

H-FC  
C-B  
632

EFEECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LOS FLUJOS DE NO  
ELECTROLITOS Y DE SODIO EN AXON GIGANTE DE JIBIA.

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON  
MENCION EN BIOLOGIA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE CHILE.

per

María Cecilia Hidalgo Tapia

1969.

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS

## A G R A D E C I M I E N T O S

Deseo expresar mis más profundos agradecimientos a todos los investigadores que iniciaron el grupo de Biofísica, que culminó con la creación del Laboratorio de Fisiología Celular de Montemar, sin cuya desinteresada ayuda, constante enseñanza y apoyo, este trabajo jamás habría sido posible.

En especial deseo agradecer al Dr. Fernando Vargas por haberme introducido al fascinante campo del estudio de las propiedades de la membrana celular.

También agradezco al señor Sergio Ubilla por su valiosa colaboración en la parte técnica de este trabajo.

Finalmente, deseo expresar mi reconocimiento a mi esposo Ramón por su apoyo y aliento incondicional durante todo el desarrollo de este trabajo.

## C O N T E N I D O

I.	INTRODUCCION .....	1
II.	REVISION BIBLIOGRAFICA .....	3
III.	MATERIALES Y METODOS	
	Técnica de Microinyección .....	10
	Técnica de Perfusión .....	12
	Electrodos y Circuitos de Registro .....	14
	Análisis de las Muestras .....	15
	Soluciones .....	17
IV.	RESULTADOS .....	19
V.	DISCUSION .....	24
VI.	RESUMEN .....	29
	BIBLIOGRAFIA .....	31

## I N T R O D U C C I O N

El efecto de la temperatura sobre el potencial de reposo ha sido objeto de numerosas investigaciones en diversas preparaciones biológicas. En el caso particular de la fibra nerviosa los principales aportes se deben a Hodgkin y Katz ( 1949 ), Dalton y Hendrix (1962), Guttman ( 1966 ) y Senft ( 1967 ).

Al estudiar el efecto de la temperatura sobre el potencial de reposo en axones gigantes de la jibia Dosicus gigas, Latorre (1969) encontró un resultado inesperado. En efecto, al subir la temperatura del medio de 3 a 18 °C, el potencial de reposo disminuyó cerca de 10 mV en valor absoluto. Este resultado discrepa con los descritos anteriormente en axones gigantes de Loligo forbesi, en los cuales el potencial de reposo permanece constante en este rango de temperatura, Hodgkin y Katz ( 1949 ), y con los datos obtenidos en axones de langosta, en los que, de acuerdo a los experimentos realizados por Dalton y Hendrix ( 1962 ) en Homarus americanus se encontró que el potencial de reposo aumentaba en 10 mV cuando se subía la temperatura del medio de 2 a 16 °C.

Para tratar de explicar este fenómeno se siguieron dos caminos diferentes. Por una parte Latorre ( 1969 ) se dedicó a investigar el efecto del potencial aplicado a través de la membrana axonal sobre los flujos de partículas hacia el interior de la célula, con la hipótesis de que la hiperpolarización provocada por la baja temperatura podría alterar la permeabilidad de la membrana. En este trabajo, por otra parte, se estudia el efecto de la temperatura sobre los flujos de diferentes tipos de partículas. Se eligió con este objeto una serie de noelectrolitos de diferentes grados de polaridad y una partícula cargada, el ión sodio.

La hipótesis que determinó estos experimentos consiste fundamentalmente en suponer que la temperatura baja altera la estructura de la membrana celular, organizándola en el sentido de hacerla presen-

tar una barrera mayor a la difusión de sustancias dentro y fuera de las células. Si esta hipótesis fuera válida, debería detectarse un cambio significativo de los flujos de partículas a través de ella al variar la temperatura. Una disminución no específica de las permeabilidades de diferentes sustancias a través de la membrana podría dar cuenta de los resultados obtenidos en potencial de reposo, ya que sería posible postular entonces que a temperaturas bajas las corrientes de fuga, que normalmente enmascaran el valor real del potencial de reposo, se verían notablemente disminuídas.

## REVISION BIBLIOGRAFICA.

La tesis más aceptada actualmente sostiene que la membrana celular constituye la barrera primaria al paso de sustancias dentro y fuera de la célula, Harris (1960). Los defensores de esta tesis consideran que el interior de la célula consiste en uno o más compartimentos relativamente uniformes que contienen iones, pequeñas moléculas orgánicas y macromoléculas. La gran masa del agua y de los cationes monovalentes dentro de la célula se supone esencialmente en el mismo estado que en el exterior de ella, y sólo una pequeña fracción de ellos estaría ligada a componentes estructurales. El agua ligada tendría una estructura particular, diferente al agua libre y por lo tanto, no estaría disponible como solvente. Las macromoléculas intracelulares no difusibles poseerían sitios potencialmente capaces de ligar solutos permeables, ya sea por fuerzas electrostáticas, formación de enlaces de hidrógeno u otros tipos de enlaces, en forma esencialmente no selectiva.

Se supone entonces que los sitios que dan cuenta de la selectividad del transporte de moléculas dentro y fuera de las células están localizados exclusivamente en la membrana celular.

Dos tipos principales de procesos de transporte diferenciables termodinámicamente estarían presentes en la membrana, transporte activo y transporte pasivo. El transporte activo, a diferencia del pasivo, se realiza en contra de una gradiente termodinámica de potencial. Se supone que el flujo a través de la membrana de solutos específicos a favor de una gradiente se realiza a través de poros o canales presentes en ella, que poseen sitios selectivos con capacidad de ligar partículas. Los procesos pasivos de este tipo no requieren el acoplamiento obligado del metabolismo celular, sin embargo es posible que se requiera la energía metabólica para mantener la membrana, o más precisamente los poros, en un estado adecuado para el flujo selectivo de solutos.

La acumulación selectiva de sustancias dentro de la célula representa un flujo de solutos a través de la membrana en contra de una gradiente. Los procesos activos de este tipo se atribuyen a bombas dependientes de la energía metabólica presentes en la membrana. En general

estas bombas representan mecanismos especializados de transducción de energía metabólica en trabajo osmótico, con componentes de reacciones energéticas y sitios de ligazón selectivos arreglados especialmente - de tal manera que la translocación direccional de un soluto específico a través de la membrana ocurra contra una gradiente termodinámica aparente.

La teoría opuesta a esta postula que el agua, los iones y las macromoléculas dentro de la célula constituyen un sistema altamente organizado, de tal manera que varios tipos de sitios fijos dentro del - sistema están disponibles para interactuar específicamente con ciertos solutos y no con otros, Ling (1962). Este sistema intracelular sería responsable de la selectividad iónica y de las propiedades de excitabilidad.

La existencia de una bomba metabólica para sodio y potasio en - los fantasmas de eritrocitos de glóbulos rojos descrita primero por - Straub (1954) y analizada luego por Hoffman (1962) y el hecho que las preparaciones de fibras nerviosas gigantes en perfusión intracelular , en que se ha reemplazado la gran masa de axoplasma por soluciones acuosas de electrolitos, presenten potenciales de reposo y acción (Baker et al, 1961, Oikawa et al, 1961) parecen demostrar que la membrana celular es efectivamente la responsable de los procesos de transporte y excitalibilidad.

No debe olvidarse, sin embargo, la importancia de las membranas presentes en el interior de la célula en ciertos procesos de transporte como la captación de calcio en el sistema sarcotubular descrita por - Hasselbach (1964) y la translocación direccional de cationes monovalentes en mitocondrias (Lehninger, 1964, Fernandez Morán et al, 1964). Estos hechos han conducido a suponer que los sistemas celulares de membranas, ya sean interiores a la célula o superficiales poseen organizaciones macromoleculares especializadas en la conversión de energía metabólica en trabajo osmótico.

#### Naturaleza de la membrana celular.

La microscopía electrónica ha revelado que las células animales y vegetales generalmente exhiben además de la membrana celular propia-

mente tal, una profusión de sistemas membranosos en su interior, Palade (1964).

La membrana plasmática que era invisible con el microscopio de luz se reveló con la microscopía electrónica. En preparaciones fijadas con permanganato de potasio, Robertson (1957) observó que la membrana aparecía como un sistema trilaminar, compuesto por dos bandas densas separadas por otra menos densa, las tres del mismo espesor, con un ancho total de 75 Å. Se ha observado que la mayoría de los sistemas membranosos de la célula presentan esta estructura trilaminar, lo que ha conducido a la teoría de la membrana unitaria propuesta por Robertson (1959, 1962, 1964) quien sostiene que la membrana celular está formada por dos monocapas de lípidos comprendidas entre dos capas de material no lipídico, presumiblemente proteínas con una organización asimétrica.

Los estudios clásicos de Overton a fines del siglo pasado en células vegetales (Davson 1964) demostraron que la velocidad de penetración de una sustancia a través de la célula está determinada en gran proporción por su solubilidad en lípidos, lo que se expresa en forma cuantitativa por el coeficiente de partición aceite-agua. Las moléculas tales como los éteres, las acetonas y los aldehidos penetran muy rápidamente, mientras que las más solubles en agua como el glicerol, el etilén glicol y el eritritol lo hacen más lentamente. Sin embargo, los esfuerzos para establecer un paralelismo exacto entre solubilidad en lípidos y velocidad de penetración fueron infructuosos;

Estos experimentos dieron el primer indicio de que la membrana celular era de naturaleza lipídica.

Junto con estos experimentos de penetración de no electrolitos dentro de la célula, Gorter y Grendel en 1925 hicieron otro tipo de experimento de gran importancia en la elucidación de la naturaleza de la membrana. Extrajeron los lípidos de glóbulos rojos con acetona y determinaron con una balanza de Langmuir que el área que ocupaba una capa monomolecular compacta de lípidos era igual al doble del área celular, concluyendo así que los lípidos de la membrana están ordenados en una capa bimolecular.

