

RESUMENES  
SIMPOSIO INTERNACIONAL  
FUNCION Y ESTRUCTURA DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS  
Punta de Tralca, Chile  
14 y 15 noviembre de 1984

ABSTRACTS  
INTERNATIONAL SYMPOSIUM  
FUNCTION AND STRUCTURE OF BIOLOGICAL MEMBRANES  
Punta de Tralca, Chile  
November 14-15, 1984



CANALES ACTIVADOS POR LUZ EN FOTORECEPTORES DE INVERTEBRADO (Light-activated channels in an invertebrate photoreceptor). J. Bacigalupo y J. Lisman, Depto. Biol. Fac. Cs. Bás. y Farm., U. de Chile y Depto. Biología, Brandeis University, Waltham, MA. EEUU.

En los fotoreceptores del ojo ventral de *Limulus* la respuesta evocada por la luz consiste en una depolarización debida a la entrada de  $\text{Na}^+$ . Este incremento en la conductancia al  $\text{Na}^+$  inducida por la luz ( $G_L$ ) es mediada por un mensajero secundario, aún no identificado. Nuestro trabajo consistió en obtener una caracterización de  $G_L$  a nivel de canales únicos. Comparamos las propiedades de estos canales con aquellas de  $G_L$ , a fin de evaluar la correspondencia entre ambos. El estímulo luminoso evoca saltos de corriente de entrada debidos a la apertura y cierre de los canales iónicos individuales. La depolarización inducida por la luz no es la causa de la activación de los canales, ya que ésta no ocurre si la membrana es depolarizada en la oscuridad. El aumento en la  $[\text{Ca}^{++}]$  libre que ocurre durante la luz tampoco provoca la activación de los canales: la microinyección de EGTA, que previene el aumento del  $\text{Ca}^{++}$  libre, potenció el efecto activador de la luz, lo que se observó también a nivel macroscópico. También examinamos si los canales únicos muestran la dependencia de  $V$  a valores positivos de potencial, lo que es característico de la conductancia macroscópica; observamos una marcada dependencia de  $V$  en la probabilidad del canal de estar en el estado abierto, mientras su conductancia es independiente del potencial. Estas observaciones apoyan fuertemente la hipótesis de que los canales observados son activados por luz y son aquellos canales correspondientes a  $G_L$  en estos fotoreceptores. Otra serie de experimentos consistió en aislar de la célula áreas de membrana conteniendo canales activados por luz, y exponer su cara interna a una solución que imitaba al citoplasma. Se observó una alta actividad de canales, independientes de la luz. Estos presentan propiedades comparables en otros aspectos a los canales activados por luz. Estos resultados y sus posibles implicancias serán también discutidos.

CORRELACION DE ASPECTOS ESTRUCTURALES, DINAMICOS Y FUNCIONALES DEL RECEPTOR COLINERGICO NICOTINICO. Barrantes, F.J. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, (INIBIBB) UNS-CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

El receptor colinérgico nicotínico (AChR) es una proteína intrínseca de membrana, hetero-oligómero de ca. 250.000 P.M. formado por cinco cadenas de glicopolipéptidos que atraviesan la membrana al menos una vez. Su abundancia en ciertos tejidos y la disponibilidad de reactivos o toxinas específicos han facilitado el avance de nuestro conocimiento del AChR con respecto a otros receptores de neurotransmisores u hormonas. Con el advenimiento de las técnicas de recombinación de ADN la secuencia nucleotídica, y por ende la secuencia aminoacídica completa de todas las subunidades del AChR ha sido dilucidada. Esto ha catapultado la formulación de modelos que postulan la estructura secundaria de la proteína, la disposición de las cadenas del AChR con respecto a la membrana y su arreglo tridimensional en la formación del canal iónico controlado por el AChR, entre otras hipótesis. Desde el punto de vista experimental, disponemos de métodos directos para la localización estructural de algunas subunidades y para el estudio de los estados oligoméricos del AChR. Cuando se combina información de este tipo con datos bioquímicos e inmunológicos se puede llegar a detallar la orientación vectorial y topología relativa de las subunidades del AChR en la membrana postsináptica y su relación con otras proteínas de esa membrana. La dinámica del receptor y de los lípidos de su entorno puede ser estudiada mediante técnicas espectroscópicas adecuadas para la medición de motilidad rotacional y translacional de macromoléculas. Finalmente, se discutirán las dificultades aún yacientes al intentar correlacionar las propiedades estructurales y dinámicas del AChR con las características funcionales del mismo, especialmente su capacidad de controlar el canal catiónico, parte integral constitutiva del receptor.

