

## Tesis de Posgrado

# Origen y mecanismos de los potenciales eléctricos del Sincicio tegumentario del *Echinococcus granulosus* en su estadio larval : Enfoque biofísico

Ibarra, Cristina Adriana

1985

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Ibarra, Cristina Adriana. (1985). Origen y mecanismos de los potenciales eléctricos del Sincicio tegumentario del *Echinococcus granulosus* en su estadio larval : Enfoque biofísico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1877\\_Ibarra.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1877_Ibarra.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Ibarra, Cristina Adriana. "Origen y mecanismos de los potenciales eléctricos del Sincicio tegumentario del *Echinococcus granulosus* en su estadio larval : Enfoque biofísico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1877\\_Ibarra.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1877_Ibarra.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE  
CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

ORIGEN Y MECANISMOS DE LOS POTENCIALES ELECTRICOS  
DEL SINCICIO TEGUMENTARIO DEL *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*  
EN SU ESTADIO LARVAL – ENFOQUE BIOFISICO

**CRISTINA A. IBARRA**

**1985**

1877.  
ej 2

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS ha sido realizado en el Departamento de Biofísica del Centro de Investigaciones Médicas Albert Einstein.

Padrino de tesis:

Dr. <sup>1</sup>Ignacio L. Reisin

Mi reconocimiento:

A las autoridades de la Fundación  
Centro de Investigaciones Médicas Albert Einst  
por haberme permitido la realización de este  
trabajo en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Cientí-  
ficas y Técnicas por haberme otorgado las  
Becas que permitieron la realización de  
esta tesis.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias  
Exactas y Naturales de la Universidad Nacional  
de Buenos Aires por haberme posibilitado  
la presentación del presente trabajo en  
dicha Casa de Estudios.

Mi agradecimiento:

Al Dr. Ignacio L. Reisin, quien propuso el tema, ejerció la dirección del presente trabajo y guió la ulterior redacción del mismo.

A la Dra. Velia Solís por haberme ayudado a elegir el camino de la investigación científica.

A mis compañeros del Departamento de Biofísica por la colaboración recibida en el transcurso de mis tareas.

Al Sr. Nestor Mena por haberme brindado su amistad durante todos estos años.

A la Srta. María C. Ramírez por su colaboración en el pasado del manuscrito.

*A mis padres que con su enorme sacrificio y permanente estímulo hicieron posible la realización de todos mis estudios.*

*A mi esposo y a mi hija.*



## RESULTADOS

### I. Registros de las DP en poblaciones de protoescólices

Distribución de los valores.....	32
Duración de los registros de las DP.....	33
Valores de las DP en PE frescos o ricos en Na. Acción de la ouabaína.....	33
Efecto del tiempo de preincubación a 37°C sobre las DP en PEs conservados a 4°C.....	37
Efecto del iodoacetato sobre las DP.....	38
Efecto del triaminopirimidina sobre las DP.....	39

### II. Registros de las DP en PEs aislados

Medición de las DP en PEs ricos en Na. Acción de la ouabaína.....	42
Efecto del Cs <sup>+</sup> sobre las DP en ausencia de K <sup>+</sup> externo.....	45
Registros de las DP en PEs suspendidos en SRT. Distribución de sus valores.....	46
Cambios de las DP por tratamiento de los PEs con desoxicolato de Na.....	47
Sensibilidad de la barrera de DP a variaciones de la concentración de K <sup>+</sup> en el baño externo.....	50
Cálculo de las permeabilidades aparentes de K <sup>+</sup> y Rb <sup>+</sup> .....	57
Efecto sobre las DP que producen la ausencia del Cl <sup>-</sup> externo.....	58
Sensibilidad de la barrera de DP a las variaciones de la concentración de Na <sup>+</sup> en el baño externo.....	59
Efecto del 3,5 diamino N (amino-iminometil)-6-cloropirazincarboxamida (amiloride) sobre la P <sub>Na</sub> .....	61
Sensibilidad de la barrera de DP a los cationes divalentes.....	64
Efecto del Ba <sup>+2</sup> sobre las DP.....	65
Efecto de la ausencia de Ca <sup>+2</sup> externo sobre las DP.....	71
Efecto de la 6 metoxil- $\alpha$ -(5 vinyl-2-quimidinil) 4-quinolinemetanol (quinina) sobre las DP.....	84
Significado de las DP positivas.....	86
Modificaciones de las DP inducidas por el suero de un paciente afectado de hidatidosis.....	90



DISCUSION

Localización de las DP..... 96

Efecto de inhibidores metabólicos sobre las DP..... 97

Caracterización del componente de las DP ouabaíno-sensible..... 98

Caracterización del componente de las DP ouabaíno-insensible

- a) Sensibilidad de las DP a los cationes monovalentes..... 100
- b) Sensibilidad de las DP al cloruro externo..... 101

Efecto de fármacos, drogas y cationes divalentes sobre el componente de las DP ouabaíno-insensible

- a) Acción del amiloride..... 103
- b) Acción del Ba<sup>+2</sup>..... 104
- c) Acción de quinina..... 109
- d) Efecto del Ca<sup>+2</sup> y otros cationes divalentes..... 110
- e) Efecto de inmunoglobulinas del suero de paciente hidatídico... 114

Conclusiones finales..... 117


APENDICE..... 121

BIBLIOGRAFIA..... 124

## SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
PE	protoescólex
PEs :	protoescólices
DP	diferencia de potencial eléctrico
DPneg :	diferencia de potencial eléctrico negativo
DPpos :	diferencia de potencial eléctrico positivo
J <sub>in</sub> :	influjo
$ C^+ _i$ :	concentración tegumentaria de cationes
$ A^- _i$ :	concentración tegumentaria de aniones
$ C^+ _o$ :	concentración externa de cationes
$ A^- _o$ :	concentración externa de aniones
G-H-K :	Goldman-Hodgkin y Katz
$P'_{Na}$ :	permeabilidad relativa de sodio
$P'_{Cl}$ :	permeabilidad relativa de cloruro
$P_{Na}$ :	permeabilidad aparente de sodio
$P_{Cl}$ :	permeabilidad aparente de cloruro
$P_{Rb}$ :	permeabilidad aparente de rubidio
$P_K$	permeabilidad aparente de potasio
$P_I$	permeabilidad aparente del ión
ME	microelectrodo
mV	milivoltio
mM	milimolar
M	molar
μmol	micromoles
μm	micrómetro
mm	milímetro

cm      centímetro  
 min :    minuto  
 seg :    segundo  
 P/V :    peso en volumen  
 %        por ciento  
 °C        grado centígrado  
 °K        grado Kelvin  
 g.p.s.:    gramo de peso seco  
 gr/lt :    gramo por litro  
       IA :    iodoacetato  
       EDTA :    etilendiaminotetracético  
       EGTA :    etilenglicoldiaminotetracético  
       TAP :    2-4-6 triaminopirimidina  
       ADP :    adenosinadifosfato  
       ATP :    adenosinatrifosfato  
       Pi :    fosfato inorgánico  
 ATPasa Na-K :    adenosinatrifosfatasa Na-K sensible  
       DOCNa :    desoxicolato de sodio  
 |Amil|<sub>o</sub> :    concentración externa de amiloride  
 |Quin|<sub>o</sub> :    concentración externa de quinina  
 ouab. :    ouabaína  
       SPH      suero de paciente hidatídico  
       Igs      inmunoglobulinas  
       N        número de empalamentos o número de protoescólices  
       P        probabilidad  
       F        96.500 Coulomb/mol  
       R        8,32 Joule/mol °K  
       T        temperatura absoluta

- f      función
- $R_I$  : resistencia del ión
- $E_I$  : fuerza electromotriz del ión
-  : generador eléctrico
- $K_{0.5}$  : constante aparente de inhibición media

## INTRODUCCION

### - Epitelios y sincicios

La estructura y función de los organismos vivos se mantiene, debido entre otras propiedades, a la existencia de membranas celulares e intra celulares que separan compartimientos entre sí y a éstos del medio exter no. La importancia funcional de las membranas celulares que constituyen entre el 50 y el 90 por ciento del peso seco total de las células, no se reduce sólo a limitar compartimientos sino que es la estructura sobre la que tiene lugar otros procesos fundamentales de los organismos tales como, entre otros, la fosforilación oxidativa, la síntesis de ácidos grasos, la conducción nerviosa. En los organismos multicelulares el intercambio de materia con el medio externo y aún entre las diversas estructuras celulares se realiza a través de entidades especia lizadas que se conoce como membranas epiteliales. Estas membranas se halla constituídas por una o más capas de células íntimamente unidas entre sí en localizaciones muy específicas. Cada una de ellas presenta una polarización morfológica que está relacionada con las propiedades de trans

porte asimétrico de materia que caracteriza su función. Las propiedades de las membranas epiteliales son muchas veces el resultado del trabajo conjunto y coordinado de los distintos mecanismos localizados en las membranas plasmáticas de cada una de las células que componen el epitelio.

En numerosos estudios realizados en una gran variedad de epitelios tales como mucosa intestinal (Giebisch y col., 1964), túbulo renal (Windhager y col., 1966), vejiga urinaria (Civan y col., 1965), piel de rana (Ussing y Windhager, 1964; Benos y col., 1976), vesícula biliar (Frömter y Diamond, 1972), fue posible establecer que las diversas sustancias pueden atravesar las membranas epiteliales a través de dos rutas: una es la ruta transcelular que permite el intercambio de materia a través de la célula con su cara apical en contacto con el medio externo y su cara basal, que la limita del medio interno y otra ruta es la vía paracelular, donde el intercambio se realiza a través de las uniones intercelulares conocidas como "uniones estrechas". La relativa contribución al pasaje de electrolitos y agua de cada una de estas rutas permitió clasificar a los epitelios como de baja y alta resistencia ("leaky y tight epithelia") respectivamente (Frömter, 1972; Frömter y Diamond, 1972). Los epitelios de baja resistencia como vesícula biliar, intestino, túbulo renal proximal posee una resistencia transpitelial en el rango de 100 a 500  $\Omega\text{cm}^2$  y el pasaje de agua, iones inorgánicos y moléculas de no electrolitos se realiza fundamentalmente a través de las uniones estrechas mientras que los epitelios de alta resistencia como piel de rana, vejiga urinaria, glándulas salivales, poseen una resistencia transpitelial de 1000 a 2000  $\Omega\text{cm}^2$  y utilizan principalmente la vía celular para incorporar agua y solutos. La conductancia observada en los epitelios de baja resistencia se debe a que aproximadamente el 99% de la corriente transepitelial pasa por las uniones estrechas, mientras que en los de alta resistencia la corriente transepitelial tiene

lugar fundamentalmente por la vía transcelular. Es decir que la existencia de los epitelios de baja y alta resistencia está asociada a la mayor o menor resistencia de las uniones estrechas. Los epitelios de alta resistencia son capaces de mantener diferencias de gradientes de concentraciones de electrolitos de  $H^+$  o bien elevados potenciales eléctricos como consecuencia de un transporte activo mientras que en los epitelios de baja resistencia no ocurre lo mismo. Por ejemplo la piel de rana puede absorber cloruro de sodio del medio externo aún cuando la concentración de este electrolito sea  $10^4$  veces menor que la estimada en el medio interno de la rana. Tales gradientes sólo son posible de mantener debido a la muy baja permeabilidad de las uniones intercelulares.

En contraste con esto, los epitelios de baja resistencia realizan principalmente funciones de absorción de grandes volúmenes de agua e iones en concentraciones isosmóticas con el medio externo.

Si bien las membranas epiteliales se observan en un amplísimo rango de especies biológicas desde insectos a mamíferos, existe un extenso grupo de organismos en los que estas membranas tienen particulares diferencias. Tal es el caso de los helmintos. En estos organismos el intercambio de materia se realiza a través de estructuras tegumentarias que si bien remeda a los epitelios tiene profundas diferencias con ellos pues se trata de un verdadero sincicio, en el cual el citoplasma celular se extiende de una célula a otra sin presentar soluciones de continuidad.

- Estructura microscópica del tegumento de los platelmintos y su relación con el transporte biológico.

Estructura:

Los platelmintos son lombrices planas más o menos alargadas provistas de

un ganglio cerebral y de un sistema de canales continuos para la excreción. No poseen aparato circulatorio ni respiratorio. La mayoría son hermafroditas. Están provistos por lo general de aparatos de fijación: las ventosas y los ganchos. Dentro de la clase de los platelmintos se distinguen los cestodes cuya característica principal es que carecen de aparato digestivo. Su cuerpo segmentado está revestido por un tegumento, que unido a una capa muscular superficial, forman una especie de tubo llamado músculo cutáneo, cuyo rol es el de imprimir los movimientos característicos de las lombrices. Por consiguiente, el tegumento es una estructura fundamental para el mantenimiento de la vida en los cestodes ya que una de sus funciones más importantes es incorporar nutrientes del medio externo (Cortelezzi, 1938). Estudios de microscopía electrónica de varios miembros de la familia de los teniados -cestodes que poseen cuatro ventosas musculares- muestra que el tegumento de los mismos tiene una estructura sincicial con un citoplasma continuo de células con una significativa actividad metabólica (Lee, 1966). Los tegumentos tienen básicamente la misma morfología dentro de las distintas clases de platelmintos (Morseth, 1966). Una característica general de este tipo de estructura es que presentan la superficie externa cubierta por numerosas proyecciones llamadas microtrichas que recuerdan las microvellosidades de la mucosa intestinal de los mamíferos. Las pequeñas evaginaciones de la membrana apical, son comparadas habitualmente con el ribete en cepillo de las células epiteliales de la mucosa de los vertebrados.

Si bien hay varias similitudes entre estos tipos de diferenciaciones apicales, hay algunas diferencias detectables en su estructura, en los contenidos relativos de partículas y de filamentos estructurales. Morseth (1966) informa que la parte distal de las microvellosidades de todas las especies de parásitos examinadas tienen características similares a las de



las células intestinales de mamíferos. La única diferencia es que, al microscopio electrónico poseen formaciones densas que le darían rigidez a las terminaciones, permitiéndole al parásito mantener su posición dentro del intestino del huésped. En principio se asoció a estas diminutas proyecciones de 1  $\mu\text{m}$  de longitud con la absorción de nutrientes. Sin embargo, las microvellosidades además de aumentar el área de absorción del tegumento, previenen la expulsión del parásito y producirían una acción abrasiva sobre las células del huésped que aumenta la concentración del material celular de éste en las proximidades de la superficie de la lombriz (Morseth, 1966).

Las microvellosidades están recubiertas por una membrana celular que, a su vez, recubre todo el parásito indicando que las proyecciones superficiales del citoplasma distal son estructuras intracelulares. Las características protectivas de la superficie tegumentaria posiblemente se deben a la presencia de una capa de mucopolisacáridos y a la continuidad de su membrana plasmática. El citoplasma distal está limitado en su parte basal por la membrana citoplasmática la que a su vez descansa en una zona fibrosa con filamentos irregularmente distribuidos en íntimo contacto hacia abajo con las fibras musculares. Dicho citoplasma contiene muchas vesículas, mitocondrias y cuerpos celulares localizados en su región basal. Esta parte citoplasmática modificada de las células tegumentarias es de importancia fundamental, pues está expuesta a los nutrientes y jugos digestivos en el intestino del huésped. Por consiguiente, a través del citoplasma distal, los helmintos no sólo obtienen las sustancias que necesitan, se protegen de las enzimas del huésped, sino que también eliminan algunos de los desechos metabólicos. Debajo de las capas musculares se encuentra el citoplasma perinuclear del tegumento el cual se asienta sobre el parénquima. Este citoplasma está limitado por la continuación de la

membrana del citoplasma distal y posee mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso, complejo de Golgi y el núcleo que frecuentemente contiene un gran nucleolo (Figura 3b). Se han observado extensiones citoplasmáticas que conectan el citoplasma distal con el que rodea al núcleo, como así también gránulos adyacentes al citoplasma perinuclear que son características del tipo de los gránulos de glucógeno.

Las células tegumentarias, las cuales son claramente multinucleadas, contienen grandes cantidades de lípidos y de grupos sulfhidrilos. Se ha demostrado la presencia de una serie de enzimas como fosfatasa ácidas y alcalinas, algunas estereosas no específicas, colinesterasas, amilopeptidasas, glucuronidasas como así también isocitrato, glutanato, cetoglutarato, succinato y lactato deshidrogenasas entre otras (Read y Simmons, 1963). Todas estas características y la presencia de un número importante de mitocondrias sugieren el activo papel del tegumento en la absorción de sustancias.

Por último algunas tenias poseen invaginaciones de la parte basal del tegumento denominados poros. Estos poros con forma de canales abiertos o no a la superficie externa son estructuras tubulares que penetran el citoplasma distal y estarían asociados a la función de absorción. Sin embargo su existencia no ha sido confirmada ya que podrían no ser canales sino glóbulos del medio los que serían absorbidos por pinocitosis (Morseth, 1966).

