Composición Hidroelectrolítica intra y extracelular: ¿cómo explicar las diferencias? *

DRES. CARLTON F. HAZLEWOOD **, HUMBERTO A. SORIANO **, *** Y BUFORD L. NICHOLS **,
Departamento de Pediatría, Escuela de Medicina de Baylor, Houston, Texas, U.S.A.

INTRODUCCION

El agua constituye entre el 60 y el 90% del peso de la mayoría de los tejidos y su importancia en los sistemas vivos es indiscutible. El agua ha sido siempre sujeto de preocupación y curiosidad por parte de los biólogos aunque aún se dispone de muy poco conocimiento básico sobre las características del agua celular. De aquí que sea necesario todavía, aceptar como válidas algunas suposiciones fundamentales sobre el estado físico del agua celular, para aceptar cualquier modelo sobre la célula viva que describa la distribución desigual de iones entre el interior y el exterior, los aspectos dinámicos del movimiento de agua y iones hacia y desde la célula y los fenómenos bioeléctricos celulares. El esclarecimiento último de estas características de la célula viva, requerirá un conocimiento más concreto sobre el estado físico del agua.

En los últimos dos siglos, han emergido dos escuelas de pensamiento diferente con respecto al estado físico del agua celular. Una de ellas es la teoría clásica más ampliamente aceptada, que supone convencionalmente que la célula es equivalente a una solución acuosa diluida, rodeada de una membrana semipermeable, que sigue las leyes osmóticas y eléctricas propias de las soluciones diluidas (1-8). La otra es la teoría "holística", mantenida persistentemente por un grupo menos numeroso de investigadores que sostiene que el agua citoplasmática

no está libre como en una solución diluida sino se encuentra en un estado físico diferente, condicionado por una interacción entre iones, macromoléculas y agua (9-13).

Oscar Hechtner en 1965 (14) presentó una revisión de esta controversia fundamental concluyendo lo siguiente: "Hemos discutido los dos conceptos clásicos opuestos sobre el transporte celular. Bajo análisis, ambas ideas han mostrado ser parcialmente verdaderas y parcialmente erróneas. Los proponentes de la tesis de la membrana plasmática están errados en cuanto descuidan considerar el papel del interior celular. Los "holistas" están errados en cuanto tienden a menospreciar el papel de la membrana plasmática y de los sistemas de membranas intracelulares en general. Si uno considera que los sistemas de membrana están envueltos en el transporte en todas partes en la célula y que la célula exhibe uniformidad a la vez que diversidad, es posible alcanzar una resolución pluralística sobre esta materia".

Mientras no se alcance una solución definitiva sobre este problema, es importante presentar para el análisis el máximo de datos relativos a la composición hidrosalina de diferentes tejidos en diferentes circunstancias. Existen muchos trabajos publicados por autores de diferentes países que han informado sobre los cambios dramáticos de las propiedades eléctricas y las concentraciones de electrolitos que ocurren en la célula muscular de animales en desarrollo (15-24).

En el presente trabajo se presenta un resumen de los resultados obtenidos en el estudio de la composición hidrosalina intra y extracelular, principalmente del músculo gastrocnemio de la rata, y se discute la in-

* Conferencia presentada por Dr. H. Soriano en las IV Jornadas Anuales de Pediatría, 1974, realizadas en la Universidad Austral de Valdivia, Chile.

** Departamento de Pediatría, Escuela de Medicina de Baylor, Houston, Texas.

*** Departamento de Pediatría, Universidad de Chile, Area Norte, Hospital Roberto del Río, Santiago de Chile.

Figura 1. Señales NMR de los protones de agua del músculo gastrocnemio de la rata antes (A) y después (B) de la denaturación proteica por el calor. El ancho de la señal disminuye de 14.5 a 3 Hertz.

muscular ha sido detallada en publicaciones anteriores (17).

La técnica usada para el análisis de algunas propiedades físicas del agua de diversos tejidos mediante el Espectroscopio de Resonancia Nuclear Magnética (NMR) ha sido explicada con anterioridad (25-28). El NMR es útil para la determinación de la libre movilidad de las moléculas de agua ya que el ancho de la señal producida por el NMR es dependiente de esta condición. A medida que la movilidad de las moléculas de agua aumenta, el ancho de la señal disminuye (Fig. 1).

Durante 1973, hemos logrado estandarizar un procedimiento para la determinación intracelular de electrolitos mediante el uso de la microsonda electrónica (EP) (29-30). Esto ha sido posible gracias a un trabajo colaborativo con el Laboratorio de Análisis Celular del Centro Espacial Lyndon B. Johnson de la NASA. En este estudio en particular se ha utilizado el músculo gastrocnemio de la rata. La muestra de tejido muscular de más o menos 2 mm³ es congelada de inmediato en propano líquido y seccionada en cortes

interpretación de estos hallazgos a la luz de la clásica teoría de la membrana y de otras teorías alternativas de interpretación de la composición hidroelectrolítica de la célula viva.

