

RESUMENES
DE CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES PRESENTADAS A LA
REUNION ANUAL DE LA SECCION BIOFISICA

FUNCION Y ESTRUCTURA DE MEMBRANAS

Concepción, Chile, 2-4 de septiembre de 1981

ABSTRACTS

OF LECTURES AND COMMUNICATIONS PRESENTED TO THE
ANNUAL MEETING OF THE BIOPHYSICS SECTION

FUNCTION AND STRUCTURE OF MEMBRANES

Concepción, Chile, September 2-4, 1981

La piel de batracios como modelo de transporte

J. CONCHA

Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales.
Universidad de Concepción

Como introducción a esta conferencia deseo rendir un corto homenaje a los investigadores que dieron realce al estudio del transporte en piel de sapos y ranas. Entre ellos merecen especial mención los del grupo de Copenhague y como labor sobresaliente la del entusiasta investigador Dr. Hans Ussing, quien puso sus investigaciones a un nivel no imaginado hasta entonces. Su trabajo fundamental realizado junto con el Dr. Zerahn lo expuso en el XVIII Congreso Internacional de Fisiología realizado en Copenhague en 1950.

El Director del Laboratorio de Zoofisiología de Copenhague, el Dr. Augusto Krogh, un eminente fisiólogo que había realizado importantísimos trabajos en fenómenos respiratorios, también se había preocupado de realizar estudios de permeabilidad y osmosis en piel de ranas. Sin embargo, no había logrado el grado de interés y difusión de los trabajos de Ussing y colaboradores. Este investigador que comenzó como biólogo marino realizando trabajos en plancton, muy pronto se entusiasmó con el ambiente tan atrayente y estimulante del Laboratorio de Zoofisiología. Antes de quedarse definitivamente en él, había estado haciendo estudios de química de proteínas en el laboratorio de Sørensen con el Dr. Linderstrom-Lang y estudios de físico-química en el laboratorio del Dr. Brønsted. La cercanía del Instituto Niels Bohr de Física Teórica, que poseía un ciclotrón, le permitió tener contacto con el Dr. Hevesy quien fue el primero en utilizar trazadores isotópicos. Junto con Hilde Levi, asociada de Hevesy, pudo realizar experimentos en piel. Después de los trabajos con el Dr. Berker Jørgensen en axolotes y músculo sartorio se trasladó a EE.UU. en 1948 con una beca de la Fundación Rockefeller. Se instaló en Berkeley donde trabajó en el "Radiation

Laboratory". Como no tenía dinero suficiente para sus investigaciones, aprovechaba los frascos desechados con restos de Na^{24} y I131 que habían sido utilizados en pacientes. Durante su estadía en EE.UU. discutió con el Dr. Lund el problema de los fenómenos eléctricos y bioquímicos en piel de rana. El Dr. Lund difundió su teoría de potenciales redox para explicarlos. Ussing no estuvo de acuerdo ya que sus estudios previos y las ecuaciones de flujo que había elaborado le indicaban otro mecanismo. Fue entonces cuando ideó el método de la corriente de cortocircuito. Cuando estuvo de regreso en Copenhague entusiasmó al Dr. Zerahn quien había estado trabajando en metabolismo fosforado en levadura. Abandonó sus trabajos y empezó a construir junto con Ussing el aparato que les permitiría medir la corriente neta de sodio que comparada con el flujo neto de sodio medido con Na^{24} y Na^{22} resultó ser equivalente. Este fue el trabajo fundamental que presentaron en 1950 al Congreso Internacional de Fisiología de Copenhague, que inició una activa y fructífera discusión que entusiasmó a los investigadores de los cuatro puntos cardinales del mundo. Desgraciadamente el Dr. Krogh no pudo gozar de este éxito pues murió antes de que el Congreso se realizara.

Durante los años después del Congreso, el Laboratorio de Zoofisiología fue visitado por muchos investigadores entre los que sobresalen los nombres de Alexander Leaf, Adrian Hogben, Peter Curran y otros tan conocidos en la literatura sobre transporte.

