ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE UN NERVIO PERIFÉRICO *IN VITRO*.

ACERCA DE ESTE PROTOCOLO

Las actividades prácticas de Fisiología buscan promover la adquisición de destrezas vinculadas al manejo del **método científico**; en particular: comprender los pasos involucrados en la elección de un tema de investigación o de la formulación de una pregunta y contribuir al planteo de hipótesis y a la formulación de objetivos generales y específicos; participar del proceso de elección del modelo experimental y de la estrategia para poner a prueba la (o las) hipótesis o para alcanzar los objetivos planteados; participar en la obtención de datos con procedimientos especializados enfatizando en el rigor del proceso, evaluando el alcance y las limitaciones del procedimiento utilizado; describir los resultados en forma precisa en el lenguaje propio del ámbito académico; concluir y evaluar la validez de la hipótesis planteada, del diseño experimental y generar nuevas preguntas.

En este protocolo se introduce una **hipótesis general** vinculada a las propiedades bioeléctricas de un **nervio periférico,** proponiéndose el desarrollo de una serie de experimentos tendientes a su **contrastación** que implican el uso de un **modelo experimental** establecido. El ámbito en el que tiene lugar el planteamiento de dicha hipótesis dependerá del marco en el que se desarrolle esta actividad práctica (*e.g.:* cursos de grado, cursos de profundización, prueba práctica de un concurso de oposición, etc.); así, la formulación del capítulo de **introducción** de este protocolo queda librada al contexto específico en el que el mismo sea aplicado.

Definida la **hipótesis** general, se plantea un **objetivo general** y una serie de **objetivos específicos (OEs)**. Dependerá del marco de desarrollo de la actividad la **selección particular** de los OEs adecuados a la misma.

Finalmente, se plantean aspectos metodológicos generales y una serie de **maniobras experimentales** concretas. Estas maniobras o "**experimentos**" son sugeridos sin que se formule explícitamente para cada uno la hipótesis particular que da lugar a su desarrollo. Tampoco se

establece al cumplimiento de qué OE contribuye cada una. Al contrario, estas aparecen como una lista de sugerencias, con ciertos detalles metodológicos, pero su selección dependerá de los OEs seleccionados para cada situación de trabajo. Así, en una instancia en particular se habrá definido, por ejemplo, cumplir con el "OE1" y el "OE2", a través de la realización de los experimentos "1" y "2".

Asimismo, se ha introducido en el protocolo una serie de cuadros y tablas con campos a completar, que permitirán el uso de este material como "bitácora" de la actividad práctica.

Por último, no se ha pautado una guía de análisis final de los resultados, o preguntas que orienten hacia la formulación de las conclusiones; en los **experimentos 1** y **2** se sugiere, a modo de ejemplo, una serie de pasos ordenados para el análisis de los datos proporcionados por dichas maniobras.

1. HIPÓTESIS

La **hipótesis** fundamental de esta serie experimental establece que el *nervio ciático* constituye una **estructura excitable**, capaz por tanto de generar una **respuesta activa propagada** consecuente a la aplicación de un **estímulo adecuado.**

2. OBJETIVOS EXPERIMENTALES

2.1. OBJETIVO GENERAL

Obtención, **descripción** y **análisis** del registro **extracelular bitópico** (**diferencial)** de un **potencial de acción compuesto (PAC)** en respuesta a la **estimulación extracelular bipolar** del *nervio ciático in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

Nota: *La siguiente no constituye una lista ordinal y exhaustiva de los* ***objetivos específicos*** *de la actividad práctica. Como se ha mencionado, la selección de estos objetivos así como la secuencia en que se dará cumplimiento a los mismos dependerá de las características de la instancia particular en la que se haga uso de este Protocolo.*

OE1. Determinar el conjunto de parámetros de adquisición óptimos (i.e.: frecuencia de muestreo, amplificación de la señal, etc.) que aseguren una adecuada resolución de la respuesta bioeléctrica del preparado a la estimulación extracelular aplicada.

OE2. Identificar y describir los componentes de las respuestas obtenidas (artefacto y respuesta biológica).

OE3. Caracterizar la relación entre la intensidad del estímulo aplicado y la amplitud de la respuesta biológica obtenida.

OE4. Determinar si la respuesta biológica satisface la *ley del todo o nada* que caracteriza a las respuestas activas de las fibras excitables.

OE5. Poner de manifiesto la existencia de *refractariedad* de la respuesta biológica, como corolario de la fenomenología que subyace a su generación.

OE6. Poner de manifiesto el carácter *no decremental* de la propagación de la respuesta biológica y cuantificar la velocidad de conducción del PAC, considerando las limitaciones impuestas por el diseño experimental a tales efectos.

OE7. Discutir el carácter *bidireccional* de la propagación del PAC, considerando las limitaciones impuestas por el diseño experimental para su demostración.

OE8. Poner de manifiesto la *acción de anestésicos locales* en la conducción de la respuesta biológica, discutiendo las bases iónicas y moleculares que sustentan su efecto.

OE9. Inferir el signo (*despolarización* vs. *hiperpolarización*) de los cambios de potencial de membrana que subyacen a la generación de la respuesta biológica y determinar el sitio de origen del PAC en las condiciones de estimulación empleadas (catódico vs anódico).

3. MÉTODOS

3.1. MODELO EXPERIMENTAL

Se empleará un modelo *in vitro*, aislando un segmento del *n. ciático* de un animal de experimentación. Se llevará a cabo su estudio electrofisiológico mediante el dispositivo experimental que se detalla en el apartado 3.6.