MATERIAL Y MÉTODOS

La técnica para la determinación del contenido de agua y electrolitos en el tejido

Figura 2. Composición electrolítica del músculo gastrocnemio de la rata según edad. Na, K y Cl expresado en mEq/kg de tejido húmedo y desgrasado (FFWW). Cada punto de las curvas corresponde al promedio de 5 a 11 muestras.

de 8 micrones de diámetro en un criostato a -20°C . Es montada por adherencia a un disco de sílice purísimo y luego criolofilizado para impedir el desplazamiento de agua y electrolitos. La muestra así preparada es colocada en la EP donde se utiliza un haz electrónico de 1.5 micron de diámetro y 10 KEV de aceleración para generar radiaciones $K\alpha$ características para sodio y potasio mediante el rastreo de fibras musculares individuales. La cantidad de radiaciones emitidas es comparada con la de soluciones estándares de gelatina, sodio y potasio que han sido procesadas en forma exactamente igual a las muestras de músculo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 2 es posible observar la composición electrolítica del músculo, en miliequivalente kilógramo de tejido húmedo desgrasado, en función de la edad del animal. El contenido de potasio aumenta, llegando a ser constante entre los 32 y 64 días de edad. Las concentraciones de sodio y de cloro exceden la de potasio al nacimiento, pero rápidamente decrecen en los primeros 10 días de vida post-natal, hasta ser constantes entre los 32 y 64 días de edad. Este fenómeno en el desarrollo celular fue llamado "maduración química" por Moulton en 1923 (31).

Durante este mismo período etario también se observan cambios en el contenido de agua del tejido muscular. Al nacimiento el porcentaje de agua del músculo desgrasado es de 90% y disminuye hasta un 75% en el tejido químicamente maduro. Expresado sobre la base de tejido seco y desgrasado, esto significa un cambio en la hidratación desde 7 litros por kg. a los 2 días de edad hasta aproximadamente 3.5 kg., a los 65 días de edad (Fig. 3).

Debido al cambio en el contenido de agua, los datos sobre composición electrolítica presentados en la figura 2 pueden ser interpretados erróneamente. Por ello, en la figura 4 se presentan los mismos datos sobre contenido electrolítico, esta vez expresados por kg. de músculo seco y desgrasado. De esta manera es posible observar que el contenido de potasio es prácticamente invariable con la edad cuando se relaciona con la masa muscular seca y desgrasada. El contenido de sodio y el cloro, en cambio, muestran disminución marcada con la edad.

Estos datos sobre la composición electrolítica del tejido muscular total fueron descritos mediante expresiones matemáticas

Figura 3. Contenido de agua del músculo gastrocnemio de la rata, según edad. Litros de agua por kg de tejido seco y desgrasado (FFDW).

simples en publicaciones anteriores (17), haciendo posible el cálculo teórico de concentraciones intracelulares. Los cálculos teóricos realizados para las concentraciones de sodio intracelular sobre la base de los límites más altos y los más bajos encontrados fueron concluyentes independientemente del análisis estadístico utilizado: el sodio intracelular decrece aproximadamente 10 veces si se compara el músculo de un animal adulto con el de uno recién nacido (Fig. 5). En el caso del potasio los cálculos no permitieron una afirmación definitiva aun cuando una de las soluciones calculadas indicó que la concentración intracelular de potasio sería constante durante el período de maduración.

En la Tabla 1 se resumen los resultados de la determinación directa del contenido intracelular de electrolitos mediante el uso de la microsonda electrónica, expresándolos en mEq/kg. de células. Los resultados del análisis de músculo gastrocnemio de ratas de 10 y 33 días de edad así como de animal adulto, confirman los cálculos teóricos realizados en 1969 (17) en el sentido de una

Figura 4. Composición electrolítica del músculo gastrocnemio de la rata, según edad. Na, K, y Cl expresados en mEq/kg de tejido seco y desgrasado (FFDW).

TABLA I

**CONCENTRACIONES INTRACELULARES DE
SODIO Y POTASIO EN EL MUSCULO
GASTROCNEMIO DE LA RATA, SEGUN EDAD**

Edad	Nº de Animales	mEq/kg/células (Promedio $\pm$ DS)	
		Potasio	Sodio
10 ds.	5	135 $\pm$ 29	54 $\pm$ 6
33 ds.	3	121 $\pm$ 14	29 $\pm$ 4
Adulto	3	126 $\pm$ 16	26 $\pm$ 3

concentración de potasio intracelular constante junto a una marcada disminución en la concentración del sodio con la edad.

El problema que surge a continuación es ¿cómo interpretar estos resultados? A primera vista pareciera que la teoría clásica de la membrana celular sería adecuada para explicar los hechos encontrados (8, 32). La figura 6 nos permitirá revisar los postulados básicos que sustentan esta teoría:

1. Existe una membrana polarizada, con carga eléctrica negativa en su lado interior, que separa dos soluciones.
2. La solución interior está compuesta por proteínas, para las cuales la membrana es impermeable, concentración de potasio elevada y concentración de sodio baja. Esta solución interna es equivalente a una solución diluida considerada desde el punto de vista físico-químico.
3. La solución externa, también considerada una solución diluida, tiene elevada concentración de sodio y baja concentración de potasio y proteínas.
4. Originalmente se pensó que la membrana celular era impermeable al sodio; cuando se descubrió que era permeable a él, surgió un dilema: El sodio debía ser transportado desde una solución de baja concentración existente en el interior de la célula hacia una solución de alta concentración existente afuera de la célula,

Figura 5. Concentración intracelular de sodio $[Na]_i$, en el músculo gastrocnemio de la rata, según edad del animal, expresada en mEq/kg de agua intracelular. Las tres curvas representan los valores calculados teóricamente por tres procedimientos diferentes (17).