Los experimentos de Collander (1947, 1949, 1954) en células de Chara ceratophylla y de Nitella flexilis en los cuales estudió permeabilidad de no electrolitos en función de coeficiente de partición y tamaño

Una de las primeras teorías en cuanto a estructura de la membrana se debe a Höber (1936) quien supuso que la membrana podría considerarse como un mosaico de regiones de tipo lipídico con regiones porosas, presumiblemente proteínas en forma de red. Opuesto a este punto de vista está el enfoque de Davson y Danielli (1952) que consideran a la membrana como una barrera lipídica continua. Según esta teoría la velocidad de penetración de moléculas a través de la membrana está determinada por la energía necesaria para pasar de la fase acuosa extracelular a la fase lipídica de la membrana. Las sustancias con grupos polares penetrarían más lentamente que las con grupos no polares.

Para explicar la importancia del tamaño molecular, Danielli supone que el material lipídico no es uniforme, presentando zonas de diferente densidad, de tal manera que las moléculas más pequeñas pasarían a través de estas regiones más rápidamente que las grandes.

En el caso particular del axón gigante, los principales estudios sobre la estructura de la membrana celular al microscopio electrónico se deben al grupo de Villegas et al, que han estudiado sistemáticamente la estructura de las fibras nerviosas de la jibia *Doryteuthis plei*. Villegas y Villegas (1960) describieron la estructura de la preparación de axón gigante, que consiste en el axón propiamente tal, limitado por la membrana axonal de aproximadamente  $80 \text{ \AA}$  de espesor, rodeada por células de Schwann. Las células de Schwann estarían a  $80 \text{ \AA}$  de distancia del axolema, tendrían un espesor mínimo de 0,1 a 0,2  $\mu$  en los extremos, y un espesor máximo de 0,8 a 0,9  $\mu$  en la región del núcleo. Existirían canales tortuosos de  $60 \text{ \AA}$  de diámetro limitados por las membranas de las células de Schwann que comunicarían el axolema con el exterior. De acuerdo con este modelo, Villegas et al concluyen que la principal barrera a la difusión dentro y fuera del axoplasma la constituye la membrana celular.

Tanto las membranas de las células de Schwann como la membrana del axón aparecen al microscopio electrónico como estructuras trilaminares con dos zonas densas y una clara entre ellas.

G. Villegas (1969) ha realizado el estudio al microscopio electrónico del axón gigante de la jibia chilena *Dasidicus gigas*, encontrando

básicamente la misma estructura descrita en los axones gigantes de Doryteuthis plei, con la diferencia de que los canales que cruzan las células de Schwann son más tortuosos y que el ancho de estas, 1,5 a 6 u, es mayor que el de las células de Schwann de los axones de Doryteuthis.

Esta misma estructura ha sido descrita en el caso de la jibia Loligo forbesi por Baker et al (1962) y de Loligo pealii por Geren y Schmidt (1954)

Según Villegas y Barnola (1961), el modelo estructural de las barreras difusivas en axón gigante indica que los solutos y el agua llegan al axolema a través de los canales que recorren la célula de Schwann, y pasan a través de ella por poros presentes en la membrana. Determinaron la constante de permeabilidad para el agua a través del axolema midiendo flujos de agua tritiada, y encontraron un valor de  $1,42 \pm 0,39 \times 10^{-4}$  cm/seg. A partir de este valor de permeabilidad para el agua, suponiendo que esta se mueva a través de la membrana por canales acuosos (Frankenhauser y Hodgkin, 1956) determinaron la razón entre el área disponible para la difusión y el espesor de la membrana  $A/\Delta X$ , encontrando un valor de 5,3, que es mayor al valor de 4,0 descrito por Frankenhauser y Hodgkin (1956) para el potasio.

Además de determinar la permeabilidad al agua por métodos radioactivos, Villegas y Villegas (1960) estudiaron el coeficiente de filtración del agua estudiando los flujos obtenidos al aplicar un gradiente osmótico, obteniendo un coeficiente de permeabilidad de filtración. Según Koefoed-Johnsen y Ussing (1953) las diferencias entre las permeabilidades obtenidas por difusión y por métodos osmóticos indicarían la presencia de poros llenos de agua en la membrana celular. En el caso del axón Doryteuthis plei estas dos permeabilidades difieren en un orden de magnitud, siendo menor la permeabilidad difusional que la osmótica. Según Pappenheimer et al (1951) la razón entre estas dos permeabilidades podría dar una estimación del radio de poro de la membrana, que en este caso tendría un valor límite máximo de  $8,5 \text{ \AA}$ , y mínimo de  $1,5 \text{ \AA}$ , que es el valor del radio de una molécula de agua.

Posteriormente, Villegas y Barnola (1961) determinaron en axón gigante

te de Doryteuthis, la permeabilidad de la membrana a una serie de no electrolitos, expresándola en términos del coeficiente de reflexión  $\sigma$  desarrollado por Staverman en 1951 para membranas porosas (Katchalsky y Curran, 1965)

Según Staverman, el coeficiente de reflexión es cero para el agua y uno para una molécula totalmente impermeable, las moléculas que pasan a través de la membrana con mayor dificultad que el agua tienen valores de  $\sigma$  entre 0 y 1. De los valores de  $\sigma$  obtenidos para los no electrolitos obtienen un radio equivalente de poro de 4,25 Å.

Villegas et al (1968) confirmaron posteriormente este valor usando un número mayor de no electrolitos.

Wright y Diamond (1969 a) determinaron los coeficientes de reflexión para 206 no electrolitos mediante mediciones de potenciales de flujo en vesícula biliar. Encontraron que en general  $\sigma$  disminuía de 1 a 0 cuando aumentaba el coeficiente de partición aceite-agua. Sin embargo, las moléculas con muchas ramificaciones tenían un  $\sigma$  mayor a lo esperado por sus coeficientes de partición, indicando una anisotropía de los lípidos de la membrana en tanto que las moléculas pequeñas tenían  $\sigma$  menores de los esperados por sus coeficientes de partición, indicando que penetran por regiones de la membrana con alta densidad de grupos polares, asociados con moléculas de agua.

Según Wright y Diamond (1969 b), la temperatura afecta más los coeficientes de reflexión de los no electrolitos con  $\sigma$  mayores y por lo tanto más permeables, que los  $\sigma$  de los no electrolitos más polares y menos permeables.

En general postulan que la membrana podría ser un mosaico de zonas no polares formadas por lípidos y de zonas polares con agua incorporada a través de las cuales pasarían solutos polares de PM inferior a 70-80. Pasado este límite de tamaño, la entrada de los solutos polares estaría condicionada por su coeficiente de partición aceite-agua.

#### Algunas consideraciones sobre la estructura del agua.

Si se supone que la membrana celular presenta zonas polares con moléculas de agua organizadas en torno a ellas, es interesante revisar

la estructura del agua tanto en estado líquido como en hidratos cristalinos o en el interior de moléculas de proteína. Según Némethy y Scheraga (1962) el agua líquida presenta estructuras cristalinas tipo hielo, formadas por moléculas de agua con distintos números de enlaces de hidrógeno, de 1 a 4, coexistentes con moléculas de agua libre. El número de moléculas de agua que forman estas estructuras es función de la temperatura, siendo menor su tamaño a mayor temperatura. Este modelo fué primero postulado por Bernal y Fowler (1933) y modificado luego por Frank y Wen (1957) quienes supusieron que estos conglomerados de moléculas de agua se formaban y se deshacían a gran velocidad.

La interacción de no electrolitos con esta estructura ha sido analizada en el caso de solutos no polares por Frank y Evans (1945), quienes demostraron que la introducción de un soluto no polar en agua provocaba una disminución de entropía. Estos autores explicaron este hecho suponiendo que como las fuerzas de interacción entre agua y soluto no polar son menores que entre agua y agua, es posible suponer que el agua se ordena en torno a la molécula no polar.

Los solutos polares por otra parte, interactuarían con la estructura del agua según su capacidad de formar enlaces hidrógenos.

Si se supone (Horowitz y Fenichel, 1965) que el agua presente en la membrana celular puede interactuar con grupos polares, tales como los que se encuentran en las proteínas, se tendría que el agua en torno a ellos estaría cristalizada en forma diferente al agua líquida, y con una estabilidad mucho mayor conferida por el tamaño de la molécula ordenadora. Esta estructura se vería grandemente afectada por la temperatura, que condicionaría el número de moléculas de agua que forman la capa cristalina en torno al grupo polar.

La difusión de una partícula a través de canales acuosos se vería entonces condicionada por su tamaño molecular, explicando así el fenómeno descrito en numerosas preparaciones de que los solutos polares pequeños penetran más rápidamente dentro de la célula que lo esperado por su coeficiente de partición aceite-agua. Las partículas muy pequeñas podrían moverse a través de los intersticios de esta estructura cristalina, en tanto que las más grandes tendrían que hacerlo por el agua líquida disponible.

## M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

Todos los experimentos se realizaron en axones gigantes, de 800 a 1100  $\mu$  de diámetro, provenientes de la jibia chilena Dosidicus gigas.

Las jibias se capturaron generalmente a 8 - 10 Km. de la costa, se decapitaron inmediatamente y los mantos que contienen los paquetes de axones gigantes se lavaron cuidadosamente y se transportaron en agua de mar con hielo al laboratorio. El tiempo promedio transcurrido desde el momento de la captura de las jibias hasta su llegada a la playa fue siempre inferior a 3 horas, generalmente una hora y media o dos. Se procedió a aislar los axones gigantes en el momento mismo en que los mantos llegaron al laboratorio.- Para ésto se extrajeron primero del manto los paquetes de fibras (disección gruesa) y éstos se disecaron posteriormente en agua de mar artificial fría bajo iluminación de campo oscuro (disección fina). Se obtienen en promedio de 4 a 8 axones de 5 - 6 cm. de largo por jibia. Debido a que los axones que se han mantenido aislados en frío por más de 12 horas presentan cambios en sus propiedades fisiológicas, por lo menos en cuanto a lo que se refiere a efectos de temperatura, todos los experimentos se realizaron con axones de menos de 12 horas, consideradas éstas desde el momento de la captura de la jibia.