Los estudios *in vitro* se realizan sobre **componentes** de un **organismo** (células, tejidos u órganos) **aislados de su entorno biológico habitual.** Este tipo de estudio permite sortear ciertas dificultades inherentes al estudio de los mecanismos fisiológicos en organismos enteros (dada la complejidad que caracteriza a los sistemas biológicos), reduciendo el número de interacciones posibles entre los múltiples componentes y niveles de organización. Asimismo, permiten **controlar variables ambientales** (tales como **temperatura**, **composición hidroelectrolítica** del medio en que son mantenidos estos componentes, **pH**, **concentraciones** de ciertas **moléculas** de **señalización**, etc.), permitiendo la

simplificación y **análisis riguroso** de las relaciones de correlación y causalidad entre las **variables** analizadas.

Se señala sin embargo la necesidad de una cuidadosa interpretación de los resultados obtenidos en este tipo de estudios cuando se pretende generalizar las conclusiones al organismo entero, restricción que puede considerarse como una de las principales desventajas de este tipo de abordajes. Finalmente, la **preservación** del preparado biológico en estas condiciones supone la implementación de un conjunto de estrategias, tales como el control de las variables fisicoquímicas antes señaladas.

3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El *n. ciático* será obtenido de ratas *Wistar (Rattus norvegicus*) adultas (pesos entre 250 y 350 g) provistas por la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina.

PROBLEMA:

Reseñe brevemente cuáles son algunas de las principales ventajas y desventajas que ofrece el empleo de un nervio ciático *in vitro* procedente de este animal de experimentación.

3.3. ANESTESIA

Los animales serán anestesiados con URETANO por vía intra-peritoneal (IP), empleando una dosis de 1,5 g/Kg de peso corporal, en dosis única o en dos dosis secuenciales del 50% del total c/u.

3.4. SOLUCIONES

Se empleará solución fisiológica artificial conteniendo buffer CO_2/HCO_3^- (pH = 7,4) con la siguiente composición: **NaCl 124 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.25 mM, $MgSO_4$ $7H_2O$ 2 mM, $NaHCO_3$ 26 mM, glucosa 10 mM, $CaCl_2$ 2 mM**. La solución será barbotada hasta el momento en que el preparado sea montado en la caja para nervio (ver DISECCIÓN) con carbógeno (**95% O_2 - 5% CO_2**).

Nota: Debe disponerse de un volumen de aproximadamente 20 ml previamente congelado en un vaso de Bohemia de 50-100 ml, al que se agregará solución a ~4°C y donde se dispondrá del preparado extraído (ver DISECCIÓN).

3.5. DISECCIÓN

Aspectos Anatómicos

- El *nervio ciático* de la rata se origina de los segmentos espinales L4-L6, dando luego origen (5-6 mm distalmente al *trocánter del fémur*) a dos fascículos: el fascículo *tibial* (del que se originan los nervios **sural** y **tibial)** y el fascículo *peroneal* (que da origen a los nervios **peroneo** y una rama cutánea que inerva la cara próximo-lateral de la pantorrilla); ver parte **C** de **Fig. 1**.
- En la parte **B** de la **Fig. 1** se presenta una vista lateral de los grupos musculares de la rata. El *n. ciático* se extiende a través de los músculos profundos del muslo; puede ser observado si se refleja el *gluteus superficialis* y el *bíceps femoris* sobre la cara lateral del muslo.
- En la parte **A** de la misma figura (tomada de **SUAID, C. A, et. al.,** ***Aspects of the Macro and Microscopic Anatom of the Sciatic Nerve in Wistar Rats*****.** Int. J. Morphol., 34(3):877-884,2016.) se indican los extremos proximal (**p**) y distal (**d**) del nervio ciático. El primero se identifica en la emergencia del nervio a través del *foramen ciático*, mientras que el distal se reconoce como el sitio en el que la ramificación terminal tiene lugar.

Recomendaciones

- Durante la disección del *nervio* debe mantenerse la región (y específicamente al n. ciático) humedecidos con solución fisiológica a 4 °C.
- Disponer de un vaso de Bohemia con 20 ml congelados de solución fisiológica, sobre los que se agregarán ~30 ml de solución enfriada a ~4°C en el momento de extraer el preparado, barbotando con carbógeno. El nervio será colocado en esta solución una vez extraído y se dejará a temperatura ambiente hasta que se alcance el equilibrio térmico, durante aproximadamente 30 minutos, antes de ser transferido a la **caja para nervio**.
- Para la extracción del *n. ciático* proceda a ligar los extremos distal y proximal. Identifíquelos adecuadamente (por ejemplo utilizando hilos de ligadura de longitudes diferentes).

