

Laboratorio de Fisiología Animal  
Departamento de Biología Animal  
Facultad de Biología  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Transporte iónico y electrofisiología del duodeno  
en *Gallotia galloti*

Memoria que presenta M<sup>a</sup> del Pino Santana Delgado  
para optar al grado de licenciada en  
Ciencias Biológicas.

La Laguna, enero de 1988.




D. Antonio Lorenzo Hernández y D. Tomás Gómez Soutullo Profesores Titulares del Departamento de Biología Animal ( U.D.I. Fisiología Animal) de la Facultad de Biología de la Universidad de La Laguna:

Certificamos:

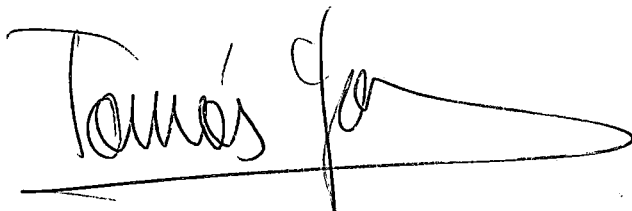
Que Dña. María del Pino Santana Delgado ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo contenido en la presente Memoria para aspirar al grado de Licenciado.

Y para que así conste, expedimos el presente certificado en La Laguna, veinticinco de enero de mil novecientos ochenta y ocho.



Fdo. Antonio Lorenzo Hernández.

Fdo: Tomás Gómez Soutullo



*La presente Memoria ha sido realizada con una  
subvención de la C. A. I. C. Y. T.*

*Expreso mi más sincero agradecimiento a Melo y Tomás por la excelente labor realizada en la dirección de ésta Tesina.*

*Igualmente, quiero dar las gracias a Virtu por compartir conmigo el trabajo realizado, así como a todos los miembros del Departamento de Fisiología Animal: Margarita, Ana, Miguel, Cándido y en especial a Pilar por la ayuda prestada en todo momento, a todos ellos gracias.*

A mis padres

**INDICE**

## INDICE

	<i>pag</i>
<b><u>1.-INTRODUCCION</u></b>	
1.1 Modelos de transporte transepitelial	3
1.1.1 Absorción electrogénica de Na <sup>+</sup> acompañada por una absorción pasiva de Cl <sup>-</sup>	4
1.1.2 Absorción de Na <sup>+</sup> acoplada a la absorción de solutos orgánicos.	6
1.1.3 Absorción neutral de Cl <sup>-</sup> y Na <sup>+</sup>	7
1.2 Efecto de algunos inhibidores en el transporte iónico a través de epitelios.	10
<b><u>2.- OBJETIVOS Y PLAN DEL PRESENTE TRABAJO</u></b>	13
<b><u>3.- MATERIALES Y METODOS</u></b>	
3.1 Animales de experimentación	14
3.2 Aislamiento del segmento intestinal	14
3.3 Incubación tisular	15
3.4 Soluciones de trabajo	16
3.4.1 Solución normal Krebs-Ringer-Bicarbonato	17
3.4.2 Solución Krebs-Ringer-Bicarbonato sin sodio	17
3.4.3 Solución Krebs-Ringer-Bicarbonato sin cloruro	18
3.4.4 Preparación de las soluciones de trabajo descritas	18
3.5 Sistema de medición de los parámetros bioeléctricos	19
3.6 Determinación de los flujos unidireccionales de los iones sodio y cloruro	23
3.7 Cálculos matemáticos y estadísticos	25
3.8 Presentación de resultados	28

<b><u>4. - RESULTADOS</u></b>	
4.1 Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos del duodeno en condiciones control	30
4.2 Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos de $\text{Na}^+$ en solución sin $\text{Cl}^-$	34
4.3 Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos del ión $\text{Cl}^-$ en ausencia de $\text{Na}^+$	37
4.4 Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos en presencia de Amiloride en el lado mucosal	40
4.5 Parámetros bioeléctricos y flujos de cloruro en presencia de DIDS en mucosa	43
4.6 Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos en presencia de DIDS en el lado serosal	46
4.7 Parámetros bioeléctricos y flujos de $\text{Na}^+$ en presencia de Ouabaína	49
<b><u>5. - DISCUSION</u></b>	
5.1 Parámetros bioeléctricos	52
5.2 Flujos iónicos	53
5.3 Efecto de la omisión del ión $\text{Na}^+$ y $\text{Cl}^-$ de las soluciones de baño	54
5.4 Efecto de la adición de inhibidores en el duodeno de <u>Gallotia galloti</u>	55
5.5 Modelo hipotético para la absorción de los iones sodio y cloruro en el duodeno de <u>Gallotia galloti</u>	59
<b><u>6. - CONCLUSIONES</u></b>	62
<b><u>7. - BIBLIOGRAFIA</u></b>	63



1. - INTRODUCCION

## 1. - INTRODUCCION

La función principal del tubo digestivo es proporcionar al organismo agua, electrolitos y sustancias nutritivas. Cada sección del tubo está destinada a una función específica, así el intestino delgado es una región especializada en la absorción de sustancias nutritivas e iones a partir de los constituyentes de la dieta, para su posterior utilización en las funciones vitales del organismo.

La pared del intestino delgado consta de capas sucesivas de tejido: muscular, conectivo, nervioso y epitelio simple. Este último es el que controla el paso de sustancias a través del intestino. Los enterocitos, responsables del intercambio selectivo de sustancias, representan el sitio en el que ocurre la discriminación con respecto a si un soluto dado será capturado o ignorado y excretado en ésta parte del intestino.

Los enterocitos permiten, además, que las soluciones de un lado y otro de la pared sobre la que se apoya el epitelio mantengan una composición diferente.

La distribución de iones a un lado y otro de la membrana que rodea al enterocito no es igual. La concentración de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  es más alta en el medio extracelular que en el interior de la célula; al revés de lo que ocurre con el ión  $\text{K}^+$ . Existe además entre el lado serosal o sanguíneo y el lado mucosal o luminal del epitelio una diferencia de potencial eléctrico. También hay diferencias de potencial entre el interior de la célula y el exterior a través del borde en cepillo y de la membrana basolateral (GUYTON, A. C. 1977).

La absorción por el epitelio intestinal consta

de dos procesos secuenciales: el primero implica la transferencia de solutos a través del borde en cepillo; seguido por una segunda transferencia a través de la membrana basolateral hacia la lámina de la villus. La red de capilares de ésta conducirá los solutos absorbidos hacia la circulación general encargándose esta última del reparto al resto del organismo.

Los epitelios pueden ser divididos en dos categorías extremas, dependiendo de la permeabilidad iónica de sus uniones intercelulares (FROMTER, E. 1972; SCHULTZ 1977).

Así tenemos los llamados epitelios impermeables o "tight", los cuales incluyen piel de anfibio y vejiga urinaria, caracterizados por grandes diferencias de potencial eléctrico transepitelial y resistencia, y baja permeabilidad a iones pequeños. Estos epitelios actúan como barreras de separación de soluciones que tienen marcadamente diferente composición iónica y osmolaridad.

En contraste, los epitelios como intestino delgado, vejiga biliar y tubo proximal renal, son catalogados como permeables o "leaky", porque ellos se caracterizan por presentar relativamente baja diferencia de potencial transmural, muy baja resistencia eléctrica y muy alta permeabilidad pasiva a iones pequeños y al agua. Estos epitelios son responsables de la absorción de grandes cantidades de sal y agua en soluciones isotónicas y son barreras entre soluciones que no difieren marcadamente con respecto a la composición y osmolaridad de iones pequeños.

Entre estos dos extremos están los epitelios "moderadamente impermeables" o "moderadamente permeables", como son el intestino grueso y nefrona

distal, que son capaces de sostener diferencias en composición y osmolaridad iónica pero no aparecen con gradientes tan grandes como aquellos que en condiciones fisiológicas tienen la piel de anfibio o vejiga urinaria (SCHULTZ, S.G. 1981).

### 1.1.- Modelos de transporte transepitelial

Los solutos se mueven a través de las membranas biológicas en respuesta a diversos mecanismos. Estos mecanismos se tienden a referir a términos de propiedades activas o pasivas de membranas.

Entre los tipos de transporte que se consideran fundamentales encontramos: la difusión y el transporte activo (GUYTON 1977; HILL, R.W. 1980; SCHMIDT-NIELSEN, K. 1976).

El primero se trata de un proceso físico que responde a una diferencia de concentración a ambos lados de una membrana semipermeable y ocurre siempre a favor de un gradiente. Puede llevarse a cabo libremente a través de dicha membrana (difusión simple) o necesitar de algún componente de la membrana como portador (difusión facilitada).

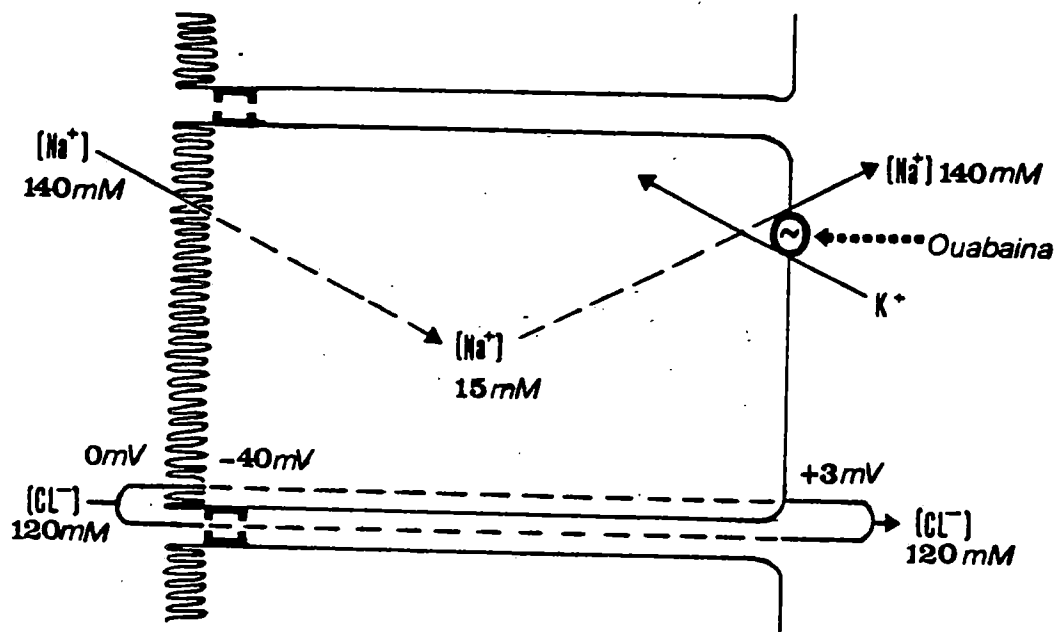
El segundo se realiza en contra de un gradiente, bien sea químico o electroquímico, y además necesita un portador en la membrana, al igual que ocurre en la difusión facilitada (CURRAN P.F. y SCHULTZ 1968; GUYTON 1977; USSING, M.H. y ZERAHN, K 1951).

A continuación describiremos algunos de los modelos descritos para el transporte de electrolitos en diversos epitelios:

1.1.1.- Absorción electrogénica de  $\text{Na}^+$  acompañada por una absorción pasiva de  $\text{Cl}^-$ .

Este modelo fue propuesto por KOEFOED-JOMNSEN y USSING (1958) para la piel aislada de rana. Según este modelo, el sodio entra en la célula favorecido por un gradiente de concentración iónico y eléctrico, siendo expulsado a través de la membrana basolateral por un mecanismo activo ATP-dependiente y sensible a la Ouabaina (SCHULTZ et al. 1974).

La absorción activa de  $\text{Na}^+$  crea una diferencia de potencial electropositivo en la solución serosal respecto a la mucosal y ésta diferencia de potencial da lugar a un flujo difusional de  $\text{Cl}^-$  desde la mucosa a la



Este modelo se ha establecido para numerosos epitelios gastrointestinales: FRIZZELL y SCHULTZ (1972) en el íleon de conejo y más tarde MUNCH y SCHULTZ (1974) en el yeyuno de rata.

Otro epitelio capaz de realizar una función absorptiva de  $\text{Na}^+$  electrogénica es la cloaca de Reptiles. Uno de los primeros trabajos realizados a éste respecto fue el de SCHMIDT-NIELSEN y SKADHAUGE (1967) en Cocodrillus acutus, en el cual se presentaban evidencias para una reabsorción importante del ión  $\text{Na}^+$ .

BENTLEY y BRADSHAW (1972) en estudios "in vitro" realizados en el colon de los lagartos Amphibolorus ornatus y A. inermis demostraron la existencia de un transporte activo de  $\text{Na}^+$  en dirección mucosa-serosa, que se refleja en la aparición de grandes diferencias de potencial y de intensidad de corriente de cortocircuito, siendo este tipo de transporte sensible a la adición de Amiloride y de Ouabaína.

En el colon de tortuga Pseudemys scripta THOMPSON y DAWSON (1978) han demostrado que la toma de  $\text{Na}^+$  a través de éste epitelio se realiza por dos mecanismos diferentes a nivel del borde mucosal. Uno de los componentes de dicha absorción es función lineal de la concentración de  $\text{Na}^+$  mucosal siendo insensible a la adición de Amiloride. El segundo mecanismo el  $\text{Na}^+$  entra en la célula a través del borde mucosal por un mecanismo sensible al Amiloride y sale de la célula a través de la membrana basolateral por la ya denominada bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

1.1.2.- Absorción de Na<sup>+</sup> acoplada a la absorción de solutos orgánicos.

La absorción de una gran variedad de solutos orgánicos entre ellos glucosa, aminoácidos, e.t.c. por el intestino delgado depende de un acople con el ión Na<sup>+</sup> (SCHULTZ y CURRAN 1970 ; SCHULTZ 1977; 1978). Estos procesos se han determinado en muchas especies de animales a través de la escala filogenética (SCHULTZ 1977).

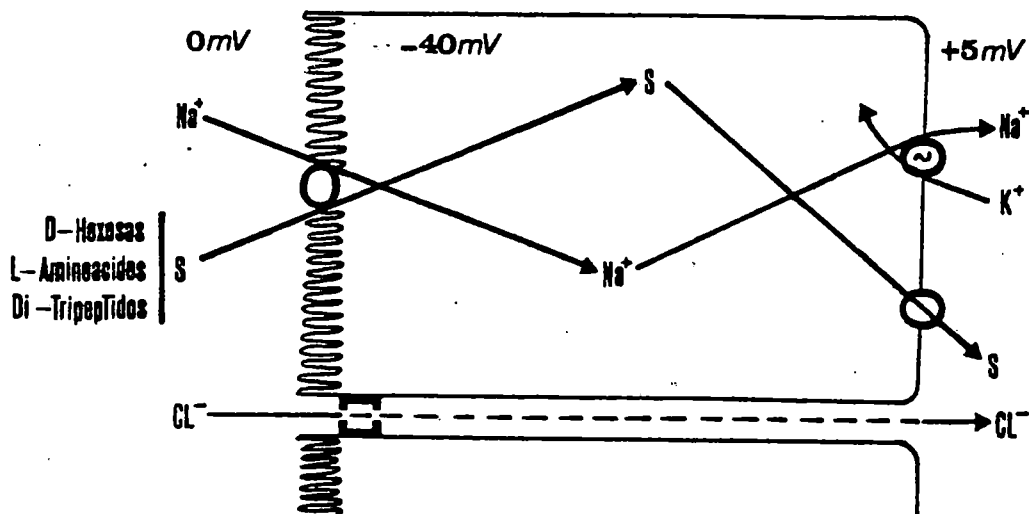
Los mecanismos absorptivos están localizados en la membrana mucosal y son capaces de acoplar la entrada de Na<sup>+</sup> y del soluto S hacia dentro de la célula, aprovechando el movimiento de Na<sup>+</sup> a favor de un gradiente electroquímico. Recientes estudios empleando vesículas de membrana del borde en cepillo, han establecido la presencia de mecanismos transportadores acoplados al Na<sup>+</sup> (MURRER 1974; KINNE 1978).

EL Na<sup>+</sup> es activamente extraído de la célula por un mecanismo ATP-dependiente sensible a la Ouabaína que desempeña dos importantes papeles en el proceso global:

a) Como postularon SCHULTZ y ZALUSKY (1964) mantener baja la actividad intracelular del Na<sup>+</sup> y mantener el gradiente químico.

b) Como sugirió SCHULTZ (1977) mantener la fuerza eléctrica para los procesos de entrada a la célula.

El flujo del soluto hacia el exterior de la célula a través de la membrana basolateral es a favor de un gradiente de concentración y no requiere energía metabólica:



### 1.1.3.- Absorción neutral de $\text{Cl}^-$ y $\text{Na}^+$ .

Este mecanismo se encuentra en la membrana mucosal y transporta  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en forma de un complejo neutro.

FRIZZELL y col. (1975) propusieron el siguiente modelo para este tipo de transporte:

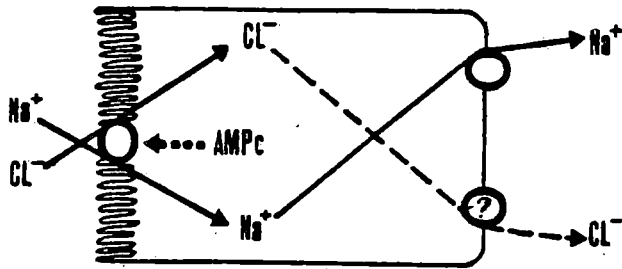
a) Un mecanismo situado en la membrana mucosal acopla el movimiento de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a través de esa membrana. El alto gradiente para la entrada de  $\text{Na}^+$  energiza la toma para el movimiento de  $\text{Cl}^-$ .

b) Un mecanismo situado en la membrana basolateral sensible a la Ouabaína y que necesita energía metabólica, expulsa  $\text{Na}^+$  activamente desde el interior de la célula a la solución serosal; este mecanismo es el responsable del mantenimiento de la baja concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular.

c) El  $\text{Cl}^-$  sale de la célula a través de la membrana basolateral por su favorable gradiente

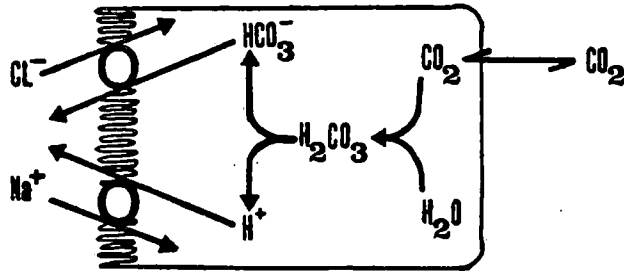


electroquímico.



TURNERG et al. (1970) basados en estudios realizados en íleon humano y más tarde LIEDKE, C.M. (1977) y MURER, H. et al (1976) empleando vesículas preparadas del borde en cepillo del intestino delgado de rata, han propuesto un modelo alternativo para la absorción neutral de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ :

De acuerdo con éste modelo, el mecanismo molecular responsable de toda la absorción neutral no es un proceso simporte  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  sino dos antiportes: uno que media un intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ; y otro que media un intercambio  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . La fuente del  $\text{H}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  intracelular es presumiblemente el  $\text{H}_2\text{CO}_3$  formado por la hidratación del  $\text{CO}_2$  endógeno o exógeno. El efecto inhibitorio de la Acetazolamida podría ser atribuido a su efecto inhibitorio en la actividad de la anhidrasa carbónica y la no formación de  $\text{CO}_3\text{H}^-$  y  $\text{H}^+$ .



