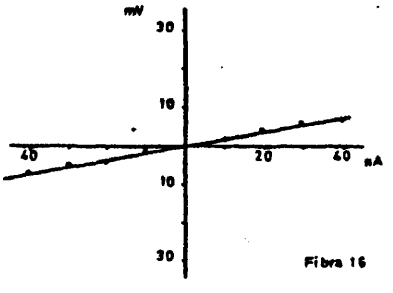


Fig 25



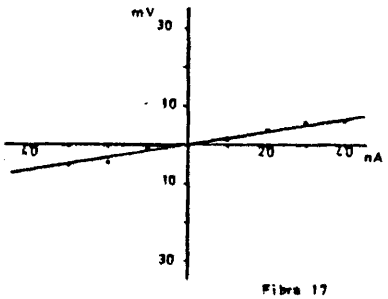
pH 7

Fig 26



pH 8

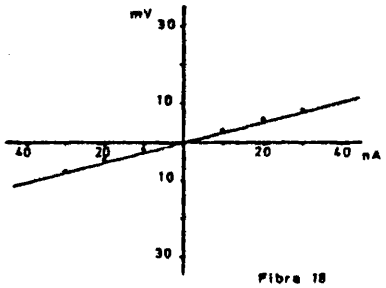
Fig 27



Fibre 17

pH 8

Fig 28



Fibre 18

pH 8

Fig 29

Una vez realizada esta primera fase experimental, valoramos estos resultados a modo de referencia y procedimos a la determinación de las propiedades pasivas a distintos pH de medio extracelular. Para ello, dejamos la preparación del músculo sartorio durante una hora en el Ringer con el pH seleccionado. Pasado este periodo de tiempo procedíamos a la medida de la resistencia input y la constante de tiempo según la técnica descrita.

2) Determinación de las propiedades pasivas de la membrana a pH 8

Los resultados obtenidos en estas condiciones experimentales se ilustran gráficamente en las figuras 27,28 y 29. Las medidas se hicieron en células de, aproximadamente, el mismo tamaño y procurando siempre la mayor proximidad posible entre los electrodos de registro y el polarizante.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Fibra Nº	Ro (Ohmios)	Tau (msec)	Cm $\mu F/cm^2$)	Vm
16	170001	28	6.2	74
17	166301	28	6.2	68
18	260714	30	6.6	76

De estos datos obtuvimos los siguientes valores medios:

Ro; 199oo5 Ohmios (D.S. 53473)
Tau; 28.6 msec (D.S. 1.1)
Cm; 6.3 $\mu F/cm^2$ (D.S. 0.2

A este pH de medio extracelular, observamos fundamentalmente una disminución de la resistencia input. Ello concuerda con observaciones de otros autores y nos referimos a ello en la discusión.

3) Determinación de las propiedades pasivas de la membrana a pH 6

. De igual manera procedimos a la medida y cálculo de las constantes eléctricas de la membrana a un pH de líquido extracelular igual a 6. Los resultados de este grupo de experimentos se pueden ver en las figuras 30,31 y 32, y en la siguiente tabla:

Fibra Nº	Ro (Ohmios)	Tau (msec.)	Cm ($\mu F/cm^2$)	Vm
19	600000	30	6.6	71
20	871428	35	7.7	90
21	491666	30	6.6	78

De estos datos se obtienen los siguientes valores medios:

Ro; 654364 Ohmios (D.S. 195630)
Tau; 31 msec (D.S. 2.8)
Cm; 6.9 $\mu F/cm^2$ (D.S. 0.6)

Destaca en estos resultados un aumento notable de la resistencia input con respecto a la obtenida a pH 7 del líquido extracelular. Ello también concuerda con observaciones realizadas por otros autores y se discutirán más adelante.

Cumplido el objetivo previo de establecer los parámetros bioeléctricos de potencial de membrana y constantes eléctricas de la misma, iniciamos la siguiente fase de nuestro trabajo experimental.

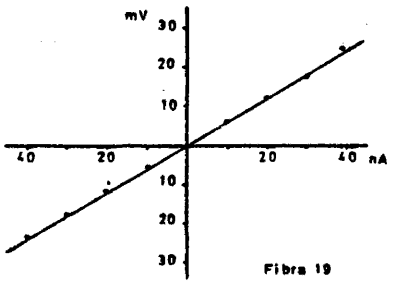

mV
30
20
10
40
20
20
40
nA
10
20
30
Fibra 19
pH 6

Fig 30

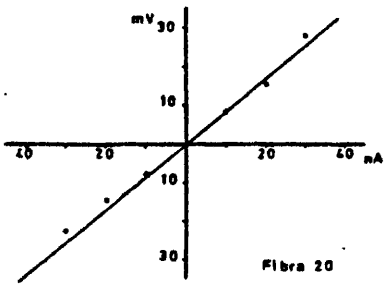

mV
30
10
40
20
20
40
nA
10
30
Fibra 20
pH 6

Fig 31

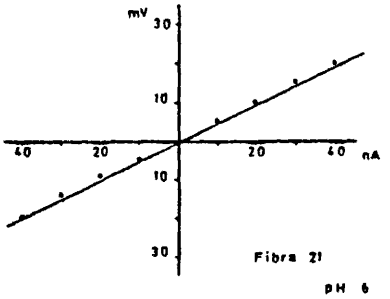


Fig 32

C)- MICROIONTOFORESIS CON AGENTES COLINERGICOS Y REACTIVOS SULFHIDRILICOS

Con el fin de intentar esclarecer la existencia o no de grupos SH reactivos a nivel de la membrana postsináptica del músculo sartorio de la rana y tratar de aclarar el papel que juegan en la activación del receptor, hemos realizado la aplicación iontoforética de reactivos de grupos sulfhidrílicos a nivel de la placa motora y en zonas alejadas de la misma.

La sistemática seguida ha sido la de trabajar con dos grupos de drogas:

- reactivos sulfhidrílicos oxidantes
- reactivos sulfhidrílicos reductores

Con ambos grupos de drogas hemos seguido un plan de trabajo homogéneo que puede esquematizarse de la siguiente manera:

- En un primer tiempo se ha realizado la aplicación del reactivo sulfhidrílico utilizando una pipeta simple. Ello obedece a dos razones que, a nuestro juicio, son fundamentales para dar por cumplidos los objetivos propuestos en esta tesis: por una parte, la aplicación de droga problema a través de pipeta simple permite descartar cualquier interpretación relativa a la técnica en cuanto al uso de pipetas dobles. Por otra parte, la obtención de algún tipo de respuesta a la aplicación electroforética de la droga en estudio, confiere la garantía de ser originada única y exclusivamente por la aplicación de dicha droga.

  Esta fase experimental, se realizó siguiendo la norma general de aplicar la droga a nivel de regiones alejadas de la placa y en zonas muy próximas e inmediatas a la misma. De esta for

ma, se pretende valorar la especificidad o no de los reactivos sulfhidrílicos por la membrana postsináptica. El criterio seguido para la localización de placas motoras, ha sido el de realizar registros en zonas próximas a ramillas nerviosas superficiales, preferentemente a nivel del borde medial del músculo muy cerca de la entrada de la rama nerviosa principal. A este respecto, también se ha valorado la presencia o no de M.E.P.Ps.

Este tipo de experimentos se llevó a cabo empleando siempre un Ringer a pH 7 y sin tampón para obviar cualquier posible efecto de factor sobreañadido.

De obtener respuestas con el empleo de pipeta única, se procede a la determinación de la sensibilidad de la membrana para la droga en cuestión, expresándola siempre en mV/nC.

Una vez cumplida esta primera fase experimental y en caso de haber obtenido resultados positivos, pasamos a un segundo tiempo en nuestro trabajo.

- estudio de las respuestas producidas por la aplicación electroforética de reactivos de grupos sulfhidrílicos.

En esta fase experimental, utilizamos pipetas dobles de carbacol y droga problema. Se ha procedido así, para facilitar la localización de placas motoras y para tener una referencia para comparar y evaluar la sensibilidad de nuestra preparación al carbacol y a la droga en estudio.En este sentido, el carbacol ha sido empleado como prototipo de agente colinérgico y sistemáticamente se ha procedido a determinar la sensibilidad al mismo, valorando la cifra obtenida como patrón de referencia para evaluar la eficacia de los reactivos de grupos sulfhidrílicos.

Este tipo de experimentos se ha llevado a cabo en Ringer a pH 6, 7 y 8. La finalidad de esto ha sido doble; por una parte, obviar cualquier interpretación sobre generación de cambios locales de pH durante la realización de la técnica iontoforética, que pudieran ser invocados como responsables de la aparición de determinados tipos de respuestas subsiguientes a la aplicación de la droga, o de enmascaramiento de las mismas. Por otra parte, al variar el pH del medio extracelular, nuestra intención ha sido la de valorar el grado de oxidación y/o reducción de los grupos SH de la proteína receptora, y su repercusión o no sobre las respuestas obtenidas en estas condiciones experimentales.

Cumplida esta segunda fase, iniciamos una tercera fase de nuestro trabajo que viene expresada por el estudio de la posible interacción entre los reactivos de grupos sulfhidrílicos y el carbacol. En este grupo de experimentos, la sistemática seguida ha sido función de las particularidades de cada droga o de cada grupo de droga y se expondrá con los resultados.

El pH del medio también se ha variado en un rango de 6 a 8 para estudiar las interacciones droga problema-carbacol. La finalidad de esta manipulación, ha sido la misma que la expuesta en el apartado anterior.

La aplicación de la técnica electroforética a las drogas catalogadas como reactivos de grupos sulfhidrílicos ofrece algunas particularidades que serán referidas en la discusión. Bástenos por ahora adelantar, que el grupo de reactivos sulfhidrílicos empleado por nosotros, caben dentro del grupo de drogas que son aplicadas por electroosmosis.

Los resultados obtenidos durante la realización de este esquema general de trabajo se exponen a continuación.

1)- IONTOFORESIS CON REACTIVOS SULFHIDRILICOS OXIDANTES

Hemos trabajado con dos drogas:

- ortoiodosobenzoato
- ditiobisnitrobenzoato

a)- Microiontoforesis con ortoiodosobenzoato (OIB)

La sistemática seguida en el estudio de la aplicación iontoforética de este agente oxidante ha sido la expuesta. Sin embargo, hemos añadido otra condición experimental para asegurarnos del efecto o no de los cambios de pH sobre las posibles respuestas a la aplicación electroforética de estos reactivos. Esta situación experimental, se refiere a la posibilidad de cambiar el pH de la solución del interior de la pipeta de OIB. En efecto, añadiendo HCl 0.1N, o bien NaOH 0.1 normal a la solución de OIB logramos variar el pH de la misma hacia valores ácidos o básicos. De esta forma, podíamos trabajar con pH de L.E.C. 6, 7 y 8 en combinacion con las pipetas de OIB ácidas, básicas y neutras. No siempre fue fácil mantener el pH de la solución de OIB dentro de un valor fijo, ya que no utilizamos tampón alguno, por no introducir un factor sobreañadido a la solución de droga problema. Por este motivo, en los resultados nos referimos globalmente a pipetas ácidas (aproximadamente pH 4,5) pipetas próximas a pH neutro y pipetas básicas (pH 8 aproximadamente).

Previamente realizamos iontoforesis con pipetas de HCl y NaOH, no obteniendo respuestas de ningún tipo en ningún caso, ni a nivel de la placa ni en zonas alejadas de la misma.

La concentración de OIB en el interior de las pipetas ha sido de $3x10^{-3}$ M, y la corriente de eyección siempre es de polaridad positiva.

La frecuencia de aplicación de pulso electroforético es de 1/6 seg. excepto cuando se especifique lo contrario.

-Iontoforesis de OIB con pipeta simple

La aplicación iontoforética de OIB a nivel de la placa motora va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas.

La aplicación electroforética a nivel de zonas extrasinápticas no va seguida de respuesta de ningún tipo.

La sensibilidad media obtenida para el OIB en esta fase del experimento fue del orden de 0.02mV/nC.

Los resultados se expresan en las figuras 33 y 34. Los potenciales de OIB se indican con una flecha.

fig. 33: Vm de la célula 73 mV

parámetros del pulso electroforético;

- duración 1500 msec.
- corriente de eyección 200 nA
- corriente de freno 5 nA

la amplitud de la despolarización es de 6mV

Fig. 34: Vm de la célula 80 mV

parámetros del pulso electroforético;

- duración 400 msec.
- corriente de eyección 200 nA
- corriente de freno 10 nA

la amplitud de la despolarización es de 2 mV

-Estudio de las despolarizaciones fásicas producidas por aplicación iontoforética de OIB a nivel de la placa motora

Se han utilizado para tal fin pipetas dobles.

La sensibilidad al carbacol mínima requerida para obtener despolarizaciones tras la aplicación iontoforética de OIB, es del orden de 2mV/nC, siendo la sensibilidad al carbacol óptima para obtener respuesta al OIB la de 10 mV/nC.

Los resultados obtenidos en las distintas situaciones experimentales creadas son los siguientes:

Ringer a pH 7

La aplicación iontoforética de OIB a pH de medio extracelular 7, se ha realizado variando el pH del interior de la pipeta:

Ringer pH 7 pipeta OIB pH neutro.- Se obtienen despolarizaciones fásicas cuando el OIB se aplica a nivel de la membrana postsináptica en zonas muy sensibles al carbacol. Ejemplo de este tipo de respuesta se ve en la figura 35.

Figura 35: el registro corresponde a la aplicación iontoforética de OIB y Carbacol a nivel de una placa motora de una fibra con un Vm de 79 mV.

parámetros de los pulsos electroforéticos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA	amplitud de la despolarización (mV)
Carb.	10	100	5	14.5
OIB	200	100	10	8

En este caso particular la sensibilidad de la placa al carbacol es del orden de 14.5 mV/nC y al OIB del orden de 0.4 mV/nC.

Ringer pH 7 pipeta OIB pH ácido.- Se obtienen despolarizaciones fásicas cuando el OIB se aplica electroforéticamente a nivel de la placa motora.

La sensibilidad media para el OIB, en este grupo experimental, es del orden de 0.04 mV/nC

En la figura 36 se pueden observar las despolarizaciones fásicas obtenidas en estas condiciones experimentales.

Fig. 36: Vm de la fibra 83 mV

parámetros del pulso electroforético:

- duración 400 msec.
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 0 nA

La amplitud de las despolarizaciones es de 4 mV y la sensibilidad en este caso particular es de 0.1 mV/nC.

A fin de comprobar la constancia de la respuesta, aumentamos la frecuencia de aplicación del pulso electroforético y mantuvimos el registro intracelular y el pulso de OIB durante 10 min.

El efecto de aumentar la frecuencia de estimulación se ilustra en la figura 37. La frecuencia de estimulación se indica debajo de los registros. Se observa una discreta disminución de la amplitud del potencial de OIB que va desde 4mV a una frecuencia de estimulación de 1/6 seg. a 2 mV con una frecuencia de estimulación de 1/2 seg. Por lo demás, el potencial de OIB se mantuvo a lo largo de los 10 min.

Ringer pH 7 pipeta OIB pH básico.- El OIB aplicado iontoforéticamente a nivel de la placa motora despolariza la membrana postsináptica fásicamente.

Las figuras 38 y 39 corresponden a potenciales de OIB obtenidos en estas condiciones experimentales.

La sensibilidad media para el OIB obtenida en este grupo experimental es de 0.07 mV/nC.

Fig. 38: despolarizaciones fásicas de 2 mV de amplitud obtenidas tras la aplicación electroforética de OIB a nivel de una placa motora.

El Vm es de 72 mV

parámetros del pulso:

- duración 200 msec.
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 0 nA

Fig. 39: potenciales de OIB registrados a nivel de una placa motora con un Vm de 76 mV

parámetros del pulso electroforético:

- duración 500 msec.
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 10 nA

la amplitud de la despolarización es de 4 mV.

Ringer pH 6

Siguiendo el mismo procedimiento experimental, hemos variado el pH de la solución de OIB del interior de la pipeta. Los resultados obtenidos son los siguientes.

Ringer pH 6 pipeta OIB pH alcalino.- La aplicación electroforética a nivel de la placa de OIB va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas.

En la figura 40, se observan potenciales de OIB obtenidos en estas condiciones experimentales. Los parámetros iniciales del pulso electroforético son:

- duración 400 msec.
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 0 nA

Este pulso electroforético da origen a un potencial de OIB de 7 mV de amplitud (flecha). En a se aplica una corriente de freno de 10 nA y se observa la disminución de la amplitud del potencial de OIB a 2 mV inicialmente, estabilizándose posteriormente a 3mV.

La sensibilidad media para el OIB en este grupo experimental es de 0.1 mV/nC.

Ringer pH 6 pipeta OIB pH ácido.- Se obtienen despolarizaciones fásicas con la aplicación de OIB electroforéticamente a nivel de la placa.

La sensibilidad media para el OIB en este grupo experimental fue de 0.1 mV/nC.

La figura 41, muestra despolarizaciones fásicas de 2mV de amplitud, obtenidas en esta situación experimental tras la aplicación de pulsos electroforéticos de OIB a nivel de la placa motora de una fibra muscular de Vm 77. Los parámetros del pulso:

- duración 500 msec.
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 5 nA

Debido a la casi imposibilidad de mantener el pH de la solución de OIB cerca de la neutralidad, optamos por aplicarlo sin forzar esta situación. El pH de la solución de OIB sin añadir HCl ni NaOH es del orden de 6. Incluimos estos resultados con los obtenidos con las pipetas"ácidas" con un pH de 4-5.

Ringer pH 8

Para completar el estudio de los potenciales de OIB procedimos a la aplicación iontoforética del mismo en un Ringer a pH8 y variando asimismo el pH del interior de la pipeta. Los resultados obtenidos en esta situación experimental son los siguientes:

Ringer pH 8 pipeta OIB pH alcalino.- La aplicación electroforética de OIB a nivel de la U.N.M. va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas. Uno de estos registros se ilustra en la figura 42.

Figura 42: Despolarizaciones fásicas producidas por la aplicación electroforética de OIB a nivel de una placa motora de una fibra de Vm 73.

Parámetros del pulso:

- duración 300 msec.
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno inicial: 0 nA

La amplitud inicial del potencial de OIB es de 5 mV. En a se aplica una corriente de freno de 10 nA y la amplitud del mismo dis

minuye a 4 mV.

La sensibilidad media de este grupo experimental al OIB es del orden de 0.08 mV/nC.

Ringer pH 8 pipeta OIB pH ácido.- La aplicación de OIB a nivel de la placa también va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas.

La sensibilidad media al OIB en este grupo experimental es del orden de 0.04 mV/nC.

Ejemplo de estos potenciales se puede ver en la figura 43.

Figura 43: despolarizaciones fásicas de 2 mV de amplitud producidas por la aplicación electroforética de un pulso de OIB de los siguientes parámetros:

- duración 300 msec.
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 10 nA

El Vm de la célula; 79 mV.

-Estudio de la interacción OIB-Carbacol

Siguiendo la misma sistemática, hemos abordado este problema trabajando a distintos pH de líquido extracelular y variando dentro de lo posible el pH de la solución de OIB en el interior de la pipeta.

En general, los resultados obtenidos en este apartado no fueron homogéneos, mostrando, por el contrario, variabilidad e incluso en ocasiones efectos dispares. Aunando nuestros resultados, podemos establecer que la interacción OIB-carb. se presenta en las siguientes formas:

- nulo efecto de OIB sobre el potencial de carbacol
- efecto potenciador de OIB sobre potencial de carbacol
- efecto inhibidor de OIB sobre potencial de carbacol sin posterior supersensibilidad, expresada como aumento de amplitud sobre la amplitud inicial del potencial de carbacol tras la eliminación del pulso de reactivo sulfhidrílico.
- efecto inhibidor del OIB sobre potencial de carbacol con aparición de supersensibilidad posterior.

Desglosados estos resultados en las distintas situaciones experimentales, obtenemos lo siguiente:

Ringer pH 7

Los resultados a este pH de líquido extracelular, fundamentalmente, mostraron un efecto inhibitorio del OIB sobre el potencial de carbacol. Este efecto inhibitorio puede ir seguido o no de un estado de supersensibilidad.

Registros ilustrativos de estos resultados se expresan en las figuras 44, 45 y 46.

Figura 44: Efecto inhibitorio de OIB sobre carbacol sin posterior supersensibilidad. Se observa el efecto inhibidor de un pulso previo de OIB sobre el primer potencial de carbacol y no se observa aumento de la amplitud del mismo al suprimir el pulso de OIB.

Parámetros de los pulsos:

droga	duración msec	c. de eyección nA	c.de freno nA	amplitud de la despolarización mV
Carb.	30	100	5	20
OIB	300	100	10	2

En 1 la amplitud del potencial de carb. disminuye a 10 mV

En a se suprime pulso de OIB y la amplitud del pot. de carb. es de 17 mV

En 2 se aplica pulso de OIB nuevamente y la amplitud del pot. de carb. disminuye a 6.5 mV.

En este caso particular la pipeta de OIB tiene un pH ácido.
El Vm de la célula es de 72 mV.

Figura 45: Efecto inhibitorio de OIB sobre potencial de carbacol con posterior supersensibilidad. Se observa la inhibición del potencial de OIB sobre el potencial de carbacol, pasando éste de tener una amplitud inicial de 20 mV a 12 mV cuando va precedido de un pulso de OIB.

En a al quitar el pulso de OIB, el potencial de carbacol sobrepasa su amplitud inicial alcanzando los 23,6 mV.

El Vm es de 72 mV

Parámetros de los pulsos:

Droga	Duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA	amplitud de la despolarización (mV)
Carb.	40	100	5	20
OIB	400	100	10	1

La pipeta de OIB tenía un pH ácido

Figura 46: Efecto inhibitorio de OIB sobre potencial de carbacol sin posterior supersensibilidad. Un potencial de carbacol de 29 mV es inhibido por un pulso previo de OIB a 20 mV. Suprimido el pulso de OIB en a, el potencial de carbacol sobrepasa su amplitud inicial, alcanzando los 33 mV.

Parámetros de los pulsos:

Droga	Duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb.	30	100	5
OIB	400	100	10

La pipeta de OIB tenía un pH ácido

Ringer pH 6

A este pH de líquido extracelular, hemos obtenido fundamentalmente una acción potenciadora de OIB sobre el potencial de carbacol. Esta acción potenciadora, se manifestó fundamentalmente bajo dos formas:

- al aplicar el primer pulso de OIB.- (fig.47) Este fue el caso más frecuentemente observado trabajando en estas condiciones experimentales. En el caso particular de la figura 47, el potencial de carbacol con

una amplitud inicial de 10 mV, se potenció en 9 mV sobre su amplitud inicial al aplicársele previamente un pulso de OIB. Al suprimir el pulso, se estabiliza nuevamente en un valor cercano a la amplitud inicial de 10 mV.

Parámetros de los pulsos:

Droga	Duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb.	20	100	5
OIB	500	100	10

En este caso el pH de la solución de OIB era alcalino.

El Vm de la célula es de 81 mV

- al aplicar sucesivos pulsos de OIB.- El primer pulso de OIB inhibe el potencial de carbacol, pero los siguientes pulsos lo potencian. (Este efecto no se obtuvo a pH7). Estos resultados se ilustran en las figuras 48 y 49

Figura 48: el primer pulso inhibe hasta hacer desaparecer practicamente el potencial de carbacol. El tercer pulso de OIB potencia el potencial de carbacol 5.5 mV sobre su amplitud inicial, siendo la amplitud inicial del mismo 13 mV.

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb.	30	100	5
OIB	500	100	10

En este caso la pipeta de OIB tenía un pH ácido

El Vm de la célula era de 78 mV

Figura 49: mismo efecto que la figura anterior. En este caso el segundo pulso potencia 4.4 mV sobre la amplitud inicial. Esta, era del orden de 10 mV.

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb.	20	100	10
OIB	200	100	10

En este caso el pH de la pipeta de OIB era ácido

El Vm de la célula era de 70 mV

En un caso no obtuvimos ningún efecto de OIB sobre los potenciales de carbacol. La amplitud de estos mismos permaneció constante, alrededor de los 10 mV, antes, después y durante la aplicación electroforética de OIB.

Este caso se ilustra en la figura 50.

Figura 50: Nulo efecto de OIB sobre carbacol

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb.	20	100	5
OIB	200	100	10

La pipeta de OIB tenía un pH alcalino

El Vm de la fibra era de 70 mV.

Ringer pH 8

A este pH la interacción OIB-carbacol puede esquematizarse en dos grandes grupos:

- nula acción de OIB sobre el potencial de carbacol.- En este caso el pulso de OIB no ejerce acción potenciadora ni inhibidora sobre el pctencial de carbacol. La figura 51, expresa esta situación experimental y sus resultados. El Vm de la célula es de 72 mV.

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c.de eyección nA	c.de freno nA	amplitud de la despolarización(mV)
Carb	12	100	5	10
OIB	200	100	10	1.5

El pH de la solución de OIB era alcalino

- acción potenciadora de OIB sobre carbacol.- Los resultados de este diseño experimental se expresan en la figura 52. Hay una potenciación de 11 mV sobre la amplitud inicial de 12 mV cuando el potencial de carbacol va precedido de un potencial de OIB.

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb	10	100	5
OIB	200	100	10

El potencial de la fibra era de 80 mV.

El pH de la solución de OIB era básico.