### Técnica de micro-inyección:

Se siguió básicamente la técnica descrita por Brady et al (1958) introduciendo algunas modificaciones especialmente en lo que concierne al registro interno de potencial,

Una vez aislada y cuidadosamente despojada del máximo posible de tejido conectivo, se montó la fibra nerviosa, con los dos extremos atados con hilos de seda, en una cámara de lucita de 2,56 cm. de ancho. La fibra descansaba horizontalmente sobre la base de la cámara y estaba completamente sumergida en un volumen de aproximadamente 1 ml de agua de mar artificial. Los extremos de la fibra reposaban sobre soportes de

lucita de la misma altura que la cámara, separados de ésta por una distancia de 1 cm. El largo total de axón en sentido horizontal era entonces de aproximadamente 4,5 cm.

A través de un extremo de la fibra se introdujo, por un corte practicado bajo microscopio, una pipeta de aproximadamente 400 u de diámetro hasta alcanzar una distancia de 0,4 cm. medidos desde el borde del soporte. Esta pipeta estaba perfectamente alineada con respecto a la fibra y a la cámara en sentido horizontal, con el objeto de facilitar la introducción del electrodo interno dentro del axón. En efecto el electrodo interno debido a su pequeño diámetro, 80 a 100 u, tiene gran flexibilidad y es por esta razón que es necesario guiarlo haciéndolo pasar por dentro de una pipeta rígida.

El electrodo interno se hizo avanzar hasta alcanzar el primer tercio de axón dentro de la cámara. Terminada esta etapa, se procedió a registrar el potencial de acción y de reposo. Si a temperatura ambiente la fibra no presentaba potenciales de acción y de reposo superiores a 90 mV y 45 mV respectivamente, se descartaba el axón y se iniciaba un nuevo experimento. En todos los experimentos de microinyección se usó electrodos de calomel como electrodos de registro de potencial.

Una vez establecido si la fibra estaba en buenas condiciones fisiológicas se cortó el axón sobre el otro soporte y se introdujo mediante un micromanipulador una pipeta de vidrio de alrededor de 150 u de diámetro llena con solución radiactiva que se deseaba inyectar en el interior del axón, hasta recorrer con ella toda la zona de axón comprendida en la cámara cuidando de no tocar el electrodo interno. Luego se retiró lentamente la pipeta inyectando al mismo tiempo la solución radiactiva, por presión,

hasta completar un volúmen de 1 - 1,5 u litros.

La micropipeta se calibró pesando el volúmen de líquido que es capaz de contener en la zona de 150 u de diámetro.

Finalizada esta operación y una vez retirada la pipeta del axón se controló el potencial de reposo y de acción, recolectando simultáneamente cada 5 o 10 min. muestras del agua de mar exterior. El líquido así obtenido se vertió directamente en planchetas secas para determinar su radiactividad posteriormente. Durante todo el experimento se controló la excitabilidad de la fibra.

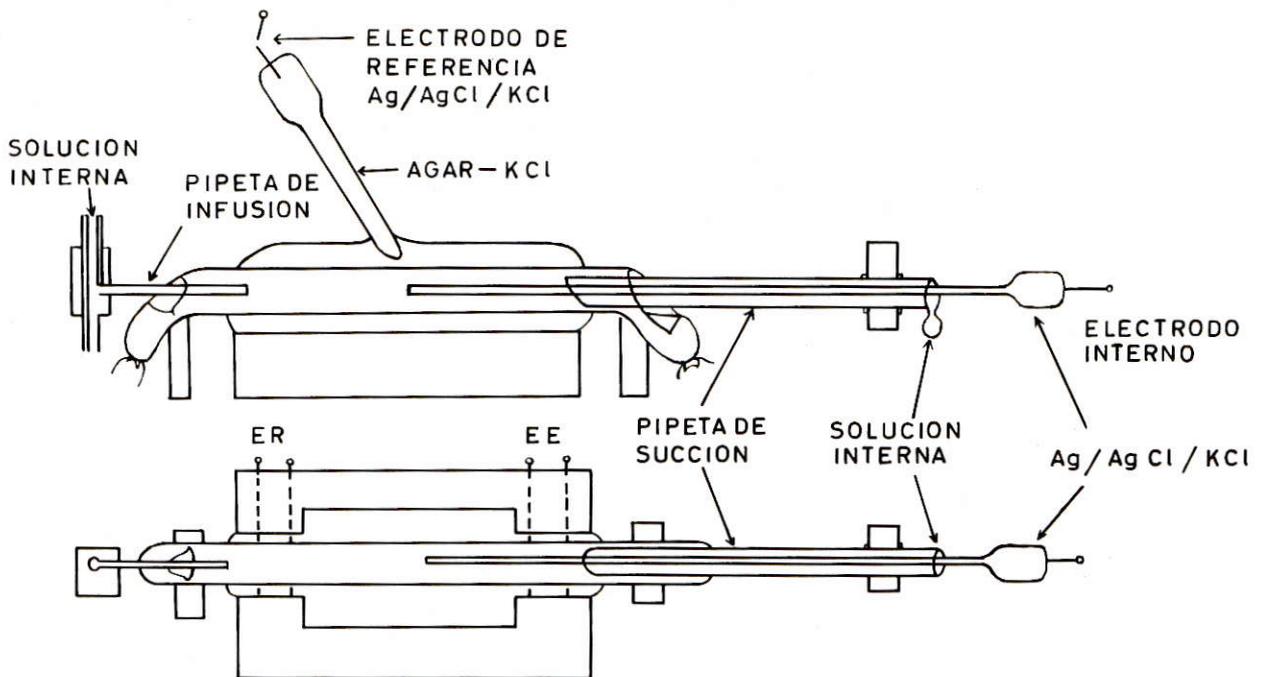
Se bajó la temperatura del agua de mar que rodeaba el axón haciendo circular bajo la cámara una solución de glicerina al 20% en agua destilada, que se enfrió sumergiendo en ella un dedo frío.

La pared de plástico que separaba ambas soluciones tenía un espesor de 1 mm., lo que permitía un eficaz enfriamiento del agua de mar. La temperatura del líquido en la cámara se controló cada minuto por medio de un termómetro calibrado sumergido en la solución. Cada vez que se bajó la temperatura del medio, se reemplazó la solución recogida en cada muestra por agua de mar fría.

#### Técnica de perfusión.

La técnica que se describe a continuación es una modificación de la técnica descrita por Oikawa et al (1961). Se ocupó la misma cámara de lucita descrita en los experimentos de microinyección, y se montó el axón en ella en la forma ilustrada esquemáticamente en la Figura 1. A través de un extremo de la fibra se introdujo lentamente una pipeta de vidrio de 600 a 650 u de diámetro, succionando axoplasma cuidadosamente

F I G U R A 1



El esquema representa una vista lateral y una superior del sistema usado para la perfusión intracelular. La solución interna se introdujo al axón mediante una leve presión producida por una columna de agua.

Para más detalles en cuanto al método seguido ver texto.

mediante un tubo de plástico conectado a la parte posterior de la pipeta para evitar estiramientos de la membrana.

Se prosiguió la introducción de esta pipeta, que se conoce con el nombre de pipeta de succión, hasta recorrer toda la zona de axón sumergida en el agua de mar de la cámara. Terminada esta etapa, se introdujo por el otro extremo de la fibra una pipeta de 300 a 350  $\mu$  de diámetro, conocida como pipeta de infusión, hasta recorrer dos centímetros por el interior de la pipeta de succión. La pipeta de infusión estaba conectada al reservorio que contenía la solución de perfusión mediante un tubo plástico. Al terminar la introducción de la pipeta de infusión dentro de la de succión, se dejó circular la solución de perfusión a través de ellas para remover todos los posibles restos de axoplasma de su interior. Se retiró luego la pipeta de infusión, siempre circulando solución de perfusión, hasta alcanzar el extremo de la cámara correspondiente, y sólo entonces se retiró la pipeta de succión hasta el otro extremo de la cámara, removiendo el tubo de polietileno conectado a su parte posterior. Al seguir este procedimiento queda bajo perfusión toda la zona de axón comprendida entre los dos extremos de la cámara. Para establecer el registro de potencial intracelular, se introdujo el electrodo interno a través del extremo libre de la pipeta de succión hasta alcanzar el centro de la cámara.

Los flujos de entrada se determinaron preparando una solución de agua de mar artificial con un isótopo radioactivo de la molécula cuyo flujo se deseaba medir. Se reemplazó el agua de mar que bañaba el axón por esta solución y se colectaron gotas de la solución de perfusión que fluía por la pipeta de succión directamente en frascos de conteo para ser analizadas posteriormente en un contador de centelleo líquido.



introduciéndolo en un tubo de vidrio que se llenó posteriormente con KCl 0,6 M., y conectando este tubo con la pipeta a través de un puente de KCl.

b.- Electrodo Externo: fundamentalmente es un electrodo corriente de calomel o plata-cloruro de plata, al que se le ha adaptado un tubo de vidrio de punta fina lleno con agar al 2% en agua de mar, para sumergirlo en el agua de mar exterior.

c.- Circuito de Registro: En todos los experimentos se conectó el electrodo a un preamplificador. En los experimentos de microinyección se usó un preamplificador marca Bak y en los de perfusión una marca Block. Para medir potencial de reposo se conectó la salida del preamplificador a un electrómetro Hewlett-Packard, al que en algunos casos se acopló un inscriptor Varian.

El potencial de acción se midió conectando directamente la salida del preamplificador a la entrada de un osciloscopio Tektronix 502 A. Se estimuló externamente la fibra mediante un par de electrodos de platino incorporados a la cámara de lucita, comandando pulsos con un estimulador Grass S5 provisto de una unidad de aislación de estímulo.

#### Análisis de las muestras.

a) Determinación en contador de centelleo líquido. En todos los experimentos de perfusión se recogieron gotas de solución interna directamente en frascos de conteo. En la gran mayoría de los experimentos se recolectaron 2 gotas de la solución de perfusión en cada frasco, aunque en algunos casos se recolectaron una o tres gotas. Sin embargo se tuvo gran cuidado en mantener constante el número de gotas recolectadas en cada experimento.

A cada frasco se agregaron 6 ml de solución de cen

telleo y 4 ml de etanol absoluto. La solución de centelleo contenía 6 g/lit P10 y 0,5g/lit POPOP disueltos en tolueno. Todas las muestras se contaron en un contador de centelleo líquido, marca Nuclear Chicago.