#### Transporte a través del tegumento:

Debido a que los cestodes carecen de aparato digestivo, la entrada de nutrientes se realiza vía intertegumento. Bañados en un medio de compleja composición como es el intestino, la evolución y propagación del parásito dentro del huésped depende directamente de los procesos involucrados en la penetración de iones y metabolitos del medio ambiente. Es, entonces de

fundamental importancia estudiar las diferentes características del transporte de sustancias a través de las membranas tegumentarias a fin de comprender la fisiología y eventualmente sus aplicaciones en el desarrollo de una quimioterapia adecuada de estos parásitos.

Estudios realizados respecto al consumo de aminoácidos (aa) en parásitos permitieron caracterizar los siguientes sistemas de transporte: 1) difusión simple en donde la absorción de aa es directamente proporcional a la concentración del mismo. Por ejemplo la entrada de L-prolina y ácido glutámico en Taenia crassiceps (Pappas y Read, 1973); 2) difusión facilitada donde existe una relación no lineal de velocidad de entrada en función de la concentración externa del aa distinguiéndose en algunos casos inhibición competitiva (específica) entre varios aa. Tal es el caso de L-valina y L-leucina en Calliobothrium verticillatum (Read y col., 1960) y L-prolina en Hymenolepis diminuta (Kilejian, 1966). Generalmente el mecanismo responde a una cinética de Michaelis-Menten (1913) siendo directamente proporcional la velocidad de entrada a la inversa de la concentración del sustrato (Lineweaver-Burk, 1934). Estos procesos mediados tendrían su origen en por lo menos los siguientes sistemas de transporte o "transportadores" de aa: a) básicos; b) ácidos y c) neutros (Pappas y Read, 1975); 3) combinación de difusión simple y facilitada como ocurre en la absorción de lisina, fenilalanina y metionina en Taenia crassiceps donde Pappas y Read (1973) sugieren la presencia de un sistema de transporte básico y 4) transporte activo sensible a ATP. Lussier y col. (1978a) informan que una parte del consumo de aa neutros depende directamente de la concentración de ATP en Hymenolepis diminuta. Los autores sugieren la presencia de una ATPasa insensible a la ouabaína la cual tendría un rol muy importante en la regulación del volumen celular (Lussier y col., 1978b).

La revisión de Pappas y Read (1975) provee varios ejemplos respecto al consumo de carbohidratos, en especial glucosa y de lípidos en distintos cestodes y nematodos.

En general, si bien es sumamente útil caracterizar en estos términos un sistema de transporte se deben comprobar varios fenómenos. Para el caso específico del transporte activo es fundamental asociarlo directamente al gasto energético que lo posibilita y a la real acumulación del sustrato en contra de su gradiente electroquímico (Kedem, 1960). Ambos fenómenos son experimentalmente bastante difíciles de establecer. Los datos histoquímicos y microfotográficos fueron los primeros en aportar conocimientos sobre el tema. Se observó que policationes (coloides catiónicos) como la poli-lisina L se adosaba al tegumento de Hymenolepis diminuta bloqueando su efecto catiónico (Lumsden y col., 1970) y que por otra parte, la ferritina (coloide aniónico) no era absorbido en cantidades significativas a pH mayores de 5. Esto permitió postular que el aspecto superficial del tegumento del parásito es fundamentalmente elctronegativo (Lumsden y col., 1970). Por otra parte estudios electrofisiológicos realizados en Schistosoma mansoni (Fetterer y col., 1980; Thompson y col., 1982; Connie y col., 1982; Thompson y col., 1984) sugirieron la existencia de tres compartimientos distintos: a) tegumental; b) muscular y c) extracelular. El potencial eléctrico correspondiente a uno de ellos, el tegumental sería sensible a la ouabaína por lo que Connie y col. (1982) postularon la presencia de un transporte activo en el tegumento del parásito.

Todos estos primeros datos aportaron conocimientos preliminares importantes sobre las características eléctricas y de afinidad de cargas en las membranas de los parásitos pero, únicamente los conocimientos sobre permeabilidad de las mismas son básicos y fundamentales para entender su fisiología. La permeabilidad de las membranas biológicas y sus característi-

cas de transporte dependen de muchos factores relacionados con el soluto y con la membrana. Por parte del soluto, tales como la concentración del mismo a ambos lados de la barrera, el tamaño de la molécula, su coeficiente de partición o su polaridad. En cuanto a las características de la membrana, intervienen su composición química y su estructura. El problema particular que nos atañe está relacionado con la caracterización de los mecanismos de transporte que originan el potencial eléctrico a través del tegumento del Echinococcus granulosus en su estadio larval.

#### Ecobiología y ciclo biológico del Echinococcus granulosus.

El género Echinococcus\* comprende varias especies de cestodes muy diminutos que viven como adultos en los intestinos de animales caninos y felinos. El Echinococcus granulosus (Batsch 1786), se ha identificado como una de las especies productora de quistes hidatídicos en el hombre y animal domésticos. El Echinococcus granulosus tiene una epidemiología selvática y pastoril a la vez. La infestación se conoce mejor, naturalmente, en las regiones donde se transmite entre perros y ganado particularmente lanar y más o menos frecuentemente pasa al hombre (Chandler y Read, 1965). Este cestode tiene una distribución cosmopolita y en nuestro país predomina en las provincias ganaderas con cría ovina tales como Buenos Aires, provincias patagónicas, etcétera. La magnitud del problema que presenta la hidatidosis, cuyo agente causal es el Echinococcus granulosus puede ser resumida de los datos publicados por Schantz (1978) respecto al número de casos, existentes a partir de catastros radiológicos. Aproximadamente 2000/100.000 habitantes sufren o han sufrido hidatidosis en la Argentina. Los últimos estudios de prevalencia indican que en las regiones endémicas alcanzan valores del 1,5% (Reunión Congreso Internacional de Hidatidología, 1983).

(\*): parásitos que pertenecen al Phylum: Platyhelminthes. Clase: Cestodea.  
Subclase:Cestodaria. Orden: Cyclophilidea.

El parásito adulto mide de 3 a 5 mm de largo por 1/2 mm de ancho a nivel del último segmento y habita en el intestino delgado de cánidos. El tamaño de los anillos del parásito aumenta hacia el extremo caudal siendo el último maduro el cual contiene de 500 a 800 huevos (Chandler y Read, 1965). La cabeza tiene un rostelo protractil, armado de una doble hileras de 28 a 50 ganchos y se une a la cadena de anillos o estróbila a través del cuello. Los proglótidos grávidos son los que se expulsan con las materias fecales del perro quedando en libertad los huevos que, en gran cantidad contaminan el suelo, los pastos, el agua, etcétera de donde serán recogidos por los huéspedes intermediarios (ovinos, bovinos y porcinos) y accidentalmente por el hombre (Figura 1). Los jugos digestivos del huésped liberan los embriones encapsulados que pasan al intestino. Allí los embriones liberados emergen de sus cápsulas y atraviesan la pared intestinal localizándose en hígado o bien por vía sanguínea llegan al pulmón. Eventualmente lo hacen en otras localizaciones no tan frecuentes (Greenway, 1952). En las distintas visceras el parásito larval, vesiculizándose va creciendo lentamente dentro de la estructura de un quiste (Figura 2). De la membrana interna del mismo, propia del parásito, se originan múltiples quistes fijos o vesículas germinativas así como los escólices larvarios llamados protoescólices. El ciclo se cierra con la ingestión de dichos protoescólices en cánidos domésticos o salvajes (Figura 1) (Read, 1978).

Las características del medio que los protoescólices encuentra en el intestino del huésped ya sea intermediario o definitivo es de fundamental importancia. Las vesículas germinativas ingeridas por los cánidos liberan los protoescólices por la acción de la pepsina gástrica, pero no evaginan a pH ácido. A pH neutro su evaginación es lenta, incrementándose notablemente en presencia de sales biliares. Los protoescólices toleran muy bien el taurocolato, componente principal de la bilis canina, no así el

el desoxicolato o glicocolato presente en la bilis de los hervíboros. Estas sales producen la lisis del tegumento del protoescólix y su consecuente muerte (Read, 1978).

A partir de la profunda implantación del protoescólix evaginado en una cripta de Lieberkjün comienza el desarrollo estrobilar del mismo. Este tipo de unión que Smith (1962) llama "placentar" a su huésped le proporciona la interacción necesaria para su nutrición y crecimiento.

El desarrollo de técnicas específicas de cultivo para Echinococcus granulosus "in vitro" posibilitaron una evolución diferente del protoescólix tanto hacia su forma adulta de tenia, como larval de hidátide (Smith, 1962; Smith y col., 1966; Smith, 1967; Smith y col., 1967).

#### Morfología del estadio larval del Echinococcus granulosus

La larva del Echinococcus granulosus se caracteriza por su estructura quística, la que contiene un líquido: el fluido hidatídico. La pared quística está representada por dos membranas adosadas totalmente diferentes del punto de vista morfológico. La membrana más externa o laminar está constituída por una serie de láminas superpuestas concéntricamente. Su composición química es similar a la quitina, razón por la cual se designa a esta membrana también con el nombre de quitinosa. Es permeable y deja pasar sustancias de alto peso molecular como inmunoglobulinas (Coltorti y Varela Díaz, 1974). Inmediatamente por dentro de la membrana laminar se encuentra la germinativa o prolígena, la que posee una estructura similar a la descrita para helmintos que se refirió más arriba (Figura 2). El contenido del quiste hidatídico está representado por una cantidad más o menos grande de líquido y por estructuras que se generan a partir de la membrana prolígena. Estas estructuras son las vesículas hijas, las vesículas prolígeras y los escólices.

Vesículas hijas: Se desarrollan a expensas del quiste madre y presentan la misma estructura del quiste. Es decir, membrana laminar y germinativa. Esta última con capacidad para producir vesículas prolíferas, escólices y líquido hidatídico. Las vesículas hijas pueden ser endógenas o exógenas según se desarrolle en el interior del quiste o fuera de él.

Vesículas prolíferas: En épocas variables de la vida de la larva se forman a nivel de la germinal unos espesamientos que al crecer hacia el interior del quiste, se ahuecan para formar pequeñas vesículas que quedan unidas a la capa germinativa por el pedículo (Figura 2). En el interior de estas vesículas también por un proceso de crecimiento e invaginación posterior, se van a desarrollar los escólices o cabezas de futuras tenias. Las vesículas prolíferas son elementos de 250 a 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, su número larval es variable, como variable asimismo es el número de escólices que ellas contienen. Por rotura del pedículo que las une a la capa germinativa las vesículas prolíferas quedan libres en el líquido hidatídico y éstas a su vez por rotura de la pared ponen en libertad a los escólices (Figura 2).

Escólices: Los escólices son formaciones ovoideas, algo achatadas en los polos, de superficie lisa, de unos 190  $\mu\text{m}$  de diámetro mayor y 145  $\mu\text{m}$  de diámetro menor (Figura 3aI). Presenta una doble hilera de ganchos refringentes y brillantes dispuestos transversalmente que corresponden al rostelo. Desde la zona de los ganchos y en forma vertical a la misma, se observa una hendidura que llega hasta el polo anterior y que corresponde a la hendidura de invaginación del escólex. En la mitad anterior y a ambos lados de la hendidura de invaginación se observan dos de las ventosas del escólex mirándose por la parte cóncava. En el parénquima y hacia la parte posterior se revela la existencia de células vibrátiles con funciones excretoras provistas de pequeños canalículos que se reúnen en cuatro canales colectores que salen a nivel del pedículo y se abren en la superficie



externa de la vesícula prolígera por pequeños orificios. La descripción anterior corresponde a un protoescólex invaginado, pero estos elementos también se los puede observar evaginados (Figura 3a-II), en cuyo caso aparece el rostro con su doble corona de ganchos desplegados hacia afuera y atrás, a continuación las cuatro ventosas salientes y en la parte posterior el cuello con los elementos celulares ya señalados. Los escólices están recubiertos por las membranas tegumentarias a través de la cual se realiza el intercambio de materia con el medio externo.

#### Estructura microscópica del tegumento del protoescólex

La estructura general de una célula tegumentaria del protoescólex es similar a la descrita anteriormente para helmintos y se puede observar en la Figura 3b. Las extensiones citoplasmáticas de las células que están en el parénquima, debajo de las bandas musculares se comunican con la matriz del tegumento. La superficie externa del citoplasma distal muestra proyecciones del mismo tipo que los ténidos adultos.

La cantidad de material PAS positivo es fácilmente visible. Es una fina malla filamentosa que no cubre toda la superficie del protoescólex sino sólo el área que no posee proyecciones superficiales. En los protoescólices que han sido cultivados durante más de un mes en medios especiales se ha perdido esta cobertura y las proyecciones están completamente desarrolladas en toda su zona posterior. En cuanto a las ventosas, sus paredes están formadas por el citoplasma distal del tegumento (Morseth, 1967).

#### Propiedades de transporte del estadio larval del *Echinococcus granulosus*

Hasta el presente son muy pocos los estudios sobre la fisiología y más particularmente sobre las propiedades de las membranas de los parásitos

del género Echinococcus, tanto en su estadio larval como adulto. Fue Schwabe (1959) quien llamó la atención sobre la necesidad de realizar estudios sobre la permeabilidad de las membranas del quiste hidatídico y él llegó a plantear las diferentes propiedades de la membrana germinal respecto de la laminar. Según ese autor, la germinal sería la responsable del control de la permeabilidad y la osmorregulación, y el papel de la laminar como estructura inerte sería responsable del crecimiento del quiste. Los estudios de permeabilidad al agua y electrolitos de las paredes del quiste hidatídico fueron realizados por Rotunno y col. (1974) quienes desarrollaron una técnica específica que les permitió medir los flujos de agua y electrolitos en quistes secundarios de Echinococcus granulosus de infecciones experimentales de ratones. A partir de un análisis cinético considerando tres compartimientos: la cavidad del quiste, su pared y el medio de incubación, estos autores demostraron la alta permeabilidad difusional al agua y la relativamente baja permeabilidad al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{Cl}^-$  lo que concuerda con los primeros datos de Schwabe.

La importancia de utilizar esta metodología de estudio es que permite analizar los mecanismos de penetración de otras moléculas tales como aa, azúcares y drogas potencialmente efectivas. Reisin y col. (1977) estudiaron la permeabilidad a la única droga hasta el momento, presuntamente efectiva en el tratamiento quimioterapéutico de la hidatidosis humana, el mebendazol. En dicho trabajo se midieron las permeabilidades al mebendazol y al agua que incluía estimaciones del espesor aparente de las capas de agua no mezcladas. Establecieron que las capas de agua no mezcladas tienen una contribución significativa a la resistencia al pasaje de agua y al mebendazol aunque la contribución para este último es menor que para el caso del agua (49% de la resistencia total a su pasaje) (Reisin y col., 1984).

Por otra parte, Cantiello y Reisin (1980) logran un importante avance en el conocimiento del balance y transporte de electrolitos en protoescólices de Echinococcus granulosus. Determinan que aproximadamente un 50% del influjo de potasio (rubidio) ingresa al protoescólex mediante un mecanismo de transporte activo (bomba Na/K) ouabaína inhibible. Establecen que el influjo de potasio activo tiene una cinética saturable y sigmoidea respecto de la concentración externa de potasio y que es activada por el contenido interno de sodio, mientras que el influjo pasivo correspondería a un mecanismo de difusión simple. Cantiello y Reisin (1980) estudiaron además la distribución de potasio a partir de la incorporación de  $^{42}\text{K}$  y establecieron que el potasio se distribuiría en por lo menos dos compartimientos, uno pequeño y de rápido intercambio y otro grande y lento. Recientes estudios de ligadura de ouabaína tritiada en protoescólices realizada por Cantiello y Reisin (1982) permiten establecer: a) que existen sitios específicos para la ouabaína accequibles desde el baño externo; b) la cantidad aproximada de sitios específicos asociados a la actividad de transporte activo de potasio; c) las características cinéticas y el cálculo de la constante de disociación para la interacción de la ouabaína- $^3\text{H}$  con los sitios específicos.

El objetivo de esta tesis es analizar los mecanismos de transporte que originan el potencial eléctrico a través del tegumento del Echinococcus granulosus en su estadio larval.