Figura 6. Visión clásica de la célula. En el interior de ella hay una solución diluida iónica y proteica separada de otra solución diluida extracelular por una membrana semipermeable polarizada (carga (-) interior). La solución externa tiene alta concentración de Na y baja de K, en tanto que lo opuesto ocurre con la solución intracelular. Esta diferencia sería mantenida por la "Bomba de Sodio" y el potencial de membrana.

debiendo atravesar una membrana polarizada que se opone a este transporte. Esta situación calza con la definición de Transporte Activo. Es por esto que Dean en 1941 (29, 33) postuló que "...debe existir algún tipo de bomba, posiblemente ubicada en la membrana celular, que sea capaz de bombear el sodio hacia afuera de la célula o, lo que es equivalente, bombear el potasio hacia adentro". De esta manera se inventó la "bomba de sodio".

En la figura 7 se hace una breve revisión del desarrollo histórico del concepto sobre la "bomba de sodio". El material bibliográfico que permitió la confección de la figura se encuentra en las referencias 1-8 y 32-34. Quisiéramos detenernos en el análisis de la

Figura 7. Desarrollo histórico del concepto de la "Bomba de Sodio".

Figura 8. Representación antropomórfica de la "Bomba de Sodio". La "Bomba" está situada en la membrana y requiere de energía para su trabajo.

parte inferior de la figura 7 que se refiere al transporte activo del sodio celular. En nuestra revisión de la literatura hemos encontrado que la evidencia sobre el transporte celular activo de sodio es, al menos, equi-

voca. Para ser más explícitos, no hemos encontrado publicada información sobre un experimento que demuestre definitivamente el movimiento de sodio ni de otro ión de una solución (libre) de baja concentración en el interior de la célula hacia otra solución (libre) de alta concentración afuera de la célula (35). Aun los experimentos con el axon exprimido de calamar (36-38) han fracasado en el intento de demostrar directamente Transporte Activo. Por ejemplo, Baker, Foster, Gilbert y Shaw, en un trabajo titulado "Transporte de Sodio por Axones Gigantes de Loligo Perfundidos", publicado en el Journal of Physiology (London) en 1971 (38), señalan que "El criterio más firme para probar la existencia de un sistema de transporte de sodio en la célula es la demostración de movimiento neto de iones sodio en contra de su gradiente electroquímica. Sin embargo, mucho se conoce actualmente sobre el sistema de transporte en la fibra de calamar, lo suficiente como para... identificar con considerable confianza a este sistema con el eflujo de sodio sensible al potasio y a la ouabaina, como ha sido hecho en el presente trabajo".

La presencia de un sistema enzimático como el de $\text{Na}^+ + \text{K}^+ \text{ATPASA}$ es mandatorio en el contexto de la teoría de la membrana y la demostración del mismo parecería, a primera vista, ser la prueba del concepto de la "bomba de sodio". Debe recordarse, sin embargo, que la primera y subsecuentes "bombas" fueron inventadas por necesidad surgida de asumir que el agua y iones celulares se encuentran en solución libre.

TABLA II

ENERGIA REQUERIDA VERSUS ENERGIA DISPONIBLE PARA MANTENER LA DIFERENCIA INTRA-EXTRACELULAR DE SODIO EN EL MUSCULO SARTORIO DE LA RANA

Duración del experimento (hs)	Intercambio de Na (M/kg/h) (b)	Potencial celular más potencial de equilibrio para el Sodio (b) (mv)	Energía mínima requerida para bombear el Na (cal/kg/h)	Energía máxima disponible (cal/kg/h)	Energía mínima requerida
					Energía máxima disponible
10.0	0.138	111	353	11.6 (22.2) (c)	3060%
4.0	0.121	123	343	22.3 (33.7) (c)	1542%
4.5	0.131	122	368	20.5 (26.1) (c)	1800%

(a) Según Ling. Modificación de la tabla 8.9 (10)

(b) Promedios integrados.

(c) Valores máximos encontrados.

La suposición de una bomba situada en la membrana y que requiere energía para movilizar los iones a través de ella y en contra de gradientes de concentración y, algunas veces en contra de gradientes eléctricos, exige, primero, la demostración de un adecuado aporte de energía. La figura 8 es una representación antropomórfica de lo señalado en el párrafo anterior.

Gilbert Ling publicó 12 años atrás un libro titulado "Una Teoría Física de la Célula Viva: La Hipótesis de Asociación e Inducción" (10). La Tabla II está tomada del capítulo 8, página 211 del libro de Ling. Esta Tabla expresa el balance de energía resultante del trabajo de la supuesta bomba de sodio en el músculo sartorio de la rana a 0°C. El flujo mínimo de la membrana fue calculado a partir de los valores integrados de los flujos de intercambio de iones sodio medidos y la energía requerida para bombear cada mol de ion sodio en contra de la gradiente eléctrica y de concentración encontrada. El flujo máximo de energía proporcionada fue calculado a partir de los valores de hidrólisis de Crp, ATP y ADP encontrados, las que eran las únicas fuentes de energía disponibles para el músculo ya que éste había sido tratado con IAA y N₂ al mismo tiempo que se había suprimido totalmente la respiración y la glicólisis mediante la presencia simultánea de NaCN en concentración de 10^{-3M}, verificando la supresión mediante la determinación de la producción de lactato residual. Debemos recalcar además que la razón entre energía requerida y la disponible señalada en la Tabla ha sido estimada en menos por el hecho de considerar la mínima energía requerida y la máxima energía disponible. Como puede verse, de acuerdo con los valores experimentales encontrados, existe una gran discrepancia entre la energía requerida y la disponible, lo que debió haber constituido una alerta sobre una inminente crisis energética para la célula. Sin embargo, aunque con frecuencia se hace referencia al libro de Ling, estos datos sobre la crisis de energía celular para operar la "bomba de sodio" han sido sorprendentemente ignorados. Al respecto hemos encontrado una refutación importante hecha por R. D. Keynes y publicada en un simposio (39) que transcribimos a continuación: "Uno de los principales argumentos usados por Ling en contra del concepto de la membrana celular se refiere a la energía requerida para la exclusión del sodio de las fibras musculares de rana. El midió el flujo de sodio marcado que emerge del músculo

