

Métodos experimentales en fisiología animal

Manual de prácticas audiovisuales

Julieta Troncoso



**Métodos experimentales
en fisiología animal:
manual de prácticas
audiovisuales**

Métodos experimentales en fisiología animal: manual de prácticas audiovisuales

Julieta Troncoso



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Bogotá, D. C., Colombia, 2025

© Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Sede Bogotá
© Julieta Troncoso

Primera edición, 2025
ISBN 978-628-503-055-0 (digital)

Edición

Alejandro Cano Moreno
Coordinación de Publicaciones, Facultad de Ciencias, Sede Bogotá
coopub_fcbog@unal.edu.co

Corrección de estilo

Alejandro Cano Moreno

Diseño de carátula

Damián Crofort

Licencia CC BY-NC-ND



Editado en Bogotá, D. C., Colombia

Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia

Troncoso, Julieta, 1974-

Métodos experimentales en fisiología animal : manual de prácticas audiovisuales / Julieta Troncoso. -- Primera edición. -- Bogotá : Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias : Coordinación de Publicaciones Facultad de Ciencias, 2025.

1 recurso en línea (84 páginas): ilustraciones (algunas a color), diagramas. -- (Colección Notas de clase).

Incluye referencias bibliográficas al final de cada capítulo.
ISBN 978-628-503-055-0 (digital)

1. Universidad Nacional de Colombia -- Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Fisiología Animal (Asignatura) 2. Fisiología animal -- Manuales de laboratorio 3. Fisiología animal -- Estudio y enseñanza -- Exámenes, preguntas, etc. 4. Fisiología del sistema musculoesquelético -- Materiales audiovisuales 5. Electrofisiología -- Métodos audiovisuales 6. Transporte biológico activo 7. Canales iónicos 8. Potenciales de acción (Electrofisiología) 9. Bombas iónicas 10. Contracción muscular 11. Fatiga muscular 12. Bufo marinus -- Fisiología 13. Rhinella marina 14. Bufónidos -- Disección 15. Bienestar animal 16. Alternativas al uso de animales 17. Refinamiento de técnicas de pruebas de animales 18. Manuales de laboratorio I. Título II. Serie

CDD-23 571.10724 / 2025

Contenido

Presentación	3
Introducción	5
Práctica # 1. Transporte activo transepitelial. Medición de la corriente de cortocircuito a través de la piel del sapo <i>Rhinella marina</i>.....	7
Objetivos	8
Marco teórico conceptual	9
Materiales y métodos	19
Resultados	22
Referencias bibliográficas	24
Guía de preguntas de la práctica # 1	25
Práctica # 2. Potencial de acción compuesto en el nervio ciático del sapo <i>Rhinella marina</i>.	27
Objetivos	28
Marco teórico conceptual	29
Materiales y métodos	42
Resultados	44
Referencias bibliográficas	50
Guía de preguntas de la práctica # 2	51

Práctica # 3. Contracción isométrica del músculo gastrocnemio sapo <i>Rhinella marina</i>.	54
Objetivos	55
Marco teórico conceptual	56
Materiales y métodos	66
Resultados	70
Referencias bibliográficas.....	76
Guía de preguntas de la práctica # 3.....	77

Tabla de figuras

Práctica # 1. Transporte activo transepitelial. Medición de la corriente de cortocircuito a través de la piel del sapo *Rhinella marina*.....7

Figura 1. Representación estructural y funcional del epitelio de la piel del sapo.....	11
Figura 2. Cámara de Ussing.....	15
Figura 3. Preparación experimental de la práctica.....	21
Figura 4. Medición del voltaje transepitelial tras la aplicación de una corriente externa.....	23

Práctica # 2. Potencial de acción compuesto en el nervio ciático del sapo *Rhinella marina*.....27

Figura 1. Registros intracelulares vs extracelulares.....	32
Figura 2. El nervio ciático y sus propiedades morfológicas y funcionales.....	35

Figura 3. El potencial de acción compuesto en el nervio es bifásico....	37
Figura 4. Montaje experimental.....	38
Figura 5. Períodos refractarios.....	41
Figura 6. Búsqueda de umbrales de respuesta en el nervio ciático del sapo.....	45
Figura 7. Estimación de la velocidad de conducción en el nervio ciático del sapo.....	46
Figura 8. Período refractario absoluto y relativo en el nervio ciático del sapo.....	47
Figura 9. Respuesta en el nervio ciático del sapo ante un tren de estímulos.....	48
Figura 10. Aplicación de xilocaína.....	49

Práctica # 3. Contracción isométrica del músculo gastrocnemio sapo *Rhinella marina*.....54

Figura 1. Contracción muscular en respuesta a la frecuencia de estimulación.....	64
Figura 2. Procedimiento quirúrgico y preparación experimental.....	67
Figura 3. Montaje experimental.....	68
Figura 4. Búsqueda de umbrales de respuesta en el nervio ciático del sapo.....	71
Figura 5. Pares de estímulos.....	72
Figura 6. Tren de estímulos de alta frecuencia.....	74
Figura 7. Tren de estímulos de baja frecuencia.....	75

Presentación

En la carrera de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, los contenidos de la Fisiología Animal se dividen en dos asignaturas: la primera (Fisiología Animal), se centra en temas de fisiología molecular y celular; la segunda (Fisiología Animal de Sistemas), aborda la fisiología de órganos y sistemas de órganos de diversos animales, con un enfoque comparado. Estas notas de clase servirán a los estudiantes para profundizar los temas de la primera parte de la fisiología y constituyen una actualización de las Notas de Clase de Fisiología Animal, publicadas en el año 2003 por la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

En Colombia, el sacrificio de animales de experimentación con fines formativos está prohibido por el Artículo 25 de la Ley 84 de 1989. A partir de esto, los profesores de asignaturas teórico-prácticas como Fisiología Animal, hemos decidido modificar la forma en que mostramos la parte experimental (utilizando animales de laboratorio) a nuestros estudiantes. Una alternativa que encontramos válida para que los estudiantes puedan tener acceso a aquellos experimentos con animales que permitieron demostrar aspectos fundamentales de la fisiología animal, fue la utilización de un único (y último) ejemplar de *Rhinella marina* para realizar y grabar en vídeo las prácticas de la asignatura. Estos vídeos son los que los estudiantes observarán, analizarán, discutirán y

utilizarán para la consolidación de conceptos, en forma individual y grupal, durante las prácticas en el salón de clases. Los profesores **Edgar Cristancho**, **Marcela Camacho** y yo (del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias) y el profesor **Alejandro Múnera** (del Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Medicina), fuimos los que realizamos estas prácticas en el Laboratorio de Neurofisiología Comportamental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Los videos fueron grabados por el personal especializado de Unimedios y editados por el monitor de la asignatura, Iván Páez Gutiérrez.

Julieta Troncoso

Bogotá, D.C, mayo de 2024

Introducción

La fisiología es la rama del conocimiento que intenta explicar de qué manera funcionan los organismos. Es decir, abarca el estudio de los procesos y mecanismos que llevan a cabo los seres vivos para mantener las condiciones homeostáticas que les permiten, justamente, la supervivencia. En el caso de la fisiología animal, esta disciplina aborda esta temática desde el punto de vista celular, de órganos, de sistemas de órganos y del organismo completo.

Estas notas de clase contienen un marco teórico de las prácticas de la asignatura Fisiología Animal de la carrera de Biología, que ayudarán a los estudiantes a comprender los conceptos fundamentales que se abordarán en cada una de ellas. Además, se encuentra la explicación del diseño experimental utilizado en cada caso, que proporcionará a los estudiantes una mejor comprensión de lo realizado experimentalmente en las prácticas, a través de ayudas esquemáticas y dibujos. Adicionalmente, los estudiantes tendrán acceso a los resultados obtenidos de manera experimental (mediciones de señales electrofisiológicas, en su mayoría), que les permitirán analizar y sacar conclusiones de cada experimento. Por último, una guía de preguntas acompaña el final de cada práctica, con la intención de que los estudiantes puedan responderla, al finalizar la misma, de manera grupal y a modo de informe.

En total, estas notas de clase abarcan tres prácticas experimentales que se presentarán a los estudiantes en forma audiovisual. En la primera de ellas, se aborda el tema de transporte activo. Para ello, se mostrarán las mediciones de la diferencia de voltaje transepitelial y de los valores de corriente de cortocircuito, con intenciones de que los estudiantes puedan calcular la cantidad de bombas Na^+/K^+ presentes en la piel abdominal del sapo. Se trabajará sobre los conceptos de transportadores, bombas y canales iónicos y se hará énfasis en las características de los transportes de sustancias pasivo y activo. En la segunda, se mostrará el registro del potencial de acción compuesto en el nervio ciático del sapo. Se hará énfasis en los conceptos de umbral de respuesta, el reclutamiento de fibras nerviosas, la característica todo-o-nada del potencial de acción, la velocidad de conducción y los períodos refractarios. En la última, se mostrarán las mediciones de la contracción isométrica del músculo gastrocnemio, estimulando el nervio ciático. Se abordarán conceptos de umbral de estimulación, electromiograma, fuerza de contracción, sumación, contracción tetánica y fatiga muscular.

Estas notas de clase, entonces, constituyen un complemento importante para la consolidación de conceptos de la fisiología abordados en el componente teórico de la asignatura Fisiología animal.

Práctica I

Transporte activo transepitelial

Medición de la corriente de cortocircuito a través de la piel del sapo *Rhinella marina*

A continuación, los estudiantes encontrarán una guía que le permitirá acceder al marco teórico de la práctica, así como la explicación del montaje experimental, el método de registro, el complejo instrumental utilizado y el procedimiento para determinar la diferencia de potencial transepitelial y las mediciones de corrientes de cortocircuito, a través de la piel del sapo. Al final del documento, encontrarán una serie de preguntas que deberán responder una vez hayan visto el video correspondiente.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo de la práctica

El objetivo de esta práctica es la medición de la corriente de cortocircuito que anula la diferencia de potencial a través del epitelio abdominal del sapo. La corriente de cortocircuito será un indicador, indirecto, del movimiento activo del sodio a través de la piel y, por lo tanto, será utilizado para calcular las bombas de sodio-potasio presentes en esta estructura.

1.1.2. Objetivo pedagógico

El objetivo pedagógico de esta práctica consiste en consolidar conceptos de transporte simple, facilitado, pasivo y activo. Asimismo, se reconocerán diferencias entre las estructuras capaces de transportar iones (canales, transportadores, bombas), en cuanto a su disposición en las membranas celulares, velocidad de transporte y gasto (o no) de

energía para realizar el transporte. De igual manera, se repasarán conceptos de “diferencia de potencial” entre compartimientos separados por membranas semipermeables y “corriente iónica” y la relación entre ambos a través de la Ley de Ohm. Se hará énfasis en las unidades de medición y sus escalas (milivoltios, microamperios).

1.2. Marco teórico conceptual

La piel abdominal de los sapos

Los epitelios cumplen funciones de barrera, ya sea entre el organismo y el medio que lo rodea (piel) o entre compartimientos corporales (revestimiento de órganos huecos, glándulas). Algunos epitelios están encargados, únicamente, de la función de separación pasiva entre compartimientos, sin ocuparse de un transporte preferente de solutos y/o agua. En el caso de los anfibios, como los sapos, el transporte activo a través de la piel un proceso crucial para su supervivencia y homeostasis.

La piel de los sapos es un órgano multifuncional que desempeña un papel vital en la respiración, la excreción, la termorregulación y la absorción de agua y electrolitos. A través del proceso de transporte activo, los sapos pueden regular la concentración de iones en su cuerpo, especialmente de sodio, potasio y cloruro. Este transporte iónico es esencial para mantener el equilibrio osmótico y la homeostasis de fluidos en el cuerpo del sapo, especialmente en ambientes acuáticos donde la regulación de la osmorregulación es crítica.

Además de los iones, la piel del sapo también puede absorber agua. Esto se logra mediante la regulación del transporte activo de iones, que crea un gradiente osmótico que favorece la entrada de agua a través de la piel. Sumado a ello, la piel del sapo también desempeña un papel

en la excreción de desechos metabólicos y toxinas. Algunas sustancias pueden ser secretadas activamente a través de la piel, mientras que otras pueden ser absorbidas y luego excretadas a través de otros órganos excretores, como los riñones.

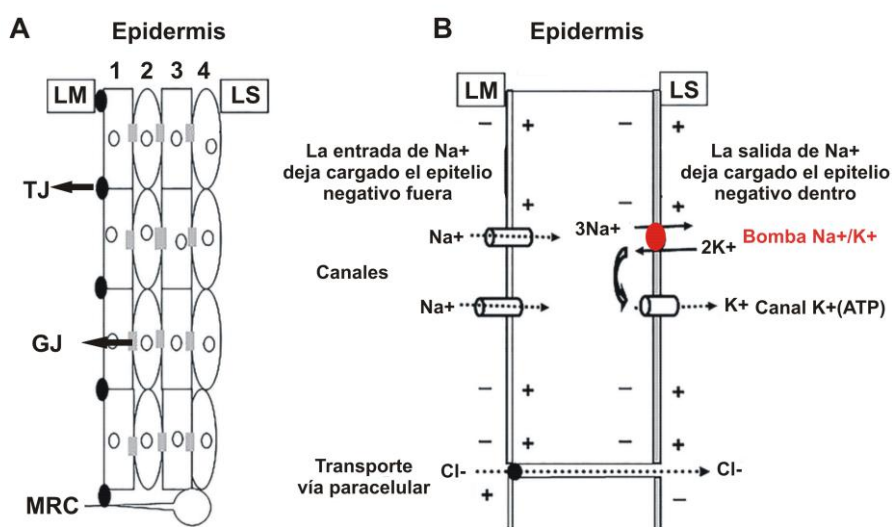
Dado que son animales que viven tanto en ambientes terrestres como acuáticos, los sapos han desarrollado adaptaciones fisiológicas para optimizar el transporte activo a través de su piel. Por ejemplo, en ambientes secos, pueden reducir la pérdida de agua cerrando sus poros cutáneos, mientras que, en ambientes acuáticos, aumentan la absorción de agua y electrolitos. Es decir, el transporte activo a través de la piel del sapo es un proceso vital que permite la regulación de la homeostasis y la supervivencia de estos animales en una variedad de ambientes.

Cabe aclarar que el transporte activo de solutos también ha sido descrito en otras estructuras como la vejiga urinaria de anfibios, las branquias de peces, el intestino de vertebrados e invertebrados, túbulos renales y vesícula biliar de vertebrados.

Epidermis estratificada del sapo

La piel del sapo, como todos los epitelios, está compuesto de células polarizadas. Es decir, las células que forman parte del epitelio tienen diferentes composiciones en sus caras apicales y basales. En la Figura 1A puede apreciarse que la epidermis del sapo está estratificada en cuatro capas, a saber, de apical a basal: 1, estrato córneo, 2, estrato granuloso, 3, estrato espinoso y 4, estrato germinativo. En un esquema simplificado, puede considerarse que la piel posee dos caras: el lado mucosal (LM), que está en contacto con el medio exterior y el lado serosal (LS), que está en contacto con el interior del sapo (Figura 1B). Como se mencionó en el apartado anterior, el sapo tiene estrategias para el transporte de electrolitos del medio, de modo tal de asegurar una correcta osmorregulación. Para eso, las células del epitelio poseen distintas vías de transporte de iones (Jared & Rao, 1017).

La Figura 1B es un esquema simplificado del epitelio del sapo, donde puede apreciarse que el lado mucosal posee sistemas de transporte pasivo a través de canales iónicos que permean sodio (Na^+). Dado que las concentraciones de Na^+ son muy bajas en el interior de las células, el ion tenderá a entrar de manera pasiva por estos canales. La corriente de Na^+ generará una acumulación de cargas positivas al interior celular (y negativas, en el exterior). La cara serosal, en cambio, posee bombas de sodio-potasio (Na^+/K^+) ATPasas, que se encargarán de mover ambos solutos en contra de sus gradientes de concentración, con gasto energético (ATP). Por último, el ion cloruro (Cl^-) se mueve hacia el interior del animal por la vía paracelular (Figura 1B) (Jared & Rao, 1017).



Jared & Rao, 2017 y modificado por Julieta Troncoso para fines didácticos de estas notas de clase.

Figura 1. Representación estructural y funcional del tejido epitelial abdominal del sapo. A: representación esquemática que muestra la sección transversal de la piel del sapo. Las células principales, predominantes en la epidermis de la rana (células P, graficadas como

rectángulos y óvalos), están intercaladas con células ricas en mitocondrias (MRC), más escasas. La epidermis está compuesta de cuatro capas nombradas, desde la más superficial (apical) a la más profunda (basal): 1, estrato córneo; 2, estrato granuloso; 3, estrato espinoso; y 4, estrato germinativo o estrato basal. TJ (*Tight Junctions* o uniones estrechas): se observan en los márgenes apicales de la capa más externa. GJ (*Gap Junctions* o uniones en hendidura): se observan en todas las capas del epitelio. Observe que la epidermis funciona como una doble membrana con una superficie apical externa (LM, lado mucosal) y una superficie serosa interna (LS, lado serosal). B: la piel del sapo se representa como una estructura de doble membrana. El lado mucosal (LM) está rodeado de TJ con canales Na^+ epiteliales donde se da el transporte facilitado pasivo de este ion. El lado serosal (LS) contiene bombas Na^+/K^+ -ATPasas (que mantienen la electronegatividad neta debido al intercambio $3\text{Na}^+ / 2\text{K}^+$) y los canales de K^+ dependientes de ATP (que dejan fluir K^+ , aumentando así la electronegatividad cuando el nivel de ATP de las células P es bajo). El movimiento de los iones Cl^- a través del epitelio se realiza por vía paracelular. Un desequilibrio entre el transporte de Na^+ y Cl^- conduce al desarrollo de una diferencia de voltaje (diferencia de potencial) a través del epitelio.

