

VCH-FC
MAG-B
A348

ACOPLAMIENTO DE LOS FLUJOS DE AGUA Y IONES
EN CANALES DE POTASIO ACTIVADOS POR CALCIO.
MEDICIONES DE POTENCIALES DE FLUJO.

Tesis entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas
con mención en Fisiología.

Facultad de Ciencias

por

CARMEN ALCAYAGA URBINA

Marzo, 1987

Profesores guía: Osvaldo Alvarez.
Ramón Latorre.



Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

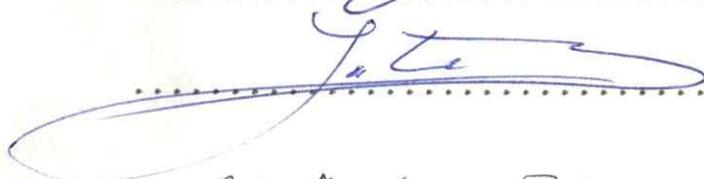
Carmen Isabel Alcayaga Urbina

ha sido aprobada por la Comisión informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Fisiología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 12 de Mayo de 1987.

Patrocinantes de Tesis
Dr. Osvaldo Alvarez


.....

Dr. Ramón Latorre


.....

Comisión Informante de Tesis
Dr. Mario Luxoro


.....

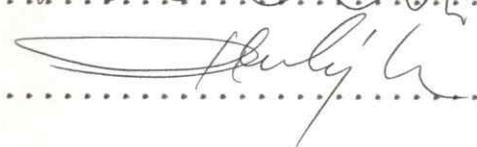
Dr. Juan Bacigalupo


.....

Dr. Ricardo Bull


.....

Dr. Benjamin Suarez-Isla


.....

A DEMETRIO Y JUAN PABLO.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer sinceramente al Dr. Osvaldo Alvarez por estar siempre dispuesto a repetir una y mil veces aquello que nunca quedó claro.

También agradezco al Dr. Ramón Latorre por su permanente preocupación más allá de lo netamente académico.

A Ximena Cecchi por enseñarme a mantener el buen humor en aquellos días en que nada va bien.

A mi amigo Rafael Torres y al Dr. Daniel Wolff quienes me impulsaron a la Fisiología.

A Juan Espinoza, cuya astucia no dejará de sorprenderme. A mis compañeros Alfredo Villarroel, Andrés Oberhauser, David Naranjo, Ricardo Delgado, Nataniel Malebrán y Claudio Laurido; por su compañerismo, los cigarrillos y el café compartido. A la amistad incondicional de diez años de Victoria Gaete.

A mis padres, por darme la oportunidad de llegar hasta aquí. A la solidaridad de mis hermanos Sergio, Julio y Claudia. A la paciencia de Verónica y la presencia de Alvarito.

INDICE DE MATERIAS.

LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUCCION	1
Generalidades	1
Canales iónicos	2
Canales de potasio activados por calcio	5
Difusión en fila india	7
Potenciales de flujo y longitud de algunos canales	10
Objetivos	12
TEORIA	14
METODOS	17
Preparación de vesículas de membrana de:	
- músculo liso de intestino de conejo.	17
- túbulo-T de músculo esquelético de conejo.	18
Equipo eléctrico.	21
- Generador de pulsos.	21
- Conversor corriente-voltaje.	21
- Amplificador inversor de ganancia variable.	22
- Filtro activo.	22

- Sistema de grabación.	24
Metodología experimental.	24
- Preparación de lípidos.	24
- Soluciones de no electrolito.	24
- Formación de bicapas.	26
- Protocolo experimental.	29
Análisis de los datos.	31
RESULTADOS	33
Potenciales de flujo.	33
Potencial de flujo y ocupación del canal	37
Comparación de dos canales de potasio activados por calcio.	39
Cambios en la conductancia y resistencias de acceso.	40
DISCUSION	49
Longitud del canal de potasio activado por calcio.	49
Modelo estructural del canal y longitud calculada.	53
Resistencias de acceso y conductancia del canal.	54
Conclusión global.	57
REFERENCIAS	59
APENDICE	64

LISTA DE TABLAS.

- Tabla 1. Potenciales de flujo y número de moléculas de agua medidos a diferentes concentraciones de potasio en el canal de túbulo-T. 38
- Tabla 2. Comparación de los potenciales de flujo y número de moléculas de agua para dos canales de potasio activados por calcio. 40
- Tabla 3. Valores de resistencia del canal de túbulo-T medidos a diferentes concentraciones de potasio. 48

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.	Generador de pulsos y niveles D. C.	20
Figura 2.	Sistema de medición y amplificación de corriente.	23
Figura 3.	Montaje experimental.	25
Figura 4.	Registro de la incorporación de un canal.	30
Figura 5.	Registros de un canal a potenciales pequeños en presencia de glucosa.	34
Figura 6.	Curvas corriente-voltaje en presencia y ausencia de glucosa.	36
Figura 7.	Razón de la conductancia v/s [KCl].	42
Figura 8.	Resistencias de un canal en condiciones: A. - Control. B. - Experimental.	44
Figura 9.	Conductancia v/s [glucosa].	45
Figura 10.	Modelo de la zona estrecha del canal de túbulo-T.	51

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS.

a.	Actividad del catión
Å	Angstrom (10^{-10} metros)
g.	conductancia del canal en condiciones control
g.	conductancia del canal en condiciones experi- mentales
g./g.	Razón de conductancias
GΩ	Gigaohm (10^9 ohm)
I	Corriente (Ampere)
MOPS	Acido 3-(-N-morfolino)propanosulfónico
N	Número de moléculas de agua
O	Osmoles contenidos en un kilo de agua
Ω	ohm (1 Volt/1 Ampere)
pA	picoAmpere (10^{-12} Ampere)
pS	picoSiemens (10^{-12} Siemens)
pF	picoFarad (10^{-12} Farad)
R	Constante de los gases
R _r	Resistencia de retroalimentación
ΔR	Variación de la resistencia del canal
R _o	Resistencia del canal en condiciones control
R _s	Resistencia del canal en condiciones experi- mentales
R _i	Resistencia del vestíbulo <u>cis</u>

R_1'	Resistencia del vestibulo <u>cis</u> en presencia de glucosa
R_e	Resistencia de la zona corta y estrecha
R_s	Resistencia del vestibulo <u>trans</u>
S	Siemens (1 ampere/1 volt)
T	Temperatura absoluta
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
V	Potencial (Volt)
V_d	Potencial de dilución
V_e	Potencial de electrodos
V_o	Potencial a $I=0$ de la recta experimental referida a la recta control
V_s	Potencial de flujo
V_v	Potencial a $I=0$ en presencia de valinomicina

RESUMEN.

Canales de potasio activados por calcio aislados de membrana de túbulo transversal de músculo esquelético y de músculo liso de intestino de conejo fueron incorporados en bicapas lipídicas artificiales. Se midió el potencial de flujo sometiendo a dichos canales a una diferencia de presión osmótica.

La magnitud del potencial de flujo para una diferencia de presión osmótica producida por glucosa 2 osmolar, es 1,5 mV. Este potencial implica que se transportan dos moléculas de agua por cada ion potasio que pasa a través del canal.

Si se supone que el acoplamiento de los flujos se debe a transporte en fila india de iones y agua, entonces la zona del canal en que el acoplamiento tiene lugar, tiene una longitud de 0,8 nm. Este resultado apoya la hipótesis de estructura del canal que lo describe con forma de reloj de arena, con dos vestíbulos amplios unidos por una zona estrecha.

La conductancia del canal disminuye cuando ésta se mide en presencia de glucosa 2 osmolar. Esta disminución de

la conductancia se debe a un aumento de la resistencia de acceso al canal.

Suponiendo que la conducción de iones en los vestíbulos del canal es comparable a la conducción en agua libre, se concluye que la resistencia de los accesos es del orden de 1 GOhm (en KCl 100 mM). Esta resistencia es aproximadamente igual a un tercio de la resistencia total del canal.

ABSTRACT.

Calcium-activated potassium channels were incorporated into planar lipid bilayers under an osmotic pressure difference and streaming potentials were measured.

Streaming potentials of 1.5 mV were found in 2 osmolar glucose. This value implies that 2 water molecules are coupled with the transport of each potassium ion.

If the coupling of fluxes is interpreted as single-file diffusion of water and ions, then, the zone of the channel in which the coupling occurs is about 0,8 nm in length. This result supports the hypothesis of an hourglass shaped channel with two wide mouths and a short zone between them.

The conductance of the channel decreases in the presence of 2 osmolar glucose. This change in conductance is due to an increase of the access resistance of the mouth.

If the conduction of ions in both mouths of the channel takes place in the same way as in free water,

then the access resistance is about 1 GOhm (in KCl 100 mM).
This resistance is approximately one third of the total
resistance of the channel.

INTRODUCCION

I. - GENERALIDADES.

Una membrana biológica típica está compuesta por una doble capa de moléculas de fosfolípidos que están orientadas con sus regiones polares hacia el exterior y sus regiones apolares hacia el interior. Esta disposición forma una lámina lipídica en la cual se insertan proteínas (Singer y Nichols, 1972). Dependiendo de la facilidad de extracción que presentan dichas proteínas, éstas pueden clasificarse en: proteínas extrínsecas y proteínas intrínsecas. Las primeras interactúan con una sola monocapa de lípidos en tanto las segundas interactúan con ambas monocapas. Por sus características físico-químicas la matriz lipídica es una barrera al paso de algunas especies químicas, especialmente los iones. Por otra parte, las proteínas son las vías de paso para los iones.

Uno de los mecanismos propuestos por los cuales las proteínas permiten el paso de los iones, es la formación de poros acuosos que comuniquen los medios extra e intracelulares. Este tipo particular de proteínas de membrana reciben el nombre de canales iónicos.

II. - CANALES IONICOS.

La naturaleza discreta de las vías de paso de los iones a través de las membranas biológicas se ha demostrado por el uso de técnicas que permiten examinar el transporte de iones mediados por un solo canal. Una de estas técnicas (reconstitución) es el aislamiento de fragmentos de membrana y su posterior incorporación en membranas artificiales de fosfolípidos (Miller y Racker, 1976; Miller, 1983a). Otra técnica ("patch-clamp") es aislar eléctricamente, mediante una micropipeta, un área muy pequeña de una membrana natural y registrar la actividad de el(los) canal(es) que está(n) circunscrito(s) en dicha área. (Neher y Sackmann, 1976; Neher y col., 1978)

El transporte de iones se puede determinar de la corriente eléctrica registrada al aplicar una diferencia de potencial a través de la membrana. La presencia de unidades conductoras discretas se observa como variaciones abruptas de la corriente registrada que toma a su vez valores discretos. Estas transiciones aparecen porque, en principio, los canales están fluctuando constantemente entre estados abierto y cerrado.

Muchos canales presentan una relación lineal entre corriente registrada (I) y potencial aplicado (V), es decir, siguen la ley de Ohm. La pendiente de la curva I-V se llama conductancia (g) y se mide en Siemens (1S = 1 A/V). La con-

ductancia de diversos tipos de canales está en el intervalo de 2 a 200×10^{-12} S (2 a 200 pS).

La fracción del tiempo que un canal permanece abierto puede depender del potencial eléctrico aplicado, de la concentración de agonistas, de la tensión de la membrana, etc. Según cual sea el agente que los abra, se habla de canales activados por potencial, acetilcolina o tensión.

Los diferentes tipos de canales generalmente conducen más eficientemente ciertos iones en comparación con otros. Esta propiedad se llama selectividad. Hay canales catiónicos y aniónicos. Dentro de los catiónicos se distinguen los canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} . Un canal aniónico es el canal de Cl^- .

La primera evidencia de la naturaleza proteica de los canales se sustenta en la inhibición de la inactivación de las corrientes de sodio en axones de jibia perfundidos internamente con pronasa (mezcla de endopeptidasas) (Armstrong y col., 1973). Posteriormente su naturaleza proteica se demuestra por aislamiento de proteínas de membrana, que al ser incorporadas en bicapas artificiales manifiestan la existencia de canales (Karlin, 1980; Weigele y Barchi, 1982; Miller, 1983a; Miller, 1983b).

Los modelos de canales, deducidos de estudios de la estructura primaria de proteínas formadoras de canales (Darbon y Angelides, 1984), cambios de aminoácidos usando

técnicas de DNA recombinante (Mishina y col., 1985), difracción de rayos X, etc, comprenden segmentos de hélices anfipáticas que se agrupan formando haces perpendiculares al plano de la membrana en que todas las hélices exponen sus residuos polares hacia el interior de la proteína. Esta estructura forma un poro que atraviesa la membrana y comunica un lado con el otro de ésta.

Este poro puede formar una vía de paso a iones al admitir agua dado que los residuos expuestos a su lumen son polares. Las dimensiones de largo y radio del poro dan en una primera aproximación la conductancia, mientras que el signo de las cargas de los residuos determinará el signo de los iones que admitirá, dando una primera aproximación de la selectividad. Pequeños desplazamientos y rotaciones de las hélices causados por la presencia de agonistas o por un potencial eléctrico impuesto pueden abrir o colapsar el canal originando las fluctuaciones entre los estados abierto y cerrado. Se habla de activación de un canal cuando la probabilidad de encontrar un canal en el estado abierto aumenta por la presencia de un agonista o al imponer una diferencia de potencial.

