

UCH-FC  
DOC-8  
W 853

PERMEABILIDAD DE LA FIBRA MUSCULAR DE  
MEGALANUS PSITTACUS AL AGUA Y NO ELECTROLITOS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN FISIOLÓGIA  
FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE

POR

JOSE DANIEL WOLFF FERNANDEZ

SANTIAGO DE CHILE 1974

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor, el Dr. Fernando Vargas, por su ayuda y el permanente estímulo que me proporcionó durante la realización de éste trabajo.

Deseo agradecer, especialmente, a los Dres. Osvaldo Alvarez y Ramón Latorre, por su desinteresada ayuda en los aspectos teóricos y experimentales de este trabajo.

A los Dres. Mitzy Canessa y Mario Luxoro, por su constructiva crítica en la elaboración de este manuscrito.

Agradezco a los Sres. Sergio Ubilla y Roberto Moreno, que me proporcionaron su valiosa colaboración en la parte técnica de este trabajo.

Finalmente, a la Sra. Ildina Cerda, por su infinita paciencia en mecanografiar este manuscrito.

INDICE

I	INTRODUCCION	.....	3
II	MATERIAL Y METODOS	.....	11
III	RESULTADOS	.....	39
IV	DISCUSION	.....	58
V	RESUMEN	.....	83
VI	REFERENCIAS	.....	86

## INTRODUCCION

Los estudios clásicos de Overton a fines del siglo pasado (1899) hechos en células vegetales, han establecido que el transporte de no-electrolitos a través de las membranas biológicas es un fenómeno pasivo y que sus velocidades de penetración están determinadas principalmente por sus coeficientes de partición entre solventes lipídicos y el agua.

Estos hallazgos constituyeron al mismo tiempo una de las primeras indicaciones acerca de la naturaleza lipídica de la membrana.

Este autor encontró que moléculas tales como éteres, cetonas y aldehídos, que son solubles en solventes no polares, penetraban con mucha rapidez, mientras que el glicerol, etilén-glicol y eritrol que son moléculas muy polares, lo hacían mucho más lentamente. Sin embargo, no fue posible establecer un paralelismo estricto entre la velocidad de penetración y solubilidad en lípidos.

Collander (1949, 1954), ha realizado estudios más cuantitativos y sistemáticos en células de Chara geratophylla y de Nitella flexilis. Sus resultados han confirmado los hallazgos de Overton respecto del factor solubilidad en lípidos, pero indican que el tamaño molecular también tiene importancia en determinar la facilidad de pe-

netración en la membrana.

Höber y Orskov (1933, cit. de H. Davson, 1970), en estudios realizados en el bacterio Beggiatoa mirabilis observaron que las velocidades de penetración son proporcionales al tamaño molecular sólo cuando se comparan series de compuestos homólogos; por ejemplo, aminas ácidas, alcoholes, cetonas, etc. Para compuestos del mismo tamaño molecular, la permeabilidad está determinada por la solubilidad en lípidos.

Los estudios de permeabilidad a los no-electrolitos en células animales, se han realizado principalmente en glóbulos rojos, axón gigante de calamar y epitelio de vesícula biliar.

Villegas y colaboradores (1960, 1961, 1971), han encontrado en axones gigantes del calamar Doryteuthis plei que las principales barreras a la difusión de los no-electrolitos son el axolemma, de aproximadamente 80 Å de espesor, y la célula de Schwann, que está atravesada por los canales de unos 60 Å de diámetro y de 4 a 5 μ de largo.

Estos autores, determinaron los coeficientes de filtración y de permeabilidad para el agua, estudiando flujos causados por una gradiente osmótica de una molécula impermeante. Mediante estudios de transporte de agua tritiada, determinaron también el coeficiente de permeabilidad difusional. Los valores obtenidos fueron  $11,0 \cdot 10^{-11}$  y

$1.4 \cdot 10^{-4}$  (cm/seg) respectivamente y esta discrepancia la atribuyen a la existencia de canales acuosos en la membrana del axón que permitirían un flujo laminar del agua cuando se establece una gradiente de concentración.

Posteriormente, Villegas y Barnola (1961), determinaron en axón gigante de Doryteuthis la permeabilidad a una serie de no-electrolitos en términos del coeficiente de reflexión de Staverman ( $\sigma$ ). Este coeficiente toma un valor máximo de uno para sustancias que son impermeantes y decrece progresivamente hacia cero a medida que el coeficiente de permeabilidad aumenta.

Los resultados obtenidos indican que estas membranas son poco permeables al glicerol, etilén-glicol y urea, y medianamente permeables al etanol y la formamida. Vargas (1968), ha determinado el coeficiente de reflexión para algunos no-electrolitos en axones gigantes de Dosidicus gigas de la razón entre los potenciales de flujo provocados por gradientes osmóticos idénticas de las moléculas de prueba y la sacarosa. Encontró que los coeficientes de reflexión para urea y glicerol, son semejantes a los obtenidos en Doryteuthis plei por Villegas y Barnola. Sin embargo, el etilén glicol y la formamida parecen ser mucho más permeantes en Dosidicus. Ya que éstas moléculas son muy solubles en lípidos, Vargas postula que este factor puede ser más importante en Dosidicus que en Doryteuthis en determinar la permeabilidad.

Hidalgo y Latorre (1970), han determinado los flujos de entrada y los coeficientes de permeabilidad de algunos no-electrolitos en axón perfundido de Dosidicus gigas, encontrando que las permeabilidades son función de la polaridad de las moléculas con la excepción del etilén glicol que entra más rápido que lo esperado de su coeficiente de partición aceite/agua.

Bunch y Edwards (1969), han estudiado la permeabilidad de la fibra muscular de Balanus nubilis al agua tritiada y a algunos no-electrolitos, haciendo determinación de los coeficientes de reflexión. Los valores que obtuvieron para el glicerol y la urea, usando el método de equilibrio osmótico, son más altos que los encontrados por Vargas y Villegas en axón. Observaron, además, que moléculas de alto peso molecular pero muy solubles en lípidos, como el DMSO (Dimetil sulfoxido), presentan valores de  $\bar{C}$  más pequeños. De estos resultados, los autores concluyen que la permeabilidad a los no-electrolitos en estas células, parece estar determinada por el coeficiente de partición aceite/agua, más que por el tamaño molecular.

Sorenson (1971), estudió también la permeabilidad al agua en fibras musculares del cangrejo Chionoectes bairdi por métodos osmóticos y de difusión de trazadores, encontrando que el coeficiente de permeabilidad medido, usando trazadores, es mucho menor que el obtenido por métodos osmóticos. Esta discrepancia, la explica por la presencia de poros de 35 Å de radio en la membrana, que resultan ser mucho más

grandes que los postulados para las membranas de glóbulo rojo y de axón. Del análisis de la cinética de intercambio de agua deuterada, Sorenson postula la existencia de dos compartimentos para el agua: el sarcoplasma, que daría cuenta del 60 a 70% del agua y los organelos intracelulares, que darían cuenta del resto.

Wright y Diamond (1969), han determinado valores de  $\sigma$  para una gran cantidad de no-electrolitos en epitelio de vesícula biliar de conejo, de la razón entre los potenciales de flujo provocados por una molécula de prueba y la sacarosa. Los resultados mostraron que  $\sigma$  disminuía a medida que aumentaba el coeficiente de partición aceite/agua, lo que los llevó a concluir que las fuerzas intermoleculares que determinan la permeabilidad, son las mismas que determinan la solubilidad en lípidos. Estos resultados fueron confirmados posteriormente, por Smulders y Wright (1971) mediante técnicas de difusión de trazadores. Encontraron algunas desviaciones para las moléculas ramificadas, que aparecen con valores de  $\sigma$  más altos que lo esperado, efecto que atribuyen a una anisotropía en los lípidos de la membrana. Estas desviaciones también las encontraron en el caso de las moléculas pequeñas poco solubles en lípidos como la urea, y que presentan un efecto de temperatura anómalo. Estos resultados son explicados, suponiendo que estos no-electrolitos penetran a través de regiones de la membrana con alta concentración de grupos



polares asociados a moléculas de agua estructuradas.

Los resultados de los estudios de permeabilidad al agua y no-electrolitos en glóbulos rojos (Goldstein y Solomon (1960), Solomón (1968), Sha'afi y Gary-Bobo (1973) ), se han interpretado suponiendo que la membrana de estas células actúa como solvente selectivo y como filtro molecular. El agua, que presenta una alta permeabilidad en la membrana, se movería por difusión pasiva y flujo viscoso, del mismo modo que lo hace en solución.

Se ha encontrado que los no-electrolitos hidrofílicos pequeños penetran muy rápido, lo que también se ha explicado suponiendo que se mueven a través de canales acuosos; en cambio los no-electrolitos lipofílicos, pasarían a través de la membrana por disolución en la parte lipídica de ella.

### OBJETIVOS

Como se puede apreciar, en general los estudios reseñados confirman las reglas de Overton respecto de los principales factores que determinan la permeabilidad de los no electrolitos. Sin embargo, también se observa que existen algunas importantes discrepancias. Por ejemplo, en algunos casos, la velocidad con que difunde

un no-electrolito pequeño, es diferente en distintas membranas.

La membrana de axón parece ser poco permeable a la urea, en cambio las membrana de glóbulo rojo y epitelio de vesícula biliar parecen ser muy permeables. Como se ha dicho anteriormente, estas diferencias pueden ser atribuidas principalmente a diferencias en la composición y estructura química de estas membranas o a diferentes mecanismos de transporte, pero también puede ser de importancia el hecho que éstos valores han sido obtenidos por distintas técnicas.

En muchos de los sistemas estudiados, sólo se han determinado la permeabilidad de algunos pocos no-electrolitos, por esta razón, juzgamos importante hacer un estudio sistemático de la permeabilidad de series de no-electrolitos, usando diferentes métodos experimentales.

Como material se eligió la fibra muscular de Balanus (Barnes, 1968), ya que éstas células resultan muy apropiadas, por su gran tamaño, para hacer estudios de efectos osmóticos y de difusión de trazadores.

Se enfocará la atención especialmente en efecto del tamaño molecular, del grado de polaridad de los no-electrolitos y en el efecto de grupos químicos como OH, NH<sub>2</sub> y CO, que poseen átomos electronegativos y que son capaces de establecer enlaces de hidrógeno con el agua.

Los flujos osmóticos causados por gradiente de concentración de no-electrolitos, se determinarán midiendo potenciales de flujo, cambios de volúmen y cambios de la densidad óptica de la fibra. De la razón entre los efectos provocados por una molécula de prueba y una molécula impermeante, se determinarán los valores de los coeficientes de reflexión osmóticos. Los coeficientes de permeabilidad difusional, se determinarán haciendo medidas de captación de trazadores radioactivos.

Otro propósito de este trabajo, es contribuir al mismo tiempo, a una caracterización de la membrana de las fibras de la especie chilena del cirripedio Megabalanus psittacus que, al igual que las de Balanus nubilis, se ha utilizado como material para el estudio de las propiedades eléctricas y mecánicas de los músculos de invertebrados, en especial del problema del acoplamiento excitación-contracción (Brinley, 1968; Hagiwara, 1966, 1968; Ashley y Ridgway, 1970; Mobley y Page, 1971; Keynes, Rojas Taylor y Vergara, 1973).

Los estudios de microscopía óptica y electrónica, han demostrado que la estructura morfológica de la superficie de estas fibras, es extraordinariamente compleja debido a la existencia de múltiples invaginaciones y túbulos. En estas regiones, la difusión de solutos está muy afectada por la existencia de capas no agitadas y efectos de dilución por flujos de agua. Por esta razón, se discutirán de qué manera estos efectos pueden explicar las discrepancias entre los resultados obtenidos con distintos métodos experimentales.

## MATERIAL Y METODOS

Los experimentos se hicieron en fibras musculares aisladas de los músculos depresores del cirripedio Megabalanus psittacus.

Los animales se recolectaron en la zona de Valparaíso y Quintero y en el Laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Ciencias, Montemar. Se seleccionaron ejemplares intactos que fueron conservados a temperatura ambiente en acuarios aislados con renovación constante del agua de mar.

Quincenalmente se trajeron ejemplares a Santiago, donde se conservaban en un acuario con capacidad para 250 lts. instalado en una pieza fría a temperatura entre 6 y 8°C. El acuario constaba de un sistema de aireación y filtros de arena y carbón activado. Hasta un máximo de 10 ejemplares se mantenían simultáneamente y el agua de mar era cambiada dos veces a la semana con agua de mar natural traída una vez por semana de Montemar.

### Disección de los Músculos.-

En primer lugar se procedió a romper longitudinalmente la concha con la ayuda de un formón y un cortador. Se cortó luego los dos paquetes de músculos ventrales y el cuerpo del animal, lo que dejó un campo libre

para el aislamiento de los dos paquetes laterales y de los dos rostrales (depresores del scutum) que tenían las fibras más largas. El interior de la concha se limpió de la hemolinfa y de otras sustancias que rodean el músculo, mediante succión.

La membrana del escudo se separó de la concha, se cortó con tijeras la inserción de los músculos a las piezas calcáreas tergo y escudo, de éste modo se obtuvieron paquetes de músculos con un extremo unido a un trozo de concha y el otro unido a un trozo de membrana del escudo.

Se llevó el paquete que contenía más o menos 50 fibras a una cámara de lucita que contenía agua de mar artificial (AMA) sin Calcio, para realizar el aislamiento de las fibras individuales.

Con ayuda de pinzas y tijeras finas, se separó cuidadosamente los tendones que unen cada una de las fibras a la membrana. Al empezar un experimento, se ató un hilo de seda al tendón y otro en el extremo opuesto; luego se cortó la fibra cerca de la concha. Esta operación produjo a veces el acortamiento de la fibra casi siempre reversible, pero se podía prevenir usando AMA sin Calcio durante la disección. Todas estas operaciones se realizaron a temperaturas entre 12 y 16°C y los músculos así obtenidos se conservaron en un refrigerador (8°C) y fueron usados durante el día en los experimentos osmóticos o en los experimentos con trazadores.

Soluciones

Se utilizaron soluciones de AMA de la siguiente composición:

	<u>AMA Normal</u>	<u>AMA sin Calcio</u>
NaCl	461,5 mM	461,5 mM
KCl	8,0 mM	8,0 mM
MgCl <sub>2</sub>	12,0 mM	12,0 mM
CaCl <sub>2</sub>	20,0 mM	-----
Sacarosa	-----	48,0 mM
Tris	10,0 mM	10,0 mM

Las soluciones se hicieron en agua destilada desionizada y el pH de las soluciones se ajustó a 7,6 titulando el Tris base con HCl. Las soluciones hiperosmóticas se hicieron disolviendo los no electrolitos en AMA normal.

Las soluciones de los isótopos radioactivos se prepararon agregando trazador al AMA de modo que alcanzasen una concentración aproximada entre 2 a 5  $\mu\text{C}/\text{ml}$ .

En los experimentos osmóticos, se hicieron correcciones para los coeficientes de actividad de las soluciones de no electrolitos. Para una concentración de 400 mM se obtuvo los siguientes valores de osmolaridad (Handbook CRC, 1966):

Sacarosa	425 mOsm
Glicerol	388 mOsm
Etilen glicol	375 mOsm
Urea	365 mOsm
Rafinosa	438 mOsm
Glucosa	397 mOsm

#### A) Medición de la Permeabilidad por Métodos Osmóticos

Un modo de determinar la facilidad con que los distintos solutos pueden pasar a través de la membrana celular, es mediante la determinación de los coeficientes de reflexión osmóticos ( $\sigma$ ).

Al poner una célula en un medio anisotónico, se produce un flujo de agua desde la zona de más alto potencial químico hacia la zona de menor potencial químico y ésto se refleja en un cambio en el volumen celular. Se sabe que la velocidad de flujo osmótico a través de una membrana, causada por una gradiente de concentración, depende de la permeabilidad de la membrana a los distintos solutos.

La teoría clásica de las membranas semi-permeables, supone a la membrana impermeable a los solutos y permeable sólo al solvente (agua). Para el flujo osmótico de solutos a los cuales la membrana es permeable, Kedem y Katchalsky (1958) y Katchalsky y Curran (1965), han desarrollado un tratamiento teórico basado en la Termodinámica de Procesos Irreversibles. La expresión para el flujo osmótico viene dada por:

$$J_v = \sigma \cdot L_p RT \Delta C \quad (1)$$

en que  $L_p$  es la conductividad hidráulica de la membrana,  $J_v$  el flujo del volumen,  $\sigma$  el coeficiente de reflexión,  $R$  la constante de los gases,  $T$  la temperatura absoluta y  $\Delta C$  la diferencia de concentración a través de la membrana.

La relación entre el coeficiente de reflexión y el coeficiente de permeabilidad está dada por la siguiente expresión (Katchalsky y Curran, 1965).

