

1  
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

La contribución de la bomba electrogénica a las  
características eléctricas del plasmalema y el  
tonoplasto en *Nitella translucens*

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA

RAÚL MARTÍN CRUZ MIRELES

México 1990

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

CAPÍTULO	PÁGINA
PREFACIO	1
Notas y Bibliografía	3
INTRODUCCIÓN	4
Teoría del transporte iónico	6
Los modelos para una membrana biológica	10
Los circuitos quimiosmóticos	15
Notas y Bibliografía	16
ANTECEDENTES	
Introducción	22
Características generales de las <i>Characeae</i>	24
Técnicas quirúrgicas	31
El $E_m$ como producto de la difusión pasiva	33
Arribo de la revolución quimiosmótica	35
Imágen contemporánea	38
Algunas contradicciones	47
Notas y Bibliografía	51
OBJETIVOS	62
MATERIAL Y MÉTODOS	
Cultivo del organismo	63
Instrumentación	65
Condiciones de iluminación	69
Soluciones	70
Determinaciones electrofisiológicas	71
RESULTADOS	
Efecto del pH sobre los parámetros eléctricos	76
Efecto del ortovanadato de sodio	79

Notas y Bibliografía	81
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	
Los efectos del pH externo	83
Los efectos del vanadato sobre el $E_m$	86
Los efectos del vanadato sobre la $R_m$	88
Notas y Bibliografía	93
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL	98
APÉNDICE I	99
APÉNDICE II	100
APÉNDICE III	101

Una tesis se edifica sobre un montón de cadáveres... Ahí no se arriesgan a entrar sino los necróforos que son los fabricantes de otras tantas tesis.

Pierre Lecarme  
*Hypocrite Lector*

## PREFACIO

Pero continuamos realizando tesis. La mayoría de los alumnos piensa que es un pesado e inútil trámite burocrático; uno más de tantos lastres absurdos que nuestra cultura continúa preservando con gran orgullo. Los menos lo consideran un buen ejercicio de redacción y lectura, o un año de gracia para buscar empleo con la relativa tranquilidad que confiere una beca. Poquísimos la conciben como el primer y quizá único contacto que tendrán en su vida con el sistema universitario de investigación y creación intelectual. Por lo que a mí respecta, la tesis constituye la demostración fehaciente del cambio que un individuo ha sufrido en su vida mental como resultado de su paso por la Universidad. (Supongo que no es necesario aclarar que me refiero a la tesis de Licenciatura; el trabajo de Posgrado posee, a mi juicio, otras características que no viene al caso discutir.)

Añadir un prefacio a una tesis resulta poco usual, sin embargo en ésta ocasión era indispensable. Una de las funciones primordiales del prefacio es orientar al lector de tal manera que pueda realizar la lectura siguiendo la ruta que el autor ha considerado más conveniente. En mi caso creo que es fundamental para una correcta comprensión de la tesis señalar por anticipado lo que debe y lo que no debe esperarse encontrar en estas 17 páginas: En un mundo donde existen decenas de millares de libros, y donde solo poseemos, con suerte, 4 mil días netos de vida ¿Cómo elegir nuestras lecturas? Los prefacios: el *minimo minimorum*

La tesis consta de 7 capítulos diseñados de la siguiente manera: El capítulo de INTRODUCCION menciona brevemente la teoría termodinámica para la electrodifusión, los modelos eléctrico y bioquímico de una membrana biológica y las características generales del transporte de materia a través de las biomembranas. En realidad resultará de poco provecho para cualquier lector interesado profundamente en alguna de estas áreas, por lo que es preferible que consulte la bibliografía señalada al final del mismo capítulo. El capítulo de ANTECEDENTES contiene una revisión actualizada de las diversas investigaciones realizada en las *Characeae*, por lo que resultará de mucha utilidad para cualquier interesado en esta área. El capítulo de MATERIAL Y MÉTODOS menciona con detalle algunos problemas que hemos detectado en diversos grupos de investigación relacionados con el cultivo de los organismos y con la forma de reportar las investigaciones, por lo que conviene consultarlo. Los capítulos OBJETIVOS, RESULTADOS, INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS y CONCLUSIONES, constituyen, naturalmente, el cuerpo central de esta tesis.

Cuando escribimos y muchas veces también cuando hablamos tendemos a matizar la verdad, a menospreciar los errores y resultar las casualidades afortunadas como si fueran

el resultado de razonados movimientos tácticos. ¿Es censurable esta actitud? A lo largo de mi paso por la Universidad he conocido investigadores que la aprueban y otros que la rechazan (recordemos que no se trata de mentir, sino simplemente de suavizar o magnificar selectivamente). "Muchas veces la tentación es demasiado grande como para decir las cosas exactamente como fueron y no como nos gustaría que hubiesen sido..."[1]. A esta afirmación de Lewis podría añadirse otra de Beadle: "La ciencia sería mucho más interesante si aquellos que la han creado dijeran cómo ha ocurrido todo realmente, en lugar de reportarla lógica e impersonalmente como de costumbre se hace en los artículos científicos"(2). Hacer eso en un artículo es poco menos que imposible, pero ¿en una tesis de licenciatura?

En un principio intenté consignar todos aquellos detalles experimentales o circunstanciales que son cruciales en su momento y que después, una vez que el trabajo se ha terminado, pierden valor y simplemente se olvidan. Sin embargo las costumbres, la premura, la flojera, fueron imponiendo limitaciones a mi afán de veracidad rigurosa dentro de esta tesis. Además están los intereses creados. Y la autoestima. ¿Me atreveré a revelar que cometí errores dignos de un ...tonto? ¿Cómo incluir esta bitácora cuasi anecdótica sin perturbar demasiado la estructura tradicional de una tesis? Por medio de notas. Al no poseer el espacio necesario para escribir glosas (a la usanza medieval), y debido a que la magnitud de mis comentarios vuelve poco práctico el uso de notas al pie de la página, he agrupado las notas junto con las referencias en una sola sección al final de cada uno de los capítulos; de aquí que resulte muy importante leer las notas conforme se va avanzando a lo largo de cada sección. Para la rápida distinción entre una referencia y una nota adopté la convención de colocar paréntesis circulares a los números correspondientes a las referencias y paréntesis cuadrados a los correspondientes a las notas. Mi principal intención al incluir estas notas ha sido construir una tesis más rica, más humana; una tesis que me permita darme cuenta de la lenta evolución intelectual que he sufrido.

La cita textual de algunos autores será más o menos usual a lo largo de la tesis. El motivo: "claridad" sintética. Tengo "esa predilección por las fórmulas breves que son como la esencia de largas meditaciones"(3). ¿Quiere eso decir que me voy a "fusilar" a quién sabe cuántos creadores? Por supuesto que no. Me refiero a las frases que encabezan o cierran secciones, y a una que otra insertada por ahí. Son afirmaciones, pensamientos o reflexiones que yo comparto, pero que otros han expresado con mucha mayor precisión y con más arte del que yo sería capaz de conseguir. Mi intención era citarlas en los idiomas originales, porque creo que cada lector es capaz de encontrar significados bien diversos para la misma frase (de ahí que escriba "claridad" entre comillas); sin embargo, mi amiga Claudia González hizo un magnífico comentario a tiempo: "Lo importante es lo que esa frase significa para tí, eso es lo que quieres transmitirle al lector." Vayan pues en español.

Levanto la vista. Frente a mí, amontonados en pilas distribuidas simétricamente sobre la mesa, descansan cien o treientos (¿importa el número?) artículos; aquellos en carpetas, esos engargolados, otros en folders o ni siquiera engrapados, pero todos agrupados bajo un estricto orden: Canales iónicos, estructura de membrana, transporte de azúcares y aminoácidos. electrónica, registro intracelular, ATPasas, los de *Nitella* y las otras algas. Estos últimos divididos en dos secciones: Los antiguos -no necesariamente clásicos- que

van de 1925 a 1938 y los modernos, de 1960 a 1990. A mi izquierda algunos libros: Teoría de transporte en membranas biológicas (Ussing, por supuesto), mecánica cuántica (Feynman), transporte en plantas (Spanswick), ATPasas plasmáticas de hongos y algas (Serrano), óptica (Jenkins), etc. A mi derecha las gráficas y libretas de laboratorio, los resultados. Me pregunto ¿He conseguido expresar algo coherente, algo interesante?

"Todo hombre que escribe... que se ve por consecuencia obligado a adoptar una cierta aptitud frente a problemas que él trata, acaba a pesar suyo por verse aprisionado en el papel que desempeña y no puede liberarse más del personaje que él encarna. A menudo, y sin por eso ser un hipócrita, las ideas que tiene en su fondo, aquellas que agita en sus meditaciones solitarias, son bastante diferentes de aquellas otras que, por hábito o por obligación profesional, expresa al exterior por la palabra o la escritura. En su fuero interno subsiste como un investigador que se inquieta y que duda, mientras que al exterior aparece como un maestro seguro de sí mismo y que afirma."(4). De Broglie tiene razón; por alguna u otra causa, con notas y todo, aún me siento prisionero. ¡Qué le vamos a hacer!

"... el hombre de ciencia actual es el prototipo del hombre-masa. Y no por casualidad, ni por defecto unipersonal de cada hombre de ciencia, sino porque la ciencia misma lo convierte automáticamente en hombre-masa; es decir, hace de él un primitivo, un bárbaro moderno... la ciencia experimental ha progresado en buena parte merced al trabajo de hombres fabulosamente mediocres, y aún menos que mediocres... una buena parte de las cosas que hay que hacer en Física o en Biología se hacen mecánica de pensamiento que puede ser ejecutada por cualquiera o poco menos... se trabaja con uno de esos métodos como con una máquina, y ni siquiera es forzoso para obtener abundantes resultados poseer ideas rigurosas sobre el sentido y fundamento de ellos..."

José Ortega y Gasset  
La rebelión de las masas

## NOTAS Y BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ¡Bravo, estás leyendo las notas! Esto lo dijo Bernard Lewis en *History Remembered, Recovered, Invented* Princeton University Press, 1975.
- 2.- Beadle, G. W. 1966. Biochemical Genetics. Some Recollections. en *Phage and The Origins Of Molecular Biology*. editado por J. Cairns, G.S. Stent y J. Watson. Cold Spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology. New York. pp. 23-32.
- 3.- Papini, G. 1912. Hugo Bernasconi. en *Obras Completas de Giovanni Papini*. Editorial Aguilar. Madrid. pp. 701-703.
- 4.- De Broglie, L. 1963. *Por los Senderos de la Ciencia* Espasa-Calpe, S.A. Madrid.

"Nosotros los biólogos celulares utilizamos el término "membrana celular" o "membrana plasmática" en al menos tres sentidos completamente distintos. En el sentido anatómico, la membrana celular es la región más externa que limita a la célula, y que puede observarse... en el microscopio electrónico como un capa (o un par de capas) de material osmiofílico. En el sentido bioquímico, la membrana celular es una "fracción" de la célula obtenida por medio de las técnicas, hoy clásicas, de la desintegración selectiva seguida de centrifugación diferencial... Finalmente, en el sentido fisiológico, la "membrana" celular es una estructura hipotética inventada para explicar algunos datos concernientes a la "permeabilidad" de las células."

W.D. Stein.

*The Movement of Molecules Across Cell Membranes*

## INTRODUCCION

La Biología contemporánea se está desarrollando en torno a un reducido número de paradigmas fundamentales. Uno de ellos es la suposición de que la vida, cualquiera que sea su definición, puede ser explicada a partir del modelo molecular de la materia. Este postula que toda la materia esta formada por partículas que poseen carga eléctrica, momentos magnético y eléctrico, y una naturaleza ondulatoria. Las partículas interactúan unas con otras por medio de los campos eléctricos y magnéticos que ellas mismas originan. La dinámica de un sistema aislado de partículas está dictada por las ecuaciones de la mecánica cuántica y de acuerdo con ellas cualquier sistema puede ser descrito por una función de onda  $\psi(t, c)$  de manera tal que  $|\psi(t, c)|^2$  es la probabilidad de encontrar al sistema en una configuración  $c$  al tiempo  $t$ . La función de onda obedece la ecuación  $H\psi = E\psi$  donde  $E$  es la energía y  $H$  un operador que describe las interacciones dentro del sistema. La distribución de un sistema sobre todos los estados posibles cuando se encuentra acoplado y en equilibrio con un baño térmico esta determinada por las leyes de la mecánica estadística; la probabilidad de encontrar al sistema en un estado con energía  $E$  es proporcional a  $e^{-\beta E}$ , donde  $\beta$  es proporcional al inverso de la temperatura absoluta. En principio, las propiedades mecánicas, ópticas, térmicas, eléctricas, magnéticas y químicas de gases, líquidos, sólidos y plasmas deben poder describirse utilizando este modelo. Sin embargo aún existen limitaciones teóricas y técnicas que hacen difícil su aplicación sobre sistemas complejos de muchos cuerpos como los organismos vivos. En los próximos decenios los científicos deberán intentar resolver estas limitaciones si desean alcanzar una descripción de los procesos vitales a partir de los principios fundamentales de la teoría molecular de la materia. Mientras tanto es necesario utilizar descripciones alternativas que, en general, son de un nivel macroscópico.

La vida es un maravilloso fenómeno espontáneo. Nosotros, científicos de fin de siglo, creemos que los procesos espontáneos en el Universo tienden a los estados de mínima energía y/o máxima entropía [1]. Cuando el ser humano que posee esta mentalidad observa los procesos vitales no puede menos que buscar relaciones energéticas y entrópicas en ellos. La ecuación fundamental de la termodinámica establece la relación entre estas cantidades



para procesos cuasi-estáticos; a partir de ella es posible desarrollar la descripción de algunos procesos vitales en términos fisicoquímicos. El transporte de materia que se lleva a cabo a través de las membranas biológicas es uno de estos procesos.

Todas las células realizan un intercambio de iones y moléculas con el medio externo; en la actualidad apenas empezamos a comprender la manera en que este intercambio contribuye a la síntesis de los compuestos capaces de donar energía para las diversas reacciones metabólicas (2), la forma en que este transporte a través de la membrana participa en la regulación de la homeostasis celular y tisular (3,4) y el papel que desempeña este intercambio en el equilibrio de la interfase biotrófica de nuestro planeta (5). Esta tesis tiene por objeto estudiar algunos aspectos del transporte de iones a través de las membranas del alga de agua dulce *Nitella translucens*.

El transporte de materia a través de las biomembranas ha atraído el interés de investigadores de muy diversas áreas, desde la fisicoquímica, la biofísica, la bioquímica y la biología celular hasta la farmacología, la patología y la fisiología. Los científicos procedentes de cada una de ellas han desarrollado sus propias nomenclaturas, sus propias técnicas experimentales e incluso sus propios paradigmas y tabues [6], lo que aunado a un pobre intercambio interdisciplinario de ideas y resultados ha generado, entre otras consecuencias, la existencia de diversas definiciones para un mismo fenómeno y el uso de múltiples símbolos para un mismo concepto. Los símbolos utilizados usualmente provienen de alguna de las siguientes teorías: la cinética, la termodinámica del equilibrio o la termodinámica irreversible. Por lo que respecta a las definiciones utilizadas para los diversos procesos de transporte, en la actualidad muchos investigadores aceptan la terminología propuesta por Mitchell dentro del marco de la teoría quimiosmótica (consultar, por ejemplo, la referencia 2), pero la diversidad de definiciones ha quedado registrada en la literatura de los años setentas y ochentas. En esta tesis utilizo la terminología de Mitchell, la metodología electrofisiológica desarrollada por la biofísica y los símbolos provenientes de la teoría cinética, la termodinámica del equilibrio y la termodinámica irreversible.

## TEORIA DEL TRANSPORTE IONICO

El transporte de materia en un sistema soluto-solvente bajo condiciones isotérmicas se puede llevar a cabo por alguno de los siguientes mecanismos:

a) **Difusión.**- La experiencia muestra que existe un movimiento espontáneo de cualquier substancia disuelta en un solvente, y que este transporte genera una distribución particular de la substancia de tal forma que el sistema tiende al equilibrio termodinámico. Este fenómeno se denomina difusión y puede explicarse a partir de los movimientos térmicos de las partículas disueltas considerando el gradiente de concentración de la substancia.

b) **Migración.**- Este mecanismo de transporte tiene lugar cuando un campo externo actúa sobre las partículas disueltas; como resultado las partículas del soluto adquieren un componente de velocidad en la dirección de la fuerza externa adicional al originado por los movimientos térmicos.

c) **Convección.**- Este tipo de transporte ocurre si el sistema no se encuentra en reposo y se genera una diferencia de presiones; entonces se origina un flujo de partículas en alguna dirección determinada por la variación de las presiones dentro del sistema.

En la naturaleza el transporte de materia suele ocurrir por la combinación de varios de estos mecanismos. Cuando se desea analizar el transporte de iones se debe considerar la combinación de dos de ellos : el de difusión y el de migración asociado a un campo eléctrico. Este proceso se denomina electrodifusión y constituye uno de los fenómenos característicos de la vida orgánica.

El análisis de los movimientos iónicos en solución puede realizarse desde un punto de vista microscópico, esto es, considerando las trayectorias y las velocidades de los iones individuales, o desde un punto de vista macroscópico, determinando los flujos de materia o carga. La iónica es la rama de la electroquímica que tiene como finalidad estudiar el transporte de iones en solución; sus fundamentos se establecieron a finales del siglo pasado y en la actualidad se encuentra en pleno desarrollo. Una revisión detallada de las teorías contemporáneas propuestas para describir la electrodifusión esta fuera de mis intenciones en esta tesis. A continuación señalaré muy brevemente algunos principios de la teoría macroscópica de electrodifusión que resultan indispensables para comprender mi trabajo de tesis, pero el lector interesado en el área puede consultar las referencias 6,7,8 y 9.

Para analizar el movimiento iónico por electrodifusión es conveniente considerar primero la contribución de cada mecanismo de transporte por separado. Una descripción cuantitativa de la difusión se encuentra contenida en la ley empírica de Fick, que establece que

$$\bar{J}_d = -D\nabla C \quad (1)$$

donde  $\bar{J}_d$  es el número de iones que se mueven por unidad de tiempo a través de una sección de área unitaria, D es un coeficiente de difusión y  $\nabla C$  es la concentración del ion como función de la posición.

Supongamos ahora que el ion posee una valencia  $Z$ , entonces el flujo debido a la migración (8) esta determinado por

$$\vec{j}_m = -u \frac{Z}{|Z|} C \nabla \Phi \quad (2)$$

donde  $-\nabla \Phi$  representa el campo eléctrico,  $\frac{Z}{|Z|}$  el signo de la fuerza sobre el ion (por convención positiva para cationes y negativa para aniones), y  $u$  es la movilidad del ion definida como la velocidad alcanzada por el ion bajo un campo unitario. Esta movilidad depende de la viscosidad del solvente, del tamaño del ion y de su carga. La relación entre la movilidad iónica y el coeficiente de difusión de la ley de Fick la desarrollo Einstein y la expresó en la ecuación que lleva su nombre:

$$D = \frac{uRT}{|Z|F} \quad (3)$$

donde  $R$  es la constante de los gases,  $T$  es la temperatura absoluta y  $F$  la constante de Faraday.

Ahora bien, el flujo total debido a la electrodifusión debe estar dado por

$$\vec{j} = \vec{j}_d + \vec{j}_m$$

es decir

$$\vec{j} = -D(\nabla C + \frac{ZCF}{RT} \nabla \Phi) \quad (4)$$

que se conoce como la ecuación de Nernst-Planck. Sus dimensiones son generalmente moles por área por unidad de tiempo. Esta densidad de flujo puede convertirse en la densidad de corriente eléctrica si la multiplicamos por  $FZ$ , que es el número de cargas acarreadas por cada ion

$$\vec{J} = -DFZ(\nabla C + \frac{ZCF}{RT} \nabla \Phi) \quad (5)$$

Esta ecuación, en principio, debiera ser capaz de describir el transporte de iones que se lleva a cabo a través de una membrana celular por electrodifusión. Como un aproximación a este caso podemos considerar un sistema ideal en el que exista una barrera o membrana permeable solo a algunas especies iónicas y en el cual se cumplen las siguientes condiciones (10):

- a) La membrana tiene un grosor constante, es homogénea e infinita en el plano transversal.
- b) Los coeficientes cruzados en las ecuaciones de Onsager son despreciables.
- c) No existe un flujo neto de solvente, por lo que el transporte iónico debido a la convección resulta despreciable.

d) El coeficiente de actividad ( $\gamma$ ) es unitario.

Si suponemos que un sistema de esta naturaleza se encuentra en el equilibrio con respecto a la distribución de una especie iónica, entonces la ecuación 5 se puede escribir como

$$\nabla C = \frac{ZCF}{RT} \nabla \Psi \quad (6).$$

y si además se propone que  $du/dx = 0$  la ecuación 6 se puede integrar a través de la membrana desde el lado externo  $e$  hasta el lado interno  $i$ . El resultado de esta operación es

$$\ln \frac{[C]_e}{[C]_i} = \frac{ZF}{RT} (\Psi_e - \Psi_i)$$

y rearreglando se obtiene la ecuación

$$E_j = \Psi_e - \Psi_i = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[C]_e}{[C]_i} \quad (7)$$

que se conoce como la solución de Nernst. El potencial  $E_j$  se denomina potencial de Nernst para el ion  $j$  y puede interpretarse como el potencial al cual el ion  $j$  se encuentra en equilibrio con la fuerza de electrodifusión. Este tratamiento puede extenderse para considerar la presencia de varias especies iónicas permeables (9), lo que da por resultado una condición de equilibrio iónico conocida como equilibrio de Donnan, que supone un  $J = 0$  para todos los iones permeables presentes en el sistema. En general los potenciales desarrollados a través de una membrana biológica no corresponden al potencial de Nernst de ninguna de las especies iónicas presentes (8), por lo que la ecuación de Nernst-Planck debe resolverse utilizando otras suposiciones.

Si se postula que la membrana es permeable únicamente a iones de la misma carga (aniones o cationes) o bien si se supone que la  $d\Phi/dx$  en el interior de la membrana se ajusta a un grupo de funciones en particular (10), donde la variación lineal resulta ser solo un caso de varios posibles, y además se postula que el flujo neto de corriente es cero, se obtiene la siguiente solución de la ecuación 5

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{\Sigma P_c (C_c)_e + \Sigma P_a (C_a)_i}{\Sigma P_c (C_c)_i + \Sigma P_a (C_a)_e} \quad (8)$$

en la que los subíndices  $c$  y  $a$  corresponden a cationes y aniones, respectivamente, y donde  $P_c$  y  $P_a$  son coeficientes de permeabilidad para los cationes y los aniones, respectivamente. Estos coeficientes se definen como

$$P_i = \frac{D_i \beta_i}{d}$$

donde  $P_i$  es la permeabilidad de la membrana al ion  $i$ ,  $D_i$  es el coeficiente de difusión del ion,  $d$  el grosor de la membrana y  $\beta_i$  el coeficiente de partición del ion definido como

$$\beta_i = \frac{[C_i]_d}{[C_i]_e}$$

donde  $[C_i]_d$  es la concentración del ion en el interior de la membrana y  $[C_i]_e$  la concentración en el medio externo.

La ecuación 8 se conoce como la solución de Goldman o solución Goldman-Hodgkin-Huxley y desde 1952, año en que Hodgkin y Huxley consiguieron explicar algunas de las características eléctricas del axón gigante de *Loligo* utilizándola (11), se ha comprobado experimentalmente que resulta bastante adecuada para describir el comportamiento eléctrico de las membranas biológicas en una variada gama de tipos celulares (6,8).

Aunque es posible obtener la ecuación 8 a partir de la ecuación 5 sin suponer que la  $d\Phi/dx$  es lineal en el interior de la membrana (hipótesis que se conoce como la aproximación de campo constante), cuando se desea derivar una expresión para la conductancia a través de la membrana a partir de la ecuación 5 resulta indispensable postular este tipo de variación. En este caso la expresión resultante es

$$G_m = \frac{F^2}{RT^2} \frac{AB}{A-B} \ln \frac{A}{B} \quad (9)$$

donde  $A = \sum P_c(C_c)_e + \sum P_a(C_a)_i$  y  $B = \sum P_c(C_c)_i + \sum P_a(C_a)_e$ .

Se debe señalar que la ecuación 9 solo resulta válida cerca del estado de reposo de las membranas biológicas, porque en general las conductancias son función del potencial de membrana y pueden presentar rectificación eléctrica. Cuando el potencial se desplaza mucho del estado de reposo se observan diversos efectos de rectificación, algunos de los cuales no pueden ser explicados a partir de la ecuación

$$G_m = \frac{d(\sum ZFJ_i)}{dE_m}$$

como por ejemplo el potencial de acción de las membranas excitables; en estos casos resulta necesario postular mecanismos empíricos para poder describir las variaciones observadas en las conductancias (9,10).

Muy recientemente Ohshima, Makino y Kondo derivaron una solución de la ecuación de Nernst-Planck añadiendo a la aproximación de campo constante las suposiciones de que los aniones y cationes transportados poseen la misma valencia y que el transporte se lleva a cabo en condiciones cuasi-estacionarias (12); la característica más relevante de esta solución es que incluye una dependencia temporal para las concentraciones iónicas y para el potencial, sin embargo la ecuación resultante no puede ser integrada analíticamente, por lo que resulta necesario resolverla numéricamente para las diversas condiciones experimentales. Al parecer todavía no se ha contrastado con algún experimento.

En sentido estricto las diversas soluciones de la ecuación de Nernst-Planck pueden considerarse modelos de una membrana, puesto que postulan características específicas para la barrera presente en el sistema, es decir, podemos referirnos a ellas como la membrana de Goldman, la membrana de Nernst o la membrana de Oshima-Makino-Kondo. Sin embargo no es común encontrar esta terminología en los libros de texto ni en los artículos originales, donde el término modelo aplicado a las membranas biológicas se reserva para otros arquetipos.

## LOS MODELOS PARA UNA MEMBRANA BIOLÓGICA

Desde el punto de vista eléctrico una porción de membrana puede representarse por medio del circuito que se muestra en la figura 1. Este modelo se conoce como el modelo de conductancia paralela, modelo de resistencia-capacitancia en paralelo o modelo RC de la membrana. El circuito toma en cuenta dos de las principales características de una membrana biológica: la resistencia al flujo de los iones y la capacitancia resultante (8). El modelo postula que la corriente total ( $I_T$ ) que fluye a través de una membrana es la suma de dos componentes, una debida a la corriente acarreada por los iones que difunden de un lado al otro de la membrana ( $I_i$ ) y otra debida a la carga del capacitor intrínseco de la membrana y que se denomina corriente de desplazamiento o corriente capacitiva ( $I_c$ ). Los valores de la resistencia, la capacitancia y del potencial a través de este circuito pueden calcularse utilizando la teoría eléctrica clásica.

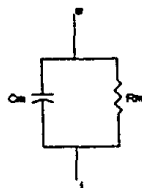


Fig. 1. El modelo RC para una porción de membrana. i, medio interno; e, medio externo;  $C_m$ , capacitancia de la membrana;  $R_m$ , resistencia de la membrana.

Un esquema tan sencillo resulta muy atractivo, pero en la práctica es sólo una primera aproximación, puesto que en la gran mayoría de las situaciones experimentales no se cuenta con una pequeña porción de membrana aislada. El modelo puede ampliarse para considerar una condición experimental más común como la respuesta eléctrica de una célula cilíndrica (un axón o una célula internodal de *Nitella*). En este caso resulta necesario incluir las características eléctricas de los medios interno y externo, y si tomamos en cuenta el flujo axial de corriente a lo largo de la célula un circuito eléctrico equivalente sería del tipo del que se muestra en la figura 2, que se conoce como el modelo de cable coaxial con pérdida

o modelo de cable conductor. Puede observarse que en este circuito los medios interno y externo se representan únicamente por medio de una resistencia, pero se ha encontrado que esta aproximación resulta válida dentro de límites de frecuencias de hasta varios cientos de kilohertz (9); regresaremos a este modelo en el capítulo de MATERIAL Y MÉTODOS.

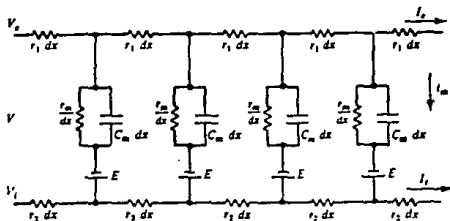


Fig. 2. Modelo de cable conductor para una célula cilíndrica en el que  $r_1 dx$  y  $r_2 dx$  representan las resistencias del medio externo e interno por unidad de longitud, respectivamente;  $r_m/dx$  la resistencia de membrana por unidad de longitud;  $C_m dx$  la capacitancia de la membrana por unidad de longitud;  $E$  el potencial de reposo de la membrana;  $V_e$  el potencial externo;  $V_i$  el potencial interno;  $I_m$  la corriente a través de la membrana por unidad de longitud;  $I_e$  la corriente axial externa neta; e  $I_i$  la corriente axial interna neta. Figura tomada de la referencia 9.

Desde el punto de vista bioquímico la membrana puede ser representada tomando en cuenta los diversos tipos de moléculas que la constituyen. Hasta este momento no hemos tenido la necesidad de considerar la estructura molecular de la barrera semipermeable, y, en sentido estricto, resulta irrelevante siempre y cuando permita realizar las diversas aproximaciones que hemos hecho hasta ahora; sin embargo, un conocimiento detallado de esta estructura resulta indispensable si se desea desarrollar nuevos modelos que permitan descripciones más precisas del transporte de materia en su interior. La estructura de las membranas biológicas parece ser muy compleja y, aunque nuestro conocimiento contemporáneo sobre ellas resulta extenso, aún estamos lejos de alcanzar una descripción precisa de su estructura estática y dinámica.

Los modelos bioquímicos de las membranas biológicas son casi tan antiguos como el propio concepto de membrana celular; el lector interesado en la historia del desarrollo de estos modelos puede consultar la referencia 13. El día de hoy sabemos que la composición de las biomembranas involucra principalmente tres tipos de moléculas:

- Lípidos.

- Proteínas.
- Esteroles.

Sin embargo, el arreglo espacial y las interacciones de estos diversos tipos de moléculas en el interior de la membrana resultan ser en la actualidad objeto de intensos debates. Antes de señalar brevemente las ideas más aceptadas conviene recordar que la estructura de una membrana no sólo debe explicar el transporte de iones en su interior, sino que además debe permitir la explicación de otros fenómenos como la transducción de señales, la secreción, la endocitosis, etc. (14).

Durante los últimos 18 años el paradigma para interpretar la estructura molecular de las biomembranas ha sido el modelo de mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson (15), y las características fundamentales de este modelo se han corroborado extensamente: a) los lípidos se encuentran asociados entre sí en una conformación de bicapa; b) las proteínas se encuentran interactuando con la bicapa lipídica; y c) tanto los lípidos como las proteínas presentan una difusión lateral dentro del plano de la membrana (figura 3). Sin embargo, el trabajo experimental reciente ha conducido a la modificación y extensión de este modelo.