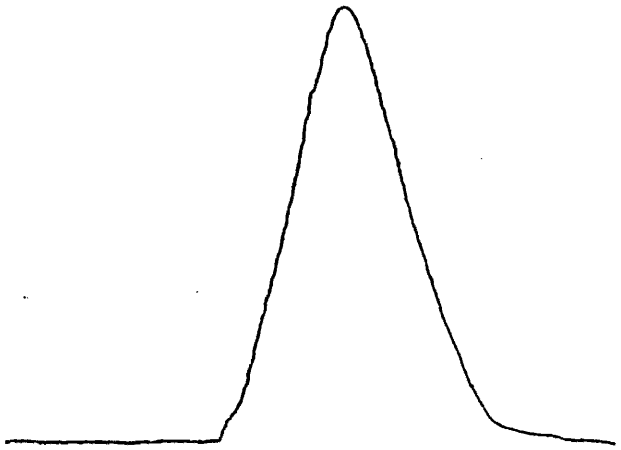


Fig 33 0.5 seg

Fig 34 1 seg

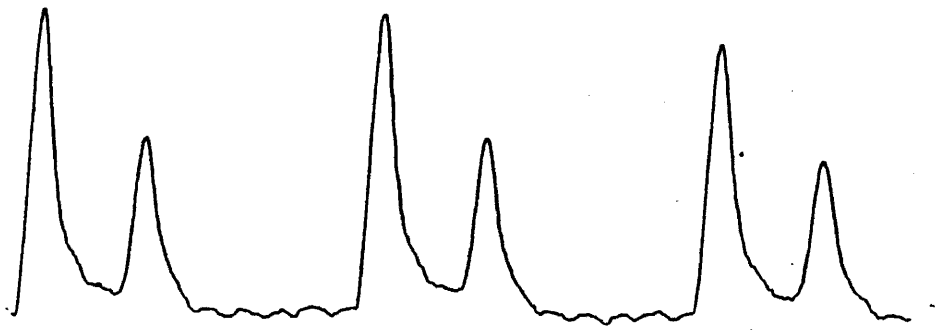


Fig 35 1seg

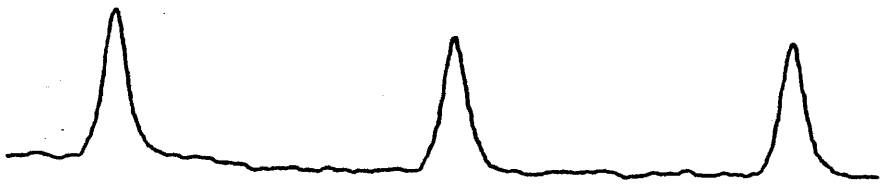


Fig 36 1 seg

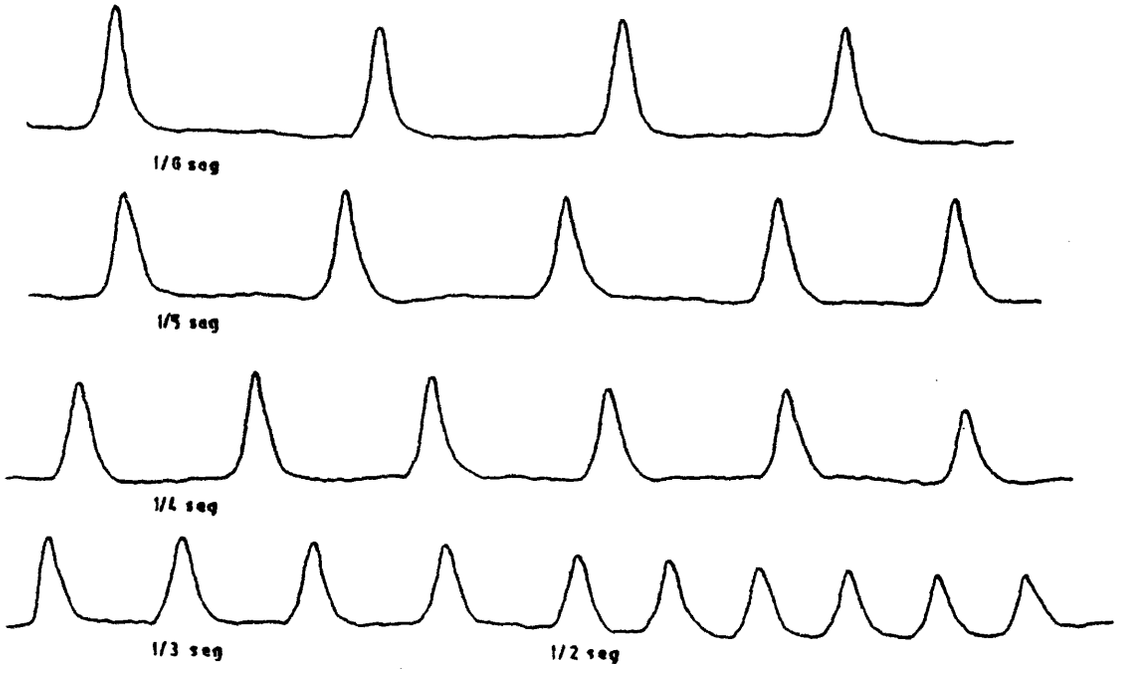


Fig 37 $\frac{}{1\ seg}$

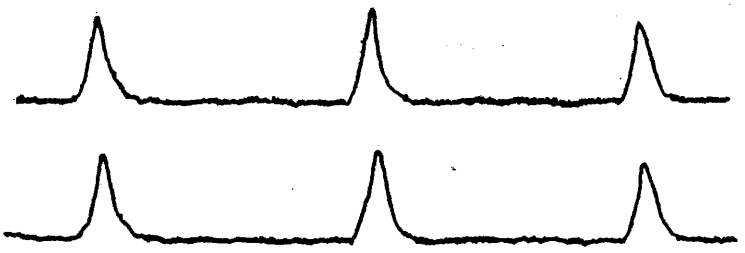


Fig 38 $\frac{}{1\,seg}$

frecuencia de estimulacion 1c/5 seg

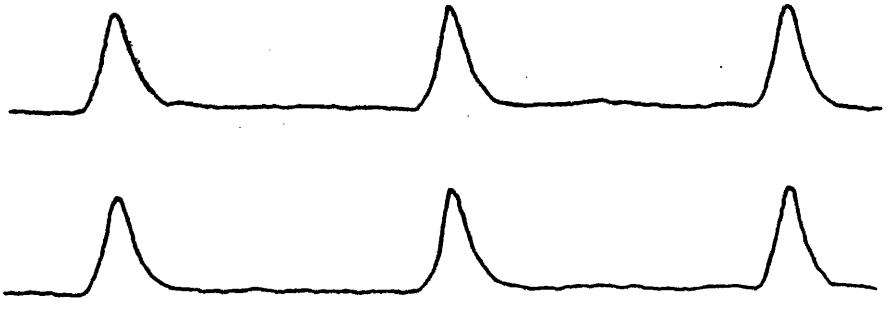


Fig 39 $\frac{}{1\,seg}$

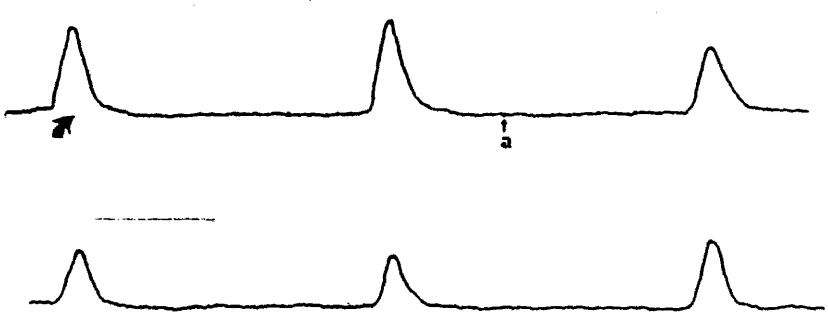


Fig 40 $\frac{}{1\ seg}$

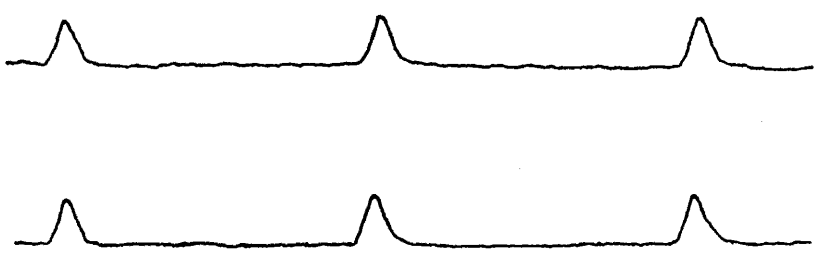


Fig 41 $\frac{}{1seg}$

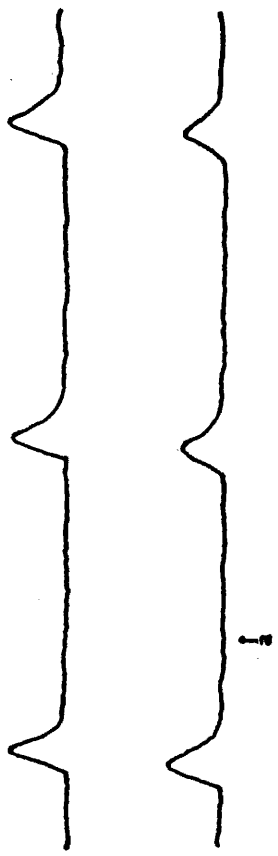


Figura 42 $\overline{\text{Tseg}}$

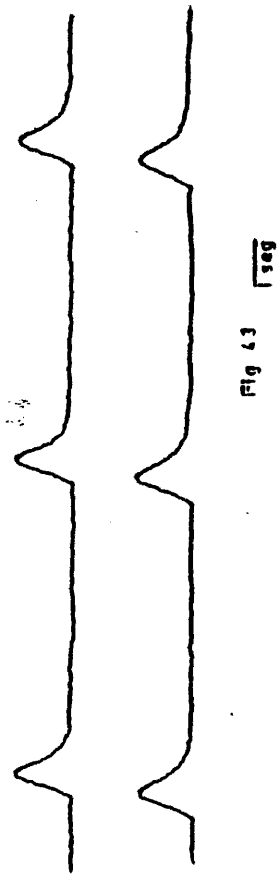


Fig 43 $\overline{\text{Tseg}}$

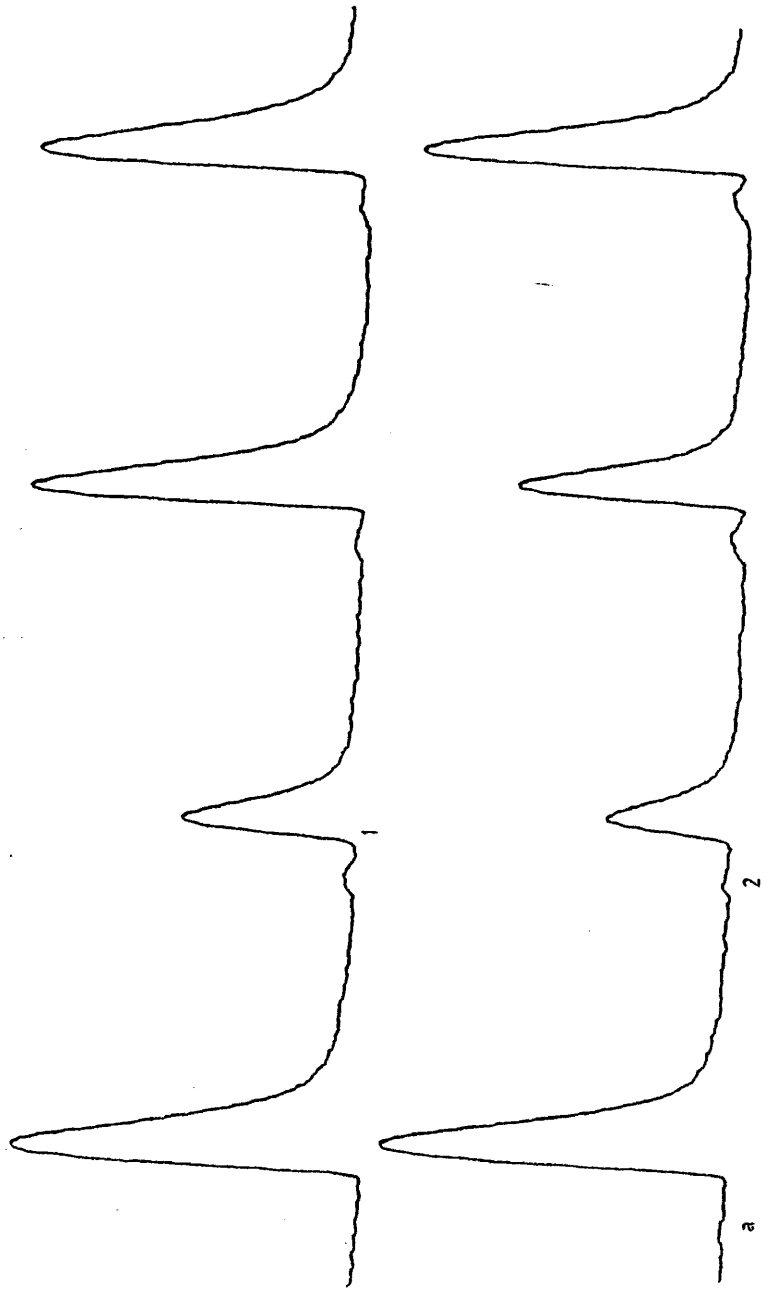


Fig 44 $\frac{}{1\,seg}$

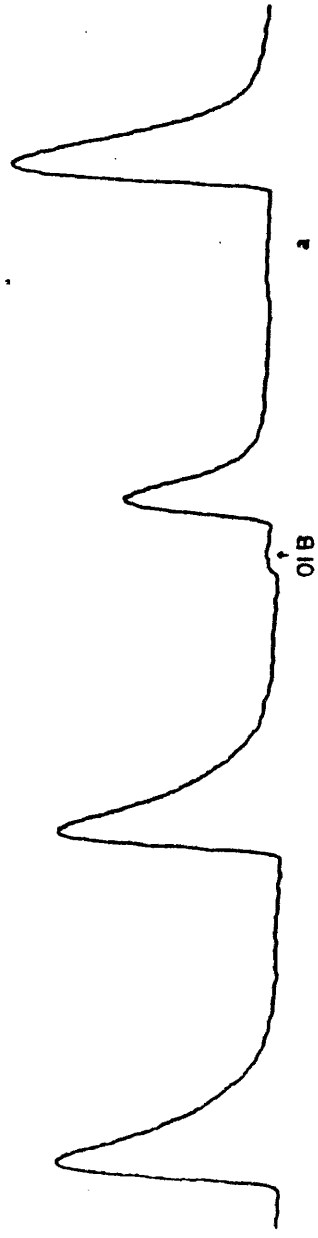


Fig 45 $\frac{1}{1\,sag}$

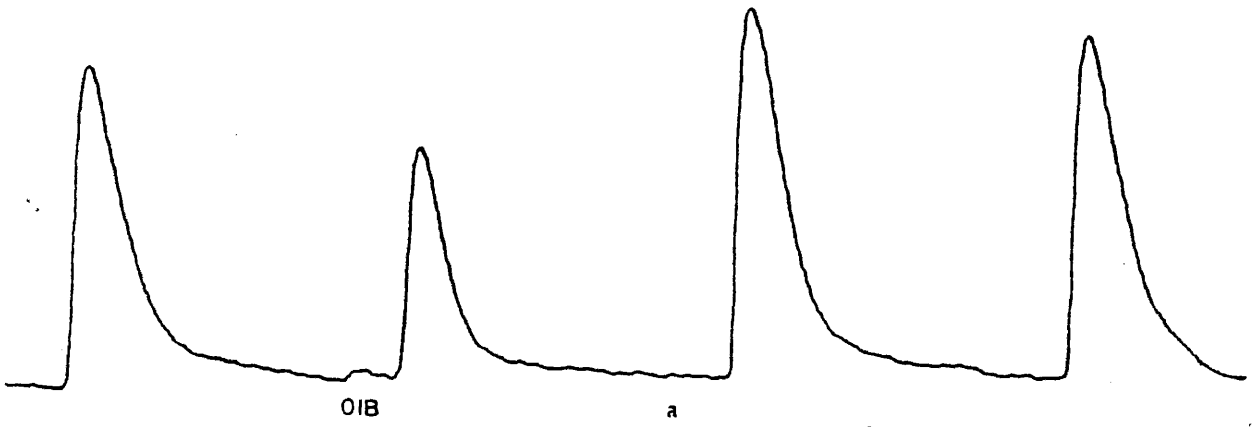


Fig 46

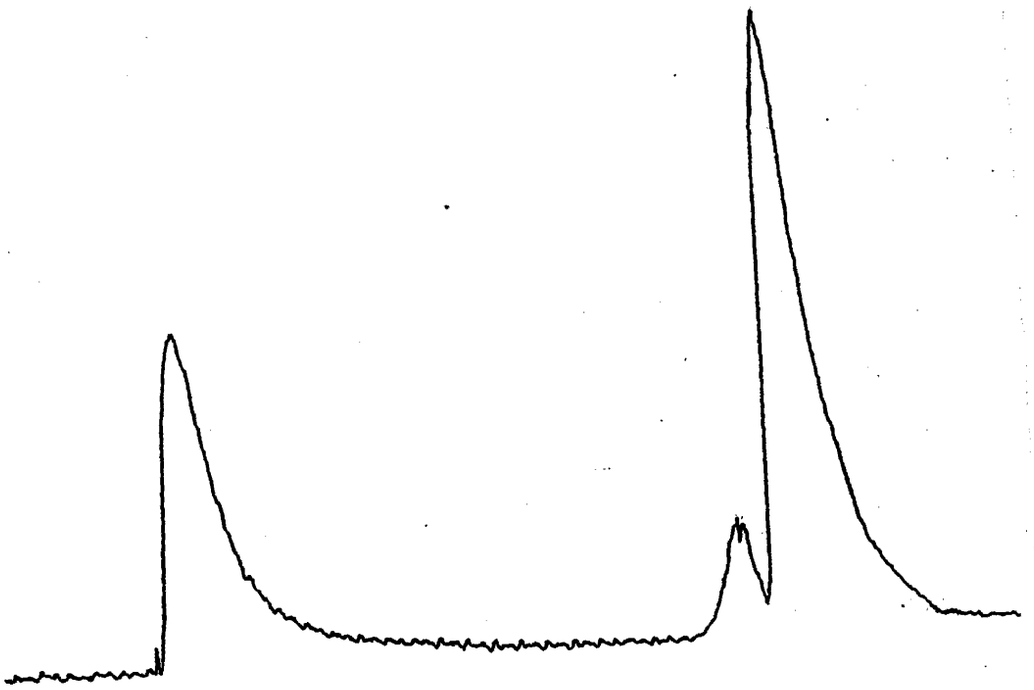


Fig 47 $\overline{1\,seg}$

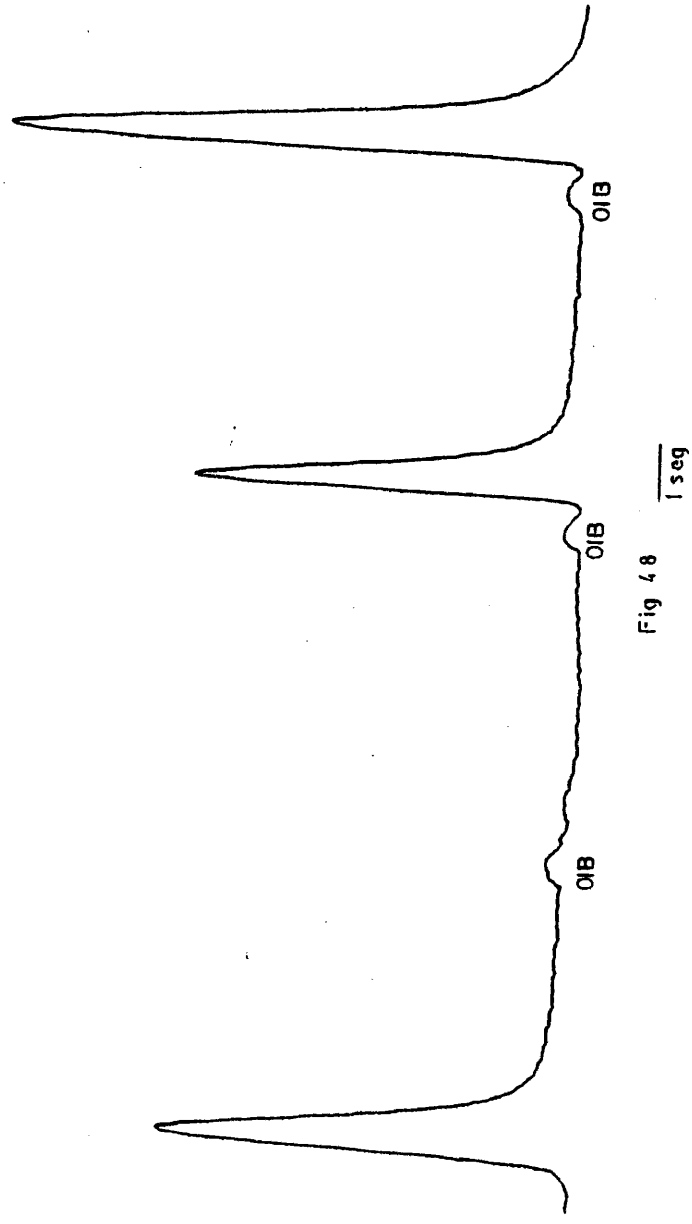


Fig 48

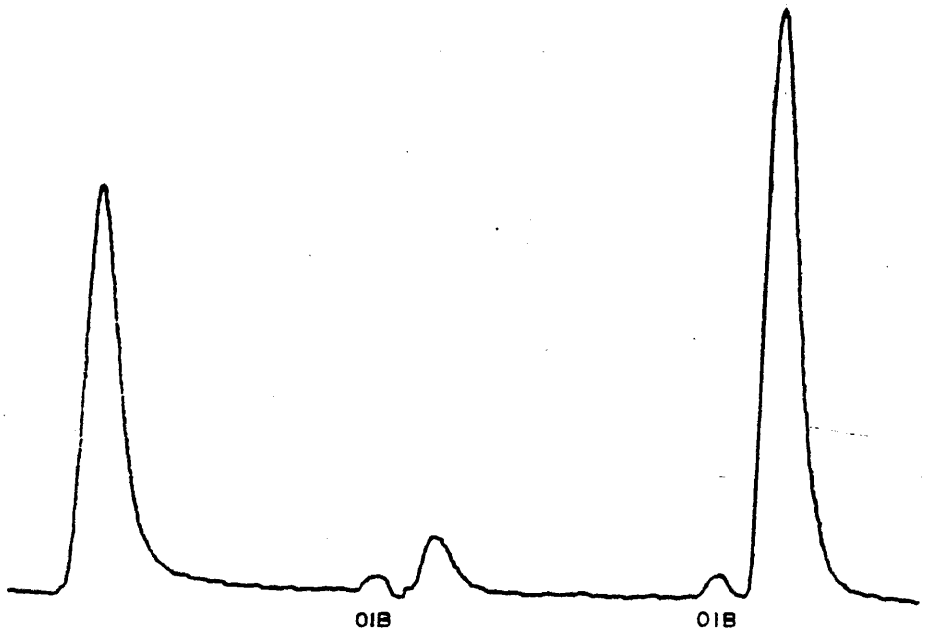


Fig 49 $\frac{}{1\text{seg}}$

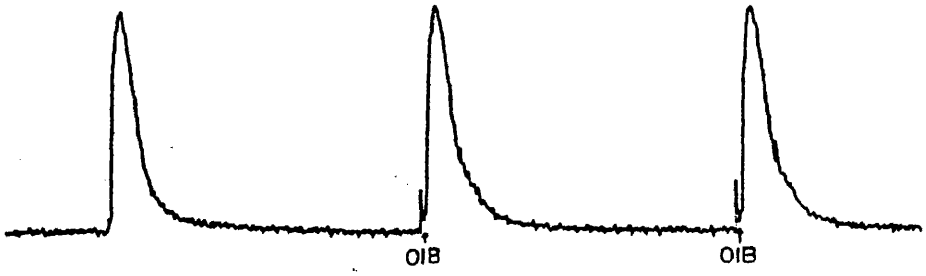


Fig 50 1 seg

Fig 51 1 seg

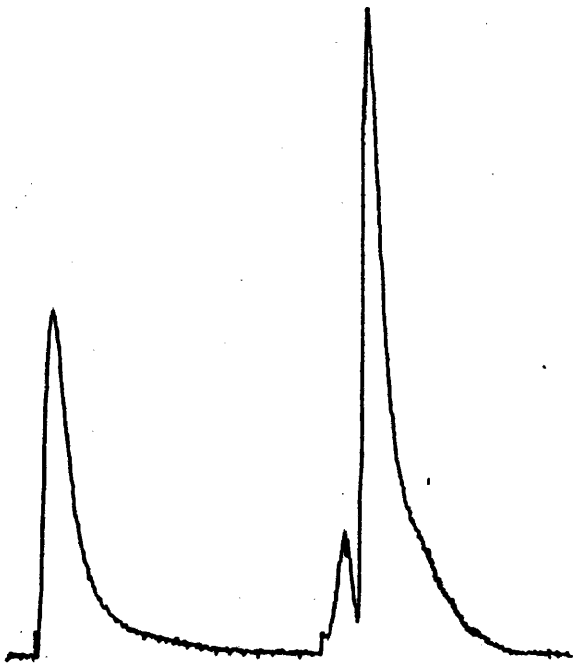


Fig 52

1seg

b) Microiontoforesis con ditiobisnitrobenzoato (DTNB)

La sistemática seguida en el estudio de esta droga, ha sido diferente en parte, a las líneas generales expuestas con anterioridad. Ello es debido, a que siendo el DTNB casi insoluble en agua, se han preparado soluciones 3×10^{-3} M. del mismo en etanol. Esto supuso, que el primer paso obligado en el estudio de la acción de esta droga, fuese la aplicación electroosmótica de etanol a nivel de la placa y en zonas alejadas de ella. La finalidad de esta fase del experimento era la de descartar cualquier efecto del etanol sobre ulteriores respuestas.

Otro factor de seguridad que hemos añadido ha sido el de realizar iontoforesis con pipetas de DTNB con la droga disuelta en agua destilada. La escasa solubilidad de la droga en agua, hace difícil su manejo. A pesar de ello, los resultados obtenidos en esta situación experimental son idénticos a los obtenidos con las pipetas DTNB-etanol. Por ser éstas más fáciles de manipular una vez obtenidos resultados con DTNB en agua destilada, pasábamos a trabajar con pipetas DTNB-etanol.

En un segundo tiempo, realizamos la iontcforesis de DTNB utilizando pipetas dobles de carbacol y DTNB.

En todos los casos la polaridad de la corriente de eyección es positiva y la frecuencia de estimulación es de 1/6 seg. salvo cuando se indique lo contrario.

Los resultados obtenidos con esta droga oxidante son los siguientes:

-Aplicación electroosmótica de etanol

No se obtuvo ningún tipo de respuesta a la aplicación electroosmótica de etanol a nivel de la placa motora ni en regiones alejadas de ella. La figura 53 muestra un ejemplo de aplicación de etanol a nivel de una zona de alta sensibilidad al carbacol (12 mV/nC).

Figura 53: aplicación electroosmótica de etanol y efecto del mismo sobre el potencial de carbacol.

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb	10	100	5
Etanol	500	100	10

En 1 potencial de carbacol de 12 mV

En a pulsos de etanol de polaridad positiva

En b se quita la corriente de freno a la pipeta de etanol

En c se aplica nuevamente corriente de freno a la pipeta de etanol

En d se invierte la polaridad del pulso de etanol

En e se aplican pulsos de etanol positivos nuevamente

En f, g y h aplicación simultánea de pulsos de carbacol y etanol. Se observa una inhibición del potencial de carbacol del orden de 3 mV sobre la amplitud inicial. Este efecto inhibitorio fue una constante y volveremos sobre él en la discusión de la interacción DTNB-carbacol.

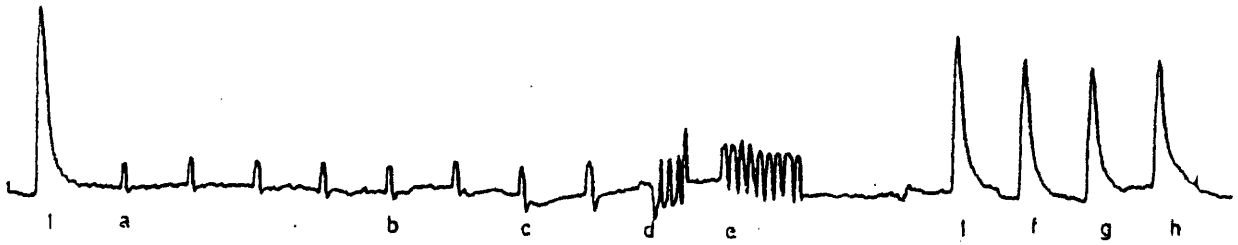


Fig 53

6 seg

- Microiontoforesis con DTNB

La aplicación iontoforética de DTNB a nivel de la placa motora, va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas. En ningún caso se obtuvo respuestas de cualquier índole a la aplicación del mismo, en regiones extrasinápticas o alejadas de la placa.

La despolarización obtenida tras la aplicación de la droga, es independiente del pH del medio extracelular dentro de los límites estudiados (6, 7 y 8).

La sistemática seguida en el estudio de estas despolarizaciones fásicas, es la expuesta en el plan general de trabajo y los resultados obtenidos son los siguientes:

Ringer pH 7

Se obtienen despolarizaciones fásicas siempre que se aplique el DTNB en zonas sensibles al carbacol. A este respecto la sensibilidad mínima de carbacol para obtener respuestas evidentes al DTNB es de 7mV/nC.

La sensibilidad media de este grupo experimental para el DTNB es del orden de 0.2 mV/nC.

Ejemplos de respuestas obtenidas en esta condición experimental se ven en las figuras 54, 55 y 56.

Figura 54: despolarizaciones fásicas de 8 mV de amplitud producidas por la aplicación de un pulso de DTNB de los siguientes parámetros:

- duración 300 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 5 nA

La amplitud del potencial de DTNB disminuye hasta 5 mV en el 4º registro. Ello es indicativo de una corriente de freno demasiado baja.

Vm de la fibra: 70 mV

Figura 55: despolarizaciones fásicas de 6 mV de amplitud obtenidas a nivel de otra placa del mismo músculo por aplicación de un pulso de DTNB de las siguientes características:

- duración 300 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 10 nA

Vm de la fibra: 70 mV

Figura 56: se observa el efecto de aplicar una corriente de freno de 20 nA sobre un pulso de DTNB de las siguientes características iniciales:

- duración 300 msec
- c. de eyección 100 nA
- c de freno 10 nA

La amplitud inicial del potencial de DTNB es de 7 mV
Al aplicar 20 nA de corriente de freno (flecha), la amplitud del potencial de DTNB es de 2 mV.

Ringer pH 6

La aplicación de pulsos de DTNB en zonas muy próximas a la placa motora va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas.

En esta situación experimental, la sensibilidad mínima para el carbacol requerida para la aparición de respuesta evidente al DTNB es de 7.5 mV/nC. Localizadas zonas con este orden de sensi-

bilidad para el carbacol, se obtuvieron respuestas despolarizantes a la aplicación de pulsos electroforéticos de DTNB. La sensibilidad media para esta droga a este pH de líquido extracelular es de 0.3 mV/nC.

Ejemplos de potenciales de DTNB a Ringer pH 6 se pueden ver en las figuras 57 y 58.

Figura 57: potenciales de DTNB de 5 mV de amplitud producidos por aplicación de pulsos de DTNB de las siguientes características:

- duración 300 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 5 nA

Vm de la célula: 70 mV

Figura 58: potenciales de DTNB de 5 mV de amplitud producidos por la aplicación electroforética de pulsos de DTNB con las siguientes características:

- duración 200 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 5 nA

Vm de la célula: 70 mV

Ringer pH 8

A este pH de líquido extracelular también se observan despolarizaciones fásicas cuando se aplica la droga a nivel de la placa motora.

La sensibilidad mínima para el carbacol requerida para la obtención de respuestas evidentes a la aplicación iontoforética de DTNB

es del orden de 7 mV/nC.

La sensibilidad media para el DTNB en estas condiciones experimentales es del orden de 0.1mV/nC.

Las figuras 59 y 60 son representativas de los resultados obtenidos a este pH de L.E.C.

Figura 59: potenciales de DTNB a Ringer pH 8 obtenidos tras la aplicación electroforética de DTNB a nivel de una placa motora:

Parámetros del pulso:

- duración 300 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 10 nA.

La amplitud de la despolarización es de 5 mV.

El Vm de la célula, 74 mV

Figura 60: Despolarizaciones fásicas de 4 mV producidas por pulsos de DTNB

Parámetros del pulso:

- duración 300 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 10 nA

Vm de la fibra, 71 mV

-Estúdio de la interacción DTNB-carbacol

Con este fin utilizamos pipetas dobles de DTNB y carbacol, variando el pH del L.E.C. un un rango comprendido entre 6 y 8.

Globalmente, los resultados obtenidos en este apartado fueron homogéneos, mostrándose la acción del DTNB sobre los potenciales de carbacol bajo dos aspectos fundamentales:

- inhibición del potencial de carbacol por un pulso de DTNB aplicado previamente a él.
- potenciación del potencial de carbacol cuando se aplica un pulso de DTNB coincidiendo en el tiempo con él.

De estos resultados parece deducirse la importancia de la relación temporal entre ambos pulsos. Sobre este punto volveremos a insistir en la discusión.

Los resultados obtenidos a distintos pH de L.E.C. pueden esquematizarse:

Ringer pH 7

En estas condiciones experimentales hemos observado los dos aspectos básicos de la interacción DTNB-carbacol. Estos aspectos se expresan en la figura 61.

Figura 61: interacción DTNB-carbacol

Parámetros de los pulsos:

droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb	10	100	5
DTNB	200	100	10

Vm de la fibra: 70 mV

Los pulsos de DTNB se indican con una flecha.

en 1 la amplitud inicial del pot. de carbacol es de 10 mV

en a se aplica un pulso de DTNB 2 seg. antes del pulso de carbacol y se observa una inhibición del mismo del orden de 5 mV sobre la amplitud inicial.

en b se aplica un pulso de DTNB 1 seg. antes del pulso de carbacol.

en c se aplican ambos pulsos simultánemanete (doble flecha) y se observa una potenciación de la despolarización del orden de 9 mV sobre la amplitud inicial.

en 3 se suprime el pulso de DTNB y se observa que el potencial de carbacol vuelve a su amplitud inicial de 10 mV.