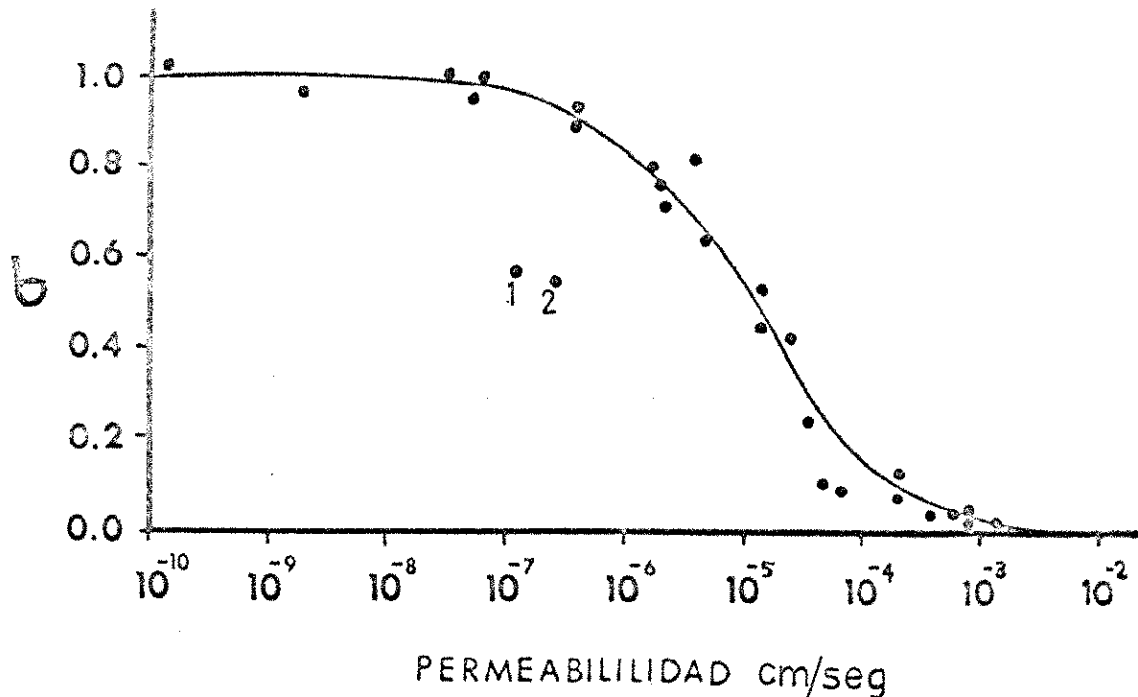
$$\sigma = 1 - \left( \omega \frac{\bar{v}_s}{L_p} + \frac{f_{sw} \cdot x}{\phi_w} \right) \quad (2)$$

en que  $\omega$  es la movilidad del soluto en la membrana y está definido como el producto de  $RT$  por el coeficiente de permeabilidad,  $P$ ;  $\bar{v}_s$  es el volumen molar parcial del soluto,  $f_{sw}$  el coeficiente de fricción entre el soluto y el agua,  $\Delta x$  el espesor de la membrana y  $\phi_w$  el contenido de agua de la membrana.

Estas relaciones, señalan que para solutos impermeantes ( $\omega = 0$ ) el coeficiente de reflexión será igual a uno. A medida que aumenta  $\omega$ , el valor de  $\sigma$  decrece. El término  $\frac{f_{sw} \cdot x}{\phi_w}$  es muy chico para la mayoría de las moléculas, por lo que generalmente se desprecia. El gráfico de la Figura 1, muestra la relación entre  $\sigma$  y  $P$  medidos experimentalmente (Wright y Diamond, 1969).



FIGURA 1



Relación entre los coeficientes de reflexión osmóticos ( $\sigma$ ), medidos en vesícula biliar de conejo y las constantes de permeabilidad medidas en Nitella mucronata, para una variedad de solutos de diferentes tamaños, formas y solubilidad (Wright y Diamond, 1969).

Excepto para urea (1) y metil urea (2), los resultados se correlacionan estrechamente.

De estas consideraciones, puede desprenderse un diseño experimental para medir coeficientes de reflexión: comparar el flujo de agua causado por una solución hipertónica de un soluto en estudio, con el flujo causado por una solución de igual concentración de un soluto impermeante ( $\sigma = 1$ ); de la razón puede obtenerse  $\sigma$  para el soluto.

Sobre las bases de estas consideraciones, se intentó determinar el flujo de agua mediante los siguientes métodos:

- a) medición del cambio del potencial de membrana,
- b) medición del cambio del diámetro de la fibra,
- c) medición del cambio de la densidad óptica.

#### Medición del cambio del potencial de membrana.-

Las diferencias de concentración a través de la membrana, generan un flujo de agua que a su vez produce un movimiento de arrastre de iones, generando una diferencia de potencial eléctrico debido a las diferentes movilizaciones de las especies químicas. Si la membrana posee cargas fijas en su estructura, se verán favorecidos en su paso los iones de carga opuesta (contraiones) y retardados los iones de igual signo (coiones).

Existe una relación directa entre un flujo osmótico y el potencial provocado. Este potencial de flujo ( $E_j$ ) está relacionado con el coeficiente de reflexión a tra-

vés de la siguiente expresión (Katchalsky, 1965).

$$E_j = R_{21} \cdot \sigma RT \cdot \Delta C \quad (3)$$

en que el factor  $R_{21}$  es una medida de magnitud del potencial eléctrico provocado por un flujo de volúmen unitario.

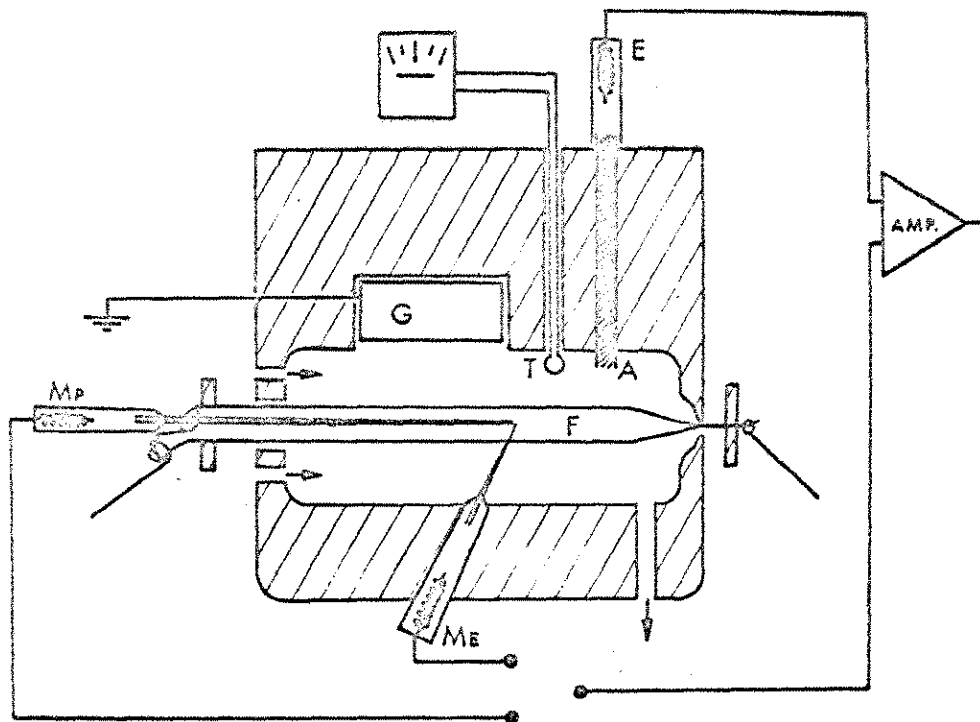
Haciendo la razón entre el potencial  $E_j$  provocado por una molécula de prueba y una molécula impermeante ( $\sigma = 1$ ), se puede determinar  $\sigma$  para otros no electrolitos (Vargas, 1968; Wright y Diamond, 1969).

Los experimentos se hicieron usando a la sacarosa como molécula impermeante, ya que se ha comprobado mediante experimentos con trazadores, que su permeabilidad es muy baja (Bunch y Edwards, 1969).

Para medir el potencial intracelular, se dispuso la fibra dentro de una cámara de lucita quedando el extremo cortado y el tendón fuera de la solución. El diseño de la cámara, es esencialmente semejante al de la utilizadas para experimentos con axón de calamar; además, se introdujo en la cámara un teletermómetro para los registros de temperatura (Figura 2).

La solución de perfusión, se hizo circular a lo largo de la cámara, mediante un sistema alimentado por gravedad y su evacuación se realizó mediante succión. El nivel del líquido se trató de mantener lo más constante posible, ya que variaciones de éste provocaban cambios apreciables de potencial de membrana que interferían con la medición de los potenciales de flujo.

FIGURA 2



Esquema de la cámara para la medición de potenciales.

F, fibra muscular

E, electrodo de Ag/AgCl

Mp, micropipeta

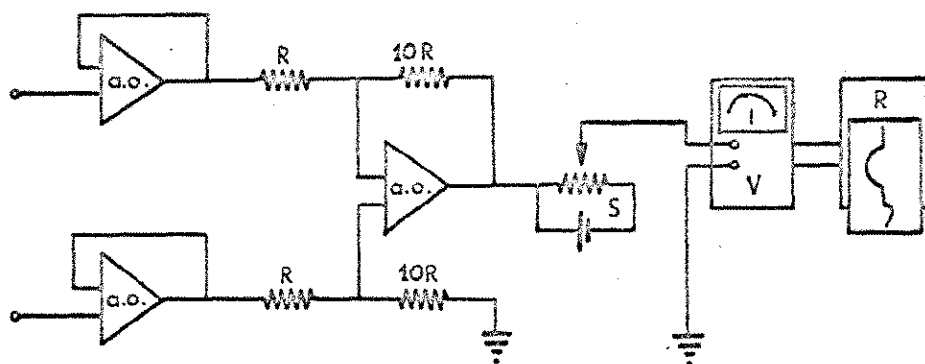
Me, microelectrodo

AMP, circuito amplificador

T, teletermómetro

Las flechas indican la entrada y salida de la solución de perfusión.

FIGURA 2B



Esquema del circuito para la medición de potenciales en fibra muscular de Balanus.

Los 3 amplificadores operacionales (a.o.) forman un sistema amplificador diferencial de ganancia 10.

S circuito supresor de potencial

V voltímetro

R registrador

Para el registro de los potenciales, en la mayor parte de los experimentos se utilizó como electrodo interno un micro electrodo de vidrio lleno con KCl 3 M ( $R$  aproximadamente entre 1 a 2  $M\Omega$ ) en contacto con un electrodo de Ag/AgCl. En algunos experimentos, se usó como electrodo interno una micropipeta de vidrio de 120 al 150  $\mu$ , llena con KCl 0,5 M que se introdujo longitudinalmente en la fibra, y que se conectó a un electrodo de calomel.

Como electrodo externo de referencia se utilizó un electrodo de Ag/AgCl o uno de calomel (cuando se usaba micropipeta) conectados a la cámara a través de un puente de agar-KCl 3 M.

La diferencia de potencial entre los dos electrodos, se midió conectándolos a un amplificador operacional diferencial con una impedancia de entrada de  $10^{14}$  Ohms, y ganancia 10.

La salida del amplificador se conectó a un voltímetro Hewlett-Packard 419-A y éste a su vez a un registrador potenciométrico Hewlett-Packard Moseley 680-M.

Como se trata de medir variaciones del potencial de reposo, se conectó además una fuente de corriente continua variable que permitiera llevar el potencial de reposo a cero, de modo de poder usar mayor amplificación. En todos los registros se utilizó un intervalo de 10 mV para todo el ancho del gráfico (Figura 2B).

La introducción del electrodo interno se hizo con ayuda de un micromanipulador y la operación se controló con ayuda de una lupa estereoscópica Bausch & Lomb con aumento 12,5 X.

Se realizaron algunos experimentos en que se midió simultáneamente cambios de potencial y densidad óptica. En este caso, se utilizó la cámara montada en la platina del microscopio con que se midieron los cambios de densidad óptica.

#### Medición de la variación del diámetro de la fibra.-

Al colocar una fibra muscular en una solución hipertónica, el flujo de salida de agua que se produce provoca una disminución del volumen y por consiguiente del diámetro de la fibra. A fin de interpretar los resultados en forma cuantitativa, se desarrolló un modelo para representar el cambio de diámetro de la fibra en función del tiempo.

Si se supone a la fibra como un cilindro recto de diámetro  $\underline{d}$  y largo  $\underline{l}$ , su volumen estará entonces dado por la expresión:

$$V = \frac{1}{4} \cdot \pi \cdot d^2 l \quad (4)$$

Al poner la fibra en un medio anisotónico, se producirá un cambio de volumen. La relación entre la velocidad del cambio de volumen y el cambio de diámetro se obtiene por derivación:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{1}{2} \cdot \pi \cdot d \cdot l \frac{dd}{dt} \quad (5)$$

El flujo de volumen  $J_V$ , está definido como el volumen que cruza la membrana por unidad área, y la superficie del manto del cilindro está dado por  $\pi \cdot d \cdot l$ , por lo tanto:

$$J_V = \frac{1}{2} \frac{dd}{dt} \quad (6)$$

La expresión  $dd/dt$ , es función del tiempo e interesa su valor inicial. Este valor se puede obtener graficamente de la pendiente inicial de los gráficos del diámetro vs tiempo. Si se supone que el cambio desde el diámetro inicial  $d_0$  hasta el diámetro en la nueva situación de equilibrio  $d_\infty$  sigue una curva exponencial como lo muestran los datos (ver Resultados), podemos escribir entonces:

$$(d - d_\infty) = (d_0 - d_\infty) e^{-\lambda t} \quad (7)$$

$$\frac{dd}{dt} = -\lambda (d_0 - d_\infty) e^{-\lambda t} \quad (8)$$

Como nos interesa el valor a  $t = 0$ :

$$\frac{dd}{dt} = -\lambda (d_0 - d_\infty) \quad (9)$$

Estas ecuaciones predicen que un gráfico de  $\ln(d - d_\infty) / (d_0 - d_\infty)$  vs  $t$  debe ser una recta cuya pendiente es  $-\lambda$ . Experimentalmente, se comprobó la



linealidad de estos gráficos (Figura 10), y  $J_V$  se calculó entonces de la expresión:

$$J_V = \frac{-\lambda}{2} (d - d_{00}) \quad (10)$$

Para hacer estas mediciones, se colocó la fibra en un portaobjetos de lucita que tenía un surco de 4 mm de profundidad por 8 de ancho para alojarlo. Los extremos de la fibra atados a hilos de seda, se fijaron al portaobjetos con plasticina. Las soluciones se hicieron circular con un sistema alimentado por gravedad y con un desagüe mediante succión. El surco con la fibra se cubrió con una lámina de vidrio y la porción cubierta por este vidrio se mantuvo siempre llena de líquido por capilaridad, mientras la parte cortada quedaba fuera, en seco.

Este conjunto se montó en el carro de un microscopio y se observó con un objetivo de 3,5 X. Para medir el diámetro de la fibra, se usó un ocular graduado. En las condiciones usadas, cada división del micrómetro correspondía a 0,88 micrones en la preparación. La calibración se hizo con un portaobjetos graduado en décimas y centésimas de mm.

Se hicieron algunos experimentos en que se midió simultáneamente los cambios de diámetro y de potencial de membrana, usando para ello una cámara de lucita como la anterior. El registro de potencial y la variación del volumen se hicieron como se ha detallado anteriormente.

Para determinar el tipo de relación entre  $\Delta E_m$  y  $\Delta C$ , se hizo una serie de experimentos en que se midieron los cambios de potencial, frente a distintas concentraciones de la molécula de prueba.

Aunque los resultados tenían cierta dispersión, se pudo establecer que existía una relación lineal en el rango entre 0 y 400 mM. En la Figura 8, se muestran los resultados obtenidos en una fibra. Establecida la dependencia lineal, entre  $\Delta C$  y  $\Delta E_m$  en el rango de concentraciones estudiadas, se comparó también el cambio de potencial provocado por soluciones hiperosmóticas de los no electrolitos de prueba, con los cambios provocados por igual concentración de sacarosa; de la razón entre ellos, se determinaron valores de  $\sigma$ .

Los no electrolitos probados fueron glicerol, urea, etilenglicol, rafinosa y glucosa y las concentraciones usadas, fueron 200 y 400 mM.

Los resultados tienen bastante dispersión y poca reproducibilidad, por lo que es difícil decidir si la relación entre el efecto de las moléculas de prueba y la sacarosa representa un valor real.

Los cambios de potencial provocados por urea y glicerol, son, en todo caso, levemente mayores que los provocados por la sacarosa, en cambio los provocados por etilenglicol son menores.

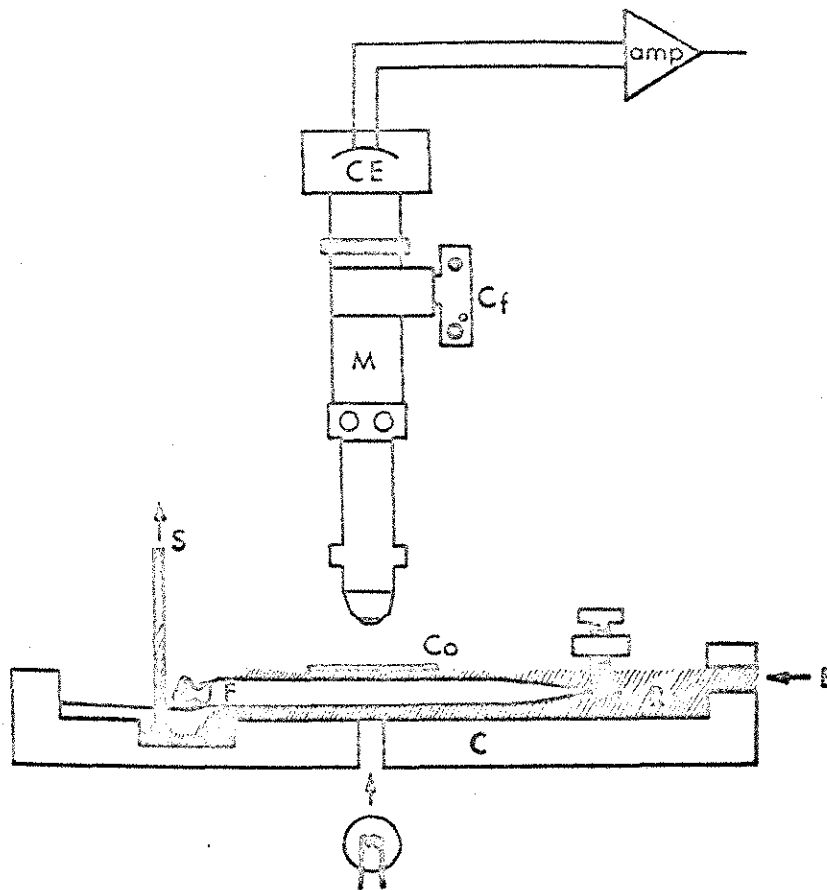
Con los datos obtenidos se calculó un valor del coeficiente de reflexión, de la razón entre el cambio

de potencial provocados por la molécula de prueba y el cambio provocado por la sacarosa. Esta relación se calculó para cada fibra, y los resultados se muestran en la Tabla 1.