Las muestras que contenían sólo un isótopo, i.e. urea- $C^{14}$ ; uretano- $H^3$ ; etilén glicol- $H^3$  y agua tritiada se contaron con el voltaje del tubo fotomultiplicador en 1515 voltios, el discriminador de la altura del pulso en 0,5 voltios y el atenuador en 1,0.

Las muestras que contenían dos isótopos se analizaron determinando el espectro de energía de cada uno de ellos con un voltaje constante de 1515 voltios en el tubo fotomultiplicador. Luego se seleccionó la región de cada espectro a la cual se iba a contar cada isótopo de acuerdo con la composición de cada muestra.

Se usaron dos mezclas distintas de isótopos. Una de ellas contenía  $Na^{22}$  y urea -  $C^{14}$  y la otra  $Na^{22}$  y etilén glicol- $H^3$ .

La primera de ellas se analizó con el atenuador en 32, variando el discriminador de tal manera que para el canal A el discriminador estaba en 0,5 voltios, para el B en 9,0 voltios. Con estas especificaciones se lee en el canal A el 95% del  $Na^{22}$  presente en la muestra y el 33% de la urea  $C^{14}$ . En el canal B se obtiene sólo el 33% del  $Na^{22}$  y nada de la urea- $C^{14}$ . Se determinan estos porcentajes tomando como 100% el número de cuentas que se obtienen con el atenuador en 1,0 y el discriminador en 0,5 Voltios.

Las muestras que contienen  $Na^{22}$  y etilén glicol  $H^3$  se analizaron con el atenuador en 4, el discriminador para el canal A en 0,5 Voltios y para el canal B en 9 volts. La eficiencia relativa del  $Na^{22}$  en el canal A es de 100% y en el B 87%, en tanto que el etilén glicol- $H^3$  sólo se determina en el

canal A con una eficiencia de 90%.

Debido a la forma en que se realiza la separación de isótopos, en que se resta al número total de cuentas obtenidas en el canal A el número de cuentas de  $\text{Na}^{22}$  obtenido en el canal B ponderado por un factor, se trató de tener siempre 15 veces más  $\text{C}^{14}$  o  $\text{H}^3$  que  $\text{Na}^{22}$  para disminuir los errores de corrección.

Siempre se determinaron junto con las muestras patrones conocidos de cada uno de los isótopos presentes en la mezcla, así como combinaciones de ellos, con el objeto de verificar si la calibración del sistema no variaba de un experimento a otro.

b) Determinación en contadores de flujo.

En los experimentos de microinyección se recolectó el agua de mar externa que contenía urea- $\text{C}^{14}$  y se colectó en planchetas adecuadamente limpias y secas. Una vez evaporada la solución, se procedió a contar las planchetas en un contador automático de flujo, marca Nuclear Chicago.

Soluciones.

Todas las soluciones se prepararon con agua destilada, purificada posteriormente por paso a través de una resina de intercambio iónico. Una vez preparadas se mantuvieron en refrigerador y se renovaron semanalmente. Todos los reactivos empleados en la preparación de las soluciones eran de grado analítico.

La composición del agua de mar artificial usada fue:  $\text{NaCl}$  430 mM;  $\text{CaCl}_2$  10 mM;  $\text{MgCl}_2$  50 mM, Tris 5 mM; pH: 7,5.

En los experimentos de microinyección el agua de mar artificial contenía también  $\text{KCl}$  10 mM.

La solución de perfusión usada en todos los experimentos fue  $\text{KF}$  550 mM; tris 5 mM; pH: 7,35

Isótopos Radioactivos: Urea- $C^{14}$ , bicurea  $C^{14}$  y uretano  $H^3$ .  
Se obtuvieron en Radiochemical Center. El resto de los  
isótopos, etilén glicol -  $H^3$ ; agua tritiada y  $Na^{22}$  se ob-  
tuvieron en New England Nuclear Corporation.

## RESULTADOS

Para determinar el efecto de temperatura sobre los flujos de no electrolitos, el primer procedimiento experimental seguido consistió en estudiar la salida de urea  $C^{14}$  del interior de un axón intacto en función de la temperatura mediante la técnica de microinyección.

El número total de cuentas de urea  $C^{14}$  que contenía cada muestra se graficó en papel semilogarítmico en función del tiempo. Por los puntos obtenidos se trazó una recta ajustada según el método de mínimos cuadrados. La inclinación de la recta,  $k$ , es la constante cinética de la exponencial.

$$(1) \quad \text{cpm}(t) = \text{cpm}(0) e^{-kt}$$

que describe la salida de radiactividad del interior de un compartimen- to sin considerar retorno, donde  $\text{cpm}(t)$  es el número de cuentas que se obtienen en tiempo cualquiera y  $\text{cpm}(0)$  las cuentas obtenidas a tiempo cero.

La recta determinada tiene la expresión:

$$(2) \quad \text{Log cpm}(t) = -kt + \text{Log cpm}(0)$$

La ecuación que describe el flujo difusional a través de una membrana, se deriva de la primera ley de Fick y tiene la siguiente expresión matemática:

$$(3) \quad J = -D \Delta c / \Delta x$$

en que  $J$  es el flujo por unidad de área,  $D$  el coeficiente de difusión a través de la membrana,  $\Delta c$  la gradiente de concentración y  $\Delta x$  el espesor de la membrana celular.

Para el caso de un cilindro de largo  $l$  y diámetro  $d$ :

$$(4) \quad J = (1/A) dn/dt = (1/\pi dl) dn/dt$$

donde  $n$  es el número de moles. Introduciendo la expresión (4) en la ecuación (3) se tiene:

$$(5) \quad (1/\pi dl) dn/dt = -D \Delta c / \Delta x$$

Transformando  $n$  en concentración se tiene:

$$(6) \quad (V/\pi dl) dc/dt = -D \Delta c / \Delta x$$

donde  $V$  es el volumen del cilindro,

$$(7) \quad V = (\pi d^2/4) l$$

Reemplazando (7) en (6) se obtiene:

$$(8) \quad (d/4) \, dc/dt = -D \Delta c / \Delta x$$

En los experimentos de microinyección se procura que la concentración externa de la molécula cuyo flujo se está determinando sea cero en comparación con la concentración interna, como:

$$(9) \quad \Delta c = C_e - C_i \quad \begin{array}{l} C_e: \text{concentración externa.} \\ C_i: \text{concentración interna.} \end{array}$$

Si  $C_e \rightarrow 0$  entonces

$$(10) \quad \Delta c = -C_i$$

Reemplazando en (8) se tiene

$$(11) \quad (d/4) \, dc/dt = D c_i / \Delta x$$

Como el espesor de la membrana es desconocido se define una nueva constante, la constante de permeabilidad P, por:

$$(12) \quad P = D / \Delta x$$

Introduciendo (12) en (11) se tiene:

$$(13) \quad (d/4) \, dc/dt = P C_i$$

Integrando esta ecuación se tiene:

$$(14) \quad \text{Log } c(t) = (4P/d) t + \text{Log } c(0)$$

Comparando la ecuación (14) con la ecuación (2) se tiene finalmente:

$$(15) \quad P = (d/4) k$$

Es posible determinar entonces la constante de permeabilidad de una molécula a través de la membrana axonal conociendo el diámetro del axón y la constante k.

Mediante este método se determinaron las permeabilidades de salida de urea  $C^{14}$  en cinco experimentos de microinyección que se resumen en la tabla 1. Se obtuvo un valor promedio de permeabilidad de  $5,53 \pm 1,80 \times 10^{-7}$  cm/seg.

Se procedió luego a determinar el efecto de la temperatura sobre la salida de urea  $C^{14}$ . Se recogieron muestras a temperaturas ambiente y luego se disminuyó la temperatura. Como ésta no baja en forma instantánea hasta el valor deseado, se controló cada minuto y se tomó el valor promedio de todas las determinaciones hasta alcanzar durante un par de muestras un valor estable y luego se volvió a temperatura ambiente. La

T A B L A 1

SALIDA DE UREA C<sup>14</sup> EN AXONES MICROINYECTADOS.

EXP	DIAMETRO (u)	k x 10 <sup>5</sup> (seg <sup>-1</sup> )	P x 10 <sup>7</sup> (cm/seg)	N
U-1	1000	3,33	8,33	5
U-2	1000	2,09	5,22	11
U-3	1100	1,21	3,32	5
U-4	1000	2,05	5,64	10
U-5	800	2,56	5,12	18
		2,25 ± 0,78	5,53 ± 1,80	

Los valores que se presentan al pié de las columnas corresponden al promedio más la desviación standard. N es el número de observaciones, k la constante cinética descrita en el texto y P el coeficiente de permeabilidad determinado según la fórmula  $(d/4) k$ .

figura 2 ilustra un resultado típico de la acción de la temperatura sobre la salida de urea  $C^{14}$ . Se puede apreciar una gran inhibición del flujo basal al bajar la temperatura hasta  $3^{\circ} C$ , y una recuperación total al volver de nuevo a temperatura ambiente. Se descartó la participación del metabolismo en los flujos de salida de urea  $C^{14}$  porque estos no fueron afectados por 2-4 dinitro fenol 2 mM ni por ouabaina 0,1 mM, aún cuando se mantuvieron en agua de mar con inhibidor durante tiempos largos, una hora o más.

