

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
CON ESPECIALIZACIÓN EN FISIOLÓGÍA

TRABAJO DE TESIS

**MEDICIONES ELÉCTRICAS TRANSEPITELIALES  
EN ANFIBIOS Y MAMÍFEROS**

AUTOR

**ERIC JAVIER SERRANO CORRO, MD**

ASESOR

DELIA DE GARRIDO, MF

Abril de 2004

TH

19 MAY 2004

origen del autor

10727



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICA**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Siendo las 5:00 p.m. del día lunes 5 de abril del año 2004, en el Salón de Profesores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá, se dio inicio a la sustentación de la Tesis, para optar el Título de Maestría en Ciencias Biomédicas con especialización en Fisiología, defendida por el estudiante Eric Javier Serrano Corro, con cédula de identidad 8-259- 281 y cuyo título es: **MEDICIONES ELÉCTRICAS TRANSEPITELIALES EN ANFIBIOS Y MAMÍFEROS.**

La calificación asignada por los miembros del Jurado, es la siguiente:

	<u>Calificación</u>	<u>Firma</u>
Magíster Delia Jaén de Garrido (Presidente):	<u>99</u>	
Dra. Cecilia Díaz (Miembro):	<u>99</u>	
Dra. Blasina de Camargo (Miembro):	<u>98</u>	
Promedio y calificación final:	<u>98.66</u>	

Magíster Lilia Rodríguez   
Representante de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Dra. Melita Rodríguez:   
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas

## **DEDICATORIA**

*Dedico mi esfuerzo a los panameños y panameñas del mañana próximo que sepan colocar a nuestro país en las altas esferas de la comunidad científica.*

## **AGRADECIMIENTO**

Le doy un agradecimiento especial a todas aquellas personas que de una u otra forma facilitaron la realización de esta investigación: Doctor Guillermo Whittembury, Profesora Delia de Garrido, Dr. Jaime Arias, Dra. Gisela Betancourt y sin olvidar a Mitzila y a Magdalena. Agradezco la cooperación que me brindó el Departamento de Oxígeno de la Caja de Seguro Social y también la Escuela de Física de la Universidad de Panamá.

## **INDICE GENERAL**

**Resumen (1)**

**Introducción (2)**

**Objetivos (5)**

1. **Objetivo General (5)**

2. **Objetivos Específicos (5)**

**Marco Teórico (7)**

**Hipótesis (20)**

**Diseño Metodológico (21)**

1. **Selección y Definición de los Grupos Controles y los Grupos de Estudio (21)**

a) **Grupos Controles (22)**

b) **Grupos de Estudio (23)**

c) **Criterios de Exclusión de Animales (24)**

d) **Comparaciones de los Grupos (24)**

2. **Definición de las Variables Operacionales (29)**

a) **Gradiente de Voltaje Transepitelial (29)**

b) **Resistencia Transepitelial Total (29)**

c) **Corriente Cortocircuito (29)**

3. **Montaje Experimental (30)**

- a) Cámara de Ussing Modificada (30)
- b) Instrumentos (32)
- c) Circuitos Eléctricos (33)
- 4. Soluciones Electrolíticas (36)
- 5. Fármacos y Reactivos (37)
- 6. Resumen de las Manipulaciones (37)
- 7. Disecciones (38)
  - a) Conejo y Rata (38)
  - b) Sapo (39)
- 8. Espesores Epiteliales y de Membrana (39)
- 9. Prueba Estadística (40)

## Resultados (42)

- 1. Resultados de los Grupos Controles (42)
- 2. Resultados de los Grupos de Estudio (47)
- 3. Comparación entre los Grupos Controles (55)
- 4. Comparación de los Resultados de los Grupos Controles y los Grupos de Estudio (57)
  - a) Sobre los Parámetros Transepiteliales (57)
  - b) Sobre la Resistencia Externa en el Circuito Cerrado (61)
- 5. Comparación del Periodo de Control y el Periodo Experimental de los Grupos Controles (62)
- 6. Contraste de los Resultados de los Grupos de Estudio y el Periodo Experimental de los Grupos Controles (67)

**7. Relación Resistencia vs Voltaje de los Grupos Controles (68)**

**Discusión de los Resultados (73)**

**Conclusiones (90)**

**Recomendaciones (93)**

**Bibliografía (94)**

**Anexos (98)**

1. Fotografías de los Cortes Histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina de los Epitelios de Sapo, Conejo y Rata (98)
2. Cuadros de la Relación Resistencia vs Voltaje de los Grupos Controles (105)
3. Costos de la Investigación (106)
4. Estructuras Químicas (107)

## **INDICE DE CUADROS**

Cuadro I (Página 15): Variaciones de la Corriente Cortocircuito, la Resistencia Transepitelial Total y Flujo de Sodio según Ussing (1951), Diamond (1972), Erlij (1974), Schultz (1975) y Lewis (1976).

Cuadro II (Página 17): Resistencia de las Uniones Apretadas en Diferentes Epitelios (Normatizadas según su Capacitancia de Membrana).

Cuadro III (Página 37) : Manipulaciones en los Grupos de Estudio y en el Periodo Experimental de los Controles.

Cuadro IV (Página 40): Espesores Epiteliales y Espesores Totales.

Cuadro V (Página 44): Medidas de Tendencia Central (Promedio y Desviación Estándar) del Voltaje Espontáneo, la Resistencia y la Corriente Cortocircuito de los Controles.

Cuadro VI (Página 48): Medidas de Tendencia Central (Promedio y Desviación Estándar) del Voltaje, la Resistencia y la Corriente de los Grupos de Estudio.

Cuadro VII (Página 49): Medidas de Tendencia Central (Promedio y Desviación Estándar) del Voltaje, la Resistencia y la Corriente de los Grupos Controles y los Grupos de Estudio.

Cuadro VIII (Página 54): Promedio y Desviación Estándar de la Resistencia Externa de los Grupos Controles y los Grupos de Estudio en el Circuito Cerrado.

Cuadro IX (Página 56): Comparación del Voltaje, la Resistencia y la Corriente Cortocircuito entre los Grupos Controles (t Student).

Cuadro X (Página 59): Comparación del Voltaje, la Resistencia y la Corriente Cortocircuito entre los Grupos Controles y los Grupos de Estudio (t Student, nivel de confianza 0.01).

Cuadro XI (Página 60): Comparación del Voltaje, la Resistencia y la Corriente Cortocircuito entre los Grupos Controles y los Grupos de Estudio (t Student, nivel de confianza 0.05).

Cuadro XII (Página 61): Comparación de la Resistencia Externa en el Circuito Cerrado de los Controles y los Grupos de Estudio (t Studente, nivel de confianza 0.01).

Cuadro XIII (Página 63): Medidas de Tendencia Central (Voltaje, Resistencia Transepitelial y Corriente Cortocircuito) en los Grupos Controles que fueron sometidos a Fase Control y Fase Experimental.

Cuadro XIV (Página 66): Comparación de los Parámetros Eléctricos de la Fase de Control y la Fase Experimental en los Grupos Controles.

Cuadro XV (Página 105): Relación Resistencia vs Voltaje en Controles de Vejiga Urinaria de Sapo.

Cuadro XVI (Página 105): Relación Resistencia vs Voltaje en Controles de Vejiga Urinaria de Conejo.

Cuadro XVII (Página 105): Relación Resistencia vs Voltaje en Controles de Piel de Sapo.

Cuadro XVIII (Página 105): Relación Resistencia vs Voltaje en Controles de Vesícula Biliar de Conejo.

Cuadro XIX (Página 105): Relación Resistencia vs Voltaje en Controles de Colon de Conejo.

Cuadro XX (Página 105): Relación Resistencia vs Voltaje en Controles de Vejiga Urinaria de Rata.

Cuadro XXI (Página 105): Relación Resistencia vs Voltaje en Controles de Colon de Rata.

Cuadro XXII (Página 106): Costo de la Investigación.

## **INDICE DE FIGURAS**

Figura 1 (Página 14): Transporte Activo de Sodio.

Figura 2 (Página 18): Relación Resistencia vs Voltaje en Vejiga Urinaria de Conejo.

Figura 3 (Página 28): Flujograma de las agrupaciones de los animales.

Figura 4 (Página 34): Modelo de Medición de Voltaje en el Circuito Equivalente de un Epitelio.

Figura 5 (Página 35): Montaje Biológico en el Circuito Abierto.

Figura 6 (Página 36): Montaje Biológico en el Circuito Cerrado.

Figura 7 (Página 45): Voltaje Espontáneo y Corriente Cortocircuito en los Grupos Controles.

Figura 8 (Página 46): Resistencia Transepitelial de los Grupos Controles.

Figura 9 (Página 50): Corriente Cortocircuito en los Grupos Controles y los Grupos de Estudio.

Figura 10 (Página 51): Resistencia Transepitelial en los Grupos Controles y los Grupos de Estudio en Epitelios de Sapo.

Figura 11 (Página 52): Resistencia Transepitelial en los Grupos Controles y los Grupos de Estudio de Vejigas de Conejo.

Figura 12 (Página 64): Resistencia Transepitelial en los Periodos Control y Experimental de los Grupos Controles en Vejigas de Conejos.

Figura 13 (Página 65): Corriente Cortocircuito de los Periodos Control y Experimental de los Grupos Controles.

Figura 14 (Página 69): Relación Resistencia Transepitelial vs Voltaje en Controles de Vejiga de Sapo.

Figura 15 (Página 69): Relación Resistencia Transepitelial vs Voltaje en Controles de Piel de Sapo.

Figura 16 (Página 70): Relación Resistencia Transepitelial vs Voltaje en Controles de Vejiga de Conejo.

Figura 17 (Página 70): Relación Resistencia Transepitelial vs Voltaje en Controles de Vesícula de Conejo.

Figura 18 (Página 71): Relación Resistencia Transepitelial vs Voltaje en Controles de Colon de Conejo.

Figura 19 (Página 71): Relación Resistencia Transepitelial vs Voltaje en Controles de Vejiga de Rata.

Figura 20 (Página 71): Relación Resistencia Transepitelial vs Voltaje en Controles de Colon de Rata.

Figura 21 (Página 77): Transporte Iónico en Epitelio de Piel de Sapo.

Figura 22 (Páginas 80 y 81): Efecto de la  $[Na^+]$  del baño en los parámetros eléctricos transepiteliales aplicados al modelo de circuito equivalente en la piel de sapo.

Figura 23 (Página 83): Recirculación del catión sodio en el transporte isotónico.

Figura 24 (Página 86): Efecto de Forskolín y 1-EBIO en Corriente Cortocircuito de Epitelio de Vía Aérea Humana (Línea Celular Calu-3).

Figura 25 (Página 98): Corte Histológico de Piel de Sapo.

Figura 26 (Página 99): Corte Histológico de Vejiga de Sapo.

Figura 27 (Página 100): Corte Histológico de Vejiga Urinaria de Conejo.

Figura 28 (Página 101): Corte Histológico de Vesícula Biliar de Conejo.

Figura 29 (Página 102): Corte Histológico de Colon de Conejo.

Figura 30 (Página 103): Corte Histológico de Vejiga Urinaria de Rata.

Figura 31 (Página 104): Corte Histológico de Colon de Rata.

## ABREVIATURAS

ADH, Hormona antidiurética o vasopresina.

Ca, Capacitancia de la membrana apical del epitelio.

Cb, Capacitancia de la membrana basolateral del epitelio.

$\Delta V$ , Gradiente de Voltaje Transepitelial.

$E_c$ , Fuerza Electromotriz del transporte de la bomba de sodio-potasio ATPasa.

$E_{Na}$ , Fuerza Electromotriz del transporte activo de sodio.

$fR_o$ , Resistencia Apical Fraccionada.

$J_{Na}$ , Flujo de Sodio.

$H_o$ , Hipótesis Nula.

$H_1$ , Hipótesis Alterna.

Isc, Corriente Cortocircuito.

n, Tamaño de la Muestra.

$R_a$ , Resistencia de la membrana apical del epitelio.

$R_b$ , Resistencia de la membrana basolateral del epitelio.

$R_j$  ( $R_{sh}$ ), Resistencia de la Unión Intercelular.

$R_{Na}$ , Resistencia al Transporte de Sodio.

$R_s$ , Suma de las Resistencias Totales Transepiteliales colocadas en serie.

$R_c$ , Resistencia celular.

$R_{te}$ , Resistencia Transepitelial.

$\sigma$ , Desviación Estándar.

## RESUMEN

### Mediciones Eléctricas Transepiteliales en Anfibios y Mamíferos.

Se realiza un estudio experimental sobre el gradiente de voltaje espontáneo, la resistencia transepitelial total y la corriente cortocircuito en algunos epitelios de anfibios y mamíferos. Se coloca el tejido disecado entre dos hemicámaras cúbicas de acrilato. El tejido separa a dos soluciones electrolíticas oxigenadas, a 20°C y pH 7.4. Un multímetro mide la diferencia de voltaje entre las soluciones y luego se inyecta 6  $\mu$ A de corriente para calcular la resistencia transepitelial. Luego se coloca una fuerza electromotriz externa de 9 – 56 V y un resistor variable en serie con el tejido para medir la corriente cortocircuito cuando la diferencia de voltaje es 0 mV. Se encontraron diferencias significativas en los parámetros eléctricos transepiteliales medidos en la piel y vejiga urinaria del sapo, en la vesícula biliar, colon y vejiga urinaria del conejo y de la rata, con un nivel de confianza de 0.01. La disminución de la  $[Na^+]$  de 107 a 0.375 mM disminuyó la corriente cortocircuito en la piel de sapo. La administración de 100 mU/ml de vasopresina en el lado seroso de la piel de sapo aumentó significativamente la corriente en un 62%. La resistencia transepitelial aumentó por efecto de la disminución del pH de 7.4 a 6.0 en la vejiga urinaria del sapo y también cuando se administró 10 mM amilorida en su lado mucoso. Ni la resistencia ni la corriente cortocircuito variaron significativamente en la vejiga urinaria de conejo expuesta a amilorida.

## SUMMARY

### TRANSEPITHELIAL ELECTRICAL MEASURES IN AMPHIBIANS AND MAMMALIANS.

An experimental study about spontaneous voltage gradient, total transepithelial resistance and short-circuit current is made on different amphibian and mammalian epithelia. The dissected tissue is placed between two cubic chambers. The biological membrane divides two electrolytic oxygenated-solutions at 20°C and pH 7.4 conditions. A multimeter measures the voltage difference between the solutions, then 6  $\mu$ A of direct current is applied through them for transepithelial resistance calculation. Thereafter a 9 – 56 V outer electromotive force and a potential divider are placed in series with the tissue to adjust and maintain zero potential, in order to measure the short-circuit current. Significant differences with 0.01 level confidence were found in the electric epithelial parameters of the frog skin and urinary bladder and in the rabbit and rat proximal colon, urinary bladder and gallbladder. While  $[Na^+]$  decrease from 107 to 0.375 mM minimized the short-circuit current in the frog skin, 100 mU/ml vasopressin in the serosal solution significantly increased it by 62%. The frog urinary bladder transepithelial resistance increased by means of pH decrease from 7.4 to 6.0 in the serosal solution and also by 10 mM amiloride in the mucosal solution. Neither the total transepithelial resistance nor the short-circuit current significantly changed in the rabbit urinary bladder exposed to amiloride.

## INTRODUCCIÓN

Las membranas celulares de los epitelios contienen diferentes tipos de canales a través de los cuales fluyen los iones que determinan la corriente total de la membrana. Para medir la corriente microscópica a través de un canal aislado, es necesario bloquear el resto de las otras corrientes. Existen técnicas experimentales que permiten reconocer a las corrientes iónicas por transportes activos y a las corrientes iónicas por transportes pasivos. Las determinaciones de estas corrientes cortocircuitos sentaron las bases electrofisiológicas para el desarrollo de modernas técnicas de la Biofísica que identifican claramente a las corrientes de sodio, potasio, cloruro, magnesio y calcio, entre otras.

En 1950 Hans Ussing inventó la cámara que lleva su apellido y probablemente nunca imaginó la amplia gama de aplicaciones que tendría este sistema. Ussing estudió las propiedades del transporte del catión sodio en la piel de sapo. En 1976 Lewis & Diamond determinaron el transporte activo del catión sodio en el epitelio apretado de la vejiga urinaria de conejo. Por otro lado, Knauf (1984) determinó la corriente cortocircuito in vivo en el colon de la rata y Grubb (1987) evaluó el efecto de las drogas aldosterona y amilorida en la corriente cortocircuito del íleo de ave. En 1991 Veeze desarrolló el Protocolo Rotterdam para medir la corriente mediante biopsia rectal por succión en humanos. Este protocolo es utilizado por el grupo europeo de investigación en la expresión de CFTR. Por otro lado, Frederiksen (1999) desarrolló un modelo esferoideo de epitelio respiratorio humano que mejora la cuantificación de la corriente en

pacientes con fibrosis quística. Hug (2002) señala que los análisis vectoriales de los transportes iónicos con microcámaras permiten estudiar a las propiedades invasivas de las células cancerosas.

En esta investigación experimental se confecciona un sistema de dos baños oxigenados que están separados herméticamente por una membrana epitelial; de manera que mediante un circuito eléctrico (primero abierto y luego cerrado) se demuestra el transporte iónico por sus características de la diferencia de potencial, la corriente cortocircuito y la resistencia transepitelial. El sistema está basado en el modelo inventado por Hans Ussing, pero con ciertas modificaciones respecto a la cámara original, las cuales están indicadas en la Metodología, tomando en consideración nuestra moderada solvencia tecnológica y económica. El estudio logra obtener elevada validez interna y externa, por cuanto los errores detectados son pocos. No se presentaron errores “proxy” porque no hubo informantes sustitutos; tampoco hubo errores diferenciales de medición en los instrumentos ni en las técnicas empleadas. Los grupos de control y los grupos de estudio fueron pareados y aleatorizados.

La importancia del presente trabajo de investigación está basada en las siguientes justificaciones: 1) Primeramente la implementación de la Cámara de Ussing y la determinación de las propiedades eléctricas de los epitelios pueden fomentar la rigurosidad de la investigación en el campo de la Electrofisiología en Panamá. Históricamente los estudios de Ussing de los años 50 del siglo pasado sentaron las bases para el posterior desarrollo de las técnicas de pinzamiento de voltaje y pinzamiento en parche, las cuales actualmente se utilizan en gran medida. Por lo tanto es posible que los registros eléctricos macroscópicos que señalamos en los resultados de este trabajo

fundamenten la necesidad de implementar la tecnología de punta indicada para analizar a las transducciones de señales intracelulares en Panamá. 2) Estos resultados también pueden facilitar la investigación interdisciplinaria con otras ciencias biomédicas como son Farmacología, Bioquímica, Inmunología y Biología Molecular.

## **OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GENERAL**

Diseñar y adquirir destrezas manuales en el montaje de un sistema biológico in vitro que permita medir los parámetros eléctricos transepiteliales en la piel y vejiga urinaria del sapo; así como también en la vejiga urinaria, colon y vesícula biliar del conejo; y en la vejiga urinaria y colon de la rata.

### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

a) Comparar el gradiente de voltaje espontáneo, la resistencia transepitelial y la corriente cortocircuito entre los siguientes epitelios: a-Vejiga urinaria de sapo con vejiga urinaria de conejo, b-Piel de sapo con vejiga urinaria de sapo, c-Vejiga urinaria de conejo con vesícula de conejo, d-Vejiga urinaria de conejo con colon de conejo, e-Vesícula de conejo con colon de conejo, f-Vejiga urinaria de rata con colon de rata, g-Vejiga urinaria de rata con vejiga urinaria de conejo y h-colon de rata con colon de conejo.

b) Indicar el efecto de la baja concentración del catión sodio en el gradiente de voltaje transepitelial, la resistencia y la corriente cortocircuito en la piel de sapo y la vejiga de conejo.

- c) Evaluar el efecto de vasopresina (ADH) en la corriente cortocircuito de la piel de sapo.
- d) Evaluar el efecto de amilorida en la corriente cortocircuito de la vejiga de sapo y conejo.
- e) Establecer la influencia del pH en la resistencia transepitelial total de la vejiga de sapo.
- f) Comparar la resistencia externa del circuito cerrado en condiciones de ausencia de gradiente de voltaje en los epitelios de sapo, conejo y rata.

## MARCO TEÓRICO

Hans Ussing ideó un sistema in vitro para determinar el transporte activo del catión sodio en el epitelio de la piel.<sup>(32)</sup> Para esto confeccionó con lucita dos hemicámaras cúbicas de tamaño idéntico, sin un lado en cada una, entre las que colocó la piel de sapo para separar a dos soluciones electrolíticas. El máximo volumen líquido que podía contener cada hemicámara fue 40 ml. Más recientemente desarrolladas, las cámaras son tan pequeñas que pueden alojar tan solo 0.3 ml.<sup>(4,33)</sup> También se han presentado modelos esferoideos de epitelio respiratorio basados en la Cámara de Ussing para amplificar la corriente cortocircuito de la vía respiratoria.<sup>(27)</sup>

Los estudios iniciales de du Bois-Reymond (1848) y Behn (1897) demostraron que existe una diferencia de potencial entre el interior y el exterior de esa piel de sapo que separa a las dos soluciones, habitualmente 100 mV. Ussing cortocircuitó ambos lados de la piel para que no hubiera diferencia de potencial entre ellos. Bajo estas condiciones, cuando las soluciones son idénticas en ambos compartimentos, analizó que no ocurre transferencia pasiva de iones. Solamente el transporte activo de iones continúa fluyendo hacia un lado, lo cual genera una corriente a la que denominó corriente cortocircuito, del inglés “short-circuit current” (Isc). Francis (1933), Stapp (1941) y Lund (1947) también determinaron en mayor o menor grado corrientes cortocircuitos en la piel de sapo.

Ussing evaluó el efecto del cobre colocado en el lado externo de la piel de sapo en el sistema, así como también el efecto de las altas presiones de dióxido de carbono, la aplicación de adrenalina 1:1 000 000 en el lado interno y la aplicación de un extracto de neurohipófisis. Encontró que el cobre aumenta gradualmente la diferencia de potencial en el curso de una hora porque disminuye el movimiento pasivo del anión cloruro. Por otro lado, mientras que la adrenalina disminuyó la diferencia de potencial en su experimento, el extracto neurohipofisiario la incrementó. Como se comenta en la Discusión de Los Resultados, varias décadas después se demostró que la vasopresina, la cual está contenida en el extracto neurohipofisiario, activa a la proteína de canal epitelial de sodio ubicada en la membrana apical de la célula mediante una cascada de reacciones químicas en las que se involucran a las fosforilaciones de proteínas; aunque aún no existe un consenso universal de las reacciones que específicamente están involucradas en los epitelios de piel y vejiga urinaria. Esta proteína de canal es fundamental para el transporte transapical del catión sodio en los epitelios. Ussing también señaló que a partir de 1% de CO<sub>2</sub> en las soluciones que bañan a la membrana biológica, ocurre una disminución de la diferencia de potencial del epitelio a medida que aumenta la concentración de dióxido de carbono. La explicación parece estar más relacionada con el descenso de pH de las soluciones que conlleva este incremento del dióxido de carbono, lo cual inactiva gradualmente a la bomba de sodio-potasio ATPasa ubicada basolateralmente. Esta bomba junto con el canal epitelial apical participan el transporte activo de sodio. A mayor transporte activo de sodio, mayor es la corriente iónica que fluye transepitelialmente, y por consiguiente mayor es la diferencia de potencial.

