

El periodo refractario de las células excitables: ¿inconsistencias de un dogma?

The refractory period of excitable cells: Inconsistencies of a dogma?

John Barco-Ríos^{1,2},  Jorge Eduardo Duque-Parra^{1,2,3},  Johanna Alexandra Barco-Cano^{2,4} 

¹ Universidad de Caldas - Facultad de Ciencias para la Salud - Departamento de Ciencias Básicas para la Salud - Manizales - Colombia.

² Universidad de Caldas - Facultad de Ciencias para la Salud - Grupo Neurociencia de Caldas - Manizales - Colombia.

³ Universidad de Manizales - Facultad de Ciencias para la Salud - Departamento de Ciencias Básicas para la Salud - Manizales - Colombia.

⁴ Universidad de Caldas - Facultad de Ciencias para la Salud - Departamento Clínico - Manizales - Colombia.

Correspondencia: John Barco-Ríos. Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias para la Salud, Universidad de Caldas. Calle 65 No. 26-10, oficina: M203. Teléfono: +57 6 8781500. Manizales. Colombia. Correo electrónico: jhon.barco@ucaldas.edu.co.

Resumen

Introducción. Los canales activados por voltaje para Na⁺ y para K⁺ presentan compuertas de activación e inactivación, las cuales se abren y se cierran dependiendo de la intensidad de la corriente eléctrica que fluye por la membrana cuando está respondiendo a un estímulo. Durante este breve momento, la membrana entra en un periodo de refractariedad que la hace insensible a otros estímulos.

Objetivo. Demostrar que los periodos refractarios absoluto y relativo se presentan a medida que se va desarrollando el potencial de acción y no después de que se ha completado, mediante un análisis teórico basado en el funcionamiento eléctrico normal de los canales activados por voltaje para Na⁺ y K⁺.

Cuestionamientos. En diversos textos y artículos de fisiología, las definiciones de los periodos refractarios absoluto y relativo son confusas y erróneas, puesto que no tienen en cuenta el funcionamiento normal de los canales activados por voltaje. Además, la ubicación que dan a dichos periodos con respecto al potencial de acción es desfasada y su tiempo de duración es incierto.

Conclusión. Los periodos refractarios absoluto y relativo se presentan durante el desarrollo del potencial de acción y no después de que ha sido completado.

Palabras clave: Potenciales de acción; Canales iónicos; Fisiología (DeCS).

Abstract

Introduction: Voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels have activation and inactivation gates that open and close depending on the intensity of the electric current flowing through the membrane when it is responding to a stimulus. During this brief moment, the membrane enters a refractory period that makes it insensitive to other stimuli.

Objective: To prove that absolute and relative refractory periods occur as the action potential develops rather than after it has been completed, by means of a theoretical analysis based on the normal electrical functioning of voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels.

Questioning: Several texts and articles on physiology provide confusing and misleading definitions of absolute and relative refractory periods, since they don't consider the normal functioning of voltage-gated channels. Furthermore, the location they give to these periods in relation to the action potential is out-of-time and their duration remains uncertain.

Conclusion: Absolute and relative refractory periods occur as the action potential develops rather than after it has been completed.

Keywords: Action Potentials; Ion Channels; Physiology (MeSH).

Barco-Ríos J, Duque-Parra JE, Barco-Cano JA. El periodo refractario de las células excitables: ¿inconsistencias de un dogma? Rev. Fac. Med. 2020;68(2):279-82. Spanish. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v68n2.74440>.

Barco-Ríos J, Duque-Parra JE, Barco-Cano JA. [The refractory period of excitable cells: Inconsistencies of a dogma?] Rev. Fac. Med. 2020;68(2):279-82. Spanish. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v68n2.74440>.