La bomba Na^+/K^+ . Diferencia de potencial transepitelial

Las bombas son proteínas transmembranales que transportan iones en contra de su gradiente y, por lo tanto, incurren en gasto energético para hacerlo (es decir, es una proteína de transporte con la capacidad enzimática de hidrolizar ATP). En el caso de la bomba Na^+/K^+ , el transporte tanto del ion Na^+ como del ion K^+ , es contra de sus gradientes de concentración. Un promedio de 3 iones de sodio y 2 iones de potasio son transportados por la bomba, por cada molécula de ATP hidrolizada. El requerimiento del sodio es absoluto: es el único ion

aceptado para el transporte neto hacia afuera de la célula y es el único catión monovalente que no es aceptado para su movimiento hacia el interior celular. Por el contrario, el requerimiento del potasio no es absoluto para el funcionamiento de la bomba. De este modo, el litio, amonio, rubidio, cesio y talio pueden sustituir al potasio en la solución externa (pero no al sodio en la solución interna). En ausencia de potasio, la bomba actúa de modo no-acoplado, sacando sodio de la célula a un 10% de su capacidad. La bomba es bloqueada específicamente por glucosídicos digitálicos como ouabaína. Además, dada su dependencia del ATP, es bloqueada por venenos como el cianuro.

En el caso del epitelio de la piel abdominal del sapo, la bomba moverá hacia el interior del sapo 3 iones de Na^+ (hacia fuera de la célula por el lado serosal) y, simultáneamente, moverá 2 iones de K^+ hacia el interior celular (Figura 1B). Este desbalance de cargas transportadas hace que la bomba sea electrogénica: deja una carga negativa neta del lado de adentro de la célula (sobre la membrana basal o lado serosal), por cada intercambio de estos dos iones (dado que saca 3 cargas positivas, pero introduce 2 al interior celular) (Figura 1B).

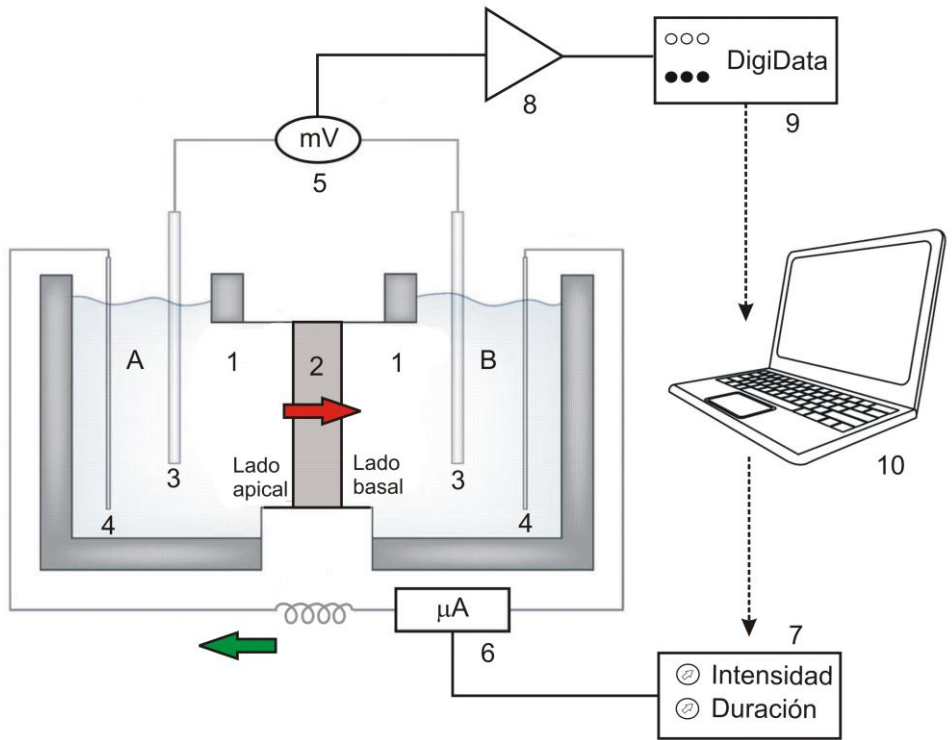
El potasio introducido al interior celular puede moverse a través de canales de potasio dependientes de ATP hacia fuera de la célula, en función de la disposición de ATP. Por último, el anión cloruro (Cl^-) se verá atraído por la acumulación de cargas positivas del lado externo de la membrana serosal y se moverá hacia el interior del sapo a través de transporte para-celular (Figura 1B).

Entonces, al colocar electrodos que midan la diferencia de potencial entre el lado mucosal y el lado serosal, encontrará un valor de voltaje distinto de cero (ya que hay una distribución de cargas desigual en uno y otro lado del epitelio). A este valor se lo denomina diferencia de potencial transepitelial.

El transporte activo a través de la piel de sapo

Muchos experimentos se hicieron para demostrar los distintos tipos de transporte de iones en el epitelio de la piel de sapo, principalmente el transporte activo. Algunos de ellos tuvieron lugar en la cámara de Ussing, que es una herramienta muy útil para el estudio del transporte iónico en membranas epiteliales. Esta cámara fue desarrollada por el fisiólogo danés Hans Henriksen Ussing, en 1946 y desde entonces se ha convertido en una técnica estándar en la investigación fisiológica.

La Figura 2 muestra un esquema general de la cámara de Ussing utilizada en la actualidad, que consiste en un arreglo experimental que permite la separación de dos compartimentos (A y B) a través de una membrana epitelial entre ellos (2). Ambos compartimentos están bañados por una solución fisiológica salina de prueba, de igual composición (1), por ejemplo, solución Ringer de anfibio. Dos electrodos de registro electrofisiológico (3) permiten obtener la medición del voltaje de membrana transepitelial (a través de un voltímetro, 5). Estas señales electrofisiológicas son muy pequeñas y, por lo tanto, deben amplificarse (8). Asimismo, al ser señales análogas, deben digitalizarse mediante una tarjeta digitalizadora (9) para poder procesarse, almacenarse y analizarse en un computador (10). El sistema permite ubicar un par de electrodos de estimulación (4) que, conectados a una pila y a una resistencia, hacen fluir corriente entre ambos compartimentos y pueden ser medidas por un amperímetro (6). Esta corriente se suministra en forma de pulsos cuadrados, cuya dirección, intensidad y duración puede ser modificada por el experimentador a través de un generador de pulsos de corriente (7).



Hoenig & Zeidel, 2014 y modificado por Julieta Troncoso para fines didácticos de estas notas de clase.

Figura 2. Cámara de Ussing. Esta cámara consiste en dos compartimientos (A y B) llenos de una solución de Ringer de anfibio de igual concentración (1), separados por el epitelio de la piel del sapo (2). Notar que el lado mucosal del epitelio (apical) está en contacto con el compartimiento A, mientras que el lado seroso (basal), está en contacto con el compartimiento B. La medición de la diferencia de potencial entre ambos compartimientos (en mV, a través de un voltímetro, 5) se obtiene utilizando electrodos de registro (3) colocados en A y B. Un circuito externo puede aplicar corriente (medida en mA, por un amperímetro, 6) a través de dos electrodos de estimulación (4) conectados a un generador de pulsos de corriente (7). Este generador de pulsos puede regular la duración y la intensidad de cada estímulo de corriente. Las señales de diferencia de potencial se amplifican (6) y se digitalizan (9) antes de ser

almacenadas para ser analizadas en un computador (10). El computador, además, controla la generación de pulsos de corriente. La corriente neta de sodio (Na^+) se indica con la flecha roja (del compartimiento A al B). La corriente a través del circuito externo, con la flecha verde. Cuando ambas corrientes son de igual magnitud, pero de sentido contrario, se obtiene la corriente de cortocircuito, que lleva la diferencia de potencial a 0 mV (es decir, la disipa).

¿Cómo se determinó que se trataba de un transporte activo?

En el año 1947, Ussing utilizó dos isótopos del ion de Na^+ para medir flujos bidireccionales entre ambos compartimientos (A y B, Figura 2) de la cámara. La solución Ringer del compartimiento A contenía Na^{22} , mientras que la del compartimiento B, Na^{24} . Esto permitía hacer un seguimiento en el tiempo del flujo de Na^+ y le permitió concluir que había un movimiento neto de este ion del compartimiento A al B (flecha roja, Figura 1). Varios experimentos adicionales llevaron a concluir que este movimiento era el resultado de un transporte activo del ion sodio. Algunos de esos experimentos fueron:

- a. Se produce aún en ausencia de gradiente de concentración (químico) y eléctrico; inclusive se observa en contra del gradiente electroquímico
- b. Es bloqueado por inhibidores generales del metabolismo (como el cianuro) y por inhibidores específicos de la bomba Na^+/K^+ (como la ouabaína)
- c. Es dependiente de la temperatura y presenta cinética de saturación, por lo que debe implicar la acción de una proteína/enzima
- d. Es específico para el ion Na^+ y no funciona con iones similares en tamaño y carga (como el Li^+)

Corriente de cortocircuito

La corriente de cortocircuito es una medida utilizada en estudios fisiológicos que se refiere a la corriente eléctrica que fluye a través de una membrana epitelial, cuando se anulan los gradientes de concentración y eléctrico que normalmente existen a través de dicha membrana. Las correspondencias eléctricas del transporte activo de Na^+ fueron descritas inicialmente por Ussing y Zehran, en 1951. Ellos razonaron que si sólo Na^+ es transportado activamente a través del epitelio, debe haber una concordancia cuantitativa entre el número de iones Na^+ transportados por segundo a través de un área unitaria de piel (Figura 2, flecha roja) y la amplitud del potencial resultante. Los investigadores anularon la formación de una diferencia de potencial, haciendo fluir corriente por un sistema externo (Figura 2, flecha verde). El ajuste a cero de la diferencia de potencial se logra, entonces, haciendo circular una corriente a través de un circuito externo de igual intensidad, pero en sentido contrario, de la corriente neta de Na^+ provocada por la bomba Na^+/K^+ . Dado que los investigadores eran los que aplicaban la corriente externa y, por lo tanto, conocían su intensidad, podían equiparar la corriente de cortocircuito con la cantidad neta de Na^+ transportado a través de la piel por unidad de tiempo. Experimentalmente, además, los investigadores encontraron una gran concordancia entre la corriente a través de la piel y el flujo de sodio medido isotópicamente.

¿Cómo se determinó la disposición de las proteínas membranales transportadoras en el epitelio de la piel del sapo?

Como muestra la Figura 1, las células que forman el epitelio de la piel del sapo están fuertemente unidas por *Tight junctions* o uniones estrechas (TJ). De esta manera, las sustancias que atraviesan el epitelio deben hacerlo primero por la cara mucosal y luego por la cara serosal de las células que lo componen. Esto implica que debe haber expresión diferencial de proteínas de membrana que faciliten el transporte en las

membranas mucosal (apical) y serosal (basal). Una gran cantidad de experimentos apoyan la hipótesis de esta distribución desigual de proteínas transmembrana. Algunos de ellos fueron:

- a. La ouabaína, bloqueador específico de la bomba Na^+/K^+ , inhibe el transporte transepitelial de Na^+ solo cuando es colocada del lado serosal del epitelio. No tiene efecto alguno del lado mucosal.
- b. El fármaco amilorida, un inhibidor del co-transportador Na^+/H^+ bloquea el movimiento de Na^+ sólo cuando se aplica del lado mucosal del epitelio.
- c. El transporte activo máximo de Na^+ se obtiene con concentraciones de K^+ del lado interno, pero no se necesita este ion del lado externo.
- d. La cinética de saturación del transporte de Na^+ depende de su concentración en el lado mucosal, pero es independiente de su concentración en el lado serosal.

Actualmente existen métodos experimentales más sofisticados que permiten, a través de marcajes con anticuerpos dirigidos contra los diferentes tipos de transportadores transmembrana, hacer una caracterización más precisa de su ubicación.

Utilidad y aplicaciones

Con la cámara de Ussing, los investigadores pueden estudiar cómo diferentes factores, como concentraciones de iones, pH, temperatura y agentes farmacológicos, afectan el transporte iónico a través de la membrana epitelial. Esto incluye el transporte activo de iones a través de bombas de membrana y el transporte pasivo a través de canales iónicos.

Además de su uso en investigación básica, la cámara de Ussing también se utiliza en estudios clínicos y farmacológicos para evaluar la permeabilidad de fármacos a través de membranas epiteliales y para desarrollar tratamientos para enfermedades relacionadas con trastornos del transporte iónico.

Su aplicación en la investigación fisiológica ha contribuido significativamente a la comprensión de los mecanismos de transporte en organismos vivos y tiene importantes implicaciones en la medicina y la farmacología.

1.3. Materiales y métodos

Animal experimental

Se utilizó un ejemplar de *Rhinella marina* obtenido del lago artificial adyacente al Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Procedimiento quirúrgico

Antes de realizar el procedimiento quirúrgico, el animal fue anestesiado con cloroformo para evitar cualquier tipo de sufrimiento. Una vez comprobado el nivel de anestesia deseado (ausencia de reflejo palpebral y de retirada en la pata), se realizó una sección medular a nivel cervical, con la ayuda de un punzón. Luego, se procedió a la disección de una porción de la piel abdominal de, aproximadamente, 4 cm cuadrados.

Preparación experimental: Cámara de Ussing

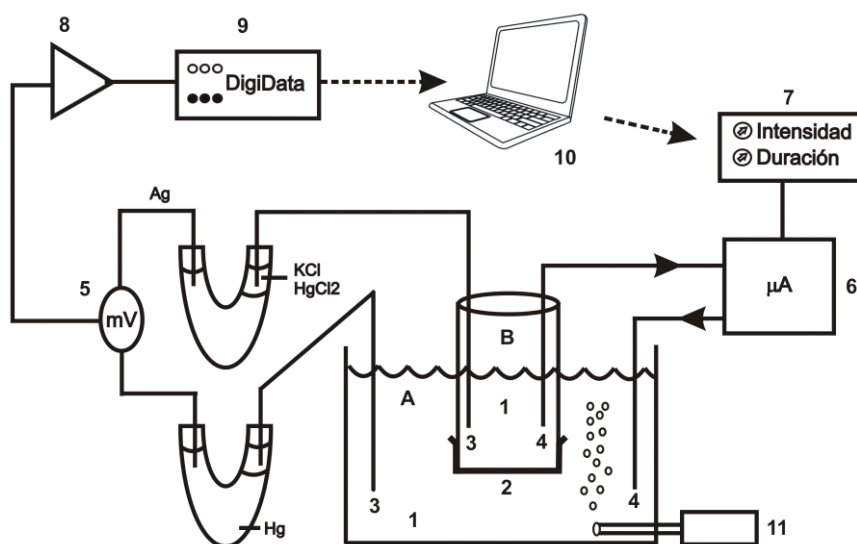
La porción de piel abdominal extraída se dispuso forrando el fondo de un tubo hueco de policarbonato transparente. El lado serosal del epitelio quedó hacia el interior del tubo, mientras que el lado mucosal, hacia el exterior (Figura 3). El tubo, a su vez, fue introducido en un frasco de vidrio, que sirvió como compartimiento A. El tubo hueco sirvió como compartimiento B. Los compartimientos A y B (interior del tubo e interior del frasco de vidrio) se llenaron de solución Ringer de anfibio de la siguiente composición (en mM): NaCl 112; KCl 1,9; CaCl₂ 1,1; NaH₂PO₄ 0,7; pH = 7,2. Una bomba suministrando oxígeno se colocó en contacto con la solución de Ringer.

Electrodos

Como electrodos de registro de potencial transepitelial se utilizaron electrodos de calomel. Estos electrodos se utilizan para medir la diferencia de potencial entre semiceldas, basándose en la reacción entre el mercurio (Hg) y el cloruro de mercurio (HgCl₂, conocido antiguamente como calomel). Ambos reactivos, Hg y Hg₂Cl₂, ganan o pierden electrones dependiendo del medio en que se sumerge el electrodo. La fase acuosa en contacto con el Hg y el HgCl₂ es una solución saturada de cloruro de potasio en agua (KCl) como medio electrolítico. Los electrodos están conectados por medio de un puente de agar. Adicionalmente, el electrodo en contacto con el voltímetro es un electrodo de plata (Ag) (Figura 3). Como electrodos de estimulación (para el paso de corriente por el circuito externo) se utilizaron electrodos bipolares de plata, de 1 mm de espesor, recubiertos con teflón (Figura 3).

Adquisición y procesamiento de datos

Para el protocolo de estimulación se administraron pulsos cuadrados de corriente de 700 ms de duración a través de una unidad de aislamiento de estímulos modelo Isolator-11 (*Axon instruments*), controlada a su vez por un generador de pulsos modelo 9514 (*Quantum Composers*). La señal fue digitalizada mediante un convertidor análogo-digital DigiData 1200 (*Axon instruments*). Los registros se guardaron para luego ser analizados off-line mediante el software Clampfit (v.8.0) en un computador (Figura 3).



Guzmán et al., 2003 y modificado por Julieta Troncoso para fines didácticos de estas notas de clase.