Figura 62: registro correspondiente a la misma fibra que en figura 61. Se muestra el efecto de quitar la corriente de freno a la pipeta de carbacol. Se observa que al quitar la corriente de freno comienza a aparecer la despolarización correspondiente al carbacol. Los potenciales de DTNB se indican con una flecha.

Valoramos este registro positivamente en tanto es expresión de la independencia de los canales de la pipeta doble.

Ringer pH 6

En esta condición experimental sigue prevaleciendo la relación temporal entre ambos pulsos a la hora de valorar su interacción.

Los resultados se pueden esquematizar en tres grupos:

- efecto inhibitorio de un pulso previo de DTNB sobre el potencial de carbacol.- Registros representativos de esta situación experimental se expresan en las figuras 63 y 64.

En ambas figuras los parámetros de los pulsos son:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb	20	100	5
DTNB	200	100	10

Figura 63: Se observa una disminución progresiva de la amplitud del potencial de carbacol desde un valor inicial de 10 mV (a) hasta 5 mV (b).
El potencial de DTNB se indica con una flecha y su amplitud es de 10 mV.
Vm de la célula: 70 mV

Figura 64: En a el pot. de carbacol tiene una amplitud de 13 mV

En b se aplica un pulso de DTNB y el pot. de carbacol se inhibe 5 mV sobre su amplitud inicial.

En c potencial de carbacol sin pulso previo de DTNB tiene una amplitud de 11.5 mV.

- efecto potenciador de un pulso de DTNB aplicado simultáneamente con un pulso de carbacol.- Este tipo de interacción se expresa en la figura 65.

Figura 65: Vm de la célula: 70 mV

parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb.	10	100	5
DTNB	200	100	10

La aplicación simultánea de ambos pulsos se indica por una doble flecha.

En a amplitud inicial del pot. de carbacol 5 mV

En b potenciación de 6.5 mV sobre la amplitud inicial

En c pulso de carbacol aislado. La amplitud del potencial de carbacol vuelve a la inicial.

- relación temporal entre los pulsos de DTNB y carbacol.- hemos variado el intervalo de aplicación entre un pulso y otro. Los resultados se muestran congruentes con la observación de que sólo la aplicación simultánea de ambos pulsos resulta en potenciación.

Ejemplos de este tipo de registros se pueden ver en las figuras 66 y 67.

Parámetros de los pulsos en las fig. 66 y 67:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
carb.	30	100	10
DTNB	200	100	10

Figura 66: Vm de la célula 70 mV

Se observa el efecto que tiene un pulso de DTNB (flecha), que produce una despolarización de 5 mV, aplicado 1 seg. antes de un potencial de carbacol de 10 mV de amplitud inicial.

En a se empieza a aplicar pulso de DTNB y se observa la inhibición progresiva del potencial de carbacol.

En b se suspende la aplicación de DTNB y se observa que el potencial de carbacol vuelve progresivamente a su amplitud inicial.

Figura 67: Efecto de DTNB sobre carbacol aplicado a diferentes intervalos.

En 1 amplitud inicial del potencial de carbacol 4 mV

En a se comienza a aplicar un pulso de DTNB 800 msec antes del pot. de carbacol

A partir de b el pulso de DTNB se aplica 700 msec antes que el pot. de carbacol.

A partir de c el pulso de DTNB se aplica 200 msec antes que el de carbacol

En c se observa ya una discreta potenciación del orden de 1 mV sobre la amplitud inicial

En d aplicación simultánea de ambos pulsos (doble flecha). Se observa una potenciación de 3 mV sobre la amplitud inicial.

Vm de la célula 78 mV.

Ringer pH 8

La interacción DTNB-carbacol a este pH de L.E.C. mostró las mismas particularidades que a pH 6 y 7.

La fig. 68 es un ejemplo representativo del tipo de interacción observado a este pH.

Figura 68: Vm de la fibra 79 mV

En a potencial de carbacol de 6 mV

En 1 (doble flecha) aplicación simultánea de ambos pulsos;pot.de 2.5m

En 2 " " " " " " " 8 "

En 3 " " " " " " " 8 "

Los demás registros corresponden a potenciales de carbacol aislados.

Los parámetros del pulso en este caso son los siguientes:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb.	20	100	5
DTNB	300	100	10

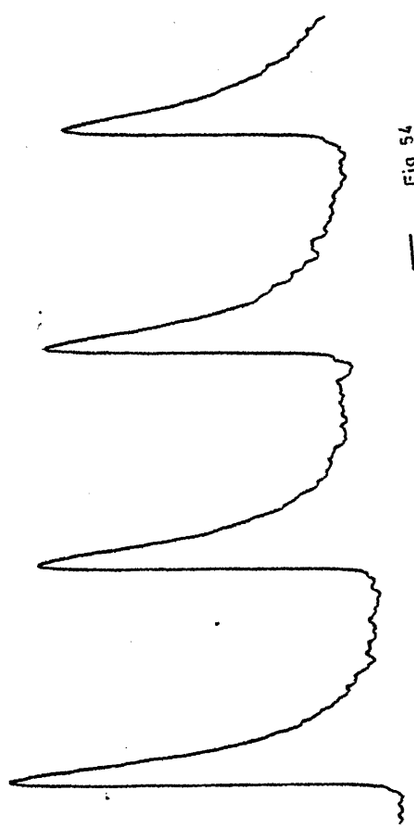


Fig 54

Fig 55 1 seg

Fig 56 1seg

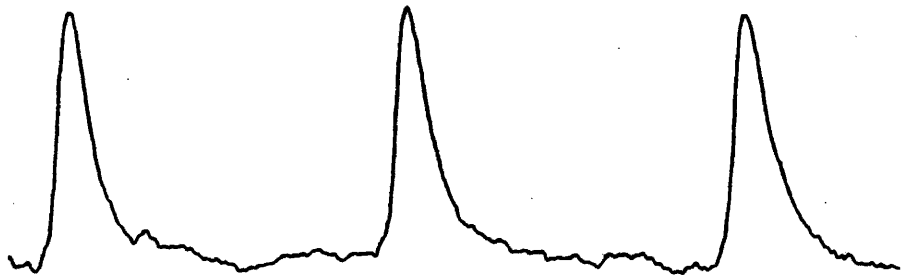


Fig 57 1 seg

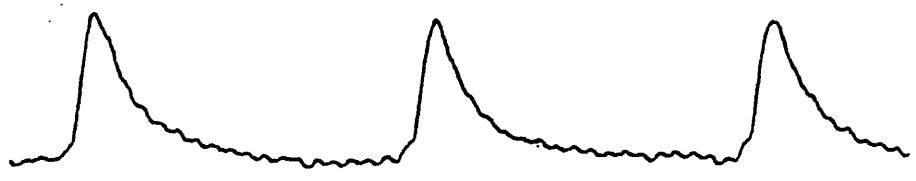


Fig 58 1 seg

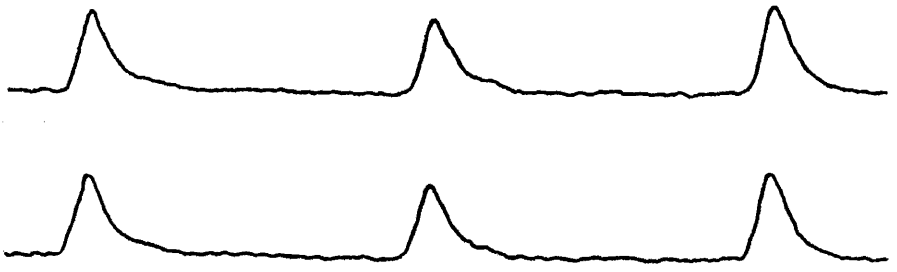


Fig 59 1seg

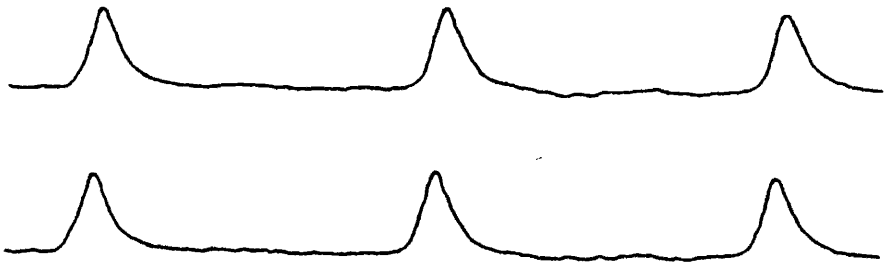


Fig 60 1seg

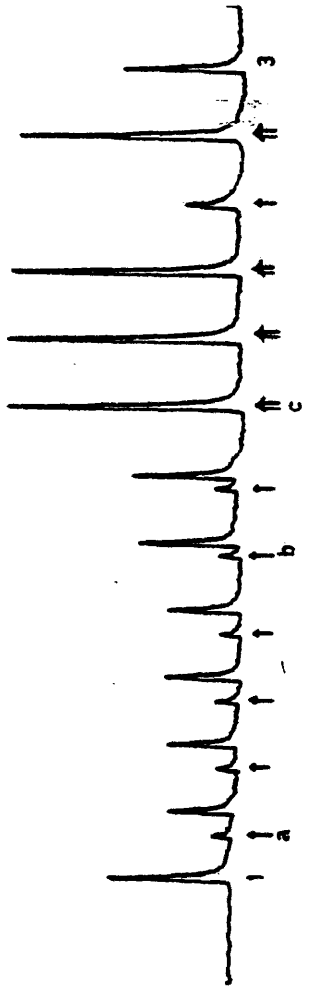


Fig 61 $\overline{6\,\text{seg}}$

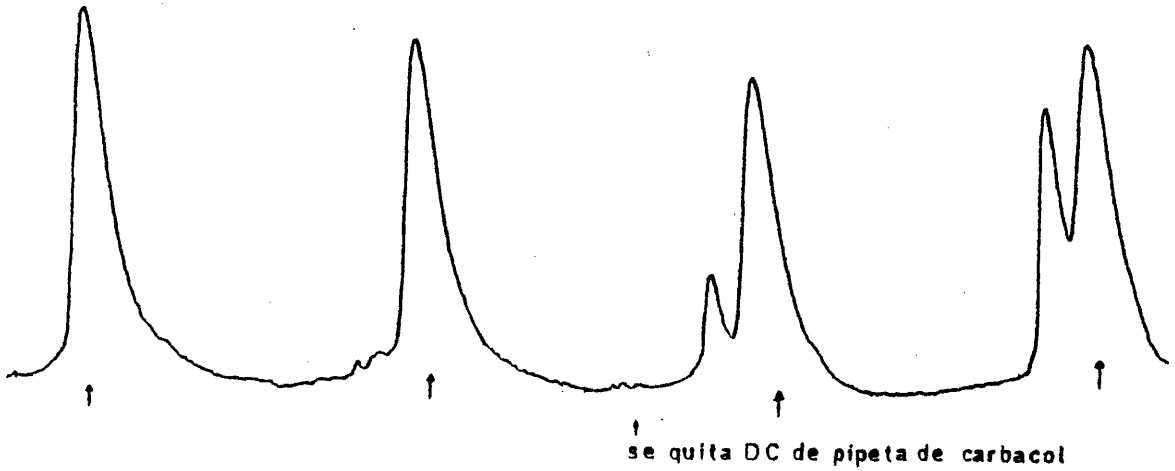


Fig 62 $\frac{}{1\,seg}$

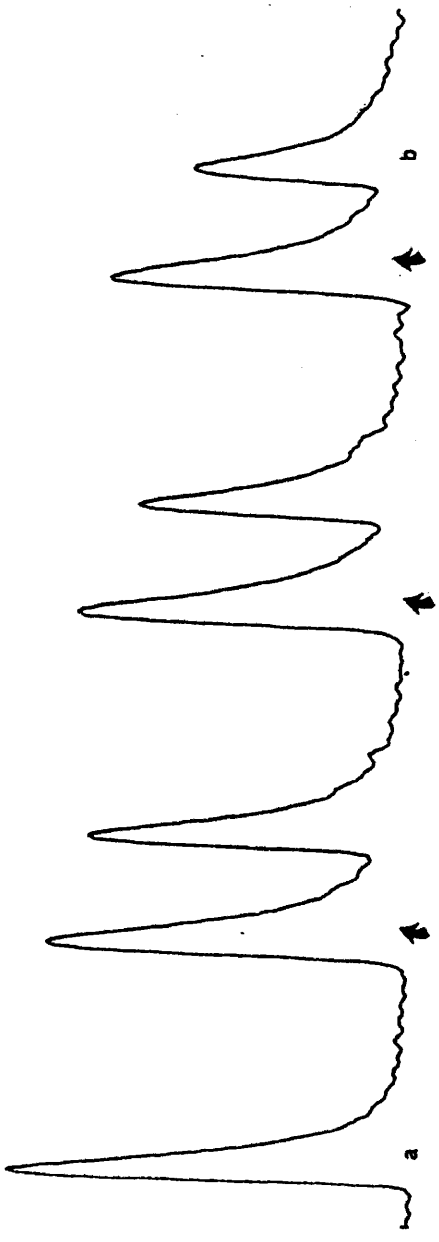


Fig 63

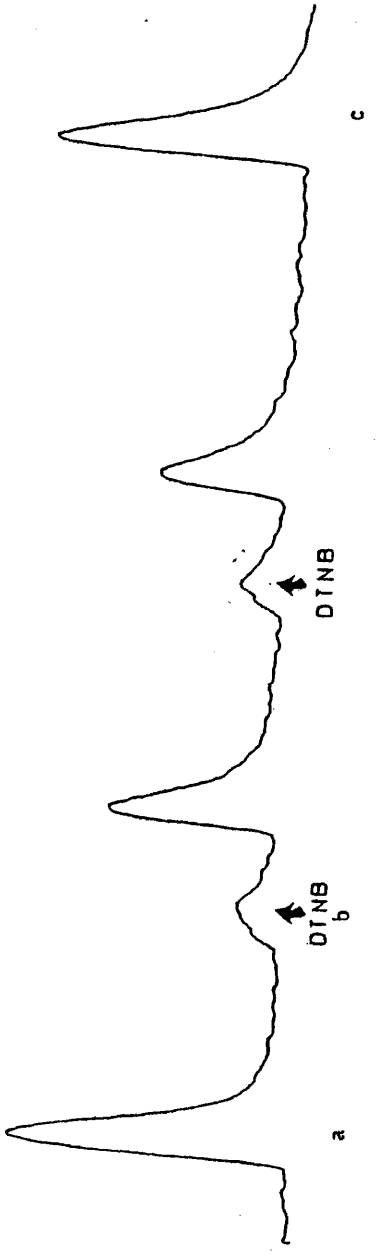


Fig 64

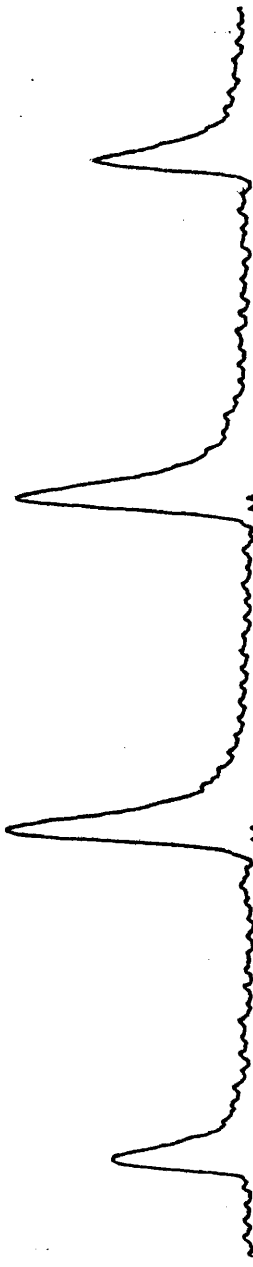


Fig 65 $\frac{}{1\,seg}$

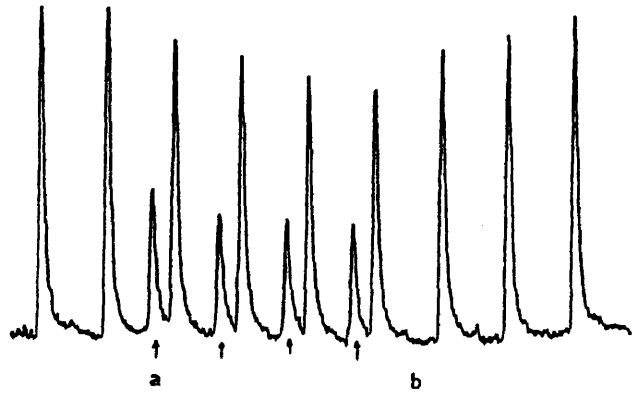


Fig 66

6 seg

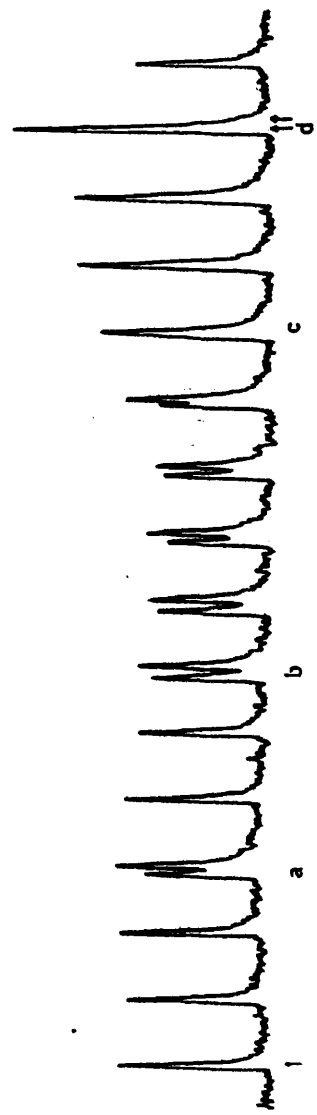


Fig 67 $\overline{6seg}$

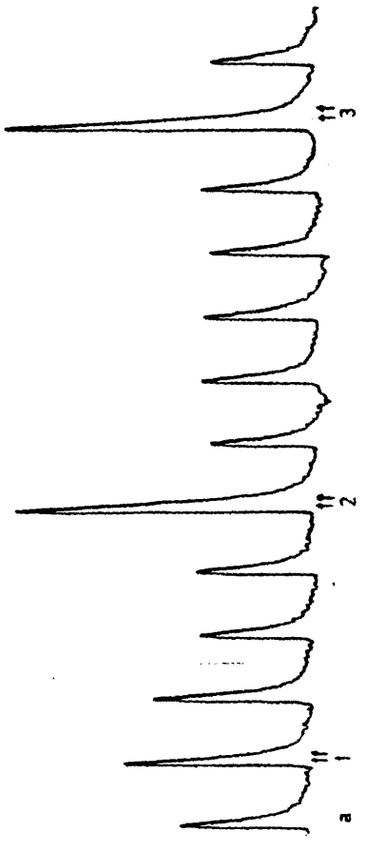


Fig 68 1seg

2)- IONTOFORESIS CON REACTIVOS SULFHIDRILICOS REDUCTORES

Hemos trabajado con dos drogas:

- ditiotreitol (DTT)
- 2 mercapto etanol

a)- Microiontoforesis con DTT

La aplicación iontoforética de DTT a nivel de la placa da origen a despolarizaciones fásicas. A nivel extrasináptico y en zonas alejadas de la placa no se obtiene ningún tipo de respuesta.

En el estudio de la acción del DTT hemos seguido la sistemática general expuesta al principio del capítulo.

El pH de la solución de DTT no se ha modificado durante los experimentos. Este era del orden de 6.

La corriente de eyección siempre es de polaridad positiva y la frecuencia de estimulación es de 1/6 seg, salvo cuando se indique lo contrario.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

-Iontoforesis con pipeta simple

La aplicación iontoforética de DTT a nivel de la placa motora va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas. En zonas alejadas de la sinapsis neuromuscular no se obtiene ningún tipo de respuesta.

La sensibilidad media para el DTT en este grupo de experimentos ha sido del orden de 0.1 mV/nC.

Ejemplo de este tipo de respuesta se muestra en la figura 69.

Figura 69: potenciales de DTT de 2 mV de amplitud producidos por la aplicación electroforética del mismo a nivel de una placa motora de una fibra de Vm 81 mV.

Parámetros del pulso de DTT:

- duración 200 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 10 nA

-Estudio de las despolarizaciones fásicas producidas por la aplicación iontoforética de DTT a nivel de la placa motora

Se han utilizado pipetas dobles para facilitar la localización de las placas, valorando para ello la sensibilidad de la zona al carbacol. La sensibilidad mínima requerida para la aparición de respuestas evidentes a la aplicación de DTT es de 10 mV/nC para el carbacol. Una vez localizada la zona sensible al carbacol se procede a la aplicación de pulsos electroforéticos de DTT, obteniendo los siguientes resultados a diferentes pH de líquido extracelular:

Ringer pH 7

Se obtienen despolarizaciones fásicas con la aplicación icntoforética de DTT a nivel de la placa motora.

La sensibilidad media al DTT en esta situación experimental es del orden de 0.3 mV/nC.

Ejemplo de estas despolarizaciones se pueden ver en las figuras 70, 71 y 72.

Figura 70: Potenciales de DTT de 9 mV de amplitud obtenidos tras la aplicación de un pulso de DTT de las siguientes características:

- duración 300 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 10 nA

El Vm es de 60 mV
La sensibilidad al DTT en este caso particular es de 0.3 mV/nC

Figura 71: despolarizaciones fásicas de 13 mV de amplitud producidas por la aplicación iontoforética a nivel de una placa motora de un pulso de DTT de las siguientes características:

- duración 200 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 10 nA

En este caso la sensibilidad para el DTT es de 0.7 mV/nC. La más alta obtenida con cualquier agente sulfhidrílico.
El Vm es de 78 mV.

Figura 72: misma célula que figura 71.

En a se aleja la pipeta de la placa. Se observa que la amplitud del potencial de DTT disminuye progresivamente hasta un valor de 9 mV en b.

Ringer pH 6

También a este pH la aplicación iontoforética de DTT a nivel de la placa motora va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas.

La sensibilidad media para el DTT en este grupo de experimentos es del orden de 1.3 mV/nC. Esta cifra representa el valor promedio más alto obtenido globalmente en el estudio de los reactivos de grupos SH.

Ejemplos de las respuestas obtenidas se ven las figuras 73 y 74.

Figura 73: despolarizaciones fásicas de 8 mV obtenidas tras la aplicación iontoforética de DTT a nivel de una placa motora.

Parámetros del pulso:

- duración 200 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 20 nA

El Vm de la fibra: 70 mV

Figura 74: Efecto de disminuir la duración del pulso electroforético sobre las respuestas obtenidas tras la aplicación de un pulso de DTT de:

- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 15 nA

La duración del pulso es diferente para cada registro:

	duración del pulso msec	despolarización mV
en a	50	7
en b	40	6
en c	30	5
en d	20	4

Ringer pH 8

Se obtienen despolarizaciones fásicas tras la aplicación de pulsos electroforéticos de DTT a nivel de zonas muy sensibles al carbacol.

La sensibilidad media para el DTT obtenida en estas condiciones experimentales es del orden de 0.2 mV/nC.

Ejemplo del tipo de respuestas obtenidas se pueden ver en las figuras 75 y 76.

Figura 75: despolarizaciones fásicas de 8 mV de amplitud producidas por la aplicación electroforética de un pulso de DTT de las siguientes características:

- duración 200 msec
- c. de eyección 180 nA
- c. de freno 5 nA

El Vm de la célula: 73 mV

Figura 76: potenciales de DTT de 10 mV originados por la aplicación de un pulso de las siguientes características:

- duración 200 msec
- c. de eyección 180 nA
- c. de freno 15 nA

El Vm de la fibra: 72 mV

-Estudio de la interacción DTT carbacol

Globalmente la interacción entre el DTT y el carbacol es función de la relación temporal entre ambos pulsos electroforéticos. Por ello, para su estudio, hemos realizado registros a distintos intervalos entre ambos pulsos. La sistemática seguida en esta fase del experimento, ha sido la de mantener fijo el retardo del pulso de carbacol, variando el retardo del pulso de DTT, de modo que, sucesivamente lo aproximábamos, lo hacíamos coincidir o lo retrasábamos con respecto al pulso de carbacol.

Los resultados se pueden esquematizar en los siguientes grupos:

- inhibición del potencial de carbacol cuando éste va precedido de un pulso de DTT
- potenciación del potencial de carbacol cuando ambos pulsos se aplican simultáneamente o muy próximos en el tiempo

-aparición de supersensibilidad tras la aplicación de pulsos de DTT.

Los resultados desglosados en las distintas condiciones experimentales son los siguientes:

Ringer pH 7

A este pH de L.E.C. se observa:

- inhibición del potencial de carbacol cuando va precedido de un pulso de DTT.
- potenciación del potencial de carbacol cuando simultáneamente a él se aplica un pulso de DTT
- aparición de supersensibilidad

Los resultados representativos de esta situación experimental se ilustran en las figuras 77, 78 y 79.

Figura 77: efecto de variar el retardo del pulso de DTT con respecto a un pulso de carbacol que se mantiene con un retardo fijo de 2000 msec con respecto a t_0 . Los retardos del pulso de DTT se indican en la figura debajo de las flechas.

Los potenciales de carbacol aislados se indican con la letra c.

Los pulsos simultáneos de DTT y carbacol se indican con una doble flecha.

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
carb	10	100	5
DTT	200	100	10

Vm de la célula: 71 mV

se observa:

- la amplitud inicial del potencial de carbacol es de 10 mV
- se aprecia una inhibición de esta amplitud cuando los pulsos de DTT se aplican a 1500,1200,1100,1000 y 900 msec antes del pulso de carbacol. La inhibición es del orden de 1-2 mV sobre la amplitud inicial.
- a 400 msec del pulso de carbacol, el DTT potencia al mismo del orden de 3 mV sobre la amplitud inicial.
- en a de observa un discreto estado de supersensibilidad de 1 mV sobre la amplitud inicial al suprimir los pulsos de DTT.
- en b potenciación de 5.5 mV sobre la amplitud inicial al coincidir los dos pulsos.
- en c se sigue observando una potenciación de 4 mV al aplicar el pulso de DTT 200 msec después del pulso de carbacol.
- la aplicación del pulso de DTT posteriormente a más de 200 msec, inhibe el potencial de carbacol del orden de 1-2 mV sobre su amplitud inicial.

Figura 78: misma célula que figura 77. Se observa la potenciación que tiene el carbacol sobre el DTT. El potencial de DTT se hace más evidente cuando se aplica después del pulso de carbacol:

- amplitud del potencial de DTT aislado; 5 mV
- amplitud del potencial de DTT cuando va precedido de un potencial de carbacol; 7.5 mV.

Figura 79: supersensibilidad tras la aplicación de pulsos de DTT:

- en a amplitud inicial del potencial de carbacol; 18 mV
- tras la aplicación de varios pulsos de DTT que preceden

en 1500 msec al potencial de carbacol se observa una inhibición de este último.

- al suprimir los pulsos de DTT el potencial de carbacol tiene una amplitud de 21 mV

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
carb	10	180	5
DTT	200	100	10

Vm de la célula; 72 mV

Ringer pH 6

Los resultados obtenidos a este pH de L.E.C. son homogéneos con los observados a pH 7.

El resultado de la interacción DTT-carbacol globalmente es función de la relación temporal entre ambos estímulos:

- aplicado el pulso de DTT previamente al de carbacol a más de 500 msec, tiene un efecto inhibitorio sobre este último.
- a partir de los 500 msec hasta la aplicación simultánea de ambos pulsos, el resultado observado es el de una potenciación.
- se observa también supersensibilidad.

Ejemplo de lo obtenido en esta situación experimental se ilustra en la figura 80.

Figura 80:

- el pulso de carbacol se aplica con un retardo fijo de 2200 msec
- los potenciales de carbacol aislados se indican con la letra c

- los pulsos de DTT y carbacol simultáneos se indican con una doble flecha
- el retardo de los pulsos de DTT se indica en la figura debajo de las flechas
- en a la amplitud inicial del potencial de carbacol es de 12 mV.
- se observa una disminución de esta amplitud inicial hasta que el pulso de DTT se aplica con un retardo de 1700 msec (a 500 msec) (b).
- en b la potenciación es de 1.5 mV sobre la amplitud inicial.
- en c supersensibilidad de 2.5 mV sobre la amplitud inicial.
- en d se aprecia otra potenciación del potencial de carbacol cuando el pulso de DTT se aplica 200 msec antes del mismo.

Vm de la célula; 72 mV

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb	9	180	5
DTT	100	180	10

Ringer pH 8

A este pH de L.E.C. no se ha observado supersensibilidad posterior a la aplicación de pulsos de DTT. Asimismo, la potenciación es más evidente cuando el pulso de DTT se aplica inmediatamente después del pulso de carbacol.

Ejemplo de este tipo de interacción obtenido en esta condición experimental se puede ver en la figura 81.

Figura 81:

- el pulso de carbacol se aplica con un retardo fijo de 1700 msec
- el retardo del pulso de DTT se indica en la figura debajo de las flechas
- en a la amplitud inicial del potencial de carbacol es de 10mV
- en b se aplica un pulso de DTT 200 msec después del pulso de carbacol y se aprecia una potenciación de 1.5 mV sobre la amplitud inicial.
- en c se aplica un pulso de DTT 200 msec antes del pulso de carbacol y se aprecia una inhibición del potencial de carbacol del orden de 1.5 mV.
- en d se aplica un pulso de DTT 100 msec después del pulso de carbacol y se observa una potenciación de la despolarización del orden de 2 mV.
- en 1, 2 y 3 no se aprecia supersensibilidad al suprimir los pulsos de DTT.

