

**SEGUNDO CONGRESO
DE BIOFISICA
DEL CONO SUR**

**SECCION BIOFISICA
SOCIEDAD DE BIOLOGIA DE CHILE
SOCIEDAD ARGENTINA DE BIOFISICA**

**Punta de Tralca, Chile
18-21 de noviembre de 1990**

CONFERENCIA DR. REINALDO DIPOLO

REGULACION DEL INTERCAMBIADOR Na/Ca POR Ca^{2+}_i .
INTERACCION DE LIGANDOS CON EL SITIO REGULATORIO.
EFECTOS DE ATP, Na_i , CATIONES MONOVALENTES Y Mg_i .
(Regulation of Na/Ca exchange by Ca^{2+}_i . Ligand
interactions with the regulatory site: the effect of
ATP, Na_i monovalent cations and Mg_i). DiPolo, R. y
Beaugé, L. IVIC, Caracas, Venezuela e Instituto M. y
M. Ferreyra, Córdoba, Argentina.

Hemos estudiado las características del sitio regulatorio para Ca_i del intercambio Na/Ca en axones dializados de calamar bajo condiciones de voltaje controlado. La activación en la entrada de calcio dependiente de sodio interior (intercambio $Ca_o:Na_i$ ó "modo reverso") por Ca_i se tomó como una medida de la afinidad aparente del sitio regulatorio para Ca_i . Para eliminar la presencia de otras reacciones del intercambiador Na/cá ($Na_o:Ca_i$, $Ca_o:Ca_i$ y $Na_o:Na_i$) las curvas de activación para Ca_i se midieron en condiciones de alto sodio interior y en ausencia de sodio exterior. Los resultados obtenidos indican: i) ATP induce un marcado aumento en la afinidad aparente del sitio regulatorio siendo el $K_{1/2}$ de 4 μM en ausencia de ATP y de 0.5 μM en presencia de ATP. La activación en la entrada de Ca por Na_i a Ca_i constante no es modificada por ATP. ii) Contrario a la marcada inhibición del sitio de transporte de Ca por sodio interior, el sitio regulatorio no es inhibido por Na_i . III) A diferencia de la interacción de cationes monovalentes (K^+ , Li^+) con el sitio de transporte de Ca, la afinidad del sitio regulatorio no es modificada por cationes monovalentes. iv) Mg_i inhibe parcialmente la activación del modo reverso por Ca_i . Los experimentos indican que el sitio regulatorio y el sitio de transporte para Ca_i son entidades distintas. Medidas de salida de calcio bajo condiciones de alto Na_i en ausencia de Na_o indican que el Ca unido al sitio regulatorio no es transportado al exterior.

SIMPOSIO: "ARQUITECTURA MOLECULAR DE PROTEINAS Y BIOMEMBRANAS"

Presidente: Dr. Raúl Grigera
Coordinador: Dr. Octavio Monasterio

ESTUDIOS ESTRUCTURALES EN MULTIBICAPAS LIPIDICAS. (Structural studies on lipid bilayers). Suwalsky, M. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción, Chile.

En este laboratorio se han desarrollado técnicas para preparar multibicapas lipídicas con un alto grado de cristalinidad y orientación, lo que ha permitido la determinación de sus estructuras por difracción de rayos X. Los fosfolípidos más estudiados han sido la dimiristoilfosfatidil etanolamina (DMFE) y la dimiristoilfosfatidilcolina (DMFC) que se encuentran, respectivamente, en la monocapa interna y externa de eritrocitos. Aunque sus conformaciones moleculares son muy similares, presentan diferencias estructurales y físico-químicas, en especial su comportamiento frente a la hidratación.

Estas multibicapas han sido utilizadas para estudiar el modo como fármacos y contaminantes afectan las biomembranas. Los compuestos analizados incluyen los pesticidas DDT y pentaclorofenol, los antibióticos clortetraciclina y cloranfenicol y el ansiolítico clorpromazina. Para esto, mezclas equimolares de cada uno de estos compuestos se hacen reaccionar con DMFE y DMFC en un medio hidrofóbico. Las muestras secas, a la forma de polvos cristalinos, se someten a la difracción de los rayos X. Adicionalmente, cada uno de los fosfolípidos se hace interactuar con soluciones acuosas de los fármacos y contaminantes, muestras que también son analizadas por rayos X a temperaturas inferiores a las de transición de los fosfolípidos. Los resultados obtenidos han permitido detectar las perturbaciones que estos compuestos producen a las bicapas lipídicas.

FONDECYT (0783/88) y U. de C. (20.13.79).

PREDICCIÓN DE ESTRUCTURAS MACROMOLECULARES. (Prediction of Macromolecular Structures). Grigera, J.R. Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB), Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

La predicción de estructura de macromoléculas de interés biológico representa un objetivo aún no logrado plenamente. No obstante se cuenta con un bagaje de técnicas que permiten la predicción de algunas estructuras. En particular consideraremos aquí estructuras y propiedades de carbohidratos en solución. Tanto mono como polisacáridos representan una clase importante de moléculas biológicas. De los muchos posibles enfoques al problema de la predicción de su estructura, la simulación mediante dinámica molecular se muestra como una de las más promisorias. El método consiste en simular el comportamiento dinámico de un sistema de partículas que cumplen con las leyes de la mecánica newtoniana. Uno de los aspectos claves para el éxito de la simulación radica en la apropiada elección de los potenciales de interacción átomo-átomo. Desde un punto de vista estricto los potenciales a utilizar deben ser comunes a cada átomo independientemente del compuesto a estudiar. De lo contrario se puede caer en la adaptación de los potenciales al deseo de obtener una estructura en particular. Se muestran ejemplos en los cuales el uso de potenciales seleccionados con criterios generales (y no particularmente para carbohidratos) puede, con un manejo apropiado de la metodología, brindar resultados satisfactorios. A manera de ejemplo se citan las estructuras en solución acuosa y no acuosa de diversos polialcoholes y la comparación de los resultados con la información experimental disponible. Asimismo se ilustra la potencialidad del método con la simulación de canales hidrofílicos e hidrofóbicos.

ESTRUCTURA DE LA INTERFAZ MEMBRANA-SOLUCION EN BICAPAS LIPIDICAS (Structure of membrane-solution interface in lipid bilayers). Disalvo, E. A. Area de Biomembranas, Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

El conocimiento de la ubicación y el balance hidrofílico-hidrofóbico de la interfaz hidrocarburo-agua en una membrana lipídica es esencial para establecer las condiciones de estabilidad y permeabilidad selectiva de membranas celulares.

Alrededor de un 40% del espesor total de la bicapa está ocupada por grupos polares y agua asociada a ellos. Diversos factores físicoquímicos de relevancia biológica pueden alterar la organización y propiedades termodinámicas de esta zona. Entre los más importantes se pueden mencionar a la osmosis, la inserción de carbohidratos y aminoácidos, la adsorción de Ca^{2+} y la intercalación de péptidos. Todos ellos pueden promover perturbaciones en dominios transversales o en el plano de la membrana induciendo cambios en la permeabilidad viscoelasticidad y susceptibilidad a la lisis por acción de enzimas.

Métodos ópticos, electroquímicos y termodinámicos indican que el potencial superficial de una membrana lipídica puede ser alterado cuando se colapsa o se expande por osmosis o cuando se intercalan moléculas formadoras de puentes de hidrógeno como carbohidratos y polioles. Estos resultados permiten establecer las condiciones de la acción de derivados de las fosfolipasas, la estabilidad de la membrana lipídica en procesos de congelación, liofilización y deshidratación y la acción de crioprotectores.

INTERACCION PROTEINA-RNA: METIONIL-tRNA SINTETASA COMO MODELO. (León, O. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile).

Las aminoacil-tRNA sintetetasas son las enzimas responsables de la correcta aminoacilación de los tRNAs durante la síntesis proteica. El reconocimiento específico entre estas enzimas y sus tRNAs correspondientes son modelos muy atractivos para el estudio de la interacción proteína-RNA.

Diversos enfoques experimentales han mostrado que solo un pequeño número de nucleótidos en el tRNA, llamados "elementos de identidad", contienen toda la información necesaria para su selección correcta. En contraste, la información acerca de secuencias aminoacídicas en contacto con tRNA es escasa, debido principalmente a la dificultad en obtener cocristales de ambas macromoléculas.

Para obtener este tipo de información, se realizaron experimentos de entrecruzamiento entre metionil-tRNA sintetasa (MetRS) de *E. coli* y tRNA^{Met} modificado en diferentes posiciones. Los péptidos entrecruzados fueron identificados y asignados a las distintas regiones del tRNA. Así, lisina 402 y 439 se encontraron unidas al Loop D y lis 465 al anticodón.

Se ha demostrado que el anticodón de los tRNA iniciadores es uno de los elementos de identidad más importantes para su reconocimiento. Por otra parte, lis 465 ha sido localizada en la estructura tridimensional de un fragmento monomérico activo de MetRS. Experimentos posteriores de mutagenesis dirigida en distintos aminoácidos de esta región de MetRS han permitido establecer trp 461 cumple un papel importante en la unión del tRNA interaccionando con la citosina 34 del anticodón.

Estos resultados muestran la validez del procedimiento de entrecruzamiento utilizado ya que han permitido localizar en MetRS el sitio de unión del anticodón, elemento determinante en el reconocimiento de los tRNAs iniciadores.

MECANISMO DE LA DESPOLIMERIZACION DE MICROTUBULOS POR CALCIO. (Mechanism of microtubule depolymerization by calcium). Monasterio, O. y Soto, C. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Tubulina, un heterodímero de peso molecular 110.000 autoensambla formando microtúbulos. La estructura del polímero depende de la naturaleza del metal presente en el medio y de GTP. El calcio despolimeriza los microtúbulos e inhibe la polimerización de tubulina.

Se ha demostrado que la despolimerización de los microtúbulos inducida por calcio, se inicia por sus extremos. Se sabe que en el microtúbulo los extremos contendrían tubulina GTP para estabilizar el polímero. Nuestro modelo para explicar la despolimerización del microtúbulo y la inhibición de la polimerización se basa en los dos hechos anteriores y postula que la hidrólisis de GTP inducida por calcio, tanto en la tubulina libre como en los extremos del microtúbulo, desfavorecía la estabilidad del polímero. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis pues calcio estimuló la actividad GTPasica de la tubulina de cerebro de pollo en 2,56 veces y fue proporcional a la concentración del metal entre 0,2 y 4,0 mM. La concentración necesaria para inhibir la polimerización y desestabilizar los microtúbulos cae en este intervalo de concentraciones. La titulación de tubulina con ^{45}Ca mostró una conducta cooperativa con dos sitios de alta afinidad y varios (30) de baja afinidad. Gadolinio un lantánido paramagnético mostró una conducta similar a la de calcio. A concentraciones no saturantes de calcio, el lantánido a bajas concentraciones produjo estimulación de la unión de calcio y a mayores concentraciones produjo inhibición. Otros lantánidos como terbio y europio indujeron polimerización y no estimularon la actividad GTPasica. Concluimos que la hidrólisis de GTP podría estar relacionada con la inhibición y la despolimerización de microtúbulos.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1133-89.

MODELAJE DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE PROTEINAS. (Modeling of the tertiary structure of proteins.) Cid, H. Laboratorio de Biofísica Molecular, Depto. de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

La determinación de la estructura terciaria de una proteína significa, aún con suerte, varios años de trabajo. En cambio, los métodos actuales de secuenciación de ADN han permitido conocer en corto tiempo la secuencia de varios miles de proteínas. Esta realidad, unida a los requerimientos de la ingeniería genética hacen necesario impulsar nuevos métodos que permitan determinar directamente la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia.

Un camino posible está en la comparación de secuencias, estructuras secundarias y estructuras terciarias ya determinadas, para establecer "patrones estructurales", que permitan modelar, por zonas, la estructura problema. El número creciente de estructuras terciarias determinadas ha permitido establecer que existen patrones estructurales que se repiten aún en familias de proteínas aparentemente no relacionadas, seguramente por constituir estructuras energéticamente muy estables, susceptibles de ser adaptadas a funciones diversas.

Un sistema de modelaje de la estructura terciaria de proteínas debe incluir al menos los siguientes pasos:

- Establecer los patrones conservativos.
- Alineación con estas secuencias de las secuencias correspondientes de la proteína problema.
- Búsqueda de secuencias para modelar las zonas no conservativas, o modelaje directo de dichas zonas utilizando minimización de energías.
- Comprobación del modelo propuesto.

Se muestra los resultados de una versión simple de este sistema de modelaje aplicado a la familia de las β -lactamasas.

Proyecto 20.31.34, D.I.U. de Concepción
Proyecto 89/87 FONDECYT

SIMULACIONES, POR PERTURBACION DE ENERGIA LIBRE, DE LA UNION DE CATIONES A VALINOMICINA. (Free energy perturbation simulations of cation binding to Valinomycin). Alvarez, O., Agvist, J. y Eisenman, G. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago Chile. Departamento de Biología Molecular, Centro Biomédico de Uppsala, Uppsala, Suecia. Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, U.C.L.A. Los Angeles, California, E.E.U.U.

Un problema central de la biofísica de los canales iónicos y transportadores de iones en membranas es evaluar las interacciones entre los iones y las proteínas, porque determinan su selectividad y rapidez de transporte. Los avances recientes en el campo de la computación, que han permitido la creación de super-computadores de laboratorio, y el progreso en el desarrollo de algoritmos computacionales adecuados para la química de las proteínas, ofrecen la oportunidad de poder deducir en detalle las propiedades de los canales iónicos de estructura tridimensional conocida. Como un paso hacia aumentar la confiabilidad de las evaluaciones teóricas de las interacciones ion-proteína calcularemos las energías de unión de iones de metales alcalinos a Valinomina, que es un depséptido cíclico que se comporta como transportador de iones. Escogimos la Valinomina porque forma complejos que contienen un solo ion, unido por medio de grupos carbonilos, de estructura tridimensional conocida. En estos complejos el ion queda encerrado de tal manera que la forma, tamaño y distribución de cargas de todos los complejos es virtualmente independiente del tipo de ion. Esta propiedad implica que la selectividad de la Valinomina es independiente del solvente y nos permite usar cálculos *in vacuo*. Usamos el método de perturbación de energía libre que consiste en simular la transformación de un ion en otro, mediante un cambio de los parámetros que lo describen, en pasos muy chicos, registrando simultáneamente los pequeños cambios de la energía libre del sistema. La selectividad la calculamos del total de la energía implicada en el camino recorrido para cambiar un ion en otro, menos la diferencia de energía libre de hidratación de ambos iones. El éxito de estos cálculos, además de afirmar la validez de los métodos usados, nos permitió refinar la descripción teórica de los grupos carbonilos de los ésteres.

Este trabajo fué financiado en Chile por el FONDECYT, proyecto 1112-1989, en Suecia por el NFR, y en los Estados Unidos por el USPHS, proyecto GM-24749.

SIMPOSIO: "TRANSDUCCION EN SISTEMAS BIOLÓGICOS"

Presidente: Dr. Gustavo Brum

Coordinador: Dr. Ricardo Bull

EL CUERPO CAROTÍDEO COMO SENSOR POLIMODAL. (The carotid body as a polymodal sensor). Zapata, P. Laboratorio de Neurobiología, Universidad Católica de Chile.

El aparato quimiorreceptor del cuerpo carotídeo está constituido por células glómicas (receptoras) y terminaciones sensoriales de neuronas aferentes primarias. Existen numerosos estudios sobre los mecanismos biofísicos y bioquímicos que podrían participar en la transducción del estímulo químico a nivel de la célula glómica y en la transferencia de señales desde dicha célula a la terminación sensorial.

También existe información abundante sobre la función quimiosensorial del cuerpo carotídeo, en cuanto a detección de cambios en los niveles fisiológicos de pO_2 , pCO_2 y pH de la sangre. Sin embargo, estudios realizados con cuerpos carotídeos *in vitro* indican que este órgano podría detectar también cambios de la osmolaridad (Gallego et al., 1979), del flujo (Alcayaga et al., 1988, 1990) y de la temperatura (Gallego et al., 1979; Eyzaguirre & Zapata, 1984; Zapata et al., no publicados) del medio de perfusión. La información sensorial sobre estos estímulos físicos es conducida por las mismas fibras cuya frecuencia de descarga es alterada por los estímulos químicos "tradicionales".

Se han realizado también registros de actividad sensorial o de reflejos ventilatorios que muestran que los cuerpos carotídeos *in situ* responden a cambios de la osmolaridad plasmática (Gallego & Belmonte, 1979), a cambios límites del flujo sanguíneo (Iturriaga et al., 1986, 1988) y a cambios discretos de la temperatura local (McQueen & Eyzaguirre, 1974) y corporal (Fadic et al., 1989; Loyola et al., 1990).

Se concluye que el mismo aparato y mecanismo quimiorreceptor del cuerpo carotídeo sirve al menos funciones polimodales de quimiosensor, osmosensor, reosensor y termosensor.

(Financiamiento FONDECYT, DIUC y Fund. Gildemeister).

ESTUDIOS DE LA TRANSDUCCION QUIMICA Y MODULACION DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA EN EL EPITELIO OLFATORIO. Bacigalupo, J., Delgado, R., Monasterio, O., Montecinos, H., Morales, B., Schmidt, P. y Labarca, P. Centro de Estudios Científicos de Santiago, Casilla 16443, Correo 9, Chile y Depto. de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Los mecanismos de transducción química y de modulación de la actividad eléctrica en el epitelio olfatorio no han sido resueltos. La evidencia experimental sugiere que los primeros eventos en la transducción olfatoria involucran la modulación por agentes odorantes de los niveles intracelulares de AMPc e IP3. Existe, además, evidencia indirecta de que algunos odorantes podrían modular directamente la actividad de canales iónicos en la membrana de los cilios olfatorios.

Nuestro grupo de investigación está abocado al estudio de la transducción química en el olfato usando aproximaciones bioquímicas, biofísicas y electrofisiológicas. Los estudios bioquímicos se realizan en una preparación de cilios purificados del epitelio olfatorio de anfibios y se concentran en investigar la modulación de la actividad adenilato ciclasa por odorantes. Esta preparación es usada también en el trabajo de reconstitución de los canales iónicos presentes en cilios olfatorios en membranas lipídicas planas. Los estudios electrofisiológicos están dirigidos a investigar la modulación de la actividad eléctrica por odorantes en neuronas olfatorias aisladas; y los mecanismos de conductancia voltaje-dependientes que regulan la actividad eléctrica en la célula olfatoria.

FONDECYT 1167-88, N.I.H. GM35981, FONDECYT 1133-89, FONDECYT 1118-90.

EL GMP CICLICO COMO MENSAJERO EXCITATORIO DE LA TRANSDUCCION EN EL FOTORRECEPTOR DE UN INVERTEBRADO. (Cyclic GMP as the excitatory messenger of transduction in an invertebrate photoreceptor). Bacigalupo, J., Johnson, E.C. y Lisman, J.E. Depto. Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile, Physiology Dept., Marshall University Sch. of Medicine, Huntington, WV and Biology Dept., Brandeis University, Waltham, MA, USA.

El mecanismo de la fototransducción consta de varios pasos, los que median entre la fotoactivación de la rodopsina y el cambio de conductancia de la membrana del fotorreceptor. Mensajeros secundarios están implicados en este mecanismo. En invertebrados la naturaleza del mensajero secundario que participa en este proceso abriendo los canales dependientes de luz no había sido establecida, aunque estudios previos sugirieron que éste podría ser el GMPc. Para resolver este problema, nosotros estudiamos parches de membrana aislados del fotorreceptor ventral de *Limulus* usando la técnica de patch clamp. Previo al aislamiento, comprobamos que la membrana contuviera canales dependientes de luz y no contuviera canales voltaje-dependientes. Los parches de membrana estaban orientados con el lado interno hacia afuera. Cuando expusimos el lado interno del parche de membrana aislado a solución interna (SI: 300 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM Hepes, pH 7.0, 5 mM BAPTA y CaCl₂, pCA 7.0) la actividad de canales era extremadamente baja. Sin embargo, si se perfundía con SI conteniendo concentraciones μM de GMPc, la actividad de canales iónicos aumentaba considerablemente. El efecto del GMPc era reversible y dependiente de la concentración de GMPc. Una comparación de los canales dependientes de GMPc con los canales dependientes de luz que se registran en la célula intacta nos permitieron concluir que ambos corresponden al mismo canal iónico y que el GMPc es el mensajero que participa en el mecanismo de fototransducción produciendo la apertura de los canales. Como SI no contenía ATP, la acción del GMPc sobre los canales no es mediada por fosforilación.

CORRIENTE DE CALCIO, MOVIMIENTO DE CARGAS Y LIBERACION DE CALCIO EN EL ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION. (Calcium current, charge movement and calcium release in excitation-contraction coupling). Brum, G. Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina, Montevideo, URUGUAY.

En el músculo esquelético la liberación de calcio por el retículo sarcoplasmático está controlada por estructuras sensibles al voltaje ubicadas a nivel del túbulo T. Se ha propuesto que estos sensores de voltaje son los receptores de alta afinidad de dihidropiridinas (DHP) que se aíslan del músculo. Esta hipótesis sugiere que el sensor de voltaje presente propiedades similares al canal de calcio. Mediante la técnica de la fibra cortada hemos estudiado el efecto de las DHPs, el D600 y la sustitución del calcio extracelular por otros cationes sobre el movimiento de cargas y la liberación de calcio. Los resultados obtenidos muestran que existe un paralelismo entre los efectos sobre el movimiento de cargas y la liberación de calcio de estas maniobras experimentales. Estas observaciones se interpretarán en base a un modelo de cuatro estados del sensor de voltaje del acoplamiento excitación-contracción.

INOSITOL TRISFOSFATO: METABOLISMO Y RECEPTORES EN MEMBRANAS AISLADAS DE MUSCULO ESQUELETICO DE ANFIBIO. (Inositol triphosphate: metabolism and receptors in membranes isolated from amphibian skeletal muscle). Hidalgo, C., Carrasco, M. A., Sánchez, X. y Rojas, C. Centro de Estudios Científicos de Santiago y Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Se ha estudiado el metabolismo de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) en membranas de tubulos transversales (T-T) y retículo sarcoplasmático (RS) aisladas de músculo esquelético de anfibio, encontrando que la quinasa que fosforila fosfatidilinositol (PI) a fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP) se encuentra en ambas membranas, en tanto que la que fosforila PIP a fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato (PIP2), el precursor directo de IP3, está presente sólo en las membranas de T-T. Se encuentran también asociadas preferentemente con los T-T las enzimas que hidrolizan IP3 a inositol bisfosfato, inositol monofosfato e inositol. Tanto la cantidad de PIP2 formado como la velocidad de hidrólisis de IP3 son compatibles con los requerimientos del modelo que postula al IP3 como mensajero químico responsable del acoplamiento excitación-contracción en músculo esquelético.

Existen canales de calcio sensibles a IP3 en membranas de RS, con propiedades semejantes a los canales que corresponden al receptor de ryanodina. Se ha investigado, por lo tanto, la presencia de receptores a IP3 en membranas de RS, encontrando que existe unión específica (1-3 pmoles/mg de proteína) pero con una afinidad considerablemente menor que la descrita en otros sistemas celulares ($K_d \geq 100$ nM). Se aisló el receptor de ryanodina de las membranas de RS y se encontró que los receptores a IP3 no siempre copurifican con los receptores de ryanodina, lo que sugiere que distintas moléculas poseen actividad de canal de calcio con propiedades similares.

Se discuten estos resultados en términos del posible papel del IP3 en el acoplamiento en músculo esquelético. Financiado por FONDECYT 972-88, DTI, NIH GM35981.

DEPENDENCIA IONICA DE LA REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR EN LA PORCIÓN DELGADA ASCENDENTE DEL ASA DE HENLE.

(Ionic dependence of cell volume regulation by the thin ascending limb of Henle's loop). Onuchic, L.F.*, Arenstein, I.R. y Lopes, A.G. Departamento de Fisiología e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil. *Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo - Brasil.

Thin ascending limb cells from Henle's loop were studied with optical and video techniques to evaluate cell volume regulation in response to anisoosmotic media and its ionic dependence. Cell volume regulation was observed when these cells were exposed to hypoosmotic solutions. Under hyperosmotic conditions only an osmometric response was found, with no volume regulatory increase (VRI). The removal of Cl^- or HCO_3^- abolished the volume regulatory decrease (VRD) normally observed during exposure to hypoosmotic solutions. Re-addition of these ions did not elicit the VRD response. The removal of K^+ from hypoosmotic solutions abolished VRD but its re-introduction restored the volume regulatory response. In the absence of Na^+ , a partial inhibition of VRD was found; re-addition of Na^+ completely restored the regulatory response. These indicate that cells from the thin ascending limb of Henle's loop regulate their volume under hypoosmotic conditions, and that this process is dependent upon Cl^- , HCO_3^- , Na^+ and K^+ , with different patterns of response being observed upon addition or deletion of these ions.