#### Medidas del cambio de densidad óptica.-

Varios investigadores han observado, que al cambiar una fibra muscular desde un medio isotónico a uno hipertónico, se produce una disminución en el volumen y la transmitancia de la fibra (Sorenson, 1971). El origen de tal fenómeno ha sido explicado por Reuben (1964) por un proceso de vesiculación de la membrana de la fibra, debido a la salida de agua desde el interior hacia los túbulos e invaginaciones del espacio extracelular. Este fenómeno de vesiculación provocaría dispersión de luz que se traduce en una mayor opacidad del músculo proporcional a la gradiente de concentración. Se pensó entonces, que si existe una correlación entre la cinética del cambio de volumen y del cambio de densidad óptica, se pueden utilizar los cambios de transmitancia como una medida del cambio del volumen de la fibra. Las mediciones de los cambios de densidad óptica se realizaron colocando la fibra en una cámara igual a la usada para los cambios de diámetro, sólo que en este caso se montó en la platina de un microscopio Leitz Ortolux conectado a una fotocelda.

FIGURA 3



Esquema del sistema de medición de Densidad Optica.

M, Microscopio

CE, Celda fotoeléctrica

Cf, Cámara fotográfica

F, Fibra Muscular

Co, Cubreobjetos

C, Cámara de lucita

amp, circuito amplificador

R, Solución de perfusión

E y S, indica la entrada y salida de la solución de perfusión.

Los cambios en la densidad óptica o transmitancia, se midieron conectando la salida de la celda a un registrador potenciométrico Goertz Servogor. Al iniciar cada experimento, se calibró el registrador para tener un 100% de transmitancia, cuando se enfocaba a una zona de la cámara en que sólo había solución. Luego se enfocó una zona de la fibra muscular, cercana al tendón. Para evitar perturbaciones provocadas por la luz proveniente de la cámara o de otro sitio, la fotocelda tenía un sistema de diafragma, con el que se podía aislar una pequeña zona en el centro de la fibra.

El microscopio tenía también adaptada una cámara fotográfica, con la que se podía seguir la variación del cambio de diámetro, tomando fotos a intervalos regulares (Figura 3).

Contenido de agua.— Se tomaron las fibras aisladas, previamente equilibradas en AMA, y se secaron en papel filtro. Luego se pesaron y se determinó su peso húmedo. Se colocaron en una estufa a 100°C durante 20 horas y se pesaron nuevamente. El contenido de agua se determinó como la diferencia entre el peso húmedo y el peso seco, expresado en ml/gr de peso seco.

B) Medición de los coeficientes de permeabilidad al agua y no-electrolitos con trazadores radioactivos.—

Un enfoque más directo para la determinación de permeabilidad, la dan las mediciones con trazadores radioactivos.

En los experimentos realizados, se estudió la cinética de captación de agua y no-electrolitos.

El flujo de trazador a través de la membrana de la fibra, está dado por:

$$\frac{dM^*}{dt} = P A (C_e - C_i) \quad (11)$$

donde  $M^*$  es el número de cuentas de trazador;  $P$  es la permeabilidad,  $A$  el área geométrica de la fibra y  $C_e$  y  $C_i$  son las concentraciones del trazador fuera y dentro de la fibra respectivamente.

Dividiendo por el volumen de la fibra, se tiene entonces:

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{P \cdot A}{V} (C_e - C_i) \quad (12)$$

$$\frac{dC_i}{(C_e - C_i)} = \frac{P \cdot A}{V} dt \quad (12')$$

Si suponemos que el volumen del medio exterior es infinito,  $C_e$  será constante y, por lo tanto, se cumple que:  $d(C_e - C_i) = -dC_i$  y, por lo tanto, se puede escribir:

$$\frac{-d(C_e - C_i)}{(C_e - C_i)} = \frac{P \cdot A}{V} dt \quad (13)$$

Por integración de la ecuación 13, se obtiene:

$$\ln(C_e - C_i) = \frac{-P \cdot A \cdot t}{V} + Cte \quad (14)$$

Si se establecen las siguientes condiciones de borde, se tiene:

$$\begin{aligned} \text{a } t = 0 & \quad C_i = 0 \\ \text{a } t = \infty & \quad C_i = C_{\infty} = C_e \end{aligned}$$

entonces:

$$\ln \left( \frac{C_{\infty} - C_i(t)}{C_{\infty}} \right) = - \frac{P \cdot A \cdot t}{V} \quad (15)$$

Si se considera, en una primera aproximación, a la fibra como un cilindro, se tiene:

$$\frac{A}{V} = \frac{2}{r} \quad (16)$$

$$\ln \left( \frac{C_{\infty} - C_i(t)}{C_{\infty}} \right) = - \frac{2}{r} P \cdot t \quad (17)$$

Con esta última expresión se obtuvo  $P$  de la siguiente forma: se determinó  $C_{\infty}$ , la concentración de equilibrio del isótopo en una fibra, y en otra, a un tiempo  $t$ , se determinó  $C_i(t)$ . Conociendo el radio de la fibra y su volumen, se tienen todos los datos para aplicar la ecuación (17) directamente.

Para la determinación de la permeabilidad al agua y no electrolitos, se utilizaron las moléculas marcadas con  $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$  disueltas en AMA, con una actividad de 2 a 5  $\mu\text{C/ml}$ . Los isótopos fueron obtenidos de la firma New England Nuclear Co. (NEN).

Las fibras se disecaron como se ha reseñado anteriormente y se suspendieron verticalmente de un gancho colocado en el carro de un soporte metálico. Este sistema permitía que la fibra pudiera bajarse con facilidad, a una cámara de lucita diseñada para que hubiera agitación de la solución, sin daño de la fibra, lo que se conseguía por un flujo continuo paralelo a ella, que no le provocaba torsión. (Figura 4).

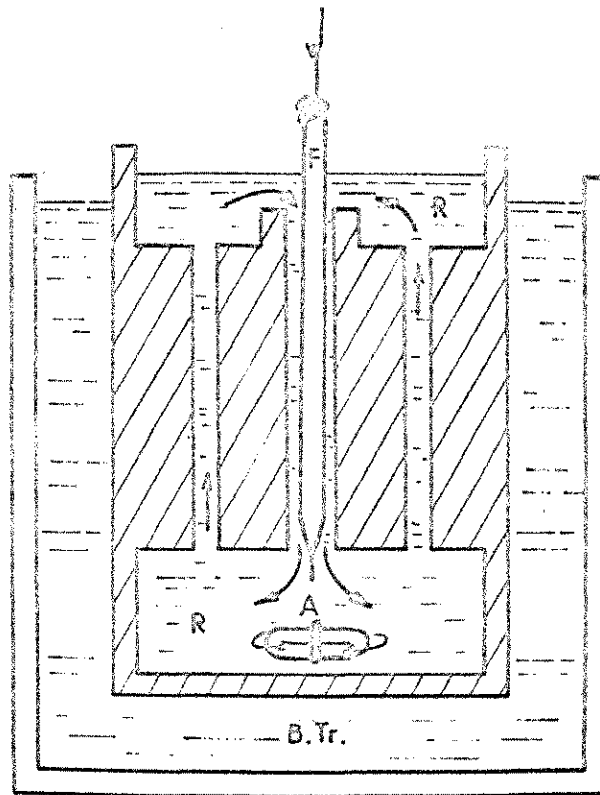
La cámara contenía la molécula de prueba y sacarosa marcada con  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ , según el caso, disueltas en AMA. La sacarosa se usó como marcador del espacio extracelular.

Antes de colocar cada fibra en la cámara, se le midió el diámetro y luego se le expuso a las soluciones radioactivas; se usaron dos fibras para cada tiempo. Los tiempos ensayados fueron  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 3, 5 y 20 minutos para el agua tritiada y 1, 2, 5, 10, 30, 50 y 70 minutos para los no electrolitos. Al final del período de incubación, las fibras se enjuagaron rápidamente en AMA, luego se secaron en papel filtro y se pesaron en tubos de ensayo previamente tarados. Posteriormente se agregó  $\text{HNO}_3$  0.1 N y se dejaron equilibrar durante 24 horas.

Las determinaciones de radioactividad se hicieron en alícuotas de 1 ml de la solución de ácido nítrico agregado a los músculos y en diluciones 1:100 del medio de incubación; de igual manera se prepararon solucio-



FIGURA 4



El esquema representa un corte lateral de la cámara utilizada para la medición de captación de trazadores.

A, Agitador magnético

R, Solución de perfusión (trazador disuelto en AMA)

F, Fibra muscular

B. Tr., Baño termoregulado a  $20 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ . Las flechas indican la dirección del flujo de la solución de perfusión.

nes patrón de Tritio y Carbono 14. Las alícuotas se disolvieron en 10 ml de mezcla centelleante preparada de la siguiente manera:

80 ml Tritón X-100  
 1 gr Omnifluor  
 250 ml Tolueno

Las muestras permanecieron líquidas y transparentes durante el proceso de conteo. Las determinaciones de radiactividad se efectuaron en un contador de centelleo líquido refrigerado Packard, modelo 526 de tres canales. Se escogieron dos bandas del espectro de energía de las radiaciones a fin de poder determinar las cuentas de tritio y carbono en forma separada basándose en la diferencia de energía de sus radiaciones.

La rapidez de conteo en cada una de las bandas, está dada por:

$$\begin{aligned} A &= 1 T + e_A C \\ B &= e_B T + C \end{aligned}$$

en que  $e_A$  es la eficiencia relativa del Carbono en el canal A y  $e_B$  es la eficiencia relativa del tritio en el canal B.

De este sistema de ecuaciones, se determinó inmediatamente las concentraciones de Tritio y Carbono (T y C) previa resta del background para cada canal.

Si se define  $\Delta = 1 - (e_A \cdot e_B)$

se tiene entonces que:

$$T = \frac{1}{\Delta} A - \frac{e_B}{\Delta} B$$

$$C = \frac{1}{\Delta} \cdot B - \frac{C}{\Delta} \cdot A$$

Para calcular las concentraciones de la molécula de prueba en el interior de la célula, se descontaron de las cuentas totales, las cuentas del trazador localizado en el espacio extracelular, que se midieron a través del análisis de las cuentas de sacarosa, marcada con  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$  según el caso.

Se supuso que la razón de concentraciones entre la sacarosa marcada ( $S^*$ ) y la molécula de prueba ( $M^*$ ) en la solución ( $[S^*]$  sol y  $[M^*]$  sol respectivamente) era igual a la razón de las cantidades absolutas de las mismas moléculas contenidas en el espacio extracelular ( $S^*e$  y  $M^*e$  respectivamente).

También se supuso que la sacarosa no penetra a la célula en los tiempos ensayados.

Por lo tanto se tiene:

$$\frac{[S^*] \text{ sol}}{[M^*] \text{ sol}} = \frac{S^*e}{M^*e} \quad (18)$$

de donde:

$$M^*e = \frac{[M^*] \text{ sol}}{[S^*] \text{ sol}} \cdot S^*e \quad (19)$$

Entonces, la cantidad de marca de la molécula de prueba en el interior de la fibra ( $M^*_{int}$ ) está dada por:

$$M^*_{int} = M^*_{total} - M^*_e \quad (20)$$

$$M^*_{int} = M^*_{total} - \frac{[M^*]_{sol}}{[S^*]_{sol}} \cdot S^*_e \quad (21)$$

Para obtener la concentración del isótopo en el interior de la fibra, se dividió  $M^*_{int}$  por el peso húmedo del músculo.

La relación (21) se cumple sólo si las velocidades de difusión de la sacarosa y de la molécula de prueba en el espacio extracelular son iguales. Si hay diferencias apreciables entre los coeficientes de difusión, la molécula más rápida llenará el espacio extracelular antes, por lo que el volumen que "ven" ambas moléculas será diferente, en especial a tiempos cortos.

Por esta razón se calculó un factor ( $f(t)$ ) que relaciona los volúmenes de espacio extracelular aparente para sacarosa ( $VeS$ ) y la molécula de prueba ( $VeM$ ) a un tiempo ( $t$ ) y que está definido por la expresión:

$$f(t) = \frac{VeM}{VeS} \quad (22)$$

Para calcular este factor, se determinó experimentalmente el volumen extracelular invadido por la sacarosa a diferentes tiempos.

El volumen extracelular aparente para la sacarosa a tiempo  $t$ , se calculó de la expresión:

$$V_e(t) = \frac{S^* t}{[S^*]_{sol}} \cdot 100 \quad (23)$$

donde  $S^* t$  son las cuentas de sacarosa marcada en la fibra al tiempo  $t$  y  $[S^*]_{sol}$ , la concentración de sacarosa marcada en solución.

Se observó que la entrada de sacarosa sigue una cinética exponencial de modo que el volumen extracelular aparente está dado por la expresión:

$$V_{eM} = V_0 (1 - e^{-\lambda t}) \quad (24)$$

donde  $V_0$  es el volumen extracelular en el estado estacionario y  $\lambda$  es la constante de tiempo del proceso.

De un gráfico semi logarítmico de  $(1 - \frac{V_{eM}}{V_0})$  vs  $t$ , se obtuvo  $\lambda$ .

Se supuso que  $\lambda$  depende de la geometría del sistema y del coeficiente de difusión  $D$ , y está expresado por:

$$\lambda_M^* = A \cdot D_M^* \quad (25)$$

Por lo tanto, es posible calcular  $\lambda$  para una molécula de prueba si se conoce  $\lambda$  para la sacarosa y los coeficientes de difusión en solución de ambas moléculas, ya que  $A$  debe ser igual en ambos casos.

$$\lambda_{M^*} = \frac{\lambda_{S^*}}{D_{S^*}} \cdot D_{M^*} \quad (26)$$

Obtenido  $\lambda_{M^*}$ , se calculó el espacio extracelular aparente para las moléculas de prueba ( $V_{eM^*}$ ) a cada tiempo y de la razón entre éste y el espacio extracelular aparente para la sacarosa se calculó  $f(t)$ .

$$f(t) = \frac{V_{eM^*}(t)}{V_{eS^*}(t)} = \frac{(1 - e^{-M^*t})}{(1 - e^{-S^*t})} \quad (27)$$

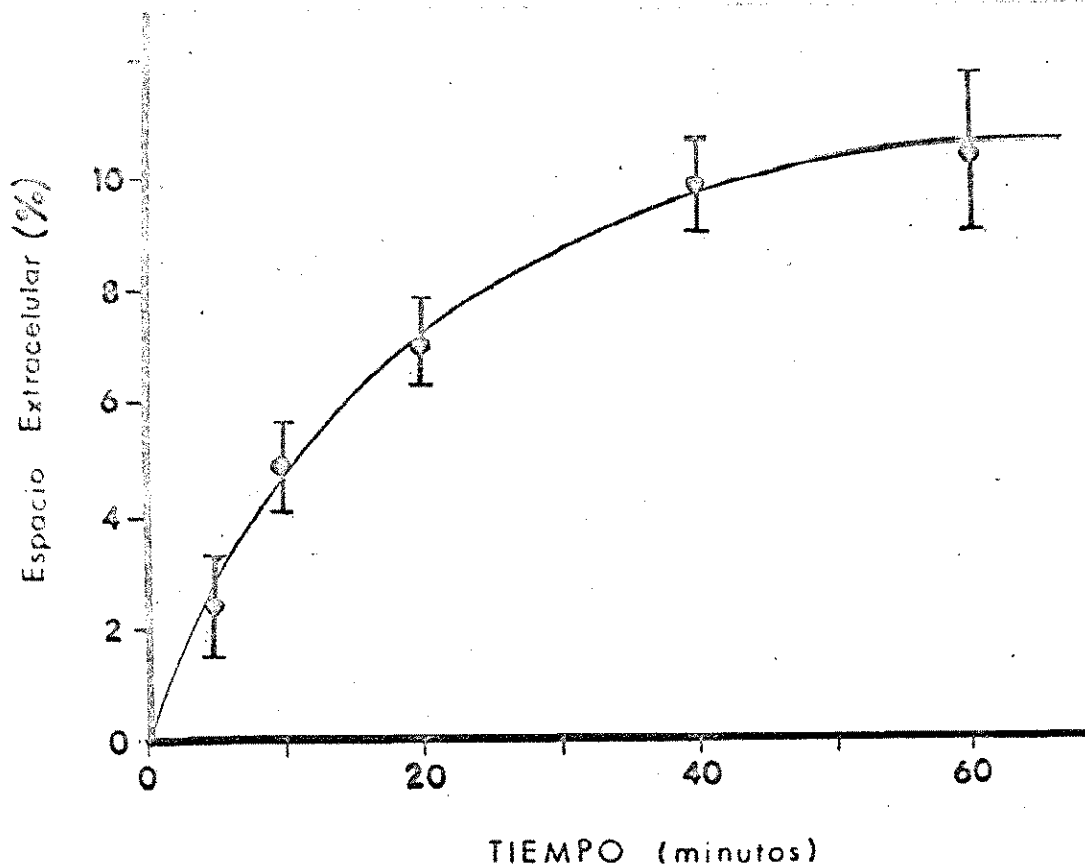
Como la determinación de  $f(t)$  para las diferentes moléculas de prueba exigía muchos cálculos, se elaboró un programa de computación que se pasó en un mini-computador Wang 720-C.

Finalmente, la cantidad de marca en el interior de la fibra a un tiempo ( $t$ ) está dada por la expresión:

$$M^*_{int}(t) = M^*_{total}(t) - f(t) \frac{[M^*]_{sol}}{[S^*]_{sol}} S^*e \quad (28)$$

Cuando no se consideraba en el cálculo de  $M^*_{int}(t)$  el factor  $f(t)$ , se obtenían valores de coeficientes de permeabilidad más altos a los tiempos iniciales. Al calcularlos corrigiendo por  $f(t)$ , los valores de  $P$ , se hicieron relativamente constantes en el tiempo, indicando que las suposiciones anteriores son razonables.

FIGURA 5



Espacio extracelular ocupado por la sacarosa marcada en función del tiempo.