Los estudios de Ussing y su escuela así como los de la mayoría de los investigadores que tomaron como modelo biológico de transporte la piel de batracios, se refieren al epitelio con sus diferentes capas de células sin tomar en cuenta a las glándulas mucosas

y serosas que en el caso de las primeras pueden alcanzar una densidad de 50 por mm^2 . El papel que juegan estas glándulas en el modelo biológico de piel es tanto o más importante que el que corresponde al epitelio. De los trabajos realizados por nosotros en piel de *Bufo arunco*, *Pleurodema thaul* y *Caudiverbera caudiverbera* se desprende que las glándulas tienen una clara y efectiva función de transporte de sodio, función que es eficazmente modulada por el sistema nervioso central. Este transporte depende de la actividad del sistema nervioso simpático cuya descarga de noradrenalina y adrenalina provoca un aumento del transporte de más de un 50%. El sistema nervioso a través del simpático controla y modula solamente el transporte glandular, ya que en zonas de piel carentes de glándulas no se observa aumento por estimulación nerviosa. En apoyo a nuestras observaciones está el trabajo de la Dra. Eva Sjöberg del Departamento de Fisiología del Instituto Karolinska de Estocolmo quien demostró que en la piel de rana solamente se encuentran terminaciones nerviosas simpáticas a nivel de las glándulas en tanto que frente al epitelio no aparecen terminaciones de ese tipo. En cuanto a nuestra posición de dar importancia al sistema nervioso como regulador del transporte en piel de batracios, el trabajo de Steggerda y Ponder del Departamento de Fisiología de la Universidad de Illinois, nos da la razón al establecer que la destrucción mecánica del sistema nervioso central produce una disminución del transporte en piel del orden de un 52%. Por otro lado la inyección de estricnina produce aumentos del transporte de hasta un 38%. La disminución del transporte por destrucción nerviosa central no es un fenómeno derivado de cambios circulatorios ya que la extirpación del corazón no produce variaciones notables del transporte.

La piel de batracio puede considerarse como un verdadero órgano que cumple entre otras, funciones de respiración, ya que hasta un 40% de la respiración del animal se realiza a su través; además, desempeña funciones de secreción y absorción glandular, entre las que consideramos el transporte glandular de sodio; funciones de transporte activo de sodio y cloro en el epitelio; síntesis de polipéptidos como bradiquinina, fisalemina, eleodoisina, sustancia P, ceruleina, polipéptidos semejantes a gastrina y colecistoquinina, ranatensina, bombesina, xenopsina, neurotensina, factor liberador de tirotrópina, demorfina, granuloliberina y angiotensina. En general los polipéptidos son de 3 a 15 aminoácidos. En las terminaciones nerviosas subglandulares existe bastante noradrenalina y en las glándulas serosas se encuentra abundante serotonina y bufotoxina. En el corion se encuentra prostaglandinas. De todo lo anteriormente expuesto se desprende que la piel como modelo de transporte es compleja y por lo tanto al realizar estudios de ese tipo hay que tener presente esta complejidad y tener cuidado de que en la manipulación con drogas o con soluciones hiper o hiposmóticas se descarte la intervención de una o más de las sustancias nombradas que pueden, por sí solas, estimular o inhibir el transporte en estudio.

En conclusión la piel de batracios es un órgano en el que se pueden hacer estudios de transporte como los realizados por innumerables investigadores que han orientado sus trabajos solamente al aspecto epitelial sin que se sepa si han tomado las debidas precauciones para descartar acciones secundarias provocadas por algunas de las sustancias activas liberadas y en consecuencia, como modelo de transporte, hay que tomarla con beneficio de inventario.

¿Qué nos enseñan las bicapas?

OSVALDO ALVAREZ y PEDRO LABARCA

Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas;
Universidad de California, San Diego

A principios de este siglo, Bernstein propuso una teoría para explicar la excitabilidad celular, que consistía en tres proposiciones: i) Las células están compuestas por una solución de electrolitos, rodeada por una membrana poco permeable a los iones. ii) Existe una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana. iii) Durante la actividad la membrana cambia de permeabilidad de modo tal que el potencial eléctrico se reduce. Esta hipótesis está vigente en nuestros días y podemos hacer afirmaciones bien precisas sobre las bases moleculares que explican cómo cambian de permeabilidad las membranas. Hoy sabemos que las membranas celulares están hechas de una bicapa de lípidos, impermeable a los iones y que algunas proteínas de la membrana están dispuestas de tal modo que forman canales que la atraviesan. Estos canales pueden cambiar de forma de modo que pueden ser o no conductores de iones, en función del potencial eléctrico o la presencia de mediadores químicos. Esta visión de la excitabilidad a nivel de membrana es, en gran medida, fruto de los estudios en sistemas modelos compuesta de bicapas de lípidos con proteínas.

Los cambios del estado de conducción de los canales iónicos en axolema se deben a cambios de forma producidos por un campo eléctrico. Este cambio de forma implica, necesariamente, el movimiento de cargas eléctricas en la membrana y contribuyen a aumentar la capacidad eléctrica de la membrana en un intervalo de potencial eléctrico. Esta predicción de la teoría ha sido comprobada experimentalmente: las membranas excitables se comportan como un dieléctrico no-lineal, en el intervalo de potencial en que se registran cambios de permeabilidad iónica. Esta no-linearidad se expresa como "corrientes de desplazamiento" (1, 2).