Figura 3. Preparación experimental de la práctica. A: frasco de vidrio que sirvió de compartimiento en contacto con la superficie mucosal de la piel. B: tubo de policarbonato transparente en contacto con la superficie serosal del epitelio. 1: Solución Ringer de anfibio. 2: Epitelio de piel abdominal del sapo (nótese que la piel, al forrar la base del tubo, no

permite que la solución Ringer pase del compartimiento B al A y viceversa). 3: Electrodo de calomel (registro del potencial transmembranal). 4: Electrodo de estimulación, por donde fluirá la corriente externa. 5: Medición por un voltímetro de la diferencia de potencial transmembranal. 6: Amperímetro. 7. Generador de pulsos de corriente, donde puede modularse la amplitud (intensidad) y duración del estímulo eléctrico. 8: Amplificador de la señal electrofisiológica de la diferencia de potencial transepitelial. 9: Tarjeta digitalizadora (conversión de señal analógica a digital). 10: Computador para almacenar, procesar y analizar los datos y, asimismo, controlar la generación de pulsos de corriente. 11: Bomba de aire que alimenta de oxígeno la preparación.

1.4. Resultados

Registros electrofisiológicos

Una vez montada la piel de sapo, se procedió a colocar en las cámaras externa (A, en contacto con la superficie mucosa de la piel) e interna (B, en contacto con la superficie serosa de la piel) solución Ringer de anfibio de igual concentración. Es decir, la piel del sapo actuó como separador entre dos compartimientos: el interno y el externo. Luego se midió la diferencia de potencial entre ambos compartimientos, a través de electrodos de registro (Figura 4).

El voltaje transepitelial obtenido a través del registro de los electrodos de calomel fue de 70 mV (Figura 4). Es decir, hay una diferencia de potencial de 70 mV entre la cara mucosal y la cara serosal del epitelio de la piel abdominal del sapo.

Con intención de anular (disipar) esta diferencia de potencial, se aplicaron pulsos cuadrados de corriente de distintas intensidades (siempre de duración 700 ms) hasta hallar el valor de corriente

cortocircuito. La Figura 4 muestra los trazos correspondientes a la diferencia de potencial obtenidos para las siguientes intensidades de estimulación: 0.075 mA, 0.10 mA, 0.125 mA, 0.15 mA (A-D, respectivamente).

La intensidad de corriente que llevó el potencial de membrana a 0 mV fue la correspondiente a 0.125 mA.

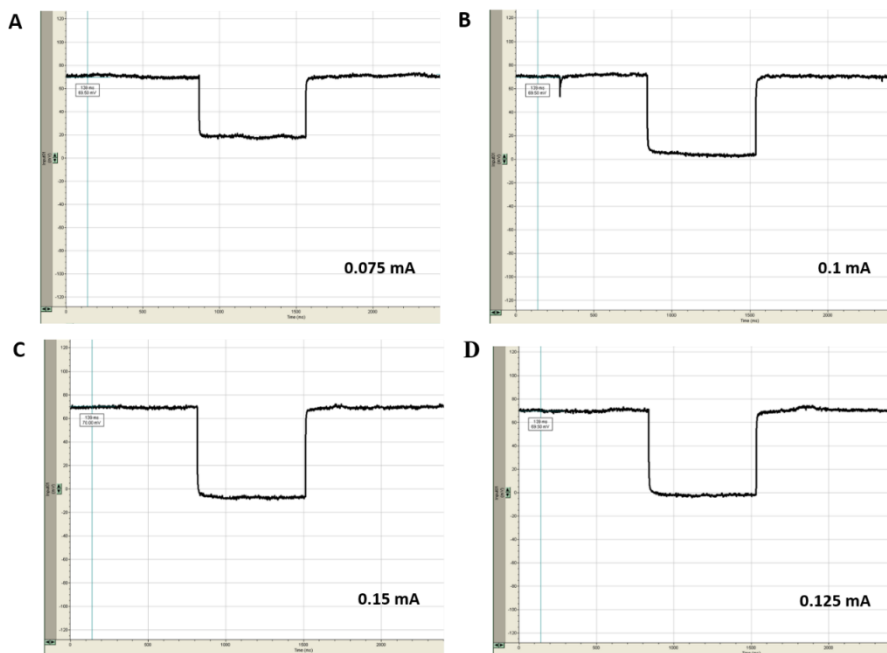


Figura 4. Medición del voltaje transepitelial tras la aplicación de una corriente externa. En cada gráfica, el eje y muestra los valores de voltaje (en mV) y el eje x el tiempo (en ms). El pulso cuadrado de corriente se suministró 800 ms luego del comienzo del registro y tuvo una duración de 700 ms. Se muestran los registros de diferencia de potencial obtenidos luego de aplicar pulsos cuadrados de corriente de 0.075 mA (A), 0.10 mA (B), 0.150 mA (C) y 0.125 mA (D), respectivamente.

1.5. Referencias bibliográficas

Guzmán, A., Rojas, J., Camacho, M., Fajardo, G., Spinel, C. (2003). *Fisiología animal. Notas de Clase*. Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ciencias - Departamento de Biología, Bogotá.

Hoenig, M. P., Zeidel, M. L. (2014). Homeostasis, the milieu intérieur, and the wisdom of the nephron. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 9(7), 1272-1281. doi: <http://10.2215/CJN.08860813>

Jared, S. R., Rao, J. P. (2017). Transepithelial sodium transport across frog skin. *Advances in Physiology Education*, 41(3), 444-447. doi: <http://doi.org/10.1152/advan.00115.2016>

Ussing, H. H., Zerahn, K. (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, 23(2-3), 110-127. doi: <http://10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x>

1.6. Guía de preguntas de la Práctica 1

Una vez leído el marco teórico, analizado los resultados y observado el video correspondiente a la práctica de transporte activo transepitelial, los estudiantes deberán responder y presentar de manera grupal a modo de informe de laboratorio, las preguntas de esta guía.

I. Medición del voltaje transepitelial

Una vez colocada la piel en la cámara de Ussing de la práctica, se procedió a medir la diferencia de potencial entre los compartimientos A y B.

1. ¿Por qué, siendo que las concentraciones de la solución Ringer de anfibio del compartimiento A y B eran las mismas, el voltaje (diferencia de potencial) medido a través de esos compartimientos no es igual a cero?
2. ¿Qué valor tuvo esa diferencia de potencial transepitelial?
3. ¿Quién es la responsable de que exista una diferencia de potencial? ¿Cómo actúa? ¿Qué tipo de transporte realiza?
4. ¿En qué situación esperaría usted que la diferencia de potencial entre ambos compartimientos fuera cero? Nombre varios ejemplos.
5. Suponga usted que en la práctica se hubiera utilizado ouabaína en la preparación experimental. ¿Qué hubiera pasado si se aplica ouabaína en el compartimiento A, en contacto con la superficie mucosa de la piel? Y ¿qué hubiera pasado si se aplica en el compartimiento B, en contacto con la superficie serosa? ¿Por qué?

II. Medición de la corriente de cortocircuito

Una vez lograda una diferencia de potencial inicial, se procedió a aplicar un pulso cuadrado de corriente a través de los electrodos de estimulación (Figura 3).

Se suministraron estímulos cuadrados de corriente, con las siguientes características:

- Duración: 700 ms (parámetro constante)
- Intensidad: 0.075 mA, 0.10 mA, 0.125 mA, 0.15 mA (parámetro variable)

1. ¿Qué es la corriente de cortocircuito y a qué equivale? ¿Cuál fue la intensidad de la corriente de cortocircuito en esta práctica?
2. Se sabe que la bomba Na^+/K^+ mueve cerca de 300 iones por segundo. Además, el diámetro del sector de la piel utilizada en la cámara de registro era de 2,2 cm. Con estos datos, usted puede calcular el número de bombas que existen en un área de 1 cm^2 de piel de sapo *Rhinella marina*.
Dato adicional: carga de un ion = $1,6 \times 10^{-19}$ Coulomb.
3. ¿Puede la bomba actuar en ausencia de Na^+ ? ¿Y en ausencia de K^+ ?
4. ¿Por qué se dice que la bomba es electrogénica?
5. ¿Qué esperarías encontrar si modifica la temperatura del baño en donde se encuentra la preparación? Realice una gráfica de flujo de Na^+ (movido por la bomba Na^+/K^+) en función de la temperatura.

Práctica II

**Potencial de acción compuesto
en el nervio ciático del sapo
*Rhinella marina***

A continuación, los estudiantes encontrarán una guía que le permitirá acceder al marco teórico de la práctica, así como la explicación del montaje experimental, el método de registro, el complejo instrumental utilizado y el procedimiento para registrar los potenciales de acción en el nervio ciático del sapo. Al final del documento, encontrarán una serie de preguntas que deberán responder una vez hayan visto el video correspondiente.

2.1. Objetivos

Objetivo de la práctica

El objetivo de esta práctica es la caracterización electrofisiológica del potencial de acción compuesto (PAC) que ocurre al estimular el nervio ciático del sapo. Se abordará la búsqueda de umbrales de respuesta, los períodos refractarios y el uso farmacológico para inhibir los canales iónicos responsables del PAC.

Objetivo pedagógico

El objetivo pedagógico de esta práctica consiste en consolidar los conceptos de potencial de acción en neuronas individuales (tipo todo-o-nada) en comparación con el potencial de acción compuesto que ocurre en un nervio (con la característica de ser graduado). Se abordarán las

estructuras responsables del potencial de acción en ambos casos (canales iónicos) y su posible inhibición farmacológica. Asimismo, se repasarán conceptos de período refractario (relativo y absoluto), relacionados con el proceso de inactivación de los canales de sodio dependientes de voltaje.

2.2. Marco teórico conceptual

El potencial de acción

El potencial de acción es característico de las células excitables (neuronas, células musculares, algunas células glandulares secretoras). Se define como el cambio brusco, de escasa duración, del potencial de la membrana cuando una de estas células es estimulada (ya sea por estímulos naturales o artificialmente, mediante electrodos, en el laboratorio). Las células excitables poseen canales iónicos que se activan cuando el voltaje de la membrana se modifica (es decir, son dependientes de voltaje). En el caso de tratarse de neuronas, estos canales son selectivos para los iones de sodio (Na^+) y de potasio (K^+).

Los canales iónicos dependientes de voltaje poseen compuertas que se activan cuando la membrana celular se hace más positiva en su cara interior. Si eso ocurre, las compuertas de los canales se abren y dejan pasar iones a su través. La cinética de activación de los canales de Na^+ es más rápida que los canales de K^+ , de modo que son los primeros que se abren con la estimulación (despolarización). De esta manera, un estímulo que despolarice “lo suficiente” la membrana de estas células, logrará activarlas y, por lo tanto, se abrirá una cierta cantidad de canales Na^+ . El sodio que fluya a través de estos canales despolarizará aún más a esta célula y, por lo tanto, provocará una apertura adicional de canales Na^+ (fase de subida). Es decir, ocurre un ciclo de retroalimentación

positiva donde la despolarización resultante en la célula excitable es máxima (pico del potencial de acción). Sin embargo, a medida que el sodio va entrando a la célula, se va perdiendo la fuerza electromotriz que lo impulsa hacia dentro. Esto, sumado a la activación de los canales de K_v y, por lo tanto, a la salida de potasio, llevan a la repolarización de la membrana plasmática.

Entonces, la despolarización y repolarización de la membrana plasmática en las células nerviosas (el ciclo de entrada de Na^+ /salida de K^+ a través de canales dependientes de voltaje o potencial de acción) es un proceso activo y transitorio (suele durar apenas unos milisegundos). Es necesario que ocurra un potencial de acción para que las neuronas se comuniquen entre sí; es decir, para que puedan liberar un neurotransmisor o molécula de comunicación con otra neurona o efector. De igual manera, es necesario que un potencial de acción ocurra en una célula muscular para que ésta se contraiga. O para que una célula glandular secrete una hormona como la insulina.

Concepto de umbral

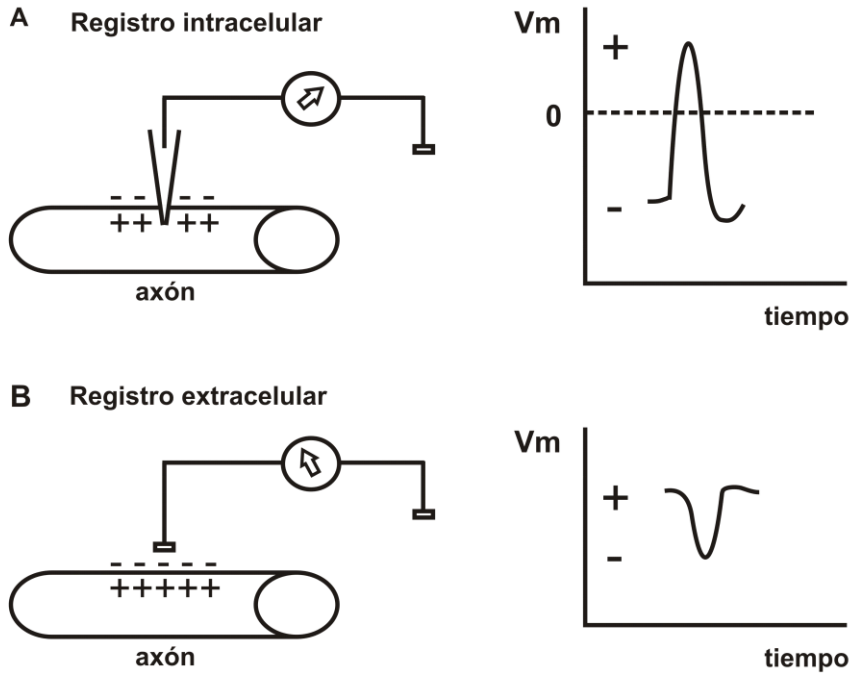
No todos los estímulos lograrán que una célula excitable dispare un potencial de acción. Sólo los estímulos que superen un umbral (como se señaló en el apartado anterior: que despolaricen “lo suficiente” a la membrana de estas células), lo lograrán. Esto significa que hay estímulos despolarizantes que no llegan a provocar la activación de una población de canales de Na_v lo suficientemente grande como para desencadenar el ciclo de retroalimentación positiva que termina por provocar la fase de subida del potencial de acción. Estos estímulos simplemente modifican de manera pasiva el voltaje de la membrana, sin producir un potencial de acción.

Registro del potencial de acción intracelular vs extracelular

Los potenciales de acción pueden ser registrados a través de electrodos. Los electrodos están fabricados con materiales conductores capaces de registrar el cambio en el potencial de la membrana de una célula. El electrodo de registro comparará la distribución de cargas en un punto determinado del espacio, en relación con la distribución de cargas de un electrodo de referencia (o tierra). En el caso de hacerse de forma intracelular, el electrodo de registro debe atravesar la membrana plasmática de la célula, mientras que el electrodo de referencia queda fuera de la célula (alejado de ella) (Figura 1A, izquierda). De esa manera, se comparará el voltaje (distribución de cargas en el espacio) entre ambos electrodos. Durante el potencial de acción, la diferencia de potencial se registra como una deflexión hacia arriba (despolarización) del voltaje de la membrana, seguida de una deflexión hacia abajo (repolarización) en función del tiempo (Figura 1A, derecha). La fase ascendente se produce por la entrada de sodio a través de los canales Na^+ ; mientras que la fase de repolarización (descendente) se debe a la salida de potasio por los canales K^+ .

Los potenciales de acción también pueden registrarse extracelularmente (Figura 1B). En este caso, el electrodo de registro no atraviesa la membrana plasmática de la célula, sino que se dispone muy cerca de ella. El electrodo de referencia se encuentra lejano al electrodo de registro (Figura 1B, izquierda). Como se ha mencionado, existe un flujo de cargas positivas hacia el interior celular (acarreadas por sodio a través de los Na^+), seguido de un flujo de cargas positivas hacia el exterior (acarreadas por el potasio a través de los K^+), durante el potencial de acción. De esta forma, el electrodo de registro (que está cerca de la célula) detecta un alejamiento de cargas positivas (entrada de Na^+ a la célula) seguido de un acercamiento de cargas positivas (salida de K^+), durante el potencial de acción. Esto implica que el registro del cambio

de potencial se verá como una deflexión hacia abajo, seguida de una deflexión hacia arriba, en función del tiempo. La señal registrada de manera extracelular tendrá menor amplitud que la intracelular (Figura 1B, derecha).



Guzmán et al., 2003 y modificado por Julieta Troncoso para fines didácticos de estas notas de clase.

Figura 1. Registros intracelulares vs extracelulares. **A.** En el registro intracelular, el electrodo atraviesa la membrana plasmática de la célula que se está registrando (en este ejemplo, la membrana de un axón, izquierda). La variación del voltaje de membrana en función del tiempo (derecha) muestra una gran despolarización que sobrepasa el cero (sobredescarga), seguida de una repolarización, cuando la neurona es estimulada por encima de su umbral de disparo. **B.** En el caso del registro extracelular, el electrodo está por fuera de la célula, pero muy cercano a ella (izquierda). La gráfica de la derecha muestra variación del voltaje medido de manera extracelular, en función del tiempo, durante el potencial de acción. En este caso, la primera deflexión es hacia abajo,

durante la entrada de cargas positivas a la neurona, seguida de una deflexión hacia arriba, correspondiente a la salida de cargas positivas durante el potencial de acción. Notar que la amplitud del potencial de acción es menor si se mide del lado extracelular.

Propiedad todo-o-nada

La máxima despolarización (máxima amplitud) que se logra durante el potencial de acción es característica de cada neurona. Ya sea que se registren del lado extracelular o intracelularmente, los potenciales de acción de células individuales tienen la característica de ser todo-o-nada. Es decir, cualquier estímulo que supere el umbral de disparo, llevará a la neurona al valor de máxima despolarización (todo); mientras que cualquier estímulo por debajo del umbral, no logrará desencadenar un potencial de acción (nada). Esto implica que la amplitud del potencial de acción no depende de la intensidad de estimulación, siempre que ésta supere el umbral (intensidad supra-umbral).