La topología y heterogeneidad de los lípidos en las biomembranas se ha estudiado intensamente (consultar, por ejemplo, las referencias 16 y 17). Hoy sabemos que aunque la estructura predominante es la de bicapa, al parecer los lípidos (o al menos algunos tipos de ellos) son capaces de formar estructuras cilíndricas de unos 20 Å de diámetro que poseen un polo hidrofílico y que parecen constituir una fase en la membrana denominada fase hexagonal H II (18). La gran heterogeneidad de los lípidos presentes en las biomembranas (14) parece ir acompañada por la formación de dominios lipídicos en el plano de la bicapa que también pueden originarse alrededor de algunas proteínas como resultado de interacciones lípido-proteína (16). Existe además una clara asimetría en el tipo de lípidos presentes en cada una de las monocapas (17); y aunque se han postulado varias explicaciones para este fenómeno, los mecanismos que lo generan no se han determinado con claridad (19). También se ha reportado una gran heterogeneidad en las tasas de difusión lateral de los lípidos, pues mientras algunos puede alcanzar una tasa de hasta  $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ , otros parecen permanecer prácticamente inmóviles (17).

Por lo que respecta al componente proteico de las biomembranas, éste resulta tan variado que es difícil hacer generalizaciones. En términos globales las proteínas de membrana son enzimas asociadas con la bicapa lipídica cuya topología membranar parece estar determinada por los dominios hidrofóbicos e hidrofílicos de su secuencia de aminoácidos, y que pueden encontrarse en una variada gama de conformaciones. De acuerdo con la interacción que presentan con los lípidos de la bicapa se distinguen dos clases de proteínas de membrana: las proteínas intrínsecas o transmembranales (que a su vez se clasifican en bitópicas, oligotópicas y politópicas) y las extrínsecas o periféricas (20); aunque es posible clasificarlas tomando en cuenta otros criterios, como la función bioquímica que llevan a cabo (2.21). El estudio de la síntesis y estructura de estas proteínas, así como el de su



inserción y dinámica dentro de la bicapa de lípidos se encuentra en pleno desarrollo (consultar, por ejemplo, las referencias 22,23,24 y 25). Me referiré con más detalle a algunas proteínas membranales en la siguiente sección.

Los esteroides parecen ser constituyentes fundamentales de las membranas biológicas (14); el principal esteroide presente en las membranas de los eucariontes es el colesterol. Esta molécula puede encontrarse asociada a los lípidos en razones de hasta 1:1 (17), pero no es capaz de formar bicapas por sí mismo. Los estudios de la estructura del colesterol cuando se encuentra asociado a la bicapa lipídica han mostrado que el grupo hidroxilo sobresale de la bicapa y se encuentra justo en la interfase acuosa superficial, mientras que la estructura de los anillos rígidos se encuentra dentro de la bicapa (26). Esta molécula también presenta una distribución asimétrica en cada una de las monocapas de lípidos (16). Se ha demostrado que los niveles de colesterol modifican la permeabilidad y estabilidad de las membranas, la actividad de algunas proteínas de membrana, los procesos de crecimiento celular y la expresión génica (26).

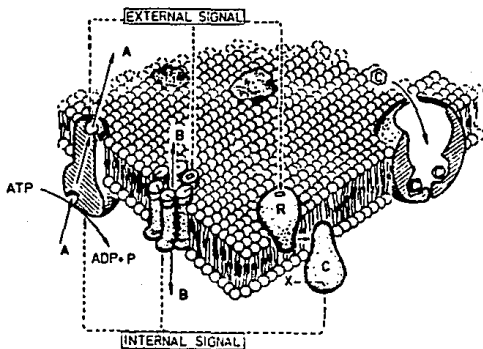


Fig. 3. Diagrama tridimensional del modelo de mosaico fluido para una membrana biológica. De izquierda a derecha se muestran las siguientes proteínas: Una ion-ATPase; un canal iónico; dos proteínas acopladas para la percepción y transducción de una señal externa; un acarreador. Figura tomada de la referencia 33.

Al contemplar la compleja estructura de esta barrera biológica contra la difusión surge la pregunta de hasta qué punto los modelos de membrana de Nernst o de Goldman resultan adecuados para describir el transporte de materia que realiza una célula. En este sentido es importante señalar que ese transporte posee otras características que no he mencionado:

a) Las membranas constituidas únicamente por lípidos y esteroides (conocidas como membranas artificiales) resultan muy poco permeables a los iones cuando se comparan con las membranas biológicas. Un postulado utilizado durante las últimas décadas para explicar esta diferencia es que algunas de las proteínas constitutivas de la membrana funcionan como enzimas alostéricas (denominadas canales y acarreadores) que catalizan el transporte de iones a través de esta estructura (14,21,36). Esta hipótesis cuenta en la actualidad con un gran apoyo experimental que ha llegado inclusive a niveles moleculares (27). Es necesario entonces suponer que la ecuación de Nernst-Planck puede funcionar como una descripción a primera aproximación del transporte de iones a través de las biomembranas; pero que una descripción detallada requiere de un mayor desarrollo teórico que tome en cuenta la dinámica de estas proteínas.

b) Las membranas biológicas presentan una gran permeabilidad al agua, que puede llegar a ser de 0.3 cm/s (28). Para tomar conciencia de la magnitud de esta permeabilidad resulta útil compararla con la permeabilidad para un ion cualquiera, por ejemplo la  $P_{Na}$  del eritrocito, que es del orden de  $5 \times 10^{-9}$  cm/s. Si consideramos una membrana artificial la diferencia es aún más notoria, pues los cálculos realizados a partir de los flujos determinados experimentalmente indican que cada segundo difunden alrededor de 4000 moléculas de agua a través de un área membranal equivalente a una sola molécula de fosfolípido, mientras que un ion sodio atraviesa la misma área en aproximadamente 70 horas (28). Resulta entonces claro que para fines prácticos la membrana no constituye una barrera al flujo de agua. Una permeabilidad tan grande conduce a varias preguntas: ¿Deberíamos considerar también al agua como una molécula constitutiva de la estructura de las membranas? ¿Qué mecanismos permiten esta permeabilidad? En la actualidad no contamos con respuestas para estas interrogantes, pero muchos grupos en el mundo las están buscando en este preciso momento (29,30).

c) Las células son capaces de transportar materia en dirección contraria a la dirección del flujo predicho a partir de los gradientes electroquímicos. Este tipo de transporte se identificó desde principios de siglo para el caso de algunos nutrientes (azúcares); pero no fue sino hasta mediados de los años cuarentas cuando se aceptó que también algunos iones eran transportados de esta manera (31). Rosenberg denominó a este tipo de transporte con el término genérico de transporte activo (citado en la referencia 14). Este proceso biológico intrigó profundamente a los fisicoquímicos de principios de siglo, y les llevaría varias décadas el demostrar la existencia de procesos energéticos acoplados a este tipo de transporte (14). Sin embargo, no será sino hasta los años sesentas que Mitchell consiga vislumbrar la enorme trascendencia que el transporte activo de iones tiene en la fisiología celular (34).

## LOS CIRCUITOS QUIMIOSMÓTICOS.

La teoría quimiosmótica contemporánea establece que el transporte activo de materia y el proceso de síntesis-hidrólisis de ATP están acoplados a la translocación de iones a través de las membranas biológicas; y que la translocación es impulsada ya sea por un gradiente electroquímico o por una diferencia de pH. De acuerdo con esta teoría (34) es posible distinguir tres tipos de transporte a través de las biomembranas si se enfatiza la naturaleza molecular del proceso más que el estado termodinámico de las sustancias transportadas: a) El transporte por difusión, que dependerá de la permeabilidad de la fase lipídica a los diversos solutos; b) El transporte primario, en el cual la translocación a través de la membrana se encuentra acoplada directa y necesariamente a una reacción química simultánea; c) El transporte secundario, que consiste en el intercambio de materia por medio de las proteínas presentes en la membrana haciendo uso de los gradientes iónicos existentes.

El transporte primario puede dividirse a su vez en dos categorías (2):

a) Translocación de grupos.- En este tipo de transporte una reacción enzimática que tiene lugar en la membrana cataliza simultáneamente la transformación química de un sustrato y su translocación a través de la membrana. Un ejemplo lo constituye la ingestión de azúcar por fosforilación (2).

b) Transporte primario de solutos.- En este caso una reacción enzimática cataliza el transporte de un soluto sin alterarlo químicamente. Las ion-ATPasas constituyen un ejemplo de este mecanismo (35).

Los procesos de transporte secundario se dividen en :

a) Uniport o Difusión facilitada.- Consiste en el transporte de materia a través de los canales o acarreadores presentes en las biomembranas (figura 3).

b) Simport o Cotransporte.- Consiste en el transporte acoplado y en la misma dirección de dos solutos por medio de un solo acarreador.

c) Antiport o Difusión por intercambio.- Consiste en el transporte en direcciones opuestas de dos solutos mediado por un solo acarreador.

Estos distintos tipos de transporte se llevan a cabo en muchas de las membranas celulares y proceden de una forma altamente regulada e interactiva (2). Al parecer en la membrana plasmática de todo tipo celular existe un proceso de transporte primario responsable de establecer los gradientes que propulsan a los sistemas de transporte secundario. Hasta la fecha se han descubierto dos circuitos globales de transporte en los organismos biológicos:

1.- El Circuito de Sodio.- Este circuito parece encontrarse únicamente en las células animales; el generador primario es una enzima membranar denominada ATPasa de sodio-potasio que expulsa sodio y lo intercambia por potasio, dando lugar así a un gradiente de

potencial electroquímico para el sodio que es capaz de propulsar a los sistemas de transporte secundario. Esta circulación de sodio contribuye profundamente a varias funciones homeostáticas como la regulación del pH intracelular y la del volumen celular (2).

2.- El Circuito de Protones.- Este sistema parece ser característico de las células de vegetales, hongos y algas; en este caso el generador primario es una ATPasa membranal que expulsa protones al medio externo, produciendo un gradiente de potencial electroquímico para los protones a partir del cual se pueden energizar los sistemas de transporte secundario. Esta circulación de protones, además de permitir la ingesta de nutrientes, contribuye a la regulación de la turgencia celular (2).

El descubrimiento de estos circuitos iónicos contribuyó a modificar un paradigma de la fisiología que se había establecido a partir de los trabajos de Hodgkin y Huxley y que consistía en suponer que el potencial generado a través de las membranas biológicas era básicamente el resultado de la difusión pasiva de iones potasio. A partir de la década de los ochentas se reconoció la contribución que los sistemas de transporte primario pueden tener sobre el potencial de reposo; y en la actualidad sabemos que el potencial de algunas células animales, de muchas células vegetales, de los hongos y de las algas es generado por el bombeo activo de iones sodio o de protones (37,38). Este bombeo se realiza en la dirección contraria a la dirección del flujo pasivo del ion transportado por un tipo particular de proteínas membranales denominadas ion-ATPasas. El estudio detallado de la cinética, la regulación y la evolución de estas enzimas constituye uno de los campos más activos en la bioenergética contemporánea (39,40,41,42). A la fecha se ha determinado la existencia de por lo menos tres tipos distintos de ion-ATPasas (35):

a) Ion-ATPasas tipo P.- Se definen como aquellas ATPasas que durante su ciclo de reacción forman un intermediario fosforilado unido covalentemente a un residuo de ácido aspártico de la proteína. Estas enzimas se inhiben específicamente con vanadato y están formadas por uno o dos péptidos con un peso molecular total de aproximadamente 100 kDa. Este tipo de enzimas se ha identificado en las membranas plasmáticas de las células eucarióticas, en las membranas de los retículos endoplásmico y sarcoplásmico y en la membrana celular de algunas bacterias como *E. coli* y *S. fecalis* (figura 4).

b) Ion-ATPasas tipo F.- Estas enzimas no forman un intermediario fosforilado durante su ciclo de reacción, se inhiben específicamente con oligomicina o venturicidina y están formadas por varios péptidos con un peso molecular total mayor a los 450 KDa. Este tipo de enzimas se encuentran en las membranas internas de las mitocondrias y los cloroplastos, así como en la membrana plasmática de los procariontes (figura 4).

c) Ion-ATPasas tipo V.- Se definen como aquellas ATPasas asociadas a la membrana de organelos celulares distintos de las mitocondrias y los retículos sarcoplásmico y endoplásmico. No parecen formar un intermediario fosforilado y se inhiben específicamente con N-etilmaleimida,  $KNO_3$  y  $KSCN$ . Tienen un peso molecular de aproximadamente 400 KDa y parecen estar constituidas por varios péptidos. Se han identificado en las vacuolas de hongos, algas y plantas superiores, en los lisosomas, los endosomas, en vesículas cubiertas con clatrina, granulos secretores y vesículas del Golgi (figura 4).

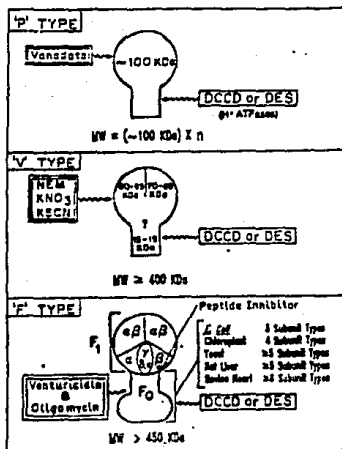


Fig. 4. Esquema de los tres tipos de ion-ATPasas identificados en la actualidad. Figura tomada de la referencia 35.

Por lo que respecta a las proteínas involucradas en los procesos de transporte secundario, su estudio se ha desarrollado bastante en el caso de las células animales (27), mientras que en las células vegetales las investigaciones apenas se encuentran en las fases iniciales (43). En el siguiente capítulo describiré uno de los modelos vegetales más promisorios para el desarrollo de este tipo de estudios.

## NOTAS Y BIBLIOGRAFIA.

1.- Las cantidades energía y entropía poseen una definición matemática precisa y resultan muy útiles dentro del esquema teórico formal, pero los conceptos asociados a ellas (la imagen mental que podemos desarrollar de la energía o la entropía) resultan extraños al sentido común humano; para ser sincero me parece que resultan casi fantásticos. Lo señalo porque normalmente no reparamos en este tipo de problemas; cien años de indoctrinación no resultan despreciables, y llega un momento en el que los conceptos son aceptados por nuestro intelecto más por su repetición que por su contenido semántico.

2.- Harold, F.M. 1986. *The Vital Force. A study of Bioenergetics.* W.H. Freeman.

3.- D.A. Baker y J.L. Hall (editores). 1988. *Solute Transport in Plant Cells and Tissues.* Longman Scientific & Technical, New York.

4.- Perona, R., Serrano, R. 1988. Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature* **334**, 438-440.

5.- Smith, F.A., Smith, S.E. 1989. Membrane transport at the biotrophic interface: an overview. *Aust. J. Plant Physiol.* **16**, 33-43.

6.- Una breve discusión sobre estos hechos puede consultarse en Ussing, H.H. 1978. Membrane Transport in Biology, en el libro *Membrane Transport in Biology. I. Concepts and Models.* editado por G. Giebisch, D.C. Tosteson y H.H. Ussing, Springer-Verlag, Heidelberg. pp. 1-3.

7.- Bockris, J. O'M., Reddy, A.K.N. 1973. *Modern Electrochemistry* Plenum Press, New York.

8.- Plonsey, R., Barr, R.C. 1988. *Bioelectricity. A Quantitative Approach.* Plenum Press, New York.

9.- Plonsey, R. 1969. *Bioelectric Phenomena.* McGraw-Hill, Inc. New York.

10.- Ortega Blake, I. 1978. *A Biophysical Study of The Plant Cell Membrane* Ph.D. Thesis. University of Edinburgh, Faculty of Science.

11.- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500-544.

12.- Ohshima, H., Makino, K., Kondo, T. 1988. Membrane transport of electrolyte ions and time-dependent membrane potential. *Biophys. Chem.* **31**, 225-229.

13.- Robertson, J.D. 1981. Membrane structure. *J. Cell Biol.* **91**, 189s-204s.

- 14.- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1989. *Molecular Biology of The Cell* Garland Publishing, Inc. New York.
- 15.- Singer, S.J., Nicholson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of membranes. *Science* **175**, 720-731.
- 16.- Zachowski, A., Devaux, P.F. 1989. Bilayer asymmetry and lipid transport across biomembranes. *Comments Mol. Cell. Biophys.* **6**, 63-90.
- 17.- Storch, J., Kleinfeld, A.M. 1985. The lipid structure of biological membranes. *TIBS* **7**, 418-421.
- 18.- de Kruijff, B., Cullis, P.R., Verkleij, A.J., Hope, M.J., van Echteld, C.J.A., Tarashi, T.F. 1984. en *Enzymes of Biological Membranes* editado por A. Martinosi. Plenum, New York. pp. 131-201.
- 19.- Sune, A., Vidal, M., Morin, P., Sainte-Marie, J., Bienvenue, A. 1988. Evidence for bidirectional transverse diffusion of spin-labeled phospholipids in the plasma membrane of guinea pig blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* **946**, 315-327.
- 20.- Dalbey, R.E. 1990. Positively charged residues are important determinants of membrane protein topology. *TIBS* **15**, 253-257.
- 21.- Eisenberg, R.S. 1990. Channels as enzymes. *J. Membrane Biol.* **115**, 1-12.
- 22.- *Proteins: Form and Function*. 1990. R. A. Bradshaw y M. Purton edits. Elsevier Science Publishers, Cambridge.
- 23.- *Enzymes of Biological Membranes* serie de 4 volúmenes editada por A. Martinosi. Plenum, New York. 1984.
- 24.- Salkoff, L.B., Tanouye, M.A. 1986. Genetics of ion channels. *Physiol. Rev.* **66**, 301-329.
- 25.- Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Papazian, D.M., Jan, Y.N., Jan, L.Y. 1988. Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at *Shaker* locus in *Drosophila*. *Nature* **331**, 137-142.
- 26.- Yeagle, P.L. 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **822**, 267-287.
- 27.- Hille, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 1984. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.

- 28.- Deamer, D.W., Nichols, J.W. 1989. Proton flux mechanisms in model and biological membranes. *J. Membrane Biol.* **107**, 91-103.
- 29.- Benga, G., Popescu, O., Borza, V., Pop, V.I., Hodarnau, A. 1989. Water exchange through erythrocyte membranes: biochemical and nuclear magnetic resonance studies re-evaluating the effects of sulfhydryl reagents and of proteolytic enzymes on human membranes. *J. Membrane Biol.* **108**, 105-113.
- 30.- Haydon, D.A. 1982. Water Permeation through lipid bilayer membranes. en *Biophysics of Water*. editado por F. Franks y S. Mathias. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. pp. 269-271.
- 31.- Dean, R.B. 1987. Reminiscences on the sodium pump. *Trends in Neurosciences* **10**, 451-454.
- 32.- Reinhold, L., Kaplan, A. 1984. Membrane transport of sugars and amino acids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**, 45-83.
- 33.- Hedrich, R., Schroeder, J.I., Fernandez, J.M. 1987. Patch-clamp studies on higher plant cells: a perspective. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 49-52.
- 34.- Mitchell, P. 1968. *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*. Glynn Research Laboratories, Bodmin, Cornwall, England.
- 35.- Pedersen, P.L., Carafoli, E. 1987. Ion motive ATPases I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 146-150.
- 36.- Jardetzky, O. 1966. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* **211**, 969-970.
- 37.- Bashford, C.L., Pasternak, C.A. 1986. Plasma membrane potentials of some animal cells is generated by ion pumping, not by ion gradients. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 113-116.
- 38.- Serrano, R. 1985. Plasma membrane ATPase of plants and fungi. CRC. Boca raton, Fl.
- 39.- Nelson, N., Taiz, L. 1989. The evolution of  $H^+$ ATPases. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 113-117.
- 40.- Chen, Y-D. 1988. Asymmetry and free energy transduction in biology. *Cell Biophys.* **12**, 87-103.



41.- Westerhoff, H.V., Tsong, T.Y., Chock, P.B., Chen, Y-D., Astumian, R.D. 1986. How enzymes can capture and transmit free energy from an oscillating electric field. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 4734-4738.

42.- Serrano, R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 61-94.

43.- Sanders, D. 1990. Kinetic modeling of plant and fungal membrane transport systems. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 77-107.

"El trabajo del alga que concentra en sus tejidos las sustancias esparcidas en dosis infinitesimales por las capas inmensas del océano...no es sino una pálida imagen de la elaboración continua que experimentan en nosotros todas las fuerzas del Universo para convertirse en espíritu...a lo largo de todos sus días terrestres, el hombre se hace su alma; y a la vez colabora con otra obra, con otra *opus*, que desborda de modo infinito, al mismo tiempo que las domina estrechamente, las perspectivas de su éxito individual: la culminación del mundo."

Pierre Teilhard de Chardin

*Le milieu divin.*

## ANTECEDENTES.

### INTRODUCCION

*Nitella translucens* es un alga que pertenece a la familia *Characeae*, única representante de la división *Charophyta* de acuerdo con Round (figura 1). A pesar de que las Charofitas se han estudiado desde 1774 (2) resulta bastante difícil encontrar referencias a esta familia en los libros de texto contemporáneos [3]. El hecho es inesperado si se toma en cuenta el papel que estas algas han tenido en el desarrollo de la biología: Hörmann descubrió la existencia de un potencial de acción en 1898. Taylor y Whitaker realizaron la primera determinación *in situ* de un pH intracelular utilizando células de *Nitella* en 1928 (2). Ese mismo año Osterhout y Harris reportaron el primer estudio cuantitativo de los potenciales de membrana de una célula utilizando como modelo a *Nitella* (4). La primera determinación de la conductancia membranal en células vegetales fue realizada por Blinks en 1930 sobre *Nitella*. El primer registro intracelular de un potencial de acción lo realizó Umrath, también en 1930, usando células de *Nitella*; y, de hecho, el género *Nitella* fue colocado en la vanguardia de la fisiología durante los años veintes y treinta gracias al trabajo de Osterhout y su grupo en Harvard, y al de Hoagland y Davis en Berkeley (2); a estos grupos se unieron, a mediados de los años cuarentas, los laboratorios de Collander en Helsinki y de Umrath en Graz [5]. Más aún, el modelo de circuito RC para la membrana, que ha resultado de validez universal, fue postulado por Cole primero para *Nitella* y un año después para el axón gigante de calamar. Revisiones de los estudios realizados en las *Characeae* hasta principios de los años cincuentas y de los años sesentas se pueden consultar en las referencias 6 y 7 respectivamente.



experimental. Tal vez no hace falta mencionarlo, pero nosotros somos el único grupo que trabaja con esta familia de algas en México. Mediante el uso de fijadores de voltaje, trazadores radioactivos y la novedosa fijación por secciones (patch clamp) esta veintena de laboratorios ha desarrollado gran parte de la electrofisiología vegetal contemporánea (120). Y a 38 años de Hodgkin, Huxley y Katz podemos decir que algo sabemos del "axón verde".

### CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS CHARACEAE.

Esta familia está compuesta esencialmente por algas de agua dulce, aunque algunas especies de los géneros *Chara* y *Lamprothamnion* crecen en aguas salobres y marinas. Se encuentran ampliamente distribuidas alrededor del mundo (excepto en las zonas árticas) y se han identificado esporas de esta familia en estratos geológicos correspondientes al periodo Ordovícico de la era Paleozoica, lo que significa que las primeras especies aparecieron hace por lo menos  $4 \times 10^8$  años (2).

La talla del organismo completo va de  $1 \times 10^{-2}$  a  $1 \times 10^2$  metros; es de color verde y está compuesto de internodos cilíndricos unicelulares y pequeños nodos multicelulares (figura 2). Es un organismo haploide; los óvulos y los anterozoides móviles son producidos dentro de atractivos y complejos órganos sexuales. La fertilización da lugar a una espora encapsulada por una capa de carbonato de calcio; este cigoto es diploide; la meiosis ocurre en el momento de la germinación y mitosis posteriores dan lugar al organismo macroscópico. El crecimiento tiene lugar de una forma similar a la que normalmente se asocia con las plantas superiores: el eje principal crece en su ápice, el cual inhibe el desarrollo de los ápices secundarios que surgen en cada nodo; el desarrollo de rizoides lo promueve el mismo ápice y tiene lugar en el nodo más alejado de éste. Se ha demostrado que la célula inicial del ápice puede dar lugar a dos células hijas con características distintas: mientras una de ellas continúa dividiéndose mitóticamente, la otra crece de manera amitótica. Es esta peculiaridad de producir células no equipotenciales la que explica la alternancia de nodos e internodos en el organismo adulto (2).

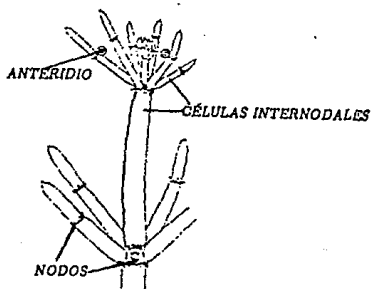


Fig. 2. Anatomía típica de una *Characeae* (*Najas Fraxetana*). Dibujos detallados de todas las especies de esta familia se pueden observar en la referencia 7.

Las células nodales son mononucleadas, mientras que las células internodales presentan macro y micronúcleos. Los micronúcleos son de un tamaño semejante al de los núcleos de las plantas superiores (5-10  $\mu\text{m}$ ) y son los únicos que controlan el sexo. Los macronúcleos se generan a partir de los micronúcleos, pero una vez formados son incapaces de dividirse mitóticamente, por lo que, al continuar sintetizando cromatina, se vuelven gigantes (de 30 a 60 veces más grandes que los micronúcleos) y terminan por fragmentarse en múltiples cariomeritos (10). ¿Cuál es la actividad génica en estos distintos núcleos? Nadie parece interesado en responder esa pregunta [11].

La selección de los modelos biológicos determina el desarrollo de una disciplina. Cuanto más complejo el modelo, más difícil la construcción de marcos conceptuales. Por supuesto que los fisiólogos de principios de siglo no eligieron a las *Characeae* porque les parecían sistemas complejos; antes bien, las escogieron porque presentaban muchas ventajas aparentes. El uso de estas algas para estudios electrofisiológicos se debe, ante todo, a la capacidad que poseen las células internodales para sobrevivir (hasta varias semanas) aisladas del organismo completo; así como a su gran tamaño y geometría.

La célula internodal es cilíndrica, con un diámetro aproximado de 1 milímetro y hasta 15 centímetros de longitud cuando se cultivan en el laboratorio (las células silvestres poseen mayores dimensiones). No existen muchos datos concernientes a la ultraestructura, pero, en general, es de esperarse una organización similar a la de cualquier otra célula eucarionte, en particular a la de las plantas superiores. Al igual que la mayoría de las células vegetales, las células de las *Characeae* poseen una pared celular, una membrana plasmática (conocida como plasmalema) y una extensa membrana interna, denominada tonoplasto, que define el compartimento vacuolar. La mayor parte de los cloroplastos se encuentran unidos entre

sí por filamentos de actina y permanecen muy cerca de la cara interna del plasmalema, en una región del citoplasma conocida como interfase sol-gel. No se ha reportado una conexión estructural entre los cloroplastos y el plasmalema, pero estos pueden llegar a estar separados de aquel por una distancia tan pequeña como 100 nm (13). La localización de otros organelos parece ser menos rigurosa.

La pared celular tiene un grosor aproximado de 10  $\mu\text{m}$ . Su composición varía dependiendo de la especie y la edad de las células. En el caso de *Nitella azillaris* la pared esta compuesta principalmente por pectinas, hemicelulosas, celulosa y proteína en un razón 25:30:35:10 (como porcentaje del peso seco); se han identificado en ella urónidos y varios azúcares neutros: glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa, manosa, fucosa y ramnosa; mientras que las ligninas no parecen estar presentes en su constitución (14). La pared es permeable a moléculas de hasta 4158 daltones de peso molecular, y parece tener poros con un diámetro máximo de 4.8 nm (33). Sus propiedades con respecto al intercambio iónico son bastante bien conocidas (23), pero los valores de los coeficientes de difusión para diversos iones y el retraso consecuente entre la llegada a la superficie externa de la pared y la llegada a la superficie externa de la membrana celular han sido objeto de discusión durante los últimos años; en la actualidad parece aceptarse que tanto los aniones como los cationes poseen en su interior movilidades relativas comparables, con una constante de retardo del orden de 1 a 3 segundos (15).

Con respecto a las membranas celulares, la más externa de ellas es el plasmalema, el cual posee las propiedades eléctricas y de transporte dominantes en la célula, por lo que ha llamado la atención de la gran mayoría de los investigadores. Su composición bioquímica no se ha determinado con exactitud. Su conductancia eléctrica ( $G_m$ ) en reposo es aproximadamente de 2 siemens por metro cuadrado ( $S/m^2$ ). Esta membrana genera una diferencia de potencial ( $E_m$ ), negativa con respecto al medio externo, con valores que se encuentran dentro del amplio margen de 90-250 milivolts, dependiendo de la composición de la solución externa y de la especie de *Characeae*. El plasmalema tiene además la capacidad de generar potenciales de acción. Este potencial de acción (PA) es extraordinariamente lento si se compara con el de las células nerviosas; la depolarización tarda cientos de milisegundos y la repolarización varios segundos. Aunque la naturaleza de las corrientes iónicas involucradas no es del todo clara, y el proceso global está todavía lejos de ser comprendido con exactitud [16], existe un modelo para uso didáctico que señala un aumento de la permeabilidad al ion calcio como el primer evento del PA; el influjo de calcio provocaría la apertura de canales de cloro y esta alteración de la permeabilidad al cloro ( $P_{Cl}$ ) sería la principal responsable de la depolarización; posteriormente un incremento en la permeabilidad al potasio ( $P_K$ ) permitiría la repolarización (3). Este PA comparte con los encontrados en células animales las características de ser disparado por estímulos eléctricos, mecánicos, térmicos y químicos; responder a un valor umbral de potencial (alrededor de -80 mV); tener una respuesta todo o nada; presentar un período refractario (de varios minutos) y ser conducido en ambas direcciones a partir del punto inicial de estímulo. Se debe señalar además que la presencia de magnesio y ATP resulta indispensable para mantener la excitabilidad de la membrana (21).

El plasmalema presenta además algunos fenómenos eléctricos poco comunes, o al menos no reportados para la mayor parte de las membranas biológicas. Uno de ellos consiste en el incremento abrupto de la conductancia membranal cuando el potencial de membrana se hiperpolariza experimentalmente más allá de un potencial crítico (alrededor de los 350 mV), que depende de la composición iónica de la solución externa. Cuando el potencial de membrana alcanza el potencial crítico tiene lugar un intenso flujo de iones  $Cl^-$  y el  $E_m$  se depolariza a valores muy cercanos al  $E_{Cl}$ ; si el campo eléctrico externo se elimina, la célula recupera las condiciones iniciales. Aunque la membrana plasmática de *E. Coli*, el eritrocito y *Valonia* presentan un comportamiento similar, Coster y Zimmermann consideran que en estos casos el fenómeno se puede explicar como un rompimiento dieléctrico debido a la inestabilidad electromecánica de la membrana provocada por el intenso campo eléctrico, mientras que en el caso de las *Characeae* el campo externo provocaría una redistribución iónica en la membrana perfectamente reversible (57). Coster denominó a este fenómeno "perforación total" (punch-through) para distinguirlo del rompimiento dieléctrico; sin embargo, Ohkawa y Tsutsui han cuestionado recientemente las ideas de Coster señalando que las células sometidas a estos experimentos no siempre recuperan su potencial de reposo y que la mayor parte de ellas no sobrevive más de una noche (58); así que la relación entre la perforación total y la tolerancia eléctrica de la membrana es un campo abierto a la investigación contemporánea. Otra característica poco común de esta membrana fué reportada hace una década por Ortega-Blake (116) y confirmada hace unos meses por Fishan y Lucas (118): estos investigadores encontraron que es posible provocar el disparo de potenciales de acción si se hiperpolariza el potencial de membrana a valores cercanos a -300 mV; por lo que resulta necesario estudiar en el futuro con mayor detalle las propiedades eléctricas del plasmalema en esta región de potenciales hiperpolarizados.