SIMPOSIO: "FUNCION Y MODULACION DE CANALES IONICOS"

Presidente: Dr. Francisco Barrantes
Coordinador: Dr. Pedro Labarca

MODULACION DE CANALES IONICOS EN *Drosophila* Y MUTANTES NEUROLOGICOS. (Modulation of ion channels in *Drosophila* and neurological mutants) Ramón Latorre, Ricardo Delgado y Pedro Labarca. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Centro de Estudios Científicos de Santiago, Santiago, Chile.

Con el fin de elucidar el papel de los canales iónicos en la actividad concertada de las células excitables es de gran interés estudiar aquellos que son regulados por segundos mensajeros. Tanto las neuronas como los músculos de la mosca *Drosophila melanogaster* nos proveen de excelentes preparaciones en donde la modulación de la actividad eléctrica puede investigarse a nivel de canal único. Más aún, se han identificado mutantes cuya excitabilidad celular está alterada y en algunos casos se ha demostrado que la alteración genética se restringe a una sola clase de canales iónicos. El mutante *dunce* es un mutante que muestra niveles bajos de aprendizaje asociativo y lo que aprende lo olvida con mucho mayor rapidez que la cepa silvestre. Este mutante carece de una forma de la fosfodiesterasa II que conduce a una acumulación del AMPc intracelular.

Registros de la corriente que pasa a través de canales únicos en músculos longitudinales-ventrolaterales de la larva de *Drosophila*, mediante la técnica de patch clamp, revelan la presencia de un canal selectivo al K^+ y que es activado de manera directa y reversible por el AMPc. Las curvas de dosis-respuesta revela que la constante de disociación aparente entre el canal y el AMPc es de $50.8 \mu M$ y que el número de Hill es de 2.9. Esto sugiere que a lo menos se necesitan tres moléculas de AMPc para la activación completa del canal. El canal es específicamente activado por el AMPc ya que su comportamiento no es modificado por una serie de otras moléculas como AMP, GMPc, ATP, IP_3 y Ca^{2+} . Estos mismos canales se han detectado en una serie de mutantes *dunce* y en todos ellos muestran una probabilidad de apertura mucho mayor que en la cepa silvestre. Este hallazgo sugiere que en los mutantes la conductancia al potasio de la membrana del músculo es mayor que en la cepa silvestre y por lo tanto sus parámetros de excitabilidad diferentes.

Financiado por FONDECYT 1167-88, 451-88 y NIH GM-35981

MUSCARINIC REGULATION OF NEURONAL PROPERTIES IN RAT CEREBRAL CORTEX. Andrade, R. Dept. of Pharmacology, St. Louis University School of Medicine, St. Louis, MO 63104, U.S.A.

The cerebral cortex receives a dense cholinergic innervation. To better understand the actions of acetylcholine in this region and its underlying ionic and molecular mechanisms, I have used current and single electrode voltage clamp techniques in *in vitro* brain slices.

Bath administration of the cholinergic agonist carbachol elicited a dose-dependent depolarization of the cell membrane. This depolarization was small and generally failed to bring the neurons to spike threshold. In addition to these effects, carbachol also reduced the calcium-activated potassium current present in these cells and elicited its replacement by a slow calcium-dependent inward aftercurrent. When carbachol administration was paired to cell stimulation either in the form of depolarizing current pulses or synaptic excitation, the ability of carbachol to depolarize these cells was markedly enhanced. This enhancement resulted from the cumulative activation of the slow inward aftercurrent following each stimulus, a process that resulted in the appearance of an activity-dependent depolarization which summed to that elicited directly by carbachol. All of these effects were blocked by atropine and pirenzepine indicating that they were mediated by muscarinic receptors. Thus, by simultaneously acting on at least 2 distinct membrane currents, muscarinic receptors in the prefrontal cortex can increase cell excitability in a manner that is conditional upon the simultaneous presence of a separate excitatory input onto these cells.

MECANISMO INTRACELULAR DE UNA I_K LENTA INDUCIDA POR LA SEROTONINA EN UNA NEURONA IDENTIFICADA DE CARACOL. Gerschenfeld, H.M. y Paupardin-Tritsch, D. Laboratoire de Neurobiologie, Ecole Normale Supérieure, 75005 Paris, Francia.

En la neurona F2 del caracol *Helix aspersa*, la inyección ionotórfica de serotonina (5-HT, 500 ms) provoca una I_K lenta (de varios minutos de duración) insensible a los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ y que presenta una marcada rectificación de salida. Esta I_K lenta inducida por la 5-HT es diferente de otras tres respuestas a la 5-HT dependientes del K^+ en neuronas de Moluscos (una I_K "rápida", una I_K asociada al cierre de canales S-K+ y otra I_K lenta que presenta una rectificación de entrada). Como la inyección intracelular de AMPc en la neurona F2 induce también una I_K lenta, se dosificó la adenilciclase en neuronas F2 aisladas con un método de microensayo bioquímico. La serotonina y la forskolina estimulan la actividad de esta enzima. La aplicación de forskolina induce también una I_K lenta en la neurona F2 mientras que la inhibición de la fosfodiesterasa por la isobutilmetixantina (IBMX) además de producir una I_K lenta en la neurona F2, causa una notable potenciación de la respuesta a la 5-HT. Finalmente, la inyección intracelular de un péptido sintético que inhibe la proteína quinasa dependiente del AMPc (PKA) bloquea totalmente la I_K inducida por la 5-HT. En conclusión, la I_K lenta inducida por la 5-HT en la neurona F2 resulta de un aumento del AMPc intracelular que estimula la PKA quien, a su vez, probablemente fosforila una población de canales de K^+ o una o más proteína/s asociada/s a estos canales iónicos.

REGULACION DE CANALES DE K^+ EN EL MUSCULO LISO. Stefani, E., y Toro de Stefani, L. Dept. Molecular Physiology & Biophysics. Baylor College of Medicine. Houston, TX 77030, U.S.A.

Los canales de K^+ activados por Ca^{2+} del músculo liso están regulados (positiva o negativamente) por una gran variedad de metabolitos. Entre ellos se encuentran: neurotransmisores, hormonas, lípidos y nucleótidos (acetilcolina, histamina, sustancia P, angiotensina II, factor cardíaco natriurético, adenosina, GMP, cGMP, GDP, GTP, colesterol, ácido araquidónico y otros ácidos grasos). En años recientes se ha demostrado que los distintos metabolitos modulan la actividad de estos canales a través de: 1) un cambio en la afinidad del canal de K^+ activado por Ca^{2+} ($K_{1/2}$ se modifica); 2) un corrimiento paralelo de la curva de activación en el eje de voltaje; o 3) modificar la pendiente de la curva (valencia efectiva) de dependencia al voltaje. El corrimiento paralelo de la curva de dependencia al voltaje puede ser una consecuencia directa del cambio en la afinidad por Ca^{2+} . En cuanto a los pasos mecánicos involucrados en la modulación de estos canales, estudios recientes han demostrado o sugerido que algunas interacciones pueden ser directas con el canal y que otras pueden ser mediadas por proteína G, segundos mensajeros o fosforilación. Por ejemplo, datos de nuestro laboratorio han demostrado que la angiotensina II inhibe a los canales de K^+ activados por Ca^{2+} provenientes de músculo liso de coronaria, posiblemente de manera directa. Por otra parte los canales de K^+ activados por Ca^{2+} provenientes de miometrio son activados por agonistas β -adrenérgicos a través de una proteína G (α_1). Esta proteína GTP-dependiente parece actuar de manera directa sobre el canal. En conjunto estos datos resaltan la posibilidad que los canales de K^+ activados por Ca^{2+} puedan ser activados o inhibidos por metabolitos sin un cambio en la concentración intracelular de Ca^{2+} .

MODULACION POR Ca^{2+} Y Mg^{2+} DE LA ACTIVACION DEL CANAL DE CALCIO DE RETICULO SARCOPLASMATICO (RS) SENSIBLE A IP_3 . B. Suárez, C. Alcayaga y J. Vergara*. Depto. Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, U. de Chile, Centro de Estudios Científicos de Santiago y *Dept. of Physiology, UCLA School of Medicine.

El canal de calcio de RS sensible a IP_3 incorporado en bicapas presenta las siguientes propiedades: a) Es activado por IP_3 (0.5-20 μM) a una $[Ca^{2+}]_i$ libre en la cara citoplasmática similar a la del músculo en reposo (100 nM), y no a concentraciones menores; b) La activación por IP_3 es modulada por la concentración de Ca^{2+} siendo óptima entre pCa 7.0 y 6.0, decreciendo a menores pCa. c) En presencia de Mg^{2+} (2 mM) la activación del canal por IP_3 se produce a menores concentraciones. d) La activación por ATP (0.1-2 mM) es también dependiente de Ca^{2+} , no produciéndose activación a pCa 7.0. Estos resultados sugieren que el canal sensible a IP_3 se encuentra cerrado en condiciones fisiológicas de reposo.

Nuestras observaciones sugieren un mecanismo de retroalimentación negativa de inhibición por Ca^{2+} de la activación de canales de Ca^{2+} mediada por agonistas: el rápido aumento en la concentración local de Ca^{2+} en el espacio triádico como consecuencia de la activación del canal disminuiría la afinidad del IP_3 por su sitio de unión, causando el cierre del canal. Además, degradación de IP_3 y el bloqueo del canal por alto Ca^{2+} pueden contribuir a interrumpir la liberación de Ca^{2+} .

Las propiedades farmacológicas de canales únicos, complementarias con la información proveniente de estudios de transientes de calcio con métodos de imaging permiten definir un modelo semiespérico de liberación de Ca^{2+} en músculo esquelético, que puede dar cuenta de la magnitud y la cinética del transiente de calcio en células musculares.

Financiado por Proyectos Fondecyt # 902, # 972 y Grants NIH GM-35981.

SIMPOSIO: "PROCESOS DE TRANSPORTE EN MEMBRANAS BIOLÓGICAS"

Presidente: Dr. Alcides Rega
Coordinador: Dr. Tulio Núñez

INTERACCIONES DE Mg CON LA Na,K-ATPasa (Mg interactions with Na,K-ATPase), Marta Campos, Instituto M. y M. Fe-reyra, Córdoba, Argentina.

Mg actúa como activador esencial de la Na,K-ATPasa. En este trabajo se estudiaron la unión de Mn-54 a la enzima en ausencia y presencia de fosforilación por ATP (a 0°C) y los efectos de Mg sobre la fosforilación por ATP y el sustrato alternativo AcP en estado pre-estacionario (a 20°C). La existencia de una unión estable de Mn a la enzima dependió de su fosforilación por ATP; esta unión existió tanto como Mn.E1P o Mn.E2P y se perdió con la defosforilación. La Mn.EP vs. MnCl₂ siguió una función Michaeliana con un Km de 0.76 μ M, y la relación Mn/Pi fué de 1:1. En el análisis de la cinética de fosforilación se consideró un sistema simplificado donde EP vs. t es una reacción irreversible de pseudo primer orden. En presencia de 10 μ M ATP, el valor de la constante de velocidad (kf) vs Mg⁺⁺ se ajustó a una función Michaeliana con Km de 20 μ M y k_{max} de 0.089 ms⁻¹; para MgATP el Km fué de 2.3 μ M. En presencia de Mg⁺⁺ = 1 mM y de relación MgATP / ATP = 10, kf vs. MgATP o ATP siguió una función saturable con K_{0.5} de 5 μ M y 0.5 μ M respectivamente. Con AcP (2.5 mM), kf vs. Mg⁺⁺ obedeció igual cinética pero con Km = 2.3 mM y k_{max} de 0.004 ms⁻¹; el Km(MgAcP) fué de 1.6 mM. La unión de 54-Mn a la enzima (en equilibrio y a 20°C) reveló una relación lineal hasta MnCl₂ de 1.0 mM. Esta relación fué idéntica en enzima nativa o denaturalizada en presencia de Na, K y Na⁺ADP. Aparte de confirmar la complejidad de la interacción enzima-ATP-Mg, estos resultados sugieren que los efectos de Mg⁺⁺ con alta afinidad implican la formación del complejo MgATP.

AMILORIDE ANALOGS IN H⁺ION TRANSPORT IN CORTICAL DISTAL TUBULE OF THE RAT. M.J. Lopes, E.J. Cragoe, Jr. and G. Malnic.

Dept. of Physiology and Biophysics, Inst. Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil.

In earlier studies we have shown that the cortical distal tubule secretes H⁺ions and that both n-ethyl maleimide and amiloride inhibit this process. However, both these drugs affect also transepithelial PD, so that their primary effect is difficult to define. In the present work we used two amiloride analogs, benzamil (B), a specific Na⁺ channel blocker, and hexamethylene amiloride (HMA), a blocker of Na/H exchange, during stationary microperfusion experiments. Adding 10⁻⁵M B to the perfusion solution (25mM NaHCO₃, 80 NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄, raffinose to isotonicity), there were no significant differences in stationary pH although PD fell from -6.8 \pm 4.38 to -2.0 \pm 1.35 mV in early distal tubule (ED) and from -47.3 \pm 2.87 to -6.2 \pm 3.17 mV in late distal segments (LD). Net bicarbonate reabsorption was not affected significantly in both tubule segments. When 10⁻⁴M HMA was used, stationary pH was not significantly affected (P < 0.05) in both ED and LD, but acidification t/2 increased from 7.8 \pm 1.43 (n=8) to 23.9 \pm 3.21 (16)s in ED, and from 10.7 \pm 1.48 (6) to 17.4 \pm 2.24 (12)s in LD, causing in both segments a significant fall in net bicarbonate reabsorption (0.88 \pm 0.17 (8) nmol/cm². s to 0.33 \pm 0.07 (16) in ED, 0.81 \pm 0.12 (6) to 0.40 \pm 0.08 (12) in LD). PD was not significantly altered both in ED and LD. In conclusion, we obtained evidence that Na/H exchange mediates ED and LD bicarbonate reabsorption. However, no evidence favoring electrogenic H-ion secretion in these segments was obtained.

EL USO DE LA PRESION HIDROSTATICA PARA ESTUDIAR CAMBIOS DE CONFORMACION DE LA (Na,K)-ATPasa (The use of hydrostatic pressure to study conformational changes of (Na,K)-ATPase). Fortes, P.A.G., Department of Biology, C-016, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093-0116, E.U.A.

El transporte activo de Na y K se efectúa por una serie de cambios de conformación de la (Na,K)-ATPasa inducidos por la asociación y disociación de los sustratos: Na, K y ATP, y por la fosforilación y defosforilación de la enzima. En esta presentación se discutirán experimentos en los que se utiliza la presión hidrostática para estudiar: cambios de volumen asociados a los cambios de conformación; la relación entre la fluidez de la membrana y la actividad enzimática, y posibles interacciones entre las subunidades de la (Na,K)-ATPasa. Las respuestas catalíticas a altas presiones (1 bar-1 kbar) son paradójicas. Dependiendo cuales iones están presentes, los aumentos de presión estimulan o inhiben la actividad enzimática. Los resultados sugieren que ciertas formas de la enzima que tienen iones asociados u ocultos se acumulan al aumentar la presión porque ocupan un volumen menor. (Subvencionado por ONRN-00014-88-K-0324)

TRANSPORTE DE HIERRO: UN PROCESO CELULAR DE ETAPAS MULTIPLES. (Iron Transport: a Multistep Cellular Process). Núñez, M.T., Gaete, V., Escobar, A., Ahumada, A. y Lanau, X. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

En mamíferos y otros vertebrados el hierro en su estado de oxidación 3+ es transportado desde lugares de absorción y almacenamiento a lugares de utilización por la proteína plasmática transferrina. La unión de Fe³⁺ a transferrina (K_{asoc.} = 10²⁰) es termodinámicamente reversible, siendo la reacción de unión cinéticamente favorable. La disociación de hierro y transferrina es sin embargo lenta, por lo que han evolucionado mecanismos celulares especiales para disociar el metal a velocidades suficientes para satisfacer los requerimientos celulares.

En condiciones normales, las células obtienen su hierro mediante el proceso de endocitosis mediada por el receptor de la ferrotferrina. En la vesícula endocítica ocurre una serie de eventos secuenciales que terminan con el paso hacia el citosol del hierro inicialmente unido a transferrina. Entre los eventos estudiados en nuestro laboratorio se encuentran: 1.- La acidificación del lumen de la vesícula endocítica mediada por una H⁺-ATPasa electrogénica y por sistemas de disipación de gradiente eléctrica; 2.- La disociación, o pérdida de afinidad, de Fe³⁺ y transferrina mediada por la acidificación. 3.- La reducción de Fe³⁺ a Fe²⁺, mediada por sistemas de transporte asociados a membrana, y 4.- El transporte membranoso del Fe²⁺ desde el lado luminal al lado citoplasmático.

En este trabajo se discutirá la evidencia experimental que fundamenta un modelo de incorporación celular de hierro en base es la secuencia de eventos mencionada anteriormente.

Financiado por Proyectos FONDECYT 1003-88 y D.T.I. Universidad de Chile B-2200.

TRANSPORTE Y DISTRIBUCION DE Zn(II) EN ESPERMATIDAS DE RATA. (Zn(II) transport and distribution in rat spermatids).

J.G. Reyes, M.P. Arrate, M. Santander y D.J. Benos. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso; Depto. Fisiología y Biofísica, Fac. Medicina, U. de Chile y Dept. Physiology and Biophysics, University of Alabama at Birmingham.

En espermatozoa, Zn(II) está relacionado con regulación de condensación de cromatina y expresión génica, e inhibición del metabolismo celular. Estos roles intracelulares de Zn(II) permiten postular la existencia de sistemas de transporte que internalicen este ión. Utilizando los precursores inmediatos de la espermatozoa, las espermatidas, hemos estudiado el transporte y distribución de Zn(II) en estas células. Utilizando 65-Zn(II) como trazador, nuestros resultados indican: 1) a 34°C aproximadamente, 20-30% del Zn(II) intercambiable está asociado con un comportamiento extracelular. 2) El influjo de Zn(II) a 34°C se puede estimar en 1.5-2.0 nmoles/min. mg proteína. 3) El influjo de Zn(II) es dependiente de temperatura, el Q10 del influjo es en promedio 3.6 entre 4 y 34°C. 4) 80% Zn(II) celular está unido o asociado con organelos celulares. 5) La distribución de Zn(II) intracelular es modulada por el metabolismo energético celular.

Financiado por Gran GAPS 8905 y 9016, Fundación Rockefeller; Proyecto 90-0142, Fondecyt y Proyecto DGI-UCV 125.745-89.

INTERACCION DE ANESTESICOS CON LOS TRANSPORTADORES DE COLINA Y GLUCOSA DE ERITROCITOS HUMANOS. (Interaction of anesthetics with the choline and glucose carriers of human erythrocytes). Davis, R. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Existen proposiciones alternativas respecto al mecanismo mediante el cual los anestésicos inhiben la función de las proteínas de membrana. Una hipótesis propone que éstos ejercerían su efecto indirectamente a través de una perturbación de la matriz lipídica, mientras que otra postula que su acción inhibitoria resultaría de su unión directa a las proteínas afectadas. Con el propósito de investigar este problema, hemos caracterizado cinéticamente la inhibición de los transportadores de colina y glucosa del eritrocito humano por esta clase de drogas. Ambos transportadores son inhibidos por anestésicos de estructuras diversas (alcoholes alifáticos y anestésicos locales) en el mismo rango de concentración en que éstos ejercen su efecto farmacológico. La potencia aumenta al aumentar la liposolubilidad, pero los mecanismos de inhibición difieren dependiendo de la droga y el transportador. El transportador de colina es inhibido nocompetitivamente por alcoholes alifáticos (C₂-C₁₀) y la inhibición resulta de la unión de al menos dos moléculas de inhibidor. El efecto es simétrico, es decir, se ejerce sobre ambos estados conformacionales (externo e interno) por igual. Los alcoholes interfieren con la unión de inhibidores específicos del sistema como el decametónio. Anestésicos locales, en cambio, inhiben competitivamente y se unen de preferencia a la forma externa. La estequiometría es 1:1 y la forma cargada del anestésico es la especie activa. En el caso del transportador de glucosa, los alcoholes interfieren con la unión del sustrato y de inhibidores específicos del sistema (citaloalaina B y floretina) y la interacción requiere de más de una molécula de alcohol. Estas observaciones sugieren una acción directa de las drogas sobre estos transportadores. Los anestésicos se unieron a regiones hidrofóbicas en las proteínas, explicándose así la correlación simple entre potencia y liposolubilidad, pero dependiendo de la estructura de cada transportador la inhibición se expresaría de distintas formas. (Financiado con Proyectos DTI B2674, FONDECYT 156/89).

SIMPOSIO: "BASES MOLECULARES DE PATOLOGIAS HUMANAS"

Presidente: Dr. Roque Venosa
Coordinador: Dra. María Isabel Behrens

LAS INMUNOGLOBULINAS G (IgG) DE PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTROFICA (ELA) AFECTAN LOS CANALES DE CA SENSIBLES A DIHIDROPIDRIDINA DE MUSCULO ESQUELETICO. (IgG immunoglobulins of patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ELA) affect the dihydropyridine-sensitive Ca channels of skeletal muscle). Delbono O., García J., Appel S. H., Stefani E. Dept. of Molecular Physiology and Biophysics and Dept. of Neurology, Baylor College of Medicine, Houston Texas.

La ELA es una enfermedad de las motoneuronas superiores e inferiores de probable etiología inmunológica. Estudiamos la corriente de Ca (ICa) mediante voltage-clamp, empleando la técnica de doble gap de vaselina en fibras aisladas del músculo extensor digitorum longus de la rata. La corriente pico en condiciones controles fue de (media ± ES) 4.7 ± 0.29 A/F (a 0 mV) y luego de 40 min de incubación en IgG de pacientes con ELA fue de: 2.52 ± 0.04, desplazándose la curva I-V, 10 mV hacia Vm más positivos. La relación ICa pico en IgG test/control fue: normales: 0.97 ± 0.013, ELA: 0.75 ± 0.014, Miastenia Gravis: 1.07 ± 0.097, Guillain Barré: 0.87 ± 0.04, Esclerosis Múltiple: 0.97 ± 0.21, Síndrome de Eaton-Lambert: 0.95 ± 0.11, Polineuritis Crónica Inflamatoria Recurrente: 0.98 ± 0.13.

El movimiento de cargas (MC) se redujo claramente en presencia de la Ig de ELA. Tanto el efecto sobre la ICa como sobre el MC no fue verificado cuando la preparación de IgG de ELA fue hervida o cuando fue adsorbida a tejido muscular en forma prolongada.

Los estudios cinéticos demostraron que las IgG actúan fundamentalmente sobre la ICa, modificando las constantes α y β de activación. La interacción de la IgG de ELA con Nifedipina fue del tipo de cooperativismo positivo con un coeficiente de Hill para ambas individualmente o en forma asociada de aproximadamente 1.

La afectación de: a) ICa, b) del MC, c) el efecto bloqueante voltaje dependiente de las IgG y d) la interacción con Nifedipina, sugieren fuertemente que las IgG de los pacientes con ELA interactúan específicamente con los canales de Ca sensibles a Nifedipina del sis-

MUSCULO HUMANO EN CULTIVO CONTINUO. UN MODELO PARA LA FISIOLOGIA Y FISIOPATOLOGIA MUSCULARES. (Human muscle in continuous culture. A model for muscle physiology and pathology). Jaimovich E. y Caviedes R. Depto. Fisiología y Biofísica Fac. Medicina, U. de Chile y C.E.C.S.

El uso de células en cultivo de músculo esquelético presenta ventajas evidentes para el estudio de fenómenos tales como la transducción de señales, canales iónicos, miogénesis y transporte. El disponer de líneas celulares de músculo esquelético normal y patológico, puede representar una fuente importante para el estudio de funciones musculares en diversas condiciones.

Hemos caracterizado una línea transformada de músculo esquelético humano normal que exhibe diversos marcadores propios de la célula muscular diferenciada entre ellos podemos destacar la inmunocitoquímica para mioglobina, miosina y desmina, presencia de creatina cinasa de tipo MM, receptores para alfa-bungarotoxina y dihidropiridinas, diversos canales iónicos medidos con "patch-clamp" y una serie de metabolitos del ciclo de los fosfatidil-inositoles e inositoles fosfatos.

Inductores de la diferenciación como la insulina-transferrina y el suero de caballo gatillan la fusión celular con la aparición de miotubos multinucleados y un aumento concomitante de los receptores de alfa-bungarotoxina.

La comparación con células obtenidas de pacientes con distrofia muscular Duchenne muestra diferencias en las poblaciones de receptores de dihidropiridinas (canales de calcio) y de alfa-bungarotoxina (canales nicotínicos de acetil colina).

Financiado por NIH-GM35981, Fondecyt-896 y MDA.

ALTERED GATING PROPERTIES OF THE SARCOLEMMA SODIUM CHANNELS PRODUCE THE HYPER-EXCITABILITY IN THE HUMAN MYOTONIAS. Rudel, R. Department of General Physiology, University of Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, D-7900 Ulm, Germany.