En un poro acuoso como el descrito, lleno de agua y de iones de carga opuesta a la de las cargas fijas en las paredes, se produce un acoplamiento entre los flujos de agua y de iones, lo que genera un conjunto de fenómenos llamados

electrocinéticos. Si se aplica una diferencia de presión hidrostática o presión osmótica a través del canal, se producirá un flujo de agua que arrastrará a los iones. Como son iones de un solo tipo (positivos o negativos), al cerrar el circuito externo ($V=0$), se observará una corriente eléctrica llamada corriente de flujo. Si el circuito se deja abierto ($I=0$) se observará un potencial eléctrico o potencial de flujo. Por otra parte si se genera una corriente aplicando externamente un potencial eléctrico y en condiciones de presión constante, los iones arrastrarán agua produciendo un flujo de ésta; si el experimento se hace a volumen constante se desarrollará una presión hidrostática (electroosmosis).

III.- CANALES DE POTASIO ACTIVADOS POR CALCIO.

Los canales de potasio activados por calcio han sido descritos y caracterizados en: células cromafines de bovino (Marty, 1981), neuronas simpáticas de vertebrados (Adams y col., 1982), células de músculo esquelético de rata en cultivo (Pallota y col., 1981; Barret y col., 1982; Blatz y Magleby, 1984), línea de células tumorales de la pituitaria anterior (Wong y col., 1982), células disociadas de musculatura gástrica de Bufo marinus (Singer y Walsh, 1984), membranas de túbulo transversal de conejo (Latorre y col., 1982; Vergara, 1983; Vergara y Latorre 1983), membranas de

túbulo transversal de rata (Moczydlowski y Latorre, 1983; Villarroel, 1986), células cromafines de bovino (Yellen, 1984) y en membranas de músculo liso de intestino de conejo (Cecchi y col., 1986).

Estos canales de potasio son activados por calcio cuando éste ion es agregado a su lado citoplasmático, son altamente selectivos al ion potasio, y además poseen una muy alta conductancia al ion permeante. Estas dos últimas propiedades en conjunto nos colocan ante una situación aparentemente contradictoria. En principio mientras más selectivo es un canal a un ion determinado, de mayor intensidad serán las interacciones que deban existir entre la proteína y el ion; esto significa que el número de iones que atraviesen el canal por unidad de tiempo será menor respecto a un canal que presenta baja selectividad ya que en este caso las interacciones entre la proteína y las especies permeantes son de baja intensidad. Según estas consideraciones un canal selectivo será de baja conductancia y recíprocamente un canal poco selectivo tendrá una alta conductancia.

La conductancia de un canal de potasio activado por calcio de túbulo-T o de músculo liso de conejo es del orden de los 200 pS en una solución simétrica 100 mM KCl. Suponiendo una longitud de poro de 5 nm (espesor de una membrana biológica), se determina un diámetro de 0,56 nm para un canal que presenta dicha conductancia (Villarroel,

1986). Un diámetro de tal magnitud permitiría el paso de especies de dimensiones mayores que el más grandes de los cationes alcalinos (Cs^+), el cual no es transportado por estos canales (Vergara, 1983; Xecchi y col., 1986).

¿De que manera puede compatibilizarse la alta conductancia y gran selectividad de estos canales de potasio ?

Evidentemente el problema nace de considerar un canal iónico como un poro acuoso cilíndrico de una cierta longitud y de un diámetro constante. Sin embargo, un canal puede tener una estructura mucho más compleja que un cilindro lleno de agua. Latorre y Miller (1983) han propuesto un modelo geométrico con una estructura que permite el transporte de iones con una alta eficiencia y que puede ser altamente selectivo a una sola especie cargada. Este modelo supone una estructura del canal con dos accesos o vestíbulos amplios en que la difusión no está limitada (el ion se conduce de la misma manera que lo hace en solución) y con una zona central corta y estrecha donde se sitúa el filtro de selectividad. En esta zona necesariamente el transporte de los iones debe ocurrir por un mecanismo diferente al de los vestíbulos. Se postula para dicha zona un mecanismo de difusión en "fila india".

IV.- DIFUSION EN FILA INDIA.

Supongamos el interior de un canal como un poro

acuoso con una longitud y diámetro tales que en el interior se ubican moléculas de agua y un ion permeante, los cuales no pueden sobrepasarse unos a otros. En un espacio así de restringido, la difusión de las especies se hace interdependiente: los flujos de ambas especies están acoplados. Cuando una molécula se mueve de un sitio al siguiente a lo largo del poro, ésta debe "empujar" a las que están delante. Esto es, una especie se mueve si toda la fila lo hace (Hodgkin y Keynes, 1955; Levitt y Subramanian, 1974).

Si un canal presenta este tipo particular de estructura que determina que la difusión del ion permeante y las moléculas de agua que lo acompañan, esté restringida a cursar en fila india, se puede llegar a determinar la longitud del poro conociendo el número de moléculas de agua asociadas al ion dentro del canal.

El acoplamiento de los flujos iónicos y de las moléculas de agua en un poro puede ser cuantificado mediante cuatro aproximaciones experimentales: electroosmosis, corrientes de flujo, potenciales de flujo y medición de parámetros macroscópicos.

A. - Electroosmosis.

En estos experimentos se aplica una diferencia de potencial y se mide el flujo de agua y la corriente llevada por los iones. El número de moléculas de agua en asociación a un ion en el interior del canal está dado por la razón

entre el número de moléculas de agua que fluyen a través de la bicapa y el número de iones que generan dicho flujo.

B. - Corrientes de flujo.

En este caso se aplica una diferencia de presión osmótica, usando un no electrolito y se mide el flujo de agua y la corriente eléctrica producida en condiciones de circuito cerrado ($V = 0$). Expresando ambas cantidades en número de moles se puede calcular cuantos moles de agua acompañan a cada mol de iones.

Ambos tipos de experimentos implican la medida de flujos de agua (cm^3/min). Estos flujos son pequeñísimos para cada canal, por lo que sólo se pueden hacer en membranas con muchos canales. Las medidas de potenciales de flujo no requieren medir flujos de agua.

C. - Potenciales de flujo.

Para realizar estas determinaciones se aplica una presión osmótica y se mide el potencial a corriente cero. En el canal - selectivo a una especie iónica - no se mueven ni el agua ni los iones, si no que se llega a un equilibrio en que la diferencia de energía de N moléculas de agua impulsadas por la diferencia de presión osmótica se iguala a la diferencia de energía del ion impulsado por la diferencia de potencial aplicado. Conociendo la diferencia de presión osmótica y midiendo la diferencia de potencial se puede obtener N (Rosenberg y Finkelstein, 1978a, 1978b;

Finkelstein y Rosenberg, 1979).

D. - Parámetros macroscópicos.

Levitt (1974) deriva una relación general entre el número de moléculas de agua promedio (n_w) por poro y los parámetros macroscópicos de las membranas que contienen dichos canales. Los parámetros que se determinan experimentalmente son: las permeabilidades hidráulica (L_p) y difusiva (ω) de dicha membrana al agua. Estos se relacionan con el número promedio de moléculas de agua en el canal de la siguiente forma: $n_w = L_p / (\omega \bar{V}_w)$, siendo \bar{V}_w el volumen molar parcial del agua.

Entonces, frente al problema de postular una geometría para un canal iónico, disponemos de, al menos, tres aproximaciones experimentales que nos permiten determinar, de una manera indirecta, la longitud de un poro o la longitud de una zona de un canal en que el transporte de los iones ocurre en fila india.

V. - POTENCIALES DE FLUJO Y LONGITUD DE ALGUNOS CANALES.

Se ha podido determinar la longitud de tres canales diferentes por registro de potenciales de flujo al imponer gradientes osmóticos en bicapas artificiales que contienen dichos canales.

A. - Gramicidina A.

Se determinó que el número máximo de moléculas de agua,

en el interior del canal de gramicidina eran 7 a concentraciones relativamente bajas de electrolito permeante. A altas concentraciones de electrolito la determinación del número de moléculas de agua era levemente inferior debido, probablemente, a que el canal bajo estas condiciones tiene en su interior más de un ion permeante (Rosenberg y Finkelstein, 1978a; 1978b). Independientemente Levitt, (Levitt y col., 1978) encuentra que son 11 las moléculas de agua en el interior del canal (ver discusión). La determinación del número de moléculas de agua permite el cálculo de una longitud de poro de 2,8 nm que se acerca bastante a la longitud de poro del modelo molecular de este pentadecapéptido (Urry, 1971; Finkelstein y Andersen, 1981).

B. - Hemocianina.

Este canal en presencia de un gradiente osmótico puede acomodar en su interior 3 moléculas de agua y un ion potasio en fila. La longitud estimada para este canal es de 0,6 nm de largo (Cecchi y col., 1982).

C. - Canal de potasio de retículo sarcoplasmático.

En este caso el número estimado de moléculas de agua es 2 a 3, lo que da una longitud de menos de 1 nm (Miller, 1982).

OBJETIVOS.

La caracterización de la vía de conducción de un canal iónico permite, en conjunto con otras evidencias, comprender globalmente los mecanismos de conducción de dicho canal. Para explicar como un canal puede tener una alta conductancia y una gran selectividad se ha desarrollado el modelo arquitectónico de dos bocas o vestíbulos grandes, y una zona corta y estrecha entre ambos vestíbulos donde se sitúa el filtro de selectividad. Este modelo es común al canal de hemocianina, al canal de potasio de retículo sarcoplásmico y a los canales de potasio activados por calcio de túbulo-T y de músculo liso de conejo. El grado de acoplamiento de los flujos de agua y iones en estos dos últimos debe ser similar al que se encuentra en los dos primeros y muy diferente al acoplamiento de flujos que presenta el canal de gramicidina. Recordemos que gramicidina A es un canal de radio uniforme en tanto que el modelo estructural del canal de hemocianina y del canal de retículo sarcoplásmico supone dos vestíbulos amplios y una zona corta y estrecha entre ambos.

El objetivo general del presente trabajo es determinar la longitud de la zona donde la difusión cursa en fila india para los dos canales de potasio activados por calcio ya mencionados. Esto se hará por la medición de potenciales

de flujo, determinándose el número de moléculas de agua asociadas al ion potasio en dicha zona del canal.

TEORIA

Si una membrana que contiene un canal selectivo a un catión es sometida a una diferencia de presión osmótica, se producirá movimiento de agua a través del canal. Este movimiento arrastrará a su vez cationes al cual el canal es permeable. En condiciones de circuito abierto se generará un potencial eléctrico por el paso de dichos iones. En el momento en que el potencial eléctrico compense exactamente la energía que el agua entregó a los iones, el proceso se detendrá. El estado de equilibrio se describe por:

$$N \Delta\mu_w = \Delta\mu_c \quad [1]$$

donde N es el número de moléculas de agua asociadas al catión en el interior del canal, $\Delta\mu_w$ es la diferencia del potencial químico del agua a ambos lados de la membrana y $\Delta\mu_c$ es la diferencia del potencial electroquímico del catión a ambos lados de la bicapa.

Supongamos una membrana semipermeable que separa una solución de un no electrolito en agua y agua pura. La diferencia de potencial electroquímico del agua a ambos lados de la membrana es:

$$\Delta\mu_w = \bar{V}_w \Delta\pi \quad [2]$$

donde $\Delta\pi$ es la diferencia de presión osmótica a ambos lados de la bicapa y \bar{V}_w es el volumen molal parcial del agua.

La ecuación de van't Hoff para la presión osmótica es:

$$\Delta\pi = \Delta C_s RT \quad [3]$$

donde ΔC_s es la diferencia de concentración del no electrolito a ambos lados de la membrana medido en osmoles/kg de agua, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta.

Reemplazando [3] en [2] se tiene:

$$\Delta\mu_w = \Delta C_s RT \bar{V}_w \quad [4]$$

Por otra parte la diferencia del potencial electroquímico del catión se escribe como:

$$\Delta\mu_c = F \Delta V + (RT/F) \ln (a_1/a_2) \quad [5]$$

donde F es el Faraday, R y T tienen sus significados usuales, ΔV es la diferencia de potencial a través de la membrana y a_1/a_2 es la razón de actividad del catión a

través de la misma.

Reemplazando [4] y [5] en la ecuación [1] se tiene:

$$N \Delta C_i RT \bar{V}_w = F \Delta V + RT \ln (a_i / a_i^0) \quad [7]$$

Finalmente podemos encontrar una expresión para el potencial dada por:

$$\Delta V = N (RT/F) \Delta C_i \bar{V}_w + (RT/F) \ln (a_i / a_i^0) \quad [8]$$

El primer término de la ecuación corresponde al potencial de flujo generado a través de un canal inserto en una bicapa sometida a un gradiente osmótico. El segundo término es generado por la diferencia de actividad del catión en las zonas adyacentes a la membrana. Esta diferencia se debe a la existencia de capas no agitadas y al flujo osmótico de agua a través de la bicapa misma. La magnitud del segundo término de la ecuación puede ser medida experimentalmente por medio de un ionóforo específico al catión.

