

CARACTERIZACION BIOFISICA DE LA MEMBRANA EXCITABLE DEL NERVIIO (*)

Por *Raimundo Villegas.*

Departamento de Biofísica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado 1.827, Caracas - Venezuela.

R E S U M E N

El presente trabajo es un resumen de las investigaciones realizadas sobre la identificación y caracterización de la membrana excitable de la fibra nerviosa y el cual está dividido en cuatro secciones: (I) las vías de paso a través de la cepa celular de Schwann; (II) las vías de paso a través del axolema; (III) la significación de la capa celular de Schwann y del axolema como barreras de difusión; y (IV) las diferencias de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de la célula de Schwann y del axolema durante reposo y actividad. En estas investigaciones se utilizaron las fibras nerviosas gigantes de los calamares tropicales *Doryteuthis plei* y *Sepioteuthis sepioidea*. Los resultados de las investigaciones sobre la ultraestructura y permeabilidad de estas fibras nerviosas resumidos en las tres primeras secciones permitieron proponer la identificación del axolema como la membrana excitable sobre las siguientes bases indirectas: (a) demostración de un espacio de 40 a 120 Å entre el axolema y la capa celular de Schwann, (b) la presencia de canales a través de la capa celular de Schwann capaces de permitir el tránsito indiscriminado entre el exterior y la superficie del axolema de los iones en-

(*) Trabajo leído en la 1ª sesión del Symposium celebrada el 20-3-63. Presentado al IVIC como informe cuatrienal bajo el título: Identificación y Caracterización de la Membrana Excitable de la Fibra Nerviosa.

vueltos en el proceso de excitación, y (c) la demostración de la continuidad estructural del axolema, sólo perforado por poros con un radio de 4.25 Å, capaces de discriminar pequeñas partículas por tamaño y por tanto capaces de mantener las diferencias de concentración iónica y de potencial eléctrico necesarias para la actividad de la fibra nerviosa. En la última sección se presenta la demostración directa, lograda recientemente, al registrar simultáneamente las diferencias de potencial eléctrico durante reposo y actividad a través de la membrana plasmática de la célula de Schwann y del axolema, habiéndose comprobado que el impulso nervioso se registra solamente a través del axolema.

S U M M A R Y

The present paper is a summary of the works on the identification and characterization of the nerve fiber excitable membrane. It is divided in four sections: (I) pathways across the Schwann cell layer; (II) pathways across the axolemma; (III) significance of the Schwann layer and the axolemma as diffusion barriers; and (IV) Schwann cell and axon electrical potential differences in the nerve fiber at rest and during activity. The giant nerve fibers of the tropical squids *Doryteuthis plei* and *Sepioteuthis sepioidea* were utilized. The results of the investigations on the ultrastructure and the permeability summarized in the first three sections led to the proposition of the axolemma (membrane proper of the axon) as the excitable membrane on the following basis: (a) demonstration of a 40 to 120 Å space separating the axolemma from the Schwann layer, (b) the existence of wide channels crossing the Schwann layer, and (c) the demonstration of the structural continuity of the axolemma, perforated only by cylindrical pores 4.25 Å in radius, and therefore, able to maintain the ionic concentration differences necessary for normal nerve fiber function. In the last section, direct evidence on the identification of the axolemma as the excitable membrane is presented. Simultaneous recording of the Schwann cell and the axon electrical potential differences have shown that the typical nerve fiber action potential is only recorded across the axolemma.

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

El presente trabajo es un resumen de las investigaciones realizadas en colaboración con Gloria M. Villegas, Flor V. Barnola, Leopoldo

Villegas, Carlo Caputo y Máximo Giménez, sobre la identificación de la membrana excitable de la fibra nerviosa.