Recientes estudios en vesícula biliar de conejo (DUFFEY, M.E. et al. 1978) e intestino delgado de sapo (ARMSTRONG et al. 1979) y lenguado (DUFFEY, M.E et al 1979), empleando microelectrodos selectivos indican que la actividad del  $\text{Cl}^-$  intracelular es mucho más grande que aquella que sería atribuida a una distribución pasiva. Demostrando que en presencia de sodio, la actividad termodinámica para el cloruro celular es de 2 a 3 veces superior a la encontrada aplicando la ecuación de NERST, para una distribución aniónica pasiva, mientras que en ausencia de  $\text{Na}^+$  coinciden los valores predichos por la ecuación y los observados experimentalmente.

En el caso de los Reptiles, existen estudios realizados en la cloaca del lagarto Agama stellio (SKADHANGE y DUVDEVANI 1977) que presenta evidencias de un transporte del ión  $\text{Na}^+$  acoplado de forma electroneutral al  $\text{Cl}^-$  en el borde mucosal. Estos autores proponen que la entrada de sodio energizaría el ingreso de cloruro en la célula presentando un modelo similar al de FRIZZELL y col. (1976) para el íleon de conejo.

En vesícula biliar del cobaya, la absorción de éstos iones también es electroneutral (DIAMOND 1968; HEINTZE y col. 1979).

Estudios realizados en éste Departamento en el colon del lagarto Gallotia galloti, proponen éste mismo modelo de transporte electroneutral para los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ; el cual se lleva a cabo por medio del intercambio  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-$  (BADIA y col. 1987).

También hay que resaltar que varios de los modelos de transporte antes mencionados pueden darse conjuntamente en algunos epitelios, tal es el caso del íleon del lagarto Gallotia galloti (BADIA y col. 1987), en el cual parte del ión  $\text{Na}^+$  se puede transportar de forma electrogénica, no viendose afectado por la presencia de Amiloride ni por la ausencia de  $\text{Cl}^-$ ; y de forma electroneutral acoplado al  $\text{Cl}^-$  pero por un intercambio  $\text{Na}^+-\text{H}^+ / \text{Cl}^--\text{HCO}_3^-$  sensible al Amiloride.

### 1.2.- Efecto de algunos inhibidores en el transporte iónico a través de epitelios.

Una de las formas de estudiar el transporte de los diferentes iones, a través de membranas biológicas, es utilizando inhibidores específicos de los diferentes mecanismos de transporte.

Así, por ejemplo, el glucósido cardiaco Ouabaina se emplea para bloquear la bomba electrogénica  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ , presente en muchas membranas de diversos epitelios (SMITH 1964; OIDE 1967; RIBO y FONZ 1969; ROBINSON 1979; ANDO 1981; BOLANOS y col. 1984; VERNAY 1986).

ROBINSON y col. (1976) observó que la toma de fenilalanina por la mucosa colónica de perro era fuertemente inhibida por Ouabaina, sugiriendo que la droga actúa disipando el gradiente de sodio, necesario

para el mantenimiento de la acumulación activa del aminoácido.

ANDO y col. (1981) estudiaron los efectos de la Ouabaína sobre los movimientos de  $\text{Cl}^-$  en la anguila de mar y encontró que tanto la Ouabaína como la ausencia de  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$  del medio de incubación, anulaban la diferencia de potencial y el flujo neto de agua, postulando un mecanismo para el transporte de  $\text{Cl}^-$  dependiente de la bomba  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ .

Otro inhibidor del transporte iónico es el diurético Amiloride. Este ejerce su acción específica bloqueando el intercambio  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  (SKADHAUGE y DAWSON 1980; DREWNOWSKA y BIBER 1985; AMAT y col. 1986) y los canales de sodio en la parte apical del enterocito (FRIZZELL y col. 1976).

La adición de  $10^{-4}$  M de Amiloride inhibe también el transporte activo de  $\text{Cl}^-$  en varios epitelios.

Este efecto inhibitorio sobre los flujos de  $\text{Cl}^-$  es debido a inhibición del intercambio  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  localizado en el lado apical de la célula. Tal inhibición bajaría el pH intracelular, lo cual decrecería la toma de  $\text{Cl}^-$  a través de dicha membrana apical vía intercambio  $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-$  (DREWNOWSKA y BIBER 1985).

RAMOS y ELLORY (1981) encontraron que el diurético Amiloride, no tiene efecto en el intestino del pez Pleuromites platesse, demostrando que en éste pez el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  están acoplados vía un simporte  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$ .

En el colon del lagarto Gallotia galloti la adición de Amiloride a la solución mucosal, produjo una reducción significativa en los flujos de sodio y cloruro de mucosa a serosa, anulandose el transporte neto de ambos electrolitos. Esto revela que la entrada de los

iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a la célula puede ser mediada por dos antiportes  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (BADIA y col. 1987).

Los derivados isetiociano del ac. disulfónico estilbene comprenden un grupo de compuestos aniónicos los cuales se asocian con determinados polipéptidos de membranas de eritrocitos y bloquean la transferencia aniónica (CABANTCHIK y col. 1972). Estos inhibidores penetran las membranas muy despacio, produciendo su inhibición por unión con alta afinidad y especificidad a sitios transportadores (CABANTCHIK y col. 1978).

Los estilbenos no son sólo inhibidores específicos en intercambio aniónico de eritrocitos, sino también bloquean el transporte aniónico en varios epitelios (EHRENSPECK y BRODSKY 1976).

El ac. disulfónico estilbene simultaneamente inhibió la absorción de  $\text{Cl}^-$  y secreción de  $\text{HCO}_3^-$ , cuando fue añadido al medio de incubación serosal en el intestino delgado de Amphiuma, sin embargo, la adición en el medio mucosal no tuvo efecto (WHITE 1980). Por otro lado, cuando el íleon y colon del lagarto Lacerta gallotia fueron incubados en presencia del ac. disulfónico estilbene (DIDS) en el medio mucosal, los flujos de cloruro y sodio fueron inhibidos (BADIA y col. 1987).

2.- OBJETIVOS Y PLAN DEL  
PRESENTE TRABAJO

## 2.- OBJETIVOS Y PLAN DEL PRESENTE TRABAJO

Dentro del proyecto de Investigación " Estudio de los flujos iónicos y características eléctricas en el intestino del reptil Lacerta Gallotia galloti y efectos de diversas sustancias sobre dichos flujos" subvencionado por la C.A.I.C.Y.T., los objetivos a desarrollar en el presente trabajo son los siguientes:

1.- Establecer los parámetros bioeléctricos DP, I<sub>sc</sub> y G<sub>t</sub> en el duodeno del lagarto Gallotia galloti.

2.- Establecer los flujos iónicos de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en condiciones control.

3.- Determinar la influencia de la omisión de un ión en los flujos del otro.

4.- Ver la influencia de diversos inhibidores específicos del transporte de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> sobre los flujos de éstos iones.

5.- A la vista de los resultados obtenidos establecer un modelo de transporte iónico en el duodeno de Gallotia galloti.

### 3. - MATERIALES Y METODOS



### 3.- MATERIALES Y METODO

#### 3.1.- Animales de experimentación

Para la realización del presente trabajo, se han utilizado ejemplares endémicos de la isla de Tenerife, perteneciente a la especie Gallotia galloti (Reptilia Lacertidae).

Los especímenes fueron capturados en El Médano (Tenerife, Islas Canarias) y mantenidos en terrarios adecuados a tal fin, perteneciente a éste Departamento, hasta el momento de ser sacrificados. La permanencia en éstos terrarios no superaba los dos días.

Durante éste período y hasta el momento de su sacrificio los animales se mantuvieron en condiciones de "ad libitum".

Se utilizaron ejemplares de un sexo u otro indistintamente por no observarse variabilidad significativa alguna en los resultados experimentales entre ambos sexos, una vez realizado el test de Kolmogorov-Smirnov sobre normalidad de poblaciones.

#### 3.2.- Aislamiento del segmento intestinal

Los animales fueron sacrificados por decapitación y a continuación, mediante una incisión ventral desde la región pélvica hasta la base de la región torácica, se procedía a separar el intestino del peritoneo. Posteriormente se aislaba el duodeno poniendolo en una placa de Petri que contenía solución Ringer normal oxigenada a una temperatura de 5°C, con el fin de efectuar un lavado para evacuar el contenido intestinal. A continuación el trozo de intestino tomado

se abría longitudinalmente, quedando preparado para su utilización.

### 3.3.- Incubación tisular

El tejido se dispone en una cámara similar a la descrita por USSING, consistente en dos semicámaras dotadas cada una de cuatro pocillos. Cada pocillo presenta dos orificios, uno apical y otro lateral, de tal forma que al unir las dos semicámaras quedan conectados dos a dos lateralmente (Fig 3.3.1). La cámara se abre longitudinalmente y el tejido se coloca entre las dos partes a la altura de los orificios laterales, sobre una serie de agujas dispuestas circularmente con el fin de que el fragmento tisular quede fijado. En todo momento se evita el estiramiento excesivo del tejido. Interiormente, la cámara está atravesada por un sistema de conductos, por los que circula agua bombeada por un depósito termostatado (Kottermam).

Una vez cerrada la cámara se añade a cada pocillo cuatro mililitros de la solución de trabajo a utilizar, de forma que cada lado del tejido, mucosal y serosal, quedan sometidos a la misma presión osmótica e hidrostática.

Cada tejido, un total de cuatro por experimento, era gasificado constantemente a través de una red de tubos conectada a una fuente de oxigenación del 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono.

Para comprobar el efecto de la ausencia de determinado ión sobre el tejido, se realizaban series de experimentos en los cuales la solución utilizada era diferente a la solución control (ver soluciones de trabajo). En estos experimentos se realizaba en primer

lugar la incubación en solución control, y transcurrido el tiempo necesario para la determinaciones control de los parámetros bioeléctricos y de flujos iónicos, las soluciones eran sustituidas por aquellas carentes del ión en cuestión, tomándose la primera parte del experimento como control, y dejando transcurrir un periodo de tiempo similar al primero para readaptación del tejido a la nueva solución de baño.

Otras series de experimentos, destinados a confirmar o rechazar los mecanismos propuestos, basados en las experiencias ya efectuadas, se realizaron añadiendo diversas sustancias de conocida acción sobre los transportadores. Estas sustancias se añadían después de transcurrido el periodo de condiciones control en cantidad adecuada para conseguir la concentración deseada en el pocillo, y transcurridos 30 min. desde la adición de la sustancia se procedía a la determinación de los parámetros anteriormente medidos.

#### 3.4.- Soluciones de trabajo

Fueron tres las soluciones empleadas, obtenidas al mezclar tres soluciones que designaremos con las letras A, B, y C:

3.4.1.- *Solución normal*  
*Krebs-Ringer-Bicarbonato*

<i>Solución</i>	<i>Composición</i>	<i>Concentración</i>
A	<i>NaCl</i>	107.00
	<i>NAHCO<sub>3</sub></i>	25.00
	<i>NAH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O</i>	0.20
	<i>NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O</i>	1.80
	<i>KCl</i>	4.50
B	<i>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</i>	1.25
C	<i>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	1.00

3.4.2.- *Solución Krebs-Ringer-Bicarbonato sin sodio*

<i>Solución</i>	<i>Composición</i>	<i>Concentración</i>
A	<i>Cloruro de colina</i>	110.00
	<i>Bicarbonato de colina</i>	25.00
	<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	2.00
	<i>KCl</i>	2.50
B	<i>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</i>	1.25
C	<i>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	1.00

3.4.3.- Solución Krebs-Ringer-Bicarbonato sin cloruro

<u>Solución</u>	<u>Composición</u>	<u>Concentración</u>
A	Isocianato de Na	111.50
	$\text{NaCO}_3\text{H}$	21.50
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.2
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.80
	$\text{KHCO}_3$	4.50
B	$\text{CaCO}_3$	1.25
	$\text{H}_2\text{SO}_4$	1.25
C	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.00

La composición de la solución A en la solución libre de sodio es semejante a la descrita en la solución normal de trabajo, pero en la cual se ha sustituido el sodio por colina y potasio debido a razones osmóticas. Lo mismo sucede en la solución libre de cloruro donde dicho ión es sustituido por isocianato y  $\text{CO}_3$ .

3.4.4.- Preparación de las soluciones de trabajo descritas.

La solución A se preparó en todos los casos 10 veces más concentrada, no así las soluciones B y C que se prepararon 50 veces más concentradas. La solución de trabajo se obtuvo tomando 25 ml de la solución A; 0.25 ml de la solución B; y la misma cantidad de la C, luego

se enrasaba con agua destilada hasta 250 ml (100:1:1000). Posteriormente se añadía glucosa con una concentración final de 5mM a la solución para el baño serosal.

Una vez preparadas las soluciones de trabajo se procedía a medir su pH, con un pH-metro Crison (modelo 506) con una fiabilidad de 0.02 unidades de pH, ajustandolas a un rango de 7.3 a 7.4.

Las soluciones eran gasificadas durante la media hora previa al experimento, con una mezcla del 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono, a una temperatura de 20 C.

Las sustancias inhibidoras del transporte utilizadas en éste trabajo fueron: Amiloride, Ouabaína y DIDS (ácido 4,4'-diisotiocianato stilbene-2,2'-disulfónico), ensayadas todas a una concentración final de  $10^{-8}$  M por estimarse las más convenientes.

### 3.5.-Sistema de medición de los parámetros bioeléctricos

Las medidas eléctricas se realizaron utilizando equipos de alta impedancia de entrada ( $10^{14}$  ohmios), para no alterar los parámetros eléctricos del tejido. Con el fin de efectuar las medidas eléctricas con la mayor precisión posible, se dotó al circuito de un blindaje adecuado en todas aquellas partes en las que el nivel de señal era bajo y donde el "ruido" (corrientes o señales parásitas que son extrañas a la señal de interés y que pueden interferirlas) podría

producir registros falsos. Todos los componentes del sistema estaban conectados a tierra y llevados a un punto único, evitando así, el acoplamiento nocivo de las señales externas en las distintas etapas.

Las medidas de las diferencias de potencial transepitelial (DP), así como de la intensidad de corriente de cortocircuito (Isc), entre los compartimentos mucosal y serosal, se llevaron a cabo utilizando puentes de agar y ClK 3 M al 3% W/V.

Para la medición de la diferencia de potencial se emplearon dos puentes por cámara, que se disponían por un extremo a un lado de la superficie de los tejidos, mientras que los extremos opuestos se conectaban, vía electrodos de calomelano (Radiometer Copenhagen, modelo K-401), a un aparato de fijación de voltaje controlado por ordenador (AC-Copy, D5100 versión 82-2). Este equipo consta de un microprocesador (AIM 65) que mediante cuatro interfases analiza la DP, en los valores por nosotros prefijados (Fig. 3.5.1).

Para la medición de la Isc se utilizaron, así mismo, dos puentes de agar y ClK 3 M al 3% W/V, uno a cada lado de la solución, colocados por el otro extremo, vía electrodos de platino en ClK 3 M (AC-Copy) a la pinza de voltaje antes descrita (Fig. 3.5.1).

Los dos electrodos de calomelano se denominan también de "referencia", debido a que el potencial de media pila del electrodo permanece completamente insensible a cambios en la composición de la solución (Bkoag y Wset 1975).

La conexión con los electrodos de platino en ClK 3 M permite el paso de la corriente generada por la pinza de voltaje, corriente directa que da lugar al cortocircuitado de la membrana.

Una vez montado el sistema eléctrico correspondiente se realizaba el calibrado del cero inicial de voltaje y, éste era comprobado en repetidas ocasiones a lo largo de la experiencia para reajustar las fluctuaciones de la DP, ocasionadas por causas ajenas al tejido. Tanto el potencial cero como la resistencia de la solución se obtenían antes de colocar los tejidos en las cámaras y eran corregidos automáticamente.

Los tejidos, en principio, se incubaban en condiciones de circuito abierto durante un intervalo de tiempo de 40 minutos, en el que las muestras se estabilizaban. Durante éste periodo a los tejidos se les proporcionaban pulsos de  $10 \mu\text{A}$  de un segundo de duración, a intervalos de cinco segundos. Después de un periodo de relajación de 0.5 segundos el sistema realizaba para cada cámara dos medidas del desplazamiento de la DP así como del cambio en la amplitud de pulso. A partir de estas medidas se calculaba la conductancia tisular ( $G_t$ ). En circuito abierto, por tanto, se determinaban los valores de intensidad de corriente a partir de la DP y de la  $G_t$  calculada. La lectura de los parámetros indicados se llevó a cabo a intervalos de dos minutos.