Una bicapa sola, sin canales, debe ser un dieléctrico no-lineal porque está en estado líquido. Al separar dos soluciones a distinto potencial eléctrico, la membrana se comprime, por ser un líquido, disminuyendo de espesor y aumentando de área. Ambos factores hacen que la membrana aumente de capacidad eléctrica. En la primera parte de esta conferencia hablaremos de electrocompresión estudiada en membranas artificiales sin canales.

La electrocompresión se puede medir haciendo determinaciones de los cambios de capacidad eléctrica en función de potencial eléctrico transmembrana. Estos cambios son pequeños, del orden del uno por mil al aplicar 100 mV, pero se pueden medir usando técnicas de promediación de señales transitorias. La capacidad resulta ser una función del potencial eléctrico al cuadrado, pasando por un mínimo cuando el potencial transmembrana es cero. En membranas con distribución desigual de lípidos cargados en sus dos monocapas, el mínimo ocurre cuando el potencial aplicado compensa exactamente la diferencia de potencial superficial. Las medidas de electrocompresión son un nuevo método para medir asimetría de membranas. Suponiendo que la electrocompresión medida en bicapas es una buena medida de la compresión de membranas biológicas, se puede estimar que un 1% de las "corrientes de desplazamiento" son debidas a este fenómeno (3).

El uso de membranas artificiales de lípidos como modelo de membrana celular permite contar con un sistema simple en el cual reconstituir y estudiar canales iónicos individuales con el objeto de estudiar su comportamiento y derivar de allí los principios básicos que generan el potencial de acción en el nervio (4).

El primer estudio de este tipo se llevó a cabo a través de la incorporación de EIM

(Excitability Inducing Material) en membranas artificiales de lípidos. La observación de fluctuaciones de la conductancia de la membrana debidos a la presencia de un canal iónico inducido por EIM demostró que éste presentaba sólo dos estados de conductancia: abierto, en el que conduce iones; y cerrado, que no permite el paso de iones. La probabilidad de estos dos estados es función del potencial de membrana. Estas observaciones llevaron a postular un modelo de dos estados para el funcionamiento de este canal. La contribución más importante de los estudios del canal de EIM consiste en que el modelo de dos estados de conductancia cuya probabilidad depende del potencial eléctrico da cuenta de la fenomenología básica de excitabilidad observada a nivel macroscópico en membranas biológicas. Paradojalmente, se ha encontrado que el EIM no es una proteína de membranas (5).

Una segunda etapa en el estudio de las bases moleculares de la excitabilidad celular, consistente en la reconstitución de canales iónicos derivados de membranas biológicas, en una membrana artificial, ha comenzado a desarrollarse en años recientes. El problema básico a resolver en este caso es el de la incorporación de una proteína de membrana, en su estado nativo, en una bicapa de lípidos. Actualmente existen dos métodos para lograr tal incorporación. El primero consiste en la fusión de vesículas derivadas de una membrana biológica con una membrana artificial de lípidos. El segundo método consiste en formar monocapas a partir de vesículas derivadas de una membrana biológica o de liposomas que contengan una proteína de membrana, y la posterior formación de una bicapa a partir de dos de estas monocapas. La técnica de fusión de vesículas con membranas artificiales ha permitido incorporar canales voltaje-dependientes, selectivos para potasio, provenientes del retículo sarcoplásmico, y un canal de cloruro proveniente del órgano eléctrico de anguila. Las propiedades cinéticas de estos canales son consistentes con los postulados básicos del modelo de dos estados desarrollados a partir de los estudios del canal de EIM (6, 7).

La técnica de formación de bicapas a partir de monocapas permitió la incorporación del canal de acetilcolina. El receptor de acetilcolina es la primera proteína de membrana que participa en fenómenos de excitación celular, que ha sido purificada y reconstituida en una membrana artificial. Aunque la probabilidad de los estados abierto y cerrado del receptor no es controlada por el potencial de membrana, sino que por el ligamen de un neuro-transmisor, los postulados básicos de la teoría de canales iónicos son aplicables a su estudio. La observación de fluctuaciones de la conductancia de la membrana, mediados por la apertura y cierre del canal iónico asociado al receptor, indican que éste posee una cinética compleja. Sin embargo, se ha encontrado que el canal del receptor de acetilcolina presenta sólo dos estados de conductancia y que el comportamiento de cada canal individual reproduce las observaciones hechas en membranas nativas en relación con la permeabilidad inducida por el ligamen de acetilcolina con el receptor (8).