When Bryant discovered that the hyperexcitability in human myotonic muscle (New Developments in Electromyography, Karger 1973, p 451) was connected with a reduced chloride conductance, G_{Cl} , of the sarcolemma, the "low chloride conductance theory of myotonia" was soon accepted as the general mechanism for myotonia. However, voltage-clamp studies on excised myotonic muscles suggest for all human diseases with myotonia that the hyperexcitability may be caused by unphysiological gating of the sarcolemmal Na^+ channels, in some cases corroborated by reduced G_{Cl} . Reduced G_{Cl} was found in Becker-type recessive generalized myotonia (Rudel & al., Muscle Nerve 11: 202, 1988), but also the Na^+ channel activity is abnormal (Franke & al., Muscle Nerve, in press). In paramyotonia, G_{Cl} is normal and the inactivation of the Na^+ current is altered (Lehmann-Horn & al., Muscle Nerve 10: 633, 1987). The same is true for hyperkalemic periodic paralysis with myotonia (Lehmann-Horn & al., Muscle Nerve 10: 363, 1987) where the defect has been located on the α -subunit of the Na^+ channel gene (Fontaine & al., Science, in press). In myotonic dystrophy, a K^+ channel (Renaud & al., Nature 319: 678, 1986) and the Na^+ channel are abnormal (Franke & al., J. Physiol 425: 391, 1990). Also in Schwartz-Jampel syndrome (Lehmann-Horn & al., Muscle Nerve 13: 528, 1990) and Thomsen-type myotonia congenita (Iaizzo & al., J. Neuromusc Disorders, in press) the Na^+ currents are abnormal. Voltage-clamp studies on myoballs made from satellite cells from myotonia patients (Rudel et al., Muscle & Nerve 12: 281, 1989) indicated that in several hereditary myotonias more than one type of ion channel behaves abnormally, suggesting that the genetic defect does not always concern the gene of a particular channel.

CAMINOS HACIA EL ENTENDIMIENTO DE LAS BASES MOLECULARES DE LA MIOTONIA DISTROFICA (On the way to understanding the molecular bases of myotonic dystrophy). Vergara, C., Behrens M.I. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, U. de Chile, Centro de Estudios Científicos de Santiago.

Miotonía es la dificultad para relajar la musculatura esquelética luego de una contracción voluntaria o inducida. Esta contracción mantenida se debe a una actividad eléctrica repetitiva en respuesta a un estímulo único. Existen varias patologías en las cuales se observa miotonía, una de ellas es la distrofia miotónica de la cual aún no se conocen sus bases moleculares.

Se ha postulado que en la generación de la miotonía en pacientes con distrofia miotónica está involucrado un canal de potasio activado por calcio de baja conductancia. La expresión de este canal en músculo esquelético es regulada por el nervio encontrándose presente en músculo fetal no inervado, en músculo denervado y en membranas de músculos de pacientes con distrofia miotónica, pero no en músculos normales. Existe por lo tanto una anomalía en la regulación de la expresión de este canal en pacientes con esta enfermedad.

Nosotras estamos investigando cuales son los factores que afectan su expresión. Experimentalmente, la presencia o ausencia de este canal la hemos determinado midiendo el ligamen de apamina-¹²⁵ a vesículas de membranas de músculo. La apamina es un péptido que se liga al canal con alta afinidad y lo bloquea.

Hemos encontrado que el bloqueo del flujo axoplásmico inducido mediante la aplicación de colchicina al nervio ciático de ratas induce la aparición del receptor de apamina en membranas de músculo de la pata posterior. Por otra parte, hemos inducido miotonía en ratas mediante el uso de drogas, con el propósito de comprobar si la miotonía esta relacionada con la presencia del canal-receptor de apamina.

Financiado por: Fondecyt 296-89 y NIH GM 35981.

ANORMALIDADES EN EL RECEPTOR COLINERGICO EN SINDROMES MIASTENICOS CONGENITOS (Cholinergic receptor anomalies in congenital myasthenic syndromes) Uchitel, O.D., Engel, A.G., Walls, T.J. y Nagel, A. Instituto de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y Mayo Clinic, Rochester Minnesota.

Los síndromes miasténicos congénitos (S.M.C.) se caracterizan por debilidad muscular debido a fallas en la transmisión neuromuscular. Estudios electro fisiológicos en biopsias intercostales de músculos de pacientes con S.M.C. permitieron describir alteraciones del receptor colinérgico.

En dos casos de S.M.C donde la liberación evocada y el número de sitios para la I-Bungarotoxina fue normal se estudiaron las propiedades de los canales activados por la acetilcolina mediante la técnica de fijación del voltaje con microelectrodos intracelulares. Se analizaron las propiedades de las corrientes sinápticas y el ruido en la corriente generado por la aplicación de acetilcolina.

En un caso se registraron potenciales y corrientes miniatura aumentadas con constante de decaimiento anormalmente breve. El análisis de ruido determinó que los canales activados poseían una conductancia aumentada 1.7 veces y un tiempo medio de apertura 30% más corto que los controles.

En otro caso se registraron potenciales y corrientes miniatura disminuidas. La conductancia unitaria obtenida del análisis de ruido fue normal. Sin embargo el espectro de poder del ruido mostro dos componentes. Esto podría resultar de la presencia de dos poblaciones de receptores con diferentes tiempos medios de apertura o de una anormal interacción de la acetilcolina con su receptor. La primera posibilidad es improbable ya que ambas poblaciones debería tener baja conductancia unitaria para poder explicar la disminución de la amplitud en las corrientes miniatura y sin embargo la conductancia de los canales activados fue normal.

ANTITRANSPORTE DE Na^+/H , HIPERTENSION Y DIABETIS. Mitzy Canessa, Roberto Pontremoli y Alicia Rivera. Department of Medicine, Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital, Boston, Ma.

Nuestro laboratorio ha estudiado la cinética del intercambio de Na^+/H y Na^+/Li en eritrocitos de sujetos normales y en pacientes con hipertensión esencial (HT) y diabetes. La mayoría de los pacientes HT (77%) presentan anomalías en la cinética de activación por el pH celular del antitransporte de Na^+/H que se reflejan en un coeficiente de Hill disminuido (n_{app}). Solo una fracción menor de pacientes HT tienen un aumento de la V_{max} de intercambio de Na^+/H y Na^+/Li . En pacientes con diabetes insulina-dependiente (DID), observamos que la V_{max} esta aumentada con respecto a los sujetos normales. Sin embargo, los pacientes con DID que desarrollan nefropatía e hipertensión, presentan las mismas anomalías que los pacientes HT: la activación del antitransporte de Na^+/H por el pH celular (n_{app}) esta disminuida y la V_{max} de intercambio de Na^+/Li esta aumentada. Hemos estudiado la cinética de activación del antitransporte de Na^+/H en eritrocitos de sujetos normales en ayunas incubados in vitro con insulina y glucosa. La insulina aumento significativamente el V_{max} y el n_{app} del intercambio de Na^+/H pero no afecto el de Na^+/Li . Estos resultados indican que a) la tirosina kinasa de los receptores de insulina del eritrocito pueden regular por fosforilación el antitransporte de Na^+/H ; b) que este mecanismo estaria defectivo en los pacientes HT (diabetes insulina-resistente ?) y en los DID que desarrollan nefropatía; c) que el aumento de la V_{max} de intercambio Na^+/Li puede reflejar un aumento compensatorio del número de intercambiadores de Na^+/H .

INHIBICION DE LA Ca²⁺-ATPasa DE MEMBRANA DE ERITROCITOS HUMANOS: ENSAYOS IN VIVO E IN VITRO.
(Inhibition of the Ca²⁺-ATPase of human erythrocyte membranes: in vivo and in vitro assays)
Rossi J.P.F.C., González Flecha F.L. y Gagliardino J.J. Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA-CONICET), y Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET) - ARGENTINA.

Hemos mostrado previamente (IECS Med. Sci. 14,478, 1986) que la actividad Ca²⁺-ATPasa de membranas de eritrocitos de individuos diabéticos descompensados es significativamente menor que la de individuos normoglucémicos. Recientemente hemos logrado reproducir estos resultados en experimentos realizados in vitro (Diabetes 39:707-711,1990). Las evidencias experimentales indican que la inhibición de la Ca²⁺-ATPasa reúne las siguientes características: a) la disminución de la actividad enzimática es dependiente de la temperatura, concentración de glucosa, pH y del tiempo de incubación; b) este efecto se evidencia tanto incubando membranas aisladas de glóbulos rojos como eritrocitos intactos en presencia de glucosa y siempre se acompaña por un aumento en los niveles de proteínas glucosiladas de membrana; c) la presencia de 5mM ATP en el medio de incubación previene los efectos de la glucosa sobre la bomba de Ca²⁺ pero no disminuye el nivel de glucosilación de las proteínas de membrana; d) la calmodulina en el medio de ensayo no modifica significativamente el grado de inhibición respecto del ensayo en ausencia de la misma; e) la enzima preincubada con glucosa tiene una mayor afinidad aparente por calmodulina que la control. Estos resultados sugieren que la inhibición de la Ca²⁺-ATPasa sería debida a la glucosilación no enzimática de residuos de lisina de la enzima.

Con subsidios de ANTORCHAS, CONICET, TWAS y UBA.

COMUNICACIONES LIBRES EN PANELES

Estructura

ESTRUCTURA A 1.5 Å⁰ DE RESOLUCION DE RIBONUCLEASA T, ACTIVA Y LIBRE DE INHIBIDORES. NUEVAS EVIDENCIAS PARA EL MECANISMO DE ACCION. (The structure of inhibitor free ribonuclease T, in active conditions at 1.5 Å⁰. resolution. New evidences for the action mechanism) Marti - nez, J., Choa, H-W., Heineman, U. and Saenger, W. Lab. Biofísica Molecular, Universidad de Concepción, Institut für Kristallographie Freie Universität, Berlin, West Germany.

Ribonucleasa T₁ (RNasa T) se cristalizó a pH 7.0 en un sistema de difusión de vapor, utilizando PEG 6000 como agente precipitante. Cristales en forma de bipirámide rectangular pertenecientes al sistema ortorrómbico P 2₁2₁2₁, permitieron recolectar un total de 3115 reflexiones únicas, con una resolución de 1.5 Å⁰. La estructura se refinó por un procedimiento de mínimos cuadrados con restricciones. Las coordenadas del complejo RNasa T₁-vanadato (Biochemistry 28: 7592, 1989) fueron usadas como modelo inicial.

Después del refinamiento, el factor R clásico fue de 14.3%. El modelo final presentó 7 residuos de aminoácidos en doble conformación, 120 moléculas de agua y la presencia de un ión de calcio. El plegamiento de la cadena polipeptídica es similar al del complejo RNasa-vanadato; la conformación de los aminoácidos involucrados en el sitio catalítico, y en el sitio de reconocimiento de la base, son también muy similares. Ambos sitios están ocupados sólo por moléculas de agua en RNasa T₁, ocupando las mismas posiciones que los átomos de oxígeno del fosfato o del vanadato en los complejos respectivos.

Un importante descubrimiento que la solución de esta estructura aporta, es un contacto de unión hidrógeno entre His 4D y Glu 58. Este contacto explicaría el rol de His 40 como activador de Glu 58, aumentando la basicidad del grupo carboxilato.

COMPOSICION, ORDENAMIENTO MOLECULAR Y TENSION SUPERFICIAL DINAMICA DE UN SURFACTANTE PULMONAR EXOGENO (Composition, molecular order and dynamic surface tension of an exogenous lung surfactant). Bressiani, P., Itho, J., De Paoli, T., Hager, A. Departamento de Físico-matemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Utilizando surfactante pulmonar exógeno de origen porcino se estudió la influencia de la proporción de colesterol y las condiciones de esterilización sobre la tensión superficial dinámica y sobre los parámetros de orden de los ácidos 5, 12 y 18 doxil esteéricos incorporados en la bicapa lipídica del surfactante. Las medidas de tensión superficial dinámica se realizaron con un tensiómetro de burbuja pulsante y los parámetros de orden se midieron a partir de espectros de resonancia paramagnética electrónica.

Se observó una relación directa entre la proporción de colesterol y el aumento de los parámetros de orden y la concomitante pérdida de la capacidad de disminuir la tensión superficial dinámica.

FLUIDEZ DE MEMBRANA Y MICROVISCOSIDAD INTERNA DE ERITROCITOS DE PACIENTES NORMALES Y CON DIVERSAS PATOLOGIAS (Membrane fluidity and internal microviscosity of erythrocytes of normal patients and with different pathologies). HAGER, A. A., De Paoli, T. e Itho, J. E. Departamento de Físicomatemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

La fluidez de la membrana de los eritrocitos se midió determinando el parámetro de orden del ácido 5 Doxil esteérico mediante resonancia paramagnética electrónica (ESR). Se trabajó con eritrocitos enteros lavados y resuspendidos en solución de ClNa 150 nM - buffer fosfatos (pH 7.4), marcados durante 2 hs a 4°C y lavados nuevamente para eliminar el radical nítróido incorporado.

La microviscosidad interna de los eritrocitos se midió determinando los tiempos de correlación de la 4-maleimida tempo mediante ESR. La marcación se efectuó sobre eritrocitos lavados y resuspendidos con solución de ClNa 150 nM - buffer fosfato pH 7.4 hasta un hematocrito del 10%, durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego lavados para eliminar el radical nítróido no incorporado.

Se encontraron diferencias significativas con respecto a los normales en los valores de fluidez de membrana en varias patologías, en otras se encontraron diferencias de la microviscosidad interna y en otras en ambos indicadores.

Las patologías estudiadas fueron diabéticos tipo I y tipo II, esferocitosis hereditaria, síndrome urémico hemolítico.

EFEECTO ESTRUCTURAL DEL PENTAFLOROFENOL EN BICAPAS LIPIDICAS Y FIBRAS NERVIOSAS. (Study on the interaction of pentafluorophenol with lipid bilayers and nerve fibers). Suwalsky, M., Montoya, G., Villena, F., Espinoza, M.A. y Garrido, C. Facultad de Ciencias y Facultad de Ciencias Biológicas y Recursos Naturales, Universidad de Concepción, Chile.

Dado su extenso uso, resistencia a la degradación y alta toxicidad el pentaclorofenol (PCF) constituye un peligroso contaminante, capaz de incorporarse en las bicapas lipídicas de las membranas celulares alterando diversas funciones y su organización molecular. Con el fin de interpretar las interacciones del PCF con las bicapas lipídicas, se efectuaron estudios estructurales por difracción de rayos X. Para este efecto se hicieron reaccionar bicapas constituidas por los fosfolípidos dimiristoilfosfatidil-etanolamina y dimiristoilfosfatidilcolina con diferentes concentraciones de PCF en ausencia y presencia de agua, a 17°C. Los resultados indican que el PCF perturbó significativamente las estructuras de ambos. Para relacionar estos resultados con los daños que puede causar a membranas celulares, ratas fueron alimentadas con agua conteniendo PCF en una concentración 3mM. Al cabo de 3-4 meses fueron sacrificadas y sus nervios ciáticos analizados por difracción de rayos X y microscopía electrónica. Resultados preliminares indican que se produjeron cambios estructurales y morfológicos a nivel de la mielina, los que estarían relacionados con alteraciones de las bicapas lipídicas.

Financiamiento: Proyectos FONDECYT (0783/88 y 0625/89) y de la Universidad de Concepción (20.13.79 y 20.33.41).

PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DE PROTEÍNAS POR SU CLASE ESTRUCTURAL. (Prediction of the secondary structure of proteins according to their structural class). Hilda Cid, Marta Bunster y Mauricio Canales. Lab. Biofísica Molecular, U. de Concepción y Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, FDR.

Estudios recientes han demostrado que la predicción de estructura secundaria de proteínas, utilizando el método de Chou y Fasman, mejora cuando los parámetros estructurales se han calculado independientemente para cada una de las 4 clases estructurales definidas para proteínas: α , β , $\alpha+\beta$, α/β .

El método de predicción diseñado en nuestro laboratorio considera los coeficientes de hidrofobicidad ambiental de Ponnuswamy, para cada aminoácido, parámetros que deberían mostrar una mayor dependencia aún, de la clase estructural de la proteína.

Se calcularon los coeficientes de hidrofobicidad de Ponnuswamy para 19 proteínas clase α , 15 proteínas clase β , 14 de la clase $\alpha+\beta$, y 16 proteínas de la clase α/β . Los resultados muestran que tanto las distribuciones de los coeficientes de hidrofobicidad como su valor promedio difieren significativamente para cada una de las clases estructurales.

La posibilidad de predecir la clase estructural de la proteína a partir de su composición de aminoácidos, hecho ya demostrado, abre la posibilidad de mejorar notablemente la predicción de estructura secundaria, utilizando los métodos de Chou y Fasman y de los Perfiles de Hidrofobicidad, con los coeficientes específicos para la clase estructural a la que pertenece la proteína problema.

Proyecto 20.31.32, DI, U. de Concepción
Proyecto GTZ-DAAD-FONDECYT.

COLAGENO EN HUESO: PROCESO DE RELAJACION EN EL RANGO DE MICROONDAS Y RADIOFRECUENCIAS. (Collagen in bone: relaxation process in the radio waves and microwaves spectrum). Ivancich*, A. y Grigera**, J.R. Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB) y Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

El estudio del colágeno en su función específica en la matriz colagénica es de interés desde el punto de vista básico así como también por su aplicación en el área médica. A través del análisis del comportamiento dieléctrico de hueso en un extendido rango de frecuencias, kHz-GHz, se obtienen parámetros dieléctricos significativos por su relación con las radiaciones no ionizantes utilizadas terapéuticamente.

Para el rango de 20kHz a 5 Mhz, en muestras de hueso nativo y desmineralizado y analizados en el dominio de las frecuencias se encontró una relajación a baja frecuencia en ambos casos y un aumento de todo el espectro de permitividad para el hueso descalcificado. Se concluyó que dicha relajación es debida a efectos interfaciales y que el incremento se puede atribuir a movimiento de cadenas laterales de la matriz colagénica (1).

Como continuación del trabajo, se presenta el estudio de propiedades dieléctricas en el dominio del tiempo (TDR) de muestras en ambos estados para el rango de las radiofrecuencias y microondas.

1. *Studia Biophysica* (1990) 135, 201-207.

*Becario de perfeccionamiento de la CIC

**Carrera del investigador de CONICET.

COLAGENO-EFECTOS DE SURFACTANTES EN SU ESTABILIDAD. (Collagen: Effect of Surfactants on its stability). Mogilner, I.G. y Grigera, J.R. Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB) y Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

El estudio del punto de vista básico del sistema colágeno-agua-detergente es un gran aporte a la tecnología del cuero, ya que en el proceso de curtición del mismo son utilizados (con criterios empíricos) surfactantes iónicos y no iónicos a diferentes pHs. El estudio realizado en Tendón de Aquiles Bovino, muestra que el efecto liotrópico en el colágeno es fuertemente dependiente del pH: siendo en el caso del Tritón X-100 y Polietilenglicol mayor a mayor pH, y en el caso de detergentes iónicos mayor (1) cuando ambos poseen la misma carga. El objetivo de este trabajo es encontrar una explicación al aparente extraño comportamiento de la interacción colágeno-detergente. Se trabajó con polvo de piel bovina. Las muestras se introdujeron en soluciones acuosas de TX-100, SDS e Hyamina 1622 a pH: 2,7 y 13. Después del equilibrio el detergente adsorbido fue medido con el método apropiado a cada caso. Se computó la hidratación preferencial (2). Los resultados explican la desestabilización por la formación de una tercera fase termodinámicamente desfavorable, efecto opuesto al hallado en proteínas globulares.

Investigador del CONICET

1. E.M. Caillaba, N. Sierra, U.D. Vera, I.G. Mogilner y J.R. Grigera, *J. Soc. L.T., Chem.*, 71 153, 1988.

2. Pittz, S.N., Timasheff, *Biochemistry* 17, 615, 1978.

ANÁLISIS DE CONFORMACION DE POLIALCOHOLES Y SU PODER EDULCORANTE. ESTUDIO MEDIANTE DINÁMICA MOLECULAR. (Conformational analysis of polyalcoholes and sweetness. Molecular Dynamics Simulation). Howard*, E. y Grigera**, J.R. Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos y Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Se analizan las propiedades edulcorantes de polialcoholes pequeños en relación con su estructura en solución acuosa. El modelo usualmente aceptado se basa en la presencia de un "triángulo edulcorante", con dos oxidrilos vecinos actuando como dador y receptor de protones en puente hidrógeno, y un centro hidrofóbico. Se simuló por Dinámica Molecular dos polialcoholes de cuatro carbonos, eritrol y L-treitol, en solución acuosa, estudiándose la estructura y dinámica de hidratación de ambos. Se encontró en eritrol una disposición de grupos oxidrilo que se ajusta a la descripción geométrica y de características de hidratación del "triángulo edulcorante", no encontrándose la misma en L-treitol. Esto es coincidente con la determinación experimental del poder edulcorante de ambos. Las características de hidratación de los distintos oxidrilos del eritrol cambian según las dos conformaciones dominantes que adopta esta molécula. El coeficiente de difusión obtenido para el agua que hidrata al eritrol es cinco veces mayor al obtenido para el modelo de agua, utilizando en la simulación (SPC/E), que indica que pese a la capacidad de formar puentes hidrógeno, el Eritrol introduce mayor movilidad en las moléculas de agua de su entorno.

*Becario CONICET

**Investigador CONICET

ESTRUCTURA DEL AGUA EN PRESENCIA DE UREA. ESTUDIO MEDIANTE DINAMICA MOLECULAR. (Water Structure in presence of urea. A molecular Dynamics Study). Tolosa*, E. y Grigera,** J.R. Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos y Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de La Plata, La Plata, Argentina.

Repetidas veces se menciona el efecto de la urea en la estructura del agua, sin embargo existen pocas evidencias directas sobre su real comportamiento. En este trabajo realizamos la simulación, por el método de dinámica molecular, de soluciones de urea en agua a dilución infinita y 4 molal. El modelo de agua corresponde al SPC/E, en tanto que la urea la modelizamos utilizando los potenciales de interacción GROMOS, con ángulos de enlaces flexibles y longitudes rígidas. Efectuamos 20ps de simulación, después del equilibrio, para cada solución, a temperatura y presión constantes. Cada 0.01ps de simulación guardamos la configuración del sistema. Los resultados se comparan adecuadamente con los experimentos de difracción de neutrones. Del análisis del coeficiente de difusión del agua y de la red de puentes de hidrógeno se obtiene interesante información sobre la estructura del agua en estas soluciones.

*Profesional del CIC

**Investigador CONICET

ANÁLISIS GLOBAL DE LA ANISOTROPIA DE COMPLEJOS FLUORESCENTES DE PEROXIDASA DE RABANO. (Global Analysis of the Fluorescence Anisotropy of Horseradish Peroxidase Conjugates). Brunet, J.E. y Vargas, V. (Patrocinio: J. Reyes) Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso y Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Para rotores asimétricos moderados, como la mayoría de las proteínas globulares, frecuentemente es posible obtener un solo tiempo de correlación rotacional a pesar de que presentan decaimientos complejos en la anisotropía de su fluorescencia. En este trabajo se demuestra que es posible obtener más de un tiempo de correlación rotacional combinando varios experimentos. En cada uno de éstos se emplea una sonda fluorescente unida a la proteína. Se estudia la Peroxidasa de Rábano (HRP), que es una hemoproteína globular monomérica y de un peso molecular de 44.000. A esta proteína se le extrajo el grupo heme y se obtuvieron cuatro complejos con sondas fluorescentes. Se midió la fluorescencia resuelta en el tiempo mediante la técnica multifrecuencial de fase y modulación. Si se analizan los resultados en forma individual, para cada complejo se obtiene un sólo tiempo de correlación rotacional que difiere notablemente de un complejo a otro. Sin embargo al efectuarse un Análisis Global simultáneo sobre todos los complejos con HRP, para resolver un conjunto consistente de tiempos de correlación rotacional, se recuperan dos tiempos de correlación que concuerdan con los calculados en forma independiente para un elipsoide prolato con una relación de ejes de 1:3.

EFFECTO DEL GLICEROL SOBRE LA ESTRUCTURA DE MEMBRANAS LIPÍDICAS EN SU ACCIÓN CRIOPROTECTORA (Effect of glycerol on the structure of lipid membranes in its cryoprotectant action). Biondi, A.C.¹ y Disalvo, E.A.². ¹ Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán; ² Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

El propósito de este trabajo es estudiar por métodos de polarización de fluorescencia usando sondas en distintas profundidades de la membrana el efecto del glicerol sobre la membrana lipídica en las condiciones en que se use como crioprotector.

Para proteger células en un proceso de congelación-descongelación se agrega 20% de glicerol a la suspensión. En este trabajo se demuestra que este agregado conduce a una alteración del empaquetamiento y polarización interfacial de la membrana según la velocidad de descenso de la temperatura a través de la transición gel- líquido cristalina sea lenta o rápida. Estos cambios se producen en la interfaz membrana-solución; en la zona de los 5-6 carbonos cercanos al grupo polar ó en la zona terminal de las cadenas parafínicas según la concentración de glicerol. Estas perturbaciones influyen sobre la recuperación de las propiedades de la membrana luego de la descongelación.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (CHCM) SOBRE LA REOLOGIA ERITROCITARIA. (Influence of mean corpuscular hemoglobin concentration on erythrocyte rheology). Luquita, A., Rasia, R., Rasia, M. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Cátedra de Biofísica, Facultad de Medicina, U. N. de Rosario.