El citoplasma tiene un grosor de aproximadamente 10 micras. Se divide en dos regiones: la primera se localiza próxima a la cara interna del plasmalema y se denomina citoplasma cortical, ectoplasma o interfase sol-gel; en él se encuentra una capa insoluble en detergente parecida a las mallas de actina de las células animales; esta región cortical se supone en un estado de agregación gelificado, con las alteraciones consecuentes de los procesos de difusión. La segunda región se denomina endoplasma circulante, presenta menos estructura que el ectoplasma y ocupa por lo menos la mitad del volumen del citoplasma. Las determinaciones más recientes del pH interno ( $pH_i$ ) dan un valor (probablemente para la región endoplásmica) de aproximadamente 7.7 en el rango de pH externo 6.5-7.5 (17). El  $pH_i$  parece seguir una ecuación empírica muy simple que es válida para cualquier pH externo ( $pH_o$ ) entre 4.5 y 9.5

$$pH_i = 6.28 + 0.22pH_o \quad (1)$$

pero los procesos que producen este resultado son desconocidos (18). Es conveniente señalar que el  $pH_i$  es dependiente de las condiciones de iluminación, pues la transición de luz a obscuridad provoca una disminución del  $pH_i$  de entre 0.2 a 0.4 unidades (17).

El fenómeno más llamativo que ocurre en el endoplasma es la circulación citoplásmica, ciclosis o corriente protoplásmica. Este consiste en el eterno movimiento de pequeños cristales (denominados genéricamente partículas citoplásmicas) y de algunos cloroplastos a todo lo largo de la célula internodal. La ciclosis provoca también el movimiento, en la misma dirección, de partículas vacuolares y de protuberancias o irregularidades del tonoplasto. La velocidad de los cristales puede llegar hasta los 120 micrometros por segundo. Hasta donde yo sé, nadie ha determinado la composición de estos cristallitos, pero imagino que son agregados de productos fotosintéticos. La ciclosis es el criterio de vida en las Charofitas; una célula sin corriente protoplásmica se considera una célula muerta. La única condición fisiológica que origina un alto total, aunque breve, de la ciclosis es el disparo de un potencial de acción; la causa inmediata de este fenómeno parece ser el incremento transitorio en la concentración del calcio citoplásmico provocado por, o durante, el PA (26).

La investigación realizada sobre la ciclosis es muy extensa, y se conoce su dependencia a gran variedad de condiciones ambientales; de hecho, fué la ciclosis lo que llamó la atención de Corti sobre las *Characeae* en 1774 [19]. En la actualidad sabemos que la circulación citoplásmica involucra filamentos de actina F, pero además se ha postulado la participación de una proteína tipo miosina. Aunque existen algunos datos que permiten pensar en un proceso de fosforilación-defosforilación de la proteína tipo miosina postulada, la comprensión detallada del fenómeno a nivel molecular se encuentra en pleno desarrollo. La similitud entre la ciclosis y el proceso de excitación-contracción de las células musculares es notable; en ambos casos una alteración de las características eléctricas de la membrana se encuentra acoplada a la modificación de un grupo de reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en el citoplasma y que están relacionadas con procesos mecánicos. Una revisión más o menos reciente de la ciclosis se encuentra en la referencia 20, una recolección de los hallazgos contemporáneos en la referencia 21 y una discusión interesante sobre la relación entre la ciclosis y el movimiento de los organelos se encuentra en la referencia 35.

Existe comunicación química y eléctrica entre las células internodales a través de los nodos, vía delgados canales citoplásmicos que atraviesan la pared celular y que se denominan plasmodesmatas (equivalentes a las uniones brecha de las células animales). Su diámetro está entre 62 y 71 nanometros, comprenden del 0.06 al 0.15 % del area total de la pared intercelular (2) y no parecen estar asociados con elementos del retículo endoplásmico (desmotúbulos). Se supone que están equipados con un mecanismo tipo válvula que sería sensible al gradiente de presión de turgencia a través del nodo y no parecen estar regulados por un sistema citoesquelético tipo actina-miosina (24). Se ha reportado que carbohidratos de bajo peso molecular (en particular pentosas, hexosas y algunos disacáridos) pueden ser fotosintetizados en una célula internodal, ser exportados al citoplasma y pasar a través de los plasmodesmatas hasta una célula internodal vecina en el lapso de una hora (59).

La vacuola tiene un papel preponderante en el control de la osmolaridad intracelular y en la acumulación y degradación de metabolitos. Ocupa, al igual que en la mayoría de las células vegetales, gran parte del volumen celular (entre un 90 y un 95 %). El medio interno es ácido, con un pH de 5.6 aproximadamente. Se ha reportado la existencia de hidrolasas



ácidas y proteasas en el interior de la vacuola, y se ha demostrado que en ella se llevan a cabo procesos de degradación proteica (25). El tonoplasto presenta una diferencia de potencial con respecto al citoplasma que tiene un valor aproximado de +15 mV. El valor de la conductancia en reposo varía mucho en la literatura, algunos autores la reportan de  $0.5 S/m^2$ , mientras que otros la miden tan grande como  $11 S/m^2$  (18). La naturaleza de los movimientos iónicos a través del tonoplasto era prácticamente desconocida hasta 1975 (2), debido principalmente a la dificultad técnica para realizar cambios en la composición iónica a cada lado de la membrana; sin embargo, el desarrollo reciente de nuevos modelos experimentales (ver la sección técnicas quirúrgicas) permite suponer un rápido avance en esta área a muy corto plazo. La concentración iónica en el interior vacuolar determinada para células de *Chara corallina* se muestra en la tabla I.

TABLA I

ESPECIE IONICA	CONCENTRACIÓN PROMEDIO (mM)
$Na^+$	53
$K^+$	80
$Ca^{++}$	3
$Mg^{++}$	4
$Cl^-$	106
$SO_4^{2-}$	6
$PO_4^{2-}$	10
$NO_3^-$	0.5

Tabla I. Concentración iónica en la vacuola de células internodales de *Chara corallina* de acuerdo a la referencia 121.

Se ha reportado que el tonoplasto también posee la capacidad de generar potenciales de acción; por lo menos en las especies *Chara corallina*, *Nitellopsis obtusa*, *Nitella pulchella*, *Nitella translucens*, *Nitella syncarpa*, *Nitella azilliformis* y *Nitella flexilis* (28). Aparentemente este PA es causado por un incremento en la permeabilidad al  $Cl^-$ , pues el pico del potencial se encuentra muy cerca del potencial de Nernst para el  $Cl^-$  (figura 3). Aunque es posible generar potenciales de acción en el plasmalema sin afectar el tonoplasto, no se ha logrado producir un PA en el tonoplasto si no se genera primero uno en el plasmalema (21). Estos hallazgos han sugerido la existencia de un mecanismo que acopla el PA del plasmalema con el PA del tonoplasto; este mecanismo involucraría al ion  $Ca^{2+}$ , pues cuando el calcio externo se reemplaza con bario, magnesio o manganeso el PA del plasmalema no presenta ninguna alteración, pero se inhibe la generación del PA del tonoplasto (26).

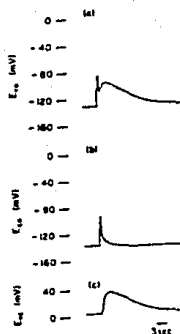


Fig. 3. Potenciales de acción en *Nitella*. a) Registro Vacuola-Exterior, b) Potencial de acción del plasmalema, c) Potencial de acción del tonoplasto.

Por lo anterior, el esquema conceptual contemporáneo del PA del tonoplasto resulta ser el siguiente: el potencial de acción en el plasmalema provoca un incremento en la concentración de calcio interno y éste incremento altera la permeabilidad del tonoplasto al cloro, probablemente a causa de la activación de canales de cloro sensibles a calcio. Es importante, sin embargo, mantener en mente que esta explicación es solo una hipótesis pues, como de costumbre en las *Characeae*, los datos en la literatura resultan bastante confusos, cuando no contradictorios; por ejemplo, Kikuyama reportó el año pasado que bajas concentraciones de calcio (menores a  $1\mu M$ ) parecen activar canales de cloro en el tonoplasto de *C. corallina*, mientras que inactivan los supuestos canales de cloro del tonoplasto de *N. azilliformis* (29). Si se incrementa la concentración de calcio a  $1\mu M$  los canales de cloro de *C. corallina* se inactivan. Además, la naturaleza de la corriente de repolarización aún no se ha determinado.

Me gustaría dar por concluida la sección en este punto. Hasta aquí he tratado de exponer las características que son generales a todas las especies de *Characeae*; a continuación quiero profundizar en varias características que solo se han estudiado en tres o cuatro especies, entre ellas *Nitella translucens*, y que son directamente relevantes para la comprensión de mi trabajo de tesis. Pero antes resulta necesario mencionar algunos modelos teóricos y experimentales desarrollados recientemente.

## TECNICAS QUIRÚRGICAS.

Aunque la célula internodal intacta resulta adecuada para llevar a cabo una variada gama de experimentos, su anatomía implica restricciones inevitables. Por ejemplo, ¿cómo desarrollar estudios iónicos del tonoplasto análogos a los realizados sobre el plasmalema, donde es posible variar la composición del medio externo? o ¿cómo tener acceso a la cara interna del plasmalema? Las técnicas de la bioquímica animal podrían haber contribuido a resolver estos problemas; sin embargo, los electrofisiólogos prefirieron desarrollar sus propias técnicas que resultaron ser, las más de las veces, asombrosamente burdas.

La primera modificación física de una célula vegetal con la intención de producir un nuevo modelo experimental la realizó Blinks en 1935 al perfundir la vacuola de células de *Halicystis*; sin embargo, no fué sino hasta 1964 que Tazawa utilizó esta técnica en las *Characeae* (30). La prolongada supervivencia (cuantificada en términos de la corriente citoplásmica) de las células internodales a las que se les ha reemplazado la savia vacuolar por soluciones artificiales, ha permitido el estudio *in situ* del tonoplasto, en particular de su cara interna. Partiendo de este modelo Williamson desarrollo en 1975 otro conocido como "célula libre de tonoplasto" (figura 4). La diferencia esencial entre ambas técnicas radica en la composición del medio de perfusión: en el caso de la célula con vacuola perfundida el medio contiene calcio, el cual mantiene la integridad del tonoplasto (30); mientras que en el caso de la célula libre de tonoplasto la solución de perfusión contiene un quelante de calcio, el etilenglicol-bis-( $\beta$ -aminoetileter)N,N'-ácido tetracético (EGTA), lo que provoca que el tonoplasto se desintegre y parte del endoplasma se distribuya en el espacio que ocupaba la savia vacuolar. La ciclosis no desaparece si el medio de perfusión contiene ATP (31). Este modelo permite alterar la composición iónica del citoplasma y estudiar las funciones del plasmalemma bajo esas condiciones.

Otra modificación celular que ha facilitado el estudio de las funciones del tonoplasto en relación con las condiciones del citoplasma es la denominada célula permeabilizada (figura 4). Este modelo fue desarrollado en 1983 por Shimmen y Tazawa (32) y se obtiene colocando la célula a baja temperatura y bañándola con un medio ligeramente hipertónico que contiene EGTA. La célula se plasmolisa y el plasmalema se vuelve permeable a moléculas como el colorante rojo neutro y al ATP; de hecho, el criterio que se utiliza para determinar que la permeabilización ha sido obtenida es el alto total de la corriente protoplásmica y su reinicio cuando se añade ATP a la solución externa. Esta permeabilización es irreversible. Experimentos recientes han demostrado que el plasmalemma permeabilizado permite el paso de moléculas de hasta 874 daltones de peso molecular, por lo que este proceso parece inducir la formación de poros con un diámetro máximo cercano a los 3 nanómetros (33).

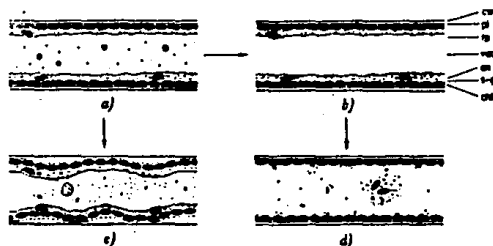


Fig. 4. Algunos modelos experimentales desarrollados en las Characeas. a) célula intacta, b) célula con la vacuola perforada, c) célula permeabilizada, d) célula libre de tonoplasto. cw, pared celular; pl, plasmalema; tp, tonoplasto; vac, interior vacuolar; ea, endoplasma circulante; e-g, interfase sol-gel; chl, cloroplastos.

Las gotas citoplásmicas constituyen otro modelo experimental. Estas gotas se obtienen cortando un extremo de la célula y exprimiendo cuidadosamente su contenido en un medio isosmótico. Se ha demostrado que la membrana que rodea a estas gotas proviene esencialmente del tonoplasto (34). Aunque este modelo se desarrolló en 1955 y a la fecha ha perdido muchos adeptos, una parte de los conocimientos actuales (ver la sección *imagen contemporánea*) se ha obtenido a partir de estas gotitas.

Aún cuando la existencia de una variada gama de modelos experimentales resulta importante para el desarrollo fructífero de cualquier disciplina, es la presencia de varios modelos teóricos alternativos lo que realmente establece la posibilidad de un desarrollo pleno. El caso de las *Characeae* es un caso clarísimo de limitación teórica. Durante el período 1922-1968 es posible encontrar decenas de artículos con títulos prácticamente idénticos: "El efecto del potasio sobre el potencial de membrana", "El potasio externo y el potencial de membrana", "Dependencia del potencial de membrana al potasio externo", etc. ¿Los resultados? frecuentemente contradictorios. Apenas Osterhout establece que el potencial de reposo de *Nitella* es un potencial de difusión de potasio, viene un estudiante y le muestra que bajo las "mismas condiciones" el potencial de otra célula ya no responde al potasio externo (2); y así durante 40 años. En este período los conceptos, no las técnicas, resultaron el paso limitante.

## EL $E_m$ COMO PRODUCTO DE LA DIFUSION PASIVA.

El objetivo central del trabajo electrofisiológico de principios de siglo consistía en explicar el potencial eléctrico que se puede detectar a través de una membrana biológica en términos de la termodinámica reversible. Los diversos grupos de investigación intentaron lograr esta descripción a partir de la ecuación de Nernst-Planck utilizando principalmente las soluciones de Henderson o de Nernst. Estas soluciones permitieron explicar el potencial de membrana en algunos tipos celulares como el eritrocito cuyo  $E_m$  parece ser el resultado de un equilibrio de Donnan (36), pero resultaron poco adecuadas para describir los potenciales de células excitables como las Charofitas. Por ello, cuando Hodgkin y Huxley consiguieron una descripción del axón de *Loligo* utilizando la solución de Goldman (37), los diversos grupos que estudiaban a las *Characeae* supusieron que bastaría aplicar la misma solución a estos tipos celulares para obtener una descripción precisa del potencial de reposo y del potencial de acción.

Veinte años de investigación (de 1952 a 1972) mostraron que cuando las células se incubaban por varias horas en presencia de  $NaCl$  5mM y las determinaciones del potencial se realizaban en ausencia de calcio externo el potencial obedecía la ecuación

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_e + \alpha[Na^+]_e}{[K^+]_i + \alpha[Na^+]_i} \quad (2)$$

en la que el parámetro  $\alpha$  es la razón de las permeabilidades al sodio y al potasio. Esta solución de la ecuación de Nernst-Planck implica las suposiciones de que los únicos iones permeables son el  $Na^+$  y el  $K^+$  y de que las permeabilidades son constantes (117). Sin embargo bajo muchas condiciones experimentales esta ecuación no era capaz de describir el  $E_m$ , y los datos experimentales mostraban que las células internodales presentaban una serie de características que resultaban totalmente inesperadas:

- El potencial de reposo cambiaba muy poco cuando se alteraba la  $[K^+]_e$  a menos que se alcanzara cierta concentración (que variaba en el rango de 1 a 10 mM dependiendo del grupo de investigación) a la cual se disparaba un potencial de acción y en la que la repolarización resultaba incompleta; solo a partir de entonces el  $E_m$  se comportaba de acuerdo con la ecuación 2 [38].

- En soluciones donde la  $[K^+]_e$  era cercana a 1mM, la célula a veces [39] estaba hiperpolarizada hasta valores que no podían ser obtenidos con la ecuación 2 o con una solución de la ecuación de Nernst-Planck que consideraba los iones  $K^+$ ,  $Cl^-$  y  $Na^+$ .

- El potencial de reposo y la resistencia de la membrana resultaron sensibles a las condiciones de iluminación.

Si a estos datos se añade el hecho de que las condiciones de cultivo y las experimentales variaban notablemente entre los distintos laboratorios (consultar el capítulo MATERIAL Y MÉTODOS) se podrá tener una idea de lo complejo que parecía el campo a principios de los

años setentas. Sin embargo, esta complejidad fue, en el fondo, resultado del excesivo interés por reproducir los hallazgos reportados en las células animales. Los datos experimentales esenciales para desarrollar un nuevo modelo teórico se habían obtenido ya a fines de los años cincuentas.

En el año de 1959 Kishimoto reportó que las células de *Chara corallina* se depolarizaban notoriamente al disminuir el pH de la solución externa. La suposición inmediata fue que el cambio en el  $pH_e$  afectaba la permeabilidad al potasio o al cloro. Pero quedó en eso, en una suposición. No fue sino hasta 1968 que Kitasato realizó los experimentos necesarios para validar esta idea y los resultados fueron inesperados (40). Utilizando células de *Nitella clavata* encontró que la  $P_{Na}$  es muy pequeña comparada con la  $P_K$  o la  $P_{Cl}$  y que las tres son independientes del  $pH_e$ , además encontró una gran discrepancia entre la  $G_m$  determinada eléctricamente ( $40 \mu S/cm^2$ ) y la conductancia calculada a partir de la suma de los flujos de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Cl^-$  ( $2 \mu S/cm^2$ ). Para Kitasato esta diferencia reflejaba la contribución de otro ion al potencial de membrana, y el hecho de que el potencial respondiera al pH externo sugería que este ion era el  $H^+$ . Un análisis riguroso consistiría entonces en incluir los protones en la solución de Goldman

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_e + P_{Na}[Na]_e + P_H[H]_e + P_{Cl}[Cl]_i}{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_H[H]_i + P_{Cl}[Cl]_e} \quad (3)$$

y resolverla para las diversas condiciones experimentales. La discrepancia entre la  $G_m$  obtenida mediante la inyección de un pulso de corriente y la  $G_m$  determinada por flujos radioactivos permitía suponer que el potencial de membrana era prácticamente el potencial de equilibrio para los protones; sin embargo la  $[H^+]_i$  no correspondía a la predicha por la ecuación de Nernst, además, si se agregaba DNP al medio externo el potencial de reposo se depolarizaba, lo que parecía indicar la existencia de un proceso de transporte activo. Debido a que los flujos de potasio, cloro y sodio no se alteraban en la presencia del DNP la conclusión de Kitasato fue que la mayor parte de la corriente pasiva era acarreada por los protones pero que existía un mecanismo que impedía alcanzar el potencial de Nernst para el  $H^+$  mediante el bombeo activo de los protones presentes en el interior celular hacia la solución externa. Kitasato postuló que la descripción de este proceso estaría dada por la ecuación

$$E_m \approx E_H - \frac{F\phi_H}{G_m} \quad (4)$$

donde  $\phi_H$  es la cantidad de moles de protones transportados activamente por unidad de tiempo. De esta forma el plasmalema de las Charofitas se convertía en un electrodo de protones y el  $E_m$  resultaba ser un potencial de Nernst desplazado por el factor  $-F\phi_H/G_m$  que podría ser el producto de una bomba electrogénica. Para un fisiólogo contemporáneo esta ecuación resulta sumamente extraña, pero debemos recordar que nos encontramos en 1968 y señalar además que Kitasato no leyó el reporte que Mitchell publicó ese año: "Chemiosmotic coupling and energy transduction" (41).

## ARRIBO DE LA REVOLUCION QUIMIOSMOTICA.

La ecuación 4 contradice uno de los postulados fundamentales de la teoría quimiosmótica contemporánea: las membranas biológicas son prácticamente impermeables a los protones [42]. Sin embargo, en el 68 esta idea se encontraban restringida a la membrana plasmática de las bacterias y a las membranas internas de las mitocondrias y los cloroplastos, por no mencionar que las ideas de Mitchell eran poco aceptadas y que a pesar de sus continuos esfuerzos por demostrar la validez de sus hipótesis debería esperar aún diez años para alcanzar un Nobel reconocimiento. En realidad la ecuación 4 fue cuestionada mucho antes de ello y sin que se mencionara a Mitchell o a su teoría.

“Como una alternativa a estas hipótesis [las ecuaciones 2 y 4] voy a desarrollar una tercera que difiere de las otras por la suposición de que la permeabilidad de la membrana a todos los iones, incluido el  $H^+$ , es baja, y por lo tanto, las propiedades eléctricas de la membrana reflejan las de la bomba electrogénica postulada [por Kitasato]. Smith [43], aún cuando no se interesa primordialmente en las propiedades eléctricas de la membrana celular, ha incorporado esta bomba de protones en una hipótesis para explicar el efecto del pH sobre el influjo de  $Cl^-$ . En resumen, la bomba establece un gradiente de pH que propulsa el influjo de  $Cl^-$  a través de un mecanismo de intercambio  $Cl^-/OH^-$ . Una eficiencia razonable para este proceso implica que el influjo pasivo de protones sea bajo. ¿Es posible entonces explicar las propiedades eléctricas de la membrana en términos de una bomba electrogénica?...”

El párrafo anterior fué escrito por Spanswick en 1972 (44) después de haber realizado experimentos similares a los de Kitasato pero con un mayor control de los diversos parámetros experimentales como las condiciones de iluminación y la temperatura. Al determinar el potencial de reposo en la obscuridad bajo ciertas condiciones (consultar la sección algunas contradicciones) encontró un valor muy similar al  $E_K$  (una diferencia de 2 mV), pero al encender la luz la célula se hiperpolarizaba por lo menos 50 mV. Utilizando condiciones de fijación de voltaje (consultar el capítulo MATERIAL Y MÉTODOS) determinó la corriente que era necesario aplicar para alcanzar el  $E_K$  en estas condiciones y encontró un valor de  $2.2 \mu A/cm^2$ . Spanswick postuló que este aumento en la corriente correspondía al incremento del flujo de protones a través de la bomba electrogénica y no a una alteración de las permeabilidades pasivas, es decir, que la corriente que puede determinarse experimentalmente ( $I_m$ ) debe dividirse conceptualmente en dos componentes, uno debido a la difusión pasiva ( $I_d$ ) y otro debido al transporte activo ( $I_b$ ); y si se usa la teoría de Hodgking y Huxley (37)  $I_d = G_d(E_d - E_m)$  e  $I_b = G_b(E_m - E_b)$  donde el  $E_b$  se define como el máximo potencial que puede ser generado por una bomba electrogénica en ausencia de flujos iónicos pasivos. La figura 5 expresa la idea de Spanswick utilizando el circuito eléctrico equivalente.

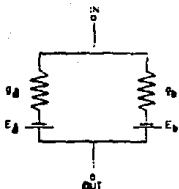


Fig. 5. La hipótesis de la bomba conductora. Figura tomada de la referencia 45.

De acuerdo a este modelo la misma cantidad de corriente debe fluir en ambas ramas del circuito, en direcciones opuestas, bajo condiciones de reposo. El potencial estaría descrito entonces por la ecuación

$$E_m = \frac{E_b G_b + E_d G_d}{G_b + G_d} \quad (5)$$

La expresión para la fuerza electromotriz de una bomba de este tipo (que sólo transporta protones) se puede desarrollar a partir de consideraciones termodinámicas. Si el cambio en energía libre para la reacción de transporte activo es

$$\Delta F = \Delta \mu_b - \nu_H \Delta \mu_H \quad (6)$$

donde  $\Delta \mu_b$  representa el cambio en energía libre para los componentes no transportados de la reacción,  $\nu_H$  es el coeficiente estequiométrico de la reacción y  $\Delta \mu_H$  es la diferencia de potencial electroquímico para los protones a través de la membrana, entonces en el equilibrio

$$\Delta \mu_b = \nu_H \Delta \mu_H$$

o lo que es lo mismo

$$\Delta \mu_b = \nu_H \left( RT \ln \frac{[H]_i}{[H]_e} + FE \right) \quad (7)$$

y despejando

$$E (= E_b) = \frac{\Delta \mu_b}{F \nu_H} - \frac{RT}{F} \ln \frac{[H]_i}{[H]_e} \quad (8)$$

La ecuación 8 muestra que la FEM de la bomba dependería de muchas variables. Para Spanswick la hiperpolarización bajo condiciones luminosas podría atribuirse a un valor más negativo del  $\Delta \mu_b$  y el efecto del pH externo se podría explicar como una alteración del



$E_b$  y no del  $E_d$ . En su siguiente artículo (1974) demostró que la DCCD producía una depolarización al valor de oscuridad, que reducía notablemente la respuesta subsecuente a los cambios en el pH externo y que incrementaba la  $R_m$  a los valores que normalmente tenía en la oscuridad (45). Estos datos sugerían que la bomba era una  $H^+ATPasa$  que se mantenía activa en condiciones de iluminación. A partir de este momento los diversos grupos de investigación intentarán contrastar esta hipótesis utilizando diversos protocolos experimentales.

En 1974 Richard y Hope mostraron que el  $E_m$  de *Chara corallina* resultaba sensible a los cambios en el pH externo bajo condiciones de iluminación, confirmando así los datos de Kishimoto (46). En los años subsecuentes diversos grupos mostraron en esta especie que existía una relación estrecha entre el  $E_m$  y los niveles intracelulares de ATP: en células intactas varios desaccoplantes de la fosforilación como el CCCP y el DNP provocaron la depolarización de la célula hasta valores cercanos al  $E_K$ , así como un gran incremento en la  $R_m$  de manera concomitante a la disminución de los niveles intracelulares de ATP (47). En células libres de tonoplasto perfundidas con un medio sin ATP el  $E_m$  era muy cercano al  $E_K$  pero al añadir esta molécula al medio de perfusión el  $E_m$  se hiperpolarizaba por lo menos 50 mV y la conductancia de la membrana resultaba alterada (48). Si las células internodales intactas se trataban con inhibidores de las  $H^+ATPasas$  tipo F como la DCCD y el DES el potencial de membrana se depolarizaba y se alteraba la resistencia membranal (47,49), lo que era de esperarse si existía una  $H^+ATPasa$  en el plasmalema que contribuía al potencial y conductancia de la membrana y que era sensible a estos compuestos.

Probablemente alguien que conozca un poco la historia de la bioenergética se preguntará por qué Spanswick o algún otro investigador no había relacionado esta bomba con la postulada por Slayman para la hifa de *Neurospora crassa* desde 1965 [50]. No lo sé. Los grupos que trabajaban con las Charofitas empiezan a citarlo alrededor de 1977. El hecho es que Slayman consideraba a la ATPasa como una fuente de corriente constante, mientras que Spanswick la postulaba como una fuente de voltaje constante en serie con una conductancia. Distinguir entre estas dos opciones resulta importante. Si la bomba se comporta como una fuente de corriente constante la conductancia a través de la bomba debe ser cero (por definición, ver nota 51), el flujo de corriente a través de la bomba resulta independiente del potencial y la conductancia de la membrana debe ser igual a la sumatoria de las conductancias de los distintos canales pasivos.

Para 1979, cuando la visión quimiosmótica había sido aceptada como un nuevo paradigma, se acumulaban reportes de potenciales hiperpolarizados que parecían implicar la existencia de una bomba electrogénica en una amplia variedad de organismos: *Nitella translucens*, *Chara corallina*, *Acetabularia mediterranea*, *Riccia fluitans*, *Avena sativa*, *Pisum sativum*, *Elodea canadensis* y *Zea mays* (52). Pero la idea de explicar el potencial de reposo de los hongos, las algas, las hepáticas y las plantas superiores con base en una bomba de protones era poco aceptada por muchos fisiólogos vegetales que aún se empeñaban en reproducir los esquemas animales; de hecho, en el "International Workshop on Membrane Transport in Plants" que se llevó a cabo en Toronto en Julio de 1979, Spanswick señalaba:

"La idea de una bomba de protones es atractiva porque es consistente con un esquema quimiosmótico para el transporte en células vegetales... aunque la hipótesis de la bomba conductora podría estar limitada a su aplicación en las *Characeae*" (53). Un año después Scarborough terminó de demostrar que la  $H^+ATPasa$  de *Neurospora* transloca protones a través de vesículas membranales purificadas a partir de protoplastos (54); para 1981 esa  $H^+ATPasa$  se había purificado (55) y para 1986 el gen correspondiente ha esta enzima había sido clonado (56). En contraste, la  $H^+ATPasa$  de las *Characeae* permanece ajena a cualquier intento de purificación; además su contribución a las propiedades eléctricas del plasmalema continúa siendo un área abierta a la discusión.

## IMAGEN CONTEMPORANEA.

Como señalé en el capítulo de INTRODUCCIÓN, la Biología actual se rige por el pensamiento microscópico. La explicación en términos moleculares resulta ser un componente casi esencial de cualquier teoría, desde las embriológicas hasta las evolutivas. El objetivo central de esta Biología radica en explicar las características macroscópicas de los organismos en términos de las moléculas que los conforman. Un esfuerzo importante en este sentido se ha realizado sobre las *Characeae* en la última década, aunque de una forma mucho menos global que en otros organismos. En la actualidad no sabemos casi nada de su genética o su bioquímica, pero existen bastantes datos sobre los diversos sistemas de transporte presentes en el plasmalema y el tonoplasto. El objetivo de esta sección consiste en señalar cada uno de los sistemas de transporte descritos a la fecha y mencionar los modelos que se han propuesto para integrarlos en patrones fisiológicos, en particular para explicar las características eléctricas de las membranas en reposo.

Al lector interesado en esta área le resultará muy conveniente consultar todos los artículos citados a partir de este momento, pero la investigación contemporánea en las *Characeae* presenta un par de características que conviene mantener en mente cuando se revisan los artículos originales: la selección limitada de especies y la generalización prematura. Me explico: la selección limitada de especies se refiere al hecho de que los experimentos concernientes a los transportadores membranales se han realizado sobre un número muy limitado de especies que podrían no representar adecuadamente al resto de la familia (*Chara corallina*, *Nitellopsis obtusa*, *Nitella clavata* y *Nitella translucens*). La generalización prematura se refiere al hecho de que bastantes autores tienden a mezclar la información obtenida, no sólo en especies distintas, sino en géneros distintos (*Chara* y *Nitella*), argumentando que es de esperarse una gran similitud entre ellos. A mi juicio es preferible hacer un esfuerzo por mantener agrupados los datos en género y especie, al menos hasta contar con información suficiente que permita sospechar una verdadera homogeneidad a nivel molecular [60].