FLUJOS DE Na Y K INHIBIDOS POR LA FUROSEMIDA: EQUILIBRIO, MODOS DE OPERACION Y DEPENDENCIA METABOLICA EN ERITROCITOS HUMANOS. Mitz Canessa, Carlo Brugnara y Georges Dagher, Departamento de Fisiología y Biofísica, Harvard Medical School, Boston, Mass. 02115 USA

Seis modos de transporte de Na y K son inhibidos por la furosemida (FS) en eritrocitos humanos: cotransporte de Na-K de entrada y salida, intercambio de  $\text{K}_i/\text{K}_o$  y  $\text{Na}_i/\text{Na}_o$ , salida de K desacoplada y salida de Na desacoplada. La concentración relativa de Na y K en ambos lados de la membrana determina varios tipos de acoplamiento de flujos FS. Un esquema mínimo de reacciones para un sistema de cotransporte acoplado de Na y K puede dar cuenta de estas interacciones y de la variación de la estequiometría cuando varían las concentraciones relativas de Na y K en los lados internos y externos de la membrana. En el rango fisiológico de gradiente de Na y K, la estequiometría en el punto de equilibrio para eflujos e influjos de Na y K FS es 2 Na:3 K. La incubación por 13-15 hrs de estas células en un medio sin glucosa inhibe el cotransporte de entrada y salida y el intercambio de  $\text{K}_i/\text{K}_o$  cuando se reduce el contenido de ATP bajo 100  $\mu\text{mol/L}$ . La reincubación de células depletadas de ATP en un medio conteniendo adenosina e inosina recupera el contenido de ATP y restablece la operación del sistema(s) de cotransporte inhibido por la furosemida. Los resultados indican que el sistema de cotransporte puede utilizar la energía de los gradientes de Na, K y Cl solamente en la presencia de una reacción de alta afinidad por el ATP ( $\mu\text{M}$ ) que regularía el "turnover" de este sistema de transporte. Es probable que reacciones de fosforilación dependientes de cAMP o Ca participen en este proceso ya que este sistema de transporte es modulado por catecholaminas o bradikinina en otras células.

MODELOS DE FUSION DE MEMBRANAS INDUCIDAS POR PROTEINAS. Chaimovich, H., Araujo, P. S., Ortega, V. y Costa, M.E. Instituto de Química da Universidad de Sao Paulo, C.P. 20780, Sao Paulo, S.P., Brasil.

La fusión de membranas inducida por proteínas en una serie de sistemas biológicos es determinada por diversos pasos que incluyen reconocimiento, aproximación y redistribución lípido-proteica. La mecánica molecular de este proceso está siendo investigada en nuestro laboratorio, utilizando un modelo que consiste de vesículas unilamelares pequeñas de fosfatidilcolina y albúmina sérica de bovino. Una conformación singular (forma F) de albúmina induce agregación y fusión de las vesículas en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o lípidos cargados. Usando fragmentos de albúmina demostramos que el tipo de agregación que precede a la fusión determina el tamaño del producto. Tratamiento de albúmina con pepsina produce un péptido de  $M_r 9000$  que también es un eficiente inductor de fusión a pH bajo. Basados en el conjunto de datos estructurales obtenidos en este sistema, hemos propuesto que la exposición al medio acuoso de regiones hidrofóbicas de hélices anfífilas puede ser una característica general de proteínas capaces de inducir fusión de membranas.

DESARROLLO DE LA INACTIVACION CONTRACTIL EN FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS. (The onset of contractile inactivation in skeletal muscle fibers). Caputo, C. y Bolaños, P. Centro de Biofísica y Bioquímica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela.

