

## Tesis de Posgrado

# Estudio electrofisiológico de las fibras lentas del músculo cruralis del anfibio normalmente inervado, desnervado in vivo y en cultivo de órgano

Szczupak de Rodgers, Lidia

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Szczupak de Rodgers, Lidia. (1989). Estudio electrofisiológico de las fibras lentas del músculo cruralis del anfibio normalmente inervado, desnervado in vivo y en cultivo de órgano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2235\\_SzczupakdeRodgers.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2235_SzczupakdeRodgers.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Szczupak de Rodgers, Lidia. "Estudio electrofisiológico de las fibras lentas del músculo cruralis del anfibio normalmente inervado, desnervado in vivo y en cultivo de órgano". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2235\\_SzczupakdeRodgers.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2235_SzczupakdeRodgers.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DE LAS FIBRAS LENTAS  
DEL MUSCULO CRURALIS DEL ANFIBIO NORMALMENTE INERVADO,  
DESNERVADO IN VIVO Y EN CULTIVO DE ORGANO

Autor: Lidia Szczupak

Director de Tesis: Dr. Osvaldo D. Uchitel

Lugar de Trabajo: Instituto de Biología Celular,  
Facultad de Medicina, U.B.A.

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Ciencias Biológicas

1989

-2.235 -  
Ej 2

## RESUMEN

Dos tipos de fibras fueron caracterizadas en el musculo cruralis del sapo: lentas y rapidas. Este musculo posee un alto porcentaje de fibras lentas, facilmente abordables con tecnicas electrofisiologicas.

Las fibras lentas de musculos cruralis desnervados desarrollaron la capacidad de producir potenciales de accion 25 dias tras el corte del nervio ciatico a la altura de la pelvis.

Esta latencia fue reducida a 20 dias cuando el nervio fue transectado a la altura de su entrada al musculo. La inyeccion de  $\alpha$ -bungarotoxina al musculo desnervado redujo la latencia a 18 dias.

Los musculos cruralis fueron cultivados en un sistema de cultivo de organo (19°C) por 30 dias. Las fibras lentas en cultivo desarrollaron respuestas regenerativas tras 24 dias. El desarrollo del potencial de accion no se produjo durante el invierno.

Las fibras lentas desnervadas de musculos desnervados in vivo o en cultivo de organo mantuvieron sus propiedades electrofisiologicas, pero se observo un significativo decremento en la constante de tiempo.

El efecto de la  $\alpha$ -bungarotoxina sobre la latencia del fenomeno desnervatorio sugirio que la acetilcolina podria cumplir un rol neurotrofico.

Musculos cruralis fueron cultivados en presencia de carbacol (1-5  $\mu$ M). Este agonista colinergico no afecto el desarrollo de la capacidad de las fibras lentas desnervadas de producir potenciales de accion.

Nuestros resultados sugieren que la acetilcolina podria jugar un rol importante en la excitabilidad de las fibras lentas pero este agente no parece ser, por si mismo, el factor critico.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Osvaldo Uchitel haberme iniciado en el tema de trabajo, haberme permitido trabajar en su laboratorio, facilitandome todo aquello que fue necesario para cumplir mi tarea.

Agradezco al Dr. Leonardo Nicola Siri, maestro, por haberme guiado en los principios de la electrofisiología y por su enorme paciencia a todo lo largo del camino del aprendizaje. Agradezco al Dr. Nicola Siri, compañero, por su constante apoyo y por su invalorable colaboración en la tarea desarrollada.

Agradezco profundamente a Alba Mezio por la labor compartida, por lo que su criterio y serenidad aportaron a mi tarea, por su compañerismo y su dedicación, que contribuyeron enormemente en la realización del trabajo que constituye esta tesis.

Agradezco a Ariel Escobar, por su ayuda, que en en muchos momentos críticos resultó vital para el desarrollo del trabajo realizado, y por las largas horas de discusión que enriquecieron mi formación en el campo de la biofísica.

Agradezco a Alejandro Schinder por su ayuda en la elaboración de este manuscrito y por su invalorable apoyo. A Ale por la risa y por el llanto.

Mi agradecimiento a Adrian, Susana y Juan Jose, porque su trabajo es tambien parte de este trabajo con disfraz de palabras.

A Claudio, porque tantas cosas y porque su movilizacion fue fuente de energia y lucidez.

Dedico esta tesis a  
Leonardo, Maestro y Amigo,  
porque el unico crecimiento  
es el crecimiento en el  
"mundo del reconocimiento":  
si tu creces yo crezco.

Lo unico cierto era el peso en la boca del estomago, la sospecha fisica de que algo no andaba bien, de que casi nunca habia andado bien. No era ni siquiera un problema, sino haberse negado desde temprano a las mentiras colectivas o a la soledad rencorosa del que se pone a estudiar los isotopos radiactivos o la presidencia de Bartolome Mitre. Si algo habia elegido desde joven era no defenderse mediante la rapida y ansiosa acumulacion de una "cultura", truco por excelencia de la clase media argentina para hurtar el cuerpo a la realidad nacional y a cualquier otra, y creerse a salvo del vacio que la rodeaba. Tal vez gracias a esa especie de fiaca sistematica, como la definia su camarada Traveler, se habia librado de ingresar en ese orden fariseo (en el que militaban muchos amigos suyos, en general de buena fe porque la cosa era posible, habia ejemplos), que esquivaba el fondo de los problemas mediante una especializacion de cualquier orden, cuyo ejercicio conferia ironicamente las mas altas ejecutorias de argentinidad. Habia vivido lo suficiente para sospechar eso que, pegado a las narices de cualquiera, se le escapa con la mayor frecuencia: el peso del sujeto en la nocion del objeto.

Rayuela  
Julio Cortazar

## INDICE

OBJECTIVOS GENERALES DEL PROYECTO	1
INTRODUCCION	
Relaciones Troficas	3
Fibras Musculares Lentas de Anfibio	14
Propiedades Electrofisiologicas de la	
Membrana Muscular	21
Mecanismo Molecular del Potencial	
de Accion	30
MATERIALES Y METODOS	34
RESULTADOS EXPERIMENTALES	
Caracterizacion Electrofisiologica de las	
Fibras del Musculo Cruralis del Sapo	
Musculos Normalmente Innervados	42
Musculos Desnervados	53
Musculos Mantenidos en Cultivo de Organ	61
Modulacion del Proceso Desnervatorio	65
Estudio del Efecto del AMPc en la	
Modulacion del Canal de Sodio Voltaje	
Dependiente en las Fibras Lentas	65
Estudio del Efecto del Largo del Cabo	
Nervioso Distal sobre el Retardo del	
Proceso Desnervatorio	68
Efecto del Bloqueo de los Receptores	
Colinergicos sobre la Latencia del	



Proceso Desnervatorio	70
Estudio del Efecto del Carbacol en el Desarrollo de la Capacidad de la Fibra Lenta de Producir Potenciales de Accion en Cultivo del Organ	74
DISCUSION	77
REFERENCIAS	96

## **Capítulo I**

### **OBJETIVOS GENERALES DEL PROYECTO**

El objetivo ultimo del proyecto encarado es comprender como, en la sinapsis neuromuscular, la neurona regula las propiedades electrofisiologicas de la fibra muscular que inerva.

La sinapsis neuromuscular es un modelo de sinapsis quimica que ofrece la ventaja de una celula postsinaptica muy accesible para su estudio con tecnicas electrofisiologica. Mas alla de la transmision del mensaje sinaptico, que se expresa a nivel postsinaptico como un cambio en el potencial de membrana, existe un mensaje trofico entre la celula pre y postsinaptica que se expresa en el mantenimiento de la estructura sinaptica, funcional tanto desde el punto de vista morfologico como bioquimico. Es el mecanismo de este ultimo tipo de mensaje el objeto mismo de nuestro estudio. Como tal el estudio emprendido contribuye al conocimiento de los mecanismos de modulacion sinaptica. Pero mas alla de esta contribucion en el campo de las ciencias basicas el tema tiene proyeccion clinica, en tanto que desordenes en la regulacion ejercida por la neurona sobre la fibra muscular pueden ser responsables de la patogenia de ciertas enfermedades que afectan a la funcion motora. Como modelo de estudio investigaremos la modulacion neuronal de las propiedades electricas de las fibras lentas del musculo esquelético de anfibio. Estas fibras tienen la propiedad, entre otras, de carecer de un mecanismo de excitabilidad mientras se hallan normalmente inervadas. Al ser desnervadas adquieren la capacidad de generar respuestas regenerativas. Esta observacion sugiere que el nervio ejerce una

modulacion negativa de la capacidad de la fibra de tipo lento de generar potenciales de accion.

Los objetivos del presente trabajo fueron realizar un estudio detallado de como la desnervacion afecta las propiedades electrofisiologicas pasivas de las fibras lentas en correlacion con los cambios en las propiedades electrofisiologicas activas, e investigar sobre factores neuronales de putativa accion trofica como posibles moduladores de dichas propiedades.

## **Capitulo II**

### **INTRODUCCION**

## II.A. RELACIONES TROFICAS

Guth (1968) encabeza un extenso trabajo sobre trofismo definiendo las influencias troficas del nervio sobre el musculo como aquellas funciones del nervio que afectan o regulan el metabolismo de la celula muscular. El autor argumenta que si bien el termino metabolismo implica cierta constriccion bioquimica, la histologia y la fisiologia quedan incluidas en esta definicion pues, en definitiva, ambas tienen base bioquimica.

Drachman (1970) define como "influencia trofica" del nervio aquella que contribuye a la sobrevivencia del musculo y que regula su adaptacion a la funcion que cumple; y sostiene que solo pueden incluirse dentro de esta categoria de influencias los efectos a largo plazo.

McArdl (1983) expresa que las influencias troficas son aquellas que contribuyen al mantenimiento del fenotipo maduro del musculo, incluyendo tanto los factores quimicos como la actividad neuromuscular.

Resumiendo estas concepciones, elegimos definir la accion trofica de una neurona sobre la fibra muscular que inerva como aquella que provee a la sobrevivencia del musculo y a su adaptacion a la funcion especifica que cumple. Pero todavia es tema de estudio si la accion trofica se ejerce justamente via el mensaje sinaptico (algo asi como "la funcion hace al organo") o es ejercida por mensajeros troficos especificos.

La evidencia mas clara sobre la existencia de una accion trofica por parte de la neurona motora la constituyen los cambios morfologicos, fisiologicos y metabolicos que se suceden al desnervar un musculo. Si mediante una maniobra quirurgica se corta el nervio, no solo se interrumpe la transmision de la senal electrica de este hacia el musculo, sino que con un retardo (latencia) comienzan a observarse cambios en ciertas propiedades de la celula postsinaptica.

#### **II.A.1. Efectos Presinapticos de la Desnervacion**

El corte del nervio provoca una serie de reacciones histometabolicas en el cuerpo celular de la neurona y en las dendritas: disolucion de los granulos basofilos, engrosamiento del nucleolo y dispersion de la substancia de Nissl debido a la desagregacion de los grupos de ribosomas citoplasmicos y a la desgranulacion del reticulo endoplasmico rugoso. Estos procesos se inhiben si se bloquea la sintesis de RNA (por inyeccion de Actinomicina D) (Gorio, 1987). A nivel del cabo distal del nervio seccionado las reacciones metabolicas se ven acompanadas por la degeneracion de los terminales nerviosos, produciendose la interrupcion de la liberacion de la substancia neurotransmisora. No solo se interrumpe la liberacion evocada por la estimulacion de la neurona motora, sino que cesa tambien la liberacion cuantica espontanea. La liberacion espontanea evoca, a nivel postsinaptico, pequenos cambios de potencial de placa de alrededor de 1 mV de amplitud (potenciales miniatura), que como consecuencia de la desnervacion se interrumpen (Miledi y Slater, 1968). Sin

embargo, tras un corto periodo, esta actividad postsinaptica se reanuda, ya no debido a la liberacion de cuantos del neurotransmisor desde el terminal nervioso, sino de las celulas de Schwann, que ocupan el lugar vacante por la degeneracion del terminal (Birks y col., 1960; Miledi y Slater, 1970). La liberacion cuantica desde estas celulas gliales se distingue principalmente por ser de menor frecuencia que la liberacion de origen neuronal e independientes de la concentracion intra y extracelular del ion calcio.

El proceso de degeneracion neuronal puede afectar al musculo no solo por el agotamiento de los factores neuronales de putativo rol trofico sino por la formacion de productos de la degeneracion del nervio.

#### **II.A.2. Efectos Postsinapticos de la Desnervacion**

Existen extensos estudios sobre los efectos de la desnervacion en la fisiologia de la fibra muscular. Estos efectos varian segun el origen del musculo (anfibio o mamifero) y segun el tipo de fibra muscular.

Estudios realizados en fibras musculares de mamifero mostraron que con la desnervacion se produce una despolarizacion de la membrana (Ware y col., 1951; Albuquerque y col., 1971). Este fenomeno se desarrolla en apenas tres horas tras la seccion del nervio, y aun cuando el musculo es mantenido in vitro (Bray y col. 1976). Esta caida del potencial de membrana de aproximadamente 10 mV, solo se produce en la cercania (1-3mm) de la placa, mientras que en zonas mas alejadas de la fibra el potencial de reposo



se mantiene. La aplicacion de catecolaminas o de analogos permeable del AMPc anulan este efecto. Los resultados de Bray y colaboradores (1976) sugieren que las catecolaminas actuan activando la bomba electrogenica  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  via el segundo mensajero.

Aparentemente la despolarizacion de la membrana se produciria como consecuencia de la perdida de un componente electrogenico de la bomba de cationes.

En este mismo tipo de fibras la conductancia a  $\text{Na}^+$  que dispara el potencial de accion se torna resistente a la tetrodotoxina, agente que normalmente bloquea esta corriente (Redfern y col, 1970).

Por su parte las fibras lentas de los musculos esqueléticos de anfibio (Miledi y col., 1971) y de mamifero (Bondi y col., 1986), que normalmente son inexitables, desarrollan con la deservacion la capacidad de generar potenciales de accion .

La mayoria de las fibras musculares fascicas son inervadas por una sola fibra nerviosa a traves de una unica placa (Hinsey, 1934, Tiegs, 1953). Si se implanta un nervio en la vecindad del musculo, este no puede crear una coneccion viable (Elsberg, 1917). Al ser desnervadas las fibras adquieren la capacidad de aceptar nuevas inervaciones de nervios vecinos o incluso de nervios implantados, que resultan estructural y funcionalmente normales (Miledi, 1962; Guth y Zalewski, 1963). Si se realizan desnervaciones parciales de los musculos puede observarse que los terminales correspondientes a fibras nerviosas intactas envian ramificaciones (sproutings) hacia las placas

desnervadas (Brown e Ironston, 1978).

Uno de los fenomenos desnervatorios mas generalizados y por ende muy extensamente estudiado es la hipersensibilidad a la acetilcolina (Cangiano, 1985).

En la fibra muscular normalmente inervada las moleculas receptoras del neurotransmisor tienen un patron de distribucion especifico (Miledi, 1960). Existe una alta concentracion de receptores en la placa sinaptica, mientras que a 100-200  $\mu\text{m}$  de la misma, la densidad es alrededor de tres ordenes de magnitud menor y a 400  $\mu\text{m}$  de la placa no puede registrarse ninguna respuesta a la aplicacion de acetilcolina; la densidad de receptores vuelve a crecer en la union de las fibras musculares con el tendon (Katz y Miledi, 1964).

Con la desnervacion se mantiene la alta concentracion de receptores en la placa, extendiendose la zona de alta densidad hacia areas perisinapticas (Axelson y Thesleff, 1959) y luego de un tiempo de desnervacion toda la membrana de la fibra muscular se torna sensible a la molecula transmisora debido a la aparicion de receptores a la acetilcolina en toda la membrana muscular (Thesleff, 1960; Bekoff y Betz, 1977).

Todos los cambios postdesnervatorios mencionados no resultan de la simple desregulacion de las estructuras existentes en la fibra muscular, sino que son cambios que requieren de la sintesis 'de novo' de proteinas (Thesleff, 1973). Gran parte de estas modificaciones revierten cuando el musculo es reinervado (Edwards, 1979).

### **II.A.3. Estudios sobre la Etiologia de los Fenomenos**

#### **Desnervatorios Postsinapticos**

Existen dos hipotesis contrapuestas centrales para explicar la etiologia de los fenomenos desnervatorios a nivel postsinaptico:

- i) que estos devienen de la interrupcion del patron de actividad electrico/mecanico que el nervio le impone al musculo;
- ii) que la funcion trofica esta ejercida por sustancias quimicas liberadas al espacio sinaptico.

La lectura de la vasta revision realizada por McArdle (1983) da cuenta del rompecabezas que conforman los datos extraidos de experimentos que intentan avalar una u otra teoria para distintos fenomenos postdesnervatorios.

Si analizamos los resultados de los experimentos que se realizaron para investigar los factores que modulan la distribucion de receptores colinergicos en la membrana postsinaptica tendremos un buen ejemplo del estado actual del conocimiento en materia de trofismo.

#### **En favor de la hipotesis i):**

Lomo y Westgaard (1975) observaron que la hipersensibilidad postdesnervatoria a la acetilcolina puede ser revertida aplicando al musculo un patron de estímulos con una frecuencia minima determinada. De estas observaciones se desprende que la actividad del musculo es capaz de modular la distribucion de receptores.

Otra linea de experimentos que contribuye a sustentar la

importancia trofica de la actividad muscular es la desarrollada por Lavoie y colaboradores (1976). Ellos comprobaron que la paralisis de un musculo esquelético de rata, producida por aplicacion local de tetrodotoxina al nervio, provoco un aumento en la fijacion de  $\alpha$ -Bungarotoxina en estos musculos. El experimento incluye los controles necesarios para comprobar que la capsula no produce constrenimiento del nervio ni bloquea el transporte axoplasmico, sino que su efecto se debe a un efectivo bloqueo de la propagacion del potencial de accion en el nervio. Sin embargo, al comparar este efecto con el producido por la desnervacion cronica (por corte del nervio) del musculo se observo que la paralisis inducida por tetrodotoxina produjo un aumento en el numero de receptores significativamente menor que el producido por la desnervacion.

#### **En favor de la hipotesis ii)**

Experimentos realizados por Miledi (1960) aprovechando rasgos fisiologicos distintivos del musculo sartorio del anfibio aportan evidencias en favor de la hipotesis trofica. La mayoria de las fibras del musculo sartorio poseen dos placas neuromusculares, por lo que puede practicarse una desnervacion parcial de estas fibras (desnervacion de una de las dos placas). El corte de uno de los aferentes nerviosos no impide que se produzca la transmision de impulsos desde la zona innervada hacia el resto de la fibra muscular. Miledi (1960) observo que aun cuando los musculos parcialmente desnervados continuaron manteniendo su

actividad contractil, la zona desnervada desarrollo hipersensibilidad a la acetilcolina.

En coincidencia con la hipótesis que postula que el nervio actúa como un reservorio de sustancia(s) trófica(s) responsable(s) de modular las propiedades de la célula muscular, se observó que la latencia de los procesos desnervatorios puede ser regulada por el largo del cabo distal: cuanto más largo es el cabo distal mayor es la latencia y viceversa (Luco y Eyzaguirre, 1955, Uchitel y Robins, 1978). Estos resultados tienen su correlato en las observaciones realizadas por Miledi y Slater (1970) que determinaron que el retardo con que se interrumpe la transmisión sináptica basal, desde el tiempo del corte del nervio, depende en forma directamente proporcional del largo del cabo distal.

Dado que la actividad neuromuscular es abolida tanto en las desnervaciones distales como proximales, estos resultados pretenden ser utilizados como prueba de que la actividad no juega ningún rol en la modulación de las propiedades del músculo.

Por su parte, Thesleff (1960) mostró que la aplicación de toxina botulínica a un músculo esquelético de gato causó la aparición de sensibilidad a acetilcolina a lo largo de la membrana de la fibra muscular, siendo este efecto similar al obtenido por la desnervación crónica del músculo. La toxina botulínica es un bloqueante de la liberación cuántica de acetilcolina y se ha mostrado que no afecta la ultraestructura del terminal sináptico (Thesleff, 1960).

Estos resultados indicarian que no es necesario que se produzca la degeneracion del nervio para que se produzca el fenomeno postdesnervatorio, alcanzaria con interrumpir la transmision sinaptica para lograrlo. Johns y Thesleff (1961) utilizaron la tecnica introducida por Tower en 1937, quien logra inactivar las neuronas motoras mediante su aislamiento de toda aferencia a nivel de la medula. Esta maniobra evita la transmision de potenciales evocados pero no inhibe la liberacion cuantica espontanea. Su ejecucion no genero hipersensibilidad a la acetilcolina, por lo que Thesleff concluye que la aplicacion de toxina botulinica causa el fenomeno desnervatorio por privar al musculo del neurotransmisor. La liberacion cuantica espontanea seria suficiente para mantener el trofismo muscular.

#### **En favor de la interaccion entre i) y ii)**

Cangiano y colaboradores (1984) realizaron una serie de experimentos que apuntaron a examinar el efecto combinado de la actividad y de factores quimicos. Aprovechando el patron de inervacion del musculo soleo y extensor digitorum longus de la rata, estos investigadores estudiaron el efecto de la desnervacion, cuando solo desnervaban parte de las fibras de este musculo. Ellos observaron sensibilidad normal en las fibras inervadas e hipersensibilidad en las desnervadas. Al paralizar el nervio intacto, mediante el bloqueo de la transmision de senales electricas a lo largo de los axones (por aplicacion de tetrodotoxina), las fibras inervadas adquirieron una hipersensibilidad similar a la de las fibras desnervadas del mismo musculo. Sin embargo, la paralisis por

si misma, sin la transeccion de parte de los nervios, no fue capaz de producir hipersensibilidad.