Sobre la naturaleza de la membrana excitable no existe acuerdo entre morfólogos y fisiólogos; para los fisiólogos se trata de una barrera indeterminada situada en la superficie del nervio, a través de la cual se mantienen las diferencias de potencial eléctrico y de concentración iónica características de la fibra nerviosa. Los morfólogos se dividen entre quienes, siguiendo a Cajal, sustentan que el axón, como prolongación de la neurona, es una unidad morfológica y funcional, siendo, por tanto, su membrana plasmática (axolema) la estructura excitable y otros, especialmente los especialistas en microscopía electrónica, quienes impresionados por el cerrado empaquetamiento de las células que forman la fibra nerviosa sugieren que las células de Schwann están fusionadas con el axolema, constituyendo el axolema y la capa celular de Schwann la representación morfológica del sistema excitable de la fibra nerviosa.

Los trabajos de nuestro laboratorio realizados con las fibras nerviosas gigantes de los calamares tropicales *Doryteuthis plei* y *Sepio-teuthis sepioidea*, indican que el axolema es la membrana excitable. Esta identificación fue propuesta primero sobre bases indirectas, tales como (a) la demostración de un espacio entre el axolema y la membrana interna de la capa celular de Schwann vecina, (b) la presencia de vías de paso a través de la capa de Schwann capaces de permitir el tránsito indiscriminado entre el exterior y la superficie del axolema de los iones envueltos en el proceso de excitación y (c) la demostración de la continuidad estructural del axolema sólo perforado por pequeñas vías de paso, no observables con el microscopio electrónico, capaces de discriminar pequeñas partículas por tamaño y por tanto capaces de mantener las diferencias de concentración iónica y de potencial eléctrico necesarias para la actividad normal de la fibra nerviosa. La demostración directa ha sido presentada recientemente, al lograr registrar simultáneamente las diferencias de potencial eléctrico durante reposo y actividad a través de la membrana plasmática de la célula de Schwann y del axolema, habiéndose comprobado que el impulso nervioso se registra solamente a través del axolema.

Este resumen está dividido en cuatro secciones: (I) las vías de paso a través de la capa celular de Schwann; (II) las vías de paso a través del axolema; (III) la significación de la capa celular de Schwann y del axolema como barreras de difusión; y (IV) las diferencias de

potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de la célula de Schwann y del axolema durante reposo y actividad.

I.—*Las vías de paso a través de la capa celular de Schwann*

Al microscopio electrónico la capa celular de Schwann aparece formada por células individuales de 0.1 a 0.9 μ de espesor en el *D. plei* y de 1.5 a 5 μ de espesor en el *S. sepioidea*. La capa de Schwann está atravesada por canales (G. M. Villegas y R. Villegas, 1960), algunos formados por los espacios intercelulares y otros por espacios dejados entre digitaciones de la superficie de la misma célula de Schwann (G. M. Villegas y R. Villegas, 1963). Estos canales tienen un ancho de aproximadamente 60 Å en el *D. plei* y de 40 a 120 Å en el *S. sepioidea*. La longitud de la luz de los canales es aproximadamente mil veces mayor que el ancho. Los canales recorren distancias a través de la capa de Schwann diez a veinte veces mayores que el grosor de la capa y van a desembocar en un espacio que separa al axolema de la membrana interna de las células de Schwann. El espacio alrededor del axolema es de aproximadamente 80 Å en el *D. plei* y de 40 a 120 Å en el *S. sepioidea*.

La resistencia que el espacio axolema-capla de Schwann y los canales ofrecen a la difusión de agua fue medida en el *D. plei* utilizando agua marcada con H^3 y expresada en términos del parámetro $A/\Delta x$, la relación del área efectiva para la difusión de agua dividida por la longitud de la vía de paso (R. Villegas y G. M. Villegas, 1960 a y b). El valor encontrado de 5.3 cm, muy parecido al determinado por Frankenhaeuser y Hodgkin (1956) para describir la resistencia extracelular a la difusión del ión potasio, nos hizo suponer que la vía de paso hasta la superficie del axolema era la misma para el agua y los iones.