Cada punto es el promedio entre 6 y 10 fibras.

La solución de sacarosa tenía una concentración de 2 a 5  $\mu\text{C}/\text{ml}$  en AMA y la temperatura era de  $20 \pm 1,0$  °C.

## RESULTADOS

### I Métodos Osmóticos

Previamente se determinaron algunos parámetros de la fibra con el objeto de caracterizar el material.

Contenido de agua: Este se determinó según se describe en Métodos. El resultado obtenido para 10 fibras fue de 79,0%  $\pm$  1,8% (e.s.).

Espacio extracelular.- El espacio extracelular se determinó como se indica en Métodos, usando la sacarosa como marcador y dejándola equilibrar por 90 minutos. La Figura 5 muestra que el gráfico del espacio extracelular aparente vs tiempo, es una exponencial y que tarda en alcanzar el equilibrio, alrededor de 60 minutos. El valor promedio para 38 fibras fue de 10,58%  $\pm$  1,5% (e.s.).

Se hicieron experimentos en que se midió el espacio extracelular después de haber equilibrado durante una hora la fibra en AMA - sacarosa 200 y 400 mM. En este caso, se encontró que el espacio extracelular era de 18 $\pm$ 2,1% y 32 $\pm$ 3,5% respectivamente. Estos resultados parecen indicar que al colocar la fibra en soluciones hipertónicas, el agua sale desde el interior de la fibra hacia el espacio extracelular hinchando los túbulos, aumentando de este modo el volumen.

#### a) Medidas de la variación del potencial de membrana.-

En cada experimento se controló el potencial de reposo, que fue medido con un electrodo longitudinal o con un microelectrodo de vidrio. Las mediciones del potencial



de reposo, obtenidos de un total de 34 observaciones, dieron un valor de  $53 \pm 5$  mV (e.s.), el interior negativo respecto al exterior. Los valores fueron registrados a temperaturas entre 17° y 20°C.

Efecto de la temperatura sobre el potencial de membrana.-

Se observó una relación lineal entre el potencial y la temperatura, y las pendientes variaron entre 0.60 y 0.90 mV por grado.

En la Figura 6, se muestra el efecto de un cambio de temperatura sobre el potencial de reposo de la fibra. El 30% del cambio de potencial, se obtiene a los 17 segundos, lo que es una indicación de la eficiencia de la renovación de las soluciones en la cámara. El experimento fue planeado de modo que se produjeran cambios de temperatura de corta duración, a partir de una temperatura de alrededor de 15°C.

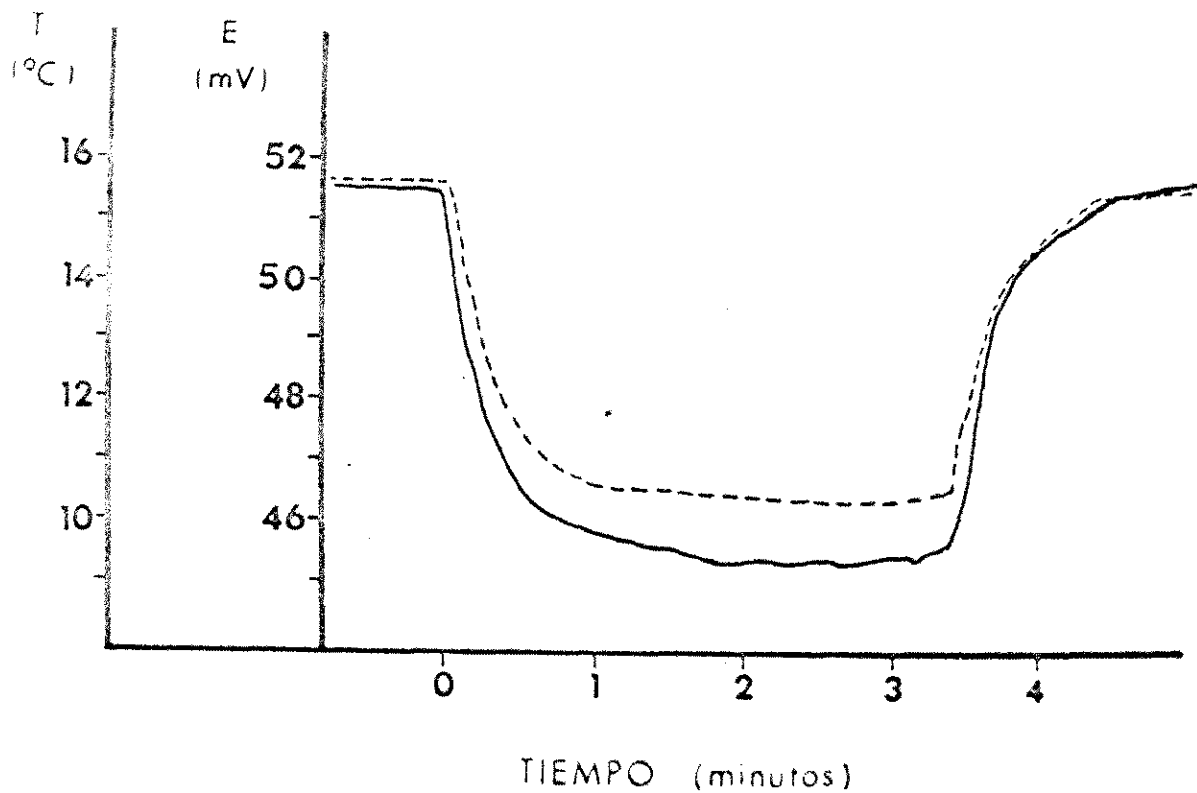
Estos experimentos señalaron la necesidad de controlar cuidadosamente la temperatura de las soluciones, para lo cual se usó una cámara termoregulada.

Los resultados obtenidos muestran que el potencial aumenta con la temperatura más de lo esperado teóricamente, si se aplica la ecuación de Goldman Hodgkin.

Este efecto ha sido estudiado también por Dipolo y Latorre (1972) en Balanus nubilis y lo explican por una alteración del mecanismo de permeabilidad pasiva al Na y K.

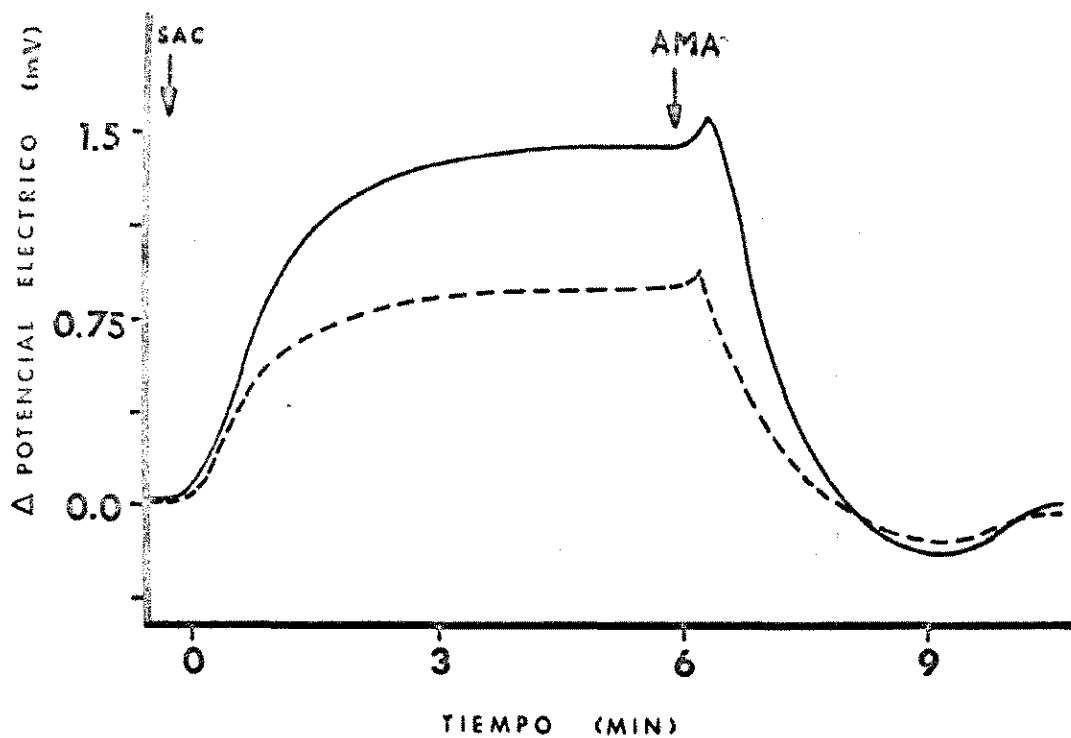
Esta alteración no afectaría al mecanismo de transporte activo, ya que ni la estrofantidina ni el reemplazo de sodio por litio afectan la magnitud del cambio de potencial inducido por la temperatura.

FIGURA 6



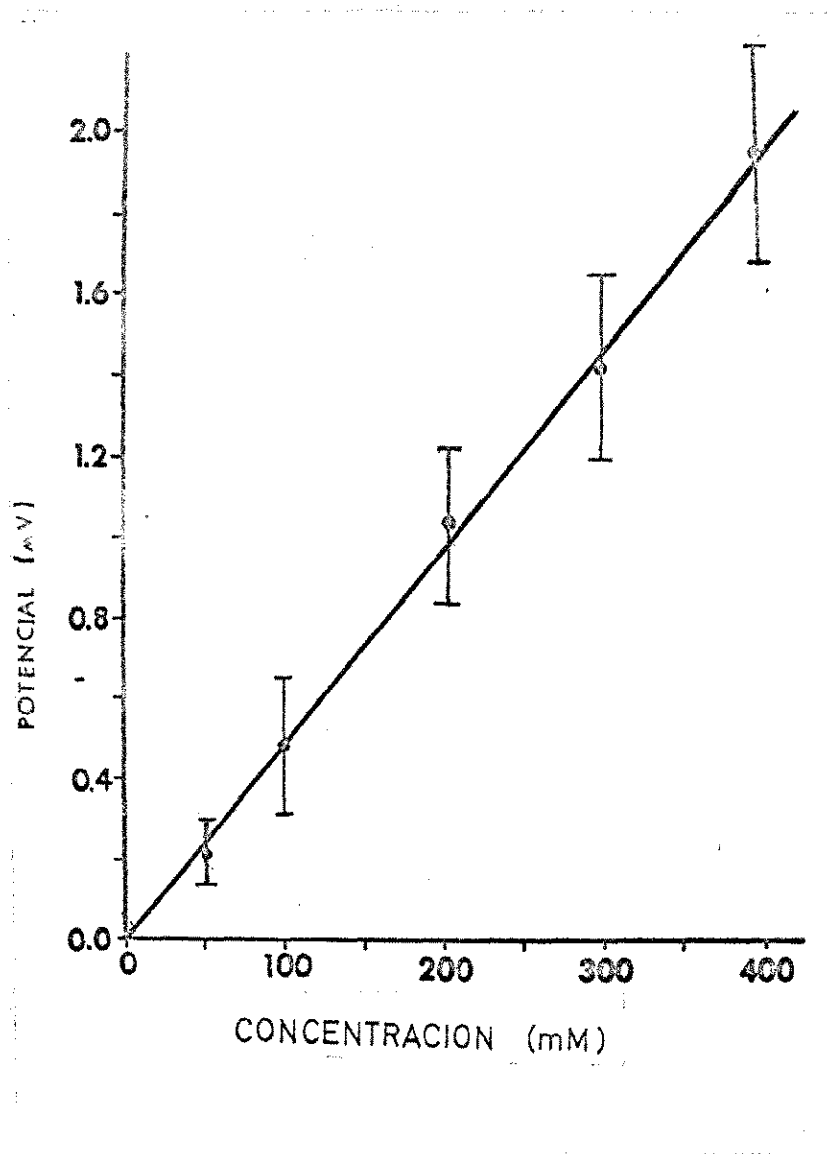
Curso temporal de la variación del potencial eléctrico durante un cambio de temperatura (copia de un registro original). De este gráfico se calculó un  $t_{\frac{1}{2}}$  de 17 segundos que corresponde a una constante de recambio de la solución en la cámara de  $2,5 \text{ minutos}^{-1}$ . La variación del potencial se muestra en línea llena; la variación de la temperatura de la solución, en línea quebrada.

FIGURA 7



Curso temporal del cambio de potencial eléctrico por efecto de soluciones hiperosmóticas de sacarosa. La línea continua muestra el efecto de una solución de sacarosa 400 mM en AMA; la discontinua, una solución 200 mM. (AMA = agua de mar artificial).

FIGURA 8



Efecto de la concentración de sacarosa sobre el potencial de membrana en una fibra muscular de *Balanus*. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones.

En la ordenada se muestran las variaciones de potencial sobre el potencial de reposo, que se ha tomado como 0.

Efecto de los cambios osmóticos sobre el potencial de membrana.-

( $E_m$ ). El cambio en la concentración del medio que baña la fibra muscular, produjo una variación en la diferencia de potencial, que llegó a un valor estable en alrededor de 3 a 4 minutos. Después del cambio temprano rápido, se apreció en muchos de los experimentos un cambio más lento en el mismo sentido (hiperpolarización) (Figura 7).

En estos casos se extrapoló la componente lenta a tiempo cero y éste valor se tomó como el valor del cambio de potencial. Se observó una relación lineal entre la concentración de solutos y el potencial de membrana en el rango de 0 a 400 mM. El caso de la sacarosa se muestra en la Figura 8.

Los valores de coeficientes de reflexión calculados de los cambios de potencial se muestran en la Tabla 1. Para urea y glicerol, dieron un promedio cercano a 1, lo que indica que éstas moléculas son tan impermeantes como la sacarosa, que tiene una permeabilidad muy baja en estas fibras. Como se verá más adelante, estos valores de  $\sigma$  son más altos que los obtenidos por medidas de cambio de volumen. Usando este mismo método, Vargas (1968) encontró en axón gigante para urea un  $\sigma$ : 0,83; 0,79 para glicerol y 0,00 para etilenglicol.

Los cambios de potencial provocados por la sacarosa y los no electrolitos, variaban mucho de fibra en fibra, por lo que se normalizaron los datos calculando los valores de  $\sigma$  en cada fibra.

b) Medidas de diámetro de la fibra.- La Figura 9, muestra un experimento típico en que una fibra equilibrada en una solución de agua de mar artificial se traslado a una solución

T A B L A 1

VALORES DE  $\sigma$  OBTENIDOS POR CAMBIOS DE POTENCIAL  
PARA UNA SERIE DE NO ELECTROLITOS.

MOLECULA	Nº EXPERIMENTOS	$\sigma$		e. s.
Sacarosa	—	1,0		—
Urea	14	1,08	+	0,235
Glicerol	13	1,11	+	0,180
E. glicol	8	0,51	+	0,13
Rafinosa	8	1,01	+	0,15
Glucosa	6	0,84	+	0,131

de sacarosa 400 mM en AMA.

El cambio de solución tomó aproximadamente 15 seg desde el momento en que la columna llegó a la cámara. Para evitar mezclas en los tubos de conducción, se dejó entrar una pequeña burbuja de aire para separar las soluciones.

En la mayoría de los casos, el cambio de diámetro se completó a los 20 minutos. Para las moléculas probadas, el orden en la magnitud del cambio fue  
Sacarosa > Glicerol > Urea > Etilenglicol.

En la Figura 10, se ilustra un gráfico de  $\ln(d_t - d_\infty) / (d_0 - d_\infty)$  vs tiempo. La buena linealidad obtenida permite concluir que el cambio de diámetro ocurre según una función exponencial (ecuación 7).

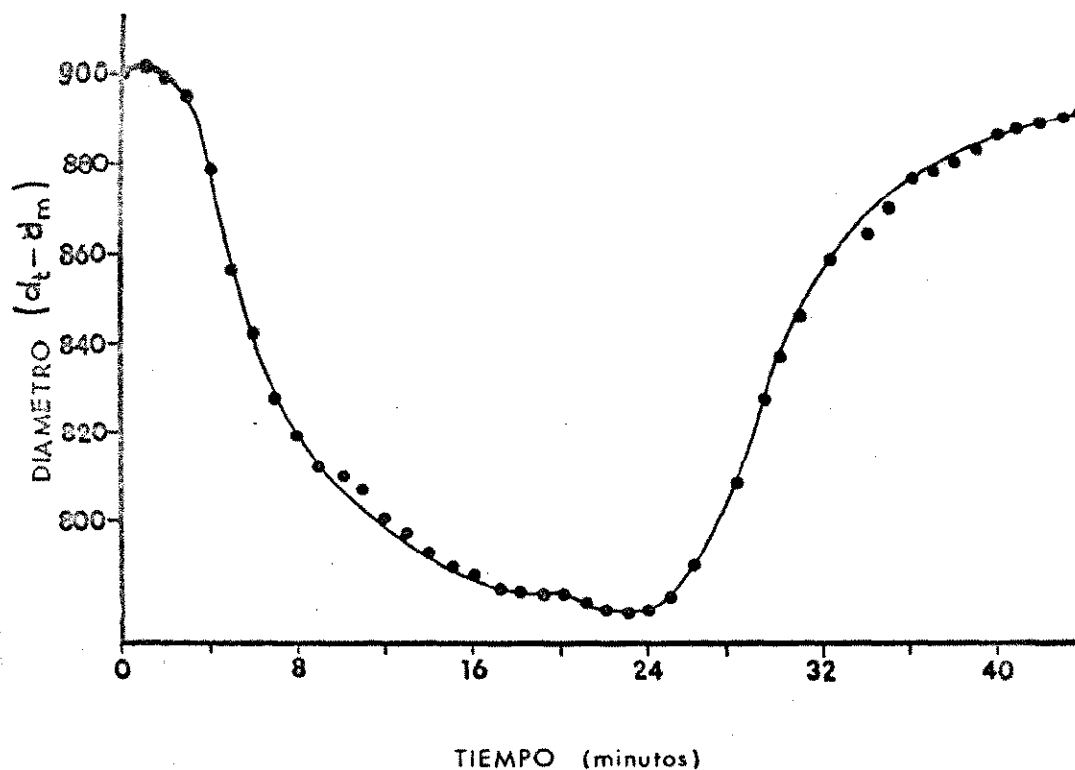
Comparando los valores de  $J_v$  de la sacarosa con los de los otros solutos, se determinó  $\sigma$ , el coeficiente de reflexión osmótico. Los valores obtenidos aparecen en la Tabla 2.