Estos experimentos pueden ser comparados con los experimentos de Lomo y Westgaard en tanto que la contraccion de las fibras inervadas produjeron la contraccion del musculo, en forma analoga a la accion de un electrodo implantado en el musculo. Mientras Lomo y Westgaard observaron reversion del proceso postdesnervatorio, Cangiano y colaboradores observaron que las fibras desnervadas desarrollaron hipersensibilidad a pesar de que el musculo podia aun contraerse por la accion de las fibras normalmente inervadas. Por otra parte, si la inactividad fuera el unico factor importante, el bloqueo de la transmision con tetrodotoxina deberia haber sido suficiente para promover la hipersensibilidad, y sin embargo no lo fue.

Por otra parte, los resultados electrofisiologicos de Cangiano y colaboradores parecerian contradecir a los resultados obtenidos por Lavoie y colaboradores por medios bioquimicos. Sin embargo es importante observar que los primeros estudian los musculos tras 56-72 horas de paralisis con tetrodotoxina, mientras que Lavoie y col. muestran expresamente que mientras la desnervacion es efectiva en este tiempo, la paralisis logra inducir un aumento significativo en el numero de receptores recién a partir del cuarto dia.

Cangiano y colaboradores mostraron ademas que la hipersensibilidad puede ser inducida si el musculo normalmente inervado se expone a los productos de

degeneracion de un nervio extraño (previamente transplantado en la vecindad del musculo) solo si el musculo permanece paralizado por la aplicacion de tetrodotoxina al nervio motor.

Estos resultados indicarian que para que el proceso desnervatorio estudiado se manifieste deben producirse concomitantemente inactividad + degeneracion del nervio.

A la luz de estos experimentos podria interpretarse que el nervio, durante su degeneracion, libera un factor que instala el fenomeno desnervatorio. Pero con el tiempo este factor se agota y la actividad por si misma seria capaz de revertir el fenomeno.

Se evidencia entonces que existe una suma de factores que llevan al desarrollo del fenomeno desnervatorio en que la inactividad y factores neuronales determinados parecen estar interactuando en el tiempo.



## II.B. FIBRAS MUSCULARES LENTAS DE ANFIBIO

Los musculos esqueléticos se componen de diferentes tipos de fibras. Los dos tipos principales son las fibras musculares lentas o tónicas, y las fibras rápidas o fásicas. Las fibras lentas poseen características morfológicas, histoquímicas, eléctricas, mecánicas y de innervación que las diferencian del tipo fásico.

Las fibras musculares lentas fueron reconocidas primero en los anfibios, y es justamente en esta especie donde se realizaron la mayor cantidad de estudios (Morgan y Proske, 1984).

Al microscopio electrónico las fibras lentas se distinguen por poseer miofibrillas poco definidas, con bandas Z en forma de zigzag y no poseer bandas M en el centro de las bandas A (Peachey y Huxley, 1962).

La porción subsináptica de las fibras lentas no muestra los característicos pliegues subsinápticos (Verma y Reese, 1984) observables en las fibras fásicas, y el terminal sináptico tiene una estructura fina en forma de racimo ('en grappe'). La concentración de acetilcolinesterasa asociada a la placa es menor que en las fibras fásicas (Verma y Reese, 1984; Fedorov y col., 1982). Los nervios que llegan a las fibras lentas son generalmente de menor calibre que los que inervan a las fibras rápidas y tienen una baja velocidad de conducción, (2-8m/sec) (Kuffler y Vaughan Williams, 1953; Verma y Reese, 1984). Al microscopio electrónico pudo observarse que los terminales presinápticos, yuxtapuestos a

las placas de fibras lentas, muestran zonas activas de liberacion de mucho menor tamano que las observadas en el caso de las fibras fascicas y cuya organizacion es mucho menos regular (Verma y Reese, 1984).

Desde un punto de vista histoquimico las fibras lentas se caracterizan por poseer un perfil que refleja un bajo nivel metabolico, que es consistente con la baja velocidad de contraccion y asociado con la alta eficacia del proceso contractil de este tipo de fibras. Se observo que las fibras lentas poseen un menor numero de mitocondrias (Verma y Reese, 1984) y un bajo nivel de actomiosina ATPasa y de la ATPasa activada por  $K^+$  (Engel e Irwin, 1967) en comparacion con las fibras rapidas .

Estudios electrofisiologicos (Kuffler and Vaughan-Williams, 1953; Burke and Ginsborg, 1956; Stefani and Steinbach, 1969;) muestran que las fibras lentas pueden ser facilmente distinguibles por poseer una prolongada constante de tiempo (100-1000 msec), que deriva de una alta resistencia de membrana (2-20M $\Omega$ ), siendo su capacidad levemente menor que la mostrada por las fibras fascicas. Stefani y Steinbach (1969) mostraron que la resistencia de membrana es modulable por la concentracion extracelular de  $Ca^{++}$ . Al aumentar la concentracion de este cation divalente aumenta la resistencia membranar. Estas fibras tienen una larga constante de espacio (1000mm) (Stefani y Steinbach, 1969; Gilly y Hui, 1980b).

Al igual que las fibras fascicas, la membrana de las fibras

tonicas, en reposo, se comporta como un electrodo de  $K^+$ : su potencial es proporcional a la concentracion extracelular de  $K^+$ .

Ante impulsos despolarizantes de amplitud creciente estas fibras se despolarizan en forma gradual, sin producir respuestas regenerativas del tipo del potencial de accion. Gilly y Hui (1980a) en un estudio de fijacion de voltaje mostraron que la despolarizacion activa, en las fibras lentas, una corriente saliente de  $K^+$  del tipo del rectificador retardado, pero no se registra ninguna corriente entrante. Esto indica que la despolarizacion no activa la clasica corriente de  $Na^+$ , responsable del disparo del potencial de accion. No se sabe aun si el canal de  $Na^+$  activado por voltaje esta ausente en la membrana o esta presente en una forma constitutivamente inactiva.

Miledi y colaboradores (1971) demostraron que las fibras lentas adquirian, tras la desnervacion, la capacidad de producir potenciales de accion. De esto se infiere que la inevitabilidad de las fibras lentas esta regulada por la neurona motora que la inerva.

Kuffler y Vaughan Williams (1953) mostraron que ante la estimulacion del nervio las fibras lentas respondian con potenciales compuestos. Esto puso en evidencia que las fibras lentas, a diferencia de las rapidas, eran poliinervadas. Orkand y colaboradores (1978) estudiaron el patron de distribucion de los receptores colinergicos en las fibras lentas mediante el binding de  $\alpha$ -bungarotoxina marcada con fluorescencia, y confirmaron la sugerencia anterior.

Ellos pudieron observar que en las placas de las fibras lentas los receptores se agruparon en forma de racimos, irregularmente a todo lo largo de la fibra. Este estudio histoquímico confirmó que las fibras lentas posee varios sitios de inervación.

La poliinervación de la fibra lenta permitiría activar el sistema contráctil en diferentes puntos de la fibra muscular y de esta manera se compensaría la falta del mecanismo para generar la propagación regenerativa de las señales.

La liberación cuántica espontánea o evocada produce en las fibras lentas potenciales de placa que resultan más lentos (mayor tiempo de subida y caída), y de menor amplitud que los registrados en fibras rápidas (Miledi y Uchitel, 1981; Fedorov y col., 1982; Uchitel y Miledi, 1987).

Estudios de análisis de ruido inducido por el transmisor acetilcolina, permitieron observar que el canal asociado al receptor postsináptico en las fibras lentas es un canal más lento que el registrado en fibras rápidas y de menor conductancia (Miledi y Uchitel, 1981; Fedorov y col., 1982). Miledi y Uchitel (1981) hallaron que estas características del canal pueden explicar las características de los potenciales de placa registrados en este tipo de fibras. Sin embargo, Fedorov y colaboradores (1982) sostienen que las características del canal solo pueden explicar en parte la cinética de los potenciales de placa y debería existir un factor adicional que prolonga la acción del neurotransmisor. Los autores sugirieron que en la sinapsis de las fibras lentas existen condiciones favorables para la unión

repetitiva de la molecula de acetilcolina al receptor.

Las características mecanicas de las fibras lentas constituyen un rasgo distintivo respecto de las fibras rapidas. Ante un estimulo despolarizante de larga duracion las fibras lentas son capaces de mantener la contraccion durante el periodo que dure el impulso.

Ademas, estas fibras pueden producir un gran rango de intensidades de tension, dependiendo de la frecuencia de disparo de la neurona motora (Kuffler and Vaughan Williams, 1953, Lannergren, 1979).

Kuffler y Vaughan Williams (1953) sugieren que el rol funcional de las fibras lentas seria el de mantener la actividad postural gracias a su capacidad de mantener contracciones prolongadas que pueden ser gradualmente ajustadas. Esta propiedad mecanica esta relacionada con las características electricas de la membrana plasmatica que le permite despolarizarse gradualmente y no a traves de respuestas del tipo todo o nada.

Al igual que en el caso de las fibras rapidas, las despolarizaciones producen un aumento en la concentracion intracelular de calcio que no depende del reservorio extracelular. El transiente de calcio en las fibras tonicas tiene un patron temporal lento que podria ser responsable del curso temporal del desarrollo de la tension y de la relajacion en este tipo de fibra (Miledi y col., 1981).

Las fibras lentas de anfibio resultan de interes en el estudio de la interaccion trofica nervio-musculo debido a

que siendo incapaces de generar respuestas regenerativas cuando estan normalmente innervadas, adquieren dicha propiedad al ser desnervadas (Miledi y col., 1971). Con cierto retardo luego de la ablacion del nervio, las fibras lentas comienzan a producir potenciales de accion al ser estimuladas. Dichos potenciales de accion son de mayor duracion y de subida mas lenta que los potenciales de accion en fibras rapidas (Miledi y col., 1971). Los potenciales de accion de las fibras lentas al igual que el de las fibras rapidas, pudieron ser bloqueados por tetrodotoxina (un bloqueante especifico de los canales de  $\text{Na}^+$  activados por voltaje) o reemplazando el  $\text{Na}^+$  extracelular por Tris o  $\text{Ca}^{++}$  (Miledi y col., 1971). Estos resultados indicarian que el potencial de accion en las fibras lentas desnervadas tambien se genera por un aumento en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$ , via la activacion de los canales de  $\text{Na}^+$  activados por voltaje. La desnervacion podria actuar desbloqueando la activacion de estos canales, si estos se hallaren constitutivamente inactivos, o induciendo la sintesis de novo de la proteina canal, en caso de no encontrarse estos en la membrana de las fibras lentas normalmente innervadas membrana. La regulacion de la excitabilidad de las fibras de tipo lento constituye un excelente modelo para estudiar los mecanismos involucrados en la modulacion neurotrofica por las siguientes razones:

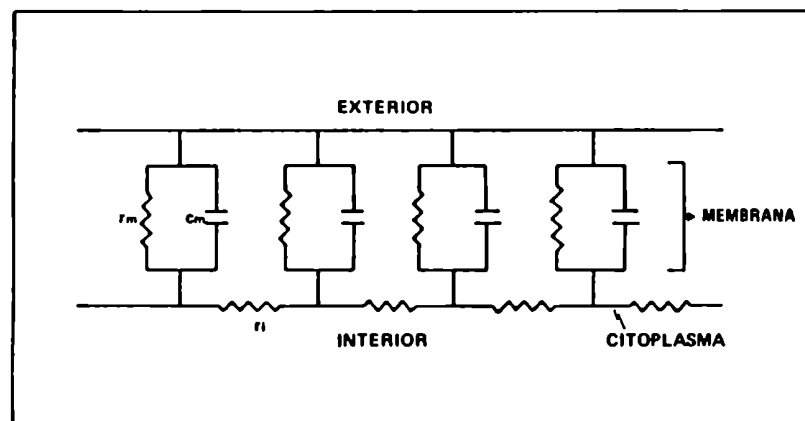
- i) el potencial de accion es un fenomeno todo o nada que es inequívocamente registrable por metodos de electrofisiologia clasica.
- ii) la inexcitabilidad de las fibras lentas se basa en la

carencia absoluta de expresion funcional de una proteina altamente caracterizada como es el canal de  $\text{Na}^+$  activable por voltaje.

## II.C. PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LA MEMBRANA MUSCULAR

### II.C.1. Teoría del Cable

La fibra muscular fue homologada, por su estructura y sus propiedades de conducción con un cable unidimensional (Katz, 1949). Este puede ser visualizado como una membrana



**FIGURA 1. Circuito Equivalente de la Membrana.**  
Cada unidad de longitud de la fibra muscular es un circuito con su resistencia y su capacidad. Estos circuitos están conectados entre sí por la resistencia del medio intracelular. El medio extracelular es considerado de resistencia virtualmente nula.

$r_m$  resistencia membranal por unidad de longitud.

$c_m$  capacidad membranal por unidad de longitud.

$r_i$  resistencia intracelular por unidad de longitud.

cilíndrica con un área de sección transversal constante, que rodea al líquido intracelular. Se asume que la impedancia del medio intracelular puede ser representada como una resistencia ohmica y que el gradiente no axial de voltaje



resulta despreciable. La membrana tiene una alta resistencia de fuga y una gran capacidad por unidad de superficie (Hodgkin y Rushton, 1946). El circuito equivalente de este cable es el que se representa en la Figura 1.

Las ecuaciones que describen este circuito equivalente fueron desarrolladas por Hodgkin y Rushton (1946) y predicen los cambios de potencial transmembranal ocasionados por la inyeccion de un pulso de corriente a traves de la membrana plasmatica como funcion del tiempo y de la posicion.

La ecuacion general que describe las propiedades pasivas del musculo esquelético, asimilable a un cable unidimensional es:

$$\Delta V_m = -\tau \frac{\partial V_m}{\partial t} + r^2 \frac{\partial^2 V_m}{\partial x^2} \quad (1)$$

$\Delta V_m$  : el cambio del potencial transmembranal.

$x$  : la posicion medida desde el punto de inyeccion de corriente.

$t$  : el tiempo, medido desde el momento en que comienza a inyectarse la corriente.

$r$  : constante de atenuacion espacial =  $\sqrt{r_m/r_i}$ .

$\tau$  : constante de tiempo de la membrana =  $r_m \cdot c_m$ .

$r_i$  : la resistencia intracelular por unidad de longitud.

$r_m$  : la resistencia transmembranal por unidad de longitud.

$c_m$  : la capacidad de la membrana por unidad de longitud.

En el analisis matematico ulterior se asume que  $r_m$  y  $c_m$  tienen valores constantes.

La ecuacion (1); en estado estacionario ( $\partial V_m / \partial t = 0$ ) deviene en:

$$\Delta V_m = r^2 \frac{d^2 V_m}{dx^2} \quad (2)$$

y su solucion mas general es de la forma:

$$\Delta V_m = A e^{-x/r} + B e^{+x/r} \quad (3)$$

Para el caso de un cable infinito ( $r \ll L$ ) ( $L$ =longitud del cable) debe satisfacerse la condicion que  $x \rightarrow \infty$ ,  $V_m \rightarrow 0$ , por ello  $B=0$ , y la ecuacion resulta:

$$\Delta V_m = A e^{-x/r} \quad (4)$$

Si aplico una corriente de amplitud constante  $I_0$  en el punto  $x=0$  en el medio de la fibra y considerando que  $\Delta V_m / x = -r_i \cdot I_0$

$$A = I_0 r_i r \quad (5)$$

y

$$\Delta V_m = \frac{I_0}{2} r r_i e^{-x/r} \quad (6)$$

Esta es la solucion para el hemicable derecho. El hemicable izquierdo tendra, por simetria, un comportamiento igual.

La ecuacion (6) describe la atenuacion espacial que sufre  $V_m$  debido a las fugas a traves de la membrana plasmatica. Estas fugas hacen que a una distancia de  $5r$  del punto de

inyeccion  $V_m$  haya caido aproximadamente a su valor asintotico (valor 0).

La resistencia equivalente de entrada de la fibra se define como:

$$R_i = \Delta V_m_{(x=0, t \rightarrow \infty)} / I_0 \quad (7)$$

Si analizamos la ecuacion (1) en funcion del tiempo y de la posicion la solucion que esta adopta es:

$$\Delta V_m = \frac{I_0}{4} r_i \Gamma \left[ e^{-x/r} \operatorname{erfc} \left( \frac{x/r}{2\sqrt{t/r}} \right) - e^{x/r} \operatorname{erfc} \left( \frac{x/r}{2\sqrt{t/r}} \right) \right] \quad (8)$$

donde  $\operatorname{erfc}$  es la funcion error complementaria =  $1 - \operatorname{erf}$ , siendo  $\operatorname{erf} = \frac{2}{\pi} e^{-x^2/2}$

En el punto  $x=0$  la funcion se simplifica a:

$$\Delta V_m = \frac{I_0}{2} r_i \Gamma \operatorname{erf} \sqrt{t/r} \quad (9)$$

Esta ecuacion muestra que segun la teoria del cable la diferencia de potencial aumenta con el tiempo desde la iniciacion del pulso de corriente de acuerdo a una funcion error.

Esto se diferencia del cambio de potencial en un circuito RC simple (soma neuronal, por ejemplo) en que el aumento del potencial con el tiempo sigue una funcion exponencial.

En el caso del cable infinito, tras un tiempo equivalente a

$r$  se alcanza el 84% del cambio de potencial ( $\text{erf}1=0.84$ ), mientras que en el caso de del circuito RC simple se alcanza el 63% del cambio de potencial ( $e^{-1}=0.63$ ).

### II.C.2. Cable Corto

El modelo del cable infinito es un caso particular de la teoria del cable. En la naturaleza existen casos intermedios entre sistemas analogables a un circuito RC simple y el cable infinito. Estos son los cables de dimensiones finitas, osea en los que no se cumple que  $r \ll L$ . En estos casos no es valido asumir que  $B=0$  como se hizo al obtener la ecuacion (4). Los extremos de los cables finitos funcionan como un circuito abierto mas alla de los cuales no se propaga la corriente. Esta retorna una y otra vez al chocarse con los extremos. Esto resulta equivalente a tener un cable infinito con un infinito numero de fuentes de corriente a  $x=0, 2L, 4L$ , etc y a  $x=-2L, -4L$ , etc. El cambio de voltaje estara descrito por la superposicion de los cambios de potencial producidos por cada una de las fuentes de corriente. Cuanto menor es la relacion  $r/L$  menor sera el "numero de fuentes" que aporten una intensidad de corriente significativa. Stefani y Steinbach (1969) utilizaron el metodo grafico de superposicion para calcular como cambia  $V$  en el caso de cables finitos. A partir de los resultados obtenidos construyeron la curva que relaciona cual es el porcentaje del cambio de potencial que se alcanza en un tiempo equivalente a la constante de tiempo de la membrana, con el cociente  $r/L$ .

La tecnica con que actualmente se miden las propiedades pasivas de la membrana de una fibra muscular, siguiendo la teoria del cable, es el registro con microelectrodos intracelulares. Mediante un microelectrodo se inyectan pulsos rectangulares de corriente, de amplitud y duracion controlables, y con un segundo electrodo, ímpalado en la misma fibra, se registran los cambios de potencial que se ocasionan (en el Capitulo III se especifica como se realizan las mediciones).

### **II.C.3. Valor Fisiologico de las Propiedades Pasivas de la Membrana**

La medicion de las propiedades pasivas de la membrana de celulas excitables tiene como objetivo el poder describir el curso temporoespacial de los cambios de potencial transmembranal, que constituyen la senal fisiologica utilizada por este tipo de celulas. La homologacion a circuitos electricos y la utilizacion de los modelos matematicos ya desarrollados para tales sistemas permite predecir el comportamiento electrofisiologico de estas celulas.

El componente lipidico de la membrana constituye una barrera infranqueable para el movimiento de agua y iones a traves de la misma. El pasaje de estos se realiza a traves de proteinas transmembranales, que cumplen el rol de canales especificos para el transporte de las distintas especies ionicas. Esto garantiza un intercambio ionico controlado. La resistencia transmembranal es el parametro electrofisiologico que expresa la restriccion que imponen

los canales al intercambio ionico, y puede ser clasificada en un componente pasivo (de reposo) y un componente activo. Mientras que la resistencia transmembranal activa se debe a la presencia en la membrana plasmatica de canales ionicos cuyo comportamiento depende de factores tales como la diferencia de potencial de membrana o de ligandos especificos, la resistencia transmembranal pasiva se debe a canales cuyo comportamiento es independiente de tales factores.

La capacidad de conduccion electrotonica pasiva de senales a lo largo de la celula excitable depende directamente de la resistencia transmembranal e inversamente de la resistencia intracelular. La constante de atenuacion espacial ( $\sqrt{r_m/r_i}$ ) indica el grado de atenuacion que sufrira una senal electrotonica a lo largo de la celula, debido a las fugas que puedan producirse a traves de la membrana. Esta constante es de importancia en la sumacion espacial de las senales recibidas por la fibra, puesto que cuanto mayor sea su valor, menor sera la atenuacion, y mayor la posibilidad que senales simultaneas recibidas en distintos puntos de la membrana se sumen.

Muchos procesos fisiologicos dependen del movimiento de iones especificos a traves de la membrana (potencial de accion, proceso de liberacion del neurotransmisor, etc). La densidad del flujo ionico depende de la permeabilidad de la membrana al ion y del potencial electroquimico de este (dependiente de las concentraciones intra y extracelulares del mismo). Tales procesos fisiologicos se activan por la apertura o cierre de canales especificos por accion directa

de ligandos o por cambios en el potencial de membrana, osea afectando el componente activo de la resistencia transmembranal.

