

Tesis de Posgrado

Biofísica de membranas epiteliales : Transporte epitelial de halogenuros

Skorka, Armando

1978

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Skorka, Armando. (1978). Biofísica de membranas epiteliales : Transporte epitelial de halogenuros. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1577_Skorka.pdf

Cita tipo Chicago:

Skorka, Armando. "Biofísica de membranas epiteliales : Transporte epitelial de halogenuros". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1577_Skorka.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOFISICA DE MEMBRANAS EPITELIALES
Transporte Epitelial de Halogenuros.

ARMANDO SKORKA

*Rep. N° 1577
p. 2*

1577 - -

1978

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOFISICA DE MEMBRANAS EPITELIALES
Transporte Epitelial de Halogenuros

AUTOR DE LA TESIS: Licenciado Armando Skorka

DIRECTOR DE LA TESIS: Doctor Ignacio L. Reisin

**LUGAR DE TRABAJO: Departamento de Biofísica del Centro de
Investigaciones Médicas Albert Einstein-
-Buenos Aires- Argentina.**

MI RECONOCIMIENTOS

a la Fundación Centro de Investigaciones
Médicas Albert Einstein por haberme auto-
rizado a realizar en sus Laboratories las
investigaciones que conforman la presente
tesis.

Mi agradecimiento:

al Doctor Ignacio L. Reisin por su dedicación,
esfuerzo, enseñanza y guía.

a los Doctores: Marcelino Cereijido, Catalina
Rotunno, Carlos A. Rabito, por lo mucho que he
aprendido de ellos.

al Doctor Carlos P. Lantos, por su dedicación
en su función de consejero de tesis.

a mis compañeros del Departamento de Biofísica:
Licenciado Máximo Panitch y Médico Veterinario
Horacio F. Cantiello, por su espíritu de confrater-
nidad y apoyo sin desmayo.

A mis padres:

Por haberme enseñado el camino de
le honrado, de le justo, de le mi-
sericordioso.

ABREVIATURAS

min	minuto
s	segundo
ms	milisegundo
cm	centímetro
μm	micrón, 10^{-4} cm
\AA	Angstrom, 10^{-8} cm
ΔV	diferencia de potencial
E	fuerza electromotriz
mV	milivoltio
Ω	ohmio
k Ω	kilo-ohmio
Σ_x	conductividad equivalente límite de χ ($\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{equiv}^{-1}$)
$[X]_e$	concentración de X en la solución externa
$[X]_i$	concentración de X en la solución interna
$[X]_c$	concentración celular de X
mM	milimolar
μM	micromolar
cpm	cuentas por minuto
^{36}P Cl	actividad específica del ^{36}Cl (cpm/mol)
pH	logaritmo decimal de la inversa de la concentración protónica.
$^{\circ}\text{K}$	grado Kelvin
$^{\circ}\text{C}$	grado centígrado
T	temperatura absoluta
F	constante de Faraday
R	constante de los gases
I	intensidad de corriente
J	flujo
ATP-asa Na-K	adenosinatrifosfatasa Mg (Na-K) sensible

I N D I C E

<u>PROLOGO</u>	I
<u>CAPITULO I: INTRODUCCION</u>	1
1- MEMBRANAS EPITELIALES.....	2
a) Morfología de la piel de los anfibios.....	3
2- TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE SODIO.....	8
a) El modelo de Koefoed-Johnsen y Ussing.....	9
b) Modificación del modelo transcelular.....	13
c) Modelos con compartimiento de transporteespecializado.....	15
d) Modelo con rutas extracitoplasmáticas.....	18
e) Ruta Pasiva.....	21
f) Modelos más recientes.....	24
3- TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE CLORURO.....	29
<u>CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS</u>	35
1- METODOLOGIA GENERAL.....	36
a) Animales.....	36
b) Disección y Montaje.....	36
c) Medida de la diferencia de potencial eléctrico..	37
d) Aparatos.....	37
e) Soluciones.....	40
2- DETERMINACION DE LA LONGITUD DEL CAMINO DE DIFUSION MEDIANTE CAMBIOS TRANSITORIOS EN EL POTENCIAL DE LA PIEL DEBIDOS A MODIFICACIONES RAPIDAS EN LA COMPOSI CION DE LA SOLUCION EXTERNA.....	43
a) Procedimiento.....	43
b) Estadística.....	47
c) Cálculo del tiempo medio.....	47
d) Determinación de las capas de agua no mezclada..	48

3- DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE DIFUSION APARENTE DE CLORURO (D_{Cl}).....	50
a) Aparatos.....	52
b) Drogas y Soluciones.....	54
c) Procedimiento.....	54
d) Cómputos.....	54
e) Elección del tiempo de difusión.....	56
f) Estadística.....	56
<u>CAPITULO III: RESULTADOS</u>	57
1- DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE DIFUSION DEL Cl^-	58
2- EFECTO DE LOS HALOGENUROS SOBRE LOS CAMBIOS DE POTENCIAL ELECTRICO DE LA PIEL DE RANA.....	59
3- EFECTO DEL SODIO SOBRE EL POTENCIAL ELECTRICO DE LA PIEL DE RANA.....	68
a) Efecto del SO_4^{2-} como principal contraión.....	68
b) Efecto de los halogenuros Cl^- , Br^- e I^- como principal contraión.....	70
4- EFECTO DEL COION DEL SODIO SOBRE LA DIFERENCIA DE POTENCIAL ELECTRICO DE PIELES EXPUESTAS A ALTA CONCENTRACION DE HALOGENURO Y BAJA DE Na	79
5- EFECTO DEL Na SOBRE EL DESCENSO DEL POTENCIAL PRODUCIDO POR LA PRESENCIA DE HALOGENUROS PERMEABLES (Cl^- , Br^-) A LA PIEL DE RANA.....	81
<u>CAPITULO IV: DISCUSION</u>	84
1- DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE DIFUSION APARENTE DE CLORURO.....	85

2- EFECTO DE LOS HALOGENUROS SOBRE LOS CAMBIOS DE POTENCIAL ELECTRICO DE LA PIEL DE RANA.....	86
3- EFECTO DEL SODIO SOBRE EL POTENCIAL ELECTRICO DE LA PIEL DE RANA.....	89
a) Efecto del SO_4^{2-} como principal contraión.....	89
b) Efecto de los halogenuros Cl^- , Br^- e I^- como principal contraión.....	91
4- EFECTO DE LA COLINA SOBRE LA DIFERENCIA DE POTENCIAL ELECTRICO DE PIELES EXPUESTAS A ALTA CONCENTRACION DE HALOGENURO.....	92
5- EFECTO DEL Na SOBRE EL DESCENSO DEL POTENCIAL PRODUCIDO POR LA PRESENCIA DE HALOGENUROS PERMEABLES (Cl^- , Br^-) A LA PIEL DE RANA.....	94
6- CINETICA DE ENTRADA DE LOS HALOGENUROS Cl^- Y Br^- A LA PIEL DE RANA.....	95
7- CIRCUITOS EQUIVALENTES ALTERNATIVOS QUE CONTEMPLAN EL DESCENSO DE POTENCIAL TRANSEPITELIAL DEBIDO A LA PRESENCIA DE UN HALOGENURO PERMEABLE (Cl^- , Br^-) EN LA SOLUCION EXTERNA.....	99
<u>CAPITULO V: RESUMEN Y CONCLUSIONES</u>	104
<u>APENDICE</u>	109
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	113

PROLOGO

El intercambio de sustancias entre los organismos superiores y el medio se realiza a nivel de membranas epiteliales constituidas por una o más capas de células íntimamente asociadas. Existe un caudal considerable de información que indica que el movimiento neto de Na^+ a través de estas membranas juega un papel fundamental en:

- 1) La regulación del balance de Na^+ del organismo.
- 2) El movimiento de agua a través del acople al pasaje de Na^+ .
- 3) El movimiento de aminoácidos y azúcares, gracias a que el Na^+ modifica las propiedades de selectividad de la membrana.

En condiciones fisiológicas, por requerimiento de electroneutralidad el ión Na^+ no puede transportarse solo, sino que debe intercambiarse por un ión de su misma carga o bien acompañado de algún anión.

Los datos experimentales demuestran que el movimiento neto de Na^+ en la mayoría de las membranas epiteliales se realiza en compañía de Cl^- . De esta manera, el movimiento neto de Na^+ y todas las funciones fisiológicas que de él dependen pasan a estar controladas por el movimiento de Cl^- . Resulta pues crucial determinar cuál es el paso que limita al movimiento de Cl^- a través de las membranas epiteliales, en particular cuál es su localización anatómica.

El objeto de esta tesis es establecer el lugar en el que el Cl^- modifica el potencial eléctrico que se observa a través de una membrana cuando es montada como diafragma entre dos cámaras y establecer el efecto de distintos halogenuros sobre este potencial eléctrico.

Los estudios se realizaron en la piel aislada de Leptodactylus ocellatus, preparación que ha sido extremadamente útil para el estudio de procesos de transporte de Na^+ en particular.

La tesis comprende cinco capítulos:

-En el capítulo introductorio se describe la estructura biológica de la piel de rana y se resume la información existente sobre sus propiedades de transporte hasta el presente; en el segundo capítulo se describe los materiales y

métodos que se utilizaron en las investigaciones; el tercer capítulo se refiere a los resultados obtenidos en las distintas experiencias; en el cuarto capítulo se discuten los resultados obtenidos y en el quinto capítulo se resumen las experiencias y presentan las conclusiones.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1- MEMBRANAS EPITELIALES

Los seres vivos están formados por compartimientos que contienen soluciones de muy variada composición: orina, bilis, sangre, humor acuoso, lágrimas, líquido cefalorraquídeo, sudor, saliva, leche, jugo pancreático, etc. Estos compartimientos se encuentran limitados por membranas epiteliales compuestas por una o más capas de células, de cuyas propiedades depende la composición de los líquidos mencionados.

De este modo, las células epiteliales, además de regular su propia composición mediante bombas, vehículos, poros, etc., como lo haría cualquier otra célula del organismo, controlan también la composición del compartimiento que limitan.

Las membranas celulares poseen en algunos casos las mismas propiedades alrededor de toda la célula (por ejemplo: un glóbulo rojo, una bacteria), mientras que en otros casos (fibras musculares, axones) puede diferir en algunas regiones específicas (por ejemplo, la región sináptica, la placa motora, etc.) donde la permeabilidad es distinta a la del resto.

En las membranas epiteliales toda la cara celular que da hacia un compartimiento tiene propiedades distintas de las del polo que da hacia el compartimiento situado del otro lado del epitelio. Por ejemplo, la membrana de una célula del tubo contorneado renal presenta una permeabilidad al K^+ mucho mayor en la región luminal. Con la permeabilidad al Na^+ , en cambio, sucede lo contrario.

Estas características de asimetría funcional tienen fundamental importancia en la translocación de sustancias a través de los epitelios:

1) Las membranas epiteliales tienen una superficie externa (*) limitada por las membranas apicales de las células epiteliales y otra interna (*) cuya superficie se relaciona con el tejido conectivo (corion).

2) En las células de las membranas epiteliales, los núcleos, las mitocondrias, el aparato de Golgi, los ribetes en cepillo, etc., no se ordenan al azar, sino que en general se disponen de una manera también asimétrica, conservando una posición preferencial.

Así, en el túbulo contorneado proximal del riñón de los mamíferos, las microvellosidades están del lado de "afuera" -la luz- y en cambio las mitocondrias se alinean del lado de "adentro" o intersticial.

3) Las células epiteliales están separadas entre sí por un interespacio cerrado hacia fuera por los llamados "complejos de unión", que son un caso especial de contactos celulares, que posteriormente detallaremos. En ellos, la hojuela externa de las membranas celulares vecinas parecen fusionarse a lo largo de una faja o en varios puntos cerrando así el interespacio de toda la célula y oponiendo una seria barrera a la difusión. A este nivel se halla el límite real entre el "afuera" y el "adentro" de las membranas epiteliales. El espacio intercelular contiene una sustancia que, por lo menos en algunos epitelios, parece tener capacidad de complejar iones. También se aprecia en estas membranas, distintos tipos de contactos celulares como ser: zónulas adherentes, desmosomas y máculas, algunas de las cuales (en particular las máculas) desempeñan un papel importante en la comunicación intercelular.

(*) En esta tesis serán sinónimos: cara externa, lado de afuera o lado mucoso, y por otra parte: cara interna, lado de adentro o lado seroso de una membrana epitelial. En el caso del tubo renal, intestino, mucosa gástrica, vesícula biliar, glándulas sudoríparas, páncreas, etc., "afuera" corresponde a la luz y "adentro" corresponde al lado intersticial en conexión con el torrente sanguíneo.

Se denominará "solución externa" a la solución Ringer que baña la cara externa de la piel, y "solución interna" a la solución Ringer que baña la cara interna de la piel.

a) Morfología de la piel de los anfibios

La piel de rana consiste en una epidermis, compuesta por 5 a 7 capas de células epiteliales, y una dermis que contiene vasos sanguíneos, glándulas y elementos de tejido conectivo. La epidermis contiene 1 o 2 capas de células escamosas, parcialmente cornificadas (estrato corneo), 3 o 4 láminas intermedias

de células poliédricas o cúbicas (estrato granuloso y estrato espinoso) y una lámina basal de células columnares o cúbicas (estrato germinativo) (Fig. I.1) (Farquhar y Palade, 1964, 1965, 1966; Parakkal y Matolstsy, 1964).

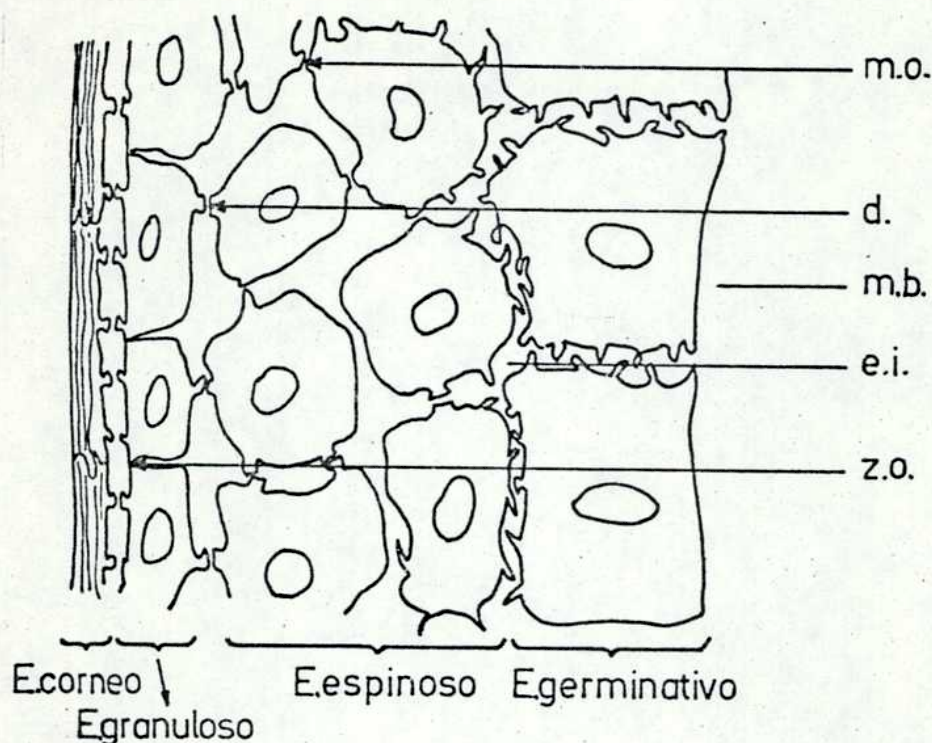


Figura I.1: Esquema de la estructura de la piel de Rana.

d: desmosoma; **zo:** zónula ocludente; **mo:** mácula ocludentes, **mb:** membrana basal; **ei:** espacio intercelular.

Estrato germinativo: Las células de este estrato poseen los elementos subcelulares corrientes, pero en pequeñas cantidades: pocas mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso, algunos ribosomas libres y un complejo de Golgi rudimentario con una o dos pequeñas cisternas aplanadas y vesículas asociadas especialmente cerca de las membranas celulares laterales. Poseen un sistema bien desarrollado de filamentos citoplasmáticos (tonofilamentos).

Estrato espinoso y estrato granuloso: En las células correspondientes a esta región de la epidermis, los filamentos citoplasmáticos son más abundantes y están más fuertemente empaquetados. Al mismo tiempo, el sistema retículo endoplasmático rugoso es más voluminoso y el complejo de Golgi más elaborado.

Las células poseen cuerpos densos de tamaño y forma irregular con un contenido heterogéneo, que corresponden a derivados lisosomales.

Estrato corneo: La cornificación ocurre gradualmente y se encuentran en esta lámina celular elementos queratinizados en distintos estados. Las células queratinizadas aparecen muy densas, están completamente ocupadas por filamentos citoplasmáticos y contienen pocas organelas celulares. Las células parcialmente cornificadas tienen una matriz citoplasmática menos densa y sus organelas son más numerosas y están menos alteradas.

Varios tipos de células especializadas se encuentran diseminadas a través de la epidermis. En la piel de rana, ocasionalmente se pueden reconocer linfocitos, macrófagos y células pigmentarias en las capas celulares más profundas. Pero, regularmente, se ha encontrado otro tipo de células, ubicadas predominantemente en el estrato espinoso y estrato granuloso. Estas células tienen la forma de una botella alargada. Citológicamente, las características distintivas de estas células son una matriz citoplasmática transparente y la presencia de una gran cantidad de mitocondrias; por eso a estas células se las denomina "células ricas en mitocondrias".

1) Contactos celulares

Las uniones intercelulares son reconocidas actualmente como modificaciones de la superficie de células adyacentes, más que como puentes intercelulares, y consisten en tres elementos de unión morfológicamente distintos, identificados como zónula occludentes, mácula occludentes, y mácula adherentes (desmosoma) (Fig 1.2). Se encuentran relacionadas a los fenómenos de adhesión y comunicación entre célula y célula y también actúan como barreras de permeabilidad al movimiento de fluido transepitelial.

En las ranas adultas, entre las células adyacentes de la lámina más externa del stratum granulosum, las membranas celulares se fusionan (zónula occludentes) uniendo a las células entre sí en una lámina continua e ininterrumpida que cancela el espacio intercelular.

Estas membranas celulares fusionadas por zónula occludentes forman la única

barrera estructuralmente continua en la epidermis de la rana. Otro grupo de zónula occludentes se encuentra también en el stratum corneum donde no mantienen una buena continuidad estructural.

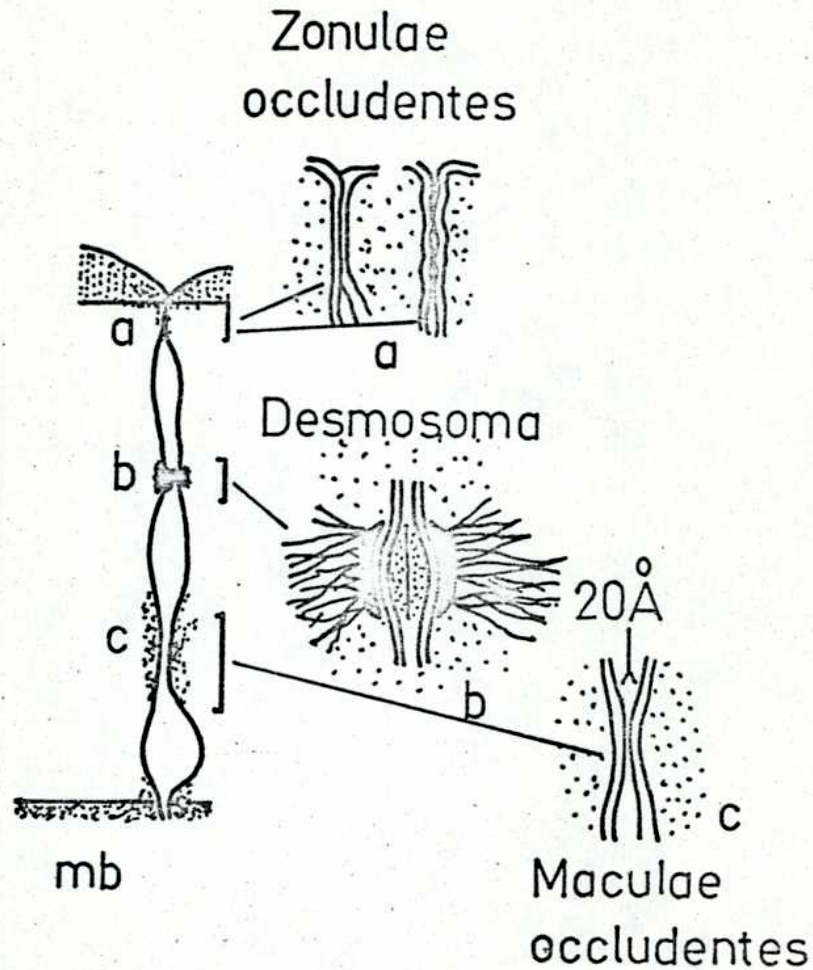


Figura I.2: Diagrama que ilustra los diversos tipos de contactos celulares de la piel de rana. a: zónula occludentes; b: mácula occludentes; c: desmosoma.

Los desmosomas o mácula adhaerens son el tipo de unión predominante en el resto de la epidermis. Son menos numerosos y complejos en el estrato germinativo y alcanzan su total desarrollo y mayor frecuencia en el estrato granuloso. La estructura de los desmosomas es bien conocida y son áreas de

membranas celulares paralelas, donde el espacio intercelular ($\approx 240 \text{ \AA}$) está ocupado por un disco de material denso dividido en dos partes iguales por una lámina central más densa; placas citoplasmáticas se apoyan sobre la parte interna de cada membrana celular y manojos de filamentos citoplasmáticos convergen sobre la fase interna de cada placa. Estas estructuras sólidas y rígidas están involucradas principalmente en la unión célula-célula, transformando una población de células aparentemente independientes en una estructura parcialmente conectada.

En el *stratum spinosum* y *stratum germinativum* se encuentran otras uniones permeables o mácula occludentes, caracterizadas por un espacio intercelular de 20 \AA ocupado por un material aparentemente amorfo de baja densidad. Las membranas celulares adyacentes se mantienen paralelas. Estas uniones representan áreas de baja resistencia que facilitan la difusión de una célula a otra (Bennet, 1973).

En la piel de anfibios, las máculas occludentes, junto con las zónulas occludentes del estrato corneo y estrato granuloso, representan regiones permeables que facilitan el movimiento iónico de una célula a otra y por lo tanto permiten una rápida equilibración de las concentraciones de Na^+ y K^+ entre todas las células conectadas por estas uniones, transformando esta población de células en un compartimiento continuo.

ii) Espacio intercelular

El espacio intercelular entre el estrato corneo y el estrato granuloso contiene un material amorfo y denso, probablemente derivado de gránulos secretorios descargados por las células correspondientes, mientras que el espacio intercelular en el estrato germinativo, espinoso y granuloso está ocupado por un material de baja densidad. La geometría y volumen de estos espacios varían considerablemente de una lámina celular a otra, alcanzando el mayor volumen a nivel del estrato espinoso. Los espacios son menos voluminosos en el estrato granuloso y son más complejos y tortuosos en el estrato germinativo debido a la gran interdigitación entre las células. Las terminaciones basales de los espacios intercelulares a nivel del *stratum germinativum* al-

canzan una separación de 200 Å. Por lo tanto, el espacio intercelular de la epidermis constituye una red continua abierta hacia la dermis. Hacia el medio externo el espacio intercelular está cerrado por las zónula occludentes y este hecho provee la explicación estructural necesaria para la respuesta osmótica asimétrica observada por Mac Robbie y Ussing (1961). Estos autores encontraron que las células de la epidermis aumentan de volumen cuando se pone en contacto el lado interno de la piel con soluciones hipotónicas pero no cuando lo está en la superficie externa. Estos hechos fisiológicos y morfológicos indican que las zónulas occludentes de la epidermis de la piel de rana son impermeables al agua, ciertos iones y pequeñas moléculas solubles en agua. Posteriormente Farquhar y Palade (1963) observaron que estas zónulas son impermeables a macromoléculas (hemoglobina y enzima pancreática).

2- TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE SODIO

Diversas membranas epiteliales (la mucosa intestinal, el epitelio del túbulo renal, la piel de rana entre otras) transportan activamente Na^+ de un lado a otro del epitelio. Se ha visto además que el transporte de diversos aminoácidos y azúcares se haya asociado al transporte activo de Na^+ . Por ello reviste gran importancia dilucidar el mecanismo por el cual se lleva a cabo el transporte transepitelial de este ión.

Una sustancia puede atravesar las membranas epiteliales: a) penetrando a través de la membrana celular de las células epiteliales que da hacia el lado externo, para difundir luego a través del citoplasma y cruzar nuevamente la membrana celular por el lado opuesto de la célula (ruta transcelular) o bien b) migrando a través de compartimientos de transporte especializados, sin mezclarse con el contenido de la misma especie molecular que puede existir en el citoplasma y c) pasando entre las células (ruta paracelular).

A continuación, describiremos los distintos modelos propuestos para el transporte transepitelial de sodio en la piel de rana, cada uno de los cuales corresponde a una de las posibilidades descritas. Comenzaremos con el modelo transcelular propuesto por Koefoed-Johnsen y Ussing en 1958.

a) El modelo de Koefoed-Johnson y Ussing

Cuando se monta la piel abdominal de una rana a manera de diafragma entre dos cámaras que contienen Ringer (Fig I.3), se establece espontáneamente una diferencia de potencial entre el lado de adentro (positivo) y el de afuera (negativo). Fukuda (1942) demostró que el mantenimiento de ese potencial exige la presencia de Na^+ en la solución externa y de K^+ en la interna. Esta dependencia fue investigada en detalle por Koefoed-Johnsen y Ussing (1958) en pieles bañadas con líquidos de Ringers en los que el Cl^-

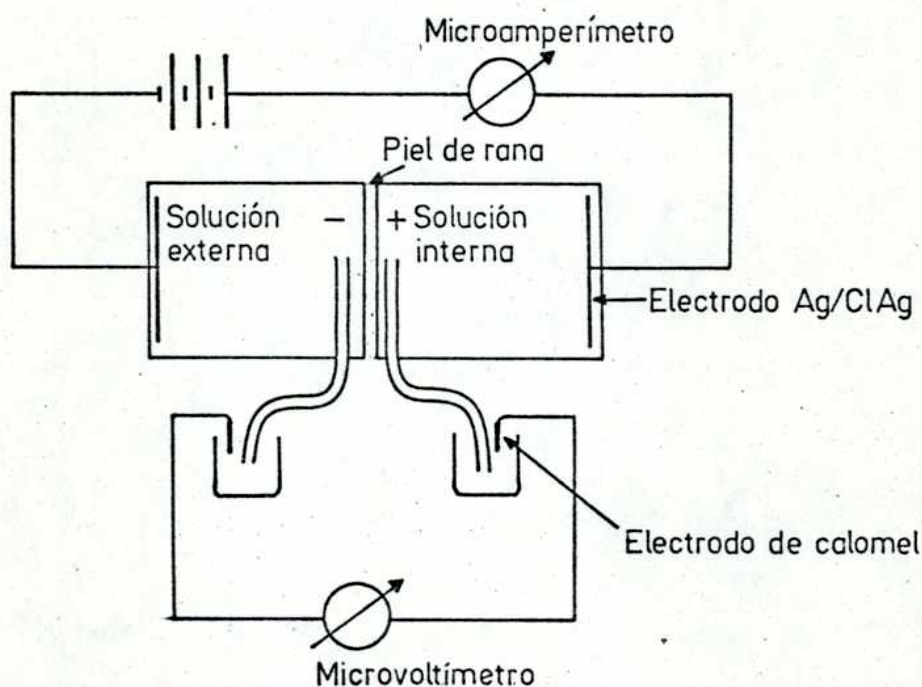


Figura I.3: Dispositivo experimental utilizado para medir la diferencia de potencial eléctrico y la corriente de cortocircuito en epitelio aislado. El epitelio se montó a manera de diafragma entre dos cámaras.

era reemplazado por una cantidad equivalente del anión impermeable SO_4^{2-} . Variando las concentraciones de Na^+ y K^+ en las soluciones externas e internas, demostraron que el potencial se modifica casi en 58 mV por cada cambio de 10 veces en la concentración de Na^+ en la solución externa o de

K^+ en la solución interna. Los cambios de la concentración de K^+ en la solución externa o de Na^+ en la interna no afectan mayormente al potencial eléctrico. El comportamiento de las caras externa e interna de la piel de rana era muy semejante al de los electrodos reversibles de Na^+ y de K^+ , respectivamente. Esto fue tomado como índice de que hay un compartimiento cutáneo limitado del lado de afuera por una barrera selectiva al Na^+ y por adentro que una barrera selectiva al K^+ (Fig. I.4).

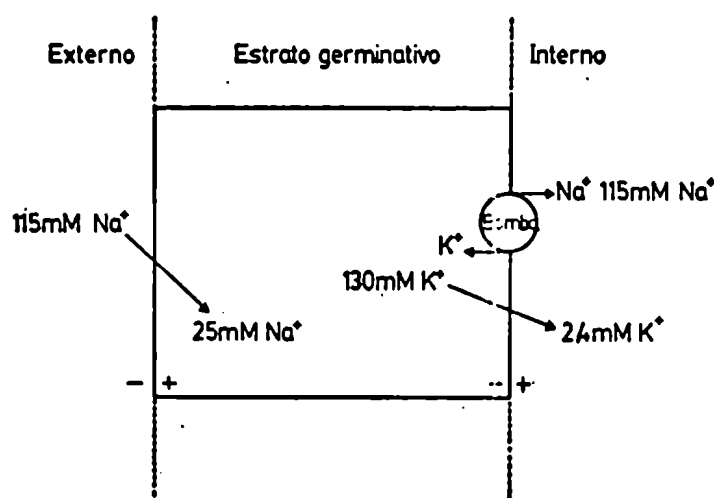


Figura I.4: Esquema del modelo de Koefoed-Johnsen y Ussing. Ver explicación en el texto.

Puesto que Meyer y Bernfeld (1946), y el mismo Ussing (1948) habían sugerido que tanto las propiedades eléctricas como la capacidad de transportar Na^+ reflejaban propiedades de las células del estrato germinativo (la capa más interna de células epiteliales), la barrera interna y la barrera externa del modelo de Koefoed-Johnsen y Ussing fueron identificadas con las caras internas y externas de estas células.

La forma en que el transporte de Na^+ participa en los fenómenos eléctricos fue investigada por Ussing y Zerahn (1951). Un esquema del dispositivo experimental se muestra en la figura I.3. En ella se observa una piel de rana montada entre dos cámaras que contienen idéntico Ringer a ambos lados. Dos

puentes salinos por intermedio de electrodos de calomel conectam las cámaras a un voltímetro de alta impedancia de entrada para medir la diferencia de potencial eléctrico. Dos electrodos de Ag-ClAg y un microamperímetro sirven para pasar y medir una corriente a través de la piel. El "influjo" y "eflujo" de Na^+ fue medido usando dos isótopos radiactivos del Na (Na^{22} y Na^{24}), que se agregan a las soluciones interna y externa, respectivamente. Ussing y Zerahn midieron, tanto la cantidad de corriente que es necesario pasar para anular la diferencia de potencial, como el flujo neto de Na^+ hacia una de las cámaras. Este flujo neto está dado por la diferencia entre el influjo (J_{ei}^{Na}) medido con un isótopo y el eflujo (J_{ie}^{Na}) medido con el otro. Observaron que el primero es mucho mayor que el segundo y que la carga transportada por esta cantidad neta de Na^+ por unidad de tiempo es igual a la corriente eléctrica que se debe pasar para mantener el potencial eléctrico en cero. De modo que el flujo neto de sodio ($J_{\text{neto}}^{\text{Na}} = J_{ei}^{\text{Na}} - J_{ie}^{\text{Na}}$) es igual a la corriente de corto-circuito expresada en moles por hora. Puesto que el uso de soluciones idénticas a ambos lados y la cancelación del potencial eléctrico espontáneo por medio de la corriente pasada asegura que no hay entre las dos soluciones ninguna fuerza operativa, se atribuye el movimiento neto de Na^+ desde la solución externa a la solución interna a un proceso de transporte activo.

La corriente en corto-circuito medirá exactamente el movimiento neto de Na sólo en los casos en que: 1) el único ión transportador de la corriente fuese el Na y 2) se requiere también la asimetría completa de la membrana, o sea: barrera externa impermeable al K^+ y barrera interna impermeable al Na^+ (Ginzburg y Hogg, 1967).

En case a estas observaciones, Koefoed-Johnson y Ussing (1958), propusieron el modelo ilustrado en la figura I.4, que representa una célula del estrato germinativo. Este modelo fue diseñado originalmente para la piel abdominal de la rana, que es una de las preparaciones más comunes para el estudio de la biofísica de las membranas epiteliales.

La barrera externa representada por la membrana externa de la célula es permeable al Na^+ e impermeable al K^+ , y cuando está bañada en Ringer con aniones

impermeables (por ejemplo, SO_4^{2-}), se comporta como un electrodo de Na^+ . La barrera interna, identificada con la membrana interna de las células del estrato germinativo es permeable al K^+ e impermeable al Na^+ , y cuando está bañada por líquidos de Ringer con aniones impermeables, se comporta como un electrodo de K^+ . Esta célula tiene una alta concentración de K^+ (130 mM) y una baja concentración de Na^+ (25 mM) (Zylber, Rotunno y Cereijido, 1973, Rotunno, Zylber y Cereijido, 1973) a causa de una bomba del tipo Na-K localizada en la barrera interna. El intercambio de K^+ por Na^+ mantiene la concentración celular de Na^+ baja, y se establece así un gradiente de concentración de Na^+ a través de la barrera externa (el Ringer rana tiene una concentración de Na de 115 mM). Este gradiente provoca la entrada neta de Na^+ desde la solución externa a la célula. El K^+ acumulado dentro de la célula por la bomba difunde hacia la solución interna pero no hacia la externa, puesto que, como dijimos, la cara externa es impermeable al K^+ . Si bien bajo ciertas condiciones experimentales la bomba puede trabajar electrogenéticamente, en condiciones fisiológicas parece trabajar en forma neutra, es decir, intercambia un Na^+ por un K^+ (Bricker, Biber y Ussing, 1963; Essig, Frazier y Leaf, 1963; Curran y Cereijido, 1965).

El proceso de transporte de Na^+ a través de la piel de rana depende por lo tanto de dos mecanismos básicos: difusión pasiva a través de la barrera externa, seguida de un bombeo activo a través de la barrera interna. Hay que notar que el mecanismo de transporte de iones que la célula usa para mantener su propio balance iónico es el mismo que utiliza para transportar Na^+ a través del epitelio. Esto nos lleva a puntualizar otro requerimiento importante para que la corriente de corto-circuito sea una medida del flujo neto de iones a través del epitelio: la preparación debe estar en estado estacionario.