Vm de la célula; 71 mV

Parámetros de los pulsos:

droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb	20	200	5
DTT	200	100	10

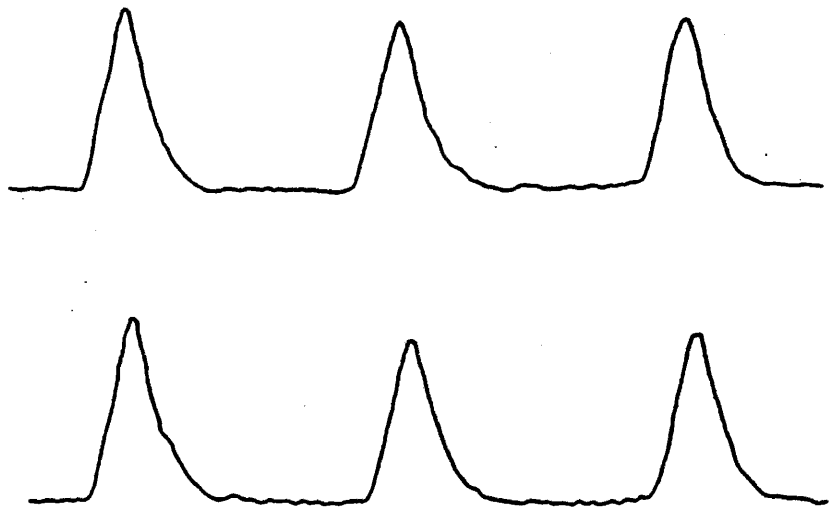


Fig 69

1seg

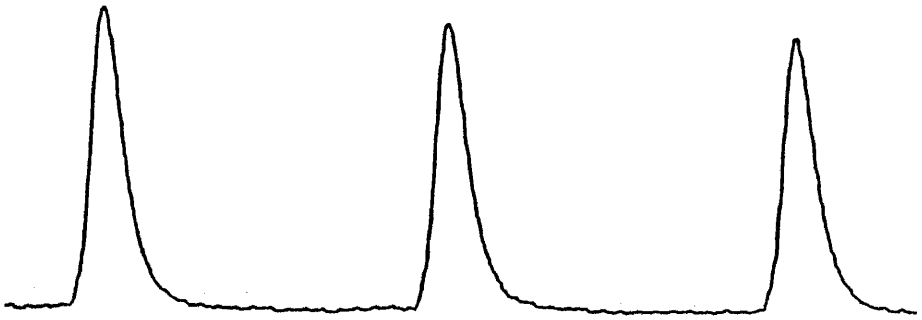


Fig 70

1seg

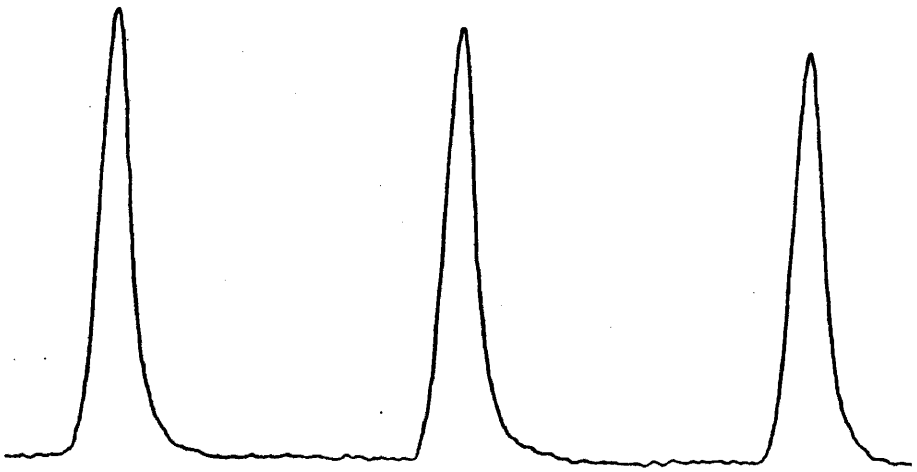
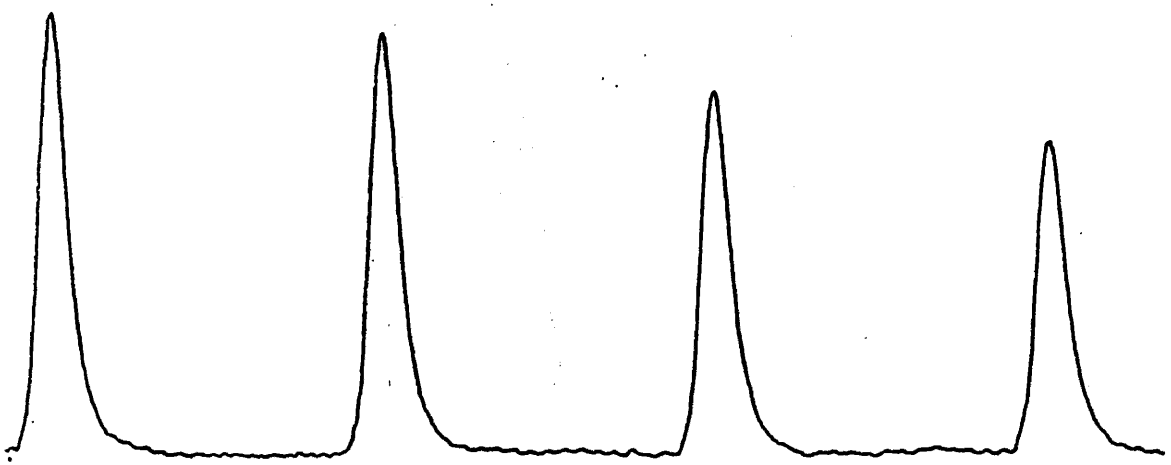


Fig 71

1seg



alejando pipeta de la placa

Fig 72

1 seg

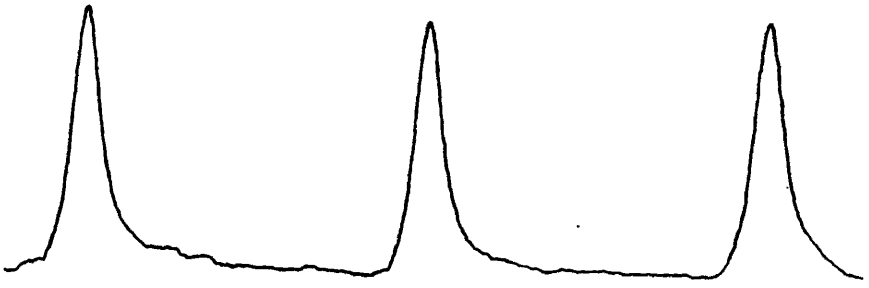


Fig 73 $\frac{}{1\text{seg}}$

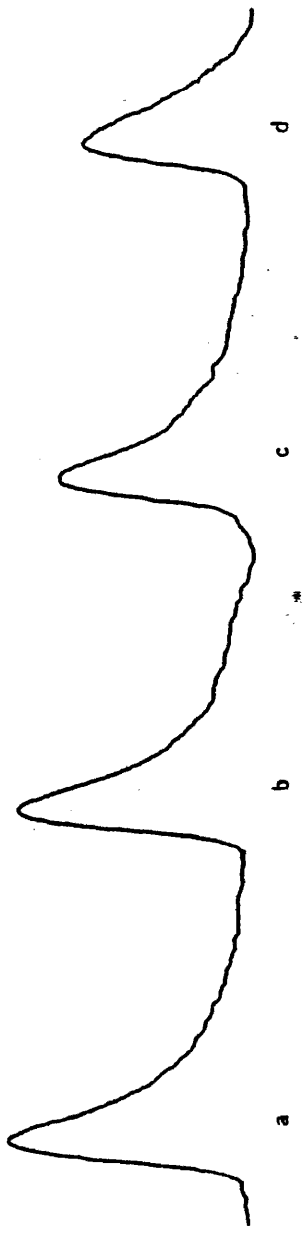


Fig 74 $\frac{}{1\text{seg}}$

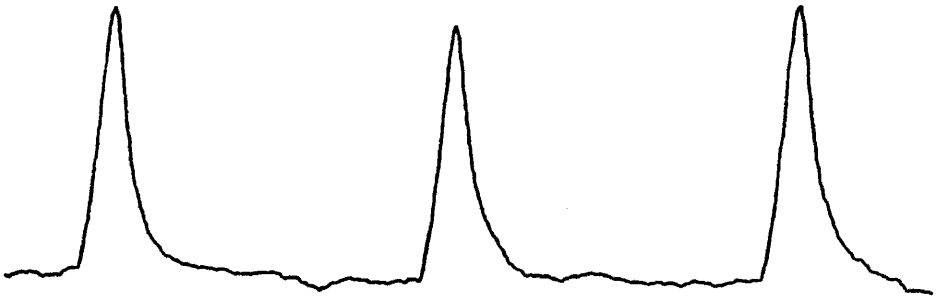


Fig 75

1seg

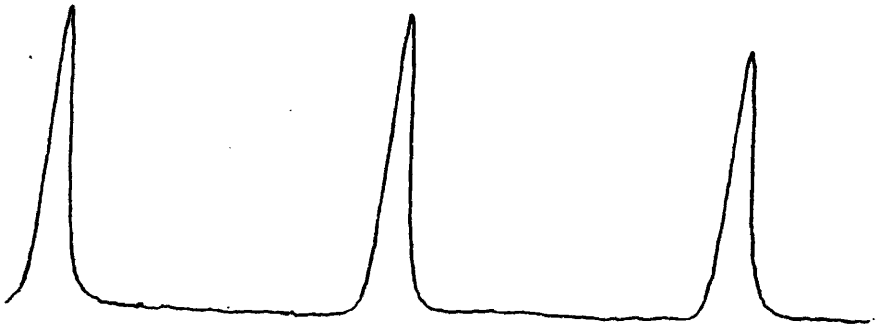
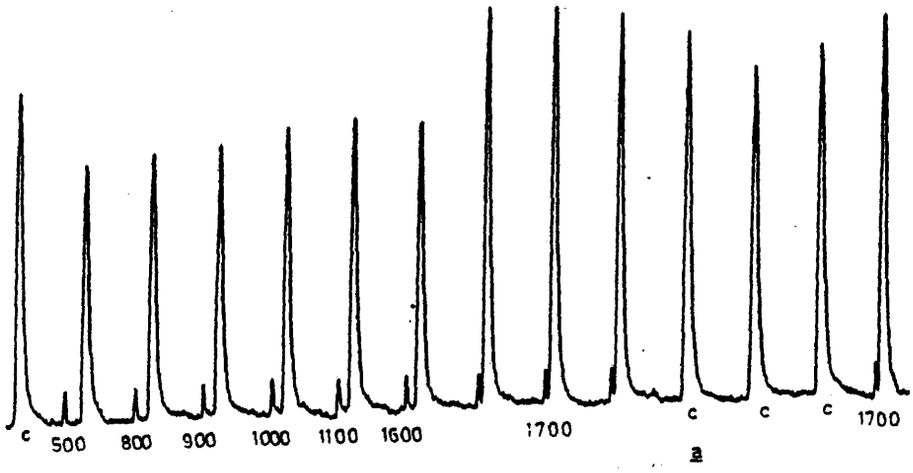


Fig 76

1seg



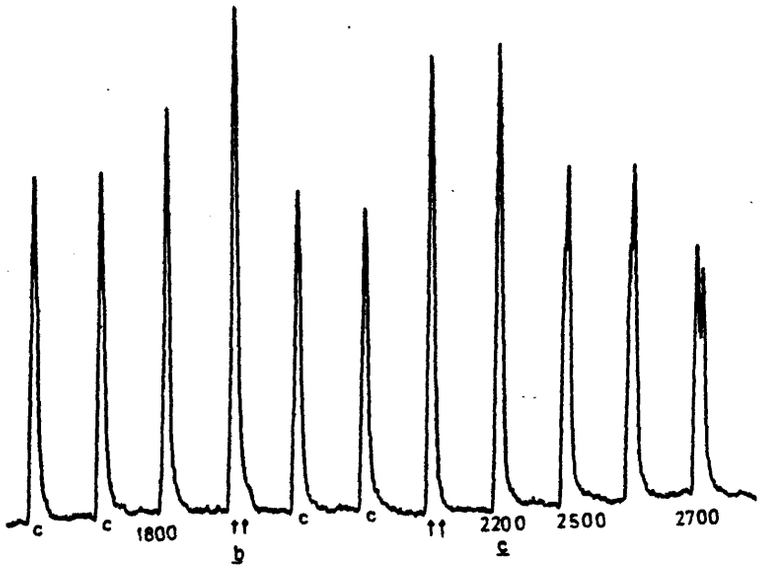


Fig 77 $\frac{}{1\text{seg}}$

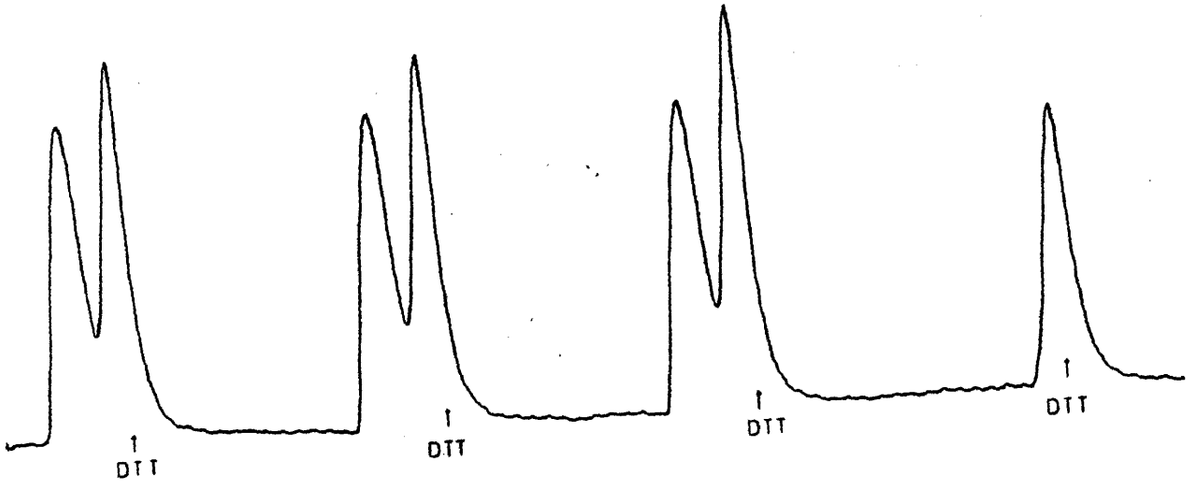


Fig 78

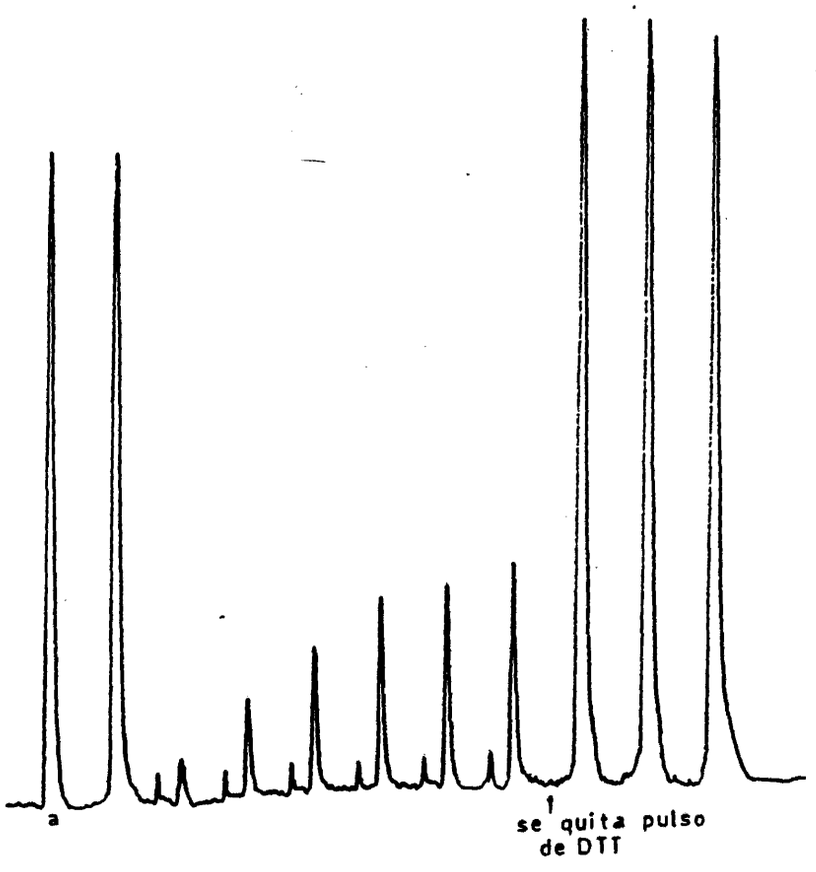


Fig 79 $\overline{6\,seg}$

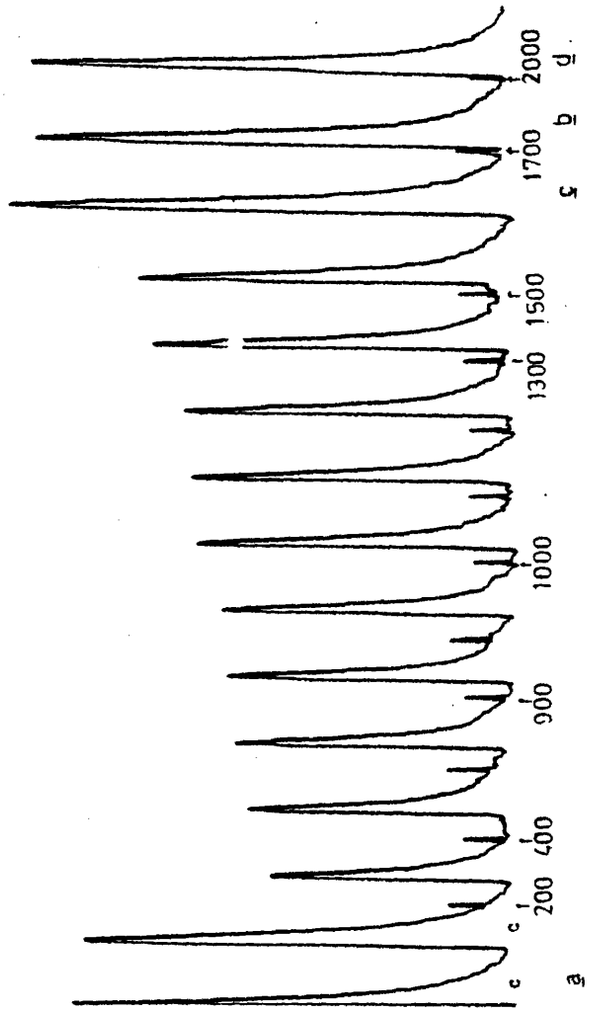


Fig 80 6 seg

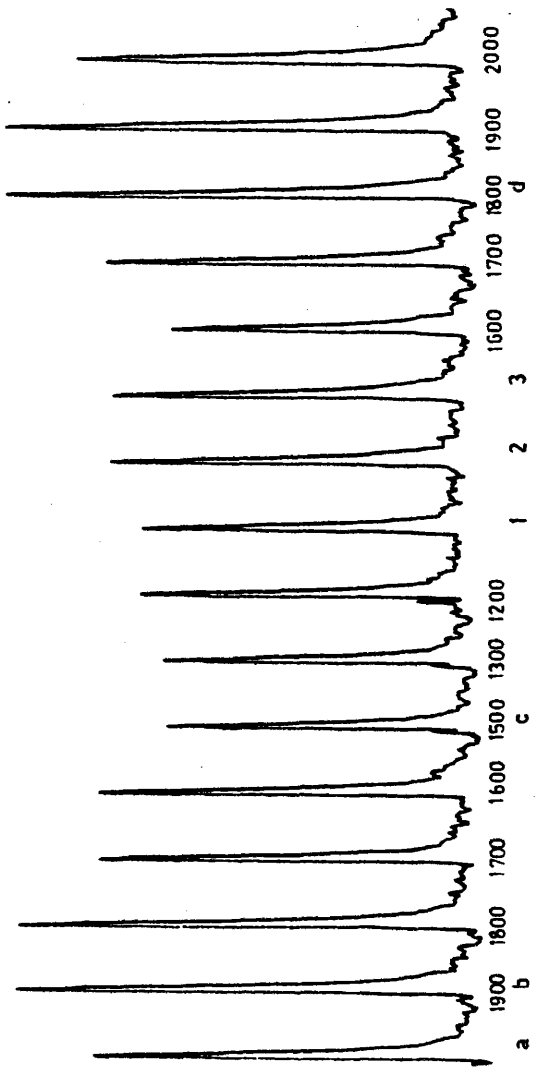

a
b
1900
1800
1700
1600
1500
c
1300
1200
1
2
3
1600
1700
1800
d
1900
2000

Fig 81 6 seg

b)- Microiontoforesis con 2 ME

La aplicación iontoforética de 2ME a nivel de la placa motora va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas. No se obtienen respuestas cuando la aplicación se realiza a nivel extrasináptico o en zonas alejadas de la placa.

En el estudio de la acción del 2 ME se ha seguido la sistemática general ya expuesta.

El pH de la solución de 2 ME, ha sido del orden de 4 y no se ha variado durante las distintas fases experimentales. Este valor de pH corresponde al pH de la solución comercial de 2 ME.

La frecuencia de aplicación de pulsos electroforéticos ha sido de 1/6 seg., salvo cuando se indique lo contrario.

La polaridad de la corriente electroforética ha sido positiva. No hemos obtenido ningún tipo de respuesta utilizando pulsos de corriente negativos y por ello nuestro diseño experimental ha sido:

- corriente de eyección; positiva
- corriente de freno; negativa

Esto último contrasta con el diseño de otros autores y volveremos sobre ello en la discusión.

-Iontoforesis con pipeta única

Se obtienen despolarizaciones fásicas tras la aplicación electroforética de pulsos positivos de 2 ME a nivel de la placa motora. En zonas extrasinápticas no se obtiene respuesta alguna.

La sensibilidad media al 2 ME en este grupo experimental es del orden de 0.09 mV/nC.

En la figura 82 se pueden apreciar despolarizaciones fásicas de 4 mV obtenidas en esta situación experimental.

Figura 82: Vm de la célula 72 mV

Parámetros del pulso:

- duración 200 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 15 nA

-Estudio de las despolarizaciones fásicas producidas por la aplicación iontoforética de 2 ME a nivel de la placa motora

Se han utilizado pipetas dobles. Con ayuda del canal de carbacol se localizan zonas sensibles a este agente colinérgico. La sensibilidad mínima para el carbacol requerida para la aparición de respuestas evidentes a la aplicación de pulsos de 2 ME, es del orden de 8.5 mV/nC. Una vez localizada una zona sensible al carbacol, se procede a la aplicación iontoforética de 2 ME por el otro canal, teniendo cuidado siempre de aumentar la corriente de freno en la pipeta de carbacol para evitar la salida de éste por difusión.

Los resultados obtenidos a distintos pH de L.E.C. son los siguientes:

Ringer pH 7

La aplicación de pulsos positivos de 2 ME a nivel de la placa, va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas a nivel de la membrana postsináptica.

La sensibilidad media para el 2 ME en estas condiciones experi

mentales es del orden de 0.3 mV/nC.

Ejemplo de estas despolarizaciones fásicas se pueden ver en la figura 83.

Figura 83: potenciales de 2 ME de 5 mV de amplitud producidos por la aplicación electroforética de 2 ME a nivel de una placa motora.

Parámetros del pulso:

- duración 200 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 20 nA

Ringer pH 6

A este pH de L.E.C. la aplicación iontoforética de 2 ME a nivel de la placa motora o en zonas muy próximas a ella, va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas.

La sensibilidad media para el 2 ME a este pH de Ringer es del orden de 0.4 mV/nC.

Ejemplo de este tipo de respuesta se ilustra en la figura 84.

Figura 84:

despolarizaciones fásicas obtenidas tras la aplicación de pulsos de 2 ME a nivel de una placa motora de una fibra con un Vm de 80 mV.

Parámetros del pulso:

- duración 200 msec
- c. de eyección 100 nA
- c.de freno 10 nA

La amplitud del primer potencial de 2 ME es de 8 mV

- en a se disminuye la corriente de freno y la respuesta tiene una amplitud de 10 mV
- en b se disminuye la duración del pulso a 100 msec y la amplitud de la respuesta es de 5 mV.

Ringer pH 8

A este pH de L.E.C. la aplicación electroforética de 2 ME va seguida asimismo de la aparición de despolarizaciones fásicas.

La sensibilidad media al 2 ME en estas condiciones experimentales es de 0.1 mV/nC.

La figura 85 ilustra una respuesta obtenida en estas condiciones experimentales.

Figura 85: potenciales de 2 ME de 5 mV de amplitud obtenidos tras la aplicación de un pulso de 2 ME de las siguientes características:

- duración 200 msec
- c. de eyección 150 nA
- c. de freno 15 nA

Vm de la fibra; 80 mV

-Estudio de la interacción 2 ME-carbacol

Los resultados pueden conceptuarse globalmente afirmando que básicamente dependen de la relación temporal entre los pulsos de forma que:

- la aplicación simultánea de ambos pulsos origina una potenciación.
- un pulso previo de 2 ME resulta en inhibición o potenciación del potencial de carbacol, dependiendo de la relación tempo-

ral entre ambos.

- la aparición de supersensibilidad es frecuente.

Los resultados desglosados en las diferentes condiciones experimentales son los siguientes:

Ringer pH 7

Sigue las líneas generales expuestas previamente. La figura 86 expresa los resultados obtenidos a este pH de L.E.C.

Figura 86

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb	10	200	5
2 ME	200	100	10

- el retardo del pulso de carbacol se mantiene fijo a 2000 msec
- el retardo del pulso de 2 ME se indica en la figura debajo de las flechas
- en a amplitud inicial del potencial de carbacol 15 mV
- en b un pulso de 2 ME aplicado 1800 msec antes del pulso de carbacol, inhibe el potencial de carbacol 2.5 mV respecto a la amplitud inicial
- en c un pulso de 2 ME aplicado 1200 msec antes del pulso de carbacol potencia el potencial de carbacol 0.5 mV respecto a la amplitud inicial
- en d aplicación simultánea de ambos pulsos; se observa una potenciación de 5 mV sobre la amplitud inicial. Esta potenciación

disminuye espontáneamente en los registros siguientes:

- en e nueva aplicación simultánea de ambos pulsos; potenciación de 5 mV
- en 1 supersensibilidad de 1 mV sobre la amplitud inicial

Ringer pH 6

Básicamente se obtienen los mismos resultados que a pH 7. Sin embargo, a este pH de L.E.C., la aplicación de ambos pulsos simultáneamente va seguida de la aparición de potenciales de acción. Ejemplo de esta situación experimental se ilustra en la figura 87.

Figura 87: Vm de la célula 80 mV

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
carb	10	200	10
2 ME	200	100	5

- en a amplitud inicial del potencial de carbacol 18 mV
- en s aplicación simultánea de ambos pulsos
- potenciales de accíon señalados con una flecha

El Vm pierde negatividad debido a que la contracción de la fibra mueve el electrodo de registro.

Ringer pH 8

Los resultados obtenidos a este pH de L.E.C. son homogéneos con los expuestos como principios generales de la interacción 2 ME-carbacol. La figura 88 expresa los resultados observados a este pH de Ringer

Figura 88: Vm de la célula 84 mV

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb	7	200	5
2 ME	200	150	15

- el retardo del pulso de carbacol se mantiene constante a 2000 msec
- el retardo del pulso de 2 ME se indica en la figura debajo de las flechas.
- en a amplitud inicial del potencial de carbacol 12 mV
- en b pulso de 2 ME 1500 msec antes que el pulso de carbacol. Se observa una inhibición del potencial de carbacol de 3 mV sobre su amplitud inicial.
- en c pulso de ME 500 msec antes que el pulso de carbacol; se observa una potenciación de este último del orden de 3 mV sobre su amplitud inicial.
- en d discreta supersensibilidad de 1 mV sobre la amplitud inicial.