El caracter aislante de la bicapa lipidica que separa dos medios altamente conductores, como son los medios intra y extracelular le confieren a la membrana su propiedad capacitiva. En el circuito equivalente el capacitor membranial se halla en paralelo con la resistencia membranial. Esta propiedad capacitiva introduce un termino que retarda el curso temporal de los cambios de potencial transmembranial. La constante de tiempo ( $R_m.C_m$ ) de la membrana es el parametro que cuantifica el curso temporal de los cambios de potencial. La propiedad de la membrana de sumar senales electricas en el tiempo esta intimamente ligado a este parametro. En membranas con constantes de tiempo prolongadas los cambios de potencial tienen cursos temporales lentos y por ello facilitan que se produzca la sumacion temporal de senales que llegan con cierto retardo unas respecto de otras, a nivel postsinaptico.

Las propiedades pasivas de la membrana afectan directamente la excitabilidad de la celula, ya que determinan la capacidad de la membrana de alcanzar el umbral de disparo del potencial de accion, e incluso afectan al umbral mismo. El valor del potencial umbral resulta de una competencia entre la corriente entrante de  $Na^+$  (producida por la apertura de canales de Na activados por el voltaje) y la corriente de fuga que depende directamente de la resistencia

transmembranal pasiva. Un decremento en la resistencia transmembranal pasiva implicaria un aumento en la corriente de fuga lo que ocasionaria un corrimiento del umbral a valores mas despolarizados. Ademas, un decremento en la resistencia hace que la membrana se despolarice menos ante la inyeccion de un mismo pulso de corriente.

De las consideraciones desarrolladas en este capitulo se desprende la importancia de correlacionar los cambios en las propiedades activas de las fibras lentas, con las propiedades pasivas de las mismas.



## II.D. MECANISMO MOLECULAR DEL POTENCIAL DE ACCION

La excitabilidad de las neuronas y las fibras musculares esta determinada por el componente activo de su resistencia transmembranal. Existen en las celulas excitables canales ionicos, activables por voltaje, cuya cinetica es responsable del desarrollo del potencial de accion. Mediante la tecnica de fijacion de voltaje con tres microelectrodos intracelulares, Adrian y colaboradores (1970) estudiaron las corrientes ionicas asociadas al potencial de accion en las fibras musculares esqueléticas de anfibio.

Ellos observaron que ante la despolarizacion de la membrana se producía una corriente temprana entrante con un potencial de reversion cercano al potencial de equilibrio del  $\text{Na}^+$ , que era abolida por Tetrodotoxina (TTX). Con cierto retardo respecto del inicio de la corriente entrante se observo una corriente saliente de  $\text{K}^+$ , bloqueable por Tetraetilamonio (TEA). A diferencia de lo observado en el axon gigante de calamar, esta corriente tardia de  $\text{K}^+$  (el rectificador retardado) se inactiva en un tiempo relativamente corto (Standford, 1970).

Adrian y Peachey (1973) mostraron que las membranas que componen el sistema tubular tambien poseen los canales asociados con el potencial de accion.

La corriente entrante de  $\text{Na}^+$  responsable de la despolarizacion inicial que da lugar al potencial de accion se ocasiona por la apertura de canales de Na que son

sensibles al voltaje. Existe una gran fuerza electromotriz para la corriente de sodio dada por la diferencia entre el potencial de equilibrio del  $\text{Na}^+$  y el potencial de reposo de la membrana.

La activación del canal de Na conforma un fenómeno de retroalimentación positiva: la despolarización de la membrana induce la activación del canal que resulta en una mayor despolarización, y así sucesivamente.

La interrupción de este ciclo está dada por dos fenómenos. Uno intrínseco del canal de Na y otro asociado con la activación del canal de K activado por voltaje. El canal de Na una vez activado por el voltaje se inactiva con el tiempo, extinguiéndose así la corriente entrante; la activación del canal de K tiende a repolarizar la membrana a su valor de reposo.

#### **II.D.1. El Canal de $\text{Na}^+$ Activado por Voltaje.**

La apertura de los canales de sodio se produce por un cambio conformacional de la proteína canal. La despolarización de la membrana implica un cambio en el campo eléctrico de la membrana que produce un aumento en la probabilidad de apertura del canal (Catterall, 1986).

El mecanismo subyacente en este fenómeno puede estar dado por la existencia de residuos cargados de la molécula canal, expuestos al campo eléctrico intramembranal. Un cambio en este campo eléctrico podría modificar el ordenamiento de las cargas de la molécula, disminuyendo la barrera de energía potencial existente entre el estado abierto y el estado cerrado del canal (Hille, 1984).

La existencia de este movimiento de cargas intramembranal, asociado con la activación del canal de  $\text{Na}^+$ , ha sido evidenciado por la medición de corrientes capacitivas (corrientes de compuerta) asociadas con la activación de este canal en el axón gigante de calamar (Armstrong y Bezanilla, 1973). Estas corrientes son salientes y constituyen solo 0.3% de la corriente de  $\text{Na}^+$  durante el potencial de acción. Los autores asocian esta corriente capacitiva con el movimiento de carga asociado con la activación del canal.

Con la inactivación no se observan corrientes de compuertas. Este fenómeno no parece depender del voltaje, sino que se produciría secuencialmente después de la activación (Catterall, 1986).

La farmacología de este canal es de particular utilidad ya que se hallaron drogas de alta especificidad capaces de actuar sobre distintos aspectos de la fisiología del canal. La tetrodotoxina y la saxitoxina actúan específicamente bloqueando el paso de  $\text{Na}^+$  a través del poro del canal; la veratridina y batracotoxina actúan bloqueando el mecanismo de inactivación causando la activación persistente del canal (Catterall, 1980).

La molécula canal se compone de tres polipeptidos alfa, beta 1 y beta 2. La subunidad alfa es una proteína transmembranal que está glucosilada en la porción expuesta al espacio extracelular (Messner y Catterall, 1985). La porción intracelular tiene cuatro sitios de fosforilación, que son el blanco de la proteína quinasa dependiente del cAMP (Costa

y Caterall, 1984). Las subunidades beta 1 y beta 2 estan expuestas a la superficie extracelular y estan altamente glucosiladas (Messner y Caterall, 1985).

La TTX se une a la porcion extracelular de la subunidad alfa. La inactivacion parece estar controlada por componentes de la molecula que se hallan localizados en la porcion intracelular ya que la perfusion del interior del axon gigante de calamar con pronasa (mezcla de enzimas proteoliticas) bloquea la inactivacion del canal de sodio (Rojas y Armstrong, 1971).

### **Capitulo III**

#### **MATERIALES Y METODOS**

### **Animales**

Los estudios fueron realizados en sapos (*Bufo Arenarum*) recogidos en la provincia de Buenos Aires durante la estacion de verano y otono. Estos eran mantenidos en el laboratorio, en cajas plasticas (hasta 5 sapos por caja) conteniendo un minimo nivel de agua, a temperaturas que oscilaron entre 18 y 21°C. Los animales eran conservados en el laboratorio por un periodo de hasta seis meses y no eran alimentados.

### **Soluciones**

La composicion de la solucion Ringer era, en mM: NaCl, 115; KCl, 2.5; CaCl<sub>2</sub>, 7.8; Tris (pH 7.2). Los estudios fueron realizados utilizando una solucion Ringer conteniendo 7.8mM Ca (en lugar de 1.8mM Ca) pues de esta manera se aumenta selectivamente la constante de tiempo de la membrana de las fibras lentas (Datos no mostrados; Stefani y Steinbach, 1969) y asi se incrementa la diferencia ya existente entre el  $\tau$  de las fibras lentas y rapidas.

### **Diseccion y Montado de los Musculos**

Los musculos cruralis y piriformis eran disecados y montados en camaras de Petri con base de resina (Sylgard), conteniendo solucion Ringer (ver Soluciones). El montado de los musculos se realizaba fijando el musculo a la base de resina mediante alfileres entomologicos de acero inoxidable de manera que el tejido quedara bien estirado. En el musculo cruralis los registros se realizaron en las fibras superficiales de la banda central en la cara interna

del musculo. Es en esta banda central donde se halla concentrada la poblacion de fibras lentas. Siendo este un musculo grueso, era necesario remover las fibras de la cara externa y de las capas medias para mejorar la transparencia del tejido y asi poder visualizar en la lupa las fibras musculares superficiales de la cara interna.

Para estudiar el musculo piriformis era suficiente estirar bien el tejido. Las fibras lentas de este musculo fueron halladas en la cercania de la zona de insercion del nervio.

### **Registros Electrofisiologicos**

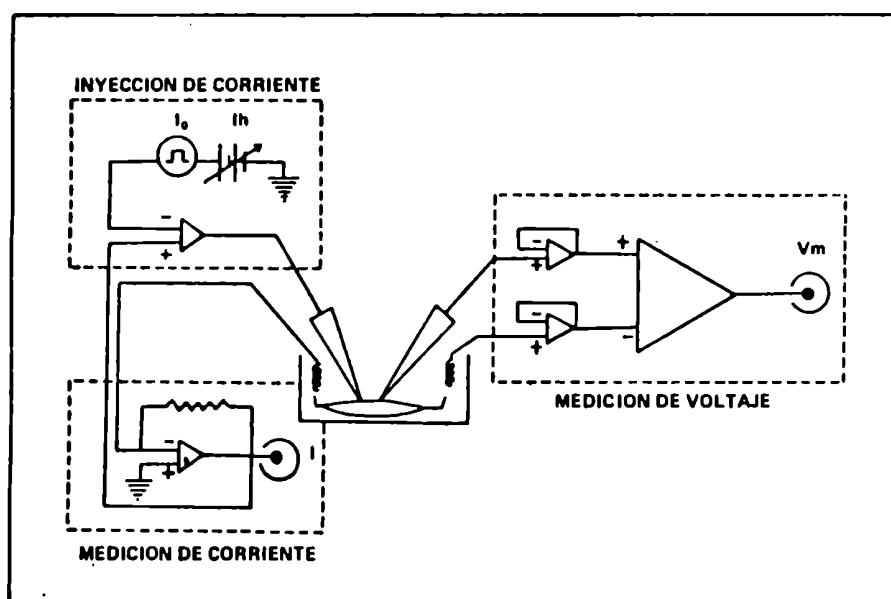
Los registros electrofisiologicos se realizaron mediante la tecnica convencional de microelectrodos intracelulares.

Las micropipetas eran construidas con capilares de vidrio con filamento (A-M System, 1.5mm.0.86mm, 4"). Los capilares eran estirados con un estirador de pipetas David Kopf modelo 700C, con una intensidad de corriente de 16A y 50 de solenoide. Las micropipetas eran llenadas con una solucion 3M de KCl. Los microelectrodos se constituian introduciendo a las micropipetas un electrodo de plata previamente clorurado. Estos microelectrodos tenian una resistencia de 10-50M $\Omega$ .

El microelectrodo utilizado para el registro intracelular de voltaje se conectaba a un osciloscopio de memoria continua Tektronix 5115 y a un voltmetro digital via un preamplificador construido en nuestro laboratorio. Un segundo electrodo construido con un alambre de plata clorurado era colocado en el bano para dar referencia del potencial del medio extracelular.

El microelectrodo utilizado para inyectar pulsos de corriente se conectaba a un estimulador Grass S8 via una unidad aisladora. El pulso de corriente inyectado era registrado via un electrodo de plata clorurada colocado en el bano conectado a un amplificador operacional FET en la configuracion amperometrica, que ademas proveia al bano de una tierra virtual.

La Figura 2 muestra un esquema del sistema de registro.



**FIGURA 2. Esquema del Sistema de Registro.**

El microelectrodo de medicion de voltaje esta conectado al osciloscopio via un amplificador diferencial, que recoge, ademas, informacion de un electrodo colocado en el bano.

El electrodo de inyeccion de corriente se conecta a un estimulador en serie con una fuente de corriente continua regulable.

La medicion de la corriente inyectada se realiza via un electrodo colocado en el bano que se conecta al osciloscopio via un amplificador operacional en configuracion amperometrica.



## **Analisis de los Registros**

Para analizar las senales de voltaje y corriente, registradas en el osciloscopio, se tomaron fotografias de la pantalla del mismo con una camara kimografica Grass y las senales fueron medidas proyectando los films sobre papel milimetrado.

El potencial de reposo de la membrana ( $V_r$ ) era medido impalando la fibra muscular con el microelectrodo de registro de potencial, bajo control visual a traves de la lupa. Se tomaba como dato el valor obtenido una vez que el registro alcanzaba un valor estable.

Para medir la resistencia de entrada de la fibra ( $R_i$ ) se inyectaba un pulso cuadrado de corriente (Fig. 3) impalando en la misma fibra un segundo microelectrodo. Este pulso de corriente producia un cambio en el potencial de la membrana que era registrado a traves del microelectrodo de registro de potencial. Se administraban pulsos tal que produjeran cambios de potencial de alrededor de 20mV, en sentido hiperpolarizante, de duracion suficiente para que la fibra alcansace un nuevo estado estacionario ( $V_m$ ) (Fig. 3).

La penetracion del segundo microelectrodo producia generalmente una perdida de potencial ocasionada por el dano. Utilizando una fuente de corriente continua la membrana era llevada a un potencial sostenido ( $V_h$ ) de -80 a -90 mV. Era a partir de este potencial que se median  $R_i$  y el resto de los parametros electricos.

En las fibras rapidas que cumplen con las condiciones establecidas para el modelo de cable infinito (Capitulo II.C), el valor de la constante de tiempo ( $\tau$ ) fue calculado

midiendo el tiempo en que la membrana alcanza el 84% del cambio de potencial producido por el pulso cuadrado de corriente (Fig. 3). Las fibras lentas no se adecuan a este modelo ya que el valor de la constante de atenuacion

### FIGURA 3. Esquema de las Mediciones Realizadas

La figura A esquematiza la respuesta (en el tiempo) de una fibra muscular ante un pulso cuadrado de corriente en sentido hiperpolarizante.

$I_0$  representa la amplitud del escalon de corriente.

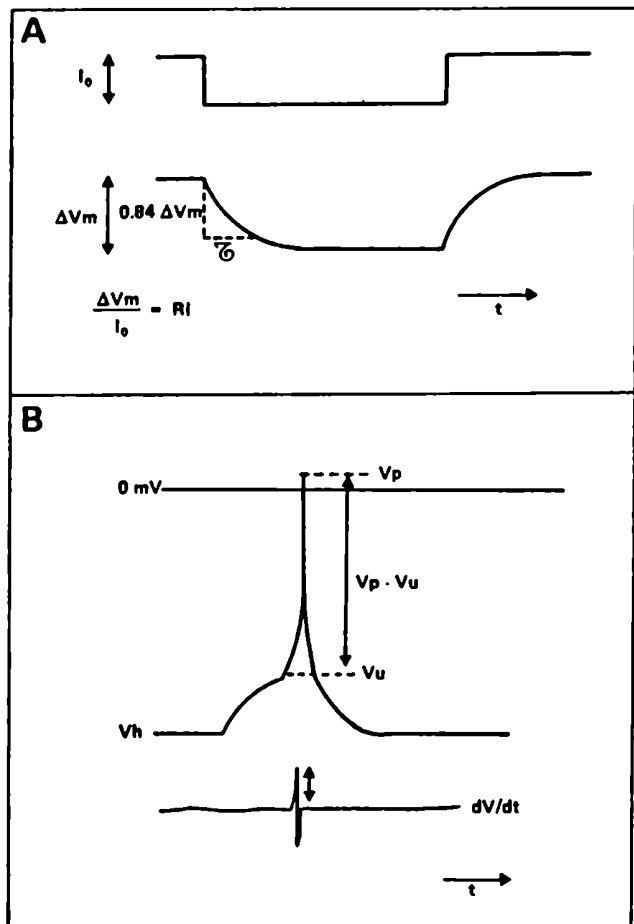
$V_m$  representa la amplitud del cambio de potencial de membrana.

$\tau$  es la constante de tiempo y se calcula midiendo el tiempo en que la membrana alcanza, en este ejemplo, el 84% del valor de  $V_m$ . Este ejemplo vale para una fibra rapida que se ajusta al modelo de cable infinito (ver texto). La resistencia de entrada de la celula ( $R_i$ ) se calcula como el cociente  $V_m/I_0$ .

La figura B esquematiza

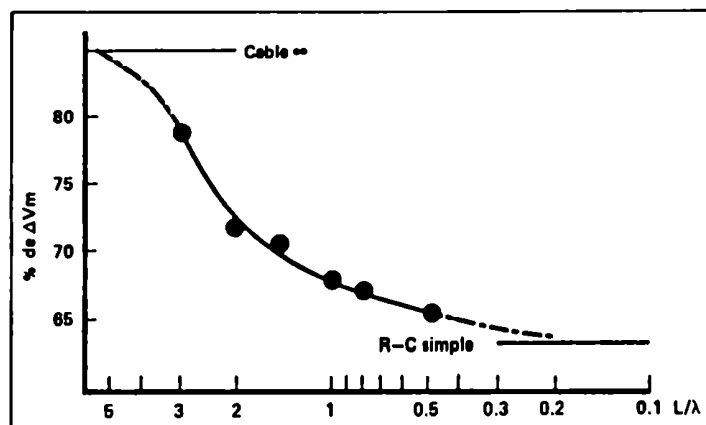
una respuesta regenerativa tipica. En ella se miden el potencial al pico ( $V_p$ ), el potencial umbral ( $V_u$ ). La amplitud de la espiga del potencial de accion se calcula como la diferencia  $V_p - V_u$ .

El trazo inferior esquematiza la derivada del cambio de potencial en el tiempo ( $dV/dt$ ). La amplitud de la derivada durante la subida de la espiga es la velocidad de subida de la espiga.



espacial ( $r$ ) de las mismas no es similar a la longitud de la fibra ( $L$ ) (Datos no mostrados; Stefani, 1969) (Capitulo

II.C). Stefani y Steinbach (1969) graficaron una curva teorica del porcentaje del cambio de potencial que debe considerarse para distintas relaciones de  $r/L$  (Fig. 4). Considerando un valor de  $r$  de 1cm (Stefani y Steinbach, 1969; Gilly y Huy, 1980) y un valor promedio de longitud para las fibras lentas del cruralis del sapo de 1.2 cm, la curva teorica trazada por Stefani y Steinbach (1969) indica considerar  $r$  como el tiempo en que se alcanza el 70% del cambio de potencial. Por lo tanto para las fibras lentas del musculo cruralis la constante de tiempo fue calculada utilizando esta relacion.



**FIGURA 4.** Relacion teorica entre el largo de la fibra muscular dividido la constante de tiempo de la misma ( $L/r$ ) y el porcentaje del cambio de potencial alcanzado cuando  $t=r$ . Los valores van del 63%, para un sistema R-C simple (esfera), a 84%, para un cable infinito.

Para evaluar la excitabilidad de la membrana de las fibras musculares, se aplicaron pulsos de corriente de amplitud creciente en sentido despolarizante. Los potenciales de accion, cuando se producian, eran caracterizados segun la

amplitud de la espiga y la velocidad de subida de la misma. Tal como se muestra en la Figura 3 la amplitud de la espiga era calculada como la diferencia entre el potencial al pico ( $V_p$ ) y el potencial umbral ( $V_u$ ). La velocidad de subida era medida a partir de la derivada del cambio de potencial en el tiempo.

### **Desnervacion**

Las desnervaciones eran realizadas en el lado derecho de los sapos, que eran previamente anestesiados por inmersión en una solución de agua y éter.

Los músculos cruralis y piriformis eran desnervados cortando el nervio ciático a la altura de la pelvis, y extrayéndose un segmento (de aproximadamente 5mm) del mismo para demorar la reinervación.

En el caso del músculo cruralis esta fue considerada una desnervación que rendía un cabo distal largo. Con el fin de obtener, además, desnervaciones con cabo distal corto, se abordó el nervio ciático a la altura de su inserción al músculo cruralis, cortando las ramificaciones del mismo que contactan con el músculo.

Las inyecciones de  $\alpha$ -bungarotoxina al músculo cruralis se aplicaron en sapos a los que previamente se les cortó el ciático a la altura de la pelvis. Se inyectaban 10  $\mu$ l de una solución 166ng/ $\mu$ l de  $\alpha$ -bungarotoxina. Para ello se realizaba una incisión en la piel del animal a la altura del muslo, que dejaba expuesta la cara externa del músculo cruralis. La inyección se aplicaba en el centro del músculo.

### **Cultivo de Organo**

La tecnica de cultivo resulta de una adaptacion de la utilizada por Harris y Miledi (1972) y Cull Candi y colaboradores (1980).

Los musculos cruralis extraidos para cultivo eran disecados en condiciones de esterilidad, en una camara de flujo laminar horizontal. Los animales eran previamente tratados sumergiendolos por 24 horas en una solucion de sulfato de gentamicina (Gibco, 1mg/100ml).

Los musculos eran montados en bloquitos de Sylgard (esterilizados en autoclave) y luego eran colocados en tubos conteniendo 10ml de medio M199 (Gibco). Los cultivos eran mantenidos en una estufa a 19°C.

El medio de cultivo era adicionado con 20mM Hepes a pH 7.4 y con 10mg/ml de sterptomycin y 10mg/ml de penicilina (Gibco).

El medio era cambiado cada cinco dias para garantizar el abastecimiento de nutrientes al musculo a todo lo largo del cultivo.

Los datos son normalmente expresados como el valor promedio mas/menos el error estandard.

Para comparar estadisticamente los valores obtenidos para un mismo parametro electrofisiologico, en dos condiciones diferentes, se aplico el test t.