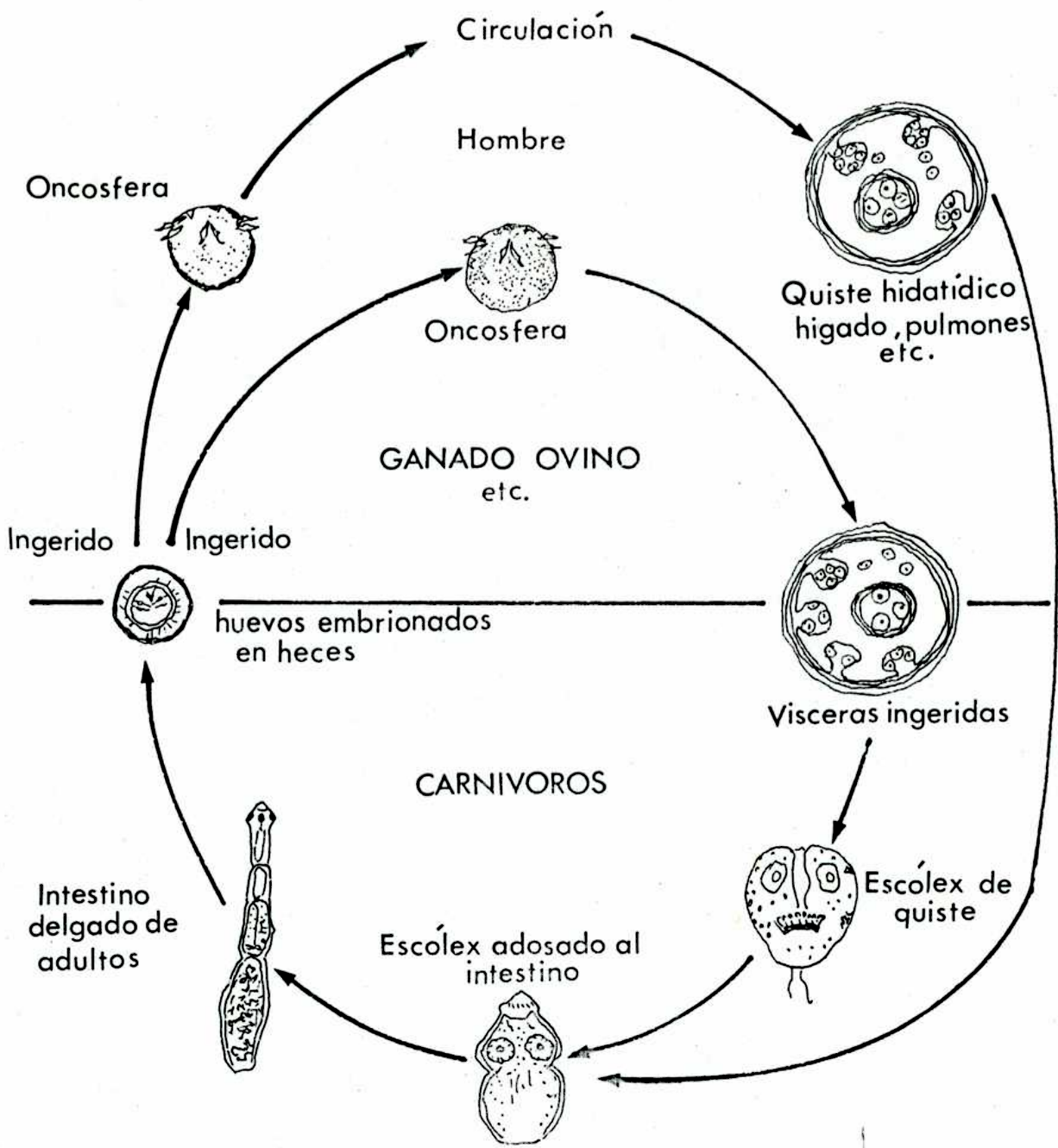
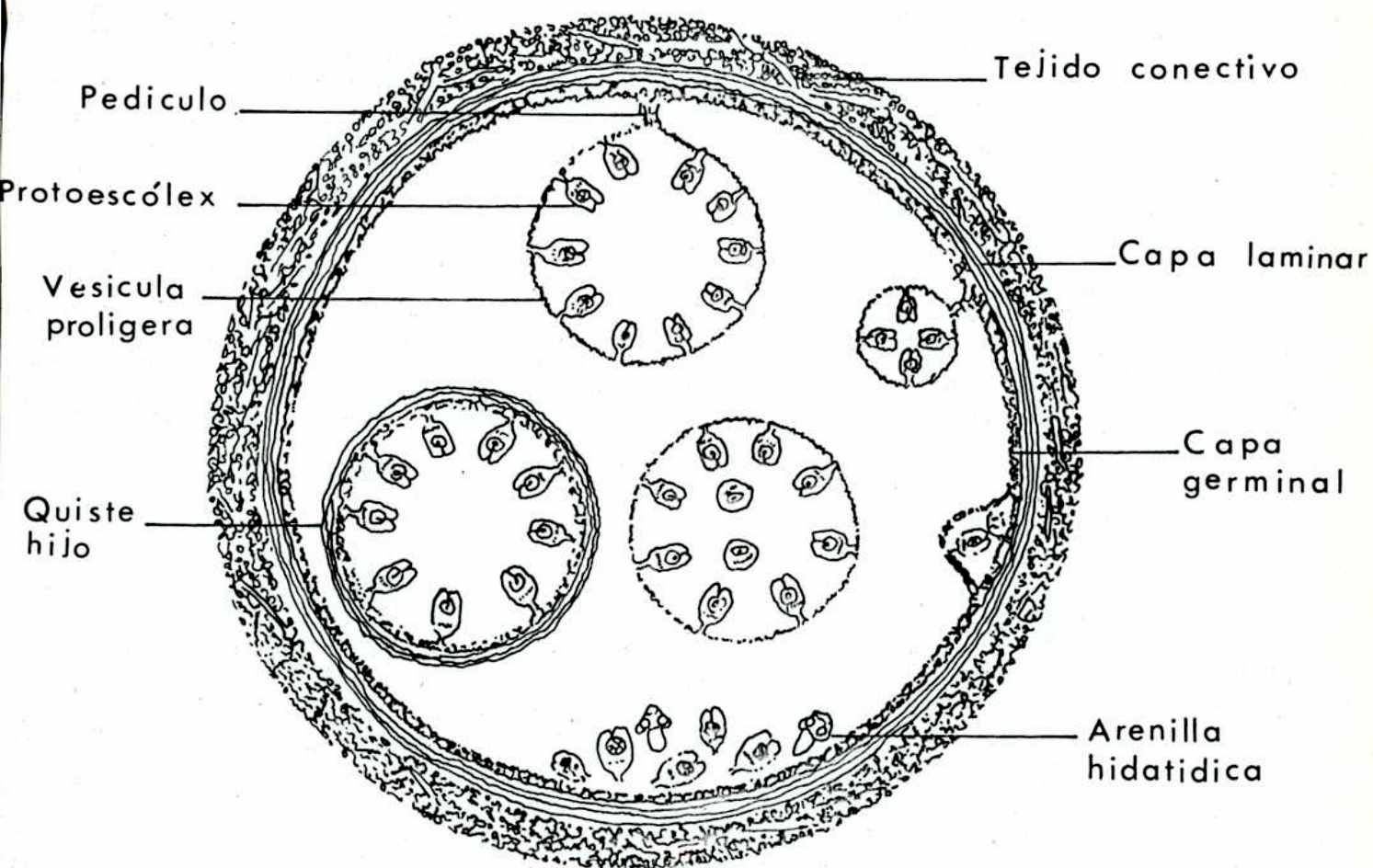


FIGURA 1: Ciclo biológico del parásito *Echinococcus granulosus* redibujado del Atlas of Medical Parasitology (Zaman, V., 1978).



**FIGURA 2:** Relación entre las distintas estructuras que se observan en un quiste hidatídico. Redibujado del Atlas of Medical Parasitology (Zaman, V., 1978).



FIGURA 3aI: Imagen de un PE invaginado.



FIGURA 3aII: Imagen de un PE evaginado.

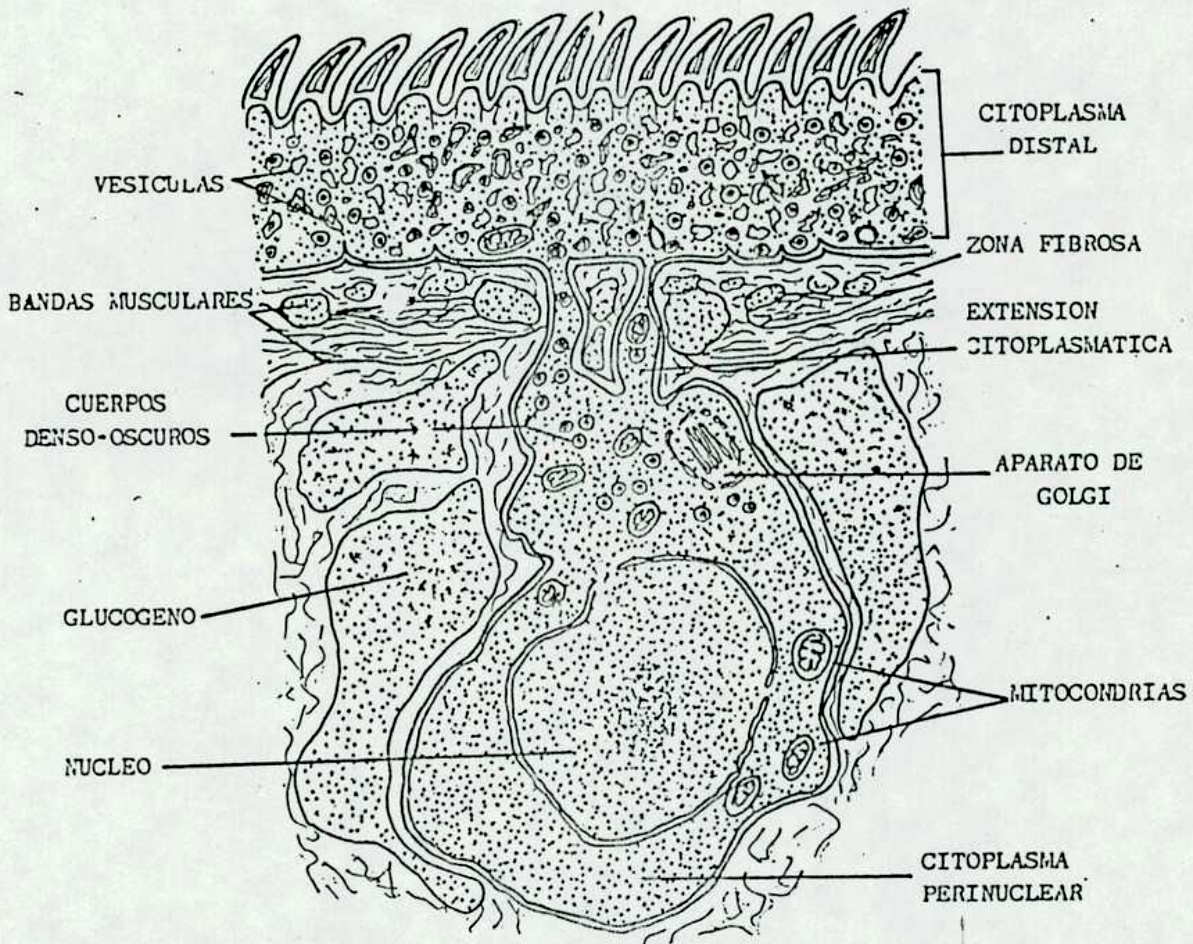


FIGURA 3b: Vista en corte del ordenamiento celular del tegumento del protoescolax de Echinococcus granulosus. Similar al de la tenia adulta. Redibujado del trabajo de Morseth (1966).

## MATERIALES Y METODOS

### - Obtención de los parásitos.

Los protoescólices (PEs) de Echinococcus granulosus (variedad ovina) (Smith y Davis, 1974) se obtuvieron de quistes hidatídicos de hígados y pulmones de ovejas infectadas. De las vísceras recién extraídas de animales sacrificados en frigoríficos se procedió a separar los PEs. El fluido hidatídico se extrajo de los quistes por medio de un sistema de aspiración conectado a un sistema de succión que se colectó en frascos de 500 ml de capacidad. Una vez decantada la suspensión, se descartó el fluido hidatídico y los PEs sedimentados se resuspendieron en SRK. La suspensión se filtró a través de gasas a fin de retener las membranas de los quistes, otros restos de tejido, coágulo, etc. y luego de decantarla se descartó el sobrenadante. Posteriormente los PEs se colocaron repetidas veces en grandes volúmenes de solución Ringer Krebs descartando cada vez el sobrenadante a fin de lavarlos adecuadamente.

Finalmente, la suspensión de PEs fue aspirada y expelida repetidamente mediante una pipeta para separar los PEs adheridos a la membrana germinal de las vesículas hijas y poder contar con una suspensión de PEs libres. Los PEs así obtenidos se usaron inmediatamente o bien se mantu-

vieron a 4°C en SRK con penicilina (1500 U/ml) y estreptomina (50 gr/ml) para evitar la proliferación bacteriana.

- Soluciones

Dentro del quiste hidatídico, los PEs intercambian agua y electrolitos con el medio que los rodea. Este medio es el líquido hidatídico, el cual contiene las sustancias esenciales para el mantenimiento del Echinococcus granulosus en su estadio larval. La composición del líquido hidatídico (Mazzocco, 1923) en por 100 cm<sup>3</sup> es: ClNa: 0.65; glucosa: 0.06; albúmina: 0.02; grasas: 0.04; agua: 98.7; extracto: 1.3; cenizas: 0.83. La densidad varía entre 1006 a 1009 y la reacción es alcalina. A fin de conservar los PEs "in vitro" se usó la solución Ringer Krebs (SKR) de similar composición que el líquido hidatídico (Reisin y Rotunno, 1981). En la Tabla siguiente se muestra la composición del SRK y las modificaciones que sobre ella se realizaron. Todas las soluciones se burbujearon con carbógeno (O<sub>2</sub>, 95%; CO<sub>2</sub>, 5%) hasta alcanzar un pH final de 7.3 a 7.4.

	ClNa	ClK	Cl <sub>2</sub> Mg	CO <sub>3</sub> HNa	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na	glucosa	Cl <sub>2</sub> Ca	ClCs
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
SRK	121	5	1.2	22.5	1.2	5.6	2.5	
SRK-OK	126	-	1.2	22.5	1.2	5.6	2.5	
SRK-1K	125	1	1.2	22.5	1.2	5.6	2.5	
SRK-75K	51	75	1.2	22.5	1.2	5.6	2.5	
SRK-121K	-	121	1.2	22.5	1.2	5.6	2.5	-
SRK-OK-25Cs <sup>+</sup>	101	-	1.2	22.5	1.2	5.6	2.5	25

También se usó solución Ringer-Tris (SRT) que es un Ringer Krebs modificado donde se reemplazó el tampón CO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>-CO<sub>3</sub>HNa por Tris-ClH de pH final 7.3. A continuación se muestra la composición de la SRT y las modificaciones que sobre ella se realizaron.