En el presente trabajo se ha utilizado la técnica de control de potencial con dos microelectrodos, aplicada a fibras musculares cortas (<2 mm), disecadas de los músculos Lumbricalis de Rana. Las fibras incubadas en una solución Ringer, con 300 nM de TTX se mantenían a un potencial impuesto de -100 mV. Al condicionar la membrana de estas fibras con pulsos despolarizantes subumbrales, se inducen cambios importantes en las respuestas contractiles a pulsos despolarizantes de prueba. El primer parámetro afectado es la duración de las contracturas inducidas por pulsos prolongados a 0 mV, seguido por una disminución en su tensión máxima. Normalmente es difícil lograr la abolición completa de la respuesta contractil utilizando pulsos rectangulares condicionantes subumbrales. Sin embargo, esto es posible utilizando despolarizaciones condicionantes en forma de rampas (dientes de sierra). Normalmente si las rampas tienen una pendiente mayor que 0.2 mV/seg, se obtienen respuestas contractiles reducidas en la región de potencial entre -50 y -30 mV. Con pendientes menores que 0.1 mV/seg, se logra la inactivación contractil completa sin activación. En presencia de compuestos que interfieren con el acoplamiento Despolarización-Constricción, tales como el Dantrolene y el antagonista de calcio D-600 es posible obtener inactivación completa utilizando rampas con pendientes hasta de 0.8 a 1.2 mV/seg, lo cual indica que estas sustancias afectan el proceso de inactivación contractil. Subvencionado por CONICIT, proyecto S1-1148.

CANAL RÁPIDO DE CALCIO EN FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DE ANFIBIO. Cota, G. y Stefani, E. Depto. de Fisiología y Biofísica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Apdo. Postal 14-740, 07000 México, D. F.

Los experimentos fueron realizados a 18°C en fibras del músculo cutáneo pectoris de *Rana pipiens* y *Rana montezumae*, utilizando la técnica de fijación de voltaje con 3 microelectrodos. La solución de registro contenía TEA-Metanosulfonato 120 mM, Ca<sup>2+</sup> 10 mM y sacarosa 350 mM. Los registros obtenidos luego de 5 mins de exposición a la solución hipertónica, mostraron dos componentes de corrientes de Ca<sup>2+</sup>: un primer componente rápido se detectó a -60 mV, con un máximo de -10 a -30  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  a aproximadamente -20 mV. Esta corriente tuvo un curso rápido de activación, por ejemplo a -45 mV se activó con una constante de tiempo de 25 mseg. El segundo componente lento fue detectado a -30 mV con un valor pico de 40 a 60  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  a 0 mV y con un tiempo al pico de 250-400 milisegundos. Luego de una exposición de 10-15 minutos, el primer componente rápido desapareció, indicando un efecto deletéreo de la hipertonicidad.

Estos resultados sugieren la presencia de dos poblaciones de canales de calcio en músculo esquelético de anfibio; el canal rápido tiene un "umbral" de activación más bajo, un curso temporal rápido y podría ser activado durante un potencial de acción.

Financiado por CONACyT, donativo PCCBBEU 020187 a Stefani Enrico.

DEPENDENCIA DEL INTERCAMBIO Na/Ca AL POTENCIAL DE MEMBRANA EN AXONES DIALIZADOS DE CALAMAR BAJO CONTROL DE POTENCIAL (Voltage dependence of the Na/Ca exchange in voltage clamped dialyzed squid axons). Dípolo, R. Bezanilla F.\*, Caputo C. y Rojas H. Centro de Biofísica y Bioquímica. IVIC, Apdo. 1827, Caracas 1010-A, Venezuela. \*Department of Physiology, ULA, Los Angeles, California, U.S.A.

Hemos combinado las técnicas de control de potencial y de diálisis intracelular para estudiar la dependencia de potencial de la salida de calcio, dependiente del sodio extracelular, en axones gigantes del calamar. Para prolongar la sobrevivencia de los axones los experimentos se han llevado a cabo utilizando soluciones internas y externas preparadas con cationes y aniones orgánicos impermeantes, los cuales no afectan el funcionamiento del intercambio sodio-calcio. En axones dializados con soluciones preparadas sin sodio interno, la salida de calcio, dependiente del sodio externo, no presenta una apreciable sensibilidad a cambios del potencial de membrana: para un desplazamiento de 25 mV en la dirección hiperpolarizante, el flujo de calcio solo incrementa en un 7.4% (n=13). Cuando el medio de diálisis contiene sodio (de 20 a 55 mM), la salida de calcio aumenta en un 32.3% (n=25) para el mismo cambio de potencial. La adición de ATP al medio de diálisis aumenta la magnitud de la salida de Ca (dependiente de sodio externo), sin modificar aparentemente su sensibilidad a cambios del voltaje. No se encontraron cambios en la sensibilidad al voltaje al variar la concentración de calcio libre intracelular en un rango entre 0.21 y 230  $\mu\text{M}$ . Al variar el potencial de membrana por períodos prolongados, encontramos que los cambios correspondientes en la salida de calcio, no se mantienen constantes, sino decaen a valores intermedios de manera exponencial. Este efecto puede indicar un proceso de inactivación en el mecanismo de intercambio sodio-calcio. (Financiado por CONICIT, fondos S1-1156, S1-1144 y S1-1148, por la National Science Foundation (Int-8312953) por USPHS grant GM30376 y M.D.A.