METODOS

I. - PREPARACION DE VESICULAS DE MEMBRANA.

A. - Vesículas de músculo liso de intestino de conejo.

Esta preparación se realiza de acuerdo al método desarrollado en nuestro laboratorio (Cecchi y col., 1986). Se sacrifica el conejo por un golpe en la cabeza, inmediatamente se abre el abdomen y se extrae el intestino delgado libre de mesenterio y tejido adiposo. El intestino es lavado internamente perfundiéndolo con una solución tampón 0,15 M NaCl, 10 mM TRIS-Cl, pH=7,4. Se cortan trozos de intestino de aproximadamente 15 cm. de largo, los que son evertidos y lavados en la misma solución varias veces. Luego los trozos son cortados en pedazos mas pequeños (* 2 cm de largo). El material es pesado y suspendido, en un volumen igual a 3 veces su peso, en la misma solución tampón. El tejido así obtenido es sometido a fuerte vibración mecánica durante dos minutos para retirarle las células de la mucosa que son eliminadas por medio de filtración al vacío y sucesivos lavados del material en un embudo Buchner con una solución 0,75 M KCL, 10 mM TRIS-Cl pH=7,4. Los trozos de intestino son suspendidos en un volumen de 4 veces su peso en la misma solución tampón y homogenizados en una juguera Waring a baja velocidad durante 20 s. El homogenizado es centrifugado

a 9.000 x g durante 90 min y el sobrenadante descartado. El sedimento es resuspendido en 250 ml. de una solución 0,25 M sacarosa, 10 mM TRIS-Cl, pH=7,4 y homogenizado en un homogenizador de tejido (Tekmar Co., Modelo SLR-1810, Cincinnati, Ohio) durante 30 s. a 3/4 de velocidad y 30 s. a toda velocidad. El homogenizado es centrifugado a 15.000 x g durante 30 min. El sedimento se descarta y al sobrenadante se le agrega KCl sólido hasta una concentración final de 0,75 M, lo que solubiliza las proteínas contráctiles. La suspensión se mantiene en hielo por 30 min., centrifugándose luego a 100.000 x g durante 60 min. El sedimento que contiene los microsomas se resuspende en un volumen final de 10 ml. en una solución 0,25 M sacarosa, 10 mM MOPS-K, pH=7,4. Se separan alícuotas de 0,1 ml. y se dejan durante la noche a 2 °C, para que las vesículas se carguen con potasio. Al día siguiente estas alícuotas son congeladas sumergiéndolas en una mezcla frigorífica de acetona-hielo seco y se mantienen refrigeradas a -80 °C hasta el momento de su utilización.

B. - Vesículas de túbulo-T de músculo esquelético de conejo.

La preparación de estas vesículas se realiza según el método descrito por Roseblatt (Roseblatt y col., 1981). Este consiste en extraer la musculatura de las extremidades posteriores y espalda de un conejo adulto. Los músculos son

cortados con tijera en pequeños trozos y homogenizados en una juguera Waring con 4 volúmenes/peso de solución tampón 100 mM KCl, 20 mM TRIS-maleato, pH=7,0 a baja velocidad durante 30 s. seguidos de otros 30 s. a alta velocidad. La suspensión es centrifugada a 10.000 x g durante 30 min; el sedimento se resuspende en una proporción 1:4 (peso/volumen) en la misma solución tampón, homogenizado a baja velocidad durante 30 s y centrifugada a 10.000 x g durante 30 min. Al sobrenadante se agrega KCl sólido a una concentración final de 600 mM, para solubilizar las proteínas contráctiles; la suspensión es centrifugada a 100.000 x g durante 60 min. El sedimento es resuspendido y homogenizado en 30 ml. de una solución tampón 300 mM sacarosa, 20 mM TRIS-maleato, pH=7,0 y centrifugado a 100.000 x g durante 60 min. El sedimento resultante es nuevamente resuspendido en 20 a 30 ml de la misma solución tampón. La fracción microsomal resultante es sometida a una centrifugación a 85.000 x g durante 20 hr. en un gradiente discontinuo de sacarosa (25%, 27,5% y 35% p/v). La fracción utilizada se ubica en una banda en la interfase 25%, 27,5%; la cual es resuspendida en un pequeño volumen de tampón y centrifugada a 80.000 x g durante 60 min. Posteriormente es separada en alícuotas y congelada sumergiéndola en una mezcla frigorífica acetona-hielo seco. Se mantiene refrigerada a -80 °C hasta su utilización.

GENERADOR DE PULSOS Y NIVELES D.C.

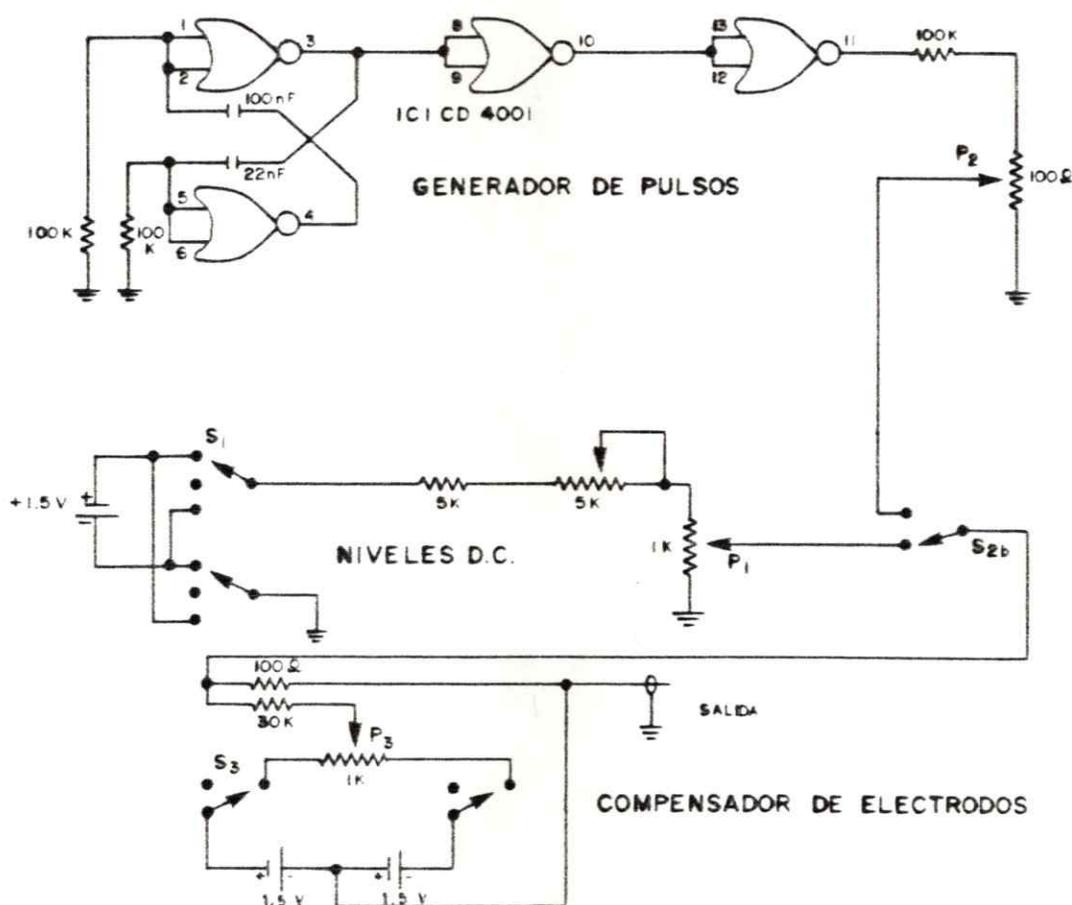


Figura 1.

Los pulsos se generan en un conjunto de circuitos NOR (CMOS) que están conectados de modo tal que funcionan como un oscilador. En el punto 11 del CD 4001 la amplitud de los pulsos es 9 volt (voltaje de la fuente que lo alimenta). La resistencia de $100\text{ K}\Omega$ y el potenciómetro P_2 permiten que la amplitud de los pulsos varíen entre $0 - 9\text{ mV}$. Los niveles de potencial son generados por una pila de $1,5\text{ V}$, el signo del potencial se escoge por medio de S_1 ; en la posición superior escoge $V > 0$, en la posición inferior $V < 0$ (el polo positivo de la pila queda conectado a tierra y el negativo al divisor) y en la posición intermedia $V = 0$. La amplitud máxima de los niveles D.C. es ajustada con el potenciómetro de $5\text{ K}\Omega$. Dos pilas de $1,5\text{ V}$, P_3 y la resistencia de $30\text{ K}\Omega$ forman una fuente de corriente, dando un potencial en la resistencia de $100\ \Omega$ que permite compensar la diferencia de potencial de los electrodos en cada experimento.

II. - EQUIPO ELECTRICO

A. - Generador de pulsos.

El generador de pulsos (figura 1) en su diseño contempla dos modalidades de funcionamiento. La primera modalidad genera un tren continuo de pulsos rectangulares de potencial, con lo que se puede seguir el curso temporal del proceso de formación de la bicapa. La segunda modalidad consiste en la generación de niveles constantes de voltaje (niveles D.C.) para establecer una diferencia de potencial a través de la bicapa. Estos niveles D.C. se obtienen de un divisor de tensión, construido con un potenciómetro ($10\text{ K}\Omega$) calibrado y una batería de 1,5 V, con esto se logra un intervalo de potencial que abarca entre -200 mV y $+200\text{ mV}$ (Alvarez, 1986). Además es posible compensar la diferencia de potencial que por construcción tienen los electrodos. Esto se hace aplicando un potencial igual pero de signo contrario al que presentan los electrodos, éste es generado por dos pilas de 1,5 V y modulado por un potenciómetro.

B. - Convertor corriente-voltaje.

Un convertor corriente-voltaje (figura 2A) se construye utilizando un amplificador operacional con una resistencia de retroalimentación. En este circuito el potencial medido a la salida es función de la corriente de entrada y de la resistencia utilizada: $V_o = -IR$. Utilizando R , igual a 1 giga ohm ($10^9\Omega$), el factor de amplificación es

1mV/1 pA.

C. - Amplificador inversor de ganancia variable.

Este tipo de amplificadores se construye utilizando un amplificador operacional, una resistencia de acceso (R_i) y una resistencia de retroalimentación (R_f). La amplificación en un amplificador inversor es función de la relación entre las resistencias de acceso y retroalimentación: $V_o = -V_i R_f / R_i$. Si se colocan resistencias de retroalimentación en paralelo, de manera que se conecta una a la vez, se obtienen tantas ganancias como resistencias se utilicen. En este caso se construyó un amplificador con ganancias 10x, 20x y 50x (figura 2B). Este circuito además tiene la posibilidad de sumar un voltaje constante a la señal de salida, de manera que se pueda ajustar la línea basal a voluntad. Para ello se emplea un segundo amplificador operacional (utilizado como sumador) al cual llegan simultáneamente la señal de salida del primer amplificador y un potencial constante que se obtiene de un divisor de tensión construido con un potenciómetro de 10 vueltas y la fuente de alimentación de los amplificadores (± 6 V).

D. - Filtro activo.

Cuando se amplifica una señal se tiene de manera concomitante un aumento del ruido eléctrico. Para mejorar la relación señal-ruido se utiliza un filtro activo - que elimina fundamentalmente las altas frecuencias - cuya frecuen-

SISTEMA DE MEDICION Y AMPLIFICACION DE CORRIENTE

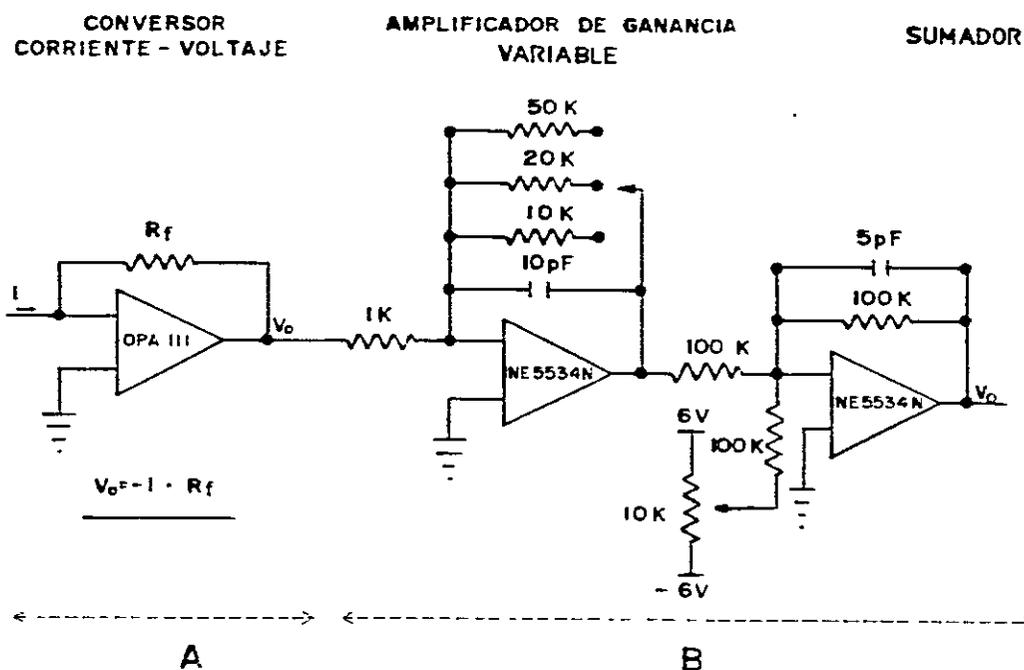


Figura 2.

A. - Conversor corriente-voltaje. El potencial a la salida del conversor es $V_o = I \times R_f$, siendo I la corriente de entrada y R_f es la resistencia de retroalimentación, cuyo valor es $1 \times 10^9 \Omega$.

B. - Amplificador de ganancia variable y sumador. Por medio de un interruptor se puede escoger una de las tres resistencias en paralelo puestas como resistencias de retroalimentación del primer amplificador NE 5534. Esto permite amplificar la señal que proviene del conversor 10, 20 o 50 veces. Un nivel de voltaje generado por un potenciómetro de 10 vueltas y la fuente de alimentación de los amplificadores es llevado al punto de suma del segundo amplificador NE 5534, permitiendo ajustar la línea basal a voluntad.

cia de corte puede ajustarse a voluntad. Normalmente se eliminaron frecuencias mayores que 1 kHz., de modo que las transiciones del canal entre el estado abierto y el estado cerrado fueran claramente discernibles.

E. - Sistema de grabación.

El sistema de grabación consta de una interfase analógica-digital y digital-analógica de 8 "bits" que toma 15.000 muestras/s. La señal digitalizada se graba en cintas magnéticas utilizando una grabadora de video y puede recuperarse en forma analógica mediante la misma interfase (diseñada y construida en el laboratorio de Fisiología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile).

III. - METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A. - Preparación de lípidos.

Todas las bicapas utilizadas para realizar los experimentos fueron hechas con fosfatidiletanolamina (PE) como único lípido. En el momento de su utilización a una cantidad apropiada de una solución de PE en cloroformo, mantenida a -20 °C, se le evapora el solvente por medio de nitrógeno gaseoso, y se agrega n-decano como solvente, hasta lograr una solución 15 mg/ml o 20 mg/ml.

B. - Soluciones de no electrolito.

Para preparar estas soluciones se recurrió a un manual para saber la concentración, en gramos/litro de una

MONTAJE EXPERIMENTAL

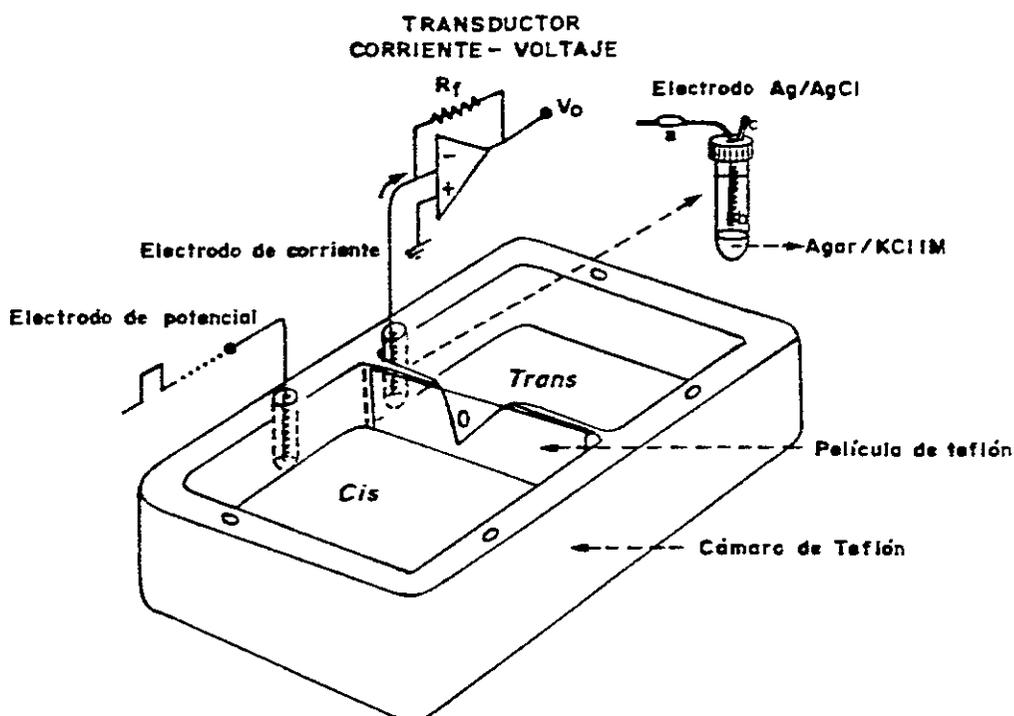


Figura 3.

La cámara de Teflón (6 cm. de largo, 4 cm. de ancho, 1,5 cm. de alto) define dos compartimientos de 3 ml cada uno. En el compartimiento cis se aplican los pulsos y los niveles de potencial y se agregan las vesículas de membrana. Al lado trans se conecta el transductor corriente-voltaje (tierra virtual). Las conexiones a la cámara se hacen por medio de electrodos Ag/AgCl y un puente agar/KCl 1 M (a: conector del electrodo, b: solución KCl 1 M, c: tubo para salida de aire). Los electrodos de potencial y corriente son iguales. La membrana se forma en el agujero (350 μ m) que posee la película de Teflón adherida al tabique divisorio por medio de grasa de silicona. El potencial a la salida del conversor es: $V_o = - I \times R_f$.

solución osmolar. Se prepara la solución de KCl y un cierto volumen se utiliza para disolver en él, la cantidad de no electrolito necesaria de acuerdo al valor leído en las tablas. Ocasionalmente se corrobora la osmolaridad de las soluciones por medio de un osmómetro.

C. - Formación de bicapas.

Las bicapas se forman en cámaras de Teflón (figura 3). Cada cámara posee dos compartimentos, con una capacidad de 3 ml. cada uno, separados por un tabique que tiene un corte en forma de V. Adyacente a cada compartimento existen tres agujeros comunicados con éste que permitirán la conexión con los electrodos y el cambio de soluciones del compartimento. En el tabique se adhiere una lámina de Teflón (25 μm de espesor), por medio de grasa de silicona, con un agujero de diámetro conocido (350 μm) a través del cual quedarán en contacto las soluciones de ambos compartimientos. El agujero se practica en la lámina con un sacabocado hecho con una aguja hipodérmica cortada y afilada.

Para formar la bicapa se aplica la solución de lípidos en n-decano en el agujero de la lámina de Teflón, utilizando una varilla de vidrio pulida al fuego. Se deja evaporar el solvente a temperatura ambiente por 5 a 10 min. y luego se llenan ambos compartimentos con las soluciones necesarias de cloruro de potasio de acuerdo con el experimento a realizar.

La cámara es colocada en un soporte que descansa sobre una base de metal o granito de gran peso colocada sobre una cámara de neumático de auto. Colocando este montaje en el interior de un refrigerador en desuso y haciendo una buena conexión a tierra el sistema queda libre de interferencias mecánicas, acústicas y eléctricas. Bajo la cámara misma se sitúan 2 motores con un imán que, al girar, moverán sendos pequeños agitadores magnéticos colocados en cada compartimento.

La cámara se conecta al sistema de registro por medio de un par de electrodos reversibles Ag/AgCl y un puente salino de Agar/KCl 1M (1% p/v). Se define el compartimiento cis como el lado donde se aplicarán los pulsos rectangulares y los niveles D.C. y donde se agregarán las vesículas de membrana; se define a su vez el lado trans como aquél donde se conecta el transductor corriente-voltaje, siendo este compartimento tierra virtual. Utilizando el generador de pulsos en el modo de pulsos rectangulares, se despliega en el osciloscopio una señal característica indicando continuidad eléctrica entre ambos compartimentos. Aplicando la solución de lípidos al agujero con la varilla de vidrio (que queda bajo el nivel de las soluciones) se observa la formación espontánea de la bicapa (Mueller y col., 1963) por la presencia de una corriente capacitiva. El área de la bicapa en formación está dada por la integral de

la corriente en el tiempo, que es proporcional al cambio de voltaje y a la capacidad del condensador en formación (Alvarez y Latorre, 1978). El sistema de medición se calibra por medio de un condensador de capacidad conocida, con lo cual puede conocerse la capacidad final de la bicapa.

Una vez que la membrana se estabiliza se determina su resistencia. Para ello se aplica un nivel D.C. y se amplifica la señal de salida del conversor corriente-voltaje hasta tener una sensibilidad de 10 pA/V. Normalmente se trabajó con bicapas de 250-450 pF de capacidad y una resistencia $\geq 5 \times 10^9 \Omega$.

Una vez obtenida una bicapa de las características mencionadas, se agregan al lado cis 5-10 μ l de la preparación de vesículas, agitando permanentemente hasta que se verifica la incorporación de un canal de potasio activado por calcio a la bicapa. Esta incorporación se evidencia por un salto discreto en la corriente que circula a través de la membrana. Si se produce la incorporación de dos canales o más, todos los saltos tendrán la misma amplitud. En el caso del canal de potasio de músculo liso es necesario imponer un gradiente de concentración 500/100 mM KCl (cis/trans) a través de la bicapa para que exista incorporación. Sin embargo si se utiliza una concentración de potasio mayor o igual a 300 mM, no es imprescindible establecer dicho gradiente. Para el canal de túbulo-T la incorporación espon-

tánea se produce en soluciones simétricas de KCl iguales o mayores a 100 mM; para concentraciones mas bajas (20 mM) también es necesario un gradiente, en este caso 100/20 mM KCl, a través de la membrana. Cuando el canal es incorporado en gradiente de concentración, se procede inmediatamente a perfundir el lado cis de la cámara para establecer condiciones de simetría. En la figura 4 se muestra la incorporación de un canal de potasio de túbulo-T en soluciones simétricas de KCl 300 mM, aplicando un potencial de 40 mV.

D. - Protocolo experimental.

Todos los experimentos que se realizaron comparten el mismo protocolo experimental. La única diferencia estriba en las concentraciones de KCl y el no electrolito impermeante utilizado para establecer el gradiente osmótico.

Luego que se verifica la incorporación de un canal y se lo tiene en condiciones simétricas de KCl, se aplican niveles D.C. entre ± 12 mV variando el potencial en pasos de 2 mV cada vez y se determina la corriente asociada a cada uno de estos potenciales. En algunas ocasiones fue necesario agregar calcio para aumentar la probabilidad de apertura de un canal. Se utilizó como concentración final máxima 100 μ M Ca^{2+} en el medio.

Una vez que se tiene la curva corriente-voltaje en condiciones simétricas (curva control) se procede a establecer el gradiente osmótico. Para ello se perfunde el lado cis



Figura 4.

La incorporación de un canal de túbulo-T en una bicapa que separa soluciones simétricas KCl 300/300 mM se evidencia por un salto discreto en la conductancia basal de la membrana (cb). El estado abierto del canal (o) puede discriminarse dadas las transiciones (t) hacia la línea basal. El potencial aplicado es 40 mV. El registro se realizó en presencia de agitación, de allí el ruido de baja frecuencia en la señal.

de la cámara con un volumen de 30 ml de la solución no electrolito/KCl. Para ello se utiliza un sistema de jeringas, de volumen idéntico, en que una extrae y la otra inyecta solución al compartimento de manera simultánea. Cuando era necesario se utilizaba la misma concentración final de calcio en el medio que en el experimento control. Una vez perfundido el lado cis con la solución respectiva se procede a determinar las corrientes asociadas a los distintos potenciales entre ± 12 mV.

Después de determinar las curvas control y experimental se agrega a cada compartimento 10 μ l de una solución etanólica de valinomicina 3 μ M, alcanzando una concentración final en el compartimento de 10 nM. Se agita constantemente durante 2 a 3 min. y luego de cortar la agitación se aplica un potencial de magnitud y sentido necesario para obtener corriente igual a cero. Este valor es el correspondiente al potencial de dilución que se origina por la diferencia de concentración local de potasio debido al flujo de agua en las capas no agitadas, vecinas a la superficie de la membrana.

IV. - ANALISIS DE LOS DATOS.

Por medio de un registrador térmico los registros de corriente son llevados a cintas de papel graduado. Se mide, para cada potencial aplicado, la corriente que circula

a través del canal, correspondiendo ésta al salto discreto de la corriente sobre el nivel basal de la membrana. Las mediciones se llevan a cabo con la ayuda de una regla graduada en 1/2 de milímetro. Conociéndose la calibración del sistema de medición existe siempre una equivalencia entre los milímetros y los pA de cada salto discreto. Para cada experimento se obtienen 13 pares de datos los que fueron sometidos a una regresión lineal para determinar la mejor recta que ajusta estos valores. Los parámetros obtenidos de estas rectas ajustadas son: la conductancia del canal (que corresponde a la pendiente de la recta) y el valor del potencial al cual la corriente es cero para los casos control y experimental. Según se expuso en el capítulo de teoría, el potencial total que se mide corresponde al potencial de flujo a través del canal más el potencial debido a la diferencia de actividad del catión a ambos lados de la bicapa por la presencia de las capas no agitadas y el flujo osmótico de agua a través de la bicapa. La magnitud de este último potencial se determina midiendo el potencial a corriente cero en presencia de valinomicina. El potencial de flujo es la diferencia entre el potencial (experimental) al cual la corriente es cero y el potencial a corriente cero medido en presencia de valinomicina.

RESULTADOS

Según se explicó en el capítulo de métodos el protocolo experimental requiere de la medición de las corrientes que circulan a través del canal al aplicar potenciales pequeños (± 12 mV). En la figura 5 se muestra un registro de las fluctuaciones de un canal de túbulo-T al aplicar potenciales pequeños, en presencia de glucosa a una concentración de 2 Os/kg. El canal fue incorporado en soluciones simétricas KCl 100 mM.

I. - POTENCIALES DE FLUJO.

Cuando se somete una bicapa lipídica - que contiene un canal permeable a un catión específico - a un gradiente osmótico el agua se moverá de un compartimento a otro a través del canal, impulsada por la diferencia de presión osmótica. En un primer instante a través del canal pasará también el catión permeante arrastrado por las moléculas de agua; la acumulación de carga en el lado que contiene el no electrolito impedirá el flujo de iones. Sin embargo la separación de cargas que se produce generará un potencial eléctrico a ambos lados de la bicapa cuando la corriente es cero. Este potencial es el potencial de flujo (V_s).