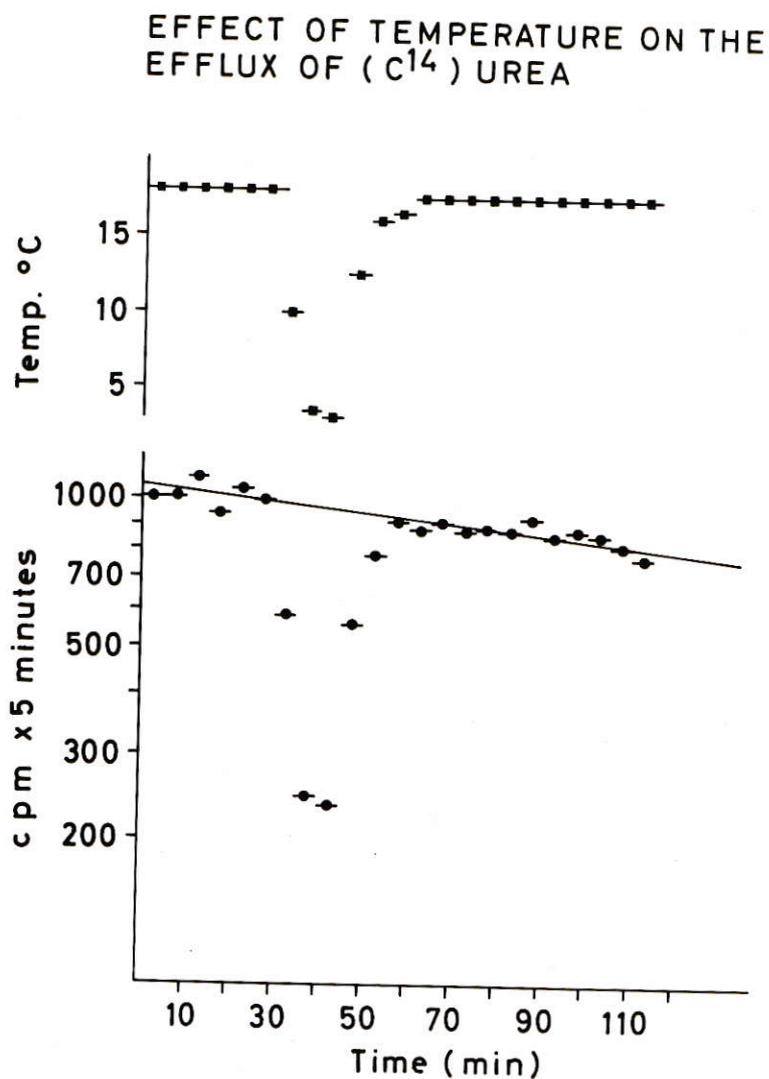
La figura 3 muestra los resultados obtenidos en 3 experimentos diferentes. Se determinaron los flujos de salida relativos tomando como 100% los valores de flujo obtenidos a  $18^{\circ} C$ . Se trazó la recta que aparece en la figura analizando los puntos experimentales según el método de los mínimos cuadrados. Se obtuvo una inhibición de hasta un 80% cuando se disminuyó la temperatura de  $18^{\circ}$  a  $3^{\circ} C$ .

Para continuar el estudio de la dependencia térmica de los flujos de no electrolitos, se cambió la técnica de microinyección por la técnica de perfusión intracelular. Numerosas razones motivaron este cambio, entre ellas que esta preparación permite estudiar con mayor precisión los flujos de partículas muy permeables, que la recolección de las muestras es más sencilla y por lo tanto involucra menos factores de error y finalmente que el axón perfundido representa más claramente una preparación de membrana que el axón intacto que se utiliza en los experimentos de microinyección.

Para el caso del axón perfundido, se calculó la permeabilidad por un método similar al descrito previamente para axones microinyectados, considerando que la gradiente de concentración tiene signo opuesto y que el volumen del compartimento en el que se origina el flujo es el volumen del agua de mar exterior. Con estas correcciones, el flujo por unidad de área, que se designa por la letra J, está dado por:

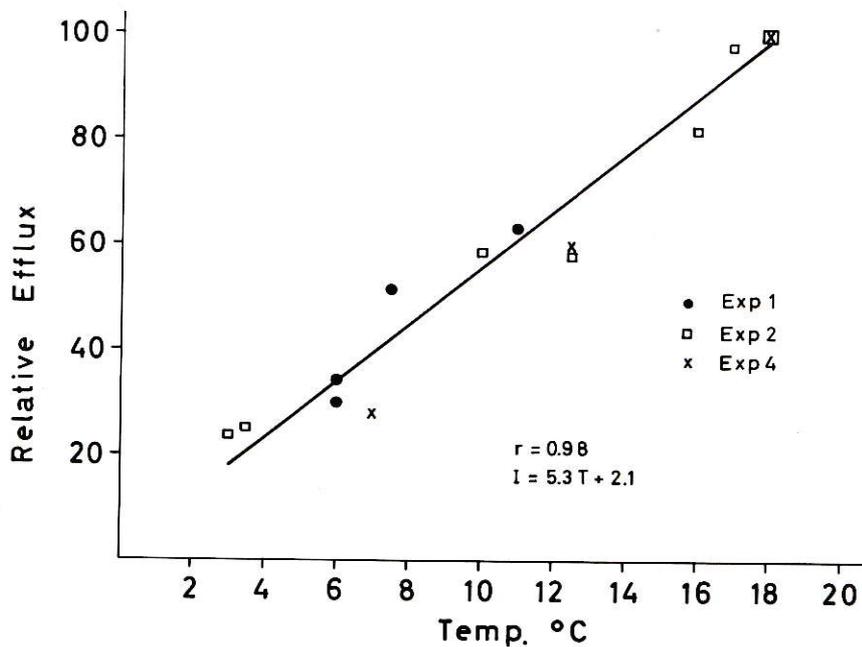
$$J = -P (C_i - C_e)$$

donde P es la constante de permeabilidad,  $C_i$  la concentración interna y  $C_e$  la concentración externa. Debido a la gran velocidad de flujo de la solución de perfusión interna es posible suponer que la concentración interna es igual a cero en todo momento comparada con la externa. Se obtie



Se determinó la recta que aparece en la figura por el método de mínimos cuadrados. La temperatura del agua de mar que rodeaba el axón se determinó cada minuto y se tomó el valor promedio. Diámetro del axón: 1000  $\mu$ . Coeficiente de regresión de la recta: 0,98.

EFFECT OF TEMPERATURE ON THE EFFLUX OF (C<sup>14</sup>)-UREA



Los flujos relativos que figuran en la ordenada se calculan tomando como 100% el flujo obtenido a 18°C. La recta se calculó por el método de mínimas cuadradas tomando los resultados obtenidos con tres axones diferentes. El coeficiente de regresión de la recta es 0,98.

ne entonces:

$$P = J/C_e$$

Se determinó  $J$  midiendo el número de cuentas que entraban al axón por unidad de tiempo y dividiendo este valor por el área de la fibra y por la actividad específica del isótopo en la solución de agua de mar exterior. Los posibles errores que pueden intervenir en la determinación de los flujos provienen entonces de las mediciones del tiempo de muestreo del área del axón y de la actividad específica de la solución. La concentración exterior de la sustancia estudiada se determinó en cada experimento, recogiendo un volumen fijo de agua de mar, midiendo su radiactividad y multiplicando el número de cuentas obtenido por el recíproco de la actividad específica.

La tabla 2 presenta un resumen de las permeabilidades obtenidas según este método para urea, tiourea, etilén glicol, uretano y tolueno, en orden creciente. También aparece en esta tabla la permeabilidad al agua tritiada, que se determinó por la fórmula:

$$P = J'/C'_e$$

en que  $J'$  representa el número de cuentas que atraviesa la membrana por unidad de tiempo y de área y  $C'_e$  el número de cuentas por unidad de volumen de la solución externa.

Es posible observar en la tabla 2 que en general la permeabilidad aumenta con el coeficiente de partición aceite-agua. El etilén glicol y la tiourea presentan una anomalía ya que el etilén glicol es más permeable de lo que podría esperarse por su coeficiente de partición. Este hecho podría deberse a que el etilén glicol tiene un peso molecular inferior a la tiourea.

El agua por su alta permeabilidad constituye un caso particular que se analizará detalladamente en la discusión.

El efecto de la temperatura sobre la entrada de tiourea está ilustrado en la figura 4. Es posible apreciar una correlación estrecha entre temperatura y flujo. Como puede observarse en la figura es necesario un tiempo de 3 a 4 minutos para obtener un flujo de entrada

T A B L A 2

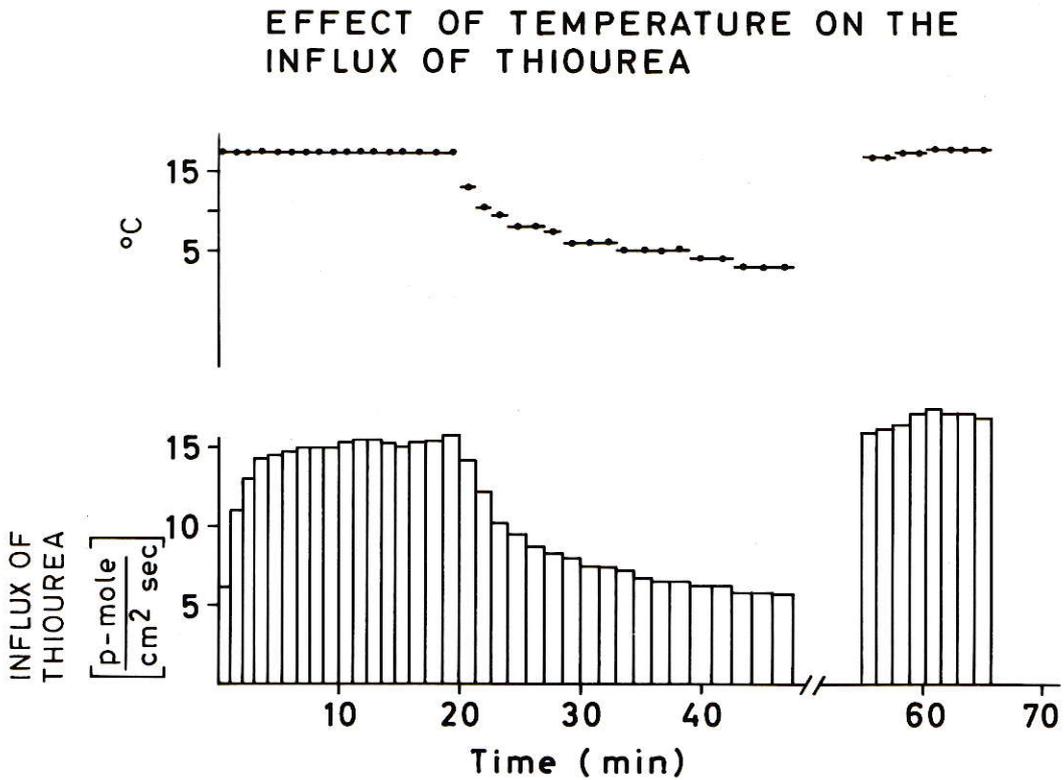
CONSTANTES DE PERMEABILIDAD PARA EL AGUA TRITIADA Y UNA SERIE DE NO ELEC-  
TROLITOS EN AXONES PERFUNDIDOS.