## **Capitulo IV**

### **RESULTADOS EXPERIMENTALES**

#### **IV.A. CARACTERIZACION ELECTROFISIOLOGICA DE LAS FIBRAS DEL MUSCULO CRURALIS DEL SAPO**

##### **IV.A.1. Musculos Normalmente Inervados.**

Las fibras lentas o tónicas constituyen en general un bajo porcentaje de la población total de fibras de los músculos que las contienen. Dado que nuestro proyecto de trabajo incluye el estudio de fibras lentas en cultivo de órgano, fue necesario buscar un músculo que poseyera el mayor número posible de fibras lentas accesibles para el estudio con microelectrodos intracelulares. Entre los músculos que clásicamente constituyen fuentes de fibras lentas el iliofibularis del sapo solo posee una o dos fibras lentas detectables en su superficie. El músculo piriformis fue reportado como un músculo con un 70% de fibras lentas (Orkand y col., 1978), pero su posición anatómica presenta grandes inconvenientes para su utilización en cultivo de órgano. Este músculo se halla adherido al fémur y su inserción proximal se encuentra muy cerca de la cloaca del animal.

Mediante técnicas histoquímicas Gilly (1975) observó que el músculo cruralis posee un 50% de fibras lentas. El cruralis es uno de los músculos que componen el tríceps femoris. En su extremo distal se halla adherido a la rótula por un amplio tendón. El extremo proximal del músculo está constituido por un tendón cilíndrico que termina en la cadera ventral. Las fibras lentas se concentran en la banda central de la cara interna del músculo. Esta banda central

forma un triangulo con su base en el tendon distal y el vertice opuesto en el tendon proximal. Esta porcion del musculo es facilmente disecable.

El primer paso del proyecto encarado fue el caracterizar electrofisiologicamente la poblacion de fibras de la banda central de la cara interna del musculo cruralis con el fin de identificar los distintos tipos celulares que se observan y determinar si este musculo puede ser considerado una fuente adecuada de fibras lentas, utilizando esta herramienta de estudio.

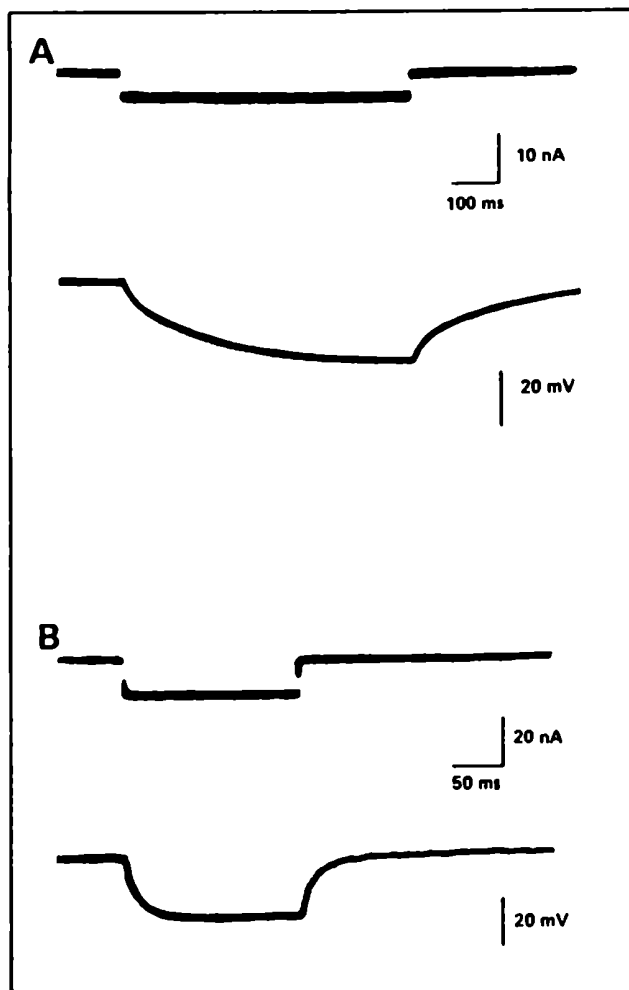
Desde un punto de vista electrofisiologico las fibras tonicas se identifican por el lento curso temporal de los cambios de potencial electrotonicos ocasionados por la inyeccion de un pulso cuadrado de corriente, su alta resistencia de membrana, y su inexcitabilidad (incapacidad de generar potenciales de accion).

El parametro que cuantifica el curso temporal del cambio de potencial es la constante de tiempo de la membrana ( $\tau$ ).

Siendo todas las fibras de la banda central del cruralis de diametro similar (por inspeccion visual al microscopio (30-50 $\mu$ m), y Fedorov y col., 1982), se cuantifico la resistencia de la membrana midiendo la resistencia de entrada ( $R_i$ ) de la fibra. La excitabilidad se determino observando la respuesta de la misma ante pulsos despolarizantes. La medicion y el analisis de todos estos parametros se realizo como se detalla en el Capitulo III. A la hora de observar la evolucion temporal de los



parametros electrofisiologicos durante el proceso desnervatorio fue importante contar con una clasificacion inequivoca de los distintos tipos de fibras existentes en la preparacion que se utiliza, para que los cambios ocasionados por la desnervacion pudiesen ser asignados al tipo celular en que se produjeron.

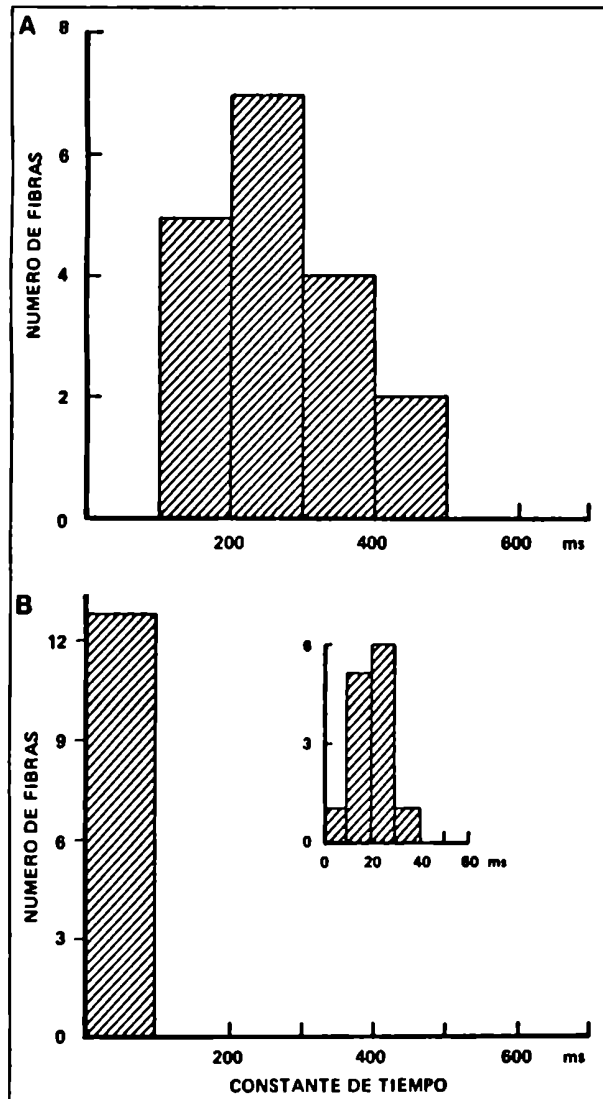


**FIGURA 5. Registros  
Tipicos de las Res-  
puestas de Fibras  
Lentas y Rapidas  
Normalmente Innerva-  
das ante Pulsos  
Hiperpolarizantes.**  
A. El trazo superior  
muestra el registro  
del pulso de  
corriente inyectado,  
y el trazo inferior  
el curso temporal  
del cambio de po-  
tencial de una fibra  
lenta.  
B. como A, en una  
fibra rapida.

#### Constante de Tiempo ( $\tau$ )

Las fibras del musculo cruralis pudieron ser clasificadas de acuerdo al curso temporal de los cambios de potencial, evocados por un pulso hiperpolarizante (Fig. 5). Un grupo de

fibras desarrollaban el cambio de potencial con un curso temporal un orden de magnitud mas lento que el otro grupo. La Figura 6 detalla la distribucion de valores de  $\tau$ , pudiendose observar la existencia de dos poblaciones bien



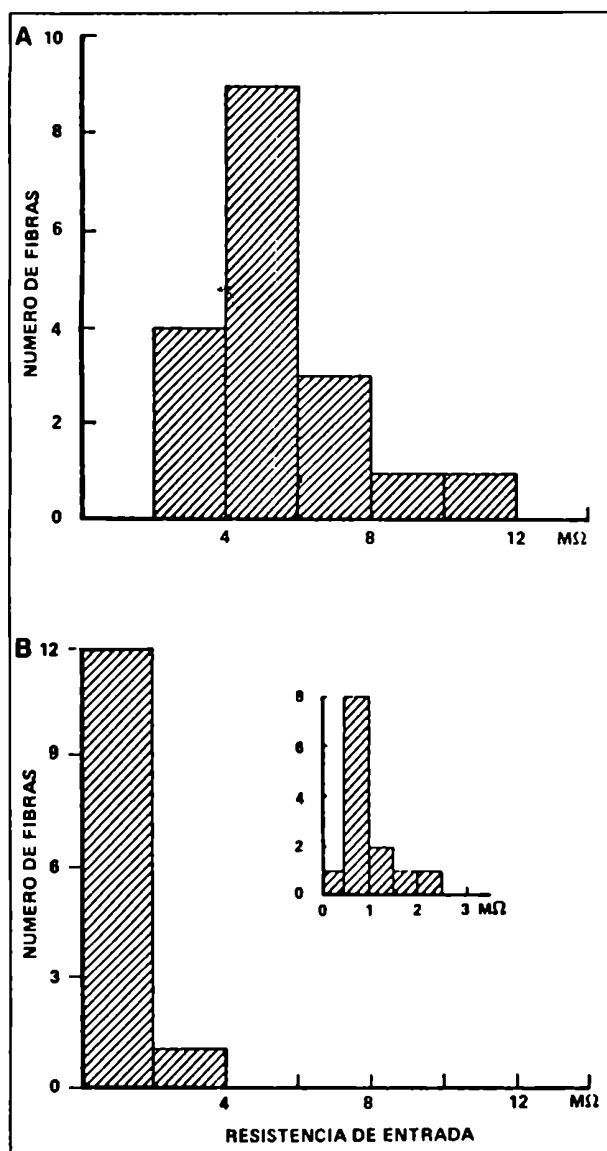
**FIGURA 6. Histograma de las Constantes de Tiempo.**

Distribucion de las constantes de tiempo de las fibras lentas (A) y rapidas (B) registradas en tres musculos crurales estudiados durante la estacion estival. Para las fibras lentas se considero el tiempo en el que se alcanza el 70% del cambio de potencial, mientras que para las fibras rapidas se considero el tiempo en el que se alcanza el 84% del mismo.

El inserto de la figura B muestra los mismos datos que en B, en escala expandida.

diferenciadas: una poblacion con valores de  $\tau$  mayores que 100 ms (Fig.6A) (mediana: 250ms) y otra con valores de  $\tau$  menores que 50 ms (Fig. 6B) (mediana: 23ms). A partir de

esta observacion designaremos al primer grupo como fibras lentas y al segundo grupo como fibras rapidas. Como se vera posteriormente esta clasificacion esta apoyada por otras caracteristicas electrofisiologicas.



**FIGURA 7. Histograma de las Resistencias de Membrana.**

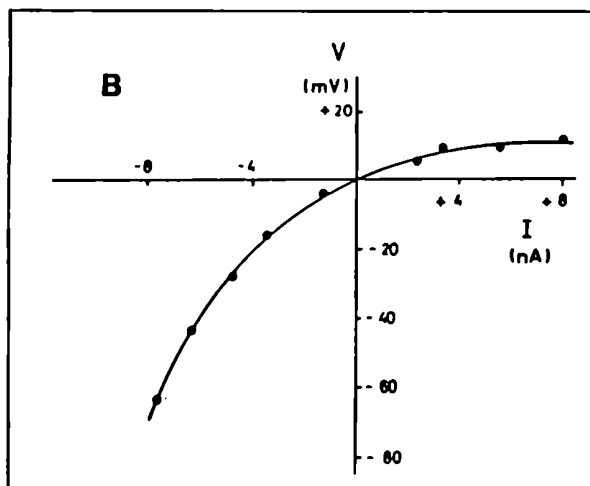
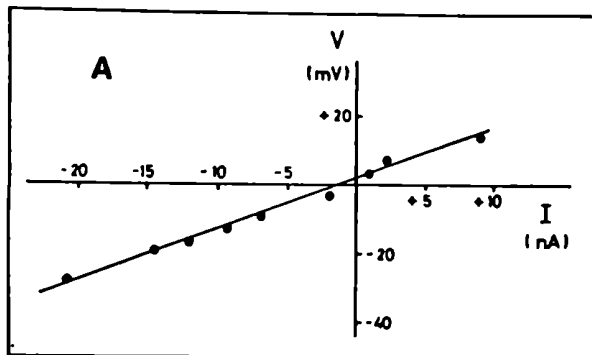
Distribucion de las resistencias de membrana de las fibras lentas (A) y rapidas (B) registradas en tres musculos cruralis estudiados durante la estacion estival.

El inserto de la figura B muestra los mismos datos que en B, en escala expandida.

#### Resistencia de Membrana ( $R_i$ )

Otro parametro que distinguio a las fibras lentas del musculo cruralis fue su alta resistencia de entrada ( $R_i$ ),

comparada con la de las fibras rapidas. Sin embargo, existe cierta superposicion en los valores de  $R_i$  entre la poblacion



**FIGURA 8. Curvas Corriente-Voltaje.**

Registros tipicos obtenidos de una fibra rapida (A) y una fibra lenta (B). Los puntos representan el cambio de potencial de membrana (en su valor estacionario) alcanzado por la fibra muscular ante la aplicacion de un pulso cuadrado de corriente. Tanto la amplitud del pulso de corriente como el cambio de potencial son registrados directamente del osciloscopio.

de fibras lentas (mediana:  $4.7M\Omega$ ) y fibras rapidas (mediana:  $1M\Omega$ ) (Fig. 7). Los valores bajos de  $R_i$  de las fibras lentas se superponen con los valores altos de  $R_i$  de las fibras rapidas. Por ello, aunque la tendencia es que las fibras lentas tienen altos valores de  $R_i$  y las rapidas valores bajos, este parametro no resulta un parametro inequivoco para la discriminacion. Una fibra lenta algo danada por la penetracion del electrodo de registro podria, segun este

parametro, ser confundida con una fibra de tipo rapido.

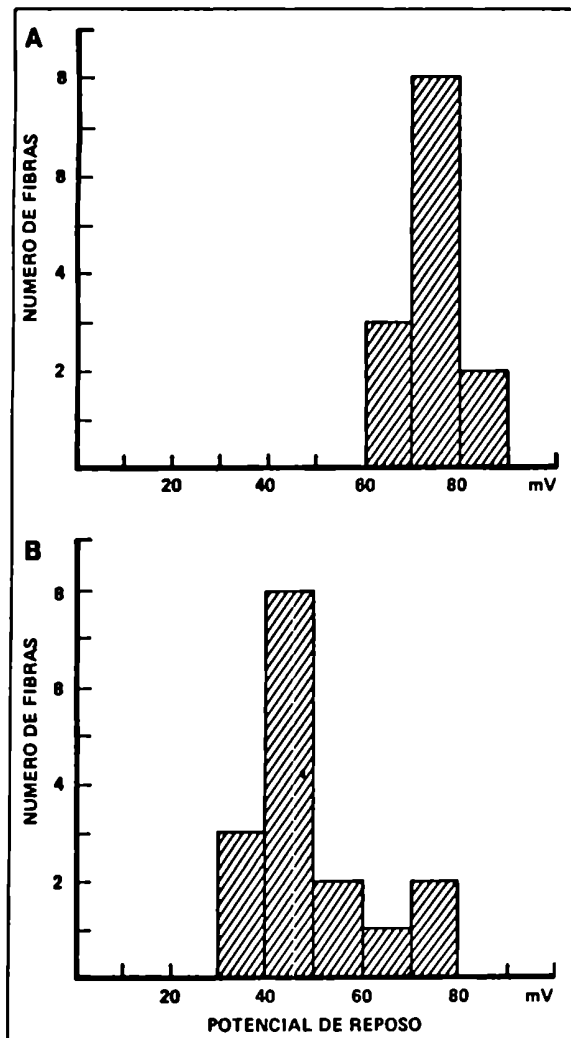
Si se traza la curva corriente-voltaje, se observa que las fibras lentas (Fig. 8B), a diferencia de las rapidas (Fig. 8A), muestran una marcada rectificacion. Las fibras lentas muestran una mayor resistencia ante corrientes hiperpolarizantes que ante corrientes despolarizantes. Este tipo de rectificacion es llamada rectificacion retardada. Esta se debe a la manifestacion de canales de  $K^+$ -voltaje dependientes, cuya conductancia aumenta con la despolarizacion (Rudy, 1988).

### **Potencial de Reposo**

La poblacion de fibras lentas muestra potenciales de reposo mas despolarizados (mediana:  $-44mV$ ) (Fig. 9B) que las fibras de tipo rapido (mediana:  $-78mV$ ) (Fig. 9A), aunque, como puede observarse en los histogramas, existe una gran superposicion entre ambas poblaciones.

La baja polarizacion de la membrana ha sido considerada un signo caracteristico de la fibra lenta (Kuffler y Vaughan Williams, 1953). Sin embargo es importante hacer notar que en nuestros registros el valor documentado es el valor estacionario que alcanza la membrana al ser impalada, pero no es el valor maximo que se registra. En la gran mayoria de fibras que luego fueron reconocidas como lentas, apenas se introduce el electrodo se observa un potencial de reposo similar al de las fibras rapidas pero este valor decae en algunos milivoltios hasta alcanzar un nuevo valor estacionario (observaciones similares fueron realizadas por Stefani y Steinbach, 1969). Consideramos que solo este valor

estacionario resulta de una medicion inequivoca y es este el valor que finalmente tabulamos.

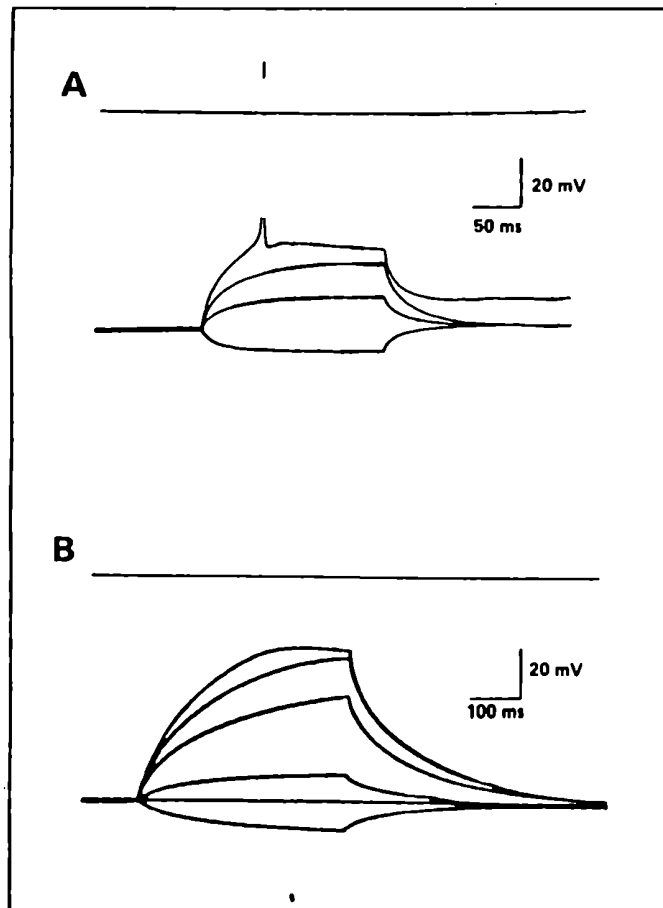


**FIGURA 9. Histograma de los Potenciales de Reposo.**

Distribucion de los potenciales de reposo de las fibras lentas (A) y rapidas (B) registrados en tres musculos crurales estudiados durante la estacion estival.

Como ya se observo, las fibras lentas muestran una mayor resistencia de entrada que las fibras rapidas. Es razonable esperar que el dano causado por el microelectrodo tenga mayor incidencia sobre el potencial de reposo en una fibra de alta resistencia que en una fibra de menor resistencia (Stefani y Steinbach, 1969). Este dano resultaria equivalente a colocar una resistencia de bajo valor en

paralelo con la resistencia de la membrana, por la que pasaria una corriente de fuga adicional. Esta corriente de fuga provocaria una mayor despolarizacion en la membrana de mayor resistencia.



**FIGURA 10. Registros Tipicos de las Respuestas de Fibras Lentas y Rapidas Normalmente Inner-vadas ante Pulsos Despolarizantes.**

A. Respuestas sub-umbrales y potencial de accion generados por una fibra rapida ante pulsos de -10, 10, 20 y 30 nA.

B. Respuestas generadas por una fibra lenta ante pulsos de -4, 4, 15, 20 y 25 nA, sin elicitar una respuesta regenerativa.

El trazo recto superior en A y B marca 0 mV.

### Potencial de Accion

Las fibras de la banda central de la cara interna del musculo cruralis mostraron dos tipos de respuestas diferentes ante pulsos despolarizantes: un grupo respondio generando un potencial de accion una vez alcanzado cierto potencial umbral, mientras que el otro grupo se despolarizo

gradualmente hasta alcanzar un plateau, sin producir respuesta regenerativa (potencial de acción). La Figura 10 muestra registros representativos de estos dos tipos de respuesta.

Todas las fibras que exhibieron bajos valores de  $r$ , baja resistencia y mayor potencial de reposo respondieron como en la Figura 10A, disparando un potencial de acción. Por su parte todas las fibras del grupo con altos valores de  $r$ , alta resistencia, y menor potencial de reposo respondieron como la fibra de la Figura 10B.

En la capa superficial de la banda central del músculo cruralis pueden registrarse, con suma facilidad, de 5 a 10 fibras lentas.