Al mismo tiempo la presencia del gradiente osmóti-

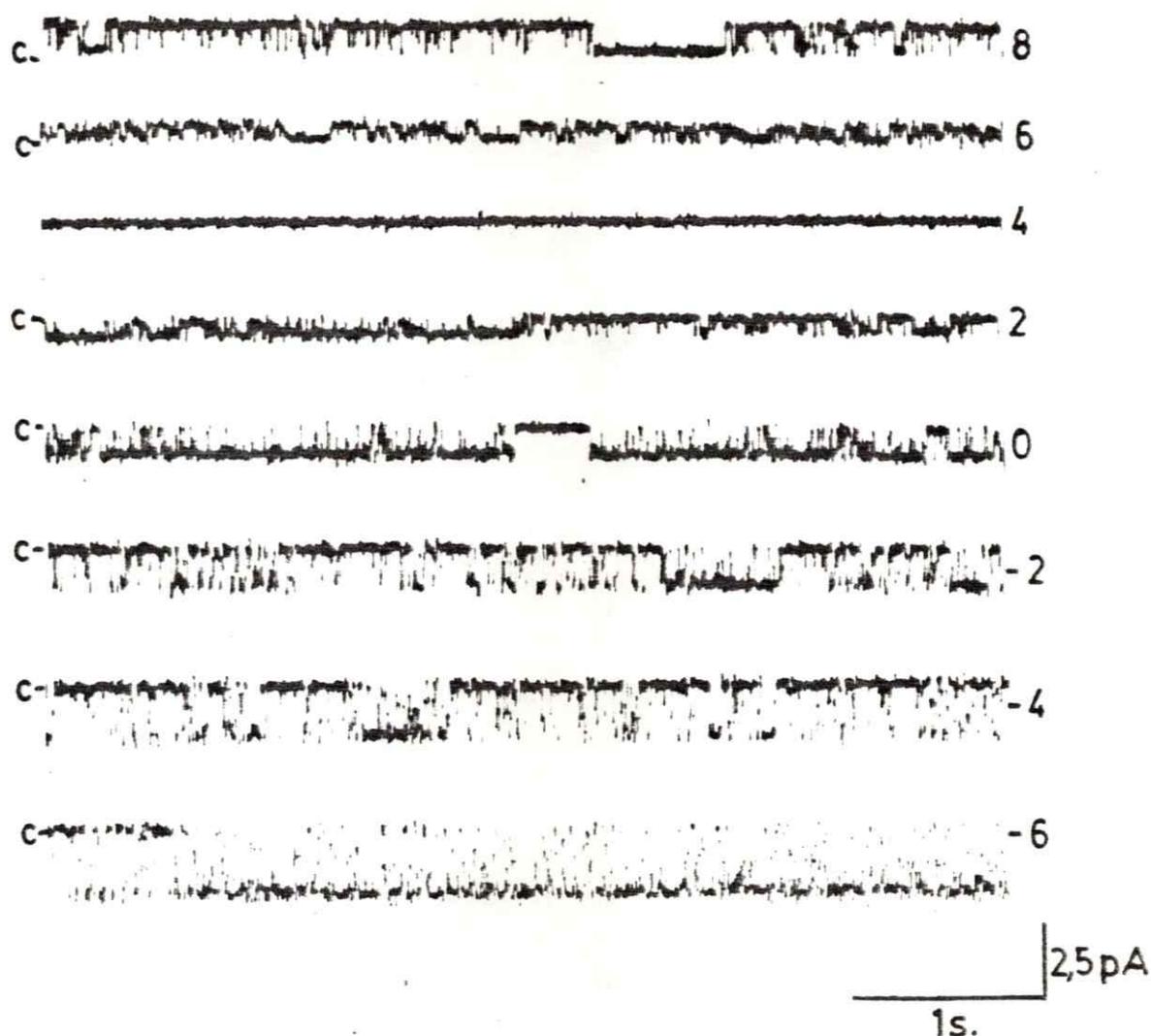


Figura 5.

Registros de las fluctuaciones de un canal de túbulo-T, en presencia de glucosa 2 Os/kg en el lado cis y solución KCl 100 mM simétrico, al aplicar potenciales pequeños. Los potenciales aplicados se indican a la derecha de cada registro. El estado cerrado del canal se indica con c-. Obsérvese que la corriente cero se encuentra en el registro de 4 mV. Si se comparan dos registros de igual potencial y diferente signo se observa una gran asimetría en la corriente que circula a través del canal. Esto trae como consecuencia que la curva corriente-voltaje en presencia de glucosa se desplace hacia la derecha respecto de la curva control. Para estos registros la mínima resolución de corriente fue de 0,5 pA.

co hará que el agua se mueva a través de la bicapa desde el compartimento trans al compartimento cis. Por lo tanto en la vecindad de la superficie cis de la membrana, y como consecuencia de las capas no agitadas adyacentes a ella, la actividad del catión será menor que en el seno de la solución contenida en el compartimento cis. Este fenómeno generará un potencial que se denomina potencial de dilución. La magnitud del potencial de dilución se determina haciendo la bicapa permeable específicamente al potasio por medio de un ionóforo tal como valinomicina. Este potencial (V_v) es el potencial eléctrico generado por la diferencia de concentración de potasio a ambos lados de la bicapa.

De manera que cuando se establece un gradiente osmótico a través de una bicapa que contiene un canal se mide un potencial total (V_o) que es la suma del potencial de flujo y del potencial de dilución. Utilizando la ecuación [12] expuesta en el Apéndice, se obtiene la siguiente expresión para determinar el número de moléculas de agua (N), que existen dentro de la zona estrecha del canal en asociación al ion:

$$V_s = V_o - V_v = N \times cte \text{ (mV)}.$$

En un experimento típico se obtienen los valores del potencial de corrimiento (V_o) respecto del control y el

CURVAS CORRIENTE-VOLTAJE EN PRESENCIA
Y AUSENCIA DE GLUCOSA

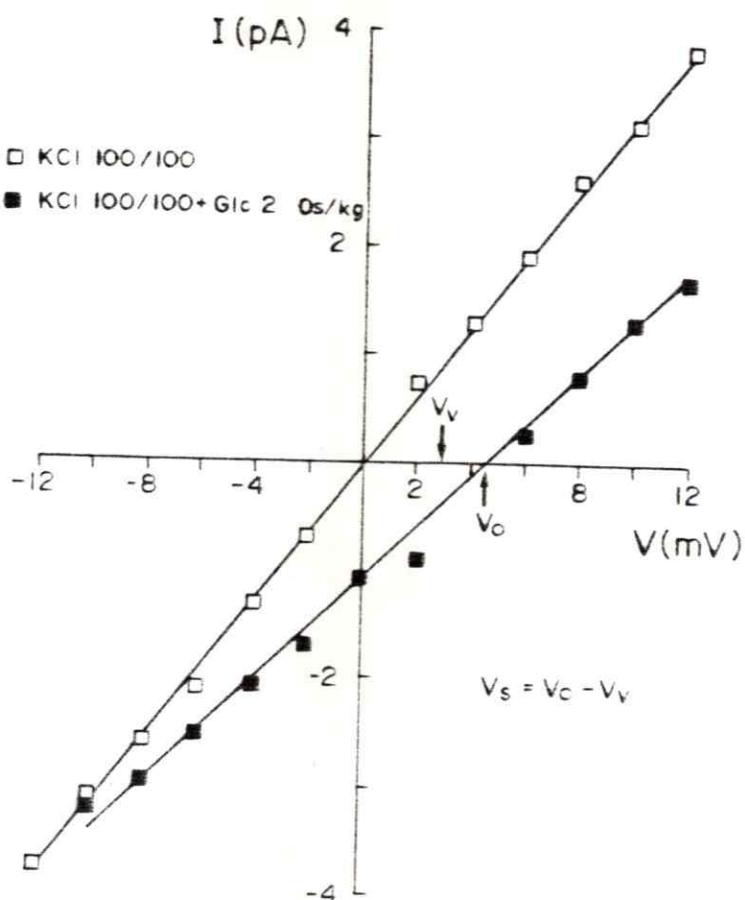


Figura 6.

En presencia de un gradiente osmótico impuesto por glucosa a una concentración 2 Os/kg, la curva experimental (\blacksquare) se desplaza hacia la derecha respecto del control (\square). El potencial de corrimiento, V_o , corresponde al potencial en que la corriente es cero. Se señala el potencial de dilución en el punto V_v ; determinado por medio de valinomicina a una concentración 10 nM. Las rectas que se muestran corresponden a las regresiones lineales de los datos experimentales.

potencial de dilución (V_v). En la figura 6 se muestra uno de estos experimentos en que se señalan dichos potenciales. Para este caso particular $V_o = 4,55$ mV y $V_v = 2,8$ mV entonces $V_s = 1,75$ mV. El número calculado de moléculas de agua es: 1,9.

II. - POTENCIAL DE FLUJO Y OCUPACION DEL CANAL.

La ecuación descrita nos señala el número de moléculas de agua que acompañan a un ion en la zona donde la difusión está restringida a cursar en fila india. Ahora bien si en algún momento dentro de la zona estrecha hay mas de un ion ¿ de que manera se afectará el potencial de flujo ? Supongamos que el canal contiene dos iones, el número de moléculas de agua en su interior debe disminuir, disminuyendo a su vez la magnitud del potencial de flujo en términos absolutos, dada la proporcionalidad entre éste y N . Para determinar si existe una variación en este potencial que podría depender del número de iones en la zona corta y estrecha se realizaron experimentos en un intervalo de concentraciones de potasio que iban desde 20 mM a 500 mM.

En la tabla 1 se muestran los valores de potencial de flujo y el número de moléculas de agua correspondientes en experimentos realizados con el canal de potasio activado por calcio de túbulo-T. Debe recordarse que para poder aplicar la ecuación [12] (Apéndice) que estima el número de

[KCl] (mM)	V _o (mV)	V _v (mV)	V _s (mV)	N
20	4,07	2,20	1,88	2,0
	3,67	2,20	1,47	1,6
	4,24	2,50	1,74	1,9
100	3,52	2,20	1,32	1,4
	4,55	2,80	1,75	1,9
	3,95	2,40	1,55	1,7
300	5,56	4,00	1,56	1,7
	5,37	3,80	1,57	1,7
	5,18	4,00	1,18	1,3
500	9,88	9,00	0,88	1,0
	12,68	11,00	1,68	1,8
	4,31	3,40	0,91	1,0
				N = 1,6 ± 0,1

Tabla 1: POTENCIALES DE FLUJO Y NUMERO DE MOLECULAS DE AGUA MEDIDOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POTASIO EN EL CANAL DE Túbulo-T.

V_o (potencial de corrimiento) se mide estableciendo un gradiente osmótico a través de la bicapa al perfundir el lado cis de la cámara con una solución de glucosa disuelta en la correspondiente solución de KCl. V_v (potencial de dilución) se determina luego de agregar a ambos lados de la cámara 10 µl de una solución 3 µM valinomicina. Los valores para el potencial de flujo (V_s) son las diferencias entre los potenciales anteriores. La estimación de N, el número de moléculas de agua, se obtiene de la ecuación: $N = V_s \times 0,46$ (mV). Se muestra el valor promedio de N y su correspondiente desviación estándar. La concentración de glucosa utilizada para generar el gradiente osmótico fue 2 Os/kg (1,57 M).

moléculas de agua, es necesario que los valores se expresen para 1 Os/kg. Al inspeccionar los datos se observa que el potencial de flujo presenta una tendencia a la disminución a medida que la concentración de potasio aumenta. Realizando un test estadístico de análisis de varianza se obtiene $p > 0.05$, con lo cual las diferencias no son significativas y pueden deberse al azar. El valor promedio calculado de N es $1,6 \pm 0,1$.

III.- COMPARACION DE DOS CANALES DE POTASIO ACTIVADOS POR CALCIO.

En la tabla 2 se muestran los valores del potencial de flujo, su valor promedio y N estimado para tres experimentos en dos preparaciones diferentes: túbulo-T de músculo esquelético y músculo liso de intestino de conejo. Lo que se confronta es el número de moléculas de agua contenidas en el interior de la zona estrecha de ambos canales. Se tiene entonces que el canal de músculo liso contiene en la zona corta y estrecha un máximo de dos moléculas de agua; al igual que el canal de túbulo-T. Los experimentos comparados fueron llevados a cabo en soluciones simétricas KCl a una concentración 300 mM. Para establecer el gradiente osmótico en el lado cis se utilizó glucosa 2 Os/kg.

	Vs (mV)	Vs (mV)	N
Músculo liso	0,89 0,77 0,84	0,83 ± 0,049	1,80 ± 0,10
túbulo-T	0,78 0,79 0,59	0,72 ± 0,092	1,57 ± 0,20

Tabla 2: COMPARACION DE LOS POTENCIALES DE FLUJO Y NUMERO DE MOLECULAS DE AGUA PARA DOS CANALES DE POTASIO ACTIVADOS POR CALCIO.

Se muestran los valores del potencial de flujo expresados para i_0 , su valor promedio y el número de moléculas de agua estimado para los canales de potasio activados por calcio que se encuentran en músculo liso de intestino de conejo y en túbulo-T de músculo esquelético de conejo.

En ambos casos se utilizó una concentración de 300 mM KCl y glucosa como no electrolito impermeante a una concentración 2 Os/kg.

IV. - CAMBIOS EN LA CONDUCTANCIA Y RESISTENCIAS DE ACCESO.

Cuando se realiza la medición del potencial de corrimiento (V_o) para determinar el potencial de flujo se espera que la recta resultante se desplace a la derecha de la curva control y que ambas rectas se mantengan paralelas. Sin embargo nuestros resultados muestran un cambio en la pendiente de la recta experimental. Esto significa que la conductancia del canal disminuye en presencia del no electrolito (figura 6). La figura 7 muestra la razón promedio de la conductancia experimental y la conductancia control (g./g.) a diferentes concentraciones de KCl. La conductancia del canal se determina de la pendiente de la curva I/V. g./g. es independiente de la concentración de KCl y su valor es: $0,73 \pm 0,03$; esto indica que la conductancia del canal en presencia de glucosa 2 Os/kg cae un 27% respecto de la conductancia control.