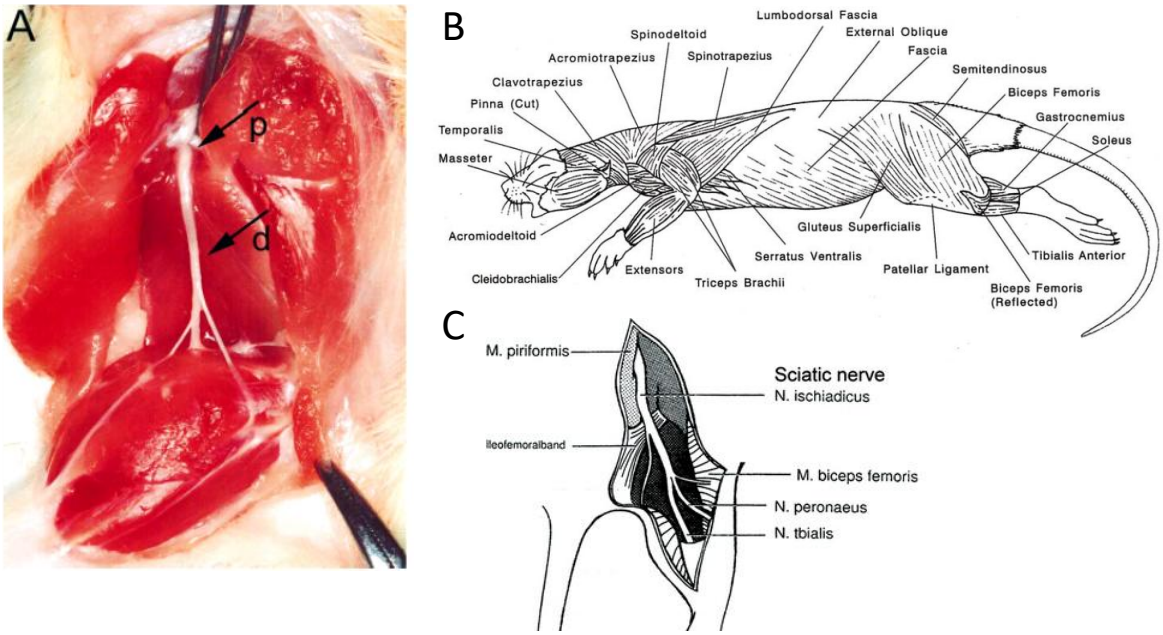


Fig. 1

3.6. ESTIMULACIÓN, REGISTRO Y ADQUISICIÓN DE DATOS

En la **Fig.1** se representan los componentes del **dispositivo experimental** que será empleado. Una descripción en mayor detalle de las características de los componentes, así como comentarios respecto del proceso de digitalización, adquisición y almacenamiento de datos, se encuentran en los ANEXOS.

CAJA PARA NERVIO

Una vez extraído del animal, y tras el tiempo de permanencia en la solución fisiológica descrita en "DISECCIÓN" el preparado será montado en una **caja para nervio** como la presentada en la **Fig.1**. Esta caja contiene una serie de **electrodos** paralelos de **plata clorurada (Ag/AgCl)**, separados entre sí por 0,5 cm. La caja debe ser cubierta luego con un **portaobjetos** de **vidrio**, a los efectos de evitar la desecación del preparado. La caja para nervio asegura la no existencia de cortocircuitos extracelulares entre los electrodos de estimulación y registro, por lo que el volumen de solución hidroelectrolítica que mantiene el preparado una vez retirado de la incubación y colocado sobre los electrodos de Ag/AgCl debe ser minimizado.

ESTIMULADOR

Los estímulos eléctricos serán generados por un **estimulador GRASS mod. SD9** y consistirán en **pulsos rectangulares de voltaje**. Para una descripción en mayor detalle de las características del

estimulador empleado véase el ANEXO correspondiente. El **cátodo** y el **ánodo** de estimulación se dispondrán en el **extremo DISTAL** del nervio, colocando inicialmente el cátodo por fuera y el ánodo por dentro (véase **Fig.1**). De este modo, se efectuará la **estimulación extracelular bipolar del preparado.** Se controlará la **frecuencia** a la que se aplique la estimulación (pulsos por segundo) y el **intervalo** entre pulsos (en los casos en los que se aplique **pulsos pareados**) según objetivos específicos.

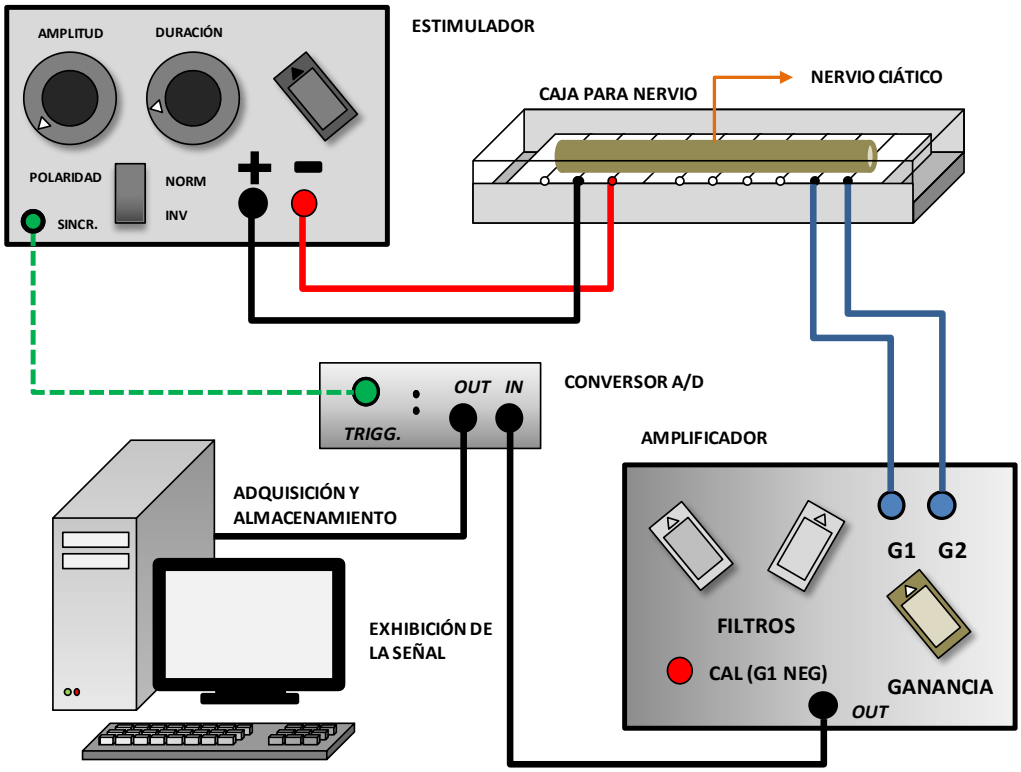


Fig. 2

CONVERSIÓN A/D, ADQUISICIÓN, VISUALIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO

El registro de la actividad bioeléctrica se llevará a cabo a través de la **medida diferencial del potencial eléctrico extracelular** mediante un **PRE-AMPLIFICADOR GRASS mod. p55** (ver ANEXOS). Los electrodos de registro designados por **G1** y **G2** se situarán en el **extremo PROXIMAL** del preparado. La señal será **amplificada** de acuerdo a los requerimientos de resolución del CAD (ver ANEXOS) y **filtrada** analógicamente. La señal analógica generada por el PRE-AMPLIFICADOR será digitalizada por el **CAD NI USB-6009** (ver ANEXOS). La **adquisición,** almacenamiento y visualización

de la señal se efectuará mediante el programa **WinWCP V. 5.7.2.** (ver ANEXOS). Este programa será igualmente utilizado para el **procesamiento** y **análisis** ulterior de los datos.

4. MANIOBRAS EXPERIMENTALES PROPUESTAS

Para el cumplimiento de los **Objetivos Específicos** (**OE**) planteados se propone a continuación una serie de maniobras experimentales (designadas "Experimentos 1, 2, 3", etc.), indicando asimismo que: **(1)** el cumplimiento de un **OE** dado puede depender de la realización de un **conjunto de maniobras experimentales**, que deberá seleccionarse adecuadamente y **(2)** una misma maniobra experimental puede proporcionar datos que contribuyan al cumplimiento de más de un **OE**.

Para los Experimentos 1 y 2 se propone un cuestionario guía para el ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS obtenidos.

4.1. EXPERIMENTO #1

El objetivo de este experimento es el de proporcionar una primera aproximación a los aspectos fundamentales de la estimulación del preparado y del registro del PAC.

En la **Fig. 3** se esquematiza la **disposición** de los **electrodos de estimulación y registro** relativa a los extremos **DISTAL** y **PROXIMAL** del preparado.

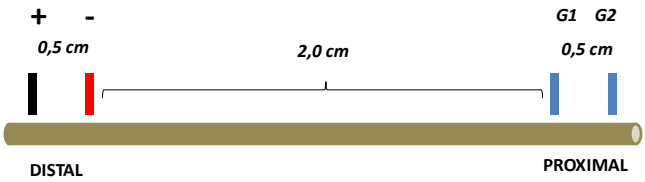


Fig. 3

La disposición de los electrodos de estimulación del modo presentado es referida como "**estimulación catódica**".

a) **Configure el amplificador GRASS p55** de acuerdo a los siguientes parámetros:

Ganancia	X 1000
Filtros (LOW, -6 dB)	0.1 Hz
Filtros (HIGH, -6 dB)	10 KHz

b) Realice la **calibración** del dispositivo de adquisición para la ganancia seleccionada, obteniendo como dato el **factor de escala (V/*Units*)** que será empleado en la **configuración de la adquisición** en WinWCP.

c) Configure la **estimulación** con los siguientes parámetros (consulte los ANEXOS para mayor detalle); los parámetros controlados se representan en el esquema de la Fig. 4:

Amplitud del Estímulo	0.5 Volts (*)
Duración del Estímulo	0.05 ms
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
Modalidad de la estimulación (simple o pares)	Simple
Polaridad	Normal (Estimulación **catódica**)

(*) La amplitud del estímulo puede incrementarse, de ser necesario, hasta que se oberve una respuesta con dos componentes, siendo bifásico y de mayor duración el segundo.

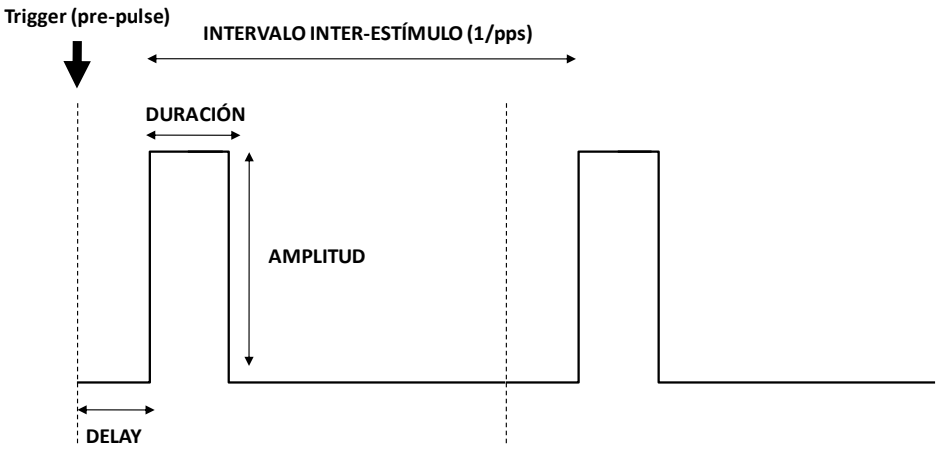


Fig. 4

d) Configure la **adquisición** en WinWCP con los siguientes parámetros (consulte los ANEXOS para mayor detalle):

N° de Canales	1
Intervalo de Muestreo (1/frecuencia de muestreo)	5×10^{-5} s (20 KHz)
Duración del Trazado	12.8 ms
N° de Trazados	256
V/*Units*	Según **calibración**
N° de Trazados	20

Nota: En WinWCP deberá asignar un nombre de archivo para guardar los datos obtenidos en cada experimento. Consulte en ANEXOS para mayor detalle.

e) Inicie la adquisición en *WinWCP* pulsando el botón "RECORD" de la ventana "*Record to disk"* y llevando el selector "MODE" del ESTIMULADOR a la posición "Repeat".