Estos resultados nos permiten concluir que en el músculo cruralis existe una población de fibras que cumplen con las características electrofisiológicas básicas descritas para las fibras lentas y otro grupo que responde a las características del tipo rápido.

### **Diferencias Estacionales**

Los anfibios tienen un ciclo vital ligado a las estaciones anuales que se refleja en su actividad motora, alimentación, actividad sexual, etc. (Gallardo, 1974). Por lo tanto al caracterizar electrofisiológicamente las fibras musculares de anfibios es importante tener en cuenta posibles diferencias estacionales. Dulhunty y Gage (1973) hallaron diferencias significativas en los valores de la resistencia



intracelular, y de la resistencia y capacidad electrica registradas en las fibras del musculo sartorio de la rana entre las estaciones de verano e invierno.

Las fibras musculares lentas y rapidas del cruralis fueron estudiadas durante los meses abril-octubre (Invierno) y diciembre-marzo (Verano). La Tabla I detalla el valor promedio de los parametros electrofisiologicos estudiados.

	$V_r$ (mV)	$\tau$ (ms)	$R_i$ (M $\Omega$ )	$V_p - V_u$ (mV)	$dV/dt$ (V/s)	
lentas						
inv	-68 $\pm$ 2	363 $\pm$ 43	5.0 $\pm$ 0.6			20
ver	-49 $\pm$ 2	276 $\pm$ 24	5.3 $\pm$ 0.5			16
rapidas						
inv	-78 $\pm$ 4	23 $\pm$ 2	1.5 $\pm$ 0.2			17
ver	-76 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2	1.1 $\pm$ 0.1	42 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	13

**TABLA I: PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS FIBRAS LENTAS Y RAPIDAS DEL MUSCULO CRURALIS DEL SAPO.**

Valores promedio ( $\pm$  ES) del potencial de reposo ( $V_r$ ), resistencia de entrada ( $R_i$ ), constante de tiempo ( $\tau$ ), amplitud de la espiga del potencial de accion ( $V_p-V_u$ ) y tasa de crecimiento del potencial de accion ( $dV/dt$ ) de fibras lentas y rapidas, medidas durante la estacion de invierno (inv) y verano (ver).

n numero de fibras estudiadas.

Puede observarse que no se registraron diferencias significativas ( $P>0.05$ , test t) en la resistencia de entrada ni en la constante de tiempo de las fibras lentas y rapidas.

El potencial de reposo de las fibras lentas en verano ( $-49 \pm 2 \text{ mV}$ ) fue significativamente menor ( $p < 0.01$ , test-t) que el registrado en invierno ( $-68 \pm 2$ ), mientras que en las fibras rapidas no se observo diferencia con la estacion. Las fibras lentas no pudieron ser inducidas a generar potenciales de accion en ninguna de las dos estaciones. En las fibras rapidas no se estudiaron los parametros que caracterizan al potencial de accion, pero en ambas estaciones estas tienen la capacidad de generar este tipo de respuesta.

#### **IV.A.2. Musculos Desnervados**

Como se senalo en el Capitulo II.B, estudios realizados en otros musculos muestran que con la desnervacion las fibras lentas de rana adquieren la capacidad de generar respuestas regenerativas. Se afirma que las fibras lentas conservan sus características electrofisiologicas basicas (Miledi y col., 1971), pero no se ha publicado ningun estudio detallado sobre como se comportan estas variables con la desnervacion. Teniendo en cuenta que la excitabilidad de la celula esta directamente relacionada con los parametros electrofisiologicos analizados, se realizo un estudio detallado de los mismos a lo largo de distintos periodos desnervatorios.

#### **Verano**

Estudios realizados durante los meses de verano (diciembre a febrero) permitieron construir las tablas II y III en las

Tiempo desnerv(d)	$V_r$ (mV)	$\tau$ (ms)	$R_i$ (M $\Omega$ )	$V_p - V_u$ (mV)	$dV/dt$ (V/s)	
0	-49 $\pm$ 2	276 $\pm$ 24	5.3 $\pm$ 0.5			16
20	-65 $\pm$ 7*	136 $\pm$ 20*	4.8 $\pm$ 0.6			7
22	-63 $\pm$ 2*	168 $\pm$ 18*	4.3 $\pm$ 0.2	-	-	14
25	-71 $\pm$ 6*	193 $\pm$ 25	3.7 $\pm$ 0.6	47 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2	6
28	-64 $\pm$ 5*	166 $\pm$ 32*	2.4 $\pm$ 0.3*	38 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	9
40	-66 $\pm$ 6*	153 $\pm$ 15*	5.8 $\pm$ 1.2	37 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	10

TABLA II. PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS FIBRAS LENTAS DEL MUSCULO CRURALIS TRAS DISTINTOS PERIODOS DE DESNERVACION DURANTE ESTACION DE VERANO.

Valores promedio ( $\pm$  ES) del potencial de reposo ( $V_r$ ), resistencia de entrada ( $R_i$ ), constante de tiempo ( $\tau$ ), amplitud de la espiga del potencial de accion ( $V_p - V_u$ ) y tasa de crecimiento del potencial de accion ( $dV/dt$ ) de fibras lentas del musculo cruralis, estudiadas a diferentes periodos tras la desnervacion, por corte del nervio ciatico a nivel de la pelvis.

Estos experimentos se realizaron entre los meses de diciembre y febrero. Los valores control (0 dias) son aquellos hallados para un musculo con inervacion normal durante el verano (Tabla I).

n numero de fibras estudiadas.

\* estadisticamente diferente del control (0 dias),  $p < 0.01$  (test T).

® estadisticamente diferente del control (0 dias),  $p < 0.05$  (test T).

que se resume la evolucion temporal de las propiedades electrofisiologicas de las fibras lentas y rapidas, respectivamente, a lo largo de un periodo de hasta 40 dias de desnervacion.

El musculo cruralis fue desnervado, como se indica en el Capitulo III, cortando el nervio ciatico a la altura de la pelvis. Los sapos eran mantenidos a temperaturas entre

18-21°C por los periodos consignados en las tablas. Al cabo de este periodo los musculos eran disecados para su estudio.

### Constante de Tiempo

A los 20 dias de desnervacion la constante de tiempo de las fibras lentas disminuyo a un  $49 \pm 23\%$  ( $p < 0.01$ , test-t) de su valor control (0 dias) (Tabla II), manteniendose en este nivel, con ciertas oscilaciones, a lo largo del periodo de desnervacion estudiado (de hasta 40 dias).

---

Tiempo desnerv (d)	$V_r$ (mV)	$\tau$ (ms)	$R_i$ (M $\Omega$ )	$V_p - V_u$ (mV)	$dV/dt$ (V/s)	
0	$-76 \pm 2$	$21 \pm 2$	$1.1 \pm 0.1$	$42 \pm 2$	$10 \pm 1$	13
20	$-65 \pm 3$	$28 \pm 2$	$2.6 \pm 0.4$	$34 \pm 2$	$11 \pm 2$	9
22	$-69 \pm 4$	$29 \pm 2$	$1.9 \pm 0.2$	$33 \pm 1$	$9 \pm 1$	11
25	$-74 \pm 6$	$52 \pm 6$	$2.2 \pm 0.2$	$35 \pm 8$	$14 \pm 3$	5
28	$-77 \pm 4$	$31 \pm 2$	$1.5 \pm 0.3$	$44 \pm 2$	$20 \pm 2$	6
40	$-69 \pm 5$	$29 \pm 6$	$1.4 \pm 0.2$	$33 \pm 4$	$10 \pm 4$	5

---

**TABLA III. PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS FIBRAS RAPIDAS DEL MUSCULO CRURALIS DESNERVADO, DURANTE LA ESTACION DE VERANO.**

Valores promedio ( $\pm$  ES) del potencial de reposo ( $V_r$ ), resistencia de entrada ( $R_i$ ), constante de tiempo ( $\tau$ ), amplitud de la espiga del potencial de accion ( $V_p - V_u$ ) y tasa de crecimiento del potencial de accion ( $dV/dt$ ) de fibras rapidas del musculo cruralis, estudiadas a diferentes periodos tras la desnervacion, por corte del nervio ciatico a nivel de la pelvis.

Estos experimentos se realizaron entre los meses de diciembre y febrero. Los valores control (0 dias) son aquellos hallados para un musculo con inervacion normal durante el verano (Tabla I).

n numero de fibras estudiadas.

La constante de tiempo de las fibras rapidas no se vio afectada por la desnervacion (Tabla III).

Continua subsistiendo una gran brecha entre el  $\tau$  de las fibras tonicas y el de las fibras fascicas.

#### **Resistencia de Entrada**

La resistencia de entrada de las fibras lentas no vario significativamente ( $p > 0.05$ , test-t) con la desnervacion, salvo un drastico descenso observado hacia los 28 dias de desnervacion ( $45 \pm 22\%$ ), pero que no parece mostrar una tendencia determinada (Tabla II).

Tambien se observaron oscilaciones en los valores de la resistencia de entrada de las fibras rapidas sin que se registre tendencia alguna (Tabla III).

La disminucion de la constante de tiempo de las fibras lentas no se correlaciona con una disminucion en la resistencia de membrana, por lo que se infiere que con la desnervacion se produjo una disminucion de la capacidad electrica de las fibras lentas.

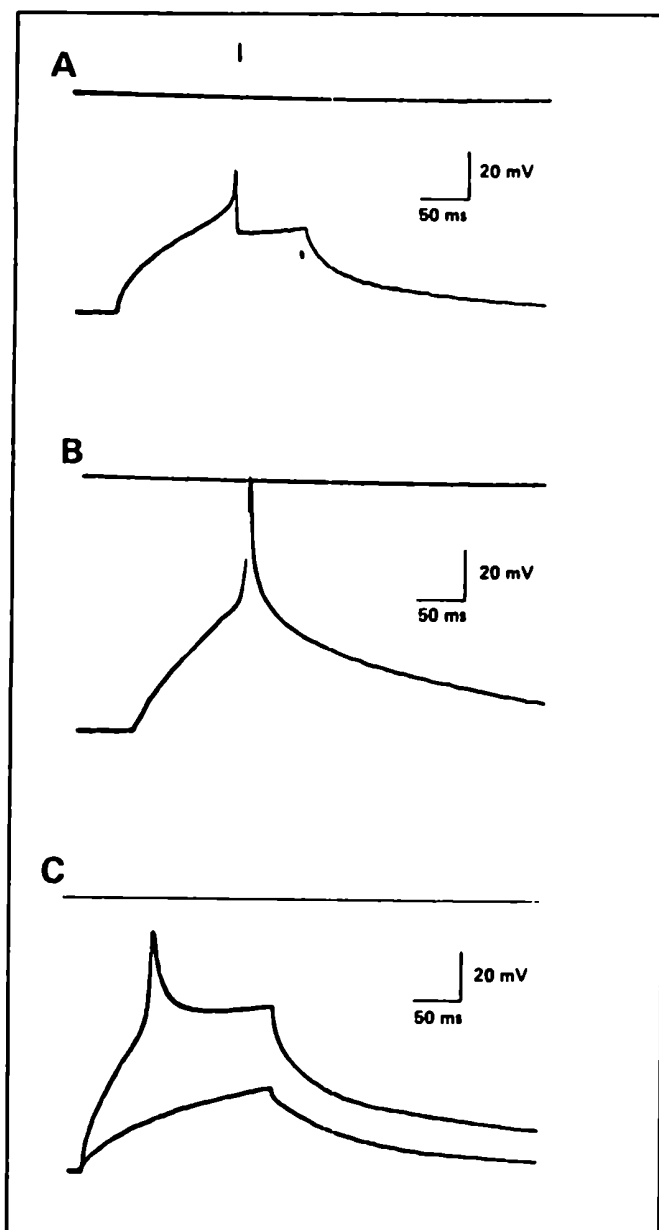
#### **Potencial de Reposo**

Con la desnervacion se observo una hiperpolarizacion de las fibras lentas, que se evidencia ya a los 20 dias de desnervacion (Tabla II), con un aumento del potencial de reposo de  $-49 \pm 2$  mV a  $-65 \pm 7$  mV ( $p < 0.05$ , test-t).

No se observaron alteraciones en el potencial de reposo de las fibras rapidas (Tabla III).

### Potencial de Accion

Hacia los 25 dias de desnervacion, se registraron respuestas regenerativas en las fibras lentas estimuladas por un pulso cuadrado de corriente, que persistieron tras 40 dias de desnervacion (Fig. 11), como minimo. La amplitud de la



**FIGURA 11. Registros Tipicos de las Respuestas de Fibras Lentas y Rapidas de Musculos Desnervados**  
A. Potencial de accion generado por una fibra rapida de musculo cruralis 40 dias despues del corte del nervio ciatico a la altura de la pelvis.  
B. Potencial de accion generado por una fibra lenta del mismo musculo.  
C. Respuesta subumbral y potencial de accion generados por una fibra lenta de un musculo piriformis 17 dias despues del corte del nervio ciatico a la altura de la pelvis.  
El trazo recto superior en A, B y C marca 0 mV.

espiga y la tasa de crecimiento de la misma tuvieron valores comparables con los registrados en las fibras rapidas de los musculos desnervados (Tabla II y III).

Los potenciales de accion en las fibras rapidas no sufrieron alteraciones con la desnervacion (Tabla III).

La latencia con que se desarrollo la capacidad de las fibras lentas del cruralis de producir potenciales de accion fue mayor que las dos semanas reportadas por Miledi y colaboradores (1971), en las fibras lentas del musculo iliofibularis de la rana.

Esta diferencia podria deberse a una diferencia en los ritmos metabolicos de la rana y el sapo. Sin embargo se observo que las fibras lentas del musculo piriformis de los mismos sapos desarrollaron la capacidad de generar potenciales de accion en 17 dias (Fig. 11C).

La diferencia en el periodo de latencia de ambos musculos podria estar relacionado con la distancia de cada uno de estos respecto del sitio de transeccion del nervio. Este punto sera estudiado con mas detalle en la seccion IV.B.2.

### **Invierno**

En otra serie de estudios de desnervacion, realizados durante el periodo de otono-invierno (mayo-julio) se obtuvieron los resultados expuestos en la tabla IV y V.

### **Constante de Tiempo**

Con la desnervacion, la constante de tiempo de las fibras lentas sufre cierta disminucion en invierno, pero no resulta

significativamente diferente que la registrada en musculos normalmente inervados (0 dias) (Tabla IV).

Por su parte, y al igual que en verano, la constante de tiempo de las fibras rapidas desnervadas tampoco muestra diferencias significativas respecto del control (0 dias).

Tiempo desnerv(d)	$V_r$ (mV)	$\tau$ (ms)	$R_i$ (M $\Omega$ )	$V_p - V_u$ (mV)	$dV/dt$ (V/s)
0	$-68 \pm 2$	$363 \pm 43$	$5.0 \pm 0.6$		20
1	$-58 \pm 2$	$326 \pm 55$	$7.8 \pm 1.3$		3
7	$-60 \pm 5$	$270 \pm 34$	$5.8 \pm 1.0$		7
16	$-65 \pm 6$	$236 \pm 19$	$6.5 \pm 1.2$		5
30	$-48 \pm 6$	$210 \pm 19$	$5.3 \pm 0.5$		4
35-38	$-59 \pm 3$	$224 \pm 19$	$6.0 \pm 0.6$		26
40-45	$-62 \pm 2$	$267 \pm 54$	$6.5 \pm 1.3$		9
68	$-58 \pm 2$	$371 \pm 106$	$6.3 \pm 1.7$		5

**TABLA IV. PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS FIBRAS LENTAS DEL MUSCULO CRURALIS DESNERVADO, DURANTE LA ESTACION DE INVIERNO.**

Valores promedio ( $\pm$  ES) del potencial de reposo ( $V_r$ ), resistencia de entrada ( $R_i$ ), constante de tiempo ( $\tau$ ), amplitud de la espiga del potencial de accion ( $V_p - V_u$ ) y tasa de crecimiento del potencial de accion ( $dV/dt$ ) de fibras lentas del musculo cruralis, estudiadas a diferentes periodos tras la desnervacion, por corte del nervio ciatico a nivel de la pelvis.

Estos experimentos fueron realizados durante los meses de abril a julio.

Los valores control (0 dias) son aquellos hallados para un musculo con inervacion normal durante el invierno (Tabla I).

n numero de fibras estudiadas.

#### Resistencia de Entrada

La resistencia de membrana de las fibras lentas y rapidas



permanece invariable, salvo las oscilaciones propias de la variabilidad biologica y experimental.

En invierno la desnervacion no produjo la disminucion en la capacidad electrica observada en verano.

Tiempo desnerv(d)	$V_r$ (mV)	$\tau$ (ms)	$R_i$ (M $\Omega$ )	$V_p - V_u$ (mV)	$dV/dt$ (V/s)	
0	-78 $\pm$ 4	23 $\pm$ 2	1.5 $\pm$ 0.2			17
1	-74 $\pm$ 3	34 $\pm$ 9	1.5 $\pm$ 0.3	61 $\pm$ 3	52 $\pm$ 6	4
7	-76 $\pm$ 7	45 $\pm$ 10	1.7 $\pm$ 0.3	48 $\pm$ 2	29 $\pm$ 2	5
16	-83 $\pm$ 3	42 $\pm$ 12	1.1 $\pm$ 0.1	69 $\pm$ 2	71 $\pm$ 3	4
30	-72 $\pm$ 1	20 $\pm$ 3	1.8 $\pm$ 0.7	54 $\pm$ 7	39 $\pm$ 8	4
35-38	-59 $\pm$ 6	31 $\pm$ 5	2.3 $\pm$ 0.4	62 $\pm$ 2	51 $\pm$ 4	10
40-45	-70 $\pm$ 4	29 $\pm$ 4	2.1 $\pm$ 0.4	59 $\pm$ 1	51 $\pm$ 5	7

TABLA V. PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS FIBRAS RAPIDAS DEL MUSCULO CRURALIS DESNERVADO, DURANTE LA ESTACION DE INVIERNO.

Valores promedio ( $\pm$  ES) del potencial de reposo ( $V_r$ ), resistencia de entrada ( $R_i$ ), constante de tiempo ( $\tau$ ), amplitud de la espiga del potencial de accion ( $V_p - V_u$ ) y tasa de crecimiento del potencial de accion ( $dV/dt$ ) de fibras rapidas del musculo cruralis, estudiadas a diferentes periodos tras la desnervacion, por corte del nervio ciatico a nivel de la pelvis.

Estos experimentos fueron realizados durante los meses de abril a julio.

Los valores control (0 dias) son aquellos hallados para un musculo con inervacion normal durante el invierno (Tabla I).

n numero de fibras estudiadas.

### Potencial de Reposo

El potencial de reposo de las fibras lentas de musculos normales tuvo, durante el invierno, valores mas

hiperpolarizados que los registrados en verano (Tabla I), y

no se observaron cambios en este parametro con la desnervacion (Tabla IV).

El potencial de reposo de las fibras rapidas permanecio inalterable (Tabla V).

#### **Potencial de Accion**

Durante el invierno las fibras lentas no desarrollaron la capacidad de generar respuestas regenerativas ni aun tras 68 dias de desnervacion (Tabla IV). Este hecho no puede adjudicarse al factor temperatura ya que los animales fueron mantenidos en el laboratorio a 18-21°C en ambas estaciones. Epstein y Beckerman (1976) realizaron una observacion similar en el musculo iliofibularis del sapo.

Los potenciales de accion de las fibras rapidas desnervadas muestran, en invierno, una mayor amplitud y una mayor velocidad de subida que en verano (Tabla V).

#### **IV.A.3. Musculos Mantenidos en Cultivo de Organo.**

Como ultimo paso en la caracterizacion del musculo cruralis como fuente de fibras lentas estudiamos los parametros electrofisiologicos anteriormente discutidos, en las fibras del musculo cruralis mantenidos en cultivo por un periodo de hasta 30 dias, a 19°C de temperatura. La tecnica de cultivo se describe en el Capitulo III. Los musculos cultivados conservaban una buena apariencia, pero el tejido mostraba una mayor fragilidad. Esto se evidenciaba al montarlo en la camaras de registro, observandose una menor elasticidad del mismo ( Esta serie de experimentos fue realizada entre los

meses de octubre-enero).

### Constante de Tiempo

Los valores de  $\tau$  de las fibras lentas en cultivo sufrieron una drastica caida de con el tiempo de cultivo. A los 30 dias de cultivo la constante de tiempo cayo al  $34 \pm 17\%$  de su valor control (0 dias) ( $p < 0.01$ , test-t).

---

Dias en cultivo	$V_r$ (mV)		$R_i$ (M $\Omega$ )	$V_p - V_u$ (mV)	$dV/dt$ (V/s)	
0	$-49 \pm 2$	$276 \pm 24$	$5.0 \pm 0.6$		-	20
24	$-57 \pm 4$	$156 \pm 24$	$4.2 \pm 0.8$	$31 \pm 4$	$12 \pm 2$	6
30	$-58 \pm 4$	$94 \pm 8$	$3.4 \pm 0.5$	$40 \pm 5$	$6 \pm 1$	12

rapidas						
0	$-76 \pm 3$	$21 \pm 2$	$1.1 \pm 0.1$	$42 \pm 5$	$10 \pm 1$	17
22	$-80 \pm 1$	$47 \pm 5$	$1.8 \pm 0.2$	$57 \pm 5$	$35 \pm 5$	6
30	$-65 \pm 4$	$23 \pm 3$	$3.0 \pm 0.3$	$64 \pm 4$	$10 \pm 1$	11

---

**TABLA VI. PROPIEDADES ELECTRICAS DE FIBRAS MUSCULARES LENTAS Y RAPIDAS MANTENIDAS EN CULTIVO DE ORGANO.**

Valores promedio ( $\pm$  ES) del potencial de reposo ( $V_r$ ), resistencia de entrada ( $R_i$ ), constante de tiempo ( $\tau$ ), amplitud de la espiga del potencial de accion ( $V_p - V_u$ ) y tasa de crecimiento del potencial de accion ( $dV/dt$ ) de fibras lentas y rapidas del musculo cruralis en musculos normalmente inervados (0 days) y tras 24 y 30 dias en cultivo de organo.  
n numero de fibras estudiadas.