El potencial de acción compuesto

El término potencial de acción compuesto (PAC) se utiliza para definir a los potenciales de acción en los nervios periféricos. Un nervio periférico está formado por un haz de axones (o fibras nerviosas) de neuronas sensoriales (aférentes), motoras (eferentes) o mixtas, recubierto por tejido conectivo. Cada uno de estos axones disparará, si es estimulado por encima de su umbral, un potencial de acción de tipo todo-o-nada. Sin embargo, a pesar de que cada una de las fibras nerviosas tiene una respuesta tipo todo-o-nada, la respuesta en el nervio en su conjunto es de característica “graduada” (es decir, que su amplitud dependerá de la intensidad de estimulación).

Como los nervios periféricos están formados por axones con distinto diámetro y éstos pueden estar mielinizados o no, cada axón tendrá un umbral de activación y una velocidad de conducción diferente

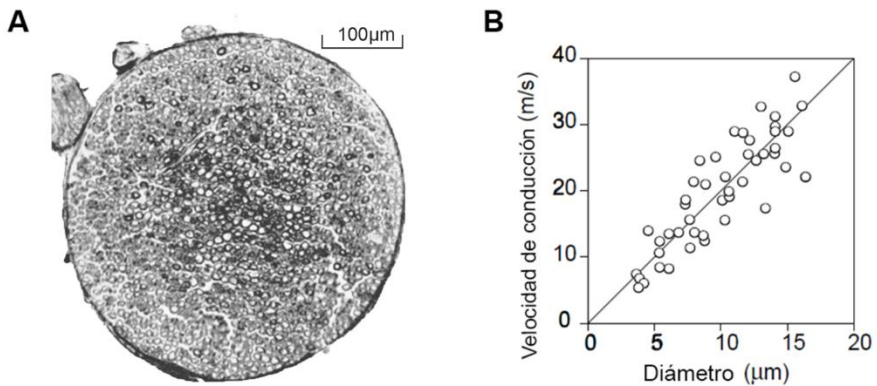
y característica. De modo que el PAC refleja una combinación de estas señales individuales. Entonces, habrá un mínimo estímulo capaz de provocar una respuesta del nervio (umbral de estimulación) y a medida que se aumente la intensidad del estímulo, la respuesta en el nervio (PAC) aumentará en amplitud, producto de un mayor reclutamiento de los distintos axones que componen el nervio (respuesta graduada).

Los primeros axones en ser reclutados (y que, por lo tanto, dispararán potenciales de acción primero) serán los de menor umbral de activación. A medida que el estímulo incremente en su intensidad, mayor número de fibras responderá a la estimulación y se alcanzará una respuesta mayor. La respuesta será máxima, cuando todas las fibras hayan alcanzado su umbral de disparo.

El nervio ciático del sapo

Los axones que forman el nervio ciático presentan importantes diferencias estructurales y funcionales. Este nervio se compone tanto de fibras aferentes (sensoriales) como eferentes (motoras y autónomas). Es decir, que es un nervio mixto. En un corte transversal del nervio pueden diferenciarse los axones rodeados de vaina de mielina (con aspecto de anillos concéntricos oscuros alrededor del axón), de aquellos desnudos (sin mielina). Los axones del sistema nervioso autónomo (que inervan órganos o glándulas) tienen un diámetro menor que los que inervan, por ejemplo, músculo esquelético (Figura 2A).

La velocidad de conducción de los axones es proporcional al diámetro del axón y a la resistencia de membrana (Figura 2B). Entonces, aquellos axones de diámetro pequeño y desnudos son los que conducirán potenciales de acción a menor velocidad (respecto de los de mayor diámetro y con vaina de mielina alrededor). Los umbrales, los periodos refractarios y las duraciones de los potenciales de acción difieren entre los distintos tipos de axones.



A Krnjevic, 1954 y **B**. Tasaki, 1953 y modificados por Julieta Troncoso para fines didácticos de estas notas de clase.

Figura 2. El nervio ciático y sus propiedades morfológicas y funcionales.

A. Corte transversal del nervio ciático del sapo con tinción de fucsina Ponceau y anilina azul. **B.** Velocidad de conducción en función del diámetro de la fibra para axones mielinizados del nervio ciático del sapo. La pendiente de la línea indica la constante que mejor se ajusta a los puntos medios y corresponde a un valor de 2m/s.

El potencial de acción compuesto es bifásico

El potencial de acción compuesto tiene una forma bifásica característica que está relacionada con la manera de hacer su registro. El registro del PAC en el nervio ciático siempre es extracelular. Un par de electrodos ubicados en contacto directo con el nervio servirán de elementos conductores capaces de registrar el momento preciso por donde está pasando el potencial de acción (en rojo, Figura 3) producido en los axones que componen el nervio. Esto solo ocurrirá, como se mencionó anteriormente, si el nervio se estimula con corriente por encima de cierto umbral (Figura 3, Est).

Dado que se trata de un registro diferencial, es decir, se registra la diferencia de potencial entre dos electrodos (R2 vs R1, Figura 3), respecto de un electrodo de referencia (tierra), hay 3 momentos del

registro en el que la diferencia de potencial entre ambos electrodos es cero (es decir, cuando el voltaje en R1 es igual al voltaje en R2). Estos momentos (o tiempos) son: t1, antes de que el potencial de acción (que se generó en el sitio de estimulación) alcance cualquiera de los dos electrodos; t3, cuando el potencial de acción está abarcando ambos electrodos; y t5, cuando el potencial de acción ya está por delante de ambos electrodos (Figura 3). Tanto en t2 como en t4, los electrodos registran una diferencia de potencial entre ellos: en t2, la diferencia de potencial es de cierta magnitud (deflexión hacia arriba) y en t4 es de igual magnitud, pero en sentido contrario (deflexión hacia abajo).

Registro del PAC en el nervio ciático

El registro del potencial de acción compuesto en el nervio ciático muestra la suma de todos los potenciales de acción generados por las diferentes fibras nerviosas dentro del nervio. Es relativamente fácil de realizar, porque puede hacerse de manera extracelular, colocando el nervio sobre una serie de electrodos horizontales en paralelo (Figura 4). Por algunos electrodos se pasará una corriente despolarizante (electrodos de estimulación, S, Figura 4) y otros servirán de electrodos de registro del potencial de acción compuesto (R1 a R10, Figura 4).

Estos registros se pueden utilizar para analizar varios aspectos PAC, como su amplitud, latencia y forma de onda. Estos parámetros proporcionan información sobre la integridad del nervio ciático, así como sobre su velocidad de conducción, períodos refractarios, frecuencias máximas de disparo, propagación diferencial de las distintas fibras que componen el nervio, etc.

Velocidad de conducción del PAC

La velocidad de conducción en un nervio como el ciático es relativamente fácil de medir. La Figura 4 muestra que el nervio puede

ser estimulado en un extremo (Est) y el PAC generado puede ser registrado en dos puntos: uno proximal al sitio de estímulo (R2-R3) y otro distal al mismo (R6-R7). Siendo que el nervio es estimulado en un extremo, el PAC viajará en una única dirección posible: hacia el otro extremo. De esta manera, el PAC pasará primero por el sitio proximal de registro y luego por el distal.

Si se restan las latencias de comienzo del PAC en el sitio distal (t_2) y proximal (t_1), se obtendrá un $Dt = t_2 - t_1$. Sabiendo, además, la distancia que separa a ambos sitios de registro (Dd), será sencillo utilizar la fórmula: Dd / Dt para calcular la velocidad de conducción en el nervio.

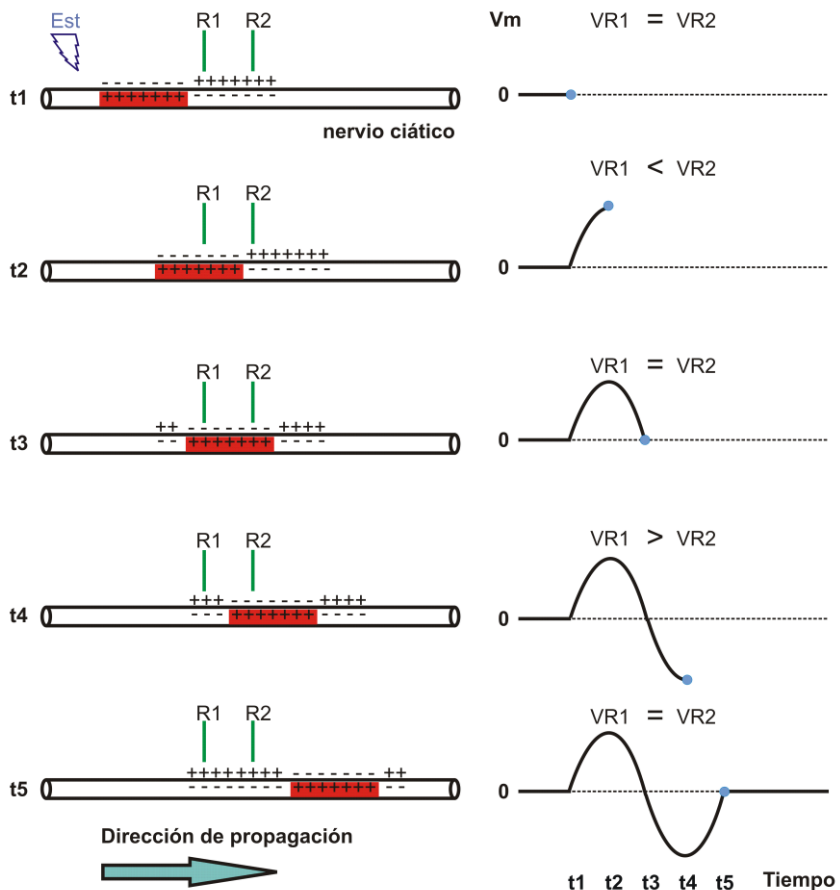


Figura 3. El potencial de acción compuesto en el nervio es bifásico. A la izquierda se grafica el nervio ciático, siendo estimulado (Est) en un extremo. Este estímulo provoca un potencial de acción compuesto (PAC) en el nervio, representado en rojo. El PAC es registrado de manera diferencial por dos electrodos (R1 y R2). A la derecha se grafica la diferencia de potencial (voltaje) en función del tiempo. Se destacan 5 tiempos característicos: t_1 a t_5 . En t_1 , todavía el PAC no ha alcanzado ninguno de los electrodos de registro, de modo que la diferencia de potencial entre ellos es cero ($VR_1 = VR_2$). En t_2 , hay una diferencia de potencial entre ambos electrodos, dado que el PAC ha alcanzado R1, pero no R2 ($VR_1 < VR_2$). En t_3 , la diferencia de potencial entre ambos vuelve a ser cero, dado que el PAC alcanza, en ese momento, ambos electrodos ($VR_1 = VR_2$). En t_4 , vuelve a haber una diferencia de potencial entre ambos electrodos, dado que el PAC ya pasó por R1, pero está afectando R2 ($VR_1 > VR_2$). La diferencia de potencial es igual que en magnitud que en t_2 , pero en sentido contrario. En t_5 , ambos electrodos están en igual potencial, por lo que su diferencia vuelve a ser cero ($VR_1 = VR_2$).

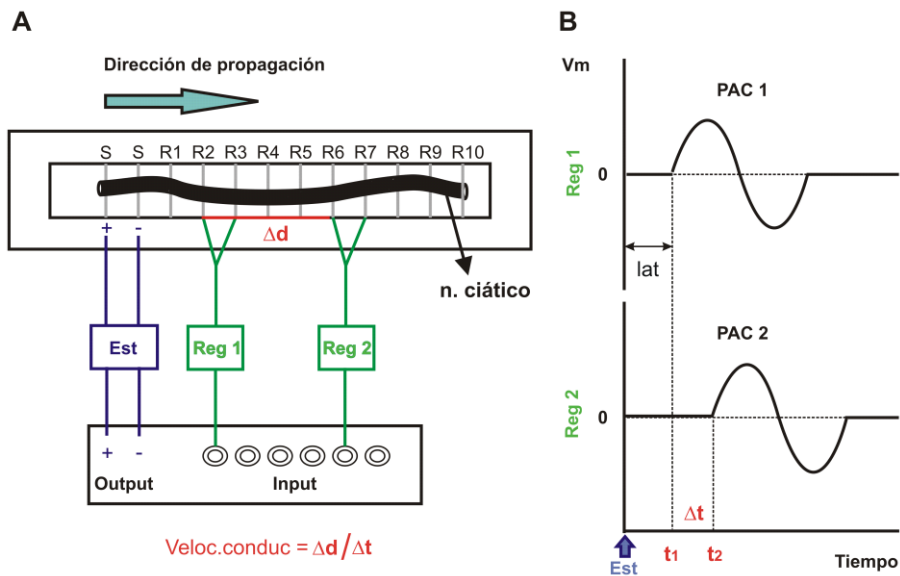


Figura 4. Representación esquemática del montaje experimental. A. Cámara con electrodos dispuestos en paralelo donde se apoyó el nervio ciático. Un par de electrodos (S) sirvió para estimular al nervio en un extremo. Los otros electrodos (R1 a R10) sirvieron como potenciales sitios de registro del potencial de acción compuesto (PAC). Todos los electrodos están dispuestos de manera equidistante, a 1 cm. En este caso se usaron para el registro del PAC un par de electrodos proximales (R2-R3) y otro par de electrodos distales (R6-R7). **B.** Variación del voltaje en función del tiempo para cada sitio de registro: proximal (Reg1) y distal (Reg2). El tiempo que transcurre entre el estímulo y el comienzo de una respuesta se denomina latencia (lat). La diferencia entre las latencias de comienzo de los PAC en el sitio distal (t_2) y proximal (t_1) da un valor Dt que, sabiendo la distancia entre los sitios de registro (Dd) puede utilizarse para calcular la velocidad de conducción del nervio. La unidad de aislamiento de estímulos (Est) está conectada a un generador de pulsos que, además, produce un estímulo de sincronismo para disparar simultáneamente el sistema de adquisición de datos (output). Las señales electrofisiológicas se amplificarán, se acondicionarán (input) y se digitalizarán para luego ser analizadas.

Períodos refractarios

Hay un período de tiempo en el cual una neurona, una vez ha sido estimulada y dispara un potencial de acción, no puede disparar un segundo potencial de acción ante un nuevo estímulo. Este lapso se conoce como periodo refractario.

Los períodos refractarios están relacionados con la inactivación de los canales de Na_v luego de que éstos se abren por la despolarización de la membrana. Entonces, el canal de Na_v tiene tres estados: cerrado (cuando el voltaje de la membrana está en reposo), abierto (cuando la membrana se despolariza) e inactivo (cuando pasa un tiempo después de abrirse, una compuerta de inactivación inhabilita al canal para el paso del sodio). Tiene que pasar un tiempo para que el canal pase de su estado

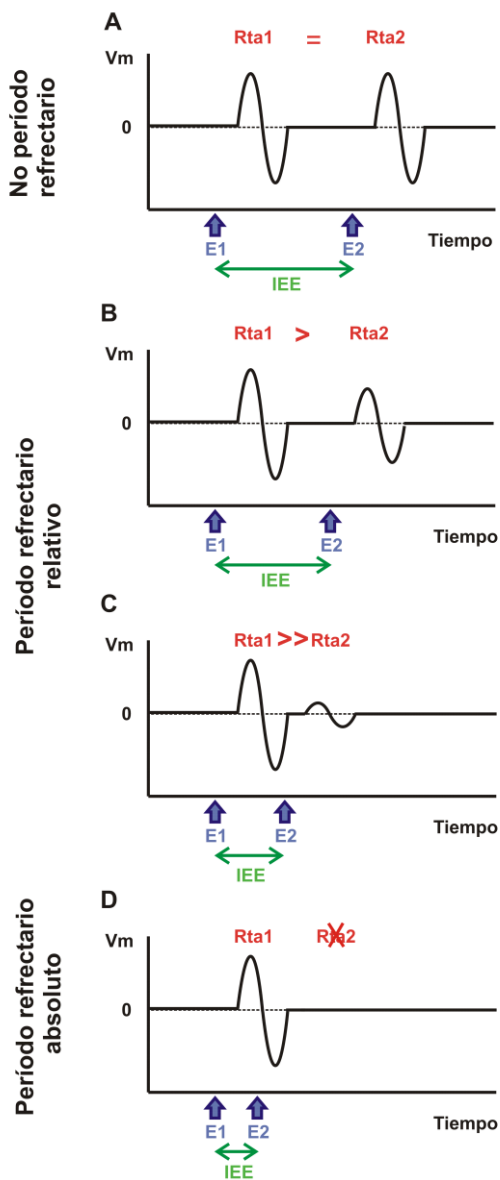
inactivado a su estado cerrado. Sólo si está en estado cerrado, es susceptible de activarse (abrirse) por una despolarización.

Período absoluto vs relativo

Si una neurona es recibe un par de estímulos, separados por cierto intervalo de tiempo entre ellos, y estos estímulos son despolarizantes, de igual duración e intensidad, se espera que la neurona responda de igual manera a ambos. Imaginemos que esos estímulos son supra-umrales, de modo que la respuesta que se genere sea un potencial de acción. Si la neurona responde con un potencial de acción para el primer estímulo y otro potencial de acción de igual magnitud que el primero, para el segundo estímulo, se dice que la neurona no está en período refractario. Es decir, todos los canales de Na_v que se abrieron por la despolarización provocada por el primer estímulo (y luego entraron en estado de inactivación), salieron de su estado inactivado antes de la llegada del segundo estímulo. De esta manera, el intervalo entre los dos estímulos fue lo suficientemente grande como para que la neurona pueda responder de igual manera a ambos.