Las células epiteliales forman un sincitio tridimensional (Ussing, Windhager, Farquhar y Palade, 1951) que funciona como una sola célula con asimetría de transporte iónico en la membrana apical respecto a la basolateral, por lo cual se genera una polaridad o diferencia de potencial. El epitelio es considerado como un conjunto de hojas de células unidas entre sí por uniones apretadas (“tight junctions”). Esta geometría permite al epitelio funcionar como barrera parcial porque restringe el movimiento de sustancias hacia un lado o el otro del epitelio. De manera que las características de las resistencias transepiteliales totales y fraccionales parecen depender más en primera instancia de la cantidad de uniones apretadas y en segundo lugar de la resistencia transcelular. La resistencia transepitelial total de unidad funcional del sincitio celular depende más de las uniones apretadas y menos de la cantidad de capas celulares en los diferentes epitelios. Aunque se pensó inicialmente que las funciones epiteliales del transporte de los iones fueran controladas fundamentalmente por los neurotransmisores y las hormonas, actualmente se le otorgan papeles relevantes a diversas macromoléculas, entre ellas las citocinas, los constituyentes celulares y los xenobióticos bacterianos y no bacterianos.<sup>(16)</sup>

Es conveniente considerar a los epitelios como circuitos equivalentes, donde existe una resistencia de la membrana apical que se encuentra en serie con la resistencia de la membrana basolateral. Estas resistencias de la membrana se encuentran a su vez en paralelo con la resistencia de la unión intercelular. De acuerdo a la Ley de Kirchhoff la resistencia transepitelial total depende de estas tres resistencias. La resistencia apical fraccionada puede obtenerse de la división de la diferencia de voltaje apical entre la

diferencia de voltaje transepitelial, ya que la resistencia apical es una fracción de la resistencia transepitelial total.<sup>(4)</sup>

**(Fórmula 1)** 
$$fR_o = R_o / (R_o + R_j) = \Delta V_o / \Delta V_t$$

Donde  $fR_o$  es la resistencia apical fraccionada,  $R_o$  es la resistencia apical,  $R_j$  es la resistencia de la unión intercelular,  $\Delta V_o$  es la diferencia de voltaje apical y  $\Delta V_t$  es la diferencia de voltaje transepitelial. La diferencia de voltaje apical es el gradiente entre el voltaje de la solución externa y el interior de la célula epitelial. La diferencia de voltaje transepitelial es el gradiente entre el voltaje de la membrana apical y el voltaje de la membrana basolateral.

Para determinar cada una de las tres resistencias por separado, son necesarios los registros eléctricos intracelulares y la determinación de los flujos iónicos radiomarcados. La corriente cortocircuito se debe al flujo iónico por transporte activo, principalmente del catión sodio. Como señalamos anteriormente, en la membrana apical se ubican los canales epiteliales del catión sodio (ENaC, del inglés “Epithelial Sodium Channel”) y en la membrana basolateral se ubican las bombas de sodio-potasio ATPasa. Las acciones en conjunto de estas proteínas permiten el movimiento neto del catión sodio desde el exterior celular hacia el interior celular y luego su salida a través de la membrana basolateral. Este movimiento del catión sodio también involucra su recirculación desde el lado seroso de la célula hacia el espacio intercelular lateral (Refiérase también a la Discusión de los Resultados para ampliar este concepto).

La corriente cortocircuito ( $I_{sc}$ ) se definió clásicamente como una corriente directa medida en  $\mu A/cm^2$  de área de superficie epitelial, que se presenta cuando la diferencia de voltaje transepitelial es 0 mV. Esta situación se puede realizar experimentalmente

cuando se coloca una solución Ringer idéntica en ambos lados del tejido. En otras condiciones de los baños, esta vez contando con soluciones asimétricas a cada lado del tejido,  $I_{sc}$  puede indicar no solamente transporte activo sino también difusión pasiva de los iones. En ambas condiciones señaladas la corriente cortocircuito, también llamada corriente macroscópica, es la suma de las corrientes a través de una población de canales iónicos individuales que fluctúan entre un estado abierto y un estado cerrado, induciendo así a fluctuaciones de corriente de menor magnitud.<sup>(1)</sup>

Para medir el transporte iónico activo epitelial es necesario eliminar el gradiente electroquímico de los iones que se movilizan a través de la membrana. Hay dos formas de mantener la diferencia de potencial en cero: una es utilizando la técnica del pinzamiento de voltaje y la otra es colocando externamente una fuerza electromotriz, la cual está en serie con la membrana epitelial. Esta fuerza externa sobreviene a las resistencias de los baños seroso y mucoso, pero no elimina el flujo iónico del catión sodio por transporte activo desde el lado apical hacia el lado basolateral. El flujo neto del catión sodio en este caso es exactamente igual a la corriente cortocircuito.

En una situación experimental, la sustitución del catión sodio de las soluciones por una molécula con carga positiva y osmóticamente activa (por ejemplo colina), eliminará la corriente cortocircuito. La explicación de esta eliminación de corriente es que la ausencia de oferta del sustrato sodio de los baños impedirá el flujo de ese catión a través de las proteínas apicales y basolateral.

Por otro lado, los canales epiteliales de sodio ubicados apicalmente pueden ser bloqueados por amilorida, debido a que su grupo guanidinio se carga positivamente de acuerdo al pH de la solución y al pKa de los grupos disociables. En esta situación

también se limitará la entrada del catión sodio a la célula, disminuyendo la corriente cortocircuito. En los sistemas in vitro la vasopresina actúa sinérgicamente sobre el efecto de aldosterona, aumentando la permeabilidad apical del catión sodio a través de la fosforilación de ENaC y por ende también aumentan a la corriente cortocircuito..

Bajo condiciones de cortocircuito eléctrico de un sistema biológico in vitro, la fuerza electromotriz del transporte activo es el producto de la resistencia transepitelial por la corriente cortocircuito<sup>(4)</sup>, según lo describe la Ley de Ohm:

**(Fórmula 2)** 
$$E_c = I_{sc} \times R_c$$

Donde  $E_c$  es la fuerza electromotriz del transporte de la bomba de sodio-potasio ATPasa,  $I_{sc}$  es la corriente del catión sodio movido por la bomba y  $R_c$  es la resistencia transepitelial o celular.

En la situación experimental de un circuito eléctrico abierto armado en un sistema biológico in vitro (Figura 4), la corriente iónica es la división de la fuerza electromotriz del transporte activo de sodio entre la suma de las resistencias del transporte del catión sodio y de la unión intercelular.<sup>(3)</sup>

**(Fórmula 3)** 
$$I = E_{Na} / (R_{sh} + R_{Na})$$

Donde  $I$  es la corriente iónica,  $E_{Na}$  es la fuerza electromotriz del transporte activo de sodio,  $R_{sh}$  es la resistencia de la unión intercelular y  $R_{Na}$  es la resistencia al transporte de sodio.

En el circuito cerrado (Figura 5), la corriente cortocircuito puede despejarse de la fórmula 2, para obtener lo siguiente:

**(Fórmula 4)** 
$$I_{sc} = I_{Na} = E_{Na} / R_{Na}$$

**(Fórmula 5)** 
$$1 / R_T = 1 / R_{Na} + 1 / R_{sh}$$

De lo anterior se puede deducir que en condiciones de cortocircuito:

**(Fórmula 6)** 
$$1 / R_T = I_{sc} / E_{Na} + 1 / R_{sh}$$

En el transporte activo transepitelial del catión sodio desde la membrana apical hacia la membrana basolateral en la piel y vejiga urinaria del sapo y en la vejiga urinaria, colon, vesícula biliar y túbulo renal del conejo y la rata participan los siguientes mecanismos de transportes iónicos : apicalmente canales epiteliales de sodio sensibles a amilorida y basolateralmente la bomba de sodio-potasio ATPasa. Las fosforilaciones de estas proteínas de transporte por los sistemas de transducciones de señales intracelulares de varias Proteínas G, modifican el transporte del catión sodio y por lo tanto a la corriente cortocircuito. Estas señales forman parte de los mecanismos de acción de la adrenalina y la vasopresina.

En la Figura 1 se señalan tres aspectos referentes al transporte iónico transepitelial del catión sodio:

A- La ubicación de los canales iónicos y la bomba.

B- El modelo aceptado del circuito equivalente epitelial: La resistencia eléctrica pasiva de la vía paracelular se representa como  $R_p$ . En ausencia de diferencia de potencial electroquímico transepitelial, la corriente a través del shunt paracelular es cero. En esta situación toda la corriente generada por el transporte iónico activo del epitelio fluye a través del amperímetro, dependiendo del balance del catión sodio in vivo o en un sistema in vitro.

C- Se indica la representación del movimiento activo del catión sodio a través del túbulo distal del riñón de mamífero, con las respectivas concentraciones iónicas y algunas sustancias que aumentan o disminuyen el transporte iónico. La corriente cortocircuito en

el tubo distal del riñón de mamífero oscila entre  $2 - 150 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  para las concentraciones señaladas del catión sodio. La variabilidad de la corriente refleja la habilidad del tejido para variar su estado de transporte del catión sodio.

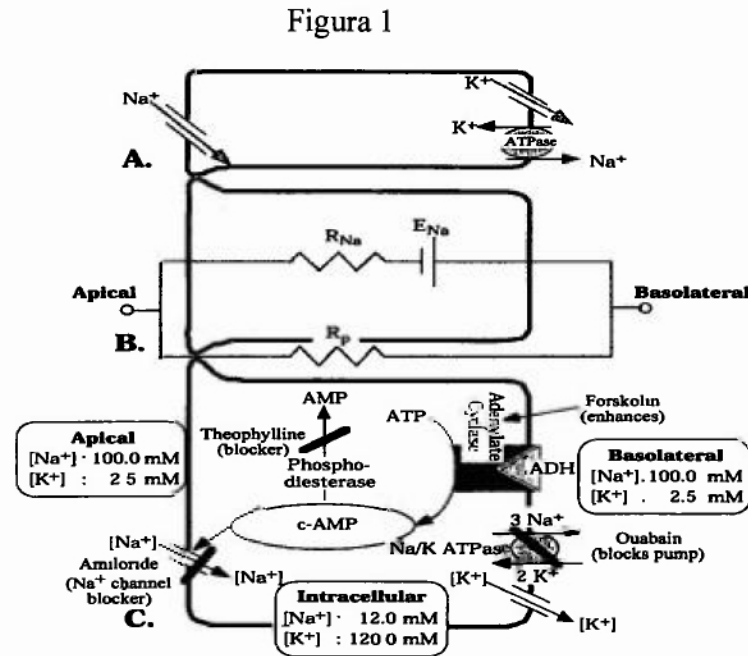


Figura 1: Transporte activo del catión sodio, tomado de Tosteson 1989.

Algunas condiciones o fármacos que disminuyen la corriente cortocircuito son: la disminución de la concentración o carga del catión sodio en el lado apical del epitelio<sup>(23)</sup>, amilorida, ouabaina, baja presión de oxígeno y descenso de la temperatura. Algunas condiciones que aumentan la corriente cortocircuito son: el aumento de la carga del catión sodio, vasopresina, forskolín, aldosterona,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ <sup>(28)</sup> y teofilina<sup>(14)</sup>.

En el Cuadro I de la página 15 se indican los primeros experimentos que evaluaron las variaciones de la corriente macroscópica o cortocircuito. La disminución de  $I_{\text{sc}}$  ocurre

cuando disminuye el transporte activo del catión sodio, ya sea porque hay poco catión disponible o porque se inhiben las proteínas de transporte (canal epitelial del catión sodio y la bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ ). En cambio la activación de estas proteínas y el aumento de la carga de  $\text{Na}^+$  aumentarían a la  $I_{sc}$ .

## Cuadro I

Variaciones de la Corriente Cortocircuito, la Resistencia transepitelial total y Flujo de Sodio según Ussing (1951), Diamond (1972), Erlj (1974), Schultz (1975) y Lewis (1976)

Condición	Vejiga Conejo		Vejiga Rana		Piel Sapo		Vejiga Sapo		Vejiga Tortuga		Ducto Colector		Túbulo Distal		Ducto Salival		Colon Conejo	
	Isc	R	Isc	R	Isc	R	Isc	R	Isc	R	J $\text{Na}^+$	R	J $\text{Na}^+$	R	Isc	R	Isc	R
Sin $\text{Na}^+$	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-		-				-	+
Sin $\text{Cl}^-$	0	0			0	+	+				-		-				0	+
Sin $\text{HCO}_3^-$	-	+/-			0	0	0	0									0	+
Sin $\text{Ca}^{2+}$	+	-			+	-												
Amilorida	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+			-	+
Aldosterona	+	-	+	-					+	-	+		+		+	-	+	-
ADH	0	-	+	-	+	-												
Ouabaína	-	+/-	-		-	+			-	+	-		-		-			0
Bajo pH mucoso	+	-			-	+												
Bajo pH seroso	-				-	+												

Tomado de Lewis 1976, Denominaciones: (+) = aumento (-) = descenso

Claramente podemos observar en los diferentes estudio indicados en el Cuadro I que  $I_{sc}$  guarda una relación inversa con la resistencia transepitelial total. Esto es así porque la corriente es directamente proporcional a la permeabilidad de las membranas apicales y basolaterales al catión sodio a través de las proteínas ya señaladas. Por otro lado, la conductancia guarda una relación inversa con la resistencia. A menor conductancia, mayor resistencia y menor corriente. En general la ausencia de  $\text{Na}^+$  disminuye la corriente y aumenta la resistencia. La

ausencia de cloruro no varió a la  $I_{sc}$  en los estudios señalados. La ausencia de  $\text{HCO}_3^-$  disminuye el pH, lo cual inactiva a la bomba de sodio-potasio ATPasa y disminuye  $I_{sc}$  en la vejiga urinaria del conejo. Aldosterona y ADH activan al canal apical de sodio posiblemente mediante la cascada tradicionalmente conocida de proteína Gs, adenilatociclasa, cAMP y PKA. Estas acciones aumentan a la  $I_{sc}$  y disminuyen la Rte. Amilorida inhibe el canal epitelial de sodio porque bloquea el poro de entrada para el ión  $\text{Na}^+$  de la proteína. Por otro lado, oubaína inhibe a la bomba de sodio-potasio ATPasa, aunque su mecanismo es complejo y no es totalmente comprendido. Es posible que la mayor parte de la porción extracelular de la bomba interactúa con oubaína y parece que el primer asa extracelular es la más importante. La tasa de asociación de oubaína a la bomba depende principalmente de la conformación del enzima, de la presencia de los cationes sodio y potasio, y también en cierto modo del tamaño del glucósido cardiaco. Aunque por mecanismos distintos, tanto amilorida como oubaína disminuyen el transporte activo del catión sodio, por lo tanto disminuyen la  $I_{sc}$  y aumentan la Rte.

El principal condicionante de la resistencia transepitelial total es la resistencia paracelular. Los epitelios pueden clasificarse según su permeabilidad iónica en herméticos y no herméticos. Los epitelios con abundancia de uniones apretadas tienen elevada resistencia de la unión intercelular, tal es el caso de la vejiga urinaria de sapo y conejo y la piel de sapo. En cambio el colon y la vesícula biliar de conejo tienen resistencias mucho menores y son considerados no herméticos. En los epitelios herméticos, la resistencia transcelular suele ser menor que la resistencia paracelular de las uniones apretadas. En cambio en los epitelios no herméticos, la resistencia

transcelular suele ser mayor que la resistencia paracelular porque estas últimas son escasas (Refiérase al Cuadro II).

Cuadro II

Resistencia De Las Uniones Apretadas En Diferentes Epitelios  
(Normatizadas Según Su Capacitancia De Membrana)

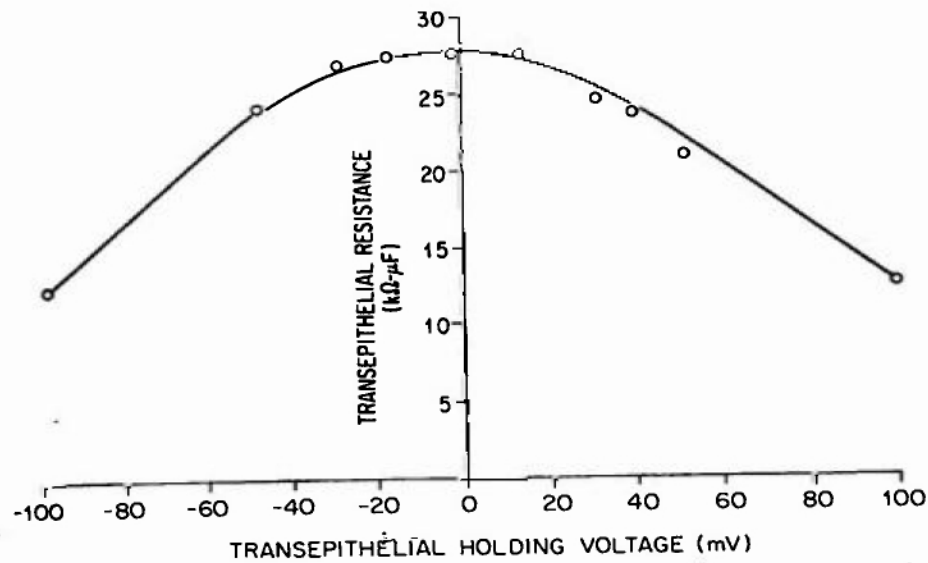
Epitelio	Resistencia (R <sub>j</sub> )	Referencia
Vejiga de conejo	> 78 000ohm-μF	Lewis, 1976
Vejiga de sapo	> 33 000 ohm-μF	Lewis, 1976
Piel de sapo	> 40 000 ohm-μF	Ussing, 1951
Colon de conejo	> 300 ohm-cm <sup>2</sup>	Schultz, 1975
Vesícula de conejo	< 300 ohm-cm <sup>2</sup>	Diamond,1972

Bindslev, Tormey, Pietras y Wright (1974) documentaron la relación no lineal de la curva corriente-voltaje en la vejiga urinaria de la rana y en otros epitelios herméticos. Esta no linealidad involucra un descenso reversible de la resistencia, la cual es dependiente del tiempo, cuando se aplican pulsos de 200 - 300 mV. Bindslev (1974) concluyó que estos cambios de resistencia involucran tanto a las uniones apretadas como a las membranas celulares. Lewis y Diamond (1976) también encontraron estos descensos de la resistencia dependientes del tiempo en la vejiga urinaria de conejo, aún con voltajes menores. En la Figura 2 se observan los cambios de resistencia transepitelial en la vejiga urinaria de conejo, publicados por Lewis y Diamond (1976), cuando al epitelio colocado en solución Ringer se le aplican pulsos cuadrados de corriente de 0,8 μA y 1 segundo de duración. En el eje de la abscisa se señala el voltaje

transepitelial pinzado y en el eje de la ordenada se señala la resistencia transepitelial, normalizada según su capacitancia en  $\text{kohm}/\mu\text{F}$ .

Figura 2

Relación resistencia vs voltaje en vejiga urinaria de conejo (Lewis 1976)



La mayor resistencia transepitelial ocurre con el pinzamiento de voltaje en 0 mV y a partir de este punto ocurre una caída de la resistencia con pinzamientos de voltaje hipopolarizantes e hiperpolarizantes, casi como imagen en espejo. A partir de pinzamientos muy hiperpolarizantes (-100 mV), la resistencia aumenta hasta llegar a su máximo cuando el voltaje es pinzado en 0 mV. A partir de pinzamientos muy hipopolarizantes (100 mV), la resistencia también aumenta hasta llegar a su máximo cuando el voltaje es pinzado en 0 mV.

La caída de la resistencia en función del tiempo, la relación no lineal de la corriente y el voltaje en los epitelios y las variaciones de la resistencia de acuerdo al nivel de pinzamiento de voltaje son hechos experimentales que han sido atribuidos a la densidad de uniones estrechas en la vía paracelular (Lewis y Diamond, 1976).

## **HIPÓTESIS**

### **Planteamiento 1: Comparación de los parámetros eléctricos transepiteliales en condiciones controladas entre diferentes epitelios de varias especies.**

Hipótesis Nula (H<sub>0</sub>)

Los parámetros eléctricos transepiteliales son similares entre los epitelios de piel, vejiga urinaria, colon y vesícula biliar de conejo, rata y sapo.

Hipótesis Alterna (H<sub>1</sub>)

Los parámetros eléctricos transepiteliales son diferentes entre los epitelios de piel, vejiga urinaria, colon y vesícula biliar de conejo, rata y sapo.

### **Planteamiento 2: Efecto de la manipulación experimental en los parámetros eléctricos transepiteliales en el sapo y el conejo.**

Hipótesis Nula (H<sub>0</sub>)

Los parámetros eléctricos transepiteliales no se modifican con las variaciones de la concentración de sodio, el pH ni por efecto de vasopresina y amilorida.

Hipótesis Alterna (H<sub>1</sub>)

Los parámetros eléctricos transepiteliales se modifican con las variaciones de la concentración de sodio, el pH, por efecto de vasopresina y amilorida.

## **DISEÑO METODOLÓGICO**

El estudio es prospectivo, analítico y experimental.

### **1. Selección y Definición de los Grupos Controles y los Grupos de Estudio.**

Los animales del estudio fueron conejos, ratas y sapos. Los individuos dentro de estas tres especies fueron alimentados y cuidados de la misma manera antes de ser utilizados. Los conejos y las ratas procedieron cada grupo por separado de la misma camada y los sapos fueron capturados del mismo hábitat natural (estanque en el Corregimiento de Juan Díaz), lo cual garantiza la homogeneidad entre los individuos de cada especie. Los pesos de los animales vivos incluidos en este trabajo fueron los siguientes: conejos (1.5 – 3 kg), ratas (100 – 200 g) y sapos (40 – 200 g). El criterio de inclusión “peso del animal” dentro de los intervalos señalados fue utilizado porque la publicación de Cox (1992) señala que en los animales muy jóvenes o de poco peso las corrientes cortocircuitos pueden aumentar por los efectos de amilorida. Los animales fueron seleccionados al azar por parte de personal de Bioterio, los cuales no participaron en el diseño, la recolección, la tabulación ni en el análisis del estudio. Asimismo los animales que fueron recibidos del Bioterio fueron incluidos ya sea en los grupos controles o en los grupos de estudio el mismo día de la medición. En cada día de trabajo se midieron la variables operacionales

de un animal dentro del grupo control y de un animal de la misma especie dentro del grupo de estudio, según un cronograma de actividades previamente diseñado.

a) Grupos Controles:

a.1. Grupo de pieles aisladas de 10 sapos.

(peso de animal vivo: 40-200 g)

a.2. Grupo de vejigas urinarias aisladas de 10 sapos.

(peso de animal vivo: 40-200 g)

a.3. Grupo de vejigas urinarias aisladas de 8 conejos.

(peso de animal vivo: 1,5-3 kg)

a.4. Grupo de segmentos de colon proximal aislados de 8 conejos.

(peso de animal vivo: 1,5-3 kg)

a.5. Grupo de vesículas biliares aisladas de 8 conejos.

(peso de animal vivo: 1,5-3 kg)

a.6. Grupo de vejigas urinarias aisladas de 5 ratas.

(peso de animal vivo: 100-200 g)

a.7. Grupo de segmentos de colon proximal aislados de 5 ratas.

(peso de animal vivo: 100-200 g)

Todos estos grupos controles se encuentran en condiciones denominadas “controladas o fisiológicas” que a continuación se detallan en el punto d.3.1).

b) Grupos de Estudio o Cohortes:

b.1. Grupo de pieles aisladas de 8 sapos con 0,375 mM del catión sodio en ambas soluciones.

b.2. Grupo de pieles aisladas de 8 sapos con 100 mU/ml de ADH en la solución del lado seroso.

b.3. Grupo de vejigas urinarias aisladas de 8 sapos con pH 6 en la solución del lado seroso.

b.4. Grupo de vejigas urinarias aisladas de 8 sapos con 10 mM amilorida en la solución del lado mucoso.

b.5. Grupo de vejigas urinarias aisladas de 5 conejos con 0,375 mM del catión sodio en ambas soluciones.

b.6. Grupo de vejigas urinarias aisladas de 5 conejos con 10 mM amilorida en la solución del lado mucoso.