II.—*Las vías de paso a través del axolema*

La primera información sobre las vías de paso a través del axolema la obtuvimos al investigar el flujo de agua inducido por una diferencia de presión osmótica creada variando la concentración de NaCl en el líquido extracelular (R. Villegas y G. M. Villegas, 1960 a). La posibilidad de crear una diferencia de presión osmótica y provocar un flujo de agua a través del axolema, variando la concentración de NaCl, nos permitió sugerir, suponiendo que las vías de paso tienen forma cilíndrica, que su radio debería ser comparable con el radio del

ión Na hidratado y por tanto menor de 10 Å, aunque mayor de 1.5 Å, el radio de la molécula de agua.

Koefoed-Johnsen y Ussing (1953) han propuesto que las diferencias de permeabilidad al agua por difusión y filtración son debidas a la presencia de poros llenos de agua en las membranas celulares. Combinando los coeficientes de permeabilidad al agua por difusión (1.4×10^{-4} cm/seg) y filtración (1.0×10^{-10} cm/seg. cm H₂O presión) obtenidos experimentalmente en fibras nerviosas del *D. plei*, siguiendo los métodos de Pappenheimer, Renkin y Borrero (1951) y Koefoed-Johnsen y Ussing (1953), calculamos que el radio de los poros en el axolema estaba entre 8.5 y 1.5 Å (R. Villegas y G. M. Villegas 1960 a).

TABLA I
COEFICIENTE DE REFLEXION (σ) DEL AXOLEMA PARA SEIS
MOLECULAS DE PRUEBA

SOLUTO	Radio molecular, Å	σ
Metanol	1.83	0.35
Formamida	1.96	0.44
Etanol	2.13	0.63
Urea	2.17	0.70
Etilen-glicol	2.24	0.72
Glicerol	2.77	0.96

En trabajos posteriores (Villegas y Barnola, 1960 y 1961), siguiendo los principios desarrollados por Durbin, Frank y Solomon (1956), Durbin (1959) y Solomon (1960), medimos la habilidad del axolema para discriminar entre la molécula de agua con un radio de 1.5 Å y seis moléculas anelectrolíticas de radio conocido, todas de radio mayor al de la molécula de agua y menor de 3 Å. La capacidad discriminativa fue expresada en términos de σ , el coeficiente de reflexión de Staverman (1951). Los valores límites de este coeficiente son: $\sigma = 1$ cuando la membrana se comporta ante el soluto de prueba y el solvente (agua) como una membrana ideal y $\sigma = 0$ cuando el soluto y el solvente pasan a través de la membrana a igual velocidad. En la Tabla I se resumen los resultados obtenidos con las seis moléculas.

las anelectrolíticas investigadas. Los valores de σ fueron luego utilizados para calcular el radio de los poros en el axolema. Se trazó una familia de curvas teóricas que representaban los valores esperados de $1 - \sigma$ para las moléculas de prueba, asumiendo valores para el radio de los poros entre 1.5 y 8.5 Å con intervalos de 0.25 Å. Como se muestra en la Figura 1 los valores cayeron sobre la curva de 4.25 Å.

El valor de 4.25 Å encontrado para el radio de los poros en el axolema, de acuerdo con los valores límites de 1.5 a 8.5 Å calculados a partir de los coeficientes de permeabilidad del agua, demostró que el axolema era capaz de mantener los gradientes de concentración iónica necesarios para el funcionamiento normal de la fibra nerviosa.