Con los datos obtenidos en los experimentos realizados con sacarosa, se puede calcular  $L_p$ , el coeficiente de conductibilidad hidráulica de la membrana, asignando un valor de  $\sigma$  igual a 1 para la sacarosa.

$$L_p = \frac{J_v}{RT \Delta C}$$

La razón  $J_v / \Delta C$  no permaneció constante en el rango de concentraciones de sacarosa usado (Fig. 11). Este resultado indica que la presencia de capas no agitadas en las zonas cer-

FIGURA 9



Cinética del cambio de volumen en una fibra muscular, por efecto de una gradiente osmótica de sacarosa 400 mM. Las unidades del diámetro son unidades arbitrarias que luego se llevaron a  $\mu$  y cm. (1 unidad = 0,88 u).



FIGURA 10

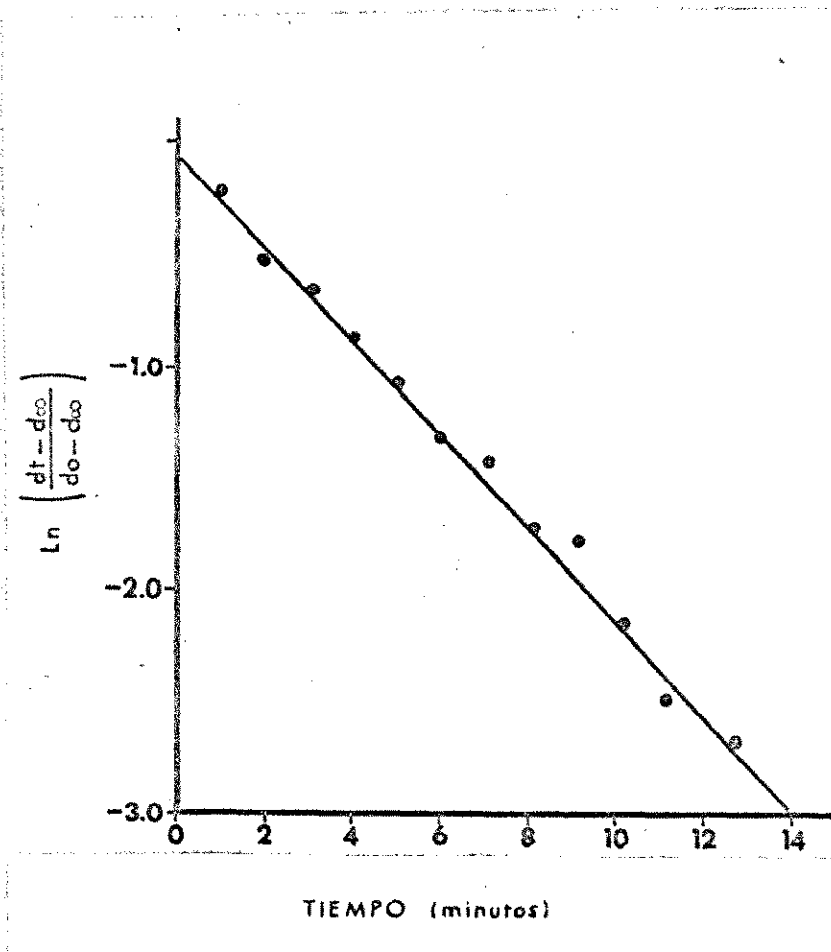


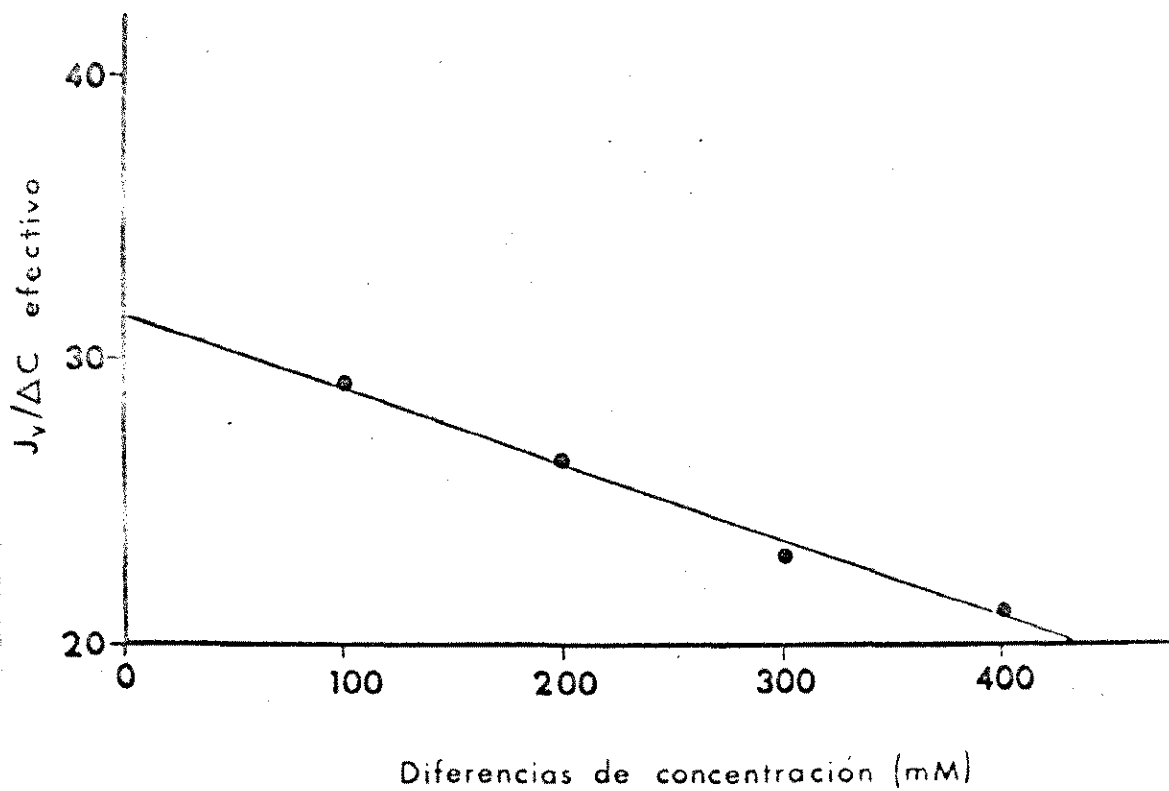
Gráfico de  $\ln \frac{dt-d_{\infty}}{do-d_{\infty}}$  vs. tiempo para un experimento típico de cambio de diámetro en una fibra, provocado por una gradiente osmótica de 400 mOsm de sacarosa.

T A B L A 2

VALORES DE  $\sigma$  DETERMINADOS POR MEDIDAS DE CAMBIO  
DE DIAMETRO PARA VARIOS NO ELECTROLITOS

MOLEC.	$\sigma^+$		e.s.
Sacarosa	1		--
Glicerol	0,96	$\begin{matrix} + \\ - \end{matrix}$	0,11
Urea	0,83	$\begin{matrix} + \\ - \end{matrix}$	0,13
Etilen glicol	0,45	$\begin{matrix} + \\ - \end{matrix}$	0,08

FIGURA 11



Efecto de la gradiente de concentración sobre la razón entre el flujo de volúmen y la diferencia de concentración:  $J_v/\Delta C$  efectiva ( $\mu$  M/min. lt).

canas a la membrana alteran la cinética de salida de agua. Se puede apreciar que los valores son función de la concentración (Figura 11).

Para calcular  $L_p$  se extrapoló a  $C_{\text{sacarosa}}=0$  lo que dio un valor de  $J_v / \Delta C$  de 31.6 ( $\mu \cdot \text{lt}/\text{Mol} \cdot \text{min}$ ) con lo que se obtiene un  $L_p = 2.16 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^3 \cdot \text{seg}^{-1} \text{ dina}^{-1}$

c) Medidas del cambio de densidad óptica.-

La Figura 12, muestra un cambio típico de la transmitancia al pasar una fibra de una solución isosmótica (AMA) a soluciones hiperosmóticas de urea 200 mM y de sacarosa 200 mM. Los resultados obtenidos al colocar a las fibras en soluciones hiperosmóticas de no-electrolitos, muestran que los cambios de transmitancia son función de la concentración y de la transmitancia inicial.

En experimentos en que se hicieron medidas simultáneas de cambio de potencial, de diámetro y de transmitancia, se pudo comprobar que las cinéticas de cambio son diferentes. El cambio de potencial demora alrededor de 4 minutos en completarse. El cambio de volumen tarda 17 minutos para la urea y 22 minutos para la sacarosa y el cambio de transmitancia tarda 12 minutos para la urea y 22 minutos para la rafinosa. Estos resultados mostraron que no es posible entonces, establecer una correlación entre los cambios de densidad óptica y de volumen.

FIGURA 12

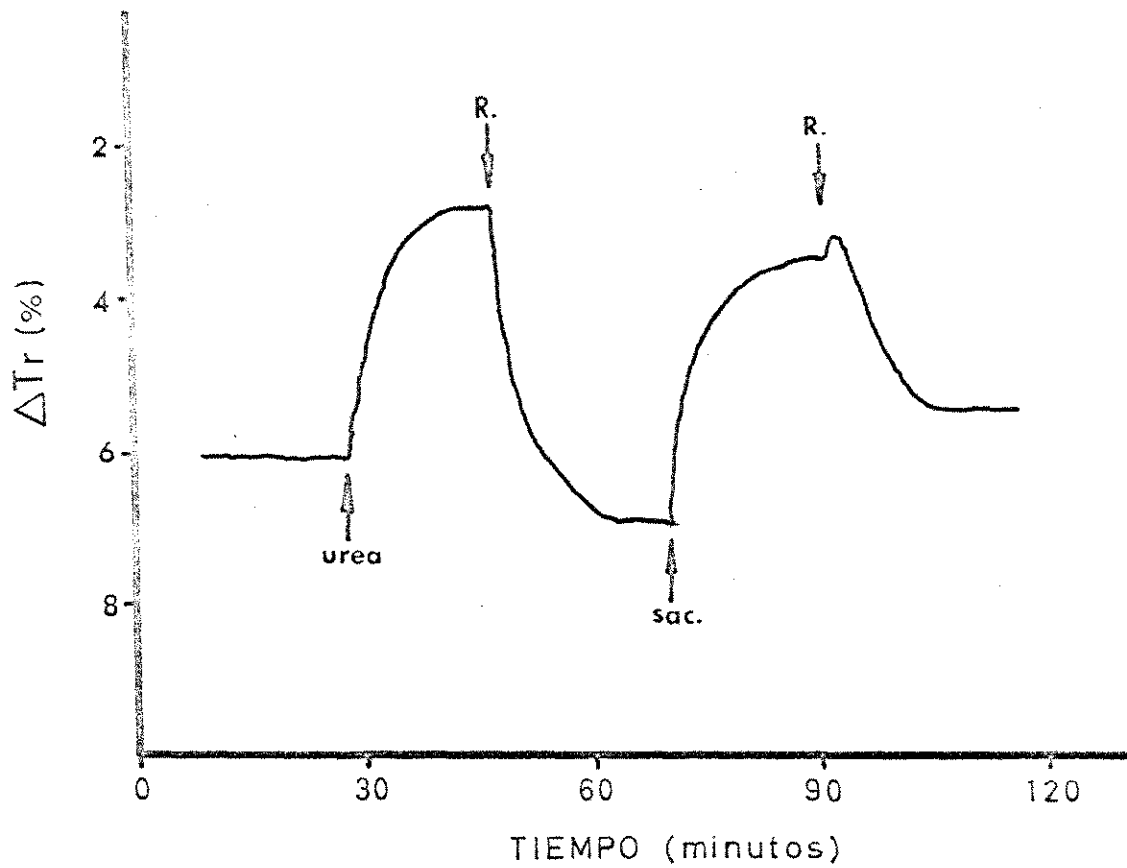


Gráfico de la cinética de los cambios de transmitancia de una fibra muscular por efecto de gradientes 200 mM de urea y sacarosa.

R, Ringer músculo.

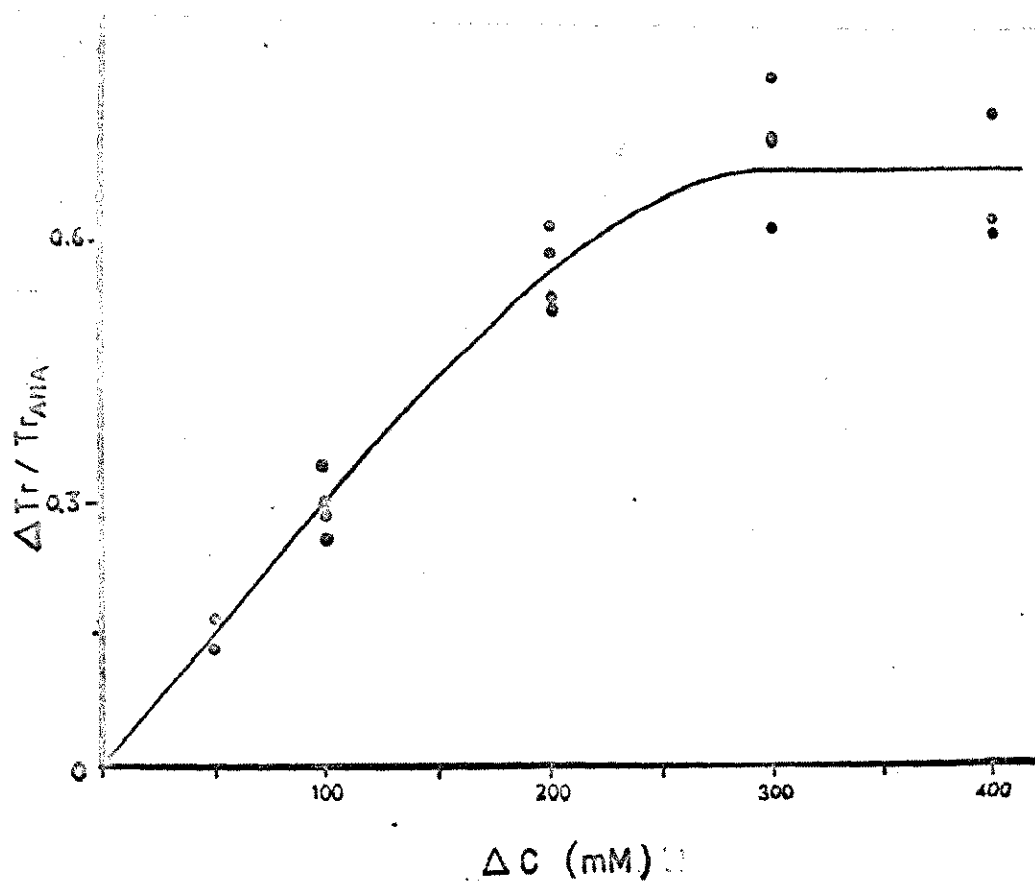
La Figura 13 muestra un gráfico del cambio de transmitancia vs concentración para soluciones de sacarosa en AMA. Los valores se dan normalizados por la transmitancia en AMA.

Se puede apreciar una relación lineal hasta alrededor de 250 mM. Concentraciones mayores no producen cambios en la transmitancia de la fibra. Una relación semejante se obtuvo para el glicerol y urea, aunque para esta última la transmitancia se hace constante cerca de 400 mM.

Se encontró que la urea y el glicerol eran capaces de oscurecer a las fibras de alta transmitancia inicial (25 a 35% T), la sacarosa, la glucosa y la rafinosa producían un efecto menor en el mismo sentido. En cambio, en músculos de baja transmitancia (10 a 15%) la urea y el glicerol produjeron sólo un pequeño oscurecimiento; en cambio la sacarosa y, más aún, la rafinosa, produjeron un gran aclaramiento de la fibra. La inulina 25 mM y el dextrano 6 mM produjeron aclaramiento de las fibras de baja transmitancia a pesar de su bajísima concentración.

El etilenglicol provocó inicialmente un rápido oscurecimiento que llegó a un máximo y luego bajó hasta una transmitancia mayor que la que tenía inicialmente. Este efecto transiente podría deberse a que el etilenglicol penetra muy rápido en el espacio extracelular y como es muy permeante, entra a la fibra atenuando la gradiente osmótica.

FIGURA 13



T A B L A 3

Molécula	P (cm/seg · 10 <sup>4</sup> ) (experimentales)	P (cm/seg · 10 <sup>4</sup> ) (corregidos)
HTO (45)	3,42 ± 0,18	5,05 ± 0,12
Antipirina (12)	2,55 ± 0,04	3,85 ± 0,17
Metanol (10)	2,33 ± 0,12	2,91 ± 0,08
Acetamida (15)	1,15 ± 0,08	1,52 ± 0,09
Etilenglicol (15)	0,58 ± 0,02	0,64 ± 0,01
Glucosa (10)	0,13 ± 0,01	0,32 ± 0,01
Metilurea (22)	0,19 ± 0,02	0,23 ± 0,02
Urea (25)	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Tiourea (14)	0,15 ± 0,02	0,17 ± 0,01
Glicerol (30)	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Inulina (8)	0,00	0,00

Coeficientes de permeabilidad (P) de varios no-electrolitos determinados por difusión de trazadores.

La tabla muestra también, los valores de permeabilidad (P) corregidos por capas no agitadas.

Las cifras en paréntesis representan el número de experimentos. Los datos se dan con el error standard.



DISCUSIONCoefficientes de Reflección Osmóticos.-

Los valores experimentales obtenidos por métodos osmóticos merecen ser discutidos, ya que éstos parecen estar muy afectados por la morfología de la superficie de la fibra muscular. La complejidad del espacio extracelular hace que no se pueda medir el efecto osmótico real de las soluciones de no electrolitos en toda el área de la membrana. Las moléculas deben difundir primero en un sistema de canales con solución no agitada antes de ejercer su efecto osmótico, que aparece entonces muy amortiguado.