La purificación de los canales iónicos relacionados con la excitabilidad y su reconstitución en membranas artificiales constituyen el camino más racional a seguir para resolver la estructura y función de estas entidades a un nivel molecular. Sin embargo, la membrana artificial no es el único sistema que permite estudiar canales iónicos individuales. En los últimos años, y gracias a la introducción de un método en que se mide corriente en un área pequeña de membrana, ha sido posible registrar canales iónicos individuales del receptor de acetilcolina, así como de los canales de Sodio y Potasio responsables del potencial de acción, en la membrana nativa. El registro de fluctuaciones de la conductancia de la membrana debido a la apertura y cierre de los canales de sodio ha permitido reconstruir la corriente de sodio del potencial de acción a partir del comportamiento individual de los canales (9).

REFERENCIAS

1. ARMSTRONG, C. y F. BEZANILLA, 1973. *Nature* 242: 459-461.

2. KEYNES, R. y E. ROJAS, 1973. *J. Physiol.* 223: 28 p.
3. ALVAREZ, O. y R. LATORRE, 1978. *Biophys. J.* 21: 1-17.
4. LATORRE, R. y O. ALVAREZ, 1981. *Physiol Reviews* 61: 77-150.
5. EHRENSTEIN, G. y H. LECAR y R. NOSSAL, 1970. *J. Gen. Physiol.* 55: 119-133.
6. MILLER, C., 1978. *J. Membrane Biol.* 40: 1-23.
7. LABARCA, P. y C. MILLER, 1981. *J. Membrane Biol.* 61: 31-38.
8. NELSON, R., R. ARNOLT, J. LINSTON y M. MONTAL, 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3057-3061.
9. SIGWORTH, F. y E. NEHER, 1980. *Nature* 287: 447-499.

ESTIMACION DEL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS EN ORGANOS AUTOPERFUNDIDO IN SITU. (Estimation of aminoacid transport by "in situ" autoperfused organs). Bravo, I., Cruz M.A. y Rojas, S. Depto. Ciencias Fisiológicas, Universidad de Concepción.

A fin de caracterizar permeabilidad capilar se ha recurrido a la estimación de la extracción fraccional de una molécula test desde la sangre $E = 1 - \frac{\text{conc. test}}{\text{conc. test}}$. Una expresión similar ha sido utilizada para estimar captación tisular hepática de aminoácidos. En este trabajo se dan mayores evidencias sobre la utilidad del método para estudios de transporte hepatocelular en el hígado autoperfundido "in situ".

Se trabajó en perros alimentados con dieta equilibrada. A un grupo se le dio a beber etanol al 15% (v/v) durante 48 hrs. El grupo control bebió agua ad lib. En el animal anestesiado se inyectó a través de la porta una mezcla de trazadores: Sodio-22, como referencia extracelular, y un aminoácido marcado como trazador test. Se estimó volumen extracelular hepático, captación tisular de L-leucina- ^3H , glicina- ^3H y AIB- ^3H , de acuerdo a técnicas ya descritas.

Los valores de captación celular hepática de los aminoácidos en el grupo control fueron similares a los obtenidos por otros, utilizando técnicas y/o preparaciones diferentes. La ingesta alcohólica redujo significativamente la captación de glicina y de AIB, y en menor grado la de leucina. Después de infundir por la porta glicina fría o etanol en animales controles, se observó inhibición de la captación de glicina y de AIB.

MODIFICACION DEL TRANSPORTE DE IONES EN MEMBRANAS ARTIFICIALES POR DDT Y DDE. (Modification of ion transport in artificial membranes by DDT and DDE). Bull, R. y Wolff, D. Depto. de Fisiología y Biofísica, Fac. de Medicina y Depto. de Biología, Fac. de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Existen diversas evidencias que los insecticidas interfieren con procesos de transporte en membranas biológicas, aunque los mecanismos de acción no son aún conocidos. Podrían actuar directamente sobre la estructura de canales o transportadores o indirectamente modificando propiedades físicas de la matriz lipídica. Con el objeto de dilucidar el mecanismo de acción de los insecticidas sobre el transporte de iones en membranas estudiamos el efecto del DDT y su análogo DDE sobre los parámetros estructurales de bicapas lipídicas de fosfatidil etanolamina (PE). DDT y DDE disminuyen de modo comparable la corriente llevada por los complejos valinomicina- K^+ y nonactina- K^+ . DDT y DDE (en menor grado) aumentan la conductancia tanto para el anión tetrafenilborato como para el catión tetrafenil arsonio. Mediciones directas del potencial de superficie de monocapas de PE, muestran que este no es alterado por DDT ni DDE. Por otra parte DDT produce un aumento en la capacidad eléctrica de la bicapa de sólo un 2% y DDE de un 1%.