Introducción

Una característica particular de las células excitables (neuronas y fibras musculares) es su capacidad de reaccionar en fracciones de segundo ante un estímulo aplicado, lo cual se conoce como irritabilidad.¹

Varios autores,²⁻⁴ utilizando la técnica de fijación de voltaje en el axón gigante de calamar, corroboraron que esta reacción se origina en la membrana debido a cambios transitorios en su permeabilidad para ciertos iones. Mediante esta misma técnica también se determinó que el potencial de acción —que es el mecanismo básico para la transmisión de información⁵⁻⁸ y el desencadenante de las respuestas celulares— se origina por una corriente iónica de entrada que es seguida inmediatamente por una corriente iónica de salida, proceso en el que participan básicamente dos tipos de canales iónicos activables por voltaje,^{2,4} uno para Na⁺ y otro para K⁺.⁸⁻¹⁰

Los canales de Na⁺ activados por voltaje están conformados por cuatro dominios homólogos no idénticos (I, II, III y IV)¹¹ y tienen dos regiones sensibles que actúan como compuertas: una región próxima a la parte externa del canal (compuerta de activación) donde los sensores de voltaje que rodean el poro central del canal sufren cambios de conformación para poder activarse,¹² y otra región cercana a la parte interna del mismo (compuerta de inactivación)^{7,8} donde los canales se inactivan rápidamente por un motivo hidrófobo intracelular que ocluye el poro^{13,14} y corresponde a la región de unión entre los dominios III y IV del canal,¹⁵ lo cual lleva a la membrana a su estado de reposo.¹⁶ Por su parte, los canales de K⁺ activados por voltaje están constituidos por cuatro subunidades proteicas idénticas¹¹ y solo tienen una compuerta de activación por su lado interno.^{7,8}

Dado lo anterior, se hace evidente que el modo de funcionamiento de los canales de Na⁺ es un poco más complejo, pues deben atravesar por tres estados conformacionales: *reposo* (compuerta de activación cerrada y compuerta de inactivación abierta), *activado* (ambas compuertas abiertas) e *inactivado* (compuerta de activación abierta y compuerta de inactivación cerrada). Por el contrario, los canales de K⁺ solo muestran dos estados conformacionales: *reposo* (compuerta cerrada cuando el potencial de membrana es cercano a -90mV) y *activado* (la compuerta se abre lentamente cuando hay despolarización).^{7,8}

Durante el potencial de acción se produce un cambio brusco y rápido en el potencial eléctrico de la membrana^{4,7} (que en células nerviosas mielinizadas de mamíferos tarda poco menos de 1ms en completarse),^{1,9} después del cual las células se vuelven refractarias por un corto periodo de tiempo.¹⁷ Este mecanismo se desarrolla básicamente en dos etapas electroquímicas regenerativas:⁸ despolarización y repolarización.

La etapa de despolarización se da por un incremento súbito en la permeabilidad de la membrana a los iones de sodio^{4,7} generada por la activación rápida de los canales de Na⁺ activados por voltaje,³ los cuales ingresan de forma masiva a la célula y alteran el potencial de la membrana, que pasa de ser negativo a positivo.^{4,7-10} La etapa de repolarización comienza inmediatamente después debido a que la membrana se vuelve impermeable a los iones de sodio pero se hace permeable a los iones de potasio, de tal manera que estos salen de

forma masiva de la célula y se restablece de nuevo el potencial negativo de la membrana.⁷

El periodo refractario limita el tiempo de recuperación de una excitación previa en una membrana excitable, por lo que puede restringir la transmisión de información.¹⁸ En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue demostrar que los periodos refractarios absoluto y relativo se presentan a medida que se va desarrollando el potencial de acción y no después de que este se ha completado. La metodología empleada para lograr el objetivo consistió en realizar un análisis teórico basado en el funcionamiento eléctrico normal de los canales activados por voltaje para Na⁺ y K⁺.

El periodo refractario y su relación con los canales iónicos

Comprender lo que sucede durante los periodos refractarios y su duración es importante debido a que la alteración de estos es un marcador sensible de la disfunción axonal en afecciones como el síndrome de Guillain-Barré, el síndrome del túnel carpiano y la esclerosis múltiple,¹⁹ en donde dichos periodos se prolongan y la velocidad de conducción del impulso nervioso se reduce.^{20,21} Así pues, el periodo refractario corresponde al breve momento en el que la membrana pasa de ser totalmente insensible ante un segundo estímulo, a recuperar de nuevo su sensibilidad; este proceso consta de dos momentos críticos denominados *periodo refractario absoluto* y *periodo refractario relativo*.