Posteriormente, se procedió a cortocircuitar, la técnica del cortocircuito es una aproximación experimental a la introducida por USSING y ZBRAHN (1951), para el estudio del transporte de sodio a través del tegumento de rana. Esta técnica ha sido adaptada al estudio de una gran variedad de epitelios. Según esta técnica, cuando las soluciones que bañan el tejido por ambas superficies presentan idéntica composición y se deja pasar suficiente corriente a través de la pareja de



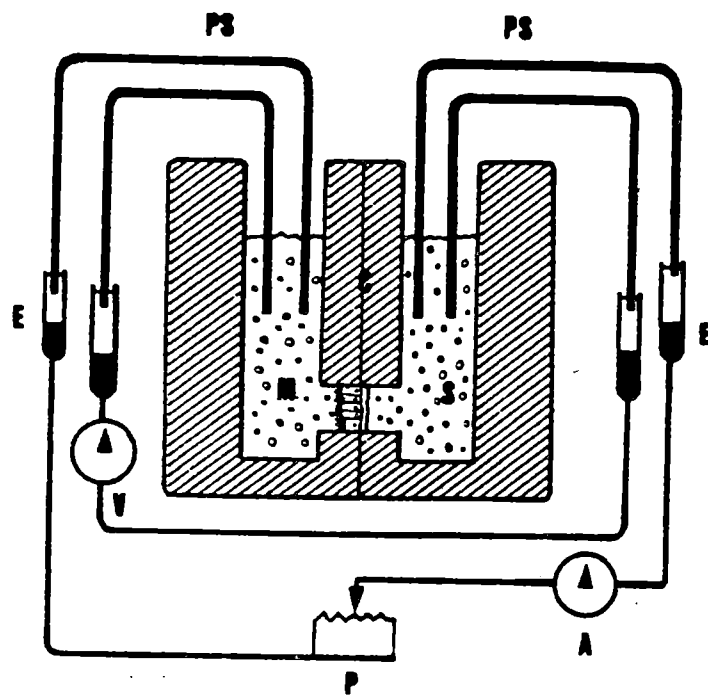


Fig 3.5.1

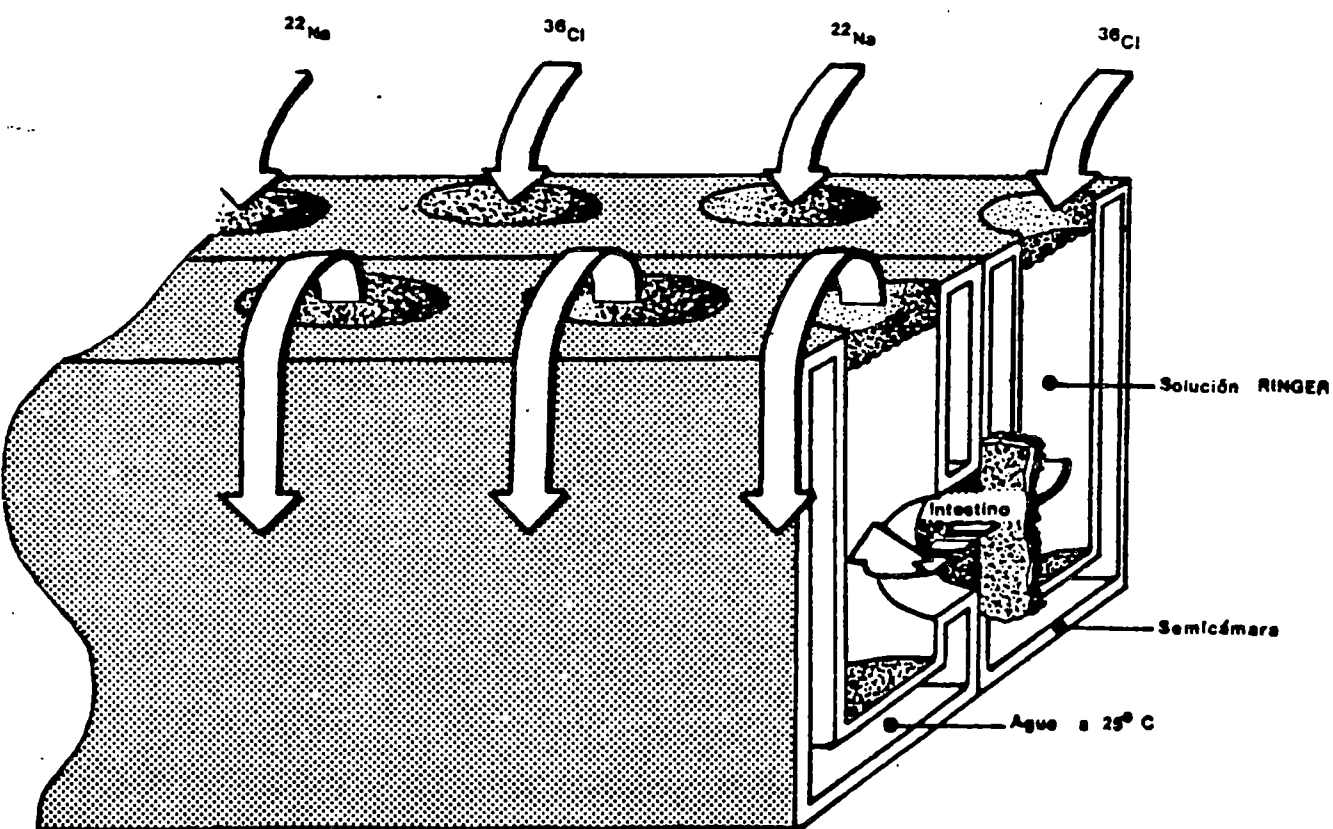


Fig 3 3 1

electrodos conectados a la pinza de voltaje (Micro clamp) como para anular la DP generada espontáneamente por el tejido, la diferencia de potencial electroquímico a través del tejido es cero para todos los iones.

Así, los movimientos netos de los iones resultan exclusivamente del acoplamiento con alguna fuente celular de energía metabólica (mecanismo de transporte activo). Bajo estas condiciones la corriente necesaria para anular la DP es igual a la suma aritmética de los flujos transepiteliales de aquellos iones cuyo movimiento no es debido a la difusión simple (SCHULTZ 1980). En condiciones de cortocircuito además de los pulsos mencionados para circuito abierto, el sistema inyecta corriente continua en sentido inverso a la DP generada por el tejido, hasta que ésta resulta anulada. En estas condiciones se calculó la DP del tejido a partir de la  $G_t$  medida y de la  $I_{sc}$  generada. Esta  $I_{sc}$  generada era determinada y corregida con una frecuencia de 4 Hz. Los parámetros eléctricos mencionados se registraban en una impresora digital a intervalos de un minuto.

### 3.6.- Determinación de los flujos unidireccionales de los iones sodio y cloruro.

Aproximadamente a los 40 minutos de haber montado los tejidos en la cámara y tras haber comprobado la estabilidad de los potenciales eléctricos, los cuatro tejidos fueron cortocircuitado al tiempo que se realizaba el marcaje radiactivo con los isótopos  $Na^{22}$  y  $Cl^{36}$ . De estos isótopos radiactivos se añadieron 50  $\mu$ l de una solución diluída al cien por cien que contenía 100  $\mu$ Ci del isótopo correspondiente. El marcaje sólo se

ejecutaba bien en el lado mucosal bien en el serosal, adoptando como norma realizar en cada sesión dos marcajes en mucosa y dos en serosa. Después de un tiempo adicional de 40 min. se tomaban muestras de 0.2 ml del lado marcado, como patrón, y del lado no marcado como indicador del tiempo cero ( $t_0$ ). A partir de éste momento y a intervalos de 20 min. hasta 40 min. se tomaban alícuotas de 0.2 ml. En todos los casos, las muestras se tomaron por duplicado, con el fin de promediar los datos de contaje obtenidos, reemplazando el mismo volumen extraído (0.4 ml por pocillo) con la solución no marcada adecuada al experimento diseñado.

Las alícuotas eran depositadas en viales (Beckman) previamente pesados, repitiendo la pesada una vez colocada la muestra. El peso de la muestra se utilizó como factor de corrección de los volúmenes de las mismas, para los cálculos matemáticos de los flujos iónicos. A cada vial se le añadía un volumen de 4 ml de líquido de centelleo (BDH Chemical Ltd. Poole England) cuya composición por litro es la siguiente: Tolueno 666 ml, Tritón 332 ml, PPO 5 gr, POPOP 0.15 gr.

En cada experimento se tomaron dos muestras adicionales, las cuales contenían la solución pertinente no marcada (blanco) con el fin de conocer el ruido de fondo y, así corregir los datos de marcaje obtenidos para cada muestra. La actividad de los isótopos  $\text{Na}^{22}$  y  $\text{Cl}^{36}$  fue reslizada en un contador beta (LKB-1210, Ultra-Beta, Wallac).



### 3.7.- Cálculos matemáticos y estadísticos

#### 3.7.1.- Matemáticos:

Los flujos unidireccionales fueron calculados a partir de las ecuaciones estandars de SCHULTZ y ZALUSKY (1964):

$$\text{Flujo unidireccional (J)} = \frac{(cpm_2/Vm_2) \cdot Vt - ((cpm_1/Vm_1) \cdot Vt) - Fc}{Ae \cdot t \cdot s}$$

Donde:

*cpm* = cuentas por minuto de las muestras 1 y 2

*Vm* = volumen de las muestras 1 y 2

*Vt* = volumen total de cada compartimento

*Ae* = actividad específica del isótopo

*t* = intervalo entre la toma de muestras

*s* = superficie de transporte

*Fc* = factor de corrección

El flujo neto es definido como la diferencia entre las medias de los flujos unidireccionales:

$$J_{\text{neto}} = J_{m \rightarrow s} - J_{s \rightarrow m}$$

$J_{m \rightarrow s}$  = flujo medio unidireccional de mucosa a serosa

$J_{s \rightarrow m}$  = flujo medio unidireccional de serosa a mucosa

El flujo residual neto, se obtiene de la diferencia entre la  $I_{SC}$  expresada en  $\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$  y los flujos netos para el sodio y el cloruro, mediante el siguiente algoritmo:

$$J_{\text{residual}} = I_{SC} - (J_{\text{Na}^+ \text{ neto}} - J_{\text{Cl}^- \text{ neto}})$$

El error estandar para los flujos netos se obtuvo por el método de proporción:

$$s^2 = \frac{S_{ms}^2 + S_{gm}^2}{n}$$

Todo el proceso de cálculo se efectuó mediante el empleo de una calculadora fx-5200 P (Casio) programada para tal efecto.

### 3.7.2.- Estadísticos:

Centramos el análisis estadístico en contraste de hipótesis, realizamos las siguientes pruebas:

#### A.- Test de la Normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

Permite comprobar si los datos siguen una distribución Normal. Se acepta la hipótesis nula, si la diferencia máxima obtenida  $(F_i - P_i)$  es menor que la  $D_0$  de la tabla de MASSEY para un nivel de significación  $\alpha < 0.01$ .

$$(F_i - P_i) < D_0$$

B. - Test de igualdad de varianzas:

Se pretende contrastar la hipótesis de igualdad de varianzas a partir de las varianzas muestrales. El estadístico de contraste  $F$  es la relación entre las cuasivarianzas muestrales, siendo:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

de tal forma que ésta hipótesis nula se acepta si:

$$\frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} \in \left[ F_{1-\alpha/2; (n_1-1), (n_2-1)} ; F_{\alpha/2, (n_1-1), (n_2-1)} \right]$$

La hipótesis de homocedasticidad es requisito previo a los análisis posteriores.

C. - Test de igualdad de medias:

para poblaciones normales, con varianzas poblacionales iguales pero desconocidas:

$$H_0: M_1 = M_2$$

1. - Muestras grandes  $n_1 + n_2 > 30$   $n_1, n_2$

Se acepta  $H_0$  si  $Z < Z_{\alpha/2}$

$$Z = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

2.- Muestras de varianzas muestrales desconocidas pero iguales y de tamaño pequeño, tal que  $n_1 + n_2 < 30$

$H_0$  se acepta si  $t < t_{\alpha/2, n_1+n_2-2}$

$$t = \frac{|M_1 - M_2|}{sp \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

3.- Muestras pequeñas  $n_1 + n_2 < 30$ . Con varianzas muestrales desconocidas y distintas.

$H_0$  se acepta si  $t < t_{\alpha/2, f}$

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

donde  $f$  es el valor de la aproximación de WELCH.

### 3.8.- Presentación de resultados

Todos los resultados se expresan en tablas, complementadas con gráficas, disponiendo en la parte superior los resultados de los parámetros bioeléctricos y en la parte inferior los flujos netos y unidireccionales.

El número de muestras utilizadas se indican con la letra "n". Todas las variables se expresan como la media  $\pm$  el error estandar (ES).

Las unidades empleadas son las siguientes:

- Diferencia de potencial (DF)	mV
- Intensidad de corriente (Isc)	$\mu\text{A}/\text{cm}^2$
- Resistencia tisular (Rt)	$\Omega.\text{cm}^2$
- Conductancia tisular (Gt)	$\text{mS}/\text{cm}^2$
-Flujo iónico (J)	$\mu\text{eq}/\text{cm}^2.\text{h}$

En los experimentos realizados en condiciones control para determinar los parámetros eléctricos y flujos iónicos, los primeros 40 minutos se refieren a los valores en condiciones de circuito abierto y la segunda parte a los valores en circuito cerrado (Tabla 1).

En las tablas 2 y 3 se presentan las variaciones de los parámetros bioeléctricos y flujos iónicos al omitir los iones cloruro y sodio respectivamente del medio de incubación.

En las tablas 4, 5, 6 y 7 se expresan los valores de los parámetros bioeléctricos y flujos iónicos tras la adición de Amiloride, DIDS en mucosa, DIDS en serosa y Ouabaína; correspondiendo los primeros 40 minutos a las condiciones control y el resto a los valores obtenidos en presencia de estas sustancias.

Los niveles estadísticos de significación calculados para las distintas variables, se simbolizan de acuerdo con el siguiente criterio:

$p > 0.05$	N.S.
$0.05 > p > 0.01$	*
$0.01 > p > 0.001$	**
$0.001 > p$	***



#### 4. - RESULTADOS

#### 4. - RESULTADOS

##### 4.1. - Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos del duodeno en condiciones control. -

El duodeno del lagarto Gallotia galloti se incubó en solución Krebs-Ringer-Bicarbonato (solución normal) y tras un tiempo de adaptación del tejido a las condiciones del baño, 40 min. en circuito abierto, se cortocircuitó. A los 40 min. de cortocircuitado se tomó éste tiempo como tiempo cero ( $t_0$ ), siendo ya estables los parámetros bioeléctricos. Estos datos se encuentran en la tabla 1. En ella podemos observar como la diferencia de potencial transmural (DP) fue en promedio 2.2 mV, positiva la serosa respecto a la mucosa, a lo largo de todo el periodo de incubación.

Respecto a la intensidad de corriente de cortocircuito ( $I_{sc}$ ) se observó cómo ésta osciló desde 27  $\mu A/cm^2$  al  $t_0$  hasta 31  $\mu A/cm^2$  al  $t_{40}$ .

La conductancia tisular ( $G_t$ ), por otra parte, presentó unos valores próximos a 14  $mS/cm^2$ .

Cuando los parámetros bioeléctricos estaban estables (40 min. de cortocircuitar) se midieron los flujos unidireccionales para el sodio y cloruro, resultando los valores indicados en la tabla 1.

El flujo neto para el  $Na^+$  fue de  $2.29 \pm 0.17$   $\mu eq/hcm^2$ , siendo el del  $Cl^-$   $1.16 \pm 0.16$   $\mu eq/hcm^2$ . Es significativa la diferencia del flujo neto de  $Na^+$  que es casi el doble del flujo neto de  $Cl^-$ .

Al comparar los flujos netos de  $Na^+$  y  $Cl^-$ , con la intensidad de corriente ( $I_{sc}$ ) según la ecuación

$$J^N = I_{sc} - ( J_{ntNa^+} - J_{ntCl^-} )$$

se obtiene un flujo residual cerca de cero  $J^R$   
 $= 0.12 \pm 0.12$  (tabla 1).

Tabla 1.- Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos en condiciones control.-

t	DP (mV)	Isc ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2\text{ht}$ )	Gt ( $\text{mS}/\text{cm}^2$ )	n
0	3.73 $\pm$ 0.31	32.70 $\pm$ 3.21	8.96 $\pm$ 0.65	14
20	3.57 $\pm$ 0.31	32.43 $\pm$ 3.75	9.01 $\pm$ 0.71	14
40	3.53 $\pm$ 0.32	33.24 $\pm$ 4.55	8.95 $\pm$ 0.72	14
0	2.20 $\pm$ 0.32	27.69 $\pm$ 1.46	13.51 $\pm$ 1.61	14
20	2.29 $\pm$ 0.26	30.87 $\pm$ 1.49	14.06 $\pm$ 1.58	14
40	2.15 $\pm$ 0.28	31.97 $\pm$ 1.53	15.64 $\pm$ 1.76	14

$$J_{\text{memNa}^+} = 5.50 \pm 0.57 \quad (n=14)$$

$$J_{\text{smNa}^+} = 3.21 \pm 0.31 \quad (n=14)$$

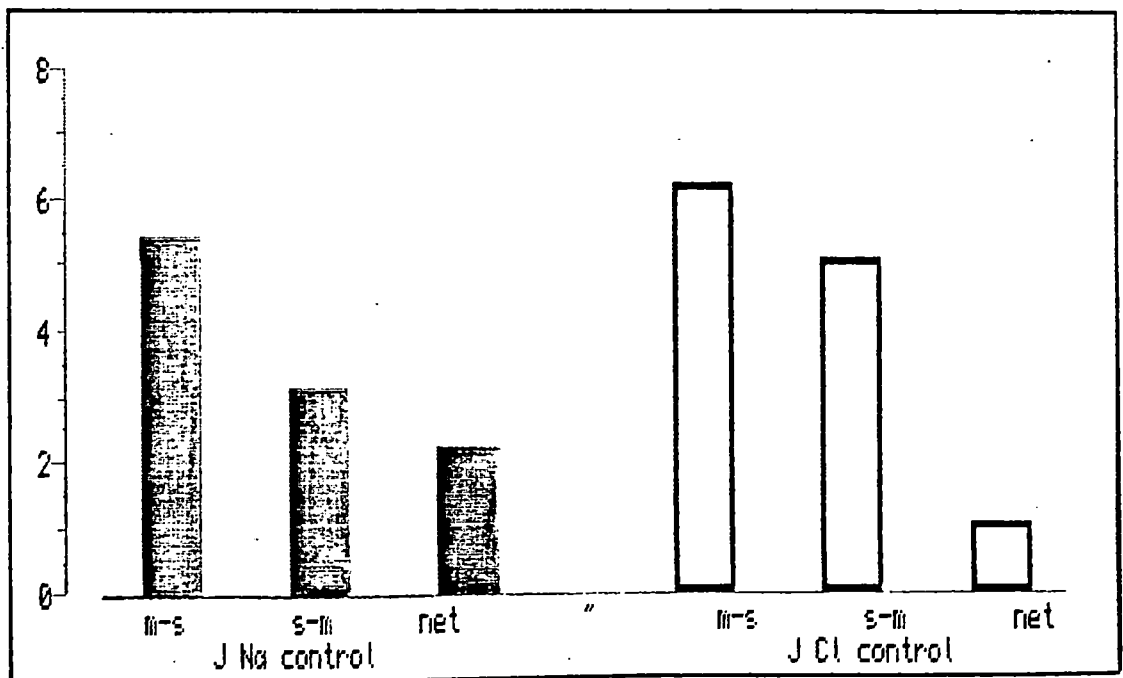
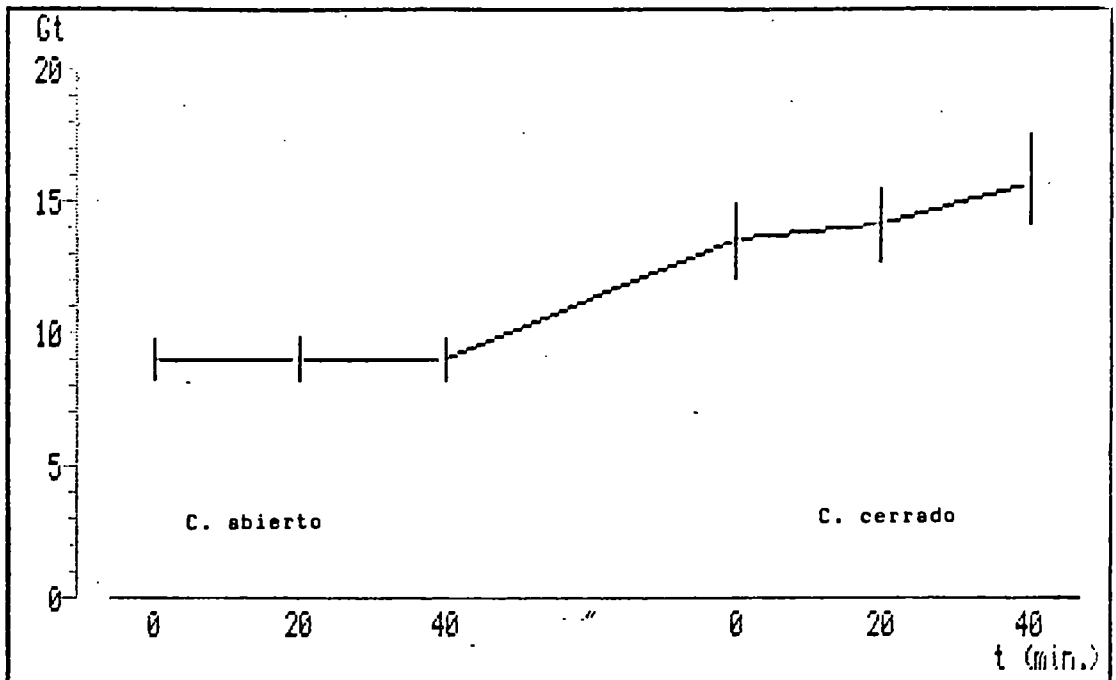
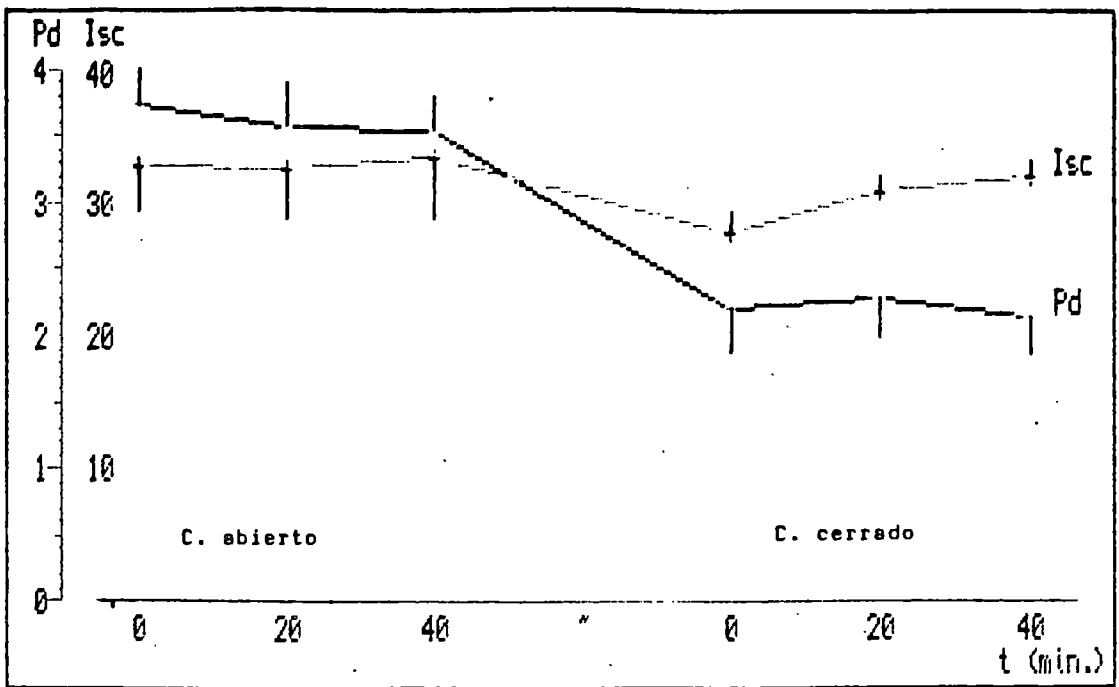
$$J_{\text{ntNa}^+} = 2.29 \pm 0.17 \quad (n=14)$$