Estos resultados son compatibles con la hipótesis de que estos compuestos organoclorados aumentan la conductancia intrínseca de la membrana haciendo la bicapa más fluida e incrementando en menor grado su constante dieléctrica.

AISLAMIENTO DE RECEPTORES EN BIOMEMBRANAS (Isolation of receptors from biomembranes) Marta C. Bunster B., Dept. C. Fisiológicas, Universidad de Concepción.

Se describió el aislamiento de receptores a Conavalina A (Con-A) en membranas de células CHO H7w; para ello se utilizaron técnicas de marcaje de células con ^1I y ^3H utilizando la técnica de la lactoperoxidasa con el objeto de seguir la purificación. Un primer método consistió en utilizar técnicas de cromatografía de afinidad (Agarosa-ConA) y elución posterior con el hapteno alfa-metil-manosa, y por posterior electroforesis en gel de poliacrilamida, analizando los por autoradiografía o por fluorografía dependiendo de la marca; detectándose tres tipos de receptores de diferente afinidad por ConA utilizando los gráficos de Scatchard.

También se utilizó inmunotécnicas como un método alternativo para su purificación mediante el uso de anticuerpos anti ConA, caracterizándolos por electroenfoque isoeléctrico y por la cuantificación de la radiación presente en cada fracción.

Se pretende con esta separación de receptores identificar a aquellos que están involucrados en el proceso de aglutinación celular que puede lograrse utilizando anticuerpos específicos.

MODIFICACIONES QUIMICAS EN BACTERIORODOPSINA DE LA MEMBRANA PURPURA DEL HALOBACTERIUM HALOBIIUM. (Chemical modifications of bacteriorhodopsin from purple membrane of Halobacterium halobium). Campos, M., Moore, T.A. y Perham, R.N. Departamento de Química, Universidad de Concepción, Casilla 3-C, Concepción, Chile y Departamento de Bioquímica, Universidad de Cambridge. U.K.

La membrana púrpura ocupa el 50% del área de la membrana celular del bacterio. Contiene una sola proteína, bacteriorodopsina, la cual está unida a una molécula de retinal, y que le confiere la capacidad de transporte activo de protones. Esto se traduce en la síntesis de energía a partir de luz. Esta membrana se encuentra cristalizada en su estado natural, por lo que constituye un excelente modelo para determinar la estructura de membranas naturales. Nosotros estamos interesados en el mecanismo de transporte de protones a través de esta membrana (50 Å), para dilucidar la contribución de la proteína en este proceso. Nos preocupamos del posible rol de tirosina. Cabe destacar que esta proteína tiene un peso molecular de 25.000 y que contiene 10 tirosinas. Estos residuos fueron modificados selectivamente con tetranitrometano, que es capaz de reaccionar tanto en medio hidrofílico e hidrofóbico. La técnica utilizada fue la de Riordan y Vallee con un rango de concentración molar TNM/enzima de 1/100. En todos los experimentos se realizó un control en idénticas condiciones. Luego de modificar esta membrana pura, se realizaron las siguientes determinaciones; análisis de aminoácidos, capacidad de translocación de protones (en vesículas), electroforesis en SDS, difracción de rayos X. Se estableció que es posible modificar el 40% de las tirosinas, sin afectar la actividad de transporte de protones y solamente al modificar un 85% de ellas se logró anular su actividad.

TRANSPORTE DE IONES EN MEMBRANAS TRATADAS CON HEMOCIANINA. (Ion transport in hemocyanin-treated membranes). Cecchi, X. y Alvarez, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

La hemocianina es una proteína que forma canales conductores de iones en membranas artificiales. Si se pone hemocianina por un solo lado de la membrana, los iones positivos pasan más fácilmente si entran a la membrana por el mismo lado de la hemocianina que en el sentido opuesto. El propósito de este trabajo es estudiar si esta diferencia de permeabilidad se debe a una asimetría del canal o a un cambio de la estructura producido por el campo eléctrico usado para mover los iones a través de la membrana.

La técnica usada fue medir la diferencia de las corrientes producidas por potenciales positivos o negativos en función del tiempo, usando pulsos de potencial eléctrico.

Nosotros observamos que en el borde inicial del pulso, la diferencia de corriente presenta un curso temporal de forma sigmoidal, mientras que en el borde final presenta un curso temporal exponencial. Nosotros hemos reconstruido esta cinética usando como datos el curso temporal del potencial aplicado, la curva corriente-potencial del canal de hemocianina en estado estacionario y la función de transferencia del sistema de registro de corriente. Como este modelo no incluye cambios de la conductancia en función del tiempo, concluimos que la rectificación del canal de hemocianina se puede explicar usando cualquier modelo estático de un canal asimétrico.