	ClNa	ClK	Cl <sub>2</sub> Mg	PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na	glucosa	Cl <sub>2</sub> Na
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
SRK-pH 6.1	146	5	1.2	5	5	5.6	2.5

	ClNa	ClK	Cl <sub>2</sub> Mg	Tris	ClH	glucosa	Cl <sub>2</sub> Ca	Cl colina
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
SRT	145	5	1.2	8	4.5	5.6	2.5	
SRT 25Na 0K	25		1.2	12.5	7.3	5.6	2.5	120
SRT 25Na 1K	25	1	1.2	12.5	7.3	5.6	2.5	119
SRT 25Na 3K	25	3	1.2	12.5	7.3	5.6	2.5	117
SRT 25Na 5K	25	5	1.2	12.5	7.3	5.6	2.5	115
SRT 25Na 10K	25	10	1.2	12.5	7.3	5.6	2.5	110
SRT 25Na 30K	25	30	1.2	12.5	7.3	5.6	2.5	90
SRT-25Na 60K	25	60	1.2	12.5	7.3	5.6	2.5	60
SRT 25Na 120K	25	120	1.2	1.25	7.3	5.6	2.5	

	ClNa	ClRb	Cl <sub>2</sub> Mg	Tris	ClH	glucosa	Cl <sub>2</sub> Ca
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
SRT OK 1Rb	144	1	1.2	12.5	7.3	5.6	2.5
SRT OK 5Rb	140	5	1.2	12.5	7.3	5.6	2.5
SRT OK 7Rb	138	7	1.2	12.5	7.3	5.6	2.5
SRT OK 10Rb	135	10	1.2	12.5	7.3	5.6	2.5
SRT OK 25Rb	120	25	1.2	12.5	7.3	5.6	2.5
SRT OK-100Rb	45	100	1.2	12.5	7.3	5.6	2.5

	ClNa	ClK	Cl <sub>2</sub> Mg	Tris	ClH	glucosa	Cl <sub>2</sub> Ca	Clcolina
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
SRT-ONa		5	1.2	8	4.5	5.6	2.5	145
SRT-1Na	1	5	1.2	8	4.5	5.6	2.5	144
SRT-3Na	3	5	1.2	8	4.5	5.6	2.5	142
SRT-5Na	5	5	1.2	8	4.5	5.6	2.5	140
SRT-10Na	10	5	1.2	8	4.5	5.6	2.5	135
SRT-50Na	50	5	1.2	8	4.5	5.6	2.5	95
SRT-100Na	100	5	1.2	8	4.5	5.6	2.5	45

	ClNa	ClK	Cl <sub>2</sub> Mg	Tris	ClH	glucosa	Cl <sub>2</sub> Ca
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
SRT-0Ca	145	5	1.2	11.5	6.5	5.6	
SRT-0.05Ca	145	5	1.2	11.4	6.5	5.6	0.05
SRT-0.1Ca	145	5	1.2	11.3	6.4	5.6	0.1
SRT-0.2Ca	145	5	1.2	11.2	6.3	5.6	0.2
SRT-0.3Ca	145	5	1.2	11.1	6.2	5.6	0.3
SRT-0.5Ca	145	5	1.2	10.8	6.0	5.6	0.5
SRT-1Ca	145	5	1.2	10.1	5.6	5.6	1.0
SRT-2.5Ca	145	5	1.2	8	4.5	5.6	2.5
SRT-5Ca	145	5	1.2	4.6	2.6	5.6	5.0

	ClNa	ClK	Cl <sub>2</sub> Mg	Tris	ClH	glucosa	Cl <sub>2</sub> Ba
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
SRT 0Ca 0.1Ba	145	5	1.2	11.3	6.4	5.6	0.1
SRT 0Ca 0.5Ba	145	5	1.2	10.8	6.0	5.6	0.5
SRT 0Ca 1Ba	145	5	1.2	10.1	5.6	5.6	1
SRT 0Ca 2Ba	145	5	1.2	8.7	4.8	5.6	2
SRT 0Ca 5 Ba	145	5	1.2	4.6	2.6	5.6	5
SRT 0Ca 10 Ba	145	5	1.2	1.8	1	5.6	10

	ClNa	ClK	Cl <sub>2</sub> Mg	Tris	ClH	glucosa	Cl <sub>2</sub> Sr
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
SRT-0Ca 0Mg	145	5		13.1	7.5	5.6	
SRT-0Ca 0.1Mg	145	5	0.1	13.0	7.4	5.6	
SRT-0Ca 0.5Mg	145	5	0.5	12.5	7.1	5.6	
SRT-0Ca 1Mg	145	5	1	11.7	6.9	5.6	
SRT-0Ca 2Mg	145	5	2	10.4	6.1	5.6	
SRT-0Ca 3Mg	145	5	3	9.1	5.3	5.6	
SRT-0Ca 5Mg	145	5	5	6.5	3.6	5.6	
SRT-0Ca 10Mg	145	5	10	1.8	1.0	5.6	
SRT-0Ca 10Sr	145	5	1.2	1.8	1.0	5.6	10

	GluNa	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	SO <sub>4</sub> Mg	Tris	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	glucosa	Glu <sub>2</sub> Ca	sacarosa
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
SRT-OC1	145	2.5	1.2	10	2.2	5.6	2.5	
SRT-OC1-25Na-1K	25	0.5	1.2	10	2.2	5.6	2.5	246
SRT-OC1-25Na-5K	25	2.5	1.2	10	2.2	5.6	2.5	240
SRT-OC1-25Na-60K	25	30	1.2	10	2.2	5.6	2.5	172

La composición del PBS en gr/lt: ClNa: 8; ClK: 0.2; PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub>: 1.2;

PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na: 0.2; pH: 7.2

#### - Drogas y reactivos

Todas las drogas y reactivos usados fueron de calidad proanálisis. Los inhibidores usados: ouabaína, desoxicolato de sodio, quinina y valinomicina fueron de Sigma Chem. Corp.; iodoacetato de BDH Labs.; 2,4,6 triaminipirimidina de Aldrich Labs y amiloride de Sintyal Labs.

#### - Técnicas empleadas

##### - Enriquecimiento en sodio

Para producir la estimulación de los sistemas de transporte, se incubó los PEs en SRK-OK durante 16 horas a 4°C. De esta manera se obtuvo PEs ricos en Na<sup>+</sup> y deplecionados de potasio.

##### - Sistema de medición eléctrico de las DP

El sistema de medición eléctrico de las DP consistió en empalar

los PEs con microelectrodos (ME) tipo Ling-Gerard preparados como se refiere más abajo. El ME se conectó a través del electrodo  $\text{Ag/ClAg/Cl}^-$  a un seguidor catódico y a un preamplificador con ganancia variable. La salida del preamplificador que además posee un compensador de la capacitancia, se conectó en paralelo a un osciloscopio Trío (30 MHz) y a un graficador que permitió el mismo tiempo que inscribir cada medición de DP observar la señal en el osciloscopio donde también pudo ser fotografiada. El circuito se cierra con un segundo electrodo  $\text{Ag/ClAg/Cl}^-$  que a través del puente salino en agar al 2% se inserta en la cámara de medición por un lado y a tierra por el otro (Figura 4b). La observación de los PEs antes, durante y después del empalamento se realizó mediante un microscopio invertido (Carl Zeiss) con un aumento habitual de X200.

Todo el sistema de medición se colocó dentro de una caja de Faraday que lleva a tierra cualquier señal ajena a la medición. Esta caja contruida con tejido de alambre y caños metálicos permitió disminuir el ruido hasta menor de 0.6 mvolt. valor aceptable para el rango de las DP registradas en el tegumento del PE.

#### - Diseño de los ME:

Los ME consisten en tubos capilares dotados con fibra de llenado (Frederick-Haer & Co.) de 5 cm de longitud y 0.15 cm de diámetro externo cuyos extremos terminan en puntas de tamaño entre 0.2 a 0.3  $\mu\text{m}$ . Estas puntas se obtienen mediante un estirador de pipeta que posee una lámina de platino fumante a través de la cual se coloca el capilar por un extremo fijo y por el otro sostenido a un dispositivo que ejerce una tracción positiva. El vidrio que por el calor se deforma y por la presión ejercida se estira, forma una estrangulación cada vez más delgada hasta separarse en dos capilares con puntas muy aguzadas. Así con cada procedimiento

como el descripto se obtuvieron 2 ME.

Posteriormente se procedió al llenado de los ME obtenidos por inmersión de éstos en una solución de CLK 2.8 M durante unos minutos dejando fuera el extremo más fino. De esta manera se llenó este extremo por capilaridad mientras que el resto se completó introduciendo la solución de CLK con jeringa y aguja muy fina diseñadas para ello. Luego los ME se guardaron en cámara húmeda y se usaron hasta 48 horas de elaborados sólo aquellos de resistencia de punta entre 20 y 30 MΩ.

#### - Propiedades de la punta del ME.

La medición de DP mediante la técnica de ME requiere realizar un control estricto sobre las propiedades de los ME. Es decir, la resistencia y el potencial de la punta de los mismos (Schanne y col., 1968). En los registros de DP se usaron ME con resistencia de punta entre 20 y 40 MΩ, siendo descartados cuando se observaron cambios del 10 al 20% de su valor. Las resistencias fueron controladas antes y después del empalamento del PE durante la experiencia, mediante un circuito generador de pulsos cuadrados adicionado al preamplificador. El pulso cuadrado de amplitud 0.5 volt. p-p, pasa a través del ME dispuesto en el sistema de medición y produce, debido a su resistencia de punta, una diferencia de potencial eléctrico que se observa en el osciloscopio. Previamente se calibra el osciloscopio pasando el pulso eléctrico por resistencias conocidas entre 10 y 40 MΩ.

Por otra parte el potencial de punta de los ME usados fue entre 2 y 5 mV. Estos se midieron mediante un milivoltímetro Orión cuyos bordes terminales se conectaron a los extremos libres de dos electrodos de Ag/ClAg/Cl<sup>-</sup> que terminan en un ME y un puente de agar respectivamente. Previo a la medición del potencial de punta de un ME, se estableció el cero del milivoltímetro colocando puentes de agar en los terminales libres de ambos elec-

trodos de  $\text{Ag}/\text{ClAg}/\text{Cl}^-$  (2.8 M).

#### - Procedimientos empleados para la medición de la DP

##### Procedimiento I:

El primer procedimiento consistió en la medición de las DP en una población de PEs (Figura 4a). Los registros de las DP se obtuvieron a partir de empalear los PEs suspendidos en una cámara de plexiglass que contiene en su centro una red de tejido de nylon de monofilamentos que forman un retículo cuadrado de  $100 \mu\text{m}$  de lado. De esta manera los PEs cuyos diámetro mayor oscila entre  $120$  y  $140 \mu\text{m}$  quedan suspendidos en la red en un volumen aproximado de SRK de  $1.5 \text{ ml}$ .

##### Procedimiento II:

El segundo procedimiento consistió en la medición de las DP en un mismo PE (Figura 4b). El PE suspendido en SRK y colocado en un portaobjetos que posee seis cavidades independientes fue aspirado en una micropipeta preparada como se refiere más abajo. La micropipeta montada sobre un micromanipulador y conectada a un sistema de vacío, permitió retener el PE elegido previamente. El cambio del PE de un baño a otro se realizó por rápidos movimientos ascendentes y descendentes de la platina del microscopio invertido que soporta el portaobjetos. Entonces fue posible tomar mediciones de DP de una a otra solución experimental en tiempos menores o iguales a  $15$  segundos.

#### - Diseño de la micropipeta

Las micropipetas se elaboraron a partir de capilares de vidrio Pirex de  $2,5 \text{ mm}$  de diámetro externo colocados en el estirador de pipetas. Debido al calor aplicado al vidrio mediante el filamento de tungsteno se confec-

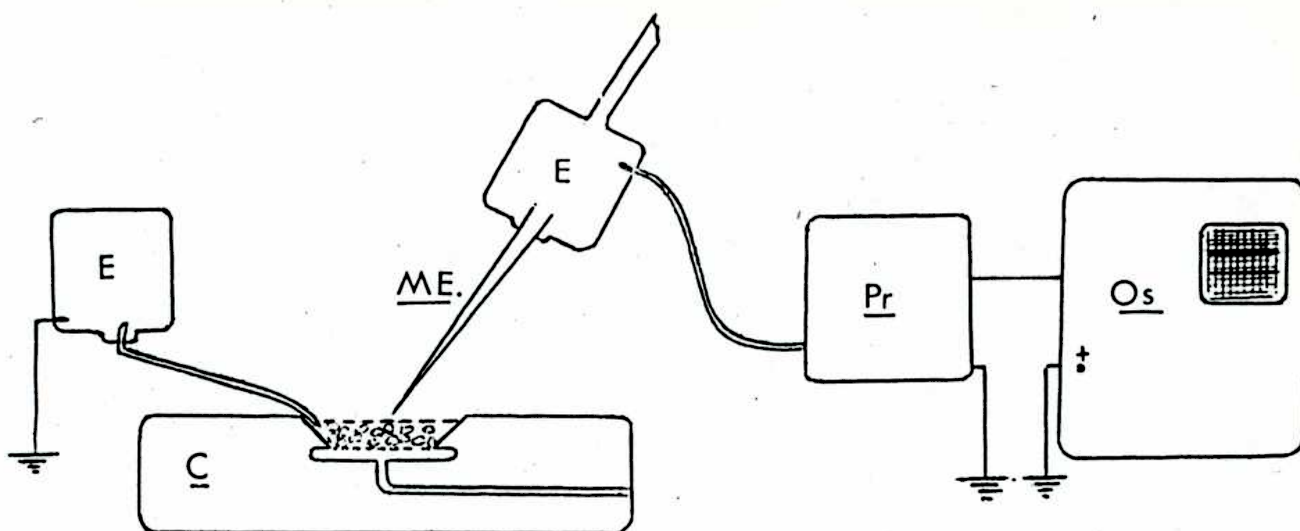


FIGURA 4a: C) cámara de medición; M.E.) microelectrodo;  
 E) electrodos Ag, ClAg, ClK 2.8M; Pr) preamplifi-  
 cador; Os) Osciloscopio.

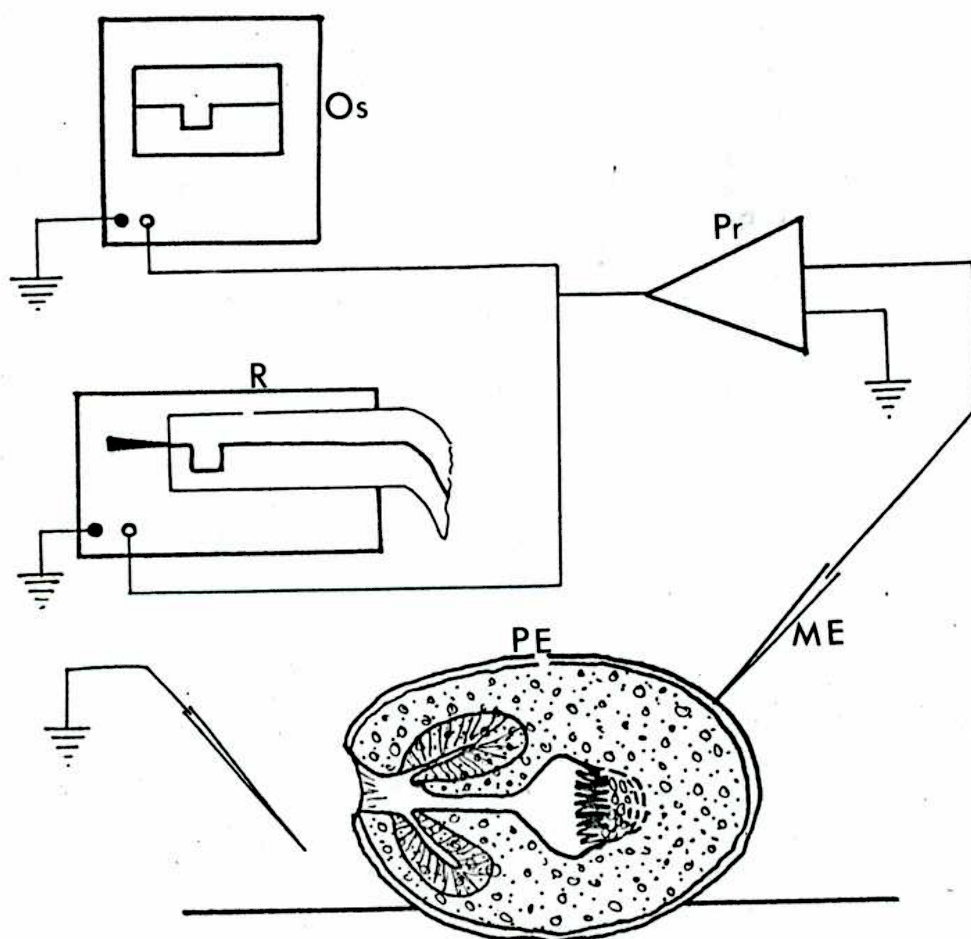


FIGURA 4B: PE) protoescoléx; ME) microelectrodo; MP) micropipeta;  
 Pr) preamplificador; Os) osciloscopio; R) registrador.



cionaron micropipetas de punta muy finas que se rompieron a fin de obtener un diámetro interno de las mismas entre 60 y 80  $\mu\text{m}$ . Luego se sometieron a las puntas a cortas exposiciones de calor generado en el mismo filamento hasta lograr fundir y redondear las aristas del vidrio que permitió manipular los PEs sin dañarlos.

#### - Prueba de inmunofluorescencia indirecta

Los PEs obtenidos de la manera habitual se lavaron repetidas veces con PBS que contiene además 1% de albúmina y 0.1% de azida sódica. Se dejó decantar a 4°C y se descartó el sobrenadante. Luego se tomaron cuatro alícuotas de PEs de 0.1 ml cada una y se resuspendieron en 50  $\mu\text{l}$  de suero de individuo normal total o inactivado (30 minutos a 56°C) y suero de paciente hidatídico total o inactivado diluidos ambos al 10% en PBS. Se incubó 30 minutos a 4°C y posteriormente se lavaron repetidas veces en PBS. De nuevo se dejó decantar descartando el sobrenadante. A continuación se agregó inmunoglobulina de conejo anti gamaglobulina humana\* conjugada con isotiocianato de fluoresceína y diluída al 0.01% incubándose 30 minutos a 4°C. Se lavó 2 o 3 veces repitiendo el procedimiento anterior y se resuspendió en un volumen pequeño. Luego, los PEs obtenidos en las distintas condiciones se colocaron en un portaobjetos y se observaron con microscopio de fluorescencia.

\*La inmunoglobulina de conejo fue cedida gentilmente por el Dr. Oscar Burrone.

#### - Estadística

Los datos se informan como media  $\pm$  un error standard de la media (número de casos). La media se calculó con la fórmula:

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{N}$$

donde N es el número de casos y  $X_i$  cada valor individual. El error estándar se obtuvo de la ecuación:

$$ES = \frac{DS}{\sqrt{N}} \quad \text{donde DS (desviación standard) se calculó de:}$$

$$DS = \sqrt{\frac{\sum X_i^2 - N (\sum X_i)^2}{N (N - 1)}}$$

Las rectas de regresión y coeficientes de correlación lineal se calcularon en una calculadora Texas modelo SR 51-II. El grado de significación "p" se obtuvo a partir del cálculo del valor "t" de Student y su respectiva probabilidad se halló en tablas de Student para los grados de libertad  $n = N - 2$  donde N es el número total de casos.