Los pesos de los animales vivos en los grupos de estudio se encontraron dentro del mismo intervalo de pesos que los grupos controles de la misma especie. Aparte de una modificación específica en los grupos de estudio, el resto de las condiciones de los baños o soluciones fueron idénticas a las de los grupos controles.

c) Criterios de Exclusión de Animales:

c.1. Animales con pesos fuera del intervalo establecido, así fueron excluidos: sapos menores de 40 gramos y mayores de 200 gramos, conejos menores de 1.5 kg y mayores de 3 kg, y ratas menores de 100 gramos y mayores de 200 gramos.

c.2. Animales con deformaciones y lesiones visibles externas e internas tales como tumores, infecciones y traumatismos que pudieran alterar la estructura y función de los tejidos estudiados.

d) Comparaciones de los Grupos:

Los grupos comparados estadísticamente entre sí fueron:

d.1. Los siguientes grupos controles entre sí.

d.1.1. Grupo control de vejigas de sapos con grupo control de vejigas de conejos.

d.1.2. Grupo control de pieles de sapos con grupo control de vejigas de sapos.

d.1.3. Grupo control de vejigas de conejo con grupo control de vesículas de conejos.

d.1.4. Grupo control de vejigas de conejos con grupo control de colon de conejos.

d.1.5. Grupo control de vesículas de conejos con grupo control de colon de conejos.

d.1.6. Grupo control de vejigas de ratas con grupo control de colon de ratas.

d.1.7. Grupo control de vejigas de ratas con grupo control de vejigas de conejos.

d.1.8. Grupo control de colon de ratas con grupo control de colon de conejos.

d.2. Los grupos controles con los grupos de estudio.

d.2.1. Grupo control de pieles aisladas de sapos con grupo de estudio de pieles aisladas de sapos expuestas a 0,375 mM del catión sodio en ambas soluciones.

d.2.2. Grupo control de pieles aisladas de sapos con grupo de estudio de pieles aisladas de sapos expuestas a 100 mU/ml ADH en la solución del lado seroso.

d.2.3. Grupo control de vejigas urinarias aisladas de sapos con grupo de estudio de vejigas urinarias aisladas de sapos expuestas a pH 6 en la solución del lado seroso.

d.2.4. Grupo control de vejigas urinarias aisladas de sapos con grupo de estudio de vejigas urinarias aisladas de sapos expuestas a 10 mM amilorida en la solución del lado mucoso.

d.2.5. Grupo control de vejigas urinarias aisladas de conejos con grupo de estudio de vejigas urinarias aisladas de conejos expuestas a 0,375 mM del catión sodio en ambas soluciones.

d.2.6. Grupo control de vejigas urinarias aisladas de conejos con grupo de estudio de vejigas urinarias aisladas de conejos expuestas a 10 mM amilorida en la solución del lado mucoso.

d.3. Cada grupo control también fue comparado en el tiempo en dos momentos: al inicio en un período denominado Período Control y después en un período denominado Período Experimental.

d.3.1. Condiciones de los baños en el Período de Control de los Grupos

Controles:

- Temperatura de las soluciones en el lado mucoso y seroso: 20°C.
- pH 7.4 en las soluciones del lado mucoso y seroso.
- Concentración total del catión sodio en las soluciones del lado mucoso y seroso según la especie.
  - 107 mM en la piel y la vejiga urinaria de sapo.
  - 157 mM en la vejiga urinaria, la vesícula biliar y el colon de conejo.
  - 155 mM en la vejiga urinaria y el colon de rata.
- Ausencia de ADH y amilorida en las soluciones.

d.3.2. Condiciones de los baños en el Período Experimental de los Grupos

Controles:

Después de las mediciones del periodo de control en los grupos controles, se cambiaron las soluciones o se agregó un fármaco según sea la situación y treinta minutos después de esta manipulación experimental, se midieron en este segundo período las mismas variables operacionales nuevamente.

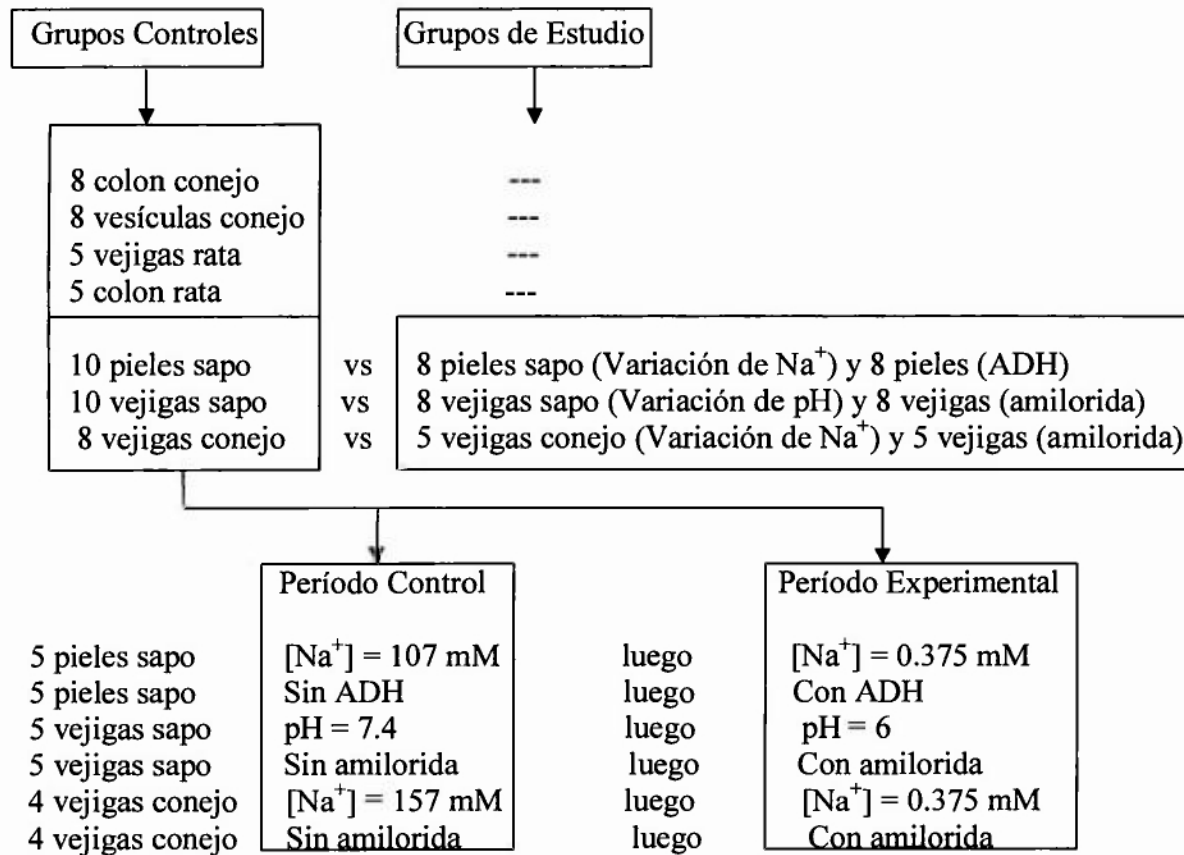
- Temperatura de las soluciones en el lado mucoso y seroso: 20°C. No se varió la temperatura en ningún momento.

- Manipulación de una variable en los grupos controles después de registrar en el período de control, tal como sigue:
  - A 5 pieles de sapo del grupo control se les disminuyó la concentración del ión  $\text{Na}^+$  de la solución a 0.375 mM, manteniendo el pH en 7.4, en ausencia de ADH y amilorida.
  - A 5 pieles de sapo del grupo control se les agregó 100 mU/ml de ADH en la solución del lado seroso, manteniendo la concentración del ión  $\text{Na}^+$  en 107 mM, el pH 7.4 y en ausencia de amilorida.
  - A 5 vejigas urinarias de sapo del grupo control se les disminuyó el pH a 6 en la solución del lado seroso, manteniendo la concentración del ión  $\text{Na}^+$  en 107 mM, en ausencia de ADH y amilorida.
  - A 5 vejigas urinarias de sapo del grupo control se les agregó 10 mM amilorida en la solución del lado mucoso, manteniendo la concentración del ión  $\text{Na}^+$  en 107 mM, el pH en 7.4 y en ausencia de ADH.
  - A 4 vejigas urinarias de conejo del grupo control se les disminuyó la concentración del ión  $\text{Na}^+$  a 0.375 mM, manteniendo el pH en 7.4 y en ausencia de ADH y amilorida.
  - A 4 vejigas urinarias de conejo del grupo control se les agregó 10 mM amilorida en la solución del lado mucoso, manteniendo

la concentración del ión  $\text{Na}^+$  en 157 mM, el pH en 7.4 y en ausencia de ADH.

Refiérase a la figura 3 para resumir mediante un flujograma a las agrupaciones de los animales en Grupos Controles en Período Control y Período Experimental y en Grupos de Estudio.

Figura 3



Flujograma de las agrupaciones de los animales.

## 2. Definición de las Variables Operacionales.

### a) Gradiente de voltaje transepitelial ( $\Delta V$ ):

Es la diferencia de voltaje espontáneo (mV) entre el lado mucoso y el lado seroso de la membrana, medida con los electrodos de un multímetro colocados respectivamente en los baños mucoso y seroso de la cámara, cuando el valor en el multímetro digital solamente oscila  $<1\text{mV}$  al cabo de 30 minutos después de montado el circuito abierto.

### b) Resistencia Transepitelial Total ( $R_{te}$ ):

Se calcula mediante Ley de Ohm ( $R = V / I$ ). Cuando se inyecta un pulso de corriente de  $6 \mu\text{A}$  de 1 s de duración se mide el cambio de gradiente de voltaje. Se obtiene el máximo voltaje instantáneo registrado con el multímetro y se le resta el voltaje espontáneo transepitelial obtenido anteriormente. La resistencia transepitelial total es la división que resulta del cambio de voltaje registrado en voltios entre la corriente inyectada de  $6 \times 10^{-6} \text{ A}$ . La unidad de medida de resistencia kohm/cm<sup>2</sup>, atendiendo al área de superficie de la membrana biológica.

### c) Corriente Cortocircuito ( $I_{sc}$ ):

Es la corriente medida en el circuito cerrado cuando el voltaje transepitelial es cero ó muy cercano a éste al colocar una fuerza electromotriz de 9 hasta 56 V (según lo requiera) y un potenciómetro variable que anula a los gradientes de transporte iónico pasivos. La unidad de medida es  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

Las mediciones eléctricas se realizaron 30 minutos después de haber montado el circuito abierto, tanto en los grupos controles como en los grupos de estudio. Hubo un lapso de 30 minutos entre las mediciones del período control y el período experimental en los grupos controles, para asegurar ese tiempo de exposición de los controles a las manipulaciones. El orden de las mediciones eléctricas siempre fue el siguiente: primero se midió el gradiente de voltaje espontáneo; luego se calculó la resistencia transepitelial total cuando se inyectó corriente y finalmente se midió la corriente cortocircuito en el circuito cerrado.

### 3. Montaje Experimental.

#### a) Cámara de Ussing Modificada:

Consiste de dos hemicámaras cúbicas de acrilato (0.5 ó 2 cm cada lado). Las dos hemicámaras son idénticas. Cada una tiene 5 lados para que al unir las entre sí, el lado vacante quede ocupado por la membrana biológica de estudio. De acuerdo al tamaño de la membrana que se logre disecar, se utilizarán ya sea las hemicámaras de 0.5 cm de lado o las hemicámaras de 2 cm de lado. La membrana biológica que separa a las dos hemicámaras tendrá respectivamente un área de  $0.25 \text{ cm}^2$  o de  $4 \text{ cm}^2$ . Cada hemicámara contiene una solución electrolítica con un volumen de 125 microlitros en el caso de la hemicámara de 0.5 cm de lado; mientras que la hemicámara de 2 cm de lado contiene un volumen de 8 mililitros de solución electrolítica. Una solución contacta a la superficie apical del epitelio,

al que se denominará lado mucoso o lado apical de la cámara de Ussing. La solución de la otra hemicámara está más próxima a la superficie basolateral del epitelio o del tejido submucoso y se denominará lado seroso o lado basolateral de la cámara.

Las soluciones que se colocarán en las hemicámaras son las siguientes:

° Solución Ringer de acuerdo a la especie (conejo, rata o sapo) la cual contiene a concentraciones isosmolares de los iones sodio, cloruro, potasio, bicarbonato, magnesio, calcio y fosfato. Véase las concentraciones de las soluciones en el subtítulo 4.

° Solución Ringer Colina la cual contiene una pobre concentración del ión  $\text{Na}^+$ , porque la colina reemplaza mol por mol al catión sodio, de manera que esta solución también es isosmolar.<sup>(17)</sup>

En el lado superior de cada hemicámara existen dos orificios de 3 mm de diámetro. En un orificio de cada hemicámara se introduce herméticamente 5 mm de un tubo plástico flexible de 5 cm de longitud que está conectado también herméticamente por el otro extremo a un cilindro de 1 ó 2 cm de diámetro por 4 cm de largo. Este cilindro de acrílico está abierto por su borde superior. Cada cilindro, uno conectado a cada hemicámara, contiene la misma solución electrolítica de las hemicámaras, pero recibiendo una mezcla de 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$  de un tanque. El flujo de oxígeno que reciben los cilindros es regulado con un manómetro a 3 L/min. El otro orificio de cada hemicámara se utiliza para introducir los electrodos del multímetro que mide voltaje, corriente o

temperatura; los electrodos que inyectan corriente y/o el electrodo negativo que forma el circuito cerrado con la batería y la resistencia externa.

Se coloca una capa de sellante de cianoacrilato en los bordes del lado vacante de cada hemicámara para adherir a la membrana biológica y evitar el escape de la solución de cada lado. Lewis<sup>(17)</sup> refiere que la vaselina como sellante solamente logra una resistencia hasta de 30 000 ohm- $\mu$ F; en cambio el silicón puede aumentar esta resistencia de los bordes de la membrana hasta 78 000 ohm- $\mu$ F. Está demostrado que esta resistencia aumenta hasta dos horas después de montada la goma sellante, sin reducir la superficie efectiva de la membrana biológica para los transportes iónicos.

b) Instrumentos:

b.1. Multímetro Digital Modelo AVD-830 D

Se utilizaron dos multímetros en el circuito eléctrico, uno para medir voltaje y el otro para medir corriente. Se realizaron las pruebas de validación en el Departamento de Física de la Escuela de Ciencias Exactas de la Universidad De Panamá y en el Departamento de Biomédica de la Universidad Especializada De Las Américas.

Sensibilidad del Multímetro: 0.95

Especificidad del Multímetro: 0.90

b.2. Estimulador Grass SD9

El estimulador inyecta una corriente predeterminada al circuito abierto para calcular la resistencia transepitelial total. Se realizaron pruebas de validación en

el Departamento de Biomédica de la Universidad Especializada De Las Américas.

Sensibilidad del Estimulador: 0.90

Especificidad del Estimulador: 1.00

c) Circuitos Eléctricos:

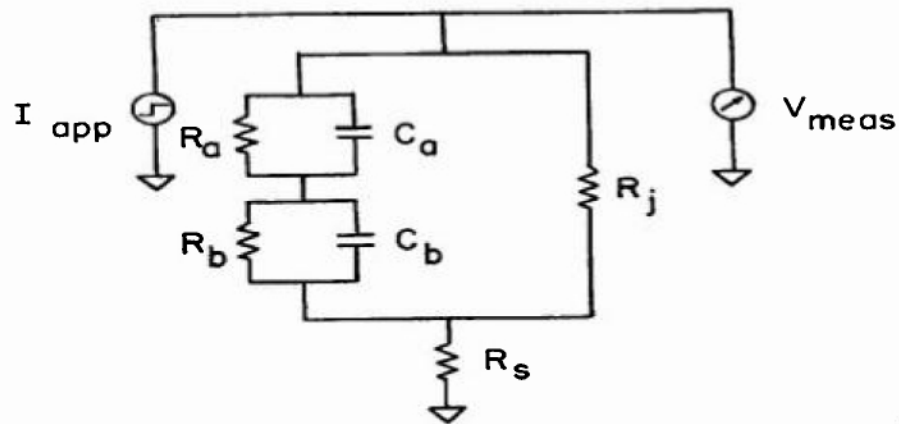
El gradiente espontáneo de voltaje, la resistencia transepitelial y la corriente cortocircuito se midieron utilizando dos circuitos eléctricos. Primeramente se utilizó un circuito abierto para medir directamente la diferencia de voltaje y después se inyectó corriente para calcular la resistencia. Luego se dispuso de un circuito cerrado para que el gradiente de voltaje transepitelial espontáneo se anulara y se midió la corriente cortocircuito con el amperímetro colocado en serie.

c.1.Circuito Abierto (Figuras 4 y 5)

Se introduce el electrodo positivo de registro en una de las hemicámaras y el electrodo negativo en la otra hemicámara. Estos electrodos están conectados a un multímetro que mide voltaje en el orden de las milésimas. De esta manera el voltímetro se encuentra en paralelo con la membrana biológica. La diferencia de potencial es la primera medición que se realiza en cada control y en cada manipulación, después de haber colocado la membrana entre las dos hemicámaras con el sellante, los tornillos fijados externamente y la solución electrolítica oxigenada dentro de cada hemicámara. Esta medición se realizó alrededor de 30 minutos después de acabado el montaje.

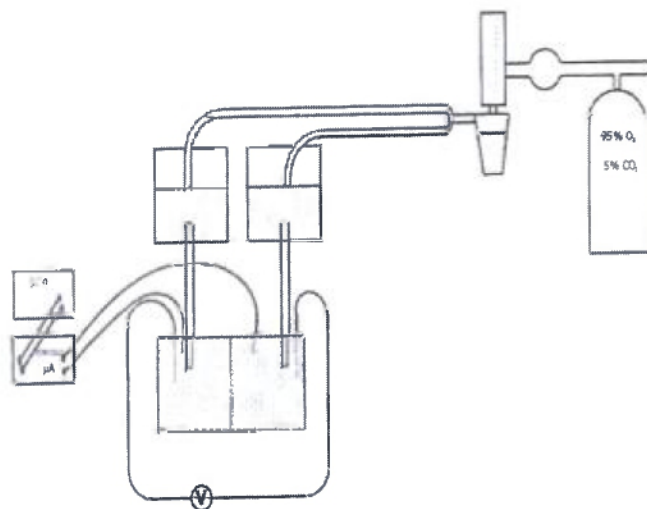
Luego se inyecta una corriente de  $6 \mu\text{A}$  durante un segundo mediante el estimulador Grass SD9 a través de un electrodo fino de estimulación introducido en cada hemicámara. Se mide la diferencia de potencial, esto es el máximo voltaje registrado con el voltímetro menos el voltaje espontáneo medido anteriormente. La resistencia se calcula mediante Ley de Ohm. La corriente inyectada siempre es 6 microamperios durante un segundo. Esto se determinó midiéndola con un amperímetro en serie con la membrana de acuerdo a los parámetros prefijados en el estimulador: 4 V, 18 Hz, 120 milisegundos de duración.

Figura 4



Modelo de medición de voltaje en el circuito equivalente de un epitelio (denominaciones  $I_{app}$  es corriente aplicada y  $V_{meas}$  es voltaje medido)

Figura 5



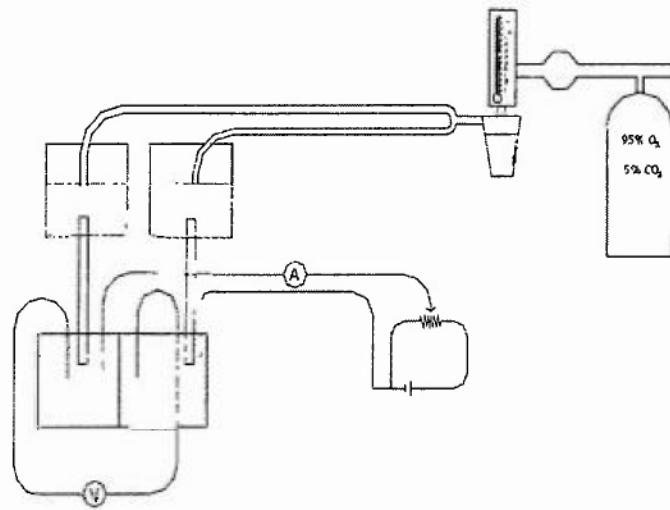
Montaje biológico en el circuito abierto

### c.2. Circuito Cerrado (Figura 6):

La tercera medición es la corriente cortocircuito. Se coloca una batería y un potenciómetro de resistencia variable en serie con la membrana biológica. La salida negativa de la batería se introduce a través de un alambre de plata-cloruro de plata en la hemicámara donde se encuentra el electrodo negativo del voltímetro. A partir de una resistencia externa de cero se va incrementando hasta lograr que la diferencia de voltaje espontáneo disminuya hasta cero. La corriente en el circuito se mide con el amperímetro colocado en serie con la membrana biológica; esto es el electrodo negativo de registro de corriente en la hemicámara donde se encuentra el electrodo positivo de registro de voltaje y el electrodo positivo de registro de corriente se une a la salida central del potenciómetro. De esta manera se cierra el circuito. Dependiendo de la membrana biológica que se

estudia, la batería y el potenciómetro varían respectivamente entre 9 – 56 V y entre 1 kohm – 1 Mohm. En el caso de que se necesite más de 9 V en el circuito, se utilizaron entre 2 y 6 baterías alcalinas de 9 V cada una colocadas en serie.

Figura 6



Montaje Biológico en el Circuito Cerrado

#### 4. Soluciones Electrolíticas.

**Solución Ringer para conejo:** (mM) 132 NaCl, pH 7.4, 7 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 0.375 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 glucosa.

**Solución Ringer-Locke para rata:** (mM) 130 NaCl, pH 7.4, 7 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 0.375 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 glucosa.

**Solución Ringer para sapo:** (mM) 102 NaCl, pH 7.4, 4 KCl, 5 NaHCO<sub>3</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 0.8 MgSO<sub>4</sub>, 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 glucosa.

**Solución Ringer-Colina:** (mM)111.2 Colina, pH 7.4, 5.8 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 0.375 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 glucosa.

5. Fármacos y Reactivos.

Vasopresina 100 mU/ml en la solución del lado seroso de la cámara.

Amilorida 10 mM en la solución del lado mucoso de la cámara.

HCl 0.1 N para acidificar la solución del lado seroso de la cámara (pH 6).

KCl 3 M para sacrificar a los conejos y ratas.

6. Resumen de las Manipulaciones en los Grupos de Estudio y en el Período Experimental.

Cuadro III  
Manipulaciones en los Grupos de Estudio y en el Período Experimental

Epitelio	Variación de Na <sup>+</sup>	Variación de pH	Vasopresina	Amilorida
Piel de sapo	<b>Sí</b>	-----	<b>Sí</b>	-----
Vejiga de sapo	-----	<b>Sí</b>	-----	<b>Sí</b>
Vejiga de conejo	<b>Sí</b>	-----	-----	<b>Sí</b>

## 7. Disecciones.

### a) Conejo y Rata:

Estos animales fueron sedados con 15 mg/kg de peso de xilazina intraperitoneal. Después fueron sacrificados con 2 cc de KCl 3 M intracardíaco. Inmediatamente después se abre la cavidad abdominal para la extracción de la vejiga urinaria, vesícula biliar y 3 cm de colon proximal del conejo; mientras que la vejiga urinaria y 3 cm de colon proximal de la rata. La vejiga urinaria y la vesícula biliar fueron lavadas tres veces con solución Ringer y colocadas separadamente en soluciones oxigenadas. El colon es lavado cinco veces con la solución Ringer para descartar el contenido fecal y después se coloca en solución oxigenada. Este procedimiento se realiza lo más rápidamente posible.

La membrana que se utilizará en la Cámara de Ussing debe tener el menor espesor posible, casi cercano al espesor epitelial. Para esto es necesario disecar las capas submucosas, musculares y adventicias y separarlas de la capa de tejido epitelial. En el caso de la vejiga urinaria y colon es necesario llenar estos órganos huecos con solución Ringer oxigenada a fin de facilitar la disección. La vejiga urinaria llena de líquido es anudada con hilo de seda por su base y el colon es anudado por los extremos proximal y distal. Se utilizan pinzas finas de disección para lograr la máxima eliminación de músculo, vasos sanguíneos y tejido conectivo. La vesícula biliar es cortada con una tijera de punta fina por su diámetro más largo, eliminando las puntas y se descarta su contenido biliar. De esta manera se obtiene un rectángulo o cuadrado ideal para su posterior

colocación entre las dos hemicámaras. El interior vesicular debe lavarse enérgicamente con solución Ringer oxigenada para eliminar los restos biliares. El espesor de la vesícula es delgado, razón por la cual no es necesario separar las capas mediante la disección.

b) Sapo:

El sapo es descerebrado y desmedulado. Se corta un cuadrado de piel abdominal de 2.5 cm de cada lado y se coloca en solución Ringer oxigenada. La vejiga urinaria bilobulada es extraída con cuidado, cortando el urostilo que la separa de la cloaca. En el caso del sapo, al igual que en la vesícula biliar de los mamíferos, no se disecaron las capas de la piel y vejiga urinaria.