Cuando el epitelio está bañado por líquidos de Ringer con aniones impermeables, el potencial eléctrico está dado por la suma de un potencial de

difusión de Na a través de la membrana externa y un potencial de difusión de K^+ a través de la membrana interna. El potencial total E equivale entonces a:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \left[\frac{[Na]_e}{[Na]_c} \frac{[K]_c}{[K]_i} \right]$$

donde los subíndices e, c e i se refieren a la solución externa, a la célula y a la solución interna, respectivamente. Los estudios del perfil del potencial eléctrico a través del epitelio, llevados a cabo con microelectrodos, en contraron dos o más saltos de potencial lo que en principio apoyaría la hipótesis descripta, pues el primer salto se atribuye al componente de Na^+ y el segundo al componente de K^+ (Engbaek y Hoshiko, 1957; Frazier, 1962; Whittenbury, 1964; Cereijido y Curran, 1965).

b) Modificación del modelo transcelular

El modelo que acabamos de describir fue la clave para la comprensión del transporte transepitelial de sustancias. Desde su introducción en 1958 hasta el presente ha sido objeto de cambios más o menos importantes para adaptarlo a los nuevos hechos experimentales que se fueron obteniendo. La denominación de transcelular se refiere a que según estos modelos el Na^+ atraviesa el epitelio por una ruta que pasa por el citoplasma de las células epiteliales. A continuación describiremos el punto de vista actual de los modelos transcelulares. El flujo neto de sodio a través del epitelio es función de la concentración de Na en la solución externa (Kirschner, 1955; Morel 1958; Cereijido, Herrera, Flanigan y Curran, 1964; Frazier y Leaf, 1964). A medida que la concentración aumenta, el flujo neto se hace mayor hasta que alcanza un máximo. La figura I.6 ilustra un experimento llevado a cabo por Kidder y col. (1964) en la piel de rana, que demuestra que un aumento instantáneo de la concentración de Na desde 1.4 mM hasta 47 mM produce un aumento del potencial eléctrico, que llega a un nuevo valor estable en menos de 600 milisegundos. Si en vez de estudiar el potencial se estudia la corriente en corto-circuito, se observa también un transitorio semejante (Cereijido y col. 1974). El retardo en alcanzar el nuevo potencial o la nueva corriente se debe al tiempo que tarda el Na en alcanzar la nueva concentración (47 mM) a nivel de la barrera sensible al Na^+ . Usando una ecuación de difusión se calculó que la distancia entre la solución per-

fectamente mezclada y la barrera que se comporta como un electrodo de sodio es de unos 25 μm . Puesto que la mayor parte de estos 25 μm están dados por la

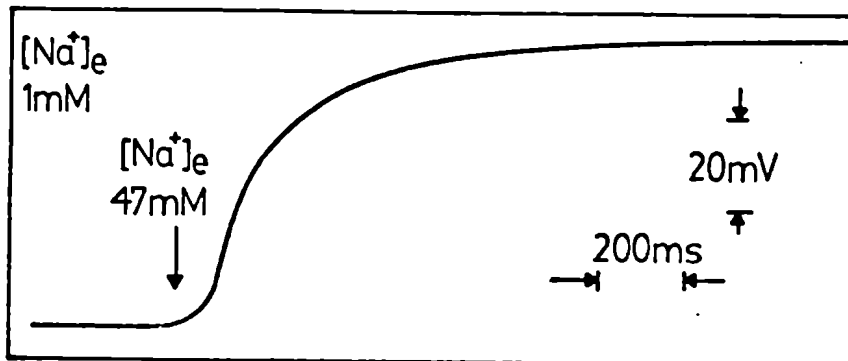


Figura I.5: Cambio transitorio del potencial de la piel debido al brusco aumento de la Na del Ringer que baña la cara externa del epitelio (redibujado de Kidder y col., 1964).

capa de agua no mezclada que baña la cara externa de la piel, se concluyó que la barrera sensible al Na^+ coincide con el borde anatómico externo del epitelio (Dainty y House, 1966). Esta información, junto con la observación de Curran y Cereijido (1965) de que cuando se agrega K a la solución interna todo el K de la piel de rana se intercambia con K con aparentemente una sola constante de velocidad, sugirió que la barrera externa del modelo de Koefoed-Johnsen y Ussing (que como recordamos, era Na -sensible y K -impermeable) no podía estar localizada en la cara externa de las células del estrato germinativo, sino en el borde anatómico externo del epitelio. De esta manera, los modelos transcelulares (Ussing y Windhager, 1964; Farquhar y Palade, 1966 (Fig. I.6) no confinan el compartimiento de transporte que viéramos en la figura I.5 a las células del estrato germinativo y hacen formar parte de él a todas las células del epitelio. Estos modelos tienen tres características principales: 1) el Na^+ entra en las células difundiendo a favor de un gradiente de concentración a nivel del borde anatómico externo del epitelio; 2) desde allí y gracias a las uniones de alta conductividad que posee el tejido, pasa del citoplasma de una célula al de la otra,

de modo que estas forman un único compartimiento de sodio; 3) el paso activo del transporte neto de Na^+ está localizado a nivel de todos los bordes celulares que miran hacia el interespacio. Puesto que este interespacio se halla cerrado hacia fuera por las zónulas ocludentes, pero está abierto hacia dentro, el Na^+ bombeado hacia él, sólo puede difundir hacia la solución interna.

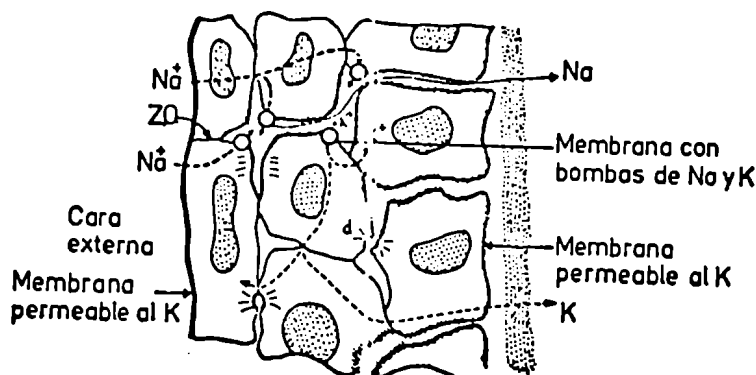


Figura I.6: Esquema del modelo transcelular modificado. ZO: zonulas ocludentes, d: desmosoma. Ver explicación en el texto.

Estos modelos identifican por lo tanto la barrera externa con el borde anatómico exterior, y la barrera interna con todos los bordes celulares en contacto con el interespacio. Los modelos transcelulares llevaron a una investigación del perfil del potencial eléctrico, encontrándose que consta de tres o más saltos de potencial atribuible cada uno de ellos a la contribución de una capa celular al potencial total (Biber y col., 1966; Rawlins y col.1970).

c) Modelos con compartimiento de transporte especializado

Como se dijo anteriormente, la técnica de montar las membranas epiteliales con Ringer idéntico a ambos lados y con la diferencia de potencial eléctrica entre ambas soluciones abolido mediante el pasaje de una corriente de cortocircuito es una forma de anular cualquier gradiente de potencial electroquímico.

mico, de modo que la existencia de un flujo neto en estas condiciones puede ser atribuido a transporte activo.

Los modelos transcelulares descriptos, o con alguna modificación, son aptos para explicar el funcionamiento de un gran número de epitelios (especialmente aquellos que trabajan entre dos soluciones de composición parecida o en los que la diferencia de potencial eléctrico entre ambas está muy disminuido por la presencia de rutas pasivas a través de las zónulas ocluyentes que lo cortocircuitan, ej.: epitelio del túbulo renal).

Sin embargo, estos modelos no explican, ni tampoco son concordantes con ciertos fenómenos que presenta el transporte de Na^+ a través de la piel de rana. Las ranas pueden tomar del medio acuático en que viven una cantidad neta de Na^+ , aún cuando el medio posea una concentración muy inferior a la de las células. Krogh (1938) ha demostrado que la piel de rana es capaz de tomar NaCl de soluciones tan diluidas como un cien milésimo molar. Según los modelos transcelulares, el Na^+ debe entrar al compartimiento celular a favor de un gradiente; o sea que la concentración celular debería ser aún más baja que el del agua de la laguna; y sin embargo se demostró recientemente (Aceves y Erluj, 1971; Zylber y col. 1973; Rotunno y col. 1973) que el epitelio tiene una concentración de Na que oscila entre los 15 a 30 mM. Para explicar este fenómeno se sugirieron las siguientes posibilidades: la existencia de un paso activo a nivel de la barrera externa (Biber y Curran, 1970; Cuthbert, 1972); que la actividad química del sodio celular fuese muy baja (o sea que los coeficientes fuesen significativamente inferiores a la unidad). Una de las causas que podría explicar la baja actividad química del sodio celular podría ser la complejación del Na^+ con polielectrolitos intracelulares, siguiendo esta idea, Rotunno, Kowalewski y Cereijido, 1967) demostraron que el espectro de resonancia magnética nuclear que da el sodio contenido en la piel de rana es distinto del que da cuando se encuentra ionizado en solución libre.

Sin embargo, esto no representa una prueba inequívoca, puesto que el espectro se halla afectado por otras causas además.

Otra posibilidad de explicar la penetración de Na^+ en forma pasiva desde una solución externa de concentración mucho menor a la del epitelio podría ser que el Na no esté distribuido en un único compartimiento uniforme, sino que haya dentro del epitelio algún compartimiento de transporte (CTNa) con una concentración muy baja. De esta manera, aunque la concentración promedio fuera más alta que en el baño externo, el Na podría entrar pasivamente en el CTNa. Cereijido y Rotunno (1967 y 1968) demostraron que en realidad, el Na^+ epitelial está compartimentalizado y que en su mayor parte no interviene en el proceso de transporte transepitelial. Es decir, la ruta del transporte de Na^+ no pasa por el citoplasma de todas las células epiteliales, como lo sugiere la figura 2-7. Realmente la cantidad de Na contenida en el CTNa es tan poca que resulta ser una pequeñísima fracción de todo el Na en el epitelio (Zerahn, 1969, Moreno y col., 1973, Cereijido y Col., 1974). Vouite y Ussing (1970) observaron que cuando la piel de rana transporta Na, la capa más externa de células epiteliales funcionantes (estrato granuloso) aumenta de espesor. Atribuyeron este hecho a que el Na penetra y atrae por ósmosis cierta cantidad de agua que hincha las células de este estrato. Sostuvieron entonces que la cantidad de sodio bombeado por estas células al interespacio es mucho mayor que la que difunde a través de los contactos celulares a las capas más profundas, las cuales, por esta razón no se hinchan. Las capas internas desempeñarían así un papel muy pequeño en el transporte epitelial. El estrato granuloso sería entonces el verdadero compartimiento de transporte de sodio, y como representa una pequeña fracción de todo el epitelio, la mayor parte del sodio epitelial -contenido en otras células- no participaría. Pero, debe advertirse que estas observaciones fueron hechas con una alta concentración de Na^+ en el lado externo y en condiciones de cortocircuito, es decir, dos factores que podrían forzar artificialmente la penetración pasiva de Na dentro de las células y su ulterior bombeo, aún cuando no fuera, éste, el mecanismo fisiológico. Por otra parte, el perfil del potencial eléctrico estudiado a través de todo el epitelio por medio de microelectrodos tiende a indicar que el transporte de sodio provoca manifestaciones eléctricas en todas las célu-

las y no solamente en las de la capa más externa.

Otra crítica que suelen recibir los modelos transcelulares está basada en el hecho de que agregando cantidades progresivamente mayores de inhibidores metabólicos al medio (dinitrofenol, cianuro, etc.), se puede llegar a una concentración de inhibidor que frena el transporte transepitelial sin afectar mayormente el balance iónico de las células; hecho harto difícil de explicar mediante modelos de bombas que eliminan Na^+ citoplasmático sin distinguir si éste viene o no de la solución externa.

Los estudios de Bentley (1968) sobre el comportamiento de la vejiga urinaria del sapo frente a la anfotericina B y la hormona antidiurética, sugieren la existencia de un compartimiento de transporte. (Cuthbert, 1973), utilizó amilorida marcada con carbono-14 radiactivo para hacer una estimación del número de sitios de la barrera externa por donde penetraría el Na^+ .

d) Modelo con rutas extracitoplasmáticas

Para evitar las críticas hechas a los modelos transcelulares, Cereijido y Rotunno (1968) propusieron un modelo en el cual los movimientos de Na transepitelial no pasan por el citoplasma celular. La figura I.7 esquematiza la idea básica de ese modelo. Vemos una célula en la cual, por razones de claridad, el componente lipídico de la membrana se ha representado muy agrandado y fuera de escala. La solubilidad del Na^+ en lípidos es tan baja que, en principio, sería más fácil para un Na^+ llegar al otro lado de la célula migrando de grupo polar en grupo polar, que atravesar las barreras hidrofóbicas (Cereijido y Fraidenraich, 1970). Como se mencionó anteriormente, el potencial eléctrico transepitelial es insensible a los cambios de concentración de Na en la solución interna. El presente modelo atribuye esta insensibilidad a la presencia de una barrera hipotética similar a la barrera interna del modelo de la Fig. I.6, que separaría grupos polares de los lípidos de la solución interna. Por lo tanto, los grupos polares de la mitad externa de la membrana plasmática estarían comprendidos entre dos barreras de baja permeabilidad al Na la

barrera hidrofóbica de los lípidos (barrera 1) y la barrera que confiere a la membrana interna de las células epiteliales su baja sensibilidad y la permeabilidad al Na (barrera 2). Esta segunda barrera no existe a nivel del borde externo puesto que, como dijimos anteriormente, las membranas epite-

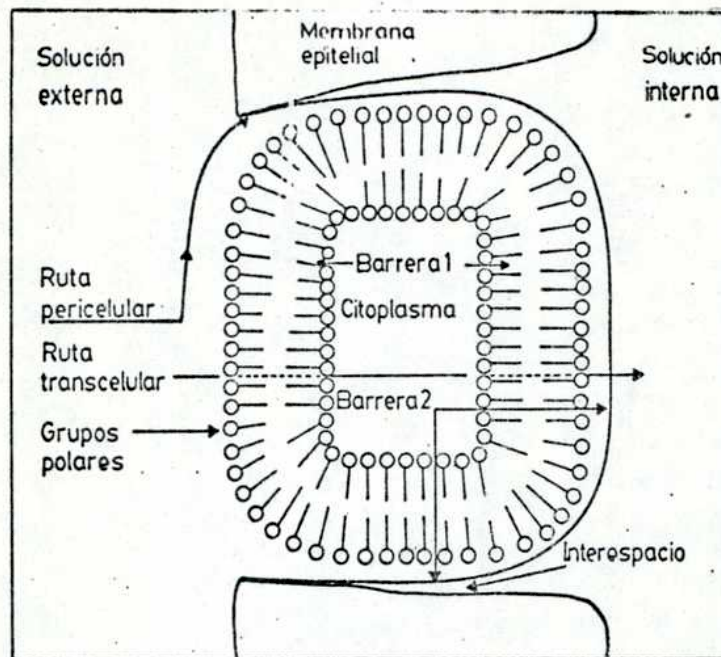


Figura 1.7: Esquema de una célula epitelial en la que el componente lipídico se ha dispuesto en la forma propuesta por Dawson y Danielli y se ha representado en una escala mucho mayor. Ver explicación en el texto. Tomado de Cerejido y Rotunno, 1971).

liales son sensibles a los cambios de la concentración de Na en la solución externa. Esto significa que sólo a nivel de la cara externa el Na puede entrar o salir del pequeñísimo compartimiento de Na (CTNa) constituido por los grupos polares entre las dos barreras. Las bombas localizadas a lo largo de los bordes internos que miran hacia el interespacio traslocan iones Na desde este CTNa hacia el interespacio a través de la barrera 2. A causa de las zónulas ocluyentes el Na bombeado hacia el interespacio sólo puede difundir hacia la solución interna. El grupo polar que estaba unido al Na que fue bombeado queda -entonces- libre, y está vacante no puede ser

llenada fácilmente por el Na celular ni por el Na en el interespacio (por la barrera 2), de modo que sólo es llenada cuando el Na^+ unido a un grupo polar vecino salta a ella. La absorción de un Na de la solución externa se produce siempre que haya sitios vacantes y no depende de que la concentración intracelular sea mucho más baja que la del baño exterior, ni de que el potencial eléctrico dentro de la célula sea positivo con respecto al baño (es decir, se oponga a la penetración de Na desde el baño).

Según este modelo, el Na^+ transportado a través de todo el epitelio no se mezcla con el Na del citoplasma celular. El CTNa se limita al Na^+ unido a los grupos polares de las membranas celulares de las células epiteliales, lo que está de acuerdo con los análisis compartamentales que indican que el CTNa contiene una fracción ínfima de todo el Na en el epitelio (Zerahn, 1969; Moreno y col, 1973).

En base al comportamiento de la piel de rana frente a la hormona antidiurética (HAD) (Huf y col., 1957; Fuhrman y Ussing, 1951; Herrera y Curran, 1963) Cereijido y Rotunno (1971), idearon experiencias que apoyan al modelo de la Fig. I.7 y manifiestan fenómenos difíciles de ser descriptos según el modelo de la figura I.6.

Otro argumento que arroja dudas sobre las rutas transcelulares y que apoya en cambio el pasaje de Na por rutas que evitan el citoplasma, surge del experimento que se describe a continuación (Cereijido y col, 1974): Cuando la concentración de Na en la solución externa se eleva instantáneamente de 1 a 50 mM, la corriente de cortocircuito (I) aumenta lo cual indica un aumento

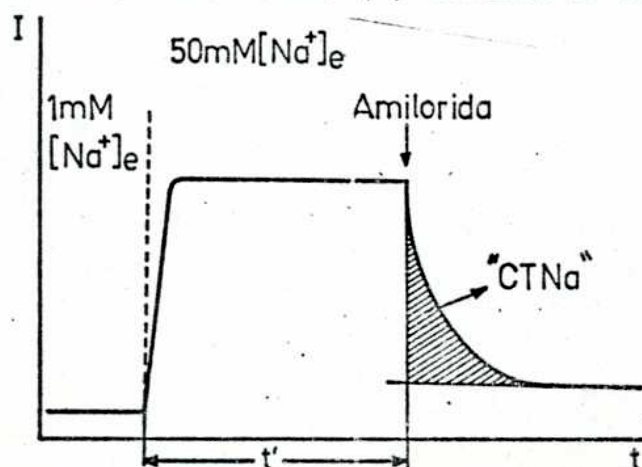


Figura I.8: Esquema de la experiencia de Cereijido et al (1974).
Ver explicación en el texto.

del transporte de Na (Fig. I.8). Después de un cierto tiempo (t') que la corriente ha estado en este nuevo valor, el agregado de amilorida ($10^{-4}M$) produce una caída exponencial de la corriente. El área debajo de esta curva (Fig. I.8), sombreado) representa cierta cantidad de Na, que generalmente se tomaba como expresión del compartimiento de transporte de Na (CTNa) implicado en el transporte transepitelial. Los autores mencionados encontraron que si bien I aumenta instantáneamente a un nivel estable, el CTNa es una función mucho más lenta del tiempo de exposición a 50 mM Na. La cantidad de Na transportado expresado por I no es función entonces de la cantidad de Na en el supuesto compartimiento de transporte. El Na en ese "CTNa" representaría cierta cantidad de Na fuera de la ruta principal del transporte transepitelial. Como hay razones para pensar que el CTNa está contenido en el citoplasma celular (Cereijido y col., 1974) se llegaría a la conclusión de que el Na del citoplasma no está intercalado en la ruta de transporte de Na y que ésta es principalmente paracelular. La suposición de que el Na puede seguir la ruta que acabamos de describir no descarta que una fracción del Na penetre realmente en el epitelio y siga una ruta transcelular como la indicada en las figuras I.6 y I.7.

Este modelo propone que la diferencia de potencial eléctrico entre ambos lados del epitelio es producida por el bombeo activo de sodio. Es decir, que a consecuencia de la traslocación activa de este ión, se genera una diferencia de potencial, tanto mayor cuanto más sodio se bombea y cuanto menor es la permeabilidad al Cl.

●) Ruta Pasiva

El hecho de que epitelios como la piel de rana y el túbulo presenten un transporte activo de Na^+ no significa que sea sólo este ión el que tenga un flujo neto. Si así ocurriera, se acumularían cargas positivas en la solución interna (y negativas en la externa), las cuales daría origen a un enorme potencial eléctrico (negativo en la solución externa y positivo en la solución interna) que frenaría el pasaje de Na^+ .

En general, se observa que si bien el Na^+ es transportado en forma neta

por un proceso activo que opera directamente sobre este ión, el potencial eléctrico establecido por ese proceso hace que penetre una cantidad neta de ión Cl^- . En resumen: el transporte activo de Na^+ provoca un pasaje neto de Na^+ y de Cl^- . El transporte neto del ión pasivo Cl^- solamente desaparece cuando abolimos el potencial eléctrico espontáneo de la membrana epitelial por medio de una corriente en corto-circuito (Fig. I.3). Puesto que en condiciones fisiológicas los epitelios no están "cortocircuitados" por una corriente aplicada externamente como en el caso de la Fig. II-4, el transporte activo de Na siempre da origen a la penetración de un anión en la misma dirección (por ejemplo, el Cl^-) o de un catión en la dirección opuesta (por ejemplo, el H^+ o el NH_4^+) (García Romeu, 1971; García Romeu y Salibián, 1968; y García Romeu, Salibián y Pezzani, Hernández, 1969). Si esos iones no fueran permeables, el movimiento de Na^+ se frenaría. Resulta entonces que el transporte de Na^+ está condicionado al movimiento pasivo de otros iones. Veremos entonces por donde pasan y qué características tienen los movimientos pasivos.

Al comienzo del capítulo, dijimos que los espacios intercelulares están limitados hacia fuera por las zónulas ocludentes (Fig. I.3) y que esta particularidad anatómica constituye un serio obstáculo para la difusión de sustancias entre la solución externa y el interespacio. Esto no significa que el pasaje de sustancias a nivel de las zónulas ocludentes sea nulo. Hay epitelios en los que estas uniones son atravesadas con relativa facilidad por sustancias de molécula pequeña (Barry y col., 1971; Boulpaep, 1971), y otros epitelios en que el movimiento de estas sustancias no es espontáneo pero se puede provocar (es decir, abrir la zónula ocludente) mediante el uso de soluciones externas hipertónicas (Ussing y Windhager, 1964; Ussing, 1965; Erlj y Martínez Palomo, 1972; Mandel y Curran, 1972 y 1973), Frömter y Diamond (1972) midieron, en el epitelio de la vesícula biliar del Necturus, la resistencia eléctrica entre ambos lados de la membrana epitelial (R_s) y también la resistencia de la cara externa (R_e) y la cara interna (R_i) de las células epiteliales con tres electrodos: un electrodo convencional en cada

solución y un microelectrodo introducido en el citoplasma celular. Ellos hallaron que la resistencia total entre las dos soluciones (R_s) era de 307 ohms-cm² y la resistencia R_e de 4.170 y R_i : 2.700 ohm-cm². La resistencia total para la ruta transcelular es entonces $4.170+2.700; 6.800$ ohm-cm²; o sea 22 veces mayor que la resistencia total del epitelio (307 ohm-cm²). Esto significa que el 95% de la conductancia transepitelial se debe a una ruta que no pasa a través del citoplasma celular, lo cual señala de por sí al espacio intercelular como una posible ruta de alta conductividad. Ver Fig. I.9.

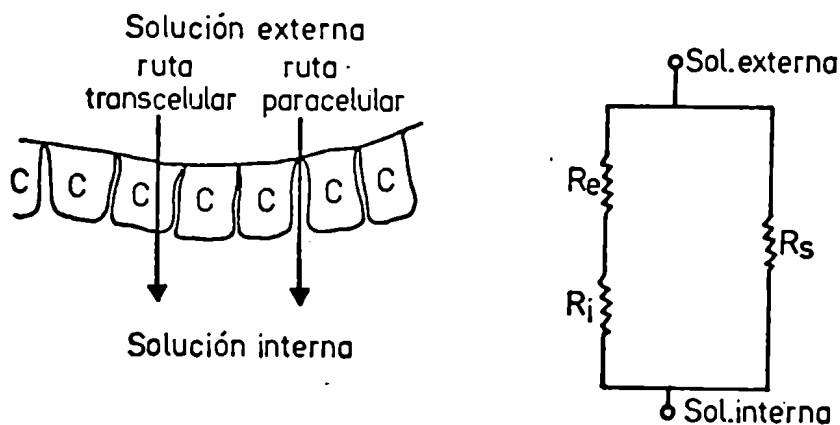


Figura I.9: Esquema y circuito equivalente para interpretar el transporte a través de una ruta pasiva. Ver explicación en el texto.

Frömter y Diamond, en un segundo experimento identificaron en forma más manifiesta aún, a las rutas de alta conductividad con las zónulas ocluyentes. Moreno y Diamond (1974) hicieron un estudio exhaustivo de la ruta pasiva paracelular de la vesícula biliar y determinaron que se trata de un corto trayecto ($\sim 100\text{Å}$) revestido de grupos hidrofílicos, los cuales, por el hecho de poseer carga neta o por tratarse de dipolos orientados, dan a su luz una carga positiva que facilita el pasaje de aniones y dificulta en cambio el pasaje de cationes.

El epitelio de la vesícula biliar, al que corresponden los datos que aca-

bamos de describir, pertenece al grupo de epitelios de alta conductividad paracelular. La piel de rana es en cambio un epitelio en que la ruta pasiva paracelular es mucho menos permeable, sin embargo, esta permeabilidad aumenta cuando la piel se despolariza mediante una corriente en corto-circuito que hace su potencial interno 100 mV negativo con respecto al lado externo (Mandel y Curran, 1972). Estudios llevados a cabo por Von Petery y Col. (1974) han demostrado que la piel de rana posee una ruta que deja pasar Cl^- y Br^- (pero no I^- y F^-) y que sólo se abre en presencia de Na^+ o Li^+ (pero no Rb^+ , K^+ y Cs^+). Resulta interesante entonces que en condiciones fisiológicas, es decir, sin corriente de corto circuito, el movimiento de Na^+ depende del pasaje de Cl^- , pero que a su vez este anión pueda pasar siempre y cuando el Na^+ le abra su ruta.

f) Modelos más recientes

En los tres últimos años se han realizado una serie de experiencias que tienden a aclarar definitivamente el proceso de transporte de Na^+ a través del epitelio abdominal de la rana.

Ferreira, Ferreira y Lew (1976) encontraron que la actividad de la ATP-asa-ouabaina-sensible es usualmente mucho mayor que la requerida para el transporte de Na^+ , lo cual se ajustaría a un modelo de transporte que supone la participación activa de una fracción de las células epiteliales y no todo el epitelio.

Lahav, Essig y Roy Caplan (1976) hallaron-usando la termodinámica de los procesos irreversibles-que el grado de acoplamiento entre el transporte de Na^+ y los procesos metabólicos es de 0.78-0.79., lo cual indicaría que el transporte de sodio está incompletamente acoplado a los procesos metabólicos aún cuando el pasaje pasivo de sodio es tomado en consideración.

Cuthbert (1974), Cuthbert y Shum, (1974, 1976, a,b,) estudiando la forma de inhibición del transporte de sodio por efecto del amilorida, pudieron probar que el sodio penetra en la piel a través de sitios específicos. Establecieron que en Rana temporaria hay de 200 a 300 sitios/ μm^2 y que en pieles de ranas desprovistas de Na^+ , o tratadas con aldosterona, mostraban

un aumento en la densidad de sitios que era proporcional al aumento de la corriente en corto-circuito. Este hecho, junto a otros datos adicionales sugieren que nuevos sitios de entrada se generan bajo estas condiciones. Ellos observaron que cuando una corriente eléctrica es pasada a través de la piel ocurren cambios inmediatos en el número de sitios que son amilorida-sensibles; la despolarización determina un aumento en el número de sitios. Los cambios concomitantes en la corriente amilorida-sensible sugieren que el flujo de sodio a través de los sitios de entrada es voltaje-dependiente. La hormona antidiurética no tiene efecto sobre la densidad de los sitios, pero aumenta la corriente de sodio. Ellos concluyeron que: este hecho y otros adicionales sugieren que la hormona aumenta el recambio a nivel de cada sitio mediante el aumento de la fracción de conducción del sitio a cada instante.

W. Nagel(1975,1976), perfeccionando la técnica de medición con microelectrodos encontró que los saltos de potencial a través del epitelio abdominal de la rana informados previamente(Engbaek y Hoshiko, 1957; Ussing y Windhager,1964; Whittembury, 1964; Coreijido y Curran;1965; Biber, Chez y Curran, 1966; Biber y Curran, 1970; Hviid Larsen, 1973) que se ajustaban a la teoría de Koefoed-Johnsen y Ussing(1958), puesto que aparecían como dos saltos de potencial positivos; serían incorrectos, ya que correspondían -probablemente- a mediciones a través de células más o menos dañadas.

Este autor encontró la presencia de un salto de potencial negativo a nivel de la barrera externa, que aparece aún cuando la piel está bañada en su cara exterior con Ringer ClNa 110 mM, y uno positivo a nivel de la interna. Por otro lado halló un salto de diferencia de potencial de -100mV en condiciones de corto-circuito (en las mediciones anteriores en iguales condiciones se informó -20mV).

Los datos de Nagel fueron posteriormente corroborados por Helman y Fisher, (1976). Nagel(1977) explica estas discrepancias diciendo (1977): "las observaciones de perfiles de potencial y respuesta a los cambios de composición electrolítica previamente apreciados pueden fácilmente ser explicados, ya que

la barrera de mayor resistencia del epitelio está localizada en la superficie exterior, y la membrana basolateral puede ser dañada primariamente después de un empalamiento inadecuado, consecuentemente el micro-electrodo registrará potenciales que, en general, serán orientados por el potencial trans epitelial, y los cambios observados serán en función del mismo, dejando de lado el comportamiento real del potencial trans membranal. Una orientación y comportamiento similares de los potenciales de microelectrodos se observaría si la punta del mismo es colocada en los espacios intercelulares. La figura I.10 (tomada del trabajo de Nagel, 1977) esquematiza las diferencias entre los datos previamente informados y los obtenidos cuidando de no dañar las células.

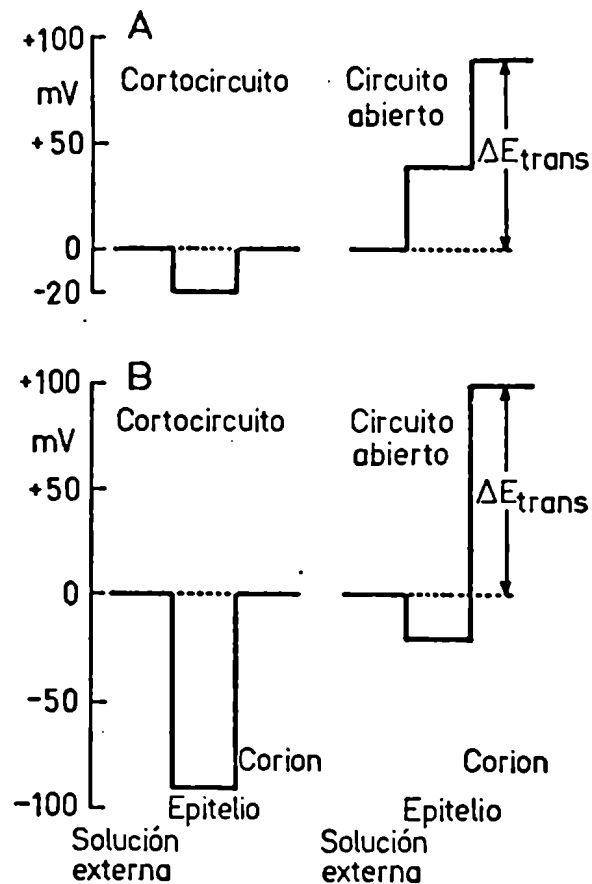


Figura I.10: Presentación esquemática de los perfiles de potencial de la piel de rana. A: valores obtenidos previamente (Engbaek y Hoshiko, 1957; Ussing y Windhager, 1964; Whittembury, 1964; Cereijido y Curran, 1965; Biber, //

Chez y Curran, 1966; Biber y Curran, 1970; Huid Larsen, 1973). B: Observaciones recientes (Nagel, 1976; Helman y Fisher, 1976). Las diferencias de potencial son referidas a la solución que baña al epitelio. Esquema redibujado del trabajo de Nagel, (1977).

En estudios posteriores (1977) Nagel encontró que: la dependencia de las diferencias de potencial a través de la membrana con la Na \circ de la solución que baña la cara externa de la piel, está semilogarítmicamente relacionada. O sea que al graficar el potencial transmembrana vs. el log.

$[Na] \circ$ se obtiene una recta cuya pendiente es 28.4 ± 1.8 mV/ de cada.

$[Na] \circ$. Al graficar las diferencias de potencial a través de las membranas externa e interna de la piel versus el log $[Na] \circ$, obtuvo rectas cuyas pendientes respectivas son: 33.4 ± 1.8 y 4.8 ± 1.5 mV/ de cada $[Na] \circ$.

Todos los datos corresponden a la condición de circuito abierto. El potencial intracelular bajo condiciones de cortocircuito es función lineal del log $[Na] \circ$, con una pendiente de 33.3 ± 3.4 mV/dec. $[Na] \circ$.

Estos resultados no son concordantes con la hipótesis de Koefoed-Johnsen y Ussing (ya que los valores de las pendientes distan notoriamente del 59 mV/dec $[Na] \circ$ teórico). Tampoco la polaridad del electrodo de Na postulado por el borde externo pudo ser obtenida. Nagel sugiere la presencia de una corriente de recirculación a través de caminos paralelos para explicar—por lo menos en parte— la desviación descripta. Bajo todas las condiciones encontró que la incorporación de sodio ocurre a través de un gradiente energético, y que deben ser sugeridos cambios en la permeabilidad de la barrera externa para explicar la dependencia del transporte neto de Na como función de la concentración del catión en el Ringer que baña la cara externa.

Por otro lado, Nagel descarta —a partir de sus datos— la posibilidad que compartimientos—intermembrana sean los responsables del transporte transepitelial del Na, como fue propuesto por Cerejido y Rotunno (1968), ya que

los potenciales que midió correspondían a los citoplasmas de las células respectivas. Concluye que la distribución del Na en todo el epitelio después de su entrada a través del borde externo sería posible a través de las uniones intercelulares, y que todas las capas celulares participarían en la extrusión activa del Na hacia el corium. Ya que la actividad ATP-ásica del epitelio de la piel de rana excede a la cantidad necesaria para el transporte transepitelial neto (Ferreira, Ferreira, y Lew, 1976), se sugiere que en condiciones normales solamente una fracción de las bombas de Na en la membrana basolateral transporta realmente.

Trabajos recientes han sido realizados con el propósito de obtener propiedades y datos que permitan conocer el mecanismo de entrada de Na a la piel a través de la barrera externa sensible a su paso.

Analizando las fluctuaciones de la corriente de Na, Van Driessche y Lindemann (1976), Lindemann y Van Driessche (1977) llegaron a la conclusión que el Na entraría a la piel mediante un proceso de difusión a través de canales. En el rango de voltajes fisiológicos, entre V_r y $0mV$ (V_r : potencial de reversión es el voltage en el cual: $I_{Na}=0$; donde $I_{Na}=I_{total}-I_{amilorida-insensible}$) la corriente a través de la membrana Na-selectiva de la piel de rana varía con la diferencia de potencial según lo predice la ecuación de campo constante (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949). Esta ecuación fue deducida para el caso de una electrodifusión en estado estacionario a través de canales homogéneos en los cuales hay una caída de potencial uniforme. Ellos llegaron a la conclusión que en la piel de rana no hallaron indicios para suponer un mecanismo de transporte de Na que requiera suposiciones más complicadas que las expuestas, aunque no descartan la posibilidad que en vez de canales hayan sitios sensibles en los cuales se encuentren vehículos transportadores del Na, en este caso la ecuación de Goldman, Hodgkin y Katz también se cumplirán. Existen pruebas como para suponer la existencia de tales vehículos, como ser el fenómeno de saturación de la incorporación de Na a través de la barrera externa, pero por otro lado, el mismo puede explicarse a través de un proceso de electrodifusión a través de poros estrechos (Heckmann et al, 1972).

3- TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE CLORURO

Se conoce la existencia del transporte activo de cloruro en una vasta serie de epitelios: en el túbulo ascendente del asa de Henle en los nefrones de los mamíferos (Burg y Green, 1973), la mucosa gástrica (Hogben, 1959), la córnea (Candia, 1973), la vejiga del sapo (Finn, Handler y Orloff, 1967); y "ya no quedan dudas de la presencia del mismo en el epitelio abdominal de la rana" (Lote, 1976).

En 1937, Krogh había demostrado que las ranas eran capaces de absorber una cantidad neta de Cl^- de soluciones tan diluidas como 10^{-5}M , este resultado fue corroborado posteriormente por Jorgensen, Levi y Zerahn (1954), Martín, (1964), y Martín y Curran (1966). Este movimiento de Cl^- que se realiza en forma neta y en contra de un gradiente de potencial electroquímico es mucho menor que el transporte neto de Na^+ (a 115 mM Na^+) y sólo detectable en condiciones en que el movimiento de Na^+ es experimentalmente disminuído.

En 1949, Ussing demostró que los movimientos de Cl^- en la piel de rana son los que corresponderían por el efecto del gradiente electroquímico existente entre las caras externa e interna, esto implica que los movimientos de Cl^- a través de la piel serían pasivos. El hecho que al montar la piel de rana entre dos soluciones iguales anulando el potencial eléctrico espontáneo por medio de una corriente en corto-circuito, se tenga un flujo neto de cloruro igual a cero (o sea que el influjo de cloruro es igual a su eflujo) es una prueba más que el pasaje de cloruro a través de la piel se da en forma pasiva (Ussing y Zerahn, 1951; Koefoed-Johnsen, Levi, Ussing, 1952; Koefoed-Johnsen, Ussing y Zerahn, 1952).

En 1972, Mandel y Curran estudiando la relación entre el movimiento de ^{14}C -urea, el $^{36}\text{Cl}^-$ y el potencial eléctrico a través de la piel, llegaron a la conclusión de que dicho flujo pasivo de Cl^- se hace a través de un camino extracelular, probablemente a través de las zónulas occludentes.