Si el intervalo entre el par de estímulos disminuye, puede suceder algo particular: la respuesta al segundo estímulo (potencial de acción) es de amplitud menor que la respuesta al primer estímulo. Esto sucede porque una parte de la población de canales de Na_v está inactiva al momento de la llegada del segundo estímulo. Es decir, el tiempo transcurrido entre los dos estímulos no fue suficiente como para que todos los canales salieran de su estado de inactivación (pero algunos sí). En este caso, se dice que la neurona está en período refractario relativo.

Si el intervalo entre el par de estímulos sigue disminuyendo, sucede algo más drástico: no hay respuesta al segundo estímulo. Ni siquiera aumentando la intensidad o duración del segundo estímulo, no se logra que la neurona responda. En este caso, en el momento de la



llegada del segundo estímulo, todos los canales de Na_v están en su estado inactivo y, por lo tanto, ningún estímulo despolarizante puede provocar la entrada de sodio a través de ellos (y no se produce el potencial de acción). Si esto sucede, se dice que la neurona está en período refractario absoluto.

En los nervios, donde lo que se registra es el potencial de acción compuesto por todos los axones que lo componen, también pueden evidenciarse los períodos refractarios absolutos y relativos. Estos parámetros son característicos de cada nervio. La Figura 5 explica de manera gráfica estos fenómenos en el nervio.

Figura 5. Períodos refractarios. A. Si la respuesta al segundo estímulo ($Rta2$) es igual en amplitud que la respuesta al primer estímulo ($Rta1$) los canales de Na_v que están presentes en los axones que componen el nervio han salido por completo de su estado inactivado para ese intervalo entre estímulos (IEE). Es decir, el estímulo 2 llega cuando el nervio no

está en período refractario. **B** y **C**. Si la $R_{ta\ 2}$ es menor que la R_{ta1} , algunos canales de Na_v que están presentes en los axones que componen el nervio no han salido de su estado inactivado. Es decir, el segundo estímulo llega cuando el nervio está en período refractario relativo. **D**. Si no hay respuesta al segundo estímulo, todos los canales de Na_v que están presentes en los axones que componen el nervio están en estado inactivado. Es decir, el segundo estímulo llega cuando el nervio está en período refractario absoluto. Los estímulos 1 y 2 (E_1 y E_2) son iguales en intensidad y duración.

2.3. Materiales y métodos

Animal experimental

Se utilizó un ejemplar de *Rhinella marina* obtenido del lago artificial adyacente al Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Nota: este animal es el mismo que se utilizó para la Práctica 1.

Procedimiento quirúrgico

Antes de realizar el procedimiento quirúrgico, el animal fue anestesiado con cloroformo para evitar cualquier tipo de sufrimiento. Una vez comprobado el nivel de anestesia deseado (ausencia de reflejo palpebral y de retirada de la pata), se procedió a realizar una sección medular a nivel cervical, con la ayuda de un punzón.

Antes de la disección del nervio, se separó completamente la piel de la pata derecha del animal. Se procedió a la disección del nervio ciático, con ayuda de tijeras quirúrgicas para separar el nervio del músculo y del tejido conectivo. Se tuvo especial cuidado de mantener intacto el nervio, utilizando técnicas de disección romas. Se intentó

retirar la máxima cantidad de tejido conectivo alrededor del nervio para evitar interferencias en el registro.

Una vez separado de todo tejido muscular y conectivo, se utilizó un trozo de seda quirúrgica (4-0) para atar el extremo del nervio disecado a la altura de la cadera. Se utilizaron tijeras quirúrgicas para cortar el nervio y separarlo de la médula espinal. La seda quirúrgica permitió manipular el nervio sin tocarlo, manteniendo intacta su integridad. Una vez diseccionado por completo (hasta la altura del tobillo del animal), se ató el otro extremo con seda quirúrgica 4-0 y se cortó de igual manera que el otro extremo. El nervio ciático se colocó en un vaso de precipitado con solución Ringer de anfibio (NaCl 114,9 mM; KCl , 5mM; NaH_2PO_4 , 85mM; pH7, 1) y se mantuvo allí hasta el momento de realizar los registros.

Montaje experimental

La Figura 4 muestra el esquema del montaje experimental que se utilizó en esta práctica. En una cámara con electrodos se apoyó el nervio ciático, que se bañó con gotas de solución Ringer durante los registros. Estos electrodos estaban dispuestos de manera paralela, equidistantes entre sí (a 1 cm). El par de electrodos de un extremo de la cámara sirvió para estimular al nervio (S). Los electrodos restantes (R1 a R10) sirvieron como potenciales electrodos de registro del PAC. Para la práctica se utilizaron un par de electrodos proximales (en la Figura 4 representados como R2-R3) y otro par distales (representados como R6-R7), distanciados 4 cm entre sí.

Estimulación

Para el protocolo de estimulación se administraron pulsos cuadrados de corriente de 100 ms de duración, a través de electrodos (S, Figura 4) conectados a una unidad de aislamiento de estímulos modelo

Isolator-11 (Axon instruments), contralada a su vez por un generador de pulsos modelo 9514 (Quantum Composers). El estimulador de corriente puede generar pulsos de duración, intensidad (amplitud) variable y controlada y, además, produce un estímulo de sincronismo (*trigger*) para disparar simultáneamente el sistema de adquisición de datos.

Adquisición y procesamiento de datos

Los electrodos de registro estaban conectados a un pre-amplificador diferencial y a un amplificador de la señal (CiberAmp 380, Axon instruments); las señales electrofisiológicas obtenidas se digitalizaron mediante un convertidor análogo-digital DigiData 1200 (Axon instruments). Los registros se guardaron para luego ser analizados off-line mediante el software Clampfit (v.8.0) en un computador.

Inhibición farmacológica del PAC

Para evaluar el efecto de la xilocaína en la conducción nerviosa, se aplicó una gota de este fármaco (al 2%), sobre el nervio ciático, en el sitio distal de registro y se realizaron registros de los PAC a distintos tiempos luego de la aplicación.

2.4. Resultados

Búsqueda de umbrales

Se aplicaron pulsos cuadrados de corriente estimulante de duración constante (100 μ s, parámetro fijo) e intensidades crecientes: 25 μ A; 75 μ A; 100 μ A; 300 μ A; 500 μ A, 700 μ A, 1 mA; 2 mA (parámetro

variable). La Figura 6 muestra los registros del PAC en el sitio proximal obtenidos con cada intensidad de estimulación.

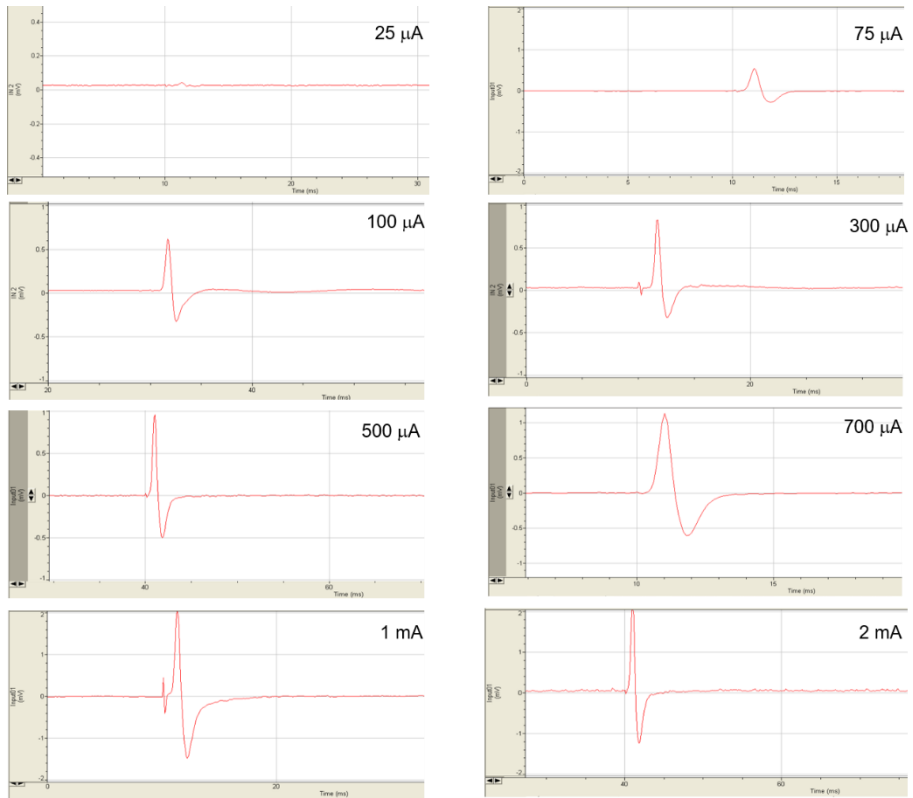


Figura 6. Búsqueda de umbrales de respuesta en el nervio ciático del sapo. Los diferentes registros muestran el potencial de acción compuesto en el nervio ciático ante estímulos de intensidad creciente. En todos los casos, la duración del estímulo fue de 100 ms. Las gráficas corresponden a valores de voltaje (V_m) en función del tiempo (ms).

Velocidad de conducción

La Figura 7 muestra los registros del PAC en los sitios proximal (arriba) y distal (abajo) del nervio ciático. Dado que se sabe que los electrodos de la cámara donde está ubicado el nervio están separados

por 1 cm, se puede calcular la velocidad de conducción, teniendo en cuenta las latencias observadas en cada registro (proximal *vs* distal).

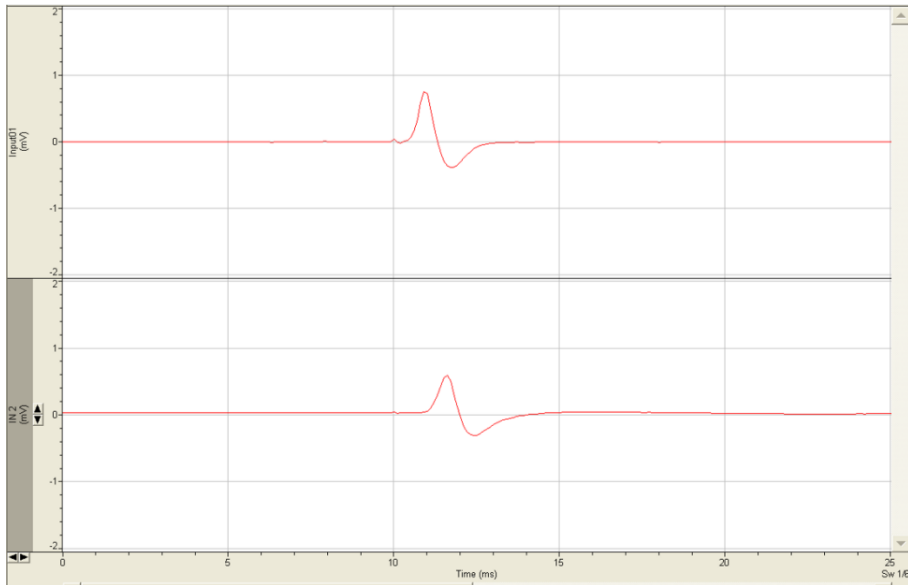


Figura 7. Estimación de la velocidad de conducción en el nervio ciático del sapo. Arriba: potencial de acción compuesto (PAC) registrado en el sitio proximal; abajo: PAC en el sitio distal del nervio ciático. Las gráficas muestran valores de voltaje (V_m) en función del tiempo (ms). El estímulo despolarizante se está dando a los 10 ms.

Períodos refractarios: pares de estímulos

Para la determinación de los períodos refractarios absoluto y relativo, se estimuló al nervio con pares de estímulos de igual duración ($100\ \mu\text{s}$) e intensidad (1 mA) y un intervalo entre estímulos (IEE) variable de: 40 ms, 20 ms, 10 ms, 4 ms, 4 ms y 3 ms. La Figura 8 muestra los resultados obtenidos para cada intervalo.

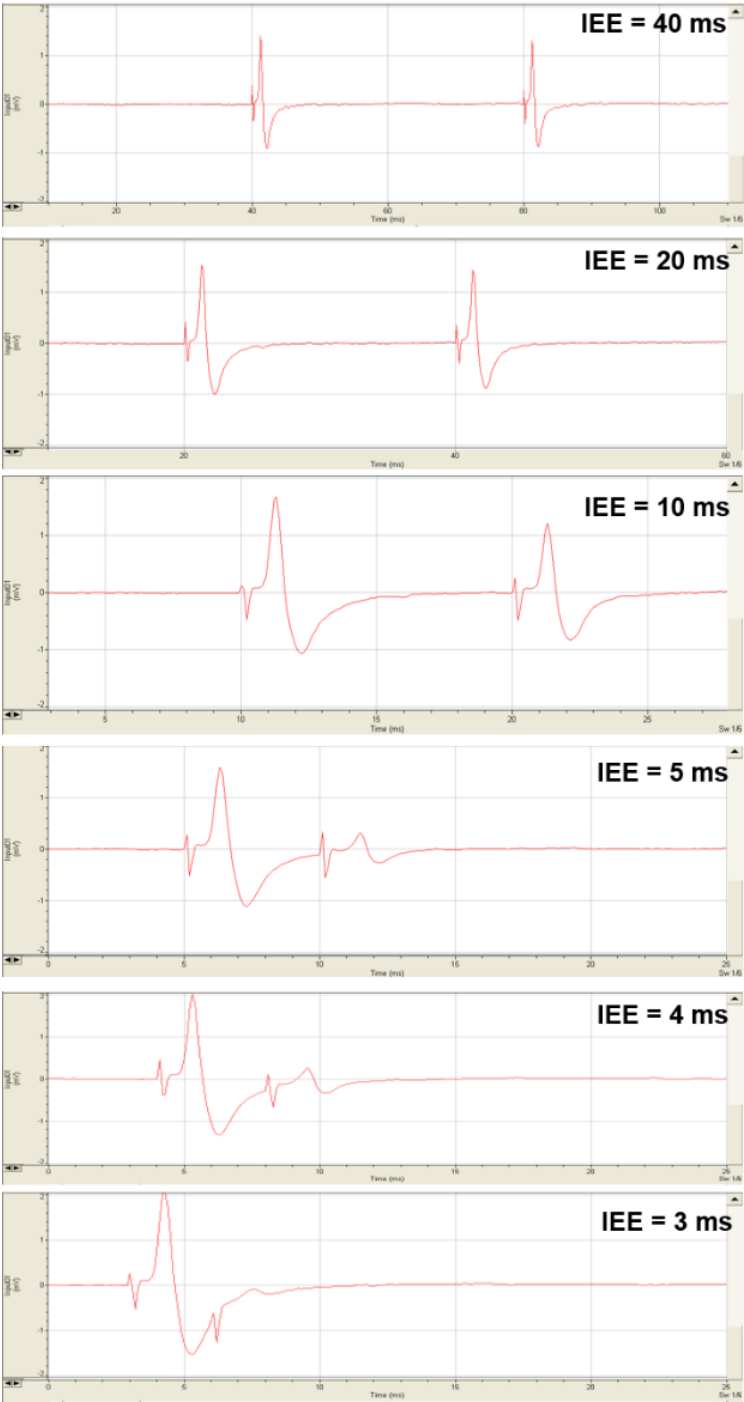


Figura 8. Período refractario absoluto y relativo en el nervio ciático del sapo. Los diferentes registros muestran el potencial de acción compuesto en el nervio ciático ante un par de estímulos, cuyo intervalo entre estímulos (IEE) está siendo modificado. La intensidad y duración del estímulo, para cada caso, se mantuvo constante: 1 mA, 100 ms, respectivamente. Las gráficas corresponden a valores de voltaje (V_m) en función del tiempo (ms).

Tren de estímulos

Se aplicó una estimulación en forma de tren (seguidilla de estímulos) para ver la respuesta a cada uno de los estímulos del tren. En total se dieron 5 estímulos, de 1 mA de intensidad, con una duración de 100 μ s y un intervalo entre estímulos del tren de 3.5 ms. La Figura 9 muestra la respuesta del nervio ciático a este tipo de estimulación.

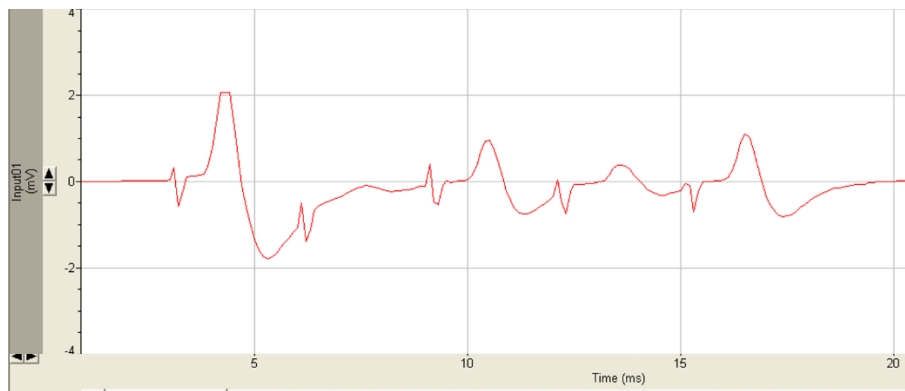


Figura 9. Respuesta en el nervio ciático del sapo ante un tren de estímulos. Registro correspondiente a la respuesta del nervio ciático a 5 estímulos de 1 mA de intensidad, con un intervalo entre estímulos de 3.5 ms y una duración de 100 ms. Las gráficas muestran valores de voltaje (V_m) en función del tiempo (ms).