Para el tratamiento de los resultados obtenidos con suero de paciente hidatídico mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, se aplicó la prueba del  $\chi^2$ .

PEs preincubados en	Fluorescencia	No fluorescencia	Totales
Suero de paciente hidatídico	a	c	e
Suero de individuo normal	b	d	f
Totales	g	h	k

El grado de significancia se obtuvo a partir del cálculo del  $\chi^2$  dado por la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \frac{(bc - ad)^2 k}{efgh}$$

donde se estableció, de acuerdo a las tablas del  $\chi^2$ , que un valor de  $\chi^2 \geq 3,85$  que corresponde a una probabilidad del 5% ( $P < 0.05$ ) era suficiente para considerar que en una asociación de 2 x 2 como la representada anteriormente, las frecuencias observadas en ambas distribuciones difieren significativamente entre sí.

Algunas de las curvas que se indican en Resultados fueron calculadas mediante el uso del programa elaborado por Rossi y Garrahan (1984). Se empleó una calculadora Texas TI 99/4A.

## RESULTADOS

### I. Registros de las DP en poblaciones de protoescolices.

#### - Distribución de los valores

Los registros de las DP se midieron en PEs suspendidos en una cámara de plexiglass de acuerdo al procedimiento I ya descrito en la sección Materiales y Métodos. Las mediciones se realizaron en PE frescos y en PE ricos en  $\text{Na}^+$ . En ambos casos las experiencias se efectuaron en ausencia o en presencia de  $10^{-4}$  M de ouabaína. Para cada una de las condiciones experimentales, las distribuciones de los registros de las DP individuales se analizaron mediante histogramas. Se observó que todas las distribuciones tienen características monomodales con una sola población detectable (Figura 5). Por otra parte los PEs frescos presentan una ligera asimetría con respecto a los PEs ricos en  $\text{Na}^+$  donde parecería que en estos últimos el enriquecimiento en  $\text{Na}^+$  produce un desplazamiento de los valores hacia DP más negativos con una menor dispersión en sus poblaciones. En presencia de ouabaína, tanto para PEs frescos como para aquellos ricos en  $\text{Na}^+$ , la distribución de población de las DP muestra una asimetría hacia la derecha que podría explicarse como consecuencia de la variabilidad de la sensibilidad de cada PE a la ouabaína. Por otra parte, los registros de

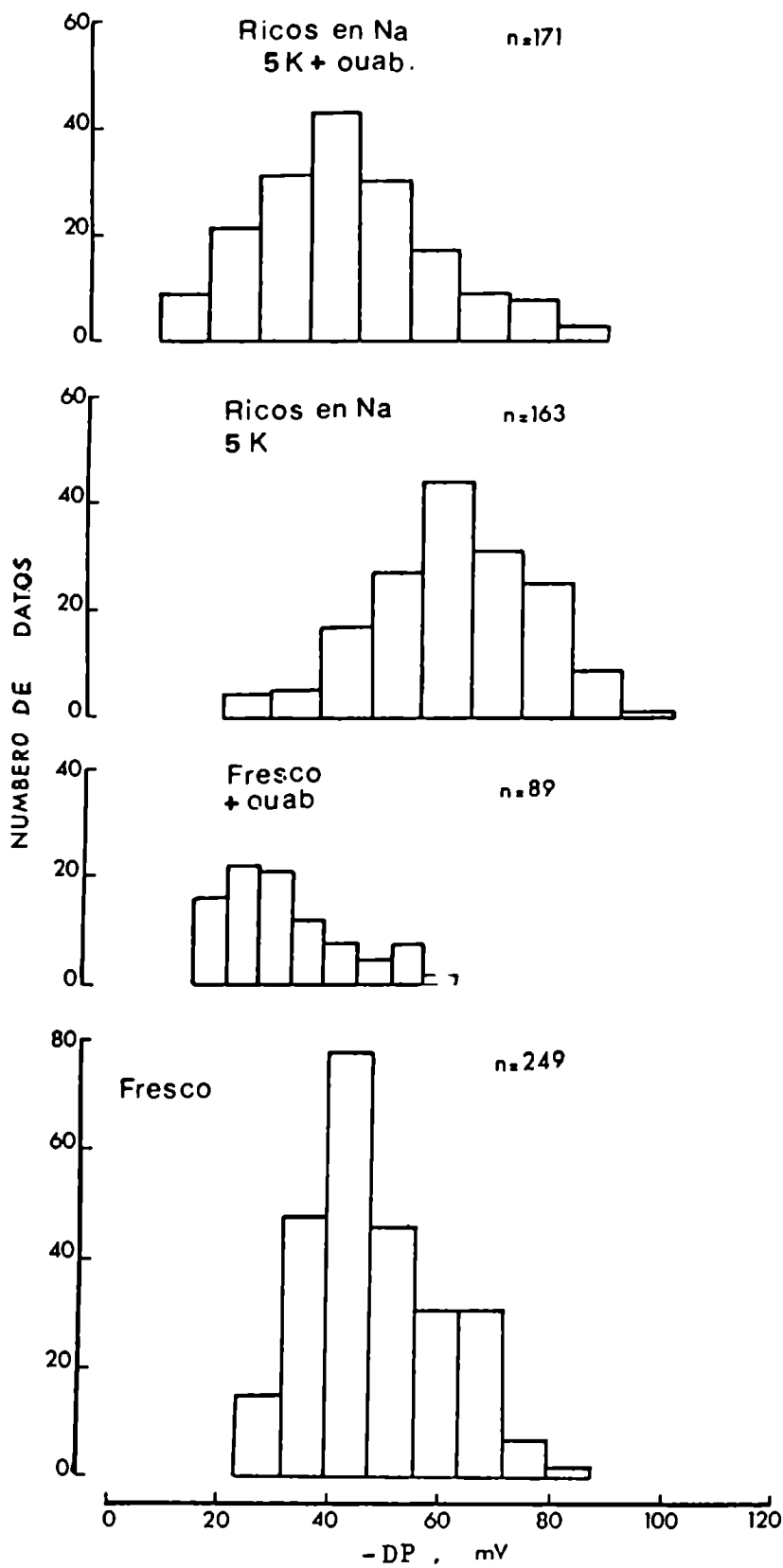
las DP obtenidos como consecuencia de empalar en distintas regiones de un mismo PE no parecerían presentar una distribución topográfica distinta a las descritas más arriba. Mediciones de las DP realizadas mediante el procedimiento II que se describirán posteriormente confirman estas conclusiones.

- Duración de los registros de las DP.

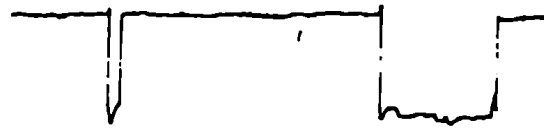
El análisis de los registros de las DP muestra que la duración de cada una de ellas no es constante sino que varió entre valores menores de 1 segundo a 6 segundos o más. En algunos casos favorables, particularmente cuando el ME pareció penetrar tangencialmente a la superficie del PE, fue posible registros de DP por períodos más prolongados (Figura 6). Como los valores de las DP pueden depender del tiempo de empalamento debido al "sellado de la membrana celular en derredor del ME (Schanne y col., 1968) se analizó qué relación existe entre la duración de los registros de las DP y el valor de los mismos. La Figura 7 muestra que la duración de las DP, agrupadas en intervalos de 1 segundo, es independiente de la duración del empalamento. En otras palabras, en los PEs frescos o ricos en  $\text{Na}^+$ , las DP medidas se mantuvieron relativamente constantes independientes del tiempo durante el cual se obtuvo el registro. Por consiguiente, estos resultados indicarían que los DP registrados aún durante empalamientos de un segundo refleja el valor de la DP real a través del tegumento del PE.

- Valores de las DP en PEs frescos o ricos en  $\text{Na}^+$ . Acción de la ouabaína.

Estudios de Reisin, Cantiello y Rotunno (1977) mostraron que un 50% de la entrada del  $\text{K}^+$  al PE puede ser inhibida por la ouabaína y postularon la existencia de una bomba Na/K ouabaína-sensible que regula el balance de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en los PEs. Teniendo en cuenta estos resultados se trató de

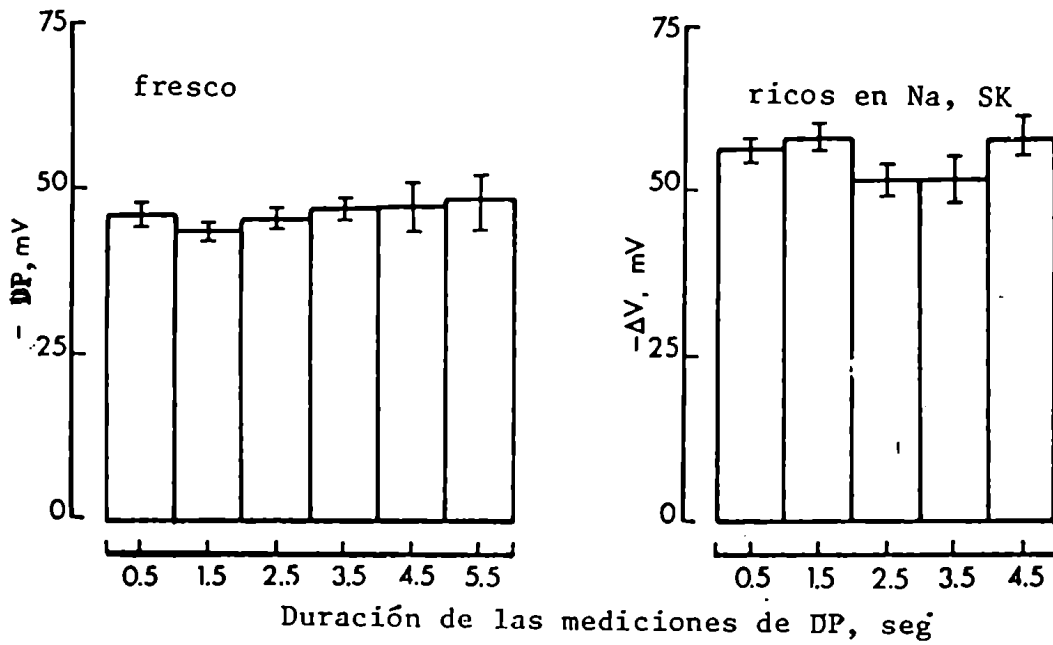


**FIGURA 5:** Histograma correspondiente a PE frescos o ricos en  $\text{Na}^+$  incubados en SRK en presencia o en ausencia de ouabaína ( $10^{-4}$  M). El número de datos representa los distintos empalmientos realizados en PEs mediante el procedimiento I.



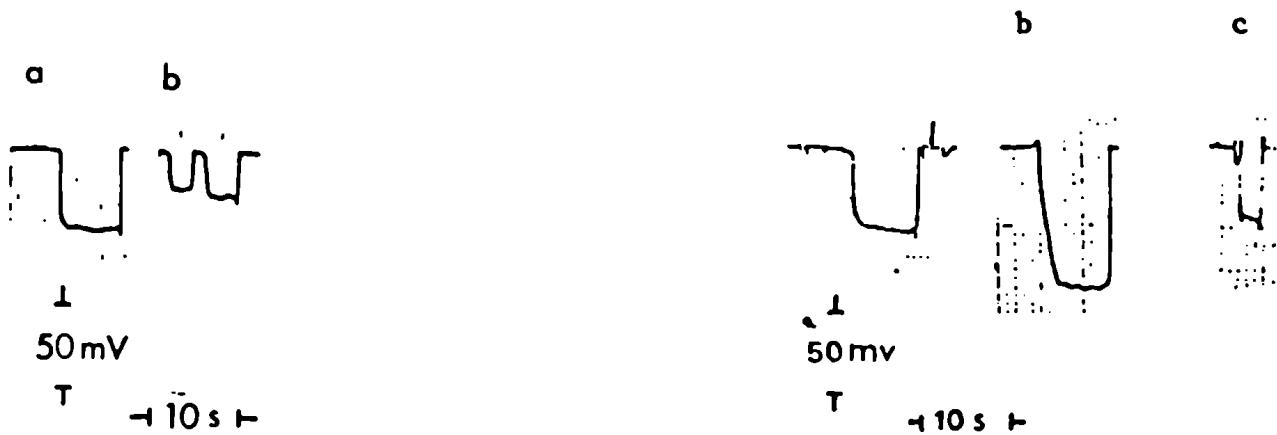
$\perp$   
 50 mV  
 $\tau$   
 10 s

**FIGURA 6:** Registros de las DP de duración variable obtenidos de dos empalmientos distintos realizados sobre un dado PE.



**FIGURA 7:** Efecto que produce la duración de los registros sobre las DP medidas.

establecer si la bomba Na/K contribuye al mantenimiento de las DP (Cantiello y col., 1980). Los primeros grupos de experiencias se realizaron usando PEs frescos (Figura 8) y PEs ricos en Na<sup>+</sup> (Figura 9).



PIRTOESCOLICES FRESCOS

- a) medidos en SRK -5K
- b) medidos en SRK-5K + ouabafna  $10^{-4}$  M.

PROTOESCOLICES RICOS EN SODIO

- a) medidos en SRK-OK
- b) medidos en SRK-5K
- c) medidos en SRK-5K + ouabafna  $10^{-4}$  M.

FIGURAS 8 y 9: Registros de las DP medidas en un PE fresco y un PE rico en Na<sup>+</sup>.

El valor de las DP que en PEs frescos fue de -48 mV, se depolarizó parcialmente a -35 mV por el agregado de  $10^{-4}$  M de ouabaína en el baño externo (Tabla 1). Por otra parte, las experiencias realizadas en PEs ricos en Na<sup>+</sup> mostraron que las DP inicialmente depolarizada a valores de -28 mV en ausencia de K<sup>+</sup> externo, se hiperpolarizaron notablemente a -60 mV por la introducción de 5 mM de K<sup>+</sup> en el baño externo y esta hiperpolarización pudo ser inhibida por el agregado de ouabaína (Tabla 1).



Condición	Medición en	I*		II*	
		DP <sub>neg</sub>	DP <sub>pos</sub>	DP <sub>neg</sub>	DP <sub>pos</sub>
<u>mV</u>					
PEs frescos	SRK	-49 <sub>±</sub> 1 (351)		-53 <sub>±</sub> 1 (57)	
	SRK + ouab. 10 <sup>-4</sup> M	-35 <sub>±</sub> 1 (113)		-37 <sub>±</sub> 1 (4)	
PEs ricos en Na <sup>+</sup>	SRK - OK	-32 <sub>±</sub> 1 (9)	+15 <sub>±</sub> 1(9)	-28 <sub>±</sub> 2 (4)	+19 <sub>±</sub> 1(4)
	SRK	-61 <sub>±</sub> 1 (163)		-63 <sub>±</sub> 3 (4)	
	SRK + ouab. 10 <sup>-4</sup> M	-41 <sub>±</sub> 3 (171)		-42 <sub>±</sub> 2 (4)	--

\* experiencias realizadas en población de PEs

\*\*experiencias realizadas en un PEs aislados

TABLA 1

Además de las DP negativas observadas en SRK-OK, se produjo la aparición de deflexiones positivas que desaparecen por el agregado de 5 mM de K<sup>+</sup> en el baño externo. El significado de estas DP positivas son analizadas más abajo. Estos resultados similares a los obtenidos con el procedimiento II, demuestran que existen por lo menos dos componentes de las DP, uno ouabaíno sensible activado por K<sup>+</sup> externo y otro ouabaíno insensible en concordancia con aquellos descritos por Marmor y Góрман (1970) en neurona de molusco.

- Efecto del tiempo de preincubación a 37°C sobre las DP en PEs conservados a 4°C.

Los PEs tienen la propiedad de resistir fuera de su huésped intermediario

por tiempos prolongados aún a bajas temperaturas conservando su vitalidad y viabilidad. Reisin, Rabito y Cantiello (1981) midieron los flujos de entrada de  $K^+$  o  $Rb^+$  en PEs incubados a  $4^{\circ}C$  hasta una semana y establecieron que el mecanismo de transporte activo está presente durante todo ese período. Las mediciones de las DP en función del tiempo de conservación de los PEs a  $4^{\circ}C$  en SRK muestran una notable y progresiva hiperpolarización con respecto a los valores de los PEs frescos (Figura 10). Sin embargo si a los PEs conservados a  $4^{\circ}C$  se los somete a una preincubación de 1 a 2 horas a  $37^{\circ}C$  en una nueva solución de SRK, se observa que las DP no son significativamente diferentes a los valores de los PEs frescos.