Al estudiarse la piel de la rana sudamericana Leptodactylus ocellatus, se observó que presentaba algunas propiedades notables con respecto al pasaje de Cl^- . Zadunaisky y Candia (1962) encontraron una diferencia importante (del

orden del 25%) entre el flujo neto de Na^+ ($J_{\text{neto}}^{\text{Na}} = J_{\text{in.}}^{\text{Na}} - J_{\text{ex}}^{\text{Na}}$) y la corriente en corto-circuito en dicha piel. Esta discrepancia sólo se notaba en pieles bañadas con el anión Cl^- , cuando el mismo se reemplazaba por SO_4^{2-} se observaba la equivalencia entre el $J_{\text{neto}}^{\text{Na}}$ y la corriente en corto-circuito. En trabajos posteriores, Zadunaisky, Candia y Chiarandini (1963); Zadunaisky y Fisch (1964), Fischbarg, Zadunaisky y Fisch (1967) demostraron que la piel de Leptodactylus ocellatus posee un transporte activo de Cl^- hacia adentro, que en ciertas épocas del año puede alcanzar a ser un 30% del $J_{\text{neto}}^{\text{Na}}$. García Romeu (1971) hizo notar que las condiciones experimentales "in vitro" que usan una concentración exterior de 115 mM-Na (concentración que es cientos de veces superior a las que suele tener en condiciones fisiológicas) puede dañar seriamente al mecanismo de transporte de Cl^- , y que esta puede ser la causa que impide verlo en las preparaciones "in vitro". En 1972, Kristensen encontró la presencia de un transporte activo de cloruro en Rana temporaria, cuando la piel se hallaba bañada con Ringer de baja concentración del anión. (La presencia de transporte activo de cloruro bajo estas condiciones en Rana pipiens y Rana esculenta fue informado por Martin y Curran (1966) como ya hemos mencionado anteriormente). En 1975, Schneider observó la presencia de un transporte activo de cloruro en epitelios aislados de Rana esculenta bañados con soluciones Ringer con concentraciones de cloruro superiores a los 90 mM. Lote en 1976, informó que en epitelios aislados de Rana temporaria (bañados con soluciones Ringer normales, de 11 mM-ClNa) no encontró una discrepancia estadísticamente significativa entre el influjo y el eflujo de cloruro a través del epitelio, en la cual el influjo era siempre mayor que el eflujo, bajo condiciones de corto-circuito; mientras sus diferencias de potencial se hallaban entre los 20-92 mV. Sin embargo, en pieles que presentaban un bajo potencial (menor a 50 mV) el influjo de cloruro era significativamente mayor que el eflujo ($p < 0.05$). Se sabe (Burg y col., 1973) que la furosemida inhibe el transporte activo de cloruro en el túbulo ascendente de los nefrones de los mamíferos. Cuando pieles de bajo potencial eléctrico se tratan con furosemida se observa una disminución inmediata en el influjo de cloruro, de manera que el mismo se iguala al eflujo (Lote, 1976).

Kristensen (1972) y Schneider (1975) sugieren, en base a los datos de sus observaciones que las bombas de cloruro estarían localizadas en la primer capa de cé-

lulas vivas del lado externo. La rapidez con que el influjo neto de cloruro es reducido por la furosemida (Lote, 1976) parecería sustentar esta hipótesis. Sin embargo, si ésta fuese la situación, señala Lote en su trabajo, sería imposible la presencia de una barrera de permeabilidad efectiva entre la bomba y la solución que baña la cara externa. Una alternativa sería que la bomba estuviese localizada sobre la cara interna de la capa de células mucosales, o que cambios en la permeabilidad del lado interno de la bomba puedan influenciar la magnitud del transporte neto de cloruro.

Si la furosemida es aplicada a la superficie externa de la piel de rana, su efecto es diferente al aplicado en la superficie externa (Bevis y col. 1975). Sólo después de una hora se observa una reducción en la permeabilidad de la membrana al cloruro.

Estos hechos llevaron a Lote (1976) a concluir que: "ya no quedan dudas de la presencia de un transporte de cloruro en el epitelio de la piel abdominal de la rana".

Por otro lado, Lindey y Hoshiko (1964) y Gil Ferreira (1968) demostraron que el $J_{\text{neto}}^{\text{Na}}$ depende de la naturaleza del anión aún en condiciones de corto-circuito Ussing y Zerahn (1951); Linderholm (1952), Koefoed-Johnsen, Levi y Ussing (1952) demostraron que el movimiento de Cl^- está influenciado por el Na^+ , no sólo por la diferencia de potencial eléctrico generado por el transporte de Na^+ , sino también porque su permeabilidad se ve aumentada por el Na^+ (Macey y Meyers, 1963). Von Petery (1975) realizó un extenso estudio del transporte transepitelial de cloruro en Leptodactylus ocellatus, ella concluyó que:

1)- El flujo pasivo de Cl^- (medido por el eflujo de Cl^- , $J_{31}^{\text{Cl}^-}$) se hace a través de un mecanismo saturable que es estimulado por la presencia de Cl^- en la solución que baña la cara externa (lado-trans).

2)- La presencia de Na^+ en la solución externa, en cambio, no aumenta de por sí el eflujo $J_{31}^{\text{Cl}^-}$. Sin embargo, cuando el $J_{31}^{\text{Cl}^-}$ es estimulado por la presencia de Cl^- en el lado trans, un agregado de Na^+ produce un significativo aumento adicional.

3)- De los puntos 1 y 2 surgiría, en primera aproximación que el componente pasivo que nos ocupa transcurre por un proceso de difusión facilitada que es estimulable por Na^+ . Sin embargo, los estudios de conductancia eléctrica indican que a bajas concentraciones de Cl^- externo el \int_{31}^{Cl} utiliza realmente un mecanismo de difusión de intercambio, pero a altas concentraciones de Cl^- externo utiliza una ruta cuya activación es proporcional a aumentos de la conductividad eléctrica.

4)- Estos resultados considerados en relación a datos de la bibliografía sugieren que la primer ruta (es decir, la difusión de intercambio) está localizada a nivel extracelular -presumiblemente a través de las uniones estrechas- y que la segunda atraviesa en cambio, el citoplasma celular. El Na^+ parece activar solamente la segunda ruta.

5)- El estudio del influjo de Cl^- (\int_{13}^{Cl}) hecho a bajas concentraciones de Cl^- en la solución externa (1mM) muestra que el Cl^- penetra por dos mecanismos: a) una translocación pasiva que utiliza aparentemente una ruta paracelular y que exhibe las características de un proceso de difusión de intercambio y b) un proceso activo que se presume atraviesa el citoplasma celular.

6) El aumento de la concentración de Cl^- externo (115 mM) aumenta la penetración de Cl^- tanto a nivel de la barrera externa (\int_{12}^{Cl}) como a través de toda la piel (\int_{13}^{Cl}). Los estudios simultáneos de \int_{13}^{Cl} y \int_{31}^{Cl} demuestran que el aumento de penetración se hace por una estimulación tanto del proceso pasivo como del activo. Esto sugiere que el Cl^- externo activa un mecanismo de penetración probablemente localizado en la barrera externa, por el cual el Cl^- entra a la célula y llega a la bomba de Cl^- .

7)- Un aumento de la concentración de Cl^- en el lado interno no produce los cambios que se consiguen con las variaciones del Cl^- externo. Esto corrobora la conclusión del punto 3, de que el efecto del aumento de Cl^- en el lado externo no producía una difusión de intercambio y justifica suponer que activa en cambio, un sitio localizado en la cara externa.

8)- El Na^+ estimularía el sitio mencionado en el punto 7 siempre y cuando éste sea previamente activado por el Cl^- .

9)- El Cl^- estimula a su vez la penetración de Na^+ a través de la barrera externa \int_{12}^{Na} .

10)- Por las razones técnicas que se detallan en el texto, los estudios arriba mencionados se llevaron a cabo sobre preparaciones cortocircuitadas, es decir, en membranas en las que el $\Delta\psi$ estaba anulado experimentalmente. En otra serie de estudios llevados a cabo en pieles no cortocircuitadas, se estudió la conducta del $\Delta\psi$ y se vio: a) que cuando el principal anión usado es el SO_4^{2-} , $\Delta\psi$ aumenta con la concentración de Na^+ externo hasta 87 mV, valor al que llega a alrededor de 20 mM. De ahí en adelante $\Delta\psi$ permanece constante, b) cuando el principal anión es el Cl^- , se observa que $\Delta\psi$ aumenta con la concentración de ClNa externo $[\text{ClNa}]$ ext., con una pendiente similar a la curva obtenida con SO_4^{2-} (37 mV por década) pero con una ordenada al origen más baja, atribuida al bombeo activo de Cl^- , c) entre 2 y 9 mM de $[\text{ClNa}]$ ext. se activa un canal específico para el Cl^- , de modo que todo aumento posterior de $[\text{ClNa}]$ ext produce un descenso de $\Delta\psi$. d) se estudió la selectividad del sitio para ser activado por cationes (1) y para ser atravesado por aniones monovalentes (2).

11)- Los datos expuestos más arriba, muestran entonces, un mecanismo por el cual el Na^+ para pasar necesita Cl^- , pero a su vez, éste entra en forma significativa cuando está presente la concentración adecuada y aquél (Na^+) le activa el mecanismo de penetración. Esto no sólo muestra una interrelación interesante entre dos iones cuantitativamente tan importantes como el Na^+ y Cl^- , sino que pone además en evidencia un proceso que in vivo le permitiría al animal poner a funcionar un importante mecanismo de recuperación de Na^+ y Cl^- cuando se pone en contacto con un medio desprovisto de ClNa ".

Estas observaciones nos llevaron a tratar de determinar el lugar en el que el Cl^- modifica el potencial eléctrico que se observa a través de la membrana, o sea la localización de la membrana externa sensible al paso del anión; y a estudiar mediante experiencias de cambio rápido la activación de los sitios específicos del cloruro.

(1) Observó que el Li^+ al igual que el Na^+ es capaz de activar dicho sitio.

(2) Observó que el Br^- al igual que el Cl^- es capaz de atravesar el sitio.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

1- METODOLOGIA GENERAL

a) Animales

Se usó la piel abdominal de la rana sudamericana Leptodactylus ocellatus (L. 1758). Los animales se mantuvieron en ambiente húmedo y a temperatura entre 15 y 22°C, con circulación continua de agua que había sido previamente equilibrada con aire. Se utilizaron animales de ambos sexos, durante todas las épocas del año, excepto cuando se observaba el fenómeno de muda de piel.

b) Disección y Montaje

Una vez desmedulada la rana, se le disecó la piel y después de varios lavados con solución de sacarosa 230 mM se la montó a manera de diafragma entre dos bloques de plexiglas que tienen talladas cuatro pares de cámaras (Fig. II.1 y II.2), especialmente diseñadas para obtener de una misma piel cuatro porciones que pueden ser sometidas a condiciones experimentales diferentes (Cereijido, Rabito, Boulan y Rotunno, 1974). El área expuesta fue de 1.54 cm^2 , el volumen de las hemicámaras externas, es de 0.8 ml y el de las internas de 4 ml.

La Fig. II.1 represente a las hemicámaras externas vistas de frente. Los orificios que aparecen en los bordes superior e inferior permiten el pasaje de una tuerca que sirve para el ajuste de las hemicámaras. La Fig. II.2 muestra a las cámaras acopladas y ajustadas mediante tuercas, entre las mismas se observan los bordes salientes de la piel que se halla entre ellas a modo de diafragma, protegida mediante una fina malla de polietileno. Cada una de las hemicámaras externas poseen dos conductos que las comunican con el exterior, a uno de ellos se ajusta una jeringa que permite el pasaje de 10 ml de solución por las mismas en menos de 300 ms, el orificio restante se comunica a un tubo de polietileno que conduce al líquido expulsado de la hemicámara a un recipiente colector (Fig. II.3). De tal modo, si la hemicámara contiene una solución dada al comenzar la experimen-

cia, y deseamos cambiarla rápidamente mediante la inyección de una nueva solución, el $t_{1/2}$ (tiempo medio) del cambio será de 12 ms.

c-) Medida de la diferencia de potencial eléctrico

Los tubos de polietileno que emergen de cada una de las hemicámaras (Figs. II.1 y II.2) son llenados con Agar-ClK 2.8 M, y sirven como puentes de conductividad entre las cámaras y electrodos de calomel, que a su vez, se conectan a un voltímetro cuya salida se comunica a un polígrafo, tal como se esquematiza en la Fig. II.3.

d-) Aparatos

La medición de voltajes se realizó con un voltímetro KEITHLEY, modelo: 200 B DC, cuya impedancia de entrada es de $10^{14} \Omega$; los cambios se registraron en un polígrafo GRASS, modelo 7B (SERIE E 791 W9), cuyas características son: Low Level D.C. PRE AMPLIFIER MODEL 7 P1 A, con una impedancia de entrada: D.C. $20 K \Omega$ con D.C. DRIVER AMPLIFIER.

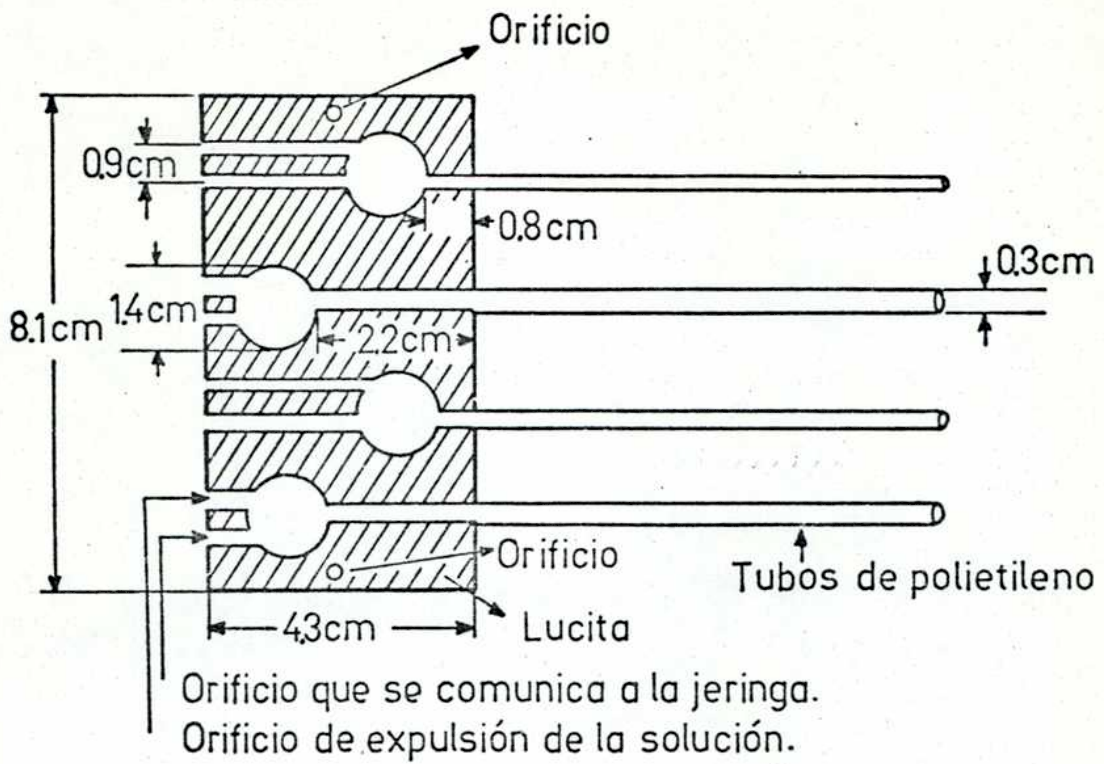


Figura II.1: Hemicámara externa vista de frente.

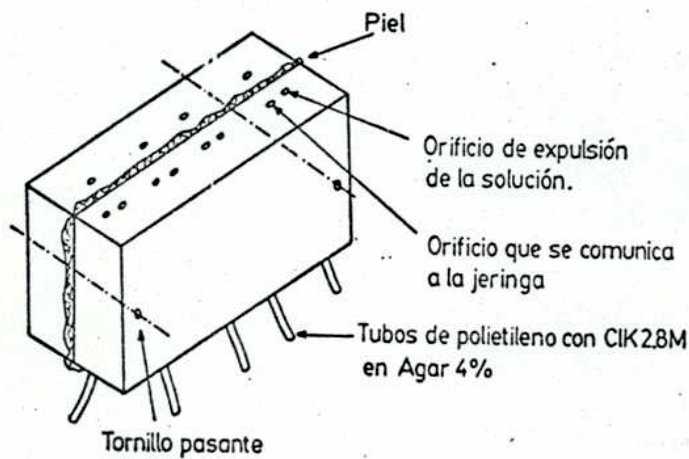


Figura II.2: Hemicámaras montadas entre las cuales se observa los bordes salientes de la piel que ha sido colocada a modo de diafragma entre las mismas.

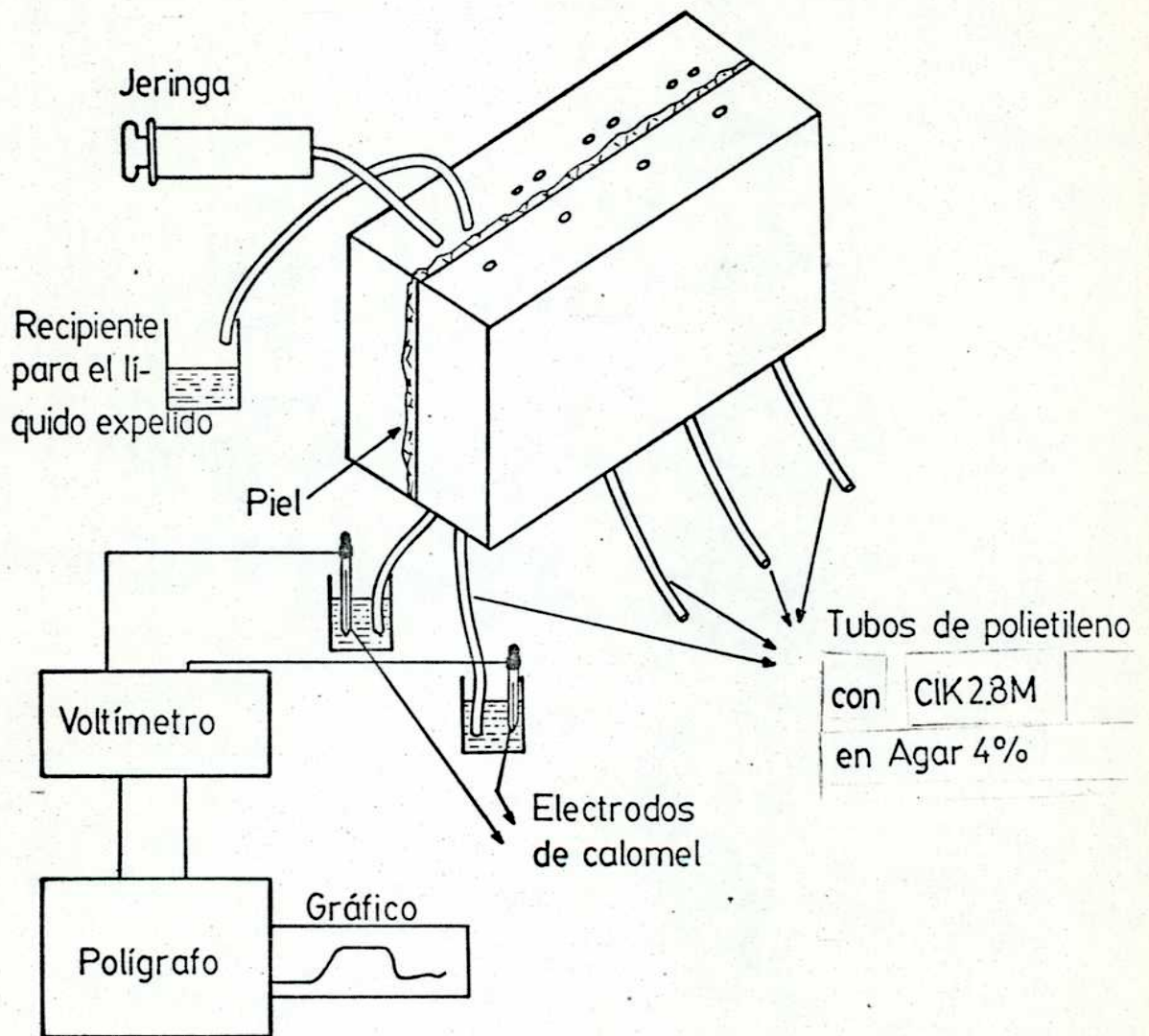


Figura II.3: Esquema general del dispositivo experimental utilizado

e) Soluciones

Todos los datos están expresados en mM. Las soluciones Ringer son denominadas en base a la sal de sodio seguido de la concentración de este catión. Cuando se utilizan soluciones de igual concentración de Na y del mismo anión, pero distinto co-ión, éste se especifica entre paréntesis a continuación de la concentración. Así ClNa 1mM (colina) significa que la concentración de Na es de 1mM; el anión que lo acompaña es el Cl^- y el co-ión: la colina; a su vez ClNa 1mM(K) indica que el co-ión es el K, siendo las demás características iguales al caso anterior.

El pH de todas las soluciones fue de 7.6 (ajustado con buffer de fosfatos). La osmolaridad fue en todos los casos de 230 mosmol. Todos los Ringer fueron preparados con agua bidestilada y drogas proanálisis de Fisher Scientific Co. y Mallinckrodt Chemical Works.

TABLA II.1

	ClK	SO ₄ Na ₂	PO ₄ HNa ₂	Cl ₂ Ca	Sacarosa	Glucosa	Gluconato de Sodio	ClNa	PO ₄ HK ₂	PO ₄ H ₂ K	SO ₄ K ₂	Cloruro de Colina
Gluconato-Na 115 mM	2.40		3.60	0.50		2.00	105.00					
SO ₄ Na ₂ 115 mM	2.40	52.50	3.60	0.50	52.50	2.00			1.00	0.11	24.50	
SO ₄ Na ₂ 1 mM		0.50		0.50	148.28	2.00			1.00	0.11		
SO ₄ Na ₂ 50 mM		25.00		0.50	148.28	2.00		105.00				
ClNa 115 mM	2.40		3.60	0.50		2.00						
ClNa 1 mM (colina)				0.50	28.48	2.00		1.00	1.00	0.11		96.40
ClNa 50 mM (colina)				0.50	28.48	2.00		50.00	1.00	0.11		47.40
ClNa 1 mM (K)	96.40			0.50	28.48	2.00		1.00	1.00	0.11		
ClNa 50 mM (K)	47.40			0.50	28.48	2.00		50.00	1.00	0.11		

TABLA II.2

	$PO_4 HNa_2$	$PO_4 H_2 Na$	$Cl_2 Ca$	Sacarosa	Glucosa	$PO_4 HK_2$	$PO_4 H_2 K$	Bromuro de Colina	Ioduro de Colina	BrK	IK	BrNa	INa
BrNa 115 mM	3.60	0.40	0.50		2.00					2.40		105.00	
BrNa 1mM (colina)			0.50	28.48	2.00	1.00	0.11	96.40				1.00	
BrNa 50mM (colina)			0.50	28.48	2.00	1.00	0.11	47.40		96.40		50.00	
BrNa 1mM (K)			0.50	28.48	2.00	1.00	0.11					1.00	
BrNa 50mM (K)			0.50	28.48	2.00	1.00	0.11			47.40		50.00	
INa 115 mM	3.60	0.40	0.50		2.00						2.40		105.00
INa 1mM (colina)			0.50	28.48	2.00	1.00	0.11	96.40				1.00	
INa 50mM (colina)			0.50	28.48	2.00	1.00	0.11	47.40				50.00	
INa 1mM (K)			0.50	28.48	2.00	1.00	0.11				96.40	1.00	
INa 50 mM (K)			0.50	28.48	2.00	1.00	0.11				47.40	50.00	

2- DETERMINACION DE LA LONGITUD DEL CAMINO DE DIFUSION MEDIANTE CAMBIOS TRANSITORIOS EN EL POTENCIAL DE LA PIEL DEBIDOS A MODIFICACIONES RAPIDAS EN LA COMPOSICION DE LA SOLUCION EXTERNA.

a) Procedimiento

En 1964, Kidder, Cereijido y Curran, demostraron que siguiendo mediante un osciloscopio o polígrafo los cambios transitorios de voltaje producidos como consecuencia de una variación muy rápida en la concentración de Na en la solución externa, es posible, mediante aproximación teórico-práctica, determinar la posición anatómica de la barrera externa sensible al Na en el epitelio abdominal de la rana. Para los presentes estudios se aplicó una técnica semejante.

El esquema representado en la Fig. II.3 representa la técnica aplicada: la piel fue montada entre las dos hemicámaras, como solución interna en todas las experiencias se utilizó Ringer ClNa 115 mM. Esta condición fue impuesta tomando en consideración que: a) Rabito, Boulan y Cereijido (1973) han demostrado que los cambios de Ringer interno provocan fenómenos eléctricos que se adjudican generalmente a variaciones en la cara externa, y b) el Ringer ClNa 115mM es el que más se asemeja al medio interno de la rana.

Las soluciones Ringer externas se especificarán en cada caso. Para lograr un cambio rápido en la composición de la concentración externa se conecta una jeringa a la hemicámara externa con la solución elegida y otro tubo de polietileno que llevará el líquido expelido a un recipiente, tal como se explicó en la sección II.1b. De este modo, mediante una inyección del líquido de la jeringa se logra expeler rápidamente la solución inicial lavando la cara externa de la piel con la nueva solución en un mínimo de tiempo.

En todas las experiencias las pieles se estabilizaron por 15 minutos con las soluciones Ringer iniciales.

Los cambios de presión debidos a la inyección no introdujeron errores significativos en las lecturas de las diferencias de potencial, según se pudo observar en los gráficos obtenidos con el polígrafo.

La Figura II.4 nos muestra los cambios de potencial en el tiempo debidos a un cambio rápido en la concentración de la solución externa de Na.

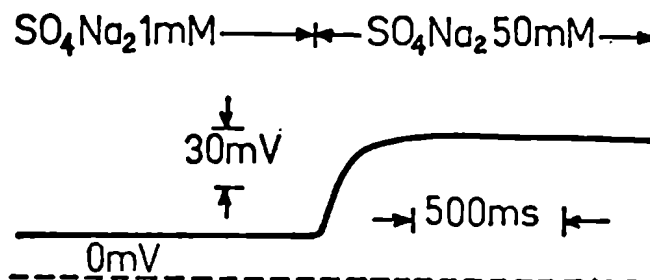


Figura II.4: Gráfico experimental en el que se observa la modificación del potencial eléctrico debido al rápido aumento de la concentración de Na^+ de la solución externa: (Ringer inicial: SO_4Na_2 1mM; Ringer final: SO_4Na_2 50mM).

De estas curvas se leyó las diferencias de potencial correspondientes a distintos tiempos: a partir de los cuales para un número dado de curvas, se pudo obtener valores promedios de E (potencial de membrana) para los tiempos elegidos. Con el propósito de independizar a los valores de E de las características propias de la piel (piel de alta o baja resistencia); y obtener datos cuya distribución de valores corresponda al fenómeno cinético, se trabajó con una función normalizada. Para obtenerla se consideró: 1) De acuerdo a Koefoed-Johnsen y Ussing (1958), cuando la piel está bañada por Ringer SO_4Na_2 como solución externa, será:

$$E = \alpha \log [\text{Na}] + \beta \quad (2.1)$$

donde α , y β son constantes y $[\text{Na}]$ representa a la concentración de Na en la membrana externa de las células transportadoras. (Las bases de la ecuación (2.1) son discutidas en detalle por Hoshiko, 1961).

2) Sea E_0 el potencial de membrana al tiempo t_0 : instante en el cual se introduce la nueva solución; y sea E_{∞} el potencial de membrana una vez obtenido el equilibrio con la nueva solución.

De (2.1) queda:

$$E_0 = \alpha \left[\log [Na]_0 + \beta \right] \quad (2.2)$$

$$E_{\infty} = \alpha \left[\log [Na]_{\infty} + \beta \right] \quad (2.3)$$

3) Si definimos a F (función normalizada) como:

$$F = \frac{E - E_0}{E_{\infty} - E_0} \quad (2.4)$$

de (2.1), (2.2), (2.3), y (2.4), obtenemos:

$$F = \frac{\log \left(\frac{[Na]}{[Na]_0} \right)}{\log \left(\frac{[Na]_{\infty}}{[Na]_0} \right)} \quad (2.5)$$

A partir de los gráficos obtenidos para distintas pieles se miden los valores de E para distintos tiempos previamente escogidos. Mediante los mismos y utilizando (2.4) se tiene un conjunto de valores de F para cada tiempo, al promedio de los mismos lo indicaremos con \bar{F} . Se grafican los valores de \bar{F} vs. los tiempos de t correspondientes. Utilizando la ecuación de difusión libre integrada entre 0 y δ (camino de difusión) en una sola dimensión (Crank, 1956):

$$[Na] = [Na]_{\infty} + \frac{4}{\pi^2} \left([Na]_0 - [Na]_{\infty} \right) \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \exp. \left[-(2n+1)^2 \pi^2 D' t / 4 \delta^2 \right] \quad (2.6)$$

donde D' es el coeficiente de difusión aparente del Na; δ : la longitud del camino de difusión desde la membrana hasta un espesor de la capa de agua no mezclada, t: tiempo. Dando adecuados valores a $(\pi^2 D' / 4 \delta^2)$, se pueden aproximar curvas teóricas a la curva experimental obtenida; y así saber cuál es el valor de $(\pi^2 D' / 4 \delta^2)$ que más ajusta a la curva en cada caso.

En base a distintas consideraciones que se discutirán en cada caso se despeja δ , que es el dato buscado. Cuando los cambios de potencial son debidos a un cambio rápido del anión que acompaña al Na^+ , y si cambiamos un anión impermeable a la membrana (por ej.: SO_4^{2-} o gluconato) por uno permeable (por ej.: Cl^- o Br^-)

estaremos frente a un fenómeno de descenso de potencial (Figura III.1). En este caso, obtendremos la función normalizada suponiendo que el potencial E en un momento dado de la difusión de Cl^- hacia la piel será:

$$E = V - \alpha' \log [Cl] + \beta' \quad (2.7)$$

donde: V = constante de potencial que depende de la concentración externa de Na y de la resistencia de la piel; α' y β' son constantes.

Si llamamos E_0 al potencial a tiempo t_0 , instante en el cual se inyecta la nueva solución, y sea E_{∞} el potencial una vez obtenido el equilibrio con la nueva solución, será:

$$E_0 = V - \alpha' \log [Cl]_0 + \beta' \quad (2.8)$$

$$E_{\infty} = V - \alpha' \log [Cl]_{\infty} + \beta' \quad (2.9)$$

Definimos, en este caso, a F como:

$$F = \frac{E - E_{\infty}}{E_0 - E_{\infty}} \quad (2.10)$$

De (2.8), (2.9) y (2.10), obtenemos:

$$F = \frac{\log \left(\frac{[Cl]_{\infty}}{[Cl]} \right)}{\log \left(\frac{[Cl]_{\infty}}{[Cl]_0} \right)} \quad (2.11)$$

En este caso, al igual que en el del Na, si se tiene un número n de mediciones de F para un tiempo t dado, definimos:

$$\bar{F} = \frac{\sum_{i=1}^n F_i}{n} \quad (2.12)$$

La ecuación de difusión libre de cloruro integrada en una sola dimensión, será en este caso:

$$[Cl] = [Cl]_{\infty} + \frac{4}{\pi} \left([Cl]_0 - [Cl]_{\infty} \right) \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \exp. \left[- (2n+1)^2 \frac{\pi^2 D}{4L^2} t \right] \quad (2.13)$$

la cual es semejante a la ecuación (2.6). El procedimiento continúa en forma semejante a la descripta para el Na.

b-) Estadística

Se calcularon los F para tiempos determinados en cada experiencia y a partir de los mismos se calculó el respectivo F promedio, que en la presentación anterior indicamos con \bar{F} , según la fórmula (2.12).

Cada uno de los \bar{F} , se graficó con su correspondiente error standard del promedio (S.E.) que se define:

$$S.E. = \sigma / \sqrt{n}$$

donde σ es la desviación standard de cada medición, definido por:

$$\sigma = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

Cuando en esta tesis, se hace referencia a un valor de F , el valor es el valor promedio de un grupo de medidas y no a una medición dada. Por razones de claridad, escribiremos F y no \bar{F} entendiéndose que nos referimos a un valor promedio.

c-) Cálculo del tiempo medio

A partir de las ecuaciones (2.5) y (2.11), se puede determinar el $F_{1/2}$, o sea el valor de F para el cual:

$[X] = ([X]_{\infty} + [X]_0) / 2$, donde X corresponde según los casos al Na^+ o al Cl^- .

De (2.5) se obtiene:

$$F_{1/2} = \frac{\log \left(\frac{[Na]_{1/2}}{[Na]_0} \right)}{-\log \left(\frac{[Na]_{\infty}}{[Na]_0} \right)} \quad (2.14)$$

reemplazando por los correspondientes valores que corresponden a las condiciones que se describen en el Capítulo de Resultados:

$$[Na]_{1/2} = 25.5mM; [Na]_0 = 1mM; [Na]_{\infty} = 50mM, \text{ resulta:}$$

$$F_{1/2} = 0.82 \quad (2.15)$$

De (2.11) es:

$$F_{1/2} = \frac{\log \left(\frac{[Cl]_{\infty}}{[Cl]_{1/2}} \right)}{-\log \left(\frac{[Cl]_{\infty}}{[Cl]_0} \right)} \quad (2.16)$$

reemplazando por los correspondientes valores: $[Cl]_{1/2} = 56.1 \text{ mM}$; $[Cl]_0 = 3.4 \text{ mM}$; $[Cl]_{\infty} = 108.9 \text{ mM}$, resulta:

$$F_{1/2} = 0.20 \quad (2.17)$$

A partir de los $F_{1/2}$ podemos obtener los valores correspondientes de $t_{1/2}$ mediante la observación en los respectivos gráficos de \bar{F} vs. t que se obtendrán de cada una de las experiencias.

d-) Determinación de las capas de agua no mezclada

El camino de difusión δ corresponderá en primera instancia a la capa de agua no mezclada más la difusión libre que ocurre en otras regiones del epitelio, y que debe atravesar el ión hasta alcanzar la barrera sensible al mismo.

El concepto de "capa de agua no mezclada" fue originalmente desarrollado por Noyes y Whitney (1847) y luego por Nernst (1904) en su estudio sobre reacciones heterogéneas. De acuerdo a la teoría de Nernst la capa de agua no mezclada es una delgada capa de líquido estático inmediatamente adyacente a la superficie del cuerpo sólido inmerso en el fluido. Dentro de esta capa la concentración de soluto es función de la distancia y no es igual a la del seno de la solución.

Medidas experimentales han mostrado que el fluido dentro de esta capa no es estacionario, sino que es una región de un lento flujo laminar paralelo a la interface sólido-líquido, en la cual el único mecanismo de transporte posible es el de difusión.

El espesor de la capa δ , es una cantidad operativa definida por:

$$\left(\frac{dc}{dx} \right)_{\text{interface}} = \frac{C_b - C_{int}}{\delta} \quad (2.18)$$

donde C_b es la concentración del soluto en el seno de la solución y C_{int} es la concentración del mismo en la interface. La magnitud δ puede ser estimada mediante mediciones hidrodinámicas o cinéticas y es generalmente del orden de 10^{-3} a 10^{-2} cm.

Nernst supuso que δ es constante para condiciones de flujo determinadas; pero las teorías modernas (Levich, 1962) predicen que δ es una función no solamente de las propiedades y velocidades de la solución, sino también del coeficiente de difusión del soluto. Esto indica que, bajo un régimen dado de movimiento, el espesor efectivo de la capa de agua no mezclada puede no ser idéntico para diferentes sustancias.

La importancia de las capas de agua no mezclada en el transporte a través de membranas depende básicamente de la permeabilidad de la membrana a las especies particulares que son transportadas. Una capa de este tipo puede ser considerada como una membrana en serie con la membrana real, con un coeficiente de permeabilidad P dado por:

$$P = \frac{D}{\delta} \quad (2.19)$$

donde D es el coeficiente de difusión de la especie molecular en la solución acuosa. Para muchos solutos $D \approx 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$ y la permeabilidad equivalente de una capa de agua no mezclada sería un valor entre los órdenes: $10^{-2} - 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$. Estos valores son cercanos a los de alta permeabilidad, por lo que para estas sustancias el pasaje a través de las membranas biológicas puede ser total o parcialmente controlado por la difusión en las regiones no mezcladas adyacentes a las mismas, y no a la membrana propiamente dicha.

Dados los espesores de las capas de agua no mezcladas, δ_1 y δ_2 , asociados a cada una de las caras de una membrana, y si se supone que dicha membrana separa a dos soluciones conteniendo un soluto C, que se mueve a través de ella por difusión simple, y cuyas concentraciones son C_1 y C_2 respectivamente, se puede aplicar la ecuación de Fick;

$$J_{s-P_a} [C_2 - C_1] \quad (2.20)$$

donde P_a es la permeabilidad aparente de la membrana para el soluto particular en estudio.

La permeabilidad de la membrana propiamente dicha P_m , está dada por:

$$J_s = P_m [C_2 - C_1] \quad (2.21)$$

donde C_2 y C_1 son las respectivas concentraciones del soluto sobre las caras 1 y 2 de la membrana, y que diferirán por lo expuesto anteriormente de las concentraciones en el seno de las correspondientes soluciones.