de rana a 0°C después de bloquear la glicólisis y la fosforilación oxidativa, y calculó la cantidad de trabajo que habría sido necesaria para transportar activamente el flujo de sodio medido. Luego él mostró que este flujo de consumo energético era mucho mayor que la velocidad con que disminuían las reservas de enlaces fosfáticos energéticos en el músculo, concluyendo que el postulado sobre un mecanismo celular de bombeo de sodio era insostenible. Este no es un argumento legítimo sin embargo, ya que ningún proponente de la teoría de membrana sostendría que el intercambio de iones en un músculo a 0°C resulta totalmente de un proceso que consume energía. Parece mucho más probable que, en estas condiciones, el sodio marcado cruce la membrana a través de un tipo de mecanismo que ha sido llamado 'difusión de intercambio'. Tengo que admitir que hay escasa evidencia experimental directiva sobre la validez de la idea de 'difusión de intercambio' pero, sin embargo, estoy seguro que el argumento de Ling no descansa sobre bases satisfactorias".

Otros trabajos provenientes del laboratorio de Ling han demostrado la insuficiencia de energía para el trabajo de la bomba de sodio (11, 40, 41). Algunos otros autores, sin embargo han informado que los requerimientos de la bomba de sodio constituirían entre el 10 y el 45% del TOTAL de energía celular disponible (34, 42, 43, 44). Recordamos aquí que, históricamente, la invención de la bomba de sodio fue necesaria para explicar la distribución asimétrica del sodio a ambos lados de la membrana celular. Po-

Figura 9. Algunas de las "Bombas" postuladas. Nótese que las de azúcares, aminoácidos y proteínas comprenden varios tipos diferentes de "Bombas". Cada una requiere una cantidad de energía definida para trabajar. ¿Es la energía disponible suficiente?

dría, por lo tanto, aceptarse que la célula gastara tanto como un 10% o incluso un 45% de su energía para transportar sodio; sin embargo, desde 1941 ha habido, por decirlo así, una explosión demográfica en el mundo de las "bombas" (Fig. 9). Como puede verse, se postula ahora un número bastante grande de bombas y, aun asumiendo una necesidad energética modesta para cada una, parece muy improbable que haya energía suficiente para todas. Concluimos, por lo tanto, que de existir "bombas", ellas morirían inevitablemente de desnutrición (Fig. 10). Esta conclusión, debemos agregar, es similar a la de Minkoff y Damadian quienes informaron de un aporte insuficiente de energía para operar bombas en la *E. Coli* en una publicación titulada "Catástrofe Calórica" aparecida en *The Biophysical Journal* en Febrero de 1973 (45).

En vista de la imposibilidad de explicar nuestros datos experimentales sólo a través de la teoría clásica de la membrana, hemos buscado alternativas que expliquen la mantención de un líquido intracelular tan diferente al extracelular, encontrando que si existen algunas hipótesis diferentes, por ejemplo, la Teoría de Sorción de Troshin (12), la Teoría de Earnst en Hungría (13), la Teoría de Bioestructura de Macovschi (46), la Teoría de Estado Sólido de Cope

Figura 11. Visión alternativa de la célula. El potasio está de preferencia adsorbido por las macromoléculas. Una pequeña cantidad de sodio puede estar igualmente adsorbida. El agua citoplasmática existe en un estado físico diferente tal que deja de ser un buen solvente para el sodio el que, por lo tanto, es excluido entrópicamente de la célula.

Figura 10. Representación antropomórfica de la crisis de energía que debiera ocurrir en la célula porque el número de "Bombas" propuestas excede la disponibilidad de energía.

(47), la Teoría de la Resina de Intercambio Iónico de Damadian (48) y la Teoría de Asociación e Inducción de Ling (10, 11, 49). Todas estas teorías, aunque difieren en lo específico, concuerdan en general con que el citoplasma celular *no* debe ser considerado una solución diluida ni la membrana una barrera limitante de flujo universal para la entrada de solutos. Más aún, estas teorías consideran que el agua citoplasmática existe en un estado diferente al del agua pura, (por ejemplo, sus propiedades como solvente difieren de las del agua pura).