La conducción de los iones a través de un canal implica el paso de éstos desde la solución a la boca o vestibulo, luego el paso del ion a través de la vía de conducción (zona corta y estrecha) y finalmente el paso desde el segundo vestibulo a la solución del otro lado. Podemos decir que cada una de estas zonas del canal representa una resistencia al paso del ion; de manera que un canal iónico puede ser tratado desde un punto de vista eléctrico como tres resistencias en serie. Dos resistencias,

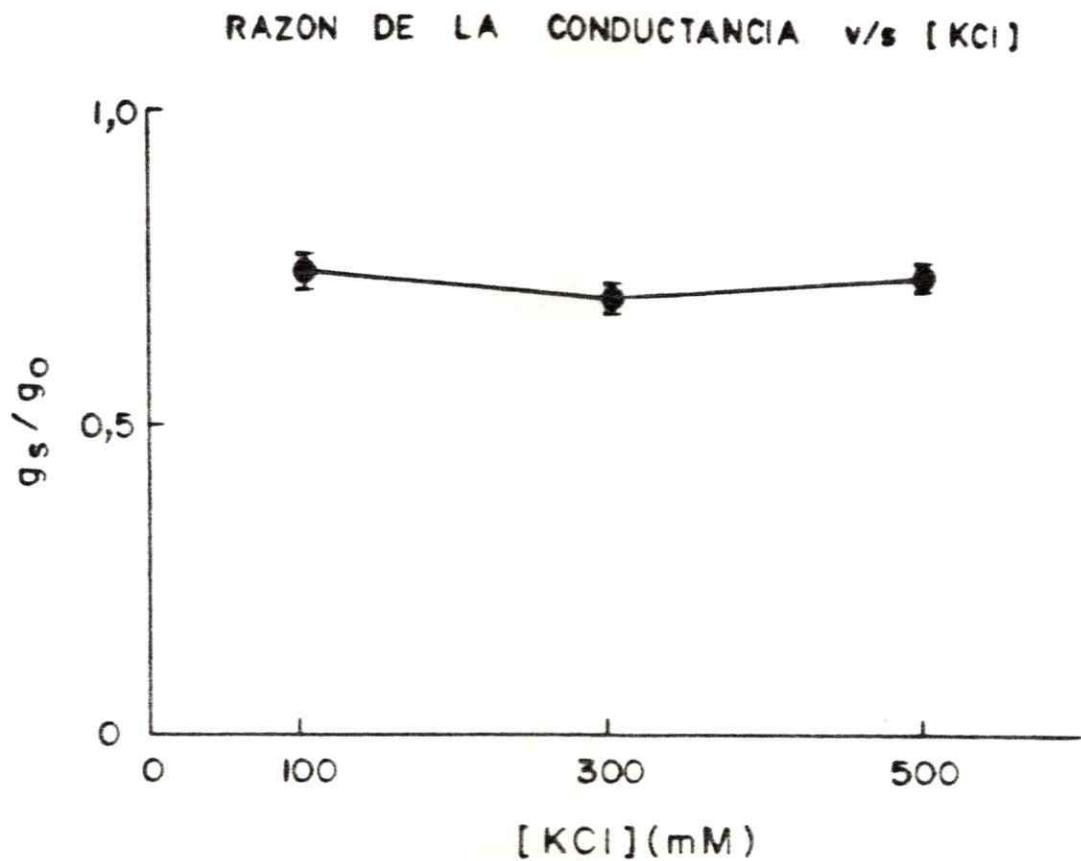


Figura 7.

En presencia de glucosa 2 Os/kg se tiene una disminución de la conductancia del canal de túbulo-T. Esta disminución, según se muestra, es independiente de la concentración de KCl utilizada. Cada punto corresponde al promedio de tres experimentos y su desviación estándar.

llamadas resistencias de acceso, que corresponden a los vestíbulos o bocas del canal y una tercera resistencia que corresponde a la vía de conducción misma. Denominaremos a la resistencia de acceso citoplasmática (lado cis) R_1 , a la resistencia de la zona corta del canal R_2 y a la resistencia de acceso del lado trans R_3 (figura 8a). La resistencia total del canal es:

$$R_0 = R_1 + R_2 + R_3.$$

Cuando el canal es sometido a un gradiente osmótico su conductancia disminuye, lo que significa que su resistencia al paso de los iones aumenta. Como la solución hiperosmótica está en contacto con el vestíbulo cis podemos suponer que el aumento en la resistencia total del canal es debido sólo al cambio de la resistencia del vestíbulo cis y que las otras dos resistencias se mantienen constantes (figura 8b). En este caso la resistencia del canal en condiciones experimentales se escribe como:

$$R_S = R_1' + R_2 + R_3.$$

Ahora bien, ¿Cuál es el sentido físico de esta resistencia R_1' ? Al agregar un no electrolito como glucosa a una solución de cloruro de potasio se tiene un cambio sustancial de las propiedades de los iones en solución. En particular la movilidad de los iones se ve altamente afectada por la presencia de glucosa en la solución. Esto se desprende de experimentos en que se midió la conductancia de

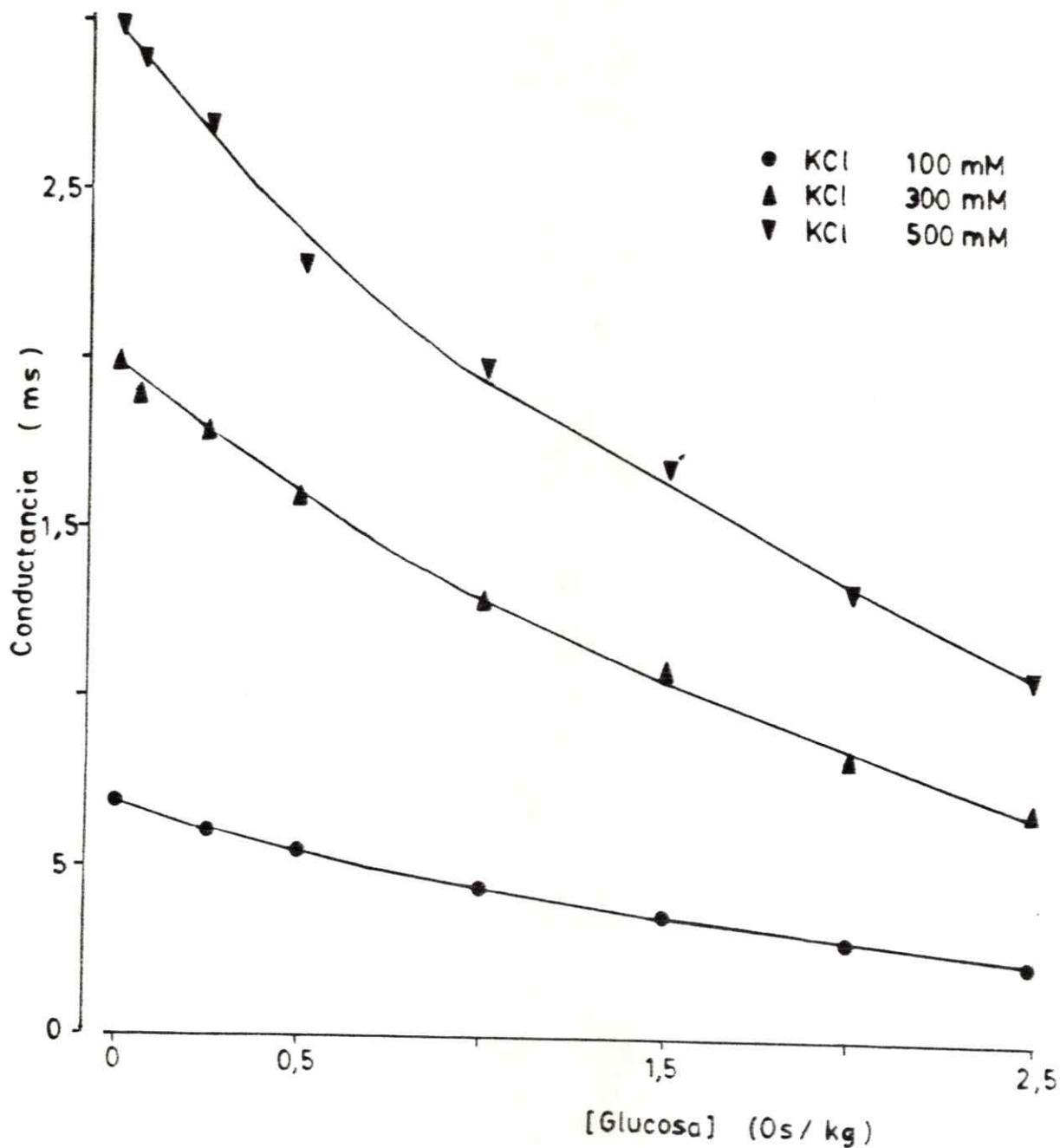


Figura 9.

Soluciones de cloruro de potasio en presencia de un no electrolito tal como glucosa presentan una disminución de la conductancia. La disminución porcentual para cada una de las curvas es igual, aproximadamente 1/2 de la conductividad de la solución KCl pura para las soluciones KCl/glucosa 2 Os/kg. Las curvas que unen los puntos no corresponden a ningún ajuste teórico.

soluciones de KCl/glucosa (figura 9), y la viscosidad de las mismas. De manera que existe una relación directa entre la disminución de la conductancia del vestíbulo cis y la disminución de la conductancia de la solución.

Para determinar la magnitud del cambio en la resistencia de acceso del lado cis se pueden plantear las siguientes ecuaciones. La diferencia de resistencias entre el canal con glucosa y sin glucosa es:

$$\Delta R = R_s - R_o = R_1' - R_1$$

Dado que la conductancia equivalente de la solución KCl/glucosa 2 Os/kg disminuye 2,35 veces respecto de la solución de KCl pura, se tiene:

$$R_1' = 2,35 \times R_1$$

$$\text{Por lo tanto, } R_1 = \Delta R / 1,35 \quad [14]$$

La suposición implícita en esta derivación es que todo el cambio en la conductancia (resistencia) del canal se debe a la presencia de glucosa en el vestíbulo cis y que ni la resistencia de la zona corta del canal (R_2), ni la resistencia de acceso del lado trans (R_3) se ven afectados por la presencia de glucosa en el vestíbulo cis. Además suponemos que la solución desde el punto de vista de su conductancia se comporta de igual manera en la boca del canal y en la celda del conductímetro.

En la tabla 3 se muestran los valores de las resistencias en condiciones control (R_o) y experimental

(R_s). Utilizando estos valores de resistencia y la ecuación [14] se calcula el valor de la resistencia de acceso (R_1). Suponiendo $R_1 = R_2$ se puede calcular la resistencia de la zona corta del canal (R_2). Esta última resistencia corresponde a un $1/3$ de la resistencia total del canal

[KCl] (mM)	R ₀ (GΩ)	R _S (GΩ)	R ₁ (GΩ)	R ₂ (GΩ)
100	3,4	4,6	0,8	1,8
	3,3	4,7	1,0	1,3
	3,5	4,5	0,7	2,1
300	3,0	4,4	1,0	1,0
	3,1	4,3	0,9	1,3
	3,0	4,1	0,8	1,4
500	2,0	2,7	0,5	1,0
	2,2	3,0	0,6	1,0
	2,3	3,2	0,7	0,9

Tabla 3: VALORES DE RESISTENCIA DEL CANAL DE Túbulo-T MEDIDOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POTASIO.

R₀ y R_S son los valores de la resistencia total del canal, en condiciones control y experimental respectivamente, determinados del recíproco de la conductancia. La condición experimental se estableció generando un gradiente osmótico con soluciones KCl/glucosa (2 Os/kg). R₁ es la resistencia del vestibulo (R₁ = R₃), calculada según [14]. R₂ es la resistencia de la zona corta y estrecha, calculada de: R₀ - 2 R₁.

DISCUSION

I. - LONGITUD DEL CANAL DE POTASIO ACTIVADO POR CALCIO.

Según se indicó en la introducción la metodología utilizada en el presente trabajo ha permitido determinar la longitud de tres canales diferentes. En el caso de gramícidina A existe una discrepancia en la determinación del número de moléculas de agua. Rosenberg y Finkelstein (Rosenberg y Finkelstein, 1978a; 1978b) determinan un valor de 7 moléculas de agua para este canal (a concentraciones relativamente bajas de electrolito), en cambio Levitt (Levitt y col., 1978) estima que estas son 11. Estas diferencias se deben a que los experimentos realizados por Levitt no toman en cuenta la presencia de un potencial de dilución, por lo tanto el valor para el potencial de flujo que él obtiene es en realidad el potencial total; $V_o = V_s + V_v$. Esta sobreestimación del potencial de flujo trae como consecuencia un cálculo erróneo de N.

Por otro lado nos parece importante destacar que dada las propiedades de transporte de la valinomicina (Pinkerton y col., 1969), ésta no contribuye al potencial de flujo, i. e., no existe movimiento de agua a través de valinomicina. De manera que la presencia del ionóforo en el medio permite determinar únicamente la magnitud del poten-

cial de dilución.

El valor que se obtiene para N (número de moléculas de agua) es un número fraccionario. Esto significa que dentro del canal pueden haber 1 ó 2 moléculas de agua en asociación al ion. Evidentemente 2 moléculas de agua es la cota superior para la situación descrita. Se estima la longitud máxima de la zona corta y estrecha utilizando un radio iónico para el potasio de 1,33 Å y un radio molecular para el agua de 1,39 Å (Robinson y Stokes, 1970).

La longitud máxima calculada de la zona corta es de unos 0,8 nm en donde pueden situarse un ion potasio y dos moléculas de agua en fila india. En la figura 10 se muestra un esquema de la estructura propuesta para la zona corta y estrecha del canal.