Clásicamente se acepta que la viscosidad citoplásmica es un factor determinante de la deformabilidad eritrocitaria. Sin embargo, no hay estudios sobre la variación de deformabilidad de glóbulos rojos normales en función de la CHCM en condiciones de isosmolalidad, es decir, sin modificar la relación superficie/volumen de los eritrocitos. En este trabajo la CHCM de glóbulos rojos normales se modificó por lisis controlada y las distintas poblaciones obtenidas (rango 25-38 %) se separaron por gradiente de densidad de dextran. En cada muestra se determinó: CHCM (a partir de la concentración de hemoglobina y volumen globular), volumen corpuscular medio (VCM), relación superficie/volumen y los parámetros reológicos eritrocitarios: deformabilidad celular, módulo elástico y viscosidad superficial por difracción láser. Los resultados obtenidos demuestran que manteniendo constante la relación superficie/volumen, conforme disminuye la CHCM (38-25%) el módulo elástico celular también lo hace (1.511×10^{-2} a 9.34×10^{-3} dinas.s/cm), $n=10$, $r=0.692$, $p<0.05$. Los eritrocitos se hacen más deformables (índice 0.342 a 0.553), $n=10$, $r=-0.673$, $p<0.05$. La viscosidad superficial permanece constante.

Estas observaciones tienen relevancia fisiológica y clínica en relación con el tránsito capilar y la vida media eritrocitaria.

EFFECTO DEL ESTRES OSMOTICO SOBRE LA ACCION CRIOPROTECTORA DE LA TREHALOSA EN MEMBRANAS LIPIDICAS. (Effect of osmotic stress on cryoprotective action of trehalose in lipid membrane). Bakas, L. y Disalvo, E. Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Cuando se somete una suspensión celular a ciclos de congelación-descongelación una de las perturbaciones que afectan la estabilidad de la membrana plasmática es el desequilibrio osmótico producido durante el proceso. Este origina cambios topológicos en la membrana que alteran la efectividad de compuestos como la trehalosa, cuyas características crioprotectoras son ya conocidas.

En este trabajo se presenta un estudio de la estabilidad de membranas lipídicas de fosfatidilcolina sometidas a gradientes osmóticos, originados por la adición de Ca^{2+} , Na^+ y/c trehalosa en el medio.

Cada uno de estos compuestos es capaz de modificar las propiedades interfasiales, las cuales han sido sensadas con anilinaftalenosulfonato; marcador sensible al potencial superficial.

Los datos indican que existe una relación inversa entre potencial y estabilidad. La estabilidad fue determinada por el dequencheo de octadecilrodamina, parametro relacionado con la extensión del reordenamiento lipídico producido.

Por otro lado los resultados muestran que la trehalosa es menos efectiva en proteger a los liposomas de la fusión inducida por los ciclos de congelación cuando aumenta la osmolaridad del medio. Esto es independiente del compuesto utilizado para originar el gradiente incluyendo la propia trehalosa. Esto indicaría que las condiciones óptimas para la interacción trehalosa-grupo fosfato responsable del efecto crioprotector existirían en condiciones isoosmóticas.

ACCION LITICA DE LISOFOSFATIDILCOLINAS SOBRE MEMBRANAS CONSTITUIDAS POR LIPIDOS RAMIFICADOS. (Lytic action of lysophosphatidylcholine on membranes with branched phospholipids). Viera, L. y Disalvo, E.A. Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

La interacción de lisofosfatidilcolinas con membranas lipídicas promueve la destrucción de sus propiedades de barrera. Esta acción litica es máxima cuando la membrana se encuentra en la temperatura de transición gel-líquido cristalino o cuando proteínas lipo o hidrofílicas interaccionan con la membrana en estado fluido. Asimismo, membranas deshidratadas en presencia de trehalosa y luego rehidratadas en buffer son sensibles a la acción del lisoderivado a temperaturas por debajo de la transición de fase en contraste con membranas en estado gel no deshidratadas previamente.

Estudios estructurales y termodinámicos permiten suponer que en todos estos casos la acción litica se produce por la presencia de defectos estructurales promovidos por la coexistencia de lípidos en estado gel y líquido cristalino.

En este trabajo se estudia el efecto litico sobre membranas compuestas con lípidos ramificados. Los resultados indican que la presencia de un metilo lateral en una cadena del residuo de ácido graso promueve una lisis equivalente a la encontrada en lípidos de cadena lineal sometidos a deshidratación en presencia de trehalosa. La acción es más notoria cuando la ramificación se encuentra cercana a la cabeza polar del fosfolípido.

EFFECTO DE LA TREHALOSA EN MEMBRANAS LIPIDICAS. (Effect of trehalose on lipid bilayers). Disalvo, E. y Alonso-Romanowski, S. Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Se estudio el efecto de las interacciones con membranas lipídicas del disacárido trehalosa utilizando varios sistemas modelo de bicapas lipídicas por métodos ópticos, eléctricos, por espectroscopia infrarroja y en presencia de sondas fluorescentes (MCS40). Los fosfolípidos utilizados fueron DPPC y DPhPC.

Los resultados encontrados por espectroscopia i.r. y con el sistema de bicapas planas (BLM) indican que esta molécula modifica el espesor de la bicapa al interaccionar con la cabeza polar del fosfolípido por formación de puente de hidrógeno. Estudiando las propiedades ópticas (A_{450}) de liposomas en contacto con concentraciones crecientes de trehalosa en función de la temperatura se observó que el cambio de absorbancia en la transición de fase gel a líquida cristalina es función de la concentración de disacárido presente en el medio. El área bajo la curva esta presenta un máximo a 0,75 M de trehalosa y luego disminuye. Con el marcador óptico MCS40 se encontró un resultado semejante. Este máximo coincide con el encontrado para una muestra deshidratada en presencia de trehalosa 10^{-3} M y luego rehidratada. Estos resultados indican que la trehalosa promueve cambios estructurales en la interfase membrana/solución los que determinarían sus propiedades estabilizadoras de la membrana en los procesos de deshidratación-rehidratación.

PARAMETROS DE SORCION DE AGUA POR PROTEINAS : ¿VALORES SEGUN B.E.T. O SEGUN G.A.B.? (Multilayer sorption parameters of water by proteins: B.E.T. or G.A.B. values?) Timmermann, E.O. Depto. Q.Inorgánica, Analítica y Q.Física, Fac. Cs. Exactas y Naturales, U. de Bs.Aires, Argentina.

Es conocido que la isoterma BET linealizada (BET plots) (2 ctes: c, v_m) es sólo válida entre $.05 < p/p_0 < .4$ mientras que la isoterma GAB linealizada (GAB plots) (3 ctes: c, v_m, f) es válida para $.05 < p/p_0 < .8-.9$ y que los valores de las ctes. comunes c y v_m obtenidos por ambos gráficos difieren, siendo siempre $c(\text{BET}) > c(\text{GAB})$ y $v_m(\text{BET}) < v_m(\text{GAB})$. Considerando trabajos previos (EOT 1) J.Chem.Soc.Far.Trans.I 85(1989)1631 2) GAB 1988) se demuestra que los valores de BET plots se pueden expresar en términos de las 3 ctes. de la isoterma GAB. Si vale la isoterma GAB ($f < 1$) los BET plots responden realmente a una ecuación no lineal del tipo $(a_0 \neq p/p_0)$ $F(\text{BET}) = a_0 / v(1-a_0) = A + B.a_0 + C.a_0^2 / (1-a_0)$ [$A, B, C = G(c, v_m, f)$], siendo ésta $F(\text{BET})$ la que se ajusta usualmente por cuadr. mínimos a una recta. Usando una formulación de cuadr. mínimos continua se demuestra que $c(\text{BET})$ y $v_m(\text{BET})$ dependen de los valores reales c, v_m y f (GAB) de la siguiente manera:

$$v_m(\text{BET}) = v_m / [1 + 2(1-f)/c] \cdot R_m(\Delta a_0)$$

$$c(\text{BET}) = c \cdot [1 + 2(1-f)/c] \cdot R_c(\Delta a_0)$$

R_m y R_c son funciones del intervalo Δa_0 considerado, de su valor medio a_0 y de f y c , siendo siempre ≥ 1 . Estas ecs. explican las desigualdades señaladas cuali-cuantitativamente, lo cual se lo verifica mediante datos de la literatura (p.ej. H.B.Bull J.A.C.S. 66(1944)1499). Se demuestra además que para el intervalo $.05 < a_0 < .3$ recomendado para BET plots por IUPAC (Pure Appl.Chem. 57(1985)603) para valores usuales de $f = .7$ y $c = 20$ $v_m(\text{BET}) = 85\% v_m$ y $c(\text{BET}) = 150\% c$.

Bs.As. Agosto 1990

ESTUDIO TEORICO DE PEPTIDOS CONSTITUTIVOS DE ANGIOTENSINA II. (Theoretical study of Angiotensine II constitutive peptides). G.M. Ciuffo, M.E. Morales, E.R. Correché y E.A. Jáuregui. Cátedra de Química General. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. Argentina (Patrocinio: Hilda Cid).

Angiotensina II es un péptido endógeno con diversas actividades, tanto en el control de la tensión arterial como a nivel de SNC. Se han estudiado parcialmente sus péptidos constitutivos: Arg-Val-Tyr-MA e His-Pro. El dipéptido His-Pro presenta, por la presencia de Pro, características especiales. Se pueden encontrar 4 formas cis-up, cis-down, trans-up, trans-down. Este estudio se realizó empleando como método de cálculo un potencial átomo-átomo empírico. En el modelo 1 se supuso que la hidratación eliminaría el efecto de las interacciones electrostáticas y en el modelo 2, se incluyeron las interacciones electrostáticas, atenuadas por una $D=4$.

De las numerosas conformaciones analizadas para His-Pro sólo entre 10 y 15 conformaciones se encontraron en un ΔE de 3 kcal/mol. Se observó que ambas conformaciones trans (up y down) son de menor energía que las "cis". La conformación trans-down presenta el mínimo global (-10.87). La conformación de mínima energía en todos los casos es del tipo α -plegada, con diedros de 120 y -120 para el residuo His y las posiciones clásicas para la cadena lateral ($\chi_1 = 60, 180, \chi_2 = 90$). Cuando se aplicó el modelo 2 se observó que este privilegió algunas conformaciones sobre otras. En el caso particular de las cis-down, se observa que la conformación II alcanza con este modelo una población de 60%. Para el tripéptido Arg-Val-Tyr, la conformación preferida es del tipo β -plegada, con una gran movilidad para el residuo Arg.

Los resultados obtenidos concuerdan con datos experimentales para Angiotensina II, que indican la presencia de una conformación β -plegada. Las conformaciones de mínima energía serán posteriormente ensambladas, a fin de obtener las conformaciones finales de Angiotensina II.

PID de CONICET (Argentina) 1989-1991.

Transporte

INTERACCION FOSFOLIPIDO-CARBOHIDRATOS Y SU INFLUENCIA EN EL TRANSPORTE IONICO A TRAVES DE POLIPEPTIDOS (Phospholipid-carbohydrate interaction and its influence on ion transport through polypeptides). Alonso-Romanowski, S. y Disalvo, E.A. Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Menlendyks y col. (1989) postularon la posibilidad de formación de puentes de H entre el grupo carbonilo y el protón del indol perteneciente al triptofano 15 (Trp 15) de la gramicidina A (GA).

Por otro lado, la trehalosa (disacárido de la glucosa) forma puentes de hidrógeno a la altura del grupo carbonilo.

En este trabajo se analizó la competencia entre la trehalosa y el indol del triptofano en la formación de puentes de hidrógeno con el carbonilo del lípido a través de técnicas eléctricas aplicadas a membranas lipídicas negras (BLM) de difitanoilfosfatidilcolina y por espectroscopia infrarroja. Las propiedades eléctricas se estudiaron en solución de KCl 1M determinando la capacidad y la resistencia.

La información estructural se obtuvo de espectros IR en la región del grupo polar ($\nu_{C=O}$ 1400 cm^{-1}) y del grupo carbonilo del lípido ($\nu_{C=O}$ 1600 cm^{-1}).

La disminución de resistencia de la bicapa por el agregado del péptido es menor en presencia de trehalosa y por lo tanto el transporte iónico es menor. Se infiere de estos resultados que los cambios a nivel de la interfase pueden afectar la conformación del péptido ya que trehalosa aumenta el espesor de la bicapa y sus resistencia.

Expresión del transportador de urea inhibible por floretina en ovocitos de *Xenopus laevis* (Expression of phloretin-sensitive urea carrier by *Xenopus laevis* oocytes). Ibarra, C., Martial, S.; Rebelo, L. y Ripoché, P. Dept. Fisiología, Fac. de Medicina, UNBA, Argentina y Dept. Biologie, CEN Saclay, Francia.

El estudio del transporte de urea a través de las membranas plasmáticas de células aisladas y epiteliales ha permitido la caracterización de un transportador específico de urea inhibible por floretina que serviría a mantener la presión osmótica celular. Evidencias indirectas indican que dicho transportador sería de naturaleza proteica. Sin embargo hasta el presente no se ha podido identificar y/o aislar las proteínas involucradas en el transporte de urea. Nosotros intentamos, mediante la técnica de inoculación de RNA mensajero (RNAm) en ovocitos anfibios: 1) expresar el transporte de urea en la membrana del ovocito, 2) identificar la población de RNAm que codifica dicha función. El RNAm fue purificado a partir de las células epiteliales de vejiga urinaria de rana mediante el uso de la técnica de extracción cloroformo-fenol y de la cromatografía de afinidad y la traducción "in vitro" del RNAm fue llevada a cabo en un sistema libre de reticulocitos en presencia de (S^{35})-metionina. La traducción "in vivo" fue realizada mediante la inoculación de RNAm a ovocitos anfibios. El análisis de la expresión de RNAm "in vitro" demostró que al menos 10 proteínas bien definidas con una masa molecular entre 19 y 200 kDa fueron sintetizadas. La expresión en la membrana del ovocito fue medida de 3 a 5 días después de la inyección mediante la incorporación de (C^{14})-urea. Se pudo observar que en ovocitos inyectados con RNAm (testigos) la incorporación de urea (Jurea, nmol/cm²/min) fue mayor (17.1±0.2; n=6; p<0.02) que en los ovocitos inyectados con agua (controles) (11.6±1; n=6). Este incremento de Jurea fue totalmente inhibido por la floretina (0.1 mM) en ovocitos testigos mientras que el Jurea no fue afectado en los controles. Resultados preliminares mostraron que la expresión del transporte de urea se encontraría en una fracción de RNAm de tamaño entre 6 y 10 Kb. Nosotros concluimos que el transportador de urea floretina-inhibible puede ser funcionalmente expresado y específicamente detectado en ovocitos anfibios inoculados con RNAm de células epiteliales de vejiga urinaria de rana.

FLUJOS IONICOS MEDIADOS POR MONENSINA EN MUSCULO ESQUELETICO DE RANA (*L. ocellatus*). (Ionic fluxes mediated by monensin in frog skeletal muscle (*L. ocellatus*)). Hoya, A. y Venosa, R.A. Cátedra de Fisiología con Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

El ionóforo monensina (MON) se desprotona asociándose con distintos grados de afinidad a otros cationes monovalentes, principalmente Na^+ y K^+ , formando complejos eléctricamente neutros que facilitan el movimiento de aquéllos a través de membranas artificiales y biológicas. En estos experimentos se estudiaron, mediante trazadores ($^{22}\text{Na}^+$), espectrofotometría de AA y alteraciones de pH, los flujos de intercambio entre Na^+ , K^+ y H^+ mediados por MON a través del sarcolema en Ringer normal (RN) ($[\text{Na}^+]_e = 115 \text{ mM}$) y en $[\text{Na}^+]_e = 0$ (reemplazado por Mg^{++}). Los flujos (J) generados por MON fueron reversibles y [MON]-dependientes. Los valores de los parámetros de la relación entre J y [MON], i.e., J máximo (J_m) en $\text{pmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y [MON] a la cual $J = J_m/2$ ($K_{0.5}$ en μM) fueron: a) $\text{Na}^+_i/\text{Na}^+_e: J_m = 112 \pm 13, K_{0.5} = 8.5 \pm 2.9$; b) $\text{Na}^+_i/\text{H}^+_e: J_m = 30.7 \pm 4.3, K_{0.5} = 12.7 \pm 4.4$; c) Neto de Na^+ (hacia adentro): $J_m = 32.5 \pm 5.6, K_{0.5} = 11.6 \pm 5.2$; d) Neto de K^+ (hacia afuera): $J_m = 14.2 \pm 2.8, K_{0.5} = 6.7 \pm 4.2$. MON para difundir de una interfase a otra de la membrana debe estar protonada o asociada a otro catión monovalente, tal que el J neto mediado por cationes es cero. Esto permite inferir (dada la disponibilidad de cationes transportables a ambos lados del sarcolema) que debe haber un intercambio $\text{H}^+_i/\text{Na}^+_e$ con un J_m de $49 \text{ pmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La tabla resume los J_m unidireccionales y netos calculados.

MOVIMIENTO IONICO	FLUJO ($\text{pmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Neto
Na^+ (ext \rightarrow int)	175.2	32.5
Na^+ (int \rightarrow ext)	142.7	
K^+ (int \rightarrow ext)	14.2	14.2
H^+ (ext \rightarrow int)	30.7	
H^+ (int \rightarrow ext)	49.0	18.3

En consecuencia, en RN el resultado neto del transporte mediado por MON en el sarcolema sería equivalente al de un sistema que intercambia 7 Na^+ extracelulares por 3 K^+ y 4 H^+ intracelulares. La Plata, Argentina

CARACTERIZACION BIOFISICA Y MATEMATICA DE UNA NEURONA DEL GANGLIO ESTOMATOGASTRICO. (Biophysical and Mathematical Characterization of a Stomatogastric Ganglion Neuron). Jorge Golowasch y Eve Marder, Biology Department, Brandeis University, Waltham, MA 02254, USA.

El ganglio estomatogástrico de la jirafa *Camelopardalis* ha sido ampliamente utilizado en el estudio de la generación de patrones rítmicos de actividad neuronal y de su modulación por péptidos y aminas. Hemos utilizado técnicas electrofisiológicas para estudiar las propiedades biofísicas de una de las neuronas que lo componen. Usando esta célula como modelo de célula del sistema pilórico, nuestro objetivo fue estudiar cómo depende su actividad de las diferentes corrientes iónicas que ella expresa.

En primer lugar hemos identificado 7 corrientes voltaje, tiempo y Ca^{2+} dependientes: una de salida de rectificación tardía, I_{L} , una de salida activada por Ca^{2+} , $I_{\text{O}(\text{Ca})}$, una de salida tipo A, I_{A} , una rectificadora de entrada, I_{E} , una de entrada de Ca^{2+} , I_{Ca} , una de entrada de Na^+ , I_{Na} , y finalmente una corriente voltaje dependiente activada por el pentapéptido proctolina, I_{proc} . La corriente activada por este neuromodulador muestra una voltaje dependencia que le permite influenciar fuertemente la excitabilidad celular a pesar de su baja amplitud.

Hemos usado las propiedades de las corrientes identificadas para obtener ecuaciones que las describen. Con estas ecuaciones hemos desarrollado un modelo computacional de la célula, e investigado la contribución de cada corriente a su excitabilidad. El modelo computacional muestra el sorprendente resultado de que la terminación de un potencial de acción depende principalmente de la activación de la corriente $I_{\text{O}(\text{Ca})}$ y no de I_{L} . El modelo muestra que la corriente activada por proctolina despolariza la célula e incrementa la frecuencia de disparo de manera muy similar a la célula real. Además la activación de I_{proc} cambia significativamente la contribución relativa que hacen las corrientes rectificadora tardía y la de salida activada por Ca^{2+} al patrón de actividad.

ASOCIACION COMPETITIVA DE ANIONES CON LAS SUPERFICIES DE VESICULAS DE DODA Y PERMEACION (ISO - OSMOTICA) A TRAVES DE LA BICAPA (Competitive Binding of Counterions at the Surfaces of DODA Vesicles and Permeation Across the Bilayer). Lissi E. y Abuin, E. Departamento de Química, Fac. de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

La asociación competitiva de aniones (bromuro/cloruro; yoduro/bromuro; yoduro/cloruro) con las superficies (externa e interna) de vesículas de DODA (dioctadecildimetilamonio) y la permeación (exterior/interior) de bromuro y yoduro a través de la bicapa bajo condiciones iso osmóticas es estudiada mediante experimentos de supresión de fluorescencia de sondas extrínsecas (100% incorporadas a las vesículas) conteniendo naftaleno y/o pireno como grupo fotoactivo. Las vesículas consideradas son de tamaño gigante (aprox. 0.5 micra de diámetro externo) y fueron obtenidas por el método de inyección con evaporación simultánea del solvente (cloroformo). El estudio se realizó a 25 °C, temperatura inferior a la T_c de las vesículas, condiciones bajo las cuales la bicapa se encuentra en su estado de gel. Condiciones iso-osmóticas fueron mantenidas trabajando en presencia de sales (NaCl en DODACl y NaBr en DODABr) a idéntica concentración en el compartimento acuoso interno y en la fase intervesicular.

La fluorescencia de las sondas decrece por agregado de iones supresores (yoduro o bromuro) a la fase intervesicular. Cambios temporales en la fluorescencia observados luego de la adición del supresor son interpretados en términos de un intercambio iónico rápido en la capa externa seguido de una permeación lenta hasta un estado final en que los iones alcanzan su distribución de equilibrio en ambas superficies (externa e interna). La interpretación cuantitativa de los resultados se realiza en base al modelo de intercambio iónico (1).

E. Lissi agradece a Fondecyt (Proyecto #1035/88) el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo (1).

E. Lissi, E. Abuin, D. Whitten and C. Backer, *J. Phys Chem.*, **93**, 4886 (1989).

EFFECTOS DE LA PROCAINA SOBRE LA LIBERACION DE CALCIO EN EL MUSCULO ESQUELETICO. (Effects of procaine on calcium release in skeletal muscle fibers). Pizarro, G., Brum, G. y Gonzalez, S. Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina, Montevideo, URUGUAY.

La procaina es un inhibidor de la liberación de Ca inducida por Ca (LCIC) en fibras peladas y vesículas de retículo sarcoplasmático (RS). Su efecto fue estudiado en fibras cortadas de anfibio bajo control de voltaje en doble trampa de vaselina. El movimiento de carga y el transitorio de Ca mioplásmico se midieron simultáneamente. El efecto de la droga aplicada extracelularmente depende drásticamente del pH. A $\text{pH} = 7$ 1 mM redujo entre 10 y 30 % la amplitud del transitorio de Ca producido por un pulso de voltaje desde -85 a 0 mV. A $\text{pH} 8.5$ la misma concentración redujo dicha respuesta en un 70%. En ambos casos el movimiento de carga no fue afectado. Siendo su $\text{pKa} = 8.9$, a $\text{pH} = 7$ sólo el 1% de la droga está en forma neutra, permeable a través de la membrana celular, mientras que a $\text{pH} = 8.5$ el 24% está en esa forma. La dependencia con el pH sugiere una barrera hidrofóbica en el camino hacia el sitio de acción de la droga. La indemnidad de la carga implicaría un efecto directo sobre el canal de liberación de Ca del RS. Los resultados sugieren que: 1) existe un componente de LCIC operando en condiciones fisiológicas o 2) la droga inhibe la liberación independientemente del mecanismo de estímulo.

Financiado por el PRONICIA y la Fundación M. Pérez

VIAS DE PASAJE PARA EL AGUA EN EL YEYUNO DE LA RATA. (Water pathways in the rat jejunum). C. CAPURRO y M. PARISI. Sección Biomembranas, Dpto. de Fisiología. Fac. de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La primera porción del yeyuno de ratas Wistar fué montada como un diafragma entre dos cámaras y el movimiento neto de agua transepitelial (J_w) fue medido minuto a minuto, determinándose el coef. de permeabilidad al agua bajo un gradiente de presión osmótica (Posm) o hidrostática (Phidr). Los valores observados son comparados en la tabla con los obtenidos en otras barreras epiteliales en idénticas condiciones experimentales:

	Yeyuno rata	Ciego rata	Colon humano	amnios humano	vejiga sapo
Posm	3,3 ±	1,4 ±	2,0 ±	15,2 ±	0,4 ± 6,5±
SEM	0,7	0,3	0,5	1,4	0,6 0,5
Phidr	61 ±	164 ±	223 ±	325 ±	79 ± 81 ±
SEM	2,4	18	33	53	8 9

valores en cm/s. x 10⁻³, n(6), en el caso de la vejiga de sapo se dan valores antes y después de ADH. La acidificación del medio por el pasaje de CO₂ 5% a CO₂ 100% en un medio con 25mM de bicarbonato (pH 7,1 a pH 6,2) produjo una fuerte reducción de la permeabilidad osmótica en el yeyuno de la rata (inhib. media 73 ± 10 %, n=6). El efecto fue totalmente reversible. Un efecto bloqueante de la permeabilidad osmótica por la acidificación fue previamente demostrado en el amnios humano y en la vejiga de sapo. La medida de los flujos unidireccionales de agua y sacarosa, junto al J_w, permitió determinar en estos tejidos una vía osmótica paracelular (amnios) y otra transcelular (vejiga estimulada con ADH). Similar metodología será aplicada al yeyuno de la rata.