Aplicación de xilocaína

Luego de haber aplicado una gota de xilocaína al 2% en el sitio distal de registro, se registraron los PAC en el nervio ciático. La Figura 10 muestra el PAC en el sitio proximal (arriba) y en el sitio distal (abajo) a distintos tiempos luego de la aplicación del anestésico: 1 min, 2 min, 3 min y 5 min, respectivamente.

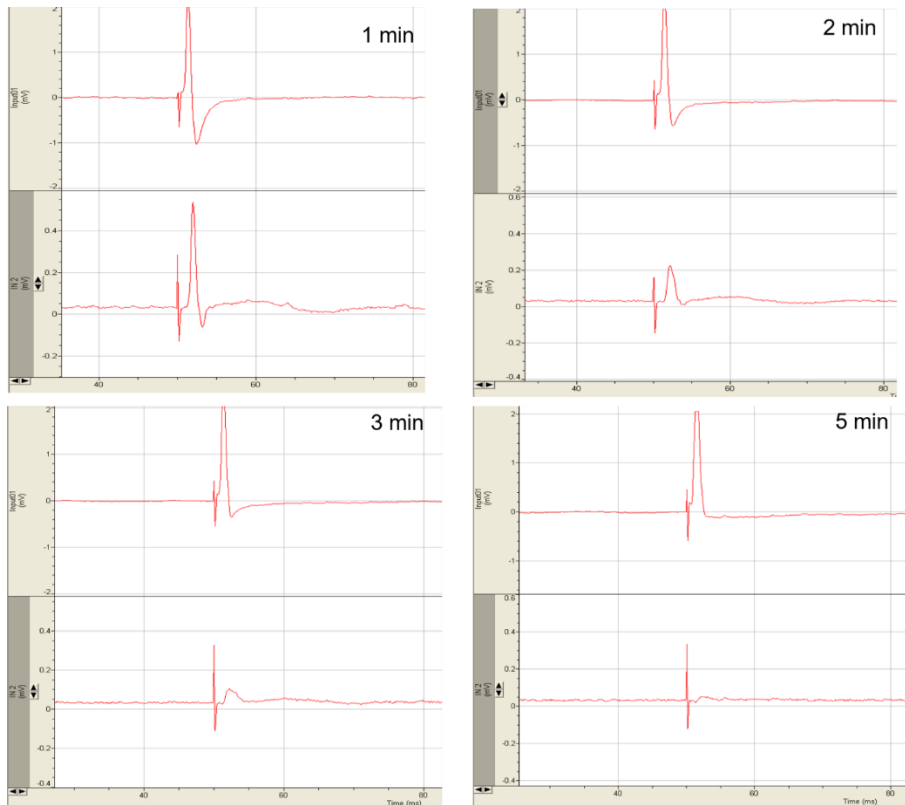


Figura 10. Aplicación de xilocaína. Se muestran los registros del potencial de acción compuesto del nervio ciático en el lado proximal (registros de arriba) y distal (registros de abajo), a distintos tiempos luego de la aplicación de 1 gota de xilocaína al 2%. La duración del estímulo y la intensidad de este fue la misma en todos los casos: 100 ms y 1 mA, respectivamente. Las gráficas muestran valores de voltaje (Vm) en función del tiempo (ms).

2.5. Referencias bibliográficas

- Guzmán, A., Rojas, J., Camacho, M., Fajardo, G., Spinel, C. (2003). *Fisiología animal. Notas de Clase*. Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ciencias - Departamento de Biología, Bogotá.
- Krnjevic, K. (1954). The connective tissue of the frog sciatic nerve. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*, 39(1), 55-72. doi:
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1954.sp001048>
- Tasaki, I. (1953). *Nervous Transmission*. C. C. Thomas, Springfield, IL.

2.6. Guía de preguntas de la Práctica 2

Una vez leído el marco teórico, analizado los resultados y observado el video correspondiente a la práctica de potencial de acción compuesto en el nervio ciático, los estudiantes deberán responder y presentar de manera grupal a modo de informe de laboratorio, las preguntas de esta guía.

I. Curva de intensidad

Se suministraron estímulos cuadrados de corriente, con las siguientes características:

- Pulso cuadrado de corriente de duración constante: 100 μ s (parámetro fijo).
 - Intensidades crecientes de estimulación: 25 μ A; 50 μ A; 100 μ A; 200 μ A; 300 μ A; 500 μ A; 750 μ A; 1 mA, 1.5 mA, 2 mA (parámetro variable)
1. ¿Qué es el estímulo umbral? ¿Entre qué valores estuvo el estímulo umbral para este nervio?
 2. ¿Por qué hay un aumento en el potencial de acción conforme aumenta la intensidad de estimulación? ¿Y la característica todo o nada del potencial de acción? ¿Cómo explicaría que en este caso no se evidencia esa característica?
 3. ¿Cuál es el estímulo saturante de la respuesta? ¿Por qué ocurre esto?
 4. Construya una curva de amplitud de la respuesta en función de la intensidad del estímulo y explíquela. Utilice los valores experimentales obtenidos en la práctica.
 5. Dado que hay dos electrodos de registro, uno distal y otro proximal al sitio de estimulación, usted puede calcular la velocidad de conducción en este nervio, teniendo en cuenta la

latencia de respuesta. Recuerde que todos los electrodos de la cámara están separados entre sí por 1 cm.

II. Pares de estímulos

Se suministraron sucesivamente dos estímulos (E1 y E2) con las siguientes características:

- Duración E1 = Duración E2 = 100 μ s (parámetro fijo).
 - Intensidad E1 = Intensidad E2 = 700 mA (parámetro fijo).
 - Intervalos entre estímulos: 40 ms, 20 ms, 10 ms, 5 ms, 4 ms, 3 ms (parámetro variable).
- 1) ¿Qué es el período refractario absoluto y qué es el período refractario relativo?
 - 2) ¿A qué intervalo entre estímulos observa el período refractario absoluto? ¿Y el relativo?

III. Tren de estímulos

Se suministraron trenes de estímulos con estas características:

- Número de estímulos del tren: 5
 - Intensidad de cada estímulo: 1 mA
 - Duración de cada estímulo: 100 μ s
 - Separación temporal entre estímulos: 3.5 ms
- 1) ¿Qué observa con la amplitud de la respuesta a los distintos estímulos del tren? ¿Por qué ocurre esto? Explique.

IV. Aplicación de xilocaína

Características de los estímulos:

- Duración del estímulo: 100 μ s

- Intensidad de estimulación: 1 mA

La gota de xilocaína (2%) se aplicó únicamente en la porción de nervio que está tocando el sitio distal de registro. La Figura 10 muestra los registros de los PAC proximal (arriba) y distal (abajo) a distintos tiempos luego de la aplicación del anestésico.

- 1) ¿Cómo actúa la xilocaína? ¿Cuánto tiempo se demora en hacer efecto la xilocaína?
- 2) ¿Qué pasó con el potencial de acción del sitio distal? ¿Cómo lo explica?

Práctica III

Contracción isométrica del músculo gastrocnemio del sapo *Rhinella marina*

A continuación, los estudiantes encontrarán una guía que le permitirá acceder al marco teórico de la práctica, así como la explicación del montaje experimental, el método de registro, el complejo instrumental utilizado y el procedimiento para registrar la respuesta electromiográfica y la fuerza de contracción del músculo gastrocnemio, cuando se estimula el nervio ciático del sapo. Al final del documento, encontrarán una serie de preguntas que deberán responder una vez hayan visto el video correspondiente.

3.1. Objetivos

Objetivo de la práctica

El objetivo de esta práctica es la caracterización de la respuesta electromiográfica (potenciales de acción extracelulares) y la medición de la fuerza de contracción (sacudida muscular) del músculo gastrocnemio frente a la estimulación eléctrica del nervio ciático del sapo. Se abordará la búsqueda de umbrales de respuesta y de los fenómenos de sumación, contracción tetánica y fatiga muscular.

Objetivo pedagógico

El objetivo pedagógico de esta práctica consiste en consolidar los conceptos de potencial de acción en las células musculares, que pueden

medirse de manera extracelular (electromiograma). Se abordará el concepto de umbral y de respuesta graduada de los potenciales de acción musculares en respuesta a distintas intensidades de estimulación. Sumado a ello, se hará énfasis en el proceso de contracción muscular y el papel del calcio en este fenómeno, en conjunto con la generación de puentes cruzados de actina/miosina. Se ahondará en el fenómeno de sumación y contracción tetánica y su relación con la concentración de calcio en el sarcoplasma. En tal sentido, se consolidarán los conceptos que relacionan el número de puentes cruzados actina/miosina y la consecuente generación de fuerza muscular. Por último, se reflexionará sobre el proceso de fatiga muscular y los posibles fenómenos que la explican.

3.2. Marco teórico conceptual

Contracción muscular

A diferencia de la conducción nerviosa, que no es apreciable a simple vista, la contracción muscular es un fenómeno que puede verse a ojo desnudo. Es decir, el acortamiento del músculo cuando se contrae es evidente. Y esto puede ocurrir tanto cuando se lo estimula directamente, como cuando se estimula el nervio responsable de su contracción. Este fenómeno ha intrigado a la comunidad científica por siglos. De hecho, las primeras observaciones formales acerca de la contracción muscular se remontan al siglo II d.C., cuando el médico griego Claudio Galeno propuso que la contracción muscular era causada por la acción de un fluido denominado "espíritu animal", que se originaba en el cerebro y viajaba a través de los nervios hasta los músculos, provocando su movimiento. Galeno consideraba que los nervios eran conductos huecos que transportaban este fluido vital, permitiendo la comunicación entre el sistema nervioso y el sistema muscular.

En el proceso de contracción, los músculos generan fuerza. Esta fuerza es utilizada por los animales para moverse, desplazar objetos, modificar la tensión arterial, masticar, desplazar fluidos y un sinfín de otras actividades como la comunicación a través de la gesticulación o la generación de sonidos. Los músculos, entonces, fueron interpretados como los responsables del ánima (alma) de los cuerpos, que sólo estaban presentes en los animales (de ahí su nombre).

El concepto de “electricidad animal”

Los experimentos pioneros respecto de la contracción muscular datan del siglo XVII, donde Jan Swammerdam, un extraordinario anatomista y zoólogo holandés, demuestra que la contracción muscular podía producirse sin la intervención del sistema circulatorio, al estimular mecánicamente el nervio ciático, en sapos.

Posteriormente, Luigi Galvani, un destacado médico italiano, realizó los experimentos que demostraron que las patas de las ranas se contraían cuando un par de barras metálicas (de distinta composición: una de cobre y otra de zinc) estando en contacto con el músculo y con el nervio, respectivamente, entraban en contacto entre sí. Esto lo llevó a proponer la existencia de una “electricidad animal” (almacenada en los músculos) que fluía a través de los metales hacia los nervios y que la descarga de electricidad hacía que los músculos se hincharan (aumentaran su diámetro) a expensas de acortarse (Galvani, 1791).

Luego, Alessandro Volta, un extraordinario físico también italiano, cuestionó la interpretación de Galvani y en 1792 hace una propuesta alternativa de sus resultados. Volta construye la primera pila eléctrica, demostrando que la electricidad podía generarse artificialmente y que los efectos observados por Galvani podían deberse a una corriente externa en lugar de una electricidad inherente a los tejidos. Sin duda, estos experimentos sentaron las bases de la electrofisiología y el estudio

de la bioelectricidad, fundamentales para la comprensión moderna de la excitabilidad neuromuscular.

Pero no fue sino hasta principios del siglo XX que los procesos fisiológicos asociados a la contracción muscular comienzan a dilucidarse con detalle, gracias a los avances en microscopía electrónica, bioquímica y biofísica que permitieron describir en detalle la estructura del mecanismo contráctil de las células musculares.

Las células musculares contienen proteínas motoras

Los músculos están formados por células especializadas grandes, multinucleadas, que surgen de la fusión de varias células (sincitio). Cada una de las células que forman el músculo se denomina fibra muscular. Los músculos están formados por estas fibras musculares dispuestas en paralelo. (Nota: hay tres tipos de músculos -estriado, liso y cardíaco-; en este apartado solo se hará referencia al músculo estriado).

Cada fibra muscular contiene múltiples estructuras proteicas denominadas miofibrillas. Las miofibrillas están formadas por filamentos gruesos de miosina y filamentos finos de actina, organizadas en unidades estructurales llamadas sarcómeros. Durante la contracción, los filamentos de miosina, que tienen cabezas móviles, se unen a los filamentos de actina mediante puentes cruzados. Con la energía aportada por el ATP, las cabezas de miosina se flexionan, tirando de los filamentos de actina hacia el centro del sarcómero. Este mecanismo, conocido como la teoría de los filamentos deslizantes, hace que las fibras musculares se acorten, generando la fuerza necesaria para el movimiento, en presencia de calcio. La coordinación de múltiples sarcómeros acortándose simultáneamente da lugar a la contracción de todo el músculo, que puede ser medible experimentalmente.

Las células musculares son excitables

Al igual que las neuronas, las fibras musculares son capaces de disparar potenciales de acción, es decir, son células excitables. De hecho, el proceso de contracción comienza con despolarización de la membrana plasmática de la fibra muscular.

Para que el músculo se contraiga tiene que haber un comando desde una neurona (una motoneurona). Una vez que la motoneurona dispara un potencial de acción liberará el neurotransmisor acetilcolina a la hendidura sináptica. En la membrana de la célula muscular hay receptores ionotrópicos para este neurotransmisor. Una vez que la acetilcolina interactúa con los receptores de la fibra muscular, se abrirán canales de Na^+ . La entrada de este catión a la célula muscular provocará una despolarización de esta. Esta despolarización, si es lo suficientemente intensa como para llevar a la fibra al umbral de disparo, hará que la célula muscular dispare un potencial de acción.

Si bien cada fibra muscular responde disparando un potencial de acción de manera todo-o-nada, la respuesta de contracción muscular es un fenómeno gradual. Esto se debe a que hay muchas fibras conformando el músculo, cada una con un umbral propio de activación. De esta manera, modificando la intensidad y la frecuencia de estimulación, se podrá reclutar una mayor cantidad de fibras y la fuerza de contracción será mayor.

El acoplamiento excitación-contracción

La relación entre la excitación de la célula muscular y la consecuente contracción del músculo esquelético de los vertebrados está actualmente bien caracterizada. A este fenómeno se lo denomina acoplamiento excitación-contracción.

Una vez que la célula muscular dispara un potencial de acción, éste se propagará por la membrana de la fibra muscular hasta alcanzar a

los túbulos T. En ellos se encuentran los receptores de dihidropiridina que sufrirán un cambio conformacional con la despolarización. Los receptores de dihidropiridina están conectados mecánicamente con receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico, de modo que el cambio conformacional de los primeros producirá la apertura de los segundos. Esta apertura de los receptores de rianodina permitirá la salida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. El aumento del Ca^{2+} en el sarcoplasma, es crucial en la formación de puentes cruzados entre los filamentos de actina y miosina y el deslizamiento entre ellos, provocando el acortamiento muscular y la generación de fuerza, en presencia de ATP (Randall et al., 2002).

La unidad motora

Cada motoneurona puede inervar más de una fibra muscular. La unidad motora está formada por las fibras musculares y la motoneurona que las inervan. Una motoneurona puede inervar a 200 fibras musculares o menos (unidad motora pequeña) o a más de 2000 (unidad motora grande). El tamaño de la unidad motora determina la precisión de los movimientos que puedan realizarse. En tal sentido, una unidad motora más pequeña permitirá movimientos mucho más finos y controlados.

Registro experimental de la actividad muscular

Tanto el fenómeno de actividad eléctrica muscular, como la fuerza generada por un músculo al contraerse, pueden registrarse de manera experimental. Para ello, hace falta utilizar electrodos en el nervio (de estimulación), electrodos de registro (en el músculo) y un transductor de fuerza, como se hizo en la práctica.

En este caso, se utilizan electrodos metálicos en contacto con el nervio ciático conectados a un estimulador eléctrico, que genera pulsos de corriente de intensidad y duración específicos. Por otra parte,

mediante electrodos ubicados directamente en el músculo gastrocnemio, se registra la actividad eléctrica de las células musculares en respuesta al estímulo nervioso. Este registro extracelular de potenciales de acción en las fibras musculares recibe el nombre de electromiograma (EMG). Los potenciales de acción de las diferentes fibras que componen el músculo no son sincrónicos y la amplitud de la señal desde cada fibra en particular depende de cuán cerca esté del electrodo de registro. Es por este motivo que el EMG puede apreciarse como una señal muy compleja.

Por otra parte, la fuerza generada por el músculo al contraerse se registra mediante un transductor de fuerza. El transductor de fuerza es un dispositivo que convierte la fuerza mecánica generada por la contracción muscular en una señal eléctrica cuantificable. En la preparación experimental del músculo gastrocnemio del sapo, el músculo se monta en un sistema de registro donde un extremo se fija a un soporte inmóvil y el otro extremo se conecta al transductor de fuerza a través de un hilo o filamento no elástico. Cuando el músculo es estimulado, las fibras musculares generan tensión al contraerse. Esta tensión se transmite al transductor, el cual contiene un sensor piezoeléctrico. Estos sensores convierten la deformación mecánica en una variación de resistencia eléctrica, generando una señal proporcional a la fuerza ejercida.

A partir de estos registros se pueden analizar parámetros como el periodo de latencia y sacudida muscular isométrica, así como la relación entre la intensidad del estímulo y la magnitud de la respuesta. Esto permite estudiar fenómenos como el umbral de excitabilidad, sumación, contracción tetánica y fatiga muscular.