8. Espesores Epiteliales y de Membrana.

Se obtuvieron muestras de los tejidos disecados de colon, vejiga y vesícula de conejo, colon y vejiga de rata y la piel y vejiga urinaria de sapo para medir los espesores epiteliales y los espesores totales respectivos de las muestras. Se utilizó un microscopio de luz que tiene un ocular cuadrículado. Cada raya del ocular mide 0.004927 mm en el poder 20x y 0.002470 mm en el poder 40x. Cada espécimen se fijó en formalina amortiguada y después fue teñido con hematoxilina y eosina antes de las mediciones (Anexo 1). Se realizaron 8 observaciones de diferentes campos en cada espécimen y luego se promediaron los espesores epiteliales y los espesores totales de cada tejido (Cuadro IV). De los especímenes revisados, la vejiga de la rata tuvo el menor espesor

epitelial y la piel de sapo, el mayor espesor epitelial. En cambio el menor espesor total lo tuvo la vesícula de conejo y el mayor espesor total, la piel de sapo. Las razones **Espesor Epitelial : Espesor Total** fueron las siguientes: colon de conejo (1:3.8), vejiga de conejo (1:3.6), vesícula de conejo (1:1.6), vejiga de sapo (1:2.8), piel de sapo (1:4.0), colon de rata (1:5) y vejiga de rata (1:5.8). Lewis y Diamond (1976) reportaron un espesor epitelial en la vejiga de conejo entre 15 y 60 micras y un espesor de tejido conectivo de 80 micras.

Cuadro IV  
Espesores Epiteliales y Espesores Totales

Especimen	Número de Observaciones	Espesor promedio Epitelial (micras)	Espesor promedio total (micras)
Colon Conejo	8	28.9	110.1
Vejiga Conejo	8	23.8	85.3
Vesícula Conejo	8	19.7	32.3
Vejiga Sapo	8	19.1	53.5
Piel Sapo	8	35.1	140.9
Colon Rata	8	18.5	92.4
Vejiga Rata	8	9.2	53.8

#### 9. Prueba Estadística.

Se utilizó la **t de student** con un nivel de confianza de 0.01 y 0.05 para la comparación de dos grupos entre sí, tal como se indicó con anterioridad. La comparación se realiza sobre una variable en particular, es decir hay una t para cada variable operacional para cada par de grupos que se comparan. El valor de t se obtiene mediante la fórmula siguiente:

**(Fórmula 7)**

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}}$$

Donde  $\bar{X}$  es el valor promedio de cada grupo, S es la desviación estándar y N el tamaño de la muestra.

Para saber si el valor de t es significativo, se aplica la fórmula y se calculan los grados de libertad. La prueba t se basa en una distribución muestral o poblacional de diferencia de medias conocida como la distribución t de Student. Los grados de libertad constituyen el número de maneras en que los datos pueden variar libremente. Son determinantes, ya que nos indican qué valor debemos esperar de t dependiendo del tamaño de los grupos que se comparan. Al elegir el nivel de confianza, se compara en la tabla respectiva el valor obtenido con el valor de referencia. Si el valor calculado es igual o mayor al que aparece en la tabla, se acepta la hipótesis de investigación. Pero si es menor, se acepta la hipótesis nula. Los niveles de confianza adquieren el significado del que se ha hablado (el .05 significa 95% de que los grupos en realidad difieran significativamente entre sí y 5% de posibilidad de error). Cuanto mayor sea el valor de t calculado respecto al valor de la tabla y menor sea la posibilidad de error, mayor será la certeza en los resultados.

## RESULTADOS

### 1. Descripción de los Resultados de los Grupos Controles.

En relación al voltaje, la resistencia y la corriente cortocircuito de los grupos controles se señalan algunas características particulares. La piel de sapo y la vejiga de rata presentaron los mayores gradientes de voltaje promedios en sus epitelios (34,4 mV y 28,1 mV respectivamente); en cambio el epitelio de colon de rata (1,8 mV) y colon de conejo (3,4 mV) presentaron los menores gradientes de voltaje. El epitelio de vejiga de sapo, vejiga de conejo y vesícula de conejo presentaron valores promedios parecidos en los voltajes (9,5 mV, 9,1 mV y 9,1 mV respectivamente). Las mayores variabilidades de voltajes ocurrieron en la piel de sapo ( $\sigma = 11,0$  mV) y la vejiga de rata ( $\sigma = 8,5$  mV); en cambio el colon de conejo y el colon de rata presentaron las menores variabilidades (0,5 mV y 0,4 mV respectivamente). Véase Cuadro V y Figuras 7 y 8.

El epitelio de la vejiga de rata y de conejo presentaron elevadas resistencias transepiteliales (643,2 y 590,6 kohm/cm<sup>2</sup>); mientras que la vesícula de conejo presentó la menor resistencia (5,3 kohm/cm<sup>2</sup>). En orden decreciente, las resistencias transepiteliales resultaron como sigue: vejiga de rata > vejiga de conejo > piel de sapo > colon de conejo > vejiga de sapo > colon de rata > vesícula de conejo. La resistencia transepitelial de la vejiga urinaria de conejo presentó la mayor desviación estándar (107,9 kohm/cm<sup>2</sup>).

La mayor corriente cortocircuito ocurrió en el epitelio vesicular de conejo ( $32,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), seguido de la vejiga de sapo ( $24,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). El resto de los epitelios presentaron corrientes promedios menores que  $5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . La menor corriente se presentó en el grupo control de colon de rata ( $0,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). La mayor variabilidad de la corriente cortocircuito ocurrió en la vejiga urinaria de sapo ( $5,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) y en la vesícula de conejo ( $3,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). La menor variabilidad de la corriente cortocircuito ocurrió en el colon de ambos mamíferos ( $0,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ).

La corriente cortocircuito del colon de rata apenas representó 2% la corriente cortocircuito de la vejiga urinaria de sapo. La corriente del colon de conejo representó 6,9% la corriente de la vejiga urinaria de sapo. En esta investigación, la corriente cortocircuito de la vejiga de sapo resultó diez veces mayor que la corriente de la vejiga urinaria de conejo.

Cuadro V

MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL (PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR) DEL VOLTAJE ESPONTÁNEO, LA RESISTENCIA Y LA CORRIENTE CORTOCIRCUITO DE LOS CONTROLES

EPITELIO	$\Delta V$ (mV) espontáneo		R te (kohm/cm <sup>2</sup> )		Corriente ( $\mu A/cm^2$ )	
	Promedio	$\sigma$	Promedio	$\sigma$	Promedio	$\sigma$
Piel Sapo	34.4	11.0	82.8	9.0	4.8	1.1
Vejiga Sapo	9.5	2.3	35.0	6.2	24.7	5.3
Vejiga Conejo	9.1	2.6	590.6	107.9	2.5	0.4
Vesícula Conejo	9.1	3.3	5.3	1.0	32.9	3.5
Colon Conejo	3.4	0.5	37.5	4.3	1.7	0.2
Vejiga Rata	28.1	8.5	643.2	56.4	2.8	0.8
Colon Rata	1.8	0.4	23	3.8	0.7	0.2

Figura 7

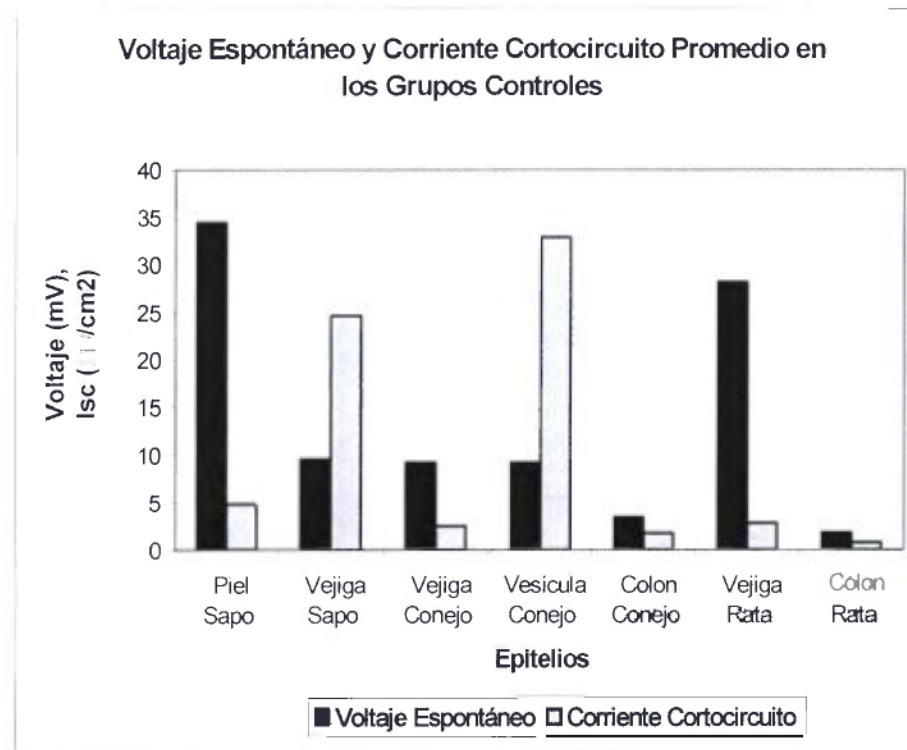
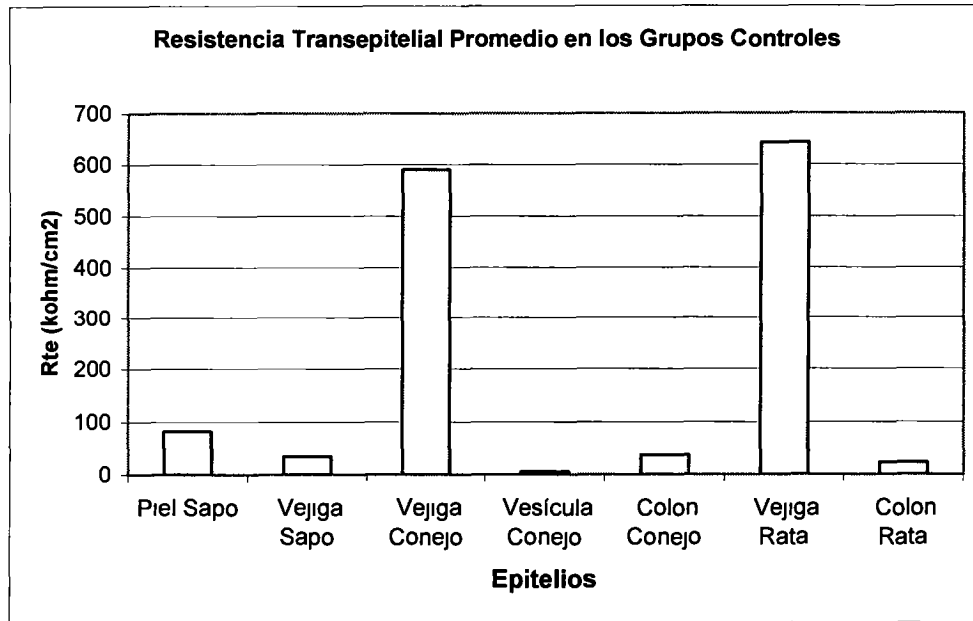


Figura 8



## 2. Descripción de los Resultados de los Grupos de Estudio.

Los epitelios que fueron sometidos a experimentación, ya sea variando la concentración de sodio, variando el pH o en presencia de ADH o amilorida fueron los siguientes: piel y vejiga urinaria de sapo y vejiga urinaria de conejo. El resto de los epitelios, colon de conejo y rata, vejiga de rata y vesícula de conejo no fueron sometidos a experimentación. De los grupos de estudio, el mayor gradiente de voltaje espontáneo ocurrió en la piel de sapo con ADH en la solución del lado seroso (35,4 mV); en cambio el menor voltaje se presentó en la vejiga de sapo con pH 6 en la solución del lado seroso (3,8 mV). La mayor resistencia ocurrió en la vejiga de conejo con variación de sodio (586 kohm/cm<sup>2</sup>) y con amilorida en la solución del lado mucoso (405 kohm/cm<sup>2</sup>). La vejiga de sapo con amilorida del lado mucoso y el grupo de estudio de la vejiga de sapo con pH 6 del lado seroso tuvieron las menores resistencias (31,6 y 30,1 kohm/cm<sup>2</sup> respectivamente). La mayor corriente cortocircuito se presentó en el grupo de vejiga de sapo con pH 6 del lado seroso (14,4 µA/cm<sup>2</sup>) y la menor corriente se presentó en el grupo de la vejiga de conejo con variación de sodio (1 µA/cm<sup>2</sup>). Véase Cuadro VI.

Cuadro VI

MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL (PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR) DEL VOLTAJE, RESISTENCIA Y CORRIENTE DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

GRUPOS DE ESTUDIO	$\Delta V$ espontáneo (mV)		R te (kohm/cm <sup>2</sup> )		Corriente ( $\mu A/cm^2$ )	
	Promedio	$\sigma$	Promedio	$\sigma$	Promedio	$\sigma$
Variación Na <sup>+</sup> Piel Sapo	13	4.9	93.1	3.8	3.1	0.7
ADH seroso Piel Sapo	35.4	3.3	39.5	6	7.8	1.2
pH 6 seroso Vejiga Sapo	3.8	0.7	30.1	3.1	14.4	1.6
Amilorida mucoso Vejiga Sapo	4.5	1.4	31.6	5.8	12.4	2
Variación Na <sup>+</sup> Vejiga Conejo	6.4	1.8	586	78.6	1	0.2
Amilorida mucoso Vejiga Conejo	9.5	2	405	135	1.8	0.5

En el Cuadro VII y en las figuras 9, 10 y 11 se resumen las medidas de tendencia central de los grupos controles y los grupos de estudio. A continuación se puntualizan los seis experimentos realizados en los grupos de estudio: 1) Primer Experimento sobre la variación de la concentración de sodio en la piel de sapo (Ringer vs Ringer Colina), 2) Segundo Experimento sobre la variación de la concentración del catión sodio en la vejiga de conejo (Ringer vs Ringer Colina), 3) Tercer Experimento sobre la administración de ADH seroso en la piel de sapo, 4) Cuarto Experimento sobre la variación de pH seroso

en la vejiga de sapo (pH 7.4 vs pH 6), 5) Quinto Experimento sobre la administración de amilorida mucoso en la vejiga de sapo y 6) Sexto Experimento sobre la administración de amilorida mucoso en la vejiga de conejo.

Cuadro VII

MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL (PROMEDIO +/- DESVIACIÓN ESTÁNDAR) DE VOLTAJE, RESISTENCIA Y CORRIENTE DE LOS GRUPOS CONTROLES Y LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Epitelio	Controles: Ringer				Estudio: Ringer Colina			
	n	$\Delta V$ (mV)	R (kohm/cm <sup>2</sup> )	Isc ( $\mu A/cm^2$ )	n	$\Delta V$ (mV)	R (kohm/cm <sup>2</sup> )	Isc ( $\mu A/cm^2$ )
Piel Sapo	10	34.4 +/- 11	82.8 +/- 9.0	4.8 +/- 1.1	8	13 +/- 4.9	93.1 +/- 3.8	3.1 +/- 0.7
Vejiga Conejo	8	9.1 +/- 2.6	590.6 +/- 107.9	2.5 +/- 0.4	5	6.4 +/- 1.8	586 +/- 78.6	1 +/- 0.2

Epitelio	Controles				Estudio: ADH seroso 100 mU/ml			
	n	$\Delta V$ (mV)	R (kohm/cm <sup>2</sup> )	Isc ( $\mu A/cm^2$ )	n	$\Delta V$ (mV)	R (kohm/cm <sup>2</sup> )	Isc ( $\mu A/cm^2$ )
Piel Sapo	10	34.4 +/- 11	82.8 +/- 9.0	4.8 +/- 1.1	8	35.4 +/- 3.3	39.5 +/- 6	7.8 +/- 1.2

Epitelio	Controles				Estudio. pH 6 seroso			
	n	$\Delta V$ (mV)	R (kohm/cm <sup>2</sup> )	Isc ( $\mu A/cm^2$ )	n	$\Delta V$ (mV)	R (kohm/cm <sup>2</sup> )	Isc ( $\mu A/cm^2$ )
Vejiga Sapo	10	9.5 +/- 2.3	35 +/- 6.2	24.7 +/- 5.3	8	3.8 +/- 0.7	301 +/- 31	14.4 +/- 1.6

Epitelio	Controles				Estudio: Amilorida mucoso 10 mM			
	n	$\Delta V$ (mV)	R (kohm/cm <sup>2</sup> )	Isc ( $\mu A/cm^2$ )	n	$\Delta V$ (mV)	R (kohm/cm <sup>2</sup> )	Isc ( $\mu A/cm^2$ )
Vejiga Sapo	10	9.5 +/- 2.3	35 +/- 6.2	24.7 +/- 5.3	8	4.5 +/- 1.4	31.6 +/- 5.8	12.4 +/- 2
Vejiga Conejo	8	9.1 +/- 2.6	590.6 +/- 107.9	2.5 +/- 0.4	5	9.5 +/- 2	405 +/- 135	1.8 +/- 0.5

Figura 9

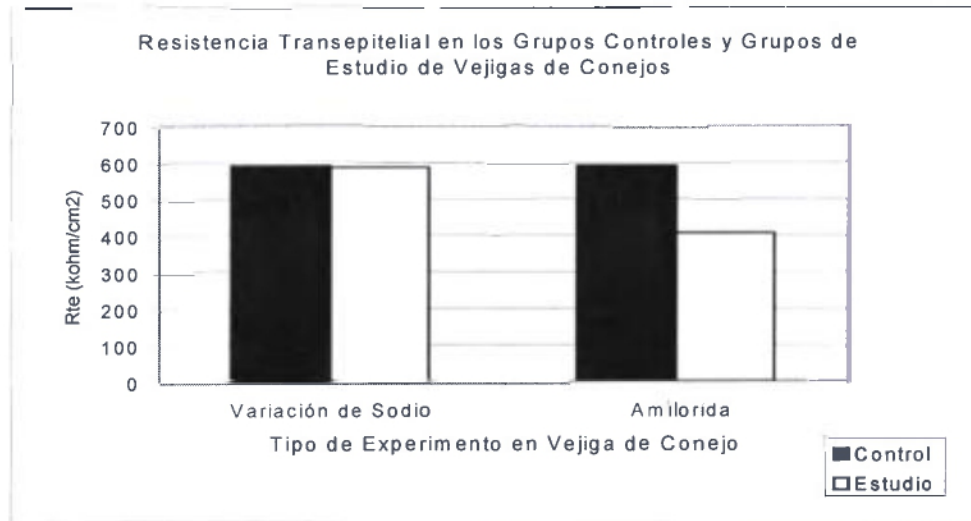


Figura 10

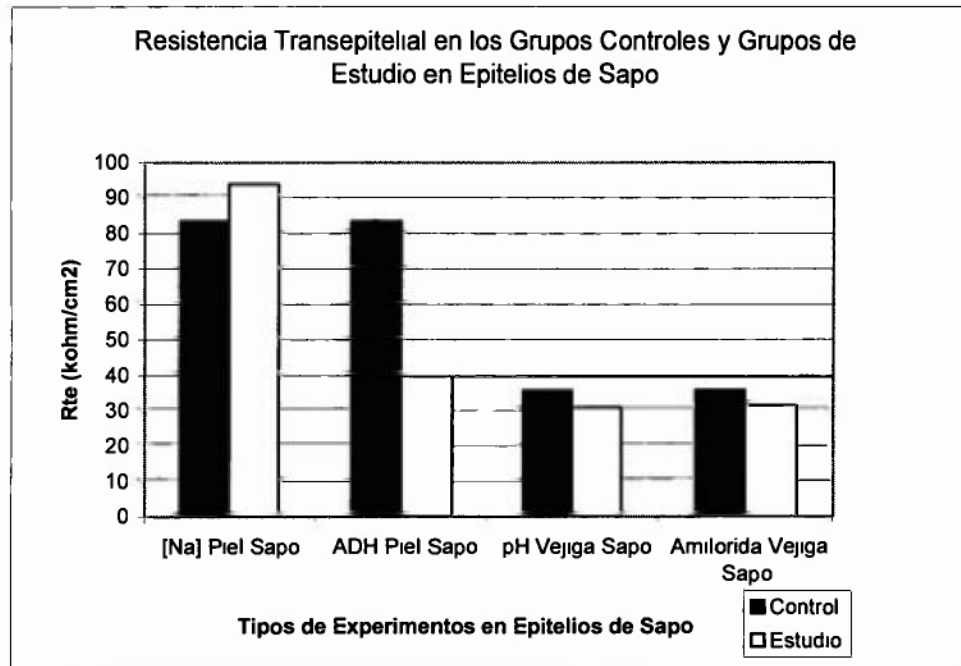
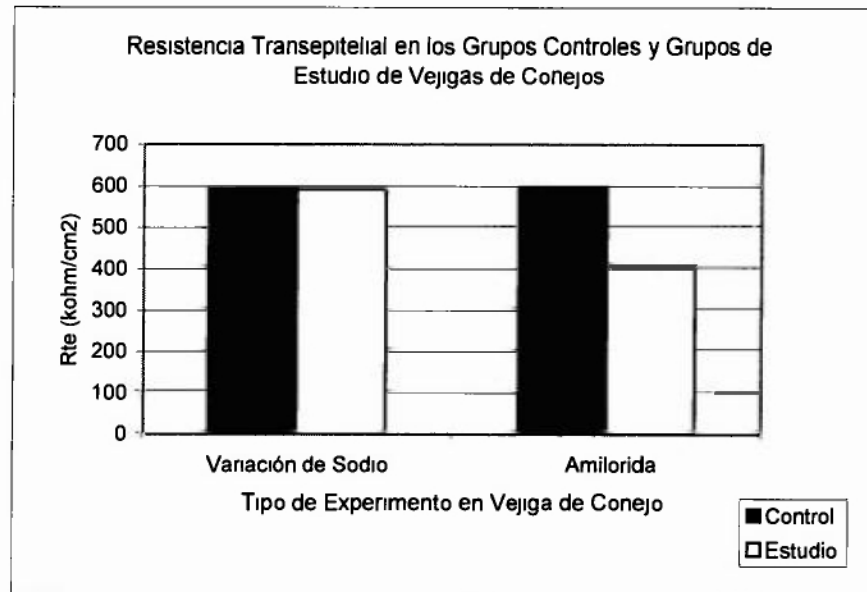


Figura 11



Los trabajos iniciales de las corrientes cortocircuitos en epitelios de sapo de Francis (1933), Stapp (1941) y Ussing (1951) señalaron el uso de la resistencia externa en el circuito cerrado, sin especificar la magnitud de la misma. Los estudios electrofisiológicos posteriores prescindieron de la resistencia externa porque utilizaron la técnica de pinzamiento de voltaje para medir la corriente cortocircuito. En el Cuadro VIII se resume el valor promedio y la desviación estándar de la resistencia externa que fue utilizada para los grupos controles y de estudio en el circuito cerrado.

En los grupos controles de colon de conejo y vejiga urinaria de rata, los circuitos eléctricos cerrados utilizaron las mayores resistencias externas para la medición de la corriente cortocircuito (302.5 y 352.2 kohm respectivamente). En cambio en los controles de vesícula de conejo y piel de sapo, los circuitos eléctricos cerrados utilizaron las menores resistencias externas (14.1 y 41.6 kohm respectivamente).

En el grupo de estudio de piel de sapo con 0.375 mM del catión sodio, el circuito cerrado utilizó 24% mayor resistencia externa que el grupo control de piel de sapo. En la vejiga de sapo con pH 6 del lado seroso, el circuito cerrado utilizó 47% menor resistencia externa que el grupo control de vejiga de sapo. En las vejigas de conejos expuestas a amilorida y pobre concentración del catión sodio, las resistencias externas utilizadas en los circuitos eléctricos cerrados variaron 4% respecto al grupo control de vejigas de conejos.

Cuadro VIII

PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA RESISTENCIA EXTERNA DE LOS GRUPOS CONTROLES Y LOS GRUPOS DE ESTUDIO EN EL CIRCUITO CERRADO

EPITELIO	RESISTENCIA EXTERNA DE CONTROLES			RESISTENCIA EXTERNA DE ESTUDIO		
	n	Promedio (kohm)	$\sigma$ (kohm)	Tipo de Estudio n	Promedio (kohm)	$\sigma$ (kohm)
Piel Sapo	n=10	41.6	13.7	Variación Na <sup>+</sup> n=8	51.6	8.7
				ADH seroso n=8	42.2	4.5
Vejiga Sapo	n=10	131	60.8	pH 6 n=8	69.5	10.3
				Amilorida n=8	122.1	39.5
Vejiga Conejo	n=8	181.1	46.9	Variación Na n=5	188.6	54.1
				Amilorida n=5	172.6	18.7
Vesícula Conejo	n=8	14.1	5.4			
Colon Conejo	n=8	302.5	57.4			
Vejiga Rata	n=5	352.2	84.8			
Colon Rata	n=5	62.6	11.1			

### 3. Comparación entre los Grupos Controles.

En la mayoría de las comparaciones de voltaje, resistencia y corriente cortocircuito entre los grupos controles se demuestra diferencia significativa con un nivel de confianza de 0.01, excepto en las siguientes situaciones: a) No hay diferencia en el voltaje espontáneo entre la vejiga de conejo y la vejiga de sapo, b) No hay diferencia en el voltaje espontáneo entre la vejiga de conejo y la vesícula de conejo, c) No hay diferencia en la resistencia transepitelial ni en la corriente cortocircuito entre la vejiga de conejo y la vejiga de rata.