PERMEABILIDAD AL Rb DEL EPITELIO SINCICIAL DEL PROTOESCOLEX DE *Echinococcus granulosis* (Rb permeability of the syncytial epithelium of *Echinococcus granulosis* protoescolex). Treco, T., Batelli, M. y Reisin, I. Departamento de Biofísica, Fundación CIMAE y Cátedra de Química Gral. e Inorg. Fac. de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 958, (1006) Buenos Aires, Argentina.

Se estudió el efecto del bario (Ba) y de la caribdotoxina (CTX) sobre la permeabilidad al Rb del epitelio sincicial del tegumento del protoescolex (PE) del *Echinococcus granulosis*. Para eso se midieron los flujos de entrada de Rb (J_{in}) por la incorporación de (86)Rb y los potenciales eléctricos de membrana, por empalme con microelectrodos. La técnica de incorporación de (86)Rb utilizada consiste en mezclar 50 µl de una suspensión de PE con 200 µl de solución Ringer-Krebs con el trazador e incubarla a 37 °C durante tiempos de carga entre 2 y 120 s. Finalizada la carga, se vuelca la suspensión en un sistema de filtración por vacío (filtro de 0,65 µm) y el filtro se lava rápidamente con 6 ml de solución de sacarosa isoosmolar. La actividad del (86)Rb se determina en el filtro. Los J_{in} se obtienen de la pendiente de los gráficos del (86)Rb incorporado contra tiempo y se normalizan por peso seco de PE. El J_{in} fué de 11,1 ± 9 umoles Rb / g seco h (15) para PE controles. La ouabaina (0,1 mM) bloquea el 31 % del J_{in} control. Del 59 a 62 % del J_{in} ouabaino-insensible es inhibido por el Ba (5 mM) o Ba + CTX (5 mM y 4 nM, respectivamente) mientras que la CTX (4 nM) bloquea el 48 % del J_{in} ouabaino-insensible. Se calculó que la permeabilidad para el Rb es de 14 nm/s; el Ba o la CTX desciende ese valor a 6 y 7 nm/s, respectivamente.

Subsidio PID 302230085, COMICET de la Rep. Argentina.

HIPEROSMOLALIDAD Y MECANISMOS DEL TRANSPORTE EPITELIAL DE SODIO. (Osmolality and mechanisms of epithelial sodium transport). Gazitúa, S. y Carrasco, S. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Universidad de Concepción.

Nosotros hemos sostenido que la célula epitelial se recupera de la caída del transporte de Na⁺ en hiperosmolaridad recurriendo a la activación del transportador Na⁺-K-2Cl y al aumento de la conductancia basolateral de K⁺. En piel de sapo montada en cámara con perfusión continua del lado interno, la corriente de cortocircuito (CCC) cayó mostrando cinética de saturación cuando se agregó manitol a la solución isotónica del lado interno (en dosis crecientes hasta obtener 280 mM); la caída de CCC aumentó al adicionar BaCl₂ (3mM) al lado interno y se hizo máxima al agregar amilorida (10⁻⁶ M) al lado externo: en hiperosmolaridad hay bloqueo parcial de ambas conductancias apical de Na⁺ y basolateral de K⁺. Más aún, el efecto de la amilorida fue un 40% inferior a la suma de los efectos separados de manitol y de Ba²⁺. Con menor concentración de manitol (70mM), CCC se recuperó espontáneamente en un 60%; antes de que se iniciara la recuperación, el manitol se reemplazó por urea obteniendo un 100% de recuperación, efecto que fue bloqueado por Ba²⁺ en un 70%; durante la recuperación de volumen, el alza del transporte de Na⁺ ocurre en su mayor parte por un aumento de la conductancia basolateral de K⁺. La caída parcial de la conductancia de Na⁺, a pesar de la concentración saturante de manitol, sugiere la existencia de dos grupos de canales de Na⁺: uno regulatorio de volumen y otro no regulatorio.

Proyecto Dirección de Investigación. U. de Concepción 20.33.46.

CARACTERIZACION INICIAL DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR TRANSPORTE MEMBRANOSO DE HIERRO. (Initial characterization of an experimental model to determine membrane iron transport). Escobar, A., Ahumada, A., Lanau, X. y Núñez, M.T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Durante el proceso de incorporación celular, el hierro es transportado a través de la membrana antes de acceder al citoplasma. En este trabajo definimos algunas características de este proceso utilizando como modelo experimental fantasmas sellados de reticulocitos de conejo.

Se prepararon fantasmas de reticulocitos por lisis hipotónica, centrifugación diferencial y centrifugación en gradiente de sacarosa. Los fantasmas fueron sellados por incubación en salino (pH 7,0) en presencia de 1 mM MgSO₄. El sellamiento se comprobó midiendo la permeabilidad de albúmina de bovino marcada con ¹²⁵I y la accesibilidad de la gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa. Los fantasmas sellados fueron examinados por microscopía de luz y electrónica de barrido.

Se determinó la capacidad de los fantasmas para incorporar Fe²⁺ ofrecido como un complejo de ⁵⁹Fe-ascorbato (1:20, mol/mol). El sistema incorporó hierro con K_m de 5 y 200 µM para Fe²⁺ y Fe³⁺ respectivamente. La incorporación de Fe²⁺ mostró cinética de saturación siendo los puntos experimentales ajustados por una ecuación que define dos sistemas con cinéticas de primer orden. El sistema de transporte mostró dependencia a la temperatura con un punto de quiebre a los 18°C tanto para el proceso de entrada como de salida de Fe²⁺. Cinéticas de salida de ⁵⁹Fe²⁺ en presencia de ⁵⁶Fe²⁺ externo indicaron que la vía de paso puede ser un transportador. Experimentos de competencia con otros metales indicaron que la acumulación de ⁵⁹Fe²⁺ en fantasmas fue inhibida por Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ y Mn²⁺.

Concluimos que existe un sistema de transporte de hierro asociado a membrana con preferencia por Fe²⁺ que podría ser utilizado por otros metales traza.

Financiado por FONDECYT 1003-88 y D.T.I. U. de Chile.

ATPasas

FUSION ENTRE SINAPTOSOMAS Y LIPOSOMAS DE PS. ALTERACION DE LA ACTIVIDAD DE Na^+, K^+ -ATPasa. (Fusion between synaptosomes and PS liposomes. Alteration of Na^+, K^+ -ATPase activity). Bernik, D., Rivas, E. y Rodriguez de Lores Arnaiz, G. Instituto de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Fracciones sinaptosomales aisladas de corteza cerebral de rata fueron incubadas en ausencia y presencia de liposomas de fosfatidilserina (PS). La centrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa de los sinaptosomas tratados con PS mostró nuevas bandas a menores densidades de flotación. En dichas bandas se observó un incremento en la relación fósforo lipídico/proteína junto con una incorporación masiva de PS y una disminución preferencial de la fosfatidilcolina (PC) de las membranas.

El proceso de fusión fue confirmado mediante estudios del "self-quenching" de fluorescencia de la sonda octadecilrodamina B (R18).

La disminución del quenching en las bandas del gradiente de los sinaptosomas tratados con PS, además de los análisis bioquímicos, indican que en las condiciones empleadas se produce fusión entre sinaptosomas y liposomas.

Se analizó la influencia de este proceso en la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa. La incubación produce un aumento significativo de la actividad enzimática de un 30 a 50% según la fracción sinaptosomal.

Se comienza a estudiar los distintos factores que podrían intervenir en el proceso de fusión. El efecto de quelantes, de las proteínas de membrana, y de otros parámetros fisicoquímicos tales como la presión osmótica, podrían influir en este proceso.

LA FOSFORILACION DE LA SR-ATPasa POR Metal-ATP Y Metal-Pi ES CONDUCCIDA POR CATIONES. (Phosphorylation of SR-ATPase by Metal-ATP and Metal-Pi is driven by cations). J.J. Lacapere⁺, B. Trinnaman⁺, N. M. Green⁺, F. Guillaín^{*}, E. Mintz^{*} y G.L. Alonso^{*}. (*) Biophysique, CEN SACLAY, FRANCIA; (+) Prot. Struc., NIMR, LONDON, INGLATERRA; (#) Biofísica, Odontología UBA, Buenos Aires, ARGENTINA.

El transporte de calcio por la ATPasa del retículo sarcoplásmico (RS) se realiza a expensas de la energía de hidrólisis de $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$. Es posible sustituir magnesio por otros cationes; se ha medido actividad ATPásica utilizando varios complejos Metal-ATP como sustratos. El clo de la ATPasa es reversible y la fosforilación de la enzima por $\text{Mg}\cdot\text{Pi}$ es el paso inicial de la reacción de síntesis de ATP. Recientemente ha sido demostrado que otros complejos Metal-ATP pueden dar lugar a la formación de fosfoenzimas covalentes, e inclusive a la síntesis de ATP.

En este trabajo mostramos que la velocidad de formación de la fosfoenzima covalente depende del catión presente como cosustrato. Entre varios cationes utilizados, el cromo, que forma un complejo covalente con el ATP, presenta características particulares: La ATPasa es fosforilada por $\text{Cr}\cdot\text{ATP}$; la fosfoenzima es extremadamente estable; su formación no requiere la presencia de calcio en el sitio de transporte. ADP, que es usualmente liberado luego de la formación de la fosfoenzima covalente, permanece unido a la enzima, probablemente a través de su unión con el cromo. La presencia simultánea de otro catión, Mg^{2+} por ejemplo, acelera la formación de la fosfoenzima covalente.

Se discuten la función y el número de cationes que interaccionan con el sitio catalítico.

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE Na POR HIDROPEROXIDOS DE LAS CADENAS DE ACIDOS GRASOS DE MEMBRANAS DE RIÑON DE RATAS. (Inhibition of the Na-ATPase activity by fatty acid chain hydroperoxides of membranes from rat kidney). Rodríguez, A., Proverbio, I. y Marín, R. Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), A.P. 21827, Caracas 1020A (Venezuela). (Patrocinio: A.G. Lopes).

La inhibición de las actividades de enzimas de membrana por la peroxidación de los lípidos es un tema que ha sido ampliamente investigado, ya que pudiera explicar muchos procesos degenerativos como el envejecimiento celular. En el presente trabajo se estudió el efecto de la generación de hidroperóxidos de las cadenas de ácidos grasos de membranas plasmáticas laterobasales de corteza renal de ratas, sobre la actividad de una enzima asociada a la regulación del volumen celular: la ATPasa de Na. Los hidroperóxidos fueron generados a través de un tratamiento de las membranas con luz UV, a una longitud de onda de 254 nm, a una distancia lámpara-membrana de 4 cm. y a una temperatura de 4°C, por diferentes tiempos de incubación. Los niveles de hidroperóxidos se determinaron mediante el ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBA) y mediante la extracción lipídica y determinación de dienos y trienos conjugados. Se encontró que al incrementarse los niveles de compuestos reactivos con TBA de 3.75 ± 0.29 a 10.89 ± 1.26 nmoles MDA/mg prot. y de dienos conjugados de 1.63 ± 0.10 a 2.25 ± 0.18 nmoles/mg lípidos y trienos conjugados de 1.30 ± 0.34 a 2.36 ± 0.20 nmoles/mg lípidos, la actividad ATPásica de Na se inhibe en un 100%. Si el incremento en los niveles de hidroperóxidos es bloqueado mediante el uso de "eliminadores" de radicales libres como la tiourea, la actividad de la ATPasa de Na no se pierde. La inhibición ocasionada por los hidroperóxidos no es debida a un cambio en los parámetros cinéticos de la enzima. Análisis de la curva de Arrhenius sugieren que la inhibición de la actividad enzimática es debida a una disminución en la fluidez de membrana.

REACTIVIDAD DIFERENCIAL DE RESIDUOS DE LISINA ENTRE LAS CONFORMACIONES E1 Y E2 DE LA BOMBA DE CALCIO DE MEMBRANA DE ERITROCITOS. (Differential reactivity of lysine residues between E1 and E2 conformers of red cell membrane Ca^{2+} pump). Donnet, C., Carida, A.J., Ferrández, H.N. y Rossi, J.P.F.C. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-CONICET). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

El metilacetimidato (MA) reacciona específicamente con grupos amino primarios, tales como los $\epsilon\text{-NH}_2$ de las lisinas. El presente trabajo determina el efecto de la modificación de residuos de lisina con MA sobre la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática. Se incubó una suspensión de membranas de eritrocitos libres de calmodulina (CaM) con MA, en buffer bicina pH 8.30, y se demostró que dicho tratamiento produce inhibición parcial de la actividad Ca^{2+} -ATPásica medida en ausencia o en presencia de CaM, la cual no se debe a la alteración de la afinidad por CaM, ni a la variación de la afinidad por el ATP. La presencia de 5mM ATP o de $50\ \mu\text{M}$ VQp^- (que estabiliza a la enzima como $\text{E}_2\text{-VQp}^-$), durante el tratamiento con MA, previno la inhibición de la actividad en ausencia de CaM. Es conocido que la preincubación de membranas con Ca^{2+} o la remoción del sitio para CaM son tratamientos que estabilizan la enzima en conformación E1, mientras que la incubación en un medio sin Ca^{2+} y Mg^{2+} la estabiliza en E2. Se determinó el curso temporal de la inhibición por MA de la Ca^{2+} -ATPasa llevada a conformación E1 y a conformación E2, y se observó que la enzima en E1 se inhibe con una velocidad veinte veces mayor que la enzima en E2. Se comprobó además que, en condiciones en que coexisten E1 y E2, se obtiene una cinética de inhibición bifásica, pudiéndose calcular el porcentaje de la enzima en cada una de las conformaciones. Estos resultados indican que existe una reactividad diferencial de los conformeros E1 y E2 al MA, lo cual puede ser utilizado como herramienta para el estudio de la acción de diferentes ligandos sobre el equilibrio conformacional E1-E2 en la bomba de Ca^{2+} .

Con subsidios de UBA, CONICET, TWAS y ANTORCHAS.

EL SITIO DE UNIÓN PARA LA CALMODULINA COMO INHIBIDOR ENDOGENO DE LA ACTIVIDAD FOSFATÁSICA DE LA BOMBA DE Ca^{2+} DE ERITROCITOS HUMANOS. (The calmodulin-binding site as an endogenous inhibitor of the phosphatase activity of the Ca^{2+} -pump of human erythrocytes) A.J. Caride, J.T. Peoniston, and J.P.F.C. Rossi Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA-CONICET) Buenos Aires 1113, ARGENTINA y Mayo Clinic, Rochester MN. 55905, USA.

La proteólisis de la bomba de Ca^{2+} con quimotripsina, elimina la región C terminal, región que corresponde al sitio de unión de la calmodulina a la enzima (James et al (1988) J.Biol.Chem. 263, 2905). Este tratamiento produce un aumento de la afinidad aparente para el Ca^{2+} y de la V_{max} de la actividad ATPásica de la bomba. En presencia de Ca^{2+} y ATP, o del complejo Ca^{2+} -calmodulina, la bomba de Ca^{2+} expresa una actividad p-nitrofenil fosfatásica (Rossi et al (1986) B.B.Acta 858, 21). Hemos comprobado que el tratamiento de membranas aisladas de eritrocitos con quimotripsina, activa la fosfatasa eliminando los requerimientos de ATP, Ca^{2+} y Ca^{2+} -calmodulina. Por otra parte un péptido sintético diseñado siguiendo la secuencia del sitio de unión de la calmodulina (C20), inhibió completamente ($K_i=20 \mu M$) la actividad fosfatásica generada por el tratamiento con quimotripsina, pero no afectó la actividad estimulada por Ca^{2+} y ATP en la enzima intacta. En ausencia de ATP, la inhibición por el péptido C20 es no competitiva con respecto al Ca^{2+} mientras que en presencia de 2 mM ATP, el Ca^{2+} antagoniza la inhibición. Estos resultados sugieren que el sitio para la calmodulina es un inhibidor endógeno de la actividad fosfatásica y permiten proponer un mecanismo para la hidrólisis del p-nitrofenil fosfato por la bomba de Ca^{2+} .

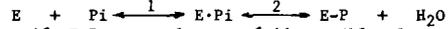
Con subsidios de ANTORCHAS, CONICET, TWAS y UBA.

ACTIVIDAD FOSFATASA DE LA Na,K-ATPasa, FOSFORILACION EN ESTADO ESTACIONARIO, CONFORMACIONES DE LA ENZIMA E INTERCAMBIO K-K. (Phosphatase activity, steady state E-P, enzyme conformations and K-K exchange). Berberián, G. y Beaugé, L., Instituto M. y M. Ferreyra, Córdoba, Argentina.

En liposomas con Na,K-ATPasa incorporada, la [E-P] por Pi no se afectó por K-cit, o Na-ext., se redujo un 50% por K-ext., y fué inexistente en presencia de Na-cit. La fosforilación por AcP se incrementó 30% por K o Na-cit; en esas condiciones K-ext. redujo en un 50% [E-P] pero no afectó el E-P formado sin Na- y K-cit. En ausencia de Mg (y de actividad fosfatasa) pNPP estimuló levemente el intercambio K-K pero AcP no tuvo efecto. En presencia de Mg (marcada actividad fosfatasa) AcP no afectó el intercambio K-K mientras pNPP produjo una estimulación mayor que sin Mg. La adición de 1 mM ADP redujo en un 30% la actividad AcPasa e incrementó el intercambio K-K a los niveles observados con 10 mM Pi. Con 3 mM Mg, la captación neta de K no fué afectada por AcP o pNPP y fué inhibida por Pi + ADP. Con 0.05 mM Mg, Pi produjo un pequeño incremento, no hubo cambios con AcP y escasa inhibición con pNPP. En fragmentos de membrana, los cambios de fluorescencia de la enzima marcada con FITC indicaron que E-P a partir de Pi corresponde a la forma E2; a partir de AcP, a E2 en presencia de Na o K y a E1 en ausencia de ambos; con pNPP y Mg la señal fué tipo E1 sin Na y K o con Na solamente y E2 en presencia de K. Estos resultados sugieren que la fosforilación por Pi y la actividad fosfatasa de la Na,K-ATPasa poseen pasos diferentes y que el intercambio K-K en presencia de actividad fosfatasa depende de la existencia de E-P pero no de los eventos bioquímicos de esa reacción.

DEMOSTRACION DIRECTA DE UNA FOSFOENZIMA ACIDO-LABIL EN EL CICLO DE LA Ca-ATPasa DEL RETICULO SARCOPLASMICO. (Direct demonstration of an acid-labile phosphoenzyme in the cycle of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase). Alonso, G. L., Takara, D. y González, D. A. Cátedra de Biofísica, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.

La Ca-ATPasa del retículo sarcoplásmico (RS) puede fosforilarse con fósforo inorgánico (Pi) como sustrato, en ausencia de Ca^{2+} , según el siguiente esquema:



La unión E-P es covalente y ácido estable; la unión E·Pi es no covalente y ácido lábil. La reacción depende de Mg^{2+} .

Fragmentos de RS depositados sobre filtros Millipore fueron perfundidos a flujo constante con dos soluciones sucesivas, ambas libres de Ca^{2+} y conteniendo dimetilsulfóxido (DMSO) 40% además de otros reactivos. Se analizaron las muestras efluentes: Perfundiendo sucesivamente soluciones sin y con Pi^{32P} , se detecta retención de 32P solo en presencia de Mg^{2+} , indicando formación de las fosfoenzimas (E·Pi y E-P). Perfundiendo las fosfoenzimas con ácido tricloroacético 5%, se libera 32P , indicando la cantidad de fosfoenzima ácido lábil (E·Pi) en equilibrio con la fosfoenzima ácido estable y los reactivos libres. La fosfoenzima ácido estable fue evaluada luego del lavado exhaustivo del filtro con ácido y Pi frío. Utilizando Pi 20 μM , las cantidades de E·Pi y E-P detectadas fueron, respectivamente, 0.72 ± 0.12 y 1.48 ± 0.10 (ES, n=5) nMoles/mg de proteína.

Los resultados indican: (1) El método permite la evaluación del intermediario fosforilado ácido lábil en el ciclo de la Ca-ATPasa del RS. $K_{eq} = k_2/k_{-2}$, es aproximadamente igual a 2.0. (2) Los resultados apoyan la hipótesis de que el sustrato de la reacción, en presencia de DMSO, es el complejo $Mg \cdot Pi$, dado que Mg^{2+} es necesario en la etapa '1' de la reacción.

EFFECTOS DE INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD Ca^{2+} -ATPasa DURANTE LA GLUCOSILACION DE MEMBRANAS DE ERITROCITOS HUMANOS. (Effects of Ca^{2+} -ATPase inhibitors during the glycation of human erythrocyte membranes) González Flecha F.L., Gagliardino J.J. y Rossi J.P.F.C. Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA-CONICET) y Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET) - ARGENTINA.

Hemos demostrado (Diabetes 39:707-711,1990) que la actividad Ca^{2+} -ATPasa de membrana de eritrocitos humanos disminuye al incubarse membranas libres de calmodulina en presencia de elevadas concentraciones de glucosa o de glucosa-6-fosfato durante 1 hora a 37°C. Este efecto responde a modificaciones en las condiciones de incubación de manera compatible con la hipótesis de glucosilación no enzimática. En el presente estudio se ensayó el efecto de la incubación de membranas con 100 mM glucosa o glucosa-6-fosfato en presencia simultánea de inhibidores de la Ca^{2+} -ATPasa. Luego de dicha incubación las membranas fueron lavadas exhaustivamente de manera de eliminar completamente estas sustancias. Los controles contenían las mismas drogas en presencia de 100 mM de manitol. Los resultados obtenidos muestran que: i) La presencia de inhibidores de la Ca^{2+} -ATPasa como 50 μM $LaCl_3$ o 100 μM NH_4VO_3 potencian significativamente la inhibición de la enzima; ii) este efecto es independiente del azúcar utilizado durante la incubación; iii) la presencia de 100 $\mu g/ml$ del compuesto 48/80 (inhibidor de la calmodulina) no modifica significativamente el efecto de los azúcares reductores. Estos resultados sugieren que durante la glucosilación de las membranas se modifican las propiedades de la Ca^{2+} -ATPasa por un efecto directo sobre la enzima.

Con subsidios de F. ANTORCHAS, CONICET, TWAS y UBA.

CARACTERIZACION DE LA FOSFORILACION DE LA Na,K-ATPasa POR ALTAS CONCENTRACIONES DE ATP. (Characterization of the phosphorylation of the Na,K-ATPase by high concentrations of ATP). Paluffo, R.D., Garraban, P.J y Reza, A.E. Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA-CONICET).

En una comunicación previa (Sociedad Argentina de Biofísica, 1989) demostramos, utilizando un equipo de flujo detenido, que en medios sin K⁺ y con 500 μM ATP la fosforilación de la Na,K-ATPasa es mucho más rápida y alcanza un valor dos a tres veces superior a la fosforilación con 10 μM ATP. El fenómeno es transitorio ya que el nivel de fosforilación decae hasta alcanzar el mismo nivel estacionario que con 10 μM ATP. Se continuó la caracterización de este fenómeno, comprobándose que: (a) la fosforilación es bloqueada totalmente por la ouabaina, (b) el fenómeno se observa en ausencia de Na⁺ si el medio contiene imidazol-HCl y requiere Na⁺ si el imidazol se reemplaza por Tris-HCl, (c) la fosfoproteína obtenida es rápidamente hidrolizada en medios con hidroxilamina, (d) toda la fosfoproteína obtenida en medios con 500 μM ATP tiene la misma movilidad electroforética que la obtenida en medios con 10 μM ATP. Los resultados sugieren que la fosforilación extra de la Na,K-ATPasa observada en medios con 500 μM ATP es causada por la formación de fosfoenzima de la ATPasa. Esto sugiere que la ATPasa tiene más sitios fosforilables que los que se expresan a 10 μM ATP y que el nucleótido ejerce un efecto de baja afinidad en ausencia de K⁺. El fenómeno observado podría deberse a la fosforilación de una clase distinta de sitios o a un efecto de baja afinidad del ATP, que induce un aumento transitorio en la disponibilidad de los mismos sitios que se fosforilan en medios con 10 μM ATP.

Con subsidios de UBA y CONICET.

Canales Iónicos

GRUPOS AMINO PRIMARIOS Y LA SECUENCIA PROBABLE DEL SITIO DE UNIÓN DE TETRODOTOXINA EN EL CANAL DE SODIO (Primary amino groups and the probable sequence for the tetrodotoxin binding site in the sodium channel) Liberona, J.L. y Jaimovich, E. Departamento de Fisiología y Biofísica, Fac. de Medicina, U. de Chile y C.E.C.S.