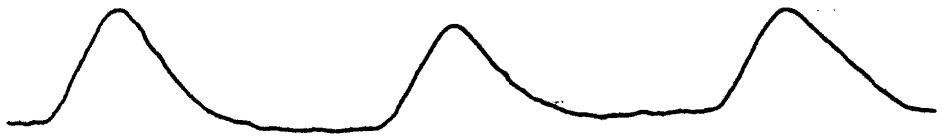


Fig 82 $\overline{1\text{seg}}$

Fig 83 $\overline{1\text{seg}}$

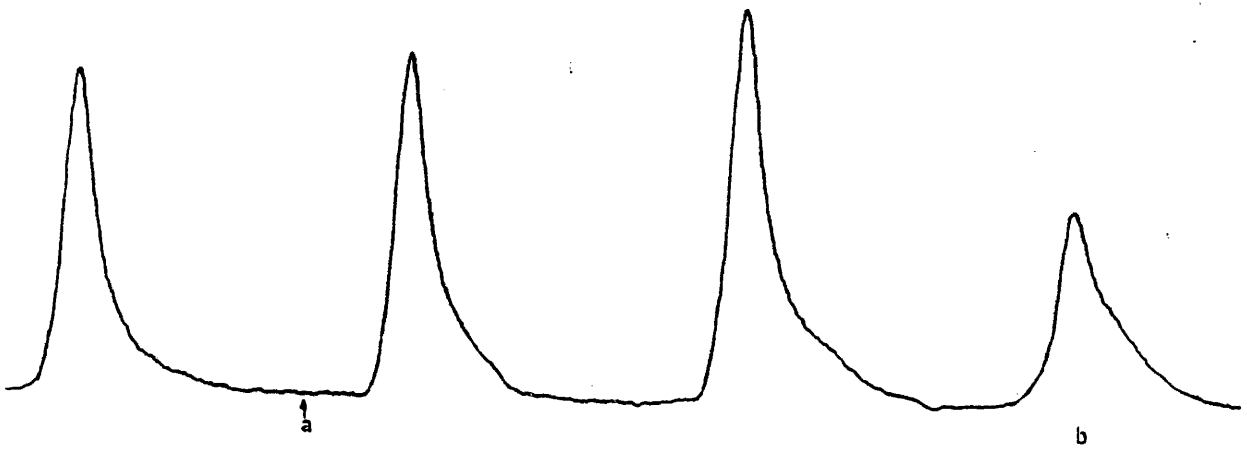


Fig 84

1 seg

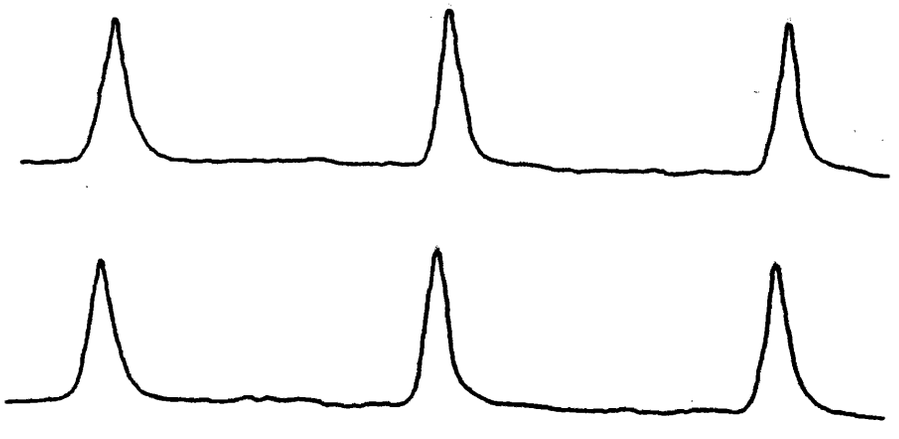


Fig 85

1seg

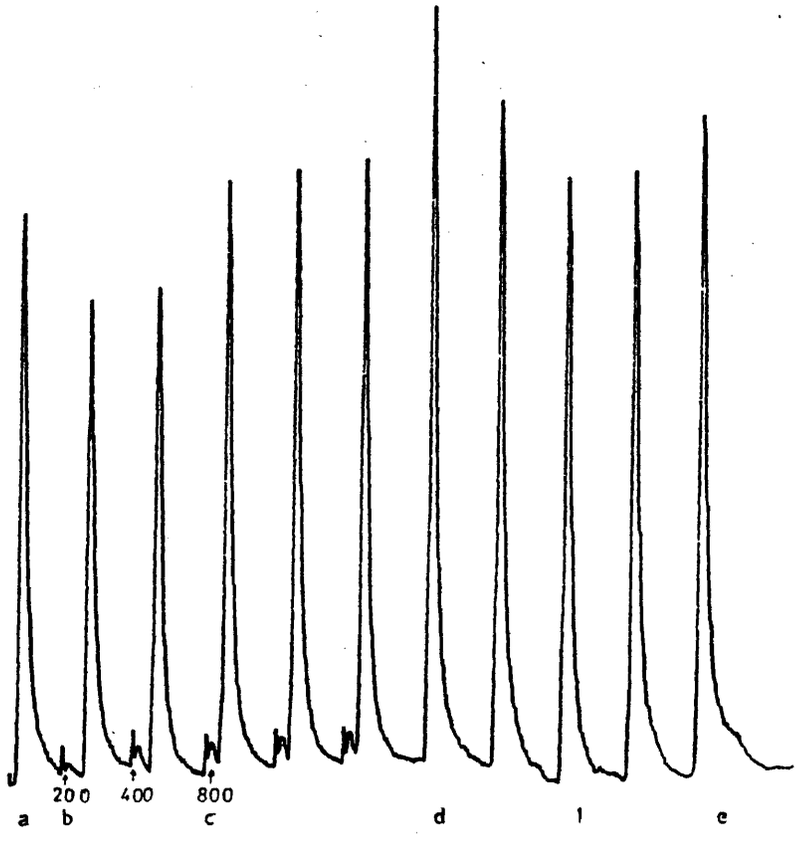


Fig 86

6seg

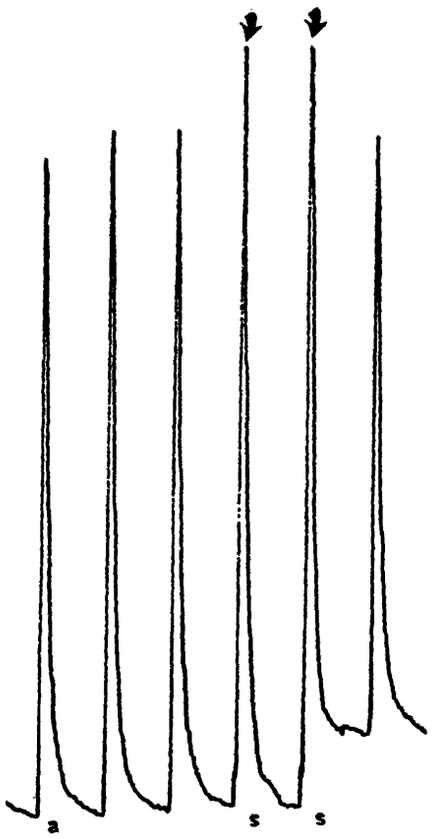


Fig 87 6 seg

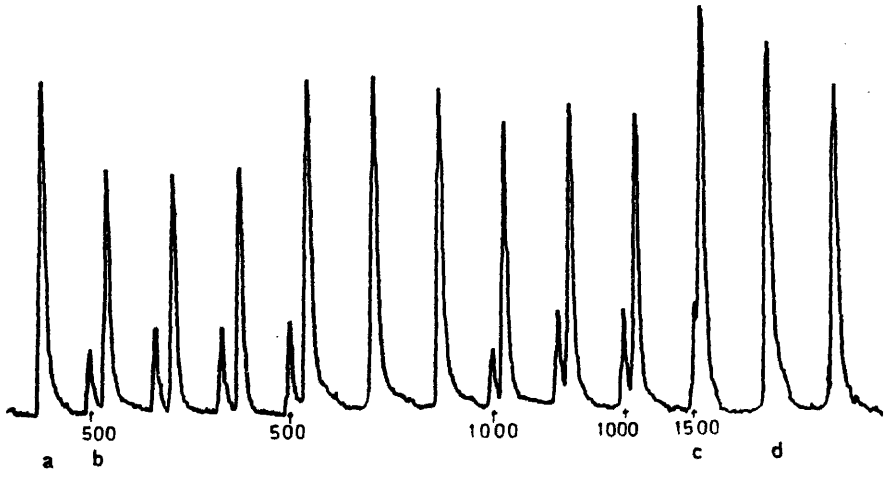


Fig 88

6 seg

D)- ACCION DEL CURARE SOBRE LAS RESPUESTAS DE LA MEMBRANA POSTSINAPTICA A LA APLICACION ELECTROFORETICA DE REACTIVOS SULFHIDRILICOS

La finalidad de estos experimentos ha sido la de valorar el lugar de acción de los reactivos sulfhidrílicos de una manera más precisa. Para ello, hemos aplicado una concentración constante de tubocurarina al baño de la preparación y simultáneamente se ha observado el efecto que esta droga tiene sobre los potenciales de carbacol y los potenciales de reactivos sulfhidrílicos.

Se ha trabajado a pH 7 y siempre con pipetas dobles para poder comparar el efecto del curare sobre los potenciales de reactivos de grupos SH con respecto al efecto que tiene sobre el potencial de carbacol.

La concentración de curare ha sido de 10^{-6} M.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Acción del curare sobre los potenciales de OIB

El curare tiene un efecto inhibitorio sobre los potenciales de OIB. Esto se puede ver gráficamente en las figuras 89 y 90.

Figura 89: la flecha indica el momento en que se añadió curare al baño. Se observa una inhibición del potencial de carbacol y del potencial de OIB (flecha doble).

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb	4	200	5
OIB	200	150	10

La comparación entre el efecto que tiene sobre los potenciales de OIB y el potencial de carbacol se expresa gráficamente en la fi

gura 90 y en la siguiente tabla:

Se toma como 100% la amplitud inicial de las despolarizaciones.

Carbacol	OIB
100% (12 mV)	100% (6.5 mV)
86%	83%
62%	61%
24%	29%
12%	16%
0%	6%

La relación no es perfectamente lineal, si bien se puede afirmar que dentro de ciertos límites, el efecto del curare sobre ambos es homogéneo. Insistiremos en ello en la discusión.

Acción del curare sobre los potenciales de DTNB

El efecto del curare sobre los potenciales de DTNB es inhibitorio. Esto se expresa en la figura 91.

Figura 91: La flecha indica el momento en que se añade curare al baño de la preparación. Se observa una inhibición del potencial de carbacol y del potencial de DTNB (flecha doble).

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb	10	200	5
DTNB	200	150	5

La comparación del efecto del curare sobre el potencial de carbacol y el potencial de DTNB se expresa en la gráfica 94 y en la siguiente tabla:

La amplitud inicial de los potenciales se valora como 100%.

Carbacol	DTNB
100% (15 mV)	100% (5 mV)
86%	72%
74%	60%
10%	4%
20%	13%
6%	0%

La relación tampoco es perfectamente lineal, si bien, se puede afirmar que dentro de ciertos límites el efecto del curare sobre ambos también es homogéneo. Volveremos sobre este punto en la discusión.

Acción del curare sobre los potenciales de DTT

El curare inhibe los potenciales de DTT, si bien no en la misma proporción que a los potenciales de carbacol.

En la figura 93, se puede observar el efecto inhibitorio de la tubocurarina sobre los potenciales de DTT (doble flecha) y sobre los potenciales de carbacol.

Figura 93: La flecha indica el momento en que se añade curare al baño.

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb	6	200	5
DTT	200	180	10

La comparación entre el efecto inhibitorio del curare sobre los

potenciales de carbacol y los potenciales de DTT se expresa en la gráfica 94 y en la siguiente tabla:

La amplitud inicial de ambos potenciales se conceptúa como 100%

Carbacol	DTT
100% (16.5 mV)	100% (2.5 mV)
94%	88%
82%	86%
73%	84%
70%	83%
0%	60%

La relación no es lineal y el efecto del curare sobre los potenciales de DTT es claramente distinto al efecto del mismo sobre el carbacol y las drogas oxidantes. A nuestro juicio esto sugiere diferentes lugares de acción de las citadas drogas. Volveremos sobre ello en la discusión.

Acción del curare sobre los potenciales de 2 ME

Se observa un efecto inhibitorio de las mismas características que las señaladas para el DTT. La figura 95 representa un registro de potenciales de carbacol y 2 ME y el efecto del curare sobre los mismos. La flecha indica el momento en que se añade curare al baño.

Parámetros de los pulsos:

Droga	duración msec	c. de eyección nA	c. de freno nA
Carb	10	200	5
2 ME	200	100	10

La comparación entre el efecto inhibitorio del curare sobre los

potenciales de carbacol y 2 ME se expresa en la gráfica 96 y en la siguiente tabla. Se toma como 100% el valor correspondiente a la amplitud inicial de ambos potenciales:

Carbacol	2 ME
100% (5.6 mV)	100% (2 mV)
94%	95%
82%	89%
73%	85%
70%	84%
0%	52%

Estos resultados son homogéneos con los obtenidos con el DTT.

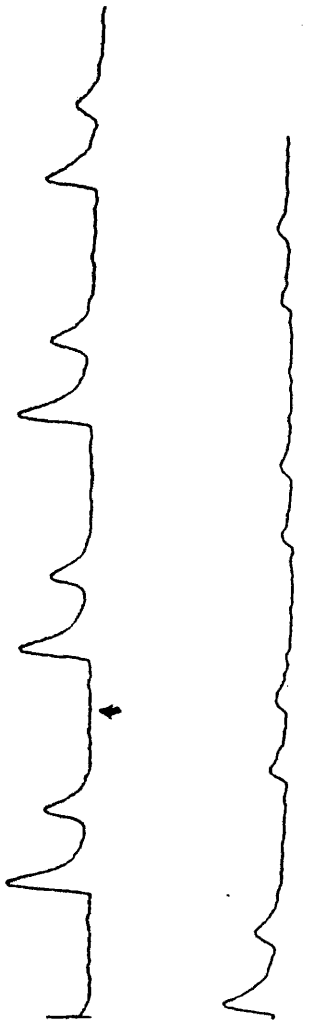


Fig 89
Vm 60 mV

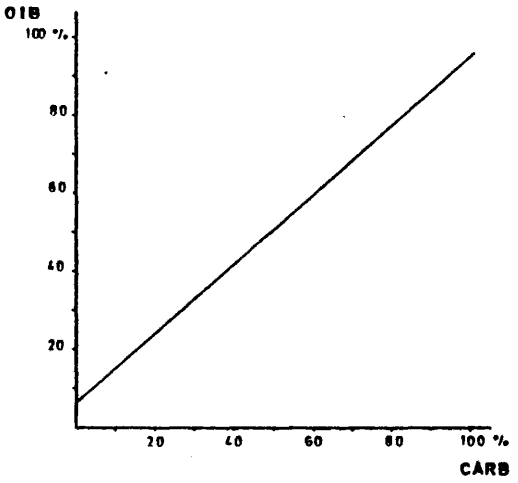

OIB
100 %
80
60
40
20
20
40
60
80
100 %
CARB

Fig 90

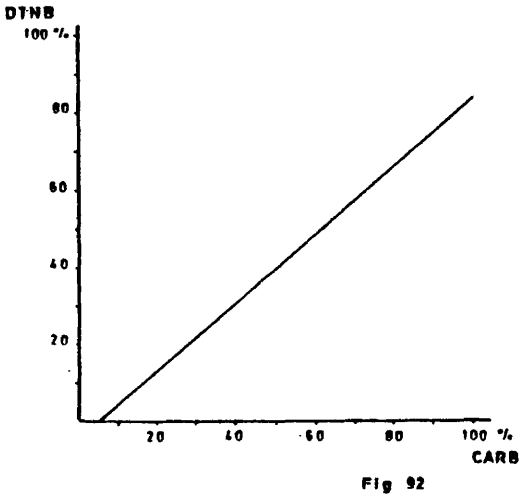

DTNB
100 %
80
60
40
20
20
40
60
80
100 %
CARB

Fig 92

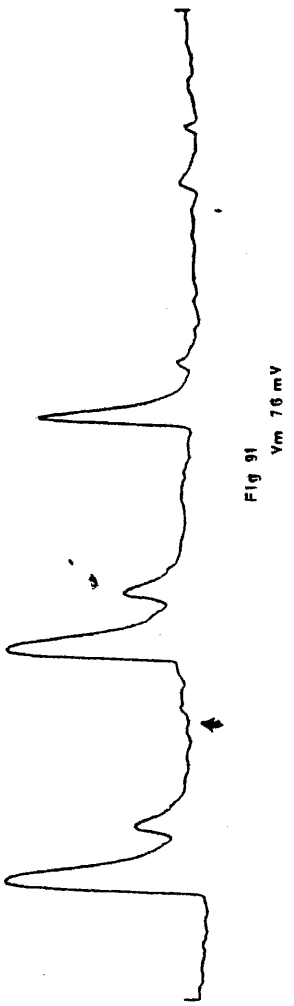


Fig 91

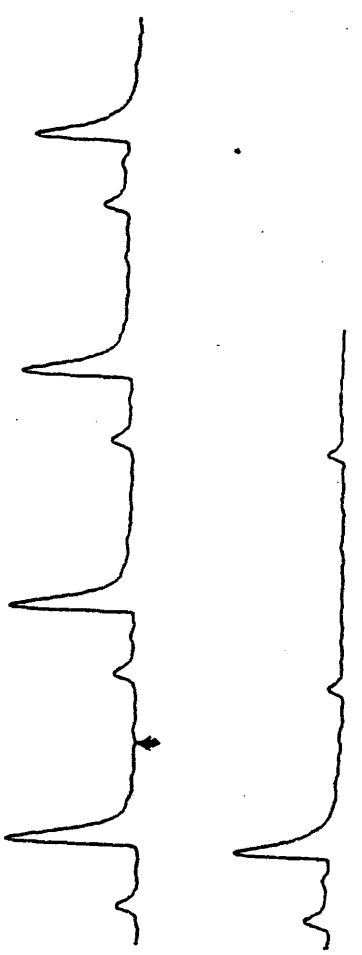


Fig 93
Vm 78mV

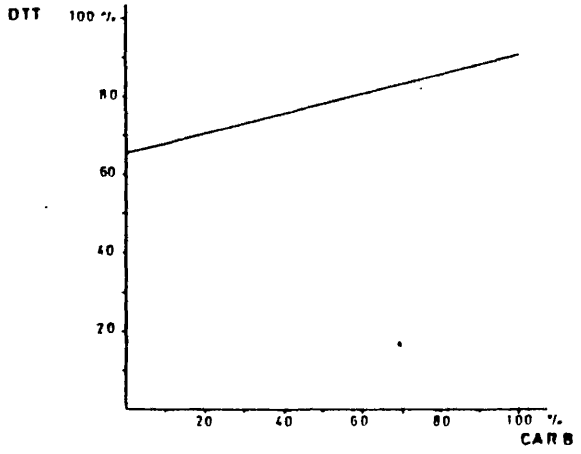

DTT
100 %
80
60
40
20
20
40
60
80
100 %
CARB

Fig 94

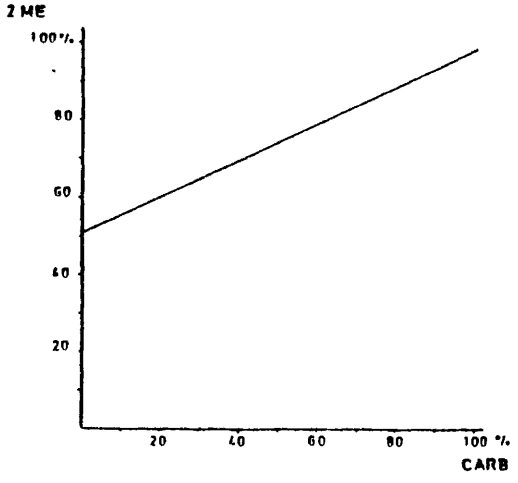

2 ME
100 %
80
60
40
20
20
40
60
80
100 %
CARB

Fig 98

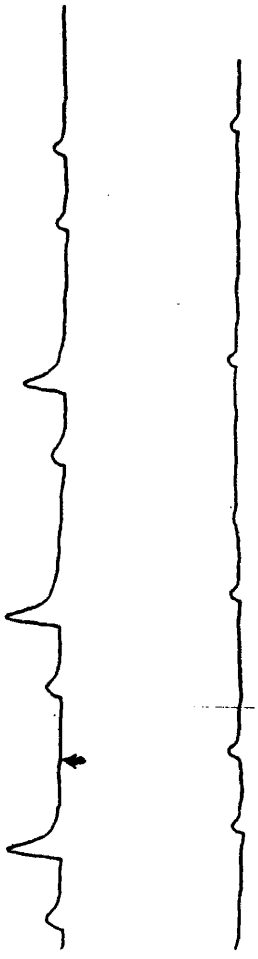


Fig 95
Vm 79

E)- APLICACION ELECTROFORETICA DE REACTIVOS SULFHIDRILICOS EN PRESENCIA DE BETA BUNGAROTOXINA

La finalidad de estos experimentos ha sido doble: por una parte, hemos querido descartar cualquier efecto de los reactivos de grupos SH "a nivel de" o "a través de" la membrana presináptica en la génesis de las respuestas de la membrana postsináptica originadas tras la aplicación iontoforética de los mismos. Por otra parte, nuestra finalidad ha sido la de obviar cualquier interpretación relativa a la posibilidad de generación de respuestas postsinápticas, a través de un estímulo eléctrico de la terminal nerviosa presináptica con el pulso electroforético de la droga en cuestión, si bien, esta última posibilidad quedaba prácticamente descartada por la utilización de pulsos de menos de 500 msec de duración.

Para cumplir estos objetivos, se ha utilizado un bloqueador presináptico de la transmisión neuromuscular: la beta bungarotoxina. Esta droga se añadió al baño de la preparación del músculo sartorio con nervio a la concentración de 5 Microgramos/ml.

En estas condiciones experimentales, se procedió al estímulo del nervio y al registro intracelular del potencial de acción muscular en la zona de las placas motoras. Este procedimiento se repitió hasta constatar el bloqueo total de la T.N.M. El criterio seguido para ello evidentemente fué comprobar la ausencia de potenciales de acción y/o potenciales de placa tras estímulo del nervio motor.

El bloqueo total de la transmisión sináptica se obtuvo a las tres horas. En este momento, se procedió a la aplicación de los reactivos sulfhidrílicos mediante técnica electroforética.

En estas condiciones experimentales obtuvimos despolarizaciones

fásicas tras la aplicación iontoforética de reactivos de grupos SH a nivel de la placa motora. Ejemplos de las mismas se observan en las figuras 97 y 98.

Figura 97: Potenciales de OIB obtenidos tras la aplicación iontoforética de la droga a nivel de una placa motora a las 3 horas de haber añadido Beta BUTOX a la preparación. Después de obtener este registro, se procedió nuevamente a la estimulación del nervio motor constatándose el bloqueo completo de la transmisión.

Parámetros del pulso:

- duración 250 msec
- c. de eyección 180 nA
- c. de freno 10 nA

La amplitud de los potenciales de OIB es de 7 mV
El Vm de la célula 78 mV

Figura 98: Potenciales de 2 mV de amplitud producidos por la aplicación iontoforética de 2 ME a nivel de una placa motora. Este registro se obtuvo 5 horas después de añadir Beta BUTOX al baño de la preparación. Con posterioridad, se constató asimismo, la existencia de bloqueo de la T.N.M.

Parámetros del pulso:

- duración 200 msec
- c. de eyección 100 nA
- c. de freno 10 nA

El Vm de la fibra; 80 mV.

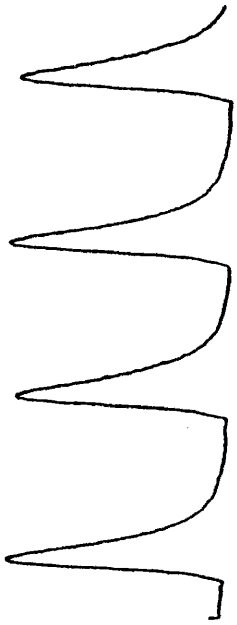


Fig 97

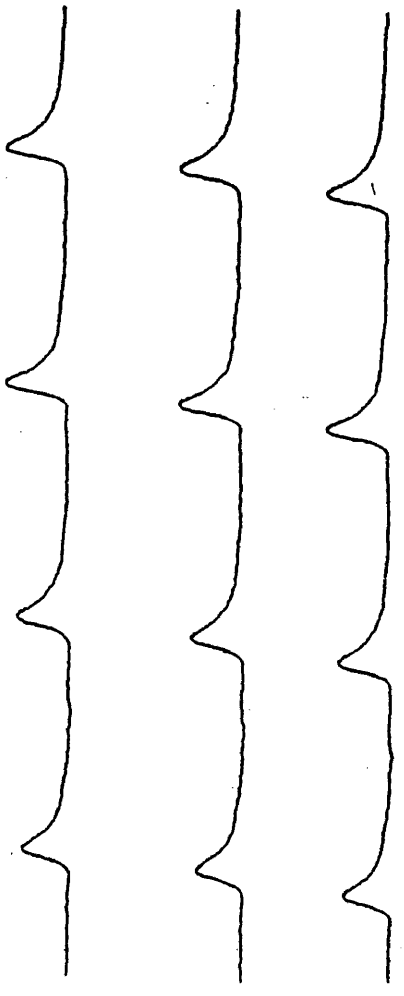


Fig 98

VI - DISCUSION

A)-Iniciamos el trabajo experimental de esta tesis estableciendo los parámetros bioeléctricos convencionales de las fibras musculares del sartorio de la rana. En un sentido amplio, la finalidad de este estudio fue la de constatar la viabilidad de nuestra preparación en las distintas condiciones de pH de L.E.C. que íbamos a emplear en el estudio de la aplicación de los reactivos sulfhidrílicos a nivel de la placa motora y en zonas alejadas de la misma.

Nuestros resultados indican en primer lugar, la viabilidad de nuestra preparación en un rango de pH comprendido entre 6 y 8. En segundo lugar, queremos destacar que el estudio de potencial de membrana y propiedades pasivas de la misma, se ajustan a los resultados obtenidos por otros autores que han realizado este estudio en la misma preparación biológica (HODGKIN y HOROWICZ 1959 b; DEL CASTILLO, NELSON y SANCHEZ 1962; LAMBERT 1973).

Consideramos necesario hacer las siguientes observaciones:

- el rango de pH manejado por nosotros no ha sido llevado a extremos de acidez o alcalinidad.
- a pH 6 y 8, hemos obtenido valores de Vm menores que a pH 7. A pH 7, el valor medio encontrado fué de 92.6 mV frente a 77.4 mV a pH 6 y 79.2 mV a pH 8. DEL CASTILLO, NELSON y SANCHEZ (1962), encuentran valores de potencial de membrana ligeramente superiores en medio ácido, con respecto a los valores encontrados a pH neutro. Esta diferencia con nuestros resultados puede ser debida a que estos autores trabajan a un pH de 4.8 y 5.2. Por último, estos autores encuentran una disminución de Vm en pH ácido cuando trabajan con las fibras musculares del Bufo Marinus.

- nuestros resultados indican un aumento de la resistencia input en medio ácido, pH 6, con respecto a los valores obtenidos a pH 7. A pH 8 se observa una disminución de la resistencia input con respecto a la medida a pH neutro:

  - resistencia input pH 7: 239131 (D.S. 28602)
  - resistencia input pH 6: 654364 (D.S. 195630)
  - resistencia input pH 8: 199005 (D.S. 53473)

Estos datos deben ser tenidos en cuenta a la hora de valorar resultados posteriores, ya que el aumento de resistencia input a pH ácido implica una mayor caída del potencial de membrana, debida a la acción cortocircuitante del transmisor (DEL CASTILLO, NELSON y SANCHEZ, 1962). Esto, en definitiva, se traduce en una sensibilidad aumentada de la membrana postsináptica para el transmisor a pH ácido. Por el contrario, a pH alcalino la sensibilidad de la membrana postsináptica se encontrará disminuída y las respuestas a los agentes despolarizantes serán menores.

Al comienzo de nuestro trabajo, justificábamos el mismo con el propósito de continuar una línea de investigación encaminada a estudiar el receptor colinérgico de la placa motora de la rana con técnicas electrofisiológicas actuales y a la luz de las dos hipótesis existentes en relación a la exacta naturaleza del receptor. Estas dos tendencias vienen representadas por los trabajos de KARLIN y colaboradores y por otra parte, por el grupo de trabajo de DEL CASTILLO. Los resultados de ambas líneas de investigación y sus postulados básicos han sido referidos con detalle en la Introducción.

La valoración global de nuestra particular manera de realizar la técnica electroforética ha quedado descrita con cierto detalle en Material y Métodos. Bástenos por tanto, añadir ahora que, contrastada con los requisitos que para la realización correcta de la misma determinan otros autores (DREYER, PEPER y STERZ, 1978) la aplicación iontoforética de sustancias a nivel de la placa, ha sido realizada con el máximo rigor que nos permiten nuestras posibilidades técnicas actuales. En este sentido, nos hemos separado de los requisitos apuntados por los citados autores en aquellos aspectos que requieren como condición indispensable el uso de un sistema óptico Nomarski, del que en la actualidad carecemos.

La discusión de nuestros resultados debe hacerse teniendo presente la técnica utilizada. En efecto, un primer aspecto que llama la atención en nuestros resultados experimentales, es la obtención de despolarizaciones con la aplicación de reactivos sulfhidrílicos. Independientemente de consideraciones posteriores, es nuestro propósito inmediato hacer una breve referencia a las posibles diferencias interpretativas a que puede dar lugar el uso de métodos diferentes a la hora de estudiar un mismo aspecto de la fisiología celular; transmisión neuromuscular y receptor colinérgico en nuestro caso.

La técnica iontoforética permite la obtención de concentraciones elevadas de la droga problema en las inmediaciones de una zona muy circunscrita de la membrana celular. Además, esta zona puede ser escogida y determinada por la correcta situación de la pipeta a nivel del lugar exacto donde se quiere estudiar la acción de determinada droga. Ninguno de estos requisitos puede lograrse aplicando la droga problema al baño de la preparación.

Por otra parte, el estudio de los reactivos sulfhidrílicos a nivel de zonas muy circunscritas de la membrana celular, plantea otros problemas. Estos reactivos pueden potencialmente reaccionar con cualquiera de los grupos S-S o SH, que siendo accesibles a los mismos se encuentren presentes en las células. La interacción específica con determinados grupos SH o S-S difícilmente puede lograrse aplicando la droga al baño de la preparación, ya que en el mejor de los casos, se obtendrá además del efecto de los reactivos sulfhidrílicos sobre los posibles grupos reactivos a nivel del receptor, un efecto generalizado inespecífico sobre los grupos reactivos accesibles de toda la superficie celular. Esta dificultad puede solventarse con la aplicación de los reactivos sulfhidrílicos a nivel de zonas localizadas, empleando para ello pulsos electroforéticos de corta duración que garanticen concentraciones despreciables de los mismos en el líquido que baña la preparación.