Entre estas teorías, la Hipótesis de Asociación e Inducción de Ling ha sido trabajada con mayor detalle. Incidentalmente, Ling fue el primero en sugerir que el agua celular podía ser un factor determinante primordial de la permeabilidad celular (9, 11, 49, 50). En las figuras 11 y 12 hemos interpretado con bastante libertad la teoría de Ling sobre la célula viva. En la figura 11 se puede observar que, de acuerdo con dicha

Figura 12. Interpretación libre de la teoría de asociación e inducción de Ling. Tanto la superficie (membrana) como el interior de la célula, contienen receptores (sitios "cardinales") los que, al adsorber o "asociarse" con moléculas determinadas, ("biorreguladores") inducen cambios en las propiedades de las macromoléculas relacionadas con su interacción con el agua y los iones.

teoría, la célula es considerada un sistema altamente complejo, donde muchos de los procesos biológicos son controlados a través de interacciones entre el agua, los iones y las macromoléculas. La concentración intracelular de cada ión estaría determinada por su energía de asociación (atracción) con sitios de carga eléctrica fija en las macromoléculas y por las propiedades solventes del agua dependientes, a su vez, del estado físico de ella. Por ejemplo, el potasio se asocia preferentemente con las cargas fijas de las proteínas intracelulares lo que condiciona su alta concentración en el citoplasma. El sodio en cambio se encuentra en baja concentración en el interior de la célula principalmente porque el agua celular es más estructurada que el agua pura y por lo tanto tiene menor capacidad solvente y secundariamente porque el sodio no se asocia de preferencia con las cargas fijas de las proteínas intracelulares.

En la figura 12 es también posible observar de qué manera podría ser regulada la estructura del agua y la composición electro-lítica de la célula, de acuerdo a la teoría de Ling. Sustancias biorreguladoras, como el ATP, Insulina o Ouabaina competirían por

asociarse a sitios receptores llamados alostéricos o sitios cardinales, ubicados en la superficie o en el interior de la célula. Esta asociación induciría efectos de corta o larga duración sobre los polímeros proteicos determinando la especificidad de los sitios de carga eléctrica fija y modulando el grado de estructuración de las moléculas de agua. La Ouabaina, por ejemplo, podría tener su efecto en la superficie, compitiendo exitosamente contra el ATP por el receptor, cambiando de esta manera la preferencia del polímero proteico por el potasio hacia el sodio. Podrían, o no, inducirse simultáneamente efectos en el estado físico del agua.

Volviendo a la pregunta que nos hacíamos inicialmente a la luz de nuestros resultados experimentales: ¿cómo explicar la gran disminución del contenido de sodio que ocurre en la fibra muscular durante el período de crecimiento postnatal inmediato? Con los antecedentes señalados, podemos postular ahora que este descenso del sodio intracelular es debido principalmente a un cambio en el estado físico del agua. Dicho de otra manera, el agua citoplasmática se hace menos solvente para el sodio debido a una mayor interacción entre las moléculas de

proteínas y las de agua. Si esta hipótesis fuera remotamente plausible ¿cuáles serían las evidencias para formularla?

Consideremos primero las variaciones encontradas en la movilidad del agua reflejadas en las señales del NMR provenientes del músculo antes y después de someterlo a desnaturalización mediante el calor (Fig. 1). La señal de la izquierda de la figura es por lo menos 10 veces más ancha que la del agua pura y da lugar a una señal más angosta por efecto del calor, como puede verse a la derecha de la figura 1. Hemos interpretado estos hechos, junto con numerosos otros trabajos con el NMR (25, 51) como debidos a la existencia de una ordenación o estructuración del agua en la célula muscular normal debido a interacción con las macromoléculas. Al desnaturalizar el músculo, por efecto del calor, esta interacción cesa y el agua queda menos estructurada, más libre, hecho que es captado por el NMR en forma de una señal más angosta. Esta interpretación utilizando el NMR de resolución elevada fue respaldada por observaciones similares utilizando el "Spin Echo NMR" (26).

A continuación nos hicimos una nueva pregunta: ¿cambia la señal del agua muscular en el NMR con el proceso normal de desarrollo? La figura 13 muestra los resultados de este estudio donde en la ordenada están los valores del ancho de la señal del agua muscular (en Hertz) en el NMR de elevada resolución y en la abscisa la edad del animal en días. El ancho de la señal aumenta monitóricamente con el desarrollo normal e interpretamos estos datos como un aumento progresivo en la estructuración del agua en el desarrollo normal.

En seguida buscamos una correlación entre estos cambios en la señal del agua muscular en el NMR y los cambios en la concentración de sodio en este tejido. La figura 14 resume los resultados de este estudio. La ordenada es la concentración de sodio en mEq/kg de músculo húmedo desgrasado y la abscisa el ancho de la señal del agua muscular en el NMR. Las señales más angostas se relacionan con las concentraciones más elevadas de sodio muscular. Las señales más anchas se relacionan con las concentraciones más bajas de sodio tisular. De esto concluimos que el agua muscular existe de manera menos ordenada o estructurada en el animal joven y que, por lo tanto, una mayor cantidad de sodio puede ser disuelta en esta agua. Con el desarrollo el agua asume un estado físico diferente, más estructurado, debido al aumento en la concentra-

Figura 13. Ancho de la señal NMR, en el músculo gastrocnemio de la rata, según edad.

Figura 14. Ancho de la señal NMR y contenido de sodio en el músculo gastrocnemio de la rata.

ción de macromoléculas disminuyendo su capacidad solvente y resultando una menor concentración intracelular de sodio. Un análisis detallado de los estudios presentados en las figuras 13 y 14 se encuentra en las referencias 27 y 28. En la figura 15 se representa esquemáticamente lo que pensamos: es una interpretación razonable de los mecanismos de exclusión del sodio intracelular asociados con el desarrollo normal.