El periodo refractario absoluto comienza justo en el momento en que la membrana alcanza su nivel umbral o nivel de disparo,²² pues en ese instante las compuertas de activación e inactivación de algunos canales de Na⁺ activados por voltaje se abren (estado activado) y los iones de sodio fluyen masivamente al interior celular despolarizando la membrana, lo que a su vez actúa como estímulo eléctrico para provocar que más de estos canales de Na⁺ se abran e ingrese mayor cantidad de sodio a la célula.^{2,7} Este proceso de retroalimentación positiva continúa hasta que todos los canales de Na⁺ activados por voltaje se abren por completo⁷ e ingresan más iones de sodio a la célula, lo cual conduce a que el potencial de membrana se haga positivo hasta alcanzar un pico máximo de +35mV, tal como sucede en las motoneuronas alfa. En este punto es importante aclarar que, sin importar qué tan fuerte haya sido aplicado el estímulo para originar un potencial de acción, la onda despolarizante siempre alcanzará un valor máximo de +35mV debido a dos fenómenos eléctricos que se presentan de manera simultánea:

1. Las compuertas de inactivación de los canales de Na⁺ se cierran rápidamente (estado inactivado)^{7,8,13,14}, bloqueando el flujo de entrada de más iones de sodio, aunque se debe anotar que en un estudio realizado con neuronas Purkinjenses se encontró que, contrario a lo que se suponía, no todos los canales de Na⁺ se inactivan,²³ lo cual indicó que aunque el flujo de entrada de sodio nunca se detiene, sí se reduce considerablemente.
2. Las compuertas de inactivación de los canales de K⁺ se abren (estado activado) y los iones de potasio salen de la célula arrastrando cargas positivas, pues la cantidad de potasio que sale es mucho mayor que la cantidad de sodio que ingresa a través los pocos canales

que quedaron abiertos, y entonces se da inicio a la repolarización de la membrana.

A medida que el potasio sale de la célula, el potencial de membrana comienza a disminuir de manera progresiva alterando su campo eléctrico, lo cual es percibido por algunos canales de Na^+ que alteran su estado conformacional, de tal suerte que se cierran sus compuertas de activación y, simultáneamente, se abren sus compuertas de inactivación (estado en reposo). Puesto que hasta este momento la gran mayoría de canales de Na^+ se encuentran cerrados, la membrana se hace totalmente refractaria a la llegada de un segundo estímulo, sin importar qué tan fuerte sea aplicado.⁷ En conclusión, el periodo refractario absoluto se extiende desde el nivel de disparo hasta que se completa cerca de un tercio de la repolarización,²² momento en el que el voltaje del potencial de membrana ya ha caído lo suficiente como para que algunos canales de Na^+ puedan abrir sus compuertas de activación; si a estos se suman los pocos canales de Na^+ que permanecieron activos todo el tiempo, entonces la membrana ya puede estar en condiciones de reaccionar ante un segundo estímulo, siempre y cuando este sea aplicado con mayor intensidad de lo normal.^{2,7,8}

A medida que la fase de repolarización sigue avanzando con rapidez por la salida de potasio, más canales de Na^+ entran en estado de reposo y, por consiguiente, la membrana se va haciendo cada vez más sensible y susceptible de responder a nuevos estímulos despolarizantes. Esta susceptibilidad creciente corresponde al periodo refractario relativo, el cual se extiende desde el final del primer tercio de la repolarización hasta el inicio de la posdespolarización.²²

Cuestionamientos

Algunas definiciones que se encuentran en la literatura sobre los periodos refractarios absoluto y relativo son confusas y contradictorias, pues al parecer no tienen en cuenta el modo de funcionamiento normal de los canales activados por voltaje para Na^+ y K^+ :