MOLECULA	PERMEABILIDAD (cm/seg.) <i>x 10<sup>6</sup></i>	PESO MOLECULAR	RANGO DE TEMPERATURA	COEFICIENTE DE PARTICION ACEI- TE-AGUA x 10 <sup>4</sup>
UREA (18)	0,76 ± 0,19	60	17-19	1,5
TIOUREA (11)	3,47 ± 1,00	76	17-19	12,0
ETILEN GLICOL (19)	8,60 ± 1,32	62	17-19	5,0
URETANO (11)	36,2 ± 8,7	89	17-18,5	740
TOLUENO (9)	80 ± 36	92	17-19	- -
AGUA (11)	78 ± 22	18	17	- -

Los valores de permeabilidad representan el promedio más la desviación Standard. El número de experimentos figura entre paréntesis.

Los coeficientes de partición aceite-agua se tomaron de los datos pre-  
sentados por Collander (1954).

F I G U R A 4



Se determinó el flujo de entrada de tiourea mediante la técnica de perfusión intracelular. Se bajó continuamente la temperatura hasta alcanzar un valor estable de 3°C, recogiendo muestras simultáneamente. Luego se dejó subir a temperatura ambiente sin tomar muestras hasta alcanzar un valor estable de temperatura.

constante.

La figura 5 describe un experimento similar en que se midieron simultaneamente flujos de entrada de urea y sodio y potencial de reposo.

Nuevamente es posible apreciar como afecta la temperatura los flujos de urea y el potencial de reposo. El efecto sobre los flujos de sodio se analizará detalladamente más adelante.

La tabla 3 resume los resultados obtenidos con toda la serie de no electrolitos estudiados.

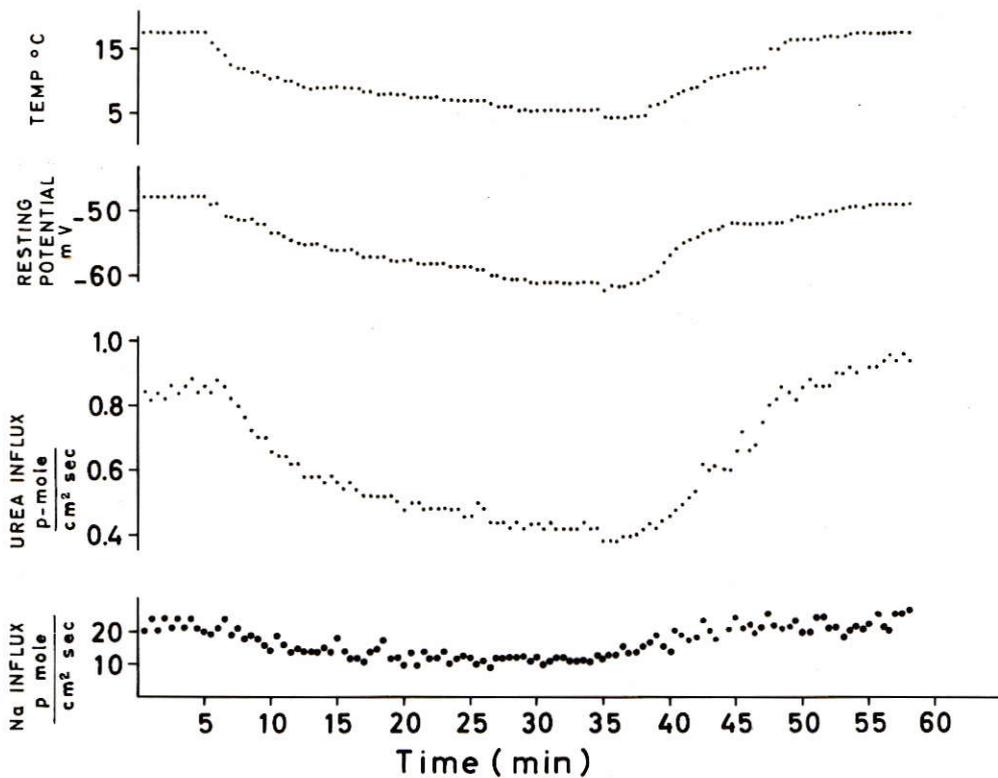
En general se observa que los flujos de no electrolitos polares como urea, tiourea y etilén glicol se ven más afectados por la temperatura que los de no electrolitos no polares. Asimismo es posible apreciar que en la gran mayoría de los casos el efecto de la temperatura fue completamente reversible.

Los resultados obtenidos con sodio se presentan en la tabla 4. Los flujos de sodio se midieron simultaneamente con los de urea o de etilén glicol. En general es posible notar que los valores obtenidos a temperatura ambiente son menores que los descritos anteriormente por Rojas y Canessa (1968) en la misma preparación, quienes determinaron un valor promedio de 43 p.moles/cm<sup>2</sup>.seg. El valor promedio determinado según estos experimentos es de 23 p.moles/cm<sup>2</sup>.seg. La discrepancia entre estos valores podría deberse a que en los axones usados por Rojas y Canessa la concentración interna de sodio no es cero como en estos experimentos, sino 2 mM. Asimismo el agua de mar artificial usada por estos autores tenía KCl 10 mM.

La temperatura afectó en casi todos los experimentos los flujos de sodio. Sin embargo, en dos casos los flujos de sodio aumentaron continuamente a través de todo el experimento y no fueron sensibles a la temperatura. No es posible explicar estos datos suponiendo que el axón estuviera dañado, ya que los potenciales de reposo y de acción presentaron valores normales durante el transcurso del experimento.

En el caso del sodio, sólo se presentan datos de flujos porque en la estimación de la permeabilidad para partículas cargadas deben considerarse las gradientes eléctricas además de las gradientes de -

F I G U R A 5



Se determinaron simultaneamente en axones perfundidos el potencial de reposo y los flujos de entrada de urea y sodio y la temperatura en función del tiempo. Se observa una dependencia directa entre los flujos y la temperatura.

T A B L A 3

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LOS FLUJOS (J) Y LAS PERMEABILIDADES (P) PARA UNA SERIE DE NO ELECTROLITOS Y AGUA TRITIADA, EN AXONES PERFUNDIDOS.

MOLECULA	EXP	CONC. (mM)	TEMP. °C.	FLUJO DE ENTRADA (p.moles/cm <sup>2</sup> seg.)	P x 10 <sup>6</sup> (cm/seg)	N
UREA	UNa-3	2,00	17	1,04 ± 0,06	0,52 ± 0,03	8
			10,5	0,89 ± 0,02	0,44 ± 0,01	9
UREA	UNa-4	2,00	18	1,44 ± 0,06	0,72 ± 0,03	16
			10,5	0,96 ± 0,03	0,48 ± 0,01	9
			16,5	1,56 ± 0,07	0,78 ± 0,03	4
UREA	UNa-7	0,86	19	0,69 ± 0,03	0,80 ± 0,04	15
			9	0,45 ± 0,03	0,52 ± 0,04	12
			18	0,65 ± 0,03	0,76 ± 0,04	8
UREA	UNa-8	0,92	17,5	0,85 ± 0,02	0,92 ± 0,02	10
			7,5	0,48 ± 0,01	0,52 ± 0,01	12
			5,5	0,43 ± 0,01	0,47 ± 0,01	13
			4,5	0,39 ± 0,01	0,42 ± 0,01	7
			17,5	0,93 ± 0,02	1,01 ± 0,02	9
UREA	UNa-10	0,71	16	0,67 ± 0,03	0,95 ± 0,04	10
			7,5	0,37 ± 0,01	0,52 ± 0,02	6
TIOUREA	Th-28	4,26	17,5	15,40 ± 0,19	3,60 ± 0,04	9
			5	6,60 ± 0,17	1,55 ± 0,04	3
			3	5,80 ± 0,10	1,36 ± 0,02	3
			18	17,10 ± 0,22	4,02 ± 0,05	6
ETILEN GLICOL E-18		1,60	18	12,40 ± 0,39	7,78 ± 0,24	6
			3	7,60 ± 0,39	4,75 ± 0,24	8
			16	11,88 ± 0,24	7,44 ± 0,15	5
ETILEN GLICOL E-21		2,13	19,5	27,10 ± 1,70	12,72 ± 0,80	13
			9	14,00 ± 0,34	6,57 ± 0,16	14
			17	22,70 ± 2,05	10,66 ± 0,96	4

T A B L A 3 (continuación)

ETILEN GLICOL	E-22	2,00	16,5	18,31 ± 0,88	9,16 ± 0,44	13
			6,5	9,45 ± 0,48	4,72 ± 0,24	11
			16,5	15,60 ± 0,70	7,80 ± 0,35	10
ETILEN GLICOL	ENa-23	2,55	18,5	23,12 ± 1,99	9,07 ± 0,78	25
			6,5	12,74 ± 0,94	5,00 ± 0,37	9
			16	20,24 ± 0,31	7,94 ± 0,12	8
ETILEN GLICOL	ENa-24	2,65	17	18,94 ± 0,49	7,15 ± 0,18	33
			6	11,05 ± 0,68	4,17 ± 0,26	4
			5	9,22 ± 0,39	3,48 ± 0,14	6
			3	7,69 ± 0,17	2,90 ± 0,06	6
			17	17,94 ± 0,31	6,80 ± 0,12	8
URETANO	Ur-15	0,51	17	18,87 ± 0,70	37,0 ± 1,4	15
			4	13,54 ± 0,28	26,5 ± 0,5	10
			17	16,68 ± 0,43	32,7 ± 0,8	10
URETANO	Ur-16	0,47	19	26,13 ± 1,14	55,6 ± 2,4	17
			10	17,80 ± 0,75	37,9 ± 1,6	7
URETANO	Ur-17	0,75	3	19,80 ± 1,13	29,3 ± 1,7	7
			17,5	29,80 ± 1,50	44,1 ± 2,2	4
TOLUENO	T-47	0,012	19	0,51 ± 0,02	41,0 ± 2,0	12
			5	0,32 ± 0,02	32,0 ± 2,0	6
			16	0,43 ± 0,02	36,0 ± 2,0	5
AGUA	HTO-31		16,5		80,9 ± 3,8	13
			5		63,9 ± 0,5	4
			16		90,0 ± 0,7	4
AGUA	HTO-35		17		54,4 ± 6,2	10
			8		39,5 ± 8,1	9
AGUA	HTO-36		4		44,6 ± 1,0	8
			17		60,9 ± 1,0	3
AGUA	HTO-37		17		65,3 ± 2,5	13
			10		49,1 ± 1,5	4

Los datos en esta tabla se calcularon por medio de la constante de permeabilidad.