$$J_{\text{memCl}^-} = 6.27 \pm 0.36 \quad (n=13)$$

$$J_{\text{smCl}^-} = 5.11 \pm 0.47 \quad (n=13)$$

$$J_{\text{ntCl}^-} = 1.16 \pm 0.11 \quad (n=13)$$

$$J^R = 0.12 \pm 0.12 \quad (n=13)$$



4.2.- Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos de  $\text{Na}^+$  en solución sin  $\text{Cl}^-$ .

La incubación del duodeno en una solución Krebs-Ringer-Bicarbonato en condiciones libre de  $\text{Cl}^-$  manifestó una DP próxima de 3 mV, éste valor ligeramente superior al control (2.2 mV) no fué estadísticamente significativo.

La  $I_{sc}$ , en ausencia del ión  $\text{Cl}^-$  disminuyó, pero no significativamente, tomando valores de  $20.12 \pm 6.10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  a  $t_0$  y  $21.23 \pm 6.6$  a  $t_{40}$ .

La conductancia tisular ( $G_t$ ) no se diferenció significativamente de la medida en condiciones control ( $G_t = 14 \pm 4.19$ ).

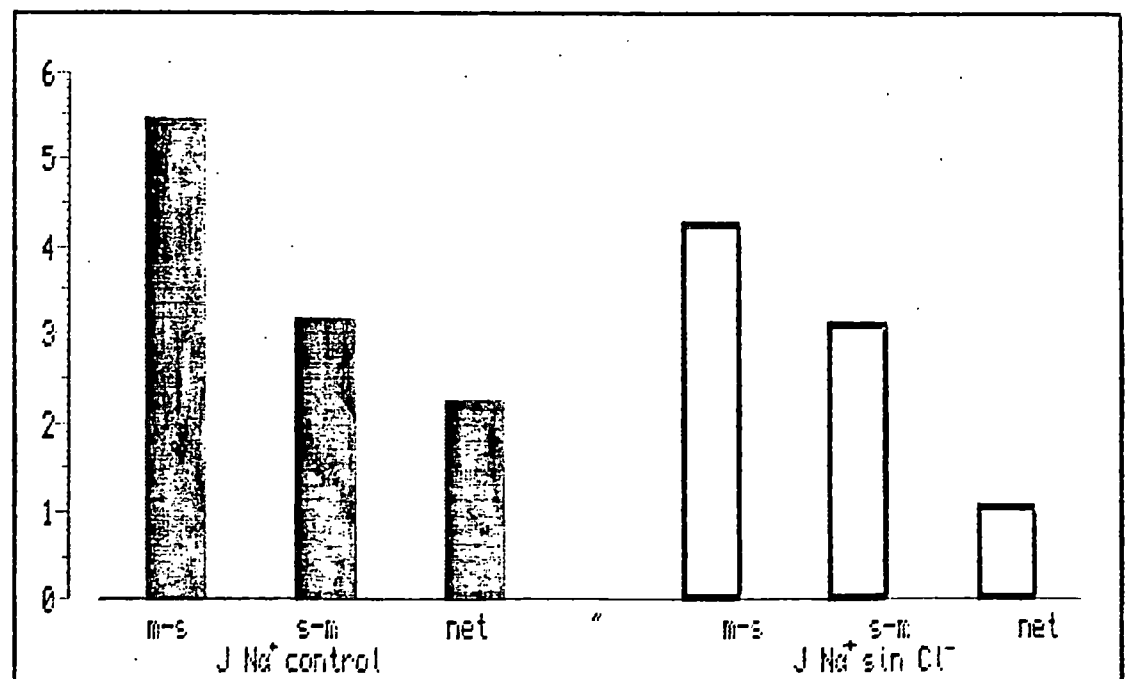
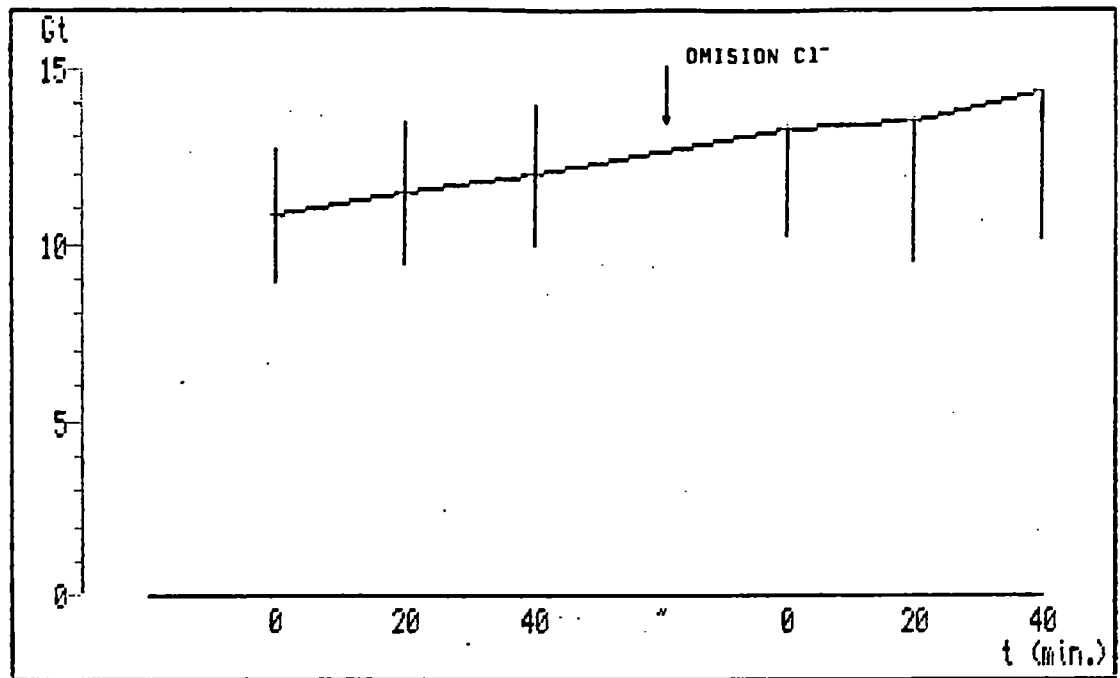
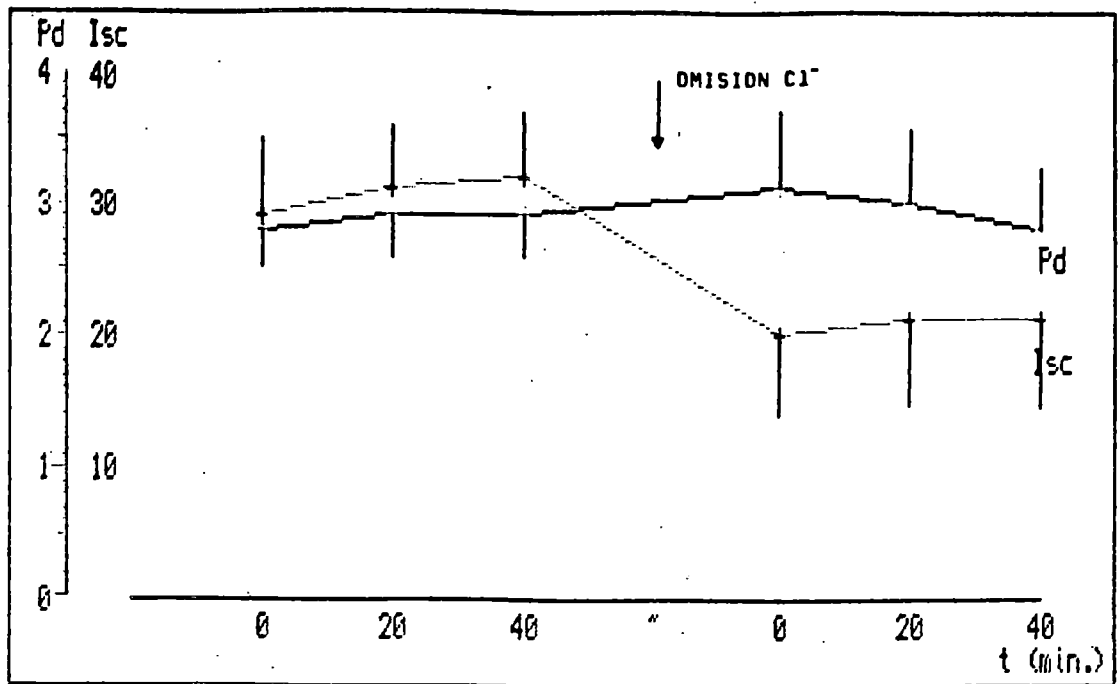
Los flujos unidireccionales de  $\text{Na}^+$  en ausencia de  $\text{Cl}^-$  tomaron los valores de  $4.3 \pm 0.60 \mu\text{eq}/\text{hcm}^2$  en sentido mucosa a serosa y  $3.18 \pm 0.59 \mu\text{eq}/\text{hcm}^2$  en sentido contrario (serosa a mucosa). Estos datos muestran que el flujo de sodio, en sentido mucosa a serosa disminuyó significativamente ( $p < 0.001$ ) con respecto al control, mientras el de serosa a mucosa permaneció inalterable, lo cual puso de manifiesto una reducción del flujo neto ( $J_{\text{net Na}^+} = 1.12 \pm 0.22$ ) (tabla 2).

Tabla 2. - Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos de Na

en solución sin Cl<sup>-</sup>.

<i>t</i>	<i>DP</i> (mV)	<i>Isc</i> (μA/cm <sup>2h</sup> )	<i>Gt</i> (mS/cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>
0	2.81±0.47	29.92±6.16	10.89±1.95	14
20	2.96±0.44	30.91±5.21	11.47±1.92	14
40	2.96±0.43	32.30±5.33	12.03±2.1	14
0	3.11±0.68	20.12±6.10	13.18±3.94	14
20	3.03±0.60	21.18±6.96	13.53±4.02	14
40	2.79±0.53	21.23±6.61	14.36±4.19	14

<i>JmsNa<sup>+</sup></i> = 5.5 ± 0.57	(n=14)	
<i>JsmNa<sup>+</sup></i> = 3.21 ± 0.31	(n=14)	Control
<i>JntNa<sup>+</sup></i> = 2.29 ± 0.17	(n=14)	
<i>JmsNa<sup>+</sup></i> = 4.30 ± 0.60***	(n=14)	
<i>JsmNa<sup>+</sup></i> = 3.18 ± 0.59	(n=14)	Sin Cl <sup>-</sup>
<i>JntNa<sup>+</sup></i> = 1.12 ± 0.22***	(n=14)	





4.3.- Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos del ión  $\text{Cl}^-$  en ausencia de  $\text{Na}^+$ .-

La medición de los parámetros eléctricos y flujos de  $\text{Cl}^-$  fue llevada a cabo con solución Krebs-Ringer-Bicarbonato carente de  $\text{Na}^+$ , el cual fue sustituido por Colina para mantener la osmolaridad de la solución.

La DP tomó valores negativos muy próximos a cero ( $\text{DP} = -0.06 \pm 0.26$ ).

La Isc también se anuló al quitar el  $\text{Na}^+$  de la solución de incubación tisular ( $\text{Isc} = 0.42 \pm 3.83$ ).

La Gt no sufrió cambios considerables respecto al control ( $\text{Gt} = 18.91 \pm 2.75$ ).

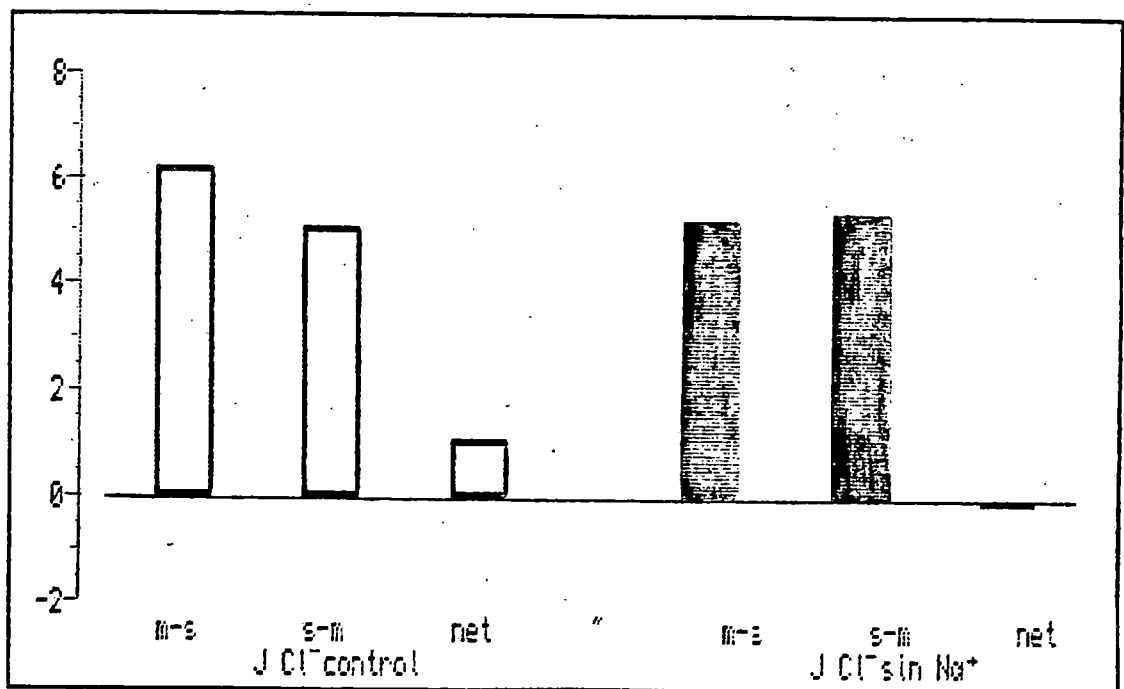
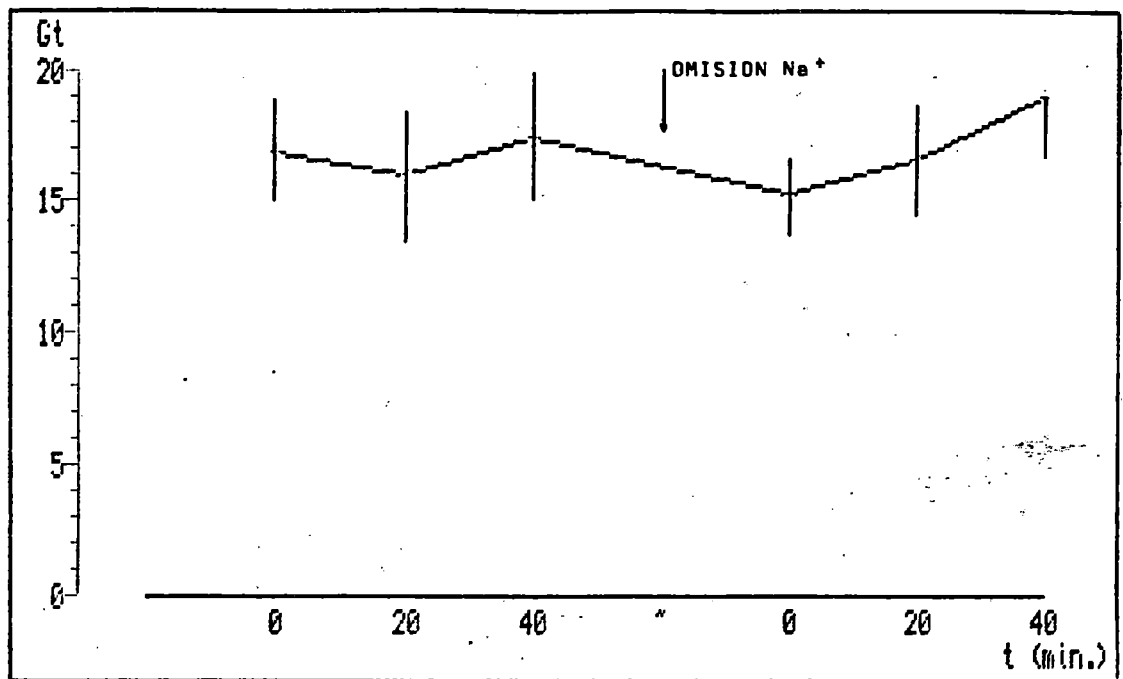
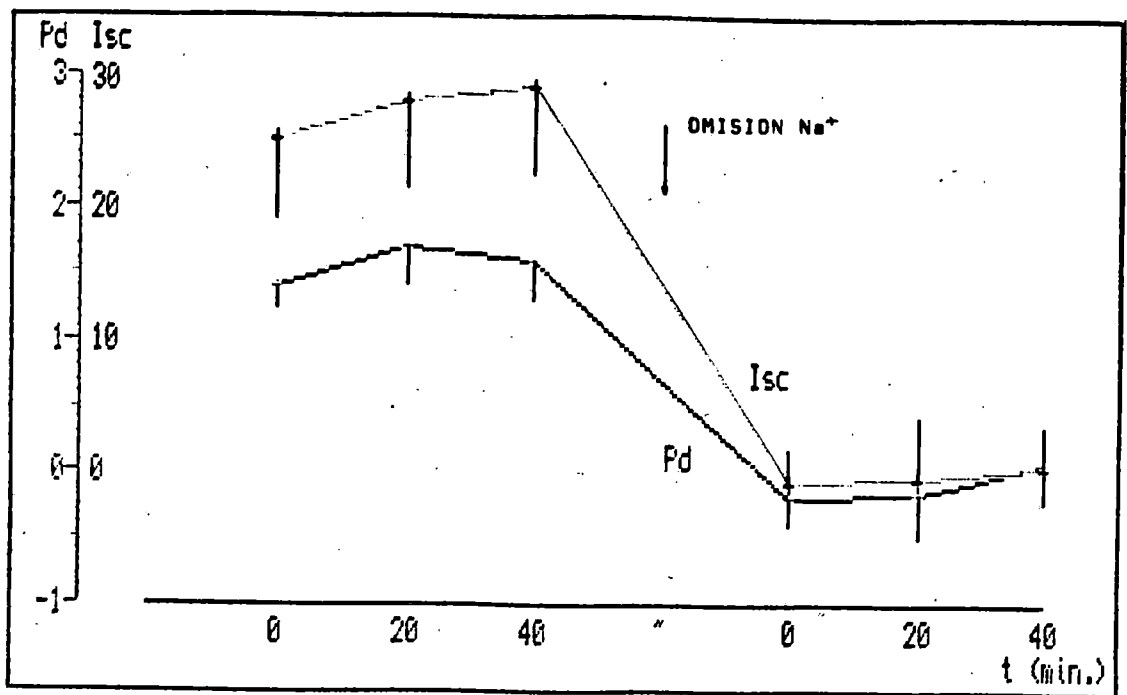
Los flujos unidireccionales de  $\text{Cl}^-$  fueron de  $5.30 \pm 0.11 \mu\text{eq}/\text{hcm}^2$  en sentido mucosa a serosa y  $5.39 \pm 0.54 \mu\text{eq}/\text{hcm}^2$  de serosa a mucosa, observandose una disminución del  $J_{\text{neto}}$  en aproximadamente una unidad. Ello nos da un flujo neto de  $\text{Cl}^-$  en ausencia del ión  $\text{Na}^+$  de  $-0.09 \pm 0.15 \mu\text{eq}/\text{hcm}^2$ , es decir muy próximo a cero. Ver tabla 3.