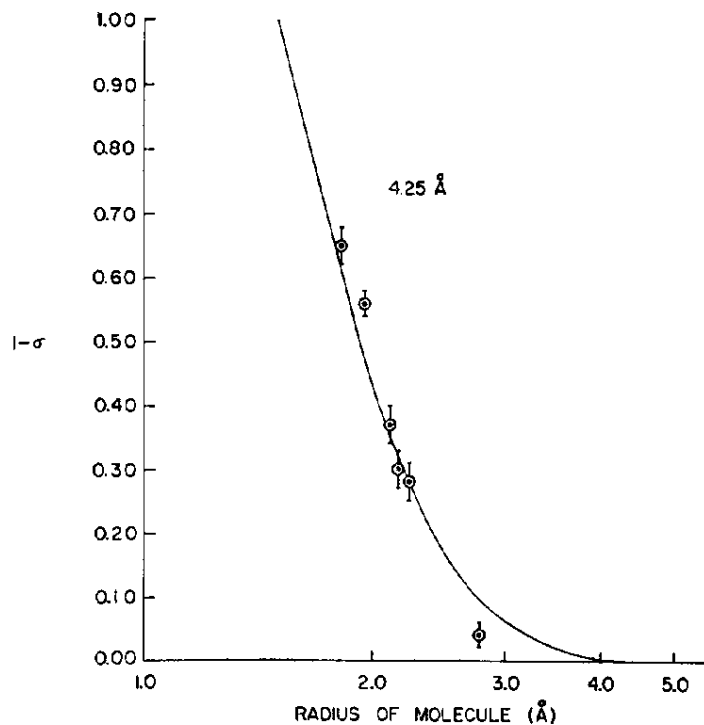


Figura 1.—Los valores experimentales de $(1 - \sigma) \pm$ error standard, de la Tabla I, están representados en función del radio molecular. Los valores experimentales caen sobre una curva teórica calculada para poros en el axolema de 4.25 Å de radio. La dispersión de los valores experimentales a cada lado de la curva teórica es de ± 0.25 Å (reproducida de R. Villegas y F. V. Barnola, *J. Gen. Physiol.*, 44, 963, 1961, con autorización).

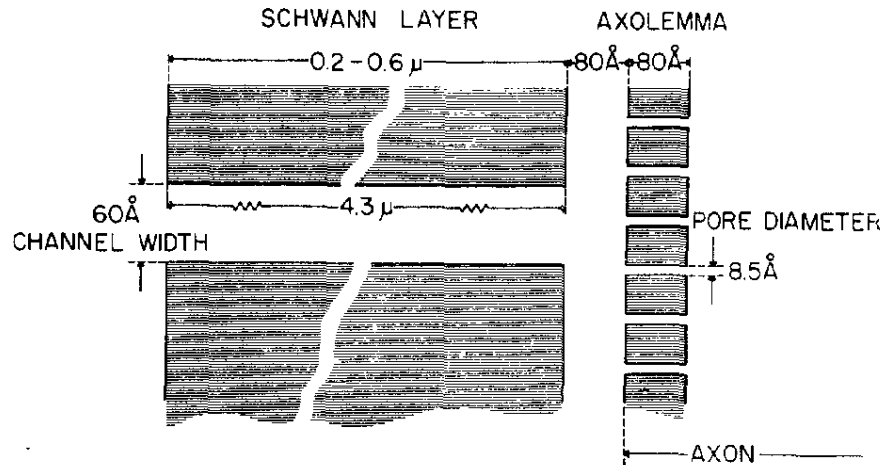


Figura 2.—Organización de las barreras, axolema y capa de Schwann, colocadas entre el axoplasma y el líquido extracelular. Las dimensiones indicadas en la figura fueron obtenidas de las observaciones de microscopía electrónica, los estudios de difusión y filtración de agua y las medidas de la capacidad discriminativa del axolema para una serie de moléculas de prueba (reproducida de R. Villegas, C. Caputo y L. Villegas, *J. Gen. Physiol.*, 46, 245, 1962, con autorización).

III.—Significación del axolema y la capa celular de Schwann como barreras de difusión

En la Figura 2 se muestra la organización del axolema y la capa celular de Schwann en la fibra nerviosa gigante del calamar. Este modelo fue construido con la información brindada por los estudios de microscopía electrónica, permeabilidad al agua y tamizado molecular resumido en las secciones anteriores. Para comprobar la validez de las observaciones anteriores citadas se investigó la posibilidad de poder predecir la rata de difusión de moléculas de radio conocido a través de las cubiertas de la fibra nerviosa.