NOTAS ADICIONALES

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Una vez obtenido el registro en las condiciones especificadas, discuta los resultados y responda a las siguientes preguntas:

A – ADQUISICIÓN DE LA SEÑAL

1. **a)** Realice el promedio *off-line* de los 20 trazados obtenidos (consulte el MANUAL de USUARIO de WinWCP para detalles sobre el procedimiento)
   b) ¿Qué diferencias advierte entre el promedio y cada uno de los trazados? ¿Qué ventajas aporta promediar una señal?
2. ¿Es adecuada la GANANCIA seleccionada para el registro de la señal efectuado? Fundamente su respuesta.

3. ¿Considera que es adecuada la relación **señal/ruido** (**SNR**) del registro? ¿Podría incrementarla? ¿Cómo?
4. **a)** ¿Es adecuada la FRECUENCIA DE MUESTREO seleccionada? Fundamente.

   b) Repita el procedimiento pero empleando frecuencias de muestreo de 100 Hz y 1KHz (consulte en ANEXOS la forma de efectuar estos cambios manteniendo constante la **duración del trazado**). Compare los resultados obtenidos en cada caso y con los obtenidos a 20 KHz. Discuta la implicancia de la selección de la **frecuencia de muestreo** en el proceso de digitalización de una señal.

   c) ¿Cómo puede determinarse la frecuencia de muestreo óptima para la digitalización de una señal?

B – COMPONENTES DE LA RESPUESTA

1. Identifique los componentes de la respuesta obtenida: ¿a qué corresponde cada uno? Fundamente.
2. **Describa los componentes identificados.** Puede completarse la siguiente tabla introduciendo algunos de los parámetros que usted entienda capaces de **caracterizar y comparar cuantitativamente** a las componentes *(por ejemplo: amplitud de la señal, duración, latencia, polaridad, etc.)*. Se recomienda incluir para cada parámetro una breve DEFINICIÓN (por ejemplo: para el parámetro **AMPLITUD** podría corresponder la **DEFINICIÓN** "*diferencia entre los valores máximo y mínimo alcanzados por la señal"*). La **cuantificación** de los parámetros puede realizarse mediante las herramientas de procesamiento de *WinWCP* (consulte el MANUAL DE USUARIO para más detalles).

3. Proponga **experimentos complementarios** para contrastar la hipótesis interpretativa planteada en la pregunta **B.1**, en relación al origen de los componentes identificados.

Parámetro	**Definición**	**Valor (unidades)**	
		Componente "1"	**Componente "2"**
		( )	( )
		( )	( )
		( )	( )
		( )	( )
		( )	( )
		( )	( )
		( )	( )
		( )	( )

4.2. EXPERIMENTO #2

En este experimento se caracterizará la relación entre la <u>amplitud del estímulo aplicado</u> y la <u>amplitud de la respuesta provocada</u>.

HIPÓTESIS:

Una vez definidos los parámetros de adquisición adecuados (dispone de un cuadro a continuación que puede utilizar para llevar un registro de los mismos), se realizará la estimulación del preparado (empleando la configuración del dispositivo mostrada en la **Fig.3**) pero variando la **amplitud del estímulo** en saltos de magnitud constante (ΔmV).

ADQUISICIÓN

N° de Canales	1
Intervalo de Muestreo (1/frecuencia de muestreo)	
Duración del Trazado	12.8 ms
N° de Trazados	
V/*Units*	
N° de Trazados	10

ESTÍMULO

a) Establezca un estímulo inicial de 0 mV de ampliud y 0.05 ms de duración. Fije un valor para el incremento ΔmV (por ejemplo 0.1 V).

b) Obtenga **10 trazados por cada amplitud de estímulo empleada**. El siguiente cuadro puede utilizarse para resumir las características del estímulo. *En WinWCP deberá asignar un nombre de archivo para guardar los datos obtenidos en cada experimento. Consulte en ANEXOS para mayor detalle.* Inicie la adquisición en *WinWCP* pulsando el botón "RECORD" de la ventana "*Record to disk"* y llevando el selector "MODE" del ESTIMULADOR a la posición "Repeat

Archivo ("*.wcp"):			
Amplitud del Estímulo	Inicial	Incremento (ΔmV)	Final
Duración del Estímulo	0.05 ms		
Frecuencia de estímulo	1 pps		
Delay	1 ms		
Modalidad de la estimulación (simple o pares)	Simple		
Polaridad	Normal (Estimulación **catódica**)		

c) **Reitere el procedimiento hasta que el** SEGUNDO COMPONENTE **de la respuesta alcance una amplitud estable**.

En el ANEXO se indica un método para monitorizar la **corriente** aplicada al preparado, medida a través de una resistencia conocida colocada en serie con uno de los electrodos de estimulación. Puede agregarse un canal de registro en WinWCP para obtener simultáneamente las señales procedentes del amplificador p55 y la corriente inyectada. En ese caso, la amplitud del estímulo puede **medirse** directamente en el registro, a los efectos de construir la curva *amplitud de la respuesta* en función de la *intensidad del estímulo* (ver ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS). Discuta las ventajas de aplicar este procedimiento en comparación con la estimación de la amplitud del estímulo mediante la lectura del **voltaje de salida** del estimulador en el panel frontal del dispositivo.