Tabla 3.- Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos de Cl<sup>-</sup> en ausencia de Na<sup>+</sup>. -

t	DP (mV)	Isc (μA/cm <sup>2</sup> h)	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )	n
0	1.42±0.25	25.73±6.13	16.84±2.74	13
20	1.72±0.30	28.69±7.51	16.03±2.53	13
40	1.68±0.29	29.79±7.65	17.45±2.86	13
0	-0.18±0.25	-0.81±3.04	15.31±1.85	13
20	-0.16±0.31	-3.24±5.61	16.55±2.14	13
40	-0.06±0.26***	0.42±3.83***	18.91±2.75	13

$J_{msCl^-} = 6.27 \pm 0.36$  (n=13)  
 $J_{smCl^-} = 5.11 \pm 0.47$  (n=13) Control  
 $J_{ntCl^-} = 1.16 \pm 0.16$  (n=13)

$J_{msCl^-} = 5.30 \pm 0.11 *$  (n=13)  
 $J_{smCl^-} = 5.39 \pm 0.54$  (n=13) Sin Na<sup>+</sup>  
 $J_{ntCl^-} = -0.09 \pm 0.15 ***$  (n=13)



4.4.- Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos en presencia de Amiloride en el lado mucosal.-

El duodeno de *Gallotia galloti* fue incubado en condiciones de cortocircuito y con solución Krebs-Ringer-Bicarbonato; una vez estabilizado el tejido y tras hacer un control de los parámetros eléctricos y flujos unidireccionales y netos de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ , se le añadió 0.2 ml. de una solución concentrada de Amiloride al lado mucosal, de manera que su concentración en los 4 ml. del pocillo fuera  $10^{-5}$  M. En el lado serosal, para no alterar la presión hidrostática se añadió 0.2 ml. de solución normal.

Los parámetros bioeléctricos DP, Isc y Gt no reflejaron cambios significativos con respecto al control (DP=2.50 mV; Isc=34.04  $\mu\text{A}/\text{hcm}^2$ ; Gt=13.93  $\text{mS}/\text{cm}^2$ ) (ver tabla 4).

En presencia del Amiloride el flujo neto de  $\text{Na}^+$  fue de  $1.15 \pm 0.15 \mu\text{eq}/\text{hcm}^2$ , reduciéndose en una unidad con respecto a su control, mientras que el flujo neto de  $\text{Cl}^-$  quedó prácticamente anulado, tomando el valor de  $0.07 \pm 0.17 \mu\text{eq}/\text{hcm}^2$ .

Tabla 4.- Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos en presencia de Amiloride en el lado mucosal.-

<i>t</i>	<i>DP</i> (mV)	<i>Isc</i> ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	<i>Gt</i> (mS/cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>
0	2.42±0.31	23.39±4.53	10.96±0.22	14
20	3.57±1.23	26.69±5.04	11.46±0.24	14
40	2.50±0.31	30.87±6.13	12.45±1.33	14
0	2.54±0.24	32.86±5.75	12.63±1.40	14
20	2.42±0.23	32.83±6.02	13.19±1.60	14
40	2.50±0.31	34.04±6.09	13.93±1.70	14

*JmsNa*<sup>+</sup> = 8.39 ± 0.55 (n=14)

*JsmNa*<sup>+</sup> = 6.25 ± 0.42 (n=14) Control

*JntNa*<sup>+</sup> = 2.14 ± 0.18 (n=14)

*JmsNa*<sup>+</sup> = 7.50 ± 0.49\*\* (n=14)

*JsmNa*<sup>+</sup> = 6.25 ± 0.30 (n=14) Amiloride

*JntNa*<sup>+</sup> = 1.15 ± 0.15\*\*\* (n=14)

*JmsCl*<sup>-</sup> = 9.31 ± 0.40 (n=14)

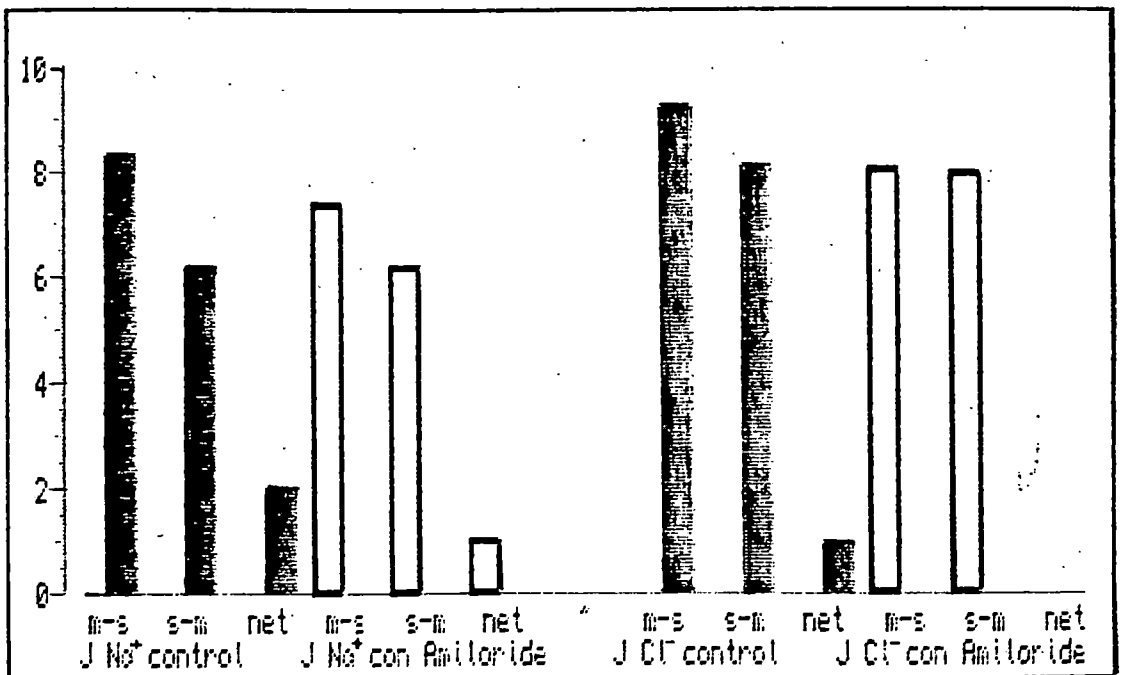
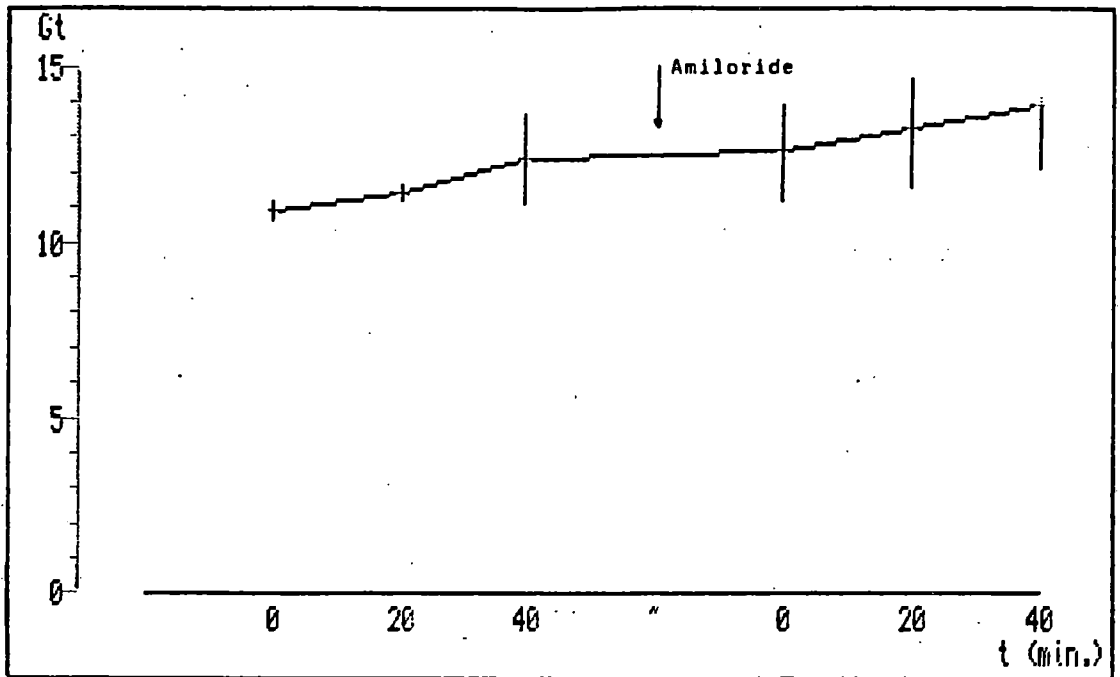
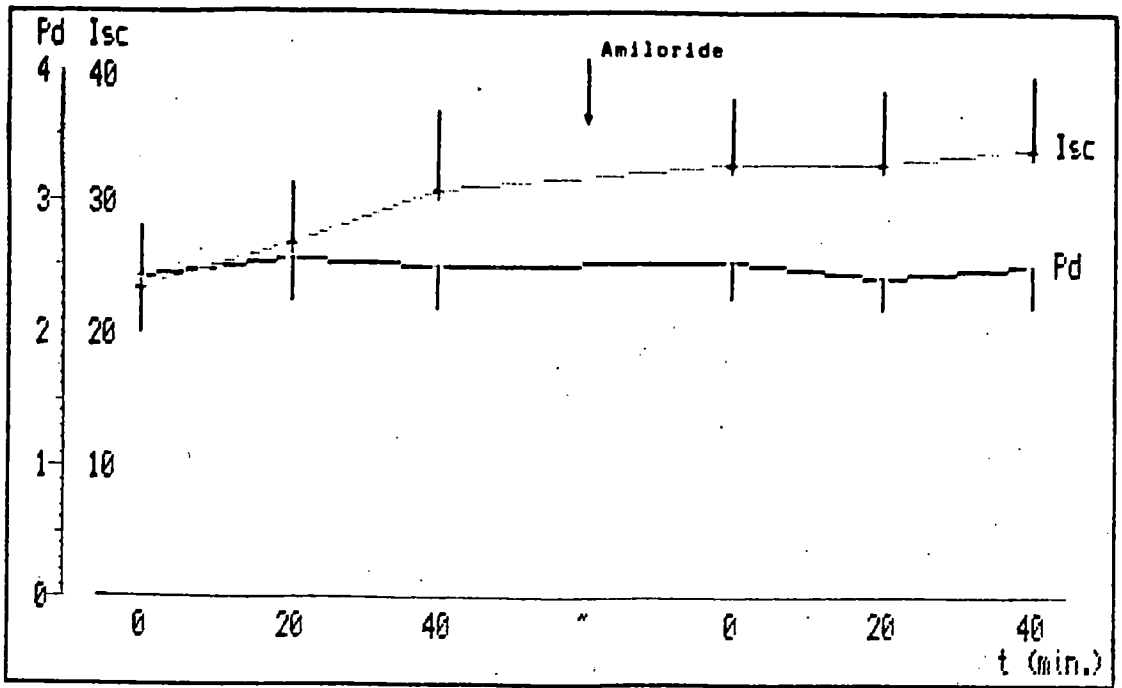
*JsmCl*<sup>-</sup> = 8.20 ± 0.60 (n=14) Control

*JntCl*<sup>-</sup> = 1.11 ± 0.19 (n=14)

*JmsCl*<sup>-</sup> = 8.10 ± 0.39\* (n=14)

*JsmCl*<sup>-</sup> = 8.03 ± 0.50 (n=14) Amiloride

*JntCl*<sup>-</sup> = 0.07 ± 0.17\*\*\* (n=14)



4.5.- Parámetros bioeléctricos y flujos de cloruro en presencia de DIDS en mucosa.-

Una vez estabilizado el tejido en condiciones de cortocircuito y medidos los parámetros eléctricos y flujos de cloruro en condiciones control añadimos al baño mucosal 0.2 ml. de una solución concentrada de DIDS, para obtener una concentración final de  $10^{-5}$  M en los 4 ml. del baño. Al baño serosal se le añadió 0.2 ml. de solución normal para mantener la presión hidrostática.

Bajo estas condiciones los valores obtenidos para la DP,  $I_{sc}$ , Gt y flujos de  $Cl^{-}$  fueron comparados con los controles.

La DP obtuvo un valor de  $2.4 \pm 0.19$  mV a  $t_0$  siendo de  $2.2 \pm 0.18$  mV a  $t_{40}$ , no difiriendo de los controles ( $p > 0.05$ ).

La  $I_{sc}$  tampoco varió a lo largo del experimento tomando valores de  $29.58 \mu A/cm^2 h$  ( $p > 0.05$ ).

Los valores para la conductancia tisular (Gt) se encontraron dentro de los obtenidos para el control:  $11.2 \pm 1.61$  mS/cm<sup>2</sup> a  $t_0$  y  $13.4 \pm 1.95$  a  $t_{40}$  ( $p > 0.05$ ). Estos valores se encuentran en la tabla 5 y figura 5.

Simultáneamente a la medición de los parámetros bioeléctricos, se tomaron muestras para la medición de los flujos de  $Cl^{-}$  en presencia de DIDS en mucosa. En estas condiciones se obtuvieron unos resultados de  $4.96 \pm 0.41 \mu eq/hcm^2$  en sentido mucosa a serosa y de  $4.78 \pm 0.79 \mu eq/hcm^2$  en sentido contrario (ver tabla 5 y figura 5) siendo el flujo neto próximo a cero ( $J_{neto Cl^{-}} = 0.18 \pm 0.30$ ).