$A_{pd}/\Delta x$, el área efectiva para difusión dividida por la unidad de longitud de la vía de paso, para cualquier molécula de radio r_x a través de una membrana como el axolema perforada por poros cilíndricos, puede ser calculada a partir de la siguiente ecuación (Renkin, 1954, ecuac. 11):

$$A_{pd}/\Delta x = A_p/\Delta x \left(1 - r_x/r_p\right)^2 \left[1 - 2.104 (r_x/r_p) + 2.09 (r_x/r_p)^3 - 0.95 (r_x/r_p)^5\right]$$

donde $A_p/\Delta x$ es el área geométrica de los poros dividida por su longitud y r_p es el radio de los poros. En esta ecuación $(1 - r_x/r_p)^2$ representa el factor estérico que restringe la entrada de la molécula en

el poro y la expresión entre corchetes representa la resistencia debida al roce de la molécula con las paredes del poro, una vez que la molécula ha entrado en éste.

Para determinar $A_{cd}/\Delta x$, el área efectiva para difusión dividida por la unidad de longitud de la vía de paso, para cualquier molécula de radio r_x a través de una barrera como la capa celular de Schwann la cual está atravesada por canales en forma de hendidura, se derivó la siguiente ecuación (Villegas, Caputo y Villegas, 1962; ecuac. 4):

$$A_{cd}/\Delta x = A_c/\Delta x (1 - r_x/0.5c) [1 - 1.004 (r_x/0.5c) + 0.42 (r_x/0.5c)^3 - 0.17 (r_x/0.5c)^5]$$

en la cual $A_c/\Delta x$ es el área geométrica ocupada por los canales dividida por su longitud y c es el ancho de los canales. En esta ecuación $(1 - r_x/0.5c)$ representa el factor estérico que restringe la entrada de la molécula en el canal y la expresión entre corchetes representa la resistencia debida al roce de la molécula con las paredes del canal.

Para calcular $A_{nd}/\Delta x$, el área efectiva transneural para difusión dividida por la unidad de longitud de la vía de paso, considerados el axolema y la capa de Schwann en conjunto, se deben añadir como conductancias en serie los valores obtenidos para $A_{pd}/\Delta x$ y $A_{cd}/\Delta x$:

$$A_{nd}/\Delta x = [1/(A_{pd}/\Delta x) + 1/(A_{cd}/\Delta x)]^{-1}$$

TABLA II

AREA EFECTIVA DIVIDIDA POR LA LONGITUD DE LA VIA DE PASO PARA LA DIFUSION DE AGUA, ETILEN-GLICOL Y GLICEROL en cm. por cm² de área

Radio molecular	$A_{pd}/\Delta x$ (axolema)	$A_{cd}/\Delta x$ (capa de Schwann)	$A_{nd}/\Delta x$ (transneural)	
			Teórico	Experimental *
Agua 1.5 Å	13.6	8.7	5.3	5.3 ± 1.4
Etilen-glicol 2.24 Å	3.5	8.3	2.5	2.5 ± 0.4
Glicerol 2.77 Å	1.0	7.9	0.83	0.29 ± 0.03

(*) Los valores de $A_{nd}/\Delta x$ representan el promedio ± desviación standard.

En la Tabla II se resumen los valores teóricos para la difusión de agua, etilen-glicol y glicerol a través de cada una de las barreras, separadamente y en conjunto, así como el valor transneural experimental obtenido al medir la rata de difusión de agua marcada con H^3 y de etilen-glicol y glicerol marcados con C^{14} (Villegas, Caputo y Villegas, 1962). El acuerdo entre los resultados experimentales y los teóricos apoya la validez del modelo representado por la Figura 2, con el cual se calcularon los valores teóricos de cada barrera y, por adición de éstos, el valor teórico de $A_{na}/\Delta x$.