NOTAS ADICIONALES

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

ANÁLISIS MÍNIMO SUGERIDO

1. Construya un gráfico en el que se represente la **amplitud de la respuesta biológica** (V_{PAC}) en función de la **intensidad del estímulo aplicado (I_{Est})**. En el mismo par de ejes, represente la **amplitud del artefacto** en función de la **misma variable independiente** [(1)]. Puede realizarlo con las herramientas de procesamiento de WinWCP o exportando los datos (por ejemplo en formato "*.txt") para su procesamiento con otro programa.
2. Discuta los resultados aportados por este gráfico. Compare el comportamiento de ambas variables (respuesta biológica y artefacto) en función de la I_{Est} ¿Qué conclusiones extrae?
3. Elabore al menos una hipótesis interpretativa capaz de dar cuenta de los resultados surgidos del análisis precedente.
4. Proponga experimentos complementarios para la contrastación de sus hipótesis.

ANÁLISIS COMPLEMENTARIO

A) Se propone como ejemplo un análisis de carácter formal de la relación entre la **amplitud de la respuesta biológica** y la **intensidad del estímulo aplicado. El objetivo de este análisis es el de obtener evidencias electrofisiológicas indirectas que sustenten la hipótesis de que el n. ciático constituye una estructura compuesta por una población heterogénea de fibras axonales. La heterogeneidad de esta población puede definirse de modo simplificado en términos de las diferencias en los diámetros de las fibras axonales, la existencia de sub-poblaciones de fibras mielínicas y amielínicas, etc. u otros elementos que determinen la existencia de sub-poblaciones de fibras que difieran en su excitabilidad, velocidad de conducción, etc.** Para ello:

1. Realice un ajuste de los datos en el gráfico $V_{PAC} = f(I_{Est})$ a una **curva sigmoidea** de tipo

$$y(x) = \frac{1}{1 + e^{-x}}$$

donde y corresponde a V_{PAC} y x corresponde a I_{Est}. Este ajuste puede realizarse en programas tales como **Sigma Plot** o **Clampfit** u otras hojas de cálculo disponibles.

[1] *Tenga en cuenta que para medir adecuadamente la amplitud del artefacto de estimulación, la* ***frecuencia de muestreo*** *de la señal debió seleccionarse de acuerdo a las características de este componente.*

2. Analice las características de la curva obtenida. Describa los resultados. ¿Qué conclusiones puede extraer?
3. Plantee elementos que permitan un análisis **cuantitativo** de la curva $y(x)$. Por ejemplo, determine la I_{Est} a la que se obtiene una respuesta igual al 50% de la respuesta máxima (I_{E50}). ¿Qué significado tiene este parámetro?
4. Estime la I_{Ees} correspondiente al "umbral" (I_0) y la I_{Ees} a la que se alcanza una respuesta "máxima" ($I_{máx}$). Halle y compare las diferencias

i) $I_{máx} - I_{E50}$

ii) $I_{E50} - I_0$

¿Son iguales estas diferencias? ¿Qué comentario le merece?

5. Obtenga la derivada primera ($y'(x)$) de la curva. Realice una descripción de carácter cualitativo de esta curva. ¿Qué significado tiene?
6. Elabore al menos una hipótesis interpretativa capaz de dar cuenta de los resultados surgidos del análisis precedente.
7. Proponga experimentos complementarios para la contrastación de sus hipótesis.

B) Otro elemento de análisis que puede ser aplicado constituye el de la **variabilidad** de la amplitud de la respuesta biológica en función de la intensidad del estímulo. Bajo la hipótesis de que en las condiciones de estimulación empleadas las fibras reclutadas con intensidades de estimulación más bajas son las de mayor diámetro (siendo asimismo éstas las que aportan un componente mayor al PAC), podría plantearse que la **variabilidad** del PAC diferirá según el rango de estimulación considerado. Se sugiere entonces la discusión en torno a este aspecto, el planteamiento de los resultados esperados y el diseño de un análisis de este carácter, empleando los datos proporcionados tanto por el experimento anterior (o por modificaciones en el diseño del mismo), así como por experimentos diseñados *de novo*.

4.3. EXPERIMENTO #3

Esta maniobra experimental consiste en la **inversión de la polaridad del estímulo**.

HIPÓTESIS:
OBJETIVOS:

a) Defina la **amplitud** y **duración** de un **estímulo supramáximo**.

Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
Modalidad de la estimulación (simple o pares)	Simple

b) Obtenga **10** trazados en esas condiciones para obtener ulteriormente su promedio.

c) Modifique la posición del interruptor "POLARITY" del estimulador, llevándola de "NORMAL" a "REVERSE" y obtenga **10** trazados nuevamente.

NOTAS ADICIONALES

4.4. EXPERIMENTO #4

Esta maniobra experimental consiste en la estimulación del preparado estableciendo una **ligadura entre los electrodos de estimulación**.

HIPÓTESIS:
OBJETIVOS:

a) Defina la **amplitud** y **duración** de un **estímulo supramáximo**.

Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
Modalidad de la estimulación (simple o pares)	Simple

b) Obtenga **10** trazados en esas condiciones para obtener ulteriormente su promedio.

c) Modifique la posición del interruptor "POLARITY" del estimulador, llevándola de "NORMAL" a "REVERSE" y obtenga **10** trazados nuevamente para obtener ulteriormente su promedio.

d) Vuelva a la posición "NORMAL" para la polaridad del estímulo.

e) Efectúe una ligadura en una posición intermedia entre los electrodos de estimulación, como se indica en la **Fig. 5.**

f) Obtenga **10** trazados en esas condiciones para obtener ulteriormente su promedio.

g) Modifique la posición del interruptor "POLARITY" del estimulador, llevándola de "NORMAL" a "REVERSE" y obtenga **10** trazados nuevamente para obtener ulteriormente su promedio.