En cambio hubo diferencia significativa al comparar voltaje, resistencia y corriente entre la piel y la vejiga de sapo, entre la vejiga y el colon de conejo, entre la vesícula y el colon de conejo, entre la vejiga y el colon de rata y entre el colon de conejo y de la rata. También hubo diferencia significativa en la resistencia y corriente entre la vejiga de sapo y la de conejo, y entre la vejiga y la vesícula de conejo. El voltaje transespitelial es significativamente diferente entre la vejiga de la rata y la de conejo. Véase Cuadro IX.

## Cuadro IX

COMPARACIÓN DEL VOLTAJE, LA RESISTENCIA Y LA CORRIENTE  
CORTOCIRCUITO ENTRE LOS GRUPOS CONTROLES (t student)

Grupo Control 1	n1	Grupo Control 2	n2	Parámetro	t	p=0.01	Conclusión*
Vejiga Sapo	10	Vejiga Conejo	8	Voltaje	0.3412	2.583	Acepta Ho
				Resistencia	14.544 9	2.583	Acepta H1
				Corriente	13.199 3	2.583	Acepta H1
Piel Sapo	10	Vejiga Sapo	10	Voltaje	7.007	2.552	Acepta H1
				Resistencia	13.831 0	2.552	Acepta H1
				Corriente	11 625 7	2.552	Acepta H1
Vejiga Conejo	8	Vesícula Conejo	8	Voltaje	0	2.624	Acepta Ho
				Resistencia	15.342 0	2 624	Acepta H1
				Corriente	24 408 0	2.624	Acepta H1
Vejiga Conejo	8	Colon Conejo	8	Voltaje	6.089	2.624	Acepta H1
				Resistencia	14.487 1	2.624	Acepta H1
				Corriente	5 059 6	2.624	Acepta H1
Vesícula Conejo	8	Colon Conejo	8	Voltaje	4.830 3	2.624	Acepta H1
				Resistencia	20 629 7	2.624	Acepta H1
				Corriente	25.172 3	2.624	Acepta H1
Vejiga Rata	5	Colon Rata	5	Voltaje	6.911 0	2.896	Acepta H1
				Resistencia	24.533 1	2 896	Acepta H1
				Corriente	5.694 4	2.896	Acepta H1
Vejiga Rata	5	Vejiga Conejo	8	Voltaje	4.858 2	2.718	Acepta H1
				Resistencia	1.150 1	2.718	Acepta Ho
				Corriente	0.779 8	2 718	Acepta Ho
Colon Rata	5	Colon Conejo	8	Voltaje	6.361 9	2 718	Acepta H1
				Resistencia	6.359 1	2.718	Acepta H1
				Corriente	8.770 5	2.718	Acepta H1

Nota: \*H1 significa que existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos controles 1 y 2 que se comparan. Ho significa que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos controles 1 y 2 que se comparan.

#### 4. Comparación de los Grupos Controles y los Grupos de Estudio.

##### a) Sobre los Parámetros Transepiteliales:

Se evaluó el efecto de la concentración del catión sodio en las soluciones sobre el voltaje, la resistencia transepitelial y la corriente cortocircuito de la piel de sapo y la vejiga de conejo. El grupo control de la piel de sapo tuvo 107 mM del catión sodio en la solución de las hemicámaras. El grupo control de la vejiga de conejo tuvo 157 mM de sodio en la solución de las hemicámaras. Los grupos de estudio de la piel de sapo y la vejiga de conejo tuvieron 0.375 mM de sodio en la solución de sus hemicámaras. El grupo de estudio de la piel de sapo con poco catión sodio tuvo menor voltaje espontáneo, mayor resistencia transepitelial y menor corriente cortocircuito que el grupo control con concentración isotónica del catión sodio, para un nivel de confianza de 0.01. No hubo diferencia estadística en los parámetros eléctricos del grupo control y el grupo de estudio de la vejiga de conejo con menor concentración del catión sodio en las soluciones, para un nivel de confianza de 0.01; aunque sí hubo reducción significativa del voltaje espontáneo en el grupo de estudio de la vejiga de conejo para un nivel de confianza de 0.05. Véase Cuadros X y XI.

No hubo diferencia de voltaje entre los controles y los de estudio de piel de sapo cuando se administró ADH en el lado seroso de la solución, pero sí disminuyó la resistencia transepitelial y aumentó la corriente cortocircuito significativamente para un nivel de confianza de 0.01. En la vejiga de sapo, tanto

el estudio con amilorida del lado mucoso como el estudio con pH 6 del lado seroso disminuyeron significativamente el voltaje espontáneo y la corriente cortocircuito, al compararlos con los controles, para un nivel de confianza de 0.01. El descenso de la resistencia transepitelial por efecto de amilorida y el pH 6 solamente fue estadísticamente significativo para un nivel de confianza de 0.05 y contrasta con los resultados publicados por Ussing y Schultz (1951). En el grupo de estudio de amilorida en la vejiga de conejo no hubo descenso significativo de la corriente cortocircuito ni de la resistencia transepitelial para el nivel de confianza de 0.01, aunque sí fue significativo el descenso para un nivel de confianza de 0.05. No hubo diferencia significativa del voltaje espontáneo en el grupo de estudio de amilorida en el lado mucoso de la solución en la vejiga de conejo. Véase Cuadros X y XI.

Cuadro X

COMPARACIÓN DEL VOLTAJE, LA RESISTENCIA Y LA CORRIENTE  
CORTOCIRCUITO ENTRE LOS GRUPOS CONTROLES Y LOS GRUPOS DE ESTUDIO  
(t de Student, nivel de confianza 0.01)

Epitelio	Control	n	Estudio	n	Parámetro	t	p=0,01	Conclusión
Piel Sapo	Ringer Locke	10	Ringer Colina	8	Voltaje	5.506 9	2.583	Acepta H1
					Resistencia	3.272 7	2.583	Acepta H1
					Corriente	3.982 1	2.583	Acepta H1
Vejiga Conejo	Ringer Locke	8	Ringer Colina	5	Voltaje	2.209 7	2.718	Acepta Ho
					Resistencia	0.088 6	2.718	Acepta Ho
					Corriente	0.028 9	2.718	Acepta Ho
Piel Sapo	Sin ADH	10	ADH seroso	8	Voltaje	0.272 5	2.583	Acepta Ho
					Resistencia	12.198 3	2.583	Acepta H1
					Corriente	5.468 1	2.583	Acepta H1
Vejiga Sapo	pH 7.4	10	pH 6.0 seroso	8	Voltaje	7.419 1	2.583	Acepta H1
					Resistencia	2.181 4	2.583	Acepta Ho
					Corriente	11.178 5	2.583	Acepta H1
Vejiga Sapo	Sin Amilorida	10	Amilorida mucoso	8	Voltaje	5.683 2	2.583	Acepta H1
					Resistencia	1.198 4	2.583	Acepta Ho
					Corriente	6.761 7	2.583	Acepta H1
Vejiga Conejo	Sin Amilorida	8	Amilorida mucoso	5	Voltaje	0.311 8	2.718	Acepta Ho
					Resistencia	2.598 8	2.718	Acepta Ho
					Corriente	2.645 7	2.718	Acepta Ho

## Cuadro XI

COMPARACIÓN DE VOLTAJE, RESISTENCIA Y CORRIENTE CORTOCIRCUITO  
ENTRE LOS GRUPOS CONTROLES Y LOS GRUPOS DE ESTUDIO  
(t Student, nivel de confianza 0.05)

Epitelio	Control	n	Estudio	n	Parámetro	t	p=0.05	Conclusión
Piel Sapo	Ringer Locke	10	Ringer Colina	8	Voltaje	5.506 9	1.745 9	Acepta H1
					Resistencia	3.272 7	1.745 9	Acepta H1
					Corriente	3.982 1	1.745 9	Acepta H1
Vejiga Conejo	Ringer Locke	8	Ringer Colina	5	Voltaje	2.209 7	1.795 9	Acepta H1
					Resistencia	0.088 6	1.795 9	Acepta Ho
					Corriente	0.028 9	1.795 9	Acepta Ho
Piel Sapo	Sin ADH	10	ADH seroso	8	Voltaje	0.272 5	1.745 9	Acepta Ho
					Resistencia	12.198 3	1.745 9	Acepta H1
					Corriente	5.468 1	1.745 9	Acepta H1
Vejiga Sapo	pH 7.4	10	pH 6.0 seroso	8	Voltaje	7.419 1	1.745 9	Acepta H1
					Resistencia	2.181 4	1.745 9	Acepta H1
					Corriente	1.745 7	1.745 9	Acepta H1
Vejiga Sapo	Sin Amilorida	10	Amilorida mucoso	8	Voltaje	5.683 2	1.745 9	Acepta H1
					Resistencia	1.198 4	1.745 9	Acepta H1
					Corriente	6.761 7	1.745 9	Acepta H1
Vejiga Conejo	Sin Amilorida	8	Amilorida mucoso	5	Voltaje	0.311 8	1.795 9	Acepta Ho
					Resistencia	2.598 8	1.795 9	Acepta H1
					Corriente	2.645 7	1.795 9	Acepta H1

b) Sobre La Resistencia Externa En El Circuito Cerrado:

No hubo diferencia significativa en la resistencia externa que se utilizó en el circuito cerrado para reducir a cero la diferencia de voltaje transepitelial al comparar los controles con los grupos de estudio de la piel de sapo y la vejiga de conejo. Solamente hubo reducción significativa de la resistencia externa en el grupo de estudio de pH 6 del lado seroso de la vejiga de sapo, ya que amilorida tampoco redujo significativamente la resistencia externa (Cuadro XII).

Cuadro XII

COMPARACIÓN DE LA RESISTENCIA EXTERNA EN EL CIRCUITO CERRADO DE LOS CONTROLES Y GRUPOS DE ESTUDIO (t Student, nivel de confianza 0.01)

EPITELIO	n	CONTROLES	n	ESTUDIO	t	p=0.01	Conclusión
Piel Sapo	10	Ringer de Sapo	8	Ringer Colina	1.882 0	2.583	Acepta Ho
Piel Sapo	10	Sin ADH	8	ADH seroso	0.130 0	2.583	Acepta Ho
Vejiga Sapo	10	pH 7.4	8	pH 6.0	3.142 8	2.583	Acepta H1
Vejiga Sapo	10	Sin Amilorida	8	Con amilorida	0.374 5	2.583	Acepta Ho
Vejiga Conejo	8	Ringer Locke	5	Ringer Colina	0.255 7	2.718	Acepta Ho
Vejiga Conejo	8	Sin Amilorida	5	Con amilorida	0.457 6	2.718	Acepta Ho

##### 5. Comparación del Período Control y el Período Experimental en los Controles.

Treinta minutos después de medir los parámetros eléctricos en los 10 controles de pieles y vejigas de sapo y en los 8 controles de vejigas de conejo; estos mismos tejidos fueron montados en una fase de experimentación. Recordemos que cinco controles de pieles se sometieron a variación de la concentración del catión sodio y otras cinco a ADH seroso; mientras que cinco vejigas de sapo se sometieron a pH 6 seroso y las otras cinco a amilorida; además cuatro vejigas de conejo se sometieron a variación de sodio y las cuatro restantes a amilorida. A diferencia de los grupos de estudio comentados anteriormente, cuando los controles de vejiga de sapo se sometieron a pH 6 o amilorida en la fase experimental, las resistencias aumentaron. Del mismo modo, en la fase de experimentación de los controles de vejiga de conejo sometidos a amilorida, las resistencias también aumentaron. En el Cuadro XIII y en las figuras 12 y 13 se anotan las medidas de tendencia central de ambos periodos. Refiérase al Marco Teórico y a la Discusión de los Resultados para la explicación de los efectos de la pobre carga del catión sodio, el descenso pH del baño y la presencia de vasopresina o amilorida en el transporte activo del catión sodio y en la corriente cortocircuito.

Cuadro XIII

MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL (VOLTAJE, RESISTENCIA TRANSEPITELIAL Y CORRIENTE CORTOCIRCUITO) EN LOS GRUPOS CONTROLES QUE FUERON SOMETIDOS A LOS PERIODOS CONTROL Y EXPERIMENTAL

Epitelio	n	Periodo de Control			Experimento	Periodo de Experimento		
		$\Delta V$	I sc	R te		$\Delta V$	I sc	R te
		(mV) Prom +/-DE	( $\mu A/cm^2$ ) Prom +/-DE	(kohm/cm <sup>2</sup> ) Prom +/-DE		(mV) Prom +/-DE	( $\mu A/cm^2$ ) Prom +/-DE	(kohm/cm <sup>2</sup> ) Prom +/-DE
Piel Sapo	5	32,8 +/- 8	3,6 +/- 0,6	90 +/- 15,1	Variación Na	14,6 +/- 7,5	1 +/- 0,7	106,8 +/- 15,4
Piel Sapo	5	35,1 +/- 12,5	5,9 +/- 2,1	75,6 +/- 8,7	ADH seroso	52,1 +/- 7,3	9,1 +/- 1,7	41,4 +/- 6,9
Vejiga Sapo	5	10,6 +/- 3,3	28,1 +/- 5,4	42 +/- 9,1	pH 6	5,2 +/- 1,1	11,6 +/- 4,5	74 +/- 10,7
Vejiga Sapo	5	8,7 +/- 1,3	26,6 +/- 9,1	21,8 +/- 7,8	Amilorida	4,2 +/- 1	12,7 +/- 7,6	53,4 +/- 8,7
Vejiga Conejo	4	9,1 +/- 2,7	2 +/- 0,7	768,8 +/- 83,4	Variación Na	3,8 +/- 3,1	0,5 +/- 0,6	787,5 +/- 83,1
Vejiga Conejo	4	9,1 +/- 2,6	3 +/- 0,5	412,5 +/- 154	Amilorida	4 +/- 3,2	2,2 +/- 0,3	424,8 +/- 156,1

Figura 12

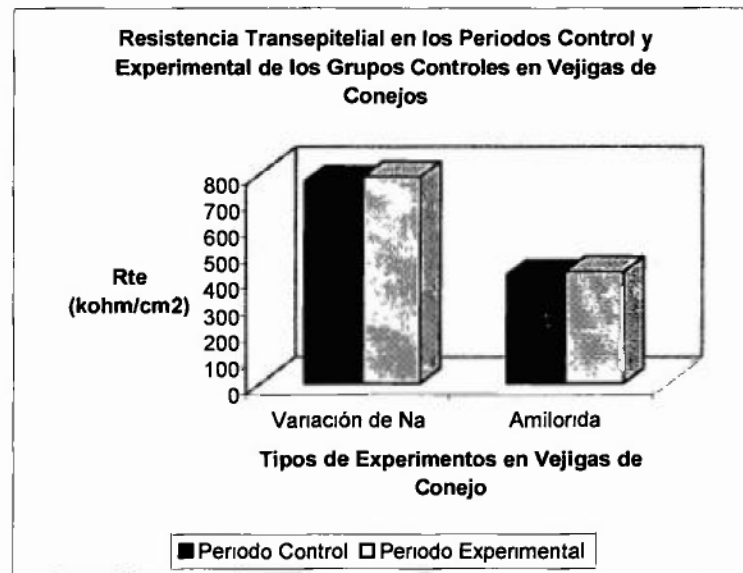
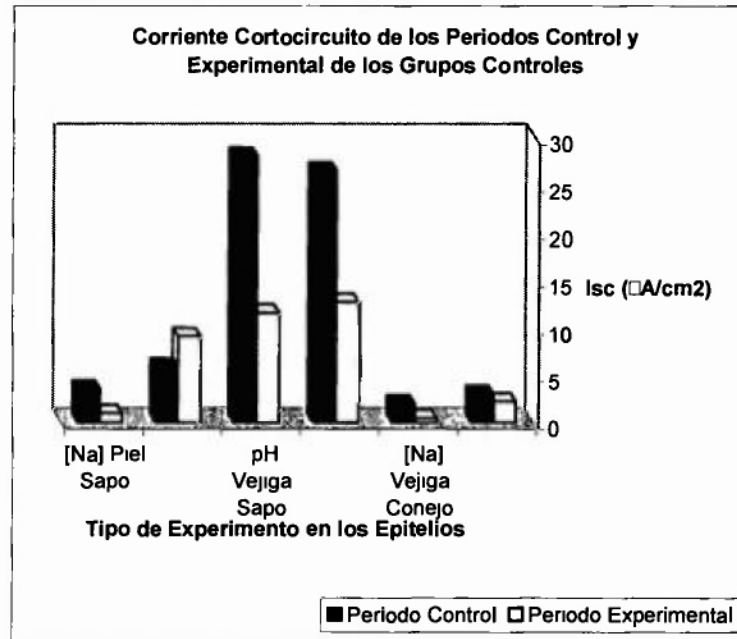


Figura 13



Cuando se compara el período control y el período de experimentación de los grupos controles sometidos a menos concentración del catión sodio, observamos que hubo reducción significativa del voltaje y la corriente en la piel de sapo, pero la resistencia no se elevó significativamente. El ascenso del voltaje y la corriente cortocircuito en la piel de sapo sometida a ADH seroso no fue significativo para un nivel de confianza de 0.01, aunque la resistencia sí disminuyó significativamente (Cuadro XIV, página 66).

Por otro lado, el pH 6 redujo significativamente la corriente y el voltaje en la vejiga de sapo; en cambio amilorida no redujo significativamente la corriente en la vejiga de sapo.

La resistencia aumentó y el voltaje disminuyó significativamente con amilorida en la vejiga de sapo para un nivel de confianza de 0.01. En la vejiga de conejo, amilorida no modificó significativamente los parámetros eléctricos para un nivel de confianza de 0.01; ni tampoco la variación de sodio en el caso de la resistencia y el voltaje. Pero la corriente cortocircuito disminuyó significativamente cuando se disminuyó la concentración del catión sodio en la vejiga de conejo. Amilorida disminuyó la corriente cortocircuito en la vejiga de conejo y de sapo cuando el nivel de confianza es 0.05.

Cuadro XIV

COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS ELÉCTRICOS DE LA FASE CONTROL Y LA FASE EXPERIMENTAL EN LOS GRUPOS CONTROLES

Epitelio	(n) Control	(n) Experimento	Parámetro	t	p=0,01	Conclusión
Piel Sapo	(5)	(5) Variación Na (Ringer Colina)	Voltaje	3,711 1	2,896	Acepta H1
			Corriente	6,305 9	2,896	Acepta H1
			Resistencia	1,741 7	2,896	Acepta Ho
Piel Sapo	(5)	(5) ADH seroso	Voltaje	2,626 0	2,896	Acepta Ho
			Corriente	2,648 3	2,896	Acepta Ho
			Resistencia	6,886 9	2,896	Acepta H1
Vejiga Sapo	(5)	(5) pH 6	Voltaje	3,471 2	2,896	Acepta H1
			Corriente	3,106 5	2,896	Acepta H1
			Resistencia	5,094 1	2,896	Acepta H1
Vejiga Sapo	(5)	(5) Amilorida	Voltaje	6,135 0	2,896	Acepta H1
			Corriente	5,248 8	2,896	Acepta H1
			Resistencia	6,047 2	2,896	Acepta H1
Vejiga Conejo	(4)	(4) Variación Na (Ringer Colina)	Voltaje	2,578 4	3,143	Acepta Ho
			Corriente	3,253 9	3,143	Acepta H1
			Resistencia	0,317 6	3,143	Acepta Ho
Vejiga Conejo	(4)	(4) Amilorida	Voltaje	2,473 8	3,143	Acepta Ho
			Corriente	2,743 9	3,143	Acepta Ho
			Resistencia	0,112 1	3,143	Acepta Ho

## 6. Contraste de los Resultados de los Grupos de Estudio con el Período Experimental de los Grupos Controles.

Es interesante contrastar los resultados cuando se comparan los grupos controles con los grupos de estudio y cuando se comparan los grupos controles en la fase de control y en la fase de experimentación. Mientras que en el grupo de estudio de piel de sapo sometido a Ringer Colina disminuyó significativamente el voltaje y la corriente y aumentó la resistencia; en la fase de experimentación de los controles de piel de sapo no aumentó significativamente la resistencia transepitelial, aunque sí disminuyeron el voltaje y la corriente con un nivel de confianza de 0,01.

El voltaje no aumentó significativamente en los casos de piel de sapo sometidos a ADH ni en los controles en fase de experimentación. En cambio la corriente aumentó significativamente en el grupo de estudio de piel de sapo sometidos a ADH, pero no ocurrió aumento significativo de la corriente en los controles durante fase de experimentación. La resistencia disminuyó en los controles en fase de experimentación y en el grupo de estudio de piel de sapo en presencia de ADH del lado seroso cuando el nivel de confianza es 0.05.

Cuando la vejiga de los sapos controles se expusieron a pH 6, cambió significativamente el voltaje, la corriente y la resistencia; mientras que para el grupo de estudio de vejiga de sapo expuestos a pH 6, disminuyó el voltaje espontáneo con un nivel de confianza de 0.01. La corriente cortocircuito y el voltaje variaron en los grupos de estudio de vejiga de sapo expuestos a pH 6 con un nivel de confianza de 0.01. Amilorida

no redujo la corriente en los controles de vejiga de sapo en el período experimental y también en el grupo de estudio de vejiga de sapo. El voltaje disminuyó tanto en el grupo de estudio como en los controles expuestos a amilorida. La resistencia transepitelial aumentó en los controles expuestos a amilorida y no ocurrió en el grupo de estudio. En las vejigas de conejos, amilorida no varió significativamente los parámetros eléctricos tanto en el grupo de estudio como en los controles expuestos. La baja concentración de sodio en la solución Ringer Colina disminuyó la corriente en el grupo de estudio de vejigas de conejo, aunque no lo hizo con significancia estadística en los controles expuestos. Ni la corriente ni la resistencia variaron por exposición a baja concentración del catión sodio en el grupo de estudio y en el control de vejiga de conejo.

#### 7. Relación Resistencia vs Voltaje de los Grupos Controles.

En todos los controles de los diferentes especímenes (piel, vejiga, colon y vesícula) se observó una relación inversa entre la resistencia transepitelial y el gradiente de voltaje espontáneo (Figuras 14-20, páginas 69-72). Refiérase al Anexo 2 para los cuadros correspondientes (XV-XXI) a estas figuras.