## Procesos de transporte primario.

En el plasmalema solo parece existir un sistema de transporte primario: la  $H^+ATPasa$  tipo P. En la sección anterior mencioné el tipo de hallazgos experimentales que permiten

postular la existencia de esta enzima en *Chara corallina* y *Nitella translucens*: potenciales hiperpolarizados (más allá de cualquier potencial de difusión pasiva) sensibles al pH, a los inhibidores típicos de las  $H^+ATP$ asas y dependientes del ATP intracelular (61,62,63,64,65). Sé que resulta obvio lo indirecto de esta evidencia, pero se puede añadir a ella un trabajo reciente del grupo de Tazawa en células profundidas de *Nitellopsis obtusa*: si el medio externo se mantiene muy bien agitado para disminuir la acumulación extracelular de protones, es posible demostrar un flujo de  $H^+$  dependiente de ATP muy similar al flujo de cargas positivas dependiente de ATP (19-20 mA/m<sup>2</sup>) determinado bajo condiciones de fijación de voltaje (66). La existencia de esta bomba se postula además por el hecho de que se ha conseguido purificar una  $H^+ATP$ asa a partir de las membranas plasmáticas de hongos y plantas superiores (52) y que la concepción contemporánea del transporte a través de las membranas vegetales implica la existencia de un circuito de protones generado por esta enzima (ver el capítulo de INTRODUCCIÓN). A partir del análisis de las curvas I/V en ausencia y presencia de varios tipos de inhibidores algunos autores han propuesto una estequiometría de  $1H^+ : 1 ATP$  (62,67) mientras otros concluyen una estequiometría de  $2H^+ : 1 ATP$  (63) para esta  $H^+ATP$ asa.

En el tonoplasto, evidencia muy reciente apunta hacia la existencia de dos procesos de transporte primario: una  $H^+ATP$ asa tipo V y una pirofosfatasa membranal. Utilizando células permeabilizadas de *Nitella translucens* Shimmen y MacRobbie muestran que la acumulación del colorante rojo neutro (RN) en la vacuola (que es dependiente del transporte de  $H^+$  al interior vacuolar) puede inducirse si se añade ATP o  $PP_i$  al medio externo. La acumulación de RN dependiente de ATP es inhibida por la DCCD, mientras que la dependiente de  $PP_i$  solo es afectada parcialmente. La presencia de  $NO_3^-$  en el medio externo inhibe completamente la acumulación dependiente de ATP, pero no afecta a la dependiente de  $PP_i$ . Si el potasio del medio se reemplaza con bis-tris-propano la acumulación dependiente de  $PP_i$  resulta inhibida, pero la dependiente de ATP no es afectada. El vanadato no tiene efecto sobre estos sistemas y ambos resultan dependientes de  $Mg^{2+}$  (68).

Por su parte Takeshige, Tazawa y Hager han reportado dos tipos de bombeo de  $H^+$ , el ATP- y el  $PP_i$ - dependientes, así como producción de  $P_i$  a partir de ATP y pirofosfato en vesículas vacuolares de *Chara corallina*. La DCCD y la NEM inhiben notoriamente la actividad de ATPasa y el bombeo de protones asociado, mientras que sólo afectan ligeramente la actividad de pirofosfatasa o el bombeo de protones asociado a ella. El  $NO_3^-$  inhibe drásticamente el bombeo de protones dependiente de ATP pero la actividad de ATPasa la inhibe sólo un 50 %. El ácido estilbenedisulfónico inhibe ambas actividades, mientras que el molibdato de amonio, la azida de sodio, y el vanadato no tienen efecto sobre ellas (69). Las dos actividades resultan dependientes de  $Mg^{2+}$  y los metales alcalinos las estimulan entre un 10 y un 40 % en el orden  $Rb^+ = K^+ > Cs^+ > Na^+ = Li^+ > colina^+$  (70).

### Procesos de transporte secundario.

Existe una gran cantidad de evidencia electrofisiológica que indica la presencia de diversos tipos de canales iónicos en las células vegetales. La mayor parte de esta evidencia se ha obtenido con técnicas clásicas, pues los registros de canal unitario son todavía muy escasos dentro del reino vegetal. Una de las familias donde se han realizado más registros de este tipo es la *Characeae* (119); sin embargo la evidencia experimental concerniente a los sistemas de transporte secundario aún no es suficiente como para poder construir un esquema conceptual detallado de alguno de ellos. A continuación describo brevemente los diversos sistemas que se han reportado en las Charofitas hasta el mes de septiembre de este año:

#### I.-En el plasmalema:

a) Canales de Potasio.- La existencia de canales de potasio en esta membrana se ha supuesto desde los años cincuentas, pero no fue sino hasta la década de los ochentas que se logró profundizar en el estudio de estas moléculas. En *Chara corallina* el grupo de Kishimoto postuló la existencia de un canal de potasio a partir de la observación experimental de que la  $G_m$  de células internodales con vacuola perfundida se incrementa cuando aumenta la  $[K]_e$  y/o con la depolarización del  $E_m$ . El análisis de curvas I/V para distintas concentraciones de potasio externo les permitió estimar la densidad total de canales de potasio en el plasmalema como cercana a 6.5 canales/ $100\mu^2$  y calcular la conductancia unitaria como de 79, 86, 105 y 119 pS para las  $[K]_e$  0.2, 0.5, 2 y 5 mM respectivamente (71).

TABLA II

Inhibitor	Chara plasmalemma	High G K(Ca)	Low G K(Ca)	Classic delayed rectifier	Inward rectifier	ATP- sensitive
TEA <sup>+</sup>	+	+	-	+	+	+
Ca <sup>2+</sup>	+	+	?	+	+	?
Ba <sup>2+</sup>	+	+	?	+	+	+
Quinine	+	+	+	+	?	+
4-aminopyridine	-	-	?	+	?	+ / -
Charybotoxin	-	+	?	-	?	-
Decamethonium	+	+	?	-	?	-
Apamin	-	-	+	?	?	-
Tubocurarine	-	?	-	?	?	?
Dendrotoxin	-	-	-	?	?	?
Totbutamide	-	-	?	-	-	+
Tetracaine	+	?	?	+	?	+

Tabla II. Efecto de varios inhibidores de los canales de potasio sobre el plasmalema de *Chara corallina* y sobre diversos tipos de canales de potasio presentes en células animales. El símbolo + indica inhibición;

el símbolo - indica ausencia de inhibición y el símbolo ? indica que el efecto no se ha determinado. La tabla procede de la referencia 72.

Por su parte Tester, a partir del análisis del efecto de diversos inhibidores sobre la corriente de membrana de *Chara corallina*, reporta que estos canales se parecen mucho a los canales de potasio de alta conductancia dependientes de calcio (canales Alta  $G K^+(Ca^{2+})$ ) encontrados en las células animales (tabla II). Por experimentos de competencia con  $Cs^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Tl^+$  y  $Ba^{2+}$  concluyó que este canal es un poro multi-iónico que permite el paso de los iones en una sola fila. La serie de permeabilidades obtenida a partir del  $\Delta E_m$  provocado por los distintos iones resulta ser  $Tl^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$ , mientras que la obtenida a partir de las determinaciones de la  $I_m$  es  $K^+ > Tl^+ > Na^+ = Li^+ > Rb^+ > Cs^+$ . El valor de la conductancia máxima a través de estos canales no es claro, pues los cálculos dan una  $G_{max}$  variable entre célula y célula que va de 3 a 11  $S/m^2$  (72,73).

En *Nitella flexilis* Sokolik y Yurin, utilizando técnicas convencionales de registro eléctrico con microelectrodos y fijación de voltaje en internodos intactos, identificaron dos tipos de canales de potasio: uno de ellos se activa en el rango -100 a -80 mV (canales D) y el otro a voltajes mayores de -100 mV (canales H). El movimiento iónico en los canales D parece seguir el mecanismo de difusión simple, mientras que el incremento en la corriente a través de los canales H en respuesta al cambio en la concentración de potasio es mucho menor al calculado a partir del principio de independencia. La serie de permeabilidades para ambos canales resulta muy similar:  $K^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Na^+ \approx Li^+ > Cs^+ > colina^+$  (74).

En *Nitellopsis obtusa* el grupo de Berestovskii encontró, utilizando la técnica de registro de canal unitario [75], que el canal de potasio parece tener varios niveles de conductancia. En condiciones iónicas balanceadas con respecto al potasio la  $G$  es de 50 pS, mientras que la conductancia máxima es de alrededor de 90 pS. El canal parece ser altamente selectivo al potasio, a diferencia de los reportados en *Chara corallina* (76).

b) Simportador  $K^+/Na^+$ .- El grupo de Walker reportó muy recientemente que si las células internodales de *Chara corallina* se ayunan de  $K^+$  por 4 semanas y posteriormente se colocan en un medio con potasio es posible observar un influjo de potasio dependiente de sodio; los cambios en la  $I_m$  asociados al potasio sólo se observan en presencia de sodio y, de manera recíproca, los cambios de corriente asociados con el ion sodio sólo se observan en presencia de potasio. El flujo radioactivo indica que la estequiometría más probable es de 1:1. A partir de curvas  $I/V$  en ausencia y presencia de potasio y sodio determinaron que el transporte presenta dependencia al voltaje con una  $K_m$  para potasio que disminuye desde 30 hasta 2  $\mu M$  conforme la célula se hiperpolariza desde -140 a -400 mV, y una  $K_m$  para el sodio de entre 470 a 700  $\mu M$  en el rango de potencial de membrana de -140 a -310 mV (77).

c) Canales de cloro.- En *Nitellopsis obtusa* Shiina y Tazawa mostraron, utilizando células libres de tonoplasto y técnicas clásicas, que existe un flujo de cloro concomitante con la depolarización de la membrana que depende de la concentración de  $Ca^{2+}$  interna, y

que el inhibidor A-9-C (ácido 9-antracencarboxílico) reduce este flujo y la magnitud de la depolarización de la membrana (78). El grupo de Berestovskii encontró en el mismo modelo experimental que el EA (ácido etacrínico) suprime completamente las corrientes de cloro inducidas por calcio. La concentración interna de calcio necesaria para alcanzar la mitad de la amplitud de la corriente inducida es de  $17 \pm 4 \mu M$ . El efecto de otros iones divalentes es variado: el magnesio y el bario son incapaces de activar este canal, el cadmio activa los canales de cloro por unos cuantos segundos, pero después provoca una inactivación reversible y el estroncio induce corrientes con la misma cinética y amplitud que el calcio pero a una concentración de 10 mM. Estos canales parecen ser permeables también a algunos cationes monovalentes como el potasio y presentan la serie de permeabilidad  $Cl^- \gg K^+ \approx CH_3SO_4 \gg SO_4^{2-}$ . Son activados por la depolarización de la membrana y su dependencia al potencial resulta muy compleja (79).

Por otra parte Coleman mostró, utilizando la técnica de fijación por secciones (en las configuraciones de célula-ligada y de célula-completa), que en *Chara corallina* existe una corriente de entrada a través de canales sensibles a voltaje que parece corresponder al flujo de iones  $Cl^-$ ; estos canales presentan una cinética compleja con un número variable de niveles de conductancia, el más bajo de los cuales resulta ser de 7 pS (80).

d) Simportador  $Cl^-/H^+$ .- Reid y Walker reportan en células de *Chara corallina* con vacuola perfundida un influjo neto de  $Cl^-$  en contra de su gradiente electroquímico en ausencia de ATP. Sus datos muestran que la adición de ATP al medio de perfusión estimuló ligeramente el influjo de  $Cl^-$  en un experimento pero no tuvo ningún efecto en otro. La adición de ADP, NADH o inhibidores metabólicos no alteran la tasa de influjo. Debido a que la diferencia de potencial electroquímico para el potasio es muy baja en las células perfundidas en ausencia de ATP (el  $E_m$  se encuentra cercano al  $E_K$ ); a que el influjo de Cl continúa aún en ausencia de sodio externo e interno; y a que el  $Ca^{2+}$  no muestra un flujo suficientemente grande en células intactas como para ser responsable de la ingesta de  $Cl^-$ , estos autores han postulado que este influjo se lleva a cabo por medio de un cotransportador  $H^+/Cl^-$  (la diferencia de potencial electroquímico para el  $H^+$  en las células perfundidas es equivalente a 17 kJ/mol) con una estequiometría de 1 o 2  $H^+$  por  $Cl^-$  transportado (81).

e) Canales de calcio.- Utilizando células libres de tonoplasto de *Nitellopsis obtusa* Shiina y Tazawa reportaron la existencia de una corriente membranal de entrada sensible a la concentración de calcio que se inhibe irreversiblemente con  $La^{3+}$  y nifedipina y que es estimulada por el agonista de calcio BAY K 8644 de manera irreversible. El canal propuesto para explicar esta corriente resulta ser permeable a cationes mono y divalentes, pero cuando en la solución externa se encuentran presentes ambos tipos de iones en concentraciones similares la corriente a través de este canal se debe esencialmente a los divalentes. La serie de permeabilidad determinada por estos investigadores para cationes divalentes es  $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$  y para cationes monovalentes  $Rb^+ > K^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$  (82); sin embargo el grupo de Berestovskii ha reportado que la serie para iones divalentes obtenida a partir de registros de canal unitario es  $Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$  (79). Este canal resulta sensible a voltaje activándose con la depolarización de la membrana, sin embargo esta sensibilidad es dependiente de la presencia de Mg-ATP en

el medio de perfusión. A partir de experimentos con inhibidores de la protein cinasa y de la fosfoprotein fosfatasa se ha propuesto que el canal está regulado por un proceso de fosforilación-defosforilación (83).

f) Canales de protones.- La única evidencia experimental que existe para postular este transportador es que por arriba de un  $pH_c$  crítico (aproximadamente 10.5) la conductancia del plasmalema de *Chara corallina* aumenta en un factor de 2.4 y el  $E_m$  se aproxima mucho al potencial de Nernst para el  $H^+$ , hiperpolarizándose con una pendiente de -58 mV por unidad de pH (84). La existencia de canales que permitan el flujo pasivo de protones es un fenómeno muy interesante; hasta donde sabemos no se ha reportado un estado electrofisiológico similar en otro organismo, por lo que resulta importante determinar la naturaleza de estos canales.

g) Uniport de aminas.- En células de *Chara corallina* y *Nitella clavata* se ha observado una corriente de entrada de cargas positivas a través del plasmalema y el tonoplasto al añadir  $NH_4^+$  o metilamonio al medio externo. La corriente atribuida al amonio y el metilamonio varía entre célula y célula de 10 a  $100 \mu A/m^2$ . Los cambios en corriente son dependientes de la concentración y presentan una cinética Michaelis-Menten. Los valores de  $K_m$  son de  $\approx 3 \mu M$  para el amonio y  $\approx 250 \mu M$  para el metilamonio. La corriente de saturación es la misma cuando se añade una sola de estas aminas o cuando se añaden las dos juntas, lo que sugiere que las dos entran por el mismo transportador. A partir de la forma de las curvas I/V y de la dependencia de la  $K_m$  al potencial de membrana el grupo de Walker ha postulado que este uniport es un canal con una sola barrera de potencial en el centro de la membrana y que posee uno o dos sitios selectivos de unión justo bajo la superficie de la membrana. Este transportador presenta una secuencia de permeabilidad amonio > metilamonio > etilamonio > dimetilamonio > isopropilamonio (85).

h) Transporte de urea.- El coeficiente de permeabilidad para la urea en el plasmalema de *Chara corallina* estimado a partir de la pendiente de una función de ingesta vs concentración resulta mucho mayor que el esperado a partir de los coeficientes de partición éter/agua [86], por lo que se postuló una difusión de urea a través de poros acuosos del plasmalema que tendrían una  $K_m$  menor a 1 mM (87). El grupo de Walker demostró recientemente que la N-metil-urea, la acetamida y la urea compiten por un sistema de transporte que presenta una  $K_m$  de  $300 \mu M$  y que resulta sensible a la DCCD y el CCCP (88). La ingesta de urea resulta influenciada por los niveles de las pozas intracelulares de nitrógeno.

## II.- En el tonoplasto:

a) Canales de potasio.- Por medio de registros de canal unitario realizados en secciones de membrana de gotas citoplásmicas de *Chara corallina* el grupo de Walker encontró una corriente sensible a TEA que parece corresponder a un canal de potasio. La respuesta I/V en el rango -250 a +200 mV es no lineal y la corriente muestra saturación a voltajes extremos y/o altas concentraciones de potasio externo. La cinética de saturación obedece el modelo Michaelis-Menten con una  $K_m$  de  $50 \pm 25 \mu M$  y la conductancia máxima del canal parece ser de  $300 \pm 20$  pS. El canal se abre y cierra bruscamente dependiendo del  $E_m$ ; el tiempo promedio en estado abierto parece ser el parámetro más sensible al potencial de membrana con un máximo entre -120 y -150 mV (89). De acuerdo con Bertl este canal

es prácticamente impermeable al sodio y al cloro, pero la presencia de sodio a cualquier lado de la membrana inhibe las corrientes de potasio (90). Por su parte Tyerman y Findlay, utilizando el mismo sistema experimental, reportan dos tipos de canales de potasio que pueden diferenciarse por su conductancia: 100 pS y 60 pS. Ambos canales presentan rectificación (91).

En gotas citoplásmicas de *Lamprothamnium succinctum* el grupo de Tazawa encontró, por medio de registros de canal unitario, un canal de potasio regulado por calcio. A bajas concentraciones de calcio interno la frecuencia de apertura es muy baja y el tiempo que el canal permanece en el estado abierto es corto; un aumento en la concentración de calcio provoca el incremento en la frecuencia y duración de la apertura, pero la conductancia del canal no se modifica. La permeabilidad del potasio es aproximadamente 50 veces más grande que la del sodio y el canal presenta una tendencia a rectificar en dirección al medio externo. Cuando el  $E_m$  es negativo la conductancia del canal resulta ser de 50 pS, pero para valores positivos del  $E_m$  la conductancia es de 100 pS (92).

b) Canales de cloro.- Tyerman y Findlay, utilizando gotas citoplásmicas de *Chara corallina* y la técnica de fijación por parches, encontraron un canal de cloro que a diferencia del canal del plasmalema muestra un solo nivel de conductancia de 21 pS. Este canal no parece ser sensible a presión o a voltaje. La secuencia de permeabilidad es  $NO_3^- > Cl^- > \text{aspartato}$  (91). Por su parte Kikuyama encontró en células permeabilizadas de *Chara corallina* que el flujo de cloro aumenta conforme se incrementa la concentración externa de calcio, lo que sugiere que este canal podría estar regulado por  $Ca^{2+}$  (93).

Además de estos sistemas, se infiere la existencia de algunos otros (para fosfato, *soa...*, carbonato, sulfato, nitrato, etc.) por simple sentido común, aunque todavía no se cuenta con evidencia experimental detallada (2,18,94).

#### Integración en patrones fisiológicos.

El día de hoy se sabe que en condiciones de reposo el plasmalema de *Chara corallina* y *Nitella translucens* puede encontrarse en uno de tres estados electrofisiológicos (84,95,96,97); cada uno de ellos puede explicarse por la preponderancia de un sistema de transporte funcionando en o cerca del equilibrio:

a) El estado K.- Se caracteriza por un  $E_m$  similar al  $E_k$  y una  $G_m$  de 15 a 20  $S/m^2$ . En este estado ambos parámetros presentan una marcada dependencia a la concentración externa de potasio. El estado K se observa si las células se encuentran en alguna de las siguientes condiciones: a) en la oscuridad [98], b) bajo condiciones de iluminación en ausencia de calcio externo, c) si se añaden inhibidores de la bomba de protones, d) si la concentración de potasio externo es mayor a entre 2 y 5 mM. Este estado se define como aquel en el que la difusión pasiva de potasio es el sistema de transporte dominante.

b) El estado P.- Se caracteriza por un potencial de membrana hiperpolarizado con respecto al  $E_k$  y una conductancia de alrededor de 2  $S/m^2$ . En este estado tanto el  $E_m$  como la  $G_m$  responden a cambios en el  $pH_e$ . Este estado se obtiene bajo condiciones de iluminación a cualquier  $pH_e$  menor de 10.5 con una  $[K]_e$  menor a 2mM. En este estado el  $E_m$  puede



llegar hasta los -350 mV y resulta insensible a variaciones en la  $[K]_e$  y al TEA. Se supone que este estado es el resultado del bombeo activo de protones a través de la  $H^+ATPasa$  de la membrana plasmática, y parece ser el estado fisiológico en el que generalmente se encuentra el plasmalema.

c) El estado H.- Se caracteriza por un potencial de reposo cercano al  $E_H$  y una  $G_m$  de por lo menos  $20 S/m^2$ . Este estado se obtiene bajo condiciones de iluminación si el  $pH_e$  se encuentra en el rango 10.5 a 12. Resulta dependiente de la presencia de  $Ca^{2+}$  externo y es sensible a la DCCD. Se postula que este estado es el resultado de un incremento en la permeabilidad al  $H^+$  o al  $OH^-$ , pues el potencial de membrana responde a la variación en el  $pH_e$  de manera que parece obedecer la ecuación de Nernst para protones.

Se ha reportado que estos estados pueden coexistir en la célula. Las bandas alcalino-ácidas que presentan los internodos de *Chara corallina* parecen constituir un ejemplo de ello. Si estas células se iluminan con una irradiancia mayor de cierto umbral ( $\approx 100 \mu E/m^2 s$ ) se desarrollan regiones de  $pH_e$  ácido alternadas con regiones de  $pH_e$  básico a todo lo largo del internodo (99). Este patrón espacial es simétrico en la dirección circunferencial, pero resulta periódico en la dirección longitudinal y se ha interpretado como la coexistencia de los estados P y H en condiciones fisiológicas normales. Los experimentos realizados por el grupo de Walker apoyan esta interpretación: La conductancia del plasmalema determinada a lo largo de la célula internodal con un electrodo colocado a una distancia de la superficie celular de entre 300 y 500  $\mu m$  varía en las zonas ácidas desde 1 hasta  $6 S/m^2$  en respuesta al cambio en el  $pH_e$  en el rango 6 a 12, mientras que la conductancia en las zonas básicas cambia de 5 a  $15 S/m^2$  en el mismo rango de  $pH_e$ . A partir de las determinaciones del flujo de corriente en ambas regiones se calculó el potencial de reposo en las bandas ácidas como de  $-265 \pm 20$  mV y en las bandas alcalinas como de  $-183 \pm 5$  mV. Si se apaga la iluminación ambas conductancias disminuyen notablemente hasta que, después de 2 o 3 horas, se alcanza una conductancia homogénea menor a  $0.2 S/m^2$  y un potencial homogéneo de aproximadamente -160 mV (100). Las bandas presentan oscilaciones espacio-temporales que permiten postular al fenómeno de bandeado como una estructura disipativa (101). Se ha propuesto una estrecha relación entre la fotosíntesis y las bandas alcalino-ácidas vía la asimilación de  $HCO_3^-$  (figura 6), pero la evidencia experimental aún no es suficiente para apoyar o descartar esta idea (102).

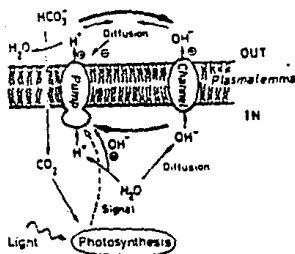


Fig. 6. Esquema propuesto por el grupo de Yamafuji para explicar al bandeo alcalino-ácido. El carbonato extracelular es reducido a dióxido de carbono por medio del gradiente de protones generado por la bomba electrogénica; el dióxido de carbono difunde al cloroplasto para ser utilizado en la fotosíntesis, la cual produce una señal aún no identificada que activaría a la bomba. El canal de hidroxilos contribuiría a mantener una regulación del potencial electroquímico de protones. Figura tomada de la referencia 102.

Se debe señalar que las células de *Nitellopsis obtusa* no presentan este fenómeno de bandeo (94), y que no existen estudios de este patrón en las células de *Nitella translucens*: sin embargo, debido a que los internodos más viejos presentan depósitos de calcio macroscópicos sobre la pared celular (al igual que las células de *Chara corallina*), es posible suponer una conducta similar, al menos en las células con pared celular secundaria.

La existencia de estos tres estados y del fenómeno de bandeo demuestra que la electrofisiología de las *Characeae* es sumamente compleja. Se me ocurre pensar que probablemente Osterhout o Cole nunca llegaron a imaginar lo asombroso que resultaría "el axón verde." Que jamás vislumbraron un sistema tan intrincado y maravilloso.

## ALGUNAS CONTRADICCIONES.

Hasta ahora he tratado de presentar un panorama global que resulte lo más coherente posible, sin embargo, el campo de las *Characeae* está lleno de lagunas y contradicciones, de incoherencias que se hacen evidentes cuando se ha revisado un buen número de artículos. Un año después de haber ingresado al laboratorio me quedó clara la existencia de algunas contradicciones, y fué una de ellas la que dió origen a esta tesis.

Se supone que el plasmalema de una célula internodal colocada en la obscuridad se encuentra en el estado K; sin embargo, en las gráficas de varios artículos es posible observar que en la obscuridad el  $E_m$  de *Chara corallina* permanece hiperpolarizado con respecto al  $E_K$  (81,103,104,105). El más claro de estos casos lo reportó Bisson en 1986 mientras estudiaba el estado H (figura 7). Esta investigadora no pasó por alto el fenómeno y señaló incluso la posibilidad de que la bomba permaneciera activa en la obscuridad, pero no hizo ningún esfuerzo posterior por demostrar esta suposición.

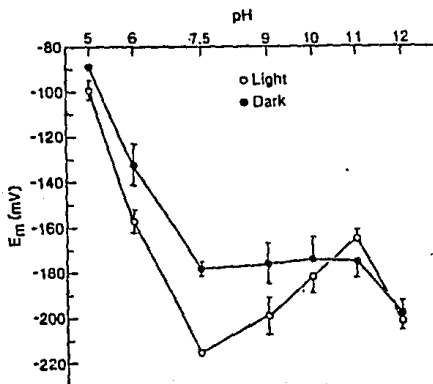


Fig. 7. El potencial de membrana de *Chara corallina* como una función del pH externo. El  $E_K$  es de -104 mV para estas condiciones. Figura tomada de la referencia 106.

El caso de *Nitella translucens* es aún más sorprendente. Ya señalé en una sección anterior que Spanswick demostró una hiperpolarización del  $E_m$  dependiente de luz que interpretó como la activación de la  $H^+$  ATPasa. Releyendo con cuidado el artículo original es posible darse cuenta de que Spanswick nunca afirmó que el  $E_m$  en la obscuridad sea por lo general semejante al  $E_K$ ; de hecho sus gráficas muestran todo lo contrario, es decir, un  $E_m$  distinto al  $E_K$  y dependiente del  $pH_e$  (figura 8). Sin embargo, a partir de entonces los

investigadores de otros grupos comenzaron a afirmar que el  $E_m$  en la obscuridad normalmente es similar al  $E_K$  y a continuación citan los dos artículos de Spanswick (44,45). Ni siquiera Bisson escapa a ello: "El plasmalema de *Nitella* se depolariza en la obscuridad del gran potencial negativo característico de la bomba electrogénica de protones a un potencial menos negativo característico de la permeabilidad pasiva al  $K^{+n}$  y a continuación cita los artículos de Spanswick (106).

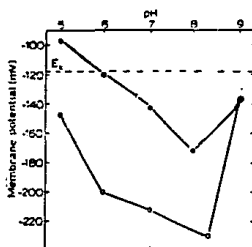


Fig. 8. El potencial de membrana de *Nitella translucens* como una función del pH externo bajo condiciones de iluminación y obscuridad. Figura tomada de la referencia 44.

No se cómo pudo llegar a mal interpretarse el trabajo de este investigador, pero se me ocurre una posibilidad. Spanswick escribió en el resumen de su artículo (44) "En una solución que contiene 0.5 mM de  $K^{+}$  a pH 6 el potencial de membrana en la obscuridad es cercano al potencial de equilibrio del  $K^{+}$ " (las negritas son mías) pero este dato corresponde a un solo punto de una de sus gráficas obtenida en una sola célula. En su siguiente artículo (45) señala en el resumen: "La Diciclohexilcarbodiimida (DCOD) produce una depolarización permanente al nivel de obscuridad y reduce la respuesta subsecuente del potencial a los cambios en el  $pH_e$ ," pero el nivel de obscuridad al que se refiere corresponde al  $E_m$  a pH 6 en presencia de 0.5 mM de  $K^{+}$  externo. ¿Quiere esto decir que la noción de que la obscuridad produce el estado K es el resultado de la lectura apresurada de un par de resúmenes? No lo sé, pero conviene remarcar que la hipótesis de la inactivación de la  $H^{+}ATPasa$  en la obscuridad concuerda muy bien con las dos principales alteraciones de los parámetros eléctricos inducidas por la obscuridad: una notoria depolarización y un gran incremento en la resistencia específica; de aquí que no resulte tan extraño el que esta hipótesis se difundiera ampliamente sin que se reparara demasiado en los efectos cuantitativos de la obscuridad. Los artículos subsecuentes al trabajo de Spanswick publicados por otros investigadores que trataban de demostrar la existencia de la bomba electrogénica generalmente reportan experimentos bajo condiciones de iluminación y aquellos grupos que también recurren a condiciones de obscuridad reportan cambios cualitativos más que cuantitativos, es decir, no reparan demasiado en el  $E_m$  de reposo en la obscuridad.

A pesar de todas estas consideraciones, durante el último año estuve temiendo que en cualquier momento alguien me dijera "estás entendiendo mal, hoy nadie cree eso"; pero en el X Congreso Internacional de Biofísica celebrado hace un par de meses converse con Laver y Tokarska y ya no me quedó ninguna duda: Al menos los australianos (Walker) y los polacos creen que en la oscuridad el plasmalema se encuentra en el estado K. ¿Porqué? Porque es *vox populi*; porque "Spanswick lo demostró."

Nos pareció entonces importante reproducir los datos de Spanswick probando el efecto de un inhibidor específico de la  $H^+ATPasa$  del plasmalema sobre la dependencia del  $E_m$  al  $pH_e$  y sobre la  $R_m$  en la oscuridad. El inhibidor de elección casi inmediata es el ortovanadato de sodio (consultar el capítulo de INTRODUCCIÓN), sin embargo al revisar el uso que se había hecho de este compuesto en la literatura surgió otra sorpresa. Una que nos asombró tanto como la anterior.

Desde que Kitasato postuló la existencia de una bomba electrogénica para protones en las *Characeae* se han publicado alrededor de 70 artículos en los que se utiliza algún inhibidor de las  $H^+ATPasas$ , en particular la DCCD y el DES, con la finalidad de obtener información sobre la contribución de esta enzima a las características eléctricas del plasmalema. Incluso los modelos cinéticos propuestos en 1984 por Beilby (62) y por el grupo de Kishimoto (63) para esta bomba se obtuvieron a partir de curvas I/V en presencia de DCCD. En la actualidad sabemos que ambos compuestos, además de afectar a los tres tipos de catión- $ATPasas$  conocidos (107), alteran notoriamente el flujo de potasio a través del plasmalema (65,103,108), por lo que resultan poco adecuados para tratar de obtener información electrofisiológica acerca de esta enzima. Lo que resulta asombroso es que solamente en uno de todos esos artículos se utilizó el vanadato. Y los resultados fueron sumamente extraños.