Período de latencia

El periodo de latencia es el tiempo que transcurre entre la estimulación nerviosa y el inicio de la contracción. Durante este período ocurren todos los eventos moleculares que permiten el acoplamiento

excitación-contracción: desde la liberación de acetilcolina desde la terminal de la motoneurona, hasta la generación del potencial de acción muscular y la consecuente salida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. El calcio es el ion que permitirá la formación de puentes cruzados de filamentos de actina y miosina (en presencia de ATP) y, por lo tanto, la generación de fuerza.

Sacudida muscular isométrica

La contracción isométrica generada con un único estímulo recibe el nombre de sacudida, como muestra la Figura 1. La amplitud de la sacudida depende de la intensidad del estímulo y su duración, del tipo de músculo (rojo o blanco) y de la temperatura (Guzmán et al., 2003).

Con el registro de sacudida muscular se puede hallar el estímulo umbral que provoca la mínima respuesta del músculo. La medición de la respuesta a estímulos de intensidad creciente permite establecer que ésta se incrementa con la intensidad del estímulo (respuesta graduada). Esto se debe a que a medida que aumenta la intensidad del estímulo hay un aumento en el número de fibras musculares reclutadas. La respuesta es máxima, cuando todas las fibras del músculo se han reclutado para dar lugar a la mayor fuerza de contracción.

En esta práctica la contracción se denomina isométrica porque se efectúa con los extremos del músculo fijos, para impedir su acortamiento. Es decir, en esta contracción el músculo tiene la misma longitud (salvo por el pequeño desplazamiento cedido por el transductor de fuerza).

Fenómeno de sumación

La sumación es un fenómeno excitatorio en el que la fuerza de la contracción muscular aumenta cuando se reciben dos o más estímulos

en rápida sucesión. Se ha explicado previamente que el inicio de la contracción muscular se produce por la liberación de acetilcolina desde la motoneurona en la unión neuro-muscular. La acetilcolina actuando sobre receptores de la célula muscular, produce una despolarización de la membrana (por la entrada de Na^+), que desencadena un potencial de acción en la fibra. Este potencial de acción se propaga a lo largo de la membrana del músculo y desencadena la liberación de iones de calcio almacenados en el retículo sarcoplásmico.

El calcio liberado se une a la troponina, una proteína que normalmente bloquea la unión entre la actina y la miosina, cruciales para el proceso de contracción muscular. Cuando el calcio se une a la troponina, provoca un cambio conformacional que permite que la miosina se una a la actina, iniciando así la generación de puentes cruzados que van a permitir el deslizamiento entre las miofibrillas y, por consiguiente, la contracción muscular.

Ahora, cuando hay un segundo estímulo que llega inmediatamente después del primero, la concentración de calcio en el sarcoplasma ya está elevada debido al primer estímulo cuando llega el segundo. Es decir, si el segundo estímulo llega antes de que los sistemas de bombeo de calcio logren mover todo el calcio nuevamente al retículo sarcoplásmico, el calcio que aún está en el sarcoplasma debido al primer estímulo (calcio residual) se suma al calcio liberado desde el retículo debido al segundo estímulo. Una mayor concentración de este calcio, entonces, está disponible para unirse a la troponina en el segundo estímulo, lo que resulta en una contracción muscular más intensa (sumación, Figura 1).

Si, por el contrario, el músculo recibe un par de estímulos separados temporalmente lo suficiente como para permitir a los mecanismos de bombeo devolver el calcio completamente al retículo sarcoplásmico luego del primer estímulo, el segundo estímulo provocará una respuesta de contracción semejante al primero. Es decir, no habrá sumación (Figura 1).

Contracción tetánica

La tasa de disparos de potenciales de acción en el músculo y la sumación de las fuerzas de contracción debido a cada sacudida, determinarán la fuerza máxima de contracción que puede realizar un músculo. A mayor número de estímulos y mayor frecuencia de estimulación, mayor fuerza de contracción. Si la frecuencia no es muy alta y se permite la sumación, se podrá evidenciar una fuerza de contracción que aumenta de manera “escalonada”, donde cada contracción se “monta” sobre la anterior (tétano no-fusionado, Figura 1). Si la frecuencia del tétano aumenta (es decir, cuando el músculo recibe varios estímulos a una frecuencia muy alta) los eventos de sumación se fusionan y la fuerza de contracción es máxima (tétano fusionado, Figura 1). En otras palabras, la contracción tetánica permite evidenciar el efecto de sumación mecánica de las fuerzas de las distintas sacudidas, producto de la estimulación repetida a alta frecuencia.

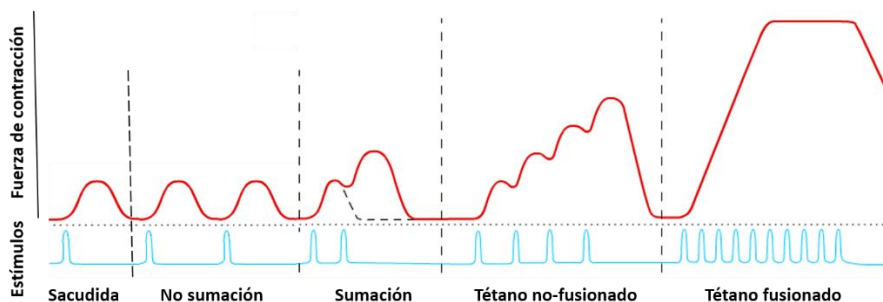


Figura 1. Contracción muscular en respuesta a la frecuencia de estimulación. La gráfica superior (rojo) muestra la fuerza de contracción generada por distintos estímulos (azul). Si un único estímulo es aplicado al nervio ciático, éste provocará una única respuesta de sacudida muscular. Si se aplica un par de estímulos lo suficientemente separados en el tiempo, la respuesta será de dos sacudidas y no habrá sumación.

En cambio, si los dos estímulos se dan con una frecuencia mayor (es decir, con un intervalo entre estímulos menor), se producirá el fenómeno de sumación. Este fenómeno se visualiza, también, con estímulos repetidos (tétano) donde con cada estímulo se produce una sumación de la respuesta que se “monta” sobre la respuesta anterior: en este caso se trata de un tétano no-fusionado. Por último, si el estímulo tetánico es de alta frecuencia, la respuesta de contracción es máxima y no logran verse las sumaciones de cada una de las respuestas sino una única respuesta fusionada.

Fatiga muscular

La fatiga muscular es el resultado de una serie de procesos fisiológicos complejos que afectan la capacidad de los músculos para generar fuerza. Es decir, la fatiga es la disminución de la actividad contráctil del músculo. Ésta podría deberse a la acumulación de productos metabólicos, la reducción de los niveles de energía disponibles y el desequilibrio en la homeostasis de las fibras musculares. Es un fenómeno reversible.

Las fibras del músculo esquelético se fatigan durante el ejercicio muy intenso cuando tienen que depender del metabolismo anaeróbico. Las primeras etapas de la fatiga implican un deterioro de la función miofibrilar, mientras que la disminución de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (SR) se vuelve más importante en las etapas posteriores (Cheng et al., 2018).

Adicionalmente, el agotamiento del glucógeno almacenado en la fibra muscular puede contribuir a la fatiga (por disminución del ATP disponible). El aumento de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno puede causar alteraciones duraderas en la liberación de Ca^{2+} del retículo, lo que resulta en una depresión prolongada de la fuerza del músculo después de una prolongada estimulación (Cheng et al., 2018).

3.3. Materiales y métodos

Animal experimental

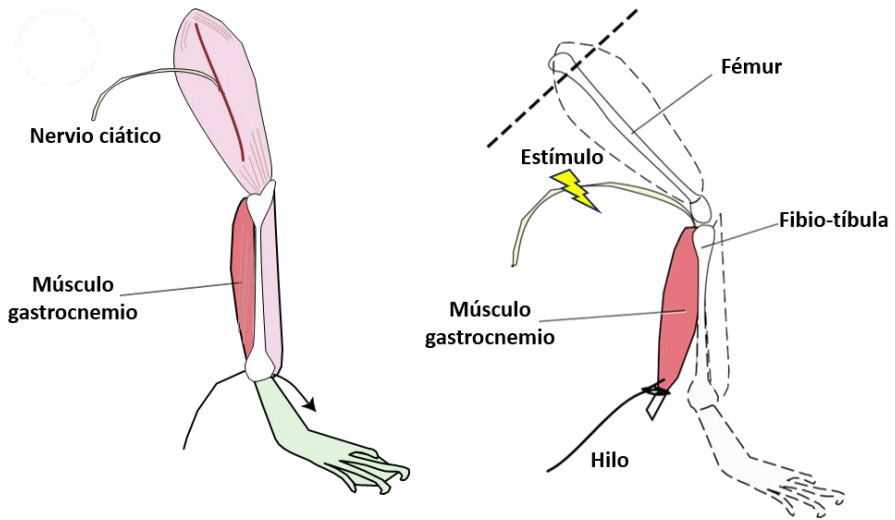
Se utilizó un ejemplar de *Rhinella marina* obtenido del lago artificial adyacente al Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Nota: este animal es el mismo que se utilizó para las Prácticas #1 y #2.

Procedimiento quirúrgico

Antes de realizar el procedimiento quirúrgico, el animal fue anestesiado con cloroformo para evitar cualquier tipo de sufrimiento. Una vez comprobado el nivel de anestesia deseado (ausencia de reflejo palpebral y de retirada de la pata), se procedió a realizar una sección medular a nivel cervical, con la ayuda de un punzón.

Antes de la disección del nervio, se separó completamente la piel de la pata izquierda del animal. Se procedió a la disección del nervio ciático a la altura del fémur, con ayuda de tijeras quirúrgicas para separar el nervio del músculo (Figura 2). Se tuvo especial cuidado de mantener intacto el nervio, utilizando técnicas de disección romas. Se intentó retirar la máxima cantidad de tejido conectivo alrededor del nervio para evitar interferencias en el registro.

Un extremo del músculo gastrocnemio se separó de la fibio-tíbula del animal a través de un corte a nivel del tendón conectado al tobillo del animal. El extremo cortado se ató a una seda quirúrgica 4-0 (hilo); el otro extremo del músculo quedó unido a la rodilla del animal (Figura 2).



<https://animalphys.butlerlab.org/>. Modificado por Julieta Troncoso para fines didácticos de estas notas de clase.

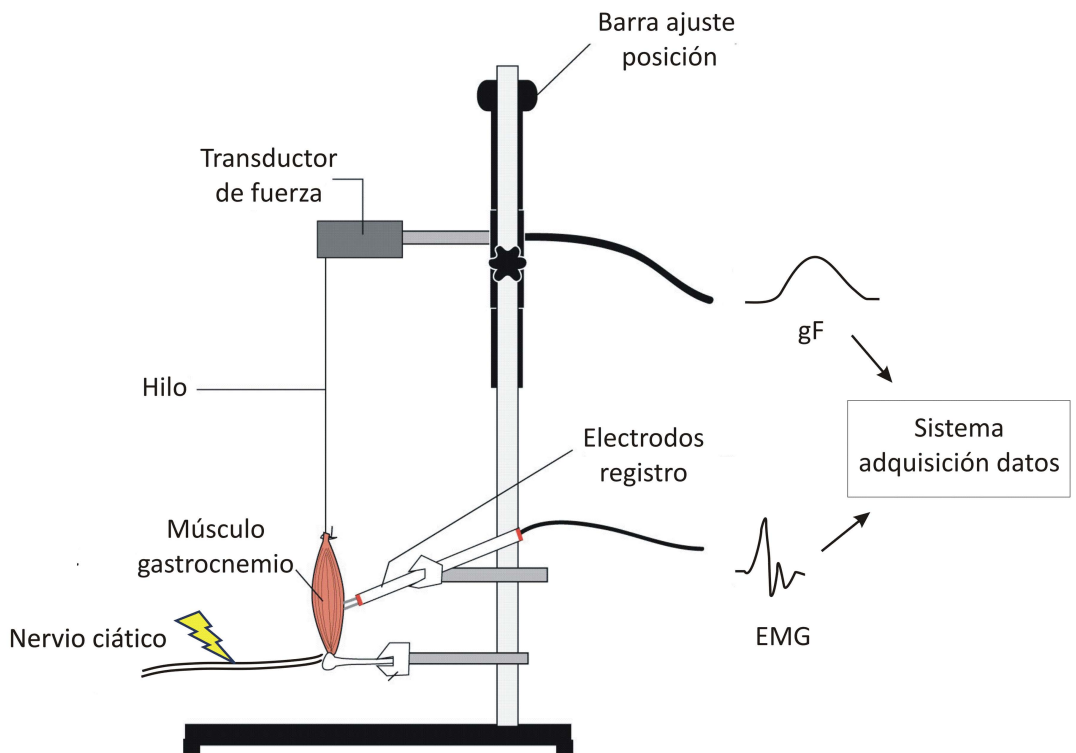
Figura 2. Procedimiento quirúrgico y preparación experimental. Se procedió a la disección del nervio ciático a la altura del fémur, separándolo del músculo y del tejido conectivo, para poder suministrar los estímulos eléctricos. El músculo gastrocnemio se separó de la fibio-tíbula por el extremo unido a la articulación del tobillo y se ató a una hebra de hilo (seda quirúrgica 4-0) para luego atarlo al transductor de fuerza (el extremo unido a la articulación de la rodilla se mantuvo intacto).

Montaje experimental

La Figura 3 muestra un esquema del complejo instrumental que se utilizó en esta práctica. Una vez separado de todo tejido muscular y conectivo, el nervio se apoyó sobre un par de electrodos metálicos de estimulación. El extremo del músculo gastrocnemio se unió, a través de un hilo, a un transductor de fuerza (*Strain Gauge*). Es decir, el músculo y el transductor de fuerza quedaron unidos en serie. El montaje experimental permite hacer la estimulación del nervio ciático a nivel femoral y el registro EMG en el músculo (a través de los electrodos

metálicos de registro directamente ubicados en el músculo) y el registro de la fuerza muscular generada (a través del transductor).

Tanto el nervio ciático como el músculo gastrocnemio se bañaron con gotas de solución Ringer de anfibio (NaCl 114,9 mM; KCl , 5mM; NaH_2PO_4 , 0,85mM; pH7, 1) durante todo el experimento.



<https://animalphys.butlerlab.org/>. Modificado por Julieta Troncoso para fines didácticos de estas notas de clase.

Figura 3. Montaje experimental. Un extremo del músculo gastrocnemio unió, a través de una hebra de hilo, a un transductor de fuerza. El desplazamiento del transductor, producto de la contracción muscular, permitió el registro de la fuerza generada por el músculo (en gramo-fuerza, gF), luego de cada estímulo. El nervio ciático se estimuló con

pulsos cuadrados de corriente (a la altura del fémur). Un par de electrodos insertados directamente al músculo sirvieron para el registro de los potenciales de acción extracelulares de las fibras musculares (electromiograma, EMG).

Estimulación

La contracción muscular y la consiguiente generación de fuerza del músculo gastrocnemio se logró por la estimulación, a través del paso de corriente, del nervio ciático. Todos los estímulos tuvieron una duración de 100 μ s (parámetro fijo). Las intensidades de estimulación fueron las siguientes: 200 μ A; 210 μ A; 220 μ A; 230 μ A; 240 μ A; 300 μ A; 400 μ A (parámetro variable).

Registro

Se realizaron dos tipos de registro sobre del músculo gastrocnemio en respuesta a la estimulación del nervio ciático: 1) registro electromiográfico (EMG): potenciales de acción extracelulares de las fibras musculares (medida mediante electrodos metálicos directamente insertados en el músculo); y 2) registro de fuerza de contracción: fuerza generada por el músculo (medida a través de un transductor).

Calibración del transductor y medición de la fuerza

El transductor consiste en un elemento que se deforma con la fuerza realizada por el músculo. Al deformarse, el transductor varía su resistencia eléctrica. De este modo, con el elemento colocado en un puente de Wheatstone se obtiene un voltaje (V) directamente proporcional a la fuerza de contracción muscular. La calibración del transductor se obtiene colgando una masa de 100 g, cuyo peso es igual a 100 gf (gramo-fuerza).

Adquisición y procesamiento de datos

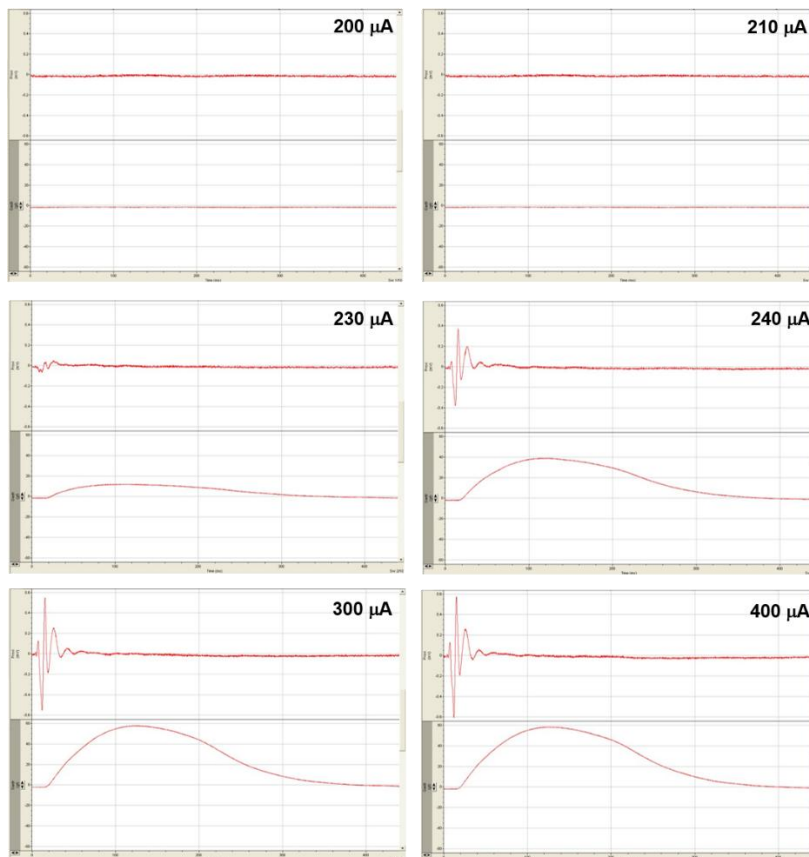
Los electrodos de registro estaban conectados a un pre-amplificador diferencial y a un amplificador de la señal (*CiberAmp* 380, *Axon instruments*); las señales electrofisiológicas obtenidas se digitalizaron mediante un convertidor análogo-digital *DigiData* 1200 (*Axon instruments*). Los registros se guardaron para luego ser analizados off-line mediante el software *Clampfit* (v.8.0) en un computador.