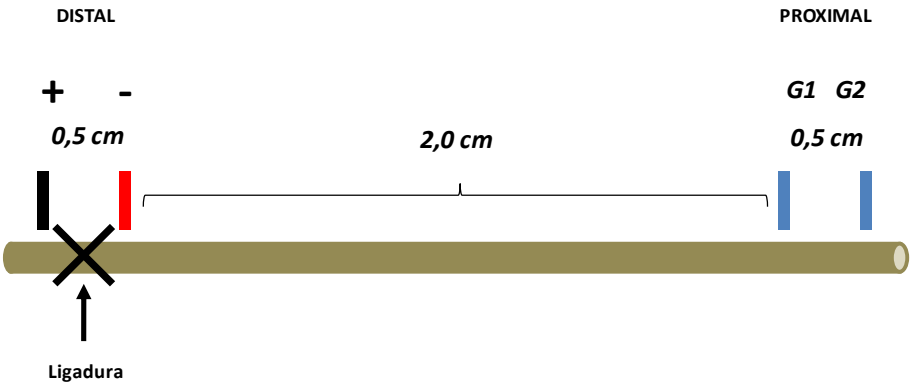


Fig.5

NOTAS ADICIONALES

4.5. EXPERIMENTO #5

En este experimento se obtendrá un **PAC monofásico,** incrementando la distancia entre los electrodos de registro y efectuando una ligadura entre ambos.

HIPÓTESIS:
OBJETIVOS:

a) Defina la **amplitud** y **duración** de un **estímulo supramáximo**.

Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
Modalidad de la estimulación (simple o pares)	Simple

b) Incremente la distancia entre los electrodos de registro **G1** y **G2**, aproximando el primero (alrededor de 1 cm) a los electrodos de estimulación.

c) Obtenga 10 trazados en estas condiciones para obtener ulteriormente su promedio.

d) Efectúe una ligadura entre los electrodos de registro, tal como se indica en la **Fig. 6.**

e) Obtenga 10 trazados en estas condiciones para obtener ulteriormente su promedio.

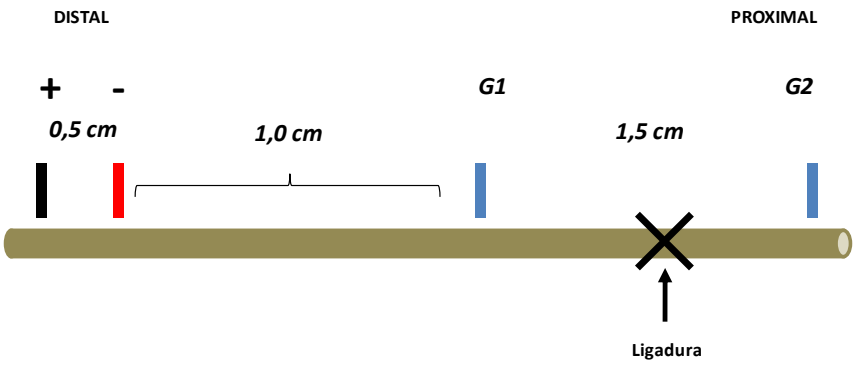


Fig. 6

4.6. EXPERIMENTO #6

En este experimento se obtendrá registros utilizando la configuración representada por la **Fig. 3** (estímulo en el extremo **distal**) e invirtiendo luego la posición de los electrodos de estimulación y registro (**estimulación proximal)**, tal como se presenta en la **Fig.7**.

HIPÓTESIS:
OBJETIVOS:

a) Defina la **amplitud** y **duración** de un **estímulo supramáximo**.
b) Obtenga 10 trazados en esas condiciones para obtener ulteriormente su promedio.
c) Modifique la configuración del dispositivo experimental **sin modificar la distancia que separa a los electrodos de estimulación y registro** entre sí, en concordancia con lo esquematizado en la parte inferior de la **Fig. 7**
d) Obtenga 10 trazados en esas condiciones para obtener ulteriormente su promedio.

Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
Localización de los electrodos de estimulación	**Prox.** ☐ **Dist.** ☐
Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	0.05 ms
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
Localización de los electrodos de estimulación	**Prox.** ☐ **Dist.** ☐

Fig.7.

4.7. EXPERIMENTO #7

En este experimento se obtendrá el registro del PAC en dos localizaciones, separadas por una distancia conocida.

HIPÓTESIS:
OBJETIVOS:

a) Defina la **amplitud** y **duración** de un **estímulo supramáximo**.

b) Obtenga 10 trazados en esas condiciones, con los electrodos de registro localizados a la máxima distancia posible de los de estimulación (representada por $\mathbf{X_1}$), como se muestra en la parte superior de la **Fig. 8**.

Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
X_1	
X_2	

c) Aproxime los electrodos de estimulación y registro a una nueva distancia (representada por X_2), como se muestra en la parte inferior de la **Fig. 8**.

d) Obtenga 10 trazados en esas condiciones

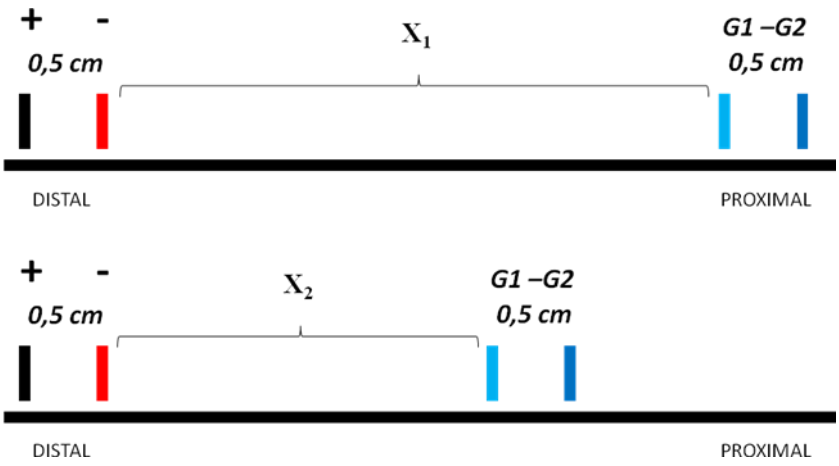


Fig. 8.