Shimmen y Tazawa publicaron en 1982 que 1 mM de ortovanadato de sodio añadido al medio externo no tiene ningún efecto sobre el  $E_m$  de las células internodales de *Nitellopsis obtusa*, pero que si una célula libre de tonoplasto se perfunde con un medio que contiene  $10\mu M$  de vanadato el  $E_m$  se depolariza hasta alcanzar el  $E_k$ ; la  $R_m$  se incrementa notablemente; y la acidificación del medio externo (el flujo de protones) desaparece (109). Ahora bien, lo extraño de este artículo es que las células recuperaron espontáneamente un valor hiperpolarizado del  $E_m$  y un valor de  $R_m$  similar al observado antes de añadir el vanadato. Una vez que las células presentaban esta recuperación no era posible depolarizarlas de nuevo o incrementar la resistencia de la membrana con vanadato fresco, ni siquiera en presencia de  $100\mu M$  de vanadato fresco añadido tanto al medio de perfusión como al medio externo (el cual también recupero un valor ácido). Este fenómeno ocurrió en 3 de 14 células estudiadas en un primer grupo de experimentos, pero en una segunda ronda de experimentos la recuperación se observó en el cien por ciento de las células usadas. Los autores especulan un poco sobre el fenómeno, pero terminan por señalar que esta recuperación "ocasional" se debe a razones desconocidas. En ningún artículo posterior se refirieron de nuevo a estos resultados, y tampoco volvieron a usar el vanadato para tratar de inhibir la  $H^+ATPasa$ .

Un efecto tan inesperado del vanadato nos llevó a revisar los resultados obtenidos en otras células vegetales cuando este compuesto se utiliza como un inhibidor de la  $H^+ATPasa$  *in vivo* (110,111). Lo que encontramos es que el vanadato tiene un efecto variable sobre el potencial de membrana que parece depender de la especie y el tejido, por ejemplo, el efecto puede ser prácticamente nulo en *Gossypium hirsutum* pero muy marcado en *Avena sativa* (Tabla III).

TABLA III

ESPECIE	[VANADATO] <sub>e</sub>	% DE INHIBICIÓN	REFERENCIA
<i>G. maz</i>	1 mM	≈ 80 %	112
<i>L. gibba</i>	1 mM	< 20 %	113
<i>T. aestivum</i>	1 mM	≈ 100 %	113
<i>N. tabacum</i>	1mM	≈ 10 %	113
<i>A. sativa</i>	1 mM	≈ 100 %	113
<i>G. hirsutum</i>	1 mM	< 10 %	113
<i>G. maz</i>	1mM	≈ 100 %	113

Tabla III. Efecto *in vivo* sobre varias especies vegetales del ortovanadato de sodio añadido al medio externo. El porcentaje de inhibición está calculado a partir de los valores del potencial de membrana; el 100 % de inhibición corresponde a un  $E_m$  con valores similares al  $E_k$ .

Esta variabilidad podría deberse a uno o más de los siguientes factores:

- El vanadato es incapaz de penetrar a algunas células, ya sea porque el plasmalema resulte impermeable a la forma monomérica o porque al  $pH_e$  y a las concentraciones usadas se encuentra polimerizado en forma de tri y teravanadato (112).
- Si el vanadato penetra a la célula utilizando un sistema de transporte para el fosfato, como se ha reportado en el caso del eritrocito y de *Neurospora crassa* (113), entonces su ingesta podría resultar limitada si las células presentan pozas elevadas de fosfato y/o por competencia del fosfato presente en el medio externo.
- El vanadato podría entrar a las células, pero ser metabolizado rápidamente a cationes vanadilo que no son capaces de inhibir a la bomba, como se ha reportado que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae* (112).
- El potencial de membrana podría permanecer hiperpolarizado debido a la presencia de una bomba redox insensible al vanadato en el plasmalema de las células vegetales, cuya existencia ha sugerido el grupo de Ivankina (114).

La búsqueda de un inhibidor específico nos mostró un nuevo problema que a primera aproximación parecía bastante complejo. Pero ahí estaba. Planteado. Y yo pensaba en una recomendación de Kuhn: "Al leer las obras de un pensador importante, busca primero las incoherencias aparentes del texto y luego pregúntate cómo es que pudo haberlas escrito una persona inteligente. Cuando tengas la respuesta... cuando esos pasajes hayan adquirido

sentido, encontrarás que los pasajes primordiales, esos que ya creías haber entendido, han cambiado de significado" (115).

## NOTAS Y BIBLIOGRAFIA

1.- Aunque me ha parecido adecuado utilizar la taxonomía propuesta por F. E. Round en 1971 (*The taxonomy of the chlorophyta. II. Br. Phycol. J. 6, 235.*), al lector interesado en el tema le conviene compararla con las desarrolladas por L. Margulis y K.V. Schwartz en 1982 (*Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth. W. H. Freeman and Co., New York.*) y por J.A. Raven en 1987 (*Biochemistry, biophysics and physiology of chlorophyll b-containing algae: implications for taxonomy and phylogeny. Progress in Phycolological Research 5, 1-121*).

2.- Hope, A.B., and Walker, N. A. 1975. *The Physiology of Giant Algal Cells.* Cambridge University Press, London.

3.- Excepción notable la constituye el libro de F. H. Harold *The Vital Force. A study of Bioenergetics.* W.H. Freeman. 1986.

4.- Osterhout, W. J. V., and Harris, E. S. 1928. Protoplasmic asymmetry in *Nitella* as shown by bioelectric measurements. *J. Gen. Physiol. 11, 391-402.*

5.- Sin embargo, resulta asombroso el aislamiento que existía entre estos grupos; por ejemplo, en los primeros años de la década de los treinta Umrath resumía el trabajo de Osterhout para la revista *Protoplasma* y hasta lo citaba en sus artículos; pero Osterhout no volvió a referirse al trabajo de Umrath a partir de 1931. ¿Consecuencias? Osterhout había encontrado que la diferencia de potencial entre el interior y el exterior de una célula internodal podía explicarse como la suma de dos potenciales generados uno a cada lado de la superficie protoplásmica. El denominó a estas superficies "X" y "Y" (el plasmalemma y el tonoplasto) y su grupo demostró que el potencial de reposo era esencialmente un potencial de difusión de potasio. Ahora bien, también reportó que algunas células tenían valores de potencial muy elevados y que no respondían a cambios en la concentración externa de potasio, pero explicó estos resultados con la hipótesis de que la superficie "X" se había vuelto insensible al potasio mientras que la "Y" conservaba su sensibilidad normal. Todo lo que necesitaba Osterhout para probar su hipótesis era insertar un microelectrodo en el citoplasma ("W"), que era lo que Umrath había estado haciendo desde 1930; sin embargo, Osterhout nunca reportó un experimento de este tipo.

6.- Blinks, L. R. 1949. The source of the bioelectric potentials in large plant cells. *Proc. Natn. Acad. Sci. 35, 566-571.*

7.- Wood, R. D. & Imahori, K. 1965. A revision of the *Characeae.* Verlag von J. Cramer, Weinheim.

8.- Young, J. Z. 1936. Structure of nerve fibers and synapses in some invertebrates. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 4, 1-21.

9.- El sombrío panorama es descrito formal y nítidamente para el caso de las cruces genéticas en: V. W. Proctor. 1976. *Genetics of Charophyta* en el libro *The Genetics of Algae* editado por Ralph A. Lewin. Botanical Monographs volume 12. University of California Press. pp 210-218.

10.- Moutschen, J. 1976. Is the Nuclear System of the Alga *Chara* Homologous to that of the Ciliates? *Naturwiss.* 8, 390.

11.- El investigador que más trabajó en ella es Jean Moutschen, un geneticista de la Universidad de Bélgica en Lieja. Aún cuando es posible rastrear su producción hasta 1956 -referencia 12- no es sino hasta los años setentas que contribuye notablemente a este campo al demostrar estrechas similitudes entre el dimorfismo nuclear de los ciliados y el de las charofitas y señalar que los macronúcleos de *Chara* pueden considerarse como productos de un antiquísimo, aunque eficiente, sistema de amplificación génica. Sin embargo, a partir de 1978 no publicó ya nada más con respecto a las *Characeae*. Intrigado por este súbito silencio le escribí una carta a principios de 1989 pidiéndole algunos sobretiros de sus trabajos más recientes y preguntándole qué había pasado con su línea de investigación. Contestación: "...desafortunadamente ya no utilizamos este material en nuestras investigaciones. Sin embargo, esperamos usarlo otra vez como un bioindicador de contaminación genotóxica en un futuro cercano..." Moutschen dejó la investigación básica por la aplicada. Hoy, ningún grupo estudia los sistemas nucleares de las charofitas.

12.- Moutschen, J., Dahmen, M. 1956. Sur les modifications de la spermiogénèse de *Chara vulgaris* L. induites par les rayons X. *Rev. Cytol. Biol. Végét.* XVII, 433-449.

13.- Franceschi, V. R., Lucas, W. J. 1980. Structure and possible function(s) of charosomes: complex plasmalemma-cell wall elaborations present in some characean species. *Protoplasma* 104, 253-271.

14.- Métraux, J-P. 1982. Changes in cell-wall polysaccharide composition of developing *Nitella* internodes. Analysis of walls of single cells. *Planta* 155, 459-466.

15.- Gillet, C., and Lefebvre, J. 1978. *J. Exp. Bot.* 29, 1155.

16.- En la literatura hay bastantes datos contradictorios que no permiten postular con confianza ningún modelo en particular. Tazawa, Shimmen y Mimura los han reunido en la referencia 21.

17.- Reid, R. J. and Smith, F. A. 1988. Measurements of the Cytoplasmic pH of *Chara corallina* using Double-barrelled pH Micro-electrodes. *J. Exp. Bot.* 39, 1421-1432.



18.- Walker, N. A. 1980. The transport systems of Charophyte & Chlorophyte giant algae and their integration into modes of behaviour. en *Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues* editado por R. M. Spanswick, W. J. Lucas y J. Dainty. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp. 287-300.

19.- En aquella época la polémica entre los vitalistas y los mecanicistas estaba en su apogeo; de ahí que se pusiera tanto interés en tratar de explicar un fenómeno como la circulación vegetal, ya en términos mecánicos, ya en términos vitales.

20.- Kamiya, N. 1981. Physical and Chemical basis of cytoplasmic streaming. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**, 205-236.

21.- Tazawa, M., Shimmen, T., and Mimura, T. 1987. Membrane control in the *Characeae*. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38**, 95-117.

22.- Jacobshagen, S. and Schnarrenberger, C. 1988. Two Class I Aldolases in the Green Alga *Chara foetida* (Charophyceae). *Plant Physiol.* **87**, 78-82.

23.- Gillet, C., Van Cutsem, P., and Voue, M. 1989. Correlation Between the Weight Loss Induced by Alkaline Ions and the Cationic Exchange Capacity of the Nitella Cell Wall. *J. Exp. Bot.* **40**, 129-133.

24.- Ding, D-Q., and Tazawa, M. 1989. Influence of Cytoplasmic Streaming and Turgor Pressure Gradient on the Transnodal Transport of Rubidium and Electrical Conductance in *Chara corallina*. *Plant Cell Physiol.* **30**, 739-748.

25.- Moriyasu, Y. and Tazawa, M. 1989. Degradation of Proteins Artificially Introduced into Vacuoles of *Chara australis*. *Plant Physiol.* **88**, 1092-1096.

26.- Williamson, R. E., and Ashley, C. C. 1982. Free  $Ca^{2+}$  and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature* **296**, 647-651.

27.- Bisson, M. A. and Bartholomew, D. 1984. Osmoregulation or Turgor Regulation in *Chara*? *Plant Physiol.* **74**, 252-255.

28.- Shimmen, T., and Nishikawa, S. 1988. Studies on the tonoplast Action Potential of *Nitella flexilis*. *J. Membrane Biol.* **101**, 133-140.

29.- Kikuyama, M. 1989. Effect of  $Ca^{2+}$  on Tonoplast Potential of Permeabilized *Characeae* cells. *Plant Cell Physiol.* **30**, 253-258.

30.- Tazawa, M. 1964. Studies on *Nitella* having artificial cell sap. I. Replacement of the cell sap with artificial solutions. *Plant Cell Physiol.* **5**, 33-43.

- 31.- Williamson, R. E. 1975. Cytoplasmic streaming in *Chara*: A cell model activated by ATP and inhibited by cytochalasin-B. *J. Cell. Sci.* **17**, 655-668.
- 32.- Shimmen, T., and Tazawa, M. 1983. Control of cytoplasmic streaming by ATP,  $Mg^{2+}$  and cytochalasin B in permeabilized *Characeae* cell. *Protoplasma* **115**, 18-24.
- 33.- Shepherd, V. A., and Goodwin, P. B. 1989. The Porosity of Permeabilised *Chara* Cells. *Aust. J. Plant Physiol.* **16**, 231-239.
- 34.- Sakano, K., and Tazawa, M. 1986. Tonoplast origin of the envelope membrane of cytoplasmic droplets prepared from *Chara* internodal cells. *Protoplasma* **131**, 247-249.
- 35.- Williamson, R. E. 1986. Organelle movements along actin filaments and microtubules. *Plant Physiol.* **82**, 631-634.
- 36.- Plonsey, R. and Barr, R. C. 1988. *Bioelectricity. A Quantitative Approach*. Plenum. New York.
- 37.- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500-544.
- 38.- Los investigadores de esta época esperaban una dependencia muy marcada a potasio por analogía con los datos obtenidos en otros tipos celulares como el axón de calamar; Dainty señala en la referencia 120: "Releyendo [mi trabajo] el día de hoy me impresiona la excesiva influencia que tuvo en mí el trabajo realizado por fisiólogos animales como Hodgkin y Katz; en realidad, pienso que inconcientemente yo consideraba a las células de las Charofitas como axones verdes de calamar."
- 39.- Como resultado de pasar por alto algunas condiciones experimentales que discuto un poco más adelante.
- 40.- Kitasato, H. 1968. The Influence of  $H^+$  on the Membrane Potential and Ion Fluxes of *Nitella*. *J. Physiol.* **52**, 60-87.
- 41.- Mitchell, P. 1968. *Chemiosmotic coupling and energy transduction*. Glynn Research Laboratories, Bodmin, Cornwall, England.
- 42.- Un corolario de este postulado es que el agua que difunde a través de las membranas biológicas no lo hace en forma iónica, por lo que el estudio de su contribución al  $\Delta pH$  y al  $\Delta pOH$  requiere de un análisis que se antoja bastante complicado.
- 43.- Aquí Spanswick, que es a quien estoy citando, se refiere a un artículo que no he podido conseguir: Smith, F.A. 1970. *New Phytol.* **69**, 903.

44.- Spanswick, R. M. 1972. Evidence for an electrogenic ion pump in *Nitella Translucens*. I. The effects of pH,  $K^+$ ,  $Na^+$ , light and temperature on the membrane potential and resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* **288**, 73-89.

45.- Spanswick, R. M. 1974. Evidence for an electrogenic ion pump in *Nitella Translucens*. II. Control of the light-stimulated component of the membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta.* **332**, 387-398.

46.- Richards, J.L., Hope, A.B. 1974. The role of protons in determining membrane electrical characteristics in *Chara corallina*. *J. Membrane Biol.* **16**, 121-144.

47.- Keifer, D. W., Spanswick, R. M. 1979. Correlation of adenosine triphosphate levels in *Chara corallina* with the activity of the electrogenic pump. *Plant Physiol.* **64**, 165-168.

48.- Smith, P. T., Walker, N. A. 1981. Studies on the perfused plasmalemma of *Chara corallina*: I. Current-Voltage curves: ATP and potassium dependence. *J. Membrane Biol.* **60**, 223-236.

49.- Kishimoto, U., Kami-ike, N., Takeuchi, Y. 1980. The role of electrogenic pump in *Chara corallina*. *J. Membrane Biol.* **55**, 149-156.

50.- El problema era el mismo: el potencial de membrana de la hifa se encontraba hiperpolarizado con respecto al potencial de difusión del potasio. Slayman observó que el potencial se depolarizaba poco tiempo después de haber inhibido la cadena respiratoria con cianuro, y por esto supuso que el donador inmediato de energía para la bomba que postulaba era el ATP. (Slayman, C.L. Electrical properties of *Neurospora crassa*. Respiration and the intracellular potential. *J. Gen. Physiol.* **49**, 93-116.)

51.- Como su nombre lo indica, una fuente de corriente constante mantiene constante el valor de la corriente que fluye a través de un circuito aún cuando se alteren otros parámetros del circuito como el potencial o la resistencia; por definición la fuente consigue este efecto sin contribuir a la resistencia total del circuito, es decir, la conductancia a través de la fuente es igual a cero. En realidad este tipo de fuentes son un concepto ideal, no existen en la práctica, pero es posible construir circuitos eléctricos o electrónicos que se comportan como una fuente de corriente constante en amplios rangos experimentales. El lector interesado en este punto puede consultar un libro de texto de electricidad o electrónica para ampliar esta información, por ejemplo, *Introduction to Electronics for Students of Physics and Engineering Science*. de D.M. Hunten. Holt, Rinehart and Winston, Inc. New York. 1964.

52.- Serrano, R. 1955. Plasma membrane ATPase of plants and fungi. CRC. Boca raton, Fl.

- 53.- Spanswick, R. M. 1980. Biophysical control of electrogenicity in the *Characeae* en *Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues* editado por R.M. Spanswick, W.J. Lucas and J. Danty. Elsevier, Amsterdam. pp 305-316.
- 54.- Scarborough, G.A. 1980. Proton translocation catalyzed by the electrogenic ATPase in the plasma membrane of *Neurospora*. *Biochemistry*. **19**, 2925-2931.
- 55.- Bowman, B. J., Blasco, F., and Slayman, C. W. 1981. Purification and characterization of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **256**, 12343- .
- 56.- Addison, R. 1986. Primary structure of the *Neurospora* plasma membrane  $H^+$ -ATPase deduced from the gene sequence. Homology to  $Na^+/K^+$ ,  $Ca^{++}$  and  $K^+$ -ATPases. *J. Biol. Chem.* **261**, 14896-14901.
- 57.- Coster, H.G.L., Zimmermann, U. 1975. The mechanism of electric breakdown in the membranes of *Valonia utricularis*. *J. Membrane Biol.* **22**, 73-90.
- 58.- Ohkawa, T., Tsutsui, I. 1988. Electrical Tolerance (Breakdown) of the *Chara corallina* Plasmalemma: I. Necessity of  $Ca^{2+}$ . *J. Membrane Biol.* **103**, 273-282.
- 59.- Trébacz, K., Fensom, D.S., Harris, A., Zawadzki, T. 1988. Transnodal Transport of  $^{14}C$  in *Nitella flexilis* III. Further studies on dissolved inorganic carbon movements in tandem cells. *J. Exp. Bot.* **39**, 1561-1573.
- 60.- Esta reticencia puede parecer exagerada si se piensa en la gran similitud que existe entre las ATPasas tipo P de organismos tan distintos como la Rata y *Neurospora*; pero creo que resulta justificable si pensamos, por ejemplo, en los canales iónicos.
- 61.- Lichtner, F. T., Lucas, W. J., Spanswick, R. M. 1981. Effect of sulfhydryl reagents on the biophysical properties of the plasmalemma of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* **68**, 899-904.
- 62.- Beilby, M. J. 1984. Current-Voltage characteristics of the proton pump at *Chara* plasmalemma: I. pH dependence. *J. Membrane Biol.* **81**, 113-125.
- 63.- Kishimoto, U., Kami-ike, N., Takeuchi, Y., Ohkawa, T. 1984. A kinetic analysis of the electrogenic pump of *Chara corallina*: I. Inhibition of the pump by DCCD. *J. Membrane Biol.* **80**, 175-183.
- 64.- Morse, M. J., Spanswick, R. 1985. ATP requirements for the electrogenic pump in perfused *Nitella* cells. *Biochim. Biophys. Acta* **818**, 386-390.
- 65.- Bisson, M. A. 1986. Inhibitors of proton pumping. Effect on passive proton transport. *Plant Physiol.* **81**, 55-59.

66.- Takeshige, K., Shimmen, T., Tazawa, M. 1986. Quantitative analysis of ATP-dependent  $H^+$  efflux and pump current driven by an electrogenic pump in *Nitellopsis obtusa*. *Plant Cell Physiol.* **27**, 337-348.

67.- Blatt, M. R., Beilby, M. J., Tester, M. 1990. Voltage dependence of the *Chara* proton pump revealed by current-voltage measurements during rapid metabolic blockade with cyanide. *J. Membrane Biol.* **114**, 205-223.

68.- Shimmen, T., MacRobbie, E.A.C. 1987. Characterization of two proton transport systems in the tonoplast of plasmalemma-permeabilized *Nitella* cells. *Plant Cell Physiol.* **28**, 1023-1031.

69.- Takeshige, K., Tazawa, M., Hager, A. 1988. Characterization of the  $H^+$  translocating adenosine triphosphatase and pyrophosphatase of vacuolar membranes isolated by means of a perfusion technique from *Chara corallina*. *Plant Physiol.* **86**, 1168-1173.

70.- Takeshige, K., Hager, A. 1988. Ion effects on the  $H^+$ -Translocating adenosine triphosphatase and pyrophosphatase associated with the tonoplast of *Chara corallina*. *Plant Cell Physiol.* **29**, 649-657.

71.- Ohkawa, T., Tsutsui, I., Kishimoto, U. 1986.  $K^+$  Channel in the *Chara* Plasmalemma: Estimations of  $K^+$  Channel Density and Single  $K^+$  Channel Conductance. *Plant Cell Physiol.* **27**, 1429-1438.

72.- Tester, M. 1988. Pharmacology of  $K^+$  Channels in the Plasmalemma of the Green Alga *Chara corallina*. *J. Membrane Biol.* **103**, 159-169.

73.- Tester, M. 1988. Blockade of Potassium Channels in the Plasmalemma of *Chara corallina* by Tetraethylammonium,  $Ba^{2+}$ ,  $Na^+$  and  $Cs^+$ . *J. Membrane Biol.* **105**, 77-85.

74.- Sokolik, A.I., Yurin, V.M. 1986. Potassium Channels in Plasmalemma of *Nitella* Cells at Rest. *J. Membrane Biol.* **89**, 9-22.

75.- Este grupo de la Unión Soviética es el único que ha conseguido realizar registros unitarios sobre el canal de potasio del plasmalema. Derer Laver, del grupo de Walker, me comentó durante un congreso reciente que ellos han intentado en múltiples ocasiones tomar este canal en *Chara corallina* con la pipeta del fijador por secciones, pero que no han tenido éxito ni una sola vez. La razón de estos fracasos no es nada clara. Creo que conviene añadir a esta nota que Berestovskii reporta la conductancia utilizando una unidad que abrevia como Cm y que no define, pero que parece corresponder a la unidad Siemen.

76.- Berestovskii, G. N., Azimov, R. R. 1988. Multilevel conductance of a single  $K^+$  channel of *Nitellopsis obtusa* cells. *Biofizika* **33**, 153-155.

- 77.- McCulloch, S.R., Beilby, M.J., Walker, N.A. 1990. Transport of Potassium in *Chara australis*: II. Kinetics of a Symport with Sodium. *J. Membrane Biol.* **115**, 129-143.
- 78.- Shiina, T., Tazawa, M. 1988.  $Ca^{2+}$ -Dependent  $Cl^-$  Efflux in Tonoplast-Free Cells of *Nitellopsis obtusa*. *J. Membrane Biol.* **106**, 135-139.
- 79.- Berestovskii, G. N., Zherelova, O. M., Katayev, A. A. 1987. Ionic channels in *Characeae* algal cells. *Biofizika* **32**, 1011-1027.
- 80.- Coleman, H. A. Chloride Currents in *Chara*- A Patch-Clamp Study. 1986. *J. Membrane Biol.* **93**, 55-61.
- 81.- Reid, R. J., Walker, N. A. 1984. The Energetics of  $Cl^-$  Active Transport in *Chara*. *J. Membrane Biol.* **78**, 35-41.
- 82.- Shiina, T., Tazawa, M. 1987. Demonstration and Characterization of  $Ca^{2+}$  Channel in Tonoplast-Free Cells of *Nitellopsis obtusa*. *J. Membrane Biol.* **96**, 263-276.
- 83.- Shiina, T., Wayne, R., Lim Tung, H. Y., Tazawa, M. 1988. Possible Involvement of Protein Phosphorylation/Dephosphorylation in the Modulation of  $Ca^{2+}$  Channel in Tonoplast-Free Cells of *Nitellopsis*. *J. Membrane Biol.* **102**, 255-264.
- 84.- Bissou, M.A., Walker, N.A. 1980. The *Chara* plasmalemma at high pH. Electrical measurements show rapid specific passive uniport of  $H^+$  or  $OH^-$ . *J. Membrane Biol.* **56**, 1-7.
- 85.- Fairley, K. A., Walker, N. A. 1987. Amine Ion Porter in *Chara australis*: Effects of Alkyl Substitution and External pH. *J. Membrane Biol.* **98**, 191-196.
- 86.- Es importante señalar que los valores de este coeficiente reportados por el grupo de Walker para *Chara* en la referencia 87 son muy diferentes a los reportados por Collander para *Nitella* en su famoso artículo de 1954 "The permeability of *Nitella* cells to nonelectrolytes" (*Physiologia Pl.* **7**, 420). ¿Que tan parecidas son en realidad las membranas de estos dos géneros?
- 87.- Wilson, M. R., Walker, N. A. 1988. The Transport and Metabolism of Urea in *Chara australis*. I. Passive diffusion, specific transport and metabolism of urea, thiourea and methylurea. *J. Exp. Bot.* **39**, 739-751.
- 88.- Wilson, M.R., O'Donohue, S.I., Walker, N.A. 1988. The transport and metabolism of urea in *Chara australis*. III. Two specific transport systems. *J. Exp. Bot.* **39**, 763-774.

89.- Laver, D.R., Fairley, K.A., Walker, N.A. 1989. Ion Permeation in a  $K^+$  Channel in *Chara australis*: Direct Evidence for Diffusion Limitation of Ion Flow in a Maxi-K Channel. *J. Membrane Biol.* **108**, 153-164.

90.- Bertl, A. 1989. Current-Voltage Relationships of a Sodium-Sensitive Potassium Channel in the Tonoplast of *Chara corallina*. *J. Membrane Biol.* **109**, 9-19.

91.- Tyerman, S.D., Findlay, G.P. 1989. Current-Voltage Curves of Single  $Cl^-$  Channels which Coexist with Two Types of  $K^+$  Channel in the Tonoplast of *Chara corallina*. *J. Exp. Bot.* **40**, 105-117.

92.- Katsuhara, M., Mimura, T., Tazawa, M. 1989. Patch-Clamp Study on a  $Ca^{2+}$ -Regulated  $K^+$  Channel in the Tonoplast of the Brackish Characeae *Lamprothamnium succinctum*. *Plant Cell Physiol.* **30**, 549-555.

93.- Kikuyama, M. 1988.  $Ca^+$  Increases the  $Cl^-$  Efflux of the Permeabilized *Chara*. *Plant Cell Physiol.* **29**, 105-108.

94.- Raven, J.A. 1988. Algae. en *Solute Transport in Plant Cells and Tissues*. D.A. Baker y J.L. Hall edits. Longman Scientific & Technical, New York, pp 166-219.

95.- Bisson, M.A. 1984. Calcium effects on electrogenic pump and passive permeability of the plasma membrane of *Chara corallina*. *J. Membrane Biol.* **84**, 59-67.

96.- Beilby, M.J. 1986. Potassium channels and different states of *Chara* plasmalemma. *J. Membrane Biol.* **89**, 241-249.

97.- Hoffmann, R., Bisson, M.A. 1987. *Chara buckellii*, a caryhaline charophyte from an unusual saline environment. II. Membrane potential and membrane conductance at steady state. *Can. J. Bot.* **65**, 222-229.

98.- Conviene resaltar que un solo estado electrofisiológico puede incluir varios estados bioquímicos distintos, por ejemplo, si se utiliza la obscuridad para alcanzar el estado K la  $G_m$  resulta ser del orden de  $0.5 S/m^2$ , pero continúa considerándose un estado K porque el  $E_m$  es cercano al  $E_k$ .

99.- Lucas, W.J., Smith, F.A. 1973. The formation of acid and alkaline regions at the surface of *Chara corallina* cells. *J. Exp. Bot.* **24**, 1-14.

100.- Smith, J.R., Walker, N.A. 1985. Effects of pH and light on the membrane conductance measured in the acid and basic zones of *Chara*. *J. Membrane Biol.* **83**, 193-205.

101.- Toko, K., Fujiyoshi, T., Ogata, K., Chosa, H., Yamafuji, K. 1987. Theory of electric dissipative structure in Characean internode. *Biophys. Chem.* **27**, 149-172.

- 102.- Toko, K., Hayashi, K., Yoshida, T., Fujiyoshi, T., Yamafuji, K. 1988. Oscillations of electric spatial patterns emerging from the homogeneous state in characean cells. *Eur. Biophys. J.* **16**, 11-21.
- 103.- Keifer, D.W., Spanswick, R.M. 1978. Activity of the electrogenic pump in *Chara corallina* as inferred from measurements of the membrane potential, conductance, and potassium permeability. *Plant Physiol* **62**, 653-661.
- 104.- Lucas, W.J. 1982. Mechanism of acquisition of exogenous bicarbonate by inter-nodal cells of *Chara corallina*. *Planta* **x** 181-192.
- 105.- Reid, R., Walker, N.A. 1984. Control of  $Cl^-$  influx in *Chara* by internal pH. *J. Membrane Biol.* **78**, 157-162.
- 106.- Bisson, M.A. 1986. The Effect of Darkness on Active and Passive Transport in *Chara corallina*. *J. exp. Bot.* **37**, 8-21.
- 107.- Pedersen, P.L., Carafoli, E. 1987. Ion motive ATPases I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends in Biochim. Sci.* **12**, 146-150.
- 108.- Smith, J.R., Walker, N.A., Smith, F.A. 1987. Potassium transport across the membranes of *Chara* III. Effects of pH, inhibitors and illumination. *J. Exp. Bot.* **38**, 778-787.
- 109.- Shimmen, T., Tazawa, M. 1982. Effects of intracellular vanadate on electrogenesis, excitability and cytoplasmic streaming in *Nitellopsis obtusa*. *Plant Cell Physiol.* **23**, 669-677.
- 110.- Lew, R.R., Spanswick, R.M. 1984. Characterization of the electrogenicity of soybean (*Glycine max* L.) roots. ATP dependence and effect of ATPase inhibitors. *Plant Physiol.* **75**, 1-6.
- 111.- Ullrich-Eberius, C.I., Sanz, A., Novacky, A.J. 1989. Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. *J. Exp. Bot.* **40**, 119-128.
- 112.- Willsky, G.R., White, D.A., McCabe, B.D. 1984. Metabolism of added orthovanadate to vanadyl and high-molecular-weight vanadates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **259**, 13273-13281.
- 113.- Bowman, B.J. 1983. Vanadate uptake in *Neurospora crassa* occurs via phosphate transport system II. *J. Bacteriol.* **153**, 286-291.
- 114.- Ivankina, N.G., Novak, V.A., Miclashevich A. I. 1984. Redox reactions and active  $H^+$ -transport in the plasmalemma of *Elodea* leaf cells. en el libro *Membrane Transport in*



Plants. W.J. Cram, K. Janacek, R. Rybova, S. Sigler, edits. John Wiley & sons, London. pp. 404-405.

115.- Kuhn, T.S. 1977. *The Essential Tension. Selected Studies in Scientific Tradition and Change.* University of Chicago Press, Chicago.