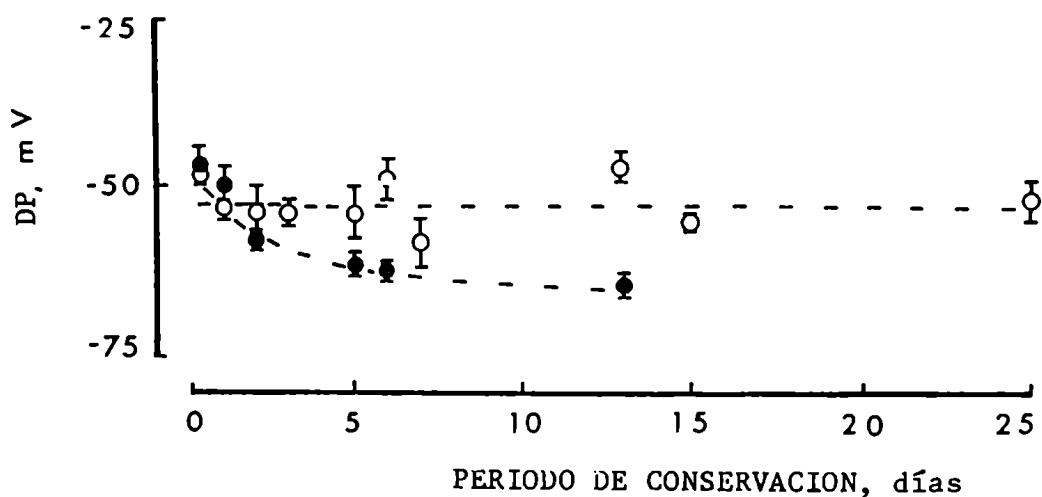


FIGURA 10: Efecto que produce sobre las DP la preincubación durante 1/2 hora (●) o 2 horas (○) de los PEs conservados a  $4^{\circ}C$  por períodos de hasta 25 días.

- Efecto del iodoacetato sobre la DP

Agosin y Repetto (1963) demostraron que el parásito obtiene energía en

condiciones anaeróbicas fundamentalmente a partir de la degradación de glucógeno en ácido láctico. Reisin e Ibarra (1980) establecieron que el consumo de  $O_2$  se inhibe en un 56% con respecto a los controles por acción del iodoacetato (IA). Reisin y col. (1981) observaron que el balance de  $Na^+$  y  $K^+$  se altera significativamente durante la primera hora de tratamiento de los PEs con 3 mM de IA. Estos resultados indicarían que la principal fuente energética de los PEs está asociada a la glucólisis, de manera que la degradación de glucógeno proporcionarí­a la energía necesaria para los mecanismos de transporte activo que mantienen el balance de  $Na^+$  y  $K^+$  en el PE. Si así fuese, debería existir una relación entre las DP y la actividad metabólica de la glucólisis anaeróbica. Se midieron entonces, las DP en presencia de un inhibidor de la glucólisis, el IA en concentraciones de 1 mM. La Tabla 2 muestra que en presencia de 1 mM de IA durante 1 hora a  $37^\circ C$ , se produce una significativa e irreversible depolarización en los registros de las DP con respecto a los controles.

#### - Efecto de triaminopirimidina sobre las DP

La 2-4-6 triaminopirimidina (TAP), en epitelios de baja "resistencia" (leaky epithelia) aumenta notablemente su resistencia eléctrica y su mecanismo sería resultado del bloqueo del movimiento de cationes a través de las uniones estrechas (Moreno, 1975). En epitelios de "alta resistencia" eléctrica (tight epithelia), este fármaco bloquea específicamente los canales de  $Na^+$  ubicados en la membrana apical celular (Balaban y col., 1979). Las características del tegumento del PE, si bien se asemeja funcionalmente al modelo de epitelios formados por células con áreas de contacto donde se encuentran las uniones estrechas, es un verdadero sincicio, en el que el citoplasma celular se extiende de una célula a otra sin presentar soluciones de continuidad (Morseth 1966 y 1967). Por consiguiente fue de interés estudiar los

posible efectos del TAP sobre el tegumento del PE. En estas experiencias se midieron las DP de PE frescos, en presencia y en ausencia de 10 mM de TAP. La Tabla 2 muestra los valores obtenidos donde se observa que, a pH 6.1, no hay efectos significativos sobre las DP en presencia de TAP. Las experiencias se realizaron en SRK a pH 6.1 pues se sabe que el TAP ejerce su máximo efecto a ese pH debido a que se encuentra en la forma disociada más activa (Moreno, 1975). Además, en otras experiencias se demostró que variaciones de pH de 6.1 a 7.4 no modifican significativamente las DP con respecto a sus controles (Tabla 2).

Medición en	DP mV
SRK	-50 ± 1 (93)
SRK + IA, 1 mM	-37 ± 2 (41) <sup>1</sup>
SRK pH 7.2	-58 ± 2 (34)
SRK pH 6.1	-60 ± 2 (69)
SRK pH 6.1 + TAP 10 mM	-56 ± 2 (54)

TABLA 2

Hasta aquí de las experiencias realizadas en población de PEs en las cuales se midieron las DP de acuerdo al procedimiento I, se establece que: a) desde el punto de vista de los registros de las DP negativas, existiría una sola población de valores; b) los registros de las DP son

independientes de la duración de las mismas; c) las DP dependen del metabolismo del parásito y d) existen por lo menos dos componentes de la DP, uno sensible a la ouabaína, y otro insensible a esta droga, que se estudió en detalle en preparaciones de PEs aislados.

## II. Registros de las DP en PEs aislados

En este capítulo se relatan las experiencias en las cuales se midieron las DP en un PE de acuerdo al procedimiento II. Una de las mayores ventajas de este sistema de medición de PEs aislados radica en que es posible elegir un determinado PE y estudiar las DP del mismo sometido a distintas condiciones experimentales. De esta manera, las DP de cada PE sirve como su propio control y es posible analizar la sensibilidad del mismo a distintos tratamientos con drogas, cambio de la composición del baño externo, etc.

### - Medición de las DP en PEs frescos o ricos en $\text{Na}^+$ . Acción de la ouabaína.

En un primer grupo de experiencias los registros de las DP se realizaron con PEs frescos y con PEs ricos en  $\text{Na}^+$ . En todos los casos, previo a las mediciones, los PEs se preincubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 horas, resuspendidos en SRK los PEs frescos y en SRK-OK los PEs ricos en  $\text{Na}^+$ . Los PEs suspendidos en SRK se los colocó en un portaobjetos excavado que posee seis cavidades independientes a las que se agregó en una de ellas SRK y en otra SRK con  $10^{-4}$  M de ouabaína. Las observaciones de los PEs para su manipulación y empalamento se hicieron mediante microscopio óptico invertido. Se seleccionó un PE, aspiró y retuvo con la micropipeta (Figura 11) y mediante un rápido cambio de la posición de la platina, se trasladó el PE de una a otra de las cavidades del portaobjetos conteniendo otra solución de SRK donde se midieron las DP. A continuación se repitió el procedimiento descripto y el mismo PE se suspendió en SRK en presencia de ouabaína midiéndose nuevamente las DP. El cambio del PE de un baño a otro se realizó en pocos segundos y fue posible tomar mediciones de una a otra solución en tiempos no mayores a 15 segundos. La Figura 12 muestra una experiencia en la cual

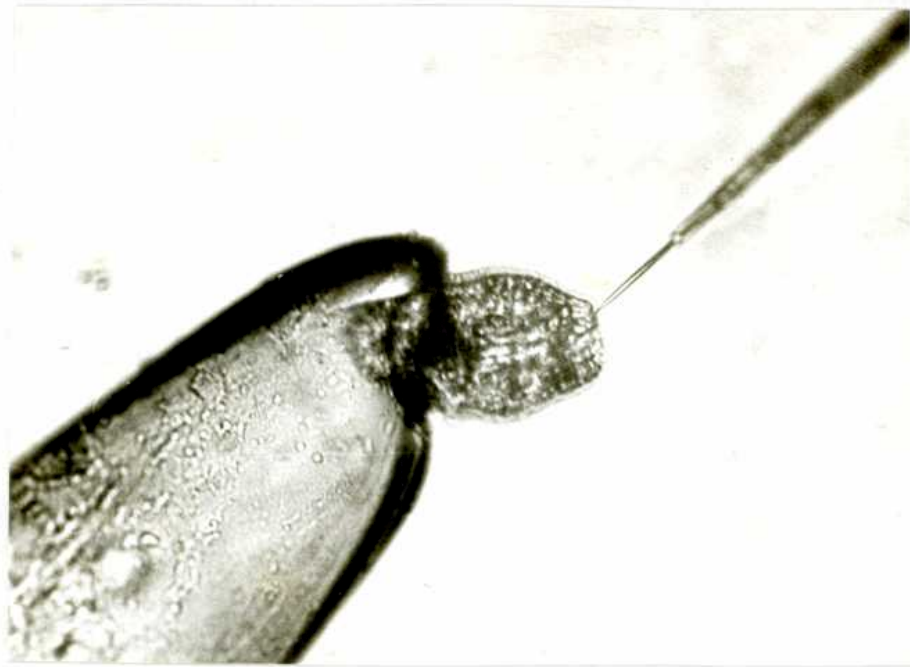


FIGURA 11: Medición de las DP en un PE mediante microelectrodo. Los PEs se transfieren de un baño a otro mediante una micropipeta.

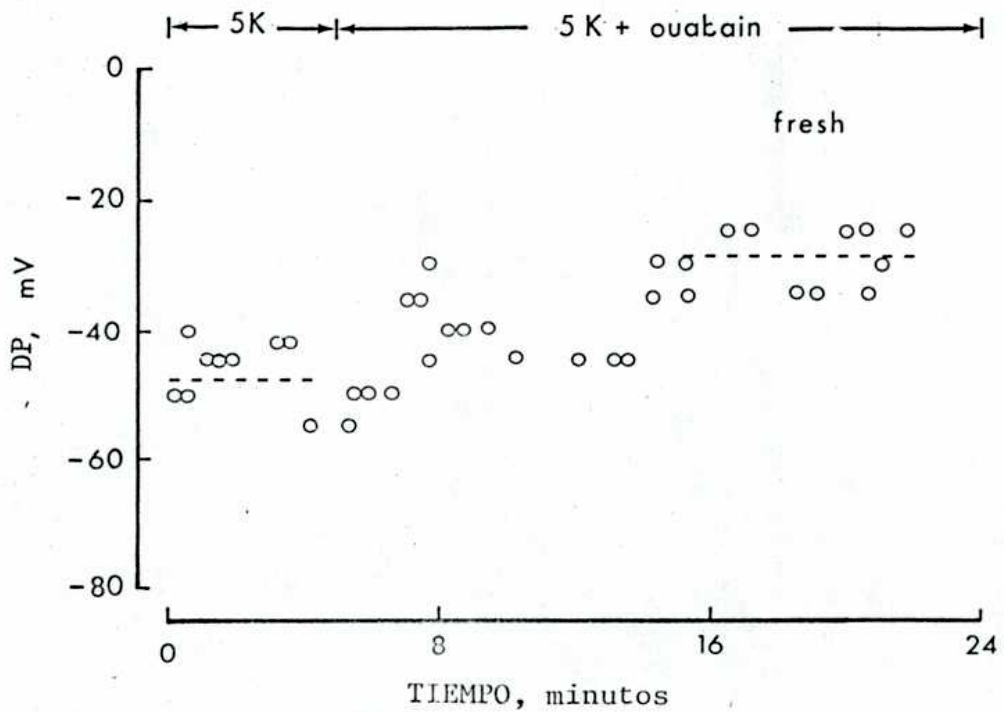
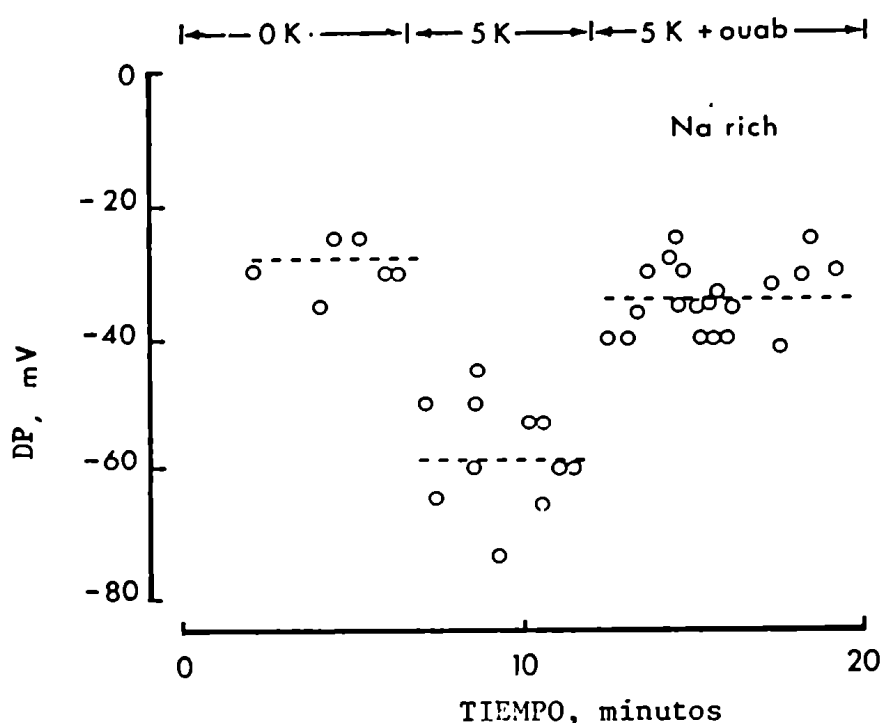


FIGURA 12: Efecto de la ouabaína sobre las DP en un PE fresco donde se detecta el componente de la DP inhibido por ouabaína ( $10^{-4}$  M)

se midieron las DP en un PE fresco. Los círculos llenos representan los valores obtenidos mediante cada empalamento individual del PE en condiciones control (SRK) y del mismo PE en presencia de ouabaína. Se puede observar que las DP cuyo valor promedio es de  $-47$  mV en condiciones control se despolariza significativamente a  $-27$  mV en presencia de la ouabaína. Por otra parte se realizan mediciones similares en PEs ricos en  $\text{Na}^+$ . El protocolo experimental seguido en estos casos fue el de bañar al PE en: 1) SRK-OK, 2) SRK y 3) SRK en presencia de  $10^{-4}$  M de ouabaína. En cada caso se realizaron mediciones de las DP. La Figura 13 muestra una de las experiencias descritas en la cual en ausencia de  $\text{K}^+$  externo se registró una DP de  $-28$  mV. La introducción de  $5$  mM  $\text{K}^+$  en el baño externo hiperpolariza la DP a  $-58$  mV. El posterior agregado de ouabaína produce una rápida depolarización de la DP de  $-58$  mV a  $-34$  mV. La respuesta a la ouabaína de las DP de los PEs frescos y los PEs ricos en  $\text{Na}^+$  no son similares. Las DP de los PEs ricos en  $\text{Na}^+$  se depolarizan dentro de los 50 segundos de la transferencia del PE a una solución que contiene ouabaína mientras que en PEs frescos, la depolarización máxima producida por la ouabaína ocurre 10 minutos después (Figura 13). Su posible significado será visto en Discusión.



**FIGURA 13:** Efecto de la ouabaína sobre las DP en un PE rico en  $\text{Na}^+$ . El componente de la DP inhibido por ouabaína ( $10^{-4}$  M) es activado por  $\text{K}^+$  externo.



En la Tabla 1 se presentan los valores promedios para las DP obtenidas en estos experimentos. En PEs ricos en  $\text{Na}^+$  suspendidos en SRK-OK a más de las habituales DP negativas se registraron DP positivas cuya aparición fueron independientes de las DP negativas y que desaparecen en presencia de 5 mM de  $\text{K}^+$  en el baño externo. Su significado será analizado más adelante.

El análisis de los datos obtenidos con el procedimiento II confirmó las propiedades de las DP observadas con el procedimiento I. En particular, la ausencia de  $\text{K}^+$  externo como la presencia de la ouabaína depolariza las DP tanto en PEs controles como en PEs ricos en  $\text{Na}^+$ . Se pudo establecer entonces la existencia de una DP localizada sobre la superficie del PE, la cual tiene propiedades similares a las descritas en el capítulo anterior.