Consideremos en primer lugar el potasio: Está asociado con cargas fijas en las macromoléculas intracelulares tanto en el músculo del animal inmaduro como del adulto. Un gran subgrupo del conjunto total de macromoléculas intracelulares (probablemente proteínas) existen en un estado físico tal que absorben preferentemente potasio antes que sodio. Este subgrupo de macromoléculas aumenta con el desarrollo normal y, consecuentemente, la acumulación de po-

Figura 15. Interpretación del proceso de "maduración química" de la célula muscular, de acuerdo con la teoría de asociación e inducción de Ling.

tasio es proporcional. Es posible también que la mayor parte del sodio intracelular del músculo maduro esté asociado con este subgrupo de macromoléculas.

Consideremos a continuación el agua y el sodio: El músculo esquelético del animal recién nacido contiene casi tanto como un 90% de agua. Este porcentaje disminuye hasta ser aproximadamente 75% en el músculo del animal maduro. Por lo tanto, la cantidad de macromoléculas intracelulares aumenta durante el desarrollo a expensas de una disminución en el contenido de agua. El aumento de la razón entre superficie y volumen entre el animal recién nacido y el de 65 días de edad puede explicarse por el aumento de la estructura u ordenación del agua que se ha propuesto. Es posible, sin embargo, que durante el período postnatal precoz puedan ocurrir también cambios en la estructura de las proteínas contráctiles. Así por ejemplo, Trayer y colaboradores han demostrado la presencia de 3 metilhistidina en el músculo de conejo adulto; esta sustancia no se encuentra en el músculo del feto de conejo (52). Está abierta, entonces, la posibilidad de que un cambio con la edad en la conformación de una o más de las proteínas contráctiles afecte al estado físico del agua, modificando la composición electrofónica intracelular. En todo caso estas alternativas son consistentes con lo que hemos

propuesto: la disminución de la concentración de sodio intracelular resulta primariamente de un aumento relativo en la estructura del agua celular.

Los conceptos generales desarrollados a partir de las observaciones en el músculo en crecimiento llevaron a considerar lo siguiente: en un sentido general, lo que estamos observando es lo que ocurre a través de un proceso controlado de diferenciación celular. Si este proceso faltara, como en la tumorigénesis, ¿esperaríamos ver diferencias en la señal del agua en el NMR? La predicción de Damadian fue que sí y experimentalmente demostró su predicción en tejido desdiferenciado en 1971 (53). Nosotros extendimos su observación a un modelo animal en el cual fue posible distinguir con el NMR tres estados morfológicos, tejido mamario normal, nódulo preneoplástico y carcinoma. Estos tres estados eran también distinguibles de la señal obtenida del agua pura. Como puede verse en la Tabla III, hubo diferencias notables en cada uno de los parámetros estudiados con el NMR, esto es: T_1 (tiempo de relajación longitudinal), T_2 (tiempo de relajación transversal) y coeficiente de difusión. Una descripción simplificada de estos parámetros puede encontrarse en la referencia 28.

Finalmente, queremos mostrar que esta especulación sobre el estado físico del agua

TABLA III

TIEMPOS DE RELAJACION (T_1 Y T_2) Y COEFICIENTE DE DIFUSION (D) DE LOS PROTONES DEL AGUA, EN AGUA PURA Y TEJIDO MAMARIO NORMAL, PRENEOPLASICO Y TUMORAL DEL RATON

	T_1 (miliseg)	T_2 (b)	D ($\text{cm}^2/\text{seg} \times 10^{-5}$) (b)
Agua Pura	3.1	1,430 $\pm$ 270	2.38 $\pm$ 0.016
Tumor (a)	920.0 $\pm$ 47	91 $\pm$ 8	0.78 $\pm$ 0.050
Preneoplasia (a)	451.0 $\pm$ 21	53 $\pm$ 1	0.44 $\pm$ 0.030
Tejido Normal (a)	380.0 $\pm$ 41	39 $\pm$ 2	0.34 $\pm$ 0.040

(a) Número de muestras =5

(b) Promedio $\pm$ Error Standard.

Figura 16. Tiempos de relajación NMR (T_1 y T_2) en tejido mamario humano. (Valores promedio $\pm$ error estándar en milisegundos).

y la interpretación de la composición hidroelectrolítica de la célula, se ha extendido en forma práctica al estudio del cáncer mamario humano a través del NMR, como puede verse en la figura 16. El adenocarcinoma mamario (AC) puede distinguirse claramente del tejido normal (N) y de la enfermedad fibroquística (FC). El fibro adenoma benigno (FA) puede distinguirse del adenocarcinoma si se toma en cuenta la razón entre T_1 y T_2 .

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a sus colegas de la Sección de Nutrición y Gastroenterología del Departamento de Pediatría de la Escuela de Medicina de Baylor y al Dr. Russell Blattner, Profesor y Jefe del Departamento de Pediatría de Baylor. Sin la colaboración y apoyo de los arriba mencionados no habría sido posible preparar una actualidad como ésta.