3.4. Resultados

Búsqueda de umbrales

Con el objetivo de buscar el estímulo umbral para desencadenar una respuesta de contracción del músculo gastrocnemio, se aplicaron pulsos cuadrados de corriente en el nervio ciático de duración constante (100 μ s, parámetro fijo) e intensidades crecientes: 200 μ A; 210 μ A; 230 μ A; 240 μ A; 300 μ A; 400 μ A (parámetro variable). La Figura 4 muestra simultáneamente el registro electromiográfico (EMG, registro superior) y la fuerza generada por el músculo gastrocnemio (registro inferior), para cada intensidad de estimulación.

Figura 4. Búsqueda de umbrales de respuesta en el nervio ciático del sapo. Los diferentes registros muestran la respuesta electromiográfica (EMG, trazo superior) y la fuerza de contracción del músculo gastrocnemio (trazo inferior) ante estímulos de intensidad creciente en el nervio ciático. En todos los casos, la duración del estímulo fue de 100 ms. Las gráficas corresponden a valores de voltaje (Vm) para la gráfica superior y de gramo-fuerza (gf) en la gráfica inferior, en función del tiempo (ms).



Pares de estímulos

Con el fin de evaluar los efectos de sumación en la fuerza de contracción del músculo gastrocnemio, se estimuló el nervio ciático con pares de estímulos (E1 y E2) separados por intervalos entre estímulos (IEE) variables. La intensidad y la duración de ambos estímulos fue siempre la misma: 220 μA y 100 ms, respectivamente (parámetros fijos). Se utilizaron frecuencias de estimulación de: 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 50 Hz y 100 Hz (parámetro variable). La Figura 5 muestra los registros electromiográficos (trazo superior) y la fuerza de contracción del músculo gastrocnemio (trazo inferior), cuando se estimula el nervio ciático a los distintos intervalos entre estímulos mencionados.

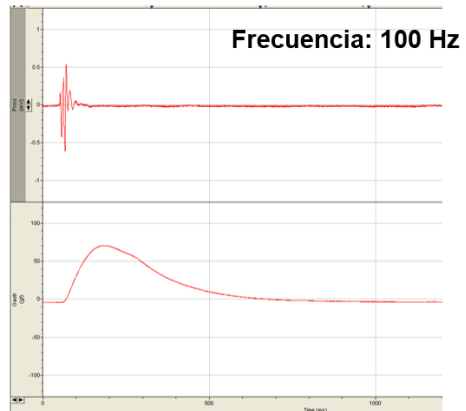
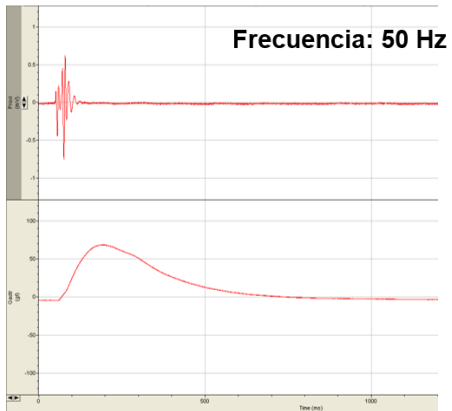
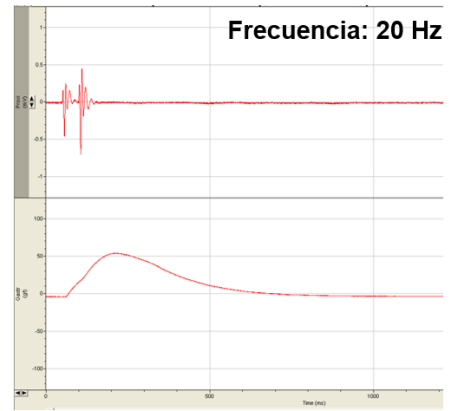
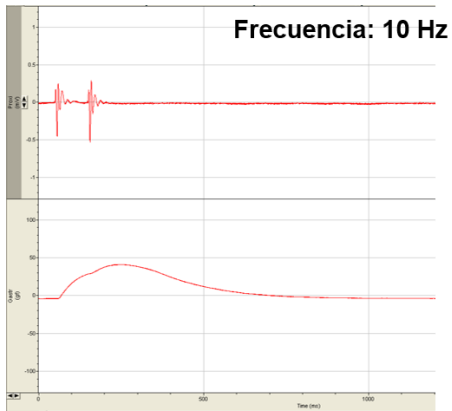
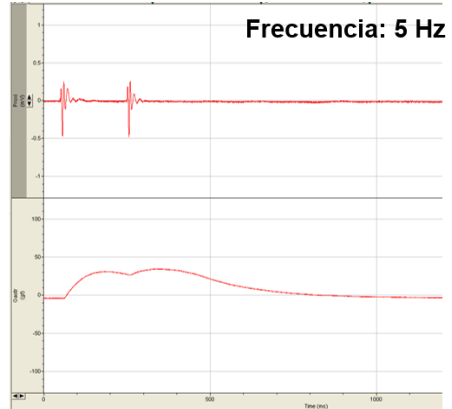
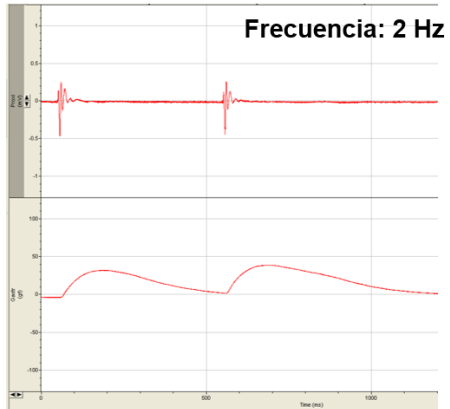


Figura 5. Pares de estímulos. Los diferentes registros muestran la respuesta electromiográfica (EMG, gráfica superior) y la fuerza de contracción del músculo gastrocnemio (gráfica inferior) ante dos estímulos en el nervio ciático, con diferente intervalo entre estímulos (es decir, diferente frecuencia de estimulación: 2, 5, 10, 20, 50 y 100 Hz, respectivamente). En todos los casos, la duración de cada estímulo fue de 100 ms y su intensidad, 220 mA. Las gráficas corresponden a valores de voltaje (Vm) para la gráfica superior y de gramo-fuerza (gf) en la gráfica inferior, en función del tiempo (ms).

Tren de estímulos

Con el objetivo de evaluar la relación entre la fuerza de contracción, el número de estímulos y la frecuencia de estimulación, se aplicó al nervio ciático un tren de 20 estímulos eléctricos consecutivos. Los estímulos del tren tuvieron siempre la misma intensidad y duración (220 mA y 100 ms, respectivamente: parámetro fijo). Se modificó, sin embargo, el intervalo entre esos estímulos (parámetro variable), a través del cambio en la frecuencia de estimulación.

En un principio se aplicaron los estímulos a alta frecuencia (30 Hz, 20 Hz, 16.6 Hz) para evidenciar el efecto de sumación tetánica no-fusionada (Figura 6). Luego, el tren de estímulos se suministró a baja frecuencia (2.5 Hz) para evidenciar el efecto de la sumación “escalonada” (tétano no-fusionado) y a bajísima frecuencia (1 Hz), donde no se observa sumación (Figura 7).

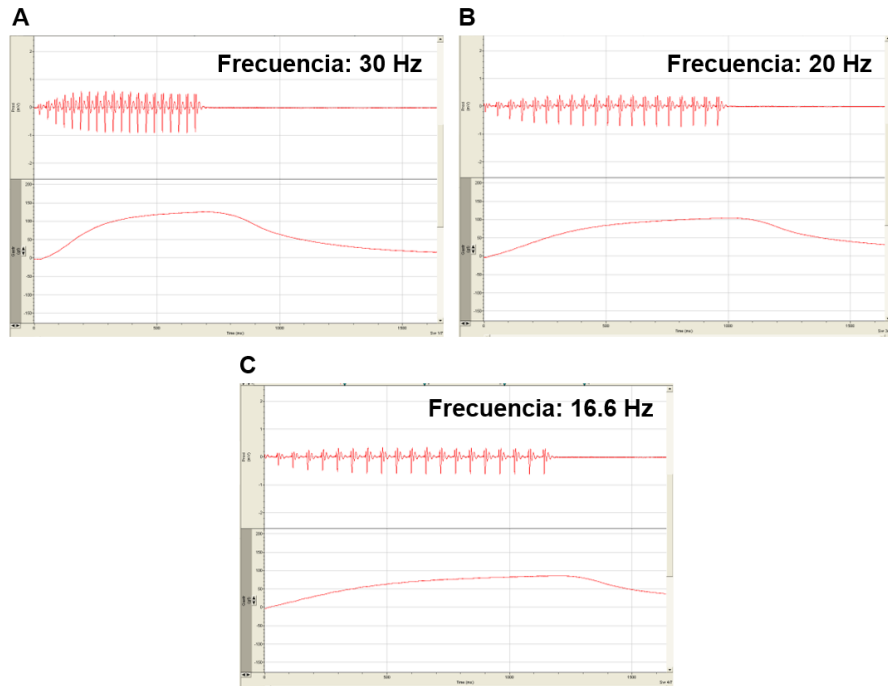


Figura 6. Tren de estímulos de alta frecuencia. Los diferentes registros muestran la respuesta electromiográfica (EMG, gráfica superior) y la fuerza de contracción del músculo gastrocnemio (gráfica inferior) ante 20 estímulos de 220 mA de intensidad y 100 ms en el nervio ciático. En cada uno de los casos, el parámetro que se varió fue la frecuencia de estimulación: a 30 Hz (A), 20 Hz (B) y 16.6 Hz (C), respectivamente. Las gráficas corresponden a valores de voltaje (Vm) para la gráfica superior y de gramo-fuerza (gf) en la gráfica inferior, en función del tiempo (ms).

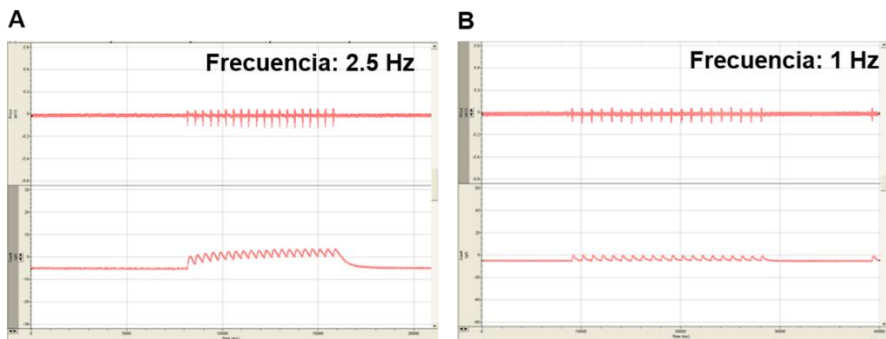


Figura 7. Tren de estímulos de baja frecuencia. Los diferentes registros muestran la respuesta electromiográfica (EMG, trazos superiores) y la fuerza de contracción del músculo gastrocnemio (trazos inferiores) ante 20 estímulos de 220 mA de intensidad y 100 ms en el nervio ciático. En **A**, la frecuencia de estimulación fue de 2.5 Hz, observándose una sumación tetánica no-fusionada. En **B**, la frecuencia de estimulación fue de 1 Hz y no se observa el fenómeno de sumación. Las gráficas corresponden a valores de voltaje (Vm) para los trazos superiores y de gramo-fuerza (gf) para los trazos inferiores, en función del tiempo (ms).

3.5. Referencias bibliográficas

- Cheng, A. J., Place, N., Westerblad, H. (2018). *Molecular Basis for Exercise-Induced Fatigue: The Importance of Strictly Controlled Cellular Ca²⁺ Handling*. Cold Spring Harb Perspect Med., 8(2), a029710. doi: <http://10.1101/cshperspect.a029710>
- Galvani, L. (1791). *Aloysii Galvani De viribus electricitatis in motu musculari commentarius*. Ed. Ex Typographia Instituti Scientiarum.
- Guzmán, A., Rojas, J., Camacho, M., Fajardo, G., Spinel, C. (2003). *Fisiología animal. Notas de Clase*. Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ciencias - Departamento de Biología, Bogotá.
- Randall, D. J., Burggren, W. W., French, K. (2002). *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. Edition 5. Freeman and Company.

3.6. Guía de preguntas de la Práctica 3

Una vez leído el marco teórico, analizado los resultados y observado el video correspondiente a la práctica de contracción isométrica del músculo gastrocnemio, los estudiantes deberán responder y presentar de manera grupal a modo de informe de laboratorio, las preguntas de esta guía.

I. Curva de intensidad

Se suministraron estímulos al nervio ciático, con las siguientes características:

- Pulso cuadrado de corriente de duración constante: 100 μ s (parámetro fijo).
- Intensidades crecientes de estimulación: 200 μ A; 210 μ A; 230 μ A; 240 μ A; 300 μ A; 400 μ A (parámetro variable)

1. ¿Qué es el estímulo **umbral**? ¿Y sub-umbral? ¿Y supra-umbral?
2. ¿Entre qué valores estuvo el estímulo umbral en este experimento?
3. ¿Por qué hay un aumento en la amplitud del registro electromiográfico del músculo gastrocnemio conforme aumenta la intensidad de estimulación?
4. ¿Por qué hay un aumento en la fuerza de contracción muscular conforme aumenta la intensidad de estimulación?
5. ¿A qué intensidad de estimulación se logra la tensión máxima muscular y por qué ocurre esto?
6. Construya una curva de fuerza de contracción (o tensión) en función de la intensidad del estímulo y explíquela. Utilice los datos experimentales que se le brindaron.
7. Calcule el período de latencia de la contracción muscular. ¿A qué corresponde ese tiempo?

II. Pares de estímulos

Se suministraron dos estímulos (E1 y E2) al nervio ciático, con las siguientes características:

- Duración E1 = Duración E2 = 100 μ s (parámetro fijo).
 - Intensidad E1 = Intensidad E2 = 220 μ A (parámetro fijo).
 - Frecuencia de estimulación: 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 50 Hz, 100 Hz (parámetro variable).
1. ¿Qué sucede con la fuerza de contracción a medida que aumenta la frecuencia de estimulación? ¿Qué ocurre con la respuesta al segundo estímulo?
 2. ¿Cómo explicaría el fenómeno observado cuando se estimula a 20 Hz?
 3. ¿Cuál es el intervalo entre estímulos E1-E2 cuando la frecuencia de estimulación es de 20 Hz? ¿Y cuando la frecuencia es de 50 Hz?

III. Tren de estímulos

Se suministraron trenes de estímulos al nervio ciático, con estas características:

- Número de estímulos del tren: 20 (parámetro fijo)
- Intensidad de cada estímulo: 220 μ A (parámetro fijo)
- Duración de cada estímulo: 100 μ s (parámetro fijo)
- Frecuencia estimulación: 30 Hz, 20 Hz, 16.6 Hz, 2.5 Hz, 1 Hz (parámetro variable)

1. ¿Qué sucede con la contracción muscular cuando se estimula al nervio ciático con un tren de estímulos de alta frecuencia? ¿Por qué ocurre este fenómeno?
2. ¿Cómo se denomina este tipo de contracción?
3. Reflexione respecto de la fuerza de contracción en función del número de estímulos y de la frecuencia.
4. ¿Qué es la fatiga muscular? ¿Por qué ocurre este fenómeno?

Colección

Notas de Clase

Las Notas de Clase *Métodos experimentales en Fisiología Animal: manual de prácticas audiovisuales*, es una herramienta pedagógica diseñada para acompañar la asignatura de Fisiología Animal de la carrera de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. La obra ofrece un enfoque práctico y conceptual de la disciplina, presentando tres prácticas fundamentales: transporte activo transepitelial, registro del potencial de acción compuesto en el nervio ciático, y contracción isométrica del músculo gastrocnemio, todas realizadas en el sapo *Rhinella marina*. Cada práctica incluye un marco teórico, explicaciones detalladas de los montajes experimentales, registros electrofisiológicos y preguntas guía para fomentar el análisis crítico de los estudiantes. El texto se adapta a la normativa colombiana que prohíbe el sacrificio de animales con fines demostrativos, por lo que utiliza grabaciones audiovisuales de experimentos, garantizando tanto el aprendizaje como la ética en la enseñanza. A través de esquemas, resultados experimentales y guías de discusión, el libro busca consolidar conceptos de transporte iónico, potencial de acción, conducción nerviosa y fisiología de la contracción muscular. En conjunto, constituye una herramienta didáctica valiosa que integra teoría, práctica y reflexión ética, facilitando la comprensión de los principios fundamentales de la fisiología animal.