La derivación de la ecuación $V_s = N \times 0,46$, descrita en el Apéndice, supone que N es el número de moléculas de agua que acompañan a un ion en el interior de un canal, o una zona del canal, donde la difusión cursa en fila india. Realizando un análisis estadístico de los potenciales de flujo obtenido a diferentes concentraciones de potasio se demostró que las diferencias entre muestras no son significativas ($p > 0.05$). Entonces podemos decir que en el intervalo de concentraciones utilizadas el canal contiene en el interior de su zona corta y estrecha como máximo dos moléculas de agua en asociación a un ion. Sin embargo también

MODELO DE LA ZONA ESTRECHA DEL
CANAL DE TUBULO-T

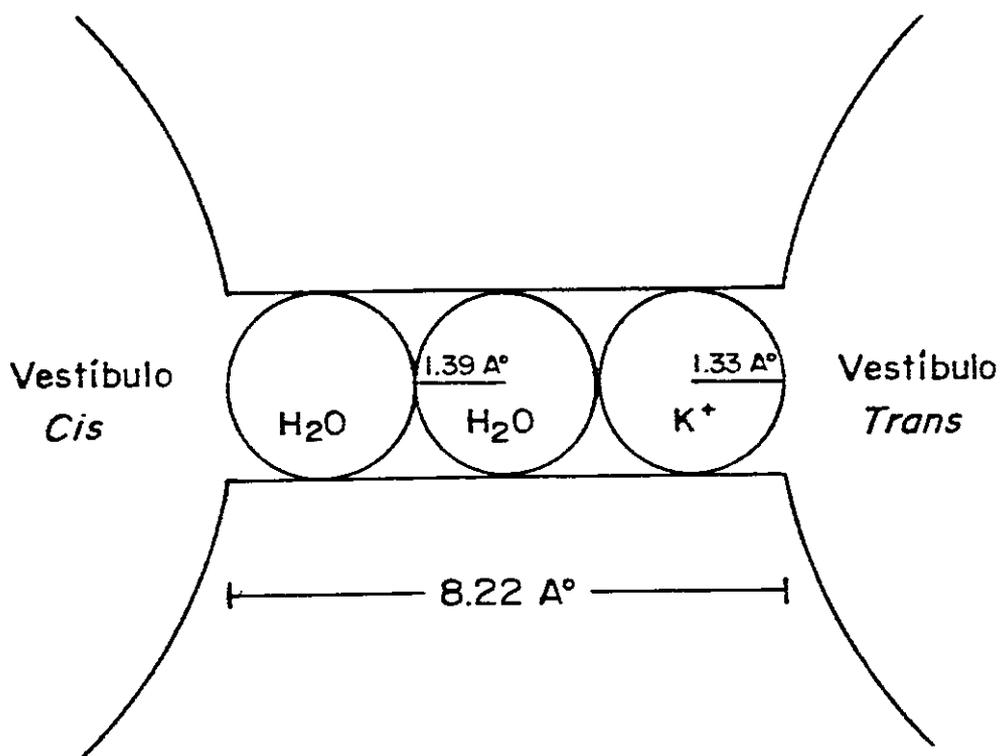


Figura 10.

Número máximo de moléculas de agua en asociación al ion, en la zona donde la difusión es en fila india. Con un radio molecular de $1,39 \text{ \AA}$ para el agua y un radio iónico de $1,33 \text{ \AA}$ para el potasio, se tiene una longitud de $8,22 \text{ \AA}$ para la zona corta y estrecha del canal de potasio activado por Ca^{2+} de túbulo-T.

podría argumentarse que pueden existir cuatro moléculas de agua y dos iones. Se ha demostrado que la existencia de dos iones simultáneamente en el interior del canal (Cecchi y col, 1986) es improbable incluso a concentraciones de KCl tan altas como 1 M. Por lo tanto la zona corta y estrecha acomoda en su interior un solo ion potasio y dos moléculas de agua en asociación con éste. Basándonos en lo anterior podemos estimar que la zona corta y estrecha, de ambos canales de potasio activados por calcio, tiene una longitud máxima de unos 0,8 nm.

Existe gran cantidad de evidencias que apunta a una similitud entre el canal de potasio activado por calcio de túbulo-T de músculo esquelético de conejo y el canal de potasio activado por calcio de músculo liso de intestino de conejo. Con los resultados expuestos se tiene una evidencia mas de dicha similitud.

Para corroborar la validez de los resultados expuestos se realizaron una serie de experimentos de determinación de potenciales de flujo pero esta vez en presencia de sorbitol como no electrolito para establecer el gradiente osmótico. Los resultados de dichos experimentos son concordante con los primeros. En el interior de la zona estrecha y corta se ubican como máximo 2 moléculas de agua en asociación a un ion potasio. Esto indica que los resultados de los potenciales de flujo medidos no son atribuibles a un efecto

particular de la glucosa sobre el canal.

Ya se ha establecido que en presencia de un no electrolito se determina un potencial total que es la suma del potencial de flujo a través del canal y un potencial de dilución a través de la bicapa; además existe un término que corresponde a la diferencia de potencial que tienen los electrodos por construcción. De manera que $V_o = V_s + V_d + V_e$. Por otra parte cuando se adiciona valinomicina al medio, y dado que las corrientes medidas son dos ordenes de magnitud mas grandes que las corrientes que circulan a través del canal, entonces $V_v = V_d + V_e$. Realizando la diferencia entre el potencial total y el potencial de valinomicina se tiene:

$$V_o - V_v = V_s + V_d + V_e - (V_d + V_e) = V_s;$$

por lo tanto no es imprescindible realizar experimentos control para llevar a cabo las determinaciones de potenciales de flujo.

II. - MODELO ESTRUCTURAL DEL CANAL Y LONGITUD CALCULADA.

Los resultados expuestos anteriormente, junto con los resultados obtenidos por Alfredo Villarroel (Villarroel, 1986), permiten decir que los canales de potasio activados por calcio de túbulo-T de músculo esquelético de conejo y de músculo liso de intestino de conejo se asemejan a un reloj de arena. Poseen dos grandes vestibulos de aproximadamente 1 nm de largo cada uno y entre ambos vestibulos existe una

zona corta y estrecha que mide 0,8 nm de largo.

Hille (Hille, 1984) acuñó el término "filtro de selectividad" para denominar a aquella zona del canal en que el ion permeante interactúa estrechamente con la proteína. Se postula que el canal de túbulo-T presentaría dicho filtro de selectividad en una zona corta y estrecha (Latorre y Miller, 1983), que puede ser descrito como una constricción del lumen de éste. En este punto nos parece importante hacer notar que se hace necesario determinar el radio de la zona corta y estrecha del canal. Para ello deben realizarse mediciones de potenciales de flujo en presencia de no electrolitos de tamaños menores que la glucosa tales como acetamida y formamida para concluir cual es el diámetro molecular mínimo que excluye el canal y así completar el modelo estructural que se propone.

III. - RESISTENCIAS DE ACCESO Y CONDUCTANCIA DEL CANAL.

El estudio de las vías de acceso realizadas en este canal (Villarreal, 1986), demuestra que ambos vestíbulos no son idénticos. El vestíbulo cis se asemeja a un embudo de un radio de a lo menos 5 nm y una profundidad de 1 nm terminando en una constricción abrupta; en tanto el vestíbulo trans tiene un radio de 3-4 nm, el cual disminuye progresivamente hasta unos 2 nm a una profundidad de 1 nm. Además el vestíbulo trans tiene carácter polar en contra-

posición con el vestíbulo cis que es hidrofóbico. Esta asimetría de las vías de acceso implica de manera inmediata que la aproximación $R_1 = R_2$ no es del todo correcta. Es indispensable, entonces, realizar experimentos en presencia de glucosa en el lado trans del canal y determinar de que manera la conductancia de éste se ve o no afectada.

Si la difusión de los iones en los vestíbulos de este canal, no presentaran limitación alguna entonces la conductancia del canal estaría dada eminentemente por la magnitud de la resistencia de la zona corta y estrecha a los iones. Si las magnitudes de estas resistencias (de acceso y de la zona corta) llegan a ser comparables entonces la conductancia del canal está determinada por toda la estructura del canal y no por una zona en particular (Lauger, 1976)

De la tabla 3 se desprende que en el caso del canal de potasio activado por calcio la magnitud de la resistencia de la zona corta y estrecha es $1/3$ de la resistencia total. Latorre y Miller (Latorre y Miller, 1983) postulan que la difusión de los iones en los vestíbulos cursa de la misma manera que en solución y que la conductancia del canal está determinada por la zona corta. De acuerdo a los resultados expuestos en el presente trabajo el transporte de los iones a través del canal está determinado no solo por la resistencia de la zona corta y estrecha si no

también por la resistencia aportada por ambos vestibulos del canal. El flujo de los iones a través del canal, en presencia de un potencial de transmembrana, drenará iones del vestibulo cis y se producirá una acumulación en el vestibulo trans, en consecuencia se generará un gradiente de concentración y un cambio en la caída de potencial entre el vestibulo y el seno de la solución (Lauger, 1976; Andersen y Procopio, 1980; Andersen, 1983). Por lo tanto cualquier modelo de conducción que se formule para estos canales de potasio activados por calcio, deben necesariamente tomar en cuenta la contribución de las resistencias de los vestibulos en la vía de conducción del canal.

La explicación para la disminución de la conductancia del canal se basa principalmente en la disminución de la movilidad de los iones en presencia de glucosa. En síntesis la presencia de glucosa hace que la concentración efectiva del ion en el vestibulo del canal sea menor que la concentración del mismo ion en la boca en condiciones control. La cantidad de iones que el canal transporta es menor porque la concentración disponible del mismo es menor.

Otro punto que nos parece importante se refiere al método utilizado para la determinación de la magnitud de las resistencias de cada zona del canal. Se supuso que el canal puede ser tratado como tres resistencias en serie y que la variación de una de las tres resistencias puede explicar la

disminución de la conductancia de todo el canal. Esto supone que la presencia de glucosa en el lado cis solamente afecta dicha resistencia y que la resistencia intrínseca del canal no cambia. El mismo argumento es válido para la resistencia del vestíbulo trans. Se ha descrito disminución de la conductancia del canal de hemocianina en presencia de glucosa y sacarosa (Menestrina y Pasquali, 1984). La explicación propuesta para la caída de la conductancia de este canal se basa en evidencias que demuestran un cambio de la estructura cuaternaria de la hemocianina por interacciones con dichos no electrolitos. Ellos no realizan ninguna consideración de cambios de las propiedades de la solución por la presencia de glucosa o sacarosa. Es importante destacar que no puede descartarse un cambio de la estructura cuaternaria de la proteína del canal de potasio activado por calcio al interactuar con glucosa, lo que puede traer como consecuencia un cambio en las propiedades de conducción de los iones a través del canal.

IV. - CONCLUSION GLOBAL.

Los canales de potasio activados por calcio aislados de túbulo-T de músculo esquelético de conejo y de membrana de células de músculo liso de intestino de conejo presentan una zona corta y estrecha cuya longitud máxima alcanza 0,8 nm en la cual pueden situarse 2 moléculas de

agua y un ion potasio en fila india. Los canales de hemocianina (Cecchi y col., 1981), de retículo sarcoplásmico, de túbulo-T y de músculo liso de intestino de conejo comparten el modelo arquitectónico de dos grandes vestibulos y una zona central corta y estrecha. Las magnitudes de los potenciales de flujo obtenidos en los canales de potasio activados por calcio de túbulo-T y de músculo liso son similares a aquellos medidos en los canales de hemocianina y de retículo sarcoplásmico. Esto en contraposición con los potenciales de flujo medidos para el canal de gramacidina A que es mas bien un cilindro de radio uniforme del mismo largo que la bicapa.

REFERENCIAS

- Adams, P. R. ; Constantini, A. ; Brown, D. A. Clark, R. B. 1982. Intracellular Ca^{2+} activates a fast voltage-sensitive K^+ current in vertebrates sympathetic neurones. Nature 296: 746-749.
- Alvarez, O. ; Latorre, R. 1978. Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers. Biophys. J. 21: 1-17.
- Alvarez, O. 1986. How to set up a bilayer system. En: Ion Channel Reconstitution. 115-130 Ed: C. Miller. Plenum Press, New York.
- Andersen, O. S. ; Procopio, J. 1980. Ion movement through gramicidin A channels. On the importance of the aqueous diffusion resistance and ion-water interactions. Acta Physiol. Scand. Suppl. 481: 27-35.
- Andersen, O. S. 1983. Ion movement through gramicidin A channels. Studies on the diffusion-controlled association step. Biophys. J. 41: 147-165.
- Barrett, J. N. ; Magleby, K. L. ; Pallota, B. S. 1982. Properties of single calcium-activated potassium channels in culture rat muscle. J. Physiol. 331: 211-230.
- Blatz, A. L. ; Magleby, K. L. 1984. Ion conductance and selectivity of single calcium activated potassium channels in rat culture muscle. J. Gen. Physiol. 84: 1-23.
- Cecchi, X. ; Alvarez, O. ; Latorre, R. 1981. A three-barrier model for the hemocyanin channel. J. Gen. Physiol. 78: 657-681.
- Cecchi, X. ; Bull, R. ; Franzoy, R. ; Coronado, R. ; Alvarez, O. 1982. Probing the pore size of the hemocyanin channel. Biochim. Biophys. Acta. 693: 173-176.

- Cecchi, X. ; Alvarez, O. ; Wolff, D. 1986. Characterization of a calcium activated potassium channel from rabbit intestinal smooth muscle incorporated into planar bilayers.
J. Membrane Biol. 91: 11-18.
- Darbon, H. ; Angelides, K. J. 1984. Structural mapping of the voltage-dependent sodium channel.
J. Biol. Chem. 259: 6074-6084.
- Finkelstein, A. ; Rosenberg, P. A. 1979. Single-file transport: Implications for ion and water movement through gramicidin A channels.
En: Membrane Transport Processes. 3: 73-88.
Ed: C. F. Stevens y R. W. Tsien. Raven Press, New York.
- Finkelstein, A. ; Andersen, O. S. 1981. The gramicidin A channel: a review of its permeability characteristics with special reference to the single-file aspect of transport.
J. Membrane Biol. 59: 155-171.
- Hille, B. 1984. Ionic channels of excitable membranes.
Sinauer Associated Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Hodgkin, A. L. ; Keynes, R. D. 1955. The potassium permeability of a giant nerve fibre.
J. Physiol. (Lond.) 128: 61-88.
- Karlin, A. 1980. Molecular properties of nicotinic acetylcholine receptor.
En: The cell surface and neuronal function. 191-260.
Ed: W. Cotman, G. Poste y G. L. Nicolson.
Elsevier North Holland Biomedical Press.
- Latorre, R. ; Vergara, C. ; Hidalgo, C. 1982. Reconstitution of planar lipid bilayers of Ca^{2+} -dependent K^+ from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 805-809.
- Latorre, R. ; Miller, C. 1983. Conduction and selectivity in potassium channels.
J. Membrane Biol. 71: 11-30.
- Lauger, P. 1976. Diffusion-limited ion flow through pores.
Biochim. Biophys. Acta. 455: 493-509.