El periodo refractario absoluto ha sido ampliamente estudiado, por ejemplo, Karp¹ manifiesta que en este los canales de sodio solo se pueden abrir varios milisegundos después de su inactivación; Kandel *et al.*² lo definen como aquel momento que se da inmediatamente después del potencial de acción; Hall⁷ expresa que es aquel espacio de tiempo durante el cual no se puede generar otro potencial de acción, incluso con un estímulo intenso; Zigmond *et al.*²⁴ y Squire *et al.*²⁵ expresan que es el momento en el cual, después de generarse un potencial de acción, usualmente no se puede originar otro potencial sin importar la cantidad de corriente que se le inyecte al axón, lo cual está mediado por la inactivación de los canales de sodio; Silbermagl & Despopoulos²⁶ indican que es un breve periodo de tiempo después de la despolarización durante el cual el nervio o el músculo no puede ser excitado; Berry & Meister²⁷ indican que es aquel momento en el que una neurona que ha disparado un potencial de acción no puede generar otro potencial por un tiempo determinado, independiente de la intensidad del estímulo; finalmente, Boron & Boulpaep²⁸ afirman que es la primera fase del potencial de acción y que en esta es imposible provo-

car un segundo potencial, independientemente de la intensidad o la duración del estímulo que se aplique.

Debido a que un potencial de acción involucra una onda ascendente de despolarización seguida por otra onda descendente de repolarización, y dado que el campo eléctrico que se genera es el responsable de la apertura y el cierre de los canales activados por voltaje para Na^+ y K^+ , se deduce entonces que las anteriores definiciones para periodo refractario absoluto están desfasadas y no coinciden con el modo de funcionamiento eléctrico de los canales iónicos, pues aducen que dicho periodo se presenta después de haberse llevado a cabo el potencial de acción. Además, el tiempo de duración que se le atribuye a este corto periodo es incierto y prolongado ya que se habla de "varios" milisegundos o de un "breve" periodo de tiempo.

En el estudio de Rompré & Miliareisis,²⁹ realizado en ratas mediante la aplicación de dos estímulos a intervalos distintos, se encontró que los periodos refractarios absolutos de las neuronas más excitables del metencéfalo duran entre 0.6ms y 0.8ms, mientras que en la mayoría de las neuronas del mesencéfalo duran 0.4ms. Estos valores son bastante coherentes con el tiempo de duración del potencial de acción en las neuronas mielinizadas de mamíferos, que, como se mencionó antes, se completa en menos de 1ms.

Por su parte, el periodo refractario relativo también ha sido ampliamente estudiado: Kandel *et al.*² lo definen como el espacio de tiempo durante el cual es posible activar un potencial de acción si se aplica un estímulo más potente de lo normal; Hall⁷ indica que es aquella fracción de segundo en la que después de generarse un potencial de acción se abren las compuertas de inactivación del canal de sodio y se puede iniciar otro potencial de acción; Zigmond *et al.*²⁴ y Squire *et al.*²⁵ afirman que es aquel que se da después del periodo refractario absoluto, durante la fase de posthiperpolarización del potencial de acción, y Berry & Meister²⁷ dicen que es el periodo de recuperación luego del potencial de acción y durante el cual la tasa de disparos se restablece poco a poco a su valor libre.

Aunque las anteriores definiciones coinciden básicamente con el análisis teórico de lo que sucede en el periodo refractario relativo, es necesario aclarar y reforzar la idea de que el periodo refractario relativo se presenta inmediatamente después de terminado el periodo refractario absoluto y, por tanto, abarca casi los dos tercios restantes de la onda de repolarización del potencial de acción, es decir, este no solo se presenta durante la posthiperpolarización como lo indican Zigmond *et al.*²⁴ y Squire *et al.*²⁵. La implicación práctica de los periodos refractarios es que no permiten que los potenciales de acción reverberen entre el segmento inicial del axón y los terminales axónicos.²⁵

Conclusión

Las definiciones dadas en muchos textos y artículos de neurofisiología sobre los periodos refractarios absoluto y relativo son ambiguas y se prestan para interpretaciones erróneas, pues en tales definiciones se ubican a estos periodos en momentos del potencial de acción que no corresponden con el funcionamiento normal de los canales activados por voltaje para Na^+ y K^+ o, incluso, después de que este ya se ha completado; además, se les atribuye

un tiempo de duración en milisegundos que es incierto y contradictorio con los fenómenos eléctricos que muestran los canales iónicos. Por tanto, para evitar ambigüedades se debe reforzar la idea de que los períodos refractarios absoluto y relativo se presentan durante el desarrollo del potencial de acción, concordante con los estados de activación e inactivación de los canales iónicos activados por voltaje, y no después de que este se ha completado.