Las medidas de variación del potencial de membrana por efecto de soluciones hipertónicas mostraron estar muy afectadas por estos factores, ya que los resultados obtenidos presentan gran variabilidad en distintas fibras y poca reproducibilidad.

En los sistemas estudiados por otros autores, como son vesícula biliar de conejo (Wright y Diamond, 1969) y axón gigante perfundido de calamar (Vargas, 1968), el problema de capas no agitadas era menor, ya que podía agitarse la solución a ambos lados de la barrera de permeabilidad y aparentemente la superficie de estas barreras no es tan compleja como la de la membrana de la fibra muscular de Balanus.

La velocidad de difusión de los no electrolitos está inversamente relacionada con su tamaño molecular.

Según esto, puede esperarse que las moléculas más pequeñas difundan más rápido ejerciendo transientemente un mayor efecto osmótico que las más grandes, a pesar de que las primeras sean más permeantes. Esto podría explicar por qué los valores de  $\bar{U}$  para urea y glicerol obtenidos por medidas de potenciales sean de la misma magnitud que el de sacarosa. El etilenglicol penetra tan rápido como la urea al espacio extracelular, pero es mucho más permeable, por lo que su efecto osmótico es menor.

Los valores de  $\bar{U}$  obtenidos por medidas de cambio de volumen muestran menos variabilidad y son muy semejantes a los obtenidos por Bunch y Edwards (1969), por medidas de equilibrio osmótico.

Un aspecto interesante de considerar es que las cinéticas de cambio de potencial y de volumen, fueron muy distintas, como se puede apreciar en las Figuras 7 y 9, lo que estaría indicando que reflejan fenómenos diferentes.

Las medidas de cambios de potencial, permiten detectar variaciones muy rápidas en las diferencias de concentración a través de la membrana. Estas medidas son muy sensibles a las variaciones locales de concentración, por lo que dependerán de la zona donde quede insertado el microelectrodo. En algunos casos, éste puede quedar cercano a la superficie de la fibra y en otros, en el interior, cercano al fondo de una invaginación. El flujo de agua en la zona cercana al electrodo será en cada caso diferente, ya que la velocidad con que se establece la gradiente osmótica

en la superficie de la fibra debe ser mucho mayor que la velocidad con que lo hace en el interior de una invaginación, ya que el no electrolito demora un tiempo en difundir. Los cambios de diámetro, son mucho más lentos y reflejarían los movimientos de redistribución de agua en todo el espacio extracelular, fenómeno que tarda cerca de 20 minutos en completarse.

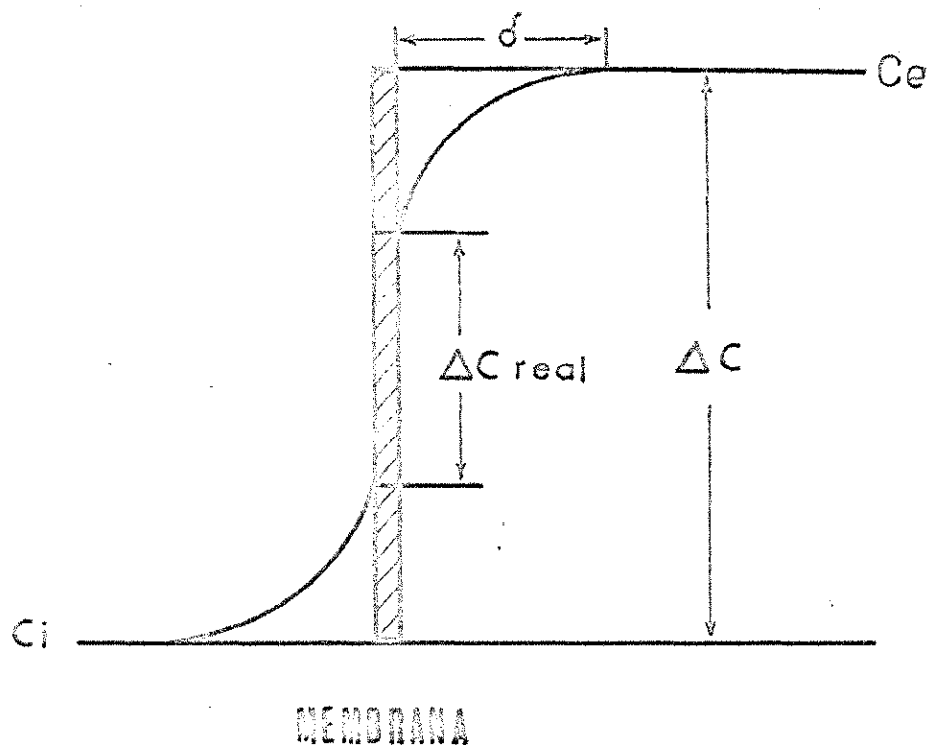
La presencia de capas no agitadas hace que la gradiente osmótica efectiva sea menor que en un sistema perfectamente agitado y esto afecta la magnitud de flujo de agua.

Al fluír el agua desde el interior de la fibra hacia el exterior, se produce un aumento de la concentración en la zona adyacente a la membrana en el interior y una dilución en la zona cercana a la membrana en el exterior (Figura 14).

Se puede demostrar que  $\Delta C$  real  $\langle \Delta C$  teórico y que la diferencia entre estos dos valores depende del espesor de la capa no agitada ( $\delta$ ), del flujo de agua y del coeficiente de difusión (D). Se supone  $\delta$  igual para todos los solutos (Dainty y House, 1966).

Comparando la sacarosa con otros solutos, tenemos que  $J_V$  sac  $\rangle J_V$  soluto y  $D_{sac} \langle D_{soluto}$ . Ambos factores hacen que la discrepancia observada entre el  $\Delta C$  real y el  $\Delta C$  teórico sea más grande para la sacarosa que para los otros solutos. Si se corrige por es-

FIGURA 14



Esquema del perfil de concentraciones a través de la membrana. Se observa el  $\Delta C$  real debido a la capa no agitada y el  $\Delta C$  teórico cuando se considera una agitación perfecta a ambos lados de la membrana.  $\delta$  es el espesor de la capa no agitada. (Dainty y House, 1966).

tos factores los  $\bar{C}$  para urea y glicerol, resultan más pequeños.

El efecto de las capas no agitadas, se estudió en los experimentos en que se midió  $J_v$  en función de  $\Delta C$ , observándose que efectivamente los valores de  $J_v$  dependen de las diferencias de concentración a través de la membrana.

El gráfico de la Figura 11, muestra que  $J_v / \Delta C$  disminuye linealmente con el aumento de la diferencia de concentración.

Por extrapolación a  $\Delta C = 0$ , se tiene que  $\Delta C$  real =  $\Delta C$  teórico.

Los experimentos mostraron que la magnitud y signo de los cambios de densidad óptica, varía de fibra en fibra y son función de la transmitancia inicial. Por otra parte, en experimentos simultáneos, se pudo comprobar que los cambios de transmitancia no se correlacionan siempre con los cambios de volumen, ya que para las moléculas más chicas los primeros son más rápidos.

Esto hizo imposible utilizar los cambios de D.O. como una medida de los cambios de volumen y determinar valores de  $\bar{C}$  con éste método.

Aunque no tenemos una explicación clara para los efectos provocados por los distintos no electrolitos en la transmitancia, puede suponerse que dependen, al igual que los potenciales, de la velocidad de difusión de los no electrolitos en el espacio extracelular.

Las moléculas pequeñas que difunden muy rápidamente, provocarían una fuerte salida de agua de la fibra, lo que haría que los túbulos se hincharan y es este fenómeno de vesiculización el que se ha postulado como responsable del aumento de densidad óptica. Las moléculas más grandes difundirían más lentamente, produciendo un efecto osmótico menor; por ello, la salida de agua del interior de la fibra sería más lenta, provocando poca o ninguna vesiculación.

De lo expuesto, aparece que en este sistema no se pueden determinar valores de  $\bar{U}$  osmóticos con medidas del cambio de transmitancia y de potencial, ya que ambos tipos de medidas están muy afectadas por la compleja morfología del espacio extracelular.

Por otra parte, las medidas de cambio de diámetro dieron valores de  $\bar{U}$  que están correlacionados con los valores de los coeficientes de permeabilidad con trazadores.

#### Medidas de Permeabilidad con Trazadores.-

El método de determinación de coeficientes de permeabilidad con trazadores radiactivos, permite una interpretación más directa de los resultados. El diseño experimental tiene el inconveniente de que, como se hicieron medidas de captación, para obtener cada valor de  $P$  se requieren varias fibras, lo que implica mayor variabilidad estadística. Este método permitió, sin embargo, hacer correcciones que toman en consideración las diferencias en la velocidad de difusión de las distintas moléculas.

las en el espacio extracelular (Figura 15). Para ello, se definió un factor ( $f(t)$ ), que relaciona las velocidades de entrada de los trazadores en el espacio extracelular con los volúmenes extracelulares aparentes que "ven" las diferentes no electrolitos a un tiempo ( $t$ ). Esto se discute en más detalle en Métodos. En una primera aproximación, se supuso a la membrana celular como la etapa limitante de la rapidez del intercambio del agua y no electrolitos, y que existía agitación perfecta a ambos lados. Según esto, una solución de la ecuación de difusión está dada por:

$$\frac{C(t)}{C(\infty)} = 1 - \exp\left(-\frac{2Pt}{r}\right)$$

en que:  $C(t)$  = es la concentración intracelular al tiempo  $t$ ;  
 $C(\infty)$ , es la concentración intracelular en el equilibrio;  
 $P$  es la permeabilidad;  $t$  el tiempo y  $r$  el radio.

Algunos autores han puesto en duda repetidas veces la idea de que la membrana celular sea una barrera limitante para la difusión de solutos. Dick, 1964; Ling, 1962; Reisin y Ling, 1973; Cope, 1967., han planteado que la velocidad de penetración sería función del tiempo que tardan en difundir en el citoplasma y en las capas no agitadas adyacentes a la membrana en el espacio extracelular.

Reisiny Ling (1973), recientemente, en experimentos de intercambio de HTO en fibra muscular de *Sarcoma nubilis*, han interpretado sus resultados en términos

FIGURA 15

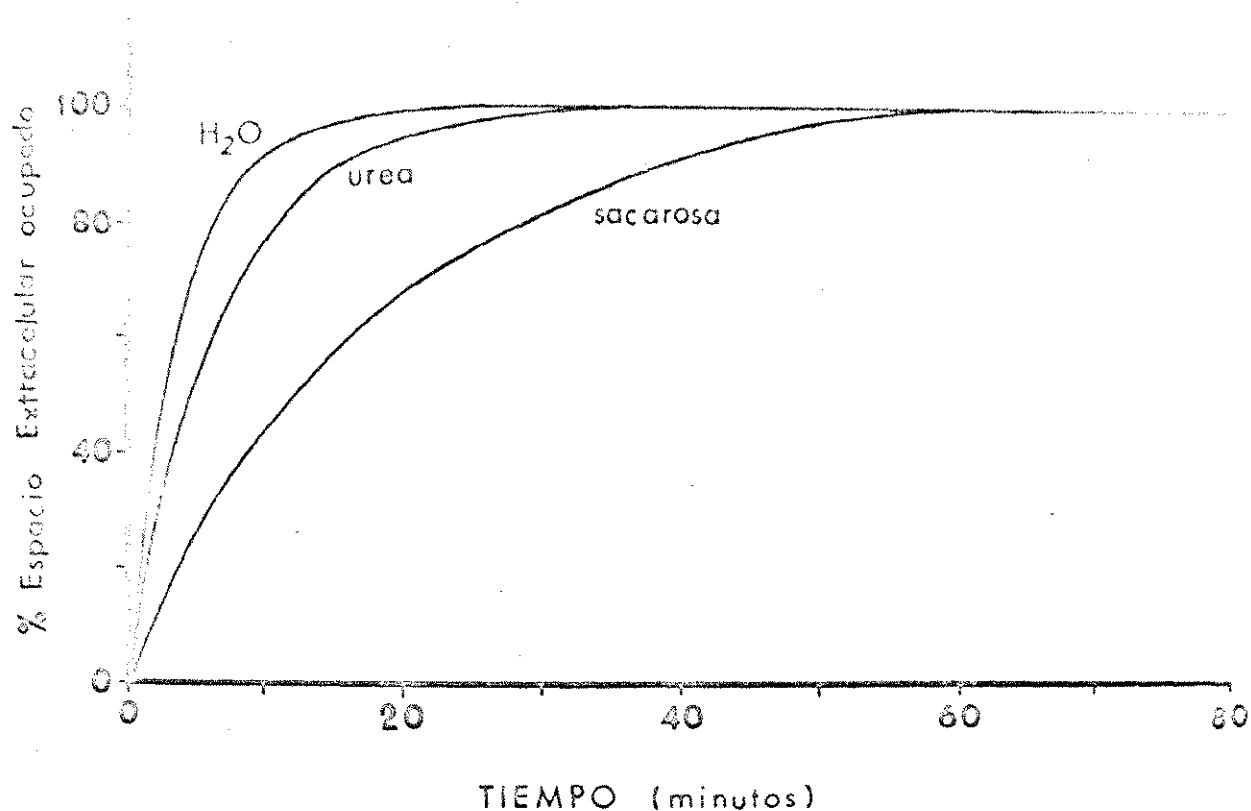


Gráfico del % de espacio extracelular ocupado por urea, H<sub>2</sub>O y sacarosa en función del tiempo. La curva de sacarosa fue obtenida experimentalmente de medidas del espacio extracelular aparente a diferentes tiempos. Los datos de urea y H<sub>2</sub>O fueron calculados de las relaciones entre sus coeficientes de difusión y la constante de tiempo de la sacarosa y se interpretan como la velocidad de difusión en el espacio extracelular. De estas curvas se calcula  $f(t)$ .



de una difusión del agua tritiada en multicapas de agua intracelular estructuradas formando un sistema heterogéneo de macromoléculas-agua, con carga fija. Según estos autores, la distribución de los no electrolitos estaría dada por la energía relativa y/o libertad rotacional que las moléculas tengan en la multicapa con respecto a la que tienen en solución.

Para probar este punto, se calcularon los valores de  $C(t) / C(\infty)$  que se espera encontrar si se considera a la fibra como un cilindro sólido, sin membrana y con un coeficiente de difusión para la molécula igual al que tiene en solución.

Una solución de las ecuaciones diferenciales que describen esta situación para el caso de un cilindro, ha sido desarrollada por Crank (1970).

$$C(t) / C(\infty) = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{4}{Bi^2} \exp\left(-\frac{Bi^2 Dt}{r^2}\right)$$

en que  $Bi$  son raíces de la función de Bessel;  $D$  el coeficiente de difusión y  $r$  el radio de la fibra. Un ejemplo se ilustra en la Figura 16, en que se muestran los valores esperados para la difusión de agua tritiada para tiempos entre 30 y 90 seg y para los valores de radios entre 0,6 y 2,4 mm. Los valores determinados experimentalmente para  $C(t) / C(\infty)$ , están siempre por debajo de los valores calculados, lo que estaría indicando que la membrana es efectivamente una barrera al paso del agua tritiada o que el valor del coeficiente intracelular es menor que el usado.

FIGURA 16

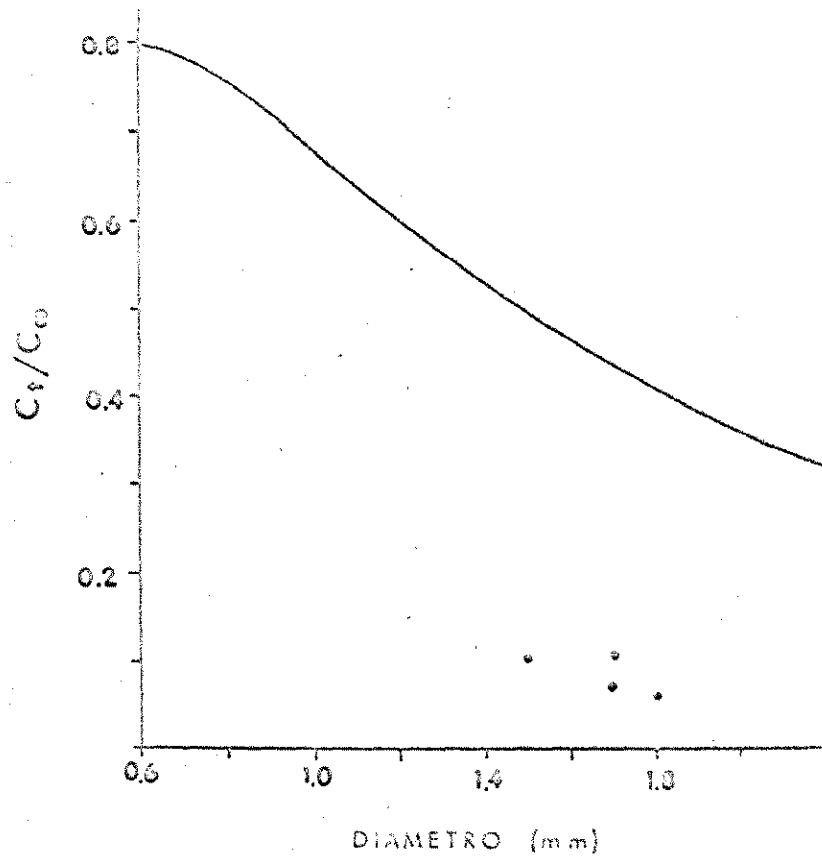


Gráfico de la razón de concentraciones  $C_t/C_{00}$  para distintos diámetros, de fibras musculares. Los puntos muestran los valores experimentales obtenidos.

La permeabilidad se ha supuesto  $0.9$  y el tiempo = 30 seg.

Bunch y Kallsen (1969), han mostrado en experimentos realizados en fibra muscular de Balanus nubi-  
lus que el coeficiente de difusión de agua tritiada en el  
mioplasma es igual al coeficiente de difusión en solución.  
Hay que hacer notar, sin embargo, que los valores encontra-  
dos por estos autores son para difusión longitudinal y en  
el cálculo se usan valores de D radial.