Figura 14

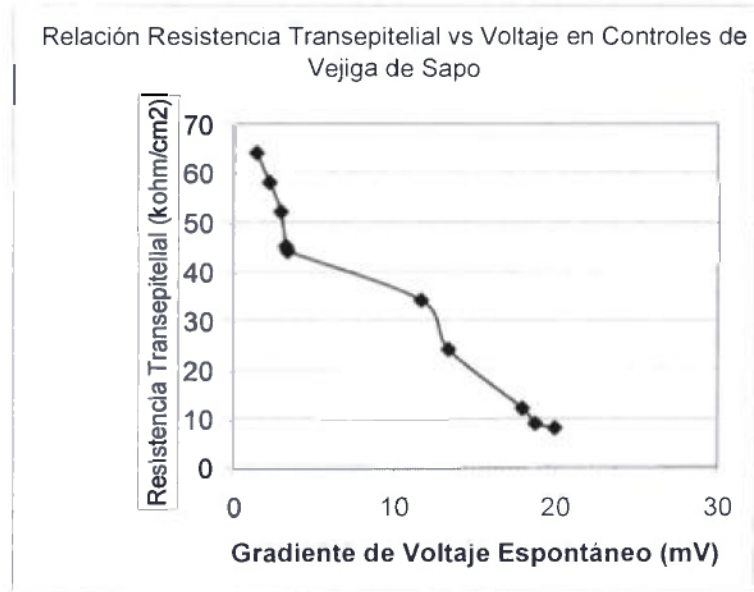


Figura 15

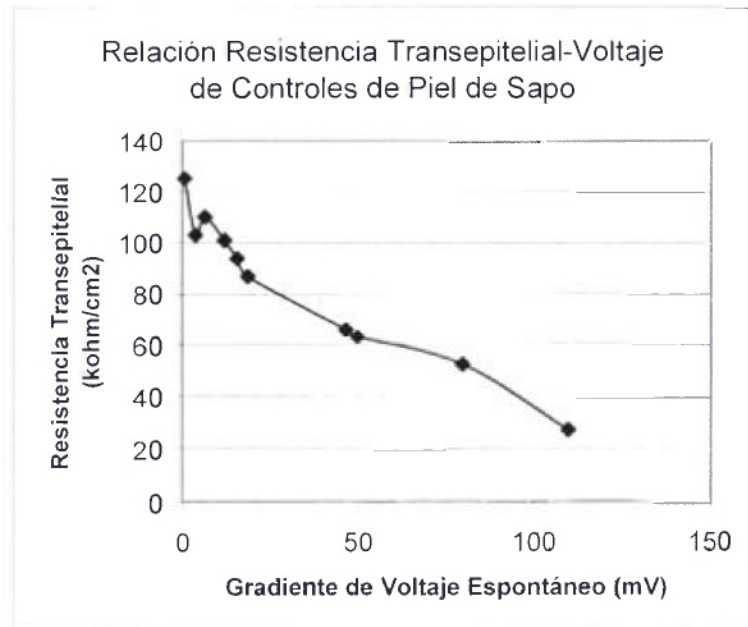


Figura 16

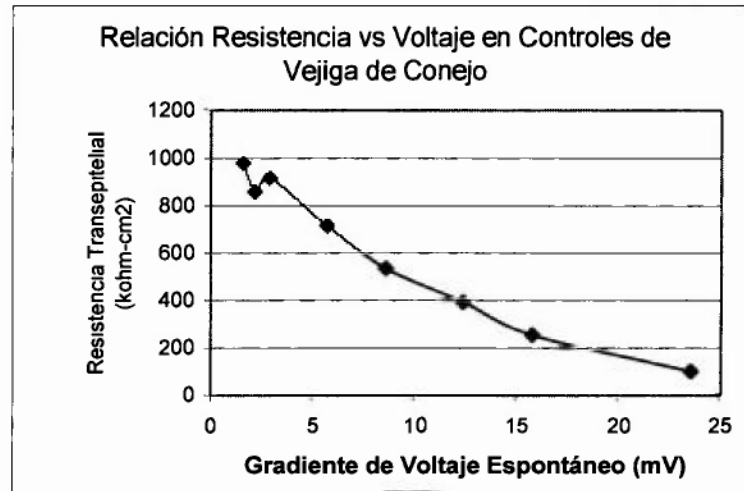


Figura 17

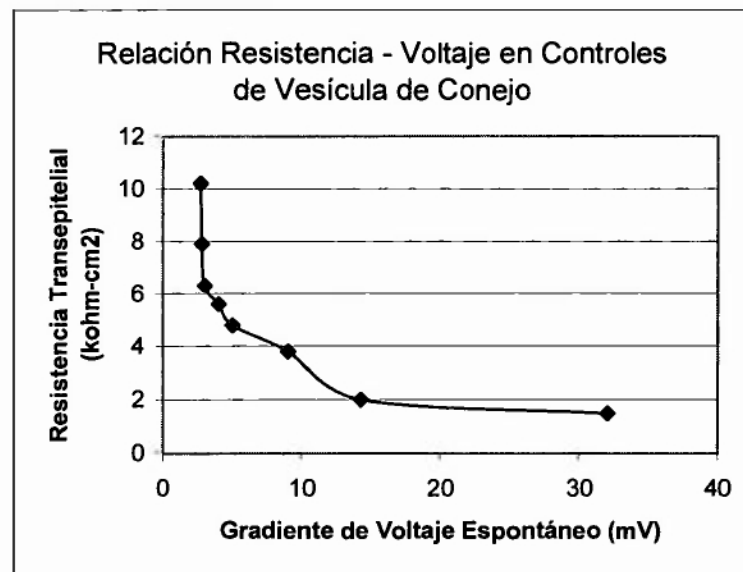


Figura 18

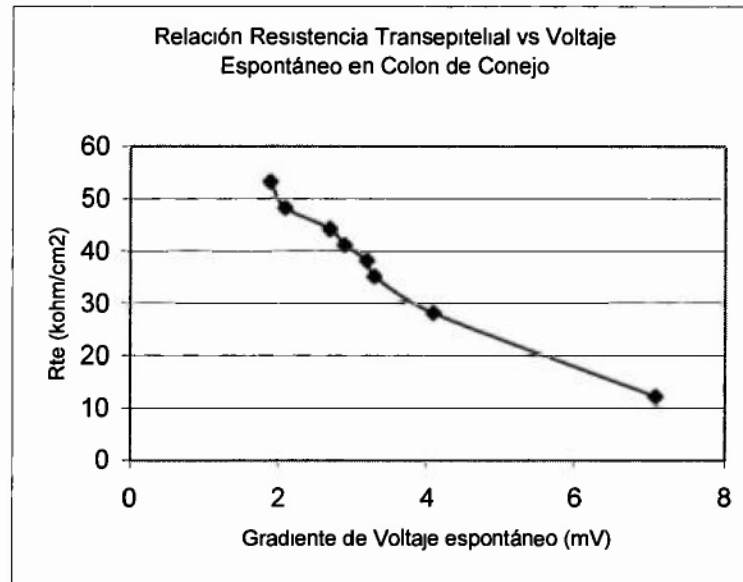


Figura 19

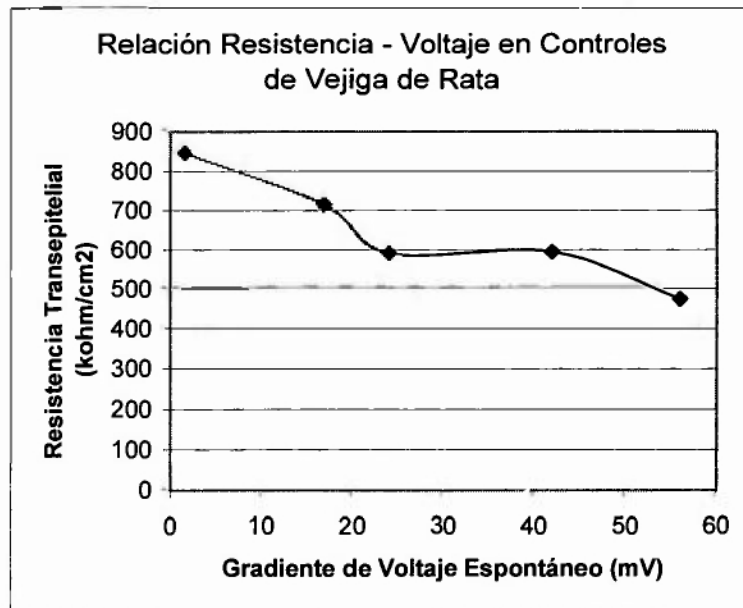
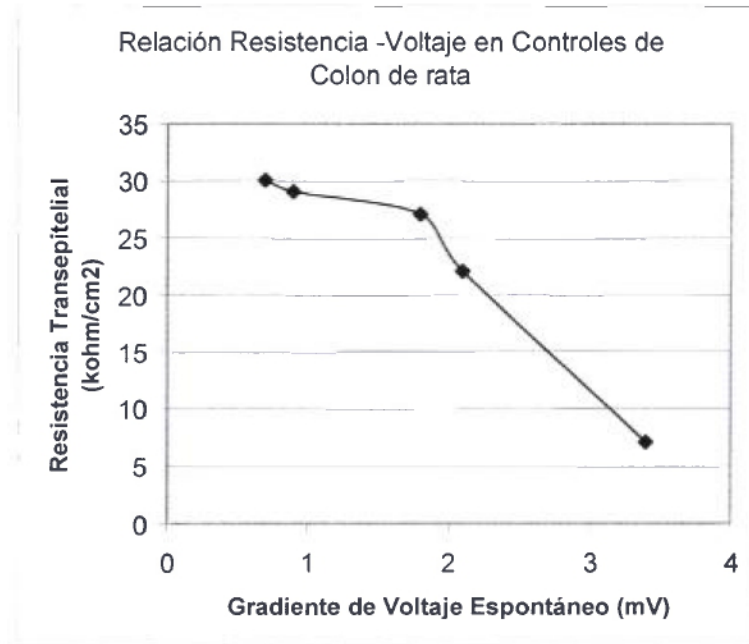


Figura 20



## DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La investigación primeramente presenta los parámetros eléctricos de los epitelios in vitro de mamíferos y anfibios en condiciones de control. Los resultados demuestran la diferencia que existe en el voltaje espontáneo, la corriente cortocircuito y la resistencia transepitelial entre el conejo, la rata y el sapo. Estas diferencias significativas obedecen en parte a las características ultraestructurales de las proteínas de canal iónico que son propias de cada especie, por ejemplo el canal ENaC tiene una conductancia de 120 – 180 pS en la vejiga de sapo, en cambio es de apenas 4 – 5 pS en el conejo. La dieta de sal es otro condicionante de la diferencia en el transporte activo del catión sodio entre las especies. Cuanto más pobre es la dieta en sal en el animal vivo, mayor es el transporte activo del catión sodio y la corriente cortocircuito en el sistema in vitro. Los trabajos de Ussing<sup>(32)</sup> en la piel de sapo encontraron voltajes espontáneos < 91 mV y densidades de corriente alrededor de 40  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . En su montaje original incluyó puentes de agar Ringer, de los cuales se prescindieron en el presente trabajo. Los mismos conectaban la cámara con pequeños cilindros llenos de solución cristaloide que contenían los electrodos de calomel-KCl para las mediciones de voltaje y corriente (puentes salinos de agar). Otra diferencia respecto al montaje del presente proyecto es el material de la cámara: mientras que Ussing utilizó lucita (metilmetacrilato), nosotros empleamos acrilato. A pesar de las diferencias señaladas en el montaje experimental, el voltaje espontáneo de la

piel de sapo es similar cuando se comparan los valores de Ussing con los del presente trabajo (34,4 +/- 11,0 mV el presente estudio), aunque la corriente cortocircuito fue menor en el trabajo actual (4,8 +/-1,1  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ).

Ussing (1951) y Lewis-Diamond (1976) complementaron las mediciones eléctricas transepiteliales con las mediciones del flujo iónico del catión sodio ( $\text{Na}^{24}$  y  $\text{Na}^{22}$  respectivamente), las cuales son instrumentos valiosos para validar los resultados de las variaciones de voltaje y corriente. Ussing encontró un influjo espontáneo de  $\text{Na}^+$  de 1,85  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$  en la piel de sapo colocada en un baño Ringer. Lewis-Diamond encontraron un flujo del catión sodio de mucosa a serosa de  $1,4 \times 10^{-12}$  moles/ $\text{cm}^2/\text{s}$  en el urotelio de conejo colocado en solución Ringer.

Loo y Diamond<sup>(22)</sup> encontraron corrientes cortocircuitos en la vejiga de conejo dependientes de la edad del animal: en animales jóvenes encontraron un promedio de 12  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  y en animales viejos hasta 46  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  debido a la acumulación de cristales de  $\text{CaCO}_3$  en la vejiga urinaria de estos últimos. También fue demostrado que la dieta del conejo modifica la corriente y la resistencia. Lewis y Diamond (1976) compararon la corriente y la resistencia ante variaciones de NaCl en la dieta del conejo: para una dieta alta, normal y una baja en sal encontraron respectivamente corrientes de 1.6, 2.2 y 5.1  $\mu\text{A}/\mu\text{F}$  y resistencias de 23 000, 16 700 y 12 700 ohm- $\mu\text{F}$ . Definieron una dieta normal en  $\text{Na}^+$  el consumo de 0,2 mequivalentes/g de alimento; una dieta alta en  $\text{Na}^+$  el consumo de lo anterior más 100 mM NaCl en el agua; y dieta baja en  $\text{Na}^+$  el consumo solamente de 100 mM NaCl en el agua, sin sal en el alimento sólido. Los conejos del presente trabajo fueron alimentados con 0,2 mequivalentes de sodio/g de alimento, sin sal

adicional en el agua y los resultados de la corriente ( $2.1 - 2.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) se encontraron dentro del intervalo descrito por Lewis y Diamond ( $2.0 - 27.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ).

Lewis y Diamond<sup>(17, 18)</sup> encontraron voltajes espontáneos en el urotelio de conejo entre 20 y 75 mV, corrientes cortocircuitos entre 1.5 y 20.1  $\mu\text{A}/\mu\text{F}$  y resistencias transepiteliales entre 7 000 y 40 000 ohm- $\mu\text{F}$ . Atendiendo a la normalización de la capacitancia de la membrana que hicieron debido al plegamiento de la mucosa de la vejiga de conejo, esto es 1.36  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ , significa que obtuvieron  $I_{sc}$  entre 2.0 y 27.9  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  y resistencias entre 5 147 y 29 411 ohm/ $\text{cm}^2$ . Los voltajes espontáneos ( $9.1 \pm 2.6$  mV) y las corrientes cortocircuitos ( $2.5 \pm 0.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) encontradas en el presente trabajo son menores y las resistencias de membrana ( $590.6 \pm 107.9$  kohm/ $\text{cm}^2$ ) mayores que las publicadas por Lewis y Diamond.

En general las resistencias totales transepiteliales obtenidas de las tres especies son mayores que las registradas en otras publicaciones.<sup>(6,15,18,21,29,32)</sup> La resistencia total depende directamente de la resistencia de la unión intercelular y de las resistencias apical y basolateral, lo cual se puede corroborar en la siguiente fórmula:

**(Fórmula 8)**             $R_t = R_j (R_a + R_b) / (R_a + R_b + R_j)$

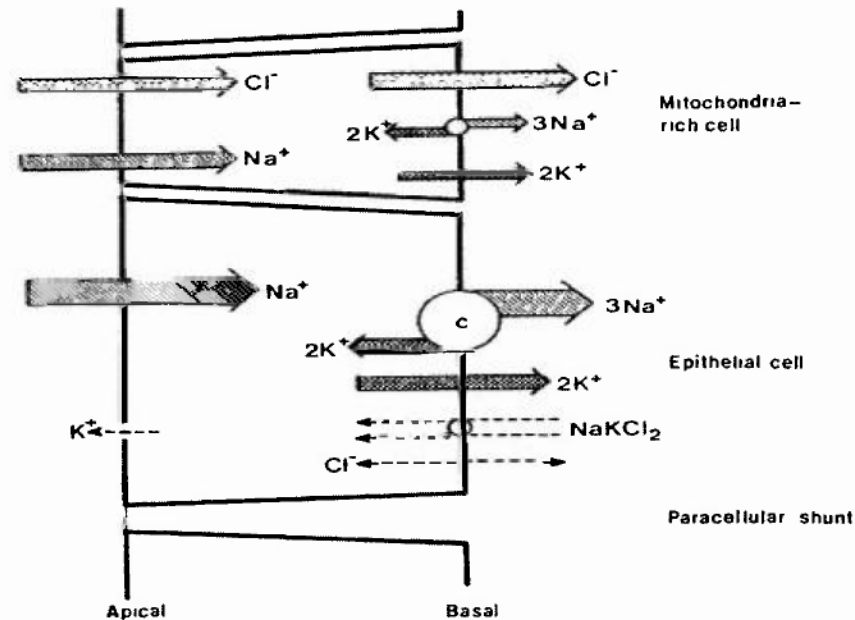
Donde  $R_j$  = Resistencia de la unión intercelular,  $R_a$  = Resistencia apical y  $R_b$  = Resistencia basolateral.

Las resistencias transepiteliales totales que se registraron en el presente proyecto tienen órdenes de magnitud similares a las resistencias de la unión intercelular señaladas en otras publicaciones. Lewis (2000) reportó una resistencia total y una resistencia de la unión en urotelio de conejo de 10 – 75 kohm/ $\text{cm}^2$  y  $>100$  kohm/ $\text{cm}^2$  respectivamente, lo

cual contrasta con la resistencia total de los controles de vejiga de conejos ( $590,6 \pm 107,9 \text{ kohm/cm}^2$ ) en el presente trabajo. En la literatura las mayores resistencias totales reportadas fueron en los cultivos de líneas celulares de epitelio: en el caso de tres líneas continuas de células epiteliales de anfibio las resistencias totales fueron  $> 4000 \text{ ohm/cm}^2$ .<sup>(11)</sup>

En cuanto a la manipulación experimental de nuestra investigación encontramos que la sustitución del catión sodio por colina disminuyó la corriente cortocircuito cuando los controles se sometieron a la fase experimental tanto en la piel de sapo como en la vejiga de conejo, aunque no fue demostrado con significancia estadística en los grupos de estudio. La corriente cortocircuito puede utilizarse como una medida de la actividad de la bomba de sodio-potasio ATPasa.<sup>(31)</sup> En el modelo de las vías de transporte iónico del epitelio de sapo, el catión sodio entra por canales selectivos apicales y la fuerza electroquímica de la bomba en la membrana basolateral lo transporta activamente al lado seroso del epitelio. En la membrana basolateral también se encuentra un cotransportador  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ , una salida pasiva del catión potasio y una salida variable de cloruro (Figura 21).

Figura 21



Transporte iónico en epitelio de piel de sapo, Tosteson 1989.

Ussing (1980) describió a las células ricas en mitocondrias en el epitelio de sapo como una posible vía transcelular para el transporte del anión cloruro, el cual es altamente sensible al potencial transepitelial. El movimiento del anión cloruro a través del urotelio de conejo también es pasivo.<sup>(15)</sup> El efecto de la carga del catión sodio en la membrana apical y la concentración intracelular de sodio modificarán respectivamente la actividad del canal epitelial del catión sodio y la bomba  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPasa. En el presente trabajo se evaluaron dos cargas del catión sodio: ante una carga isotónica en los baños, la resistencia es menor y la corriente cortocircuito es mayor que en presencia de una carga pobre del catión sodio en los baños. En la situación de una pobre carga del catión sodio disminuye la oferta de catión para ENaC, lo cual disminuye la concentración intracelular

del catión sodio y por ende disminuye la actividad de la bomba. En condiciones fisiológicas el catión sodio intracelular activa a la bomba con una constante media de activación  $K_{1/2}$  entre 10 – 20 mM y un coeficiente de Hill entre 2 y 3, dependiendo de su expresión en el epitelio y la especie.<sup>(12)</sup> Por otro lado, se ha propuesto que el aumento de la concentración intracelular del catión sodio desencadena el reclutamiento de las unidades pre-existentes del fondo común de la bomba de sodio-potasio ATPasa.<sup>(2)</sup>

Debemos considerar que el flujo del solvente agua a través de la membrana biológica en la cámara de Ussing que modificamos en nuestro experimento puede arrastrar a los iones, lo cual pudiera en parte explicar la diferencia en la significancia estadística de las corrientes cortocircuitos en los grupos de estudio versus las corrientes cortocircuitos en los grupos controles en la fase experimental. Maurice Visscher (1938) propuso una hipótesis de circuito. En presencia de arrastre iónico por solvente, la razón de flujo no es independiente de la naturaleza de la vía, sino proporcional a la tasa de volumen de flujo de agua e inversamente proporcional al coeficiente de difusión libre del ión. En nuestra investigación se utilizaron dos volúmenes de soluciones en cada hemicámara: 125  $\mu$ L y 8 ml. Si bien es cierto que la corriente cortocircuito y la resistencia transepitelial total fueron expresadas por  $\text{cm}^2$  de membrana biológica, lo cual permite la comparación entre los grupos controles y de estudio, es posible que los distintos volúmenes del solvente utilizados según el tamaño del espécimen y la cámara en los montajes pudieron determinar la diferencia en la significancia estadística de las corrientes cortocircuitos en los grupos de estudio versus las corrientes en la fase experimental de los grupos controles. El otro factor que determina el arrastre de solvente es la integral que describe

a la forma de transporte del ión y el solvente. A continuación la fórmula de flujo iónico que incorpora el aspecto de arrastre por solvente:

$$\text{(Fórmula 8)} \quad \ln \frac{J_{ms}}{J_{sm}} = \ln \frac{a_m}{a_s} - \frac{zF(V_s - V_m)}{RT} + \frac{J_w}{D} \int_0^{x_0} \frac{1}{A} dx$$

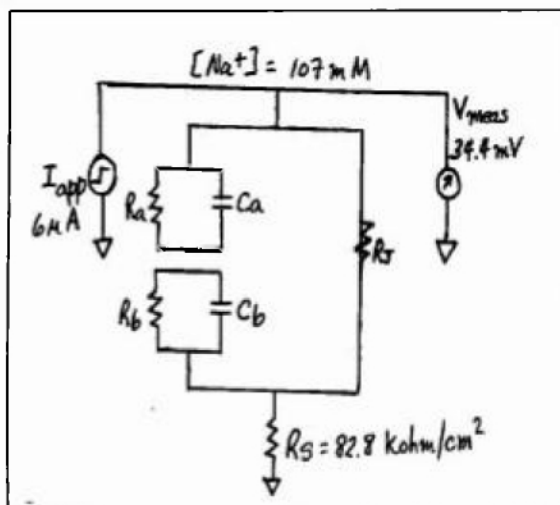
Donde  $J_{ms}$  es el flujo iónico en sentido de mucosa a serosa y  $J_{sm}$  es el flujo iónico en sentido de serosa a mucosa,  $a$  es la concentración del ión (en el lado mucoso y en el lado seroso respectivamente),  $z$  es la valencia del ión,  $F$  es la constante de Faraday,  $V_s - V_m$  es la diferencia de potencial entre los lados seroso y mucoso,  $J_w$  es la tasa de volumen de flujo de agua a través de área de membrana medido en  $L/cm^2$ -s,  $D$  es la constante de difusión del ión en el agua,  $A$  es fracción de área disponible para difusión a cualquier distancia  $x$ , y  $x_0$  es espesor total de la membrana.

Por análisis de fluctuación de corriente transepitelial macroscópica, Lewis<sup>(19)</sup> señala que los canales apicales del catión sodio sensibles a amilorida de la vejiga de conejo comparten características con los canales de los conductos colectores de conejo y también con la piel y vejiga urinaria de anfibio, aunque aún no se han realizado mediciones de canal único con la técnica de pinzamiento en parche, lo cual limita la posibilidad de conocer la densidad de proteínas ENaC en estos epitelios. Cuando se aumenta la concentración del catión sodio en el lado luminal o mucoso de la piel de sapo, se demuestra una corriente pico que luego disminuye a un estado estacionario en el lapso de un segundo. Estos experimentos resaltan que la concentración extracelular del catión sodio modifica la velocidad de actividad del canal.<sup>(8)</sup> Este descenso de la corriente pico en el lapso de un segundo representa una autoinhibición ocasionada por la unión del

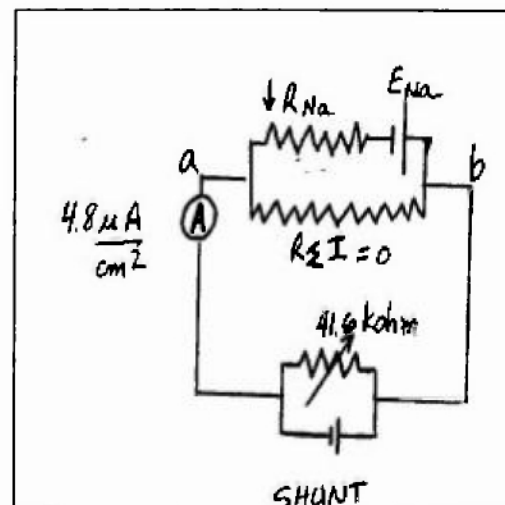
cación sodio al sitio regulador externo de la proteína de canal. Este mecanismo es apoyado por el número de sustancias químicas que elevan la corriente mediada por la proteína de canal, presumiblemente liberándolo de la autoinhibición por el catión sodio.<sup>(9)</sup> La depolarización de la membrana apical debido al aumento de la concentración extracelular del catión sodio regula cuesta abajo a los canales; en cambio en los conductos colectores de las ratas la hiperpolarización de la membrana apical aumenta la probabilidad de apertura de los canales de sodio en condiciones de célula entera y de adentro hacia afuera.<sup>(7,26)</sup> Otro mecanismo de retroalimentación en el canal epitelial de sodio se relaciona con la concentración citoplasmática del catión sodio, la cual activa en forma directamente proporcional a la proteína G.<sup>(16)</sup> A continuación se detalla en la figura 22 la aplicación del modelo del circuito equivalente en el epitelio de piel sapo sobre los resultados encontrados de los parámetros eléctricos transepiteliales ante las variaciones de la concentración del catión sodio.