Puede demostrarse que, en condiciones de estado estacionario, P_a está relacionado a P_m , por:

$$\frac{1}{P_a} = \frac{1}{P_m} + \frac{S_1}{D_1} + \frac{S_2}{D_2} \quad (2.22)$$

donde D_1 y D_2 son los coeficientes de difusión del soluto en las soluciones que bañan a la membrana. La existencia de estas capas de agua no mezclada pueden ser fuente de serios errores, al atribuir ciertas propiedades a membranas sobre la base de permeabilidades aparentes.

3- DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE DIFUSION APARENTES DE CLORURO (D_{Cl})

Para poder calcular S , a partir de los valores obtenidos para el coeficiente exponencial $\pi^2 D / 4 S^2$, debemos conocer los coeficientes de difusión para los distintos casos. En las experiencias de cambio rápido de $[Na]$ en la solución externa, tenemos una amplia bibliografía que nos permite evaluar D . Pero para el caso de cambio rápido de $[Cl]$ fue necesario realizar determinaciones a fin de determinar el valor de D_{Cl} .

El coeficiente de difusión de una sustancia que difunde en un medio químicamente no homogéneo es una expresión complicada debida al acoplamiento de los flujos.

Anderson y Saddington (1949) escriben: "Al aplicar mediciones de difusión al estudio de soluciones de electrolitos, el gradiente de concentración ocasiona una dificultad adicional. En la mayoría de los casos, el catión y el anión difundirán a distintas velocidades. Aunque esto podría no causar dificultades en un sistema químicamente homogéneo— o sea, uno en el cual

la concentración de soluto es la misma en todas partes- un potencial de difusión será alcanzado cuando la difusión tenga lugar a través de la interface entre dos soluciones que difieren en concentración. Debido al efecto mutuo de los iones de carga opuesta, el ión que difunde a mayor velocidad será retardado por el ión de velocidad lenta, y "vice-versa". La velocidad de difusión medida, entonces, no será aquella que corresponde a la del catión o del anión independientemente, pero será una velocidad promedio de difusión correspondiendo a la molécula electrolítica como un todo. Para superar esta dificultad Abegg y Bose (Z. physikal. Chem., 1849, 80:545), recomendaron la adición de un exceso de diez veces de un electrolito 1:1, distribuido uniformemente en todas partes del sistema de difusión. Los iones que difunden son entonces capaces de moverse en todas partes del sistema con una atmósfera iónica uniforme; de tal modo se preserva la electroneutralidad en todas las soluciones. Este esquema fue adoptado por Jander et al (ibid, 1930, A, 149: 97; Kollord-Beih, 1935, 41, 9) en su trabajo sobre poliácidos".

Estos hechos nos llevaron a utilizar un simil de nuestro proceso de difusión, mediante el cual, utilizando cloruro radioactivo, pudimos evaluar D_{Cl} .

En el caso en que reemplazamos el Ringer SO_4Na_2 115mM por $ClNa$ 115mM, tenemos:

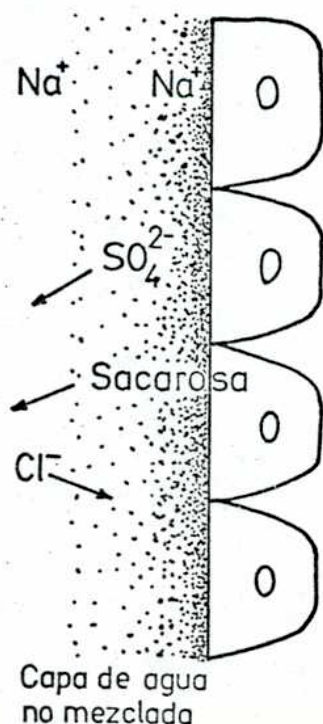


Figura II.5: Esquema de los flujos que se producen al introducir rápidamente Ringer $ClNa$ 115mM en reemplazo del Ringer SO_4Na_2 115mM.

o sea que el flujo de Cl^- tiene lugar en sentido opuesto a los flujos de SO_4^{2-} y de sacarosa.

En la situación en que reemplazamos el Ringer Gluconato-Na 115mM por Ringer ClNa 115mM tenemos:

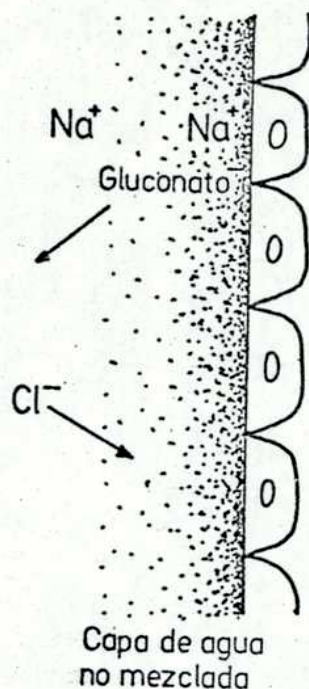


Figura II.6: Esquema de los flujos que se producen al introducir rápidamente Ringer ClNa 115mM en reemplazo del Ringer Gluconato de Na 115mM.

En este caso, el flujo de Cl^- tiene lugar en sentido contrario al flujo del ión Gluconato. Para obtener D se utilizó una técnica experimental que nos permite reproducir las mismas condiciones de flujo; y medir mediante radioisótopos, el coeficiente de difusión requerida. Para ello utilizamos la variante introducida por Kreevoy y Wewerka (1967) al método de obtención de coeficientes de difusión mediante la difusión a través de diafragmas introducido por Northrop y Anson (1929) y desarrollado por Mc. Bain (1935), Hartley y col. (1938) y Stokes (1950).

a -> Aparatos

Para medir los flujos se ha diseñado un recipiente de lucita dividido en dos

cámaras de 8.5 ml de volumen cada una, entre las mismas hay una saliencia sobre la cual se suspende sucesivamente una arandela de teflon, el papel milipore y otra arandela de teflon para fijar al mismo.

Una vez llena con la solución radiactiva, la cámara inferior, el milipore puesto con sus arandelas, y llena la cámara superior con la "solución fría" (=sin sustancia radiactiva), se enrosca una tapa de lucila al recipiente, que posee una abertura a través de la cual se introduce una varilla de polietileno en forma de T que se acopla a un rotor y que sirve para mantener una buena agitación en la cámara superior. En la cámara inferior se introduce una barra magnética que, al ser colocado el recipiente sobre un electrocímán produce una buena agitación en la misma. Un esquema del aparato se detalla en la Fig. II.7.

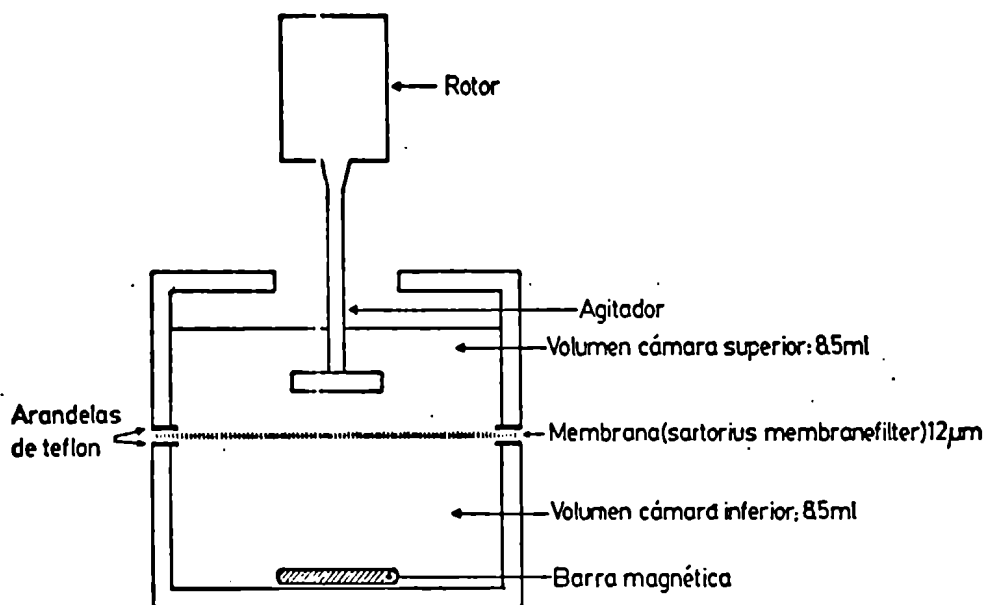


Figura II.7: Esquema del aparato utilizado para medir flujos. Ver detalles en el texto.

Las muestras que se obtuvieron en las distintas experiencias se contaron en un contador de centelleo líquido Nuclear Chicago ISOCAP 300.

b-) Drogas y Soluciones

Se utilizaron las siguiente soluciones: Ringer SO_4Na_2 115mM y Ringer Gluconato de Na 115mM, las concentraciones y especificaciones de las mismas fueron dadas en la sección II.1.e.

Se preparó Ringer $^{36}\text{ClNa}$ 115mM con las mismas concentraciones que las descritas en la sección II.1.e., pero con Cl radiactivo; la actividad específica de la solución fue: $\left|^{36}\text{Cl} = 380 \text{ C.P.M/ mol.}\right.$ El isótopo radiactivo del Cl se obtuvo de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Como líquido centelleador se utilizó la solución de Bray: 2 gramos de PPO en 200 ml de etanol, y se lleva a un volumen de 500 ml con tolueno.

c-) Procedimiento

En la primera experiencia se colocó Ringer $^{36}\text{ClNa}$ 115mM en la cámara inferior y agua bidestilada en la superior, y bajo agitación constante se mantuvo en contacto a las soluciones a través del papel milipore durante 10 minutos, luego se separaban las soluciones transvasándolas a distintos recipientes.

En la segunda experiencia se colocó el Ringer radiactivo en la cámara inferior y Ringer SO_4Na_2 115mM en la superior y se procedió igual que en el caso anterior; y en la última experiencia se colocó Ringer Gluconato de Na 115mM, procediéndose igual que en los casos anteriores.

En todas las experiencias fueron tomadas las siguientes muestras: del Ringer radiactivo al comenzar y al finalizar la experiencia, y de la "solución fría" al finalizar la misma. Todas las muestras fueron de 100λ y se colocaron en viales que contenían 25 ml de solución fluorescente. Cada muestra fue tomada con su respectivo duplicado, y ambos fueron contados en todos los casos durante 10 minutos en el contador de centelleo líquido.

d-) Cómputos

En el Apéndice que acompaña a esta tesis se encuentra la demostración de la siguiente fórmula:

$$\bar{D} = \frac{l_n}{\beta \cdot t} \ln \frac{C'_0 - C''_0}{C'_t - C''_t} \quad (2.23)$$

donde \bar{D} es el coeficiente de difusión de la sustancia que difunde a través del papel milipore; β : la constante de la cámara, t : el tiempo de duración de la difusión (10 minutos en nuestro caso); C'_0 : concentración de la sustancia que difunde en la cámara superior al comenzar la experiencia; C'_t (C'_{10} en nuestro caso) concentración de la sustancia que difunde en la cámara inferior al finalizar la experiencia; C''_t (C''_{10} en nuestro caso): concentración de la sustancia que difunde en la cámara al finalizar la experiencia.

Para nuestro caso será siempre: $C''_0 = 0$

De la primer experiencia, en la que se colocó agua bidestilada en la cámara superior, se pudo calcular r ; donde r es:

$$r = l_n \frac{C'_0}{C'_{10} - C''_{10}} \quad (2.24)$$

De (2.23) resulta:

$$D'_{ClNa, H_2O} \cdot t \cdot \beta = r \quad (2.25)$$

donde:

D'_{ClNa, H_2O} es el coeficiente de difusión aparente de ClNa cuando en la cámara superior se coloca agua bidestilada. Se puede considerar que:

$$D'_{ClNa, H_2O} \approx D^{\circ}_{ClNa} = 1.35 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1} \quad (2.26)$$

El valor de D°_{ClNa} corresponde a $T = 291^{\circ}K$, que fue nuestra temperatura de trabajo. De (2.24), (2.25) y (2.26) se deduce el valor de β . Conocido β , y aplicando (2.24) y (2.25) para los casos en que en la cámara superior se coloca Ringer $SO_4 Na_2$ 115mM, y luego Gluconato de Na 115mM, se obtienen los respectivos valores de D .

e-) Elección del tiempo de difusión

A fin de establecer el tiempo de difusión de las experiencias, se consideró el criterio generalizado (Gordon, 1945) que t tiene que ser mayor de $1.2 \ell^2/D$. Para nuestro caso es D del orden de $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ y un valor que oscila entre los $80-150 \mu\text{m}$, utilizando el valor máximo de ℓ para el cálculo obtenemos que $t > 5$ minutos. Por razones de comodidad en la técnica de trabajo adoptamos como tiempo de corrida para todas las experiencias: $t = 10$ minutos.

f-) Estadística

Las experiencias se realizaron tomando muestra y duplicado de tal modo que se obtuvo una serie de valores: C'_{10} , C''_{10} y C'''_{10} como muestras y C'_0 , C''_{10} y C'''_{10} como sus respectivos duplicados. A partir de estos datos se calcularon los promedios: \bar{C}'_{10} , \bar{C}''_{10} , \bar{C}'''_{10} , respectivamente, con los cuales calculamos r según se indica en la ecuación (2.24).

A partir de r se calculó D según se especificó anteriormente. A esta primer experiencia se denominó "a".

Luego se realizó una segunda experiencia en la cual se procedió igual que en el caso anterior, obteniéndose un nuevo valor de D . A esta experiencia se denominó "b".

Finalmente se consideró como valor final de D al promedio de los coeficientes de difusión obtenidos mediante "a" y "b".

En todos los casos -tanto entre muestra y duplicado, como entre los distintos promedios de las experiencias- los datos no diferían más que en un 3% entre sí.

CAPITULO III

RESULTADOS

1- DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE DIFUSION DEL Cl^-

Como fue explicado en la Sección II.3, para determinar la longitud del camino de difusión δ es necesario conocer el coeficiente de difusión del Cl^- en las condiciones más similares a las experimentales. Para eso es que se realizaron determinaciones del coeficiente de difusión del Cl^- por la técnica descrita en la sección II.3.

Los valores hallados son el resultado de seis difusiones realizadas en el mismo día y bajo las mismas condiciones experimentales. En la Tabla III.1 se presentan los resultados obtenidos expresados en concentraciones (mM). A las dos difusiones realizadas en cada serie de experimentos se las denomina a y b respectivamente. Cada una de las concentraciones expuestas es el promedio de cada muestra y su respectivo duplicado.

Tabla III.1

Solución en la cámara superior		C^0	C^{10}	C^{10}	$\int n r$	$D_{\text{Cl}^-} \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	
Agua	a	115	65.8	49.4	1.95		
	b	115	67.5	49.3	1.84		
Ringer Gluconato Na 115mM	a	115	69.6	48.8	1.71	1.22	1.18
	b	115	71.2	48.3	1.61	1.14	
Ringer $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ 115mM	a	115	70.2	45.4	1.53	1.09	1.11
	b	115	69.5	45.7	1.58	1.12	

El coeficiente de difusión del ClNa a dilución infinita a 291°K (Temperatura a la que se realizaron las experiencias) es $1.35 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (el cálculo para la obtención de este valor se encuentra en la sección IV.1). Se observa que los valores obtenidos difieren en un 12.60% (Ringer Gluconato Na 115mM) y 17.80% (Ringer $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ 115mM) del anterior, y en un 6% entre sí. Los resultados son comentados detalladamente en el Capítulo IV (Pág. 85).

2- EFECTO DE LOS HALOGENUROS SOBRE LOS CAMBIOS DE POTENCIAL ELECTRICO DE LA PIEL DE RANA.

Tal como se explicó en el capítulo de Introducción, uno de los propósitos de este trabajo fue el de determinar la localización de la barrera externa sensible al pasaje de halogenuros permeables, en el epitelio abdominal de la rana Leptodactylus ocellatus. Para ello se utilizó un método que consiste en analizar los cambios de diferencia de potencial en función del tiempo que resulta de cambiar rápidamente la composición de la Solución Ringer que baña la cara externa de la piel; este procedimiento fue ideado por Kidder y col. para la localización de la barrera externa sensible al pasaje de Na en el epitelio abdominal de la Rana pipiens.

El primer grupo de experiencias consistió en reemplazar mediante un cambio rápido al Ringer SO_4Na_2 115mM por el Ringer ClNa 115mM, después que el primero había bañado al lado externo de la piel durante 15 minutos, lapso en el cual se establecía un potencial estacionario.

En ambas soluciones que bañaron la cara externa de la piel la concentración de Na fue de 115mM, en el Ringer sulfato la concentración de SO_4^{2-} fue de 52.50mM, y la de cloruro de 3.4mM; mientras que en el Ringer ClNa 115mM la concentración de SO_4^{2-} fue de cero, y la de cloruro 108.4mM. Las experiencias se realizaron en presencia de altas concentraciones de Na ya que por lo trabajos de Von Petery (1975) se sabe que el Cl^- necesita de la presencia de Na para ser transportado a través de la piel. En todas las soluciones el pH fue de 7.6, el mismo corresponde a la solución no aerada puesto que por razones técnicas (pequeño volumen de la cámara) la aereación continua de las soluciones no fue posible. La osmolaridad fue en todas las soluciones de 230 mosmoles, este valor es el correspondiente al medio interno de los anfibios, en el Ringer SO_4Na_2 115mM se alcanzó la misma mediante el agregado de 52.50 mM de sacarosa.

Con el propósito de analizar el fenómeno de difusión del cloruro cuando el anión

impermeable inicial es monovalente, se repitió este tipo de experiencias utilizando como solución inicial Ringer Gluconato de Na 115mM. El pH y la osmolaridad se mantuvieron iguales al caso anterior, la concentración de Cl en el Ringer inicial fue de 3.4mM, y la final: 108.4mM; la concentración de Gluconato en el Ringer inicial fue de 105 mM y en el final de cero.

La figura III.1 ilustra dos curvas obtenidas mediante el polígrafo, la figura a muestra el comportamiento del potencial eléctrico cuando se reemplaza el Ringer SO_4Na_2 115mM por ClNa 115mM, y la figura b cuando el Ringer Gluconato de Na 115mM es reemplazado por Ringer ClNa 115mM.

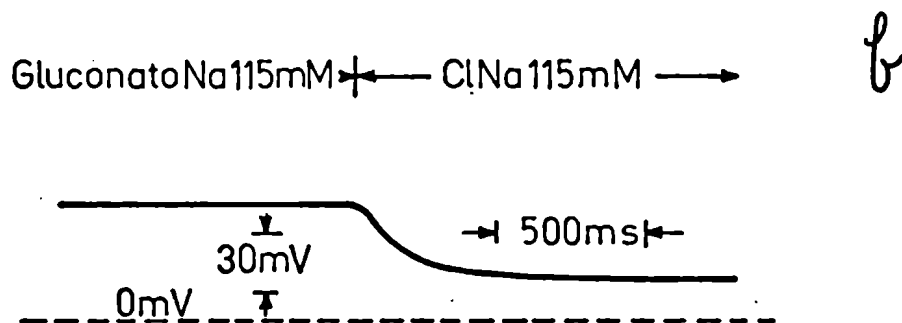
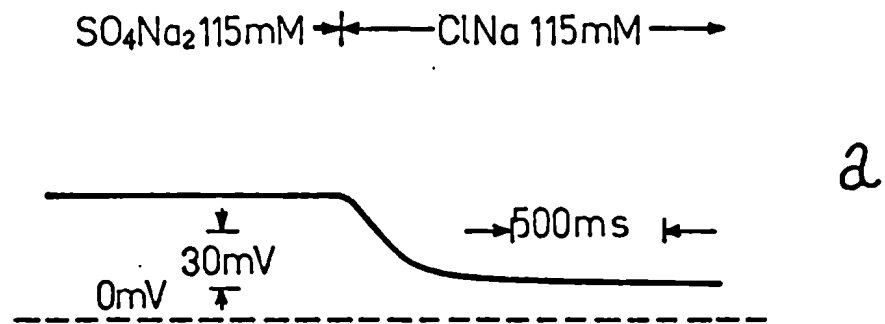


Figura III.1: Gráfico experimental en el que se observan las modificaciones del potencial eléctrico debido a los siguientes reemplazos en la solución externa: a) Cambio de Ringer SO_4Na_2 115mM a Ringer ClNa 115mM; b) Cambio de Ringer Gluconato de Na 115mM a Ringer ClNa 115mM.

La figura III.2 representa los potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo de 13 determinaciones en 8 pieles distintas para el Ringer inicial: Gluconato de Na 115mM. El rango de los potenciales de las pieles estabilizadas en SO_4^{2-} fue de 60-90 mV, mientras que después de haber sido estabilizados en Cl^- el mismo fue de 15-35 mV. Los mismos rangos de potenciales se observaron cuando las pieles estaban bañadas con gluconato (60-90 mV), y luego con cloruro (15-35 mV).

Las curvas que acompañan a los potenciales normalizados promedio fueron obtenidas a través de la ecuación integrada de difusión en una disección (ecuación 2.13) en la cual el coeficiente exponencial asumido es de 5 S^{-1} para el Ringer inicial: $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ 115mM; y de 4 S^{-1} para el Ringer inicial: Gluconato de Na 115 mM.

Estas curvas teóricas fueron calculados en primer aproximación para los datos correspondientes a los tiempos $t > 0.05 \text{ S.}$, y en segunda aproximación para $t < 0.05 \text{ S.}$ En todos los casos el cálculo teórico de F en base a la ecuación 2.13 (pág. 46) se realizó considerando todos los términos exponenciales que aseguren un error menor de 10^{-3} . Valor muy por debajo del error experimental. En todas las curvas de aproximación utilizaremos estas condiciones de cálculo en la presente tesis.

A fin de establecer correspondencia de los datos experimentales a los calculados teóricamente se correlacionó los valores experimentales de F con sus respectivos valores teóricos (F_{teor}), obtuvimos una correlación $r=0.9210$. La figura III.3 ilustra la recta de regresión obtenida .

La figura III.4 ilustra la correlación entre los F experimentales obtenidos para la condición inicial: Ringer Gluconato de Na 115mM vs. F experimentales de condición inicial: Ringer $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ 115mM. El coeficiente de correlación de la recta es de 0.9963. Este resultado muestra que no hay una diferencia significativa en la difusión del cloruro por la presencia de un anión bivalente inicial.

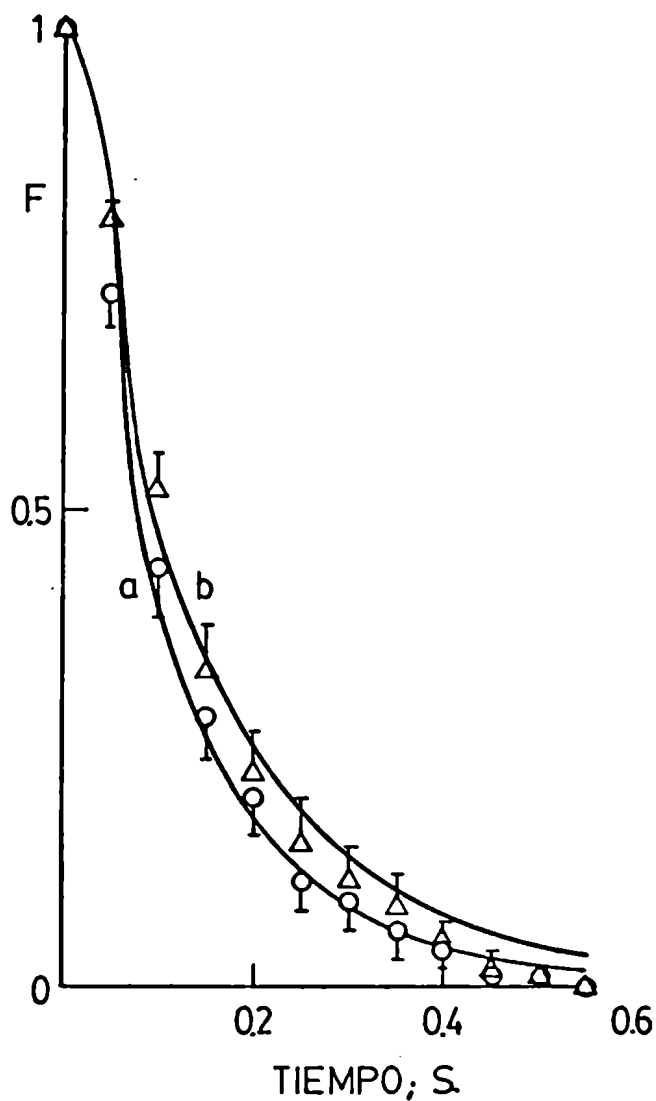


Figura III.2: Potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo para los descensos de potencial debidos a los siguientes reemplazos en la solución externa: \circ : Ringer inicial: SO Na_2 115 mM, Ringer final: ClNa 115 mM, (coeficiente exponencial de 4^{a} curva aproximada : $(\pi^2 D/4 \delta^2) = 5 \text{ s}^{-1}$); Δ ; Ringer inicial: Gluconato de Na 115 mM, Ringer final: ClNa 115 mM, (coeficiente exponencial de la curva aproximada: $(\pi^2 D/4 \delta^2) = 4 \text{ s}^{-1}$).

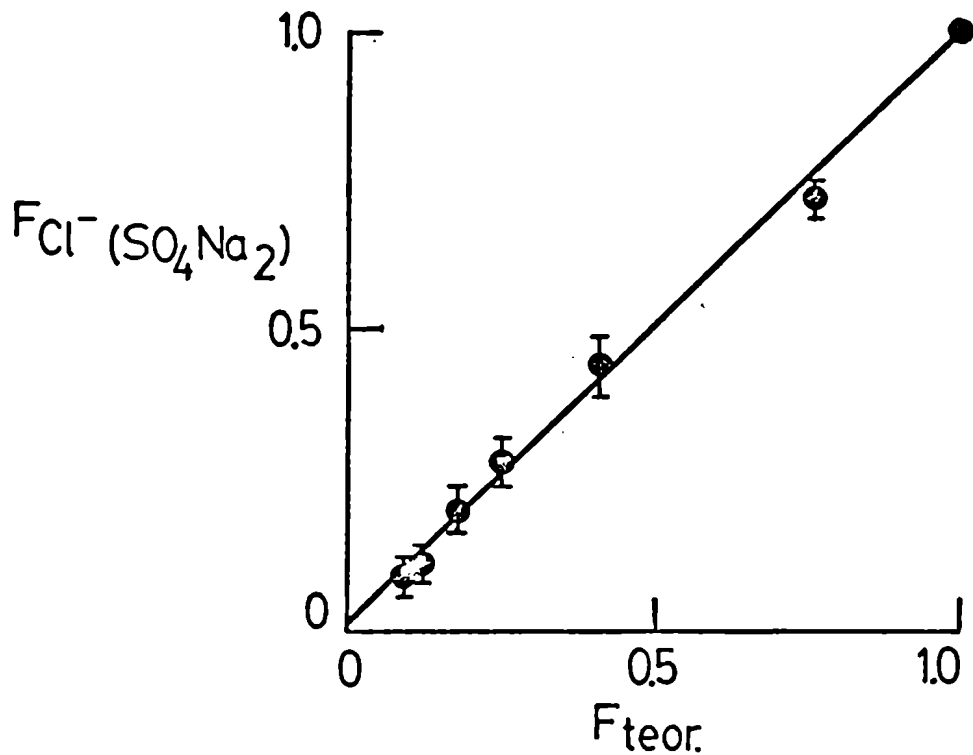


Figura III.3: Recta de regresión entre los F obtenidos para el cambio rápido de Cl^- por SO_4^{2-} en la solución externa vs. los correspondientes F teóricos. Ordenada al origen: 0.020; pendiente: 0.967, coeficiente de correlación (r): 0.9210.

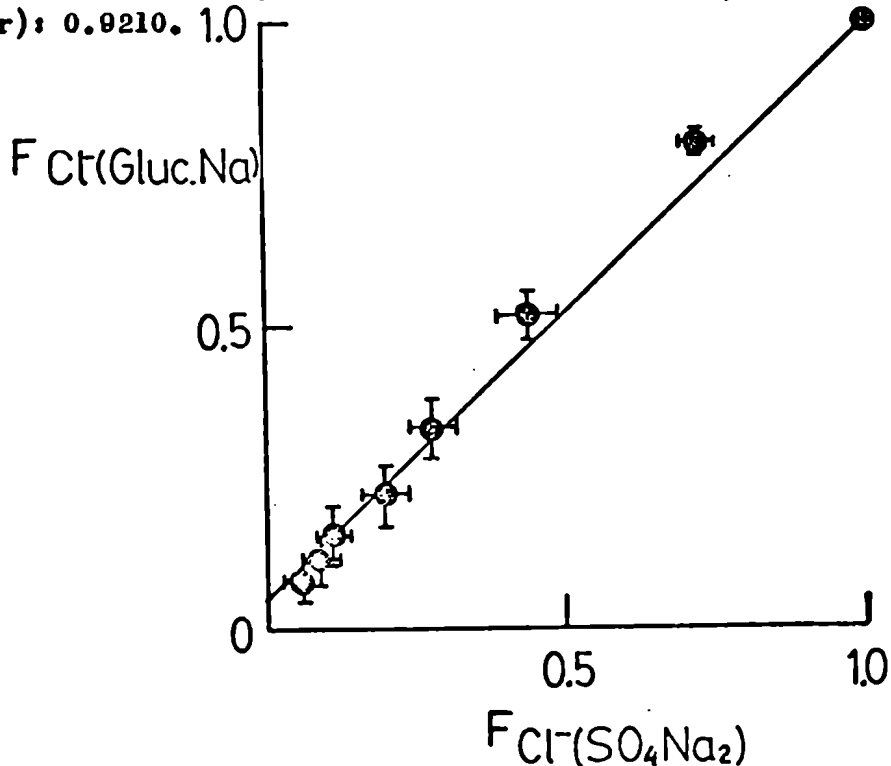


Figura III.4: Recta de regresión entre los F obtenidos para el cambio rápido de ClNa por Gluconato de Na vs. los correspondientes F obtenidos para el cambio rápido de ClNa por $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ ($r=0.9963$); pendiente: 1.0072; ordenada al origen: 0.0361.

Con el propósito de observar si el cambio de potencial era exclusivo de la presencia de cloruro o bien otros halogenuros pueden causar cambios similares, se estudió el fenómeno en presencia de Br^- . Se realizó el cambio rápido utilizando SO_4Na_2 115 mM como Ringer inicial y Br Na 115 mM como solución final. La concentración de Br^- en el Ringer inicial era de 0 mM, la de Cl^- de 3.4 mM y la de SO_4^{2-} de 52.50 mM, mientras que en el Ringer final la concentración de SO_4^{2-} era de cero, la de Cl^- de 3.4 mM y la de Br^- de 107.4 mM. La figura III.5.b. ilustra una de las curvas experimentales obtenidas donde se puede observar que el comportamiento del potencial eléctrico es cualitativamente similar a las experiencias en presencia de Cl^- . La figura III.6 representa los F experimentales obtenidos vs. tiempo para 5 determinaciones en 3 pieles distintas y la curva teórica que mejor ajusta a los datos tiene un coeficiente exponencial de 5 s^{-1} . La figura III.7 ilustra la recta de regresión entre los F experimentales del cambio rápido de Br^- vs. los F experimentales del cambio rápido de Cl^- . En ambos casos la solución externa inicial era: Ringer SO_4Na_2 115 mM, el coeficiente de correlación es de 0.9976, lo cual nos permite afirmar que el comportamiento eléctrico en presencia de Br^- es similar también cuantitativamente al de Cl^- .

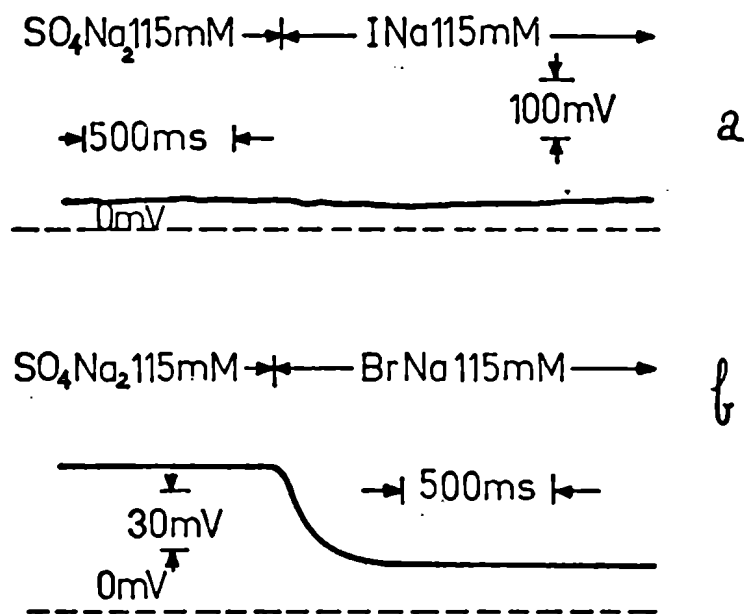


Figura III.5: Gráficos experimentales en los que se observa las modificaciones del potencial eléctrico debido a los siguientes reemplazos en la solución externa: a) Ringer I-Na 115 mM que desplaza al Ringer SO_4Na_2 115 mM, b) Ringer Br Na 115 mM que desplaza al Ringer SO_4Na_2 115 mM.

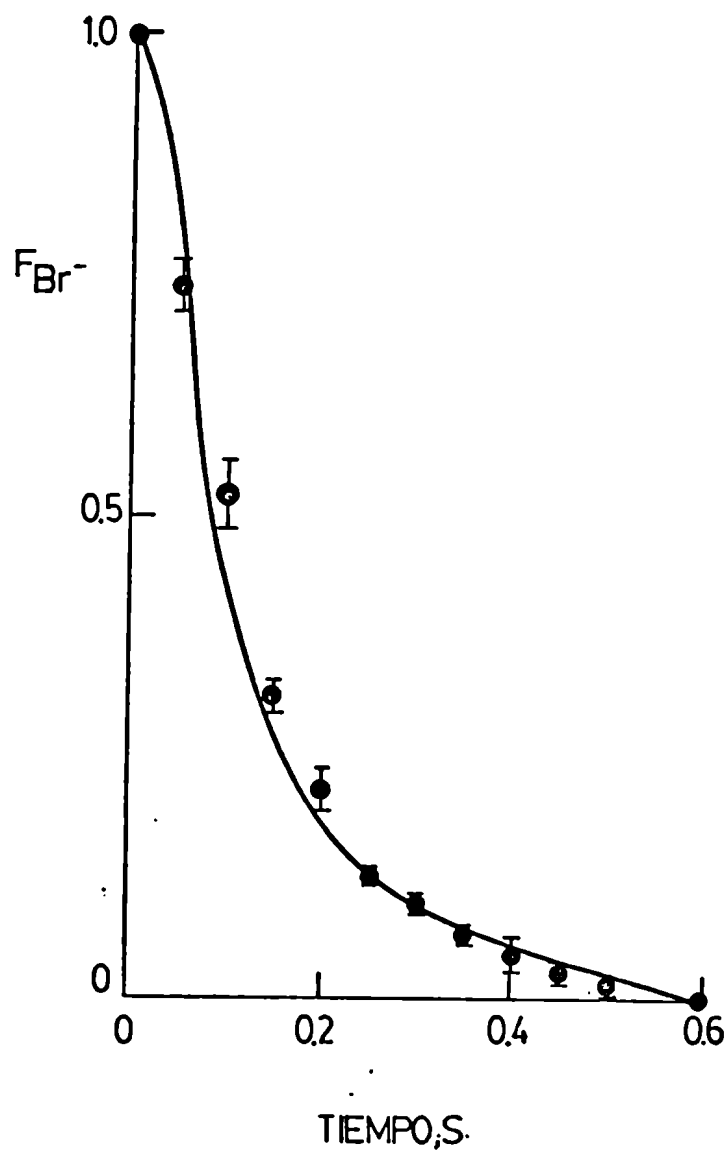


Figura III.6: Potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo para el descenso de potencial debido al siguiente reemplazo de la solución externa: Ringer inicial: SO_4Na_2 115 mM, Ringer final: Br Na 115 mM (Coeficiente exponencial $5 s^{-1}$).