La interpretación dada por Reisin y Ling  
entonces, se contrapone a los resultados encontrados en este  
trabajo y a los resultados de Bunch y Edwards, que muestran  
que la difusión del agua está limitada por la membrana.

Por otra parte, Hinke ha encontrado tam-  
bién en fibra muscular de Balanus, que el agua se distribu-  
ye en dos compartimentos: uno que representa el agua sol-  
vente y osmóticamente activa con propiedades de solubilidad  
semejantes a la solución externa y que sería entre 60 y 70%  
y el otro representaría el agua estructurada y que sería sólo  
de un 25%.

Debido a la compleja estructura morfológi-  
ca de la fibra, con numerosas invagaciones y túbulos, exis-  
ten regiones donde no hay agitación posible. Esto puede  
ser muy importante en determinar la restricción al paso de las  
moléculas, tanto por la longitud de los canales como por  
el hecho de que, como se ha postulado, puedan existir macro-  
moléculas (polisacáridos) en su interior. Una indicación

de ello, estaría dada por el largo tiempo que tarda en equilibrarse la sacarosa (Figura 15). Parece necesario entonces, en una segunda aproximación, considerar la restricción impuesta por la membrana, como el hecho de que la gradiente de concentraciones es menor que lo estimado, debido a presencia de capas no agitadas a ambos lados de la membrana.

Una solución de la ecuación diferencial que expresa la concentración intracelular en función de los coeficientes de permeabilidad y de difusión, ha sido dada por Crank (1970) para la difusión de un soluto desde un medio infinito y perfectamente agitado hacia un cilindro no agitado de radio  $r$  rodeado por una membrana de permeabilidad finita  $P$ :

$$\frac{C(t)}{C(\infty)} = 1 - \sum_{i=1}^{i=n} \frac{4L^2 \exp(-Bi^2 Dt/a^2)}{Bi^2 (Bi^2 + L^2)}$$

en que  $M = P \cdot r/D$  y  $Bi$  son raíces de la ecuación

$$B J_1(B) - L J_0(B) = 0$$

y  $J_1$  y  $J_0$  son funciones de Bessel de la variable  $B$ .

Esta ecuación se resolvió para disintos valores de  $P$ ,  $t$  y  $r$ . Debido al gran número y complejidad de los cálculos que eran necesarios para obtener las razones de concentración para las diferentes moléculas, se

elaboró un programa de computación que se introdujo en un computador IBM 360.

Con los valores obtenidos, se construyeron curvas de  $C(t)/C(\infty)$  vs  $P$  para distintos radios y tiempos (Figura 17). De estos gráficos, puede obtenerse  $P$ , el coeficiente de permeabilidad, si se ha determinado previamente  $C(t)/C(\infty)$  y se conoce el radio de la fibra.

Los valores experimentales y los corregidos se comparan en la Tabla 3.

Los valores de los coeficientes de permeabilidad corregidos son mayores que los obtenidos experimentalmente. Los valores de  $P$  para agua, urea y glicerol también resultaron más altos que los obtenidos por Bunch y Edwards en *Balanus nubilis*. Debido a la gran complejidad en la superficie de la membrana de la fibra, los valores reales de  $P$  deben ser con toda seguridad bastante más pequeños que los obtenidos por nosotros y por Bunch y Edwards, ya que, como se ha dicho, la superficie total de la membrana es 30 a 40 veces mayor que la superficie geométrica.

En todo caso, si se supone que esta relación es constante para todas las fibras, se puede obtener un orden o secuencia en los valores de permeabilidad para los no-electrolitos y el agua. Con estos valores y los obtenidos por métodos osmóticos, se puede discutir los factores que afectan el paso de las moléculas a través de la membrana.

FIGURA 17

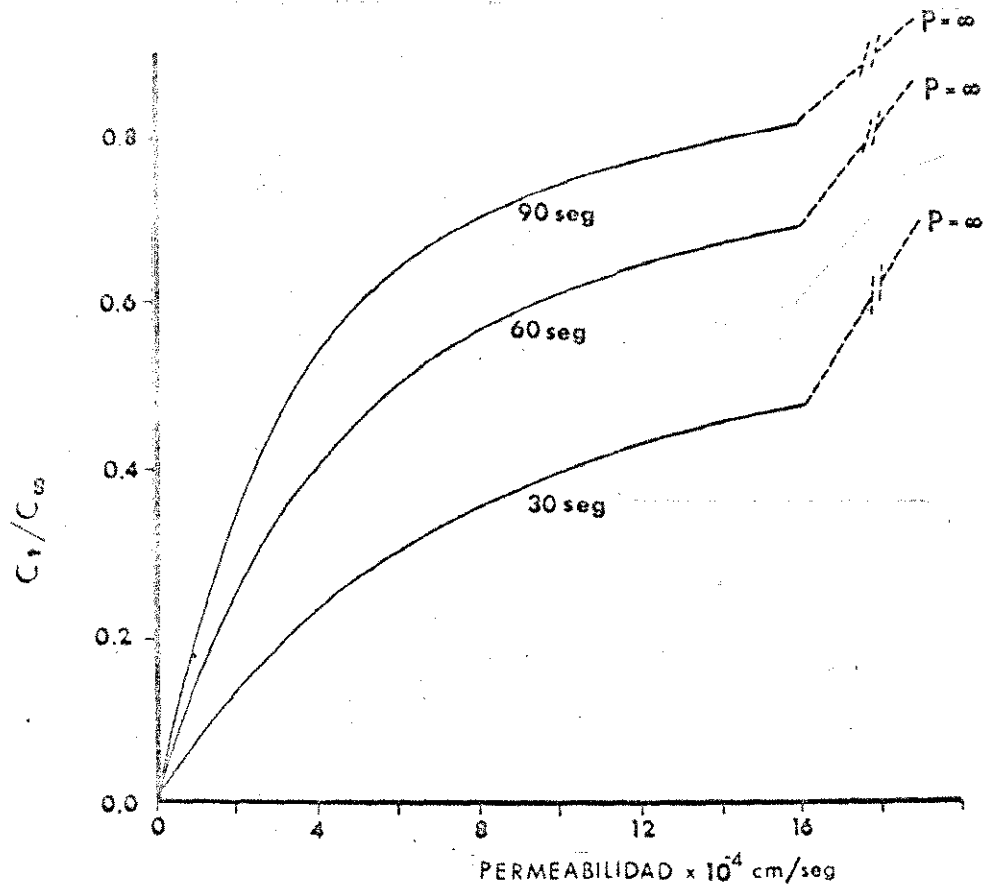


Gráfico de la razón de concentraciones  $C_t/C_\infty$  en función de la permeabilidad, a tiempos 30, 60 y 90 seg. El diámetro de la fibra es de 2,0 mm.

T A B L A 4

Molécula	P (cm/seg $\cdot 10^4$ ) (corregido)	k ( $\frac{\text{Aceite}}{\text{agua}}$ )	$P \cdot M^{\frac{1}{2}} \cdot 10^4$
BHO	5,05 $\pm$ 0,12	0,009	21,40
Antipirina	3,85 $\pm$ 0,17	0,032	52,80
Metanol	2,91 $\pm$ 0,08	0,0078	16,50
Acetamida	1,52 $\pm$ 0,09	0,00083	11,70
Etilen glicol	0,64 $\pm$ 0,01	0,00049	5,05
Glucosa	0,32 $\pm$ 0,01	---	4,56
Metil urea	0,23 $\pm$ 0,02	0,00044	1,99
Urea	0,17 $\pm$ 0,01	0,00015	1,32
Tiourea	0,17 $\pm$ 0,01	0,0012	1,48
Glicerol	0,12 - 0,01	0,00007	1,20
Inulina	0,00	---	---

Coefficientes de Permeabilidad (P), coeficientes de partición (k) aceite/agua y valores de  $P \cdot M^{\frac{1}{2}}$  de varios no-electrolitos. (M = peso molecular).

Los valores de P se dan con los errores standard.

Es obvio que pueden construirse otros modelos que tengan más similitud con la estructura morfológica de la fibra. Sin embargo, esto implica también que la solución matemática de las ecuaciones de difusión se hará enormemente más compleja.

Permeabilidad al agua y no electrolitos.-

La Figura 18 muestra un gráfico de  $PM^{\frac{1}{2}}$  vs k donde P es el coeficiente de permeabilidad, M el peso molecular y k el coeficiente de partición aceite/agua. La distribución de las moléculas, es muy semejante a la encontrada por Collander en Chara, lo que indicaría que en la fibra muscular de Balanus los factores químicos y físicos que determinan la permeabilidad son esencialmente los mismos.

Los resultados obtenidos (Tabla 4), muestran que el agua es una molécula muy permeante. La permeabilidad se determinó por medidas de captación de HTO y por métodos osmóticos medidos de cambio de volumen. Los valores obtenidos dieron un  $P_{\text{difusión}}$  de  $3,4 \cdot 10^{-4}$  cm/seg y un  $P_{\text{osmótico}}$  de  $29,3 \cdot 10^{-4}$  cm/seg con un  $L_p$  para la membrana de  $2,16 \cdot 10^{-12}$  cm<sup>3</sup>/seg · dina, obtenidos de las medidas de  $J_v / \Delta C$ .

Como se plantea más arriba, estos valores deben ser bastante más altos que los valores reales de permeabilidad, ya que en ambos métodos se considera la fibra como un cilindro y la superficie de intercambio es el manto de ese cilindro. Sin embargo, creemos que es válida una dis-



FIGURA 18

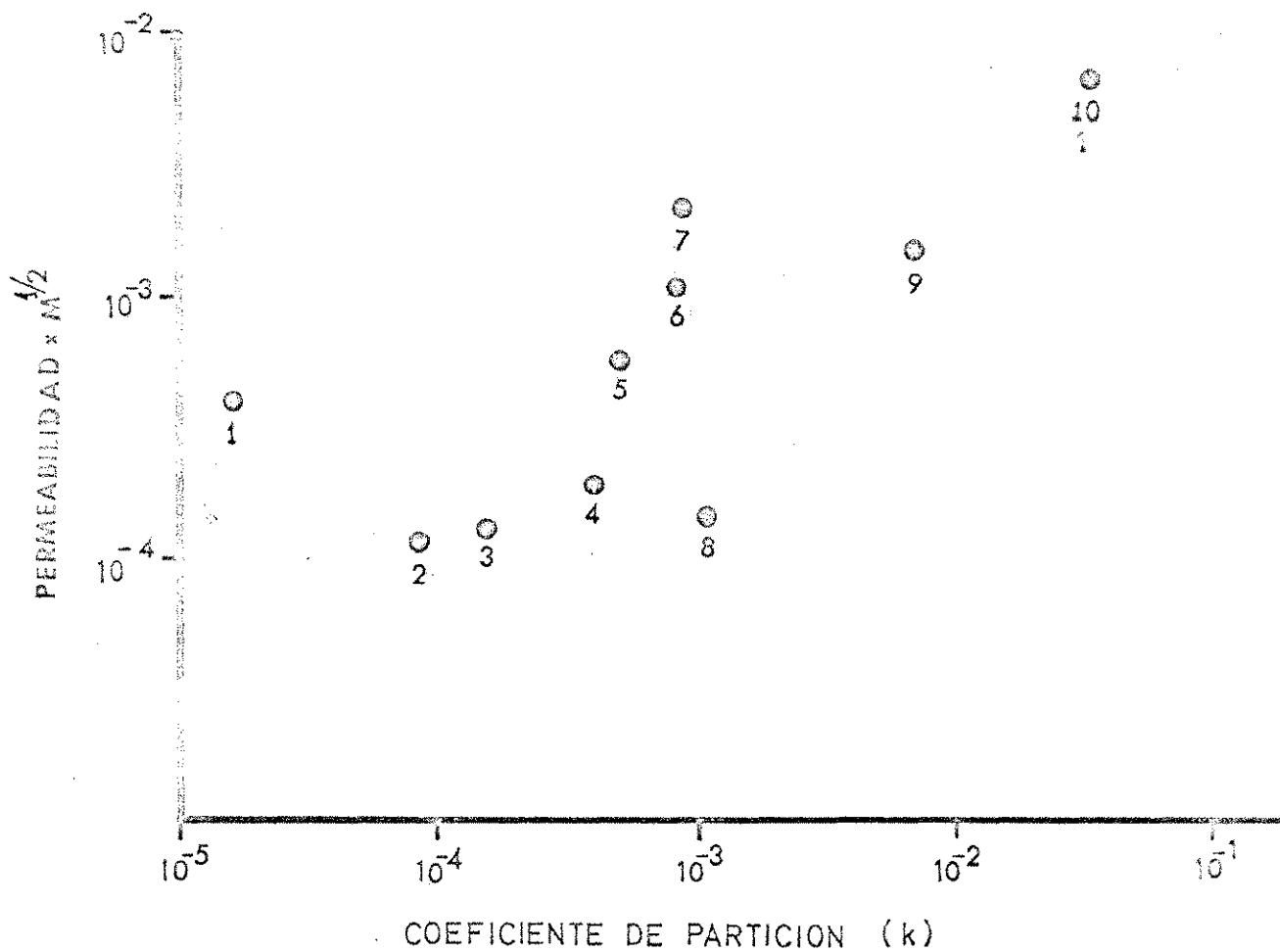


Gráfico de  $P \cdot M^{1/2}$  vs. k (Coeficiente de partición aceite de oliva :  $H_2O$ ). Estos datos son los obtenidos en los experimentos y corregidos por capas no agitadas.

- |                 |                   |               |
|-----------------|-------------------|---------------|
| 1.- Glucosa     | 2.- Glicerol      | 3.- Urea      |
| 4.- Metil urea  | 5.- Etilen glicol | 6.- Acetamida |
| 7.- Agua        | 8.- Tio urea      | 9.- Metanol   |
| 10.- Antipirina |                   |               |

cusión de las discrepancias entre los dos métodos. El hallazgo de que los flujos osmóticos son mayores que los causados por flujo difusional, ha llevado a postular a varios autores, que el movimiento de agua es de tipo Poiseuille en los primeros, fluyendo el agua por poros de la membrana debido a la gradiente osmótica y por difusión tipo Fick, en el segundo caso (Ussing, 1954; Solomón, 1968; Villegas y Villegas, 1960; Sorenson, 1971).

Cass y Finkelstein (1967), no han encontrado diferencias entre la permeabilidad osmótica y coeficientes de permeabilidad difusional en bicapas de lípidos de cerebro. Por lo tanto, otras explicaciones para estas discrepancias entre los dos coeficientes de permeabilidad podrían ser la existencia de un coeficiente de difusión para el HTO más pequeño en el citoplasma, lo que parece estar negado por los datos de Bunch y Edwards (1969), o el efecto de capas no agitadas de espesor considerable, lo que sí puede ser importante, debido a la complejidad de espacio extracelular.

El gráfico de la Figura 18, muestra que la urea y el glicerol, son los no electrolitos menos permeantes, mientras el metanol y la antipirina aparecen con las permeabilidades más altas, indicando que el factor más importante que determina la velocidad de entrada a la fibra, es la solubilidad en lípidos. En este sistema, el tamaño

no parece ser tan importante, ya que la urea por ejemplo, se sitúa en la secuencia principal, contrariamente a lo hallado por Wrigth y Diamond en vesícula biliar, donde ésta aparece con una permeabilidad bastante alta. Los mismos resultados se obtuvieron en los experimentos osmóticos (cambios de volúmen) que dieron para la urea un  $\sigma$  de 0.88, para el glicerol 0.96 y para el etilenglicol 0.45.

Se ha demostrado desde hace bastante tiempo, que el aumento en el número de los grupos OH provoca una disminución en la permeabilidad. Los experimentos muestran que, efectivamente, esto se cumple para el caso del metanol, etilenglicol y glicerol, aunque también P está afectado por el aumento de el tamaño molecular. Sin embargo, el efecto del aumento del largo de la cadena es bastante menor que el efecto del aumento de los grupos OH. Se ha postulado que el aumento en el número de OH implica una mayor posibilidad de formación de enlaces de H, aumentando de éste modo las interacciones del soluto con el agua. A mayor solvatación de la molécula en el agua, mayor es la energía que requiere para pasar a la fase lipídica. Una excepción encontrada, es el caso de la glucosa, que aparece con una permeabilidad mucho más alta que lo esperado. Esto podría explicarse por un mecanismo de transporte facilitado, descrito en muchas células y que en el músculo podría tener importancia por el enorme gasto energético que requiere el fenómeno de contracción.

Se ha demostrado que el aumento en los grupos  $\text{NH}_2$  en la molécula disminuye los coeficientes de permeabilidad y de difusión por razones análogas a los grupos  $\text{OH}$ . En los experimentos realizados, puede observarse que ésto se cumple para la urea y la acetamida. La primera tiene 2 grupos  $\text{NH}_2$  y en la segunda, se ha reemplazado un  $\text{NH}_2$  por un grupo  $\text{CH}_3$ : la urea muestra una permeabilidad 10 veces menor.

Se ha observado que los grupos  $\text{NH}_2\text{CO}$  causan una notable disminución en el coeficiente de permeabilidad que también puede explicarse porque estos grupos forman puentes de H, existiendo en este caso 4 sitios posibles de enlaces (dos aceptores y dos dadores). Los experimentos muestran que el reemplazo del O por S en la urea, produce un aumento en el coeficiente de permeabilidad. Esta mayor permeabilidad de la membrana a la tiourea, se puede explicar por la menor electro-negatividad del S, que hace que la fuerza de los enlaces H con el agua sea más débil que en el caso de la urea.

En experimentos realizados en bicapas, Lippe ha encontrado que la razón  $P(\text{tiourea})/P(\text{urea})$  aumenta en relación a la cantidad de colesterol en la membrana, lo que indica que la proporción entre fosfolípidos y esteroides es también un factor importante en la determinación de la permeabilidad a los no-electrolitos pequeños.