T A B L A 1

EFEECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL FLUJO DE ENTRADA DE SODIO EN AXONES PERFUNDIDOS.

EXP.	TEMPERATURA ( ° C.)	FLUJO DE ENTRADA (p.moles/cm <sup>2</sup> seg.)	N
UNa-3	17	18,0 ± 2,4	11
	10,5	24,0 ± 1,3	12
	17	25,5 ± 1,0	4
UNa-4	18	20,1 ± 2,9	16
	10,5	30,9 ± 2,8	8
	16,5	47,3 ± 3,6	4
UNa-7	19	17,1 ± 1,8	18
	9	13,3 ± 1,0	13
	18	17,7 ± 2,9	8
UNa-8	17,5	21,8 ± 1,8	10
	7,5	12,3 ± 1,4	12
	5,5	11,2 ± 0,7	13
	4,5	15,4 ± 1,6	7
	17,5	23,8 ± 2,4	10
UNa-10	16	15,2 ± 0,9	10
	8	12,8 ± 1,0	3
BNa-23	18,5	27,4 ± 2,4	11
	6,5	14,5 ± 2,1	8
	16	27,6 ± 1,9	6

TABLA 4 (Continuación)

ENa-24	17	$34,1 \pm 1,2$	14
	6	$18,7 \pm 0,4$	4
	5	$16,1 \pm 1,6$	6
	3	$14,8 \pm 0,6$	6
	17	$31,5 \pm 1,8$	8

---

N es el número de observaciones.

Los experimentos que figuran en la Tabla corresponden a mediciones simul  
taneas de sodio y urea (UNa) o de sodio y etilén glicol (ENa).

## D I S C U S I O N

Para discutir los resultados de efecto de temperatura sobre los coeficientes de permeabilidad medidos, es conveniente tener en cuenta la variación de los coeficientes de difusión libres con la temperatura. Longworth (1954) determinó los coeficientes de difusión de urea y agua deuterada, entre otras moléculas, a 5, 15 y 25 °C. Con los datos presentados por este autor, se trazó una recta según mínimos cuadrados, se interpoló el valor de coeficiente de difusión correspondiente a 18 °C que se consideró como 100%, y se determinó el coeficiente de difusión relativo a 5 °C que resultó ser el mismo para ambas moléculas, 68 %.

Si consideramos la fórmula de Einstein para el coeficiente de difusión de una partícula en solución:

$$D = kT/f$$

donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta y  $f$  el coeficiente friccional, que está dado por la expresión:

$$f = 6\pi\eta r_0$$

( $\eta$  es la viscosidad del agua y  $r_0$  el radio hidrodinámico equivalente de la molécula considerada), no es sorprendente que encontremos que tanto en el caso de la urea como del agua el coeficiente de difusión en solución caiga en igual magnitud en función de la temperatura, ya que en soluciones suficientemente diluidas la viscosidad del agua varía con la temperatura en forma independiente de la naturaleza del soluto.

No fué posible encontrar datos experimentales referentes a la dependencia térmica de los coeficientes de difusión para el resto de los no electrolitos, sin embargo por un razonamiento similar es posible suponer que todos ellos son afectados por la temperatura en solución acuosa en la misma forma que los de la urea y el agua deuterada.

Con los resultados mostrados en la tabla 3 es posible comparar el efecto de la temperatura sobre los distintos no electrolitos en función de su grado de polaridad. Para expresar en forma cuantitativa estos resultados, se procedió a determinar los flujos relativos a 5 °C, tomando como 100% el valor obtenido a 18 °C. En el caso del agua tritida este cálculo se realizó con las permeabilidades. Los resultados

T A B L A 5

EFECTO RELATIVO DE LA TEMPERATURA SOBRE LAS PERMEABILIDADES DE NO ELECTROLITOS Y AGUA TRITIADA Y SOBRE LOS FLUJOS DE SODIO EN AXONES PERFUNDIDOS.

---

MOLECULA	PERMEABILIDAD RELATIVA A 5° C.	COEFICIENTE DE DIFUSION RELATIVO A 5° C.
TOLUENO	88	-
URETANO	70	-
AGUA	69	68
ETILEN GLICOL	47	-
UREA	46	68
TIIOUREA	41	-
SODIO #	51	67

---

# En el caso del sodio figura en la tabla el flujo relativo a 5°C.

Se tomaron como 100% los valores de permeabilidad, de flujos y de coeficientes de difusión obtenidos a 18° C.

Los valores relativos de los coeficientes de difusión del agua tritiada y de la urea se calcularon de acuerdo a los datos publicados por Longsworth (1954) y los del sodio con los datos presentados en el libro de Harned y Owen (1950).

obtenidos con este método se resumen en la tabla 5.

Se encuentra una marcada diferencia en el comportamiento de las distintas moléculas. En efecto, el tolueno es el menos afectado por la temperatura ya que sólo decae en un 88%, siguiendo en orden creciente el uretano y el agua tritiada, para terminar con la urea, la tiourea y el etilén glicol que se ven afectados en forma similar.

Según la tabla 5, el uretano y el agua tritiada se comportarían en su paso a través de la membrana en forma similar a como lo harían en solución, en tanto que el tolueno, la urea, la tiourea y el etilén glicol lo harían en forma apreciablemente diferente.

Es posible explicar el comportamiento del tolueno suponiendo que éste penetra al interior de la célula exclusivamente por zonas lipídicas de la membrana. La difusión del tolueno en lípidos tendría un coeficiente de temperatura menor que la difusión en solución acuosa, lo que explicaría porque la temperatura afecta tan poco la permeabilidad del tolueno.

Para explicar la gran dependencia térmica de los flujos de urea, tiourea, y etilén glicol, que son los no electrolitos más polares de la serie estudiada, podemos suponer que la membrana tiene una estructura de mosaico, con zonas puramente lipídicas y zonas de carácter polar que tendrían agua asociada. Estas últimas podrían considerarse como canales acuosos de un carácter muy especial, pues sólo una fracción del agua total contenida en ellos estaría disponible como solvente para la difusión. La entrada de solutos polares de bajo peso molecular como la urea, el etilén glicol y la tiourea se realizaría por difusión a través del agua disponible como solvente. Al bajar la temperatura se produciría un aumento del número de moléculas de agua ordenadas en torno a grupos polares, lo que traería como consecuencia una disminución en el número de moléculas disponibles para la difusión. Los flujos de solutos polares a través de la membrana serían entonces mucho más afectados de lo que podría esperarse por simple difusión a través de agua líquida.

La molécula de agua sin embargo, debido a su pequeño tamaño molecular, podría difundir tanto a través del agua líquida como del agua estructurada, ya que se mueve por los intersticios de la estructura cristalina tetrahedral que presentaría el agua organizada. Por esta

razón su paso por la membrana no se vería afectado en forma especial al bajar la temperatura.

El uretano representaría un caso intermedio, en que una parte pasaría a través de zonas lipídicas y otra a través de zonas acuosas de la membrana, con un resultado neto similar al que se obtendría si todo el uretano difundiera por agua libre.

Según este modelo de mosaico que considera que sólo una fracción de la membrana, constituida por canales acuosos, está disponible para la difusión, se tiene que la constante de permeabilidad  $P$  está dada por la ecuación:

$$P = DA/\Delta x$$

donde  $A$  representa la razón entre el área geométrica y el área efectiva,  $\Delta x$  el espesor de la membrana y  $D$  el coeficiente de difusión en solución acuosa.

Si se toma el valor del coeficiente de difusión de agua deuterada a  $18^\circ \text{C}$ ., dado por Longworth (1954), que es  $1,903 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{seg}$ . y el valor de permeabilidad del agua deuterada, que se supone 14% mayor que el del agua tritiada y por lo tanto igual a  $0,91 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{seg}$ . se obtiene una razón de  $A/\Delta x$  de  $4,8 \text{ cm}^{-1}$ . Este valor es del orden de los encontrados por Villegas y Villegas (1960) para el agua,  $5,3 \text{ cm}^{-1}$ , y por Frankehauser y Hodgkin para el potasio,  $4,0 \text{ cm}^{-1}$ . Si se calcula la misma razón  $A/\Delta x$  a  $5^\circ \text{C}$ ., tomando el valor de permeabilidad para el agua de  $0,64 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{seg}$ ., ya aumentado en un 14% para corregir por la diferencia entre agua deuterada y agua tritiada, y se divide por el coeficiente de difusión del agua deuterada a  $5^\circ \text{C}$ ., que según Longworth es  $1,294 \text{ cm}^2/\text{seg}$  se obtiene un valor de  $4,9 \text{ cm}^{-1}$ , que no es esencialmente diferente al valor obtenido a  $18^\circ \text{C}$ . Esto indicaría que no habría un cambio sustancial en el área de la membrana disponible para la difusión del agua con la temperatura.