#### - Efecto del $\text{Cs}^+$ sobre las DP en ausencia de $\text{K}^+$ externo

En algunas preparaciones biológicas tales como el glóbulo rojo (Skou, 1965; Hoffman, 1969) la bomba de Na-K puede ser activada por el  $\text{Cs}^+$  cuando éste reemplaza al  $\text{K}^+$  en el baño externo. Se exploró entonces si la DP es afectada por la presencia de  $\text{Cs}^+$  en ausencia de  $\text{K}^+$  externo. Las experiencias se realizaron en PE ricos en  $\text{Na}^+$  e inicialmente suspendidos en SRK-OK. Luego de medir las DP en esta condición, se tomaron registros en presencia de SRK-OK con 25 mM de  $\text{Cs}^+$  para finalmente registrar las DP luego del agregado de  $10^{-4}$  M de ouabaína. La Tabla 3 muestra que en presencia del  $\text{Cs}^+$  externo tiene lugar una significativa hiperpolarización de la DP, la que es parcial mente inhibida por la ouabaína. Se estableció además la aparición de las DP positivas a lo largo de todo el protocolo experimental. Si se comparan las DP de PEs ricos en  $\text{Na}^+$  medidas en presencia de  $\text{Cs}^+$  (Tabla 3) con las DP medidas en SRK (Tabla 1), se observa que no son similares. En presencia de 25 mM  $\text{Cs}^+$ , la hiperpolarización respecto de sus controles es menor que

en presencia de 5 mM de  $K^+$ . Sin embargo en presencia de ouabaína, en ambas condiciones las DP son similares. Este efecto se podría atribuir a que el  $Cs^+$  puede reemplazar parcialmente la acción del  $K^+$  para activar el sistema de la bomba Na-K.

Medición en	DP <sub>neg</sub> mV	DP <sub>pos</sub> mV
SRK-OK	-28 <sub>±</sub> 2 (61)	+19 <sub>±</sub> 1 (45)
SRK-OK-25 mM $Cs^+$	-46 <sub>±</sub> 1 (112)	+17 <sub>±</sub> 1 (82)
SRK-OK-25 mM $Cs^+$ + ouab. $10^{-4}$ M	-39 <sub>±</sub> 2 (45)	+14 <sub>±</sub> 3 (7)

TABLA 3

- Registros de las DP en PEs suspendidas en SRT. Distribución de sus valores.

Los PE frescos o conservados a 4°C se preincubaron en SRK a 37°C durante 2 horas y se suspendieron en SRT para su empleo en las distintas experiencias. Habitualmente los períodos de medición, en PEs suspendidos en SRK no se extendieron más allá de 20 minutos. Sin embargo un problema que plantea el uso de la SRK es el de gasear con  $CO_2$ , debido a que haría imposible la observación del empalamento. En consecuencia, a lo largo de una experiencia se elimina  $CO_2$  de la SRK que altera el pH de la misma. El reemplazo de la solución tamponada  $CO_3H^-:CO_3H_2$  del SRK por Tris:ClH (SRT) sin producir variaciones significativas en los registros de DP, permitió realizar experiencias más largas sin necesidad de controlar la presión parcial del  $CO_2$  en el sistema de medición. La Tabla 4 muestra que los valores de DP obtenidos

Medición en	DP
	mV
SRT	-51 ± 1 (168)
SRT + ouab. 10 <sup>-4</sup> M	-37 ± 2 (21)

TABLA 4

Además la distribución de los valores de las DP de PEs aislados medidos en SRT y SRT en presencia de ouabaína tiene similares características a los obtenidos en SRK, o sea una sola población distinguible (Figura 14). Por otra parte, el análisis de los registros de las DP que corresponden a empalamientos realizados en distintas regiones de un mismo PE separadas aproximadamente 45° una de otra, indican que los valores medidos no son significativamente diferentes entre sí. Dicho de otra manera, las DP obtenidas como consecuencia de empalar varias veces a un mismo PE son independientes de la topografía del parásito.

- Cambios de las DP por tratamiento de los PEs con desoxicolato de Na.

Los registros de las DP se midieron en PEs mantenidos 24 horas a 4°C en SRK y preincubados en SRK, 2 horas a 37°C. Las mediciones se realizaron en PEs aislados en condiciones control y en presencia de desoxicolato de

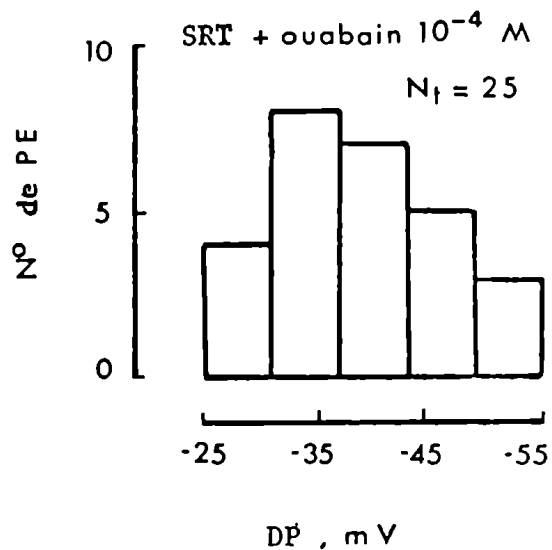
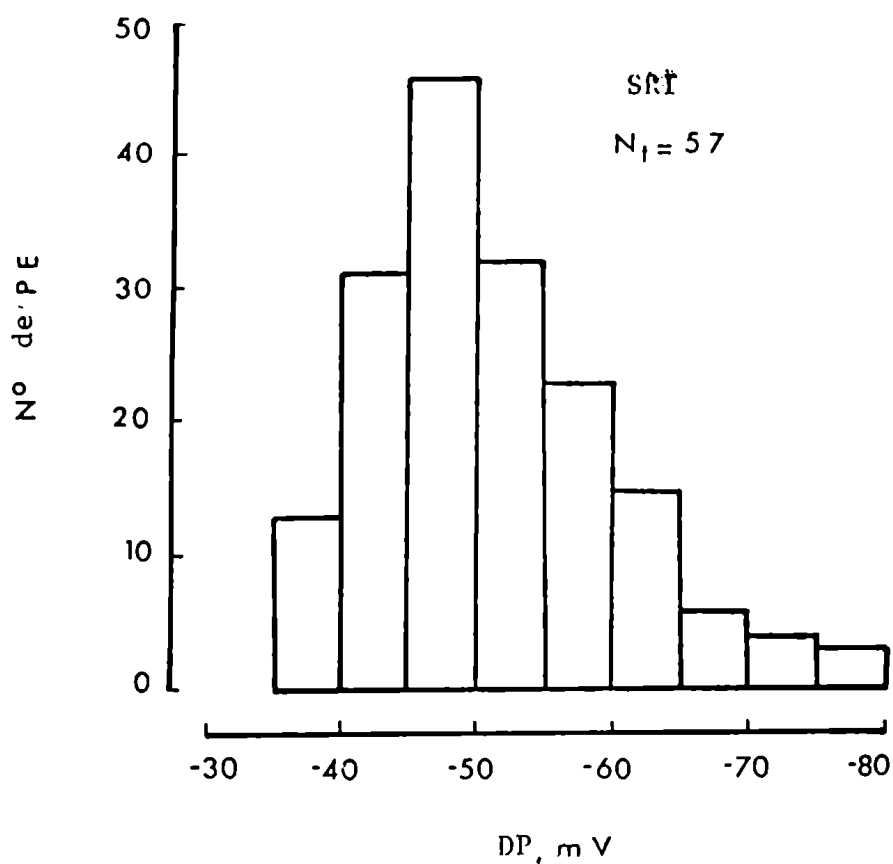


FIGURA 14: Histograma correspondiente a PE controles incubados en SRT en presencia o ausencia de ouabaína ( $10^{-4}$  M). El número de datos representa los empa<sup>l</sup>amentos realizados a distintos PEs mediante el procedimiento II.

Na<sup>+</sup> (DOC Na) en concentraciones de 1 y 0.1% (P/V) en SRT. La Figura 15 muestra una experiencia de este tipo donde se observa que para las dos concentraciones usadas de DOCNa, el detergente produce una significativa e irreversible depolarización de la DP que alcanza su valor máximo en menos de 10 minutos. En algunos casos el DOC Na ocasionó la total desaparición de las DP. Por otra parte la observación microscópica de los PEs tratados con 1% de DOC Na permitió constatar que se producen alteraciones del tegumento, formación de evaginaciones y posterior formación y desprendimiento de pequeñas vesículas. Todos estos fenómenos fueron observables en los primeros 5 minutos de exposición del PE al detergente.

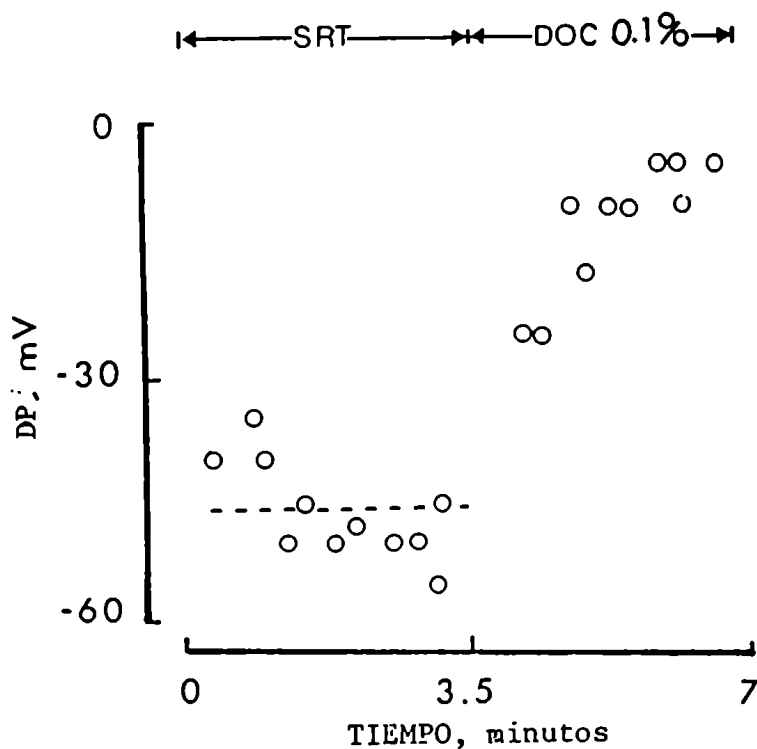


FIGURA 15: Efecto del DOC 0.1% sobre la DP en un PE fresco.

La Tabla 5 muestra la importante e irreversible depolarización de las DP observadas en presencia de DOC Na.

Medición en	DP
	mV
SRT	$-48 \pm 3$ (4)
SRT + DOC 0.1%	$-18 \pm 6$ (2)
SRT + DOC 1%	$-10 \pm 1$ (2)

TABLA 5

Es importante mencionar aquí que la observación de una DP prácticamente de 0 mV cuando se empala un dado PE en presencia de DOC Na indicaría que las DP tegumentarias registradas en cualquier condición experimental, son independientes de la presión que ejerce la punta del ME sobre la superficie del PE (Nagel, 1976).

- Sensibilidad de la barrera de DP a variaciones de la concentración de  $K^+$  en el baño externo.

Las experiencias que se refieren a continuación tuvieron por objeto estudiar la sensibilidad donde se genera la DP a las variaciones de la concentración externa de  $K^+$  ( $|K^+|_o$ ). La Figura 16 muestra una experiencia donde se midieron las DP a un mismo PE en condición control y en presencia de 1 mM  $|K^+|_o$ . Se observó que la disminución de la  $|K^+|_o$  de 5 a 1 mM produce una notable y reversible hiperpolarización de las DP con respecto a sus controles.

Para analizar más detalladamente el efecto de la  $|K^+|_o$  sobre las DP se realizaron experiencias en las que se midieron las DP de PEs ricos en  $Na^+$  tratados con  $10^{-4}$  M de ouabaína y suspendidos a distintas concentraciones externas de  $K^+$  (Figura 17). Se estableció que las DP se depolarizan

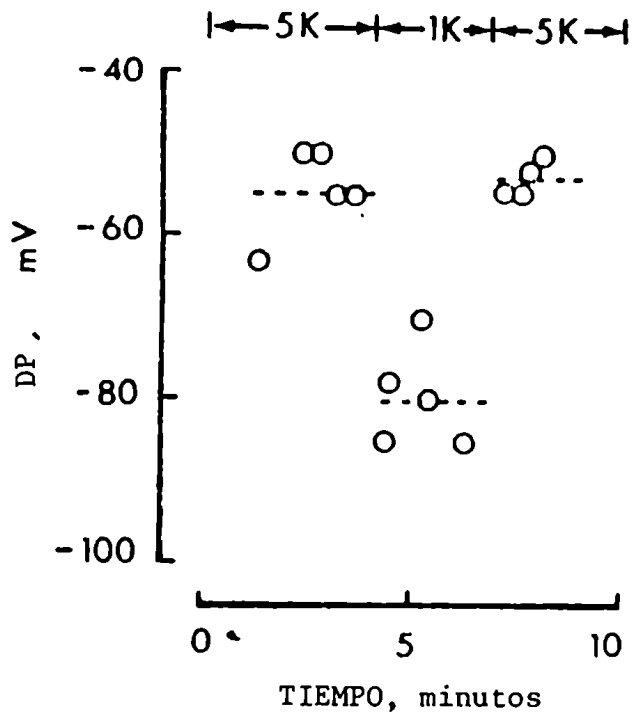


FIGURA 16: Efecto de la disminución de  $K^+$  externo sobre las DP en un PE fresco.

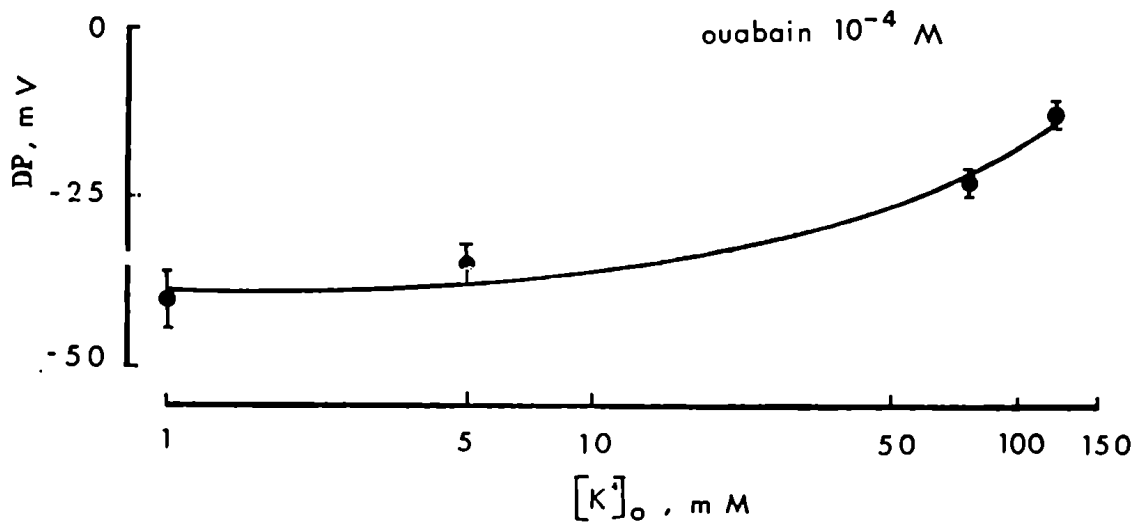


FIGURA 17: Efecto del  $K^+$  externo sobre las DP de un PE tratado con ouabaína. La suma de las concentraciones de  $Na^+$  y  $K^+$  en el baño externo se mantuvo constante (145 mM). La línea continua se calculó de acuerdo a la ecuación de G-H-K. Los parámetros se indican en la Tabla 17.

notable y progresivamente a medida que aumenta la  $|K^+|_o$ . En este tipo de protocolo experimental el  $K^+$  externo se reemplazó equivalente a equivalente por  $Na^+$  de manera que la suma de  $|K^+|_o + |Na^+|_o$  se mantuvo constante e igual a 145 mM. La curva de la Figura 17 se calculó asumiendo que las DP medidas a través de las membranas tegumentarias del PE tiene dos componentes distintos: uno directamente asociado a los gradientes electroquímicos de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Cl^-$  que respondería a la ecuación de Goldman (1943), Hodgkin y Katz (1949) y otro asociado al transporte activo.

$$DP = \frac{RT}{F} \ln \frac{|K^+|_o + P'_{Na} |Na^+|_o + P'_{Cl} |Cl^-|_i}{|K^+|_i + P'_{Na} |Na^+|_i + P'_{Cl} |Cl^-|_o} + DPreogénico \quad (1)$$

Dado que en otras membranas epiteliales que transportan activamente  $Na^+$  tales como glóbulo rojo (Glynn, 1956; Mc Manus, 1967), músculo (Hodgkin y Horowitz, 1959; Casteels, 1969), hígado (Claret y Mazet, 1972) axón gigante (Hodgkin y Huxley, 1952), la  $|Na^+|_i \ll |Na^+|_o$  y la  $P'_{Na} < P'_K$ , se supuso que en el tegumento del PE ocurre lo mismo. En consecuencia se despreció el producto  $(P'_{Na} |Na^+|_i)$  quedando una ecuación de Goldman, Hodgkin y Katz reducida (GHK), donde:

$$DP = \frac{RT}{F} \ln \frac{|K^+|_o + P'_{Na} |Na^+|_o + P'_{Cl} |Cl^-|_i}{|K^+|_i + P'_{Cl} |Cl^-|_o} + DPreogénico \quad (2)$$