Figura 22

A. Circuito abierto en la piel de sapo.  
 $[Na^+] = 107 \text{ mM}$  (grupo control).

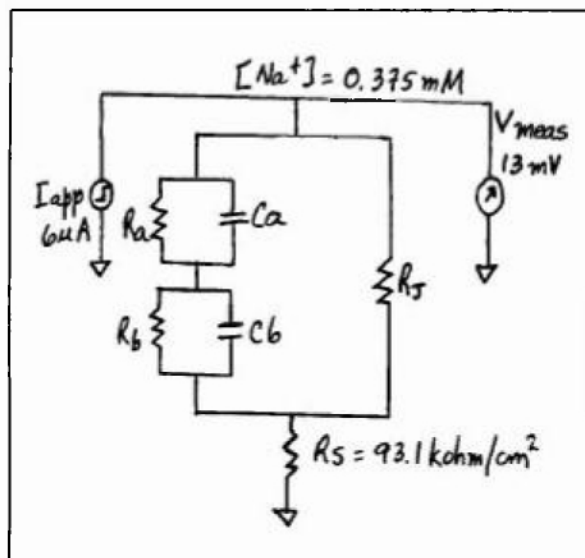


B. Circuito cerrado en la piel de sapo.  
 $[Na^+] = 107 \text{ mM}$  (grupo control).



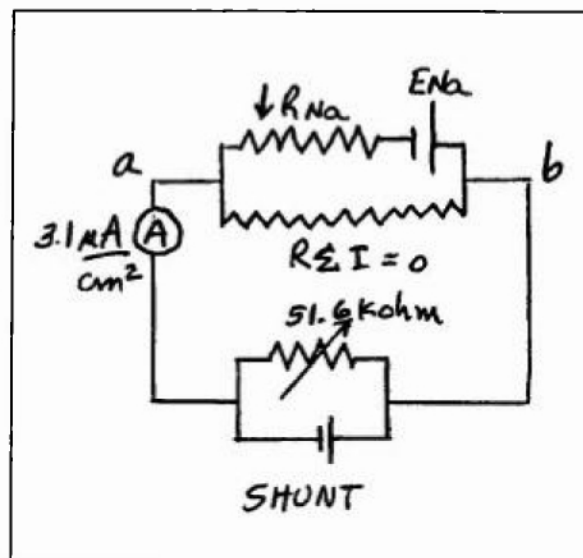
C. Circuito abierto en la piel de sapo.

$[Na^+] = 0.375 \text{ mM}$  (grupo de estudio).



D. Circuito cerrado en la piel de sapo.

$[Na^+] = 0.375 \text{ mM}$  (grupo de estudio).



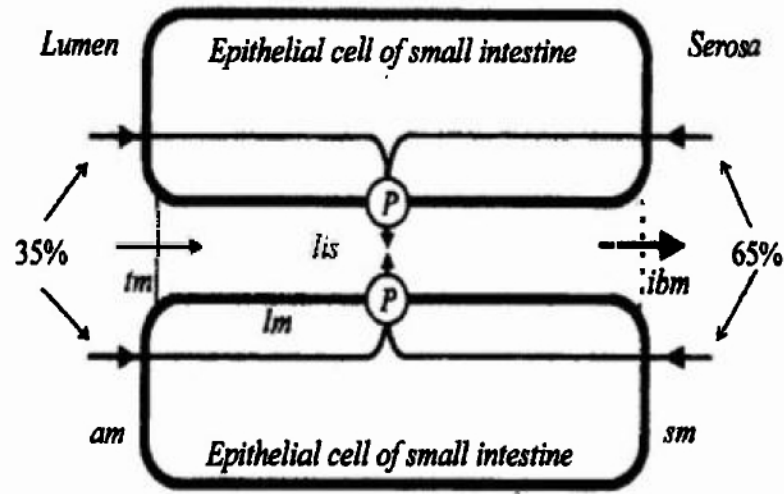
Efecto de la  $[Na^+]$  del baño en los parámetros eléctricos transepiteliales aplicados al modelo del circuito equivalente en la piel de sapo.

En la figura 22 se observa significativamente que en los circuitos abiertos el voltaje es mayor y la resistencia transepitelial total menor cuando la concentración del catión sodio es isotónica (A) que cuando la concentración es muy baja (C). Por otro lado, la corriente cortocircuito es mayor cuando la concentración del catión sodio es isotónica (B) que cuando la concentración es muy baja (D). De esta manera se comprueba que el transporte del catión sodio depende de la disponibilidad del mismo en el medio extracelular y posiblemente también de la acción efectora positiva inicial del catión sodio en el canal epitelial apical, lo cual modifica a la concentración intracelular del catión sodio y por ende a la actividad de la bomba de sodio-potasio ATPasa.

En los sistemas in vitro que utilizan soluciones isosmolares, tales como las de nuestro trabajo, también ocurre el movimiento osmótico a pesar de que las actuales técnicas disponibles para medir el flujo del solvente no lo detecten (Spring 1978 y 1999, Kovbasnjuk 1998) . Esto es así porque la permeabilidad de los epitelios al agua es tan grande que la diferencia de presión osmótica requerida para transportar el agua transepitelialmente es muy pequeña para ser detectada. El transporte activo del catión sodio es verdaderamente una pequeña fuerza osmótica que debe ser considerada, la cual es usualmente calculada pero difícilmente medida. El agua es transportada pasivamente junto con los iones a través de los epitelios en proporciones isotónicas y también en condiciones de equilibrio termodinámico transepitelial. En base a esta información, se postula que el transporte activo del catión sodio recircula. La salida del catión sodio de la célula debido a la actividad de la bomba de sodio-potasio ATPasa ocasiona un espacio intercelular lateral hipertónico. La hipertonicidad intercelular lateral genera una entrada de agua desde el espacio apical hacia el espacio lateral y desde el espacio lateral hacia la solución serosa por la pequeña diferencia de presión hidrostática que se desarrolla. Como es lógico suponer, la salida de líquido desde el espacio lateral lo convierte en un lugar hipertónico, entonces el transporte isotónico no se desarrolla a menos que el catión sodio retorne de regreso a la célula y de ahí al espacio lateral.

En el intestino delgado de sapo se ha calculado mediante el flujo del ión  $\text{Na}^+$  que solamente el 35% del catión sodio que es bombeado al espacio intercelular lateral proviene del transporte por la membrana apical. Entonces el flujo de recirculación, el cual consiste en el flujo que proviene de la solución serosa y atraviesa la membrana basolateral, aporta el 65% del catión sodio al espacio intercelular lateral (Ver figura 23).

Figura 23



Recirculación del catión sodio en el transporte isotónico. P es la bomba de sodio-potasio ATPasa, tm es unión estrecha, am es membrana apical, lm es membrana lateral, lis es espacio intercelular lateral, ibm es el espacio entre las membranas basales y sm es la membrana serosa.

Comentaremos a continuación sobre los efectos de la amilorida en los resultados de las variables eléctricas transepiteliales, basándonos en los mecanismos de acción que han sido descritos en diferentes literaturas. Por lo expuesto en el marco teórico, amilorida es un diurético pirazínico que inhibe competitivamente el transporte del catión sodio debido a su grupo guanidinio que bloquea la entrada externa del catión sodio a la proteína de canal ENaC en el túbulo renal distal (Baer, Jones, Spitzer & Russo, 1967), en la vejiga de sapo (Bentley, 1968), en el colon y piel de sapo (Crabbé, Eriij, Salako & Smith, 1968-70), en el colon de conejo (Schultz) y en la vejiga urinaria de conejo (Frömter & Diamond, 1972). El anillo pirazínico estabiliza su unión al canal en el estado abierto, interactuando con la porción extracelular. Como se une al sitio de entrada del catión sodio, amilorida aumenta la Km. Tanto en los grupos de estudio como en los controles

sometidos a experimentación en nuestro trabajo, amilorida disminuyó la corriente del catión sodio por transporte activo (Isc) en las vejigas de conejo y sapo con un nivel de confianza de 0.05 y aumentó la resistencia transepitelial total cuando se añadió a la solución del lado mucoso de la membrana. Lewis<sup>(15)</sup> señala que existe elevada sensibilidad del transporte apical del catión sodio a amilorida cuando la corriente es típicamente 2-3  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Mientras que en nuestra investigación las corrientes cortocircuitos de los controles de las vejigas de sapo fueron notablemente superiores (24,7  $\pm$  5,3  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) a los límites propuestos por Lewis, los controles de las vejigas de conejos (2,5  $\pm$  0,4  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) se encontraron en los límites señalados. Es posible que los grupos controles de sapos en nuestro experimento se alimentaron con una dieta de sal más baja que los animales en los experimentos de Lewis; o bien pudiera ser que nuestro montaje de vejiga de sapo presentó elevada sensibilidad para medir la corriente. Por otro lado, Cox<sup>(5)</sup> encontró que amilorida estimula a la corriente cortocircuito en la piel de renacuajos, en cambio la inhibe en el sapo adulto.<sup>(5,24)</sup> Esta referencia nos impulsó a incluir en nuestro estudio solamente a animales con pesos de adultos, de acuerdo a la especie.

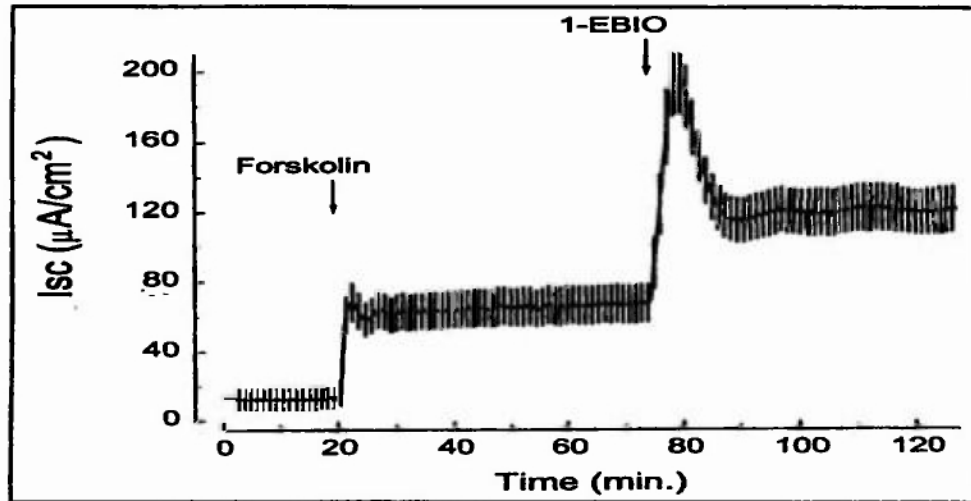
Discutiremos a continuación los resultados relacionados con vasopresina en la piel de sapo de nuestro trabajo y los compararemos con la evidencia publicada por otros autores. La hormona antidiurética (ADH) aumenta la permeabilidad y el transporte del ión  $\text{Na}^+$  en el conducto colector renal, la vejiga urinaria y en la piel de sapo. En los experimentos de Lewis y Diamond<sup>(17,18)</sup> la adición de 100 mU ADH a la superficie serosa de la vejiga urinaria de conejo no tuvo efecto en la corriente cortocircuito, pero ocasionó un pequeño descenso en la resistencia de 22  $\pm$  8 %, el cual pudo revertirse cambiando esa solución.

En el grupo de estudio de piel de sapo expuestos a ADH de nuestro trabajo ocurrió un descenso de 52% de la resistencia y un ascenso de 62% de la corriente cortocircuito, con escasa variación del voltaje transepitelial. De igual forma en nuestra investigación, los controles de piel de sapo en la fase experimental con ADH también ocurrió un descenso de 45% acerca de la resistencia y un ascenso de 54% acerca de la corriente cortocircuito. Nuestras variaciones de resistencia y corriente fueron mayores que las encontradas por Lewis y Diamond, aún utilizando la misma concentración de ADH. Nuevamente estos resultados nos permiten señalar el efecto de la dieta de sal en estos animales.

Seldin y Giebisch<sup>(30)</sup> señalan que en los sistemas in vitro, los péptidos antidiuréticos como la vasopresina inducen un aumento de 2 – 5 veces la actividad del canal apical de sodio, la cual es sinergista con el efecto de aldosterona y se desarrolla esta acción en pocos minutos. Como sabemos, ADH se une a los receptores V2, activan a la proteína Gs ( $G_{s\alpha-GTP}$ ), ésta última activa a adenilatociclasa, lo cual aumenta la concentración intracelular de cAMP. La activación de PKA (2 subunidades catalíticas) fosforilan a la proteína de canal epitelial apical, la cual se abre para permitir la entrada del catión sodio a la célula. Este es uno de los posibles mecanismos de acción de ADH sobre ENaC, sin embargo algunos autores se oponen a este mecanismo conceptualmente simplista. Un resultado que se opone a la fosforilación de esta proteína de canal epitelial de catión sodio es que no se ha demostrado un sitio de fosforilación por PKA en los dominios citoplasmáticos de las tres subunidades de ENaC en ninguna de las especies que responden a ADH. De cualquier forma, el transporte del catión sodio a través de ENaC por acción de ADH es completamente mimetizado por los análogos de cAMP, los inhibidores de fosfodiesterasa y los activadores de cAMP. Hug<sup>(13)</sup> señala el efecto

estimulador de forskolín (activador de cAMP) y 1-EBIO (benzimidazolone) en el registro de Isc de epitelio de vía aérea (Figura 24). Por otro lado, la vasopresina también recluta del fondo común de la bomba sodio-potasio ATPasa mediante fosfatasa 2A.

Figura 24



Efecto de forskolín y 1-EBIO en Isc de epitelio de vía aérea humana (línea celular Calu-3), Hug 2002.

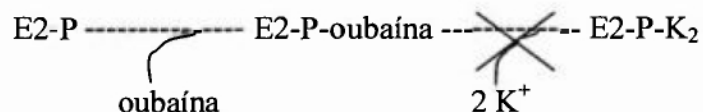
Forskolín es un activador de cAMP y 1-EBIO es un compuesto benzimidazolone que activa a los canales basolaterales de potasio. Las deflecciones positivas y luego negativas de la corriente son causadas por cortos pulsos bipolares de 2 mV de amplitud.

Verrey<sup>(34)</sup> estudió las acciones de hormona antidiurética en el transporte transepitelial de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en las células A6-C1 de nefrón distal de *Xenopus laevis*. Vasopresina indujo un aumento bifásico de la corriente cortocircuito. Tanto el efecto temprano como el efecto tardío fueron potenciados por aldosterona y pudieron mimetizarse con forskolín y BrcAMP, lo cual apunta a cAMP como mediador. El aumento temprano en Isc ocurrió 1-2 min después de añadir la hormona y fue resistente a 50  $\mu\text{M}$  de amilorida.

Ahora comentaremos los resultados relacionados con las variaciones de pH. Lewis<sup>(17)</sup> encontró los siguientes cambios en la  $I_{sc}$  por efecto de la variación de pH en la lado seroso: comparándolo con el control que mantuvo un pH de 7.4, el pH de 8.4 aumentó la  $I_{sc}$  en 15% y el pH 5.8 disminuyó la  $I_{sc}$  en 42%. Schoeffeniels (1955) también encontró resultados similares para los experimentos de variaciones del pH seroso en la piel de sapo: ocurrió 25% de estimulación a pH 8.2 y 95% de inhibición a pH 5.3. En nuestro grupo de estudio de vejigas de conejos, comparándolo con un pH 7.4 en el lado seroso, el pH 6 disminuyó en 60% la corriente cortocircuito y disminuyó el voltaje espontáneo en 29%. En el grupo de estudio de piel de sapo, comparando con el pH 7.4 del lado seroso, el pH 6 disminuyó en 35% la corriente y en 62% el voltaje transepitelial espontáneo. Las modificaciones en la resistencia transepitelial fueron menos notables: 12% de aumento de la resistencia en la piel de sapo y 1% de descenso de la resistencia en la vejiga de conejo de los grupos de estudio.

Desde los trabajos de Lewis y Diamond (1976) se señala el posible efecto de la concentración de hidrogeniones sobre la bomba de sodio-potasio ATPasa. La actividad enzimática de la bomba es óptima en el pH de 7.5; esta actividad disminuye en 60% cuando el pH desciende a 5.5. La bomba de sodio-potasio ATPasa es fuente de una corriente catiónica neta hacia afuera en el lado basolateral de la membrana y tiene una carga neta por ciclo de actividad del orden de 100 cargas positivas cada segundo, o bien su equivalente  $10^{-5}$  pA, lo cual es 4 – 5 órdenes de magnitud inferiores a la corriente llevada por las proteínas de canales iónicos<sup>(30)</sup>. Múltiples factores pueden modificar la actividad de la bomba en los estudios in vitro, en lo particular la tensión local de oxígeno, el pH, la osmolalidad y la concentración de calcio.<sup>(3)</sup> La temperatura muy baja

(O°C) y la oubaína inhiben a la bomba posiblemente bloqueando a un intermediario de enzima fosforilada antes que se produzca la unión del catión potasio con la bomba, como se describe en la siguiente reacción mecanística (Seldin 2000):



La bomba de sodio-potasio ATPasa tiene dos conformaciones principales: E1 y E2. La actividad de transporte catiónico ocurre cíclicamente en presencia del catión magnesio: mediante la fosforilación transitoria y cíclica de la proteína, adopta alternativamente las conformaciones E1 y E2. En la reacción señalada anteriormente, la conformación E2 tiene sitios de elevada afinidad por el catión potasio extracelular. Por los efectos de oubaína sobre el comportamiento alostérico de la bomba, los dos cationes de potasio no se unen a la conformación fosforilada de E2 (E2-P). Se describe que oubaína modifica la constante de tasa de disociación de la bomba (K<sub>off</sub>). La cinética de la bomba de sodio potasio ATPasa del urotelio de conejo tiene la estequiometría de 3 Na<sup>+</sup> y 2 K<sup>+</sup>, y se estima un K<sub>1/2</sub> (también llamada K<sub>on</sub>) para el catión sodio de 14.2 mM y para el catión potasio de 2.3 mM (K<sub>1/2</sub> es la constante media de activación, o sea la concentración del catión en la cual se alcanza el 50% de la máxima velocidad de actividad de la bomba, entendiéndose su actividad como el transporte cíclico de los cationes a través de un enzima de comportamiento alostérico). El coeficiente de Hill para los cationes sodio y potasio son respectivamente 2.8 y 1.8. <sup>(20)</sup>

El presente trabajo mantuvo constante la tensión de O<sub>2</sub> porque se administró un flujo de 3 L/min de una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. La concentración del catión calcio también se mantuvo constante en los baños de cada especie (véase Soluciones

Electrolíticas). El trabajo demostró que el descenso de pH (de 7.4 a 6) ocasiona menor  $I_{sc}$  en la vejiga urinaria del sapo. Por lo tanto el pH también modifica el transporte activo del catión sodio.

Para resumir el transporte activo del catión sodio, señalamos lo siguiente: el catión sodio entra por la membrana apical a través de los canales epiteliales sensibles a amilorida según un gradiente electroquímico. La bomba de sodio-potasio ATPasa de la membrana basolateral saca el catión sodio intracelular movilizado desde la solución mucosa, a la vez que introduce el catión potasio a la célula. El catión potasio sale por la membrana basolateral a través de canales selectivos de cationes potasio. Hemos comprobado la presencia de corriente por transporte activo del catión sodio en todos los epitelios estudiados (piel, vejiga urinaria, vesícula biliar y colon) en las diferentes especies, la cual se modifica por variaciones en la concentración del catión sodio, variaciones en el pH, debido a la presencia de vasopresina y también debido a amilorida. De igual forma, la resistencia transepitelial total y el gradiente de voltaje espontáneo dependen también de estos condicionantes. Desde el punto de vista molecular, las variaciones del transporte iónico activo demostradas en los distintos resultados de los parámetros eléctricos dependen de las modificaciones de la actividad de las proteínas ENaC y la bomba de sodio-potasio ATPasa, en algunos casos para aumentar sus actividades (por ejemplo las acciones de vasopresina y el aumento de la carga extracelular del catión sodio), y en otros casos para disminuirlas (por ejemplo las acciones de amilorida y disminución del pH).

## CONCLUSIONES

Deseo presentar de manera sintética y puntual a las conclusiones, tomando en cuenta los aspectos más relevantes que se señalaron en la discusión de los resultados. Las primeras tres conclusiones se refieren a las comparaciones de las mediciones que tienen significancia estadística en este trabajo y la cuarta conclusión se refiere de manera más general al diseño del sistema biológico in vitro desarrollado.

1. Los parámetros eléctricos de voltaje, resistencia y corriente cortocircuito de los epitelios estudiados son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza de 0.01, cuando se compara la rata, el conejo y el sapo, salvo algunas excepciones.
  - 1.1. La vejiga de sapo y la vejiga de conejo tienen resistencias y corrientes cortocircuitos diferentes entre sí.
  - 1.1. La piel y vejiga de sapo tienen voltajes, resistencias y corrientes diferentes entre sí.
  - 1.2. La vejiga y vesícula de conejo tienen resistencias y corrientes diferentes entre sí.
  - 1.3. La vejiga y colon de conejo tienen voltajes, resistencias y corrientes diferentes entre sí.
  - 1.4. La vejiga y colon de rata tienen voltajes, resistencias y corrientes diferentes entre sí.
  - 1.5. La vejiga de rata y la vejiga de conejo tienen voltajes diferentes entre sí.

- 1.6. El colon de rata y el colon de conejo tienen voltajes, resistencias y corrientes cortocircuitos diferentes entre sí.
- 1.7. No hay diferencia significativa en el voltaje de la vejiga de sapo y la vejiga de conejo.
- 1.8. No hay diferencia significativa en el voltaje de la vejiga y vesícula de conejo.
- 1.10. No hay diferencia significativa en la resistencia y la corriente de la vejiga de rata y la vejiga de conejo.
2. Las manipulaciones experimentales modificaron significativamente las variables electrofisiológicas cuando se compara a los grupos controles con los grupos de estudio y con la fase experimental.
  - 2.1. La baja concentración del catión sodio en la solución de las hemicámaras (0.375 mM) disminuyó el gradiente de voltaje transepitelial y la corriente cortocircuito en la piel de sapo con un nivel de confianza de 0.01. La resistencia transepitelial no varió significativamente en los controles de piel de sapo expuestos a baja concentración del catión sodio.
  - 2.2. La resistencia transepitelial en el grupo de estudio y en la fase experimental de la piel de sapo expuesta a ADH fue menor que los controles, con un nivel de confianza de 0.01. La corriente cortocircuito fue significativamente mayor en los controles de piel de sapo expuestos a ADH en el lado seroso.
  - 2.3. El voltaje espontáneo fue menor en los grupos de estudio y en el período experimental de los controles de vejigas de sapo expuestas a pH 6 del lado seroso con un nivel de confianza de 0.01. La corriente disminuyó significativamente en las cohortes y en el período experimental de los controles

de vejigas de sapos expuestas a pH 6. La resistencia aumentó solamente en los controles de vejigas de sapo expuestos a pH 6 en el período experimental, con un nivel de confianza de 0.01.

2.4. El voltaje espontáneo y la corriente fueron menores en el grupo de estudio y en los controles de vejiga de sapo expuestos a amilorida del lado mucoso cuando se compara con los controles, para un nivel de confianza de 0.01. La resistencia aumentó en los controles de vejiga de sapo expuestos a amilorida en el período experimental.

2.5. El voltaje espontáneo no se modificó por efecto de amilorida en la vejiga de conejo, ni en el grupo de estudio ni en los controles en fase experimental. La corriente disminuyó en el grupo de estudio de vejigas de conejos.

3. Las mayores resistencias externas en el circuito cerrado se utilizaron en los controles de colon de conejo (302.5 kohm) y vejiga de rata (352.2 kohm). Las resistencias externas de los grupos de estudio no variaron significativamente respecto a los controles, excepto en los grupos de estudio de vejigas de sapo expuestas a pH 6, en las que la resistencia externa fue 47% menor que sus respectivos controles de vejigas de sapo.

4. Se diseñó un sistema biológico modificado con cámara de dos baños in vitro para el registro de los parámetros eléctricos transepiteliales (gradiente de voltaje espontáneo, resistencia transepitelial y corriente cortocircuito) mediante el ensamblaje de dos arreglos de circuitos eléctricos: abierto y cerrado.