Ha sido calculado que hay 1.3×10^{10} poros ocupando un área de 7.6×10^5 cm^2 en cada cm^2 de axolema (Villegas y Barnola, 1961). El área ocupada por los canales en un cm^2 de superficie de capa de Schwann ha sido estimada igual a 4.1×10^{-3} cm^2 , 54 veces mayor que la ocupada por poros en un cm^2 de axolema. Los canales son aproximadamente 540 veces más largo que los poros, asumiendo la longitud de estos últimos igual al grosor del axolema. La restricción ofrecida por cada barrera a la difusión $(A/\Delta x)^{-1}$, depende del área y de la longitud de las vías de paso que las cruzan. Por tanto, la resistencia a la difusión ofrecida por los canales se debe esencialmente a su longitud y la ofrecida por los poros a su pequeño radio.

De los valores de difusión a través de una membrana se puede calcular un coeficiente σ' (Kedem y Katchalsky, 1961) similar al coeficiente σ para filtración, del cual tratamos en la sección II. Los valores límites para este coeficiente son: $\sigma' = 1$ en el caso de una membrana que se comporta ante las moléculas de soluto y de solvente como una membrana semipermeable ideal y $\sigma' = 0$ cuando el soluto y el solvente pasan a través de la membrana a la misma velocidad. Para el axolema se determinaron valores de σ' iguales a 0.74 para el etilenglicol y 0.93 para el glicerol. Estos valores de σ' para el axolema son similares a los obtenidos para σ en los experimentos de filtración a través de la misma membrana (Villegas y Barnola, 1960 y 1961). Estos valores indican el alto grado de selectividad del axolema para partículas tan pequeñas como las moléculas de etilen-glicol y glicerol cuyos radios son 2.2 y 2.8 Å, respectivamente. Los valores de σ' para la capa de Schwann fueron encontrados iguales a 0.05 para el etilen-glicol y 0.09 para el glicerol (Villegas, Caputo y Villegas, 1962), confirmando la poca capacidad discriminativa de la capa de Schwann para partículas tan pequeñas.

Los radios cristalinos con una capa de hidratación de los iones Na, K y Cl iguales a 3.67, 4.05 y 4.53 Å, respectivamente (Müllins,

1956), son comparables al radio de 4.25 Å determinado para los poros del axolema. Los resultados resumidos hasta aquí, tanto de microscopía electrónica como de permeabilidad, coinciden en señalar al axolema como la membrana excitable, por ser la única barrera continua en la superficie de la fibra nerviosa capaz de mantener los gradientes de concentración iónica necesarios para el funcionamiento del nervio.

IV.—*Las diferencias de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de la célula de Schwann y el axolema durante reposo y actividad*

Los resultados experimentales resumidos en las tres secciones anteriores coincidieron en señalar al axolema como la membrana excitable. Otros investigadores habían sugerido que la membrana excitable estaba formada por el axolema y la capa celular de Schwann vecina (Schmitt, 1957) o por el axolema y la membrana interna de la célula de Schwann (Sjöstrand, 1960). Para decidir entre estas proposiciones Schmitt y Geshwind (1957) sugirieron registrar simultáneamente los potenciales eléctricos del axón y una célula de Schwann vecina durante el pasaje del impulso nervioso. La dificultad para realizar estos experimentos consistía en encontrar una fibra nerviosa en la cual fuese posible insertar simultáneamente microelectrodos en el axón y una célula de Schwann. Afortunadamente encontramos a fines de 1961 en las costas de Naiguatá (Venezuela) el calamar *S. sepioidea* cuyas fibras nerviosas gigantes del manto poseen células de Schwann de 1.5 a 5 μ de grosor rodeando los axones de 300 a 450 μ de diámetro. En estas fibras fue posible realizar los registros simultáneos de los potenciales eléctricos del axón y de la célula de Schwann (Villegas, Giménez y Villegas, 1962; Villegas, Villegas, Giménez y Villegas, (1963).