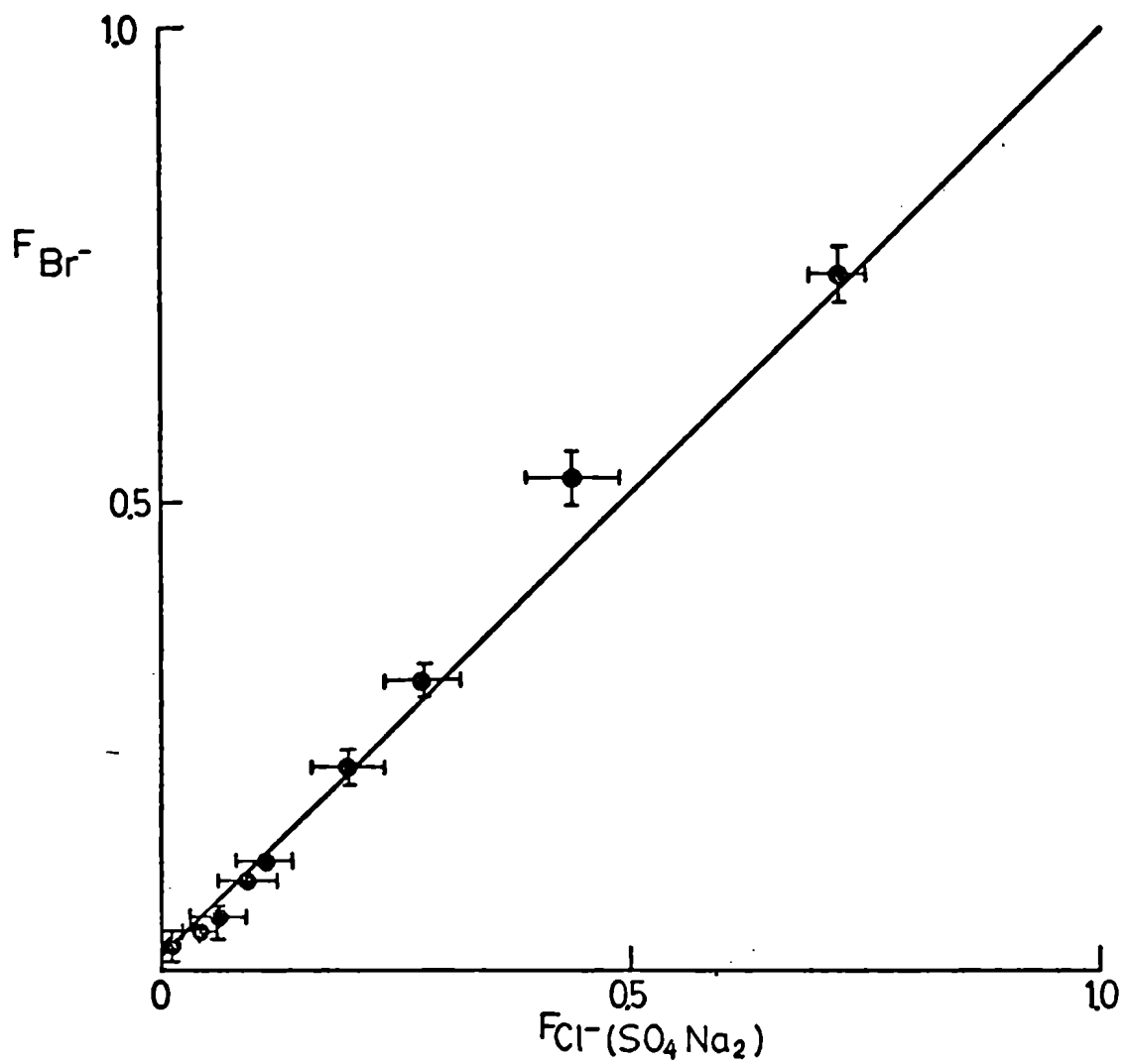


Figura III.7: Recta de regresión entre los F obtenidos para el cambio rápido de Br^- por SO_4^{2-} vs. los correspondientes F obtenidos para el cambio rápido de Cl^- por SO_4^{2-} ($1-0.9976$). Pendiente: 1.015; ordenada al origen: 0.012.

Cuando experimentos similares se realizan reemplazando Ringer SO_4Na_2 115 mM por Ringer ClNa 115 mM no se observó cambio alguno en la diferencia de potencial a través de la piel, tal como lo ilustra la figura III.5 a. Se realizaron 10 determinaciones en 3 pieles distintas.

Del gráfico de la figura III.2 se puede inferir que el parámetro exponencial adecuado para describir los datos cuando se produce el cambio de Ringer SO_4Na_2 115 mM a ClNa 115 mM es 5 s^{-1} , por lo que

$$\frac{\pi^2 D \lambda}{4 S^2} \text{Na, SO}_4\text{Na}_2 = 5 \text{ s}^{-1} \quad (3.1)$$

La determinación del coeficiente $D \text{ClNa, SO}_4\text{Na}_2$ (Tabla III.1, pág. 58) estableció que su valor es de $1.11 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, por lo cual, despejando de (3.1) se obtiene que $S = 23 \mu\text{m}$.

Un procedimiento similar con las experiencias en las que se produce el cambio rápido de Ringer ClNa 115 mM por Gluconato de Na 115 mM, permite establecer a partir del coeficiente exponencial de 4 s^{-1} y $D \text{ClNa, Gluc.Na} = 1.18 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Tabla III.1) que el camino de difusión es $S = 27 \mu\text{m}$.

Si bien el coeficiente de difusión del Br^- no fue determinado hay razones para estimar que su valor no difiere en más de un 3% del valor del Cl^- : la conductividad equivalente límite del bromuro no es significativamente distinta a la del cloruro ($[\lambda^\circ \text{Cl}^-]_{18^\circ\text{C}} = 66 \text{ cm}^2 \Omega^{-1} \text{equiv}^{-1}$ y $[\lambda^\circ \text{Br}^-]_{18^\circ\text{C}} = 68 \text{ cm}^2 \Omega^{-1} \text{equiv}^{-1}$). Por lo que hay una diferencia del orden del 3% entre ellos, los datos fueron tomados del Apéndice 6.2 de "Electrolyte Solutions" de R.A. Robinson y R.H. Stokes, Butterworths, 1968); por otra parte la dependencia entre la conductividad equivalente y la movilidad es lineal por lo que se puede suponer que, dentro de nuestro error experimental, el coeficiente de difusión D_{Br^-} es

similar a D_{Cl^-} , a partir de esta suposición y recordando que el coeficiente de la curva que mejor aproxima a los datos es de 5 s^{-1} (Figura III.6) se deduce que la longitud del camino de difusión para el Br^- será: $\delta = 23 \mu\text{m}$. En la Discusión (Cap. IV) se discute en detalle la suposición impuesta para la deducción de δ .

3- EFECTO DEL SODIO SOBRE EL POTENCIAL ELECTRICO DE LA PIEL DE RANA

a) Efecto del SO_4^{2-} como principal contra-ión.

Cerejido y col.(1974) estudiaron los cambios transitorios de la corriente en corto-circuito por un aumento rápido en la concentración de Na de la solución externa, siendo el contra-ión SO_4^{2-} . Mediante las curvas obtenidas pudieron determinar la longitud del camino de difusión δ .

Se realizaron experiencias similares pero en condiciones de circuito abierto midiéndose los cambios transitorios de la diferencia de potencial, con el propósito de obtener el valor de δ y confrontarlo con el informado por Cerejido y col., y por otro lado comparar el cambio transitorio en presencia de SO_4^{2-} con aquellos obtenidos por un aumento de la concentración de Na en presencia de una alta concentración de halogenuros permeables (Cl^- y Br^-) e impermeables a la piel (I^-).

Se montó la piel en la cámara en la que se bañó el lado interno con Ringer $ClNa$ 115 mM y el externo con Ringer SO_4Na_2 1mM en el cual la concentración de SO_4^{2-} era de 50 mM, la de Na^+ de 1 mM y la de K^+ de 51,11 mM. Después de alcanzarse el estado estacionario (en 15 minutos de exposición de la piel a las soluciones) se reemplazó la solución externa por Ringer SO_4Na_2 50mM, en el cual la concentración de SO_4^{2-} era de 50 mM, la de K^+ de 2,11 mM y la de Na^+ de 50 mM. La figura III.8 muestra los potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo obtenidos a través de 19 determinaciones en 10 pieles distintas y además la curva teórica que mejor aproxima a los datos, cuyo coeficiente exponencial es de 5 s^{-1} . Los valores obtenidos no difieren significativamente de los observados por Cerejido y col.(1974) y de los de Kidder y col. (1964).

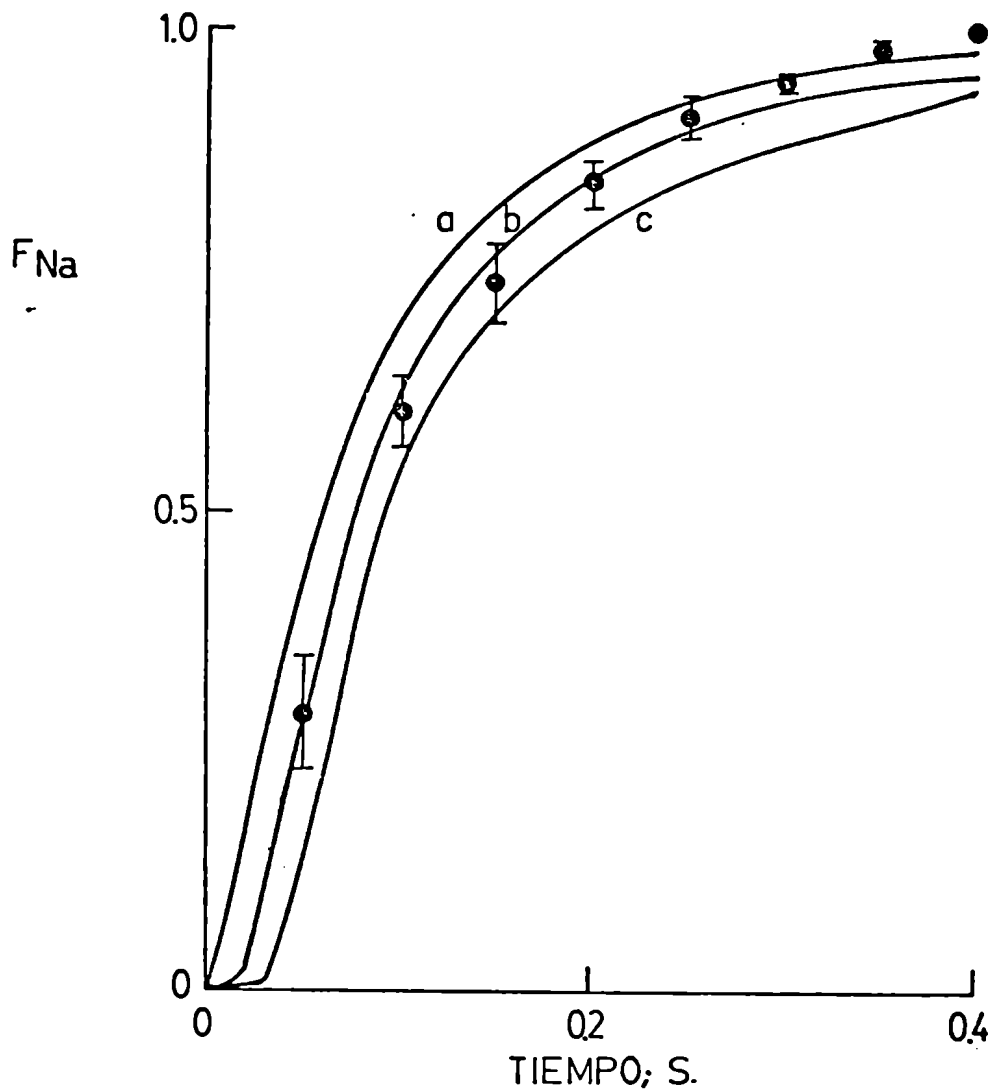


Figura III.8: Potenciales normalizadas promedio (F) vs. tiempo para el aumento de potencial debido al siguiente reemplazo de la solución externa: Ringer Inicial: $SO_4 Na_2$ 1mM, Ringer final: $SO_4 Na_2$ 50 mM. Los coeficientes exponenciales de las curvas teóricas a, b y c son: 6,5 y 4 S^{-1} , respectivamente.

b) Efecto de los halogenuros Cl^- , Br^- o I^- como principal contraión

El efecto de los halogenuros sobre el potencial eléctrico producido por cambios de la concentración externa de Na es de gran interés debido a la cinética y selectividad que se presentan.

La Figura III.9 muestra el comportamiento del potencial de una piel a la que el Na del baño externo es aumentado de 1 a 50 mM en presencia de Cl^- , Br^- y I^- respectivamente, siendo la colina el co-ión del Na.

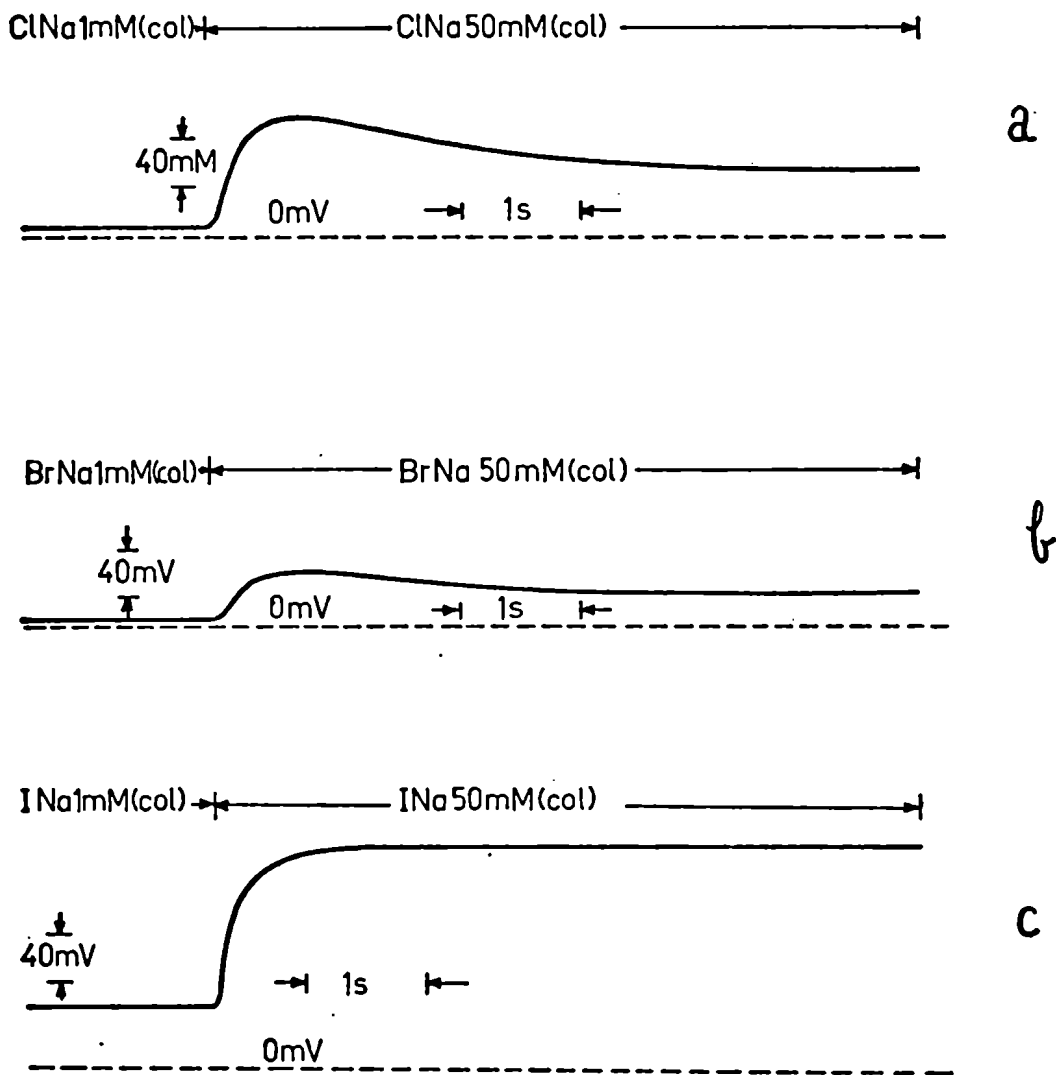


Figura III.9: Gráficos experimentales en los que se observan los cambios transitorios del potencial debidos a los siguientes reemplazos de la solución externa: a) Ringer ClNa 50 mM (colina) que reemplaza al Ringer Cl Na 1 mM (colina), b) Ringer BrNa 50 mM (colina) que desplaza al Ringer Br Na 1 mM (colina) y c) Ringer INa 50 mM (colina) en substitución del Ringer INa 1 mM (colina).

En las experiencias en las que el Cl^- era el contra-ión del Na se dejó estabilizar la piel con Ringer ClNa 1 mM (colina) en el lado externo cuya concentración de Cl^- es de 98.40 mM.

Se aumentó la concentración de Na en la solución externa mediante el cambio rápido del Ringer ClNa 1 mM (colina) por Ringer ClNa 50 mM (colina) en el que la concentración de Na es de 50 mM y la de Cl^- de 98.40 mM.

La figura III.10 ilustra los potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo obtenidos en 10 determinaciones en 6 pieles distintas y la curva teórica que mejor se ajusta a los datos, cuyo coeficiente exponencial es de 3 S^{-1} .

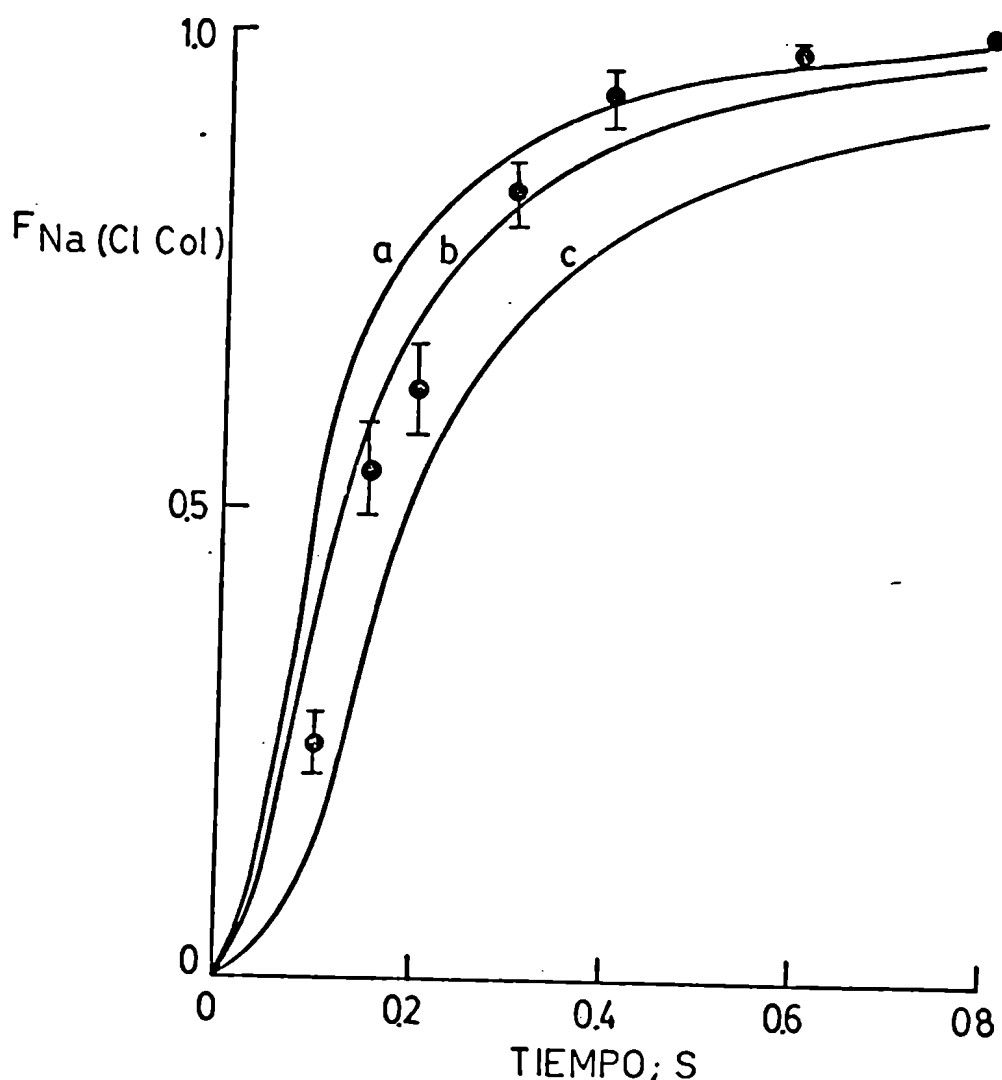


Figura III.10: Potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo para el aumento de potencial debido al siguiente remplazo de la solución externa: Ringer inicial: ClNa 1 mM (colina) y Ringer final: ClNa 50 mM (colina). Los coeficientes exponenciales de las curvas teóricas a, b y c son: 4, 3 y 2 s^{-1} respectivamente.

En otro grupo de experiencias se dejó estabilizar la piel con Ringer BrNa 1 mM (colina) como solución externa, cuya concentración de Na^+ es de 1 mM y de Br^- de 97.40 mM.

La figura III.11 representa los potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo obtenidos mediante 12 determinaciones en 6 pieles distintas en las que la solución inicial se reemplaza por Ringer BrNa 50 mM (colina). La curva teórica que mejor aproxima a los datos experimentales fue calculada con un coeficiente exponencial de 3 s^{-1} .

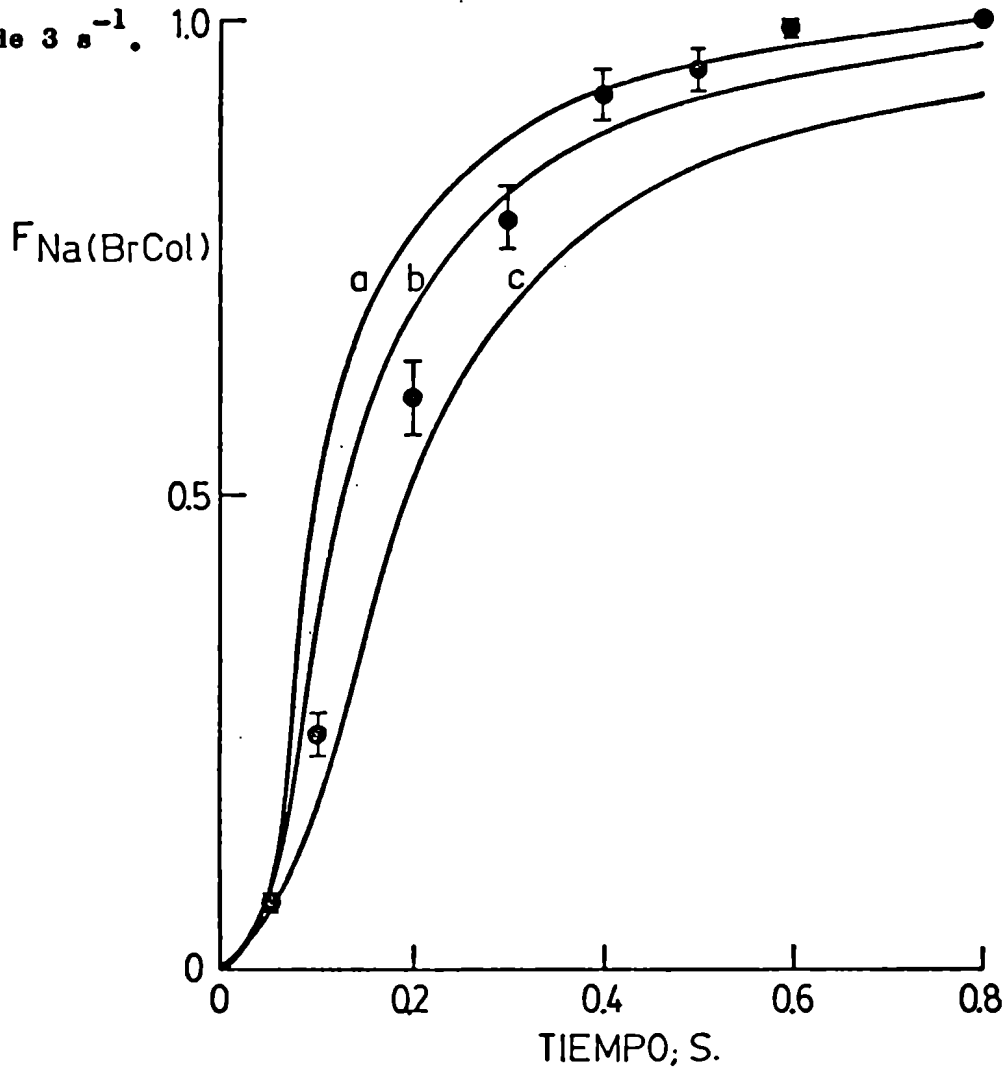


Figura III.11: Potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo para el aumento de potencial debido al siguiente reemplazo de la solución externa. Ringer inicial: BrNa 1 mM (colina), Ringer final: BrNa 50mM (colina). Los coeficientes exponenciales de las curvas teóricas a, b y c son: 4,3, y 2 s^{-1} , respectivamente.

En una tercer serie de experiencias se dejó estabilizar la piel con Ringer INa 1 mM (colina) bañando el lado externo de la piel. El Ringer externo tenía una concentración de I^- de 97.40 mM, de Na^+ de 1 mM y de colina de 96.40 mM y de colina de 47,40 mM.

La figura III.12 ilustra los potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo, obtenidos mediante 11 determinaciones en 6 pieles distintas, la curva teórica que mejor aproxima a los datos tiene como coeficiente exponencial el valor: 3 s^{-1} .

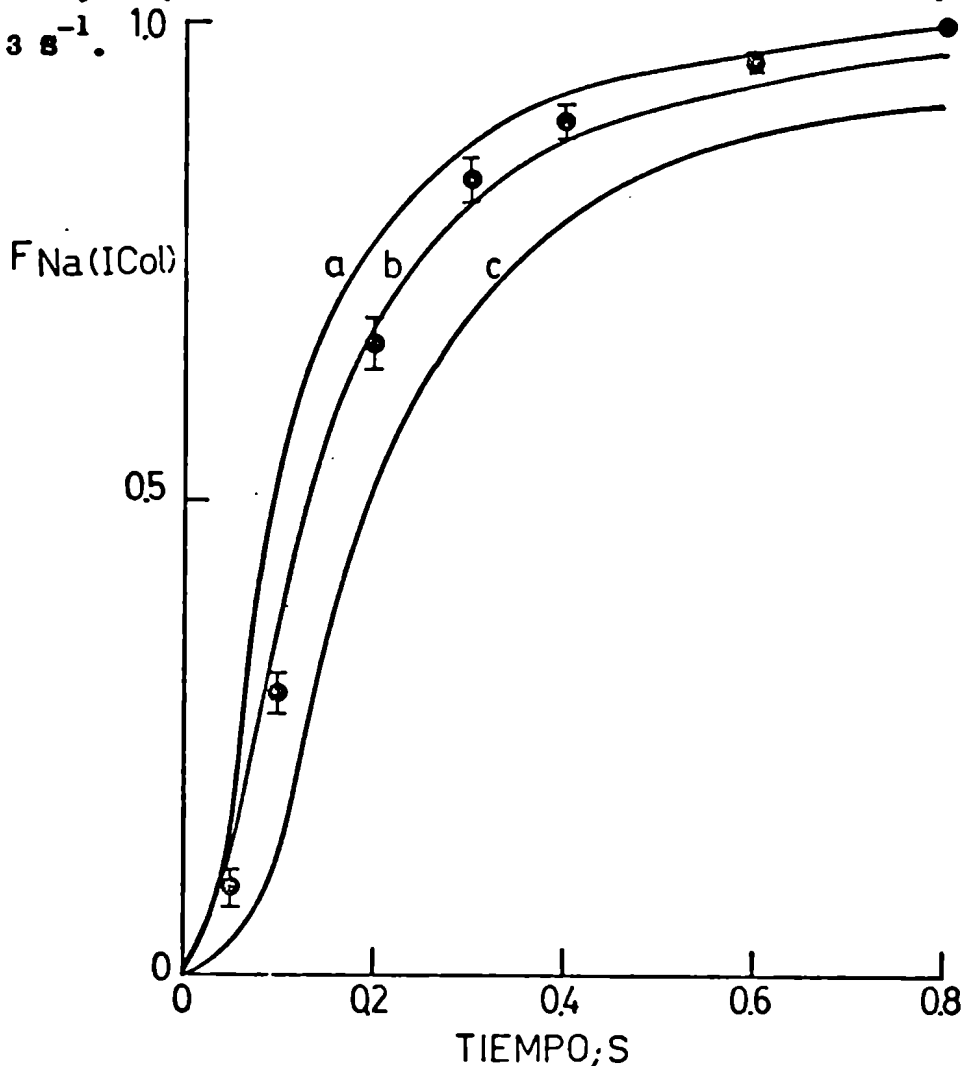


Figura III.12: Potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo para el aumento de potencial debido al siguiente reemplazo de la solución externa. Ringer inicial: INa 1 mM (colina), Ringer final: INa 50 mM (colina). Los coeficiente exponenciales de las curvas teóricas a, b y c son: 4, 3 y 2 s^{-1} respectivamente.

A fin de analizar los posibles efectos de la colina en las experiencias anteriormente descritas, se realizaron experiencias similares usando K^+ en lugar de colina como coion del Na.

La figura III.13 muestra el comportamiento del potencial de una piel a la que el Na del baño externo es aumentado de 1 a 50 mM en presencia de Cl^- , Br^- y I^- respectivamente, siendo en este caso el potasio, el coión del Na.

En la primera serie de experiencias se dejó estabilizar el epitelio con Ringer ClNa 1 mM (K). El Ringer externo tenia una concentración de Na de 1 mM, de K^+ de 98.51 mM y de Cl^- de 98.40 mM, el mismo fue sustituido por Ringer ClNa 50 mM (K) en el cual la concentración de Na era de 50 mM, la de K de 49.51 mM y la de Cl^- de 98.40 mM.

La figura III.14 nos muestra los potenciales normalizados promedio, obtenidos mediante 15 determinaciones en 6 pieles distintas. La curva que mejor describe los datos tiene como coeficiente exponencial el valor: 2.9^{-1} .

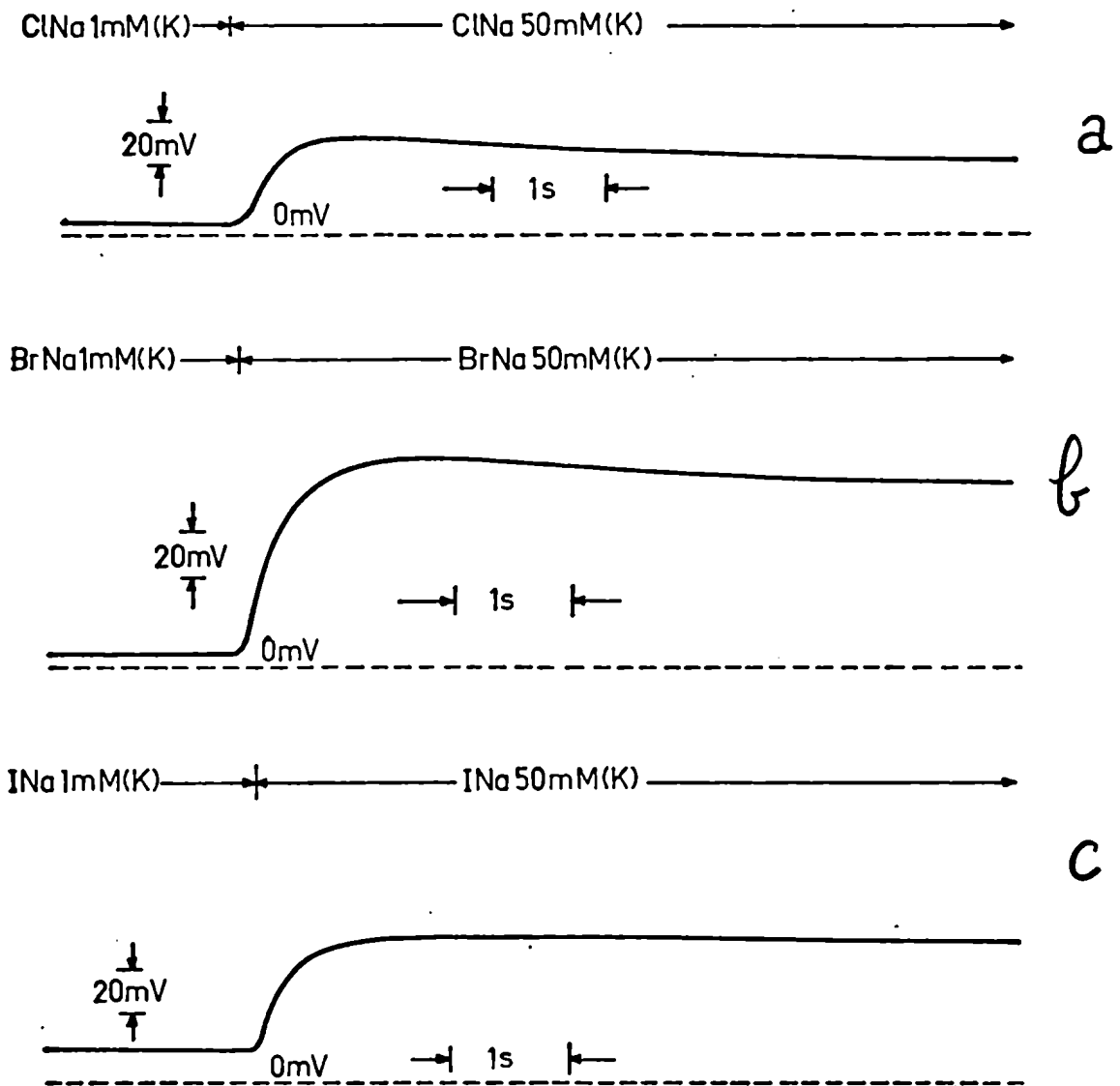


Figura III.13: Gráficos experimentales en los que se observan los cambios transitorios del potencial debidos a los siguientes reemplazos en la solución externa: a) Ringer ClNa 50 mM (K) que desplaza a Ringer ClNa 1 mM (K), b) Ringer BrNa 50 mM (K) que desplaza a Ringer BrNa 1 mM (K) y c) Ringer INa 50 mM(K) que desplaza a Ringer INa 1 mM (K).

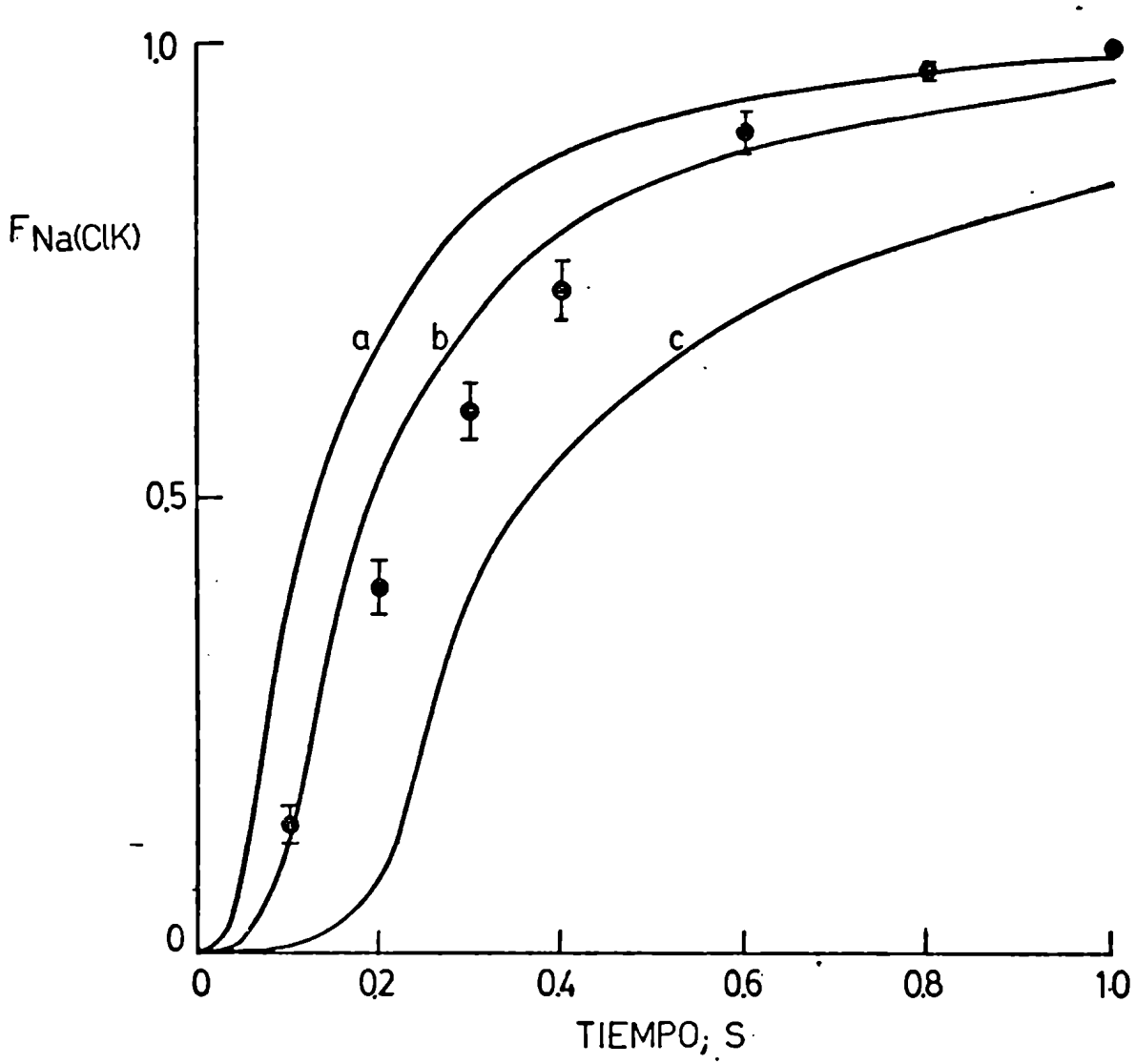


Figura III.14: Potenciales normalizados promedio (F) vs, tiempo para el aumento de potencial debido al siguiente reemplazo de la solución externa. Ringer inicial: ClNa 1 mM (K), Ringer final: E1Na 50 mM (K). Los coeficientes exponenciales de las curvas teóricas a, b y c son: 3, 2, y 1 S^{-1} , respectivamente.