REQUERIMIENTOS LIPÍDICOS DE LA Ca<sup>2+</sup>-ATPASA DE RETÍCULO SARCOPLÁSMICO (LIPID REQUIREMENTS OF THE SARCOPLASMIC RETICULUM Ca<sup>2+</sup>-ATPase). Hidalgo, C., González, M. E. y de la Fuente, M. Muscle Department, Boston Biomedical Research Institute, Dept. Neurology, Harvard Medical School, Boston, U.S.A., y Departamento Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de retículo sarcoplasmático aislado de músculo esquelético de conejo tiene 80 a 100 fosfolípidos asociados en cada monomero de enzima. Es posible remover la mayor parte de estos fosfolípidos por tratamiento con detergentes sin afectar la actividad enzimática, hasta llegar a niveles de 35 fosfolípidos por enzima. Remoción de 35 a 22 fosfolípidos por enzima produce 50% de inhibición de la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, sin afectar la reacción de fosforilación de la enzima por ATP. Al remover más fosfolípidos, sin embargo, se inhibe drásticamente la reacción de fosforilación. Se produce inhibición completa e irreversible de actividad a niveles de 10 fosfolípidos por enzima. Estudios físicos realizados en forma paralela indican que con cada monomero se encuentran asociados 22 fosfolípidos, que tienen movimientos rotacionales en torno a un eje perpendicular a la bicapa lipídica más lentos que el resto de los fosfolípidos de la membrana y que constituyen el dominio de lípidos adyacentes. Se postula un modelo mediante el cual al remover lípidos de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se disminuye la fluidez de la membrana, alcanzando un valor crítico en 35 fosfolípidos por enzima, bajo el cual se produce inhibición de actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa pero no de fosforilación. Esta última sólo se inhibe al remover lípidos del dominio de lípidos adyacentes.

Financiado por Grant NIH HL23007.

ACOPAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION EN FIBRA MUSCULAR DE BALANUS: CORRIENTE DE  $Ca^{++}$  Y SU POSIBLE SITIO DE ACCION. V. Nassar-Gentina y M. Luxoro. Lab. de Fisiol. Celular, Facultad de Medicina y Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Montemar.

Previamente hemos demostrado que en balanus la entrada de  $Ca^{++}$  es la primera etapa del acoplamiento excitación-contracción. Nos preocupa averiguar si este  $Ca^{++}$  actúa directamente sobre la maquinaria contráctil o en otra etapa intermedia, posiblemente induciendo la liberación del  $Ca^{++}$  secuestrado en el retículo. En depolarizaciones inducidas por KCl 440 mM, hemos visto que la procaína (10 mM) permite la generación de potenciales de acción y tetanus, en tanto que la tetracaína (2 mM), acelera la depolarización, no se produce potencial de acción ni sacudidas ni contractura.

a) en fibras sin membrana, expuestas a concentraciones de  $Ca^{++}$  que actúan directamente sobre el sistema contráctil, ni la procaína, ni la tetracaína afectan la contracción; b) en fibras enteras sometidas a fijación de voltaje, procaína no actúa sobre las corrientes de  $Ca^{++}$  y disminuye moderadamente la tensión inducida; tetracaína, en cambio, disminuye las corrientes en ± 30% y suprime totalmente la contracción. Como control, recuperamos el valor inicial de las corrientes (elevando el  $Ca^{++}$  extracelular de 10 a 15 mM), sin inducir contracción. Nuestra conclusión es que la tetracaína está bloqueando a otro nivel, probablemente la liberación del  $Ca^{++}$  del retículo, lo que implicaría que éste está implicado también en el músculo, en la secuencia excitación-contracción.