Cuando se penetró la fibra nerviosa en reposo del *S. sepioidea* con un microelectrodo, fue posible registrar tres niveles de potencial eléctrico: (a) el primer nivel formado por varios potenciales de -10 a -24 mV; (b) el segundo formado por una sola diferencia de potencial de -33 a -46 mV; y (c) el tercer nivel formado por una sola diferencia de potencial de -50 a -65 mV. La localización de cada uno de estos niveles de potencial eléctrico se logró determinando la posición del microelectrodo durante el registro de cada nivel mediante la técnica de Mitarai (1960) modificada por Villegas (1962). Esto permi-

tió demostrar que el primer nivel de potencial tiene su origen en las células del endoneuro (caracterizadas por Villegas y Villegas, 1962), el segundo nivel en la célula de Schwann y el tercero en el axón.

El origen del impulso nervioso y la independencia eléctrica existente entre el potencial de la célula de Schwann y el del axón fueron demostrados de la siguiente manera. Se insertaron tres micropipetas, 100 a 150 μ aparte, a lo largo de la fibra nerviosa; la primera dentro del axón para el registro de su potencial, la segunda dentro de una célula de Schwann para el registro de su potencial y la tercera dentro del axón para suplir corriente depolarizante en su interior. Como se muestra en la Figura 3a cuando se estimuló la fibra nerviosa se registraron potenciales de acción sólo con la micropipeta colocada

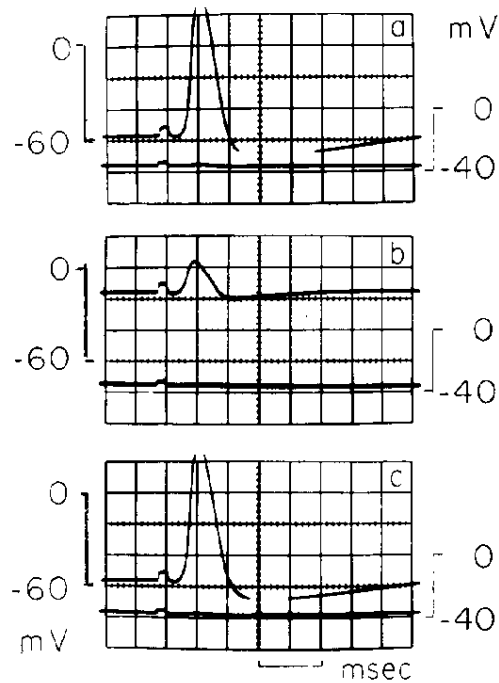


Figura 3.—Registro simultáneo de los potenciales de reposo y acción a través del axolema (trazado superior) y a través de la membrana plasmática de la célula de Schwann (trazado inferior). (a) Potenciales de reposo y acción típicos de la fibra nerviosa fueron registrados solamente del interior del axón, escala izquierda; potencial de la célula de Schwann escala derecha (b) Cuando los potenciales de axón fueron reducidos, mediante suministro de corriente depolarizante en el axoplasma, no se observaron cambios significativos en el potencial de la célula de Schwann. (c) La recuperación de los potenciales de reposo y acción se produjo al interrumpir el suministro de corriente depolarizante dentro del axoplasma. Los resultados de estos experimentos permitieron comprobar la independencia eléctrica existente entre el axón y la célula de Schwann y establecer que el impulso nervioso se sucede a través del axolema (reproducida de

R. Villegas, M. Giménez y L. Villegas, *Biochim. Biophys. Acta*, 62 610, 1962, con autorización).

dentro del axón. Cuando se depolarizó al axón, tal como se muestra en la Figura 3b, no se observó un cambio significativo del potencial de la célula de Schwann. La supresión de la corriente depolarizante fue seguida de la recuperación de los potenciales de reposo y de acción registrados en el interior del axón, tal como se muestra en la Figura 3c.