Tabla 5.- Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos en presencia de DIDS en mucosa.-

<i>t</i>	<i>DF</i> (mV)	<i>Isc</i> ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2\text{h}$ )	<i>Gt</i> (mS/cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>
0	3.04±0.30	28.87±5.84	8.56±1.72	9
20	2.87±0.23	29.48±8.23	9.15±1.46	9
40	2.73±0.19	31.04±6.62	10.76±1.78	9
0	2.49±0.19	29.87±5.84	11.27±1.61	9
20	2.33±0.20	29.58±5.53	12.12±1.81	9
40	2.27±0.18	31.19±5.50	13.40±1.95	9

$J_{msCl^-} = 6.32 \pm 0.48$  (n=9)

$J_{smCl^-} = 5.02 \pm 0.89$  (n=9) Control

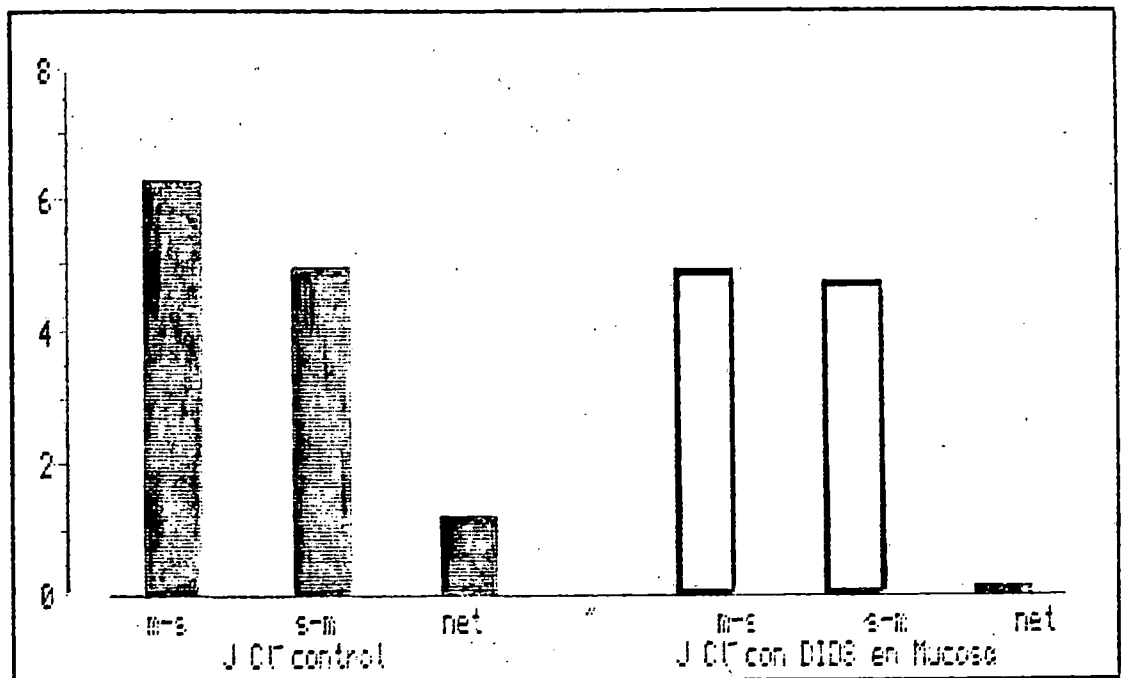
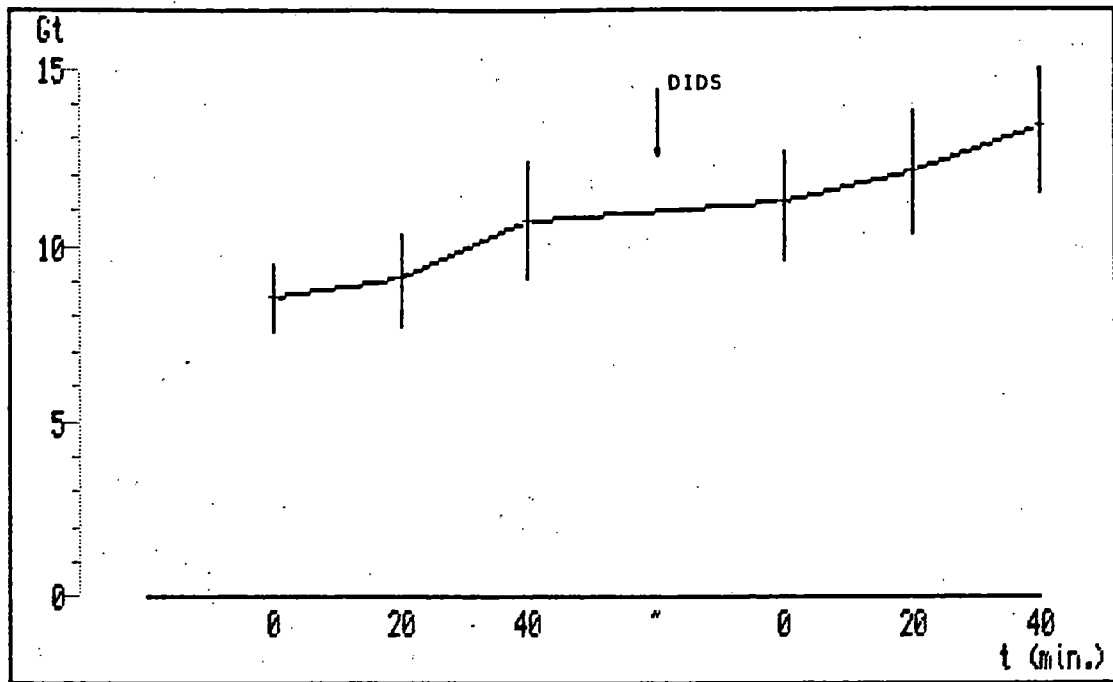
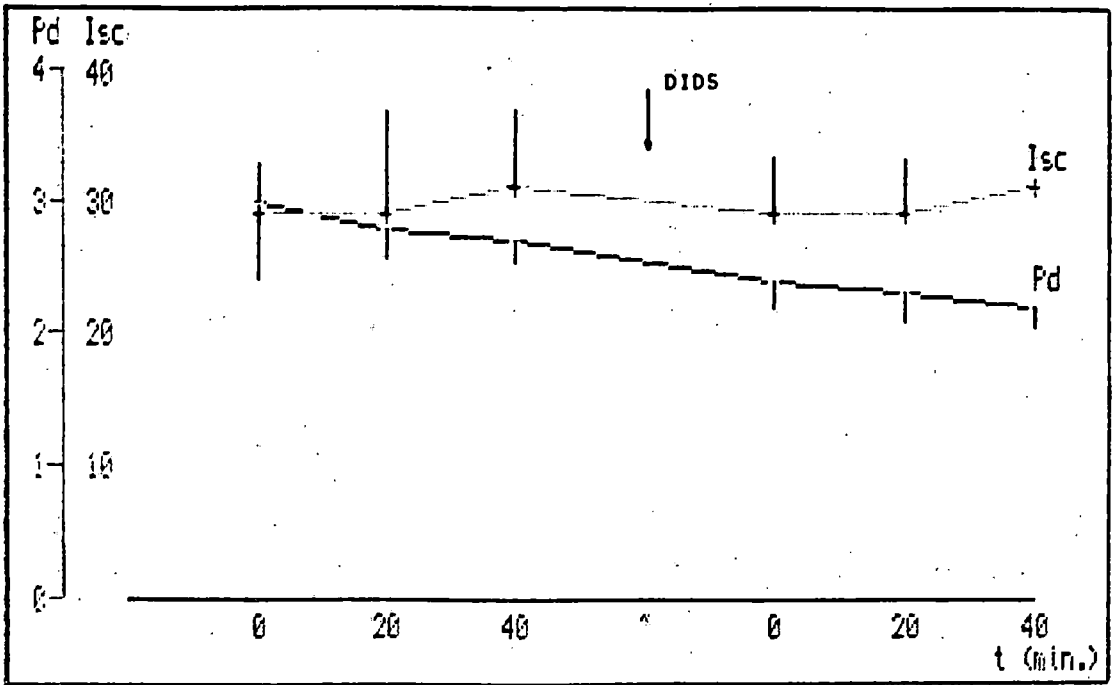
$J_{ntCl^-} = 1.30 \pm 0.34$  (n=9)

$J_{msCl^-} = 4.96 \pm 0.41^*$  (n=9)

$J_{smCl^-} = 4.78 \pm 0.79$  (n=9) DIDS mucosa

$J_{ntCl^-} = 0.18 \pm 0.30^*$  (n=9)





4.6.- Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos en presencia de DIDS en el lado serosal.-

Se procedió, como en el caso anterior, a añadir 0.2 ml. de solución concentrada de DIDS, de forma que la solución final fuese  $10^{-3}$  M en el lado serosal.

Los parámetros bioeléctricos fueron de  $1.59 \pm 0.28$  mV para la DP a  $t_0$  y de  $1.35 \pm 0.19$  mV a  $t_{40}$ . La  $I_{sc}$  tomó valores de  $30.33 \pm 5.18$   $\mu A/hcm^2$  a  $t_0$  y  $27.49 \pm 4.76$  a  $t_{40}$ ; y la  $G_t$  de  $21.56 \pm 2.05$   $mS/cm^2$  a  $t_{40}$ .

Ninguno de los parámetros anteriores difirió significativamente de los valores control ( $p > 0.05$ ).

Los flujos unidireccionales medidos para el  $Cl^-$  fueron de  $6.08 \pm 0.43$   $\mu eq/hcm^2$  de mucosa a serosa y de  $5.16 \pm 0.45$   $\mu eq/hcm^2$  de serosa a mucosa, dandonos un flujo neto de  $Cl^-$  en presencia de DIDS de  $0.91 \pm 0.20$   $\mu eq/hcm^2$ . Estos valores muestran que el DIDS no afectó el movimiento de cloruro a través del epitelio (ver tabla 6).

\* Tabla 6.- Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos en presencia de DIDS en el lado serosal.-

t	DP (mV)	Isc ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2\text{h}$ )	Gt ( $\text{mS}/\text{cm}^2$ )	n
0	1.53±0.34	23.00±4.63	16.20±1.77	9
20	1.81±0.31	28.59±5.29	16.82±1.62	9
40	1.58±0.30	27.49±4.76	19.05±1.82	9
0	1.59±0.28	30.33±5.18	20.16±2.05	9
20	1.39±0.24	28.32±4.27	21.21±2.08	9
40	1.35±0.19	27.49±4.76	21.56±2.20	9

$$J_{ms}\text{Cl}^- = 6.15 \pm 0.42 \quad (n=9)$$

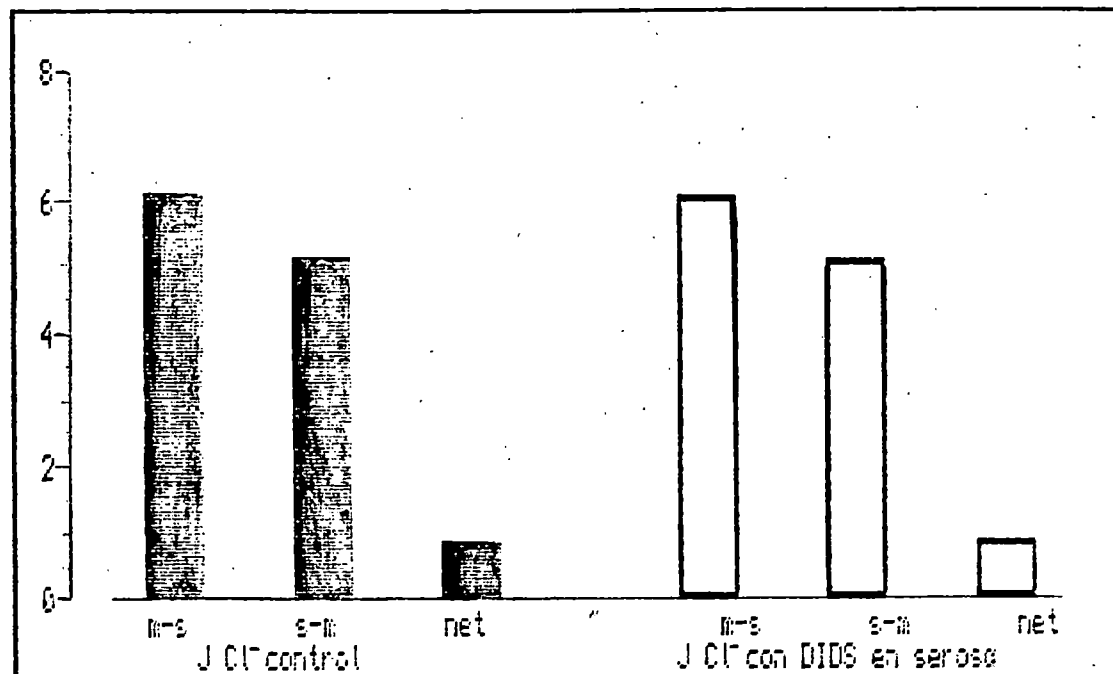
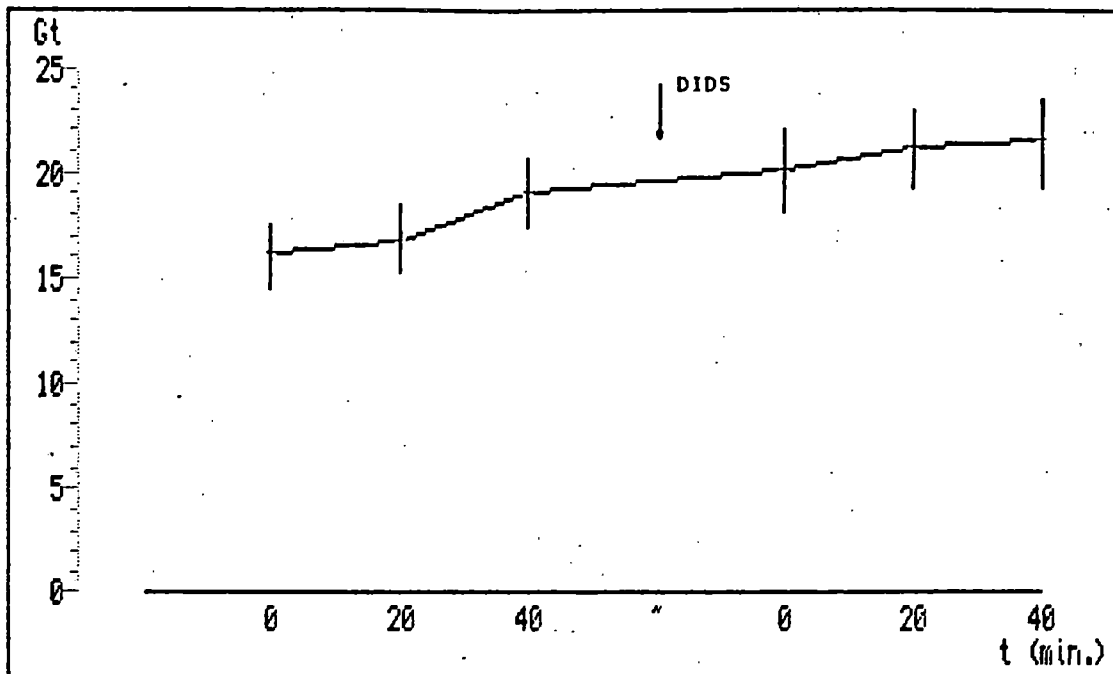
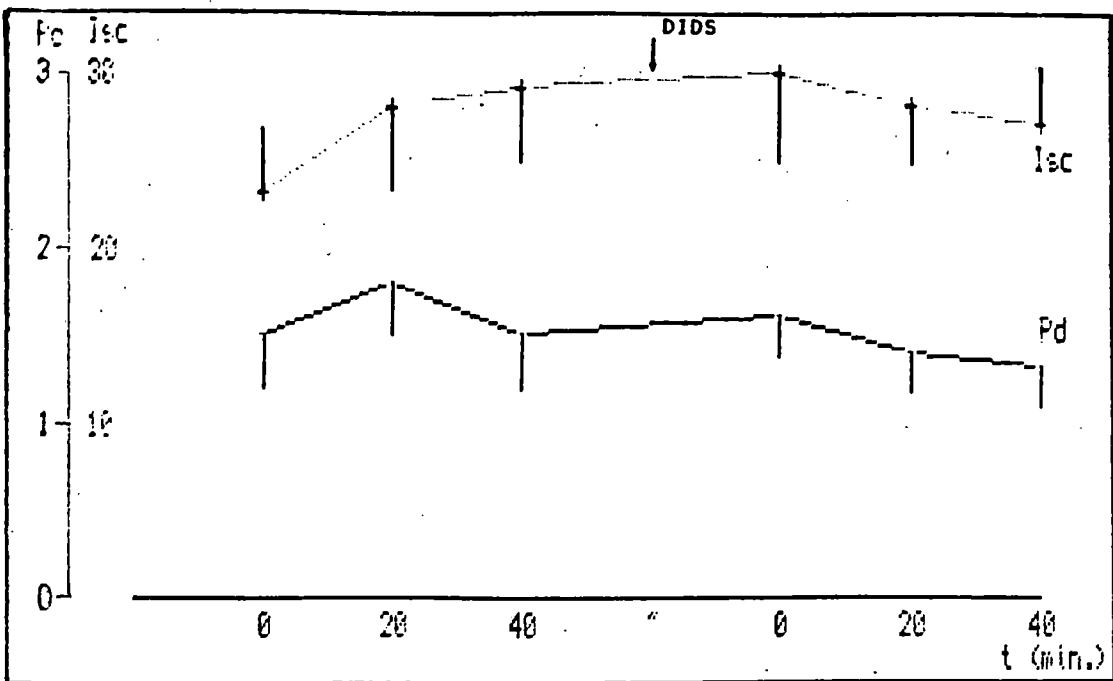
$$J_{sm}\text{Cl}^- = 5.20 \pm 0.63 \quad (n=9) \quad \text{Control}$$

$$J_{nt}\text{Cl}^- = 0.95 \pm 0.25 \quad (n=9)$$

$$J_{ms}\text{Cl}^- = 6.08 \pm 0.43 \quad (n=9)$$

$$J_{sm}\text{Cl}^- = 5.16 \pm 0.45 \quad (n=9) \quad \text{DIDS serosa}$$

$$J_{nt}\text{Cl}^- = 0.91 \pm 0.20 \quad (n=9)$$



4.7.- Parámetros bioeléctricos y flujos de Na<sup>+</sup> en presencia de Ouabaína.-

El duodeno fue incubado en solución Krebs-Ringer-Bicarbonato y cortocircuitado; una vez estabilizado el tejido y tras hacer un control de los parámetros bioeléctricos y flujos unidireccionales de Na<sup>+</sup>, se le añadió 0.2 ml. de una solución concentrada de Ouabaína al lado serosal, de manera que su concentración en los 4 ml. del pocillo fuera 10<sup>-6</sup> M. En el lado mucosal, para no alterar la presión hidrostática se añadió 0.2 ml. de solución normal.

Bajo estas condiciones los valores obtenidos para los parámetros bioeléctricos y flujos de Na<sup>+</sup> fueron comparados con los controles.

La DP registró valores muy próximos a cero, siendo de  $0.6 \pm 0.24$  a  $t_{40}$  ( $p > 0.01$ ).

Los valores de la Isc sufrieron también una disminución significativa con respecto al control, siendo de  $21.44 \pm 6.8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  a su inicio ( $t_0$ ) y de  $13.40 \pm 6.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  al final del experimento ( $t_{40}$ ) ( $p > 0.05$ ).

En el transcurso del experimento la Gt varió desde  $21.49 \pm 4.14 \text{ mS}/\text{cm}^2$  a  $t_0$  hasta  $25.5 \pm 5.29 \text{ mS}/\text{cm}^2$  para  $t_{40}$ , final del experimento.