El  $r$  de las fibras rapidas no manifesto cambios con el cultivo (Tabla VI).

#### **Resistencia de Entrada**

Por su parte la resistencia de entrada de las fibras lentas no se vio significativamente modificada con el cultivo. Las fibras rapidas mostraron una tendencia a incrementar su resistencia de entrada con el tiempo de cultivo.

La caida de los valores de  $r$  de las fibras lentas con el cultivo no puede ser considerado como un mero deterioro del tejido ya que la resistencia de entrada de las mismas no se vio significativamente afectada y las fibras rapidas de estos mismos musculos muestran características pasivas muy similares a aquellas medidas en un musculo recién disecado (0 días, Tabla VI). Al igual que lo observado in vivo (verano), la desnervación in vitro causó una disminución en la capacidad eléctrica de la membrana. In vitro esta disminución fue mas acentuada.

#### **Potencial de Reposo**

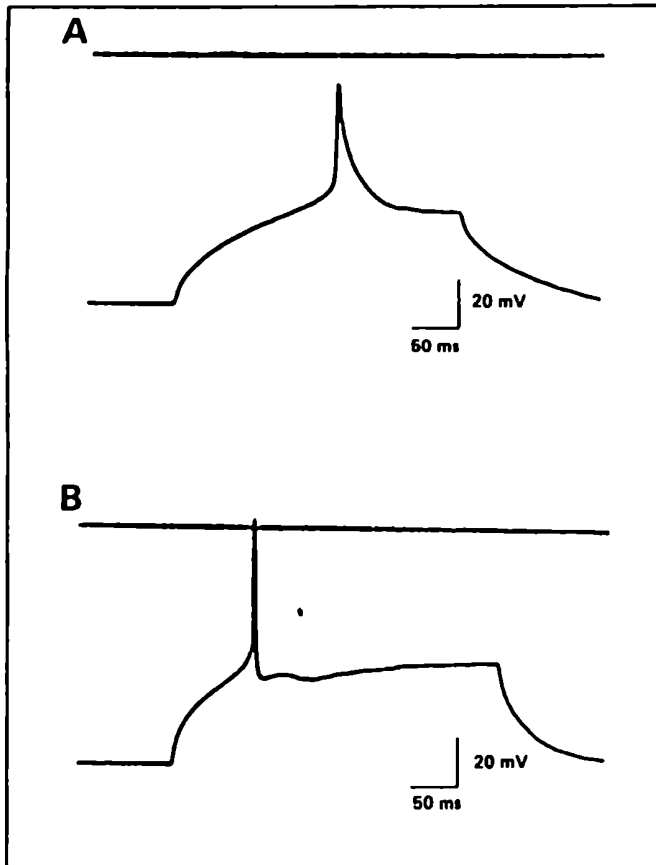
Al igual que lo observado durante la desnervación in vivo (verano) el potencial de reposo de las fibras lentas desnervadas mostro valores mas hiperpolarizados que el de las fibras lentas no desnervadas (verano) (Tabla VI).

El potencial de reposo de las fibras rapidas no se alteró con el tiempo de cultivo (Tabla VI).

#### **Potencial de Accion**

A los 22 días de cultivo las fibras lentas desarrollaron la

capacidad de producir potenciales de accion (Fig. 12). Los potenciales de accion a los 30 dias de cultivo fueron comparables a los producidos por una fibra tonica a 25 dias de desnervacion in vivo (Tabla II).



**FIGURA 12. Registros  
Tipicos de las  
Respuestas de Fibras  
Lentas y Rapias de  
Músculos Mantenidos  
en Cultivo de  
Órgano.**

A. Potencial de accion generado por una fibra rapida de un musculo cruralis mantenido en cultivo de organo por 22 dias.

B. Potencial de accion generado por una fibra lenta del mismo musculo.

El trazo recto superior en A y B marca 0 mV.

A la vista de estos resultados el sistema de cultivo de organo aparece como un sistema biologico valido para estudiar el proceso de desarrollo del potencial de accion en fibras lentas desnervadas, mostrandose que el musculo cruralis en cultivo mantiene la capacidad plastica observada in vivo.

#### **IV.B. MODULACION DEL PROCESO DESNERVATORIO.**

##### **IV.B.1. Estudio del Efecto del AMPc en la Modulacion del Canal de Na<sup>+</sup> Voltaje Dependiente en las Fibras Lentas.**

La incapacidad de las fibras lentas de producir potenciales de accion puede deberse a:

i) que la membrana de las fibras lentas carecen del canal de Na<sup>+</sup> activado por voltaje, responsable de la despolarizacion inicial en el potencial de accion, o

ii) que este canal se halla presente en la membrana de las fibras lentas pero en una forma constitutivamente inactiva.

El canal de sodio posee sitios de fosforilacion que son el blanco de la proteina quinasa dependiente del AMPc (Costa y Caterall, 1984). La fosforilacion es una transformacion postraduccional importante para la activacion de gran numero de proteinas.

Con la hipotesis ii) presente, estudiamos el efecto de un agonista permeable del segundo mensajero AMPc sobre los parametros electrofisiologicos pasivos y activos de la membrana de las fibras lentas y rapidas.

El musculo cruralis disecado de un sapo que no sufrio tratamiento previo fue incubado en presencia de 100 $\mu$ M N<sub>6</sub>-2'-O-dibutiril AMPc por periodos crecientes (0-200min), a temperatura ambiente. El estudio electrofisiologico de las fibras musculares se realizo a lo largo de esta incubacion. En esta serie de experimentos la solucion Ringer utilizada contenia una concentracion de Cl<sub>2</sub>Ca de 2mM, en lugar de 7.8mM.

La presencia del dibutiril AMPc no afecto el potencial de

Tiempo de incub (min)	$V_r$ (mV)	$\tau$ (ms)	$R_i$ (M $\Omega$ )	$V_p - V_u$ (mV)	$dV/dt$ (V/s)	
lentas						
0	-69 $\pm$ 10	108 $\pm$ 10	4.7 $\pm$ 0.7			4
15	-59 $\pm$ 3	137 $\pm$ 14	4.2 $\pm$ 0.9			5
70	-60 $\pm$ 3	83 $\pm$ 15	4.1 $\pm$ 0.9			5
100	-62 $\pm$ 4	127 $\pm$ 29	5.8 $\pm$ 0.7			4
200	-65 $\pm$ 5	105 $\pm$ 13	3.5 $\pm$ 0.4			3
rapidas						
0	-67 $\pm$ 7	20 $\pm$ 3	1.6 $\pm$ 0.2	47 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1	4
15	-85 $\pm$ 1	17 $\pm$ 1	1.6 $\pm$ 0.6	67 $\pm$ 4*	13 $\pm$ 3@	3
70	-69 $\pm$ 7	24 $\pm$ 7	1.3 $\pm$ 0.2	65 $\pm$ 3*	22 $\pm$ 2*	5
100	-70	16 $\pm$ 5	1.3 $\pm$ 0.5	63 $\pm$ 5*	20 $\pm$ 2*	3
200	-72 $\pm$ 4	19 $\pm$ 1	1.3 $\pm$ 0.1	61 $\pm$ 2*	20 $\pm$ 1*	3

TABLA VII. PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS FIBRAS LENTAS Y RAPIDAS DEL MUSCULO CRURALIS EN PRESENCIA DE AMPc.

Valores promedio ( $\pm$  ES) del potencial de reposo ( $V_r$ ), resistencia de entrada ( $R_i$ ), constante de tiempo ( $\tau$ ), amplitud de la espiga del potencial de accion ( $V_p - V_u$ ) y tasa de crecimiento del potencial de accion ( $dV/dt$ ) de fibras lentas y rapidas del musculo cruralis incubados en presencia de 100 $\mu$ M N<sup>a</sup>-2'-O-dibutiril AMPc por distintos periodos. Los experimentos fueron realizados durante el mes de octubre.

n numero de fibras estudiadas.

\* estadisticamente diferente del control (0 dias),  $p < 0.01$  (test T).

@ estadisticamente diferente del control (0 dias),  $p < 0.05$  (test T).

reposo, la constante de tiempo, ni la resistencia de entrada de las fibras lentas (Tabla VII). La constante de tiempo de las fibras lentas en este experimento fue sensiblemente menor que la reportada en la Tabla I. Esto se debio a la

presencia de la menor concentracion de calcio en el medio extracelular (ver Capitulo II.C).

No pudo registrarse ningun cambio en la excitabilidad de estas fibras. Las fibras lentas incubadas por mas de tres horas (200 min) en presencia del agonista permeable del segundo mensajero AMPc, no modificaron su inexcitabilidad. Las propiedades electrofisiologicas pasivas de las fibras rapidas no se modificaron por la presencia del dibutiril AMPc, pero se observo un aumento significativo en la amplitud de la espiga del potencial de accion y de su velocidad de subida (Tabla VII). A los 70 minutos de exposicion con el analogo del segundo mensajero la amplitud de la espiga aumento un  $38 \pm 9\%$  ( $p < 0.01$ , test-t). El aumento en la amplitud de la espiga se debio a que el potencial de pico se desplazo a valores mas positivos (de  $-5 \pm 2\text{mV}$  sin AMPc, a  $+10 \pm 3\text{mV}$  tras 70 minutos de incubacion con AMPc) mientras que el potencial umbral no se modifico ( $-52 \pm 1\text{mV}$  a  $-55 \pm 2\text{mV}$ , respectivamente). La velocidad de subida del potencial de accion aumento en un  $145 \pm 34\%$  ( $p < 0.05$ , test-t) en los primeros 15 minutos y llego a un aumento del  $315 \pm 24\%$  ( $p < 0.01$ , test-t) a los 70 minutos de incubacion en presencia del dibutiril AMPc.

El corrimiento de  $V_p$  a valores mas despolarizados y el aumento en la velocidad de subida sugieren que, en las fibras rapidas, el AMPc aumenta la conductancia al sodio. Este aumento podria estar dado por un aumento en el numero de canales de sodio activables por la despolarizacion de la membrana o por un aumento de su conductancia.

El AMPc no resulto el factor suficiente para que las fibras



lentas adquirieran la capacidad de producir potenciales de accion. Este hecho sugiere indirectamente que no es a nivel de la fosforilacion dependiente de AMPc del canal de  $\text{Na}^+$  que se regula dicha capacidad de las fibras lentas.

#### **IV.B.2. Estudio del Efecto del Largo del Cabo Nervioso Distal Sobre el Retardo del Proceso Desnervatorio**

La desnervacion ocasionada por el corte del nervio ciatico a la altura de la pelvis induce el desarrollo de la excitabilidad de las fibras lentas del musculo cruralis con un retardo de 25 dias (Tabla II); mientras que ante la misma desnervacion las fibras lentas del musculo piriformis muestran un retardo de 17 dias (Fig. 11C).

Una de las diferencias existentes entre los experimentos de desnervacion practicados en el musculo cruralis y en el piriformis es el largo del cabo distal remanente tras el corte del nervio ciatico (ver Cap III). El musculo cruralis se halla en una posicion mas distal que el musculo piriformis. Es dificil evaluar con precision esta diferencia. En los animales utilizados esta es de aproximadamente 10mm.

De acuerdo con el trabajo de Schallow y Schmidt (1977) realizado en las fibras lentas del musculo piriformis de la rana, un aumento en la longitud del cabo distal de 10 mm puede ocasionar un aumento en el periodo de latencia del desarrollo del potencial de accion del 30%.

Nosotros observamos que el cruralis mostro un aumento en el periodo de latencia de mas del 40%, respecto al observado

para el musculo piriformis. Con el fin de evaluar si tal diferencia podria deberse a la mayor longitud del cabo distal remanente en el caso del cruralis, cortamos las ramificaciones del nervio ciatico a la altura de su entrada al musculo cruralis. Esta maniobra quirurgica resulta de cierta complejidad por la gran vascularizacion que presenta la zona de insercion del nervio en el musculo cruralis.

Tiempo desnerv.	cabo	$V_r$ (mV)	$\tau$ (ms)	$R_i$ (M $\Omega$ )	$V_p - V_u$ (mV)	$dV/dt$ (V/s)
	largo	$-65 \pm 7$	$136 \pm 20$	$5 \pm 0.6$	-	
	corto	$-64 \pm 4$	$335 \pm 33$	$5 \pm 0.6$	$26 \pm 3$	

**TABLA VIII. PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS FIBRAS LENTAS DEL MUSCULO CRURALIS DESNERVADO CON CABO DISTAL CORTO Y LARGO.**

Valores promedio ( $\pm$  ES) del potencial de reposo ( $V_r$ ), resistencia de entrada ( $R_i$ ), constante de tiempo ( $\tau$ ), amplitud de la espiga del potencial de accion ( $V_p - V_u$ ) y tasa de crecimiento del potencial de accion ( $dV/dt$ ) de fibras lentas del musculo cruralis desnervado, dejando cabos distales de distinta longitud. El cabo largo corresponde al corte del nervio ciatico a nivel de la pelvis, y el cabo corto al corte del nervio a nivel de su insercion en el musculo. Estos experimentos se realizaron entre los meses de diciembre y febrero. n numero de fibras estudiadas.

Para asegurarnos la paralisis total de la gran masa muscular que conforma el triceps femoris tambien cortamos el nervio ciatico a la altura de la pelvis.

Se observo que las fibras lentas de un musculo cruralis asi desnervado mostraron una mayor constante de tiempo que las

fibras lentas de musculos desnervados con cabo largo (Tabla VIII). No se observaron cambios en el potencial de reposo ni en la resistencia de entrada de las fibras lentas en relacion con el largo del cabo distal (Tabla VIII). La mayor constante de tiempo indica, entonces, una mayor capacidad electrica de la membrana de estas fibras.

Las fibras lentas de musculos cruralis desnervados con cabo corto desarrollaron la capacidad de generar potenciales de accion a los 20 dias, periodo en el cual las fibras lentas de musculo con cabo largo no muestran ningun atisbo de respuesta regenerativa (Tabla VIII).

Este resultado muestra que la diferencia observada en los periodos de latencia de los musculos cruralis y piriformis se debian fundamentalmente a sus respectivas distancias respecto del sitio de corte del nervio ciatico.

La dependencia de la latencia de los procesos desnervatorios respecto de la longitud del cabo distal resulta indicativa de la existencia de un factor trofico de origen neuronal.

#### **IV.B.3. Efecto del Bloqueo de los Receptores Colinergicos sobre la Latencia del Proceso Postdesnervatorio**

Uno de los factores neuronales que se postulan como posible modulador de las propiedades de la membrana postsinaptica es el neurotransmisor acetilcolina (Drachman, 1973). En el caso de la fibra lenta la acetilcolina podria actuar no solo como transmisor de la senal electrica sino como factor trofico, reprimiendo en la fibra lenta su capacidad de generar

potenciales de accion.

Si la acetilcolina funcionara como tal, via su receptor especifico presente en la membrana postsinaptica, la aplicacion de un bloqueante especifico del receptor de acetilcolina al musculo deberia ser capaz de inducir por si mismo la excitabilidad a la fibra lenta. Miledi y Uchitel

Tiempo	$V_r$	$\tau$	$R_i$	$V_p - V_u$	$dV/dt$	
desnerv(d)	(mV)	(mV)	(M $\Omega$ )	(mV)	(V/s)	
16	-59 $\pm$ 7	216 $\pm$ 36	3.0 $\pm$ 0.7	-	-	6
18	-63 $\pm$ 3	193 $\pm$ 25	6.9 $\pm$ 0.3	28 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	9
22	-51 $\pm$ 4	197 $\pm$ 18	4.1 $\pm$ 0.7	38 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2	8
28	-62 $\pm$ 3	198 $\pm$ 27	4.1 $\pm$ 0.5	49 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	6
invierno						
22	-60 $\pm$ 10	199 $\pm$ 27	3.7 $\pm$ 0.5			5
29	-62 $\pm$ 5	150 $\pm$ 22	5.7 $\pm$ 0.9			6
34	-72 $\pm$ 7	132 $\pm$ 24	5.9 $\pm$ 1.3			7

TABLA IX. PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS FIBRAS LENTAS DEL MUSCULO CRURALIS DESNERVADO (CABO LARGO), TRATADO CON  $\alpha$ -BUNGAROTOXINA.

Valores promedio ( $\pm$  ES) del potencial de reposo ( $V_r$ ), resistencia de entrada ( $R_i$ ), constante de tiempo ( $\tau$ ), amplitud de la espiga del potencial de accion ( $V_p - V_{th}$ ) y tasa de crecimiento del potencial de accion ( $dV/dt$ ) de fibras lentas del musculo cruralis, desnervado por corte del nervio ciatico a nivel de la pelvis e inyectado con 10ul de  $\alpha$ -Bungarotoxina (166ng/ul). Los estudios se realizaron a diferentes periodos tras la desnervacion, durante las estaciones de verano e invierno.

n numero de fibras estudiadas.

(1984) mostraron que esto resulto asi.

Nosotros intentamos analizar como afecta la aplicacion de  $\alpha$ -bungarotoxina (un bloqueante de los receptores colinergicos) la latencia del fenomeno postdesnervatorio. Musculos cruralis desnervados, por corte del nervio ciatico a la altura de la pelvis, fueron inyectados con

Tiempo  
desnerv(d)

16	-65 $\pm$ 5	33 $\pm$ 7	2.3 $\pm$ 0.4	36 $\pm$ 2	16 $\pm$ 1	4
18	-58 $\pm$ 2	42 $\pm$ 4	3.2 $\pm$ 0.6	43 $\pm$ 4	19 $\pm$ 2	5
22	-60 $\pm$ 4	35 $\pm$ 5	1.9 $\pm$ 0.2	39 $\pm$ 2	18 $\pm$ 2	12
28	-74 $\pm$ 2	60 $\pm$ 4	2.2 $\pm$ 0.1	55 $\pm$ 2	24 $\pm$ 1	7

invierno

22	-72 $\pm$ 5	27 $\pm$ 1	2.5 $\pm$ 0.8	46 $\pm$ 5	31 $\pm$ 3	10
29	-76 $\pm$ 5	38 $\pm$ 5	2.4 $\pm$ 0.3	60 $\pm$ 3	43 $\pm$ 1	10
34	-70 $\pm$ 10	52 $\pm$ 4	3.5 $\pm$ 0.5	52 $\pm$ 3	26 $\pm$ 5	5

**TABLA X. PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS FIBRAS RAPIDAS DEL MUSCULO CRURALIS DESNERVADO (CABO LARGO), TRATADO CON  $\alpha$ -BUNGAROTOXINA.**

Valores promedio ( $\pm$  ES) del potencial de reposo ( $V_r$ ), resistencia de entrada ( $R_i$ ), constante de tiempo ( $\tau$ ), amplitud de la espiga del potencial de accion ( $V_p - V_{th}$ ) y tasa de crecimiento del potencial de accion ( $dV/dt$ ) de fibras rapidas del musculo cruralis, desnervado por corte del nervio ciatico a nivel de la pelvis e inyectado con 10ul de  $\alpha$ -Bungarotoxina (166ng/ul). Los estudios se realizaron a diferentes periodos tras la desnervacion, durante las estaciones de verano e invierno.

n numero de fibras estudiadas.

$\alpha$ -bungarotoxina. La primera inyección (10  $\mu$ l de una solución 166ng/ $\mu$ l) se aplicó en el momento de la desnervación y luego se reiteró la dosis cada siete días.

En estudios realizados durante el verano se observó que la  $\alpha$ -bungarotoxina no afectó las propiedades pasivas de las fibras lentas desnervadas (Tabla IX), si se las compara con las detalladas en la Tabla II. Las fibras lentas desnervadas y expuestas a  $\alpha$ -bungarotoxina durante el período de desnervación desarrollaron la capacidad de generar potenciales de acción en 18 días, acortándose así la latencia respecto de la desnervación pelviana en 7 días (Tabla II).

Cuando se realizaron experimentos similares durante la estación invernal se observó nuevamente que en esta época del año las fibras lentas carecen de la capacidad de desarrollar el fenómeno desnervatorio en los tiempos en que se establecen durante el verano (Tabla IX).

La Tabla X muestra un estudio similar realizado con fibras rápidas. Puede observarse que la  $\alpha$ -bungarotoxina no modificó las variables electrofisiológicas pasivas y activas de la membrana, si se las compara con las detalladas en las tablas III y V. Vuelve a observarse que en invierno las fibras rápidas desnervadas producen potenciales de acción con mayor velocidad de subida que en verano.

Estos resultados muestran que el bloqueo del receptor de acetilcolina a nivel postsináptico resultó equivalente a acortar el cabo nervioso distal, avalando la hipótesis que postula al neurotransmisor como el factor trófico. En

presencia de un cabo distal mas largo el nervio tarda mas en degenerar y la liberacion de acetilcolina se mantiene por un periodo mayor. Al desnervar y aplicar  $\alpha$ -bungarotoxina se aceleraria el cese de la accion trofica de la acetilcolina.

#### **IV.B.4. Estudio del Efecto del Carbacol en el Desarrollo de la Capacidad de la Fibra Lenta de Producir Potenciales de Accion en Cultivo de Organo.**

Si la acetilcolina fuera el factor neuronal responsable de modular la excitabilidad de las fibras lentas, la sola presencia del neurotransmisor inhibiria el desarrollo de la capacidad de las fibras lentas de un musculo desnervado de producir potenciales de accion.

Con el fin de poner a prueba esta hipotesis se utilizo el sistema de cultivo de organo. Musculos cruralis fueron cultivados en presencia y ausencia de dosis crecientes del agonista colinergico carbacol, a 19°C, por periodos en los que se observo que las fibras lentas desarrollaron la capacidad de producir potenciales de accion.