MECANISMOS DE TRANSPORTE CELULAR DE HIERRO. (Mechanisms of cellular iron uptake). Nuñez, M.T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile y Department of Medicine, Harvard Medical School.

En el proceso de incorporación celular de hierro, transferrina (Tf)-Fe(III) interactúa con receptores específicos llevando a cabo un proceso abreviado de endocitosis mediado por receptor que dura entre 1 y 4 minutos. Como resultado de este proceso, el hierro originalmente presente en Tf es retenido cuantitativamente por la célula. Experimentos cinéticos indican que el hierro pasa en forma secuencial por componentes de la membrana plasmática, el citoplasma y la mitocondria, en donde es incorporado en hem.

La pérdida de afinidad de Tf por Fe(III) es mediada por la acidificación del interior de la vesícula endocitótica. Esto fue comprobado al estudiar la acción de ionóforos capaces de disipar gradientes de protones. Monensina y nigerisina bloquean tanto la incorporación celular de hierro como la disociación de Tf y Fe(III) promovida por la célula.

Durante su paso transiente por la membrana de la vesícula, el hierro es reducido de Fe(III) a Fe(II), como se demuestra por el efecto desacoplador del quelante lipofílico de Fe(II)  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -dipiridilo.

Factores como la química acuosa del hierro, su velocidad de incorporación celular (1 molécul./min/recep.) y su dependencia de temperatura, hacen pensar que el hierro es translocado a través de la membrana mediante un transportador específico.

Financiado por grant AM-31748 del N.I.H., y Proyecto 1042-84 de Conicyt.

EFFECTOS DE LA DESNERVACION SOBRE LOS MOVIMIENTOS DE  $K^+$  A TRAVES DEL SARCOLEMA DE MUSCULO DE RANA (Effects of denervation on the  $K^+$  movements across the sarcolemma of frog muscle). Venosa R.A. Cátedra de Fisiología con Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

El movimiento de  $^{42}K$  a través del sarcolema y el potencial de reposo ( $V_m$ ) de músculos sartorios de rana normales (MN) y desnervados (MD) fueron medidos en diversas condiciones experimentales en preparaciones equilibradas inicialmente en  $K^+$  100 mM y  $Cl^-$  219 mM. Los resultados obtenidos se pueden resumir así: 1. Cuando no actúa ninguna fuerza impulsora (FI) sobre  $K^+$ , es decir, cuando  $V_m - E_K = 0$  ( $E_K$ : potencial de equilibrio de  $K^+$ ), la conductancia al  $K^+$  ( $g_K$ ) es de 368  $\mu S \cdot cm^{-2}$  y 282  $\mu S \cdot cm^{-2}$  en MD. 2. Esta reducción de  $g_K$  en MD aparentemente es el resultado de dos cambios opuestos: a) una disminución de la conductancia de un canal rectificador hacia adentro ( $g_R$ ) que se bloquea con  $Rb^+$ , b) un aumento de la conductancia,  $g_L$ , de un canal lineal de alta resistencia e insensible al  $Rb^+$ . Así en MN  $g_K = (368 \mu S \cdot cm^{-2}) = g_R (359 \mu S \cdot cm^{-2}) + g_L (9 \mu S \cdot cm^{-2})$  y en MD  $g_K (282 \mu S \cdot cm^{-2}) = g_R (198 \mu S \cdot cm^{-2}) + g_L (84 \mu S \cdot cm^{-2})$ . 3. En presencia de una FI hacia afuera ( $V_m - E_K > 0$ ) del orden de 35 mV, el canal rectificador se cierra completamente tanto en MN como en MD, pero mientras en los primeros el cierre es sostenido (1 h), en los segundos es transitorio. 4. Estos cambios se hacen evidentes después de la segunda semana post deservación y se asemejan a los producidos en MN por formaldehído (10 mM), el cual interactúa con grupos aminos que provocan cambios conformacionales en algunas proteínas de la membrana (J. Physiol. 286, 591, 1979). Sería posible entonces, que la deservación indujera cambios estructurales en proteínas relacionadas con  $g_R$  y  $g_L$ .