En la segunda serie de experiencias se dejó estabilizar la piel con Ringer BrNa 1 mM(K) como solución externa en la cual la concentración de Br^- era de 97.40 mM, la de K^+ de 98.51 mM y la de Na^+ de 1 mM, y mediante un cambio rápido se la reemplazó por Ringer BrNa 50 mM(K) en la cual la concentración de Br^- era de 97.40 mM, la de Na^+ de 50 mM y la de K de 49.51. En ambas soluciones la concentración de Cl^- fue de 1 mM.

La figura III.15 nos muestra los potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo, obtenidos mediante 10 determinaciones en 6 pieles distintas, con la curva que mejor se ajusta a los datos cuyo coeficiente exponencial es de 2 s^{-1} .

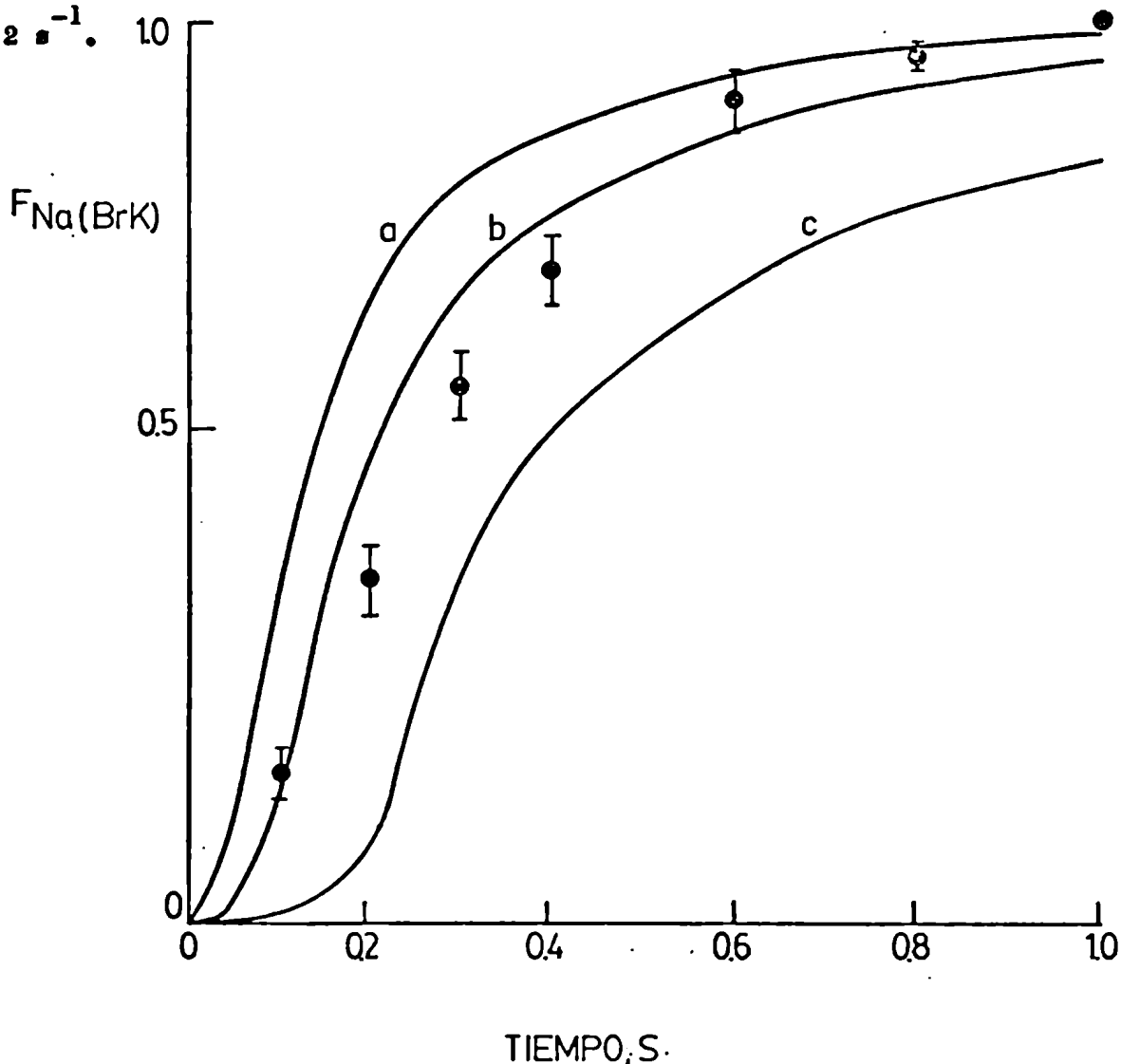


Figura III.15: Potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo para el aumento de potencial debido al siguiente reemplazo de la solución externa. Ringer inicial: BrNa 1 mM(K), Ringer final: BrNa 50 mM(K). Los coeficientes exponenciales de las curvas teóricas a, b y c son: 3, 2, y 1 s^{-1} , respectivamente.

En la tercer serie de experiencias se dejó estabilizar la piel con Ringer INa 1 mM(K) como solución externa en la cual la concentración de I^- era de 97.40 mM, la de K^+ de 98.51 mM, y la de Na^+ de 1 mM la que se reemplazó por Ringer INa 50 mM (K) en la cual la concentración de I^- era de 97.40 mM, la de K de 49.51 mM y la de Na de 50 mM. En ambas soluciones la concentración de Cl^- fue de 1 mM. Durante toda la experiencia el Ringer interno fue ClNa 115 mM. La figura III.16 nos ilustra los potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo, obtenidos mediante 7 determinaciones en 5 pieles distintas, y la curva que mejor aproxima a los datos cuyo coeficiente exponencial es de $2 s^{-1}$.

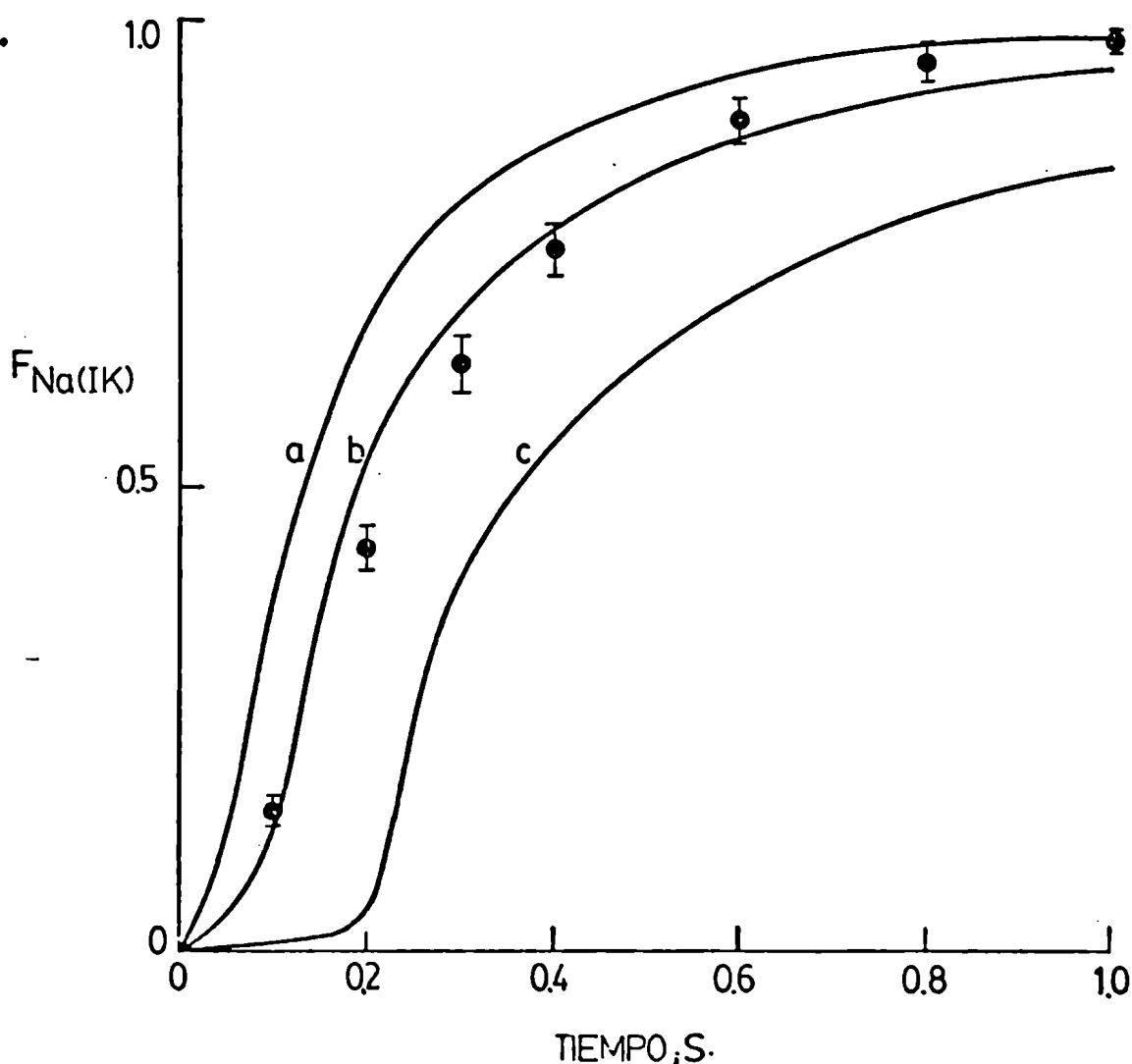


Figura III.16: Potenciales normalizados promedio (F) vs. tiempo para el aumento de potencial debido al siguiente reemplazo en la solución externa: Ringer inicial: INa 1 mM(K), y Ringer final: INa 50 mM(K). Los coeficientes exponenciales de las curvas teóricas *a*, *b* y *c* son: 3, 2 y $1 s^{-1}$ respectivamente.

De las figuras III.10, III.11 y III.12 se infiere que la curva teórica que mejor aproxima a los datos experimentales es aquella cuyo coeficiente exponencial es de 3 s^{-1} . A partir de este y considerando que $5 \times 10^{-6} < D_{\text{Na}} < 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (la elección de estos valores para D_{Na} se discute en detalle en el capítulo siguiente), se puede establecer que en presencia de los halogenuros Cl^- , Br^- o I^- , cuando la colina es el principal coión, el espesor δ del camino de difusión del Na es de $20 < \delta < 29 \mu\text{m}$.

Se realizaron entonces otro grupo de experiencias reemplazando la colina por K, con la finalidad de aclarar la posible influencia del coión sobre la difusión del Na en la capa de agua no mezclada. De las figuras III.14, III.15 y III.16 se infiere que la curva teórica que mejor aproxima a los datos es aquella cuyo coeficiente exponencial es de 2 s^{-1} . Utilizando los mismos valores que en el caso anterior para el coeficiente de difusión del Na, el espesor δ del camino de difusión de Na en pieles expuestas a una alta concentración de halogenuros (Cl^- , Br^- o I^-) en las cuales el K actuó como principal coión el δ se calculó entre 25 y 35 μm . Se observa entonces que la presencia de distintos coiones no influye significativamente en la longitud estimada del camino de difusión del Na.

Con el propósito de analizar la posible influencia del coión principal del Na (K^+ o colina) se realizaron las experiencias descritas en el apartado siguiente.

4- EFECTO DEL COION DEL SODIO SOBRE LA DIFERENCIA DE POTENCIAL ELECTRICO DE PIELES EXPUESTAS A ALTA CONCENTRACION DE HALOGENURO Y BAJA DE Na.

Para investigar la posible influencia del coión principal del Na^+ (K^+ o colina) se estudiaron los cambios transitorios en el potencial transepitelial debidos a la sustitución del K por la colina y viceversa, en la solución externa, manteniendo constantes los demás componentes de la misma.

En la primer experiencia se dejó estabilizar la piel con Ringer ClNa 1mM (Colina) como solución externa. Una vez alcanzado el estado estacionario, se introdujo Ringer ClNa 1 mM (K) que reemplazó al primero.

El Ringer ClNa 1 mM (colina) tiene una concentración de Cl^- de 98.40 mM, de colina de 98.40 mM, y el Ringer ClNa 1 mM (K) posee una concentración de K de 98.56 mM y 0 mM de colina, las concentraciones de los demás iones permanecen iguales.

En la segunda experiencia se dejó estabilizar la piel con Ringer ClNa 1 mM(K) como solución externa, y una vez alcanzado el estado estacionario se reemplazó al Ringer ClNa 1 mM (K) por Ringer ClNa 1 mM (colina).

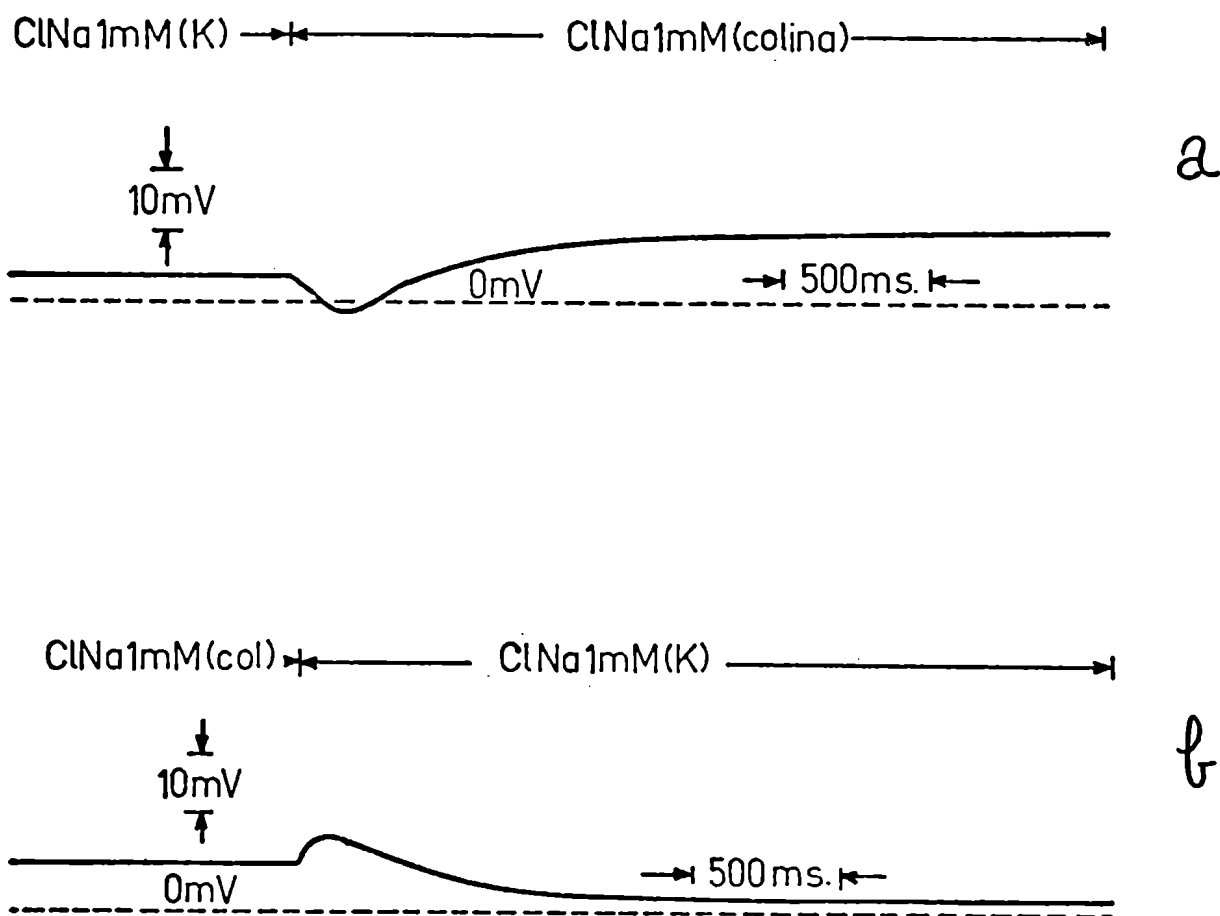


Figura III.17: Gráficos experimentales en los que se observan los cambios transitorios y estacionarios del potencial debidos a los siguientes reemplazos: a) Ringer ClNa 1 mM (colina) que desplaza a Ringer ClNa 1 mM (K) y b) Ringer ClNa 1 mM (K) que desplaza a Ringer ClNa 1 mM (colina).

La figura III.17 ilustra las curvas experimentales. En la primera de ellas ("a") se observa que la presencia de la colina determina, luego de un cambio transitorio, un aumento de potencial estacionario, mientras que al efectuarse el cambio inverso (K que desplaza a la colina, curva "b") se nota un comportamiento semejante pero con la polaridad invertida.

Esta experiencia se repitió utilizando Br^- y I^- como aniones principales obteniéndose resultados semejantes a los del Cl. Estos hechos son discutidos en el apartado 4, del próximo capítulo.

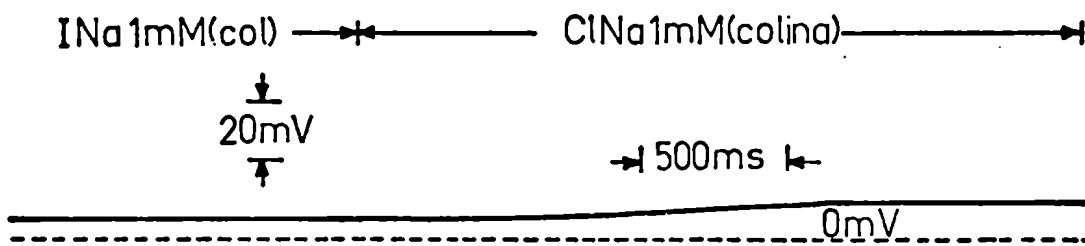
En cada serie de experiencias se realizaron 3 determinaciones en 3 pieles distintas.

5- EFECTO DEL Na SOBRE EL DESCENSO DEL POTENCIAL PRODUCIDO POR LA PRESENCIA DE HALOGENUROS PERMEABLES (Cl^- , Br^-) A LA PIEL DE RANA.

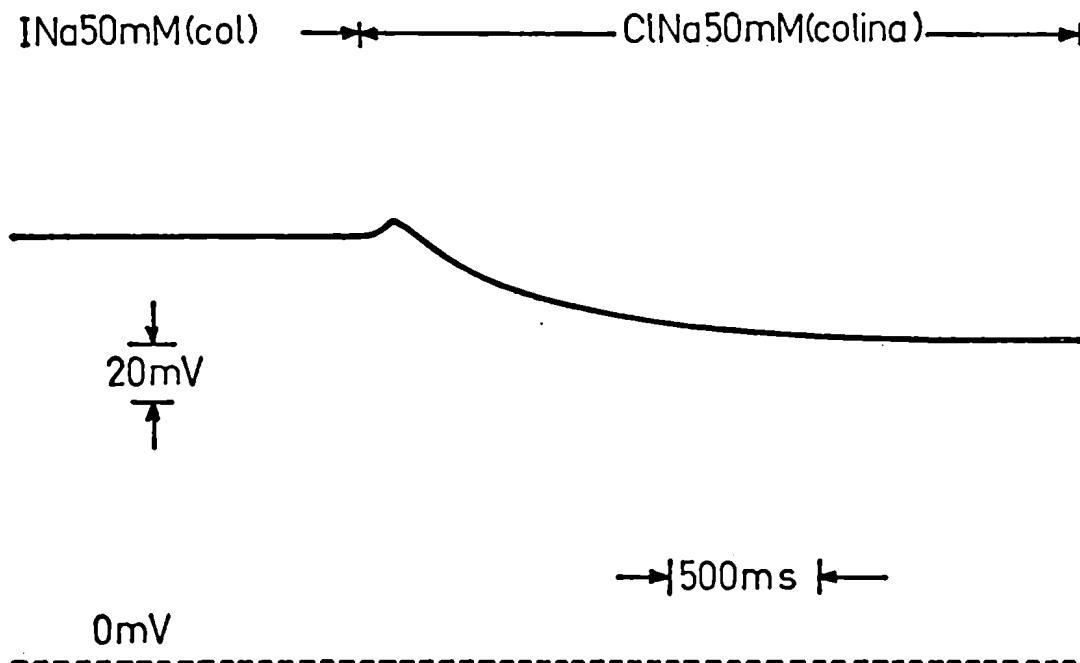
Se vio en la sección III.2 que al aumentar rápidamente la concentración del cloruro o bromuro en la solución externa, en la cual previamente el anión era impermeable (SO_4^{2-} o Glucomato) se producía un descenso rápido del potencial. Tal como se explicó oportunamente (pág. 59) se realizaron las experiencias en presencia de una alta concentración de Na para obtener un influjo máximo de halogenuro. Con el propósito de poder evaluar la importancia de la presencia de Na en el descenso del potencial debido a un aumento en la concentración de halogenuro permeables se realizaron las siguientes experiencias.

Se dejó estabilizar la piel de rana con Ringer INa 1 mM (colina) como solución externa reemplazando posteriormente al Ringer externo por Ringer ClNa 1 mM (colina). La figura III.18 a muestra que el descenso de potencial no es perceptible bajo estas condiciones.

En una segunda serie de experiencias se dejó estabilizar la piel con Ringer INa 50 mM (colina) como solución externa y mediante un cambio rápido se reemplazó al Ringer externo por Ringer ClNa 50 mM (colina). La figura III.18 b ilustra un descenso significativo en la diferencia de potencial.



a



b

Figura III.18: Gráficos en los que se observan los cambios transitorios del potencial debidos a los siguientes reemplazos; en la solución externa: a) Ringer ClNa 1 mM (colina) que desplaza a Ringer INa 1 mM (colina); b) Ringer ClNa 50 mM (colina) que desplaza a Ringer INa 50 mM (colina)

Experiencias similares en las que se empleó K como coión del Na mostraron resultados como los observados en presencia de colina. Por otra parte, cuando las mismas se realizaron en presencia de Br^- en lugar de Cl^- la respuesta del potencial fue semejante a las experiencias realizados en presencia de este último.

En cada serie de experiencias se realizaron 3 determinaciones en 3 pieles distintas.

CAPITULO IV

DISCUSION

1- DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE DIFUSION APARENTE DE CLORURO

En la Tabla III.1 se resumen los datos experimentales obtenidos para las distintas experiencias de difusión. En la primera se analizó la difusión del ^{36}Cl del Ringer ClNa 115 mM contra agua destilada, para poder calcular el valor de β , constante de la cámara, tal como se explica en la página 55. Se ha supuesto (pág. 55) que bajo estas condiciones el coeficiente de difusión del ClNa , D , es: $D \approx D^{\circ} = 1.35 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Este valor fue calculado utilizando la ecuación de Nernst-Hartley extrapolada a dilución infinita (Robinson y Stokes, pág. 288, 1968):

$$D^{\circ} = \frac{-RT(\nu_1 + \nu_2)}{F^2 \nu_1 |Z_1|} \frac{\lambda_1^{\circ} \cdot \lambda_2^{\circ}}{\lambda_1^{\circ} + \lambda_2^{\circ}}$$

donde: R : constante de los gases; F : constante de Faraday, T : temperatura absoluta (se consideró $T = 291 \text{ K}$), Z_i : valencia del ión i ; ν_i : número de iones i que se obtiene por disociación de la molécula en solución, λ_i° : conductancia equivalente límite del ión i ; $i = -1$ indica al catión; $i = -2$ indica al anión. Para los cálculos se ha considerado: $\lambda_{\text{Na}^+}^{\circ} = 42.8 \text{ cm}^2 \text{ Int } \mathcal{N}^{-1} \text{ equiv}^{-1}$; y $\lambda^{\circ} = 66 \text{ cm}^2 \text{ Int } \mathcal{N}^{-1} \text{ equiv}^{-1}$. Los datos fueron tomados de Robinson y Stokes (1968) pág. 465).

El D real, en esta primer serie de experiencias, no es exactamente igual a D° debido al efecto del potencial de difusión sobre la difusión del soluto, ya que el mismo determina un retardo en la velocidad del Cl^- y un aumento en la velocidad del Na^+ . Si colocásemos en una de las hemicámaras una solución de ClNa de concentración mayor a la del Ringer se evitaría al potencial de difusión, pero bajo estas condiciones el D sería $D < D^{\circ}$ (Robinson y Stokes, 1968, 513). Sin embargo, a los efectos de nuestras experiencias, el error que se introduce al utilizar la aproximación arriba considerada será menor o dentro del orden de los errores de las mediciones que requieren del conocimiento del valor de D para su elaboración posterior, tal como se explicó en el capítulo II de esta tesis.

Tal como se indicó en la página 55, mediante D° se puede determinar el valor de ϕ (constante de la cámara), y a través de él los valores de D_{Cl} para los distintos casos.

En la Tabla III.1 se observa que D_{Cl} es mayor para la difusión contra el Ringer Gluconato de Na 115 mM, que contra $SO_4 Na_2$ 115 mM; esto se explica haciendo un análisis de los flujos en los distintos casos. Cuando el Cl^- difunde contra Ringer Gluconato existen tres flujos acoplados: el del cloruro en un sentido; el del gluconato en sentido contrario y el del Na acompañando al anión más rápido (Cl^-) para mantener la neutralidad del medio. En el caso del Ringer $SO_4 Na_2$ existen cuatro flujos acoplados: el cloruro hacia un sentido, el sulfato y la sacarosa en sentido opuesto al anterior; y el sodio acompañando al más rápido (Cl^-) para mantener la neutralidad del medio. El hecho de que el cloruro difundiese en contra de dos flujos en el caso del SO_4^{2-} , y contra uno en el caso del Gluconato, explicaría que el coeficiente de difusión obtenido sea mayor en este último caso.

Con el propósito de evaluar D_{Br} se consideró que: 1°) los radios iónicos del Cl^- y Br^- difieren entre sí en un 7% ($Cl^- = 1.81 \text{ \AA}$, $Br^- = 1.95 \text{ \AA}$, Robinson y Stokes, 1968, pág. 461), 2°) las conductividades equivalentes límites para el cloruro y el bromuro entre los $0^{\circ}C-55^{\circ}C$ no difieren entre sí en más de un 4% (Robinson y Stokes, 1968, pág. 465), y 3°) los coeficientes de difusión del $ClNa$ y $BrNa$ difieren en un 7% como máximo, en el rango de concentraciones de 0-2.0 M (Robinson y Stokes, 1968, pág. 515).

Por lo que se supuso que, dentro del error experimental de los trabajos aquí descritos es lícito considerar que:

$$D_{Cl^-} = D_{Br^-}$$

2- EFECTO DE LOS HALOGENUROS SOBRE LOS CAMBIOS DE POTENCIAL ELECTRICO DE LA PIEL DE RANA.

Cuando la cara externa de la piel de rana se baña inicialmente con Ringer $SO_4 Na_2$ 115 mM y a continuación se substituye el SO_4^{2-} por Cl^- , se estableció que el potencial eléctrico transepitelial descendió al $53 \pm$ % de los valores iniciales.

En experiencias similares, en las cuales en lugar de SO_4^{2-} como anión principal se usó al gluconato; cuando éste fue reemplazado por Cl^- se comprobó que el potencial eléctrico decrecía al $55 \pm 5\%$ de los valores iniciales. Esto indicaría que en la rana Leptodactylus ocellatus la permeabilidad de la piel al cloruro es significativa. En Rana temporaria y Rana esculenta, Nagel (1977) informa haber obtenido diferencias de potencial significativamente no distintas al usar Cl^- o SO_4^{2-} como contraiones del Na^+ en el Ringer que bañaba la cara externa. De manera que la rana L. ocellatus es una especie de características diferentes a otras ranas, en lo que se refiere a permeabilidad y transporte de cloruros, sabemos que es el epitelio abdominal de rana con transporte activo de cloruro más efectivo (Zadunaisky y colab. 1963).

El valor del camino de difusión δ del cloruro a través de la capa de agua no mezclada, se estableció usando dos aniones impermeables diferentes en el Ringer inicial, el anión bivalente SO_4^{2-} y el monovalente gluconato, para el primer caso se obtuvo un camino de difusión para el cloruro de $23 \mu\text{m}$, y para el segundo de $27 \mu\text{m}$.

El coeficiente de correlación de la recta de regresión de los $F_{\text{Cl}(\text{GlucNa})}$ vs. $F_{\text{Cl}(\text{SO}_4\text{Na}_2)}$, es de 0.9963 lo cual permite concluir que el fenómeno no depende de la carga del ión impermeable que baña inicialmente a la piel.

El comportamiento del potencial eléctrico es semejante cuando un anión impermeable es reemplazado por Cl^- o Br^- , pero no cuando el anión sustituto es I^- (Fig. III.5) lo cual indicaría que la barrera en la que este potencial se genera discrimina entre los distintos halogenuros.

La Fig. III.6 nos muestra la curva teórica de difusión simple integrada en una sola dimensión en la que el coeficiente exponencial es igual a 5 s^{-1} , ajusta adecuadamente a los datos experimentales obtenidos. La Fig. III.7 muestra la recta de regresión, entre los F obtenidos para el cambio rápido de BrNa por SO_4Na_2 vs. los correspondientes F obtenidos para el cambio rápido de ClNa por SO_4Na_2 . Esta correlación indica que el comportamiento del Br^- a nivel de la barrera sensible es análogo al del Cl^- .

Se ha calculado un camino de difusión para el Br^- de $23 \mu\text{m}$, habiendo partido de la suposición que $D_{\text{Cl}^-} \approx D_{\text{Br}^-}$.

En esta discusión se ha considerado que el descenso del potencial es una expresión de la permeabilidad de la piel al anión. Podría sin embargo suponerse que el descenso se debiera a cambios de la permeabilidad de la piel no sólo al anión sino también al catión.

Sin embargo, los trabajos de Von Petery (1975) en Leptodactylus ocellatus nos permiten afirmar que en el presente estudio de la barrera externa el descenso de potencial observado se debería a un doble efecto de : a) cambio de permeabilidad y b) al influjo del anión a través de la barrera externa.

Von Petery también halló que la piel abdominal de la rana sudamericana, es permeable al Cl^- y Br^- , e impermeable al F^- y I^- . Nuestros resultados confirman esa descripción y además localizan la barrera externa sensible a los halogenuros.

Ussing (1949) midió un flujo de I^- , sin embargo en los experimentos presentados en esta tesis, así como en los de Von Petery (1975) el reemplazo de un anión impermeable por I^- no produjo modificaciones en el potencial transepitelial. Es posible que en aquellos casos en que la permeabilidad al I^- medida con un trazador radiactivo sea debida, por lo menos en parte, a la existencia de un daño de borde ("edge damage". Dobson y Kidder, 1968; Helman y Miller, 1973) ya que los potenciales de interdifusión a través de este artefacto sería muy pequeños o no detectables si se tiene en consideración que en solución libre las conductividades de SO_4^{2-} y I^- no difieren en más de un 4% (Robinson y Stokes, 1968, Apéndice 6.1).

Por lo que se puede concluir que los halogenuros permeables a la piel (Cl^- y Br^-) deben transitar un camino de difusión que oscila entre 20 a $30 \mu\text{m}$ hasta alcanzar la barrera sensible a su paso. La localización de dicha barrera en base a los valores de δ obtenidos se discuten en la próxima sección.

3- EFECTO DEL SODIO SOBRE EL POTENCIAL ELECTRICO DE LA PIEL DE RANA.

Se estudió el efecto del sodio sobre el potencial de la piel de rana en presencia de SO_4^{2-} y de los halogenuros Cl^- , Br^- o I^- ; se realizó la experiencia con los halogenuros siendo el coión principal del Na^+ en un caso la colina y en otro el K.

a- Efecto del SO_4^{2-} como principal contraión

Se ha utilizado el mismo equipo descrito por Cerejido y col. (1974); ellos realizaron la misma determinación pero siguiendo los cambios transitorios de la corriente en corto-circuito, mientras que en este caso se estudian los cambios transitorios en la diferencia de potencial.

Al comparar la figura III.8, en la que se observan los potenciales normalizados promedio obtenidos vs. tiempo y las curvas teóricas que mejor aproximan a los datos, con la figura 7 del trabajo de Cerejido y col., en la cual se observan las corrientes en corto-circuito normalizadas promedio vs. tiempo con sus respectivas curvas teóricas que mejor aproximan, se observa que no hay una diferencia significativa en la longitud y propiedades del camino de difusión al ser medido por uno u otro método.

A partir de la curva teórica que mejor aproxima a los datos experimentales fue factible estimar el espesor del camino de difusión, pero para ello fue necesario evaluar al coeficiente de difusión aparente del sodio D'_{Na} . Kidder y col. (1964) hallaron que sus datos de cambios transitorios de potencial para cambios rápidos de la concentración de Na^+ en la solución externa, se ajustan a valores de δ que se hallan acotados entre 20 y 25 μm , habiendo supuesto que D'_{Na} se halla acotado por los siguientes valores: 5×10^{-6} y $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

En ausencia de una precisa información cuantitativa, el rango de valores de D'_{Na} por ellos utilizados parece ser apropiado. Estos autores consideraron que δ representa al espesor de la capa de agua no mezclada de solución que acompaña a la membrana. Ellos realizaron también experiencias de cambio rápido utilizando una membrana de intercambio catiónico y obtuvieron un valor para la capa de agua no mezclada de 20 μm bajo condiciones moderada de agitación. Este resultado

difiere, sin embargo, del informado por Ginzburg y Katchalsky (1963), que hallaron una capa de agua no mezclada de $25 \mu\text{m}$ en membranas sintéticas, bajo condiciones de intensa agitación.

Hoshiko, Lindley y Edwards (1964) obtuvieron para el corium de la piel de rana un valor de $4.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para el D_{Na} . Dainty y House (1965) utilizando la suposición arbitraria que D_{K} (en el corium) = D_{Na} (capa de agua no mezclada de la membrana externa de la piel de rana) = $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, obtuvieron los siguientes resultados: cuando la agitación era de 120 revoluciones por minuto el espesor de la capa de agua no mezclada de la membrana externa era de $50 \mu\text{m}$, y de $200 \mu\text{m}$ para la interna. Para condiciones de agitación rigurosa (500 revoluciones por minuto) los valores fueron de 30 y $140 \mu\text{m}$ respectivamente.

Lindemann y Gebhardt (1973) encontraron que para cambios de voltaje hiperpolarizantes (solución inicial): $[\text{K}^+]$: 80 mM, $[\text{Na}^+]$: 0 mM; solución de cambios: $[\text{K}^+]$: 0 mM, $[\text{Na}^+]$: 80 mM), los valores de δ estaban acotados por 10 y $15 \mu\text{m}$. Para cambios depolarizantes encontraron que las cotas inferior y superior de δ eran: 14 y $20 \mu\text{m}$, respectivamente. El valor de D'_{Na} por ellos utilizado fue de $5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Cerejido y col. (1974), utilizaron: $D'_{\text{Na}} = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, para el análisis de los cambios transitorios de la corriente en corto-circuito, debidos a un cambio rápido en la $[\text{Na}]$ de la solución externa, encontraron que δ se halla acotado por 20 y $30 \mu\text{m}$.

Para realizar los cálculos se asumió la suposición de Kidder y col. (1964), esto es que el D'_{Na} está acotado por 5×10^{-6} y $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, y se ha hallado que δ tiene como cotas inferior y superior los valores 16 y $22 \mu\text{m}$ respectivamente. (Los cálculos se realizaron considerando que el coeficiente exponencial de la curva de mejor aproximación es: 5 s^{-1} , tal como se observa en la fig. III.8).

A lo largo de esta tesis se hizo uso del concepto del camino de difusión δ , sin embargo es necesario determinar y analizar en más detalle qué representa este valor. ¿Acaso solamente evalúa la capa de agua no mezclada o abarca también la difusión en el estrato córneo?