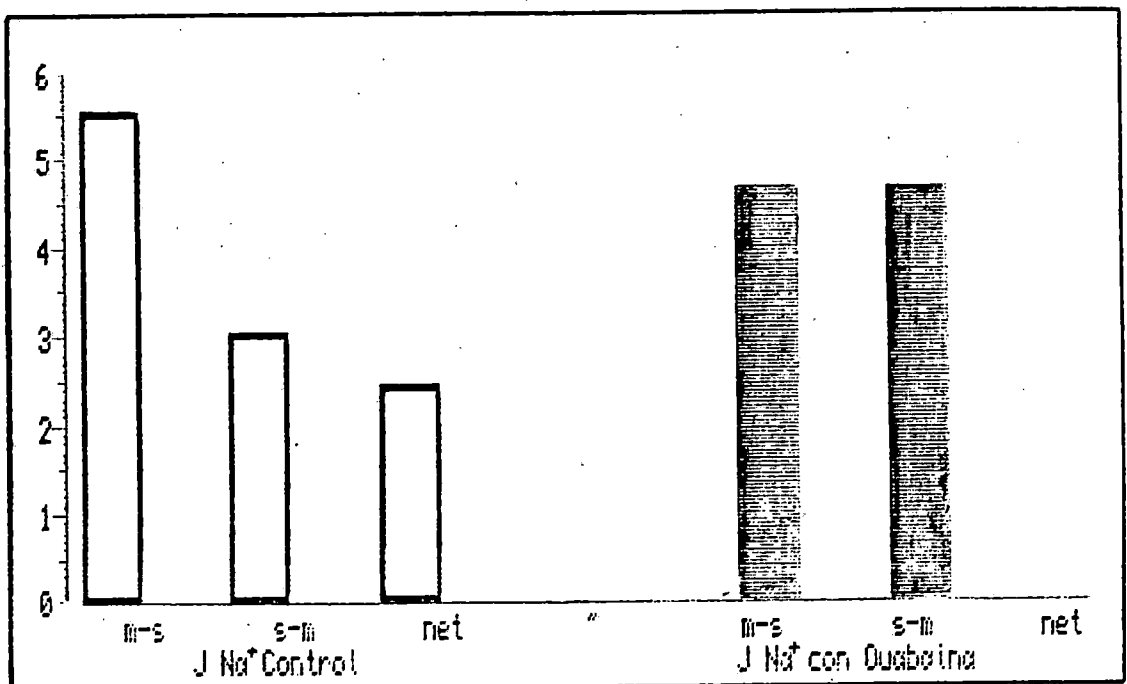
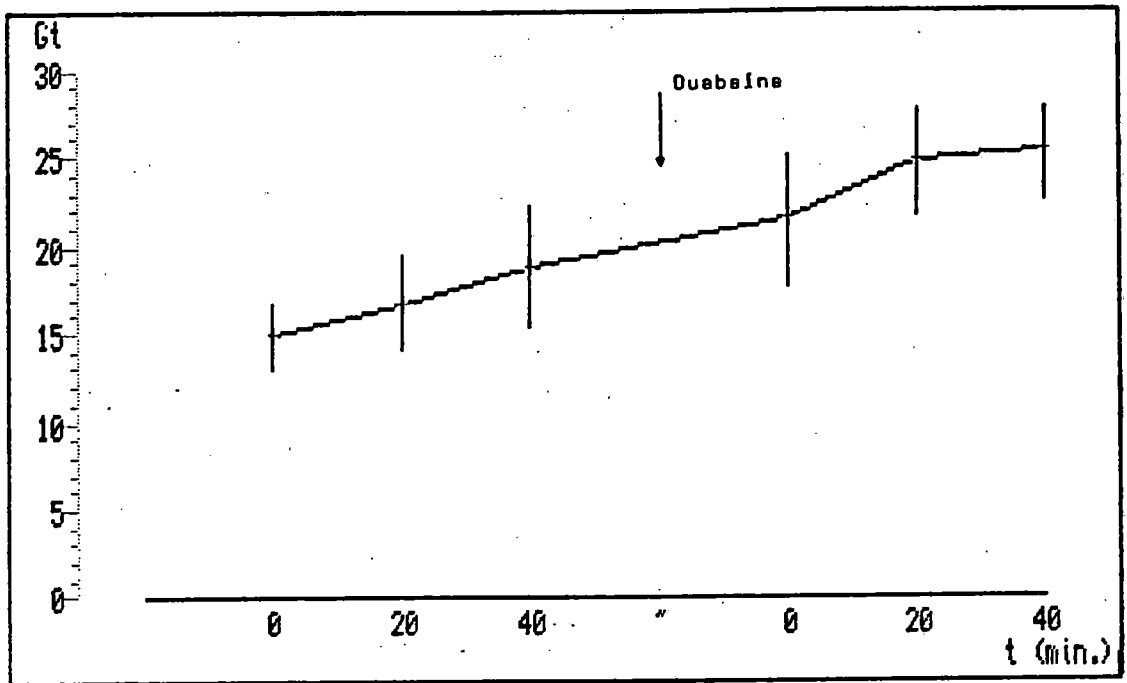
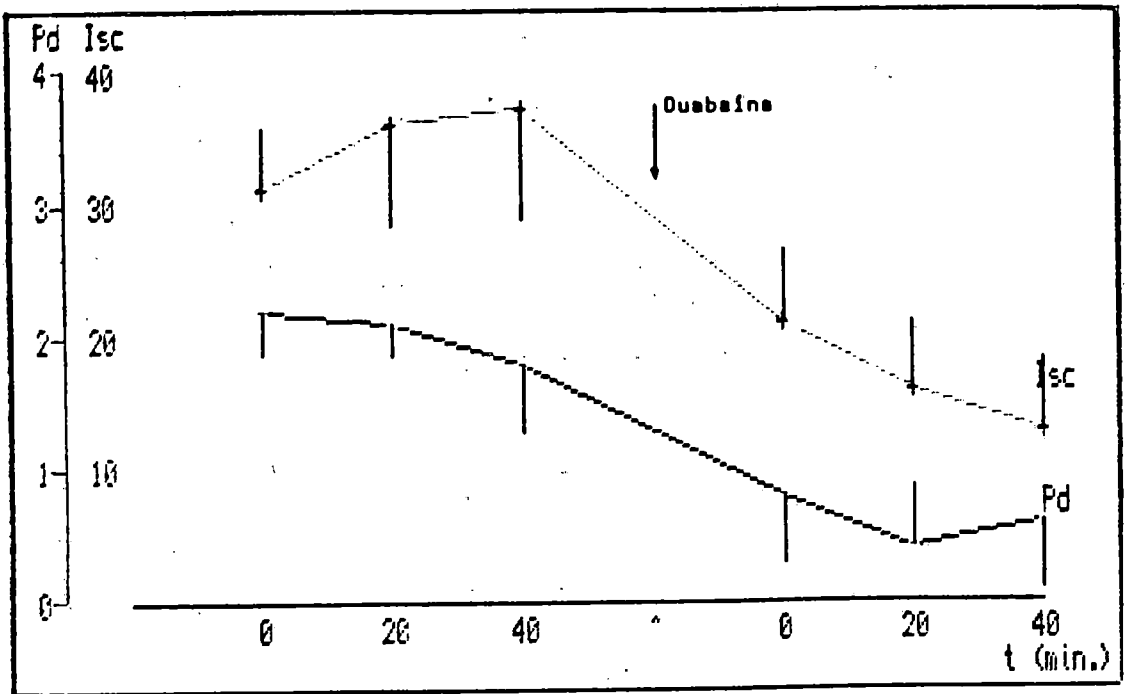
Los flujos unidireccionales para el Na<sup>+</sup> fueron cuantitativamente similares, anulándose el flujo neto de Na<sup>+</sup>  $J_{\text{netNa}^+} = 0.0 \pm 0.20 \mu\text{eq}/\text{hcm}^2$  ( $p > 0.001$ ). Ver tabla 7.

Tabla 7.- Parámetros bioeléctricos y flujos iónicos de Na<sup>+</sup> en presencia de Ouabaína.-

<i>t</i>	<i>DP</i> (mV)	<i>Isc</i> (μA/cm <sup>2</sup> h)	<i>Gt</i> (mS/cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>
0	2.19±0.30	30.95±5.63	15.08±2.45	11
20	2.13±0.26	36.59±8.08	16.85±2.95	11
40	1.81±0.55	37.69±8.31	18.91±3.40	11
0	0.8±0.51	21.44±6.86	21.49±4.14	11
20	0.2±0.59	16.08±6.32	24.69±5.37	11
40	0.6±0.57**	13.40±6.63*	25.55±5.29	11

$J_{msNa^+} = 5.6 \pm 0.40$  (n=11)  
 $J_{smNa^+} = 3.1 \pm 0.61$  (n=11) Control  
 $J_{ntNa^+} = 2.5 \pm 0.21$  (n=11)

$J_{msNa^+} = 4.7 \pm 0.50^{**}$  (n=11)  
 $J_{smNa^+} = 4.7 \pm 0.45^*$  (n=11) Ouabaína  
 $J_{ntNa^+} = 0.0 \pm 0.20^{***}$  (n=11)



5. - DISCUSION





## 5.- DISCUSION

### 5.1.- Parámetros bioeléctricos.-

Los parámetros bioeléctricos a través de tejidos nos permite caracterizarlos en epitelios "tight" o "leaky". Los epitelios denominados "tight" como la vejiga urinaria, colon de tortuga y piel de anfibios exhiben grandes  $DP$  y  $R_t$ , así como una escasa permeabilidad pasiva a iones pequeños. Los epitelios conocidos como "leaky", entre los que se encuentran el intestino delgado, la vesícula biliar y tubulo proximal renal de mamíferos, se caracterizan por presentar una  $DP$  e  $I_{sc}$  muy próximas a cero, pero poseen una alta conductancia o baja resistencia al paso de los electrolitos y al agua (SCHULTZ 1977). Otros órganos cuyos epitelios son considerados moderadamente "tight" como el colon proximal y tubulo renal distal de mamíferos son capaces de mantener  $DP$  discretas y pequeñas diferencias en la composición iónica a ambos lados del tejido.

De acuerdo con FROMTÈR y DIAMOND (1972) los epitelios que muestran  $R_t$  superiores a  $500 \Omega/\text{cm}^2$  deben considerarse como "tight", mientras que aquellos en los que la  $R_t$  es inferior a éste valor pueden considerarse epitelios "leaky". Sin embargo, actualmente se reserva el término "leaky" para epitelios cuya resistencia tisular es menor de  $100 \Omega/\text{cm}^2$  (SCHULTZ 1981b).

Nuestros resultados presentan que los parámetros bioeléctricos, una vez alcanzado el estado estacionario, muestran una  $DP$  transmural de  $2.2 \text{ mV}$ , mientras que la  $I_{sc}$  media necesaria para anularla fue de  $31 \mu\text{A}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ . Por otro lado, la conductancia tisular

permaneció elevada en todo el período de corto-circuito, alrededor de  $14 \text{ mS/cm}^2$ .

De estos resultados podemos deducir que el duodeno de Gallotia galloti se comporta como un epitelio altamente permeable, por lo que se puede considerar un epitelio "leaky", al igual que el intestino delgado de mamíferos y aves (GRUBB 1987).

#### 5.2.- Flujos iónicos.

Las medidas de los flujos unidireccionales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en Gallotia galloti fueron realizadas a partir del periodo de cortocircuito, en el que se había adquirido la estabilidad eléctrica.

La diferencia entre el flujo en sentido mucosa a serosa y el flujo serosa a mucosa nos dió el valor del flujo neto que fue de  $2.29 \mu\text{eq/cm}^2 \cdot \text{h}$  para el ión  $\text{Na}^+$  y de  $1.16 \mu\text{eq/cm}^2 \cdot \text{h}$  para el  $\text{Cl}^-$ . Estos flujos netos obtenidos muestran una relación estequiométrica de 2:1, sodio y cloruro respectivamente; dadas las condiciones de corto-circuito, éste movimiento iónico es obligatoriamente activo. Estos resultados difieren de aquellos descritos para epitelios "leaky", en los cuales en estado estacionario el flujo de sodio es igual al flujo de cloruro sin error experimental (BAERENTSEN y col. 1983; WEINMAN y REUS 1984).

Por otro lado, el hecho que el transporte neto de  $\text{Na}^+$  fuese el doble que el de  $\text{Cl}^-$  nos hizo suponer que el transporte de  $\text{Na}^+$  no se encuentra totalmente acoplado al  $\text{Cl}^-$ . Por otra parte, como la  $I_{sc}$  no se corresponde con el flujo neto de  $\text{Na}^+$ , tampoco podríamos pensar en un transporte de  $\text{Na}^+$  electrogénico, independiente por completo de la presencia de  $\text{Cl}^-$ . A partir de esto, se

deduce que probablemente el transporte de  $\text{Na}^+$  se realizaría de un lado acoplada al  $\text{Cl}^-$  y de otro por un mecanismo independiente.

El hecho de que el flujo residual calculado en las experiencias anteriores no difiera significativamente de  $0 \mu\text{eq}/\text{cm}^2.\text{h}$  nos permite suponer que la  $I_{sc}$  encontrada en los controles, es debida al movimiento del ión  $\text{Na}^+$ , y por tanto, de existir movimiento a través del tejido de otros electrolitos adicionales, no medidos por nosotros, éstos ocurren de forma electricamente neutra.

### 5.3.-Efecto de la omisión del ión $\text{Na}^+$ y $\text{Cl}^-$ de las soluciones de baño.-

Para comprobar la dependencia de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en sus mecanismos de transporte, se realizaron series de experimentos en los cuales la solución utilizada carecía del ión  $\text{Na}^+$  o del  $\text{Cl}^-$  (ver soluciones de trabajo). Transcurrido el tiempo necesario para las determinaciones control de los parámetros bioeléctricos y flujos iónicos, las soluciones eran sustituidas por aquellas carente del ión en cuestión.

Así cuando fué sustituido el ión  $\text{Cl}^-$  por isocianato (tabla 2) el flujo de mucosa a serosa y neto de  $\text{Na}^+$  fueron significativamente reducidos, casi en un 50%; mientras que los parámetros bioeléctricos no se vieron afectados.

Cuando fué el ión  $\text{Na}^+$  el que sustituíamos por colina, el flujo de mucosa a serosa de  $\text{Cl}^-$  fué reducido significativamente siendo dicha reducción similar a la sufrida por el ión  $\text{Na}^+$  en el sentido mucosa a serosa cuando estaba ausente el  $\text{Cl}^-$ .

La  $I_{sc}$  y  $DP$  en ausencia del ión  $Na^+$  sufrieron una reducción drástica, tomando valores negativos próximos a cero. La  $Gt$  no sufrió cambios ( tabla 3 ).

A la vista de éstos resultados podríamos afirmar que tal como suponíamos, el ión sodio se transporta por dos mecanismos a través de éste epitelio: uno independiente y electrogénico, el cual es responsable de la  $I_{sc}$  y  $DP$  a través del tejido; y otro electroneutral, acoplado al cloruro. Estos resultados concuerdan con los descritos por BADIA y col. (1987) para el ileon de éste mismo animal, pero difieren de otros epitelios "leaky" en que aquellos no presenta un transporte electrogénico de  $Na^+$ .

#### 5.4.-Efecto de la adición de inhibidores en el duodeno de Gallotia galloti.-

Los resultados encontrados en el ileon de conejo y de rata muestran que el transporte de  $Na^+$  y  $Cl^-$  a nivel del borde en cepillo se realiza por un mecanismo de cotransporte (FIELD y col. 1971; NELLANS y col. 1974). Este transporte es electroneutral y las bases de su mecanismo han sido explicadas de dos maneras diferentes; NELLANS (1973) sugiere un sistema de cotransporte directo entre el sodio y el cloruro; mientras que TURNBERG y col. (1977) establecen que se lleva a cabo por la existencia de un doble intercambio  $Na^+/H^+$  y  $Cl^-/HCO_3^-$ .

Al omitir los iones  $Na^+$  y  $Cl^-$  de las soluciones del baño, los resultados nos sugieren cierto acople entre dichos iones, por ello y con el fin de distinguir si se trata de un transporte  $Cl^-/Na^+$  o de un doble intercambio  $Cl^-/CO_3H^-$  y  $Na^+/H^+$  realizamos una

serie de experimentos en los que se añadían en la solución del baño, inhibidores específicos del antiporte  $\text{Cl}^-/\text{CO}_3\text{H}^-$  y  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

Cuando se añadió Amiloride a la solución de baño mucosal, diurético que bloquea el transporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (ARONSON 1984; DRÉNOWSKA y BIBER 1985) e inhibe los canales de sodio en la membrana apical de los epitelios "tight" (FRIZZELL y col. 1976), se anuló el flujo neto de  $\text{Cl}^-$  (Tabla 4) y se redujo el flujo neto de sodio a casi la mitad que el control, por reducción del flujo de mucosa a serosa. La  $\text{DP}$  e  $\text{Isc}$  no fueron significativamente reducidas. Estos resultados sugiere que el Amiloride bloquea el antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  alterando el pH intracelular, esto anularía la formación de  $\text{H}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  e inhibiría los sistemas de transporte  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . El Amiloride no bloqueó el transporte electrogénico de sodio puesto que la  $\text{Isc}$  no varió y la reducción del flujo neto de sodio fue similar a la reducción sufrida por el cloruro.

El hecho de que al adicionar Amiloride al medio de incubación afectara al antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  inhibiendo el flujo neto de  $\text{Na}^+$  y anulando el flujo neto de  $\text{Cl}^-$ , nos hizo pensar que el mecanismo responsable de la entrada de  $\text{Cl}^-$  en la célula debería ser también electroneutral acoplado al bicarbonato como se cita en la bibliografía. Por otro lado, el Amiloride no afectó la  $\text{Isc}$ . Este efecto del Amiloride contrasta con aquellos descritos para epitelios "tight" en los cuales la adición de Amiloride anula la  $\text{Isc}$  y el flujo neto de sodio (FRIZZELL y col. 1976). La razón de esto no está aclarada por el momento, pero nosotros pensamos que no depende de la dosis de Amiloride empleada ya que

estudios previos hechos en nuestro laboratorio ( enviados para su publicación ) empleando diferentes dosis de Amiloride mostraron que ninguna dosis alteró la Isc. Por otro lado, la acción del Amiloride en algunos epitelios "leaky" no está clara. Estudios hechos en el caecum y parte proximal del colon de conejo (CLAUSS y col. 1985) muestran que estos epitelios son "leaky" y que la acción del Amiloride fue incompleta. En estudios previos nosotros hemos mostrado que la acción del Amiloride en epitelios "leaky" puede ser diferente de aquella en epitelios "tight" (BADIA y col enviado para publicar).

La adición de DIDS nos permitiría comprobar si en realidad existe el hipotético intercambio  $Cl^-/HCO_3^-$ .

El DIDS se ha descrito como un potente inhibidor del intercambio  $Cl^-/HCO_3^-$  en globulos rojos (CABANTCHIK y ROTHSTEIN 1972), en vesículas del borde en cepillo ( LIEDTKE y HOPFER 1982b) y en otros tipos de células como en fibras musculares (BORON y col 1978). Cuando el DIDS fue añadido a la solución de baño mucosal, los efectos obtenidos fueron similares a los obtenidos con el tratamiento de Amiloride. El flujo neto de cloruro fue anulado. Los parámetros bioeléctricos no se vieron afectados significativamente al añadir el DIDS en el lado mucosal, por lo tanto podríamos decir que se trata de un transporte electroneutral.

Como el DIDS es un inhibidor del mecanismo  $Cl^-/HCO_3^-$  estos resultados soportan la hipótesis que el mecanismo de transporte del  $ClNa$  a través del duodeno del lagarto Gallotia galloti es vía doble intercambio  $Na^+/H^+$  y  $Cl^-/HCO_3^-$ , de manera similar al modelo propuesto para el íleon humano (TURNBERG y col. 1970) e intestino delgado de rata (LIEDTKE y HOPFER 1982b).

La presencia del DIDS en el baño serosal no redujo el flujo de  $\text{Cl}^-$  de mucosa a serosa, ni el flujo neto. Esto nos indica que la salida del  $\text{Cl}^-$  a través de la membrana basolateral no es vía un intercambio  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , sino que podría ser por el gradiente electroquímico.