La modificación de grupos amino primarios (lisinas) en la membrana plasmática de músculo esquelético de anfibio inhibe la unión de tetrodotoxina (TTX) y sus derivados e inhibe, en forma específica e irreversible la corriente de sodio. El efecto sobre la unión de TTX se obtiene con diversos modificadores químicos (TNBS, fluorescamina) y puede ser protegido por TTX.

Se encuentra disponible la secuencia primaria de aminoácidos obtenidas de cDNA para 7 canales de sodio diferentes de distintas especies y tejidos, encontrándose una alta proporción de analogía entre ellas. Cinco de estos canales (de cerebro, músculo esquelético y órgano eléctrico) tienen alta afinidad por TTX y dos (músculo denervado y corazón) tienen baja afinidad.

Consideramos los siguientes criterios: a) La secuencia del receptor de TTX debe estar altamente conservada en los canales sensibles y ausente en los insensibles. b) Debe estar localizada en un segmento ubicado en la cara externa de la membrana y c) Debe contener una o más lisinas. Se detectan dos secuencias, entre los segmentos 5 y 6 de los dominios II y IV que coinciden con regiones propuestas como receptor en base a mutaciones puntuales. Este análisis sugiere que las lisinas identificadas forman parte del receptor de TTX.

Financiado por NIH GM35981, FONDECYT 972 y MDA.

MECANISMO DE ACCION DE IBEROTOXINA: UN BLOQUEADOR ESPECIFICO DE CANALES DE K⁺ ACTIVADOS POR Ca²⁺. (Iberotoxin blockade in Ca²⁺-activated K⁺ channels). Sebastian Candia, María Luisa García y Ramón Latorre. Centro de Estudios Científicos de Santiago, Merck Institute for Therapeutic Research and Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Iberotoxina (IbTX) es una toxina peptídica que ha sido purificada recientemente del veneno del escorpión *Buthus tamulus*. La toxina tiene un peso molecular de 4,3 kDa y muestra un alto grado de homología con otras toxinas que inhiben canales de potasio. En particular, IbTX tiene una gran homología con la carbodotoxina (CTX) una toxina que bloquea en el intervalo nanomolar de concentración a canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (K(Ca)). Iberotoxina bloquea con una especificidad mucho más alta que CTX los canales K(Ca) y por lo tanto es importante elucidar su modo de acción. Esto se ha llevado a cabo estudiando el efecto de la IbTX sobre canales K(Ca) de músculo incorporados en bicapas planas de lípidos por el método de fusión. Iberotoxina a concentraciones nanomolares agregada al medio externo es capaz de inducir un estado cerrado en el canal K(Ca) con una duración de varios minutos. Estos períodos en que el canal permanece inactivo están separados por estallidos de actividad. Los largos períodos de inactividad pueden ser interpretados como períodos en que la toxina impide el paso de corriente a través del canal. A medida que la concentración de toxina aumentada la duración de los períodos de actividad se acorta. Los tiempos de duración de los períodos activos y bloqueados se distribuyen exponencialmente en el tiempo. Se encontró que el recíproco de los tiempos medios de los períodos activos depende linealmente, en tanto que el tiempo promedio de los períodos bloqueados es independiente de la concentración de IbTX. Estos resultados pueden ser interpretados sobre la base de un simple modelo de dos estado del tipo: activo + IbTX ↔ bloqueado con constantes de rapidez k_{on} para la reacción de bloqueo y k_{off} para la disociación de la toxina del canal. Se encontró un $k_{on} = 4,4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ y un $k_{off} = 0,0049 s^{-1}$ ($K_d = 0,89 nM$) lo que indica una alta afinidad de la toxina por el canal K(Ca). El tetraetilamonio compite con la IbTX. Ya que el TEA bloquea el canal K(Ca) ubicándose en la boca externa del canal, es probable que el sitio de unión de la IbTX se encuentre en el mismo lugar. Financiado por FONDECYT y NIH.

EFFECTO DE LA DESNERVACION SOBRE EL CANAL DE K-Ca ACTIVADO (BK) EN MUSCULO ESQUELETICO. (Effect of denervation on K-Ca activated channel (BK) in skeletal muscle). Biali, F. I., Escobar, A.L.M., Schinder, A.F., Nicola Siri, L.C. y Uchitel, G.D. Instituto de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Con el fin de estudiar el efecto de la deservación sobre las propiedades del canal de Potasio activado por Calcio en músculo esquelético de mamífero se procedió a la sección del nervio ciático (8-10 mm) y la posterior disección del músculo EDL. El estudio de los canales fue realizado en vesículas membranosas obtenidas por tracción mecánica de los mismos (Stein y Palade, 1989). Los músculos contralaterales fueron usados como controles.

Se utilizó la técnica de patch-clamp en configuración inside-out siendo la solución tanto del baño como de la pipeta 140 mM KCl, 5 mM MOFS (pH 7.2) y 5 o 14 μ M Ca. El estudio de la conductancia del canal no arrojó diferencias significativas siendo de 266 ± 30 pS para músculos normales y 258 ± 40 pS para músculos deservados.

Las probabilidades de canal abierto encontradas a 5 y 14 μ M Ca tanto para músculos normales como para deservados no presentan diferencias respecto de los resultados obtenidos por Barret y col. en cultivo de miotubos. Se comprobó la independencia de los canales ajustándose los histogramas de amplitudes a una distribución binomial.

La probabilidad de aparición del canal (BK) en los sellos obtenidos respecto del total de canales observados fue más frecuente en los músculos normales (0.7 n:43) respecto de los deservados (0.27 n:30).

CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES DEL CANAL DEL RECEPTOR NICOTÍNICO OBSERVADOS DURANTE MODIFICACIONES QUÍMICAS DE GRUPOS TIOLES (Changes in channel properties of acetylcholine receptors during the time course of thiol chemical modifications). Bouzat, C., Barrantes, F.I., y Sigworth, F.J., ¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas, CONICET/Univ. Nac. Sur, Argentina y ²Departamento de Fisiología, Universidad de Yale, Estados Unidos.

La influencia de los grupos tioles sobre la función del receptor colinérgico nicotínico (AChR) de células clonales musculares BC3H-1 fue evaluada utilizando la técnica de patch-clamp en la configuración "cell-attached". El tratamiento con 1 ó 5 mM ditiotreitól (DTT) o con 5 mM N-etilmaleimida (NEM) no produce cambios en la conductancia ni en el tiempo medio de estado abierto del canal. Sin embargo, la reducción con DTT seguida de alquilación con NEM produce cambios en el AChR. Bajo estas condiciones, los canales activados con 2μ M acetilcolina (ACh) muestran tiempos de estado abierto menores (aproximadamente 15 veces menor) y una leve disminución en la corriente del canal único. Ambos cambios son dependientes del tiempo de exposición y concentración de NEM. La modificación química no afecta significativamente la frecuencia de apertura del canal. Cuando el AChR reducido y alquilado es activado con 100μ M ACh, se observan episodios de aperturas separados por períodos silentes de aproximadamente 1 s. La probabilidad de encontrar al canal abierto, calculada para aperturas dentro de un mismo episodio, disminuye alrededor de 10 veces en relación a canales no modificados. Las observaciones a altas concentraciones de ACh demuestran que el AChR reducido y alquilado es capaz de sufrir desensibilización, aunque con características diferentes del AChR nativo.

INCORPORACION DE CANALES IONICOS DE BACTERIAS GRAM POSITIVO EN BICAPAS PLANAS DE FOSFOLIPIDOS. (Incorporation of ionic channels from Gram-positive bacteria into planar phospholipid bilayers). Alcayaga C., Carrasco A. y Wolff D. Departamentos de Biología y Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Estudios electrofisiológicos y bioquímicos han demostrado la presencia de canales iónicos en todas las células de organismos eucariontes de diferentes phyla, lo que sugiere un origen evolutivo común de estas proteínas. Aunque no existen estudios en los que se haya realizado una caracterización de los canales iónicos de membranas plasmáticas de bacterias, es posible que éstos se encuentren ya presentes en estos procariontes.

En este trabajo describimos la preparación de una fracción de vesículas de membrana plasmática de la bacteria *Bacillus subtilis* cepa 161 y su incorporación en bicapas planas de fosfolípidos.

Las vesículas se prepararon por lisis en medio hiposmótico de protoplastos obtenidos por digestión, con lisozima en un medio hiperosmótico, de la pared celular de un cultivo bacteriano crecido hasta la fase exponencial tardía. Las vesículas se purificaron en un gradiente discontinuo de sacarosa y el enriquecimiento de la fracción de membrana celular se siguió por medición de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa.

Resultados preliminares muestran la incorporación a la bicapa de diversos canales iónicos provenientes de la fracción enriquecida en membrana celular de *Bacillus subtilis*. Entre los más frecuentes, hemos identificado un canal levemente catiónico, con una razón de permeabilidades $P_{K/P_{Cl}} = 1.8$ y que en soluciones simétricas de KCl (300/300 mM) tiene una conductancia de aproximadamente 320 pS. También hemos observado un canal selectivo a cationes cuya conductancia es de alrededor de 180 pS en KCl 300/300 mM. Ambos canales presentan sub-estados de menor conductancia y no muestran una clara dependencia del potencial eléctrico.

Financiado por proyecto FONDECYT 1111/90.

ACTIVACION POR AMPc DE UN CANAL CELULAR DE CLORURO EN PIEL AISLADA DE SAPO. (Activation by cAMP of a cellular chloride channel in the isolated toad skin). Castillo G., Coviello A. y Orce G. Depto. Fisiología, INSIBIO (UNT/CONICET), C. de correo 38, 4000 Tucumán, Argentina.

La teofilina (alkilxantina que aumenta la concentración intracelular de AMPc) causa en la piel aislada del sapo *Bufo arenarum* un aumento del transporte transepitelial de sodio, medido por la corriente de cortocircuito (CCC). En ausencia de Cl⁻ la conductancia transepitelial (G) aumenta también en forma proporcional a la CCC. En presencia de Cl⁻, en cambio, el aumento de G es desproporcionadamente alto, demostrándose la existencia de un componente de la G independiente de la CCC y dependiente del Cl⁻. Según evidencias previas de nuestro laboratorio, dicho componente de G tiene localización principalmente celular. En piel tratada con teofilina en ausencia de Cl⁻ y luego expuesta a concentraciones crecientes de Cl⁻ se producen aumentos de G sólo cuando el Cl⁻ en contacto con la cara epidérmica (pero no dérmica) alcanza una concentración de 5 mEq/l o mayor. La exposición de la piel al dinitrofenol (DNP, desacoplador de la fosforilación oxidativa) previene o revierte los cambios inducidos por la teofilina, lo que interpretamos como una inhibición del canal de Cl⁻ por la droga. En contraste, el efecto del dibutilil AMPc no es modificado por el DNP. Estos resultados indican que la apertura del canal de Cl⁻ activado por AMPc requiere de una concentración umbral de Cl⁻ en el baño epidérmico (sugiriendo que el sensor se encuentra localizado en la membrana apical), y sugieren también que el efecto inhibitorio del DNP se realiza en una etapa previa al sitio de acción del AMPc. Estos resultados, sumados a la diferencia de velocidades con que produce la inhibición de la CCC y de la G luego de la exposición al DNP, sugieren que la inhibición de la conductancia al Cl⁻ por el DNP se debe probablemente más a la inhibición de la producción de AMPc que al agotamiento del ATP.

EFFECTO DE ODORANTES SOBRE LA RESPUESTA ELECTRICA DE NEURONAS AISLADAS DE EPITELIO OLFATORIO DE VERTEBRADO. (Effect of odorants on the electrical response of isolated vertebrate olfactory neurons). Morales, B., Montesino, H., Labarca, P., Bacigalupo, J. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Centro de Estudios Científicos de Santiago.

Las neuronas olfatorias de vertebrados responden a una gran diversidad de agentes químicos (odorantes) con un aumento en la frecuencia de potenciales de acción (PA). Los mecanismos de quimiotransducción involucrados en esta respuesta son aún desconocidos. Evidencias bioquímicas sugieren que algunos odorantes ejercen su acción a través de AMPc o del IP_3 . Se estudió el efecto de estos odorantes sobre la generación de PA en neuronas aisladas de epitelio olfatorio de *Caudiverbera caudiverbera*.

Las neuronas fueron estimuladas con una mezcla de odorantes (100 μ M de cada uno) contenidos en una micropipeta localizada a 20-80 μ m de la célula. El estímulo se aplicó mediante pulsos de presión. Los potenciales de acción se registraron usando la técnica de patch clamp en configuración de registro extracelular.

Un 60% de las neuronas que presentaban PA espontáneas respondió con un aumento en la frecuencia de PA de manera dosis-dependiente, en respuesta a una mezcla conteniendo odorantes que estimulan la adenilato ciclasa (AC) y la fosfolipasa C (FC). Los estímulos produjeron un tren de PA seguido de un período silente producto de la adaptación al estímulo. Este mismo patrón de respuesta se observó con una mezcla conteniendo solamente odorantes que estimulan la AC; sin embargo, las mismas células no respondieron a una mezcla de odorantes que estimulan la FC. Con el propósito de investigar posibles interacciones entre los mecanismos de quimiotransducción empleados por ambos grupos de odorantes, se perfundió sucesivamente la cámara con concentraciones nM de cada uno de los odorantes presentes en ambas mezclas. Algunos de estos odorantes redujeron tanto la actividad espontánea como la respuesta al estímulo de la micropipeta, mientras que otros no tuvieron efecto.

Estos resultados: 1) muestran que los odorantes que estimulan la AC producen una respuesta eléctrica, 2) sugieren que los odorantes que estimulan la FC inhiben la actividad eléctrica y 3) Muestran que ambos mecanismos de quimiotransducción interfieren entre sí.

Proyectos FONDECYT 90-1116 y 88-1167.

PARTICIPACION DE LA ADENILATO CICLASA DE CILIOS QUIMIOSENSORES DE RANA CHILENA *CAUDIVERBERA CAUDIVERBERA* EN LA QUIMIOTRANSDUCCION OLFATORIA. (Role of chemosensory cilia adenylate cyclase from the Chilean frog *Caudiverbera caudiverbera* in the olfactory chemotransduction). Schmidt, P. y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Los mecanismos de transducción de la señal olfatoria están poco esclarecidos. En los cilios olfatorios de rana chilena hemos encontrado una elevada actividad basal adenilato ciclasa (0,2-1,5 nmol cAMP/min x mg proteína) estimulada aproximadamente 2 veces por GTP y de 5 a 7 veces por GTP γ S. Para establecer la participación de las proteínas G en la actividad adenilato ciclasa, realizamos estudios de ADP-ribosilación de los cilios olfatorios en presencia de [α - 32 P-NAD] y toxina del cólera. Se encontró como único sustrato de la toxina a una proteína de 42 KDa, correspondiente a la subunidad Gs α , capaz de estimular a la adenilato ciclasa. Asimismo, la ADP-ribosilación por la toxina *Bordetella pertussis* reveló la presencia de dos sustratos de la toxina de 41 y 40 KDa, correspondientes a las subunidades Gi α y probablemente Go α , respectivamente. Para establecer el papel de la adenilato ciclasa en la quimiotransducción olfatoria, se probó el efecto de dos sustancias químicas odoríficas (citralva y ácido isobutírico) en ausencia y en presencia de GTP y GTP γ S a una concentración saturante de 10 μ M. Citralva, 100 μ M, activó a la enzima en un 50 % con respecto a la estimulación por GTP. En presencia de GTP γ S, no tuvo efecto, al igual que ácido isobutírico 100 μ M en presencia de GTP. Estudios realizados con L-aminoácidos, descritos como estimuladores de la enzima en cilios olfatorios de pez, tuvieron un leve efecto inhibitorio en presencia de GTP 10 μ M, lo cual resalta el efecto de citralva en nuestro sistema. Además, citralva (100 μ M) varió los requerimientos de GTP disminuyendo el S $_0,5$ para este nucleótido. El efecto de citralva permite correlacionar la estimulación de la actividad adenilato ciclasa con el sistema quimiotransductor de la señal olfatoria donde Gs tiene un papel preponderante.

Financiado por proyectos FONDECYT #1133-89 y 1116-90.

VISUALIZACION MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL DE SEÑALES DE CA $^{2+}$ EN MIOCITOS CARDIACOS AISLADOS. (Visualization of Ca $^{2+}$ signals by confocal microscopy in isolated cardiac myocytes). Santi, C. y Hernández-Cruz, A. Depto. de Biofísica, Fac. de Medicina, Universidad de la República, Uruguay, y Dept. of Neurosciences, Roche Institute of Molecular Biology, E.U.

Las variaciones de [Ca $^{2+}$], que resultan de la despolarización de las células cardiacas resultan de: 1) Influjos de Ca $^{2+}$ por canales de calcio voltaje-dependientes, 2) Liberación de Ca $^{2+}$ del retículo sarcoplásmico y 3) Entrada de Ca $^{2+}$ a través del intercambiador Na $^+$ /Ca $^{2+}$. Aquí se examina la contribución por separado de c/u de estos mecanismos y se estudia, a nivel subcelular, la distribución espacial de Ca $^{2+}$ durante la generación de estas variaciones. Utilizamos microscopia confocal por barrido laser en combinación con el indicador fluorescente fluo-3 para obtener tanto imágenes digitales como registros analógicos de las variaciones de Ca $^{2+}$ asociadas a la despolarización de miocitos aislados del corazón de cobayos adultos. Encontramos que estas variaciones no son uniformes, habiendo diferencias de hasta 4 veces entre distintas regiones de la célula. Comparando las respuestas a alto potasio y cafeína (10 mM), encontramos que las segundas son menores, más rápidas, y se originan de forma localizada. En acuerdo con la noción prevalente del mecanismo de acoplamiento excitación-contracción en este tejido, encontramos que la perfusión con 20 μ M de ryanodina (bloqueante específico del canal del retículo sarcoplásmico) o 10 μ M verapamil (bloqueante del canal de calcio del sarcolema) disminuyeron la magnitud de los transitorios de Ca $^{2+}$ en un 42 y 80% respectivamente. La contribución del intercambiador Na $^+$ /Ca $^{2+}$ operando en modo reverso es bastante modesta en condiciones normales. Sin embargo esta se vio incrementada significativamente en presencia de ouabaína (30 μ M) o al reducir la concentración extracelular de Na $^+$, posiblemente por desplazamiento del potencial de equilibrio del intercambiador hacia valores más negativos. Finalmente, nuestros resultados no parecen apoyar la supuesta participación de canales de Na $^+$ TTX-sensibles en la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico.

LA ACIDIFICACION INTRACELULAR INDUCE UNA DISMINUCION EN LA CONDUCTANCIA DEL CANAL DE K $^+$ ACTIVADO POR CALCIO DE TUBULO TRANSVERSO DE RATA INCORPORADO EN BICAPAS PLANAS DE FOSFOLIPIDOS. (Intracellular acidification induces a conductance decrease in the calcium-activated K $^+$ channel from rat transverse tubule incorporated into phospholipid planar bilayers). Laurido, C., Wolff, D. y Latorre, R. *Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago, *Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y *Centro de Estudios Científicos de Santiago.

En este trabajo presentamos resultados preliminares del efecto del pH intracelular en la conductancia del canal de potasio activado por calcio de túbulo transverso de músculo esquelético de rata incorporado en bicapas artificiales de fosfolípidos. En presencia de una solución de KCl 300 mM simétrico, la acidificación del lado intracelular desde pH 8 a 4 reduce la conductancia del canal de 286 pS a 150 pS.

Si se supone que los protones producen este efecto ligándose a sitios presentes en la vía de conducción del canal, se puede calcular la constante de disociación sitio-protones (K_p) y el número mínimo de protones (n) que se unen a estos sitios. Para ello, los valores de corriente a través del canal a diferentes pH a un voltaje constante de +30 mV fueron ajustados según un modelo simple de unión de los protones a un sitio presente en el lado intracelular de la proteína-canal, de acuerdo a la siguiente expresión: $I = I_{max} [1 - ([H^+]/(K_p + [H^+]))^n]$, donde I es la corriente a un pH determinado, I_{max} es la corriente máxima y $[H^+]$ la concentración de protones.

Los resultados obtenidos dan un valor para el número de Hill cercano a 1,0 y de 5,7 para el pK $_p$. Dado que los experimentos fueron realizados usando bicapas neutras de fosfolípidos y concentraciones altas de potasio, es improbable que una alteración de la carga superficial de la bicapa estuviera dando cuenta de la disminución en la conductancia. Estos resultados sugieren que los protones estarían titulando un sitio presente en la vía de conducción. Aunque los experimentos realizados no permiten identificar él o los sitios responsables de este efecto, los resultados sugieren que se trata de un sitio diferente al involucrado en los cambios de la cinética de activación del canal inducido por pH cuyo pK $_p$ es de 6,6 (Laurido, C. Tesis de Magíster. U. Chile. 1989).

Financiado por FONDECYT 0451/88, Tinker Foundation y NHI-35981.

PROPIEDADES DEL CANAL DE K^+ DE LA MEMBRANA DE VESÍCULAS CITOPASMÁTICAS DE *CHARA CONTRARIA*. (Properties of the K^+ channel in the membrane of *Chara contraria* cytoplasmic droplets). **Zanello, L.P. y Barrantes, E.L.** Instituto de Investigaciones Bioquímicas CONICET/Univ. Nac. Sur, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

La membrana que rodea a la vesícula citoplasmática obtenida de célula internodal del alga *Chara contraria* muestra actividad de canales iónicos. Mediante la técnica de patch-clamp, hemos registrado la presencia de un canal de K^+ altamente selectivo para este ion y dependiente del voltaje en un rango de -100 mV a +160 mV de potencial de pipeta aplicado y medido los tiempos de estados abierto y cerrado por métodos computacionales. La conductancia del canal para una concentración de Cl_2Ca 132 mM, Cl_2Ca 5.5 mM y Cl_2Mg 5.5 mM en el baño y la pipeta fue de 85 pS para la corriente de salida y 110 pS para la corriente de entrada. Los registros evidenciaron un comportamiento en "estallidos" (bursts), con duraciones entre 5 y 8 ms en el rango de voltajes de pipeta aplicados. El número promedio de eventos por estallido varió entre 2 y 6 para diferentes registros. Las distribuciones de frecuencias de tiempos de estados abiertos del canal se ajustaron, en la mayoría de los casos, a funciones exponenciales simples (entre 0.6 y 1.8 ms según el voltaje aplicado al área de membrana). Fueron frecuentes los registros con más de un nivel de actividad (canales múltiples). Las distribuciones de frecuencias de tiempos de estados cerrados se ajustaron a funciones multiexponenciales, revelando una cinética relativamente compleja. En adición a la configuración de patch adherida a la vesícula entera ("whole-cell"), se obtuvieron registros en las configuraciones de trozos "inside-out" de membrana. Se estudió, además, el efecto de otros cationes (Na^+ , Cs^+ , TEA^+) sobre los tiempos de estados abiertos del canal.

CORRIENTES MACROSCÓPICAS USANDO LA TÉCNICA DE PATCH PERFORADO EN UNA LÍNEA CELULAR DE MUSCULO ESQUELÉTICO HUMANO. (Macroscopic currents using the perforated patch technique in a human skeletal muscle cell line.) **Evzein, K., Hidalgo, J., Tascón, S., Caviedes, R. y Jaimovich, E.** Depto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Centro de Estudios Científicos de Santiago.

La técnica de patch perforado es una nueva modalidad de obtener corrientes macroscópicas en células sin dializar su interior de cofactores necesarios para mantener la actividad de algunos canales iónicos. Esto se logra agregando ionóforos a la pipeta que al formar poros en la membrana, permiten el flujo de cationes y aniones sin mayor selectividad. (Korn y Horn, 1989. *J. Gen. Physiol.* 24, 789.)

Hemos aplicado esta técnica en una línea celular proveniente de biopsias de músculo esquelético humano. Estas células se mantienen en un medio de diferenciación 1 a 2 días previo de su uso para registro de corrientes en voltaje clamp. Hemos agregado como ionóforo nistatina (100 µg/ml) a la pipeta de registro que contiene ya sea KCl 6 CaCl como el componente iónico mayoritario.

Manteniendo el potencial a -70 mV y usando un protocolo de pulsos despolarizantes vemos corrientes de salida durante el pulso y corrientes de "cola" de entrada al volver a -70 mV. La corriente de salida corresponde cercanamente a una de las corrientes de potasio descrita en células de músculo esquelético humano en cultivo primario (Trautmann, et al., 1986. *Pflugers Arch.* 406: 163). Además la corriente de cola es muy similar a una conductancia a cloruro dependiente de calcio en músculo de embrión de pollo en cultivo (Steele, J. A., 1989. *Pflugers Arch.* 414: 265). Sin embargo hasta ahora no hemos detectado corrientes de entrada atribuíbles a una conductancia para sodio. Esto último puede deberse al temprano estado de diferenciación presente en estas células.

Esperamos usar este procedimiento para caracterizar las conductancias iónicas presentes en estas células así como la posible expresión de otras conductancias al inducir diferenciación.

Financiado por NIH-GM35981, Fondecyt-896 y MDA.