- Levitt, D. G. 1974. A new theory of transport for cell membrane pores. General theory and application to red cell.
Biochim. Biophys. Acta. 373: 115-131.
- Levitt, D. G. ; Subramanian, G. 1974. A new theory of transport for cell membrane pores. Exact results and computer simulation (molecular dynamics).
Biochim. Biophys. Acta. 373: 132-140.
- Levitt, D. G. ; Elias, S. R. ; Hautman, J. M. 1978. Number of water molecules coupled to the transport of sodium, potassium, and hydrogen ions via gramicidin, nonactin, or valinomycin.
Biochim. Biophys. Acta. 512: 436-451.
- Marty, A. 1981. Ca^{2+} -dependent K^+ channels with large unitary conductance in cromaffin cell membranes.
Nature 291: 487-500.
- Menestrina, G. ; Pasquali, F. 1984. Effects of carbohydrates on the ion conductance of the hemocyanin channel.
Z. Naturforsch. 40c: 85-91.
- Miller, C. ; Racker, E. 1976. Fusion of phospholipid vesicles reconstituted with cytochrome c oxidase mitochondrial hydrophobic protein.
J. Membrane Biol. 26: 319-333.
- Miller, C. 1982. Coupling of water and ion fluxes in a K^+ -selective channel of sarcoplasmic reticulum.
Biophys. J. 38: 227-230.
- Miller, C. 1983a. Reconstitution of ion channels in planar lipid bilayers membranes: a five years progress report.
In: Comments Mol. Cell Biophys. 1: 413-428.
- Miller, C. 1983b. Integral membrane channels: studies in model membranes.
Physiol. Rev. 63: 1209-1241.
- Mishina, M. ; Tobimatsu, T. ; Imono, K. ; Tanaka, K. ; Fujita, Y. ; Fukuda, K. ; Kurasaki, M. ; Takahashi, H. ; Morimoto, Y. ; Hirose, T. ; Inayama, S. ; Takahashi, T. Kuno, M. ; Numa, S. 1985. Location of functional regions of acetylcholine receptor α -subunit by site-directed mutagenesis.
Nature. 313: 364-369.

- Moczydlowski, E. ; Latorre, R. 1983. Kinetics of Ca^{2+} -activated K^+ channels from rat skeletal muscle incorporated into planar lipid bilayers: evidence for two voltage-dependent Ca^{2+} binding reactions. *J. Gen. Physiol.* 82: 511-542.
- Mueller, P. ; Rudin, D. ; Tsien, H. T. ; Wescott, W. 1963. Method for the formation of single bimolecular membranes in aqueous solutions. *J. Phys. Chem.* 67: 534-535.
- Neher, E. ; Sakmann, B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature (Lond.)* 260: 779-802.
- Neher, E. ; Sakmann, B. ; Steinback, J. H. 1978. The extracellular patch-clamp: a method of resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pfugers Arch.* 375: 219-228.
- Pallota, B. S. ; Magleby, K. L. ; Barret, J. N. 1981. Single channel recording of Ca^{2+} -activated K^+ current in rat muscle cell culture. *Nature* 293: 471-474.
- Pinkerton, M. ; Steinrauf, L. K. ; Dawkins, P. 1969. The molecular structure and some transport properties of valinomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35: 512-518.
- Robinson, R. A. ; Stokes, R. H. 1970. *Electrolyte solutions.* Butterwood and Co. Publishers, London.
- Roseblatt, M. ; Hidalgo, C. ; Vergara, C. ; Ikemoto, N. 1981. Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 256: 8140-8148.
- Rosenberg, P. A. ; Finkelstein, A. 1978a. Interaction of ions and water in gramicidin A channels: streaming potential across lipid bilayers membranes. *J. Gen. Physiol.* 72: 327-340.
- Rosenberg, P. A. ; Finkelstein, A. 1978b. Water permeability of gramicidin A-treated lipid bilayers membranes. *J. Gen. Physiol.* 72: 341-350.

- Singer, S. ; Nichols, G. 1972. The fluid mosaic model of the structure cell membranes.
Science 175: 720-731.
- Singer, J. J. ; Walsh, J. V. 1984. Large conductance calcium activated potassium channels in smooth muscle cell membrane. Reduction in unitary current due to internal Na⁺ ions.
Biophys. J. 45: 68-70.
- Urry, D. W. 1971. The gramicidin A channel: a proposed $n_{1,2}$ helix.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 68: 672-676.
- Vergara, C. 1983. Characterization of a calcium-activated potassium channel from rabbit muscle incorporated into planar bilayers.
Tesis. Harvard University. Boston, Massachusetts.
- Vergara, C. ; Latorre, R. 1983. Kinetics of Ca²⁺-activated K⁺ channel from rabbit skeletal muscle incorporated into planar bilayers.
J. Gen. Physiol. 82: 543-568.
- Villarroel, A. 1986. Caracterización de las vías de acceso del canal de potasio activado por calcio de músculo esquelético de rata.
Tesis. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Weigele, J. B. ; Barchi, R. L. 1982. Functional reconstitution of the purified Na⁺ channel protein from rat sarcolemma.
Proc. Nat. Acad. Sci U. S. A. 79: 3651-3655.
- Wong, S. ; Lecar, H. Adler, M. 1982. Single calcium-dependent potassium channels in clonal anterior pituitary cells.
Biophys. J. 39: 313-317.
- Yellen, G. 1984. Ionic permeation and blockade in Ca²⁺-activated K⁺ channel of bovine cromaffin cells.
J. Gen. Physiol. 84: 157-186.

APENDICE

Para realizar las siguientes derivaciones se tomaron como punto de partida algunas ecuaciones descritas por Rosenberg y Finkelstein (Rosenberg y Finkelstein, 1978a, Finkelstein y Rosenberg, 1979).

Supongamos un canal idealmente selectivo a cationes, incorporado a una bicapa lipídica separando dos soluciones simétricas de un electrolito. Uno de los compartimentos (compartimento 2) es perfundido con una solución del mismo electrolito y un no electrolito impermeante. Al establecerse el gradiente osmótico se generará un flujo de agua y iones desde el compartimento 1 al compartimento 2. Si el circuito eléctrico está abierto, es decir los iones no pueden retornar al compartimento 1 por un circuito externo ($I = 0$), entonces se generará un potencial eléctrico, por el paso de los iones. El proceso se detendrá cuando dicho potencial, que se opone al movimiento de los iones, compense exactamente la energía que el agua entrega a los iones. El estado de equilibrio se expresa como:

$$N \mu_w(1) + \mu_+(1) = N \mu_w(2) + \mu_+(2) \quad [1]$$

donde μ_w es el potencial químico del agua y μ_+ es el poten-

cial electroquímico del ion.

Bajo las condiciones descritas la especie que está formalmente en equilibrio es el catión hidratado por N moléculas de agua; la ecuación anterior puede expandirse a:

$$g_1 \text{ NRT } \ln X_w^{(1)} + \mu_+^{(1)} + FV^{(1)} = g_2 \text{ NRT } \ln X_w^{(2)} + \mu_+^{(2)} + FV^{(2)} \quad [2]$$

donde g es el coeficiente osmótico racional; X_w es la fracción molar del agua; μ_+ es el potencial químico del catión; V es el potencial electrostático y R , T , F tienen sus significados usuales. Reordenando la ecuación anterior se obtiene la expresión para el potencial:

$$V^{(2)} - V^{(1)} = V_o = (NRT/F)[g_1 \ln X_w^{(1)} - g_2 \ln X_w^{(2)}] + (\mu_+^{(1)} - \mu_+^{(2)})/F \quad [3]$$

El primer término de la ecuación es el potencial de flujo generado por la diferencia de presión osmótica a ambos lados de la membrana, el segundo término de la ecuación representa la contribución al potencial dada por la diferencia de actividad del catión a ambos lados de la membrana. Este término puede hacerse cero ajustando la concentración del electrolito de manera que la actividad del catión sea igual en ambos compartimentos. En la práctica este término se corrige realizando experimentos control con ionóforos específicos al catión. La expresión para el poten-

cial de flujo es:

$$V_s = (NRT/F) [g_1 \ln X_w^{(1)} - g_2 \ln X_w^{(2)}] \quad [4]$$

Por otra parte, se define:

$$g_i \ln X_w = -(W_A/1000) \sum \nu m \bar{\xi}_i \quad [5]$$

donde W_A es el peso molecular del agua; m es la concentración molal del soluto; ν es el número de moles de iones formados desde un mol de electrolito y $\bar{\xi}_i$ es el coeficiente osmótico molal de la sustancia i . Reemplazando [5] en la expresión [4] se tiene:

$$V_s = (NRT/F) [-(W_A/1000) 2m_+ \bar{\xi}_+^{(1)} + (W_A/1000) (m_- \bar{\xi}_-^{(2)} + 2m_+ \bar{\xi}_+^{(2)})] [6]$$

donde $\bar{\xi}_+$ y $\bar{\xi}_-$ es el coeficiente molal osmótico del no electrolito y del electrolito respectivamente.

Una nueva expresión para el potencial de flujo está dada por:

$$V_s = (NRT/F) [\bar{\xi}_s (n_s^{(2)}/n_w^{(2)}) + 2\bar{\xi}_+^{(2)} (n_+^{(2)}/n_w^{(2)}) - 2\bar{\xi}_+^{(1)} (n_+^{(1)}/n_w^{(1)})] [7]$$

siendo n_i el número de moles de i .

Si se cumple que la osmolaridad del electrolito es

la misma en ambos compartimentos y si además la concentración del no electrolito impermeante es mucho mayor que la concentración del electrolito en el mismo compartimento; entonces:

$$V_s = N \frac{RT}{F} \frac{n_s}{n_w} \quad [8]$$

Ya tenemos una expresión para el potencial de flujo. Ahora veremos de que manera éste se relaciona con la diferencia de presión osmótica. Tomemos la siguiente definición:

$$g_i \ln X_w = - (\pi_i \bar{V}_w / RT) \quad [9]$$

donde π_i es la presión osmótica del compartimento i , \bar{V}_w es el volumen molar parcial del agua y R , T tienen sus significados usuales.

Reemplazando [9] en [4] se obtiene la siguiente ecuación, la cual nos da la relación directa entre el potencial de flujo y la diferencia de presión osmótica:

$$V_s = (NRT/F) [-(\pi_1 \bar{V}_w / RT) + (\pi_2 \bar{V}_w / RT)] = N (\Delta\pi \bar{V}_w / F) \quad [10]$$

Finalmente podemos escribir:

$$V_s = N \frac{RT}{F} \bar{\xi}_s \frac{n_s}{n_w} = N \frac{\Delta\pi v_w}{F} \quad [11]$$

Para soluciones 1 osmolal el término $(\bar{\xi}_s n_s)/n_w$ vale 1/55.6, dado que $\bar{\xi}_s$ es igual a 1. RT/F a 20 °C tiene un valor de 25.6 mV. Reemplazando estos valores en la ecuación [8] se tiene una expresión, para el potencial de flujo, dada por:

$$V_s = N \times 0,46 \text{ (mV)} \quad [12]$$

De manera que determinando experimentalmente el valor del potencial de flujo y utilizando la ecuación [12], se puede calcular el número de moléculas de agua que acompañan a un ion dentro de un canal, si se supone que la difusión está restringida a cursar en "fila india".

La derivación anterior supone, además, que el sistema está en equilibrio termodinámico. Sin embargo se pueden definir ecuaciones fenomenológicas que describen la corriente asociada y el flujo de volumen a través de una bicapa, con un canal iónico incorporado, que separa soluciones simétricas de electrolito y sometido a un gradiente osmótico por la presencia de un no electrolito en uno de los compartimentos.

Para una membrana que separa soluciones salinas simétricas se pueden escribir las siguientes ecuaciones

fenomenológicas para la corriente y el flujo de volumen:

$$i.- \quad I = L_{11} \Delta V + L_{12} \Delta P$$

$$ii.- \quad J = L_{21} \Delta V + L_{22} \Delta P$$

donde I es la corriente que circula a través de la membrana, J_v es el flujo de volumen a través de la misma, ΔP es la diferencia de presión del sistema, ΔV es la diferencia de potencial a ambos lados de la bicapa y $L_{i,j}$ son los coeficientes fenomenológicos.

Despejando dichos coeficientes y dadas las relaciones reciprocas de Onsager se encuentra la siguiente expresión para el potencial de flujo:

$$V_s = N' \frac{\bar{V}_w}{F} \Delta P \quad [13]$$

donde N' es el número de moléculas de agua en un canal que presenta difusión en fila india, \bar{V}_w es el volumen molal parcial del agua, ΔP es la diferencia de presión osmótica y F es el Faraday. De manera que la expresión $V_s = N \times cte$ puede ser derivada desde un punto de vista clásico o por medio de la teoría de la termodinámica de los procesos irreversibles, la cual no contiene ninguna suposición implícita a cerca de la ocupación del canal.