Grant B.1224-811, Universidad de Chile.

"CONTROL NERVIOSO DEL TRANSPORTE DE SODIO EN PIEL DE SAPO". (Nervous control of the sodium transport through the toad skin). * Concha J., González, C. y Acevedo, C.G. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción.

Algunos autores han señalado que la estimulación nerviosa provoca cambios bioeléctricos en piel. El presente trabajo pretende evidenciar la notoria acción que tiene el sistema nervioso en el control del transporte de sodio en piel de batracios chilenos.

Se trabajó en preparaciones nervio-piel y en animales a los que se les estimuló hipotálamo. La piel se colocó en cámara tipo Ussing para registro de diferencia de potencial (DP) y corriente de cortocircuito (CCC) antes y después de estimulación nerviosa. El hipotálamo se estimuló con electrodos bipolares finos.

La estimulación del nervio originó en la piel una respuesta bifásica consistente en una disminución de DP y CCC de corta duración. El primer efecto denominado alfa se deprimió con bloqueadores alfa adrenérgicos y el segundo denominado beta decreció con bloqueadores beta. Se demuestra que ambos efectos dependen de la estimulación simpática ya que desaparecen después de simpatectomía quirúrgica o química. La estimulación hipotalámica produce los mismos efectos. Las respuestas descritas se atribuyen a transporte de sodio a nivel de las glándulas ya que no se observan en zonas de piel sin glándulas.

Se concluye que el sistema nervioso controla el transporte de sodio a través de la piel de batracios modulando la actividad glandular de secreción y reabsorción.

* PROYECTO N°20.33.01 de la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción

PROPIEDADES ELECTRICAS DE LA MUCOSA DEL COLON DE PERRO. (Electrical properties of dog colon mucosa). Gazitúa, S. y Arriagada, E. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Universidad de Concepción.

Un método se desarrolló in vivo para mantener estables por períodos prolongados las características eléctricas de la mucosa del colon de perro. Esto se logró al conservar el volumen del órgano rigurosamente constante.

La glucosa intraluminal produjo un aumento del potencial transmural (pd) y de la corriente de cortocircuito (cotransporte sodio-glucosa). El reemplazo de Na por K en el perfusado causó un aumento de pd (potencial de difusión) mientras que la sustitución con manitol provocó una inversión (potencial de dilución). En la solución de manitol la glucosa abolió efectivamente el pd negativo (cotransporte de glucosa con iones sodio refluídos desde los capilares), mientras que en la solución de potasio el efecto del azúcar fue más pequeño que el control (inhibición del cotransporte sodio-glucosa por el potasio). La perfusión de una solución hiperosmótica provocó potenciales "streaming" dependientes de Na y sensibles a dinitrofenol (potenciales dependientes del tamaño intercelular). A diferencia del potencial de glucosa, los potenciales "streaming" no mostraron signos de saturación (pronunciada conductividad hidráulica del epitelio).

La existencia de potenciales "streaming", de difusión y de glucosa en el colon canino, indican que este epitelio tiene más en común con el intestino delgado que la mayoría de los colones de los mamíferos.

REQUERIMIENTO LIPIDICO EN EL MECANISMO ENZIMATICO DEL TRANSPORTE ACTIVO DE SODIO. (Lipidic requirement in the enzymatic mechanism of the sodium active transport). Jedlicki, A., González, M.E. y Zambrano, F. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Departamento de Biología, Universidad de Chile.

Los sulfátidos, glicolípidos que se encuentran en la membrana plasmática, son un requerimiento específico para la actividad (Na^+K^+) -ATPásica. Es importante dilucidar en qué etapa del mecanismo de acción de la (Na^+K^+) -ATPasa participan. Resultados previos involucran a los sulfátidos en la afinidad de la enzima por K^+ , por lo tanto, se estudió la dependencia de ellos en la actividad fosfatásica dependiente de K^+ , en la defosforilación dependiente de K^+ de la (Na^+K^+) -ATPasa y en el ligamen de ouabaína a esta enzima.

Al pretratar con arilsulfatasa una fracción microsomal rica en actividad fosfatásica dependiente de K^+ , se observa un 80% de inactivación, fenómeno que no es revertido por una alta concentración de K^+ , en cambio la adición de sulfátidos microdispersos al medio sí produce un incremento de la actividad remanente.

Al estudiar la defosforilación de la (Na^+K^+) -ATPasa utilizando ^{32}P -ATP también se observa una marcada inhibición de esta etapa de la reacción cuando en la fracción microsomal han sido hidrolizados los sulfátidos.