116.- Ortega Blake, I. 1978. *A Biophysical Study of The Plant Cell Membrane* Ph.D. Thesis. University of Edinburgh, Faculty of Science.

117.- Plonsey, R. 1969. *Bioelectric Phenomena.* McGraw-Hill, Inc. New York.

118.- Fisahn, J. Lucas, W.J. 1990. Application of asymmetric alternating voltage pulse series for investigation of the action potential in *Chara*. *Plant Cell Physiol.* 31, 155-157.

119.- Hedrich, R., Schroeder, J.I. 1989. The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 40, 539-569.

120.- Dainty, J. 1990. Prefatory Chapter. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 1-21.

121.- Bisson, M.A., Bartholomew, D. 1984. Osmoregulation or turgor regulation in *Chara*? *Plant Physiol.* 74, 252-255.

## OBJETIVOS.

El propósito de esta tesis consiste en estudiar el efecto del  $Na_2VO_4$  sobre las características eléctricas del plasmalema y el tonoplasto de las células internodales de *Nitella translucens* bajo condiciones de iluminación y oscuridad con la intención de determinar la contribución de la bomba electrogénica al estado P y al estado K inducido por oscuridad.

La obtención de estos datos experimentales requirió del diseño y la construcción de varios amplificadores y de un fijador de voltaje; por lo que un objetivo adicional del trabajo de tesis fué llevar a cabo esta instrumentación.

"Insistiremos sobre el hecho de que [el hombre] no puede pre-  
valerse de un espíritu científico mientras no esté seguro, en cada  
momento de la vida mental, de reconstruir todo su saber. Sólo los  
ajes racionales permitan tal reconstrucción. El resto es baja mne-  
motécnia. La paciencia de la erudición nada tiene que ver con la  
paciencia científica."

Gaston Bachelard.

*La Formación del espíritu Científico.*

## MATERIAL Y MÉTODOS.

### CULTIVO DEL ORGANISMO.

Los grupos de investigación extranjeros suelen recolectar las *Characeae* directamente de su hábitat natural y las utilizan después de un breve periodo de aclimatación dentro del laboratorio. La razón de esta conducta es que resulta muy difícil mantener un cultivo estable bajo condiciones controladas, pues normalmente las Charofitas no se reproducen en esas condiciones. Aunque algunos autores han tratado de obtener medios de cultivo eficaces, hasta la fecha no ha sido posible conseguirlos, excepto para las especies *Chara globularis* y *Chara zeylanica* (1,2). En nuestro caso las plantas completas de *Nitella translucens* fueron obtenidas originalmente de un estanque en Escocia, transportadas a México y colocadas a la intemperie en una cisterna de concreto localizada en un bosque de pino-encino en el que predomina un clima C(W<sub>2</sub>)(W)big (3). Periódicamente se recolectaron organismos completos y se colocaron en un acuario dentro del laboratorio en presencia de varias especies de peces. Aunque se ensayaron diversas condiciones ambientales no fué posible obtener una tasa de reproducción apreciable dentro de esta pecera. Los organismos destinados a experimentación se colocaron, al menos tres meses antes de utilizar sus células internodales, en pequeñas cajas de acrílico transparente que contenían solución Barr-Boyer modificada por Hope (2): 0.5 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM de NaCl, 0.2 mM de NaNO<sub>3</sub>, 0.017 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 mM de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 3.6 μ M de FeSO<sub>4</sub>, 0.91 μ M de MnSO<sub>4</sub>, 0.76 μ M de ZnSO<sub>4</sub>, y 0.014 μ M de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.

Los cultivos fueron iluminados con luz artificial utilizando un ciclo de 8h:16h luz:oscuridad, con una irradiancia luminosa determinada en la superficie de la solución de 2.6 W/m<sup>2</sup>. La temperatura de la solución varió entre los 21 y 24 °C y el pH se mantuvo alrededor de 5.5 a lo largo del año. Conviene extenderse un poco en este último punto. Difícilmente se encuentra especificado el pH de la solución de cultivo en los artículos originales de los diversos grupos de investigación. Esto podría parecer trivial, sin embargo Bisson y Walker encontraron en 1982 que el pH de la solución en la que se aclimata una célula internodal de *Chara corallina* afecta notoriamente la respuesta del E<sub>m</sub> y la G<sub>m</sub> al pH<sub>c</sub> (figura 1 y 2). Se antoja preguntar si algunas de las contradicciones que existen en la literatura no son sino una consecuencia del pH al cual cultivan las *Characeae* distintos

investigadores. Sin embargo no es fácil responder a esta pregunta precisamente porque casi nadie indica los valores de pH a los que mantuvo sus cultivos.

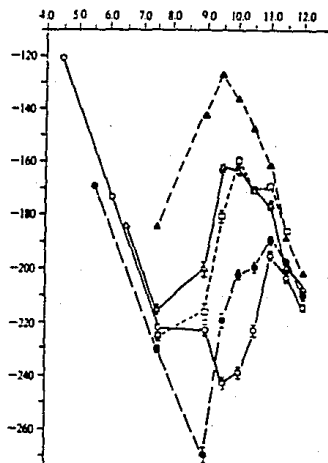


Fig. 1. El potencial de membrana como una función del pH externo para células aclimatadas a  $\circ$  pH 4.5,  $\bullet$  pH 5.5,  $\square$  pH 6.0,  $\triangle$  pH 6.5, y  $\blacktriangle$  pH 7.5. Gráfica tomada de la referencia 4.

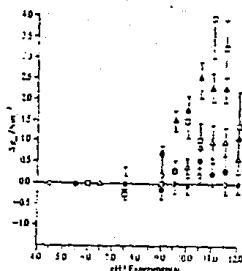


Fig. 2. La conductancia de membrana como una función del pH externo para células aclimatadas a  $\circ$  pH 4.5,  $\bullet$  pH 5.5,  $\square$  pH 6.0,  $\triangle$  pH 6.5, y  $\blacktriangle$  pH 7.5. Figura tomada de la referencia 4.

## INSTRUMENTACION.

La obtención de los registros electrofisiológicos que nos interesaban requería el uso de varios amplificadores de corriente directa y de un fijador de voltaje. Estos instrumentos se obtienen comercialmente, pero su diseño y construcción puede realizarse utilizando componentes muy baratos y bastante precisos que generalmente están disponibles en la mayoría de los comercios especializados en electrónica. Este fue uno de los motivos por el que decidimos construir nuestro propio equipo. Otro de ellos, el más importante desde mi punto de vista, fue el valor formativo intrínseco a esta construcción; la investigación electrofisiológica requiere de conocimientos sobre electricidad que no adquirí durante mi educación biológica, y la construcción de circuitos electrónicos es una forma bastante eficiente de familiarizarse con algunos de estos conocimientos. Además, el comprender de qué manera funciona el instrumento que estamos utilizando resulta muy valioso en la actividad científica; es otra cara de la idea generalizada de que la mejor forma de entender un problema es viviéndolo.

**Amplificadores.**- La construcción de un amplificador de corriente directa puede realizarse muy fácilmente en la actualidad gracias al desarrollo de la teoría y la tecnología de estado sólido. El componente fundamental de este instrumento es el amplificador operacional (figura 3), un microcircuito semiconductor denominado así porque fue diseñado originalmente para realizar operaciones matemáticas en las computadoras analógicas de los años 40. Las características centrales de estos microcircuitos son que la razón voltaje de entrada ( $V_e$ )/voltaje de salida ( $V_s$ ) generalmente es de  $5 \times 10^4$  y que poseen una impedancia de entrada ( $Z_e$ ) de por lo menos  $4 \times 10^5 \Omega$ . Por medio de la adición de resistencias externas colocadas en diferentes configuraciones es posible obtener una amplia variedad de respuestas, la mayor parte de las cuales resultan de mucha utilidad en la captura y amplificación de las señales bioeléctricas.

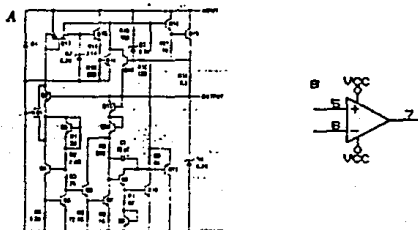


Fig. 3. Un amplificador operacional (TL084CN). a) Diagrama del circuito electrónico. b) Representación convencional. El símbolo - señala la entrada inversora y el + la entrada no inversora.

La configuración típica de los amplificadores diferenciales que construimos se muestra en la figura 4. Como puede observarse este instrumento no consiste más que en un operacional al que se le han añadido 4 resistencias cuyos valores determinarán la razón  $V_s/V_e$ , conocida como ganancia del amplificador, de acuerdo a la ecuación

$$V_s = \frac{R_2}{R_1}(V_2 - V_1) \quad (1)$$

que muestra que este arreglo entrega un valor de voltaje de salida que es igual a la diferencia de los voltajes de entrada multiplicado por el factor  $R_1/R_2$ . En general las cuatro resistencias de la figura 4 pueden tener valores distintos, pero entonces el análisis matemático del microcircuito, que se realiza a partir de las leyes de Kirchhoff, se vuelve más complejo (6). Los amplificadores diferenciales que construimos cuentan con una ganancia variable de 1 a 10, la que obtuvimos utilizando potenciómetros en lugar de resistencias fijas.

Ahora bien, para realizar un registro intracelular es necesario, antes de amplificar la señal, obtenerla por medio de una sonda de alta impedancia que se conoce como seguidor de voltaje (Figura 5a). Esta configuración, que utiliza la entrada no inversora y que posee una retroalimentación con resistencia cero a la entrada inversora, presenta una impedancia de entrada de aproximadamente  $100M\Omega$ , una ganancia unitaria y una impedancia de salida de  $150\Omega$ . Esta gran  $Z_e$  es fundamental para evitar que exista un flujo de corriente importante desde el lugar donde se realiza la medida al interior del circuito, pues si este fuera el caso los datos registrados con el instrumento de medida en realidad serían artificios experimentales. Al conjunto de dos seguidores de voltaje y dos amplificadores diferenciales es a lo que los

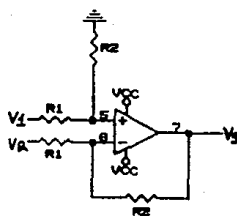


Fig. 4. Configuración típica de un amplificador diferencial.  $V_1$  y  $V_2$  corresponden a los potenciales de alimentación.

fabricantes denominan "un amplificador" para determinaciones electrofisiológicas. Resulta conveniente señalar que un amplificador construido en nuestro laboratorio tuvo un costo final de aproximadamente 5 dólares, mientras que un amplificador comercial se cotiza entre los 800 y los 1500 dólares. En realidad fue posible construir estos instrumentos a un precio tan bajo porque no se precisan circuitos integrados muy finos para monitorear los potenciales de reposo o para fijar el  $E_m$ , es decir, no es necesario conseguir componentes capaces de monitorear corrientes de picoamperes o de responder en picosegundos, pero debo señalar que los componentes electrónicos que utilizan las compañías extranjeras para construir los amplificadores en general son de muy buena calidad.

**Fijador de voltaje.**- Este instrumento ha sido la herramienta clave para determinar las características electrofisiológicas de las biomembranas. Cole lo desarrolló a partir de un seminario en el que el ponente hablaba de este principio aplicado a circuitos electrónicos y la idea central es simple: cuando se aplica un estímulo que altera el  $E_m$ , la corriente a través de la membrana esta dada por

$$I_m = C_m \frac{dE_m}{dt} + \frac{E_m}{R_m} \quad (2)$$

donde  $C_m$  es la capacitancia de la membrana y el factor  $E_m/R_m$  es igual a la corriente a través de la membrana debida a los flujos iónicos ( $I_i$ ), por lo tanto, si se consigue hacer  $\delta E_m/\delta t = 0$ , entonces  $I_m = I_i$ . Este instrumento permite además obtener registros en una variada gama de condiciones eliminando la variabilidad ocasionada por la existencia de canales sensibles a voltaje.

El fijador que construimos (APÉNDICE I) consta de los siguientes elementos:

a) Un primer paso para obtener la señal constituido por dos seguidores de voltaje TL084 y un amplificador diferencial TL084 con ganancia unitaria (En el APÉNDICE I corresponden a los componentes U1B, U2C, U3A).

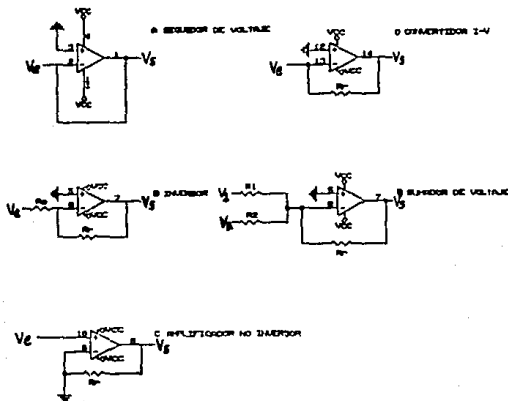


Fig. 5. Configuraciones típicas utilizadas en la construcción de los Amplificadores y del Fijador de Voltaje.  $R_r$ , resistencia de retroalimentación;  $V_e$ , voltaje de entrada;  $V_s$ , voltaje de salida.

b) Un paso de nivelación de la señal por medio de un seguidor de voltaje TL081 que posee una entrada de voltaje adicional para compensar el valor del potencial (U4).

c) Un paso de amplificación para observar el registro en el osciloscopio y la graficadora constituido por un amplificador inversor TL082 con ganancia 10 (U5A).

d) Un paso de amplificación variable por medio de un amplificador inversor TL082 (U6B) para garantizar una amplificación unitaria.

e) Un nodo construido con un sumador de voltaje TL084 para establecer el valor del voltaje fijo e insertar a voluntad pulsos provenientes de un generador de funciones (U7C).

Además añadimos un par de pasos para determinar el valor de la  $I_m$ :

f) Un convertidor Corriente-Voltaje TL084 (USB) y

g) Un sumador de voltaje TL084 con ganancia variable para observar la corriente en el osciloscopio y la graficadora (U9A).

El arreglo en forma de retroalimentación negativa permite que un desplazamiento en el potencial de membrana sea corregido en unos cuantos nanosegundos por medio del control del flujo de corriente entre el electrodo 1 (APÉNDICE I), un alambre de plata clorurado,



y el electrodo 2, un electrodo cilíndrico de AgCl colocado en el medio extracelular; tan pronto se presenta una pequeña variación en el  $E_m$ , el operacional U7C inyecta a través del electrodo 2 la corriente necesaria para reasumir el  $E_r$ . Durante el tiempo en el que se mantiene fijo el  $E_m$  todos los procesos de la membrana dependientes de voltaje pueden considerarse constantes.

### CONDICIONES DE ILUMINACION.

En el capítulo anterior mencioné que antes de que Spanswick pusiera de manifiesto la importancia de las condiciones de iluminación durante un experimento, eran muchos los grupos que omitían señalarlas. En la actualidad prácticamente todos los investigadores reportan estas condiciones, pero la forma de hacerlo es demasiado heterogénea: algunos especifican la intensidad luminosa (candelas), otros la luminancia (candelas/m<sup>2</sup>), algunos el flujo luminoso (lumens), o la iluminancia (luxes), algunos pocos señalan la irradiancia (Watts/m<sup>2</sup> o  $\mu$ Einsteins/m<sup>2</sup>s). Esta mezcla de cantidades radiométricas y fotométricas ocasiona que sea difícil evaluar la similitud de dos condiciones experimentales; además, excepto el grupo de Hansen, en la actualidad casi ningún investigador tiene el cuidado de señalar la(s) longitud(es) de onda que utilizan o el espectro de emisión de su fuente luminosa.

En nuestros experimentos preferimos utilizar un punto de vista energético y no uno relacionado con la sensación visual humana. La fuente luminosa en todos ellos consistió en un foco incandescente de 9 volts; a partir de las determinaciones de corriente y voltaje calculamos la potencia del foco y a partir de esta calculamos la temperatura del filamento por medio de la relación

$$H = A\sigma T^4 \quad (3)$$

en la que H es la potencia, A el área del filamento,  $\sigma$  la emisividad del filamento,  $\sigma$  la constante de Stefan-Boltzmann y T la temperatura absoluta (6). Considerando que un filamento incandescente emite como cuerpo negro calculamos su espectro de emisión a partir de la ecuación

$$W_\lambda \delta\lambda = \frac{8\pi hc}{\lambda^5 (e^{hc/\lambda kT} - 1)} \delta\lambda \quad (4)$$

que es la solución de Planck para la radiación de cuerpo negro y en la que  $E_\lambda$  es la irradiancia espectral a la longitud de onda  $\lambda$ , h es la constante de Planck, c la velocidad de la luz en el vacío, k la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. Para realizar la integración numérica de esta ecuación diseñamos un programa de computación en lenguaje Pascal que se muestra en el APÉNDICE II.

Por medio de estos métodos determinamos que la irradiancia durante los experimentos fué de 10 W/m<sup>2</sup> con un máximo de emisión en los 992 nm y con el espectro de emisión que se muestra en la figura 6.

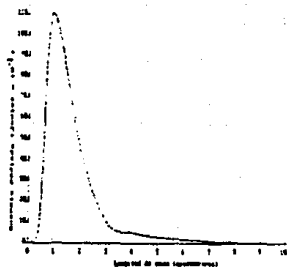


Fig. 6. Espectro de emisión de la fuente luminosa utilizada en los experimentos.

### SOLUCIONES.

Las soluciones experimentales se prepararon utilizando agua destilada (Theissier). En todos los experimentos se utilizó agua artificial de estanque (AAE) que contiene  $KCl$  0.1 mM,  $CaCl_2$  0.5 mM y  $NaCl$  1 mM (Merck). Todos los amortiguadores utilizados fueron amortiguadores tipo Good (Sigma): las soluciones AAE pH 5 y AAE pH 6 se amortiguaron con 1mM de MES, la AAE pH 7 con 1mM de HEPES, la AAE pH 8 con 1mM de TAPS, la AAE pH 9 con 1mM de CHES y la solución AAE pH 10 con 1mM de CAPS. Las soluciones que incluyen vanadato se prepararon añadiendo 1mM de  $Na_3VO_4$  marca Sigma. El pH final de las AAE se ajustó con NaOH. Aunque el ortovanadato de sodio y la sosa incrementaron la concentración final de Na a entre 4 o 5 mM final, esta variación no tiene un efecto significativo sobre las propiedades eléctricas de las membranas de *Nitella translucens* (7). Todas las soluciones se prepararon inmediatamente antes de realizar las determinaciones para evitar la acumulación de  $CO_2$ .

### DETERMINACIONES ELECTROFISIOLÓGICAS.

Las células seleccionadas para los experimentos fueron células internodales jóvenes (segundo o tercer internodo) sin calcificaciones visibles con una longitud de entre 5 a 6 cm y un diámetro de entre 0.8 a 1 mm. Las células internodales se cortaron del organismo y se mantuvieron en AAE pH 5 por lo menos 8 horas antes del experimento (generalmente toda la noche anterior). Antes de iniciar los registros la célula se secó y se aisló eléctricamente en dos secciones (ver APÉNDICE I) dentro de una cámara de acrílico de tres compartimentos recubriendo con vaselina la superficie celular y la sección correspondiente de la cámara. A lo largo de todos los experimentos las soluciones experimentales fueron perfundidas a una velocidad de 1 ml/min por medio de una bomba peristáltica (Masterflex) utilizando tubos marca tygon. Los experimentos se realizaron en el interior de una doble caja de Faraday para reducir la interferencia por radiación electromagnética.

Para realizar los registros intracelulares se utilizaron electrodos de vidrio capilar (WPI) llenos con una solución de KCl 3 M y en el caso del electrodo de referencia (otro capilar colocado en el medio externo) se añadió agar al 2 % a la solución de KCl (8). Los electrodos presentaron resistencias de entre 1.5 a 3 M $\Omega$ . Las determinaciones electrofisiológicas se realizaron tomando en cuenta las ecuaciones de cable de la célula internodal que se obtienen al aplicar las leyes de Kirchhoff al modelo de cable conductor descrito en el capítulo de INTRODUCCIÓN. En resumen: el modelo supone un carácter lineal de la resistencia de las soluciones intracelular ( $r_i$ ) y extracelular ( $r_e$ ), y es posible demostrar (9) que la variación del potencial con respecto a la distancia obedece la ecuación

$$\frac{d^2 E_m}{dx^2} = (r_i + r_e) i_m \quad (5)$$

donde  $r_i$  es la resistencia axial interna por unidad de longitud,  $r_e$  es la resistencia axial de la solución externa por unidad de longitud e  $i_m$  es la corriente a través de una sección de la membrana. Si ahora consideramos la aplicación de un pulso de corriente directa y sustituimos la ecuación 2 en la ecuación 5 obtendremos la ecuación general de cable

$$\lambda^2 \frac{d^2 E_m}{dx^2} = \frac{\tau dE_m}{dt} + E_m \quad (6)$$

donde

$$\lambda = \left( \frac{r_m}{r_i + r_e} \right)^{1/2}, \tau = r_m C_m.$$

$\lambda$  se denomina la constante espacial y es una medida de la atenuación de la corriente que difunde a lo largo del cable, mientras que  $\tau$  se denomina constante temporal y determina el tiempo necesario para que la respuesta transitoria provocada por un pulso de corriente alcance un valor cercano al valor de equilibrio (aproximadamente 2/3 de este valor, aunque el valor de la fracción depende de la distancia entre el punto de estímulo y el punto de medida). Esta ecuación se aplica a cables lineales en los cuales las resistencias y la capacitancia resultan ser independientes de  $V$ ,  $x$  and  $t$ , sin embargo la resistencia de las membranas biológicas generalmente es dependiente de estos parámetros, por lo que resulta

necesario incluir estas dependencias dentro de la ecuación general de cable. Una revisión bastante detallada para estos casos se encuentra en la referencia 10.

En *Nitella translucens* se han desarrollado soluciones independientes del tiempo para la aplicación de un pulso de corriente directa y alterna (11), una dependiente del tiempo para pulsos de CD (12) y una dependiente del tiempo para pulsos de CA independiente de la longitud del cable (13). En el caso de la inyección de un pulso de corriente directa ( $I_0$ ) un análisis cuantitativo detallado mostró que si la corriente se inyecta en el centro de una célula de longitud  $2l$ , entonces el  $E_x$  (el  $E_m$  a cualquier distancia  $x$  determinada a partir del punto de inyección de corriente) está descrito por la ecuación

$$\frac{E_x}{I_0} 2\pi dl = \frac{r_m 2\pi dl}{2\lambda} \cosh(L - X) / \sinh(L) \quad (7)$$

donde  $L = l/\lambda$  y  $X = x/\lambda$ . Sin embargo, en la práctica los cálculos numéricos necesarios para determinar parámetros como la  $R_m$  resultan muy tediosos, por lo que los investigadores han tratado de minimizar el comportamiento de cable utilizando diversos arreglos experimentales como el aislar un segmento muy corto de célula. Un método particularmente útil es el desarrollado por Hogg, Williams y Johnston (14); estos autores reescribieron la ecuación 7 en la forma

$$R'_m = R_m [L \cosh(L - X) / \sinh(L)] \quad (8)$$

donde la  $R'_m$  es la resistencia de membrana sin corregir por la constante espacial. Ecuación puede escribirse también como  $R_m = R'_m / \kappa$  donde  $\kappa$  es igual al factor de corrección  $[L \cosh(L - X) / \sinh(L)]$ ; ahora bien, se ha demostrado que si el electrodo de registro se coloca a una distancia  $X = 0.42L$  del centro de la célula el factor  $\kappa$  es igual a la unidad y resulta bastante insensible a la constante espacial en un rango de  $X$  cercanas a  $0.42L$  tanto para pulsos de corriente directa (14) como para los de corriente alterna (13), lo que da por resultado un arreglo experimental práctico con el cual es posible determinar la resistencia de membrana sin necesidad de calcular los factores de corrección.

En todos nuestros experimentos el o los electrodos de registro (ver a continuación) se insertaron en los puntos  $0.42l$  y la  $R_m$  se determinó aplicando una corriente de  $0.15\mu A$  entre el electrodo externo  $E_2$  localizado en los compartimentos laterales (APÉNDICE I) y el electrodo externo  $E_1$  localizado en el compartimento central. El valor del cambio en el  $E_m$  inducido por el pulso de corriente directa y el valor de la corriente se utilizaron para calcular la resistencia de membrana por medio de la ley de Ohm y el valor obtenido se multiplicó por el área celular para obtener la resistencia específica  $R_m$ . En algunos experimentos la corriente se inyectó intracelularmente a través de un electrodo de vidrio, pero los resultados fueron los mismos que los obtenidos con la inyección extracelular simétrica. La  $R_m$  se determinó después de fijar el  $E_m$  a  $-150$  mV con el circuito descrito en la sección anterior. El  $E_m$  se determinó utilizando los amplificadores construidos en nuestro laboratorio y dos amplificadores comerciales (WPI DAM70). En la mayor parte de los experimentos el potencial de membrana se determinó entre el electrodo de referencia y un electrodo colocado

en la vacuola, por lo que estos valores del  $E_m$  en realidad corresponden al potencial vacuola-exterior (ver capítulo de RESULTADOS); sin embargo se realizaron varios experimentos colocando un electrodo en la vacuola y otro en el citoplasma para determinar el potencial vacuola-citoplasma ( $E_i$ ) y el potencial citoplasma-exterior ( $E_p$ ) por separado. Lo más difícil de este tipo de experimentos fué conseguir colocar el microelectrodo en la delgada franja de  $10\mu\text{m}$  que corresponde al citoplasma. Los criterios que utilizamos para saber que el electrodo se encontraba en el citoplasma fueron la presencia del potencial de acción característico; un  $E_m$  hiperpolarizado con respecto al potencial de membrana vacuola-exterior y la determinación de una  $R_m$ . Los potenciales de membrana y los desplazamientos asociados a las resistencias se monitorearon en un osciloscopio y se grabaron en el mismo trazo en una graficadora. El  $E_k$  se calculó a partir de los valores del  $E_m$  en soluciones de KCl 1, 10 y 100 mM (AAE pH 7 más 1, 10 o 100 mM de KCl) suponiendo una respuesta de 59 mV por cada factor de diez, es decir, suponiendo que la membrana se comporta como un electrodo de potasio (figura 7).

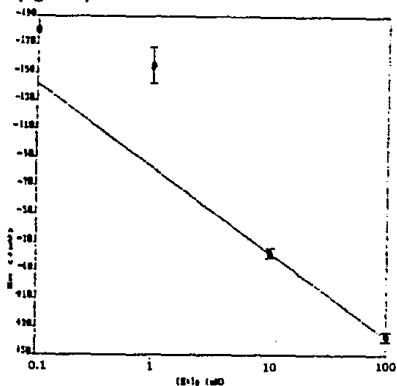


Fig. 7. El efecto del potasio externo sobre el potencial de membrana de *Nitella translucens* bajo condiciones de iluminación a pH 7 (●). La línea corresponde al comportamiento predicho por la ecuación de Nernst para un electrodo de potasio.

Al principio del experimento la célula se colocó en AAE pH 5 bajo condiciones de iluminación y se determinó el  $E_m$  y la  $R_m$  (o bien los  $E_i$  y  $E_p$  y las  $R_i$  y  $R_p$ ); a continuación se substituyó consecutivamente la solución externa por AAE pH 6, AAE pH 7, AAE pH 8, AAE pH 9 y AAE pH 10 y se determinaron los parámetros eléctricos celulares en cada una de estas condiciones. Posteriormente la célula se mantuvo en AAE pH 5 en la obscuridad hasta que la  $R_m$  alcanzó un valor estable (generalmente 2 horas) después de lo cual se repitió el protocolo anterior bajo condiciones de obscuridad. Una vez realizadas estas

determinaciones la célula se colocó en condiciones de iluminación en AAE pH 6 hasta que recuperó los valores iniciales de  $E_m$  y  $R_m$ . Entonces la solución extracelular se perfundió y en su lugar se añadió AAE pH6 que contenía 1mM de  $Na_3VO_4$  y se incubó a la célula en este medio durante una hora. Finalmente el protocolo anterior se repitió para condiciones de luz y oscuridad utilizando soluciones de AAE que contenían 1 mM de ortovanadato de sodio. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 25 °C.

## NOTAS Y BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Forsberg, C. 1965. Nutritional studies of *Chara* in axenic cultures. *Physiol. Plant.* 18, 275-290.
- 2.- Hope, A.B., and Walker, N. A. 1975. *The Physiology of Giant Algal Cells*. Cambridge University Press, London.
- 3.- García, E. 1986. Apuntes de Climatología. UNAM, México, D.F.
- 4.- Bisson, M.A., Walker, N.A. 1982. Control of passive permeability in the *Chara* plasmalemma. *J. Exp. Bot.* 33, 520-532.
- 5.- Hunten, D. M. 1964. *Introduction to Electronics for Students of Physics and Engineering Science*. Holt, Rinehart and Winston, Inc. New York.
- 6.- Bazarov, I.P. *Thermodynamics*. Edición revolucionaria del Instituto del Libro Cubano. La Habana.
- 7.- Spanswick, R. M. 1972. Evidence for an electrogenic ion pump in *Nitella Translucens*. I. The effects of pH,  $K^+$ ,  $Na^+$ , light and temperature on the membrane potential and resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 288, 73-89.
- 8.- Purves, R.D. 1981. *Microelectrode Methods for Intracellular Recording and Ionophoresis*. Academic Press, London.
- 9.- Plonsey, R., Barr, R.C. 1988. *Bioelectricity. A Quantitative Approach*. Plenum. New York.
- 10.- Rall, W. 1975. Core conductor theory and cable properties of neurons. En *Handbook of Physiology. The nervous system*. editado por la American Physiological Society. pp. 39-97.
- 11.- Williams, E.J., Johnston, R. J., Dainty, J. 1964. The electrical resistance and capacitance of the membranes of *Nitella translucens*. *J. Exp. Bot.* 15, 1-14.

12.- Hogg, J., Williams, E.J., Johnston, R. J. 1969. The membrane electrical parameters of *Nitella translucens*. *J. theor. Biol.* **24**, 317-334.

13.- Ortega Blake, I. 1980. A.C. Cable theory and its implications on the measurements of the membrane electrical parameters. *J. theor. Biol.* **83**, 595-621.

14.- Hogg, J., Williams, E.J., Johnston, R. J. 1968. A simplified method for measuring membrane resistance in *Nitella translucens*. *Biochim. Biophys. Acta* **180**, 518-520.

"¿Cómo mecerme en brisa de naranjos si soy una violenta llamarada consciente de sí misma?"

Margarita Paz Paredes.

*Éstora del Tiempo.*

## RESULTADOS.

### EFFECTO DEL pH SOBRE LOS PARÁMETROS ELÉCTRICOS.

Por lo común los diversos grupos de investigación analizan el comportamiento del  $E_m$  determinado entre la vacuola y el exterior en términos del plasmalema sin tomar en cuenta las posibles contribuciones del tonoplasto. Esto se debe a que a lo largo de los años esta membrana ha mostrado ser insensible a la mayor parte de los cambios ambientales, al menos durante periodos cortos de tiempo (1). Sin embargo nosotros decidimos confirmar esta idea y por lo tanto observamos el potencial del tonoplasto como una función del pH externo bajo condiciones de luz y oscuridad. En la figura 1 puede observarse que el  $E_t$  es ligeramente mayor en la luz que en la oscuridad, pero resulta prácticamente insensible a los cambios del  $pH_e$ , tanto en condiciones de luz como de oscuridad. La  $R_t$  se mantuvo por abajo de  $500 \Omega/m^2$  en todas las condiciones (datos no mostrados), mientras que el  $E_p$  y la  $R_p$  presentaron cambios muy notorios (figuras 2 y 3), por lo que decidimos utilizar el registro vacuola-exterior para estudiar las características eléctricas del plasmalema.