Si se hace el mismo cálculo para la urea a  $18^\circ \text{C}$ ., tomando para la permeabilidad el valor promedio que aparece en la tabla 2 de  $0,76 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$  y se divide por el coeficiente de difusión de la urea dado por Longworth (1954) a  $18^\circ \text{C}$ . que es  $1,162 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{seg}$ ., se obtiene un valor de  $A/\Delta x$  de  $6,6 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$ , que es alrededor de 100 veces menor que el valor encontrado

para el agua. Esto indicaría que la urea ve sólo un centésimo del area total disponible para la difusión de agua tritiada. La razón  $A/\Delta x$  a  $5^\circ \text{C.}$ , tomando un valor de  $P$  para la urea de  $0,35 \times 10^{-6} \text{cm/seg.}$  y de  $D$  de  $0,79 \text{cm}^2/\text{seg.}$  es  $4,4 \times 10^{-2} \text{cm}^{-1}$ , indicando que el area disponible a la difusión de urea disminuye en un 33%. De acuerdo a esta hipótesis, la membrana experimentaría un cambio estructural al bajar la temperatura.

Para dar cuenta de estos hechos experimentales también son posibles otras explicaciones. Podría pensarse por ejemplo que los coeficientes de partición aceite-agua varían con la temperatura en forma proporcional al grado de polaridad, de forma que cuanto más polar sea una molécula, mayor sea la disminución del coeficiente de partición aceite-agua. También podría pensarse que las energías de interacción entre los solutos y el agua que sería necesario vencer para pasar de una fase acuosa a una fase lipídica, como en el caso de la teoría de membrana propuesta por Danielli aumentarían al bajar la temperatura en forma mayor para los solutos polares que para los no polares. Estas dos explicaciones, que en el fondo son una sola, podrían dar cuenta del efecto de temperatura suponiendo que la membrana es una barrera lipídica uniforme, y sin que sea necesario plantear cambios estructurales de la membrana misma con temperatura. Para poder elegir entre estas dos hipótesis se necesita un mayor conocimiento de las soluciones acuosas de no electrolitos y de proteínas, que hasta el momento no ha sido aclarada aún por los físicoquímicos.

En el caso del ión sodio, la temperatura afecta los flujos en forma mayor a la esperada se si considera que el sodio pasa a través de la membrana por simple difusión. Es posible que parte del efecto de la temperatura se deba a la hiperpolarización de la membrana, ya que según los resultados obtenidos por Latorre (1969) una hiperpolarización de 10 mV produce una disminución de un 30% en el flujo de sodio. Sin embargo, no es posible extraer mayores conclusiones sobre el efecto de la temperatura en el caso del sodio por tratarse de una partícula cargada, en el sentido de que la introducción de un ión en el agua provoca cambios en su estructura difíciles de analizar en el caso del agua ligada a grupos polares.

La disminución en el flujo de entrada de sodio al bajar la temperatura podría explicar en parte el efecto de la temperatura sobre el potencial de reposo, ya que representaría una disminución en la corriente de fuga que normalmente enmascara el valor real del potencial de reposo.

## R E S U M E N.

- 1.- Se estudió el flujo de salida de urea  $C^{14}$  en axones gigantes de Dosidicus gigas mediante la técnica de microinyección. Se determinó la permeabilidad a la urea mediante el análisis cinético de las curvas de salida, encontrando un valor de  $5,53 \pm 1,80 \times 10^{-7}$  cm/seg.
- 2.- Se determinó el efecto de la temperatura sobre la salida de urea  $C^{14}$ , encontrando una dependencia lineal. Al variar la temperatura de 18 a 3° C. se produjo una disminución de un 80% en la salida de urea.
- 3.- Se determinaron los flujos de entrada y las permeabilidades de urea, tiourea, etilén glicol, uretano, tolueno y agua tritiada en axones perfundidos intracelularmente con fluoruro de potasio 0,55M. Se encontró que las permeabilidades de los no electrolitos siguen el orden de polaridad, con la excepción de etilén glicol que es más permeable de lo esperado por su coeficiente de partición aceite-agua.
- 4.- El efecto de la temperatura sobre la entrada de no electrolitos es dependiente del grado de polaridad. Los más afectados por temperatura son urea, tiourea y etilén glicol, que son los no electrolitos más polares de la serie.  
El efecto de la temperatura en el caso de estas moléculas es mayor al esperado por la variación de los coeficientes de difusión en solución.
- 5.- Se interpretan estos resultados suponiendo que la membrana posee poros acuosos a través de los cuales pasan los no electrolitos polares de bajo peso molecular como urea, tiourea y etilén glicol. La estructura de estos poros sería dependiente de la temperatura. El área efectiva disponible para la difusión disminuiría alrededor de un 33% al bajar la temperatura de 18 a 3° C.

6.- El flujo de agua tritiada a través de la membrana se ve afectado por la temperatura en la misma forma que la difusión en solución acuosa. Se explica este hecho suponiendo que el agua pasa por los mismos poros acuosos postulados para los no electrolitos, pero que por su pequeño tamaño molecular no detectaría los cambios estructurales inducidos por la temperatura en el diámetro de los poros.

7.- Se estudió el flujo de entrada de sodio simultaneamente con los de urea y etilén glicol en axones perfundidos. Se determinó un valor de flujo promedio de  $22,8 \pm 6,7$  p.moles/cm<sup>2</sup> seg.

El flujo de sodio es también afectado por la temperatura en forma mayor a lo esperado por su coeficiente de difusión en solución acuosa.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Baker, P.F., A.L. Hodgkin y T.I. Shaw, *Nature* 190: 885, (1961)
- 2.- Baker, P.F., A.L. Hodgkin y T.I. Shaw, *J. Physiol.* 164: 355, (1962)
- 3.- Bernal, J.D. y R.H. Fowler, *J. Chem. Phys.* 1: 515, (1933)
- 4.- Brady, R.O., Spyropoulos C.S. y Tasaki J., *Am. J. Physiol.* 194: 207, (1958)
- 5.- Collander, R. *Acta Physiol. Scand.* 13: 363, (1947)
- 6.- Collander, R. *Physiol. Plant.* 2: 300, (1949)
- 7.- Collander, R. *Physiol. Plant.* 7: 420, (1954)
- 8.- Dalton, J.C. y D.E. Hendrix, *Am. J. Physiol.* 41: 529, (1962)
- 9.- Davson, H., *A Textbook of General Physiology*, Little, Brown and Co. Boston USA., 3a. edición, Cap. 8, (1964)
- 10.- Davson, H. y J. Danielli en *Permeability of Natural Membranes*. Cambridge University Press, Cambridge, England, 2a. edición, 111, (1952)
- 11.- Fernandez Morán, H., T. Oda, P.V. Blair y D.E. Green, *N. Cell. Biol.* 22: 63, (1964)
- 12.- Frank, H.S. y M.W. Evans, *J. Chem. Phys.* 13: 507, (1945)
- 13.- Frank, H.S. y W. Wen, *Disc. Faraday Soc.* 24: 133, (1957)
- 14.- Frankenhaeuser, B. y A.L. Hodgkin, *J. Physiol.* 131: 341, (1956)
- 15.- Geren, B.B. y F.O. Schmitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 40: 863, (1954)
- 16.- Gorter, E. y F. Grendel, *J. Exp. Med.* 41: 439, (1925)
- 17.- Guttman, R., *J. Gen. Physiol.* 49: 1007, (1966)
- 18.- Harned, H.S. y B.B. Owen. *Physical Chemistry of Electrolytic Solutions*. Reinhold Publishing Corporation, New York, 2a. edición, (1950)
- 19.- Harris, E.J. *Transport and Accumulation in Biological Systems*, Butterworth Scientific Publications, London, England, 2a. edición, (1960)
- 20.- Hasselbach, W. *Federation Proc.* 23: 909, (1964)

- 21.- Höber, R.J. *Cell. Comp. Physiol.* 7: 367, (1936)
- 22.- Hodgkin, A.L. y B. Katz. *J. Physiol.* 109: 240, (1949)
- 23.- Hoffmann, F. *Circulation* 26: 1201, (1962)
- 24.- Horowitz, S.B. y I.R. Fenichel, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 125: 572, (1965)
- 25.- Katchalsky, R., y P.F. Curran. *Non Equilibrium Thermodynamics in Biophysics*, Harvard University Press, 1a. ed., (1965)
- 26.- Koefoed-Johnsen, V. y H.E. Ussing. *Acta Physiol. Scand.* 28: 60, (1951)
- 27.- Latorre, R. Tesis para optar al Grado de Doctor de Ciencias, Univ. Chile, (1969)
- 28.- Lehninger, A.L. en *The Mitochondrion*, W.A. Benjamin, Inc. New York, N.Y. U.S.A., (1964)
- 29.- Ling, G.N. *A Physical Theory of the Living State*, Blaisdell Publishing Co., New York, N.Y. U.S.A., (1962)
- 30.- Longworth, L.G. *J. Phys. Chem.* 58: 770, (1954)
- 31.- Némethy, G. y H.A. Scheraga, *J. Chem. Phys.* 36: 3401, (1962)
- 32.- Oikawa, T., C.S. Spyropoulos, I. Tasaki y T. Teorell, *Acta Physiol. Scand.* 52: 195, (1961)
- 33.- Pappenheimer, J.R., E.M. Renkin y L.O. Borrero, *Am. J. Physiol.* 167: s13, (1951)
- 34.- Robertson, J.D. *J. Physiol.* 140: 58, (1957)
- 35.- Robertson, J.D. *Progr. Biophys.* 10: 343, (1960)
- 36.- Rojas, E. y M. Canessa. *J. Gen. Physiol.* 52: 240, (1968)
- 37.- Senft, J.P., *J. Gen. Physiol.* 50: 1835, (1967)
- 38.- Straub, F.B. *Acta Physiol Hung.* 4: 235, (1954)
- 39.- Villegas, G.M., *J. Ultrastruct. Res.* 15: 480, (1966)
- 40.- Villegas, R. y F.V. Barnola. *J. Gen. Physiol.* 44: 963, (1967)
- 41.- Villegas, R., J. Bruzual y G.M. Villegas, *J. Gen. Physiol.* 51: 819, (1968)
- 42.- Villegas, R. y G.M. Villegas, *J. Gen. Physiol.*, 43, N° 5, suplemento (1960)