EFFECTO DEL L-GLUTAMATO EN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN EL MUSCULO DE LA LARVA DE *Drosophila*. (Effects of bath-applied L-glutamate on synaptic transmission in *Drosophila* larval muscle.) **Díaz, F.** Centro de Estudios Científicos de Santiago, Casilla 16443, Santiago 9, Chile y Depto. de Biología, Fac. de Ciencias, Univ. de Chile. (Patrocinio: P. Lebarca).

L-glutamate (L-glu) has been postulated as the or one excitatory neurotransmitter in *Drosophila* larval muscle (Jan & Jan, 1976, *J. Physiol.* 262: 215). However, insect haemolymph contains L-glu at concentrations known to lead to complete receptor desensitization (Usherwood & Machill, 1968, *J. Exp. Biol.* 49: 341; Dudel et al., 1990, *Biochem. J.* 57: 533). The fact that synaptic transmission can operate in the presence of agonist in the solution surrounding the muscles in *Drosophila* larvae could be explained by the presence of excitatory synapses operating through a different transmitter; alternatively, the concentration of L-glu in the intimate synaptic environment could be significantly lower than in the fluid surrounding the muscle. We studied nerve-evoked postsynaptic potentials (nepps) and spontaneous miniature end-plate currents (smeps) in *Drosophila* larval muscle in order to assess the effects of bath-applied L-glutamate (L-glu) on synaptic transmission. The experimental results show that L-glu, at concentrations above 2 mM, abolishes nepps. The amplitude of nepps is diminished by bath-applied agonist in a dose-dependent fashion, but nepps can be recorded at [L-glu] as high as 2 mM. These results indicate that L-glu-sensitive receptors are the only type of excitatory receptors present in these muscles and that [L-glu] in the intimate synaptic milieu might be considerably lower than in the external solution. Consequent with the above results, we found that the amplitude of smeps is diminished only at [L-glu] above 100 µM. smeps can be recorded up to 500 µM agonist in the bath but become undetectable at 1 mM. The presence of L-glutamate affects the decay times of smeps suggesting that the concentration of agonist in the external solution modulates the properties of L-glu receptors in *Drosophila* larval muscle.

Financiado por FONDECYT 1167\88, NIH GM-35981 and the Tinker Foundation.

ESTUDIO DE LOS ESTADOS CERRADOS DE LARGA DURACION EN EL CANAL DE POTASIO ACTIVADO POR CALCIO DE MUSCULO. (Study of the long-lived closed states in the Ca-activated K-channel from muscle.) **Malebrán, N., Latorre, R., Cecchi, X.** Depto. Biología, Fac. de Ciencias, U. de Chile y Centro de Estudios Científicos de Santiago.

El canal de potasio activado por calcio es bloqueado por iones bario en el lado citoplasmático. En presencia de bario, el canal presenta períodos de actividad (bursts), durante los cuales se abre y se cierra en la escala temporal de milisegundos y períodos de silencio, que duran segundos, durante los cuales no conduce iones. Los iones calcio ejercen un efecto parecido, aunque se ha sugerido que se debe a la contaminación por bario de todas las soluciones de sales de calcio.

En este trabajo, hemos estudiado la duración de los bursts y de los estados cerrados de larga duración en canales incorporados a bicapas que separan KCl 100 mM, MOPS 5 mM, pH 7.0, en el lado intracelular (*cis*) de una solución que sólo contiene el buffer en el lado extracelular (*trans*). La contaminación por bario de nuestras soluciones está en el rango 1 µM. En estas condiciones, encontramos que las duraciones de los bursts y de los estados cerrados de larga duración se distribuyen exponencialmente en función del tiempo, y las constantes de tiempo, a 0 mV, son de alrededor de 6 s para ambos casos. Las constantes de tiempo dependen exponencialmente del potencial aplicado, disminuyendo ambas a veces cada 50 mV. Cuando agregamos iones sulfato 10 mM al lado *cis* ($[Ba^{++}] = 10$ nM), las constantes de tiempo son de 7 s para los bursts y 5 s para los estados cerrados. En sulfato 30 mM ($[Ba^{++}] = 3$ nM), estas son de 3 y 5 s, respectivamente. En ambas concentraciones de sulfato, la dependencia de potencial es parecida a la obtenida en ausencia de sulfato.

Los resultados mostrados sugieren que, en ausencia de potasio en el lado extracelular, los estados cerrados de larga duración no corresponden a bloqueos por iones bario. Experimentos preliminares indican que la duración de estos estados tampoco depende de la concentración de calcio, en el rango entre 30 y 1000 µM. Por lo tanto, proponemos que este es un estado cinético del canal, cuya aparición sólo depende del potencial aplicado, como si fuera el resultado del movimiento de una compuerta del canal dentro de la zona donde cae el potencial aplicado.

Financiado por proyectos FONDECYT B-1112/89 y NIH GM-35981.

ESTUDIOS DE LAS CORRIENTES DE ENTRADA EN NEURONAS OLFATORIAS DE *Caudiverbera caudiverbera*: BLOQUEO POR AMILORIDA Y TTX. (Properties of inward currents in frog olfactory neurons: block by amiloride and TTX). Delgado, R. y Labarca, P. Centro de Estudios Científicos de Santiago, Casilla 16443, Santiago 9, Chile y Depto. de Biología, Fac. de Cs., U. de Chile

The ionic conductances of olfactory receptors that participate in the modulation of their excitatory properties are not well understood. We carried out studies of voltage-gated inward currents, using whole-cell clamp approaches, in olfactory neurons from the frog *Caudiverbera caudiverbera*, under conditions in which outward currents have been blocked. The results show the presence of two receptor populations regarding voltage-gated inward currents. One population (Type I) displays a transient and a maintained component while a second one (Type II) displays only the transient component. In both types of cells the transient component peaks at about zero-applied voltage. The maintained component present in type I cells peaks at voltages 10-20 mV more positive. Transient and maintained inward currents can be recorded in the absence of external Na^+ , in a buffer containing 5 or 20 mM Ca^{2+} , or in the absence of external Ca^{2+} , but under normal Na^+ , suggesting that both cations can permeate these voltage-gated conductances. Amiloride, in the 40-300 μM range blocks both transient and maintained components with similar affinities ($K_{0.5} \approx 160 \mu\text{M}$). This effect of amiloride is independent of the holding voltage and the blocker does not affect the inactivation properties of the transient inward currents. TTX, at 10 μM , completely abolishes the transient component but has little effect on the maintained inward currents. These results indicate that transient and maintained components of inward currents recorded from frog olfactory receptors are pharmacologically distinguishable.

Supported by FONDECYT 1167/88, 1116/90, NIH GM-35981, and the Tinker Foundation.

INCORPORACION DE MEMBRANAS DE PLACENTA HUMANA A LIPOSOMAS GIGANTES. (Incorporation of human placental membrane vesicles into giant liposomes). Riquelme, G., Liberona, J. L., Equiguren, A. L., Stutzin, A. y Barros, L. F. Departamentos de Fisiología y Biofísica, y de Medicina Experimental, Facultad de Medicina División Norte, Universidad de Chile.

A partir de una fracción microsomal (Glazier y cols., 1988, modificado) obtenida de trofo- blasto de placenta humana de término se han obtenido, mediante gradiente discontinua de sacarosa, fracciones enriquecidas en membrana apical. Los criterios de purificación y de enriquecimiento utilizados fueron la electroforesis de poli-acrilamida y marcadores enzimáticos. Las membranas obtenidas se fusionaron con vesículas lipídicas pequeñas mediante técnicas de deshidratación/rehidratación (Criado y Keller, 1987; Riquelme y cols., 1990). Este método permite obtener liposomas gigantes de tamaños semejantes o mayores al de una célula (10-60 μM) permitiendo el registro de canales iónicos únicos con la técnica de 'patch-clamp' convencional. La funcionalidad de los canales iónicos provenientes de membrana apical incorporados a los liposomas fue estudiado en sellos aislados (configuración 'inside-out'). Generalmente se registró más de un nivel de conductancia que puede corresponder a varios canales, diferentes tipos de ellos o subestados. Esta preparación de membranas y su incorporación a liposomas gigantes nos ha permitido comenzar la caracterización de las conductancias iónicas presentes en este tejido de difícil acceso a técnicas electrofisiológicas clásicas.

Financiado por Proyecto Fondecyt 0448-88 y The Wellcome Trust U.K.

MODULACION DIFERENCIAL DE CANALES DE CALCIO DE RETICULO SARCOPLASMATICO. (Differential modulation of calcium channels from sarcoplasmic reticulum). Marango, J.J. y Bull, R. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El músculo esquelético se contrae como consecuencia de la liberación de calcio por el retículo sarcoplasmático (RS), a través de canales iónicos. Hemos estudiado la modulación de canales de calcio del retículo incorporados por fusión en bicapas planas de fosfolípidos.

IP_3 activó, en concentraciones micromolares, cerca del 50% de los canales aumentando el tiempo fraccional abierto (P_o), sin cambiar la conductancia. Los canales activados por IP_3 fueron infrecuentemente activados por 10 mM cafeína. Por otro lado, el 95% de los canales que fueron activados por concentraciones milimolares de cafeína, no lo fueron por IP_3 .

Tetracaína, un anestésico local que bloquea la liberación de calcio inducida por calcio, mostró un efecto complejo sobre la cinética de los canales. En canales activados por 1 mM ATP (a pCa 5 ó 6) tetracaína aumentó P_o desde 0.56 a 1 en forma dependiente de la concentración (0.25 a 4 mM), sin cambiar la conductancia. La duración promedio de los aperturas aumentó y la de los cierres se redujo. Por otro lado, en canales activados por cafeína a pCa 7, tetracaína (0.05 a 1 mM) disminuyó P_o .

Estos resultados sugieren que el RS posee al menos dos tipos de canales con diferente perfil farmacológico. Alternativamente puede existir un solo tipo de canal cuya sensibilidad dependa de las condiciones previas de activación.

Financiado por Proyectos FONDECYT 1298, 902 y 972 y NIH GM 35981.

ESTUDIOS PRELIMINARES DEL EFECTO DE POTENCIAL DE MEMBRANA SOBRE EL METABOLISMO DE FOSFOINOSITIDOS EN CELULAS DE MUSCULO ESQUELETICO HUMANO EN CULTIVO. (Effect of the membrane potential on phosphoinositide metabolism in human skeletal muscle cells in culture. Preliminary studies). Reyes, R., Carrasco, M. A., Tascón, S., Caviedes, R. y Jaimovich, E. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Centro de Estudios Científicos de Santiago.

Utilizando una línea celular de músculo esquelético humano establecida en nuestro laboratorio se realizaron experimentos preliminares tendientes a generar un modelo de estudio del metabolismo de fosfoinositidos en tejido muscular.

Las células presentan un tiempo de duplicación de 24 hrs, una eficiencia de plaqueo superior al 20%, y se diferencian formando estructuras multinucleadas tipo miotubo en presencia de un medio inductor de fusión (bajo suero, insulina y transferrina, DMSO). Estas células presentan marcadores característicos de músculo como miosina, desmina y creatinquinasa MM.

En células incubadas con ^3H -inositol, la incorporación de marca a fosfolípidos de inositol se determinó por TLC de los lípidos extraídos con solvente, mientras que en la fracción acuosa se pesquisó la radiactividad de los inositoles fosfato separados por cromatografía de intercambio iónico.

La incorporación de marca se satura entre las 24 y las 48 hrs manteniéndose constante después de este tiempo. En la fase orgánica, un 82-90% de la marca se recupera como fosfatidilinositol (PI), un 2-6% como fosfatidilinositol monofosfato (PIP) y un 2-4% como fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂). También se logra detectar otro fosfoinositido al incubar con ^3H -glucosamina.

Una elevación de la concentración de K^+ en el medio induce incrementos en la marca de PIP₂ y de PIP, así como variaciones en la marca de los inositolpolifosfatos.

Financiado por: NIH GM 35981, FONDECYT 896, DTI y Muscular Dystrophy Association.

Receptores

SITIOS DE LIGAZÓN Y AFINIDAD DEL COLESTANO ESPIN-MARCADO EN EL RECEPTOR COLINÉRGICO NICOTÍNICO. (Binding sites and affinity of spin-labelled cholestane in nicotinic acetylcholine receptor). *Arias, H.R. y Barrantes, F.L.* Instituto de Investigaciones Bioquímicas CONICET/Univ. Nac. Sur. 8000 Bahía Blanca, Argentina.

El receptor colinérgico nicotínico (AChR) fue purificado del órgano estricto de *Discopyge tschudii* con una act. esp. de 4200 pmol [³H]-BTx/mg prot., utilizando para tal fin cromatografía de afinidad toxina-agarosa. El AChR puro fue reconstituido con lípidos de soja en una relación molar 5000:1, y con concentraciones crecientes del derivado del colesterol, colestano espin-marcado (CSL). El grupo nitrógeno presente en esta molécula permite extinguir la fluorescencia intrínseca de la proteína. Utilizando la ecuación desarrollada por London y Feigenson (1981) hemos relacionado la extinción de la fluorescencia (F/F₀) del AChR con la fracción molar del lípido espin-marcado (X_{CSL}): $F/F_0 = (F_0 - F_m)(1 - X_{CSL})^N + F_m$, donde F_m es la fluorescencia teórica mínima obtenida cuando X_{CSL} = 1. Fue posible así obtener el número de sitios de ligazón (N) del CSL. Por otro lado, conociendo F_m es posible graficar F₀-F_m/F-F_m vs. X_{CSL}, para derivar la constante relativa de ligazón para CSL (K_{CSL}), al comparar los datos experimentales con los perfiles teóricos que se obtienen con diferentes K. Nuestros datos permiten inferir que el AChR tiene 2 sitios de ligazón en su cara hidrofóbica para el CSL, y que este lípido se une con una constante de afinidad relativa igual a 1. Estos valores se asemejan a los obtenidos por Jones y McNamee (1988) para dibromo-fosfatidilcolina y están de acuerdo con los datos de resonancia de espin electrónico (Arias y col., BBA, en prensa), en los que el CSL es considerado un lípido con una K semejante a la fosfatidilcolina, es decir, que se une con escasa afinidad al AChR.

DISTRIBUCIÓN DE CLASES FOSFOLÍPIDICAS EN MEMBRANAS RICAS EN RECEPTOR DE ACETILCOLINA DETERMINADA POR TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE FLUORESCENCIA (TEF). (Distribution of phospholipids classes in acetylcholine receptor rich membranes determined by resonance fluorescence energy transfer (FRET)). *Bonini de Romanelli, I.C., Pietrasanta, L.I. y Barrantes, F.L.* Invest. Bioquímicas, CONICET/Univ. Nacional del Sur- 8000 Bahía Blanca, Argentina.

El receptor colinérgico nicotínico (AChR) es una glicoproteína intrínseca de membrana ubicada vectorialmente con respecto al plano de la misma. Hemos encontrado que también algunos fosfolípidos se disponen asimétricamente (Bonini de Romanelli et al., 1990). Con el fin de determinar la topografía del anillo lipídico que rodea al AChR recurrimos al uso de análogos de fosfolípidos fluorescentes y estudiamos su proximidad por TEF en membranas nativas y en membranas modelo preparadas ad-hoc con las sondas en distintas ubicaciones. Se eligieron pares donante-aceptor adecuados, con el fluoróforo en grupos acilos de diferente longitud (C6 y C12) o en la cabeza polar de las moléculas: 1-oleoil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino] caproil fosfatidilcolina (6-NBD-PC)/N-(lisamina rodamina B sulfonil) diacil fosfatidiletanolamina (N-Rho-PE); 12-NBD-PC/N-Rho-PE y NBD-PE/N-Rho-PE. En estudios anteriores demostramos con 12-NBD-PC/N-Rho-PE que la TEF observada en las membranas nativas ricas en AChR era alta (80% de eficiencia para una relación molar de 0.9, SAB 1989), evidenciando la cercanía molecular de ambas sondas. Ahora encontramos con 6-NBD-PC y NBD-PE/N-Rho-PE una eficiencia similar a la de 12-NBD-PC/N-Rho-PE. Esto sugeriría que estas clases fosfolípidicas formarían dominios muy próximos y que se encontrarían predominantemente en la misma hemicapa de la membrana.

LOCALIZACIÓN DE FOSFATIDILCOLINAS Y FOSFATIDILETANOLAMINAS EN MEMBRANAS RICAS EN RECEPTOR DE ACETILCOLINA (AChR) POR EXTINCIÓN DE LA FLUORESCENCIA Y CÁLCULO DE MINIMIZACIÓN DE ENERGÍA. (Localization of choline and ethanolamine phospholipids in acetylcholine receptor rich membranes by fluorescence quenching and energy minimization calculations). *Pietrasanta, L.I., Bonini de Romanelli, I.C. y Barrantes, F.L.* Instituto de Investigaciones Bioquímicas, CONICET/Universidad Nacional del Sur. 8000 B. Blanca, Argentina.

Con el fin de determinar la distribución de los fosfolípidos mayoritarios (PC y PE) de las membranas ricas en AChR se utilizaron las mismas sondas que las empleadas en las mediciones de TEF: dos análogos de PC y PE marcados en los ácidos grasos de diferente longitud de cadena, y dos en la cabeza polar: 6-NBD-PC, 12-NBD-PC, N-Rho-PE y NBD-PE. Se usaron como agentes extintores de la fluorescencia CoCl₂ y trinitrobenzeno sulfonato en condiciones penetrantes y no penetrantes. Se compararon con membranas modelo preparadas con las sondas en una de las hemicapas, externa o interna, de la membrana. Del análisis de Stern-Volmer modificado se concluye que los fluoróforos se ubicarían en la cara externa de la bicapa. Los datos de vida media de fluorescencia en presencia del ion Co²⁺ indican un proceso mixto de quenching. En cuanto a la ubicación relativa de los fluoróforos en la membrana, el grupo rodamina estaría más expuesto a la interfase lípido-agua que el grupo NBD. Independientemente de la posición del grupo NBD en los análogos (cabeza polar en NBD-PE; C6, o C12 en NBD-PC) el fluoróforo se localizaría en la bicapa a una profundidad similar en todos los casos. Esta singular ubicación se correlaciona con las conformaciones moleculares derivadas mediante métodos computacionales de minimización de energía.

TRANSFERENCIA DE FURA-2 EN UN EPITELIO POLARIZADO: EFECTO DE LA HORMONA ANTIDIURÉTICA (ADH). (Fura-2 transfer in a polarized epithelium: Effect of the antidiuretic hormone) *Parisi, M., Borgnia, M., Dorr, R. y Rossi, J.P.F.C.* Sección Biomembranas, Dto. Fisiología, Fac. de Medicina e Instituto de Química y Fisiología Biológica (UBA-CONICET)-ARGENTINA.

La sonda fluorescente Fura-2 es habitualmente utilizada para estimar la concentración intracelular de Ca²⁺ en células aisladas. Nuestro objetivo fue estudiar las interacciones entre la sonda mencionada y una barrera epitelial sensible a la ADH en condiciones de mantenimiento de la polaridad fisiológica. Sacos invertidos del epitelio vesical de *Bufo arenarum* fueron montados en un dispositivo especialmente diseñado para ser introducido en una cuba de espectrofluorómetro (Jasco PF 770). Se agregó Fura-2-AM al compartimiento mucoso en concentraciones entre 1 y 20 μM. Al cabo de 120 minutos se observó: 1) transferencia transepitelial de fluorescencia constituido por 66 ± 5% de Fura-2-AM y 33 ± 8% de Fura-2 libre; 2) El agregado de ADH aumentó significativamente la transferencia total de fluorescencia; 3) la hormona produjo además un significativo desplazamiento hacia el Fura-2 libre en el compartimiento seroso; 4) el aumento de fluorescencia en el tejido respecto de la autofluorescencia fue del 11 ± 5% y del 24 ± 2% cuando se incubó con 5 μM o 20 μM de Fura-2-AM respectivamente. 5) En presencia de ADH la acumulación de fluorescencia en el tejido disminuyó en un 15 ± 4%. Estos resultados indicarían que la hormona antidiurética estimula un sistema transportador de Fura-2 libre situado en la membrana laterobasal.

Con subsidios de Fundación ANTORCHAS, CONICET y UBA.

RECEPTORES BENZODIAZEPINICOS PERIFERICOS: CARACTERIZACION, LOCALIZACION Y ROL FUNCIONAL EN CELULAS INTERSTICIALES TESTICULARES. (Peripheral-type benzodiazepine receptors: Characterization, localization and functional role in testicular interstitial cells). Calvo, D., Ritta, M., Campos, M., Calandra, R. y Medina, J., Instituto de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires e Instituto de Biología y Medicina Experimental.

Se demostró la presencia de receptores a benzodiazepinas tipo periférico (RP-BZD) en células intersticiales testiculares por fijación del agonista específico ^3H -RO 5-4864, se caracterizaron farmacológicamente y estudió su localización subcelular, encontrándose una alta concentración de sitios (140 ± 23 pmol/mg prot), principalmente asociados a la fracción mitocondrial. El RO 5-4864 (RO) estimula la producción basal e inducida por hCG de testosterona (T) medida por radioinmunoensayo en este sistema. El tratamiento crónico con el agonista diazepam (DZ) 3 mg/kg provoca una inhibición en la T basal y una pérdida de la capacidad de estimular la esteroidogénesis por RO 5-4864. Además disminuye drásticamente el número de RP-BZD (41%). DZ agudo no modifica estos parámetros. Se concluye que existe una población homogénea de RP-BZD en estas células, presente en alta concentración con respecto a otros tejidos, de localización preferencialmente mitocondrial. El tratamiento crónico con DZ modula el número de RP-BZD y la respuesta esteroidogénica al RO. En base a estos resultados se postula un rol modulador para los RP-BZD en la esteroidogénesis testicular.

CARACTERIZACION DEL RECEPTOR DE APAMINA DE MUSCULO LISO DE CONEJO. (Characterization of the apamin receptor of rabbit small intestine smooth muscle). Behrens, C., Rojas, C., Vergara, C., Behrens, M. J. Centro de Estudios Científicos de Santiago y Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La apamina es un polipéptido extraído de veneno de abeja, que bloquea específicamente un tipo de canal de K activado por Ca que es de baja conductancia (canal SK). Mediante estudios de unión de ^{125}I apamina, se ha demostrado la presencia de canales SK en diversas células, en sistema nervioso central y en tejidos periféricos. Su función estaría relacionada con la hiperpolarización que sigue al potencial de acción en células excitables. En músculo liso de intestino grueso y de estómago, los canales SK serían responsables de la hiperpolarización que sigue a la estimulación de receptores α -Adrenérgicos y a la administración de ATP. En este trabajo demostramos la presencia de receptores de apamina en una preparación de membranas de músculo liso de intestino delgado de conejo y caracterizamos las propiedades de dichos receptores. La capacidad máxima de unión de ^{125}I apamina de las membranas de músculo liso y la Kd son similares a las descritas en otros tejidos. La unión de ^{125}I apamina se inhibe completamente en presencia de los detergentes: CHAPS, Tritón X100, Isolecicina y NP 40. En presencia de saponina, la unión de ^{125}I apamina no se ve afectada hasta concentraciones de 1 mM. Por otra parte, se estudió el efecto de otros bloqueadores del canal SK, como D-tubocurarina, sobre la unión de ^{125}I apamina a membranas de músculo liso. Se estudió además el efecto de iones divalentes (Ca y Mg), del pH y de la presencia de ATP en el medio. La obtención de una preparación de membranas rica en receptores de apamina permitirá, por una parte, intentar la purificación del receptor de apamina y por otra parte, realizar estudios de las propiedades biofísicas de canal único, mediante estudios de incorporación en bicapas planas de lípidos.

Financiado por proyectos FONDECYT 296-89, NIH y Tinker Foundation.

Radicales Libres

EFEECTO DE LA PERDIDA DE FMN DE LA ENZIMA NADPH-CITOCROMO P₄₅₀ REDUCTASA SOBRE LA GENERACION MICROSOMAL DE RADICALES LIBRES. (Depletion of FMN from NADPH-cytochrome P₄₅₀ reductase inhibits microsomal oxygen radical generation). S. Puntarulo y A. Cederbaum. Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El tratamiento de microsomas de hígado de rata con fosfatasa alcalina (FA) resulta en la pérdida del grupo prostético FMN pero no del FAD de la enzima NADPH-citocromo P₄₅₀ reductasa. Se realizaron experimentos para evaluar el efecto de evitar la transferencia de electrones desde FADH₂ a FMN, en la reducción de quelatos férricos, producción de H₂O₂, y la generación de $\cdot\text{OH}$. El tratamiento con FA altera la actividad NADPH-citocromo P₄₅₀ reductasa, pero no NADPH-ferricianuro reductasa. La oxidación de agentes atrapadores de $\cdot\text{OH}$ disminuyó a consecuencia del tratamiento con FA en concordancia con la disminución en la actividad de la enzima citocromo P₄₅₀ reductasa. Esta disminución en la producción de $\cdot\text{OH}$ ocurrió en presencia de varios quelatos férricos. Las velocidades de reducción de los quelatos férricos resultaron inhibidas luego del tratamiento con FA. La producción de peróxido de hidrógeno disminuyó en concordancia con la caída en la actividad de la citocromo P₄₅₀ reductasa y la producción de $\cdot\text{OH}$. La velocidad de producción de H₂O₂ parece ser el factor limitante para la generación de $\cdot\text{OH}$ ya que la adición de un sistema generador externo de H₂O₂ estimula la producción de $\cdot\text{OH}$ y previene la caída en la generación debido al tratamiento con FA. Estos resultados sugieren que ambas flavinas, FAD y FMN de la reductasa contribuyen a la reducción de los complejos férricos. Sin embargo, la pérdida del componente FMN y las actividades dependientes de la transferencia de electrones desde este grupo prostético resultan en una disminución de la producción de H₂O₂ que parece ser la responsable de la generación de $\cdot\text{OH}$ por los microsomas.