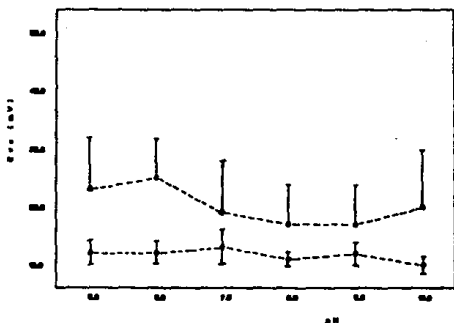


Fig. 1. El potencial del tonoplasto como función del pH externo en condiciones de iluminación (O) y oscuridad (●). Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar para una  $n=24$ .



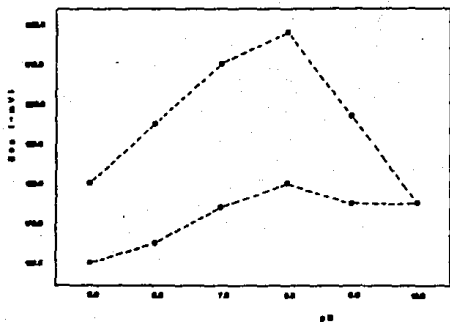


Fig. 2. El potencial del plasmalema como función del pH externo en condiciones de iluminación (O) y oscuridad (●). Los datos corresponden a una célula típica.

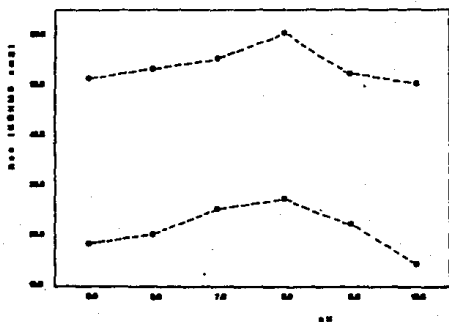


Fig. 3. La resistencia específica del plasmalema como función del pH externo en condiciones de iluminación (O) y oscuridad (●). Los datos corresponden a una célula típica.

La figura 4 muestra que la respuesta del  $E_m$  a los cambios en el  $pH_e$  en condiciones de oscuridad es muy similar a la respuesta en la luz, de hecho la pendiente de la razón  $E_m/pH_e$  es de 0.1 mV por unidad de pH en el rango  $pH_e$  6 a  $pH_e$  8 para ambas condiciones. También puede observarse que el  $E_m$  en la oscuridad está depolarizado con respecto a los valores en la luz, pero aún se encuentra muy lejos del  $E_k$ .

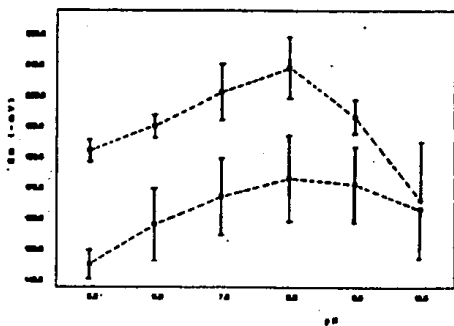


Fig. 4. El Em como función del pH en condiciones de iluminación (O) y oscuridad (●).  
Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar para una  $n=11$ .

La figura 5 muestra que la  $R_m$  también responde a los cambios en el  $pH_e$  y que se incrementa en la oscuridad, en concordancia con el grueso de los datos reportados en la literatura.

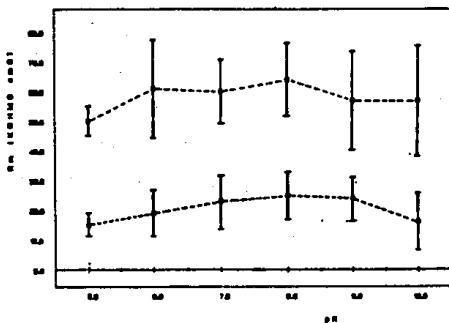


Fig. 5. La  $R_m$  como función del pH en condiciones de iluminación (O) y oscuridad (●).  
Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar para una  $n=11$ .

**EFFECTO DEL ORTOVANADATO DE SODIO.**

La presencia de 1mM de  $Na_3VO_4$  en el medio externo alteró notoriamente en un lapso de 30 minutos la respuesta del potencial de membrana a los cambios en el pH externo tanto en condiciones de luz como en condiciones de obscuridad, como puede observarse en la figura 6. Este resultado fue totalmente inesperado [2], puesto que ya he mencionado en el capítulo de ANTECEDENTES que Shimmen y Tazawa reportaron que 1 mM de  $Na_3VO_4$  presente en la solución externa no afectó estas características en las células internodales de *Nitellopsis obtusa* aún después de una incubación de 6 horas (3). Además en nuestros experimentos las células jamás mostraron una recuperación espontánea y la inhibición por vanadato resultó irreversible, aunque es importante señalar que la ciclosis permaneció inalterada y las células conservaron su capacidad de excitación aún después de 8 horas en presencia de vanadato. El o los efectos del ortovanadato de sodio provocaron la depolarización del  $E_m$  hasta un valor muy cercano al  $E_k$ , como se muestra en la figura 7.

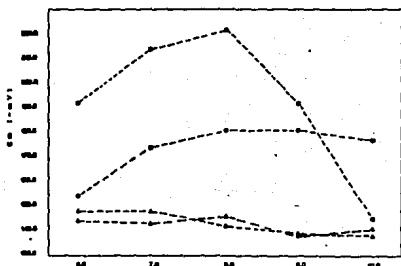


Fig. 6. El  $E_m$  como función del pH. Los datos corresponden a una célula típica bajo condiciones de iluminación en ausencia (O) y presencia de 1mM de ortovanadato de sodio (Δ); y bajo condiciones de obscuridad en ausencia (●) y presencia de 1mM de ortovanadato de sodio (▲).

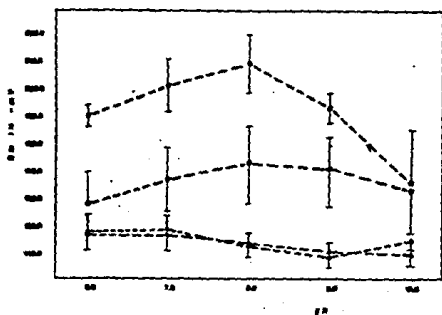


Fig. 7. El  $E_m$  como función del pH bajo condiciones de iluminación en ausencia (O) y presencia de 1mM de ortovanadato de sodio ( $\Delta$ ); y bajo condiciones de oscuridad en ausencia ( $\bullet$ ) y presencia de 1mM de ortovanadato de sodio ( $\blacktriangle$ ). Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar para una  $n=11$ .

El vanadato eliminó la dependencia de la resistencia de membrana al  $pH_e$  e incremento su valor en condiciones de iluminación, como se observa en la figura 8, pero redujo este valor en condiciones de oscuridad (figura 9). Aunque el efecto del vanadato sobre el valor de la  $R_m$  es similar al efecto de la oscuridad, existe una diferencia de magnitud entre ambos. Resulta importante hacer notar que los valores de la  $R_m$  en presencia de vanadato para condiciones de luz y oscuridad son muy similares, como puede observarse en la figura 10.

Los resultados descritos anteriormente pueden ser atribuidos a un efecto del ortovanadato sobre el plasmalema, puesto que los valores del potencial y la resistencia del tonoplasto no fueron afectados por el ortovanadato presente en el medio externo (datos no mostrados).

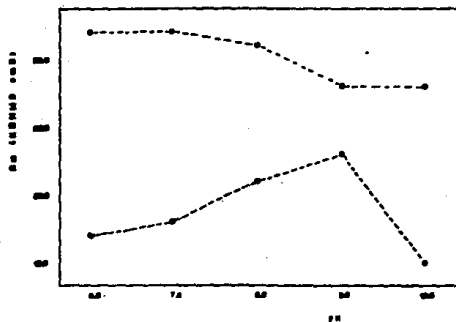


Fig. 8. La  $R_m$  como función del pH. Los datos corresponden a una célula típica bajo condiciones de iluminación en ausencia (O) y presencia de 1mM de ortovanadato de sodio (●).

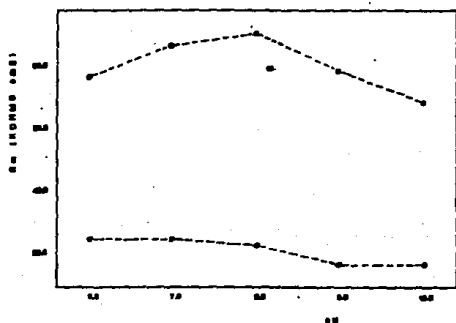


Fig. 9. La  $R_m$  como función del pH. Los datos corresponden a una célula típica bajo condiciones de oscuridad en ausencia (O) y presencia de 1mM de ortovanadato de sodio (●).

## NOTAS Y BIBLIOGRAFIA.

1.- Hope, A.B., and Walker, N. A. 1975. *The Physiology of Giant Algal Cells*. Cambridge University Press, London.

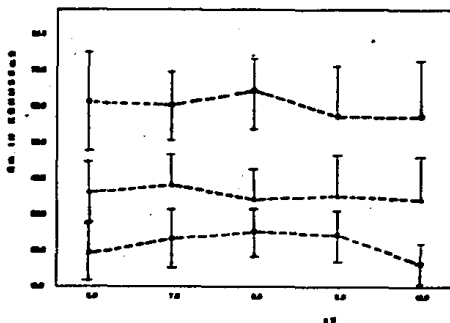


Fig. 10. La  $R_m$  como función del pH bajo condiciones de iluminación en ausencia (O) y presencia de 1mM de ortovanadato de sodio ( $\Delta$ ); y bajo condiciones de oscuridad en ausencia (●) y presencia de 1mM de ortovanadato de sodio ( $\blacktriangle$ ). Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar para una  $n=11$ .

2.- Y todas las revolucionarias teorías generadas para explicar los datos tipo Shimmen y Tazawa que "seguramente" íbamos a obtener resultaron perfectamente inútiles. Creo que resulta extemporáneo desarrollarlas aquí, sobre todo porque no pueden fundamentarse sólidamente con ningún reporte de la literatura.

3.- Shimmen, T., Tazawa, M. 1982. Effects of intracellular vanadate on electrogenesis, excitability and cytoplasmic streaming in *Nitellopsis obtusa*. *Plant Cell Physiol.* 23, 669-677.

"A fuerza de no morir, hay siempre algo que explicar."

Giovanni Papini.

Ritortí Stranieri.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### LOS EFECTOS DEL pH EXTERNO

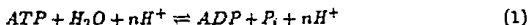
La figura 1 del capítulo anterior muestra que el potencial generado a través del tonoplasto (potencial vacuola-citoplasma) resulta ser prácticamente insensible a las condiciones de iluminación y a las alteraciones en el pH externo, lo que concuerda con la idea ampliamente difundida entre los investigadores de este campo de que el plasmalema es la membrana que posee las características eléctricas dominantes en la célula (1). El  $E_t$  posee valores cercanos a los 20 mV en las distintas condiciones experimentales; estos valores concuerdan con los encontrados para otras especies de Charofitas, como puede observarse en la tabla I.

TABLA I

ESPECIE	POTENCIAL DE REPOSO (mV)	REFERENCIA
<i>Chara corallina</i>	+10 a +20	2
	+10	3
	+10 a +20	4
(gotas citoplásmicas)	-4	5
(células permeabilizadas)	+20 a +40	6
<i>Nitella translucens</i>	+22	7
<i>Nitella flexilis</i>	+11	8
(gotas citoplásmicas)	+20 a +50	9
<i>Nitellopsis obtusa</i>	+19	10

Tabla I. Valores reportados en la literatura para el potencial del tonoplasto en células de Charofitas.

La figura 2 muestra que el pH externo tiene un efecto muy marcado sobre el potencial del plasmalema bajo condiciones de luz y de oscuridad. En principio la variación del  $E_m$  como resultado de la alteración del  $pH_e$  podría calcularse a partir de la ecuación 8 del capítulo de ANTECEDENTES tomando en cuenta que la bomba electrogénica es una  $H^+ATPasa$  y que por lo tanto cataliza el proceso quimiosmótico



donde  $n$  es el número de protones transportados durante la reacción. Si se define el  $\Delta\mu_b$  como la energía libre de hidrólisis de 1 mol de ATP ( $\Delta\mu_{ATP}$ ) y se substituyen los valores de las constantes de tal forma que los términos energéticos se expresen en kilojoules y el potencial en volts, la ecuación 8 del capítulo de ANTECEDENTES toma la forma

$$E_b = \frac{\Delta\mu_{ATP}}{96.5n} + 0.06(pH_i - pH_e) \quad (2)$$

que predice una hiperpolarización del potencial concomitante con el incremento del  $pH_e$ . Este aumento en el  $E_m$  se observa en las figuras 2 y 4 en el rango  $pH_e 5$  a  $pH_e 8$ . En teoría la hiperpolarización debe ser de 0.06 Volts por cada unidad de pH, pero en las figuras 2 y 4 puede verse que el  $\Delta E_m$  es de aproximadamente 15 mV por cada unidad de pH. Esta diferencia puede explicarse si recordamos que la ecuación 2 se refiere a la fuerza electromotriz de la bomba, que por definición corresponde al potencial generado por la  $ATPasa$  en ausencia de cualquier otro tipo de difusión iónica; y que de acuerdo con la hipótesis de la bomba conductora el potencial de membrana de *Nitella translucens* posee también un componente debido a la difusión pasiva; por otro lado, la ecuación 2 establece que en ausencia de hidrólisis de ATP el potencial de la bomba está determinado por la difusión pasiva de protones, es decir, que en ausencia de ATP la bomba se comporta como un canal de protones, pero se ha demostrado que este no es el caso (11), por lo que la ecuación 2 solo puede dar una idea cualitativa del comportamiento del  $E_m$  frente a los cambios en el  $pH_e$ .

El comportamiento del potencial en el rango pH 8 a pH 10 permite suponer que en esas condiciones el  $E_m$  ya no se encuentra dominado por la  $H^+ATPasa$ , sino que entra a un estado en el cual otro(s) proceso(s) de difusión compite(n) notablemente con el transporte primario de protones; sin embargo, la naturaleza de este proceso no puede determinarse a partir de nuestros datos experimentales, y hasta donde sabemos no existe en la literatura información suficiente que permita identificar el tipo de transportador o la especie iónica que parece contribuir al  $E_m$  en este rango.

Las figuras 3 y 5 muestran que la resistencia específica presenta una dependencia ligera al  $pH_e$ . Esta función del  $pH_e$  no es sencilla de interpretar, aunque es posible intentar explicarla en términos de la ecuación 9 del capítulo de INTRODUCCIÓN tomando además en cuenta el hecho de que la reacción catalizada por la  $H^+ATPasa$  debe responder a una regulación "por producto", es decir, que la permeabilidad de la membrana resulta sensible a la concentración externa de iones hidronio. ¿Qué tipo de alteración, a nivel molecular, provocaría la variación en el  $pH_e$ ? No lo sé; pero siempre se puede recurrir



• una explicación tipo Monod (un cambio conformacional) que por ser tan genérica, en realidad no explica nada. Por lo que respecta al valor numérico de la resistencia, la  $R_m$  bajo condiciones de obscuridad es mucho mayor que bajo condiciones de iluminación (figura 5). En la literatura suele suponerse que este gran incremento es el resultado de la inactivación de las bombas electrogénicas (12,13); sin embargo el hecho de que el  $E_m$  resulte sensible a la variación del  $pH_e$  en la obscuridad (figura 2) sugiere que la bomba continúa trabajando en esas condiciones. Discutiremos este problema con mayor detalle en la siguiente sección.

La figura 4 muestra que la obscuridad produce una marcada depolarización del  $E_m$ , aunque, contrariamente a la idea más difundida, el valor del  $E_m$  en la obscuridad no está cercano al valor del  $E_k$ , sino que continúa hiperpolarizado con respecto a él, por lo que puede concluirse que en las células internodales de *Nitella translucens* existe un sistema de transporte responsable de un potencial electrogénico que se encuentra activo bajo condiciones de obscuridad. Si a estos datos añadimos el hecho de que la razón  $E_m/pH_e$  es la misma bajo condiciones de iluminación y de obscuridad en el rango  $pH_e$  6 a  $pH_e$  8 una posible explicación de estos resultados es que la  $H^+ATPasa$  se mantiene activa tanto en condiciones de luz como de obscuridad.

Hasta aquí no he hecho más que analizar los experimentos de control similares a los de Spanswick (14) y Bisson (13), y los resultados obtenidos son también muy parecidos. Las células internodales de *Nitella translucens* cultivadas en nuestro laboratorio muestran una respuesta al  $pH_e$  bajo condiciones de iluminación y un estado K inducido por obscuridad semejantes a los descritos para las células de *Nitella translucens* cultivadas por Spanswick y para las de *Chara corallina* cultivadas por Bisson. Esto datos indican que nuestro sistema experimental (instrumentos, células, soluciones, y condiciones experimentales) funciona de manera satisfactoria.

LOS EFECTOS DEL VANADATO SOBRE EL  $E_m$ 

La carencia de un compuesto que se comporte *in vivo* como un inhibidor específico de la  $H^+ATPasa$  del plasmalema es un paso limitante en la comprensión de la fisiología de las *Characeae*. Ni el DCCD, ni el DES, ni la NEM, ni el EDAC, ni el PCMSB, o el CN consiguen inhibir esta bomba electrogénica sin producir complejos efectos secundarios sobre las características eléctricas del plasmalema; al parecer todos ellos afectan la permeabilidad pasiva de la membrana (15,16,17), por lo que resultan poco adecuados para analizar la contribución de la  $H^+ATPasa$  del plasmalema a las características eléctricas de esta membrana. En contraste, en el único artículo en el que se ha utilizado ortovanadato de sodio para intentar inhibir esta enzima en las Charofitas se reporta que este compuesto depolariza el potencial de membrana a valores cercanos al  $E_K$  y que no parece alterar el flujo pasivo de potasio (18), lo que convierte al vanadato en un buen candidato a inhibidor específico bajo condiciones fisiológicas. El primer punto a discutir en este sentido es la capacidad de este compuesto para penetrar a la célula a través de la membrana plasmática. Ya mencioné en el capítulo de ANTECEDENTES que Shimmen y Tazawa reportaron que 1 mM de ortovanadato de sodio presente en el medio externo no tiene ningún efecto sobre el  $E_m$  de las células internodales de *Nitellopsis obtusa* (18), pero que si una célula libre de tonoplasto se perfunde con un medio que contiene  $10\mu M$  de vanadato el  $E_m$  se depolariza hasta alcanzar el  $E_K$  y la  $R_m$  se incrementa notablemente. Estos experimentos concuerdan con los realizados en fantasmas de eritrocitos que muestran que este compuesto es efectivo como inhibidor de la  $ATPasa$  de  $Na^+/K^+$  solo cuando interactúa con la región citoplásmica de la enzima (19). A partir de sus resultados Shimmen y Tazawa concluyen que el vanadato no es capaz de penetrar a través del plasmalemma de *Nitellopsis obtusa*, y hasta donde sabemos ningún otro investigador ha confirmado estos resultados o a utilizado este compuesto para tratar de inhibir la  $H^+ATPasa$  plasmática de las Charofitas *in vivo*.

En la figura 6 del capítulo de RESULTADOS puede observarse que el potencial de membrana de las células internodales de *Nitella translucens* es afectado notoriamente cuando la solución externa contiene 1 mM de ortovanadato de sodio: el valor del potencial disminuye y la dependencia característica al pH desaparece. La interpretación inmediata es que estos efectos son el resultado de la inhibición de la bomba electrogénica por el vanadato, pero esta suposición implica que el vanadato es capaz de penetrar al interior de las células de *Nitella translucens*. En la literatura se ha reportado que el vanadato penetra al interior de los eritrocitos y de las células de *Neurospora crassa* a través del transportador de fosfato (19,21), y en las células de *Lemna gibba* a través de un mecanismo de cotransporte  $H^+$ /vanadato (22). En nuestro caso los datos experimentales indican que el vanadato es capaz de atravesar la membrana plasmática, pero no permiten determinar si el vanadato se ingiere como un análogo del fosfato a través de un sistema de transporte específico y/o si este transporte se realiza a expensas del gradiente de protones, lo que hace necesario el diseño de experimentos que permitan clarificar este punto en el futuro.

No puedo dar una explicación certera del motivo por el cual el vanadato resulta incapaz de penetrar en las células internodales de *Nitellopsis obtusa*. Ya he señalado en el capítulo

de ANTECEDENTES que este compuesto tiene efectos muy variables como inhibidor de la  $H^+ATPasa$  en las células de plantas superiores cuando se añade extracelularmente y la tabla III de ese capítulo muestra que la variabilidad parece ser especie- y tejido-dependiente, aunque hasta la fecha no es posible establecer una correlación ni siquiera al nivel de monocotiledóneas y dicotiledóneas (22). Nuestros datos indican que también en la familia de las *Characeae* parecen existir diferentes niveles de respuesta al vanadato presente en el medio extracelular, por lo menos a nivel de género, por lo que resulta necesario realizar un estudio más detallado del efecto de este compuesto sobre diversos géneros y especies de Charofitas. Es posible pensar, además de las hipótesis que expuse en el capítulo de ANTECEDENTES, que la composición de la pared celular influya en la permeabilidad al vanadato, sin embargo hasta donde sabemos no se han realizado experimentos dirigidos a cuantificar la unión de vanadato sobre las paredes de diversos especies.

En la figura 7 del capítulo anterior se muestra que bajo condiciones de iluminación el vanadato depolariza el potencial de membrana hasta un valor muy cercano al  $E_k$ , que es el resultado esperado si el vanadato inhibe específicamente la bomba de protones del plasmalema. El hecho de que el  $E_m$  después del tratamiento con vanadato este tan cerca del  $E_k$  sugiere que el  $\Delta E$  producido por el vanadato es una buena estimación del potencial electrogénico generado por la  $H^+ATPasa$ . La figura 7 muestra también que el vanadato elimina la respuesta del  $E_m$  al  $pH_e$ , tanto en condiciones de iluminación como de oscuridad, y que el  $E_m$  en condiciones de oscuridad también se depolariza hasta valores cercanos al  $E_k$  por efecto del vanadato; estos datos sugieren fuertemente que la  $H^+ATPasa$  del plasmalema se encuentra siempre activa, tanto bajo condiciones de iluminación como de oscuridad.

El efecto del ortovanadato de sodio sobre el  $E_m$  resultó ser estable en nuestros experimentos, y nunca observamos recuperaciones espontáneas como las descritas por Shimmen y Tazawa (capítulo de ANTECEDENTES). Resulta difícil explicar porqué estos autores encontraron una recuperación de los valores hiperpolarizados del potencial; una posibilidad es que el vanadato fuera reducido a cationes vanadilo por el metabolismo celular, como se ha reportado que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae* (23); pero es importante recordar que los experimentos se realizaron en células libres de tonoplasto y no en internodos intactos, por lo que la posibilidad de que la recuperación fuera un extraño efecto colateral inherente al modelo experimental no puede descartarse. De cualquier manera, en nuestros experimentos el metabolismo celular fué incapaz de detoxificar 1 mM de vanadato añadido al medio externo.

Las figuras 6 y 7 muestran que el potencial electrogénico es altamente sensible al vanadato, lo que sugiere que en las Charofitas este potencial se mantiene esencialmente por medio de la  $H^+ATPasa$  del plasmalema. Resulta importante subrayar este dato porque en las células vegetales de las plantas superiores aún no existe un consenso acerca de los mecanismos enzimáticos que son responsables de mantener un potencial electrogénico a través del plasmalema. En *Elodea densa*, el organismo donde este fenómeno ha sido investigado más que en otras especies, se han propuesto dos sistemas alternativos para explicar los potenciales electrogénicos: a) una cadena de oxido-reducción que bombea protones y

resulta insensible al vanadato (24) y b) una  $H^+ATPasa$  similar a las purificadas de las membranas plasmáticas de *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae* (25). En este sentido nuestros datos concuerdan con los reportados por el grupo de Marré que encuentra que la hiperpolarización del potencial de membrana y el incremento en el bombeo de protones al medio extracelular inducidos por luz o por fusicocina son sensibles al vanadato y a la eritrocina-B (25).

## LOS EFECTOS DEL VANADATO SOBRE LA $R_m$

La contribución de la  $H^+ATPasa$  a la resistencia de membrana puede ser calculada a partir de datos obtenidos usando un inhibidor específico por medio de las ecuaciones:

$$R_L = \frac{R_d R_b}{R_d + R_b}, \quad (3)$$

$$R_I = \frac{R'_d R'_b}{R'_d + R'_b}, \quad (4)$$

$$R_O = \frac{R''_d R''_b}{R''_d + R''_b} \quad (5)$$

en las que  $R_L$  corresponde a la resistencia específica bajo condiciones de iluminación,  $R_d$  es la resistencia pasiva en la luz,  $R_b$  es la resistencia de la bomba en la luz,  $R_I$  es la resistencia de membrana bajo condiciones de iluminación en presencia del inhibidor específico de la bomba de protones,  $R'_d$  es la resistencia pasiva en presencia de este inhibidor,  $R'_b$  es la resistencia de la bomba en presencia del inhibidor,  $R_O$  es la resistencia de membrana en la obscuridad,  $R''_d$  es la resistencia de las vías de difusión pasiva en la obscuridad y  $R''_b$  es la resistencia a través de la bomba bajo condiciones de obscuridad.

La figura 8 muestra que la resistencia bajo condiciones de iluminación se incrementa después del tratamiento con vanadato. Este es el resultado esperado si la  $H^+ATPasa$  se comporta como una fuente de voltaje constante en serie con una conductancia y el vanadato atrapa a la enzima en la conformación E2 (como lo indican los experimentos cinéticos realizados por el grupo de Cantley en la referencia 26). Debido a que el vanadato elimina completamente la respuesta al  $pH_e$  y a que depolariza el potencial de membrana al valor del  $E_b$ , puede suponerse que el vanadato actúa como un inhibidor específico de la  $H^+ATPasa$ , por lo menos en relación con las propiedades eléctricas de la membrana, afectando a una población importante de estas enzimas. En este caso debe ser posible calcular la contribución de la bomba de protones a la conductancia de la membrana utilizando las ecuaciones anteriores; sin embargo el efecto del ortovanadato de sodio sobre la resistencia

específica de la membrana bajo condiciones de obscuridad es muy extraño y es necesario analizarlo antes de calcular la resistencia de la bomba.

La figura 9 muestra que el ortovanadato de sodio disminuye la resistencia específica del plasmalema en condiciones de obscuridad. Esta reducción resulta inesperada por varias razones:

a) En general se piensa que los altos valores de la resistencia en la obscuridad son el reflejo de la disminución de la conductancia a través de la  $H^+ATPasa$ . Los resultados que presenté en la sección anterior indican que aún en condiciones de obscuridad existen bombas activas, por lo que era de esperarse que los valores de la  $R_m$  inducidos por vanadato fueran mayores o por lo menos muy similares a los valores de la  $R_m$  inducidos por obscuridad.

b) Si el vanadato atrapa a la enzima en la conformación E2 (26) resultaría poco probable que las bombas inhibidas retuvieran una actividad marginal como vías de difusión pasiva para los protones u otros cationes.

c) Otros inhibidores como la DCCD o el DES incrementan la resistencia de membrana a valores semejantes a los de obscuridad y esta similitud normalmente se interpreta como el resultado de la inhibición de la bomba de protones (13,16,27). Hasta donde sabemos no existe ningún artículo que reporte una reducción de la  $R_m$  cuando las células internodales de las *Characeae* se tratan con estos compuestos bajo condiciones de obscuridad.

En el capítulo de MATERIAL Y MÉTODOS mencioné que el protocolo experimental fué diseñado de tal manera que el vanadato se agregó a la célula internodal bajo condiciones de iluminación y la luz se apagó solo hasta que se determinó la respuesta a los cambios en el  $pH_e$  bajo estas condiciones, por lo que la reducción de la resistencia en la obscuridad en realidad es una observación indirecta y podría ser un extraño artificio. Para dilucidar este punto realizamos experimentos en los que primero se colocó a la célula bajo condiciones de obscuridad y luego se agregó el vanadato. Los resultados fueron los mismos, el vanadato disminuyó la resistencia específica hasta a un 50 % de su valor en la obscuridad. La figura 10 muestra la resistencia específica del plasmalema en ausencia y presencia de vanadato para condiciones de iluminación y obscuridad y se puede observar que el valor de la resistencia inducida por vanadato es el mismo bajo ambas condiciones.

Ya que en nuestros experimentos no determinamos la concentración intracelular de vanadato existe la posibilidad de explicar los resultados de obscuridad en base a suponer que esta concentración no es suficiente para obtener una inhibición notable en términos de resistencia; sin embargo cuando incrementamos la concentración de vanadato en el medio externo a 1.5, 2 y 5 mM los resultados que encontramos fueron los mismos (datos no mostrados). Aunque este tipo de experimentos no pueden demostrar que la actividad interna de vanadato es suficiente para inhibir una población importante de  $H^+ATPasas$ , los datos obtenidos aunados a los discutidos en la sección anterior ( $E_m$  depolarizado y eliminación de la sensibilidad al  $pH_e$ ) indican que el vanadato interno es suficiente para inhibir un buen número de bombas; por lo tanto, es necesario buscar una explicación de porqué este compuesto provoca la disminución de la  $R_m$  bajo condiciones de obscuridad,

tomando en cuenta otros procesos de transporte que podrían resultar afectados ya sea por las condiciones de obscuridad y/o por un efecto directo del vanadato.

El efecto de la obscuridad sobre las permeabilidades de membrana en las *Characeae* es un tema sobre el que no se ha realizado suficiente investigación. Algunos autores han reportado que el incremento de la resistencia inducido por obscuridad en células internodales intactas de *Chara corallina* parece reflejar el cerrado de las  $H^+ ATPasas$  porque la permeabilidad al potasio (que es el flujo que miden) permanece prácticamente constante cuando se apaga la luz (28); pero otros investigadores señalan, también para células internodales intactas de *Chara corallina*, que en la obscuridad la  $P_k$  se reduce alrededor de un 40 % en el rango  $pH_e$  5 a  $pH_e$  7 (29). En la actualidad no existe un consenso al respecto en el caso del género *Chara* (17), mientras que en el género *Nitella* no existen estudios cuantitativos del efecto de la luz sobre las permeabilidades de membrana.

Nuestros datos pueden ser explicados satisfactoriamente si se cumplen dos requisitos:

a) Existe un mecanismo fisiológico que bajo condiciones de obscuridad induce el cierre de alrededor de un 45 % de las vías de difusión facilitada en *Nitella translucens*, de manera análoga al incremento de la  $R_d$  inducido por la obscuridad descubierto en *Chara corallina* y que puede llegar a ser de hasta un 46 % (29).

b) El vanadato afecta este mecanismo impidiendo el incremento de la  $R_d$  bajo condiciones de obscuridad.