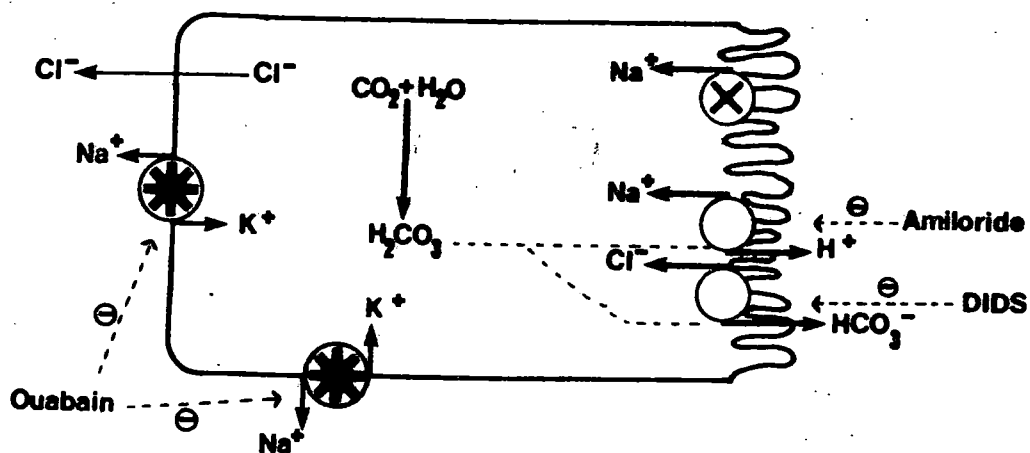
La energía para entrar  $\text{ClNa}$  deriva de dos fuerzas: la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que sigue una gran energía potencial para contener el gradiente de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana; y de los gradientes de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{H}^+$  por la producción de  $\text{H}_2\text{CO}_3$  en el interior de la célula.

Si la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  es bloqueada por la Ouabaina, entonces todos los mecanismos de transporte de  $\text{ClNa}$  serían bloqueados, puesto que al bloquear la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  se induciría un incremento en la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular y un bloqueo del transporte electrogénico de  $\text{Na}^+$  y de los antiportes  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ .

Los resultados obtenidos al añadir Ouabaina al lado serosal (Tabla 7) indican claramente que el transporte de sodio depende de la actividad ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

5.5.- Modelo hipotético para la absorción de los iones sodio y cloruro en el duodeno de Gallotia galloti.-

A la vista de los resultados obtenidos tras la experimentación, creemos poder establecer un modelo que explique la absorción de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a través de la pared del duodeno de Gallotia galloti.



Según se indica en la figura, existe dos transportadores para el ión sodio: uno independiente y eletrogénico responsable de la diferencia de potencial transmural; y otro transportador que intercambia el ión sodio por protones y por tanto electroneutral. Para el ión cloruro pensamos la existencia de un antiporte  $\text{Cl}^-/\text{CO}_3\text{H}^-$  electroneutral también.

La adición de inhibidores específicos de los antiportes  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-/\text{CO}_3\text{H}^-$  apoyan éste modelo.



La adición de Amiloride al medio de incubación disminuye el flujo de  $\text{Na}^+$  en sentido mucosa a serosa, implicando la reducción del flujo neto de dicho ión. Los parámetros bioeléctricos no sufrieron cambios al no afectarse el transporte electrogénico. El flujo neto de cloruro es anulado ya que el Amiloride bloquea el antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , anulándose la formación de  $\text{H}^+$  y  $\text{CO}_3\text{H}^-$  por tanto inhibiendo los transportes  $\text{Cl}^-/\text{CO}_3\text{H}^-$  y  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

La adición de DIDS en el lado mucosal nos inhibe el antiporte  $\text{Cl}^-/\text{CO}_3\text{H}^-$ , anulando el flujo neto del ión cloruro, sin que se afectaran los parámetros bioeléctricos.

Por otro lado, la omisión de los iones sodio y cloruro de las soluciones de incubación nos da resultados compatibles con el modelo. La omisión del ión  $\text{Cl}^-$  de la solución del baño no alteró los parámetros bioeléctricos, pero sí redujo el flujo neto del ión  $\text{Na}^+$  por reducción del flujo en sentido mucosa a serosa. En cambio, la omisión del ión  $\text{Na}^+$  de la solución de incubación, sí afectó los parámetros bioeléctricos, así como el flujo neto de cloruro que se vió anulado.

La bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , situada en la membrana basolateral es la responsable de la expulsión del sodio desde el interior de la célula a los espacios intercelulares. Esta bomba es la que mantiene baja la actividad del sodio en el interior celular.

La salida de  $\text{Cl}^-$  por la membrana basolateral se ve favorecida por la existencia de un gradiente

electroquímico, y de existir un transportador no sería del tipo  $Cl^-/CO_3H^-$ , según los resultados obtenidos al adicionar DIDS en el lado serosal.

## 6. - CONCLUSIONES

## 6. - CONCLUSIONES

Como conclusión de nuestro trabajo hemos establecido un modelo de transporte iónico para el duodeno del lagarto Gallotia galloti, que se caracteriza por:

1.- El epitelio duodenal del lagarto es un epitelio "leaky", altamente permeable que exhibe una ligera positividad de la serosa frente a la mucosa.

2.- La entrada de  $\text{Na}^+$  a través del borde apical se realiza mediante dos sistemas, uno de ellos electrogénico e independiente, el otro mediante un antiporte que intercambia  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$ .

3.- La entrada de  $\text{Cl}^-$  se realiza en intercambio por  $\text{CO}_3\text{H}^-$ .

4.- Los intercambios  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-/\text{CO}_3\text{H}^-$  son sensibles respectivamente al Amiloride y al DIDS.

5.- El  $\text{Na}^+$  es expulsado por la membrana basolateral por una bomba sensible a la Ouabaína.

7. - BIBLIOGRAFIA

## 7. - BIBLIOGRAFIA

- AMAT C., PLANAS J.M., DIEZ A. and MORETO M. (1986).  
Transmural potential difference and short circuit current of chicken cecum in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 85A n 3 pp 407-409.
- ANDO M. (1981) Effect of ouabain on chloride movements across the sea-water eel intestine. *J. Comp. Physiol. B* 138: 87-91.
- ARMSTRONG W. McD., BIEKMAN W.R., FREY K.F., GARCIA-DIAZ J.L., O'REGAN M.G. OWENS J.L. (1979). Energetics of coupled Na and Cl entry into epithelial cells of bullfrog small intestine. *Comp. Biochim. Biophys. Acta* 551:207-219.
- BADIA F., GOMEZ T., DIAZ M., LORENZO A. (1987). Mechanisms of transport of Na and Cl in the lizard colon. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A: 883-887.
- BADIA F., LORENZO A., GOMEZ T., BOLAOS A. (1987). Sodium chloride absorption across the ileal epithelia of the lizard Gallotia galloti. *J. Comp. Physiol. B* ( in press).
- BAERENTSEN H.J., GIRALDEZ F., ZEUTHEN T. (1983). Influx mechanisms for Na and Cl across the brush border membrane of leaky epithelia: a model

and microelectrode study. *J. Membr. Biol.*  
75: 205-218.

BARTON J.C. (1984). Active transport of lead-210 by  
everted segments of rat duodenum. *Amer.*  
*Physiol. Socit.* G193-G198.

BENOS D.J. (1982). Amiloride: A molecular probe of  
sodium transport in tissues and cells. *Am.*  
*J. Physiol.* 242: C131-C145.

BENTLEY P.J. AND BRADSHAW S.D. (1972). Electrical  
potential difference across cloaca and colon  
of the Australian lizards *Amphibolorus*  
*ornatus* and *A. inermis*. *Comp. Biochem.*  
*Physiol.* 42A: 465-471.

BOLAOS A. AND LORENZO A. (1984). Transmural potential  
differences and short-circuit current  
intensity in the posterior intestine of  
*Blennis parvicornis* *Rev. Esp. Fisol.* 40,  
117-122.

BORON W.R., RUSSELL J.M. BRODWICK M.S. (1978). Influence  
of cyclic AMP on intracellular pH regulation  
and chloride fluxes in barnacle muscle  
fibres. *Nature (London)* 276: 511-513.

CABANTCHIK Z.I., ROTHSTEIN A. (1972). The nature of the  
membrane sites controlling anion  
permeability of human red blood cells as  
determined by studies with disulfonic  
stilbene derivatives. *J. Membr. Biol.* 10:

311-330.

- CLAUSS W., SCHAFER H., HORCH I., HORNICKE M. (1985).  
Segmental differences in electrical properties and Na-transport of rabbit caecum, proximal and distal colon in vitro. *Pflugers Arch.* 403:278-282.
- CREMASCHI D., HENIN S. (1975). Na and Cl transepithelial routes in rabbit gallbladder. *Pflugers Arch* 361:33-41.
- CURRAN P.F. AND SCHULTZ S.G. (1968). Transport across membranes: general principles. In "Handbook of Physiology: alimentary canal. Washington, D.C. Am. Physiol. Soc. sect 6 vol III.
- DIAMOND J.M. (1962). The absorptive function of the gallbladder. *J. Physiol. (London)* 161: 442-473.
- DIAMOND J.M. (1968). Transport mechanism in the gallbladder. In "Handbook of Physiology: alimentary canal. Vol 5. 2451-2482 pp. Washington Am. Physiol. Soc.
- DREWNOWSKA K. AND BIBER T.V.L. (1985). Active transport and exchange diffusion of Cl across the isolate skin of *Rana pipiens*.
- DUFFEY M.E., TURNHEIM K., FRIZZELL A., SCHULTZ S.G. (1978). Intracellular chloride activities in rabbit gallbladder: direct evidence for the



role of the sodium-gradient in energizing "uphill" chloride transport. *J. Membr. Biol.* 42: 229-245.

DUFFEY M.E., THOMPSON S.M., FRIZZELL R.A. SCHULTZ S.G. (1979). Intracellular chloride activities and active chloride absorption in the intestinal epithelium of the winter flounder. *J. Membr. Biol.* 50: 331-341.

EHRENSPECK G. BRODSKY W.A. (1976). Effects of 4,acetamido-4-isothiocyano-2,2- disulfonic stilbene on ion transport in turtle bladder. *Biochim. Biophys. Acta.* 419: 555-558.

ERICSON A.C. SPRING K.R. (1982a) Coupled NaCl entry into *Necturus* gallbladder epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 243:C140-C145.

FIELD M. FROMM D., McCOLL I. (1971) Ion transport in rabbit ileal mucosa. I. Na and Cl fluxes and short-circuit current. *Am. J. Physiol.* 220: 1388-1396.

FIELD M. (1978) Some speculations on the coupling between sodium and chloride transport processes in mammalian and teleost intestine. In: *Membrane Transport Processes.* J. Hoffmann, editor. Vol. 1, pp 277-292. Raven Press, New York.

HEINTZE (1979). Effects of bicarbonate on fluid and electrolyte transport by guinea pig gallbladder. *J. Membr. Biol.* 45; 43.

HEYLINGS J. R., SHAMSON S. E., AND GARNER A. (1985). Endogenous E-type prostaglandins in regulation of basal alkaline secretion by amphibian duodenum in vitro. *Gastroenterology* 88: 290-4.

HILL R. W., (1980). *Fisiología Animal Comparada*. Ed. Reverte S. A. Barcelona.

KOEFOD-JØRNSSEN AND USSING M. H. (1958). The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol. Scand.* 42: 298-308.

KINNE R. AND KINNE-SAFFRAN E. (1978). Differentiation of cell faces in epithelia. In: *Molecular Specialization and Symmetry in Membrane Function*, Edit. by A. K. Solomon and M. Karnosky pp 272-293.

LIEDTKE C. M. AND HOPFER U. (1977). Anion transport in brush border vesicles from rat small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 579-585.

LIEDTKE C. M. AND HOPFER U. (1982a). Mechanism of Cl<sup>-</sup> translocation across small intestinal brush border membrane. I. Absence of Na-Cl cotransport. *Am. J. Physiol.* 242: G263-G271.

LIEDTKE C. M. AND HOPFER U. (1982b). Mechanism of Cl<sup>-</sup>

translocation across small intestinal brush border membrane. II. Demonstration of Cl-Oh exchange and Cl conductance. *Am. J. Physiol.* 242: G272-G280.

MUNCH B.G. AND SCHULTZ S.G. (1974). Properties of the passive conductance pathway across "in vitro" rat jejunum. *J. Membr. Biol.* 16: 163.

MURER H., HOPFER U., KINNE-SAFFRAN E. AND KINNE E. (1974). Glucose transport in isolated brush border and lateral basal plasma membrane vesicle from intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Acta* 345:170-179.

MURER H., HOPFER U., KINNE E. (1976). Sodium/proton antiport in brush border membrane vesicles isolated from rat intestine and kidney. *Biochem. J.* 154: 597-604.

NELLAS H.N., FRIZZELL R.A., SCHULTZ S.G. (1973). Coupled sodium-chloride influx across the brush border of rabbit ileum. *Am. J. Physiol.* 225: 467-475.

NELLAS H.N., FRIZZELL R.A., SCHULTZ S.G. (1974). Brush border processes and transepithelial Na and Cl transport by rabbit ileum. *Am. J. Physiol.* 226: 1131-1141.

OIDE M. (1967). Effects of inhibitors on transport of water and Ion in isolated intestine and Na-K ATPase in intestinal mucosa of the eel. Published Institute, Tokyo University.

- RAMOS M.M.P., ELLORY J.C. (1981). Na and Cl transport across the isolated anterior intestine of the plaice *Pleuronectes platessa*. *J. Exp. Biol.* 90:123-142.
- REUS L., WEINMANN S.A. (1979). Intracellular ionic activities and transmembrane electrochemical potential differences in gallbladder epithelium. *J. Membr. Biol.* 49: 345-362.
- RIBO J.M., AND PONZ F. (1969). Papel de la ATPasa activable por Mg an el sistema enzimático ATPasico dependiente de Na y K del intestino delgado de rata. *Rev. Espa. Fisiol.* 25 n 4 pp 257-266.
- ROBINSON J.W.L. (1976). Inhibition of transport processes in the dog colon. Reprinted from *Intestinal Ion transport*. Edy. by J.W.L. Robinson.
- ROBINSON J.W.L. (1979). Sodium extrusion from guinea-pig intestinal mucosa. *J. Physiol.* 296; 34P.
- SCHMIDT-NIELSEN K. (1976). "Fisiología animal: adaptación y medio ambiente". Ed. Omega S.A. Barcelona.
- SCHMIDT-NIELSEN AND SKADHANGE (1967). Fuction of the excretore sistem of the cocodrile (*Cocodrillus acatus*). *Am. J. Physiol.* 212:973-980.

SCHULTZ S.G. AND ZALUSKY R. (1964). Ion transport in isolated rabbit ileum. I. Short circuit current and Na fluxes. *J. Gen.* 47: 567-583.

SCHULTZ S.G. AND CURRAN (1970). Coupled transport of sodium and organic solutes. *Physiol. Rev.* 50: 637-618.

SCHULTZ S.G., FRIZZELL R.A. AND NELLANS H.N. (1974). Ion transport by mammalian small intestine. *Anun. Rev. Physiol.* 36: 51-91.

SCHULTZ S.G. (1977). The role of paracellular pathways in isotonic fluid transport. *Yale J. Biol. Med.* 50: 99-113.

SCHULTZ S.G. (1977). Sodium coupled solutes transport by small intestine: a status report. *Am. J. Physiol.* 233: E249-E254.

SCHULTZ S.G. (1978). Ion coupled transport across biological membranes. In "Physiology of Membrane Disorders" Edit. by T.E. Ancheoli J. R. Hoffman and Foust D.D. pp 273-286.

SCHULTZ S.G. (1981). Salt and water absorption by Mammalian small intestine. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Edit. by Leonard R. Johnson. Raven Press New York.

SKADHAUGE E. AND DUVDEVANI (1977). Excretion in lower vertebrates: function of gut cloaca and bladder in modifying the composition of urine. *Fed. Proc.* 36: 2487-2492.

- SKADHAUGE E. AND DAWSON T.J. (1980). *In vitro* studies of sodium transport across the lower intestine of a desert parrot. *Am. Physiol. Soc.* R285-R290.
- SMITH M.W. (1964) The *in vitro* absorption of water and solutes from the intestine of goldfish *Carassius auratus*. *J. Physiol.* 175: 38-49.
- SMITH P.L., McCABE R.D. (1984). Mechanism and regulation of transcellular potassium transport by turtle colon. *Am. J. Physiol.* 247: G445-G456.
- SMITH P.L., SULLIVAN S.K. McCABE R.D. (1986). Concentration dependent effect of disulfonic stilbenes on colonic chloride transport. *Am. J. Physiol.* 250: 644-649.
- SPRING K. R. AND KIMURA B. (1978). Chloride reabsorption by renal proximal tubules of *Necturus*. *J. Membr. Biol.* 38: 233-254.
- THOMPSON A. AND DAWSON T.J. (1977). Sodium uptake across the apical border of the isolated turtle colon: confirmation of the two barrier model. *J. Membr. Biol.* 42: 357-374.
- THOMPSON S.M. AND SELLIN J.H. (1986). Relationships among sodium current permeability and Na activities in control and Glucocorticoid-Stimulated rabbit descending colon. *J. Membr. Biol.* 92: 121-134.

THURMAN C.L. AND HIGGINS J.T. Jr (1982). Amiloride stimulation of sodium transport in the presence of calcium and a divalent cation chelater. *Biochim et Biophys. Acta* 698: 561-566.

TURNER L.A., BIEBERDORF F.A. MORAWSKI S.G. AND FORDTRAN J.S. (1970). Interrelationships of chloride, bicarbonate, sodium and hydrogen transport in human ileum. *J. Clin. Invest.* 49: 557-567.

USSING M.H. AND ZERAHN K. (1951). Active transport of sodium as the source of the electric current in the short circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23: 110.

VERNAY H. (1986). Colonic absorption of inorganic ions and volatile fatty acids in the rabbit. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 83A: 775-784.

VAN CORVEN E. J.J.H. VAN OS C. AND HIRCHEFF A.K. (1986). Subcellular distribution of ATP-dependent calcium transport in rat duodenal epithelium. *Biochim. et Biophys. Acta* 861: 267-276.

WARNOCK D.G. AND EVELOFF J. (1982) NaCl entry mechanisms in the luminal membrane of the renal tubule. *Am. J. Physiol.* 242: F561-F574.

WEINMAN S.A. REUS L. (1982). Na/H sodium proton exchange at the apical membrane of *Necturus* gallbladder. *J. Gen. Physiol.* 80: 299-321.

WEINMAN S. A. REUS L. (1984). Na/H exchange and Na entry across the apical membrane of Necturus gallbladder. *J. Gen. Physiol.* 83: 57-74.

WHITE C. (1984). Electrogenic Cl absorption and its relationship with  $\text{HCO}_3^-$  cotransport. In: *Chloride transport coupling in Biological Membranes and epithelia*. Ed. by G.A. Gerncser 1984. Elsevier Science Publishers B.V.