Generalmente, se observan apreciables variaciones en las permeabilidades cuando se comparan células de diferentes especies y aún de diferentes tejidos de un or-

ganismo. Esto puede deberse a variaciones en el coeficiente de partición de una determinada molécula en diferentes membranas. Corrientemente, el coeficiente de partición utilizado es el de aceite de oliva - agua, pero es evidente que éste será diferente si se considera la solubilidad en los lípidos de la membrana. Como las membranas varían en composición, se debe esperar una variación en los coeficientes de permeabilidad. Por ejemplo, las diferencias encontradas para las permeabilidades al etilen glicol y formamida en axones de Dosidicus gigas y Doriteuthis plei puede ser explicada por la diferente composición lipídica de estas membranas.

La alta permeabilidad al metanol, puede deberse a que es una molécula muy pequeña que no provoca gran distorsión de las cadenas parafínicas de los lípidos. Además, posee sólo un grupo OH para hacer enlaces de hidrógeno, por lo que es el grupo  $\text{CH}_3$  el que determina principalmente su solubilidad en lípidos.

La introducción de grupos  $\text{CH}_2$  aumenta el coeficiente de partición y la permeabilidad, lo que puede ser explicado por un gran efecto entrópico que determina una variación positiva en la energía libre de interacción agua:hidrocarburos, que tiende a excluir al soluto de la fase acuosa.

Como las interacciones entre moléculas de agua son mucho más fuertes que las interacciones hidrocarburo : agua, se tienden a formar enlaces entre ellas,

rompiéndose la estructura ordenada del agua en torno a las cadenas hidrocarbonadas; esto provoca entonces un aumento de entropía.

Lo contrario ocurre en la fase lipídica de la membrana donde las fuerzas de Van der Waals entre los lípidos de la membrana y las cadenas hidrocarbonadas de los solutos son predominantes.

Los experimentos de Bunch y Edwards, muestran que el DMSO (dimetilsulfóxido) y el ASA (ácido acetil salicílico) tienen mayor permeabilidad que la urea y también un mayor coeficiente de partición, siendo ambas mucho más grandes, lo que refuerza la idea que es el factor de solubilidad en lípidos el determinante en la restricción al paso de los no-electrolitos. Esto puede verse también, en el caso de la antipirina ( $M=188$ ), que es una molécula con dos anillos aromáticos, con sistemas electrónicos conjugados. Puede pensarse que éstas moléculas con electrones deslocalizados pueden hacer enlaces de Van der Waals fuertes con las cadenas lipídicas de los fosfolípidos. Estas características se verían aumentadas por aquellos grupos que tienen efectos inductivos al aumentar la densidad electrónica.

Recientemente, Träuble (1971), ha discutido el problema del paso de no-electrolitos a través de la parte lipídica de las membranas, en términos de fluctuaciones térmicas de las cadenas hidrocarbonadas. Postula

que el movimiento térmico provoca la formación de isómeros conformacionales por torcimiento de las cadenas, generando defectos estructurales que dejan volúmenes libres móviles entre ellas, donde pueden penetrar las moléculas permeantes.

La plasticidad de la membrana será función entonces, del largo de las cadenas, del grado de saturación, del tipo de isomería cis o trans, de la razón colesterol: fosfolípidos y de la temperatura.

Estos factores, además del tamaño y polaridad de los no-electrolitos, determinarán la magnitud de sus interacciones con los lípidos y por lo tanto, su permeabilidad.

Aunque no se estudió el efecto del pH en la permeabilidad, es razonable pensar que la carga y tamaño de los grupos polares de los fosfolípidos, afectará el transporte de los no-electrolitos, especialmente aquellos más polares, con los cuales pueden tener interacciones dipolo-dipolo o ión-dipolo.

Otros trabajos que pueden dar información acerca de los factores que afectan el flujo de no-electrolitos y de agua, son los estudios del efecto de la temperatura.

Hidalgo y Latorre (1970), han encontrado que en axones gigantes de Dosidicus gigas, la dependencia térmica del flujo de entrada es función del grado de polaridad, siendo las moléculas más afectadas la urea, la tiourea y etilén glicol. El efecto encontrado es mayor que lo esperado

por la variación de los coeficientes de difusión en solución. Bunch y Edwards, en Balanus, encontraron energías de activación de 7,46 K Cal/mol para agua y de 26,14 y 20,18 K Cal/mol para el DMSO y urea, respectivamente.

Existen varias explicaciones para dar cuenta de estos hechos; una sería que si se supone la existencia de poros acuosos en la membrana, el aumento de la temperatura aumentaría el área disponible para la difusión. Sin embargo, esto parece estar negado por los resultados de Bunch y Edwards, que encontraron que el valor de  $\sigma$  para urea y glicerol no se alteraba con la temperatura.

Otra posibilidad entonces, es que las energías de interacción agua-solutos, aumenten más para los solutos polares que para los no polares, por lo que éstos requieren una energía de activación más alta para pasar de la fase acuosa a la fase lipídica, sin necesidad de postular canales acuosos para el paso de no-electrolitos.

El análisis de los aumentos de energía libre de solución en  $H_2O$ , lípidos o membranas (Nitella) asociados a grupos funcionales específicos realizados por Wright y Diamond (1969), muestran que la secuencia principal se debe a las diferencias en las fuerzas intermoleculares agua-solutos; mientras más grandes sean esas fuerzas menor es la permeabilidad.

Los datos obtenidos, llevan a pensar que en fibra muscular de Balanus, la permeabilidad a los no-electrolitos depende de su coeficiente de partición aceite-



agua y en segundo lugar, de su tamaño. La permeabilidad al agua, podría ser explicada por el paso a través de canales acuosos que tienen grupos polares en su interior.

RESUMEN

Se estudió la permeabilidad de la fibra muscular de Megabalanus psittacus al agua y no-electrolitos, determinando los coeficientes de reflexión osmóticos y los coeficientes de permeabilidad difusional.

Los coeficientes de reflexión, se determinaron de la razón entre los flujos osmóticos provocados por gradientes de concentración de no-electrolitos y la sacarosa. Con este objeto, se usaron tres técnicas diferentes: medidas del cambio de densidad óptica, medida de potenciales de flujo y medidas del cambio de volumen de la fibra.

Se observó que los efectos de los no-electrolitos sobre la densidad óptica eran muy variables, ya que algunos provocaban oscurecimiento y otros aclaramiento de la fibra. Debido a estas diferencias en la magnitud y sentido de los cambios de transmitancia, no fue posible determinar un valor para el coeficiente de reflexión por éste método. La cinética de los cambios de densidad óptica, resultó ser más rápida que la de la variación del volumen, lo que parece indicar que no existe una correlación entre ambos fenómenos.

Los resultados de las medidas de potenciales de flujo, muestran que la urea y el glicerol causan los mayores efectos. El etilen glicol, provoca cambios de

potencial menores.

Los coeficientes de reflexión obtenidos para la urea y el glicerol, dieron un valor cercano a 1, o sea, que parecen ser tan impermeantes como la sacarosa. Para el etilén glicol, se obtuvo un  $\sigma$  de 0,55. Se postula que estos valores están más afectados por la difusión de las moléculas en el espacio extracelular, que los obtenidos por medidas de cambios de volumen.

Las medidas directas del cambio de volumen provocado por gradientes osmóticas de no-electrolitos, dieron valores de coeficientes de reflexión que estaban mejor correlacionados, con los coeficientes de permeabilidad difusional.

Los valores de  $\sigma$  obtenidos, fueron 0,96 para el glicerol, 0,83 para la urea y 0,45 para el etilén glicol.

Se determinaron los coeficientes de permeabilidad de HTO, urea, glicerol, glucosa, antipirina, metil urea, tiourea, metanol y acetamida en fibras musculares aisladas, haciendo medidas de captación de trazadores radiactivos.

Se encontró que los coeficientes de permeabilidad de los no-electrolitos son función de la polaridad de las moléculas. La urea, tiourea y el glicerol, presentan las permeabilidades más bajas, en cambio el agua la antipirina y la acetamida, son muy permeantes.

La glucosa aparece con un coeficiente de permeabilidad más alto de los esperado ~~por~~ su coeficiente de partición aceite/agua, lo que se explicaría por un transporte facilitado de esta molécula. En general, a medida que aumenta el número de grupos que pueden hacer enlaces de hidrógeno, disminuye la permeabilidad.

Los resultados indican, entonces, que la permeabilidad a los no-electrolitos en estas fibras, está determinada principalmente por el coeficiente de partición lípido/agua, y en segundo término, por el tamaño molecular.

Se postula que el paso de los no-electrolitos se realiza en tres etapas, que serían: a) paso desde la solución a la membrana, para lo cual deben romperse enlaces de hidrógeno entre el soluto y moléculas de agua; b) Difusión a través de la matriz lipídica de la membrana. c) Paso de la membrana a la solución en el interior de la célula y formación de nuevos enlaces de hidrógeno.

La difusión en la parte lipídica estaría favorecida para las moléculas que presentan menor energía de interacción con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, pero la etapa limitante del proceso sería el paso de la solución a la membrana.

REFERENCIAS

- 1.- Ashley, C.C. y E.B. Ridgway. On the Relations Between Potential Ca Transient and Tension in Single Barnacle Muscle Fibers. J. Physiol. 209: 105 - 130 (1970).
- 2.- Barnes, R.D. Invertebrate Zoology. W.B. Saunders Co. Philadelphia. Cap. 14, (1968).
- 3.- Brinley, F.J. Sodium and Potassium Fluxes in isolated Barnacle Muscle Fibers. J. Gen. Physiol., 51: 445 - 477 (1968).
- 4.- Bunch, W., C. Edwards. The Permeation of Non-electrolytes through the Single Barnacle Muscle Cell. J. Physiol., 202: 683 - 697 (1969).
- 5.- Bunch, W., G. Kallsen. Rate of Intra-cellular Diffusion as Measured in Barnacle Muscle. Science, 164: 1178 - 1179 (1969).
- 6.- Cass, A. and Finkelstein, A. Water Permeability of Thin Lipid Membranes. J. Gen. Physiol., 59: 1765 - 1784 (1967).
- 7.- Collander, R. The Permeability of Plant Protoplast to Small Molecules. Physiol. Plant 2: 300 - 311 (1949).
- 8.- Collander, R. The Permeability of Nitella Cells to Non-electrolytes. Physiol. Plant 7: 420-445, (1954).

- 9.- Cope, F. W. A Theory of Cell Hydration Governed by Absorption of Water on Cell Proteins Rather Than by Osmotic Pressure. Bull Mathem. Biophysics 29: 583 (1967).
- 10.- Crank, J. The Mathematics of Diffusion. Oxford University Press (1970).
- 11.- Danielli, J.F. and H. Davson. A Contribution to the Theory of Permeability of Thin Films. J. Cell Physiol., 5: 495 - 508 (1935).
- 12.- Dainty, J. y C. R. House. Unstirred Layers in Frog Skin. J. Physiol. 182: 66 (1966).
- 13.- Davson, H. A Textbook of General Physiology, Williams and Wilkins Co. Baltimore, USA. 4a. edición. Cap. VII (1970).
- 14.- Diamond, J.M. y W.H. Bossert. Standing-gradient Osmotic Flow. J. Gen. Physiol., 50: 2061-2083 (1967).
- 15.- Diamond, J.M. and E.M. Wright. Molecular Forces Governing Non-electrolyte Permeation Through Cell Membranes. Proc. Roy. Soc. B. 172: 273 (1969).
- 16.- Diamond, J.M., E.M. Wright. Biological Membranes. The Physical Basis of Ion and Non-electrolytes Selectivity. Ann. Rev. of Physiol., 31: 581 - 646 (1969).
- 17.- Dick, D.A.T. The Permeability Coefficient of Water in Cell Membrane and Diffusion Coefficient in the Cell Interior. J. Theoret. Biol. 7: 504-531 (1964).

- 18.- Dipolo, R. y R. Latorre. Effect of Temperature on Membrane Potential and Ionic Fluxes in Intact and Dialysed Barnacle Muscle Fibers. *J. Physiol.*, 224: 1 (1972).
- 19.- Goldstein, D.A. and A.K. Solomon. Determination of Equivalent Pore Radius for Human Red Cells by Osmotic Pressure Measurements. *J. Gen. Physiol.*, 41: 1-17 (1960).
- 20.- Hagiwara, S. Membrane Properties of the Barnacle Muscle Fiber. *Ann. of the New York Academy of Sciences.* 137: 1015 - 1024 (1966).
- 21.- Hagiwara, S., R.G. Reuner, N. Mayashi, M. Sakata, A.D.D. Grinell. Effect of External and Internal pH Changes on K and Cl Conductances in the Muscle Fiber Membrane of a Giant Barnacle. *J. Gen. Physiol.*, 52: 773-792 (1968).
- 22.- Hidalgo, C. y Latorre, R. Temperature Dependence of Non-electrolyte and Sodium Permeability in Giant Axon of Squid. *J. Physiol. (London)* 211: 173 (1970).
- 23.- Hinke, J.A.M. Solvent Water for Electrolyte in the Muscle Fiber of the Giant Barnacle. *J. Gen. Physiol.*, 56: 521 (1970).
- 24.- Katchalsky, A., P.F. Curran. Nonequilibrium Thermodynamic in Biophysics. Harvard University Press, Cambridge (1965).
- 25.- Kedem, O. y A. Katchalsky. Thermodynamic Analysis of the Permeability of Biological Membranes to Non-electrolytes. *Biochem. Biophys. Acta* 27: 229 (1958).
- 26.- Keynes, R.D., E. Rojas, R.E. Taylor y J. Vergara. Calcium and Potassium Systems of a Giant Barnacle Muscle Fiber under Membrane Potential Control. *J. Physiol. (London)* 229: 409-455 (1973).
- 27.- Ling, G.N. A Physical Theory of the Living State. Blaisdell Publishing Co., New York, USA (1962).

- 28.- Lippe, C. Urea and Thiourea Permeabilities of Phospholipid and Cholesterol Bilayer Membranes. *J. Mol. Biol.* 39: 669 - 672 (1969).
- 29.- Mc Laughlin, S.G.A. and J.A.M. Hinke. Sodium and Water Binding in the Single Striated Muscle Fibers of the Giant Barnacle. *Can. J. Physiol. Pharmac.* 44: 837 (1966).
- 30.- Mc Laughlin and J.A.M. Hinke. Optical Density Changes of Single Muscle Fibers in Sodium-free solutions. *Can. J. Physiol. Pharmac.* 46: 247 - 260 (1968).
- 31.- Mobley, B.A. y E. Page. The Effect of Potassium and Chloride ions on the Volume and Membrane Potential of Single Barnacle Muscle Cells. *J. Physiol.* 215: 49 - 70 (1971).
- 32.- Overton, E. The Probable Origin and Physiological Significance of Cellular Osmotic Properties. Traducción Inglesa de *Vierteljahrsschrift der Naturforschende Gesellschaft (Zürich)*, 44: 88-135 (1899) ex Paper on Biological Membrane Structure. Branton D. & R. B. Park. Editors Little Brown, Boston USA, pag. 45 - 52 (1967).
- 33.- Reisin, J., G.N. Ling. Exchange of  $^3\text{H}_2\text{O}$  in Intact Isolated Muscle Fiber of the Giant Barnacle. *Physiol. Chem & Physics* 5: 183 - 208 (1973).
- 34.- Reuben, J. P., L. Girardier and H. Grundfest. Water Transport and Cell Structure in Isolated Crayfish Muscle Fibers. *J. Gen. Physiol.* 47: 1141 (1964).
- 35.- Sha'afi, R.I. y C.M. Gary-Bobo. Water and Non-electrolyte Permeability in Mammalian Red Cell Membranes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 26: 105 - 146 (1973).



- 36.- Smulders, A.P. & E.M. Wright. The Magnitude of Non-electrolyte Selectivity in the Gall Bladder Epithelium. *J. Membrane Biol.*, 5: 297 - 318 (1971).
- 37.- Solomon, A.K. Characterization of Biological Membranes by Equivalent Pores. *J. Gen. Physiol.* 51: 335s - 364s (1968).
- 38.- Sorenson, A.L. Water Permeability of Isolated Muscle Fibers of a Marine Crab. *J. Gen. Physiol.* 38: 287 - 303 (1971).
- 39.- Träuble, H. The Movement of Molecules Across Lipid Membranes: A Molecular Theory. *J. Membrane Biol.* 4: 193 - 208 (1971).
- 40.- Ussing, H.H. Membrane Structure as Revealed by Permeability Studies. *Proc. Colston Res. Soc.* 7: 33 - 40 (1954).
- 41.- Vargas, F.F. Filtration Coefficient of Axon Membrane as Measured with Hydrostatic and Osmotic Methods. *J. Gen. Physiol.* 51: 13 - 27 (1968).
- 42.- Vargas, F.F. Water Flux Electrokinetic Phenomena in Squid Axon. *J. Gen. Physiol.* 51: 123s-130s (1968).
- 43.- Villegas, R., and F.V. Barnola. Characterization of the Resting Axolemma in Giant Axons of the Squid. *J. Gen. Physiol.*, 44: 963 (1961).
- 44.- Villegas, R.G., Villegas, M., R. Di Polo y J. Villegas. Non-electrolyte Permeability Sodium Influx, Electrical Potentials and Axolemma Ultrastructure in Squid Axons of Various Diameters. *J. Gen. Physiol.*, 57: 623 - 637 (1971).
- 45.- Villegas, R. G. y G.M. Villegas. Characterization of the Membranes in the Giant Nerve Fiber of the Squid. *J. Gen. Physiol.* 43(5, Pt 2): 73 (1960).
-

- 46.- Weast, R.C. Handbook of Chemistry and Physics. The Chemical Rubber Co., Ohio, 1966.
- 47.- Wright, E.M., J.M. Diamond. An Electrical Methods of Measuring Non-electrolyte Permeability. Proc. Roy. Soc. B. 172: 203 - 225 (1969).
- 48.- Wright, E.M. and J.M. Diamond. Patterns of Non-electrolyte Permeability. Proc. Roy. Soc. B. 172: 227 - 271 (1969).