La existencia de un mecanismo fisiológico capaz de modificar la  $R_d$  de acuerdo a las condiciones de iluminación ha sido sugerida por Shimmen, Tazawa y Mimura (30,31). Estos investigadores reportaron que en células de *Chara corallina* libres de tonoplasto y depletadas de ATP ocurre una rápida modificación del  $E_m$  en el momento en que se colocan bajo condiciones de iluminación: el potencial se aproxima al  $E_k$ , independientemente del valor que haya tenido en la obscuridad. Este fenómeno no ocurre en presencia de TEA, noniltriethylamonio o DCMU, lo que sugiere que esta mediado por un canal de potasio sensible a la fotosíntesis. Si existe un mecanismo similar en *Nitella translucens* capaz de inactivar un porcentaje importante de canales de potasio bajo condiciones de obscuridad y que resulta sensible al vanadato, entonces, utilizando las ecuaciones 3, 4 y 5 y suponiendo que el vanadato se comporta en nuestro sistema experimental como un inhibidor potente de la bomba electrogénica y que no altera la  $R_d$  bajo condiciones de iluminación, es decir,

$$R_I = R'_d$$

y

$$R'_d = R_d$$

es posible demostrar que la  $R_d$  tiene un valor aproximado de  $40 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$  y que la  $R''_d$  es de aproximadamente  $500 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ . Este incremento de la resistencia en un orden de magnitud implicaría que una pequeña parte de la población de  $H^+ ATPasas$  todavía es capaz de mantener un potencial electrogénico y una respuesta al  $pH_e$  en condiciones de obscuridad.

El valor de la  $R_s$  calculado de esta manera corresponde a una  $G_s$  de aproximadamente  $0.25S/m^2$ , y concuerda muy bien con los valores reportados por el grupo de Smith para la conductancia a través de la bomba en *Chara corallina* estimados a partir de determinaciones simultáneas del flujo de  $^{42}K$  y de la conductancia eléctrica del plasmalema (32).

Por otra parte, si la obscuridad no produce una disminución de la permeabilidad pasiva, entonces es necesario pensar que el ortovanadato de sodio altera directamente la  $R_d$ . A partir del hecho de que el  $E_m$  se depolariza a un valor muy cercano al  $E_k$  cuando la célula se trata con vanadato es posible suponer que el efecto colateral del vanadato se ejerce principalmente sobre los canales de potasio; aunque es conveniente mencionar que algunos investigadores han señalado la posibilidad de que este tipo de ATPasas posean un canal de potasio intrínseco (43,44), por lo que conviene tener en mente la idea de que el vanadato podría estar inhibiendo la bomba de tal manera que en la conformación inhibida el canal de potasio intrínseco permaneciera abierto. Las figuras 7 y 10 muestran que los parámetros eléctricos de una célula tratada con vanadato son los mismos bajo condiciones de luz o de obscuridad, por lo que el posible efecto del vanadato sobre la  $R_d$  parece ser el mismo en ambas condiciones. Si el vanadato altera la  $R_d$  nuestros cálculos de la  $R_s$  deben ser corregidos para tomar en consideración el efecto directo de este compuesto sobre los sistemas de transporte pasivo de la célula.

Se ha reportado que el vanadato inhibe las fosfatasa alcalinas (33) y las ácidas (34). La ATPasa de dineína y que tiene efectos sobre algunas enzimas del metabolismo intermedio (35), pero hasta donde sabemos no existe ningún reporte acerca de su efecto sobre los canales iónicos; sin embargo, es posible especular un poco acerca de ello. Tracey y Gresser han reportado que el vanadato esterifica rápidamente grupos hidroxilo, lo que produce ésteres de vanadato que son aceptados como sustratos por algunas enzimas cuyos sustratos fisiológicos son los ésteres de fosfato correspondientes (36). De hecho, estos autores han propuesto que el vanadato es capaz de esterificar espontáneamente residuos tirosil del receptor de insulina simulando el efecto de una enzima tirosin cinasa. Si el vanadato se comporta de una manera similar en nuestros experimentos, entonces es posible proponer una explicación para la disminución de la  $R_m$  inducida por vanadato en condiciones de obscuridad. Supongamos que el vanadato esterifica un sistema de transporte pasivo, probablemente algún tipo de canal de potasio, entonces esta modificación podría atrapar el canal en un estado abierto y convertirlo en un canal constitutivo, escapando así a los efectos de algún posible sistema regulatorio. Este modelo implica la existencia de canales regulados por reacciones de fosforilación-defosforilación en las células internodales de *Nitella translucens*, y el reciente hallazgo de Tester en *Chara corallina* de que la conductancia total del plasmalema en el estado K es fuertemente reducida cuando se disminuyen los niveles citoplásmicos de ATP con cianuro + ácido salicilhidroxámico parece apoyar la existencia de este tipo de canales en las *Characeae* (37). Resulta conveniente señalar además que la regulación de un canal iónico por fosforilación se ha reportado en el epitelio aéreo, donde la proteína cinasa C y la proteína cinasa dependiente de cAMP activan los canales de cloro al fosforilarlos (38).

El hecho de que la luz tiene una gran influencia sobre los parámetros eléctricos del plasmalema de las *Characeae* es ampliamente aceptado en la actualidad, sin embargo los mecanismos moleculares relacionados con este efecto son totalmente desconocidos. Algunos investigadores intentan explicar los efectos de la luz sobre la actividad de la  $H^+ATPasa$  de membrana plasmática con la hipótesis del "suplemento energético" de MacRobbie (13,31,39,40) que supone una inactivación de la bomba en condiciones de obscuridad debido a la disminución de las pozas de ATP producto de la fotosíntesis; mientras que otros investigadores están buscando evidencia de acoplamientos entre el cloroplasto y la membrana plasmática a través de sustancias difusibles distintas del ATP o el NADPH (41,42). Este es un campo que se encuentra en pleno desarrollo el día de hoy y en el que los datos bien establecidos son muy pocos: a) El DCMU altera la permeabilidad de la membrana al potasio (29) y b) Existe una constante temporal común a la fluorescencia de la clorofila y al  $\Delta E_m$  inducido por las condiciones luminosas en *Nitella translucens* (42). Sin embargo, aún cuando parece que las reacciones de la fotosíntesis están involucradas de alguna manera en los procesos de transporte a través del plasmalema, a la fecha no existe un verdadero modelo que explique los efectos de la iluminación; y cualquier modelo que se desarrolle en el futuro deberá tomar en cuenta que la bomba electrogénica se mantiene activa en la obscuridad así como el efecto de la luz sobre sistemas de transporte pasivo cuya regulación podría estar acoplada a la  $H^+ATPasa$ . Por lo que respecta a la existencia de moléculas transductoras de señales luminosas a nivel de la membrana plasmática (criptocromos, fitocromos, etc.) no se cuenta con ninguna información para esta familia de algas (45), pero este parece ser un promisorio campo de futuras investigaciones.

Finalmente, me ha parecido conveniente incluir el análisis que hacen Spanswick y Bisson sobre estos datos; ellos fueron los árbitros de la revista a la que mandamos el trabajo descrito anteriormente y sus opiniones se encuentran en el APÉNDICE III.



## NOTAS Y BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Hope, A.B., and Walker, N. A. 1975. *The Physiology of Giant Algal Cells*. Cambridge University Press, London.
- 2.- Findlay, G. P., Hope, A.B. 1964. Ionic relations of cells *Chara australis* VII. The separate electrical characteristics of the plasmalemma and tonoplast. *Aust. J. Biol. Sci.* **17**, 62-77.
- 3.- Coster, H.G.L. 1969. The role of pH in the punch-through effect in the electrical characteristics of *Chara australis*. *Aust. J. Biol. Sci.* **22**, 365-374.
- 4.- Coster, H.G.L., Smith J.R. 1977. Low-frequency impedance of *Chara corallina*: simultaneous measurements of the separate plasmalemma and tonoplast capacitance and conductance. *Aust. J. Plant Physiol.* **4**, 667-674.
- 5.- Homble, F. 1987. A tight-seal whole cell study of the voltage-dependent gating mechanism of  $K^+$ -channels of protoplasmic droplets of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* **84**, 433-437.
- 6.- Tester, M., Beilby, J.M., Shimmen, T. 1987. Electrical characteristics of the tonoplast of *Chara corallina*: A study using permeabilised cells. *Plant Cell Physiol.* **28**, 1555-1568.
- 7.- Spanswick, R. M. 1970. Electrophysiological techniques and the magnitudes of the membrane potentials and resistances of *Nitella translucens*. *J. Exp. Bot.* **21**, 617-627.
- 8.- Yurin, V. M., Bobrov, V. A., Plaks, A. V., Goncharik, M. N. 1979. Action of phenolic compounds on electrophysiological properties of the plasmalemma and tonoplast of *Nitella flexilis* cells. *Soviet Plant Physiol.* **26**, 563-569.
- 9.- Takenaka, T., Yoshioka, T., Horie, H. 1975. Physiological properties of protoplasmic drops of *Nitella*. *Adv. Biophys.* **7**, 193-213.
- 10.- Findlay, G. P. 1970. Membrane electrical behaviour in *Nitellopsis obtusa*. *Aust. J. Biol. Sci.* **23**, 1033-1045.
- 11.- Takeshige, K., Shimmen, T., Tazawa, M. 1986. Quantitative analysis of ATP-dependent  $H^+$  efflux and pump current driven by an electrogenic pump in *Nitellopsis obtusa*. *Plant Cell Physiol.* **27**, 337-348.
- 12.- Bisson, M.A. 1986. The Effect of Darkness on Active and Passive Transport in *Chara corallina*. *J. Exp. Bot.* **37**, 8-21.
- 13.- Spanswick, R. M. 1974. Evidence for an electrogenic ion pump in *Nitella Translucens*. II. Control of the light-stimulated component of the membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta.* **332**, 387-398.
- 14.- Spanswick, R. M. 1972. Evidence for an electrogenic ion pump in *Nitella translucens*. I. The effects of pH,  $K^+$ ,  $Na^+$ , light and temperature on the membrane potential and resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **288**, 73-89.

- 15.- Lichtner, F.T., Lucas, W. J., Spanswick, R. M. 1981. Effect of sulfhydryl reagents on the biophysical properties of the plasmalemma of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* 68, 899-904.
- 16.- Bisson, M. A. 1986. Inhibitors of proton pumping. *Plant Physiol.* 81, 55-59.
- 17.- Blatt, M. R., Beilby, M. J., Tester, M. 1990. Voltage Dependence of the *Chara* Proton Pump Revealed by Current-Voltage Measurements During Rapid Metabolic Blockade with Cyanide. *J. Membrane Biol.* 114, 205-223.
- 18.- Shimmen, T., Tazawa, M. 1982. Effects of intracellular vanadate on electrogenesis, excitability and cytoplasmic streaming in *Nitellopsis obtusa*. *Plant Cell Physiol.* 23, 669-677.
- 19.- Cantley, L.C., Resh, M.D., Guidotti, G. 1978. Vanadate inhibits the red cell (Na,K)-ATPase from the cytoplasmic side. *Nature* 272, 552-554.
- 20.- Cantley, L.C., Cantley, L.G., Josephson, L. 1978. A characterization of vanadate interactions with the (Na,K)-ATPase. Mechanistic and regulatory implications. *J. Biol. Chem.* 253, 7361-7368.
- 21.- Bowman, B. J. 1983. Vanadate uptake in *Neurospora crassa* occurs via phosphate transport system II. *J. Bacteriol.* 153, 286-291.
- 22.- Ullrich-Eberius, C. I., Sanz, A., Novacky, A. J. 1989. Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. *J. Exp. Bot.* 40, 119-128.
- 23.- Willsky, G.R., White, D.A., McCabe, B.D. 1984. Metabolism of added orthovanadate to vanadyl and high-molecular-weight vanadates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 259, 13273-13281.
- 24.- Ivankina, N. G., Novak, V. A., Micalashevich A. I. 1984. Redox reactions and active  $H^+$ -transport in the plasmalemma of *Elodea* leaf cells. en el libro *Membrane Transport in plants*. W.J. Cram, K. Janacek, R. Rybova, S. Sigler, edits. John Wiley & sons, London. pp. 404-405.
- 25.- Marrè, M. T., Moroni, A., Albergoni, F. G., Marrè, E. 1988. Plasmalemma Redox Activity and  $H^+$  Extrusion. I. Activation of the  $H^+$  pump by ferricyanide-induced potential depolarization and cytoplasm acidification. *Plant Physiol.* 87, 25-29.
- 26.- Smith, R.L., Zinn, K., Cantley, L.C. 1980. A study of the vanadate-trapped state of the (Na,K)-ATPase. Evidence against interacting nucleotide site models. *J. Biol. Chem.* 255, 9852-9859.
- 27.- Kishimoto, U., Kami-ike, N., Takeuchi, Y., Ohkawa, T. 1984. A kinetic analysis of the electrogenic pump of *Chara corallina*. I. Inhibition of the pump by DCCD. *J. Membrane Biol.* 80, 175-183.

- 28.- Smith, J. R., Walker, N. A., Smith, F.A. 1987. Potassium transport across the membranes of *Chara* III. Effects of pH, inhibitors and illumination. *J. Exp. Bot.* **38**, 778-787.
- 29.- Keifer, D.W., Spanswick, R.M. 1978. Activity of the electrogenic pump in *Chara corallina* as inferred from measurements of the membrane potential, conductance, and potassium permeability. *Plant Physiol.* **62**, 653-661.
- 30.- Mimura, T., Tazawa, M. 1986. Light-induced membrane hyperpolarizations and adenine nucleotide levels in perfused Characean cells. *Plant. Cell. Physiol.* **27**, 319-330.
- 31.- Tazawa, M., Shimmen, T., and Mimura, T. 1987. Membrane control in the Characeae. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38**, 95-117.
- 32.- Smith, J. R., Smith, F. A., Walker, N. A. 1987. Potassium transport across the membranes of *Chara*. I. The relationship between radioactive tracer influx and electrical conductance. *J. Exp. Bot.* **38**, 731-751.
- 33.- Serrano, R., Cano, A., Pestaña, A. 1985. The plasma membrane ATPase of *Dictyostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta* **812**, 553.
- 34.- Gallagher, S.R., Leonard, R.T. 1982. Effect of vanadate, molybdate and azide on membrane associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. *Plant Physiol.* **70**, 1335.
- 35.- Ramasarma, T., Crane, F. L. 1981. Does vanadium play a role in cellular regulation? *Curr. Top. Cell. Regul.* **20**, 247-301.
- 36.- Tracey, A., Gresser, M. 1986. Interaction of vanadate with phenol and tyrosine: Implications for the effects of vanadate on systems regulated by tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 609-613.
- 37.- Tester, M. 1988. Pharmacology of  $K^+$  Channels in the Plasmalemma of the Green Alga *Chara corallina*. *J. Membrane Biol.* **103**, 159-169.
- 38.- Franciolini, F., Petris, A. 1990. Chloride channels of biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1031**, 247-259.
- 39.- MacRobbie, E.A.C. 1966. Metabolic effects on ion fluxes in *Nitella translucens* I. Active influxes. *Aust. J. Biol. Sci.* **19**, 363-370.
- 40.- Reid, R.J., Walker, N.A. 1983. Adenylate concentrations in *Chara*: Variability, effects of inhibitors and relationship to cytoplasmic streaming. *Aust. J. Plant. Physiol.* **10**, 373-383.

- 41.- Hansen, U-P., Kolbowski, J., Dau, H. 1987. Relationship between photosynthesis and plasmalemma transport. *J. Exp. Bot.* **38**, 1965-1981.
- 42.- Vanselow, K.H., Hansen, U-P. 1989. Rapid effect of light on the  $K^+$  channel in the plasmalemma of *Nitella*. *J. Membrane Biol.* **110**, 175-187.
- 43.- Serrano, R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 61-94.
- 44.- Villalobo, A. 1982. Potassium Transport Coupled to ATP hydrolysis in reconstituted proteoliposomes of yeast plasma membrane ATPase. *J. Biol. Chem.* **257**, 1824-1828.
- 45.- Dring, M.J. 1988. Photocontrol of development in algae. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 157-174.

## CONCLUSIONES

Bajo condiciones fisiológicas el plasmalema de células internodales de *Nitella translucens* colocadas en la oscuridad permanece hiperpolarizado con respecto al potencial de Nerust para el potasio. Este potencial electrogénico resulta ser altamente sensible al ortovanadato de sodio, lo que sugiere que el sistema responsable de este potencial hiperpolarizado es la  $H + ATPasa$  de membrana plasmática. Nuestros datos contradicen la idea, ampliamente difundida, de que en condiciones de oscuridad el plasmalema se encuentra en el estado K. Los resultados que obtuvimos demuestran que los parámetros eléctricos de *Nitella translucens* resultan fuertemente afectados cuando se añade vanadato al medio externo. Finalmente, nuestros experimentos apoyan la teoría de que la bomba electrogénica de *Nitella translucens* se comporta como una fuente de voltaje constante en serie con una conductancia.

## BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

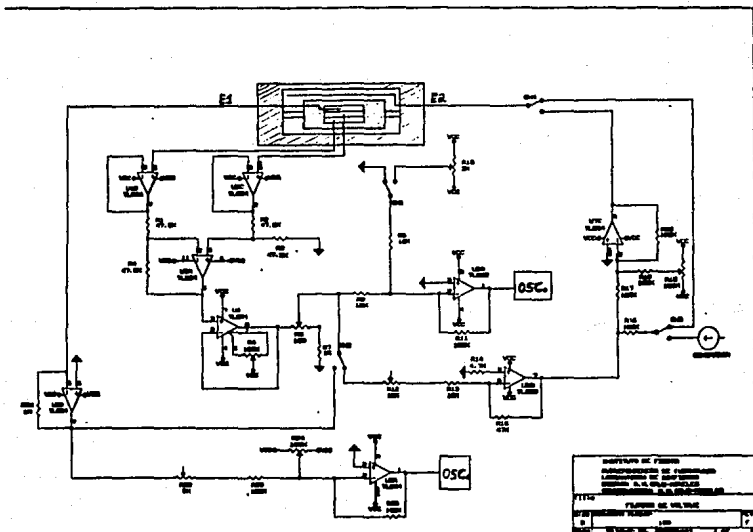
Los siguientes libros aún no están a la venta, o al menos no han llegado noticias de ello al tercer mundo; sin embargo, probablemente a partir de 1991 será posible obtenerlos, por lo que me ha parecido adecuado referirlos lo más completamente posible:

• **Role of Calcium in Biological Systems.** L. J. Anghileri, editor. Vol. 5. CRC Press, Boca Raton (FL) [Role of  $Ca^{+}$  in excitable channels and electrogenic pumps in *Chara* plasmamembrane and other cells. Tsutsui, I.]

• **Recent trends in Charophyte research.** Eds. N. M. Noor and S. K. Bhatnagar.

• **Berestovskij, G.N. et al.** Characean Algae and their Uses in Investigations of the Biological Processes of the Cell. Vilnius. (Existe una versión en ruso publicada en 1973).

# APÉNDICE I



## APÉNDICE II

```

#ix:type energia.pas
Program energia;

const

  pi = 3.1415927;
  planck = 6.6262e-34;
  lus = 2.9979e8;
  boltzmann = 1.3806e-23;
  ep=8.7310e-9;
  area=2.48e-6;
  sigma=5.647e-8;
  lam=2.8970e-3;
  xgmin=70;
  rgmin=547;
  ygmin=60;
  ygmax=170;

type
  vector=array [1..200] of real;

var
  k, i, j, nontos, e, p, d : integer;
  liinf, liisup, liinf, liisup, intervalo, energia, volt, ampere, h,
  u, g, b, h, integral, T, densidad, din, c2, io, cu, f, q, fu, z : real;
  r : char;
  architect;
  x, y: vector;
  xmax, xmin, ymax, ymin: real;

function vax(v: vector; d: integer): real;
var
  ax: real;
  q: integer;
begin
  ax:=0;
  for q:=2 to d do
    if v[q]>ax then
      ax:=v[q];
    end;
  end;
function vmi(v: vector; d: integer): real;
var
  mi: real;
  q: integer;
begin
  mi:=v[1];
  for q:=2 to d do
    if v[q]<mi then
      mi:=v[q];
    end;
  end;
function max(a, b: real): integer;
var
  mx: real;
begin
  mx:=a;
  if b>mx then
    mx:=b;
  end;
  mx:=trunc(mx);
end;
function min(a, b: real): integer;
var
  mi: real;
begin
  mi:=a;
  if b<mi then
    mi:=b;
  end;
  mi:=trunc(mi);
end;

```



```

function yscal(xreal):integer;
begin
  yscal:=max((min((ygal+trunc((ygaax-ygain)/(x-xmin)/(yaxx-ymin)),ygaax),ygal)
  and)
function yscal(xreal):integer;
begin
  yscal:=max((min((ygaax-trunc((ygaax-ygain)/(x-ymin)/(yaxx-ymin)),ygaax),ygal)
  and)
begin
  writeln('CALCULO DE ENERGIA RADIADA');
  writeln('Programa util en el rango Rayos X blandos-ondas de I.V. ');
  writeln('Los datos solicitados deben darse en unidades MKS');
  writeln('El espectro inicia en la longitud de onda=');
  readln(l1inf);
  writeln('El espectro termina en la longitud de onda=');
  readln(l1sup);
  npuntos:=50 (32700);
  writeln('Cual es el voltaje de alimentacion (en voltios)?');
  readln(Volt);
  writeln('Y cual es la corriente (en amperes)?');
  readln(Ampere);
  writeln('El calculo terminara en 20 segundos ');

  M:=Volt@ampere;
  T:=sqrt((M)/(area * c1qa));
  l:=l1sup/l1;
  c2:=pi*hc*1uz@boltzmann;
  l1inf:=c2/(l1inf@T);
  l1sup:=c2/(l1sup@T);
  intervalo := l1sup - l1inf;
  i := 0;
  integral := 0;
  b := intervalo / npuntos;
  u := l1inf - b/c;
  h := 0;
  for j := 0 to (npuntos - 1) do
    begin
      u := u + b;
      f:=t@sqrt(u)/(exp(u)-1);
      h := h + f;
    end;
  integral :=-1 h * b);
  densidad:= epsqr(T)*sqrt(T)*integral;
  energia:=densidad*area;
  z:=((l1sup-l1inf)/(200));
  assign(arch,'espectro');
  rewrite(arch);
  writeln(arch,200);
  for q:=1 to 200 do
    begin
      d1:=l1inf@boltzmann/T;
      f:=pi*planck*1uz/d1;
      c:=l1inf@sqrt(sqrt(l1inf));
      g:=planck*1uz@sqrt(1uz)/(c@t@exp(fu)-1);
      writeln(arch,l1inf,g);
      l1inf:=l1inf + z;
    end;
  close(arch);
begin
  assign(arch,'espectro');
  reset(arch);
  readln(arch,d);
  for p:=1 to d do
    readln(arch,x(p),y(p));
  close(arch);
  HIRes;
  HIResColor (3);
  xmax:=vmax(x,d);
  xmin:=vmin(x,d);
  ymax:=vmax(y,d);
  ymin:=vmin(y,d);
  for p:=1 to d-1 do
    draw(xscal(x(p)),yscal(y(p)),xscal(x(p+1)),yscal(y(p+1)));
  end;
begin
  if vmin<0 then
    draw(xscal(0),yscal(vmin),xscal(0),yscal(vmax));
  else
    draw(xscal(xmin),yscal(ymin),xscal(xmax),yscal(ymax));
  if vmin<0 then
    draw(xscal(xmin),yscal(0),xscal(xmax),yscal(0));
  else
    draw(xscal(xmin),yscal(xmin),xscal(xmax),yscal(xmin));
  end;
writeln('LA ENERGIA RADIADA POR LA FONTO EN ESTA REGION ES:');
writeln(energia);
writeln('LA TEMPERATURA DEL FILAMENTO ES (en grados K) =');
writeln(T);
writeln('LA EMISION MAXIMA ESTA EN LA LONGITUD DE ONDA =');
writeln(l1inf);
writeln('El espectro del tubo en esta region es:');
end.

```

## PLANT PHYSIOLOGY

## Manuscript Review Form

Please return the manuscript in about two weeks with the signed original review form and one copy. You may keep the other copy for your files.

Author(s) R.M. Cruz-Nireles and I. Ortega-Blake	Manuscript number 90-775
Title "The effect of $\text{Na}_2\text{VO}_4$ on the P state of <i>Nitella translucens</i> "	

Reviewer recommendations. Please check any that are applicable.

 ACCEPT

 REVISIONS NEEDED

 DECLINE

 As is

 Little new information

 After minor revision

 Inadequate documentation

 All other comments will be written in manuscript or on separate sheet.  Not suitable for Plant Physiology.

Reviewer's comments for consideration by author(s). Minor corrections may be written in pencil directly on this manuscript. Use of a separate sheet is recommended. Please do not write on the back of this form.

This paper presents well executed research on generation of the electrogenic membrane potential in *Nitella*. While this is a much-plowed field, the authors present one new result, the ability of vanadate to inhibit the electrogenic ATPase from outside the cell (it had previously been known to inhibit from the inside), and one result, the maintenance of electrogenesis in the dark, which is not totally novel but is relatively rare. The analysis of the data is based on well accepted techniques, based on solid reading of the literature. The analysis of the pump activity depends on the lack of effect of vanadate on the passive resistance; the authors show some data which contradict this assumption (p. 15). They deal with this problem but fail to address one possible indirect effect of vanadate on passive resistance, and that is voltage-dependent channels which open or close as a result of vanadate-induced membrane depolarization.

One serious error that must be corrected before the paper can be published is the "measurement" of  $E_K$  (p. 9).  $E_K$  is not measured;  $E_K$  is calculated. In this case, using a reasonable value of 115 mM for cytoplasmic  $K^+$  activity, I calculate  $E_K$  to be -176 mV. What they measure is the diffusion potential, assuming the cell depolarizes to the  $K$  state at high external concentrations of  $K^+$ . This will be somewhat positive to  $E_K$ , depending on other passive permeabilities, and will not change by 99 mV per 10-fold concentration, especially at low  $K^+$  concentrations, as shown by the Goldman-Hodgkin-Katz equation. However, I agree that when the membrane potential is -142 mV at low external  $K^+$  with  $E_K$  of -176 mV, a  $K^+$ -dominated diffusion potential is a reasonable explanation.

I am concerned about the legibility of the figures, especially the axis legends.

On p. 10, the authors claim the Fig. 5 shows a slope of 0.1, without units. I judge the slope of this line to be 5 mV (pH unit) $^{-1}$ , and question their calculation.

If Plant Physiology is serious about enforcing the use of S.I. units, they will require membrane conductance in  $S\ m^{-2}$  instead of resistance in  $\Omega\ cm^2$ . If the authors wish to keep these units, however, I strongly recommend that the axis legends state " $R_m$  in  $k\Omega\ cm^2$ " instead of " $R_m$  in  $K\Omega\ cm^2$ " which is harder to read; appropriate sub- and superscripts, if possible, would help also.

Minor errors are noted in the text.

CONFIDENTIAL

Reviewer's name (print or type)

Reviewer's signature

Date

Mary A. Bisson

Mary A. Bisson

8/22/90

Review of MS 90-775 by Cruz-Nirales and Ortega-Blake. Reviewer 2

This is an important piece of work demonstrating that vanadate applied externally can inhibit the electrogenic pump in *Nitella*, and that the observed effect on the electrophysiological properties of the plasma membrane are consistent with the pump acting as a constant voltage, as opposed to constant current, source.

The authors need to check carefully the abbreviations used in the text to ensure conformance with the usage in Plant Physiology.

Page 5, line 9. Presumably the authors mean high membrane con-  
ductance, not resistance.

Page 7, line 13. The method of vanadate preparation should be specified carefully since vanadate occurs in several oxidation forms depending on how it is made up.

Page 8, line 15. The description of resistance measurement may have suffered in translation. The authors have the current being passed between two electrodes in the external solution. Also, a 1 MΩ resistor is not large enough to give a constant current if micro-electrodes are used for current injection. How was the current measured?

Page 11, line 4 and page 12, line 18. It is not clear from the description of the experiment exactly at what stage the vanadate was applied to the cell. On p. 12 it is implied that vanadate was applied separately at all pH values between 5 and 10, but Fig. 3 is for a single cell.

Page 16, line 12. This value for  $G_0$  is somewhat lower than that obtained by Spanswick (In Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp. 305-316, 1980) from the effects of  $CO_2$  on the membrane potential and conductance of this species.

Numerous corrections have been made on the manuscript, but the final version will probably need careful proof reading.

“Así que, hermanos, cuando fui a vosotros para anunciaros el testimonio de Dios, no fui con excelencia de palabras o de sabiduría. Pues me propuse no saber entre vosotros cosa alguna sino a Jesucristo, y a éste crucificado. Y estuve entre vosotros con debilidad, y mucho temor y temblor; y ni mi palabra ni mi predicación fue con palabras persuasivas de humana sabiduría, sino con demostración del Espíritu y de poder, para que vuestra fe no este fundada en la sabiduría de los hombres, sino en el poder de Dios.

Sin embargo, hablamos sabiduría entre los que han alcanzado madurez; y sabiduría, no de este siglo, ni de los príncipes de este siglo, que perecen. Mas hablamos sabiduría de Dios en misterio, la sabiduría oculta, la cual Dios predestinó antes de los siglos para nuestra gloria, la que ninguno de los príncipes de este siglo conoció; porque si la hubieran conocido, nunca habrían crucificado al Señor de gloria. Antes bien, como está escrito:

Cosas que ojo no vio, ni oído oyó,  
Ni han subido en corazón de hombre,  
Son las que Dios ha preparado para los que le aman.

Pero Dios nos las reveló a nosotros por el Espíritu; porque el Espíritu todo lo escudriña, aún lo profundo de Dios. Porque ¿quién de los hombres sabe las cosas del hombre, sino el espíritu del hombre que está en él? Así tampoco nadie conoció las cosas de Dios, sino el Espíritu de Dios.

Y nosotros no hemos recibido el espíritu del mundo, sino el Espíritu que proviene de Dios, para que sepamos lo que Dios nos ha concedido, lo cual también hablamos, no con palabras enseñadas por sabiduría humana, sino con las que enseña el Espíritu, acomodando lo espiritual a lo espiritual. Pero el hombre natural no percibe las cosas que son del Espíritu de Dios, porque para él son locura, y no las puede entender, porque se han de discernir espiritualmente. En cambio el espiritual juzga todas las cosas, pero él no es juzgado de nadie. Porque ¿quién conoció la mente del Señor? ¿Quién le instruirá? Mas nosotros tenemos la mente de Cristo.”

1 Corintios 2: 1-16.

“Nadie se engañe a sí mismo; si alguno entre vosotros se cree sabio en este siglo, hágase ignorante, para que llegue a ser sabio. Porque la sabiduría de este mundo es insensatez para con Dios; pues escrito está: El prende a los sabios en la astucia de ellos. Y otra vez: El Señor conoce los pensamientos de los sabios, que son vanos.

Así que, ninguno se glorie en los hombres; porque todo es vuestro: sea Pablo, sea Apolos, sea Cefas, sea el mundo, sea la vida, sea la muerte, sea lo presente, sea lo porvenir, todo es vuestro, y vosotros de Cristo y Cristo de Dios."

1 Corintios 3: 18-23.