Otro problema a tener en cuenta cuando se quiere estudiar la acción de una droga sobre determinado receptor, es el concepto de eficacia de la misma. Nuestros resultados confirman la baja eficacia de los reactivos sulfhidrílicos. Resulta evidente que la aplicación de los mismos al baño tendría que ir seguida de prolongados períodos de exposición o alternativamente, la concentración de la droga en el L.E.C. debe ser muy elevada. Por citar un ejem

plo comparativo, destacamos la duración máxima de 500 msec de nuestros pulsos electroforéticos, frente al mínimo de 10 minutos de aplicación de la droga al baño realizada por otros autores (BEN HAIM, LANDAU y SILMAN, 1973).

Es de resaltar por tanto, que el empleo de la técnica electroforética con dispositivo de corriente constante, permite el estudio de las posibles interacciones de drogas de baja eficacia con grupos funcionales o estructurales situados en, o en las inmediaciones del propio receptor. Ello es posible debido a que la técnica iontoforética de corriente constante garantiza la concentración constante y localizada de la droga problema a nivel de la zona elegida para estudiar su interacción.

Por último, queremos dejar constancia de que a nuestro juicio, la aplicación electroforética de sustancias simula más fielmente la liberación fisiológica de los transmisores naturales. Por ello, nuestros resultados deben conceptuarse ante todo como debidos a la acción breve de determinados reactivos de grupos sulfhidrílicos sobre zonas muy localizadas de la membrana de la fibra muscular.

El componente de electroosmosis es el fundamental en la eyección de reactivos sulfhidrílicos desde la punta de la pipeta. Con anterioridad nos hemos referido al aspecto teórico de la electroosmosis. Bástenos señalar ahora, que las drogas utilizadas en nuestro trabajo constituyen un grupo no fuertemente ionizado y por tanto, resulta coherente y lógico que la fuerza impulsora de las mismas sea la electroosmosis y no la iontoforesis.

Sentadas estas premisas previas, pasamos a la discusión e interpretación de nuestros resultados.

La aplicación iontoforética de reactivos sulfhidrílicos, oxidantes y reductores va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas a nivel de la membrana postsináptica. Estas respuestas se muestran independientes del pH del medio.

La no influencia del pH del L.E.C. en el rango estudiado (6-8) puede en principio ser debido a dos factores fundamentales:

- el rango elegido de variación de pH del medio (6-8) no ha sido llevado a extremos límites de acidez o alcalinidad.
- las constantes de disociación de los tioles proteicos pueden depender más del entorno inmediato de los grupos sulfhidrilos que del pK de los mismos, e incluso pueden ser independientes del pH del medio (JOCELYN, 1972).

Además de lo anterior, hay que tener en cuenta que los tioles difícilmente se auto-oxidan en ningún medio. Requieren para ello, la presencia de un "catalizador" en el amplio sentido de la palabra. Ahora bien, hay factores que influyen en la velocidad de la reacción oxidativa: temperatura, tensión de oxígeno, pH del medio -dentro de ciertos límites- y muy en especial, la naturaleza del tiol en cuestión. Este último factor nos es desconocido, ya que la exacta naturaleza de la, o las proteínas en cuestión, no ha sido determinada, si bien podemos afirmar que son portadoras de un grupo S-S por lo menos y muy probablemente, como demostraremos más adelante, de un grupo SH.

En este mismo sentido, queremos destacar un factor que a nuestro juicio debe ser tenido en cuenta. La utilización de ciertos reactivos sulfhidrílicos, por ejemplo nucleofílicos como el bisulfito (STEINACKER, 1979), puede ocasionar una "superoxidación" de grupos S-S, obteniendo como productos de la reacción, ácidos sulfínicos y sulfónicos; lo cual, en definitiva, implica la ruptura

de los grupos S-S implicados en la reacción.

Este tipo de reacciones de super-oxidación, dependen en gran parte del reactivo sulfhidrílico que se utilice y se ve favorecida por la alcalinidad del medio, siendo máxima a pH 8.

Sobre la base de estos conceptos prévios, pasamos a estudiar las respuestas obtenidas en nuestra preparación a la aplicación electroforética de reactivos sulfhidrílicos-oxidantes y reductores-a nivel de la membrana postsináptica. Lo primero que nos llamó la atención fue la homogeneidad en los resultados: todos los reactivos ocasionaban despolarizaciones a nivel de la placa motora. Este efecto había sido comprobado reiteradamente y con el empleo de pipetas simples y dobles. Fue, sin duda, la obtención de respuestas claras y reproducibles con pipetas únicas el factor que más influyó en la aceptación de estas despolarizaciones como debidas, fuera de toda duda, a la aplicación única y exclusiva de reactivos sulfhidrílicos a nivel de la placa motora.

A primera vista existían dos posibilidades:

- que estuvieramos en presencia de una interacción de tipo "inespecífica", o bien
- que de alguna manera estuviesemos actuando sobre un lugar único, común para ambos tipos de reactivos.

La primera posibilidad quedaba descartada por el hecho de que respuestas "inespecíficas" habrían sido obtenidas aleatoriamente a nivel de múltiples zonas de la membrana de la fibra muscular. Muy por el contrario, en nuestra preparación, el imperativo para la obtención de respuestas a los reactivos de grupos sulfhidrílicos, era la aplicación iontoforética de la droga en cuestión en zonas extremadamente sensibles al carbacol. Lógicamente se deducía, que la condición era la proximidad de la proteína receptora.

La no obtención de despolarizaciones a nivel de zonas extrasinápticas o alejadas de la placa, nos llevó además a concluir que con toda probabilidad estábamos en presencia de grupos reactivos de incidencia funcional. Esta última conclusión nos vino dada por el hecho conocido de que los grupos sulfhidrílicos más "reactivos" son aquellos que tienen un papel funcional claro, o por lo menos, están implicados estructuralmente en zonas que tienen una elevada incidencia funcional (JOCELYN, 1972).

Establecido de esta manera, el carácter específico aparente de nuestras interacciones droga-receptor, y las despolarizaciones subsiguientes, pasamos a considerar la segunda posibilidad.

En principio, resultaba difícil aceptar que oxidantes y reductores pudiesen estar actuando de alguna manera a nivel de un grupo común. Quedaba, sin embargo, la posibilidad de lo que hemos denominado "superoxidación", cuyo resultado último, al fin y al cabo, era comparable a la acción de los reductores sobre los grupos S-S, ya que en definitiva, en ambos casos se producía la ruptura de los grupos disulfuros. En esta línea de pensamiento, nos pareció indispensable analizar todas las posibilidades de interacción de las drogas empleadas en nuestro trabajo.

Independientemente de esta última posibilidad, barajamos otra que podía tener importancia. En efecto, es un hecho que los grupos S-S tienen importancia en la determinación de la estructura terciaria de las proteínas; pero sin embargo, los grupos SH tienen un gran sentido de funcionalidad. Teniendo ésto presente, nos planteamos la posibilidad de estar actuando a nivel, no de un grupo común, pero sí de una estructura con unidad funcional.

Para dilucidar la alternativa correcta, era necesario analizar el mecanismo íntimo de acción de las drogas utilizadas por nosotros.

B) Mecanismo de acción de los reductores

Las dos drogas empleadas por nosotros, 2 ME y DTT, son reductores específicos de grupos SH. La única acción posible adjudicable a ellos, era la ruptura de un puente disulfuro:

XSH + PROTSSPROT ..... XSSPROT + PROTSH

XSH + XSSPROT ..... XSSX + PROTSH

Esta reacción es común para ambos reductores, siendo XSH el 2 ME o el DTT. El producto final de la reacción es la proteína con grupos SH reducidos y el reactivo oxidado.

Parecía claro, por tanto, que la única posibilidad de interacción primaria de los reductores, era la ruptura de un grupo disulfuro en, o en las proximidades de la proteína aceptora. Por añadidura, esta ruptura iba acompañada, o era causa de un cambio de permeabilidad que se traducía en una despolarización.

Esta posibilidad no parecía improbable, ya que puesto que los enlaces S-S tienen dentro de las proteínas un sentido estructural, la ruptura del mismo podría ocasionar un cambio conformacional, que a su vez conllevaría un cambio de permeabilidad. Cabía preguntarse ahora, si estábamos frente a una manipulación farmacológica o frente a un suceso por lo menos parcialmente fisiológico. Nuestro sentir al respecto, quedará expuesto cuando tratemos el problema de las interacciones Carbacol-reactivos sulfhidrílicos.

Quedaba, por último, explicar razonablemente cómo una ruptura de un grupo S-S podía llevar a la obtención de respuestas de cambio de potencial de tipo fásico. Para ello, había que suponer un cambio transitorio, lo cual significaba una reoxidación rápida e "in situ" del puente reducido. Dos posibilidades podían explicar,

dentro de la lógica y coherencia necesarias para todo este tipo de razonamiento, el mecanismo subyacente. Por una parte, el grupo S-S podía reducirse por acción del reductor y luego reoxidarse espontáneamente. Esto cabe dentro de lo razonable, ya que estudios polarográficos, han demostrado la existencia de grupos SS que pueden reducirse reversiblemente (JOCELYN, 1972). Por otra parte, podía invocarse la presencia de un grupo SH próximo, mediante el cual se podría establecer una reacción de intercambio TIOL-DISULFIDO. Estas reacciones son de importancia e interés en la fisiología de los grupos SH y existen datos a favor de su existencia a nivel de moléculas bien caracterizadas, como la albúmina bovina y la humana (JOCELYN, 1972).

Con estos datos, y sin entrar aún en el problema de las interacciones de los reactivos sulfhidrílicos con el carbacol, podíamos razonablemente aceptar que la ruptura, farmacológica en este caso, de un grupo S-S próximo a la proteína receptora, era responsable de la aparición de un cambio conformacional que se traducía a su vez en un cambio de potencial de tipo fásico.

Estos resultados y esta línea de pensamiento contrasta aparentemente con los resultados expuestos por KARLIN y su grupo de trabajo. En efecto, en 1973 KARLIN sostiene que el grupo SS no se reduce espontáneamente durante la activación del receptor y que su función es meramente estructural. Basa su afirmación en el hecho de que al añadir DTT al baño de la preparación, las respuestas al carbacol o acetilcolina se inhiben, y también, en el hecho de que la Netilmaleimida (NEM), agente alquilante, no ejerce acción alguna inhibitoria cuando es añadida al baño aisladamente, en ausencia de un tratamiento previo con DTT.

A este respecto, sólo podemos aducir que en nuestro diseño ex-

perimental y razonamiento subyacente, es condición indispensable la aplicación electroforética de la droga, que a nuestro juicio, produce cambios rápidos y reversibles, en este caso, a nivel del grupo S-S. Hemos visto que ambos requisitos pueden ser perfectamente probables y sólo nos cabe añadir, que en el supuesto que postulamos, la ruptura y posterior oxidación del puente SS, sería tan rápida que muy probablemente la NEM añadida al baño, no podría bloquear grupos SH de tan transitoria formación.

Este último aspecto necesita confirmación experimental con aplicación electroforética de reductores a nivel de la placa y simultánea aplicación de NEM al baño.

C) Mecanismo de acción de los oxidantes

Las dos drogas utilizadas por nosotros, deben tratarse independientemente, ya que cabe la posibilidad de mecanismos de acción diferentes.

Antes de entrar en el mecanismo de acción de las drogas oxidantes de grupos SH, queremos dejar sentadas determinadas premisas que a nuestro juicio deben ser tenidas en cuenta.

- la acción primaria de los reactivos oxidantes debe ejercerse a nivel de grupos SH. Sólo los agentes fuertemente nucleofílicos o electrofílicos pueden proceder directamente a la ruptura de grupos SS.
- los reactivos oxidantes pueden formar grupos SS como producto mayoritario y prácticamente único en su reacción con tioles. Esto conlleva la formación de enlaces de tipo covalente estables.
- la reacción agente oxidante con un único grupo SH, forma

productos de oxidación intermedios menos estables. Una reacción de este tipo, tendría el significado primario de cambiar la condición libre del grupo SH, en tanto que se le añade un producto de oxidación, pero no lleva implícita la formación de enlaces de alta energía estables y prácticamente irreversibles.

Teniendo ésto presente, pasamos a analizar el mecanismo de acción de las drogas oxidantes de tioles por separado.

Mecanismo de acción de DTNB

La discusión de los resultados obtenidos por la aplicación electroforética de DTNB, se basa fundamentalmente en estudios hechos con pipetas de DTNB-etanol. Creemos que cualquier efecto atribuible al etanol, puede descartarse por los siguientes motivos:

- se observaron los mismos efectos con pipetas DTNB-agua destilada, si bien, al ser más difíciles de manejar por la escasa solubilidad de la droga en agua, los resultados, cualitativamente iguales, eran menos aparentes.
- efectos del etanol sobre la membrana postsináptica, como los descritos por BRADLEY, PEPER y STERZ (1980), en el sentido de atribuirle una acción facilitadora sobre la transmisión neuromuscular, difícilmente pueden ser extrapolables a nuestro trabajo, ya que los citados autores, introducen el etanol al baño. Es de destacar, que estos autores observan un efecto "facilitador" del etanol sobre la interacción ACh-receptor. Nosotros observamos una acción inhibitoria del mismo sobre el potencial de carbacol. Sobre este punto no insistimos, ya que, en definitiva, no forma parte homogénea con el problema que ahora nos ocupa.

Nuestros resultados demuestran, que la aplicación electroforética de DTNB a nivel de la placa motora, produce despolarizaciones fásicas.

En una primera aproximación, lo lógico es suponer que la interacción que subyace este cambio de potencial, es la de droga oxidante con grupo o grupos SH. Sin embargo, y para agotar las posibilidades sobre un posible lugar de acción común, comenzamos por estudiar las características de este reactivo sulfhidrílico.

El DTNB pertenece al grupo de los oxidantes aromáticos con un grupo SS en su molécula. La especificidad de estos oxidantes aromáticos es limitada. En efecto, se pueden formar reacciones en cadena que llevan a la formación de disulfidos mixtos. Este tipo de reacción se ha constatado específicamente con el DTNB (JOCELYN, 1972).

La reacción general es la siguiente:

1º) RSH + XSSX ..... RSSX + XSH

2º) XSH + PrSSPr ..... PrSSX + PrSH

Si hay exceso de reactivo, la reacción aún puede continuar en cadena:

3º) PrSH + XSSX ..... PrSSX + XSH

En nuestro caso particular:

XSSX = DTNB

PrSSPr = proteína con puente SS

Sobre la base de este mecanismo de acción del DTNB, lo que no queda claro es el significado funcional de RSH. Podría tratarse de un grupo SH inespecífico en las proximidades del puente disulfuro, o bien, podría tratarse de un grupo SH único específico de

la proteína receptora en conexión funcional con el grupo SS.

Con los datos que nuestros experimentos aportan hasta el momento, no es posible dilucidar el sentido funcional ni la localización de este grupo SH necesario para la reacción en cadena con el DTNB. Aportaciones posteriores nos indicarán algo al respecto, y nos referiremos a ello cuando discutamos la acción del curare sobre los potenciales de reactivos sulfhidrílicos.

Cabe destacar también, que en nuestro caso particular, el tercer paso de la reacción en cadena puede ser eliminado, ya que la aplicación electroforética de la sustancia, probablemente no llegue a crear un exceso de reactivo en la zona.

El resultado final de este mecanismo de acción de DTNB, es la oxidación de un grupo SH y el rompimiento de un grupo SS. En este sentido, el mecanismo es semejante a lo obtenido por STEINACKER (1979), por medio de la utilización del bisulfito. Es de resaltar, que en estas condiciones, el citado autor encuentra un efecto de potenciación para la respuesta del receptor a la acetilcolina.

A modo de resumen podemos afirmar que la acción despolarizante de los pulsos de DTNB puede ser debida:

- al rompimiento del grupo SS
- a la oxidación de un grupo SH
- a la oxidación de un grupo SH y ulterior rompimiento del grupo SS.

En definitiva, queda claro el imperativo de la existencia de un grupo SH inespecífico o específico en la proximidad del puente disulfuro. Este grupo SH, sería necesario para que el DTNB se reduca en su interacción con él, y posteriormente, en forma de tiol

aromático reducido, pueda interaccionar con el puente disulfuro.

La existencia o no, de uno o más grupos SH a nivel del receptor colinérgico, ha sido un asunto largamente cuestionado y debatido. Los trabajos de DEL CASTILLO y colaboradores, citados en la Introducción, parecen confirmar la existencia de un grupo SH reactivo, por lo menos, a nivel del receptor colinérgico. Por otra parte, los resultados del grupo de trabajo de KARLIN, citados asímismo en la Introducción, son en parte confusos:

- por una parte, KARLIN y BARTELS (1966), encuentran que el p-cloromercuriobenzoato, inhibidor de los grupos SH, aplicado al baño de la preparación, produce una inhibición marcada a la respuesta al carbacol. Este hecho experimental habla a favor de la existencia de por los menos un grupo SH reactivo en las proximidades del receptor. Este diseño experimental fue realizado en la electroplaca.

- por otra parte, KARLIN (1969, 1973), sostiene la poca probabilidad de la existencia de grupo o grupos SH reactivos en el receptor colinérgico de la electroplaca, debido a que la aplicación al baño de la preparación de N.E.M. previamente a la aplicación de DTT, no tiene efectos irreversibles sobre el funcionamiento del receptor. En el razonamiento de KARLIN, de haber grupo o grupos SH, éstos habrían formado productos de adición irreversibles bloqueadores con el grupo maleimídico. A este respecto, sólo podemos añadir, que el efecto del N.E.M. es en gran parte debido a la accesibilidad o no del mismo a los grupos SH. Cabría,por tanto, la posibilidad de existencia de un grupo SH reactivo poco accesible a la acción de la maleimida en, o en la proximidad del receptor. Este aspecto sólo podrá ser confirmado con experimentos de iontoforesis de reactivos sulfhidrílicos a nivel de la placa motora y simultáneamente aplicar concentraciones conocidas de N.E.M. al baño de la preparación.

Mecanismo de acción del o-iodosobenzoato

La aplicación iontoforética de OIB va seguida de la aparición de despolarizaciones de tipo fásico a nivel de la membrana postsináptica.

El OIB es un reactivo específico de grupos SH (SOBRINO y DEL CASTILLO, 1972). Sobre esta base debemos conceptuar su acción como ejercida primariamente sobre grupos SH, los cuales oxidaría.

En efecto, el OIB no parece tener tendencia a la formación de reacciones en cadena, como las descritas para el DTNB. Tampoco hemos encontrado referencia alguna a una posible acción directa sobre los grupos SS. Por tanto, en principio, debemos aceptar que la oxidación de uno o mas grupos SH, es el mecanismo de acción de este reactivo oxidante. A este respecto, queremos añadir que la acción del OIB sobre los grupos SH próximos, llevaría a la formación de grupos SS. Para aceptar este mecanismo de acción, habría que aceptar implícitamente un mecanismo de reducción rápido, a nivel de la propia membrana postsináptica. Ello es necesario para explicar razonablemente el origen de despolarizaciones fásicas subsiguientes a su aplicación electroforética.

Si aceptamos la existencia de un único grupo SH próximo al grupo SS, el producto de la interacción agente oxidante - grupo SH, sería fundamentalmente un derivado de tipo sulfínico. En este caso, la interacción se traduciría en una acción oxidativa que fundamentalmente significaría para el tiol el hecho de dejar estar libre como tal grupo. Para el grupo de trabajo de DEL CASTILLO, esta condición sería la necesaria para ocasionar un cambio conformacional en la proteína receptora que conllevaría a su vez cambios en la conductancia a nivel de la membrana postsináptica. La reversibilidad de esta reacción en particular, bien podría explicarse

por la existencia del grupo SS próximo, con el cual se puede establecer una reacción de intercambio SS-SH, como ya hemos señalado en el apartado anterior. Sobre este aspecto insistimos en el hecho de que la reducción de un grupo SS puede ser debida a la interacción con un tiol, de forma que en principio, los grupos o el grupo SH de un tiol puede interaccionar con un grupo SS próximo (JOCELYN, 1972).

Sobre la base de este tipo de intercambio SS - SH, podemos explicar la acción homogénea observada tras la aplicación electroforética de reactivos sulfhidrílicos oxidantes y reductores. Prescindiremos de momento, del significado funcional último del grupo SH, pudiendo ser éste un grupo inespecífico en las proximidades del receptor o alternativamente un grupo específico funcional de la propia proteína receptora. Con los datos aportados hasta el momento, vemos sólo la necesidad de su existencia y ello por dos motivos fundamentales:

- la acción del DTNB requiere la acción primaria de esta droga sobre un grupo SH.
- el mecanismo de acción del OIB es primariamente oxidativo y por tanto, hay que explicar su acción sobre la membrana postsináptica como debida a la oxidación de un grupo SH por lo menos. A este respecto, queremos añadir que en moléculas tan caracterizadas como la hemoglobina, la oxidación de los grupos SH va acompañada de cambios conformacionales de la molécula (JOCELYN, 1972).

Nuestros resultados hasta el momento indican la presencia de un grupo SS y la necesidad de la existencia de un grupo SH por lo menos. Sobre esta base podemos ya formular un modelo tentativo de membrana sin incidir aún sobre el significado funcional del grupo SH. Este modelo tentativo incluiría los siguientes grupos funcionales:

- un grupo SS
- un grupo SH

La base funcional operativa de dicho modelo sería:

$$SS + S'H \rightleftharpoons SH + SS'$$

o lo que es lo mismo:

La manipulación farmacológica, en nuestro caso sobre uno de estos grupos, desplazaría la reacción hacia la derecha. Esta reacción sería reversible, como se ha explicado con anterioridad.

Probablemente, una de las conformaciones es la fisiológica en reposo. La posibilidad de que esto ocurra o no de manera natural durante la interacción neurotransmisor-receptor, será analizada más adelante.

Hemos analizado anteriormente con cierto detalle el porqué creemos que la diferencia entre nuestros resultados y los obtenidos por la escuela de KARLIN deben concepturarse como debidos a la utilización de métodos diferentes: droga añadida al baño y por periodos prolongados, en un caso; y droga aplicada iontoforéticamente a través de pulsos breves, en nuestro caso. Sin ánimo de ser reiterativos, bástenos ahora añadir al respecto, que fenómenos "fisiológicos" como la desensibilización muestran un curso temporal muy diferente cuando se estudian con la droga en el baño de la preparación, que cuando se estudian mediante la aplicación de la droga a través de pulsos electroforéticos breves. Este punto ha sido to-

cado en la introducción de nuestra tesis.

Por último, queremos añadir que la adición de un reductor al baño de la preparación (DTT por ejemplo) rompería el equilibrio de nuestro hipotético modelo al reducir el grupo SS y formarse tres grupos SH. Este estado se alejaría del imperativo puente SS y grupo SH que hemos postulado como base operativa del modelo. Esta hipótesis deberá comprobarse con experimentos de aplicación de reactivos sulfhidrílicos electroforéticamente y simultánea aplicación de dosis conocidas de reactivos sulfhidrílicos al baño de la preparación.

D) Acción del curare sobre los potenciales de reactivos sulfhidrílicos

La d-tubocurarina 10^{-6} M, aplicada al baño de la preparación del músculo sartorio de la rana, produce un efecto inhibitorio sobre la acción de ambos grupos de reactivos sulfhidrílicos, siendo más evidente la inhibición de las respuestas a la aplicación electroforética de agentes oxidantes.

En efecto, nuestros resultados demuestran que tras la desaparición de los potenciales de carbacol por acción del curare, los potenciales de reactivos sulfhidrílicos reductores persisten con una amplitud del orden de 60% de la amplitud inicial. Esta persistencia del efecto de los reactivos sulfhidrílicos reductores de grupos SS en presencia de curare, es un hecho que ha sido observado experimentalmente por otros autores (BREGETOVSKI et al. 1977 y STEINACKER, 1979).

No ocurre así con las despolarizaciones debidas a la aplicación electroforética de reactivos oxidantes de grupos SH, que siguen un curso de desaparición en presencia de curare más o menos homogéneo con respecto a la inhibición del potencial de carbacol. Este hecho ha sido referido previamente por SOBRINO y DEL CASTILLO (1972).

Estos resultados sugieren, en primer lugar, que ambos grupos de reactivos, oxidantes y reductores, actúan a nivel de lugares diferentes de la membrana postsináptica.

En segundo lugar, los resultados sugieren que el lugar de acción de los reactivos oxidantes, se encuentra próximo o en el lugar de acción de la molécula de curare y próximo o en el lugar de interacción de la molécula de carbacol con el receptor de acetilcolina. Este lugar puede ser el receptor del protómero, lugar específico de unión y reconocimiento de la molécula del transmisor con el receptor.

Conviene a este respecto recordar, los mecanismos de acción del curare.

Independientemente de una acción presináptica del curare, citada entre otros por GLAVINOVIC (1979) y MAGLEBY, PALLOTTA y TERRAR (1981), se acepta actualmente que el curare tiene dos acciones a nivel postsináptico (KATZ y MILEDI, 1978; COLQUHOUN, DREYER y SHERIDAN, 1978,1979 y LAMBERT, VOLLE y HENDERSON 1980):

- una acción de bloqueo a nivel del receptor de ACh y
- una acción de bloqueo de los canales iónicos (inoforo) asociados al receptor. Esta acción se ejercería fundamentalmente sobre los canales iónicos abiertos y sería voltaje dependiente, aumentando con la hiperpolarización. En efecto, en el músculo de la rana, COLQUHOUN, DREYER y SHERIDAN (1979) constatan, con fijación de voltaje, el efecto que la hiperpolarización de la membrana tiene sobre la velocidad de unión del curare con el canal abierto, y demuestran, además, que en estas condiciones de hiperpolarización, la velocidad de disociación del curare de los canales bloqueados, disminuye.

Establecidos los dos lugares de acción postsinápticos del curare, bástenos añadir que es un hecho aceptado por los autores citados que el lugar principal de acción se establece merced a un bloqueo del receptor, a través de un mecanismo de antagonismo competitivo.

A la luz de esta información, a primera vista parece razonable suponer que los reactivos oxidantes ejercen su acción a nivel de un grupo SH situado a nivel del receptor de ACh. Equivale esta suposición a afirmar la existencia a nivel del mismo de un grupo SH específico.

Por otra parte, parece también lógico suponer que la acción de los reactivos reductores se realizaría sobre un grupo SS situado fuera del radio de acción de la molécula de curare: en principio, el grupo SS parece estar situado muy próximo al receptor, pero posiblemente más alejado de él que el, o los grupos SH.

La inhibición parcial de los potenciales de reactivos sulfhidrílicos reductores, vendría dada por la acción de algunas moléculas de curare sobre el ionoforo. Los potenciales de membrana en nuestros experimentos, se situaban entre los 78 y 80 mV (ver figuras correspondientes) y para estos valores de Vm cabe una acción de la tubocurarina sobre los canales iónicos.

Consideramos estas conclusiones parciales, ya que requieren confirmación futura empleando en primer lugar la técnica de fijación de voltaje. Nos parece necesario constatar si existe alguna dependencia de la inhibición de los potenciales de reactivos sulfhidrílicos del potencial de membrana. Por otra parte, también consideramos necesario repetir nuestros experimentos empleando drogas bloqueadoras de longitud de molécula conocida. De esta forma, y merced a la utilización de drogas bloqueadoras del receptor y/o ionóforo con diferente y conocida longitud molecular, se podría deter-

minar la localización de los grupos SH y SS con más exactitud.

Independientemente de la necesidad apuntada de ahondar en esta línea de trabajo, nos parece razonable concluir que nuestros resultados experimentales demuestran:

- la existencia del grupo SS en las proximidades del receptor colinérgico de la placa motora de la rana. Este grupo puede ser el mismo descrito por KARLIN en la sinapsis de la electroplaca.
- la existencia de un grupo SH, por lo menos, situado muy probablemente a nivel de la molécula proteica receptora.
- ambos grupos podrían funcionar como una unidad funcional, y presumiblemente, el grupo SH podría intervenir en el proceso de reconocimiento de la molécula transmisora. Este hecho viene avalado por su comportamiento homogéneo con el carbacol frente a la tubocurarina. El grupo SS independientemente de actuar como unidad funcional con el grupo SH en el proceso de intercambio tiol-disulfido, podría estar implicado en el cambio conformacional que constituye la base operativa del ionóforo.

A modo de conclusión parcial y siguiendo el modelo de receptor propuesto por KARLIN en 1969, podríámos situar entre el sitio aniónico y el grupo SS un grupo SH. Esta concepción de modelo de receptor, nos acerca al modelo propuesto por DEL CASTILLO y SOBRINO (1974); si bien, nosotros conceptuamos como más probable la existencia de un único grupo SH a nivel del receptor.

El grupo SS estaría en relación o formaría parte del ionoforo, de modo que, al romper el puente disulfuro, independientemente de una acción previa sobre el grupo SH, se posibilitaría la apertura del ionoforo.

Este modelo hipotético, que nosotros proponemos, ofrece la posibilidad de acoplamiento ionoforo-receptor en la interacción entre el grupo SS y el grupo SH. Este acoplamiento es la base operativa del complejo receptor-ionoforo (CHANGEUX, PODLESKI y MEUNIER 1969) y por tanto, el modelo propuesto, lejos de ser una mera abstracción teórica, bien podía ser la base operativa de la interacción droga-receptor. Sobre este punto volveremos al hablar de las interacciones del carbacol con los reactivos sulfhidrílicos.

E) Interacción carbacol-reactivos sulfhidrílicos

Sobre la base de los resultados obtenidos por nosotros en el estudio de este problema, podemos abordar la discusión del mismo en torno a un postulado válido para la interacción de los dos grupos de reactivos sulfhidrílicos empleados en este trabajo. Nos referimos al hecho observado experimental y constantemente en lo que respecta a la relación temporal entre ambos pulsos electroforéticos. En efecto, el resultado de la interacción agente colinérgico-reactivo sulfhidrílico, es función del tiempo de aplicación del pulso de reactivo de grupos SH con respecto a un pulso de carbacol que se aplica con un retardo fijo. En consecuencia, nuestras conclusiones, básicamente pueden desglosarse de la siguiente manera:

- Inhibición del potencial de carbacol cuando éste va precedido por un pulso de reactivo sulfhidrílico. El límite temporal para este tipo de interacción lo podemos situar en el orden de 500 msec., de forma que los pulsos aplicados con más de 500 msec de antelación con respecto al de carbacol, resultan en inhibición de este último. No podemos dar un valor absoluto a este límite de 500 msec porque en ello entran a formar partes variables que no siempre podemos controlar. Fundamentalmente nos referimos a las pipetas cuyas característi

cas particulares pueden influir de manera más o menos notable en determinar el "momento" en que se empieza a liberar sustancia activa de la punta de las mismas. A pesar de ello, tomamos el límite de 500 msec como valor aproximativo y con base experimental para establecer un orden dentro de nuestro razonamiento y subsiguiente discusión de nuestros resultados.