Los resultados de estos experimentos permitieron establecer la independencia eléctrica, existente entre la célula de Schwann y el axón y comprobar que el impulso nervioso se sucede a través del axolema.

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

- 1.—DURBIN, R. P., FRANK, H. y SOLOMON, A. K.—*J. Gen. Physiol.*, *39*, 535, 1956.
- 2.—DURBIN, R. P.—*Proceedings of the First National Biophysics Conference*, New Haven, Yale University Press, 323, 1959.
- 3.—FRANKENHEAUSER, B. y HODGKIN, A. L.—*J. Physiol.*, *131*, 341, 1956.
- 4.—KEDEM, O. y KATCHALSKY, A.—*J. Gen. Physiol.*, *45*, 143, 1961.
- 5.—KOEFOED-JOHNSEN, V. y USSING, H. H.—*Acta Physiol. Scand.*, *28*, 60, 1953.
- 6.—MITARAI, G.—*J. Gen. Physiol.*, *43*, N° 5, Suppl., 95, 1960.
- 7.—MULLINS, L. J.—Washington D.C., American Institute of Biological Sciences, Symposium N° 1, 123, 1956.
- 8.—PAPPENHEIMER, J. R., RENKIN, E. M. y BORRERO, L. M.—*Am. J. Physiol.*, *167*, 13, 1951.
- 9.—RENKIN, E. M.—*J. Gen. Physiol.*, *38*, 225, 1954.
- 10.—SCHMITT, F. O.—*In Metabolism of the Nervous System*, New York, Pergamon Pres Inc., 35, 1957.
- 11.—SCHMITT, F. O. y GESHWIND, N.—*Progress Biophys. and Biophysical Chem.*, *8*, 166, 1957.
- 12.—SJOSTRAND, F. S.—*In Modern Scientific Aspects of Neurology*, London, Edward Arnold Ltd., 188, 1960.
- 13.—SOLOMON, A. K.—*J. Gen. Physiol.*, *43*, N° 5, Suppl., 1, 1960.
- 14.—STAVERMAN, A. J.—*Rec. Trav. Chim. Pays-bas.*, *70*, 344, 1951.
- 15.—VILLEGAS, G. M. y VILLEGAS, R. J.—*Ultrastructure Research*, *3*, 362, 1960.
- 16.—VILLEGAS, G. M. y VILLEGAS, R.—*J. Ultrastructure Research*, *8*, 197, 1963.
- 17.—VILLEGAS, L.—*Biochim. Biophys. Acta*, *64*, 359, 1962.
- 18.—VILLEGAS, R. y BARNOLA, F. V.—*Nature*, *188*, 762, 1960.
- 19.—VILLEGAS, R. y BARNOLA, F. V.—*J. Gen. Physiol.*, *44*, 963, 1961.
- 20.—VILLEGAS, R., CAPUTO, C. y VILLEGAS, L.—*J. Gen. Physiol.*, *46*, 245, 1962.
- 21.—VILLEGAS, R., GIMENEZ, M. y VILLEGAS, L.—*Biochim. Biophys. Acta*, *62*, 610, 1962.
- 22.—VILLEGAS, R. y VILLEGAS, G. M.—*II Simposio Interamericano sobre la Aplicación de la Energía Nuclear para Fincas Pacíficas*, Buenos Aires, Organización de los Estados Americanos, Washington, 77, 1960.
- 23.—VILLEGAS, R. y VILLEGAS, G. M.—*J. Gen. Physiol.*, *43*, N° 5, Suppl., 73, 1960.
- 24.—VILLEGAS, R. y VILLEGAS, G. M.—*Biochim. Biophys. Acta*, *60*, 202, 1962.
- 25.—VILLEGAS, R., VILLEGAS, L., GIMENEZ, M. y VILLEGAS, G. M.—*J. Gen. Physiol.*, *46*, 1,047, 1963.