## RECOMENDACIONES

Quiero basar mis recomendaciones en los aspectos que justifican y dan importancia al presente trabajo para fomentar la investigación en el campo de la Electrofisiología en Panamá. Recomiendo utilizar la técnica de pinzamiento de voltaje en un montaje biológico para registrar los parámetros eléctricos transepiteliales. Recomiendo evaluar la naturaleza de la corriente macroscópica cortocircuito de los epitelios de piel y vejiga urinaria de sapo y de los epitelios de la vejiga urinaria, colon y vesícula biliar del conejo y la rata mediante el aislamiento de canales iónicos con la técnica de pinzamiento en parche de célula entera. Recomiendo que se continúe con esta línea de investigación al estudiar otros factores condicionantes, como son los posibles efectos del tiempo de exposición de las variables y el volumen de los baños, de manera que complementen el presente estudio. También es recomendable estudiar la cinética de flujo con iones radiomarcados en la cámara de dos baños.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Baker T. et al. *Electrophysiological Properties Of The Tongue Epithelium Of TH Toad Bufo Marinus*. The Journal of Experimental Biology 205, 1943-1952, 2002.
2. Barlet-Bas C, Khadouri C, Marsy S, Doucet A. *Enhanced Intracellular Sodium Concentration In Kidney Cells Recruits A Latent Pool Of Na-K-ATPase Whose Size Is Modulated By Corticosteroids*. J Biol Chem 1990; 265:7799-7803.
3. Beltowski J, Marciniak Andrzej, Wójcicka G & Górny D. *Regulation Of Renal Na-K-ATPase And Ouabaine Sensitive H-K-ATPase By The Cyclic AMP Proteinkinase A Signal Transduction Pathway*. Acta Biochimica Polonica Vol 50 No.1, 2003, pp 103-114.
4. Carrasquer G. et al. *Effect of Pentachlorophenol (PCP) On Frog Cornea Epithelium (44436)*. PSEBM 1999, Vol 222:139-144.
5. Cox TC. *Calcium Channel Blockers Inhibit Amiloride-Stimulated Short Circuit Current In Frog Tadpole Skin*. Am J Physiol Regul Integr Com Physiol 263:R827-R833, 1992.
6. Fernández Y et al. *Inhibition Of Short Circuit Current In Rat Ileum By Aliphatic Alcohols*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 247: G547-G552, 1984.
7. Frindt G, Silver RB, Windhager EE et al. *Feedback Regulation Of Na Channels In Rat CCT. Effects of Inhibition of Na Entry*. Am J Physiol 1993; 264: F565-F574.
8. Fuchs W, Hvüd-Larsen E, Lindemann B. *Current-Voltage Curve Of Sodium Channels And Concentration Dependence Of Sodium Permeability In Frog Skin*. J Physiol 1977; 267: 137-166.
9. Garty H, Yeger O, Asher C. *Sodium-Dependent Inhibition Of The Epithelial Na<sup>+</sup> Channel By An Arginyl-Specific Reagent*. J Biol Chem 1988; 263: 5550-5554.

10. Grubb BR & Bentley PJ. *Aldosterone Induced, Amiloride-Inhibitable Short-Circuit Current In The Avian Ileum*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 253: G211-G216, 1987.
11. Handler JS, Perkins FM and Johnson JP. *Hormone Effects On Transport In Cultured Epithelia With High Electrical Resistance*. Am J Physiol Cell Physiol 240: C103-C105, 1981.
12. Horisberger JD. *The Na-K-ATPase: Structure-Function Relationship*. Austin: Landes, 1994.
13. Hug M. *Transepithelial Measurements Using The Ussing Chamber*. The European Working Group on CFTR Expression, 2002.
14. Knauf H. et al. *Determination of Short-Circuit In The In Vivo Perfused Rat Colon*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 246: G151-G158, 1984.
15. Kovbasnjuk O. et al. *Water does not flow across the tight junction of MDCK cell epithelium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95 (1998) 6526-6530.
16. Larsen E. *Hans H. Ussing – scientific work: contemporary significance and perspectives*. Biochimica et Biophysica Acta 1566 (2002) 2-15.
17. Lewis S. *Everything You Wanted To Know About The Bladder Epithelium But Were Afraid To Ask*. AJP – Renal Physiol Vol 278, Issue 6, F867-F874, June 2000.
18. Lewis SA, Berg JR and Kleine TJ. *Modulation Of Epithelial Permeability By Extracellular Macromolecules*. Physiol Reviews, Vol 75, 561-589, 1995.
19. Lewis S and Diamond JM. *Na<sup>+</sup> Transport By Rabbit Urinary Bladder, A Tight Epithelium*. J Memb Biol 28, 1-40 (1976).
20. Lewis S, Eaton DC and Diamond JM. *The Mechanism Of Na<sup>+</sup> Transport By Rabbit Urinary Bladder*. J Memb Biol 28; 41-70 (1976).
21. Lewis SA, Ifshin MS, Loo DD et al. *Studies Of Sodium Channels In Rabbit Urinary Bladder By Noise Analysis*. J Memb Biol 1984; 80:135-151.
22. Lewis SA and Wills NK. *Apical Membrane Permeability And Kinetic Properties Of The Sodium Pump In Rabbit Urinary Bladder*. The J of Physiol, Vol 341, Issue 1, 169-184, 1983.
23. Li YF et al. *Nitric Oxide Is Involved In Muscle Relaxation But Not In Changes In Short-Circuit Current In Rat Ileum*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 266: G554-G559, 1994.

24. Loo DD & Diamond JM. *Crystal Accumulation And Very High Short-Circuit Currents In Rabbit Urinary Bladder*. Am J Physiol Renal Physiol 248: F70-F77, 1985.
25. Lyoussi B and Crabbe J. *Influence of Apical Na<sup>+</sup> Entry On Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase In Amphibian Distal Nephron Cells In Culture*. The J of Physiology, Vol 456, Issue 1, 655-665, 1992.
26. Mauro T et al. *Effects Of t-PA On Short-Circuit Current Across Frog Skin*. Am J Physiol Cell Physiol 252: C173-C178, 1987.
27. Negrete HO, Lavelle JP, Berg J, Lewis SA and Zeidel ML. *Permeability Properties Of The Intact Mammalian Bladder Epithelium*. AJP – Renal Physiol, Vol 271, Issue 4, F886-F894, 1996.
28. Palmer LG, Frindt G. *Conductance And Gating Of Epithelial Na<sup>+</sup> Channels From Rat Cortical Collecting Tubule. Effects Of Luminal Na and Li*. J Gen Physiol 1988;92: 121-138.
29. Pedersen PS et al. *Short-Circuit Currents And Resistances In Epithelial Spheroids From Human CF And Non-CF Airways*. Am J Physiol 276:L75-L80, 1999.
30. Pohlman T et al. *Effects Of Prostacyclin On Short-Circuit Current And Water Flow In The Toad Urinary Bladder*. Am J Physiol Renal Physiol 244: F270-F277, 1983.
31. Saito T & Yoshida S. *Effects of Biguanides On Short-Circuit Current In Frog Skin*. Am J Physiol Renal Physiol 247: F277-F281, 1984.
32. Seldin DW and Giebisch GH. *The Kidney. Physiology & Pathophysiology*. Third Edition. Lippincott Williams & Williams, 2000.
33. Spring K.R. et al. *Size and shape of the lateral intercellular space in a living epithelium*. Science 200 (1978) 54-58.
34. Spring K.R. *Epithelial fluid transport – a century of investigations*. NIPS 14 (1999) 92-99.
35. Tosteson D. *Membrane Transport: People And Ideas*. American Physiological Society XIV: 337-358, 1989.
36. Ussing H & Zerahn K. *Active Transport Of Sodium As The Source Of Electric Current In The Short-Circuited Isolated Frog Skin*. J Am Soc Nephrol 10: 2056-2065, 1999.

37. Veeze et al. *Ion Transport Abnormalities In Rectal Suction Biopsies From Children With Cystic Fibrosis*. *Gastroenterology* 101 (2): 398-403, 1991.
38. Verrey F. *Antidiuretic Hormone Action In A6 Cells: Effect On Apical Cl and Na Conductances And Synergism With Aldosterone For NaCl Reabsorption*. *J Memb Biol* 1994, Feb 138 (1): 65-76.

ANEXO 1: Fotografías de los Cortes Histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina de los Epitelios de Sapo, Conejo y Rata (Poder 20x, Microscopio de luz).

Figura 25: Corte histológico de piel de sapo

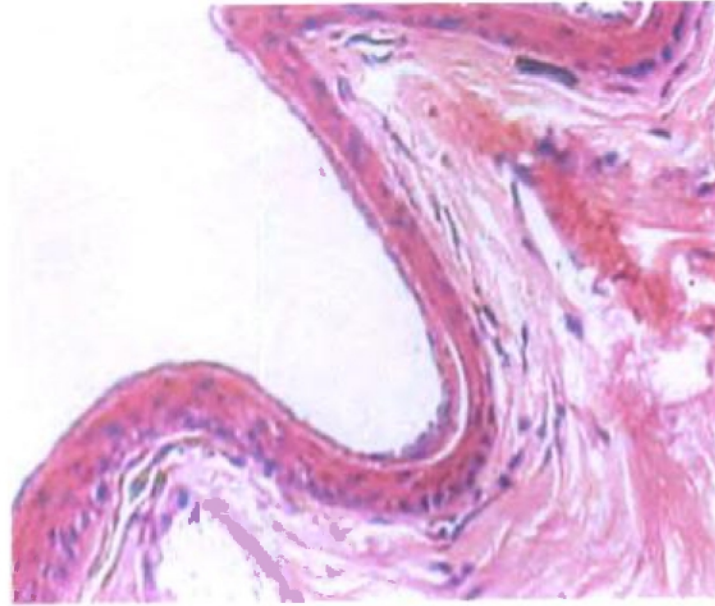


Figura 26: Corte histológico de vejiga urinaria de sapo

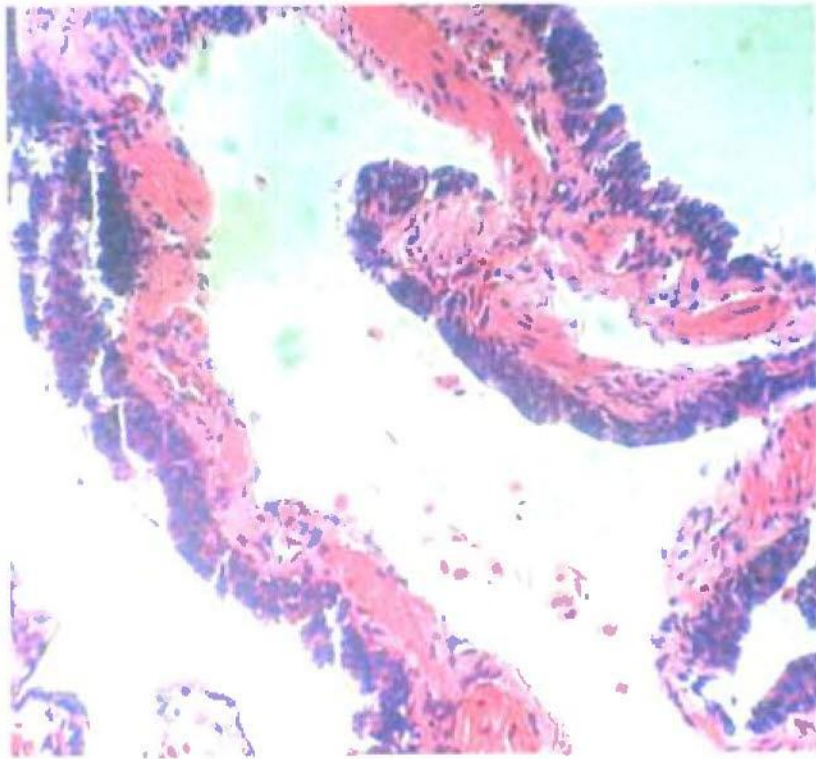


Figura 27: Corte histológico de vejiga urinaria de conejo

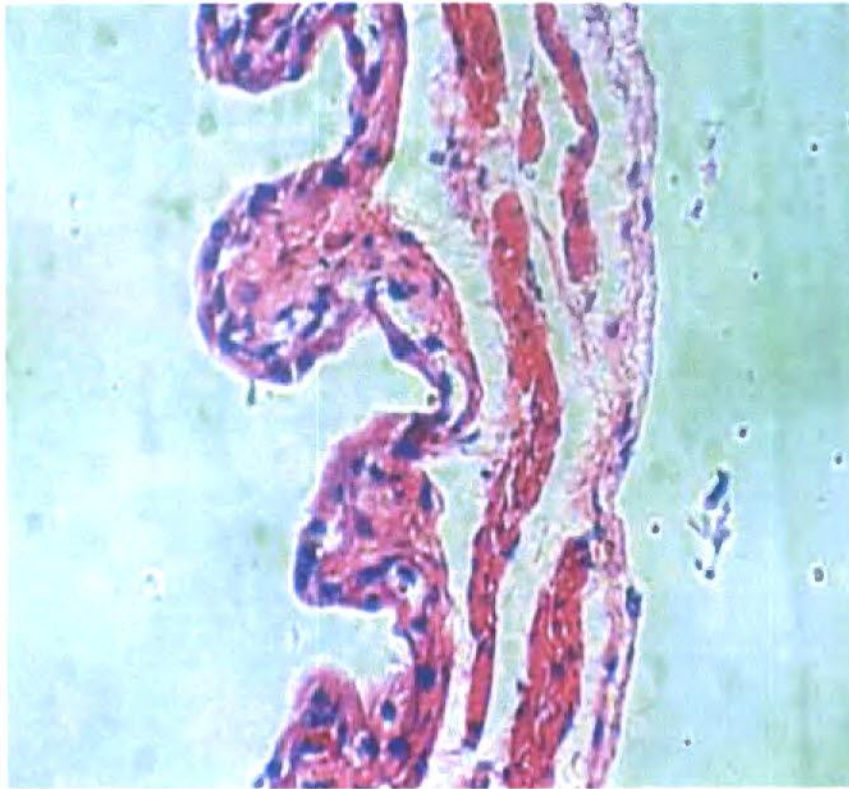


Figura 28: Corte histológico de vesícula biliar de conejo

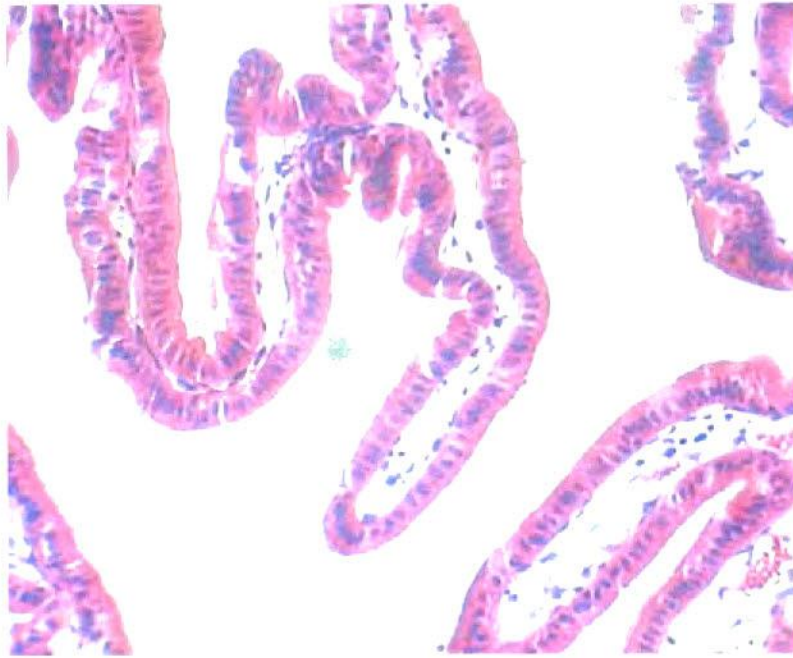


Figura 29: Corte histológico de colon de conejo

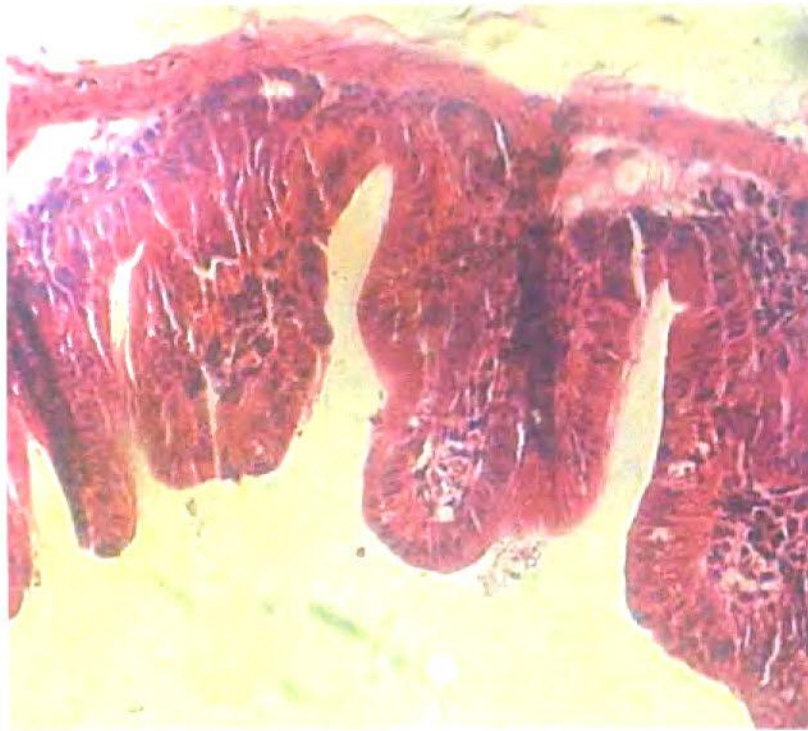


Figura 30: Corte histológico de vejiga urinaria de rata

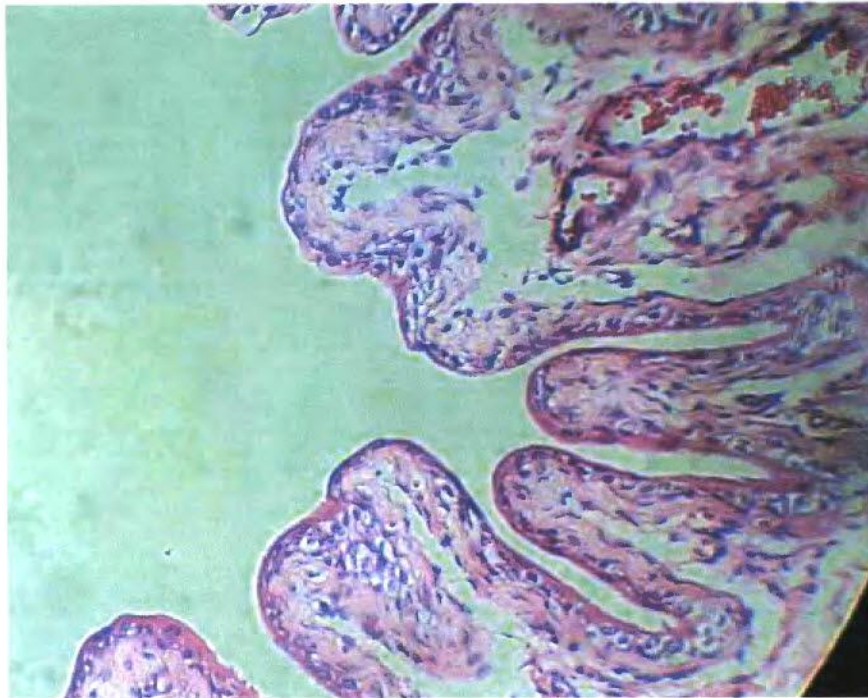
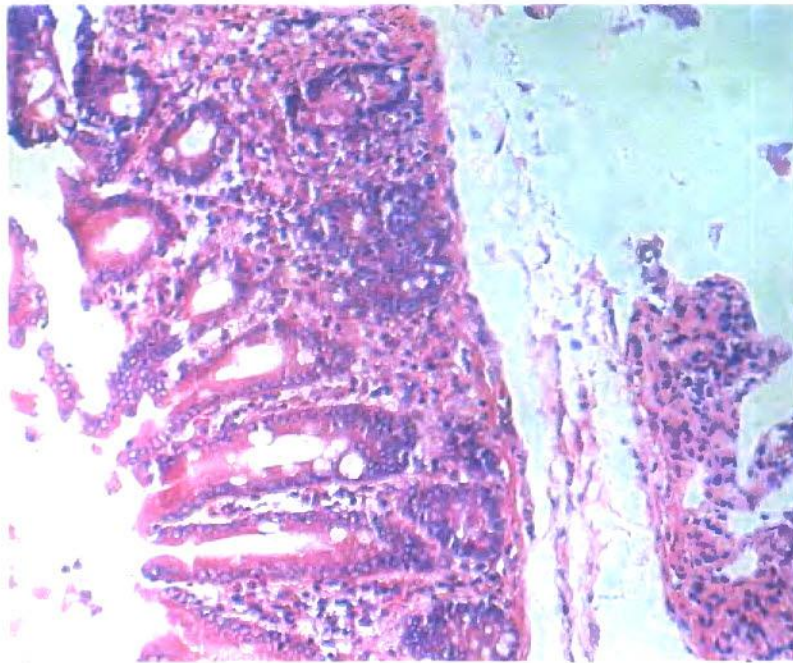


Figura 31: Corte histológico de colon de rata



## ANEXO 2

Cuadros de Relación Resistencia Transepitelial (Rte) vs Voltaje (V) en los Grupos Controles.

Cuadro XV: Rte vs V en Vejiga Urinaria de Sapo

V(mV)	1.5	2.3	3	3.3	3.4	12	13	18	19	20
Rte (kohm/cm <sup>2</sup> )	64	58	52	45	44	34	24	12	9	8.1

Cuadro XVI: Rte vs V en Vejiga Urinaria de Conejo

V (mV)	1.6	2.2	2.9	5.7	8.6	12.4	15.8	23.6
Rte (kohm/cm <sup>2</sup> )	977	856	915	712	530	389	250	96

Cuadro XVII: Rte vs V en Piel de Sapo

V (mV)	0.6	3.8	6.4	12	16	19	47	50	80	110
Rte (kohm/cm <sup>2</sup> )	125	103	110	101	94	87	66	63	52	27

Cuadro XVIII: Rte vs V en Vesícula de Conejo

V (mV)	2.7	2.8	3	4	5	9	14.2	32
Rte (kohm/cm <sup>2</sup> )	10.2	7.9	6.3	5.6	4.8	3.8	2	1.5

Cuadro XIX: Rte vs V en Colon de Conejo

V (mV)	1.9	2.1	2.7	2.9	3.2	3.3	4.1	7.1
Rte (kohm/cm <sup>2</sup> )	53	48	44	41	38	35	28	12

Cuadro XX: Rte vs V en Vejiga Urinaria de Rata

V (mV)	1.6	1.7	2.4	4.2	5.6
Rte (kohm/cm <sup>2</sup> )	845	713	590	594	474

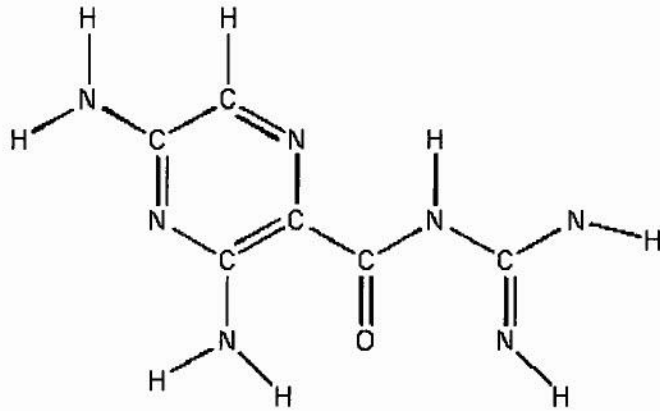
Cuadro XXI: Rte vs V en Colon de Rata

V (mV)	0.7	0.9	1.8	2.1	3.4
Rte (kohm/cm <sup>2</sup> )	30	29	27	22	7

## ANEXO 3

Cuadro XXII: Costo de la Investigación

Conejos	B/.115
Ratas	B/.30
Sapos	B/.30
Multímetros	B/.50
Gas Carbógeno	B/.35
Reactivos	B/.90
Cámaras de acrilato	B/.30
Baterías	B/.20
Plata	B/.20
Xylazina	B/.25
Alambre	B/.5
Alimento para animales	B/.30
Goma sellante	B/.10
Papelería	B/.200
Total	B/ 690

**ANEXO 4: ESTRUCTURAS QUÍMICAS****1. AMILORIDA****2. OUBAÍNA**