- Potenciación del potencial de carbacol cuando simultáneamente se aplica un pulso de reactivo sulfhidrílico. Se observa el mismo efecto cuando los dos pulsos se aplican a intervalos muy próximos; en general, a partir de los 500 msec., se observan discretos efectos de potenciación, si bien, ésta es más marcada cuando la aplicación de ambos pulsos se hace simultáneamente.

Estas dos posibilidades en la interacción carbacol-agente sulfhidrílico son especialmente claras para los reductores (DTT y 2 ME) y para el agente oxidante DTNB. Sin embargo, también resultan extrapolables, dentro de ciertos límites, a la interacción del OIB con el agente colinérgico.

En efecto,la interacción OIB-carbacol también es función en gran parte de la relación temporal entre ambos pulsos. Atribuimos la no constancia de las respuestas observadas, fundamentalmente como debidas a problemas surgidos con las pipetas de OIB. Este reactivo es escasamente soluble al agua y muy frecuentemente cristaliza en el interior de la pipeta, de modo que, es difícil evaluar la concentración real y eficaz de sustancia activa contenida en el interior del electrodo, y por ende, la concentración real de sustancia que "sale" de la punta del mismo por efecto del pulso electroforético. A pesar de ello, nuestros resultados muestran cierta homogeneidad con lo observado para los otros reactivos sulfhidrílicos:

- pulsos previos de más de 500 msec con respecto a un potencial de carbacol resultan en la inhibición de este último. Ejemplo de ello se ve en las figuras 44, 45 y 46, donde el pulso de OIB se aplicó un segundo antes que el potencial de carbacol.
- pulsos previos de menos de 500 msec con respecto al pulso de carbacol resultan en una potenciación del potencial de carbacol. Ejemplo de ello se ilustra en las figuras 47, 48 y 49. En el primer caso, el pulso se aplicó a 350 msec del pulso de carbacol y en los otros dos, el pulso de OIB se aplicó 500 msec antes que el pulso de carbacol.
- en ocasiones, observamos un efecto nulo en la interacción OIB carbacol. Como hemos referido anteriormente, ésto podría ser debido a problemas de las pipetas de OIB.

La valoración de los resultados de las interacciones, a nuestro juicio, debe hacerse sobre la base operativa de un modelo de dos estados que funcione con cooperatividad. Ello es debido, a que como hemos explicado en la Introducción de nuestra tesis, este modelo es el más ampliamente aceptado en el terreno de la fisiología que nos ocupa.

Este supuesto nos lleva, en primer lugar, a aceptar por parte del receptor, la existencia de un cambio conformacional único. Habría receptores "inactivos" y receptores "activos" sin gradaciones intermedias entre ambos estados. En segundo lugar, debemos aceptar que "receptor ocupado" no es sinónimo de "receptor activo"; habría receptores ocupados activos y receptores ocupados inactivos.

Este modelo operativo se puede esquematizar (BARRET y MAGLEBY, 1976):

$$nACh + R \underset{K2}{\overset{K1}{\rightleftharpoons}} AchnR \underset{\alpha}{\overset{\beta}{\rightleftharpoons}} AChnR'$$

donde:

R; molécula de receptor

n; número de moléculas de ACh

AChnR; complejo AChnR inactivo

AChnR'; complejo AChnR activo

K1 y K2; constantes de velocidad: k1 unión de ACh
K2 liberación de ACh

β α ; constantes de velocidad: β apertura de canales
α cierre de canales

Este modelo en particular, predice que la conductancia de un canal único es independiente de la droga utilizada. Sin embargo, una alternativa a este postulado viene dada por la posibilidad de interacción de algunas drogas a nivel de "sitios secundarios" del receptor, cuyo efecto sería modulatorio en lo que respecta a la conductancia del canal iónico (ALBUQUERQUE et al. 1974).

Prescindiendo, de momento, de tomar postura por una u otra alternativa, queda claro que en la discusión del problema de las interacciones carbacol-reactivos sulfhidrílicos, debemos introducir el concepto de eficacia de una droga. Con rigor, la eficacia de una droga a nivel del receptor, es función de k1, k2, alfa y beta. Para conocer estos parámetros con exactitud, habría que recurrir a la técnica de análisis de ruido. Podemos, sin embargo, aproximarnos a la evaluación de la eficacia de los reactivos sulfhidrílicos empleados en nuestro trabajo, estudiando la sensibilidad de los mismos frente a la sensibilidad del carbacol, tomado como término de comparación (DREYER, PEPER y STERZ, 1978). A este respecto, nuestros resultados pueden esquematizarse de la siguiente manera:

Sensibilidad de la placa motora para el OIB.- Frente a una sensibilidad mínima de 10 mV/nC para el carbacol, tomada como referencia para la obtención de respuestas evidentes a la aplicación electroforética de OIB, observamos los siguientes rangos de sensibilidad para este agente oxidante en las diferentes condiciones experimentales:

- a pH 7 sensibilidad del orden de 0.09 mV/nC
- a pH 6 sensibilidad del orden de 0.1 mV/nC
- a pH 8 sensibilidad del orden de 0.06 mV/nC

Sensibilidad de la placa motora para el DTNB.- Tomando como término de comparación una sensibilidad mínima de 7.2 mV/nC para el carbacol, para la obtención de respuestas evidentes a la aplicación electroforética de DTNB, la sensibilidad de la placa a este agente oxidante en las distintas condiciones experimentales es la siguiente:

- a pH 7; 0.2 mV/nC
- a pH 6; 0.3 mV/nC
- a pH 8; 0.1 mV/nC

Sensibilidad de la placa motora para el DTT.- Frente a la sensibilidad mínima de 10 mV/nC para el carbacol, requerida como término de comparación para la aparición de respuestas evidentes a la aplicación iontoforética de DTT, la sensibilidad de la placa a este agente reductor en las distintas condiciones experimentales, es la siguiente:

- a pH 7; 0.3 mV/nC
- a pH 6; 1.3 mV/nC
- a pH 8; 0.2 mV/nC

Sensibilidad de la placa motora para el 2 ME.- La sensibilidad mínima requerida para el carbacol, en este caso fue de 8.5 mV/nC. Frente a esta sensibilidad, requerida para la aparición de respuestas evidentes a la aplicación iontoforética de 2 ME, la sensibilidad de la placa a este agente reductor en las distintas condiciones experimentales fue la siguiente:

- a pH 7; 0.3 mV/nC
- a pH 6; 0.4 mV/nC
- a pH 8; 0.1 mv/nC

De estos datos se desprenden dos conclusiones inmediatas:

- la sensibilidad de la placa para los reactivos sulfhidrílicos es considerablemente menor en comparación con la sensibilidad de la misma al carbacol. Tomando este factor como indicativo de la eficacia, se puede concluir que los reactivos sulfidrílicos presentan como característica general una baja eficacia.

- se observa también, que la sensibilidad de la placa para los reactivos sulfhidrílicos es, en general, ligeramente superior en todos los casos en la condición experimental que corresponde a un pH de L.E.C. de 6. A nuestro juicio, ello es debido fundamentalmente, al aumento de resistencia input que se observa a este valor de pH extracelular.

Teniendo presente estas consideraciones previas pasamos a discutir nuestros resultados.

Inhibición del potencial de carbacol por un pulso previo de reactivo sulfhidrílico

Tomando como base el modelo de dos estados, la situación de los receptores en el momento de aplicación del pulso de carbacol podría ser la siguiente:

- un determinado número de receptores se encuentra ocupado por el reactivo sulfhidrílico, y el número total de receptores disponibles para interaccionar con el carbacol sería menor. Esto conlleva la suposición de que K2 sea extremadamente lento para la interacción receptor-reactivo sulfhidrílico. Alternativamente, cabe también la posibilidad, de que al no ser "inactivados" estos reactivos por la acetilcolinesterasa, sólo fuese el factor difusión el implicado en el cese de su acción a nivel de los receptores. Cabría por tanto, en este caso, la ocupación de un número escaso de receptores, cuya interacción no sería detectable como variación de potencial de membrana, debido a su escasa eficacia; pero al aplicar el pulso de carbacol, el resultado final también sería la disminución del número de receptores disponibles para la interacción con el agente colinérgico.
- los receptores ocupados por los reactivos sulfhidrílicos pueden estar activos o inactivos. Ambas condiciones también tenderían a la reducción en el número de receptores disponibles para la interacción con el agente colinérgico.

Desde el punto de vista de los grupos funcionales sobre los que se incide con la aplicación iontoforética de reactivos sulfhidrílicos, nos encontramos con la siguiente situación:

Los agentes reductores, actúan primariamente sobre un grupo SS y el resultado es la ruptura del mismo. El agente oxidante DTNB,

actúa primariamente sobre uno o más grupos SH y secundariamente por una reacción en cadena, puede dar lugar a un rompimiento de un grupo SS. Sobre esta base, podemos pensar que la ruptura de este grupo SS conlleva a la formación de una estructura molecular a nivel del receptor, que se traduce o bien en una unión menos eficiente del carbacol con el receptor, o bien, que una unión en estas condiciones sería redundante, si aceptamos que la ruptura de este grupo disulfuro forma parte de la secuencia fisiológica durante la interacción de los receptores con las drogas agonistas.

Los trabajos de KARLIN y colaboradores se inclinan por la primera posibilidad apuntada. En efecto, KARLIN (1969), sostiene que la afinidad del receptor reducido para los agentes colinérgicos, es menor que la afinidad del receptor oxidado. Fundamentalmente, basa su razonamiento en la inhibición observada a las respuestas a la acetilcolina cuando se aplica DTT al baño.

Con anterioridad hemos discutido el punto referente a los distintos métodos empleados por el grupo de trabajo de KARLIN, y cómo este factor podría incidir en los resultados obtenidos experimentalmente. Bástenos ahora hacer hincapié en los siguientes hechos:

- la aplicación electroosmótica de reactivos sulfhidrílicos reductores va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas semejantes a las producidas por el carbacol.
- la aplicación electroosmótica de DTNB también va seguida de la aparición de despolarizaciones fásicas semejantes a las producidas por el carbacol.

Estos resultados experimentales, razonablemente nos llevan a suponer que nos encontramos frente a un mecanismo activador de los receptores, que bien podría conceptuarse como, por lo menos, par-

cialmente fisiológico.

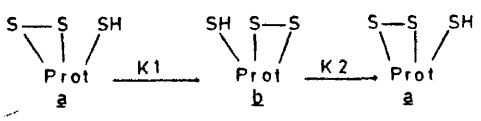
La introducción del concepto de "parcialidad", la justificamos en tanto en cuanto la activación no se ejerce a través del sitio aniónico del receptor. La posibilidad de que primaria o secundariamente estemos incidiendo sobre el sitio de unión del carbonilo, será referida más adelante.

Esto nos lleva a concluir que, en principio, parece posible suponer que el carbacol se une "menos eficientemente" al receptor reducido porque éste se encuentra en una conformación que bien puede conceptuarse como "activa".

Por otra parte, nos encontramos con el hecho experimental de despolarizaciones producidas por la aplicación del agente oxidante OIB. Este reactivo es particularmente específico para los grupos SH (DEL CASTILLO y SOBRINO, 1974). Estas despolarizaciones se inhiben en presencia de curare de la misma forma que los potenciales de carbacol. Esto nos lleva a concluir:

- la oxidación de uno o más grupos SH también podría estar implicada en el proceso de activación del receptor.
- este grupo SH se encontraría muy probablemente formando parte de la estructura molecular del receptor.

Aunando todos estos resultados y situándolos en el contexto de las interacciones que ahora nos ocupa, podemos establecer el siguiente modelo operativo hipotético que explicaría los resultados obtenidos en nuestro trabajo:



- cualquier manipulación farmacológica sobre la unidad funcional a sea en el sentido de oxidar el grupo SH, o romper el grupo SS, tendría como resultado el desplazamiento hacia una conformación b que resulta en la activación del receptor.
- la disponibilidad del receptor para una nueva interacción con una droga agonista vendría dado por la rapidez en la reacción inversa; el reestablecimiento de la conformación a
- la conformación b sería en esencia una conformación activa e inestable.

Sobre esta base, y suponiendo, como hemos dicho anteriormente, una k2 lenta, pulsos previos de reactivos sulfhidrílicos supondrían un menor número de receptores disponibles para interaccionar con el carbacol, y la respuesta a éste resultaría disminuída.

Los efectos inhibitorios del DTT aplicado por periodos de tiempo prolongados al baño de la preparación, resultaría en la formación de tres grupos SH libres. Esta conformación no sería operativa.

Estas conclusiones deberán ser sometidas a una ulterior confirmación o no, mediante utilización de la técnica de análisis de ruido.

Potenciación del potencial de carbacol por aplicación próxima o o simultánea de ambos pulsos

A nuestro juicio, esta potenciación sería el el resultado de la activación de dos poblaciones de receptores:

- la mayoría de los receptores interaccionarían eficazmente con el carbacol. En efecto, el carbacol actuaría más eficazmente y con mecanismo de cooperatividad entre las subunidades que componen el receptor con los receptores en conformación inactiva o de reposo; conformación a de nuestro hipotético modelo.
- la baja eficacia de los reactivos sulfhidrílicos supondría que sólo un escaso número de receptcres disponibles tras la interacción de la mayoría con el carbacol, se unieran a estos reactivos. Esto lleva implícito dos supuestos:
  - La potenciación sería el resultado de la despolarización debida al carbacol y producida por la interacción de la mayoría de los receptores con esta droga, más la despolarización debida a la interacción de los receptores que quedasen disponibles con los reactivos sulfhidrílicos.
  - K1 debe ser extremadamente lento en la interacción del receptor con los reactivos sulfhidrílicos en comparación con K1 de la interacción receptor-agente colinérgico. A falta de técnicas que permiten la determinación exacta de k1, podemos aproximarnos a su valor comparando las pendientes de las despolarizaciones debidas a los reactivos sulfhidrílicos y de las producidas por el carbacol. En este sentido hemos encontrado los siguientes valores medios comparativos:

	OIB	Carb.
pendiente	69.5 ± 9.2	88.9 ± 1.3
	DTNB	Carb.
pendiente	72 ± 16	87.5 ± 1.2
	DTT	Carb.
pendiente	76.6 ± 4.6	88 ± 0.7
	2 ME	Carb.
pendiente	72.2 ± 7.4	88 ± 2.1

Considerando estos valores como exclusivamente aproximativos, podemos, en este sentido, suponer razonablemente que k1 de los reactivos sulfhidrílicos es menor que k1 del carbacol.

Sobre esta base, se puede explicar la potenciación de la despolarización observada cuando ambos pulsos electroforéticos se aplican muy próximos en el tiempo o simultáneamente.

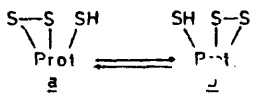
Nos queda explicar la aparición de la supersensibilidad. Este fenómeno no es constante y no hemos observado que estrictamente sea función del pH del medio. Su aparición podría explicarse en base a que tras la supresión del pulso de reactivo sulfhidrílico la mayoría o casi todos los receptores disponen de "tiempo" para volver a la conformación inactiva que implica una unión más eficaz con el agente colinérgico. Su aparición o no, estaría condicionada al número de receptores ocupados previamente por el reactivo sulfhidrílico. A mayor número de receptores ocupados con anterioridad por el reactivo sulfhidrílico, mayor número de receptores disponibles para la interacción posterior con el carbacol al ser desocupados los receptores. Queremos destacar que la frecuencia de estimulación de 1/6 seg. utilizada por nosotros a lo largo de la práctica totalidad de nuestros experimentos, supone un intervalo de tiempo razonable para permitir la difusión del reactivo sulfhidrílico tras la supresión del pulso del mismo.

Por último, nos queda referirnos al fenómeno observado ocasionalmente de potenciación de las respuestas a los reactivos sulfhidrílicos por un pulso previo de carbacol. En nuestros resultados, hemos ilustrado un ejemplo de este fenómeno el relación con el DTT (figura 78)

Este fenómeno puede ser explicado de la siguiente manera: Al estar en la proximidad de los receptores ambas drogas, el carbacol por su mayor eficacia se une a un número mayor de receptores. Esta unión lleva consigo una interacción eficaz y rápida de forma que, concluida la misma, el reactivo sulfhidrílico encuentra progresivamente un mayor número de receptores disponibles para su interacción. La posibilidad de que sea un fenómeno dependiente del potencial de membrana, que se vea "facilitado" por la despolarización producida por el carbacol, puede ser aclarado con experimentos con técnica de fijación de voltaje.

F)-Recapitulación

Nuestros resultados permiten suponer que con la aplicación electroforética de reactivos sulfhidrílicos, oxidantes y reductores, hemos actuado farmacológicamente a nivel de una estructura de unidad funcional. Esta estructura bien podría estar formada por un grupo SS y un grupo SH. La base operativa de esta estrcutura sería la posibilidad de intercambio SS-SH establecida de la siguiente manera:



a b

La posición b sería una conformación inestable y transitoria. La base de este tipo de intercambio radica en la posibilidad bioquímica que tiene este tipo de estructura de realizar intercambios tiol-disulfido intramoleculares (JOCELYN, 1972).

En este modelo hipotético, es imperativo que el grupo SH se encuentre próximo al grupo SS. Este grupo único debe encontrarse libre. Podría aducirse la posibilidad de que el grupo SH aislado tienda a formar tiazolinas de forma que no quedara en disponibilidad para el intercambio con el grupo SS. Esta posibilidad es más bien remota, ya que las condiciones experimentales requeridas para su aparición "in vitro" son tan drásticas y extremas (por ejemplo condiciones de acidez intensas), que todo hace suponer que, "in vivo", su aparición aparte de ser remota, requiere condiciones estructurales muy especiales (JOCELYN, 1972).

En lo que respecta a la localización de este grupo SH, pensamos

que experimentos futuros darán la respuesta. Nos vemos tentados, sin embargo, a dar varias soluciones hipotéticas. Por una parte, se sabe que en ciertas enzimas (por ejemplo la imidazol acetato oxigenasa) el grupo SH está implicado en la"unión", o está cerca del lugar de unión del enzima con el sustrato.

La posibilidad de que este grupo SH esté situado en las proximidades del lugar de unión del grupo carbonilo parece razonable.

Sobre la posibilidad de que el grupo SH sea él mismo el lugar de unión con el carbonilo, nos viene dada por la observación que a este respecto hicieron DEL CASTILLO y SOBRINO (1974). Para estos autores, esta posibilidad sería factible y apoyan su hipótesis en las despolarizaciones fásicas obtenidas tras la aplicación electroforética de reactivos sulfhidrílicos oxidantes.

Para aceptar esta hipótesis tendríamos que valorar, en primer lugar, la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno con el grupo SH. Es es muy poco probable desde el punto de vista bioquímico (JOCELYN, 1972). Sin embargo, parece probable que la ruptura de ciertos enlaces de hidrógeno formados en la vecindad de un grupo SH, puede afectar de manera directa a la reactividad del grupo SH (JCCELYN, 1972).

Todo ello nos lleva en principio, a aceptar como probable que el grupo SH esté situado muy próximo al lugar de unión del grupo carbonilo.

Aplicación electroforética de reactivos sulfhidrílicos en presencia de beta bungarotoxina

Empleamos la beta bungarotoxina como agente bloqueador de la transmisión neuromuscular cuya acción se ejerce fundamentalmente a nivel presináptico (CHANG, CHEN y LEE, 1973). Sin embargo, queremos destacar que MAC DERMOT, WESTGÀARD y THOMPSON (1978), aislaron de la molécula de bungarotoxina una fracción proteica de acción bloqueadora postsináptica. Esta fracción constituye sólo una pequeña parte de la totalidad de la estructura de la proteína, pero a nuestro juicio, debe ser tenida en cuenta. Por tanto, globalmente nos encontramos con que la beta bungarotoxina ejerce una acción bloqueadora de la transmisión meuromuscular a nivel presináptico, si bien una fracción de la misma tiene la particularidad de actuar a nivel postsináptico bloqueando los receptores a este nivel.

Utilizando una concentración de beta bungarotoxina de 5 μgr/ml en el baño de la preparación, se obtiene un bloqueo de la T.N.M. a las tres horas. Este tiempo se ajusta al requerido por otros autores (CHANG y HUANG, 1974), que utilizan una concentración de beta bungarotoxina del orden de 5μgr/ml y la aplican al baño de una preparación de diafragma aislado de rata.

Nuestros resultados en esta fase experimental demuestran:

- que la acción de los reactivos sulfhidrílicos se ejerce a nivel de la membrana postsináptica exclusivamente, y
- que el paso de corriente electroforética a través de la pipeta no provoca la salida del transmisor natural desde la terminal presináptica.

La fracción proteica de acción postsináptica de la beta bungaro

toxina, puede explicar la dificultad observada a la hora de obtener despolarizaciones de amplitudes superiores o iguales que las obtenidas en otras condiciones experimentales. Esta dificultad se manifestó no sólo en la obtención de respuestas a los reactivos sulfhidrílicos, sino también en la obtención de despolarizaciones a la aplicación electroforética de carbacol. Este hecho nos llevó a interpretar esta dificultad como debida a la fracción de acción postsináptica de la molécula de beta bungarotoxina.

VII- CONCLUSIONES

Los resultados expuestos en el presente trabajo pueden concretarse en los siguientes puntos:

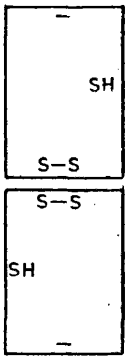
- los reactivos sulfhidrílicos, oxidantes y reductores, aplicados electroforéticamente despolarizan fásicamente la membrana postsináptica. La aplicación de los mismos a nivel de zonas extrasinápticas no va seguida de ningún tipo de respuesta.
- la eficacia de los reactivos sulfhidrílicos es considerablemente menor que la del carbacol tomado como término de comparación.
- las variaciones de pH del medio extracelular en el rango estudiado (6-8), no afectan ostensiblemente las respuestas a la aplicación electroforética de los reactivos sulfhidrílicos.
- la d-tubocurarina inhibe ambos tipos de respuesta, siendo más evidente la inhibición de los potenciales de reactivos sulfhidrílicos oxidantes.
- en presencia de beta-bungarotoxina se siguen obteniendo despolarizaciones fásicas tras la aplicación electroforética de reactivos sulfhidrílicos a nivel de la placa motora.
- la interacción carbacol-reactivos sulhidrílicos es función de la relación temporal existente entre la aplicación de ambos pulsos electroforéticos, observándose, en general, una potenciación de la respuesta cuando ambos pulsos se aplican simultaneamente o muy próximos en el tiempo. El resultado de la interacción es, por el contrario, una inhibición de la respuesta de la membrana postsináptica cuando el pulso de reactivo sulfhidrílico precede en más de 500 msec al pulso de carbacol.

Sobre la base de estos resultados se postulan las siguientes interpretaciones como conclusiones generales:

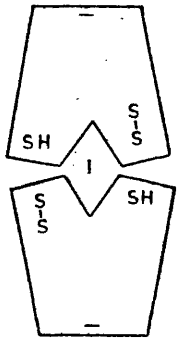
- la acción de los reactivos sulfhidrílicos oxidantes debe ejercerse, en principio, sobre uno o más grupos SH; y la de los reactivos sulfhidrílicos reductores sobre uno o más grupos SS.
- la acción de la d-tubocurarina sobre los potenciales de reactivos oxidantes y reductores, sugiere que el lugar de acción es diferente para ambos tipos de reactivos.
- la obtención de respuestas tras la aplicación electroforética de reactivos sulfhidrílicos a nivel de la placa motora en presencia de beta-bungarotoxina, posibilita descartar cualquier componente presináptico en las mismas.
- la homogeneidad de los resultados (ambos grupos de reactivos despolarizan fásicamente la membrana postsináptica) sugiere la actuación a nivel de una estructura con posible significación de unidad funcional conceptuada como:

$$\text{Prot SS} + \text{Prot S'H} \rightleftharpoons \text{Prot SH} + \text{Prot SS'}$$

- se sugiere que la interacción transmisor-receptor alteraría el grupo SH de forma que secundariamente se rompería el puente SS relacionado con el ionoforo.
- el grupo SH estaría situado en o cerca del receptor, probablemente en las proximidades del sitio de unión del grupo carbonilo.
- teniendo en cuenta los resultados experimentales y consiguientes conclusiones interpretativas, se sugiere el siguiente modelo hipotético de receptor colinérgico a nivel de la placa motora de la rana:



RECEPTOR INACTIVO



RECEPTOR ACTIVO

I = Ionoforo

VIII - BIBLIOGRAFIA

ALBUQUERQUE,E.X.; BARNARD,E.A.; PORTER,C.W.; WARNICK,J.E. (1974)
The density of acetylcholine receptors and their sensitivity in the postsynaptic membrane of muscle end plates.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA.71:2818-2822

ALONSO DE FLORIDA,F.; DEL CASTILLO,J.; GARCIA,X.; GIJON,E.(1968)
On the mechanism of the Schultz-Dale reaction in denervated muscle of the guinea pig.
J. Gen. Physiol. 51:677-693

ANDERSON, C.R.; STEVENS, C.F. (1973)
Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end-plate current fluctuations at frog neuromuscular junction.
J. Physiol. (Lond.) 235: 655-691

AXELSSON, J.; THESLEFF, S. (1959)
A study of supersensitivity in denervated mammalian skeletal muscle.
J. Physiol. (Lond.) 147:178-193

BARRET, E.F.; MAGLEBY, K.L. (1976)
Physiology of cholinergic transmission in biology of cholinergic function.
Raven Press. N.Y.: 30-89

BARRNETT, R.J. (1962)
The fine structural localization of acetylcholinesterase at the myoneural junction.
J. Cell. Biol. 12:247-262

BEN HAIM, D.; DREYER, F.; PEPER, K. (1975)
Acetylcholine receptor: modification of synaptic gating mechanism after treatment with a disulfide bond reducing agent
Pflügers Arch. Ges. Physiol. 355: 19-26

BEN HAIM, D.; LANDAU, E. M.; SILMAN, I. (1973)
The role of a reactive disulphide bond in the function of the acetylcholine receptor at the frog neuromuscular junction.
J. Physiol. (Lond.) 234: 305-325

BERNSTEIN, J. (1902)
Untersuchungen zur thermodynamik der bioelecktrischen ströme.
Pflügers Arch. Ges. Physiol. 92:521-562

BIRKS, R.;HUXLEY, H.E.; KATZ, B. (1960)
The fine structure of the neuromuscular junction of the frog.
J. Physiol. (Lond.) 150: 134-144

BOYLE, P.J.; CONWAY, E.J. (1941)
Potassium accumulation in muscle and associated changes.
J. Physiol. (Lond.) 100: 1-63

BRADLEY, R.J.; PEPER, K. STERZ, R. (1980)
Postsynaptic effects of ethanol at the frog neuromuscular junction.
Nature 284: 60-62

BRADSHAW, C.M.; SZABADI, E.; ROBERTS, M.H.T. (1973)
The reflection of efecting and retaining currents in the time-course of neuronal responses to microelectrophoretically applied drugs.
J. Pharm. Pharmac. 25: 513-520

BRADSHAW, C.M.; SZABADI, E. (1974)
The measurement of dose in microelectrophoresis experiments.
Neuropharmacology. 13: 407-415

BREGETOVSKI, P.D.; ILJIN, V.E.; JURCHENKO, O.P.; VEPRINTSEV, B.N.; VULFIUS, C.A. (1977)
Acetylcholine receptor conformational transition on excitation masks disulphide bonds against reduction.
Nature 270: 71-73

BROWN, L.M. (1961)
A thiocholine method for locating cholinesterase activity by electron microscopy.
Histochemistry of cholinesterase symposium
Bibliotheca Anat. (Basel) 2: 31-33

CAJAL, R.S. (1881)
Observaciones microscópicas sobre las terminaciones nerviosas en los músculos estriados de la rana.
Monografía editada en Zaragoza, Imprenta de "El diario Católico": 53-95

CAJAL, R.S. (1904)
Variaciones morfológicas, normales y patológicas del retículo neurofibrilar
Trab. Inst. Cajal Invest. Biol. (Madrid) Vol. 3 fascículo 1:9-15

CAJAL, R.S. (1925)
Quelques remarques sur les plaques motrices de la langue des mammiferes.
Trab. Inst. Cajal Invest. Biol. (Madrid). 23: 245-254

CAJAL, R.S. (1952)
Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.
C.S.I.C. Instituto Ramón y Cajal. Madrid

CARPENTER, D.B. (1974)
Distribution and configuration of surface myoneural junctions in the frog sartorius muscle.
A.M.J. Anat. 140: 569-576

CLARK, A.J. (1933)
The mode of action of drugs on cells.
Arnold, London

CLARKE, G.; HILL, R.G.; SIMMONDS, M.A. (1973)
Microiontophoresic release of drugs from micropipettes: use of Na as a model.
Brit.J. Pharmacol. 48: 156-161

COERS, E. (1967)
Structure and organization of the myoneural junctions
International Rev. of Cytology 22: 239-266

COHEN, J.B.;CHANGEUX, J.P. (1975)
The cholinergic receptor in its membrane environment.
Ann. Rev. Pharmacol. 15: 83-103

COLQUHOUN, D. (1973)
The relation Between classical and cooperative models for drug action.
In Drug receptors (ed. H.P. Rang) London: Macmillan

COLQUHOUN, D. (1975)
Mechanisms of drug action at the voluntary muscle endplate
Ann. Rev. Pharmacol. 15: 307-325

COLQUHOUN, D.; DIONNE, V.E.; STEINBACH, J.H.; STEVENS, C.F. (1975)
Conductance of channels opened by acetylcholine-like drugs in muscle end-plate.
Nature. 253: 204-206

COLQUHOUN, D.; DREYER, F.; SHERIDAN, R.E. (1978)
The action of tubocurarine at the neuromuscular junction.
J. Physiol. 284: 171-172P.