Los autores desean expresar su reconocimiento por la ayuda financiera para la preparación de este trabajo a las siguientes instituciones:

Instituto Nacional de Salud de EE. UU. (NIH). División de Recursos para la Investigación, Programa de Centros de Investigación Clínica General, fondo de ayuda RR-00188, administrado por el Centro de Investigación Clínica del Hospital de Niños de Texas; y Administración Nacional Aeronáutica y Espacial (NASA), fondo de ayuda NGR-44-003-053.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—H. Smith, "A Knowledge of the Laws of Solutions" Circ., XXI, 808-817 (1960).
- 2.—D.A.T. Dick, *Cell Water*, Butterworth, Inc. 7300 Pearl Street, Washington, D.C. 20014, E.U.A. (1966).
- 3.—D.A.T. Dick, "Osmotic Properties of Living Cells" Int. Rev. Cytol., 8, 387-448 (1959).
- 4.—E.G. Olmstead, *Mammalian Cell Water*, Lea & Febiger, Philadelphia (1966).
- 5.—J. Bernstein, "Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Stromme J." Archiv. Ges. Physiol., 92, 521-562 (1902) en *Founders of Experimental Physiology* (J.W. Boylan, editor). Traducción al inglés 1971, Verlag, Munich, páginas 258-299.
- 6.—B. Katz, *Nerve, Muscle and Synapse*, McGraw-Hill, Nueva York (1966).

- 7.— *A.L. Hodgkin y A.F. Huxley*, "Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre" *Nature*, 144, 710-711 (1939).
- 8.— *A.L. Hodgkin*, "The Ionic Basis of Electrical Activity in Nerve and Muscle" *Biol. Rev.*, 26, 339-409 (1951).
- 9.— *G.N. Ling*, "Hydration of Macromolecules" en *Water and Aqueous Solutions* (R.A. Horne, editor) Wiley-Interscience, Nueva York (1972), páginas 663-700.
- 10.— *G.N. Ling*, *Physical Theory of the Living State*, Blaisdell, Philadelphia (1962).
- 11.— *G.N. Ling*, "The Physical State of Water in Living Cell and Model Systems" *Annals New York Acad. of Sci.*, 125, 401-416 (1965).
- 12.— *A.B. Troshin*, *Problems of Cell Permeability*, Pergamon Press, Nueva York (1966).
- 13.— *E. Ernst*, "Bound Water in Physics and Biology" *Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 5, 57-68 (1970).
- 14.— *O. Hechter*, "Intracellular Water Structure and Mechanisms of Cellular Transport" *Annals New York Acad. of Sci.*, 125, 625-644 (1965).
- 15.— *A. Vernadakis y D.M. Woodbury*, "Electrolyte and Nitrogen Changes in Skeletal Muscle of Developing Rats" *Am. J. Physiol.*, 206, 1365-1368 (1964).
- 16.— *A.I. Novikova*, "Age Change in the Ion Composition of Muscle Fibers and Their Relation to Membrane Potentials" *Fiziol. Zh. SSSR Imeni I.M. Sechenova* (MOSKVA), 50, 626-630 (1964).
- 17.— *C.F. Hazlewood y B.L. Nichols*, "Changes in Muscle Sodium Potassium, Chloride, Water and Voltage During Maturation in the Rat: An Experimental and Theoretical Study" *Hopkins Med. J.*, 125, 119-133 (1969).
- 18.— *E.M. Widdowson y J.W.T. Dickerson*, "Chemical Composition of the Body" en *Mineral Metabolism* (C.L. Comar and F. Bronner, editores) Academic Press, Nueva York, N.Y., Vol. 2, Part A (1964) páginas 1-247.
- 19.— *J. Bergstrom, J. Boethius y E. Hultman*, "Electrolytes in Leg Neck Muscles of the Rat During Ontogeny" *Acta Physiol. Scand.*, 81, 164-169 (1971).
- 20.— *A.R. Luff y G. Goldspink*, "Changes in the Water and Electrolyte Content of Skeletal Muscles of the Mouse During Postnatal Development" *Comp. Biochem. Physiol.*, 82, 581-592 (1970).
- 21.— *S.I. Fudel-Osipova y O.A. Martynenko*, "Early Ontogenic Development of Membrane Potential of Muscle Fibers in Rats" *Fed. Proc.*, 23, N° 1, Part 2: T28-T30 (1964) *Fiziol. Zh. (Kiev.)* 8(4), (1962).
- 22.— *C.F. Hazlewood y B.L. Nichols*, "An In Vitro Study Of Resting Muscle Membrane Potential in Pre-weanling and Weanling Rat" *Nature*, 213, 935-936 (1967).
- 23.— *C.F. Hazlewood y B.L. Nichols*, "The In Vivo Muscle Resting Potentials in the Developing Rat" *Hopkins Med. J.*, 123, 198-203 (1968).
- 24.— *J. Boethius*, "Electrophysiological and Morphological Development of Leg and Neck Muscles in the Rat" *Acta. Physiol. Scand.*, 81, 492-507 (1971).
- 25.— *C.F. Hazlewood, B.L. Nichols, y N.F. Chamberlain*, "Evidence for the Existence of a Minimum of Two Phases of Ordered Water in Skeletal Muscle" *Nature*, 222, 747-750 (1969).
- 26.— *D.C. Chang, C.F. Hazlewood, B.L. Nichols y H.E. Rorschach*, "Spin-Echo Studies on Cellular Water" *Nature*, 235, 170-171 (1972).
- 27.— *C.F. Hazlewood, B.L. Nichols, D.C. Chang, y B. Brown*, "On the State of Water in Developing Muscle: A Study of the Mayor Phase of Ordered Water in Skeletal Muscle and Its Relationship to Sodium Concentration" *John Hopkins Med. J.*, 128, 117-131 (1971).
- 28.— *C.F. Hazlewood, D.C. Chang, H.E. Rorschach y B.L. Nichols*, "Cellular Water and Macromolecules" en *Reversibility of Cellular Injury Due to Inadequate Perfusion* (T.I. Malinin, Frank Gollan, Robert Zeppa, A.B. Callahan, editores) Charles C. Thomas, Springfield, Illinois (1972), páginas 22-36.
- 29.— *B.L. Nichols, J. Alvarado, S.L. Kimzey, C.F. Hazlewood y F. Viteri*, "Anomalies of the Regulation of Salt and Water in Protein Calorie Malnutrition" en *Endocrine Aspects of Malnutrition* (L.I. Gardner y P. Amacher, editores) KROC Foundation 1973.
- 30.— *B.L. Nichols, H. Soriano, J. Sachen, L. Burns y S. L. Kimzey*, "Electron Probe Localization of Electrolytes in Immature Muscle" submitted for publication.
- 31.— *C.R. Moulton*, "Age and Chemical Development in Mammals" *J. Biol. Chem.*, 57, 78-97 (1923).