La hidrólisis de estos glicolípidos produce además alrededor de un 90% de inhibición del ligamen de ouabaína, proceso que es en parte revertido por la adición de sulfátidos microdispersos al medio.

Estos resultados indican que al hidrolizar los sulfátidos, se modifica la afinidad por K^+ y que estos lípidos son requeridos por la (Na^+K^+) -ATPasa en la etapa de defosforilación.

PROPIEDADES DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA RECONSTITUIDO EN MEMBRANAS ARTIFICIALES DE LIPIDOS. (Channel properties of the purified Acetylcholine receptor reconstituted in artificial lipid bilayers) *Labarca, P., *Lindstrom, J. y *Montal, M. *Universidad de California, San Diego y + Salk Institute.

El receptor de acetilcolina (RAC), purificado del órgano eléctrico de Torpedo californica, ha sido reconstituido en una membrana artificial de lípidos. Las membranas artificiales en las cuales el receptor ha sido incorporado presentan una conductancia que depende de la concentración de agonista. Esta conductancia es inhibida por las antagonistas curare y hexametonio.

El estudio de fluctuaciones de canales individuales de RAC demuestran que la vida media del canal abierto (τ_o) depende del tipo de agonista usado, siguiendo la secuencia: Subarilcolina > Acetilcolina > Carbamilcolina.

Nuestros resultados indican también que τ_o depende de la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana.

La purificación del receptor de acetilcolina, compuesto de 4 subunidades en la razón molar $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ y su reconstitución en membranas artificiales demuestra que todas las características cinéticas y farmacológicas del RAC están contenidas en estas 4 subunidades.

FACILITACION DE LA LIBERACION DE NEURO-TRANSMISOR POR 4-HIDROXIPYRIDINA (4-HP). (Facilitation of the neurotransmitter release by 4-HP). Montoya, G., Molgó, J., Le-meignan, M., y Lechat, P. Instituto de Farmacología, Laboratorio Asociado del C.R.N.S. París, Francia.

La 4-HP presenta menor toxicidad que la 4-Aminopiridina, bloquea el canal de K^+ en el axón de jibia y facilita la liberación de neurotransmisor en la sinapsis neuro muscular.

La liberación cuantál evocada y espontánea de neurotransmisor fue estudiada in vitro en la sinapsis ciático sartorio de rana con técnicas de registro extracelular e intracelular. Evaluamos las modificaciones del potencial de placa motora, corriente de la placa motora, potenciales en miniatura y potenciales de acción de la fibra muscular estimulada indirectamente.

La acción facilitadora de la 4-HP parece ser de origen presináptico, pues la droga no modifica el potencial de membrana, no hay variación en la amplitud ni frecuencia de los potenciales en miniatura, ni alteración en el tiempo de alza del potencial de placa, ni de la corriente de placa; en cambio la 4-HP aumenta el retardo sináptico.

De nuestros resultados podemos concluir que la acción facilitadora de la 4-HP es debida a una mayor entrada de Ca^{++} en el terminal nervioso.

ACCION DE PROGESTERONA SOBRE PARAMETROS BIOELECTRICOS DE PIEL DE SAPO AISLADA (Action of progesterone on bioelectric parameters of isolated toad skin). Neumann, V.; Concha, J.; Quevedo, L. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Fac. Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción. *

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio señalaron que Progesterona (Pg) disminuía corriente de cortocircuito (CCC) y diferencia de potencial (DP) de pieles aisladas de *Pleurodema thaul*, montadas en cámara de Ussing. Esta disminución se atribuía a disminución del potencial del Na.

En el presente trabajo se descarta un efecto sobre la bomba de Na en base a estudios histoquímicos y comportamiento frente a concentraciones variables de Na^+ en el medio. Se demuestra la correlación existente entre CCC inicial y caída de CCC después de agregar Pg $3 \times 10^{-4}M$ al medio mucosal ($r = 0.97$). Mediante el método de Warburg se cuantificó la inhibición del consumo de oxígeno de pieles incubadas en presencia de Pg $4,5 \times 10^{-4}M$. Dicha inhibición fue de un $48.52 \pm 4,7\%$. Por otra parte la inhibición del consumo de oxígeno en presencia de ouabaína $10^{-4}M$ fue de un $25,9 \pm 3,4\%$.

En base a los resultados anteriores se sugiere que la acción de la hormona es a nivel de síntesis de ATP y se descarta acción sobre la bomba de $Na^+ - K^+$.

* Financiado por proyecto 20.33.02 D.I.C. - U. Concepción.