La presencia de carbacol no afecto el potencial de reposo, la resistencia de entrada ni la constante de tiempo de la membrana de las fibras lentas en cultivo (Tabla XI). En esta serie de cultivos a los 28 dias de incubacion las fibras lentas del musculo control no habian desarrollado aun la capacidad de producir potenciales de accion. Sin embargo en el musculo incubado en presencia de 1 $\mu$ M carbacol una fibra (de ocho estudiadas) produjo respuestas regenerativas (Tabla XI). A los 29 dias de cultivo el 50% de las fibras del

musculo control produjeron potenciales de accion, mientras que en el musculo tratado con 1 $\mu$ M carbacol se observo un resultado similar (Tabla XI). A los 34 dias de cultivo no pudieron estudiarse los musculos control (por hallarse contaminados), pero dos musculos tratados con 5 $\mu$ M carbacol mostraron potenciales de accion bien desarrollados. En uno de los musculos un 50% de las fibras lentas produjo respuestas regenerativas mientras que en el segundo musculo

---

Dias cult	[C] $\mu$ M	$V_r$ (mV)		$R_i$ (M $\Omega$ )	n total	n' +PA	$V_p - V_u$ (mV)	dV/dt (mV/ms)
28	1	-68 $\pm$ 2	202 $\pm$ 17	3.3 $\pm$ 0.4	8	1	28	4
28	0	-57 $\pm$ 5	154 $\pm$ 30	3.3 $\pm$ 0.7	8	0	-	-
29	1	-69 $\pm$ 5	201 $\pm$ 33	3.2 $\pm$ 0.3	7	3	25 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1
29	0	-66 $\pm$ 3	178 $\pm$ 3	6.8 $\pm$ 1.8	8	4	24 $\pm$ 3	2 $\pm$ 1
34	5	-65 $\pm$ 5	78 $\pm$ 5	1.8 $\pm$ 0.2	7	3	27 $\pm$ 6	9 $\pm$ 2
34	5	-80 $\pm$ 1	83 $\pm$ 14	1.7 $\pm$ 0.4	5	5	47 $\pm$ 4	20 $\pm$ 2

**TABLA XI. PROPIEDADES ELECTRICAS DE FIBRAS MUSCULARES LENTAS MANTENIDAS EN CULTIVO DE ORGANO EN PRESENCIA O AUSENCIA DE CARBACOL.**

Valores promedio ( $\pm$  ES) del potencial de reposo ( $V_r$ ), resistencia de entrada ( $R_i$ ), constante de tiempo ( $\tau$ ), amplitud de la espiga del potencial de accion ( $V_p - V_u$ ) y tasa de crecimiento del potencial de accion (dV/dt) de fibras lentas de musculos cultivados por 28, 29 y 34 dias en presencia o en ausencia de 1 o 5  $\mu$ M carbachol ([C]).

n total es el numero total de fibras estudiadas; n' +PA es el numero de fibras que mostraron potencial de accion y de cuyos parametros se detalla su valor promedio.



este porcentaje fue del 100%.

De esta serie de experimentos concluimos que el desarrollo de la capacidad de las fibras lentas de producir potenciales de acción no se vio afectado por la presencia de hasta 5  $\mu$ M carbacol.

## **Capitulo V**

### **DISCUSION**

## V.A. OBJETIVOS PLANTEADOS

El trabajo presentado se enmarca en el estudio de la función trofica que el nervio ejerce sobre la fibra muscular.

El modelo de estudio que se adoptó fue el efecto modulador que la neurona motora ejerce sobre las propiedades electrofisiológicas de las fibras musculares de tipo lento, de anfibio.

La estrategia de trabajo consistió en observar los cambios generados, en las propiedades electrofisiológicas de las fibras lentas, al privarlas de la influencia normal de la neurona motora. Esto se alcanzó por desnervación in vivo, o aislando a las fibras musculares en un sistema de cultivo de órgano. Se estudiaron distintos factores que pudieran influir sobre la cinética y la expresión de dichos cambios postdesnervatorios.

Las fibras lentas de anfibio resultan de particular interés en el estudio de la función trofica de la neurona motora debido a una propiedad característica: estas fibras musculares son normalmente inexcitables (no generan potenciales de acción ante impulsos despolarizantes), pero desarrollan la capacidad de generar potenciales de acción al ser desnervadas (Miledi y col., 1971). Esta observación sugiere que las neuronas motoras que innervan las fibras de tipo lento suprimen el mecanismo de generación del potencial de acción.

En el presente trabajo se analizó cómo varían las propiedades eléctricas pasivas (del reposo) de estas fibras

con la deservacion, en correlacion con los cambios operados en sus propiedades electricas activas, y se analizo el rol que cumple el neurotransmisor de la placa neuromuscular, la acetilcolina, en la modulacion de las propiedades electrofisiologicas activas.

#### **V.B. PREPARACION BIOLOGICA UTILIZADA COMO FUENTE DE FIBRAS LENTAS**

En atencion a la estrategia de trabajo adoptada, que incluia estudios en un sistema de cultivo de organo, fue necesario buscar un musculo que cumpliera con dos requisitos importantes: a) que tuviera un alto porcentaje de fibras lentas; b) que fuera facilmente disecable en condiciones de esterilidad.

Los musculos que normalmente sirven como fuente de fibras lentas en anfibios no fueron considerados adecuados por no cumplir con alguno de estos dos requisitos (Capitulo IV.A). Gilly (1975) observo mediante tecnicas histoquimicas que en el musculo cruralis la poblacion de fibras lentas constituye un 50% del total de fibras.

Fedorov y colaboradores (1982) realizaron estudios electrofisiologicos en este musculo y reportaron que este posee tres tipos de fibras: lentas, rapidas e intermedias. Las fibras consideradas pertenecientes al tipo intermedio fueron caracterizadas por poseer parametros electrofisiologicos pasivos con valores intermedios entre el tipo rapido y el tipo lento, y capaces de generar

potenciales de accion.

En un proyecto en el cual se quiere seguir la evolucion de las propiedades electrofisiologicas pasivas y activas de las fibras lentas con la desnervacion, la existencia de fibras intermedias en el musculo utilizado como fuente de fibras lentas torna dificil discriminar el tipo celular en el que se producen los cambios observados.

Los estudios electrofisiologicos que se presentan en este trabajo muestran que en la banda central de la cara interna del musculo cruralis del sapo se hallaron solo dos poblaciones de fibras musculares: una poblacion con baja resistencia transmembranal ( $1.1 \pm 0.2 M\Omega$ ), breve constante de tiempo ( $21 \pm 2 ms$ ) y capaces de generar potenciales de accion ante pulsos despolarizantes supraumbrales; y una segunda poblacion con alta resistencia de entrada ( $5.3 \pm 0.5 M\Omega$ ), prolongada constante de tiempo ( $276 \pm 24 ms$ ) e inexcitables. Por lo tanto, nuestros resultados no avalan la clasificacion realizada por Fedorov y colaboradores, pues no hallamos ningun sustento electrofisiologico para subdividir a las fibras con  $\tau > 100 ms$  (Fig. 6) en lentas e intermedias, ya que todas las fibras pertenecientes a este grupo fueron incapaces de generar potenciales de accion.

Como conclusion de la caracterizacion realizada consideramos que el musculo cruralis es una buena fuente de fibras del tipo lento.

Siendo el sapo un animal que sufre variaciones morfologicas y fisiologicas dependientes de la estacion del ano

(Gallardo, 1974), el estudio de las propiedades electrofisiológicas de la membrana de las fibras lentas y rápidas se realizó en forma paralela en las estaciones de verano e invierno. No se hallaron diferencias significativas entre los parámetros electrofisiológicos de las fibras musculares normalmente inervadas registrados en ambas estaciones.

#### V.C. DESNERVACION Y LAS PROPIEDADES PASIVAS DE LAS FIBRAS LENTAS

A los 20 días del corte del nervio ciático a la altura de la pelvis, efectuado durante el verano, se observó una caída en el valor de la constante de tiempo de la membrana de las fibras lentas a un  $49 \pm 23\%$  ( $p < 0.01$ ) de su valor control (Tabla II); el potencial de reposo se hiperpolarizó en aproximadamente 16 mV (Tabla II); y no se observó un cambio significativo en la resistencia de entrada de las fibras. En cultivo de órgano la caída de la constante de tiempo fue aun más pronunciada (al  $34 \pm 17\%$  del valor control), la resistencia de entrada no se modificó, y el potencial de reposo fue más hiperpolarizado que el registrado en fibras lentas no desnervadas, aunque no significativamente diferente.

La constante de tiempo de la membrana es igual al producto de la resistencia de entrada por la capacidad eléctrica total de la membrana celular ( $\tau = R.C$ ). No habiéndose alterado

la resistencia total de la membrana de la fibra lenta, se infiere que la caída en el valor de  $r$ , producida por la desnervación, refleja una disminución en la capacidad total de las fibras lentas.

### **Capacidad Electrica**

La capacidad electrica depende de la geometria de la membrana y de las características emergentes de su composición.

$$C = \epsilon_0 A/d \quad (10)$$

donde:

$\epsilon_0$  = constante dielectrica de la membrana

A = superficie de la membrana

d = grosor de la membrana

### **La Capacidad Electrica como Funcion de la Superficie de Membrana**

Los parametros geometricos estan dados por el grosor de la membrana (10-100Å) y la superficie en que se extiende la bicapa. La capacidad total de la fibra muscular es directamente proporcional a la superficie de la membrana (capacitores en paralelo se suman), por lo que el decremento en la capacidad total registrado podria indicar que la desnervación indujo una disminución en la superficie de membrana de la fibra lenta.

Al igual que en el caso de la fibra rapida, en la fibra lenta la membrana sarcoplasmica se halla electricamente acoplada a la membrana del sistema tubular. Siendo la superficie de esta ultima mayor que la de la membrana

sarcoplasmica (Adrian y Peachey, 1965; Stefani y Steinbach, 1969), es mayor su contribucion a la capacidad total de la fibra muscular (Falk y Fatt, 1963).

La disminucion de la capacidad podria indicar, entonces, una disminucion del diametro de la fibra, o una destubulacion parcial de la misma inducida en el proceso desnervatorio. Nicholls (1956) reporto que la desnervacion no produjo ningun cambio en el diametro de fibras musculares de anfibio.

Por otra parte, la resistencia de entrada de la fibra muscular depende del diametro de la fibra muscular (Falk y Fatt, 1963).

Dada la ecuacion (7) del Capitulo II.C, si se aplica  $x=0$  en la ecuacion (6), se obtiene que:

$$R_i = r \cdot r_1 = (r_m' \cdot r_1)^{1/2} / 2\pi a^{3/2} \quad (11)$$

donde:

$r_m'$  = resistencia transmembranal por unidad de superficie

$r_1$  = resistencia intracelular por unidad de superficie

$a$  = radio de la fibra

Esta ecuacion muestra que la resistencia de entrada es inversamente proporcional a la potencia  $3/2$  del radio de la fibra.

Por lo tanto si el diametro de la fibra fuera la causa de la disminucion de la capacidad, este efecto tambien se veria reflejado en la resistencia de entrada, y nuestros resultados no lo muestran. Por ello cobra mayor peso la posibilidad que la disminucion de la capacidad sea indicativa de una destubulacion parcial de la fibra lenta, como consecuencia de la desnervacion.



(Sin embargo no podemos descartar que en la fibra lenta se produjera una disminucion del diametro concomitantemente con un aumento en la resistencia transmembranal especifica. Estos dos efectos simultaneos se contrapondrian y la resistencia de entrada no variaria.)

### **La Capacidad Electrica como Funcion de las Propiedades**

#### **Intrinsecas de la Membrana**

Por otra parte la Ecuacion 10 muestra que la capacidad membranal depende de la constante dielectrica de la membrana. Esta constante representa el grado de aislamiento electrico que la bicapa lipidica impone entre los espacios intra y extracelular. Dicho aislamiento electrico  $d$  depende de la fase en que se halla la bicapa lipidica y de la composicion de la misma .

La capacidad electrica de la membrana muestra variaciones significativas con la transicion de fase de los lipidos que la componen (Antonov y col., 1985). La transicion de la fase solida a liquida es descripta como un fenomeno por el cual la bicapa sufre una expansion lateral y un decremento en el espesor y la densidad, produciendose un cambio en el empaquetamiento de las cadenas de hidrocarbonos (Jacobson y Papahadjopoulos, 1975).

Normalmente, en las membranas biologicas esta transicion de fase de los lipidos, de solido a fluido, se produce a temperaturas que se hallan muy por debajo de las temperaturas biologicamente relevantes (Papahadjopoulos y Fortis, 1978). Sin embargo tales transiciones de fase pueden ser inducidas por la exposicion de las membranas a

cationes divalentes y por variaciones en el pH (Jacobson y Papahadjopoulo, 1975). En estudios realizados en bicapas de fosfatidilserina se mostro que la presencia de 1mM de  $\text{Ca}^{++}$  elimina la transicion de fase del rango 0-70°C. En estas condiciones la membrana aparece como una estructura cristalina con los grupos acilos empaquetados de un modo altamente ordenado (Papahadjopoulo y Portis, 1978). Se postula que este efecto de los cationes bivalentes podria deberse a la neutralizacion de las cargas de las cabezas polares.

Jacobson y Papahadjopoulo (1975) alegaron que la sensibilidad de la estructura de la bicapa respecto de la composicion de la solucion acuosa depende estrictamente de la naturaleza quimica de las cabezas polares.

De estos datos tomados de la bibliografia inferimos que no puede descartarse que la desnervacion indujera un cambio en la composicion lipidica de la misma y/o un cambio de fase de la membrana (ocasionado, por ejemplo, por un aumento en la concentracion intracelular de  $\text{Ca}^{++}$ ), que fuera responsable de disminucion de la constante dielectrica de la membrana. Los trabajos de Papahadjopoulo y Portis, (1978) muestran variaciones significativas en la transicion de fase a concentraciones varios ordenes de magnitud superiores ( $10^{-3}\text{M}$ ) a las medidas normalmente, en el interior celular ( $10^{-7}\text{M}$ ).

Sin embargo estos trabajos fueron realizados en membranas artificiales, y en bicapas carentes de proteinas, por lo que se desconoce que concentraciones serian necesarias para modificar la temperatura de transicion en membranas

biologicas.

### **En conclusion**

Quedan asi planteadas dos posibles explicaciones para la observacion hecha que la desnervacion in vivo, e in vitro, provoco la disminucion de la capacidad de la membrana de las fibras lentas en el musculo cruralis del sapo: a) se produce una disminucion en la superficie membranal total por destubulacion parcial de las fibras; b) se produce un cambio en la constante dielectrica de la membrana producto de un cambio en la composicion lipidica y/o una transicion de fase inducida por alteracion de la composicion ionica del medio intracelular.

Para discernir entre ambas posibilidades se requeriria medir con precision la capacidad especifica de la membrana (capacidad por unidad de superficie), y observar si esta cambia entre en fibras desnervadas respecto de fibras normalmente inervadas.

Sin embargo este estudio es dificil ya que no se puede obtener una medida directa de la superficie total de membrana acoplada (membrana sarcoplasmica + membrana tubular).

Esta limitacion tecnica podria ser superada, en parte, a traves de una maniobra experimental que desacoplara la membrana sarcoplasmica de la membrana tubular. De esta manera podria medirse la capacidad especifica de la membrana sarcoplasmica, midiendo entonces la capacidad total de la fibra destubulada y usando el diametro y la longitud de la

fibra para calcular la superficie membranar.

Otro enfoque posible seria el estudio de la composicion lipidica de membranas de fibras lentas aisladas de musculos normales y desnervados.

### **Potencial de Reposo**

La hiperpolarizacion de la membrana de fibras lentas desnervadas in vivo e in vitro, podria deberse a un aumento en la permeabilidad al ion  $K^+$ , producida por un aumento en la conductancia de los canales de  $K^+$  o por un aumento en el numero de canales que se expresan en la membrana plasmatica. Pero, si esto fuera asi se esperaria observar una disminucion en la resistencia de entrada de la fibra, y esto no se observo. Un cambio en el potencial de reposo de la fibra lenta no acompanado de un cambio en la conductividad de la membrana, hace pensar en un cambio en la relacion de concentraciones de las especies ionicas relevantes en la determinacion del potencial de reposo, osea las concentraciones intra y extracelulares del  $K^+$  y el  $Na^+$ . Dentro de esta hipotesis es dable pensar en un aumento en la concentracion intracelular de  $K^+$  o en una reduccion de la concentracion intracelular del  $Na^+$ . Esto podria producirse por una disminucion en la actividad de la bomba electrogenica.

La forma mas precisa de examinar esta posibilidad seria midiendo dichas concentraciones por medio de microelectrodos selectivos para estos cationes.

### **Diferencias Estacionales**

En invierno la desnervacion de las fibras lentas no produjo variacion significativa en ninguno de los parametros electrofisiologicos pasivos analizados, dentro de un plazo de hasta 68 dias de desnervacion.

Muchos de los cambios inducidos por la desnervacion dependen de la produccion de metabolitos intracelulares que cumplen el rol de segundos mensajeros (Carlsen, 1975), y de constituyentes proteicos (Bray y col., 1976). Una caida en el ritmo metabolico del animal durante la estacion invernal, disminuiriá la capacidad de producir los metabolitos y proteínas intervinientes en el desarrollo de los procesos postdesnervatorios.

Wernig y Fischer (1986) observaron que en invierno las fibras musculares muestran una menor capacidad plastica traducida en la formacion de un menor numero de areas capaces de ser inervadas.

En nuestros experimentos, el condicionamiento del periodo invernal no parecia estar dominado por el descenso de la temperatura ambiente tipico de esta estacion, ya que los experimentos realizados fueron llevados a cabo en condiciones de temperatura controlada, tal que tras la desnervacion los animales fueron conservados a igual temperatura en verano e invierno.

Farner (1985), en una revision bibliografica sobre ritmos anuales destaca la existencia de dos formas distintas de efectivizar tales ritmos. Las variaciones estacionales pueden estar gobernadas por la existencia de un inductor

estacional específico (driver) como el fotoperiodo, la temperatura, etc, que en cada momento regula en forma directa la fisiología del organismo. Por otra parte se ha demostrado que en ciertas especies animales tal regulación estacional es inducida a través de un entrenamiento en base a inductores estacionales similares, que "imprimen" en el organismo un ritmo endógeno automantenido (Zeitgeber).

Los animales con que se realizó el presente trabajo parecen responder más a este último modelo, ya que mantuvieron diferencias estacionales a pesar de haber sido conservados en condiciones ambientales similares en ambas estaciones.

#### **V.D. DESNERVACION Y LAS PROPIEDADES ACTIVAS DE LAS FIBRAS LENTAS**

En verano, el corte del nervio ciático a la altura de la pelvis indujo a las fibras lentas del músculo cruralis a desarrollar la capacidad de generar potenciales de acción, ante pulsos despolarizantes, con una latencia de 25 días. En invierno, la desnervación no indujo al desarrollo de este fenómeno desnervatorio ni aun 68 días después del corte del nervio ciático.

En fibras lentas normalmente inervadas, Gilly y Hui (1980a) mostraron que la despolarización activa una corriente saliente de  $K^+$  del tipo del rectificador retardado, pero no se registra ninguna corriente entrante. Esto indica que la despolarización no activa la clásica corriente de  $Na^+$ ,

responsable del disparo del potencial de acción.

El efecto neurotrófico de la neurona motora sobre la capacidad de las fibras lentas de generar potenciales de acción puede ser ejercido:

- i) a nivel de la síntesis de la proteína canal de  $\text{Na}^+$ .
- ii) a nivel de la modificación postraducciona l de la proteína canal de  $\text{Na}^+$ .

Si se cumple el caso i) la proteína canal solo se expresaría en las fibras lentas desnervadas ya que normalmente la neurona reprimiría su síntesis; y si se cumple el caso ii) la proteína canal se hallaría presente en la membrana de la fibra lenta, pero en un estado constitutivamente inactivo. La desnervación induciría una modificación postraducciona l que la tornaría activable.

En ambos casos se requiere la acción de vías metabólicas específicas, que durante el invierno parecen estar inhibidas de expresarse, ante la "señal" desnervatoria. Esto podría ser explicado en los mismos términos que se argumentaron respecto de los cambios posdesnervatorios en las propiedades pasivas. En invierno, el ritmo metabólico sufriría una disminución, que inhibe el desarrollo de las señales intracelulares responsables de formular un nuevo estado fisiológico, en respuesta a la desnervación.

#### **Relación entre los Cambios Postdesnervatorios en las Propiedades Pasivas y Activas de las Fibras Lentas**

Cabe preguntarse si existe alguna relación entre los cambios en las propiedades electrofisiológicas pasivas observadas y

la capacidad de las fibras lentas de generar, o no, respuestas regenerativas.

Como se menciona (Capítulo II.C) las propiedades pasivas tienen gran importancia en la generación del potencial de acción. El umbral de disparo del potencial de acción está afectado por el potencial de reposo y por la resistencia transmembranal.

El potencial de membrana afecta el grado de activación de la población de los canales de  $\text{Na}^+$  activados por voltaje. Estos canales se inactivan con la despolarización de la membrana. En el presente trabajo se observó una hiperpolarización de la fibra lenta con la desnervación. Sin embargo no consideramos que este fenómeno pudo afectar directamente la capacidad de las fibras lentas de generar potenciales de acción. Como ya fue demostrado por Burke y Ginsborg (1956) la inexcitabilidad de las fibras lentas no se debe a una "depresión catódica": la hiperpolarización de la membrana de las fibras lentas normalmente inervadas, previo al pulso despolarizante, no induce la generación de un potencial de acción. Por lo tanto la hiperpolarización de las fibras lentas desnervadas no podría, por sí misma, afectar la excitabilidad de la fibra lenta.