Gebhard, Fuchs y Lindemann (1972) escriben: "Debe tenerse en consideración—sin embargo— que la capa de agua no mezclada real contiene subcapas de material orgánico, muy probablemente incluyendo al estrato córneo, el cual contribuye aproximadamente a la mitad del espesor de dicha capa. Los coeficientes de difusión serán difícilmente iguales en estas capas. Por esta razón la localización de la membrana que responde a los cambios de concentración de la solución externa basada en los datos de retardo de potencial es dificultosa, sino imposible".

Sin embargo, los estudios de la actividad ATP-ásica total en el epitelio abdominal de la rana (Mills, Ernst y Di Bona; 1977) y los estudios cuidadosos con microelectrodos de Nagel (1976), llevaron a Fuchs, Hviid Larsen y Lindemann (1977) y a Nagel (1977) a la conclusión que existen buenas evidencias acumuladas para afirmar que la membrana que responde a los cambios de la actividad del sodio de la solución externa $[Na]_e$ se localizaría a nivel de las membranas apicales de las células del estrato granuloso. Nagel (1977) determinó los cambios en las diferencias de potencial a través de la misma en función de la concentración externa de $[Na]$ (manteniendo Na interna igual a 110 mM en todas las mediciones); halló una recta cuya pendiente es de 33.4 ± 1.8 mV/dec. $[Na]_e$. Fuchs, Larsen y Lindemann (1977) lograron evaluar la permeabilidad de dicha membrana y la variación de la misma para distintas concentraciones de sodio externo.

Tomando en cuenta estas consideraciones y teniendo presente que no se ha hallado una diferencia significativa entre los valores δ de los caminos de difusión para el Na^+ , y el Cl^- , puede inferirse que la barrera sensible al paso de los halogenuros permeables coincidiría con la del sodio; y ambas tentativamente se localizarían a nivel de las membranas apicales de las células del estrato granuloso.

b- Efecto de los halogenuros Cl^- , Br^- o I^- como principal contraión.

La figura III.9 ilustra las curvas obtenidas en el polígrafo debido a cambios rápidos en la concentración externa de Na en presencia de una alta concentración de halogenuros. Se observa que las mismas son semejantes a las obtenidas para el cambio rápido de Na cuando la piel está expuesta a una alta concentración de SO_4^{2-} (Figura II.4).

Se graficaron los valores normalizados promedio vs. el tiempo y se ajustaron las curvas teóricas que mejor aproximaban a los datos, siguiendo el mismo procedimiento que en el caso del SO_4^{2-} .

Se observa en las figuras III.10, III.11 y III.12, que la curva teórica de coeficiente exponencial 3 s^{-1} , se ajusta a los datos experimentales para los tres casos (o sea para la piel estabilizada con una alta concentración de Cl^- , Br^- o I^-). En base a esto y considerando que el coeficiente de difusión aparente del Na (D_{Na}^{a}) tiene como cotas inferior y superior a: 5×10^{-6} y $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente, se deduce que el camino de difusión δ está acotado por 20 y 29 μm . Al comparar se este valor con el hallado para el caso de ser SO_4^{2-} el contraión del Na se constata que no hay una diferencia significativa entre ambos.

Con el propósito de analizar la posible influencia de la colina en el proceso es que se han repetido las experiencias anteriores pero utilizando K como coión del Na.

La figura III.13 ilustra las curvas experimentales obtenidas para los distintos halogenuros (Cl^- , Br^- , o I^-). Las mismas son semejantes a las anteriores por lo que se graficaron los valores experimentales normalizados promedio vs. el tiempo, y las curvas teóricas que mejor aproximaban a los mismos (figuras: III.14, III.15 y III.16), cuyos coeficientes exponenciales en los tres casos es de 2 s^{-1} . A partir de esta observación y tomando, nuevamente, como cotas inferior y superior de D_{Na}^{a} a 5×10^{-6} y $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, resulta que δ está acotado por 25 y 35 μm .

De estos resultados se puede inferir que los halogenuros Cl^- , Br^- y I^- no afectan en forma particular a los cambios transitorios del potencial debidos a un aumento de la concentración del catión en la solución externa; asimismo el coión (K^+ o celina) no afectaría significativamente al camino de difusión δ del Na.

En el próximo apartado se analiza el efecto de la colina sobre la diferencia de potencial eléctrico de pieles expuestas a alta concentración de halogenuro.

4- EFECTO DE LA COLINA SOBRE LA DIFERENCIA DE POTENCIAL ELECTRICO DE PIELES EXPUESTAS A ALTA CONCENTRACION DE HALOGENUROS

El coión que acompaña al Na^+ en la solución Ringer del baño externo afectaría la evolución de los cambios transitorios de potencial que se producen por un aumento

de Na en la solución externa. Las experiencias en las que en la solución externa se intercambi6 K por colina y viceversa manteniendo el resto de los componentes constantes, permiten analizar este fenómeno.

La figura III.17, ilustra las curvas obtenidas en el poligrafo. Se observan dos componentes a los cuales se debe hacer referencia: un primer componente transitorio, posiblemente un potencial de interdifusión, que tendria su origen en la capa de agua no mezclada sobre la superficie externa de la piel, y un segundo componente que corresponde a un potencial estacionario, que no podria ser explicado por el mismo mecanismo ya que por las caracterfsticas de los potenciales en las capas de agua no mezclada estos presentan como propiedad fundamental su carácter transitorio.

En las experiencias en las que el K desplaz6 a la colina, la diferencia de potencial inicial de las pieles se hallaba entre 6-8 mV, y una vez realizado el cambio se observaron potenciales estacionarios finales entre 4-5 mV, para los distintos epitelios. Cuando el K fue reemplazado por colina, el potencial inicial que fue de 4 a 6 mV se elev6 a 6-8 mV como potencial estacionario final. El componente transitorio inicial determin6 un aumento de potencial para el cambio de K por colina, cuyo máximo oscil6 entre 3-4 mV por sobre el potencial inicial, mientras que para el cambio inverso se observ6 un descenso de potencial previo al cambio cuyo mínimo valor fue de 3-4 mV por debajo del inicial. Este componente puede interpretarse como un potencial de interdifusión de colina y potasio a nivel de la capa de agua no mezclada, ya que el fenómeno tiene lugar inmediatamente después de producido el cambio, siendo su duración mucho menor (100-150ms) que la de potenciales transitorios que se originan por la presencia de Na u otros iones para los cuales la barrera externa es sensible (600-700 ms). El hecho que la movilidad en solución libre del K es superior a la de las aminos cuaternarias apoyaria esta hipótesis, y explicaria la polaridad de dichos cambios transitorios, ya que la conductancia equivalente límite de las aminos cuaternarias tienen valores que oscilan entre 24-61% de la conductancia equivalente límite del K (Apéndice 6.1 y 6.2 de Robinson y Stokes, 1968).

La diferencia de potencial estacionario podría explicarse en base a los resultados y conclusiones de Macey y Koblick (1963) quienes han analizado el aumento de la corriente en corto-circuito cuando se reemplazaba al K^+ (o Mg^{2+}) por colina, como coión del Na.

Estos autores observaron que el principal responsable del significativo aumento de la corriente en corto-circuito (52% con respecto a la piel equilibrada con K como coión del Na, y 36% con respecto a la piel equilibrada con Mg^{2+}) era el influjo del Na a la piel (observaron un aumento del 75% del influjo del Na en presencia de colina). Por otro lado, Kirschner (1960) y Koblick (1959) observaron que la colina es levemente permeable a la piel de rana (P es 6×10^{-4} cm/h según Koblick (1959) y según Kirschner (1960) es un valor que oscila entre 4.4×10^{-4} cm/h - 8.8×10^{-4} cm/h).

El fenómeno discutido en este apartado no podría ser causado por la presencia del principal anión presente ya que se observaron resultados similares a los de Cl^- en presencia de Br^- y I^- , siendo este último impermeable a la piel.

El tiempo que media entre el cambio del coión ($K \leftrightarrow$ colina) y la estabilización del potencial transepitelial es menor de 700 ms lo que sugiere que el sitio o por lo menos uno de los sitios donde la colina manifiesta su acción sobre el potencial de la piel se localizaría a nivel de la barrera externa.

5- EFECTO DEL Na SOBRE EL DESCENSO DEL POTENCIAL PRODUCIDO POR LA PRESENCIA DE HALOGENUROS PERMEABLES (Cl^- , Br^-) A LA PIEL DE RANA.

Al compararse las figuras 18 "a y b", considerando que en los dos casos la concentración de halogenuro es siempre la misma (98.40 mM) se observa claramente que el cloruro necesita de la presencia del Na^+ para producir el fenómeno eléctrico en la piel, ya que a bajas concentraciones de Na^+ (1 mM) no se observa un cambio de potencial significativo al intercambiar I^- por Cl^- , pese a las altas concentraciones de estos aniones. Sin embargo, en presencia de una mayor concentración (50 mM) del catión, al realizarse el cambio, se observaron cambios significativos en la diferencia de potencial.

A l repetir la experiencia en Br^- , en vez de Cl^- , se obtuvieron resultados semejantes a los obtenidos cuando se introduce Cl^- , de lo cual se concluye que la.

entrada de Cl^- y Br^- a la piel es Na-dependiente, ya que como se ha aclarado previamente (pág. 88) el descenso del potencial indicaría la entrada del halogenuro al epitelio.

Los estudios que se presentan en esta tesis no sólo concuerdan con los de Von Petery (1975) que observó que "entre 2 y 9 mM de $[\text{ClNa}]_e$ se activa un canal específico para el cloruro, de modo que todo aumento posterior de $[\text{ClNa}]_e$ produce un descenso de la diferencia de potencial" sino, que establece la posible localización de la barrera responsable del fenómeno.

6- CINÉTICA DE ENTRADA DE LOS HALOGENUROS Cl^- y Br^- A LA PIEL DE RANA

La rana sudamericana Leptodactylus ocellatus, a diferencia de las ranas europeas Rana temporaria y Rana esculenta, poseen una permeabilidad significativa al Cl^- y al Br^- , mientras que son impermeables al I^- , tal como fue demostrado por Von Petery (1975) y muestran los resultados de esta tesis.

En la presente tesis se ha determinado que la barrera externa sensible al pasaje de cloruro y bromuro sería aparentemente coincidente con la del Na, y dentro del error del método, se ha demostrado que la entrada del halogenuro a la piel es Na-dependiente.

Estos hechos nos llevaron a analizar detenidamente las curvas de las experiencias en las que se estudió el efecto del Na sobre el potencial de pieles expuestas a altas concentraciones de diversos halogenuros (apartado III.3) con el fin de aclarar parcialmente, la cinética de entrada de los halogenuros a la piel de rana. Al analizar los cambios transitorios del potencial por efecto de un cambio en la concentración de Na de la solución externa en presencia de una alta concentración de halogenuro (Cl^- , Br^- , I^-) siendo la colina el coión principal del Na^+ (Figura III.9) se observa que, en presencia de halogenuros permeables (Cl^- , Br^-) una vez alcanzado el máximo valor de potencial en el proceso de difusión y entrada de Na en la piel, aparece un fenómeno de descenso de potencial que no se observa en presencia del halogenuro impermeable (I^-). Al realizar los mismos cambios rápidos en presencia del K^+ como coión del Na^+ , se observa un comportamiento análogo (Fig. III.13). La figura IV.1 ilustra un esquema general del fenómeno.

Al analizar las curvas obtenidas como resultado de cambios rápidos de la concentración de Na de la solución externa en presencia de SO_4^{2-} , tampoco se observa descenso inmediato alguno del potencial (Figura II.4).

Este fenómeno no es atribuible a una salida de colina de la piel, ya que: 1) ocurre sólo en presencia de Cl^- y Br^- , y no de I^- , y 2) ocurre en presencia de otros cationes (K). Tampoco es atribuible a cambios de la presión hidrostática de la piel por efecto de la inyección ya que si esta fuese la causa, el fenómeno se debiera ver en otras condiciones, que no fueron observadas; por ejemplo el reemplazo de halogenuros en presencia de una baja concentración de Na (Figura III.18) El fenómeno aquí descrito tampoco sería similar al observado por Lindemann y Gebhardt (1973). Los autores describieron un descenso de potencial que aparece inmediatamente después de un rápido aumento transitorio debido a un cambio rápido en la concentración de Na^+ de la solución externa en presencia de un anión impermeable (SO_4^{2-} o gluconato). Los experimentos los realizaron con epitelios aislados de Rana esculenta, Rana ridibunda y Rana temporaria, y como solución interna utilizaron un Ringer con muy alta concentración de K (95 mM). A diferencia de lo realizado por Lindemann y Gebhardt, las experiencias descritas en esta tesis fueron efectuadas en condiciones muy distintas: se utilizaron pieles completas, y la solución interna fue en todos los casos Ringer ClNa 115 mM ($[\text{K}^+]$: 2.4 mM). Para el cambio rápido de Ringer SO_4Na_2 1 mM que es reemplazado por Ringer SO_4Na_2 50 mM, observamos un cambio transitorio del potencial que alcanza su valor máximo en aproximadamente 500 ms, y no se observó en ningún caso un descenso inmediato posterior tal como informaron Lindemann y Gebhardt.

Tampoco es atribuible el fenómeno al "daño del borde" ("edge damage") causado por la presión de ajuste de los bordes de la cámara sobre la piel, pues de ser éste el caso la conductividad a través de la lesión del borde no tendría porqué presentar la selectividad que se observó ya que a través de este camino la difusión de los distintos iones debiera hacerse como en solución libre. Más aún, en el caso que existiera cierto "daño de borde", el mismo tendería a disminuir la selectividad del fenómeno ya que, en paralelo a las rutas existentes, se crearía una nueva vía inespecífica. De manera que los resultados que se presentan pueden incluso

subestimar la selectividad que la barrera externa presenta a los halogenuros. Cereijido y colaboradores (1974) informaron en sus trabajos con Lepidodactylus ocellatus del fenómeno que se estudia en esta tesis, pero no fue aclarado en aquel trabajo la posible localización del mismo y los cambios rápidos que ocurren. Los citados autores observaron que en condiciones de corto-circuito, cuando la piel está bañada por Ringer ClNa 105 mM en el lado interno y Ringer ClNa 1 mM en el lado externo, el rápido reemplazo del Ringer del lado externo por Ringer ClNa 50 mM, permitió observar en un 70% de sus determinaciones un descenso de la corriente en corto-circuito una vez alcanzado el máximo. Y en un 37% de los descensos observaron que una vez alcanzado un valor mínimo, la corriente aumentaba levemente hasta alcanzar un valor estable.

En esta tesis se describen las experiencias que establecen que cuando las pieles están bañadas en el lado externo con una solución Ringer xNa 1 mM, donde x representa a Cl^- o Br^- , siendo el coión del Na: colina o K, en un 90% de los casos se produce un descenso de potencial, una vez alcanzado el valor máximo de diferencia de potencial por efecto de una inyección de Ringer x Na 50 mM, siendo el coión del Na colina o K. En ningún caso se observó el fenómeno de descenso de potencial en presencia de aniones impermeables (SO_4^{2-} , I^-).

De los datos expuestos puede inferirse que el descenso de potencial observado es debido a la entrada retardada del halogenuro el cual necesita de la presencia de Na para poder modificar el potencial transepitelial. Por lo que el Na permitiría que la barrera externa se haga sensible al Cl^- o al Br^- .

Entre las posibilidades que podrían explicar el mecanismo por el cual activa el Na se deben mencionar: 1) que el Na, al alcanzar una concentración determinada, actúe neutralizando sitios negativos de la barrera externa de manera de permitir la entrada de Cl^- o Br^- , o bien 2) que sea el potencial a través de la barrera externa, producido por el Na el que ocasione un cambio de permeabilidad al Cl^- o Br^- .

En epitelios de baja resistencia ("leak" en la nomenclatura de Frömter y Diamond, 1972), Moreno (1975) observó que las rutas que siguen el Na^+ y el Cl^- son paralelas.

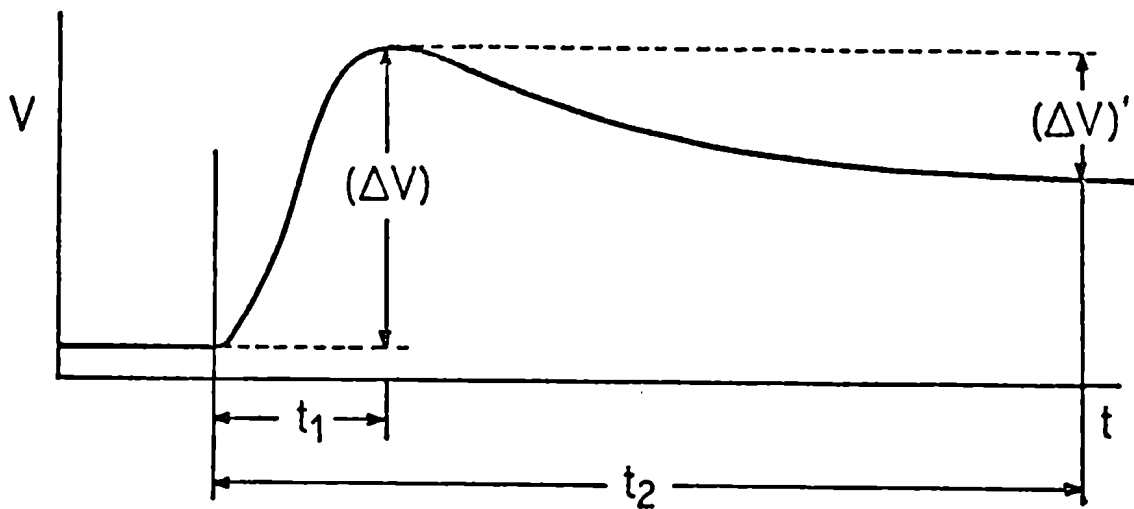


Figura IV.1: Esquema de los cambios transitorios de potencial obtenidos por un cambio rápido en la concentración de Na en el Ringer que baña la cara externa de la piel, y el posterior fenómeno de descenso de potencial. t_1 : 566 ± 30 ms, t_2 : 3.152 ± 222 ms; $\Delta V = 0.38 (\pm 0.04) \Delta V$, $n=12$ (se tomaron al azar 12 observaciones de los siguientes cambios rápidos: Ringer xNa 1 mM (colina) que es reemplazado por $x Na$ 50 mM (colina), Ringer $x Na$ 1 mM (K) que es reemplazado por Ringer xNa 50 mM (K); donde x representa Cl^- o Br^-).

Frömter (1972) y Frömter y Diamond (1972) determinaron en este tipo de epitelios que el 95% del influjo pasivo de iones ocurre a través de las "uniones estrechas" (tight junctions). Moreno (1975) determinó que existirían uniones estrechas específicas para la entrada de sodio que serían bloqueables por 2,4,6-triaminpirimidina (TAP) u drogas análogas, y serían canales hidratados de un diámetro que oscilaría entre los 10 a 20 Å, en los cuales los grupos acídicos ionizados determinarían la especificidad de los mismos, los ligandos dentro de este tipo de canales (probablemente los mismos grupos acídicos) se comportan como fuertes aceptores protónicos (Moreno y Diamond 1974 a, 1974b, 1975). Por otro lado, el mismo autor sugiere (1975) que existirían sitios específicos para la entrada del Cl^- , que son insensibles a la presencia de drogas del tipo de TAP. Balaban y Mandel (1978) estudiaron el efecto del TAP sobre un epitelio de alta resistencia ("tight") en la nomenclatura de Frömter y Diamond, 1972) y obser-

varon que el mismo inhibe al movimiento transcelular activo del Na en el epitelio abdominal de la rana, aparentemente mediante el bloqueo de la entrada del mismo a nivel de la barrera externa. Por otro lado, observaron que la amilorida, un inhibidor de la entrada de Na en la piel de rana, determina un descenso de la conductividad eléctrica en un epitelio de baja resistencia (vesícula biliar) en forma similar al TAP. Por lo que, estos autores concluyeron que, aparentemente los sitios de entrada de Na en la piel de rana y las "uniones estrechas" del epitelio de la vesícula biliar poseerían grupos reactivos similares.

Loewenstein y Kanno (1964) demostraron que en epitelios de baja resistencia existen uniones complejas intercelulares que permiten el pasaje de electrolitos de una célula a otra. Los trabajos de Korel y Leblanc (1975) y de Nagel (1976) demuestran que uniones similares existirían en los epitelios estratificados de alta resistencia. En base a dichos trabajos, Nagel (1977) concluyó que el Na que ingresa al epitelio a través de la barrera externa se distribuiría en las células de los distintos estratos por la difusión del ión a través de las uniones celulares, de manera que todas las células de este estrato participarían del transporte activo de Na.

En el presente no existen datos experimentales que permitan establecer si las conclusiones de Nagel (1976), son aplicables al epitelio abdominal de la rana Leptodactylus ocellatus, como así de la importancia de las "uniones estrechas" y de las uniones complejas intercelulares de alta conductividad en el transporte transepitelial de cloruro.

Resumiendo, los estudios de esta tesis demuestran que existe un mecanismo de entrada de los halógenos Cl^- y Br^- activado por la presencia de Na, que se localizaría a nivel de una barrera externa cuya distancia, determinada por el método cinético usado en esta tesis, se hallaría próxima al borde externo.

7- CIRCUITOS EQUIVALENTES ALTERNATIVOS QUE CONTEMPLAN EL DESCENSO DE POTENCIAL TRANSEPITELIAL DEBIDO A LA PRESENCIA DE UN HALOGENURO PERMEABLE (Cl^- , Br^-) EN LA SOLUCION EXTERNA.

En 1972, Schultz demostró que un mismo circuito equivalente explicaría los distintos perfiles de potencial observados en epitelios de alta (piel de rana, vejiga

urinaria, etc.) y baja resistencia (ileum, túbulo renal, etc.). En la figura IV.2 representamos dicho circuito.

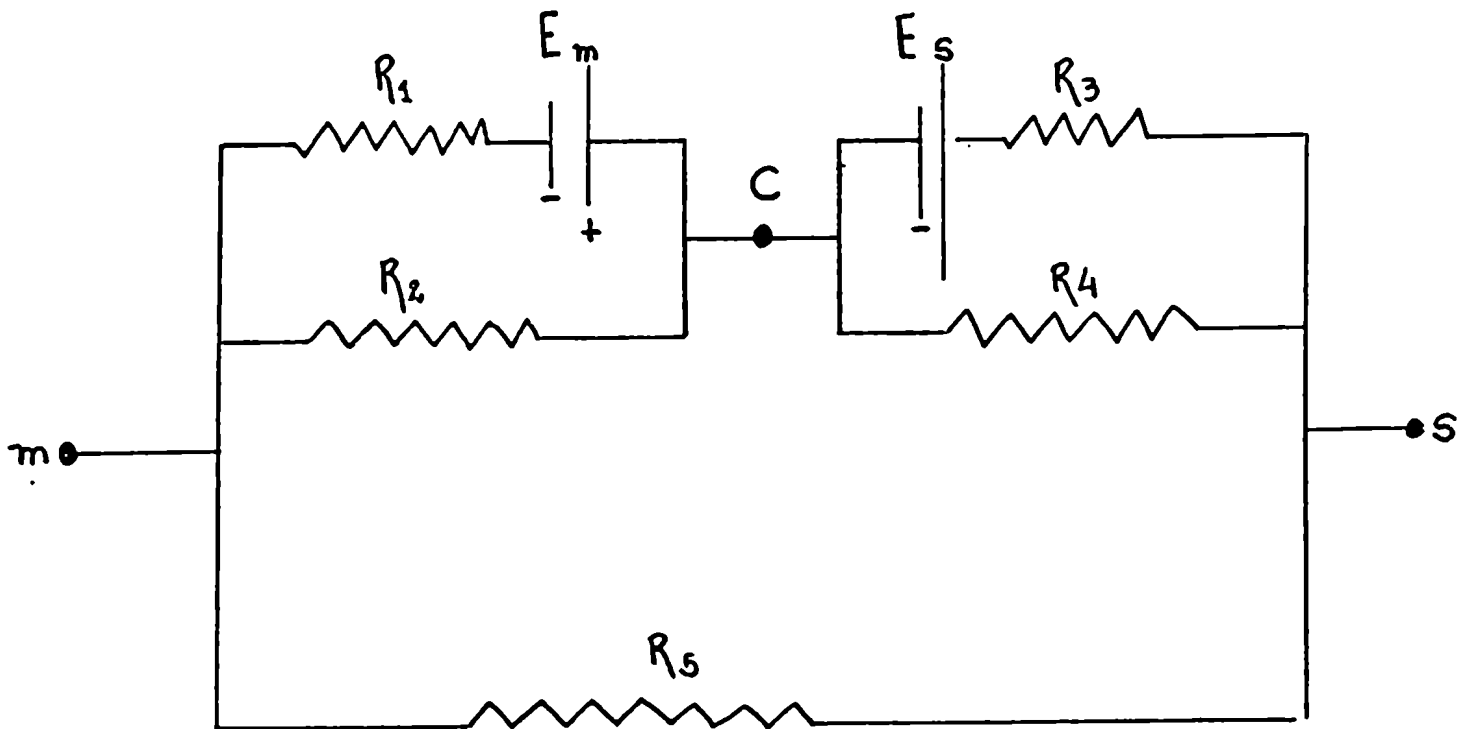


Figura IV.2: Circuito eléctrico equivalente propuesto por Schultz(1972)

Frömter y Gelber (1977) han recurrido a un circuito similar para analizar las propiedades de transporte del epitelio de la vejiga urinaria de *Necturus*, el cual es un epitelio de alta resistencia ("tight") como la piel de rana. Si bien el epitelio de la piel de rana es estratificado, es posible, en primer aproximación, aplicar los circuitos citados a tal epitelio, dado que la conductancia de los puentes intercelulares hace que sea eléctricamente análogo a los epitelios simples (Morel y Leblanc, 1975, Nagel, 1976).

Siguiendo la nomenclatura original dada por Schultz (1972) en este circuito E_m designa una fuerza electromotriz operando a través de la membrana mucosa o externa, R_1 es la resistencia interna de esta batería y R_2 es la resistencia de un camino paralelo a través de esta membrana. E_s , R_3 y R_4 son los respectivos parámetros de la membrana serosa interna. R_5 designa la resistencia de un camino paralelo transepitelial extracelular, "m", "c" y "s" representan a

los electrodos mucoso, intracelular y seroso respectivamente. Todas las diferencias de potencial eléctrico están dadas con referencia al potencia de la solución mucosa el que es considerado igual a cero. La solución de este circuito para el potencial eléctrico a través de la membrana mucosa (Ψ_{mc}) y el potencial transepitelial (Ψ_{ms}) es

$$\Psi_{mc} = \left[\left(R_3 + R_s + R_5 \right) E_m R_m - R_1 R_m E_s R_s \right] \cdot R_t^{-1} \quad (4.1)$$

$$\Psi_{ms} = \left[E_s R_s + E_m R_m \right] R_5 R_t^{-1} \quad (4.2)$$

donde:

$$R_m = R_2 \parallel R_1 + R_2$$

$$R_s = R_4 \parallel R_3 + R_4$$

$$R_t = R_1 R_m + R_3 R_s + R_5$$

Estas soluciones toman en cuenta las orientaciones de las fuerzas electromotrices como se ilustra en la figura IV.2. Así para un valor positivo de $E_m R_m$ o $E_s R_s$, indica que las baterías están orientadas como en la figura, un valor negativo indica una orientación inversa. Debe notarse que E_m está orientado en la misma dirección que E_s .

Es claro que, solamente cuando la resistencia del camino extracelular es mucho más grande que el transecelular (o sea: $R_5 \gg (R_1 R_m + R_3 R_s)$ o $(R_5 / R_t) \simeq 1$), será:

$$\Psi_{mc} = E_m R_m \quad (4.3)$$

$$\Psi_{ms} = E_s R_s + E_m R_m \quad (4.4)$$

En la presencia de un camino paralelo de baja resistencia ($R_5 / R_t \simeq 0$) la relación $R_1 R_m$ y $R_3 R_s$ simplemente definen a la magnitud mínima de $E_s R_s$ necesaria pa-

ra revertir la influencia de $E_m R_m$ sobre Ψ_{mc} . Entonces, en general, cuando las fuerzas electromotrices están orientadas como en la figura IV.2 será:

$$\Psi_{mc} < 0 \quad \text{cuando} \quad E_s R_s > \left[\left(R_3 R_s + R_5 \right) / R_1 R_m \right] E_m R_m \quad (4.5)$$

y

$$\Psi_{mc} < 0 \quad \text{cuando} \quad E_s R_s < \left[\left(R_3 R_s + R_5 \right) / R_1 R_m \right] E_m R_m \quad (4.6)$$

De esta manera es aclarado el hecho de observarse perfiles de potencial distintos para epitelios de alta y baja resistencia.

Tomando como base al citado circuito, se podría adjudicar el fenómeno de descenso de potencial a la presencia de un halogenuro permeable en la solución externa que podría producir una disminución del valor de R_1 , R_2 y/o R_5 . De esta manera el potencial de la batería E_s se haría sentir más sobre la porción del circuito análogo y dando valores adecuados se puede comprobar que podría explicarse la caída observada.

Una segunda alternativa para explicar el descenso de potencial cuando se aumenta la concentración de Na acompañado por Cl^- o Br^- , sería agregar al circuito analizado una fuerza electromotriz en paralelo y en sentido contrario a E_m , tal como se ilustra en la figura IV.3, y que representaría el potencial de difusión de Cl^- o Br^- . Sin embargo, en ambos casos esta modificación del circuito explicaría los potenciales estacionarios al principio y final de la experiencia ya que para explicar los cambios transitorios se debería recurrir a la introducción de capacitancias o bien resistencias variables.

De todas maneras una modificación de esta naturaleza se hace altamente especulativa y por consiguiente se escapa del objetivo de esta tesis.

La diferencia de potencial eléctrico transepitelial, para este circuito, tomando las mismas condiciones de cálculo que las impuestas en el caso anterior, viene dada por la siguiente expresión:

$$\Psi_{ms} = \left(E_m \frac{R}{R_1} + E_s \frac{R_s}{R_3} - E'_m \frac{R_m}{R'_1} \right) R_5 / R_m + R_s + R_5 \quad (4.7)$$

donde

$$R_m = \frac{R_1 \cdot R_1' \cdot R_2 \cdot R_2'}{R_1 + R_1' + R_2 + R_2'} \quad (4.8)$$

$$R_s = \frac{R_3 \cdot R_4}{R_3 + R_4} \quad (4.9)$$

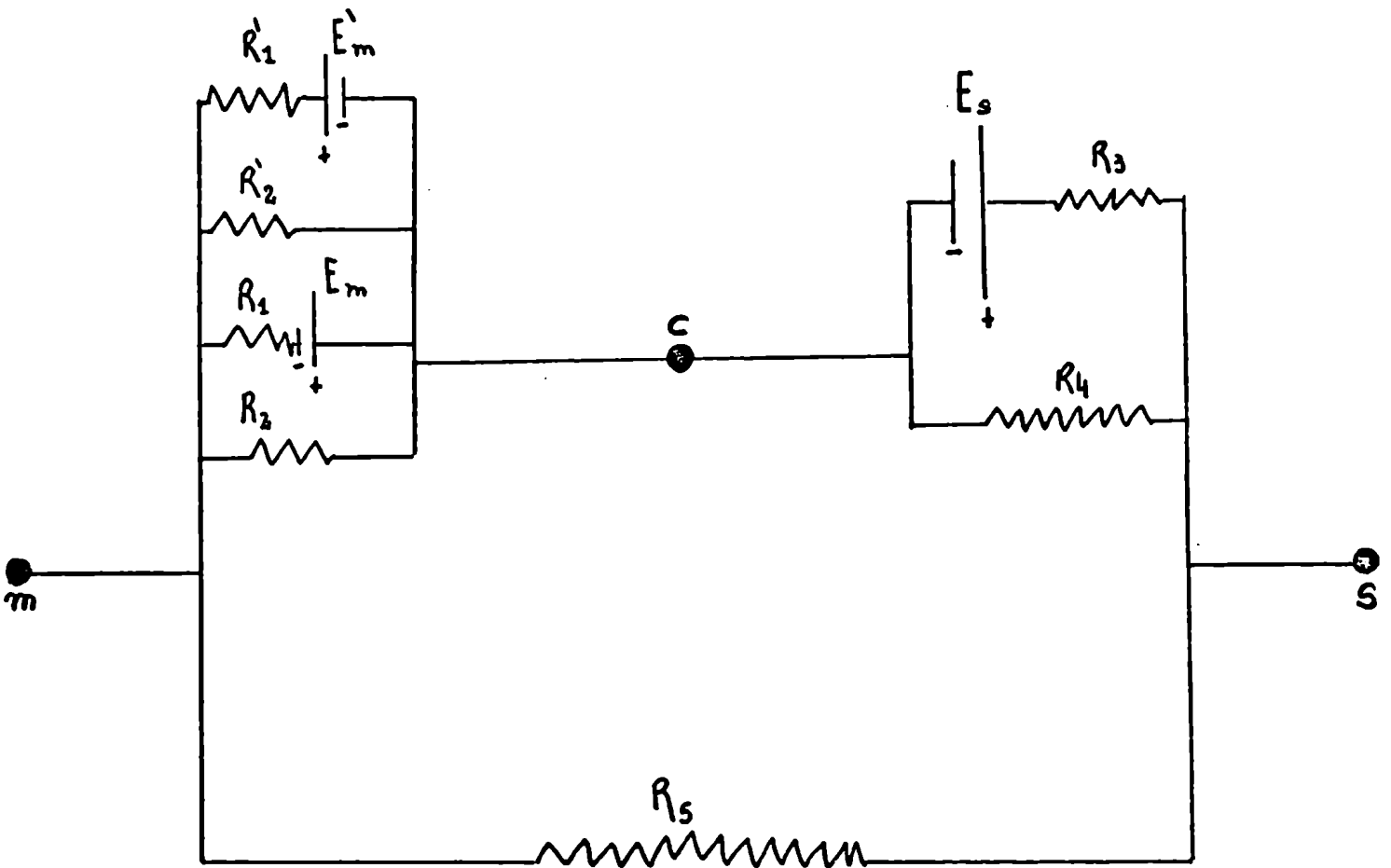


Figura IV.3: Circuito propuesto que contempla el descenso de potencial por la presencia de cloruro o bromuro en la solución externa. Ver explicaciones en el texto.

A fin de aclarar las propiedades eléctricas que se estudian en esta tesis, sería de gran utilidad un estudio mediante microelectrodos que permitirían evaluar los distintos componentes del circuito.

CAPITULO V

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Kidder y col. (1964) desarrollaron una técnica que permite seguir los cambios transitorios del potencial debidos a una rápida modificación de la concentración de Na en la solución que baña el lado externo de la piel. Utilizando la ecuación de difusión libre integrada entre 0 y δ (Crank, 1956); donde δ es el camino de difusión, y haciendo uso de la relación logarítmica entre el potencial y la concentración de Na del Ringer que baña la cara externa (Hoshiko, 1961) observaron que para ciertos valores del término exponencial las curvas teóricas describen adecuadamente los cambios transitorios del potencial eléctrico.

Ellos supusieron que δ correspondía a la capa de agua no mezclada que acompaña a la piel (Noyes y Whitney, 1897; Nernst, 1904) y supusieron que el valor de D_{Na}^0 está entre: 5×10^{-6} y $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Estos autores obtuvieron entonces valores del espesor de dicha capa entre 20 y 25 μm . Estos resultados fueron confirmados en distintas experiencias posteriores (Dainty y House, 1966; Gebhardt Fuchs y Lindemann, 1972). El análisis de los cambios transitorios de la corriente corto-circuito por efecto de un cambio rápido en la concentración de Na de la solución externa en Leptodactylus ocellatus, también permitió obtener cifras similares (Cereijido y col., 1974).

En esta tesis se han analizado los cambios de potencial que tienen lugar como consecuencia de las modificaciones o reemplazos de concentraciones de halogenuros en la solución externa; como así también la influencia que tienen estos cambios sobre los potenciales producidos por la modificación de Na.

Mediante el empleo de una técnica similar a la desarrollada por Kidder y col. (1964) se determinó el valor de δ para el caso de un aumento rápido de la concentración de Cl^- en la solución externa (anión para el cual la piel es permeable).

Este valor fue comparado con el δ obtenido para los cambios de potencial producidos por el rápido aumento de Na en la solución externa.

Este primer grupo de experiencias se realizaron reemplazando el principal anión (SO_4^{2-} o gluconato) por ión cloruro, estableciéndose que las características

de los primeros no tienen influencia sobre el camino de difusión δ .

Mediante la elaboración de los datos se han podido hallar los valores de los coeficientes exponenciales de la curva de mejor aproximación; y a partir de los mismos se pudo conocer el valor de las relaciones D'_{Cl} / δ^2 . Con el propósito de despejar δ se tuvo que evaluar D'_{Cl} .