NOTAS ADICIONALES

4.8.1. EXPERIMENTO #8a

En este experimento se aplicará **pares de pulsos de igual amplitud y duración** a intervalos definidos.

HIPÓTESIS:
OBJETIVOS:

a) Defina la **amplitud** y **duración** de un **estímulo supramáximo**.

Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	
Frecuencia de estímulo	
Delay (intervalo inter-pulso, t_{E1E2}) INICIAL	
Cambio en el intervalo interestímulo (Δt_{E1E2})	

b) Configure la **adquisición** en WinWCP a los efectos de tener una **duración total** del trazado de aproximadamente **40 ms**.

c) Seleccione la modalidad "Twin Pulses" en el **estimulador.** En la **Fig. 9**. se muestra que los parámetros **DELAY** y **Frecuencia** (**pps**) determinan el **intervalo entre pulsos del par (t_{E1E2})** y la **frecuencia de aplicación del par** respectivamente (consúltese además el ANEXO).

d) Establezca un **intervalo entre pares (=1/pps)** de 2 segundos.

e) **Establezca in DELAY inicial de 30 ms**.

f) Obtenga 10 trazados empleando la configuración del dispositivo representada en la **Fig. 3** con la aplicación de estímulos de iguales características.

g) Reduzca sucesivamente (cada 10 trazados) el DELAY en pasos de 1 o 2 ms (Δt_{E1E2}). Observe los cambios en el curso temporal de las respuestas obtenidas.

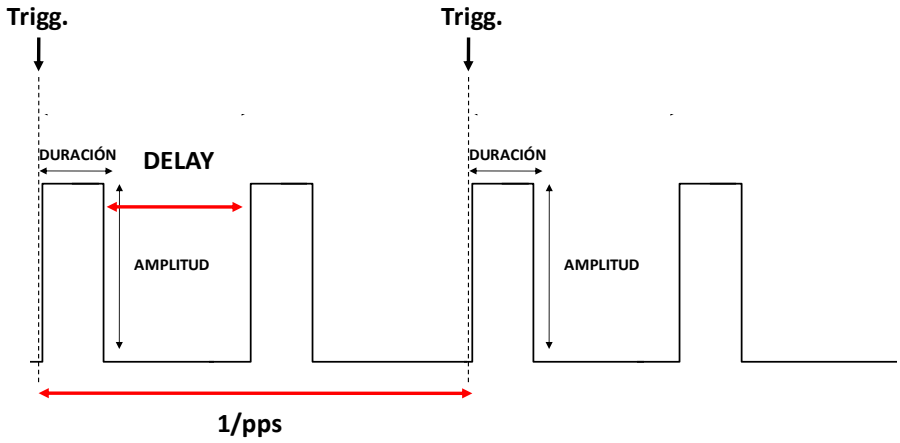


Fig. 9.

4.8.2. EXPERIMENTO #8b

Puede repetir el procedimiento detallado en **4.8.1.,** pero seleccionando **estímulos submáximos** o **apenas umbrales**.

HIPÓTESIS:
OBJETIVOS:

NOTAS ADICIONALES

4.9. EXPERIMENTO #9

En este experimento se obtendrá **potenciales de acción compuestos** de igual amplitud como resultado de la aplicación de "estímulos equivalentes" que difieren en sus características de duración y amplitud.

HIPÓTESIS:
OBJETIVOS:

a) Defina la **amplitud (A_1)** y **duración (D_1)** de un **estímulo capaz de producir un PAC cuya amplitud sea aproximadamente un 50% de la amplitud máxima**.

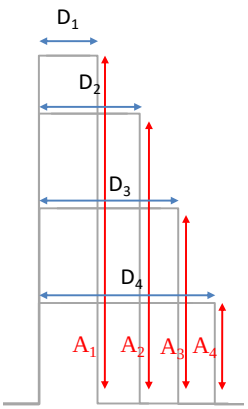
Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo (A_1)	
Duración del Estímulo (D_1)	

b) Obtenga 10 trazados en estas condiciones.

c) Reduzca la **amplitud** del estímulo en ~10% (A_2) e incremente la **duración** (D_2), verificando que la respuesta biológica obtenida sea idéntica a la anterior.

d) Repita el procedimiento con reducciones de ~10% de la amplitud, obteniendo en cada caso 10 trazados para su ulterior promedio. Obtendrá un conjunto de pulsos como el esquematizado en la **Fig. 10**.

Fig. 10.



Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo ($\mathbf{A_2}$)	
Duración del Estímulo ($\mathbf{D_2}$)	
Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo ($\mathbf{A_3}$)	
Duración del Estímulo ($\mathbf{D_3}$)	
Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo ($\mathbf{A_4}$)	
Duración del Estímulo ($\mathbf{D_4}$)	
Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo ($\mathbf{A_5}$)	
Duración del Estímulo ($\mathbf{D_5}$)	

NOTAS ADICIONALES