Por su parte, la capacidad eléctrica de la membrana no afecta por sí misma la capacidad de generar potenciales de acción. Sin embargo, si el cambio operado en la capacidad eléctrica de las fibras lentas se debiera a un cambio relacionado con la fluidez de la membrana este fenómeno podría tener determinada proyección sobre la generación de potenciales de acción. La conformación de las proteínas es



altamente relevante para su función, y la conformación de las proteínas transmembranales (tal como el canal de  $\text{Na}^+$  activado por voltaje) puede verse afectada por las propiedades intrínsecas de las bicapas lipídicas que las contienen (Malhotra, 1980).

#### V.E. MODULACION DEL PROCESO DESNERVATORIO

El desarrollo de la capacidad de generar potenciales de acción es un fenómeno característico de las fibras lentas de anfibio (Miledi y col., 1971; Epstein y Beckerman, 1976). Las fibras lentas del músculo cruralis desarrollaron esta capacidad, aunque su latencia fue sustancialmente mayor que la que se observó para las fibras lentas del músculo piriformis de los mismos animales, y la reportada en la bibliografía.

La latencia con que se desarrolla un fenómeno desnervatorio es un importante parámetro a tener en cuenta, ya que puede permitir correlacionarlo con otros fenómenos desnervatorios. A partir de dicha correlación pueden buscarse relaciones de causa y efecto entre los distintos parámetros afectados por el proceso desnervatorio a nivel pre y postsináptico.

Se ha mostrado que la latencia de los fenómenos desnervatorios pre y postsinápticos está altamente regulada por la longitud del cabo distal remanente tras la desnervación. Cuanto mayor es dicho cabo, mayor es la latencia registrada (ver Capítulo II.A.3). Esto podría deberse a que un cabo distal de mayor longitud actuaría como

un reservorio mayor de la sustancia trofica, o que el proceso de descomposicion del terminal sinaptico es mas prolongado cuanto mayor es la longitud del cabo distal. Con el fin de analizar si la mayor latencia de las fibras lentas del musculo cruralis podria deberse a una posicion mas distal del musculo cruralis, respecto de las fibras lentas del musculo piriformis del mismo animal, respecto del punto de corte, se practico una desnervacion que acorto el cabo unido al musculo cruralis. Esto se logro cortando el nervio a la altura de su insercion en el musculo, y asi se acorto el cabo distal en aproximadamente 10mm. La latencia del desarrollo de la capacidad de generar potenciales de accion por parte de las fibras lentas de un musculo asi desnervado fue de 20 dias, acortandose asi la latencia en 5 dias.

Estos resultados se condicen con los obtenidos por Schallow y Schmidt (1977) que reportaron que la latencia aumenta, a 18°C, 0.36 dias por mm de nervio.

La latencia se acorto mas aun cuando la desnervacion pelviana fue acompanada de la inyeccion de  $\alpha$ -bungarotoxina al musculo cruralis. En estas condiciones la misma fue de 18 dias. La  $\alpha$ -bungarotoxina es un bloqueante de los receptores colinergicos. Miledi y Uchitel (1981) mostraron que la inyeccion de  $\alpha$ -bungarotoxina fue capaz por si misma de inducir a las fibras lentas a desarrollar la capacidad de generar potenciales de accion.

La aplicacion de  $\alpha$ -bungarotoxina imita a la maniobra desnervatoria en dos aspectos fundamentales:

- bloquea el acceso del neurotransmisor a su receptor

postsinaptico, lo que resulta equivalente al agotamiento del neurotransmisor por la degeneracion neuronal.

- bloquea la transmision de senales electricas, que se ejecuta justamente, via el neurotransmisor.

La aplicacion de  $\alpha$ -bungarotoxina resulta equivalente a cortar el nervio a la altura de la placa neuromuscular (cabo distal 0 mm).

La dependencia de la latencia de los procesos postdesnervatorios respecto de la longitud del cabo distal es considerada como indicativo de que dichos procesos estan regulados por una sustancia trofica, y en detrimento de la teoria que postula a la actividad como un factor regulador, ya que el corte del nervio produce una paralisis inmediata del musculo, independientemente de la longitud del cabo distal.

El hecho que la  $\alpha$ -bungarotoxina imitara y aun, acelerara el efecto de acortar el cabo distal, sugirio que la sustancia de accion trofica, responsable de reprimir el desarrollo del mecanismo de generacion de potencial de accion en las fibras lentas, era justamente el neurotransmisor acetilcolina (Miledi y Uchitel, 1981).

El bloqueo de la interaccion entre el neurotransmisor y su receptor postsinaptico podria inhibir cualquier otra accion secundaria del neurotransmisor sobre la celula postsinaptica que pueda ejercerse via dicho receptor (por ejemplo, por la accion de segundos mensajeros).

Si esta hipotesis fuera correcta la exposicion de las fibras

lentas desnervadas, en un sistema de cultivo de organo, a un agonista colinergico deberia inhibir el desarrollo de la capacidad de generar potenciales de accion.

Sin embargo el cultivo de fibras lentas del musculo cruralis en presencia de una dosis de hasta 5 $\mu$ M de carbacol no fue capaz de inhibir el desarrollo de la capacidad de las fibras lentas de generar potenciales de accion.

Estos resultados sugieren que la sustancia neurotransmisora no es por si misma el factor modulador de la excitabilidad en las fibras lentas. Miledi (1960) realizo experimentos similares en musculos de anfibio, analizando el desarrollo de hipersensibilidad a acetilcolina. El observo que la incubacion de musculos desnervados en presencia de acetilcolina no impide el desarrollo de la hipersensibilidad a la acetilcolina postdesnervatoria, a pesar que tal hipersensibilidad es desarrollada en musculos inyectados con  $\alpha$ -bungarotoxina (Drachman y col., 1982).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la aplicacion cronica de acetilcolina es un metodo controvertido. La acetilcolina es liberada basalmente en forma continua, pero el mayor pool de liberacion se realiza en forma cuantica con una frecuencia determinada. El receptor de acetilcolina es una proteina alosterica que se desensibiliza ante la presencia de altas concentraciones de ligando. Por ello la aplicacion de altas concentraciones de acetilcolina puede llevar a la desensitizacion del receptor. Esto equivaldria a aplicar un bloqueante del mismo y no un agonista.

Una estrategia alternativa para confrontar al musculo desnervado con la presencia de una mayor concentracion de acetilcolina seria aplicar inhibidores especificos de la enzima acetilcolinesterasa.

Si bien con la desnervacion se produce una disminucion en el nivel de actividad acetilcolinesterasica (Cangiano y col., 1980), esta actividad no es abolida. Su bloqueo por medios farmacologicos provocaria la exposicion del musculo desnervado a concentraciones mayores del neurotransmisor. Si este cumple un rol neurotrofico, la accion de los bloqueantes de acetilcolinesterasa deberian retrazar el fenomeno desnervatorio.

Two handwritten signatures in black ink. The signature on the left is more elaborate, with a long horizontal stroke at the end. The signature on the right is more compact and stylized.

## **REFERENCIAS**

Adrian, R.H. and Peachey, L.D. (1965)

The membrane capacity of frog twitch and slow muscle fibre.

J. Physiol. 181:324-336.

Adrian, R.H.; Chandler, W.K. y Hodgkin, A.L. (1970)

Voltage clamp experiments in striated muscle fibres.

J. Physiol. 208:607-644.

Adrian, R.H. y Peachey, L.D. (1973)

Reconstruction of the action potential of frog sartorius muscle.

J Physiol. 235:103-131.

Albuquerque, E.X.; Schuh, F.Y. y Kauffman, F.C. (1971)

Early membrane depolarization of the fast mammalian muscle after denervation.

Pfl. Arch. 328:36-50.

Antonov, V.F.; Shevchenko, E.V.; Kozhomkulov, E.T.; Mol'nar, A.A. y Smirnova, E.Yu. (1985)

Capacitive and ionic currents in BLM from phosphatidic acid in  $\text{Ca}^{2+}$ -induced phase transition.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 133:1098-1103.

Armstrong, C.M. y Bezanilla, F. (1973)

Currents related to movement of the gating particles of the sodium channel.

Nature 242:459-461.

Axelsson, J. y Thesleff, S. (1959)

A study of supersensitivity in denervated mammalian skeletal muscle.

J. Physiol. 149:178-193.

Bagaveev, I.A.; Petrov, V.V.; Zubarev, V.S.; Rovin, Y.G.;

Nedozorov, V.A. y Antonov, V.F. (1981)

The influence of phase transition on electric capacity of planar lipid membranes.

Biophysics 26:511-514.

Bekoff, A. y Betz, W.J. (1977)

Physiological properties of dissociated muscle fibres obtained from innervated and denervated adult rat muscle.

J. Physiol. 271:25-40.

Birks, R.; Katz, B. y Miledi, R. (1960)

Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction in the course of nerve degeneration.

J. Physiol. 150:145-168.

Bondi, A.Y.; Chiarandini, D.J. y Jacoby, J. (1986)

Induction of action potentials by denervation of tonic fibres in rat extraocular muscles.

J. Physiol. 374:165-178.

Bray, J.J.; Hawken, M.J.; Hubbard, J.L.; Pockett, S. y Wilson, L. (1976)

The membrane potential of rat diaphragm muscle fibres and



the effect of denervation.

J. Physiol. 255:651-667.

Brown, M.C. e Irons, R. (1978)

Sprouting and regression of neuromuscular synapses in partially denervated mammalian muscles.

J. Physiol. 278:325-348.

Burke, W. and Ginsborg, B.L. (1956)

The electrical properties of the slow muscle fibre membrane.

J. Physiol. 132:586-598.

Cangiano, A. (1985)

Denervation supersensitivity as a model for the neural control of muscle.

Neurosci. 14:963-971.

Cangiano, A.; Lomo, T.; Lützenberger, L. y Sveen, O. (1980)

Effect of chronic nerve conduction block on formation of neuromuscular junctions and junctional AChE in the rat.

Acta Physiol. Scand. 109:283-296.

Cangiano, A.; Magherini, P.C.; Fasino, E.; Pellegrino, M. y Risality, R. (1984)

Interaction between inactivity and nerve breakdown products in the origin of acute denervation changes in rat skeletal muscle.

J. Physiol. 355:345-365.

Carlson, R.C. (1975)

The possible role of cyclic AMP in the neurotrophic control of skeletal muscle.

J. Physiol. 247:343-361.

Catterall, W.A. (1980)

Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20:15-43.

Catterall, W.A. (1986)

Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels.

Ann. Rev. Biochem. 55:953-985.

Costa, M.R.C. y Catterall, W.S. (1984)

J. Biol. Chem. 259:8210-18.

Cull-Candy, S.G.; Miledi, R. and Uchitel, O.D. (1980)

Induction of action potentials in cultured slow muscle fibres of the frog.

J. Physiol. 299:197-202.

Drachman, D.B. (1970)

Neuromuscular transmission of trophic effects.

Ann. N.Y. Acad. Sci.

Drachman, D.B. (1973)

The role of acetylcholine as a neurotrophic transmitter.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 228:160-176.

Drachman, D.B.; Stanley, E.F.; Pestronk, A.; Griffin, J.W. y Price, D.L. (1982)

Neurotrophic regulation of two properties of skeletal muscle by impulse-dependent and spontaneous acetylcholine transmission.

J. Neurosci. 2:232-243.

Dulhunty, A.F. y Gage, P.W. (1973)

Electrical properties of toad sartorius muscle fibres in summer and winter.

J. Physiol. 230:619-641.

Edwards, C. (1979)

The effects of innervation on the properties of acetylcholine receptors in muscle.

Neurosci. 4:565-584.

Elsberg, C.A. (1917)

Experiments on motor nerve regeneration and the direct neurotization of paralyzed muscles by their own and by foreign nerves.

Science 45:318-320.

Engel, W.K. e Irwin, R.I. (1967)

A histochemical-physiological correlation of frog skeletal muscle fibers. '

Am. J. Physiol. 213:511-518.

Epstein, R. and Bekerman, A.J. (1976)

Development of denervatory action potentials in slow muscle fibers of the toad and its trophic dependence.

En: Electrobiological of Nerve, Synapse and Muscle. Ed J.P.

Reuben y col. Raven Press. New York. pp.169-178.

Falk, G. y Fatt, P. (1963)

Linear electrical properties of striated muscle fibres observed with intracellular electrodes.

Proc. R. Soc. Lond. B 160:69-123.

Farner, D.S. (1985)

Annual Rhythms.

Ann. Rev. Physiol. 47:65-82.

Fedorov, V.V.; Magazanik, L.G., Snetkov and Zefirov, A.L.  
(1982)

Postsynaptic currents in different types of frog muscle fibres.

Pflugers Arch. 394:202-210.

Gallardo, J.M. (1974)

Anfibios de los alrededores de Buenos Aires.

Editorial Universidad de Buenos Aires.

Gilly, W.F. (1975)

Slow fibers in the frog cruralis muscle.

Tissue and Cell 7:203-210.

Gilly, W.F. and Hui, C.S. (1980a)

Membrane electrical properties of frog slow muscle fibres.

J. Physiol. 301:157-173.

Gilly, W.F. and Hui, C.S. (1980b)

Voltage-dependent charge movement in frog slow muscle fibres.

J. Physiol. 301:175-190.

Guth, L. (1968)

'Trophic' influences of nerve on muscle.

Physiol. Rev. 48:645-687

Guth, L. y Zalewski, A.A. (1963)

Disposition of cholinesterase following implantation of nerve into innervated and denervated muscle.

Exptl. Neurol. 7:316-326.

Harris, A.J. and Miledi, R. (1972)

A study of frog muscle maintained in organ culture.

J. Physiol. 221:207-226.

Hille, B. (1984)

"Ionic Channels of Excitable Membranes"

publicado por Sinauer Ass. Inc., Sunderland, Massachusetts.

Hinsey, J.C. (1934)

The innervation of skeletal muscle.

Physiol. Rev. 14:514-585.

Hodgkin, A.L. y Rushton, W.A.H. (1946)

The electrical constants of a crustacean nerve fibre.  
Proc. Roy. Soc. B. 133:444-479.

Jacobson, K y Papahadjopoulos, D. (1975)

Phase transition and phase separation in phospholipid  
membranes induced by changes in temperature, pH and  
concentration of bivalent cations.  
Biochem. 14:152-161.

Papahadjopoulos, D. y Portis, A. (1978)

Calcium-induced lipid phase transitions and membrane fusion.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 308:50-66.

Johns, T.R. y Thesleff, S. (1961)

Effects of motor inactivation on the chemical sensitivity of  
skeletal muscle.  
Acta Physiol. Scand. 51:136-141.

Katz, B. y Thesleff, S. (1957)

A study of the "desensitization" produced by acetylcholine  
at the motor end-plate.  
J. Physiol. 138:63-80.

Katz, B. y Miledi, R. (1964)

The development of acetylcholine sensitivity in nerve-free  
segments of skeletal muscle.  
J. Physiol. 170:389-396.

Kuffler, S. and Vaughan Williams, E.M. (1953)

Small-nerve junctional potentials. The distribution of small motor nerves to frog skeletal muscle, and the membrane characteristics of the fibres they innervate.

J. Physiol. 121:289-317.

Lannergren, J. (1979)

An intermediate type of muscle fibre in *Xenopus laevis*.

Nature 279:254-256.

Lavoie, P.A.; Collier, B. y Tenenhouse, A. (1976)

Comparison of alpha-bungarotoxin binding to skeletal muscles after inactivity of denervation.

Nature 260:349-350.

Lomo, T. y Westgaard, R.H. (1975)

Further studies on the econtrol of Ach sensitivity by muscle activity in the rat.

J. Physiol. 252:603-626.

Luco, J.V. y Eyzaguirre, C. (1955)

Fibrillation and hypersensitivity to Ach in denervated muscle: effects of length of degenerating nerve fibres.

J. Neurophysiol. 18:65-73.

Malhotra, S.K. (1980)

Organization, composition and biogenesis of animal cell membranes.

En: Membrane Structure and Function. Vol 1. Ed por E.E.

Bittar. pp.1-72.

McArdle, J.J. (1983)

Molecular aspects of the trophic influence of nerve on muscle.

Prog. Neurobiol. 21:135-198.

Messner, D.J. y Catterall, W.A. (1985)

J. Biol. Chem. 260:10597-604.

Miledi, R. (1960)

The acetylcholine sensitivity of frog muscle fibres after complete or partial denervation.

J. Physiol. 151:1-23.

Miledi, R. (1962)

Induced innervation of end plate free muscle segments.

Nature 193:281-282.

Miledi, R. y Slater, C.R. (1968)

Electrophysiology and electromicroscopy of rat neuromuscular junctions after nerve degeneration.

Proc. Roy. Soc. Lond. B 169:289-306.

Miledi, R. y Slater, C.R. (1970)

On the degeneration of the rat neuromuscular junctions after nerve section.

J. Physiol. 207:507-528.



Miledi, R. and Uchitel, O.D. (1981)

Induction of action potentials in frog slow muscle fibres  
paralysed by  $\alpha$ -bungarotoxin.

Proc. R. Soc. Lond. B 213:243-248.

Miledi, R.; Stefani, E. and Steinbach, A.B. (1971)

Induction of the action potential mechanism in slow muscle  
fibres of the frog.

J. Physiol. 217:737-754.

Miledi, R.; Parker, I. y Schallow, G. (1981)

Calcium transients in normal and denervated slow muscle  
fibres of the frog.

J. Physiol. 318:191-206.

Morgan, D.L. y Proske, U. (1984)

Vertebrate slow muscle: its structure, pattern of  
innervation and mechanical properties.

Physiol. Rev. 64:103-169.

Nicholls, J.G. (1956)

The electrical properties of denervated skeletal muscle.

J. Physiol. 131:1-12.

Orkand, P.M.; Orkand, R.K. y Cohen M.W. (1978)

Distribution of acetylcholine receptors on xenopus slow  
muscle fibres determined by  $\alpha$ -bungarotoxin binding.

Neurosci. 3:435-446.

Papahadjopoulos, D. y Portis, A. (1978)

Calcium-induced lipid phase transitions and membrane fusion.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 308:50-66.

Peachey, L.D. y Huxley, A.F. (1962)

Structural identification of twitch and slow striated muscle  
fibers of the frog.

J. Cell Biol. 13:177-180.

Redfern, P.; Lundh, H. y Thesleff, S. (1970)

Tetrodotoxin resistant action potentials in denervated rat  
skeletal muscle.

Eur. J. Pharmac. 11:263-265.

Rojas, E. y Armstrong, C.M. (1971)

Nature 229:177-178.

Rudy, B. (1988)

Diversity and ubiquity of K channels.

Neurosci. 25:729-749.

Schalow, G. and Schmidt, H. (1977)

Effect of nerve length and temperature on the induction of  
action potentials in denervated slow muscle fibres of the  
frog.

Pflugers Arch. 372:17-22.

Stefani, E. and Steinbach, A.B. (1969)

Resting potential and electrical properties of frog slow

muscle fibres. Effect of different external solutions.  
J. Physiol. 203:383-401.

Thesleff, S. (1960)  
Supersensitivity of skeletal muscle produced by botulinum  
toxin.  
J. Physiol. 151-598.

Thesleff, S. (1973)  
Physiological effects of denervation of muscle.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 228:89-103.

Tiegs, O.W. (1953)  
Innervation of voluntary muscle.  
Physiol. Rev. 33:90-144.

Tower, S.S. (1937)  
Function and structure in the chronically isolated  
lumbo-sacral spinal cord of the dog.  
J. Comp. Neurol. 67:109-132.

Uchitel, O.D. y Robbins, N. (1978)  
On the appearance of acetylcholine receptors in denervated  
rat diaphragm, and its dependence on nerve stump length.  
Brain Res. 153:539-548.

Verma, V. y Reese, T.S. (1984)  
• Structure and distribution of neuromuscular junctions on  
slow muscle fibers in the frog.

Neurosci. 12:647-662.

Ware, F.; Bennett, A.L. y McIntyre, A.R. (1951)

Membrane resting potential of denervated mammalian skeletal muscle measured in vivo.

Am. J. Physiol. 173:115-118.

Wernig, A. y Fischer, M. (1986)

The nerve-muscle junction: a remodelling contact.

Exp. Brain Res. 14:245-255.

## ABSTRACT

### ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY OF SLOW FIBRES OF DENERVATED CRURALIS MUSCLES IN VIVO AND IN ORGAN CULTURE.

Two types of fibres have been characterized in the cruralis muscle of the toad: slow and fast. The slow population was shown to be abundant and easily approached by intracellular microelectrodes.

The slow fibres of denervated cruralis muscles developed the capability to produce action potentials 25 days after the sciatic nerve was transected at the hip level. This latency was reduced to 20 days when the nerve was cut at its entrance to the muscle. The injection of  $\alpha$ -bungarotoxin to the denervated muscle reduced the latency to 18 days. Cruralis muscles were organ cultured (18°C) for up to 30 days. Slow fibres developed regenerative responses after 24 days in culture.

The development of action potentials was shown to be seasonal dependent.

Slow fibres of denervated muscles in vivo and in organ cultured maintained the basic electrophysiological properties, but there was found a significant decrease in the time constant value.

The  $\alpha$ -bungarotoxin effect on the latency of the denervatory phenomenon suggested that acetylcholine may play a neurotrophic role. Cruralis muscles were cultured in the presence of carbachol (1-5  $\mu$ M), an acetylcholine agonist. This colinergic agent did not affect the capability of slow fibres to develop regenerative responses in vitro.

The cruralis muscle was shown to be a good source of slow fibres. Our results suggest that acetylcholine may play an important role in the excitability of these cells but this agent doesn't seem to be, by itself, the critical factor.