COLQUHOUN, D.; DREYER, F.; SHERIDAN, R.E. (1979)
The actions of tubocurarine at the frog neuromuscular junction
J. Physiol. 293: 247-284

CONWAY, E.J. (1957)
Nature and significance of concentration relations of potassium and sodium ions in skeletal muscle.
Physiol. Rev. 37: 84-132

COUTEAUX, R. (1947)
Contribution a l'étude de la synapse myneurale.
Rev. Canad. Biol. 6: 563-711

COWAN, S.L. (1936)
The initiation of all or none responses in muscle by acetylcholine.
J. Physiol. (Lond) 88: 3P

CURTIS, D.R. (1964)
Microelectrophoresis in: Physical tecniques in biological research.
Ed. Nastuk, W.L. N.Y. Academic. Press. Vol. 5: 144-190

CHANG, C.C.; CHEN, T.F.; LEE, C.Y. (1973)
Studies of the presynaptic effect of Beta-Bungarotoxin on neuromuscular transmission.
J. Pharmacol. Exp. Ther. Vol. 184.2: 339-345

CHANG, C.C.; HUANG, M.C. (1974)
Comparison of the presynaptic actions of botulim toxin and beta-bungarotoxin on neuromuscular transmission.
Naunyn-Schmiedeber's Arch. Pharmacol. 282:129-142

CHANG, C.C.; LEE, C.Y. (1963)
Isolation of neurotoxins from the venom of Bungarus Multicinctus and their modes of neuromuscular blocking action.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther 144: 241-257

CHANG, C.C.; LU, S.E.; WANG, P.N.; CHUANG, S.T. (1970)
A comparison of the effects of various sulfhydryl reagents on neuromuscular transmission.
Europ. J. of Pharmacology 11: 195-203

CHANGEUX, J.P.; KASAI, M.; LEE, C.Y. (1970)
Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 67: 1241-1247

CHANGEUX, J.P.;PODLESKI, T.R. (1968)
On the excitability and cooperativity of the electroplax membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci, USA 57: 335-341

CHANGEUX, J.P.; PODLESKI, T.R.; MEUNIER, J.C. (1969)
On some structural analogies between acetylcholinesterase and the macromolecular receptor of acetylcholine.
J. Gen. Physiol. 54: 225-244

DALE, H.; FELDBERG, W.; VOGT, M. (1936)
Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings,
J. Physiol. (Lond. 86: 353-380

DEL CASTILLO, J. (1971)
De cómo actuan las drogas, y en particular, algunas que activan los receptores sinápticos.
Homenaje al profesor B. Lorenzo Velázquez
Ed. Oteo: 1145-1157

DEL CASTILLO, J.; BARTELS, E.; SOBRINO, J.A. (1972)
Microelectrophoretic application of cholinergic compounds, protein oxidizing agents and mercurials to the chemically excitable membrane of the electroplax
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2081-2085

DEL CASTILLO, J.; ESCOBAR, I.; GIJON, E. (1971)
Effects of the electrophoretic application of sulphydryl reagents to the end-plate receptors.
Inst. J. Neurosc. I: 199-209

DEL CASTILLO, J.; KATZ, B. (1954a)
Quantal components of the end plate potential.
J. Physiol. (Lond.) 124: 560-573

DEL CASTILLO, J.; KATZ, B. (1954b)
The membrane change produced by the neuromuscular transmitter
J. Physiol. (Lond.) 125: 546-565

DEL CASTILLO, J.; KATZ, B. (1955a)
On the localization of acetylcholine receptors.
J. Physiol. 128: 157-181

DEL CASTILLo, J.; KATZ, B. (1955b)
Local activity at a depolarized nerve-muscle junction.
J. Physiol. (Lond.) 128: 396-411

DEL CASTILLO, J.; KATZ, B. (1956)
Localization of active spots within the neuromuscular junction of the frog.
J. Physiol. (Lond.) 132: 630-649

DEL CASTILLO, J.; NELSON, T.E.; SANCHEZ, V. (1962)
Mechanism of the increased acetylcholine sensitivity of skeletal muscle in low pH solutions.
J. Cell. Comp. Physiol. 59: 35-44

DEL CASTILLO, J.; SOBRINO, J.A. (1973)
Carbonyl binding sites in the cholinergic receptor of the motor end plate.
Inter. J. Neurosc. 6: 67-75

DEL CASTILLO, J.; SOBRINO, J.A. (1974)
Cholinergic end-plate receptors: activation through three separate binding sites.
Ann. Inst. Farm. Esp. Vol. XXI: 81-87

DE HARVEN, E.; COERS, C. (1959)
Electron microscope study of the human neuromuscular junction.
J. Biophys. & Biochem. Cytol. 6: 7-10

DE ROBERTIS, E. (1971)
Molecular Biology of synaptic receptors.
Science. N.Y. 171: 963-971

DE ROBERTIS, E.; BENNETT, H.S. (1954)
Submicroscopic vesicular component in the synapse.
Fed. Proc. 13: 35

DE ROBERTIS, E.; BENNETT, H.S. (1955)
Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm.
J. Biophys. & Biochem. Cytol. 1: 47-58

DOGIEL, A.S. (1890)
Methylenblautinktion der motorischen nervendigungen in den muskeln der amphibien und reptilien.
Arch. Mikrosk. Anat. 35: 305-320

DOYERE. L. (1840)
Mémoire sur des Tardigrades.
Ann. Sci. Natur. Ser. 2. zoologie 14: 269 361

DREYER, F.; PEPER, K. (1974)
Iontophoretic application of acetylcholine: advantages of high resistance micropipettes in connection with an electronic current pump.
Pflügers Arch. 348: 263-272

DREYER, F.; PEPER, K., STERZ, R. (1978)
Determination of dose-response curves by quantitative iontophoresis at the frog neuromuscular junction.
J. Physiol. 281: 395-419

ECCLES, J.C.; O'CONNOR, W.J. (1939)
Responses which nerve impulses evoke in mammalian striated muscle.
J. Physiol. (Lond.) 97: 44-102

EDELSTEIN, S.J.; BEYER, W.B.; ELDEFRAWI, A.; ELDEFRAWI, M.(1975)
Molecular weight of the acetylcholine receptors of electric organs and the effect of Triton X-100
J. Biol. Chem. 250: 6101-6106

EHRLICH, P. (1910)
Grundlagen der experimentelle chemotherapie. Berlin

EHRLICH, P. (1913)
Chemotherapeutics: scientific principles, methods and results.
Lancet 2: 445

ELDEFRAWI, A.; ELDEFRAWI, M.; ALBUQUERQUE, E.X.; OLIVEIRA, A.C.; MANSOUR, N.; ADLER, M.; DALY, J.W.; BROWN, G.B.;BURGERMEISTER, W.; WITKOP, B. (1977)
Perhydrohistrionicotoxin: a potential ligand for the ion conductance modulator of the acetylcholine receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 2172-2176

ELMQUIST, D.; FELDMAN, D.S. (1965)
Spontaneous activity at a mammalian neuromuscular junction in tetrodotoxin.
Acta. Physiol. Scand. 64: 475-476

EMMERT, F.C. (1836)
Über die endigungsweise der nerven in den muskeln, nach eigenen untersüchen.
C. A. Jenni, Bern, pp 1-35

FAMBROUGH, D.M. (1979)
Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle.
Physiol. Rev. Vol. 55 nº 1: 165-227

FATT, P.; KATZ, B. (1950)
Some observations on biological noise.
Nature 166: 597-598

FATT, P.; KATZ, B. (1951)
An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode.
J. Physiol. (Lond.) 115: 320-370

FATT, P.; KATZ, B. (1952)
Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings.
J. Physiol. (Lond.) 117: 109-128

FEIST, B. (1890)
Beiträge zur kenntniss der vitalen methylenblaufärburg des nervengewebes.
Arch. Anat. Physiol. 116: 184

FURUKAWA, T.; SASAOKA, T.; HOSOYA, Y. (1959)
Effects of tetrodotoxin on the neuromuscular junction.
Jap. J. Physiol. 9: 143-152

GAGE, P.W.; ARMSTRONG, C.M. (1968)
Miniature end plate currents in voltage clamped muscle fibres.
Nature, 218: 363-365

GINETZINSKI, A.G.; SHAMARINA, N.M. (1942)
Uspekhi Sovremennoi Biologii 15: 283-294

GINSBORG, B.L.; JENKINSON, D.H. (1976)
Transmission of impulses from nerve to muscle.
In neuromuscular junction. Ed. Eleanor Zaimis. Cap. 3

GLAVINOVIC, M.I. (1979)
Presynaptic action of curare
J. Physiol. (Lond.) 290: 499-506

GOLDMAN, D.E. (1943)
Potential, impedance and rectification in membranes.
J. Gen. Physiol. 27: 37-60

GOEPFERT, H.; SCHAEFER, H. (1938)
Über den direkt und indireckt erregten aktionsstrom und die funktion der motorischen endplatte.
Pflügers Arch. Physiol. 239: 597-619

HALL, Z.W.; KELLY, R.B. (1971)
Enzymatic detachment of endplate acetylcholinesterase from muscle.
Nature New Biology 232: 62

HARRIS, E.J.; BURN, G.P. (1949)
The transfer of sodium and potassium ions between muscle and the surrounding medium.
Trans. Faraday, Soc. 45: 508-528

HARVEY, A.L.; DRYDEN, W.F. (1974)
The effect of disulphide bond reduction on cholinoreceptors in cultured skeletal muscle.
Biochemical Pharmacology. 23: 3093-3096

HINSEY, J.C. (1934)
The innervation of skeletal muscle.
Physiological Reviews 14: 514-585

HODGKIN, A.L. (1958)
The Croonian Lecture: Ionic movements and electrical activity in giant nerve fibers.
Proc. Roy. Soc. ser B. 148: 1-37

HODGKIN, A.L.; HOROWICZ, P. (1959)
The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibers.
J. Physiol. (Lond.) 148: 127-160

HODGKIN, A.L.; KATZ, B (1949)
The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid.
J. Physiol. (Lond.) 108: 37-77

HODGKIN, A.L.; KEYNES, R.D. (1955)
Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo.
J. Physiol. (Lond.) 128: 28-60

HODGKIN, A.L.; RUSHTON, W.A.H. (1946)
The electrical constants of a crustacean nerve fiber.
Proc. Roy. Soc. B. 133: 449-479

HOFFER, B.J.; NEFF, N. H.; SIGGINS, G. R. (1971)
Microiontophoretic release of norepinephrine from micropipettes.
Neuropharmacology 10: 175-180

HUBBARD, J.I.; LLINAS, R.; QUASTEL, D.M.J. (1969)
Electrophysiological analysis of synaptic transmission.
Edward Arnold (Publishers) LTD London.

JENKINSON, D.H. (1960)
The antagonism between tubocurarine and substances which depolarize the motor end-plate.
J. Physiol. (Lond.) 152: 309-324

JENKINSON, D.H.; TERRAR, D.A. (1973)
Influence of chloride ions on changes in membrane potential during prolonged application of carbachol to frog skeletal muscle.
Br. J. Pharmacol. 47: 363-376

JOCELYN, P.C. (1972)
Biochemistry of the SH group. The ocurrence, chemical properties, metabolism and biological function of thiols and disulphides.
Academic. Press Inc. (London)

KARLIN, A. (1967)
On the application of a "Plausible Model" of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine.
J. Theoret. Biol. 16: 306-320

KARLIN, A. (1969)
Chemical modification of the active site of the acetylcholine receptor.
J. Gen. Physiol. 54: 245-264

KARLIN, A. (1973)
Molecular interactions of the acetylcholine receptor.
Fed. Proc. 32: 1847-1853

KARLIN, A.; BARTELS, E. (1966)
Effects of blocking sulfhydryl groups and of reducing disulfide bonds on the acetylcholine-activated permeability system of

the electroplax.
Biochem. & Biophys. Acta 126: 525-535

KARLIN, A.; WINNIK, M. (1968)
Reduction and specific alkylation of the receptor for acetylcholine.
Proc. Natl. Acad. Sci. 60: 668-674

KASAI, M. CHANGEUX, J.P. (1971)
In vitro excitation of purified membrane fragments by cholinergic agonists. III Comparison of dose-response curves to decamethonium with the corresponding binding curves of decamethonium to the cholinergic receptor.
J. Membrane Biol. 6: 58-80

KATZ,B(1962)
The transmission of impulses from nerve to muscle, and the subcellular unit of synaptic action.
Proc. Roy Soc. B 155: 455-477

KATZ, B. (1966)
Nerve, muscle and synapse.
New York: M^{C} Graw Hill

KATZ, B.; KUFFLER, S.W. (1941)
Multiple innervation of the frog's sartorius muscle.
J.of Neurophysiology 4: 207-223

KATZ, B.; MILEDI, R. (1967)
Tetrodotoxin and neuromuscular transmission.
Proc. Roy. Soc. B 167: 8-22

KATZ, B.; MILEDI, R. (1972)
The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components.
J. Physiol. (Lond.) 224: 665-699

KATZ, B.; MILEDI, R. (1977)
Transmitter leakage from motor nerve endings.
Proc. Roy. Soc. B 196: 59-72

KATZ, B.; MILEDI, R.(1978)
A re-examination of curare action at the motor end-plate
Proc. Roy Soc. B 203: 119-133

KATZ, G.M.; STEINBERG, S. (1976)
Microelectrophoresis and constant current sources. Electrobiology of nerve, synapse and muscle.
Ed. by Reuben, D.P. Purpura, M.V.L. Bennet, E.R. Kandel.
Raven Press, N.Y. pp 367-377

KATZ, B.; THESLEFF, S. (1957)
A study of the "desensitization" produced by acetylcholine at the motor end-plate
J. Physiol. (Lond.) 138: 63-80

KELLY. J.S. (1975)
Microiontophoretic application of drugs into single neurons.
Handbook of psycopharmacology. Vol. 2 Principles of receptor research.
Iversen, L.L.; Iversen, S.D.; Snyder, S.H. Plenum Press N.Y.

KEYNES, R.D. (1954)
The ionic fluxes in frog muscle.
Proc. Roy. Soc. Lond. ser. B 142: 359-382

KORDAS, M. (1970)
The effect of procaine on neuromuscular transmission.
J. Physiol. Lond. 209: 689-699

KORDAS. M. (1972)
An attempt at an analysis of the factors determining the time course of the end-plate current. II Temperature.
J. Physiol. Lond. 224: 333-348

KOSHTOJANZ, K.S. (1950)
The influence of the motor and the sympathetic nerves upon the skeletal musculature: its dependence upon the reactive groups of albumens.
Doklady.Akademii Nauk SSSR 72: 981-984

KRAUSE, W. (1863)
Über die endigung der muskelnerven.
II Nat. Med. 18: 136-160

KRIEBEL, M.E.; LLADOS, F.; MATTESON, D.R. (1976)
Spontaneous subminiature endplate potentials in mouse diaphragm muscle: evidence for synchronous release.
J. Physiol. Lond. 262: 553-581

KUBA, K.; ALBUQUERQUE, E.X.; BARNARD, E.A. (1973)
Diisopropylflurophosphate: suppression of ionic conductance of the cholinergic receptor.
Science 181: 853-856

KUFFLER, S.W. (1943)
Specific excitability of the endplate region in normal and denervated muscle.
J. Neurophysiol. 57: 1-90

KUFFLER, S.W.; NICHOLLS, J.G. (1977)
From neuron to brain: a cellular approach to the function of the nervous system.
Sinauer Associates Inc. Publishers Sunderland Massachusetts.

KUFFLER, S.W.; YOSHIKAMI, D. (1975)
The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse.
J. Physiol. Lond. 251: 465-482

KÜHNE, W. (1862)
Über die peripherischen endorgane der motorischen nerven.
Engelman, Leipzig

KÜHNE, W. (1883)
Die verbindung der nervenscheiden mit dem sarkolemm.
II Biol. 19: 501-534

KÜHNE, W.(1887)
Neue untersuchungen über die motorische nervendigungen.
Z Biol. 23: 1-48

KULCHITSKY, N. (1924)
Nerve endings in muscles.
J. Anat. Lond. 58: 152-159

KRNJEVIC, K.; MITCHELL, J.F.; SZERB, J.C. (1963)
Determination of iontophoretic release of acetylcholine from micropipettes.
J. Physiol. Lond. 165: 421-436

LAMBERT, D.H. (1973)
The influence of disulfide bond reduction and lanthanum on endplate receptors.
Separatum Experientia 29: 668-669

LAMBERT, J.J.; VOLLE, R.L.; HENDERSON, E.G. (1980)
An attempt to distinguish between the actions of neuromuscular blocking drugs on the acetylcholine receptor and on its associated ionic channel.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 77 nº 8: 5003-5007

LANGLEY, J.N. (1905)
On the reaction of cells and nerve endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari.
J. Physiol. Lond. 33: 374-413

LANGLEY, J.N. (1907)
On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances.
J. Physiol. Lond. 36: 347-384

LANGLEY, J.N. (1909)
On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances. IV The effect of curari and of some other substances on the nicotine response of the sartorius and gastrocnemius muscles of the frog.
J. Physiol. Lond. 39: 235-295

LEHRER, G.M.; ORNSTEIN, L. (1959)
A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase.
J. Biophys. & Biochem. Cytol. 6: 399-406

LESTER, H.A. (1977)
La respuesta a la acetilcolina.
Investigación y ciencia, 7: 88-100

LEVI, H.; USSING, H.H. (1948)
The exchange of sodium and chloride ions across the fibre membrane of the isolated frog sartorius.
Acta Physiol. Scand. 16: 232-249

LINDSTROM, J.M.; SINGER, S.J.; LENNOX, E.S. (1973)
The effects of reducing and alkylating agents on the acetylcholine receptor activity of frog sartorius muscle.
J. Membrane Biol. 11: 217-226

LING. G.; GERARD, R.W. (1949)
The normal membrane potential of frog sartorius fibers.
J. Cell. Comp. Physiol. 34: 383-396

LUFF, A.R.; PROSKE, U (1976)
Properties of motor units of the frog sartorius muscle.
J. Physiol. Lond. 258: 673-685

Mac DERMOT, J.; WESTGAARD, R.H.; THOMPSON, E.J. (1978)
Beta-bungarotoxin: Separation of two discrete proteins with different synaptic actions.
Biochem. J. 175: 271-279

Mc MAHAN, U.J. ; SANES, J.R.; MARSHALL, L.M. (1978)
Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction.
Nature 271: 171-174

Mc MAHAN, U.J.; SPITZER, N.C.; PEPER, K. (1972)
Visual identification of nerve terminals in living isolated skeletal muscle.
Proc. Roy. Soc. B 181: 421-430

MAENO, T. (1966)
Analysis of sodium and potassium conductances in the procaine end-plate potential.
J. Physiol. Lond. 183: 592-606

MAENO, T.; EDWARDS, C.; HASHIMURA, S. (1971)
Differences in effects on end-plate potentials between procain and lidocaine as revealed by voltage-clamp experimentals.
J. Neurophysiol. 34: 32-46

MAGAZANIK, L.G.; VYSKOCIL, F. (1970)
Dependence of ACh desensitization on the membrane potential of frog muscle fibre end on the ionic changes in the medium.
J. Physiol. Lond. 210: 507-518

MAGLEBY, K.L.; STEVENS, C.F. (1972a)
The effect of voltage on the time course of end-plate currents
J. Physiol. Lond. 223: 151-171

MAGLEBY, K.L.; STEVENS, C.F. (1972b)
A quantitative description of end-plate currents.
J. Physiol. Lond. 223: 173-197

MAGLEBY, K.L.; PALLOTTA, B.S.; TERRAR, D.A. (1981)
The effect of tubocurarine on neuromuscular transmission durin repetitive stimulation in the rat, mouse, and frog.
J. Physiol. Lond. 312: 97-113

MALLART, A.; TRAUTMANN, A. (1973)
Ionic properties of the neuromuscular junction of the frog: effects of denervation and pH.
J. Physiol. Lond. 234: 553-567

MARQUIS, J.K.; MAUTNER, H.G. (1974)
The effect of electrical stimulation on the action of sulfhydryl reagents in the giant axon of squid; suggested mechanism for the role of thiol and disulfide groups in electrically-induced conformational changes.
J. Membrane Biol. 15: 249-260

MARTIN, A.R. (1955)
A further study of the statistical composition of the end plate potential.
J. Physiol. Lond. 130: 114-122

MILEDI, R. (1960 a)
Junctional and extrajunctional acetylcholine receptors in skeletal muscle fibres.
J. Physiol. Lond. 151: 24-30

MILEDI, R. (1960 b)
The ACh sensitivity of frog muscle fibers after complete or partial denervation.
J. Physiol. Lond. 151: 1-23

MILEDI, R. (1960 c)
Properties of regenerating neuromuscular synapses in the frog.
J. Physiol. Lond. 154: 190-205

MILEDI, R. (1962)
Induction of receptors.
In. Mongar, J.L. de Reuck, A.V.S.
Enzymes and drug action: 220-235
London: Churchill

MILEDI, R.; POTTER, L.T. (1971)
Acetylcholine receptors in muscle fibres.
Nature, Lond. 233: 599-603

MITTAG, T.W.; TORMAY, A. (1970)
Disulphide bonds in nicotinic receptors.
Fedn. Proc. 29: 547

MONOD, J.;WYMAN, J.; CHANGEUX, J.P. (1965)
On the nature of allosteric transitions: a plausible model.
J. Molec. Biol. 12: 88-118

NACHMANSOHN, D. (1959)
Chemical and molecular basis of nerve activity.
Academic Press, N.Y.: 148-152

NASTUK, W.L. (1953)
Membrane potential changes at a single muscle end-plate produced by transitory application of acetylcholine with an electrically controlled microjet.
Fed. Proc. 12:102

NASTUK, W.L.; HODGKIN, A.L. (1950)
The electrical activity of single muscle fibers.
J. Cell. Comp. Physiol. 35: 39-73

NASTUK, W.L.; PARSONS, R.L. (1970)
Factors in the inactivation of postjunctional membrane receptors of frog skeletal muscle.
J. Gen. Physiol. 56: 218-249

O'BRIEN, R.D.; ELDEFRAWI, M.E.; ELDEFRAWI, A.J. (1972)
Isolation of acetylcholine receptors.
Ann. Rev. of Pharmacol. 12: 19-34

PALADE, G.E. (1954)
Electron microscope observations of interneural and neuromuscular synapses.
Anat. Rec. 118: 335-336

PALAY, S.L. (1956)
Synapses in the central nervous system.
J. Biophys. & Biochem. Cytol. sppl. 2: 193-202

POTTER, L.T. (1970)
Synthesis, storage and release of (^{14}C) acetylcholine in isolated rat diaphragm muscles.
J. Physiol. 206: 145-166

POTTER, L.T. (1973)
Acetylcholine receptors in vertebrate skeletal muscles and electric tissues.
In Drug Receptors (ed H.P. Rang) London: Mac Millan.

PURVES, R.D. (1977)
The release of drugs from iontophoretic pipettes.
J. Theoret. Biol. 67: 789-798

RANG, H.P. (1971)
Drug receptors and their function.
Nature, Lond. 231: 91-96

RANG, H.P. (1973)
Receptor mechanisms: Fourth Gaddum Memorial Lecture.
Br. J. Pharmac. 48: 475-495

RANG, H.P. (1975)
Acetylcholine receptors.
Quarterly Reviews of Biophysics 7: 283-399

RANG, H.P.; RITTER, J.M. (1970 a)
On the mechanism of the desensitization at cholinergic receptors.
Mol. Pharmacol. 6: 357-382

RANG, H.P.; RITTER, J.M. (1970 b)
The relationship between desensitization and the metaphilic effect at cholinergic receptors.
Mol. Pharmacol.6: 383-390

RANG, H.P.; RITTER, J.M. (1971)
The effect of disulphide bond reduction on the properties of cholinergic receptors in chick muscle.
Mol. Pharmacol. 7: 620-631

RASH, J.E.; HUDSON, S.C.; ELLISMAN, M.H. (1978)
Ultrastructure of acetylcholine receptors at the mammalian neuromuscular junction. In Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones:
A Multidisciplinary Approach. pp 47-69
Edited by R.W. Straub & L. Bolis Raven Press. N.Y.

REGER, J.F. (1958)
The fine structure of neuromuscular synapses of gastrocnemii from mouse and frog.
Anat. Rec. 130: 7-14

ROBERTSON, J.D. (1956)
The ultrastructure of a reptilian myoneural junction.
J. Biophys. & Biochem. Cytol. 2: 381-394

ROBERTSON, J.D. (1960)
Electron microscopy of the motor endplate and the neuromuscular spindle.
Am. J. Phys. Med. 39: 1-43

ROSS, D.H.; TRIGGLE, D.J. (1972)
Further differentiation of cholinergic receptors in leech muscle.
Biochem. Pharmacol. 21: 2533-2536

ROUGET, C. (1862)
Note sur la terminaison des nerfs moteurs dans les muscles chez les reptiles, les oiseaux et les mammifères.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 55: 548-552

SANDMANN, G. (1885)
Ueber die vertheilung der motorischen nervenend apparate in den quergetreiften muskeln der wirbelthiere.
Arch. Anat. Physiol. Lpz. 240-252

SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. (1972)
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science 175: 720-731

SOBRINO, J.A.; DEL CASTILLO, J. (1972)
Activation of the cholinergic endplate receptors by oxidizing reagents.
Inter. J. Neurosci. 3: 251-258

STEINACKER, A. (1979)
Sulphonation of cholinergic receptor disulphide bond increases response to ACh.
Nature 278: 358-360

STEINBACH, A.B. (1968)
A kinetic model for the action of xylocaine on the receptors for acetylcholine.
J. Gen. Physiol. 52: 162-180

STEPHENSON, R.P. (1956)
A modification of receptor theory.
Br. J. Pharmacol. II: 379-393

TAKEUCHI, N. (1963a)
Some properties of conductance changes at the endplate membran during the action of acetylcholine.
J. Physiol. Lond. 167: 128-140

TAKEUCHI, N. (1963b)
Effects of calcium on the conductance change of the endplate membrane during the action of transmitter.
J. Physiol. Lond. 167: 141-155

TAKEUCHI, A; TAKEUCHI, N. (1959)
Active phase of frog's endplate potential
J. Neurophysiol. 22: 395-411

TAKEUCHI, A.; TAKEUCHI, N. (1960)
On the permeability of end plate membrane during the action of transmitter.
J. Physiol. Lond. 154: 52-67

TAKEUCHI, A.; TAKEUCHI, N. (1969)
A study of the action of picrotoxin on the inhibitory neuromucular junction on the crayfish.
J. Physiol. Lond. 205: 236-262

TELLO, J.F. (1905)
Terminaciones en los músculos estriados.
Trab. Inst. Invest. Biol. (Madrid) 4: 105-114

TELLO, J.F. (1917)
Génesis de las terminaciones nerviosas motrices y sensitivas.
I. En el sistema locomotor de los vertebrados superiores.
Histogénesis muscular.
Trab. Inst. Cajal Invest. Biol. Madrid 15: 101-199

TELLO, J.F. (1944)
Sobre una vaina que envuelve toda la ramificación del axon en las terminaciones motrices de los músculos estriados.
Trab. Inst. Cajal Invest. Biol. Madrid 36: 2-59

TERRAR, D.A. (1978)
Effects of dithiothreitol on end-plate currents.
J. Physiol. Lond. 276: 403-417

THESLEFF, S. (1955)
The mode of neuromuscular block caused by acetylcholine, nicotine, decamethonium and succinylcholine.
Acta Physiol. Scand. 34: 218-231

TIEGS, O.W. (1932)
A study by degeneration methods of the innervation of the muscles of a lizard (Egernia)
J. Anat. Lond. 66: 300-320

TIEGS, O.W. (1953)
Innervation of voluntary muscle.
Physiological Reviews 33: 90-144

VALENTIN, G. (1836)
Über den verlauf und die letzten enden der nerven.
Nova Acta Phys. Med. Acad. Leopoldino. Carolinae 18: 51-240

WASER. P.G. (1960)
The cholinergic receptor
J. Pharm. Pharmac. 12: 577-594

WASER, P.G. (1966)
Autoradiographic investigations of cholinergic and other receptors in the motor end-plate.
Adv. Drug Res. 3: 81-120

WASER, P.G. (1967)
Receptor localization by autoradiographic techniques.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 144: 737-753

WERNIG, A.; STIRNER, H. (1977)
Quantum amplitude distributions point to functional unity of the synaptic "active zone"
Nature, 269: 820-822

WERMAN, R.; CARLEN, P.L.; KUSHNIR, M.; KOSOWER, E.M. (1971)
Effect of thiol oxidizing agent, diamide, on acetylcholine release at the frog end-plate.
Nature (Lond.)233: 120-121

ZACKS, S.I.; BLUMBERG, J.M. (1961)
Observations on the fine structure of mouse and human neuromuscular junctions.
J. Biophys. & Biochem. Cytol. 10: 517-528

ZACKS, S.I.; SHEFF, M.F.; SAITO, A. (1973)
Structure and staining characteristics of myofiber external lamina.
J. Histochem. Cytochem. 21: 703-714

ZAIMIS, E. (1976)
The neuromuscular junction: areas of uncertainty.
In: Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 42: 1-21
Editor Eleanor Zaimis. Springer Verlag. N.Y.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
BIBLIOTECA