ESTUDIOS MORFOLOGICOS DE MEMBRANAS ARTIFICIALES. (Studies on the morphology of artificial membranes) Seguel, C.G., Suwalsky, M., Marín, O., Facultad de Ciencias y Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Por difracción de rayos X se analizaron bicapas lipídicas de membranas sintéticas de L- α -Dilauril Fosfatidiletanolamina (DLE), las cuales fueron sometidas a diferentes grados de hidratación a una temperatura de $20^\circ C$. Los resultados experimentales permiten postular que los fosfolípidos se orientan en la bicapa con sus cadenas hidrocarbonadas totalmente extendidas mientras que los grupos hidrofílicos se ubican paralelos al plano de la bicapa. El aumento de la hidratación provoca una mayor separación entre las bicapas.

Las membranas de DLFE se estudiaron asimismo por microscopía electrónica; para ello fueron fijadas en glutaldehído/ OsO_4 , incluidas en Epon-Araldita y cortadas con ultramicrotomo. Las micrografías obtenidas revelaron una subestructura de periodicidad laminar, en la cual el cuerpo hidrofílico, que es la zona donde se deposita el OsO_4 , alcanza mayor contraste presentando dimensiones de 12 \AA aproximadamente. El interespaciado correspondiente a las cadenas hidrofóbicas es de 36 \AA resultando un valor del ancho de la bicapa de $49 \text{ \AA} \pm 3 \text{ \AA}$, valor que está dentro del rango de dimensiones determinadas por difracción de rayos X.

Micrografías de las superficies de las membranas, obtenidas por metalización con C-Pt, revelan que se trata de superficies lisas con una distribución al azar de partículas.

ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE MEMBRANAS ARTIFICIALES. (Structural studies on artificial membranes). Suwalsky, M., Tapia, J., Knight, E., Seguel, C.G. y Duk, L. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción.

Membranas artificiales altamente cristalinas y muy orientadas de los fosfolípidos sintéticos dimiristoil lecitina (DML), dilauril fosfatidil etanolamina (DLE), dimiristoil fosfatidiletanolamina (DME) y dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPE), así como de los productos de las interacciones del ion Ca^{2+} y colesterol con DML, están siendo estudiadas en nuestro laboratorio por difracción de rayos X y microscopía electrónica. Las membranas son analizadas en términos de conformaciones moleculares, celdas unitarias, grupos espaciales y morfología, así como sus variaciones por efectos de la hidratación.

En términos generales todos los fosfolípidos estudiados se caracterizan por presentar la estructura de bicapa, con los grupos polares inclinados con respecto a las cadenas hidrocarbonadas extendidas. Consecuentemente, el ancho de las bicapas es una función directa de la longitud del ácido graso correspondiente.

Mientras la estructura de DML es estabilizada por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, en las etanolaminas predominan estas últimas. En consecuencia, DML sufre profundos cambios por acción de la hidratación, principalmente una progresiva separación de las bicapas acompañada de un desorden molecular rotacional, mientras que estos efectos son menores en las fosfatidiletanolaminas.

TRANSPORTE ACTIVO DE Cl^- EN PIEL AISLADA DE CAUDIVERBERA CAUDIVERBERA. (Active Cl^- transport across isolated skin of *Caudiverbera caudiverbera*). Torres, R. y Wolff, D. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

En piel aislada de rana se ha determinado la existencia de dos mecanismos de transporte activo de Cl^- , uno que se evidencia en soluciones muy diluidas (≈ 2.5 mM) y otro que se evidencia en soluciones concentradas (≈ 100 mM). En *Caudiverbera caudiverbera* se ha determinado, in vivo, la presencia del mecanismo transportador de Cl^- en bajas concentraciones. En este trabajo se estudió el transporte activo de Cl^- en piel aislada en soluciones concentradas; para ello se utilizó un sistema de control de potencial (Voltage clamp) para cortocircuitar el potencial transepitelial (V_+) de la piel, la que se montó en una cámara de Ussing con soluciones simétricas sin Na^+ , siendo éste reemplazado por colina.

Los resultados indican una inversión del potencial transepitelial, respecto de la polaridad que se manifiesta en presencia de Na^+ , y también una inversión de la corriente de cortocircuito (c.c.c.). Tanto el potencial como la corriente caen a cero cuando al medio que baña el lado mucoso de la piel se le agrega $Cu^{++} 10^{-5}M$, el que ha sido descrito como inhibidor de la permeabilidad al Cl^- .

Tanto la inversión de la c.c.c. como la inversión de la polaridad del potencial transepitelial así como la anulación de ambos por efecto del Cu^{++} , están en perfecto acuerdo con la hipótesis de un transporte activo de Cl^- en soluciones muy concentradas.