Conflicto de intereses

Ninguno declarado por los autores.

Financiación

Ninguna declarada por los autores.

Agradecimientos

Ninguno declarado por los autores.

Referencias

- Karp G. *Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos*. 7th ed. México D.F.: McGraw-Hill; 2014.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, editors. *Principles of Neural Science*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 2013.
- Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*. 1952;117(4):500-44. <http://doi.org/bbv6>.
- Brown AG. *Nerve Cells and Nervous System. An introduction to neuroscience*. 2nd ed. London: Springer-Verlag; 2001.
- Dvorkin MA, Cardinali DP, Lermoli R. *Best & Taylor: Bases fisiológicas de la práctica médica*. 14th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2010.
- Costanzo LS. *BRS Physiology (Board Review Series)*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018.
- Hall JE. *Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica*. 13th ed. Barcelona: Elsevier; 2016.
- Haines DE. *Principios de Neurociencia. Aplicaciones básicas y clínicas*. 4th ed. Barcelona: Elsevier; 2013.
- Cardinali DP. *Neurociencia aplicada: Sus fundamentos*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2007.
- Vicente R, Mirasso CR. Cuando las neuronas sincronizan sus relojes. *Mente y cerebro*. 2012;53:62-71.
- Bezanilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev*. 2000;80(2):555-92. <http://doi.org/c8r3>.
- Catterall WA. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron*. 2010;67(6):915-28. <http://doi.org/dbb9xs>.
- West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, Catterall WA. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(22):10910-4. <http://doi.org/ctpf3z>.
- Eholtz G, Scheuer T, Catterall WA. Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron*. 1994;12(5):1041-8. <http://doi.org/bm3t8m>.
- Catterall WA. Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels at Atomic Resolution. *Exp. Physiol*. 2014;99(1):35-51. <http://doi.org/f5nbpX>.
- Capes DL, Goldschen-Ohm MP, Arcisio-Miranda M, Bezanilla F, Chanda B. Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels. *J Gen Physiol*. 2013;142(2):101-12. <http://doi.org/f45dbH>.
- Rieke F, Warland D, van Steveninck RR, Bialek W. *Spikes: Exploring the neural code*. London: The MIT press; 1999.
- Song Z, Zhou Y, Juusola M. Modeling elucidates how refractory period can provide profound nonlinear gain control to graded potential neurons. *Physiol Rep*. 2017;5(11):e13306. <http://doi.org/c8r4>.
- Boërio D, Hogrel JY, Créange A, Lefaucheur JP. Méthodes et intérêt clinique de la mesure de la période réfractaire nerveuse périphérique chez l'homme. *Neurophysiol Clin*. 2004;34(6):279-91. <http://doi.org/b3hbv8>.
- Vernea J. Motor fibre refractory period and motor conduction velocity range. *Clin Exp Neurol*. 1979;16:241-9.
- Quandt FN, Davis FA. Action potential refractory period in axonal myelination: a computer simulation. *Biol Cybern*. 1992;67(6):545-52. <http://doi.org/fq629m>.
- Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. *Ganong. Fisiología médica*. 25th ed. México: McGraw Hill; 2016.
- Carter BC, Bean BP. Incomplete inactivation and rapid recovery of voltage-dependent sodium channels during high-frequency firing in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurophysiol*. 2011;105(2):860-71. <http://doi.org/bwkdf9>.
- Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, editors. *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press; 1999.
- Squire LR, Bloom FE, Spitzer NC, du Lac S, Ghosh A, Berg D. *Fundamental Neuroscience*. 3th ed. San Diego: Academic Press; 2008.
- Silbernagl S, Despopoulos A. *Fisiología. Texto y Atlas*. 2nd ed. Madrid: Elsevier; 2001.
- Berry MJ, Meister M. Refractoriness and Neural Precision. *J Neuroscience*. 1998;18(6):2200-11.
- Boron WF, Boulpaep EL. *Fisiología Médica*. 3rd ed. Barcelona: Elsevier; 2017.
- Rompé PP, Miliareissis E. Behavioral determination of refractory periods of the brainstem substrates of self-stimulation. *Behav Brain Res*. 1987;23(3):205-19. <http://doi.org/c4dn48>.