Por ser D'_{Cl} un coeficiente de difusión de difícil evaluación teórica, se recurrió a un símil mecánico a través del cual se reprodujo parcialmente los distintos gradientes que se originan por efecto de los cambios rápidos. El método se basó en la técnica desarrollada por Kreevoy y Wewerka (1967); en el cual se determina el coeficiente de difusión mediante la medición de flujos a través de diafragmas de milipore.

Una vez hallados los valores de D'_{Cl} se pudo finalmente calcular δ . Bajo estas condiciones el camino de difusión encontrado correspondió a $23 \mu\text{m}$ para el caso en el que se utilizó SO_4^{2-} como anión inicial, y de $27 \mu\text{m}$ para el caso en el que se utilizó gluconato.

Con el propósito de observar el comportamiento de la piel de rana frente a diversos halogenuros se realizaron experiencias similares en las que se utilizó Br^- y I^- en vez de Cl^- como aniones reemplazantes de SO_4^{2-} . Para el caso de Br^- se halló que su comportamiento es semejante al del Cl^- , y el valor hallado para δ fue de $23 \mu\text{m}$. El I^- se comportó como impermeable a la piel, pues no se observaron cambios transitorios de potencial al introducir al mismo desplazando al SO_4^{2-} .

A partir de estos resultados se concluyó que: 1) de acuerdo a lo observado por von Petery (1975), el Cl^- y el Br^- producen una similar caída del potencial transepitelial cuando estos iones reemplazan a un anión impermeable mientras que el I^- se comporta como impermeable para la piel de rana, 2) la presencia de aniones bivalentes no modifica el δ de difusión del cloruro y 3) tomando en consideración que no se ha hallado una diferencia significativa entre los valores aproximados de los caminos de difusión del Na^+ y del Cl^- para cambios rápidos de su concentración en la solución externa, pudo inferirse que la barrera sensible al paso de los halogenuros permeables coincidiría, dentro del error del método, con la del Na^+ . Nagel (1977) y Fuchs y col. (1977), aportaron

evidencias que confirmarían que la membrana que responde a los cambios de la actividad del Na de la solución externa, se localizaría a nivel de las membranas apicales de las células del estrato granuloso. Por lo cual habiendo demostrado que la barrera sensible al pasaje de cloruro se localizaría al mismo nivel que la del Na se podría sugerir como sitio probable de la barrera externa al Cl^- la superficie apical de las células del estrato granuloso.

De los estudios de la cinética del Na a través de la capa de agua no mezclada y su entrada a la piel en presencia de una alta concentración de los halogenuros: Cl^- , Br^- , I^- ; en las que el principal coión fue la colina o el K^+ , se concluyó que la difusión del Na^+ en la capa de agua no mezclada y su entrada a la piel a través de la membrana externa no se ve afectada por la presencia de los distintos halogenuros.

En el caso en el cual se utilizó colina como coión del sodio, se obtuvo valores de δ entre 20 y 29 μm para todas las experiencias de la serie, mientras que cuando el coión fue el K^+ los valores de δ estaban entre 25 y 35 μm , por lo que ambos valores no diferirían.

El efecto de la colina sobre los cambios de potencial transepitelial cuando esta se encuentra presente como coión fue analizado en mayor detalle. Se estudió el efecto de la colina sobre la diferencia de potencial eléctrico de pieles expuestas a alta concentración de halogenuro y baja de Na, mediante el reemplazo rápido de colina por K y viceversa, en la solución externa. Se observaron dos componentes, uno transitorio y otro estacionario, que presentaban distinta polaridad en función del coión reemplazado. El componente transitorio fue interpretado como potencial de interdifusión de colina y potasio, que tendría lugar en la capa de agua no mezclada, mientras que el segundo componente se pudo explicar en base a los resultados y conclusiones de Macey y Koblick (1967), quienes han medido un aumento en la corriente en corto-circuito cuando reemplazaban colina por K. El análisis del tiempo de estabilización del potencial transepitelial estacionario permitió sugerir que el sitio o por lo menos uno de los sitios donde la colina manifiesta su acción sobre el potencial de la piel se localizaría a nivel de la barrera externa.

Los cambios de potencial eléctrico que se producen en presencia de los halogenuros Cl^- y Br^- son dependientes de la presencia de sodio. Esto se demostró en base a experiencias en las que se estudió la caída del potencial que produce la introducción de Cl^- o Br^- en reemplazo de I^- en presencia de bajas (1 mM) y altas (50 mM) concentraciones de Na.

Al analizar los cambios transitorios del potencial por efecto de un cambio en la concentración de Na de la solución externa en presencia de una alta concentración de halogenuro (Cl^- , Br^- , I^-) siendo colina el coión del Na (Fig. III.9) se observa que en presencia de los halogenuros permeables (Cl^- , Br^-) una vez alcanzado el máximo valor de potencial en el proceso de difusión y entrada del Na a la piel, aparece un fenómeno de descenso de potencial, y el mismo no es observado en presencia del halogenuro impermeable (I^-). Al realizar los mismos cambios rápidos en presencia de K como coión del Na, se observa un comportamiento análogo (Fig. III.13).

El incremento simultáneo de Na al que acompaña como contraión el Cl^- o el Br^- ocasiona un aumento inicial del potencial transepitelial que luego desciende para estabilizarse en un valor estacionario. El análisis de estos resultados indicaron que el incremento inicial se debe al efecto que el Na tiene sobre el potencial transepitelial mientras que la más tardía caída (566 ± 30 ms) se debería a un efecto del anión permeable (Cl^- , Br^-).

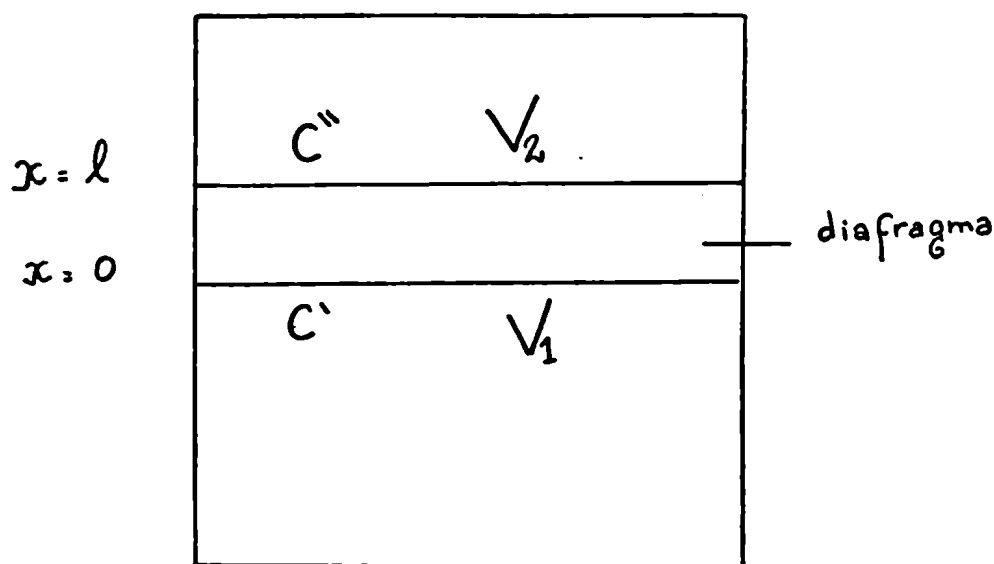
A través de un análisis de estos datos se concluyó que el descenso observado es debido a la entrada retardada del halogenuro, que necesita de la presencia de una concentración mínima de Na para poder ingresar a la piel. Estos resultados permiten sugerir la existencia, a nivel de la barrera externa, de un mecanismo de entrada para los halogenuros permeables a la piel que es activado por el Na.

Finalmente se discutió la posible localización de los sitios de entrada de los halogenuros permeables y se analizó un circuito equivalente y sus alternativas que contemplan el descenso de potencial por la presencia de un halogenuro permeable.

APENDICE

Sean dos compartimentos 1 y 2, llenos de una solución de concentración C' en 1 y C'' en 2, tal que $C' > C''$. Los compartimentos están separados por un diafragma y la sustancia C fluye estacionariamente desde 1 hacia 2.

Esquemmatizando:



Se denomina:

V_1 : volumen de la cámara inferior

V_2 : volumen de la cámara superior

A : área del diafragma

l : camino de difusión (se lo supone igual al espesor del diafragma)

C' : concentración de la sustancia a medir en el compartimento inferior

C'' : concentración de la sustancia a medir en el compartimento superior

Suponiendo que el diafragma está en estado estacionario durante la experiencia, o sea que en él no se acumula ni se pierde sustancia; entonces -a un tiempo dado- el flujo de soluto a través de un plano dado en el diafragma, paralelo a su superficie, debe ser el mismo para todo plano del mismo. Este flujo será, sin embargo, levemente variable con el tiempo, decreciendo a medida que el proceso de difusión reduzca las diferencias de concentración.

Para enfatizar este hecho, se denota al flujo como: $J(t)$

Las variaciones de C' y C'' con respecto al tiempo, se las puede entonces expresar como:

$$\frac{dc'}{dt} = J(t)A/v_1$$

$$\frac{dc''}{dt} = J(t)A/v_2$$

De donde:

$$\frac{d(c' - c'')}{dt} = J(t)A \left(\frac{1}{v_1} + \frac{1}{v_2} \right) \quad (1)$$

A continuación se introduce el valor promedio del coeficiente de difusión con respecto a la concentración sobre el rango de concentración C' a C'' que está prevaleciendo en el tiempo considerado, esta cantidad es también función del tiempo, por lo que se la denotará $\bar{D}(t)$;

$$\bar{D}(t) = \frac{1}{c' - c''} \int_{c''}^{c'} D \, dc = - \frac{1}{c' - c''} \int_{x=0}^{x=l} D \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right) dx = \frac{l J(t)}{c' - c''} \quad (2)$$

ya que $J(t) = -D \frac{\partial c}{\partial x}$ es considerado constante para todos los puntos del diafragma al tiempo t (por ser estado estacionario).

Combinando (1) y (2) queda:

$$\frac{d \ln (c' - c'')}{dt} = \frac{A}{l} \left(\frac{1}{v_1} + \frac{1}{v_2} \right) \bar{D}(t)$$

Integrando entre las condiciones iniciales y finales, utilizando la nomenclatura siguiente para las mismas:

C'_0 : concentración de C en la cámara inferior al tiempo t_0

C''_0 : concentración de C en la cámara superior al tiempo t_0

C'_t : concentración de C en la cámara inferior al tiempo t

C''_t : concentración de C en la cámara superior al tiempo t

t_0 : tiempo en el que se comienza la difusión

t : tiempo de finalización de la difusión

Se tiene:

$$\ln \frac{C'_0 - C''_0}{C'_t - C''_t} = \frac{A}{l} \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2} \right) \int_{t_0}^t \bar{D}(t) dt$$

Si se denomina β , a la constante de la celda:

$$\beta = \frac{A}{l} \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2} \right)$$

y si con \bar{D} se denota a:

$$\bar{D} = \frac{1}{t} \int_0^t \bar{D}(t) dt$$

quedando:

$$\bar{D} = \frac{1}{\beta \cdot t} \ln \frac{C'_0 - C''_0}{C'_t - C''_t} \quad (3)$$

El valor \bar{D} calculado a partir de las concentraciones iniciales y finales, y el tiempo de la experiencia mediante (3) es entonces un muy complicado doble promedio conocido con el nombre de coeficiente integrado de celda-diafragma, el que no es fácilmente convertido en forma mediata al coeficiente de difusión D . Afortunadamente fue demostrado (Gordon, 1945), que un error despreciable es introducido en todos los casos ordinarios, si en vez de usar la relación exacta:

$$\bar{D} = \frac{1}{t} \int_0^t \bar{D}(t) dt$$

se trata a la integral, como si el integrando fuese un valor constante igual a su valor cuando las concentraciones C' y C'' son la mitad de sus valores ini-

ciales y finales; éste valor constante es entonces claramente igual a \bar{D} como fue definido antes y expresado por la ecuación (3) y está relacionado al coeficiente de difusión diferencial por:

$$\bar{D} = \frac{1}{C_m' - C_m''} \int_{C_m''}^{C_m'} D \, dc \quad (4)$$

donde: $C_m' = \frac{C_o' + C_t'}{2}$ y $C_m'' = \frac{C_o'' + C_t''}{2}$

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

- Aceves, J., Erlij, D. 1971. Sodium transport across the isolated epithelium of frog skin. *J. Physiol.* 212: 195.
- Anderson, J.J., Saddington K. 1949. The use of radioactive isotopes in the study of the diffusion of ions in solution. *J. Chem. Soc.*: S 381.
- Balaban, R.S., Mandel, L.J. 1978. 2,4,6-Triaminopyrimidine (TAP) inhibition of active Na transport in frog skin. *Biophys. J.* 21: 151 a.
- Barry, P.H., Diamond, J.M., Wright E., M., 1971. The mechanism of cation permeation in rabbit gallbladder *J. Membr. Biol.* 4: 358.
- Bennett, M. 1973. Function of electrotonic junctions in embryonic and adult tissues. *Fed. Proc.* 32: 65.
- Bentley, P.J., 1962 . The effect of vasopressin on the short circuit current across the wall of isolated toad bladder *Bufo marinus*. *J. Endoc.* 21: 161.
- Bevis, M.J., James, R.J., Rider, J.B., Thomas, S. Williamson, K.A., 1975. Some effects of furosemide on chloride movement across frog (*Rana temporaria*) skin. *J. Physiol.* 245: 92 P.
- Biber, T.U.L., Chez, R.A., Curran, P.F., 1966. Na transport across frog skin at low external Na concentrations. *J. Gen. Physiol.* 49: 1161.
- Biber, T.U.L., Curran, P.F., 1970. Direct measurement uptake of sodium at the outer surface of the frog skin. *J. Gen. Physiol.* 56: 83.
- Boulpaep, E. 1971. Electrophysiological properties of proximal tubule: Importance of cellular and intracellular transport pathways. In: *Electrophysiology of Epithelial Cells.* (G. Giebisch, ed.) pp 91-Stuttgart: Schattaver.
- Bricker, N.S., Biber, T., Ussing, H. 1963. Exposure of the isolated frog skin to high potassium concentrations at the internal surface. I) Bioelectric phenomena and sodium transport. *J. Clin. Invest.* 42: 88.
- Burg, M.B., Green, N. 1973. Function of the thick ascending limb of Henle's loop. *Amer. J. Physiol.* 224: 659.
- Candia, O.A. 1973. Furosemide and ethacrynic acid effects on chloride and sodium epithelial active transport . *Fed. Proc.* 32: 245 Abs.

- Cereijido, M., Curran, P.F., 1965. Intracellular electrical potentials in frog skin. *J. Gen. Physiol.* 48: 543.
- Cereijido, M., Fraidenraich, N., 1970. Surface vs. transcellular route in the transport of sodium across epithelial membranes. In : "Horizons in surface Science: Biological Applications, edited by L. Prince and D.F. Sears. New York: Appleton-Century. Crofts.
- Cereijido, M., Herrera, F.C. Flanigan, W.J., Curran, P.F. 1964. The influence of Na concentration on Na transport across frog skin. *J. Gen. Physiol.* 47 : 879.
- Cereijido, M., Rabito, C.A., Rodriguez Boulan, E., Rotunno, C.A. 1974. The sodium-transporting compartment of the epithelium of frog skin. *J. Physiol.* 237: 555.
- Cereijido, M., Rotunno, C.A., 1967. Transport and distribution of sodium across frog skin. *J. Physiol.* 190: 481.
- Cereijido, M., Rotunno, C.A., 1968. Fluxes and distribution of sodium in frog skin. A new model. *J. Gen. Physiol.* 51: 280 S.
- Cereijido, M., Rotunno, C.A., 1971. The effect of antidiuretic hormone on Na movement across frog skin. *J. Physiol.* 213: 119.
- Crank, J., 1957. *The Mathematics of Diffusion.* London. Oxford, University Press, p.45.
- Curran, P.F., Cereijido, M., 1965. K fluxes in frog skin. *J. Gen. Physio.* 48: 1011.
- Cuthbert, A.W, 1972. A double (series) pump model for transportting epithel. *J. Theor. Biol.* 36: 555.
- Cuthbert, A.W., 1973. Evidence for multiple forms of receptors for Amiloride in Transporting Epithelia. *European J. of Pharm.* 23: 187.
- Cuthbert, A.W., Shum, W.K., 1974. Amiloride and the sodium channel. *Naunyun-Schmied ebergs Arch. Pharmacol.* 281: 261.
- Cuthbert, A.W., Shum, W.K., 1976. a. Induction of transporting sites in a sodium transporting epithelium. *J. Physiol.* 260: 223.

- Cuthbert, A.W., Shum, W.H. 1976 b. Characteristics of the entry process for sodium in transporting epithelia as revealed with amiloride. *J. Physiol.* 255: 587.
- Dainty, J., House, C.R., 1966. "Unstirred layer" in frog skin. *J. Physiol.* 182: 66.
- Dobson, J.G., Jr., Kidder, G.W., 1968. Edge damage effect in vitro frog skin preparations. *Am. J. Physiol.* 214: 719.
- Engbaek, L., Hoshiko, T. 1957. Electrical potential gradients through frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 39: 348.
- Erlj, D., Martfnez-Palomo, A., 1972. Opening of Tight Junctions in Frog Skin by Hypertonic Urea Solutions. *J. Membr. Biol.* 9: 229.
- Essig, A., Frazier, H.S., Leaf, A, 1963. Evidence for "electrogenic" active sodium in an epithelial membrane. *Nature*, 197: 701.
- Farquhar, M.G., Palade, G.E., 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell. Biol.* 17: 375.
- Farquhar, M.G., Palade, G.E., 1964. Functional organization of amphibian skin. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)* 51: 569.
- Farquhar, M.G., Palade, G.E., 1965. Cell junctions in amphibian skin. *J. Cell. Biol.* 26: 263.
- Farquhar, M.G., Palade, G.E., 1966. Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis. *J. Cell. Biol.* 30: 359,.
- Ferreira, K.G., Ferreira, H.G., Lew, V.L., 1976. On the amount of $(Na^+ + K^+)$.ATP ase available for transepithelial sodium ion transport in the amphibian skin. *Biochim Biophys. Acta* . 448: 185.
- Finn, A.L., Handler, J.S., Orloff, J. 1967. Active chloride transport in the isolated toad bladder. *Amer. J. Physiol.* 213: 179.
- Fischbarg, J., Zadunaisky, J.A., Fisch, F.W. 1967. Dependence of sodium and chloride transport on chloride concentration in isolated frog skin. *Am. J. Physiol.* 213: 963.
- Frazier, A.S., 1962. The electrical potential profile of the isolated toad bladder. *J. Gen. Physiol.* 45: 515.
- Frazier, A.S., Leaf, A, 1964, Cellular mechanisms in the control of body fluids. *Medicine (Baltimore)*, 43: 281.

- Frömter, E., 1972. The route of passive ion movement through the epithelium of Necturus gallbladder. Membr. Biol. 8: 259.
- Frömter, E., Diamond, J., 1972. Route of pasive ion permeation in epithelia. Nature, Lond. 235: 9.
- Frömter, E., Gebler, B., 1977. Electrical properties of amphibian urinary bladder epithelia. Pflügers Arch. 371: 99.
- Fuchs, W., Larsen, E.H., Lindemann, B. 1976. Current-voltage curve of sodium channels and concentration dependence of sodium permeability in frog skin. J. Physiol. 267: 137.
- Fuhrman, F.A., Ussing, H.H., 1951. A characteristic response of the isolated frog skin potential to neurohypophyseal principles and its relation to the transport of sodium and water. J. Cell. Comp. Physiol. 38: 109.
- Fukuda, T.R., 1942. Über die Bedingungen für das Zustande kommen des Asymmetrie-potentials der Froschhaut. Jap. J. Med. Sci. Part 3, 8: 123.
- Garcia Romeu, F., 1971. Anionic and cationic exchange mechanisms in the skin of anurans with special reference to Leptodactylidae in vivo. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. 262: 163.
- Garcia Romeu, F., Salibián, A., 1968. Sodium uptake and ammonia excretion through the "in vivo" skin of the South American. frog Leptodactylus ocellatus (L. 1758). Life Sci. 7: 465.
- Garcia Romeu, F., Salibián A., Pezzani-Hernandez, S., 1969. The nature of "in vivo" sodium and chloride uptake mechanisms through the epithelium of the Chilean frog Calyptocephalella gayi (Dum. et Bibr., 1841). J. Gen. Physiol. 53: 816.
- Gil Ferreira, K.T., 1968. Anionic dependence of sodium transport in the frog skin Biochim. Biophysics. Acta. 150: 587.
- Ginzburg, B.Z, Hogg, I. 1967. What does a short circuit current measure in biological systems?. J. Theret. Biol. 14: 316.
- Ginzburg, B.Z., Katchalsky, A., 1963. The frictional coefficients of the flows of noelectrolytes through artificial membranes. J.Gen. Physio. 47: 403.
- Goldman, D.E., 1943. Potential impedance and rectification in membranes. J.Gen Physiol. 27: 37.

- Gordon, A.R., 1945. The diaphragm cell method of measuring diffusion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 46: 285.
- Hartley, G.S., Runnicles, D.F., 1938. The porous diaphragm method of measuring diffusion velocity and the velocity of diffusion of potassium chloride in water. *Proce. Roy. Soc.* 168 A: 401.
- Heckmann, K., Lindemann, B., Schnakenberg, J., 1972. Current-voltage curves of porous membranes in the presence of pore blocking ions. *Biophys. J.* 12:683 .
- Helman, S.I., Fisher, R.S. 1977. Microelectrode studies of the active Na transport pathway of frog skin. *J. Gen. Physiol.* 69: 571.
- Helman, S.I., Miller, D.A., 1973. Edge damage effect on electrical measurements of frog skin *Am. J. Physiol.* 225: 972.
- Herrera, F.C., Curran, P.F., 1963. The effect of Ca and antidiuretic hormone on Na transport across frog skin. *J. Gen. Physiol.* 46: 949.
- Hodgkin, A.L., Katz, D. 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity on the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108: 37.
- Hogben, C.A., 1959. Physicochemical aspects of hydrochloric acid formation. *Amer. J. Dig. Dis.* 4: 184.
- Hoshiko, T. 1961. Electrogenesis in frog skins In: *Biophysics of Physiological and Pharmacological Actions*, edited by A.M. Shanes. Washington, D.C., AAAS, 1961, pp 31.
- Hoshiko, T., Lindley, B.D., Edwards, C., 1964. Diffusion delay in frog skin connective tissue: A source of error in tracer investigations. *Nature, Lond.* 201: 932.
- Huf, E.G., Doss, N.S., Wills, J.P., 1957. Effects of metabolic inhibitions and drugs on ion transport and oxygen consumption in isolated frog skin. *J. Gen. Physiol.* 41: 397.
- Hviid-Larsen, E., 1973. Effect of amiloride, cyamide and ouabain on the active transport pathway in toad skin. *Alfred Benzon Symposium: Transport Mechanisms in Epithelia* p. 132. Copenhagen: Munksgaard.
- Jørgensen, C.B., Levi, H., Zerahn, K., 1954. On active uptake of sodium and chloride ions in anurans. *Acta Physiol. Scand.* 30: 178.

- Kidder, G.W., Cereijido, M., Curran, P.F., 1964. Transient changes in electrical potential differences across frog skin. *Am.J.Physiol.* 207: 935.
- Kirschner, L.B., 1955. On the mechanism of active sodium transport across the frog skin. *J. Cell. Comp. Physiol.* 45: 61.
- Kirschner, L.B., 1960. Permeability of frog skin to choline. *Science N/Y.* 132:85.
- Koblick, D.C., 1959. An enzymatic ion exchange model for active sodium transport. *J. Gen. Physiol.* 42: 635.
- Koefoed-Johnsen, V., Levi, H., Ussing, G.H., 1952. The mode of passage of chloride ions through the isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 25: 150.
- Koefoed -Johnsen, V., Ussing, H.H., 1958. The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol. Scand.* 42: 298.
- Koefoed-Johnsen, V., Ussing, H.H., Zerahn, K., 1952. The origin of the short-circuit current in the adrenaline stimulated frog skin. *Acta Physiol. Scan.* 27:38.
- Kreevoy, M.M., Wewerka, E.M., 1967. A filter paper diaphragm technique for diffusion coefficients. *J. Phys. Chem.* 71: 4150.
- Kristensen, P. 1972. Chloride transport across isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 84: 338.
- Krogh, A., 1938. The active absorption of ions in some fresh water animals. *Z. Vergl. Physiol.* 25: 335.
- Lahav J., Essig, A., Roy Caplan S., 1976. The thermodynamic degree of coupling between metabolism and sodium transport in frog skin. *Biochim. Biophys. Acta* 448: 389.
- Levich, V.G., 1962. *Physicochemical Hydrodynamics*. Englewood. Cliffs:Prentice Hall.
- Lindemann, B., Gebhardt, U., 1973. Delayed changes of Na-permeability in response to steps of $[Na]_o$ at the outer surface of frog skin and frog bladder. In *Alfred Benzon Symposium. V/ Transport Mechanisms in Epithelia*, Ed. Ussing, H., Thorn, N.A., pp 115-130. Copenhagen: Munksgård .
- Lindemann, B., Van Driessche, W., 1977. Sodium specific membrane channels of frog skin are pores: Current fluctuations reveal high turnover. *Science, N.Y.* 195: 292.

- Linderholm, M., 1952. Active transport of ions through frog skin with special reference to the action of certain diuretics. *Acta Physiol. Scand.* 27, suppl. 97.
- Lindley, B.D., Hoshiko, T. 1964. The effects of alkali metal-cations and common anions on the frog skin potential. *J. Gen. Physiol.* 47: 749.
- Loewenstein, W.R., Kanno, Y., 1964. Studies on an epithelial (Gland) cell junction. *J. Cell. Biol.* 22: 565.
- Lote, C.J., 1976. Chloride transport in isolated frog (*Rana temporaria*) skin. *Pflügers Arch.* 362: 181.
- Macey, R.I., Koblick, D.C., 1963. Effects of choline and other quaternary ammonium compounds on Na movements in frog skin. *Am. J. Physiol.* 205: 1063.
- Macey, R.I., Meyers, S., 1963. Dependence of chloride permeability on sodium in the isolated frog skin. *Am. J. Physiol.* 204: 1095.
- Mac Robbie, E.A., Ussin, H.H., 1961. Osmotic behaviour of the epithelial cells of frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 53: 348.
- Mandel, L.J., Curran, P.F., 1972. Response of the frog to steady-state voltage clamping. I. The shunt pathway. *J. Gen. Physiol.* 59: 503.
- Mandel, L.J., Curran, P.F., 1973. Response of the frog skin to steady-state voltage clamping II. The active pathway. *J. Gen. Physiol.* 62: 1.
- Martin, D.W., 1964. Reversed potentials of isolated frog skin. *J. Cell. Comp. Physiol.* 63: 245.
- Martin, D.W., Curran, P.F., 1966. Reversed potentials in isolated frog skin: II Active transport of chloride. *J. Cell. Comp. Physiol.* 67: 367.
- Mc Bain, J.W., Dawson, C.R., 1935. The diffusion of potassium chloride in aqueous solution. *Proc. Roy. Soc.* 148 A: 32.
- Meyer, K.H., Bernfeld, P., 1946. The potentiometric analysis of membrane structure and its application to living animal membranes. *J. Gen. Physiol.* 29: 353.
- Morel, F., 1958. Interprétation de la mesure des flux d'ion à travers une membrane biologique comportant un "Compartiment" cellulaire; exemple des mouvements de sodium à travers la peau de grenouille, in "The Method of isotopic tracers applied to study of active ion transport", Pergamon, London.

- Morel, F., Leblanc, G., 1975. Transient Current Changes and Na compartmentalization in frog skin epithelium. *Pflügers Arch.* 358:135.
- Moreno, J.H., 1975. Blockage of gallbladder tight junction cation-selective channels by 2,4,6 -Triaminopyrimidinium (TAP). *J. Gen. Physiol.* 66: 97.
- Moreno, J.H., Diamond, J.M., 1974 a. Role of hydrogen bonding in organic cation discrimination by "tight" junction of gallbladder epithelium. *Nature (Lond.)* 247: 368.
- Moreno, J.H., Diamond, J.M., 1974.b. Discrimination of monovalent cations by "tight" junctions of gallbladder epithelium. *J. Membr.Biol.* 15: 277.
- Moreno, J.H., Diamond, J.M., 1975. Cation permeation mechanisms and cation selectivity in "tight junctions" of gallbladder epithelium. In *Membranes—A Series of Advances*, Vol. 3. G. Eisenman, editor. Marcel Dekker, New York.
- Moreno, J.H., Reisin, I.L., Rodriguez Boulan, E., Rotunno, C.A., Cerejido, M., 1973. Barriers to sodium movement across frog skin. *J. Membr. Biol.* 11:99.
- Nagel, W., 1975. Intracellular P.D. of frog skin epithelium. *Pflügers Arch.* 355: R.70.
- Nagel, W., 1976. Intercellular junctions of frog skin epithelial cells. *Nature* 264: 469.
- Nagel, W., 1976. The intracellular electrical potential profile of the frog skin epithelium. *Pflügers Arch.* 365: 135.
- Nagel, W., 1977. The dependence of the electrical potentials across the membranes of the frog skin upon the concentration of sodium in the mucosal solution. *J. Physiol.* 269: 777.
- Nernst, W., 1904. Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen. *Z. Phys. Chem.* 47: 52.
- Northrop, J.H., Anson, M.L., 1929. A method for the determination of diffusion constants and the calculations of the radius and weight of the hemoglobin molecule. *J. Gen. Physiol.* 12: 543.
- Noyes, A.A., Whitney, W.R., 1897. Ueber die Anflüungsgeschwindigkeit von festen in ihren eigenen Lösungen. *Z. Phys. Chem.* 23: 689.

- Parakkal, P.F., Matoltsy, G., 1964. A study of the fine structure of the epidermis of Rana pipiens. J. Cell. Bio. 20: 85.
- Rabito, C.A., Rodríguez Boulán, E., Cereijido, M., 1973. Effect of the composition of the inner bathing solution on transport properties of the frog skin. Biochim. Biophys. Acta, 311: 630.
- Rawlins, R., Mateu, L., Fragachan, F., Whittembury, G. 1970. Isolated toad skin epithelium: transport characteristics. Pflügers Arch. Ges. Physiol. 316:64.
- Robinson, R.A., Stokes R.A., 1968. Electrolyte solutions. Butter worths, London.
- Rotunno, C.A., Kowalewski, V., Cereijido, M., 1967. Nuclear spin resonance evidence for complexing of sodium in frog skin. Biochim. Biophys. Acta, 135:170.
- Rotunno, C.A., Zylber, E.A., Cereijido, M., 1973. Ion and water balance in the isolated epithelium of the abdominal skin of the frog Leptodactylus ocellatus. J. Membr. Biol. 13: 217.
- Schneider, W., 1975. Chloride transport in isolated frog skin of Rana esculenta. Pflügers Arch, 355: 107.
- Schultz, S.G., 1972. Electrical potential differences and electromotive forces in epithelial tissues. J. Gen. Physiol. 59: 794.
- Stokes, R.H., 1950. An improved diaphragm-cell for diffusion studies and some tests of the method. Amer. Chem. Soc. 72: 763.
- Ussing, H.H., 1948. The use of tracers in the study of active ion transport across animal membranes. Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 13: 193.
- Ussing, H.H., 1949. The distinction by means of tracers between active transport and diffusion. Acta Physiol. Scand. 19: 43.
- Ussing, H.H., 1965. Transport of electrolytes and water across epithelia. Harvey Lect. no, 59:1.
- Ussing, H.H., Windhager, E.E., 1964. Nature of shunt path and active sodium transport path through frog skin epithelium. Acta Phys. Scand. 61: 484.
- Ussing, H.H., Zerahn, K., 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Acta Physiol Scand. 23: 110.

- Van Driessche, W., Lindeman, B., 1976. Fluctuations of Na-current through the Na-selective membrane of frog skin. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 362:R 28.
- von Petery, M.V. Q. de. 1975. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- Voute, C.L., Ussing, H.H., 1970. Quantitative relation between hydrostatic pressure gradient extracellular volume and active sodium transport in the epithelium of the frog skin (R. temporaria). *Expl. Cell.Res.* 62: 375.
- Whittembury, G., 1964. Electrical potential profile of the toad skin epithelium. *J. Gen. Physiol.* 47: 795.
- Zadunaisky, J.A., Candia, O.A., 1962. Active transport of sodium and chloride by the isolated skin of the south american frog Leptodactylus ocellatus. *Nature*, 195: 1004.
- Zadunaisky, J.A., Candia, O.A., Chiarandini, D.J., 1963. The origin of the short-circuit current in the isolated skin of the South American frog Leptodactylus ocellatus. *J. Gen. Physiol.* 47: 393.
- Zadunaisky, J.A., De Fisch, F.W., 1964. Active and passive chloride movements across isolated amphibian skin. *Am. J. Physiol.* 207: 1010.
- Zerahn, K., 1969. Nature and localization of the sodium pool during active transport in the isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 77: 272.
- Zylber, E.A., Rotunno, C.A., Cereijido, M., 1973. Ion and water balance in isolated epithelial cells of the abdominal skin of the frog Leptodactylus ocellatus. *J. Membr. Biol.* 13: 198.

~~Altocho~~
Z. Zerahn

ADDENDUM

1.- Obtención de los valores de E (potencial de membrana)

El procedimiento utilizado para la obtención de los valores de E (página 44) a partir de los gráficos experimentales ha sido el de "conteo de cuadrados".

En todas las experiencias el "ruido" del aparato pudo ser despreciado frente a los cambios de potencial observados.

2.- Presentación de los resultados

En este trabajo se presentan los resultados de las variaciones del potencial eléctrico debidas a cambios rápidos en la composición de la solución Ringer que baña la cara externa de la piel en forma normalizada. Esto se debe al hecho de que el propósito de las experiencias realizadas ha sido el de analizar fenómenos cinéticos, por lo cual fue necesario "evitar" la variabilidad que presenta el potencial de membrana en estos epitelios, esto se logra mediante la normalización de los datos (Kidder y colab. 1964).

En los casos en que se observa un descenso de potencial una vez alcanzado el máximo (Figs. III.9 "a" y "b"; Figs. III.13 "a" y "b"), la expresión matemática que se utilizó para obtener los valores normalizados (F) ha sido la ecuación (2.5) de la página 45, en la cual se sustituyó E_{∞} por $E_{\text{máximo}}$, donde este último indica el valor de potencial máximo alcanzado por efecto del influjo del Na a la piel, previo al influjo del halogenuro.

Con el propósito de ejemplificar algunos datos absolutos (no normalizados) se puede mencionar que, para el cambio de Ringer ClNa 1 mM (colina) por Ringer ClNa 50 mM (colina) (Figura III.10) los valores de E_0 se hallaban entre 4-10 mV, mientras que los de $E_{\text{máximo}}$ entre 30-50 mV, valores semejantes

se obtuvieron para el cambio de Ringer BrNa 1 mM (colina) por Ringer 50 mM (colina) (Figura III.11), para el cambio de INa 1mM (colina) por INa 50 mM (colina), (Figura III.12), E_0 se hallaba entre 16-35 mV, mientras E_{∞} entre 90-140 mV.

Para el caso de utilizarse K como contraión, se obtuvieron valores de E_0 , E_{∞} y $E_{\text{máximo}}$ entre los mismos rangos que los descritos para la colina.

Para el cambio: Ringer SO_4Na_2 1 mM por SO_4Na_2 50 mM, E_0 se hallaba entre 10-15 mV y E_{∞} entre 50-60 mV.

FE DE ERRATAS

Página	Dice	Debe decir
12	la bomba puede trabajar electrogenéticamente	la bomba puede trabajar electogénicamente
13	La figura I.6 ilustra	La figura I.5 ilustra
27	con la N_a de la solución	con la $[Na]_0$ de la solución
27	28.4 \pm 1.8 mV/ de cada	28.4 \pm 1.8 mV/ década
27	está semilogarítmicamente	está logarítmicamente
31	Si la furosemida es aplicada a la superficie externa	Si la furosemida es aplicada a la superficie interna
53	sobre un electroimán	sobre un agitador magnético
54	la solución de Bray: 2 gramos de PPO en 200 ml de etanol, y se lleva a un volumen de 500 ml con tolueno.	la solución de Bray: 60 gramos de naftaleno, 200 mggramos de POPOP, 4 gramos de PPO, 100 ml de metanol, 20 ml de etilén glicol, se lleva a un volumen de 1 litro con dioxano.
86	descendió al 53 \pm % de los	descendió al 53 \pm 5% de los
110	$\frac{dc''}{dt} = -J(t)A/V_2$	$-\frac{dc''}{dt} = -J(t)A/V_2$

En el circuito que se esquematiza en la Figura I.3 (Pág. 9) debe intercalarse una resistencia variable entre la fem y el microamperímetro.