- 32.— P.C. Caldwell, "Factors Governing Movement and Distribution of Inorganic Ions in Nerve and Muscle" *Physiol. Rev.*, **48**, 1-64 (1968).
- 33.— R.B. Dean, "Theories of Electrolyte Equilibrium in Muscle" *Biol. Symp.*, **3**, 331-348 (1941).
- 34.— F. Ismail-Geigi y I.S. Edelman, "Mechanism of Thyroid Calorigenesis: Role of Active Sodium Transport" *Proc. Nat. Acad. Sci.*, (EUA) **67**, 1071-1078 (1970).
- 35.— C.F. Hazlewood, "Pumps or No Pumps" *Sci.*, **177**, 815-816 (1972).
- 36.— P.F. Baker, A.L. Hodgkin y T.I. Shaw, "Replacement of the Axoplasm of Giant Nerve Fibres with Artificial Solutions" *J. Physiol.*, **164**, 330-354 (1962).
- 37.— P.F. Baker, A.L. Hodgkin y T.I. Shaw, "The Effects of Changes in Internal Ionic Concentrations on the Electrical Properties of Perfused Giant Axons" *J. Physiol.*, **164**, 355-374 (1962).
- 38.— P.F. Baker, R.F. Foster, D.S. Gilbert y T.I. Shaw, "Sodium Transport by Perfused Giant Axons of Loligo" *J. Physiol.*, **219**, 487-506 (1971).
- 39.— R.D. Keynes, "The Function of the Cell Membrane" en *The Myocardial Cell Structure, Function, and Modification by Cardiac Drugs*, (S.A. Brillar and H.L. Conn, Jr., Editores) Univ. of Penn. Press, Philadelphia (1966), páginas 63-72.
- 40.— G.N. Ling, "Studies on Ion Permeability. I. What Determines the Rate of Na^+ Ion Efflux from Frog Muscle Cells?" *Physiol. Chem. and Physics*, **2**, 242-248 (1970).
- 41.— G.N. Ling y L.G. Palmer, "Studies on Ion Permeability: IV. The Mechanism of Ouabain Action on the Na^+ Ion Efflux in Frog Muscles" *Physiol. Chem. and Physics*, **4**, 517-525 (1972).
- 42.— R. Whittam, "The Interdependence of Metabolism and Active Transport" en *The Cellular Functions of Membrane Transport* (J.F. Hoffman, editor). Prentice-Hall, Inc., Nueva Jersey (1964), páginas 139-151.
- 43.— R.D. Keynes y G.W. Maisei, "The Energy Requirement for Sodium Extrusion from a Frog Muscle" *Proc. Roy. Soc. Series B*, **142**, 383-392 (1954).
- 44.— A.L. Hodgkin y P. Horowitz, "Movements of Na and K en Single Muscle Fibres" *J. Physiol.*, **145**, 405-532 (1959).
- 45.— L. Minkoff y R. Damadian, "Caloric Castrophe" *Biophys. J.*, **13**, 167-178 (1973).
- 46.— E. Macovski, *Biostructure*, Editura Academici Republicii Socialists Romania Bucuresti (1969).
- 47.— F.W. Cope, "Supramolecular Biology: A Solid State Physical Approach to Ion and Electron Transport" *Annals New York Acad. Sci.*, **204**, 416-433 (1973).
- 48.— R. Damadian, "Biological Ion Exchanger Resins" *Annals New York Acad. Sci.*, **204**, 211-244 (1973).
- 49.— G.N. Ling, "A New Model for the Living Cell: A Summary of the Theory and Recent Experimental Evidence in its Support" *Int'l. Rev. Cytol.*, **26**, 1-61 (1969).
- 50.— G.N. Ling, C. Miller y M.M. Ochscenfeld, "The Physical State of Solutes and Water in Living Cells According to the Association-Induction Hypothesis" *Annals New York Acad. Sci.*, **204**, 6-50 (1973).
- 51.— F.W. Cope, "Nuclear Magnetic Evidence Using D_2O for Structured Water in Muscle and Brain" *Biophys. J.*, **9**, 303-319 (1969).
- 52.— I.P. Trayer, C.I. Harris y S.V. Perry, "3-Methyl Histidine and Adult and Foetal Forms of Skeletal Muscle Myosin" *Nature*, **217**, 452-453 (1968).
- 53.— R. Damadian, "Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance" *Sci.*, **171**, 1151-1153 (1971).