PRODUCCION DE RADICAL HIDROXILO EN NUCLEOS DE HEPATOCITOS DE RATAS SOMETIDAS A SOBRECARGA DE HIERRO. (Hydroxyl radical production by hepatocytes nuclei of iron overloaded rats). Galleano, M. y Puntarulo, S. Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Se estudió el efecto de sobrecarga de hierro sobre la velocidad de producción de radical hidroxilo por parte de núcleos de hepatocitos en presencia de un complejo de hierro (Fe-EDTA) y dos cofactores (NADH y NADPH). Ratas Wistar macho entre 100 y 200 g fueron inyectadas intraperitonealmente con una dosis única de Fe-dextrán (500 mg/kg de peso) y a las 2 y 6 h posteriores a la inyección se obtuvieron núcleos de hepatocitos por la técnica de fraccionamiento celular en gradientes de sacarosa. El mismo diseño experimental se utilizó con animales controles inyectados con dextrán (114 mg/kg de peso). La velocidad de producción de radical hidroxilo por los núcleos celulares fue determinada a través de la generación de formaldehído a partir de dimetilsulfóxido. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

	Velocidad de producción de formaldehído (nmoles/min.mg prot)	
	NADH	NADPH
Control	0.70 \pm 0.06	0.24 \pm 0.06
Tratados 2 h	0.44 \pm 0.18	0.20 \pm 0.08
Tratados 6 h	0.30 \pm 0.02	0.10 \pm 0.05

Simultáneamente se midieron las actividades de Citocromo P-450 reductasa NADH y NADPH dependientes obteniéndose a las 2 h una disminución de 11% y 4% y a las 6 h una disminución de 26% y 5% en las respectivas actividades. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento de Fe-dextrán resulta en un daño progresivo a las enzimas relacionadas con la producción de radical hidroxilo que se evidencia en una marcada disminución de la producción de formaldehído, en presencia de NADH y NADPH, al cabo de 6 h de tratamiento.

EFFECTO DEL ALUMINIO SOBRE LA PEROXIDACION LIPIDICA EN LIPOSOMAS. (Effect of aluminum on lipid peroxidation in liposomes). Oretze, P.I. y Fraga, C.G. Departamento de Química Biológica y Departamento de Físicoquímica y Química Analítica (IQUIFIB), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

En estudios previos encontramos que en cerebro de ratones alimentados con dietas que contenían elevados niveles de Al había un aumento en la producción de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), en comparación con la de ratones control. In vitro, el Al afecta la velocidad de peroxidación lipídica, medida como TBARS en homogeneizados, microsomas y mielina de cerebro de ratón. Dichas evidencias sugieren que un aumento en la peroxidación de distintos componentes celulares podría ser uno de los mecanismos involucrados en la neuropatología observada en la intoxicación con Al. Con el propósito de comprender los mecanismos bioquímicos por los cuales el Al, un catión que en la naturaleza solo existe en estado redox 3+, puede ejercer su acción prooxidante, en este estudio caracterizamos el efecto del Al sobre la peroxidación lipídica en membranas sintéticas. Los liposomas se prepararon a partir de fosfolípidos (PL) aislados de cerebro de rata o de PL comerciales, por evaporación del solvente y resuspensión en el buffer adecuado. Luego de hidratar a 45°C por 10 min, se sonicaron durante 30 min. El efecto del Al sobre la peroxidación lipídica se midió por quimioluminiscencia o a través de la capacidad de producir TBARS luego de incubación de los liposomas a 37°C en presencia de 5 y 25 μM Fe(II) y distintas concentraciones de Al (0-500 μM). El Al tuvo acción prooxidante en liposomas preparados con PL totales de cerebro y con PL comerciales. Dicho efecto fue dependiente del pH y de la composición de los liposomas. El efecto prooxidante aumentó linealmente con la proporción de fosfatidil serina en la preparación. Concurrentemente el Al produjo aumentos en la agregación de los liposomas (medido como un aumento en la Abs 300 nm) indicando la existencia de cambios físicos en las membranas que dependieron del contenido relativo de fosfatidil serina.

Estos resultados sugieren que el Al unido a las membranas produciría cambios en las propiedades físicas de las mismas exponiendo los ácidos grasos al ataque por radicales libres. Este trabajo fue parcialmente subsidiado por la Fundación Antorchas (Proyecto N 52068/1).

PRODUCCION DE RADICAL HIDROXILO POR MICROSOMAS DE PLANTULAS DE SOJA EN PRESENCIA DE COMPLEJOS FERRICOS. (Hydroxyl radical production by soybean seedlings microsomes and ferric complexes). Simontacchi, M. y Puntarulo S. Cátedra de Físicoquímica, Fac. de Farmacia y Bioquímica, Univ. de Buenos Aires.

Hipocotilos de plántulas de soja obtenidos de semillas incubadas a 26°C durante 6 días, fueron macerados en buffer: manitol 0.3 M, BSA 0.1%, cisteína 0.05%, EDTA 5 mM y Tris-HCl 0.1 M pH 7.0. El filtrado fue centrifugado: a) 30 min a 10,000 g y b) 60 min a 100,000 g. El pellet así obtenido fue resuspendido en buffer Tris-HCl 0.1 M pH 7.0 conteniendo glicerol al 50%. Tanto para la generación de especies con alta capacidad oxidante ($\cdot\text{OH}$) como para la iniciación de reacciones de lipoperoxidación, se requiere la presencia de metales de transición. En sistemas microsomales de producción de especies oxidativas ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot$, H_2O_2) está vinculada no sólo al agregado de hierro, sino también a la forma en que dicho metal es adicionado (complejado con EDTA, DTPA, ADP o citrato). La producción de $\cdot\text{OH}$, se determinó midiendo la generación de formaldehído producido por la reacción de $\cdot\text{OH}$ con dimetil sulfoxido. Las reacciones se finalizaron con el agregado de TCA, determinándose la concentración de formaldehído por el método de Nash. Dado que las enzimas microsomales utilizan electrones provenientes de NADH y NADPH, se determinó la velocidad de producción de formaldehído en presencia de ambos cofactores obteniéndose un valor de 0.62 ± 0.04 nmol/min.mg y 0.22 ± 0.06 nmol/min.mg con Fe-EDTA, 0.84 ± 0.59 nmol/min.mg y 0.25 ± 0.09 nmol/min.mg con Fe-DTPA para NADH y NADPH respectivamente. Las velocidades medidas fueron de 0.12 nmol/min.mg, 0.03 para NADPH y 0.09 nmol/min.mg para NADH respectivamente, en presencia de Fe-ADP y Fe-citrato. Estos resultados indican que la producción de radical hidroxilo por las membranas microsomales es significativamente mayor en presencia de NADH que NADPH y que los complejos Fe-EDTA y Fe-DTPA son los catalizadores más adecuados para la reacción.

POTENCIACION DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL TOCOFEROL POR ISOPRENOIDES (Potentiation of the antioxidant effect of tocopherol by isoprenoid compounds). Gonzalez Flecha, B., Evelson, F. y Boveris, A. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

La reacción del tocoferol (T) con radicales no oxigenados (R^\cdot) en la región no hidrofóbica de las bicapas lipídicas sería un paso determinante en la inhibición de la lipoperoxidación por vitamina E. En el presente trabajo se estudió la cinética de esta reacción y su posible mecanismo utilizando microsomas de hígado de rata suplementados con T (0-10 nmol/mg proteína). Se simuló estrés oxidativo por adición de hidropéroxido de terbutilo 3 mM y se determinó el consumo de O_2 (ΔO_2) debido a lipoperoxidación polarográficamente. La concentración de T requerida para inhibir el 50% del ΔO_2 fue de 5.5 ± 0.5 nmol/mg prot y la inhibición máxima fue de $87 \pm 5\%$. El valor de la constante de velocidad para la reacción: $\text{R}^\cdot + \text{T}$ fue de $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La inhibición del ΔO_2 por 1 nmol/mg prot de T (20%) fue potenciada por adición de 50 nmol/mg prot de retinal (100%) o ubiquinona (60%). Iguales concentraciones de retinal o ubiquinona en ausencia de Vitamina E produjeron 65% y 20% de inhibición del ΔO_2 , respectivamente. Se postula que la formación del radical cromonoxilo luego de la reacción del T con el R^\cdot podría involucrar la formación de un complejo de transferencia de carga entre la porción fitilo del T y restos isoprenoides de compuestos presentes en la membrana.

INDUCCION DE ESTRES OXIDATIVO HEPATICO POR MITOXANTRONE. (Induction of hepatic oxidative stress by mitoxantrone). Lores Arnaiz, S. y Liesuy, S. Cátedra de Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El mitoxantrone (Mx) es un agente antineoplásico de estructura química semejante a la de la doxorubicina (Dox), siendo su uso en clínica limitado por su toxicidad. El objetivo del trabajo fue evaluar el rol de los radicales libres en la hepatotoxicidad de Mx y Dox. Las drogas fueron administradas a ratones en una dosis única de 15 mg/kg de peso i.p., y a los 3, 4 y 5 días se llevaron a cabo los ensayos de lipoperoxidación. Se midió la quimioluminiscencia "in vivo" (QLE) e "in vitro" (QLV), formación de malondialdehído (MDA) y la concentración de H_2O_2 en estado estacionario [H_2O_2]_e. El Mx indujo a los 4 días un aumento de 155% en la QLE de hígado, y aumentos de 73% y 52% en los niveles de MDA y QLV de homogeneizado de hígado respectivamente. La administración de Dox produjo incrementos de 51% y 53% en la QLE de hígado y formación de MDA respectivamente, 3 días luego de su inyección, pero no se observaron diferencias significativas en los valores de QLV (Valores control: QLE 150 ± 12 cps/cm²; QLV 237 ± 13 cps/mg de proteína y MDA 14.6 ± 1.6 nmol/g hígado). El Mx produjo un aumento de 96% en los niveles de [H_2O_2]_e de cortes de hígado al día 4 de la inyección, (valor control: $0.13 \mu\text{M}$). Los resultados de nuestro estudio sugieren que las drogas Mx y Dox generarían en el hígado una situación de estrés oxidativo con el consiguiente aumento de las concentraciones en estado estacionario de especies activas del oxígeno.

ESTUDIO DE LA LIPOPEROXIDACION PRODUCIDA POR RADIACION EN LIPOSOMAS (Radiation - induced lipoperoxidation in liposomes). *Furman F., *Duran H., *Boveris A. y *De Rey B.M., *Instituto de Quimica y Fisicoquimica, FFyB, UBA y *Dpto de Radiobiologia, CNEA, Buenos Aires, Argentina.

La lipoperoxidacion (LP) producida por los radicales libres generados por radiacion ionizante puede ser estudiada utilizando a los liposomas como modelo experimental.

En el presente trabajo se irradiaron liposomas multilamelares grandes con rayos X (12 Gy/min). La composicion lipidica utilizada fue fosfatidil colina (PC) de huevo o de soja (0,5 mg/ml, con o sin el agregado de Cl_2Fe o vit E) y se utilizaron dosis de radiacion comprendidas entre 0 y 160 Gy.

Para la evaluacion de la LP se determino la quimioluminiscencia (QL) utilizando un contador de centelleo liquido y se realizaron determinaciones de la formacion de malondialdehido (MDA) y de dienos conjugados utilizando tecnicas espectrofotometricas.

Los resultados obtenidos demuestran que para una misma dosis de radiacion (80 Gy) la PC de soja sufre una mayor lipoperoxidacion que la PC de huevo, hecho que puede ser explicado teniendo en cuenta el diferente grado de saturacion de los lipidos considerados.

Daño Celular-Mutagénesis

TRANSFERENCIA PASIVA DE ALTERACIONES NEUROMUSCULARES MEDIANTE INMUNOGLOBULINAS DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTROFICA (ELA). (Passive transfer of neuromuscular alterations by amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins) Protti, B.A., Scornik, F. S., Fuaberg, C.G., Alvarez, V., Hezib, A., Uchitel, U.D. Instituto de Biologia Celular, Fac. de Med., Universidad de Buenos Aires.

La ELA es una enfermedad caracterizada por la denervacion de las fibras musculares esqueléticas resultante de la muerte de las neuronas motoras. Un proceso autoinmune ha sido postulado como responsable de la degeneracion neuronal. Con el objeto de transferir algunas de las características de esta enfermedad del humano al raton se utilizaron Ig de 6 pacientes de ELA, Ig normal e Ig de 2 pacientes con otras enfermedades neurológicas. Las Ig fueron aplicadas sobre la superficie del musculo levator auris del raton mediante la inyeccion subcutanea de 50 ul conteniendo 1 ag de Ig. Esta aplicacion se repitio 6 veces durante 2 semanas. Los musculos fueron disecados 4 a 12 semanas despues de iniciado el tratamiento para estudiar electrofisiologicamente la actividad sinaptica mediante electrodos intracelulares y fueron posteriormente tenidos con una tecnica argéutica combinada para evidenciar la colinesterasa de las placas y los axones.

No se observaron alteraciones en la frecuencia ni amplitud de los potenciales miniatura en los musculos tratados con Ig control. En los musculos tratados con 4 Ig de ELA se registraron potenciales miniatura con una frecuencia mayor que la control. Tambien se encontraron fibras musculares donde no se registraron potenciales miniatura. En 3 musculos tratados con Ig 5 se observo una ausencia total de la actividad sinaptica.

Mediante la estimulacion del nervio con un electrodo de succion se estudio el contenido cuantico de la liberacion evocada en Ringer con bajo Ca^{++} y alto Mg^{++} . Los musculos tratados con Ig de ELA mostraron en la mayoria de los casos un incremento en el numero cuantico y en algunos un decremento del mismo. La presencia de fibras musculares sin respuesta sinaptica evocada fue un hallazgo frecuente.

Los estudios morfologicos mostraron placas neuro-musculares denervadas y degeneracion axonal en la mayoria de los musculos tratados con Ig de ELA pero no en los controles.

EFFECTO MUTAGENICO SINERGICO PRODUCIDO POR COMBINACION DE UV Y BLEOMICINA EN POBLACIONES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE (Synergic mutagenic effect produced by UV and bleomycin in populations of *Saccharomyces cerevisiae*). Lillo, O., Severgnini, A. y Nunes, E. Departamento de Biología, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

La frecuencia mutagénica total ($M(z)$) producida por la combinacion de agentes mutágenos a las dosis x e y y podría depender de los tipos de reparacion del ADN que se ponen en juego en el procesamiento de las lesiones producidas y de la letalidad de la combinacion. De acuerdo a Mitchel y Morrison (1987) la frecuencia de mutacion producida por un agente altamente mutagénico, disminuye en presencia de otro que produce lesiones procesadas por una via de reparacion sin error. Esta observacion podría explicarse en las siguientes condiciones: a) que las lesiones producidas por los dos agentes se reparen por dos vias con distinta probabilidad de error, b) que una o ambas vias sean inducibles, c) que ambas vias compitan por el mismo sustrato.

Se estudio el efecto mutagénico de las radiaciones UV (lesiones procesadas por una via sin error) y de la bleomicina (lesiones procesadas por vias con distintas probabilidades de error) como agentes únicos y en combinacion. Se utilizaron la cepa salvaje SC7K His y la cepa $psu4-1$ His (deficiente en la mutagénesis inducida). Se irradiaron muestras aleatorias en fase exponencial con UV (15 W, 2537 Å, $\approx 60 J/m^2$) y luego se las sometió a dosis crecientes de bleomicina (0 - 150 ug/ml). Se demostraron los siguientes hechos: 1) La frecuencia mutagénica total ($M(z)$) producida por la combinacion de ambos agentes es más que aditiva. 2) $M(z)$ es significativamente mayor para la cepa SC7K His. 3) Existe sinergismo en la letalidad producida por la combinacion de UV y bleomicina de acuerdo a observaciones previas (Barrios et al., 1990). Estos hechos evidencian la existencia de por lo menos dos etapas comunes en la reparacion de las lesiones letales y mutagénicas provocadas por ambos agentes, las que se procesan independientemente. Una disminucion de la probabilidad de mutacion en el caso de combinacion de agentes podría explicarse en base a una disminucion de la probabilidad de sobrevivencia de las mutantes.

ROTURAS DOBLES DE ADN Y SU RELACION CON LA LETALIDAD CELULAR. Nunes, E., Baur, M. y Nuesse, M. Laboratorio de Radiobiología Celular. Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay y Gesellschaft fuer Strahlen-und Umweltforschung, Neuherberg y Frankfurt/M, Alemania.

Las roturas dobles de ADN (DSB) son importantes en la producción de lesiones letales y aberraciones cromosómicas en poblaciones celulares tratadas con radiaciones ionizantes o agentes químicos radioniméticos. En el presente trabajo se estudia la producción de DSB espontáneas en poblaciones haploides en distintas condiciones (distintos tiempos en fase estacionaria). Se analizan simultáneamente la viabilidad y la probabilidad de mutación espontánea e inducida (reversión a la prototrofia), así como la densidad de probabilidad de contenido de ADN. Medidas de DSB: electroforesis por campos pulsados ortogonales y exploración de geles con densitómetro laser. Las curvas de densidad de contenido de ADN se obtuvieron con citometría de flujo. La sobrevivencia y la frecuencia mutagénica se estudiaron tanto para poblaciones normales como irradiadas. Fuente: Co60, dosimetría por (SO4)2Fe y TLD, $0 < D < 800$ Gy, $D = 37$ Gy/min. Se utilizaron dos cepas de *S.cerevisiae* de tipo salvaje con los marcadores LIS, ILV, TRP y ADE y una mutante isogénica afectada en la síntesis de glutatión (gsh-). Los medios nutrientes y de omisión utilizados fueron los convencionales para este eucariote.

Se comprobó una acumulación de lesiones tipo DSB en poblaciones estacionarias no irradiadas, las que pueden repararse en condiciones que permiten la duplicación del ADN (viabilidad = 100%, para 7 DSB p/genoma). La radiorresistencia de estas poblaciones disminuye en función del tiempo en fase estacionaria. Este hecho puede deberse a la disminución en las probabilidades de reparación recombinacional (ATP-dependiente) y a la acumulación de DSB espontáneas e inducidas por la absorción de la energía radiante. La ausencia de glutatión no influye sobre la letalidad espontánea ni inducida por las radiaciones en poblaciones de hasta 14 días en fase estacionaria. En cambio, el glutatión se comporta como antimutagénico, contrarrestando probablemente las lesiones por radicales libres producidas en las bases.

Agradecemos el apoyo de los Profs. Eckardt-Schupp y W. Pohlit en la realización de este trabajo.

HEAT SHOCK, LETALIDAD Y MUTAGENESIS EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

E.C.Candrea, D.Keszenman, A.Salvo, E.Barrios, U.Gelós y E.Nunes. Dpto. de Biofísica. Fac. de Medicina. Montevideo. URUGUAY.

Las proteínas de "heat shock" (HSP) se traducen o activan frente a hipertermia (HT) y otras perturbaciones del medio (stress), produciendo termotolerancia. Esta respuesta ha sido detectada en todos los sistemas biológicos analizados y constituye un modelo de regulación génica. En el presente trabajo, se analizan los efectos letales y mutagénicos a temperatura elevada (50°C) en función del tiempo de exposición (t), en poblaciones estacionarias. Parte de las muestras fueron tratadas con un "heat shock" previo (38°C, 1-2 h) en medio de cultivo con y sin cicloheximida (CHM=10µg/ml). Se utilizó una cepa haploide auxotrófica para lisina, medios de cultivo y de omisión convencionales, temperatura de incubación 30°C. Se detectó termotolerancia relativamente baja para "heat shock" previos de 2h de duración, independientemente de la presencia de CHM. En la interpretación de este hecho debe considerarse que la termorresistencia se expresa constitutivamente luego del cambio diauxico. En cambio, las HSP se inducen masivamente en fase logarítmica luego del "heat shock". La frecuencia mutagénica M(t) presenta un curso exponencial a partir de un tiempo de exposición de 30 min y disminuye para muestras tratadas con "heat shock" mientras que la CHM revierte este efecto. Estos hallazgos sugieren que las HSP protegen al ADN de los efectos mutagénicos de la HT y que la CHM por su efecto inhibidor de la síntesis proteica, contrarresta el efecto del "heat shock" en nuestras condiciones experimentales.

PROTECCION DEL DAÑO MIOCARDICO POR CLORICROMENO (Protection of myocardial damage by chloricromene). Lisuy S., Gonzalez Flecha B., Milei J. y Boveris A. Catedra de Fisicoquímica, FFyB, UBA, Argentina.

El cloricromeno (AD₂) es un derivado cumarínico ampliamente utilizado en el tratamiento de afecciones relacionadas con la síntesis de prostaciclina, en dilataciones coronarias y en la disminución de la agregación plaquetaria. La acción del AD₂ como cardioprotector e inhibidor de los radicales libres del O₂ no ha sido aun bien estudiado.

En el presente trabajo se estudio el efecto del AD₂ sobre el daño cardiaco producido por isquemia-reperfusion mediante microscopia electronica (ME), quimioluminiscencia iniciada por hidroperoxido de terbutilo (QL) y electrocardiograma (EC). Se trabajo con 20 conejos divididos en 2 grupos a) control y b) AD₂ (0,25 - 0,50 mg/Kg peso, iv durante toda la operacion). Ambos grupos fueron anestesiados, traqueotomizados y se les realizo toracotomia. Despues de 10 min de oclusion (10'I) de la arteria coronaria descendente se toma una muestra y luego a los 10 min de reperfusion (10'R) otra.

Los resultados indican que la QL (cpa/mg prot) del grupo control fue de 7000 ± 1100 (10'I) y 15000 ± 900 (10'R) mientras que para el grupo AD₂ fue de 6000 ± 800 (10'I) y 6300 ± 700 (10'R). La ME muestra una marcada proteccion del daño mitocondrial, observandose tambien mejoras en el EC. Estos resultados sugieren que el AD₂ podria tener una accion protectora sobre el daño producido por isquemia-reperfusion.

ROSA DE BENGALA COMO INDUCTOR DE DAÑO GENETICO Y ENZIMAS ANTIOXIDANTES. (Rose Bengal as inductor of genetic damage and antioxidant enzymes). Carballo, M., Alvarez, S., Preciado, M.V. y Boveris, A. Div. Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El Rosa de Bengala (tetraclorotetraiodouranina, RB) es capaz de inducir genotoxicidad en cultivo de linfocitos de sangre periférica en concentraciones de 10⁻⁷M y 10⁻⁸M. En este trabajo se estudió el efecto antes mencionado a mayores concentraciones de RB (10⁻⁴M, 10⁻⁵M y 10⁻⁶M) complementando dicho análisis con la determinación de enzimas antioxidantes (Superóxido dismutasa: SOD y Catalasa: Cat) constituyentes del principal sistema de defensa de la célula contra aumentos en las velocidades de generación de intermediarios de la reducción del oxígeno. Los cultivos fueron realizados con sangre entera en presencia de medio Ham's F 10, suplementado con Suero Fetal Bovino y Fitohemaglutinina P, como agente mitógeno, siendo incubados durante 60 h a 37°C. Se trabajó con 2 lotes, uno de los cuales fue mantenido en oscuridad y el otro sometido a la acción de la luz fluorescente durante 180 min. La determinación de enzimas antioxidantes se realizó mediante la técnica de Beers y Siner (1952) para Cat y Mc Cord y Fridovich (1969) para SOD. Los resultados obtenidos revelan un incremento dosis-dependiente en: a) la producción de aberraciones cromosómicas (AC) en los cultivos en oscuridad (10⁻⁴M: 2.01±0.14; 10⁻⁵M: 1.68±0.15; 10⁻⁶M: 1.37±0.12) con respecto al control (0.14±0.04) el cual se observa con mayor significación en los cultivos expuestos a la luz. b) los niveles de enzimas antioxidantes: SOD (Oscuridad: 10⁻⁴M: 62.5%; 10⁻⁵M: 46.0%; 10⁻⁶M: 30.0%; irradiados: 10⁻⁴M: 60.7%; 10⁻⁵M: 61.0%; 10⁻⁶M: 40.0%) y Cat (Oscuridad: 10⁻⁴M: 143.0%; 10⁻⁵M: 61.0%; 10⁻⁶M: 44.0%; irradiados: 10⁻⁴M: 144.0%; 10⁻⁵M: 71.0%; 10⁻⁶M: 61.0%). Los resultados sugieren que el incremento de AC y nivel de SOD y Cat se debería a la generación de radicales libres del oxígeno en combinación con una interacción directa entre el ADN y el RB.