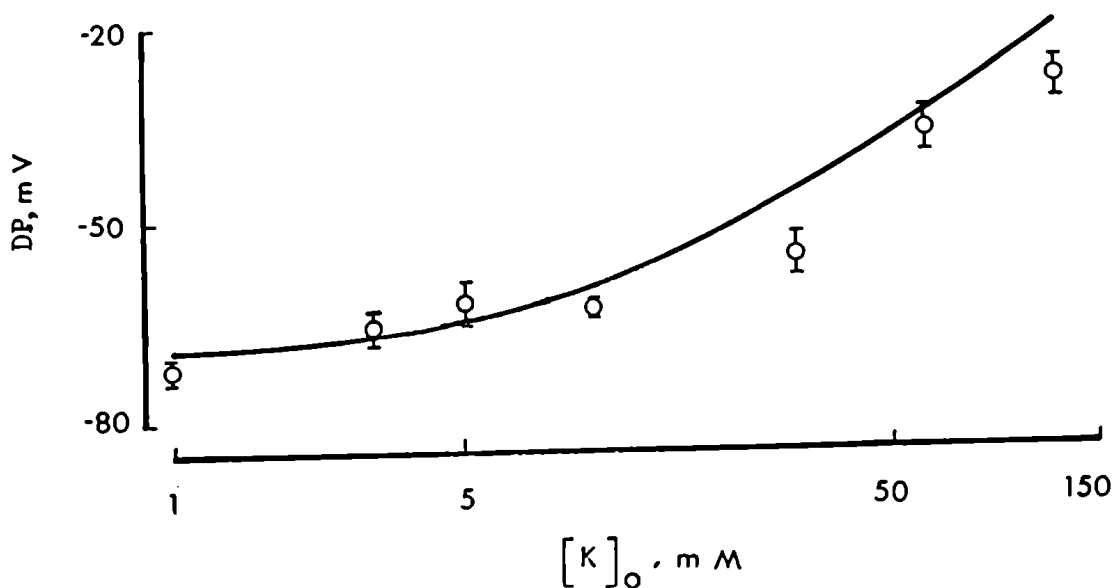
Cuando se midieron las DP en PEs tratados en ouabaína, se consideró que el componente reogénico de la DP se anula, de manera que:

$$DP = \frac{RT}{F} \ln \frac{|K^+|_o + P'_{Na} |Na^+|_o + P'_{Cl} |Cl^-|_i}{|K^+|_i + P'_{Cl} |Cl^-|_o} \quad (3)$$



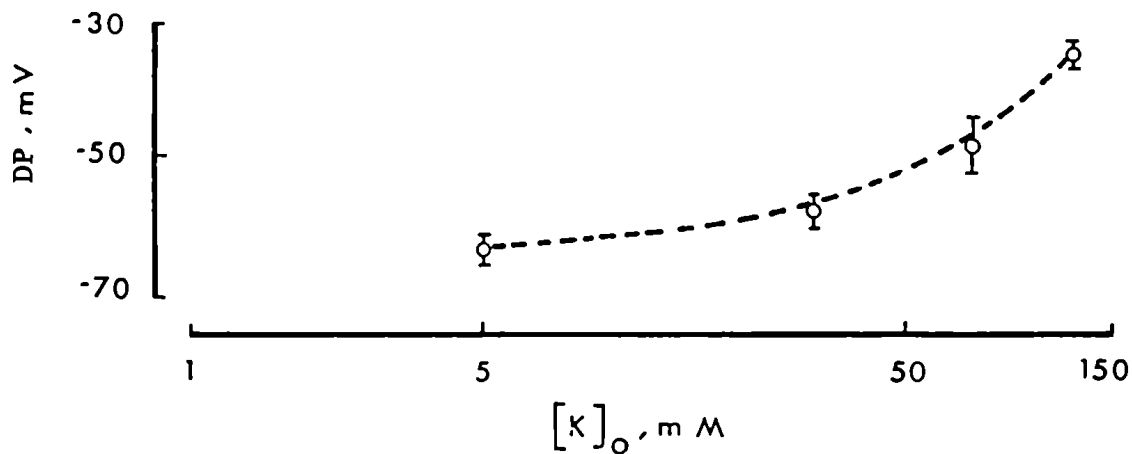
Por consiguiente, para la descripción analítica de la curva de la Figura 17 se requirió fijar los siguientes parámetros: las permeabilidades relativas de  $\text{Na}^+$  ( $P'_{\text{Na}}$ ) y de  $\text{Cl}^-$  ( $P'_{\text{Cl}}$ ) y las concentraciones internas de  $\text{Cl}^-$  ( $|\text{Cl}^-|_i$ ) y de  $\text{K}^+$  ( $|\text{K}^+|_i$ ) que se muestran en la Tabla 17.

Como en la experiencia de la Figura 17 el aumento del  $\text{K}^+$  se realizó a expensas del  $\text{Na}^+$  externo, el efecto sobre las DP observadas sería consecuencia no sólo de los cambios de  $\text{K}^+$  externo sino también de los cambios de la concentración externa de  $\text{Na}^+$  ( $|\text{Na}^+|_o$ ). Más adelante se describe el efecto producido sobre las DP debido a modificaciones en la  $|\text{Na}^+|_o$  a  $|\text{K}^+|_o$  fija y constante y se demuestra que en presencia de amiloride, cambios en la  $|\text{Na}^+|_o$  no modifican las DP (Figura 26). Por consiguiente, en las siguientes experiencias se midieron las DP a PE suspendidos en  $10^{-4}$  M de ouabaína y  $10^{-4}$  M de amiloride. Las concentraciones de  $\text{K}^+$  externo variaron entre 1 y 150 mM. En estas condiciones también tiene lugar una progresiva depolarización de la DP en la medida en que aumenta la  $|\text{K}^+|_o$  (Figura 18). Las curvas se ajustaron mediante la ecuación 3 y los parámetros se obtuvieron a través de un método iterativo hasta encontrar la mínima desviación estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 17.



**FIGURA 18:** Efecto del  $\text{K}^+$  externo sobre las DP de un PE tratado con ouabaína y amiloride. La línea continua se calculó de acuerdo a la ecuación de G-Hy K. Los parámetros se indican en Tabla 17.

En experiencias ya descritas establecimos que el reemplazo de  $\text{Cl}^-$  por gluconato no modifica significativamente las DP por períodos de hasta 25 minutos. Se midió entonces las DP de PEs tratados con ouabaína y amiloride, sometidos a distintas  $|\text{K}^+|_o$  en una situación en la que el  $\text{Cl}^-$  se reemplazó por gluconato. Nuevamente se observó un importante depolarización de las DP a medida que aumenta la  $|\text{K}^+|_o$  (Figura 19).



**FIGURA 19:** Efecto del  $\text{K}^+$  externo sobre las DP de un PE suspendido en una solución libre de  $\text{Cl}^-$  y tratado con ouabaína y amiloride  $10^{-4}$  M.

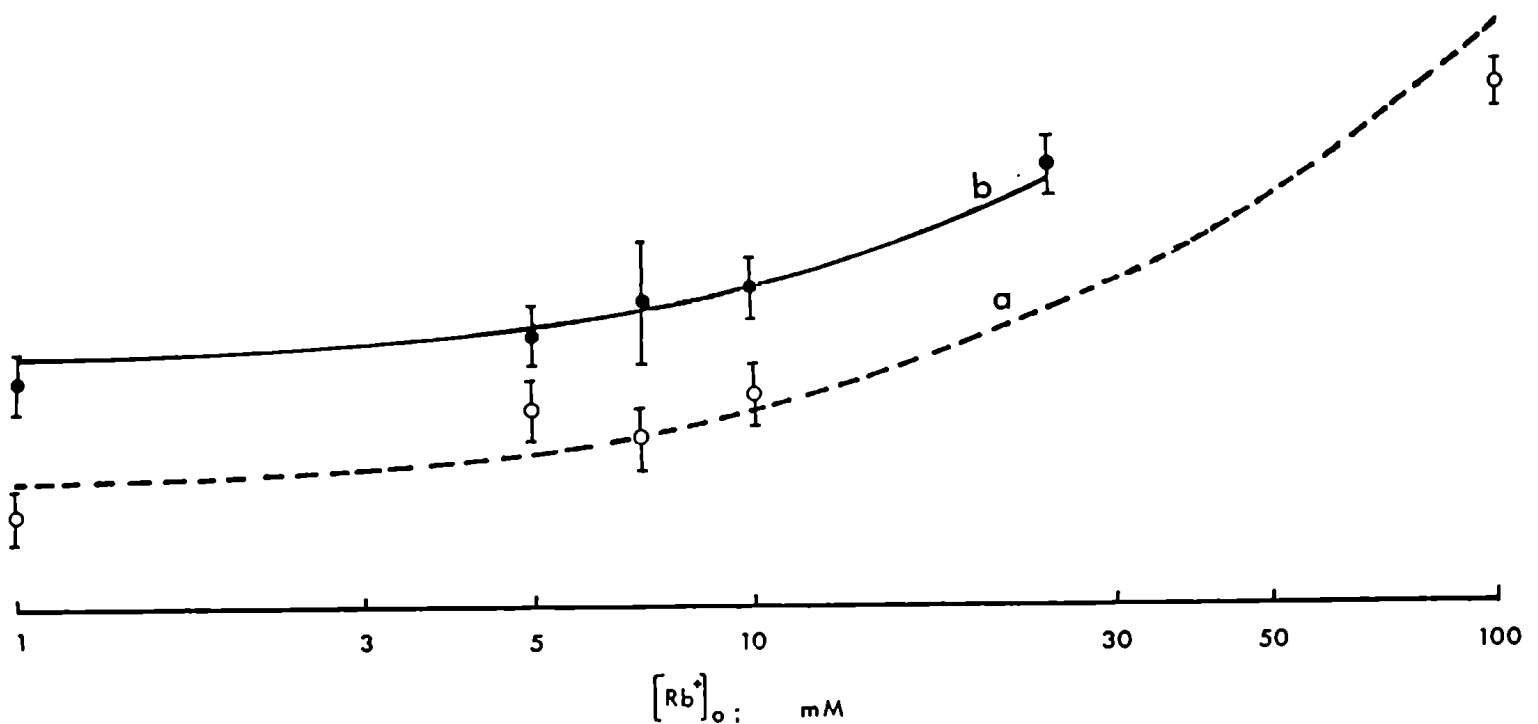
En una serie de experiencias posteriores se estudió la sensibilidad de las DP debido a los cambios de la concentración de  $\text{Rb}^+$  en el baño externo ( $|\text{Rb}^+|_o$ ), pues se sabe que este ión se comporta de manera similar al  $\text{K}^+$  (Tabla 6). Se registró las DP en PEs ricos en  $\text{Na}^+$  en condiciones control o tratados con  $10^{-4}$  M de ouabaína, suspendidos en concentraciones crecientes de  $\text{Rb}^+$  en el baño externo. Se pudo observar (Figura 20) que como en el caso del  $|\text{K}^+|_o$ , las DP se depolarizan significativamente a

medida que aumenta la  $|\text{Rb}^+|_o$ .

PEs ricos en $\text{Na}^+$	$J_{in}$	DP	P
Medidos en	$\mu\text{mol/g.s hora}$	mV	$(\text{cm seg}^{-1}) \times 10^7$
SRK + ouab. $10^{-4}$ M	27.9 $\pm$ 2.2 (14)	-42 $\pm$ 2 (4)	6.1 $\pm$ 0.5 (14)
SRK - 5 mM $\text{Rb}^+$ + ouab. $10^{-4}$ M	32.9 $\pm$ 1.1 (27)	-45 $\pm$ 1 (2)	6.8 $\pm$ 0.3 (27)

TABLA 6

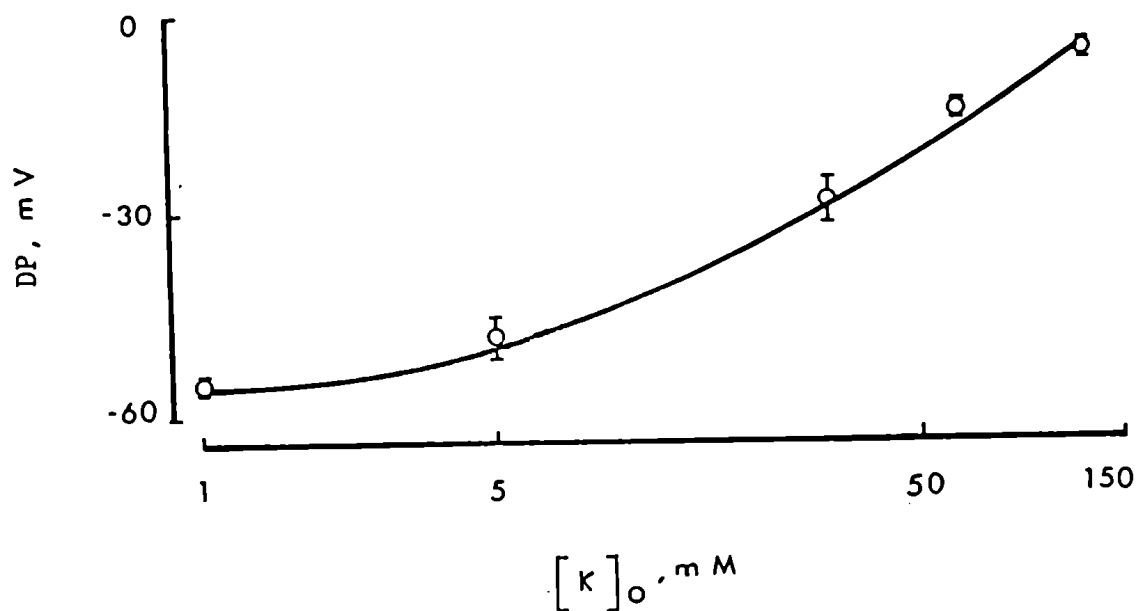
La curva teórica en presencia de ouabaína (Figura 20b) se calculó usando la ecuación 3.



**FIGURA 20:** Efecto del  $\text{Rb}^+$  externo sobre las DP de un PE: a) fresco (o) y b) incubados en presencia de  $10^{-4}$  M de ouabaína ( $\bullet$ ). La suma de las concentraciones externas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se mantuvo constante (145 mM). La curva continua se calculó en los parámetros indicados en la Tabla 17. La línea discontinua se obtuvo restando de la anterior 8 m V que se atribuyen al componente reogénico.

Los parámetros se obtuvieron con métodos iterativos y los valores calculados de  $(|K|_i)$  y de  $(|Cl^-|_i)$  junto con la  $P'_{Na}$  ( $P_{Na}/P_{Rb}$ ) se muestran en la Tabla 17. Por otra parte los punto experimentales medidos en condiciones control puede ser descripto por ecuación 2 con los mismos parámetros anteriores a los que se le sumó un valor constante de  $-8$  mV que se atribuye al componente reogénico de la DP.

Hasta aquí los resultados obtenidos sugerían que el componente de DP sensible al  $K^+$  o  $Rb^+$  externo tendría propiedades compatibles con un mecanismo fundamentalmente difusivo. En otro grupo de PEs de esta serie de experiencias se usó valinomicina, un ionófero de alta especificidad para el  $K^+$ , cuya acción fue establecida por un extenso número de investigaciones realizadas en membranas epiteliales (Tosteson y col., 1967). El objetivo de estas experiencias fue el de estudiar si era posible aumentar la sensibilidad de las DP al  $K^+$  externo y desplazar las permeabilidades relativas en la ecuación 3. La Figura 21 mostró que nuevamente la DP se depolarizó a medida que aumenta la concentración de  $K^+$  en el baño externo.



**FIGURA 21:** Efecto del  $K^+$  externo sobre las DP de un PE fresco tratado con Valinomicina ( $10^{-5}$  M). La línea continua se calculó de acuerdo a la ecuación G-H-K. Los parámetros se indican en Tabla 17.

La curva externa se calculó de acuerdo a la ecuación 2 con los parámetros de ajuste de la Tabla 17. Si se comparan las  $P'_{Na}$  y  $P'_{Cl}$  con la correspondiente a la curva de  $DP = f |K^+|_o$  en ausencia de valinomicina (Tabla 17), se observa que estos parámetros se modifican sustancialmente en presencia de valinomicina. Esto estaría en concordancia con lo que se conoce acerca de las propiedades de esta droga. También en el tegumento del PE, actuarían como un ionóforo que aumenta la  $P_K$ .

#### - Cálculo de las permeabilidades aparentes de $K^+$ y $Rb^+$

La DP medida a través del tegumento del PE es sensible a la concentración de  $K^+$  o  $Rb^+$  en el baño externo. Las mediciones eléctricas, conjuntamente con los flujos de entrada medidos por Cantiello y col., (1980) en PEs en presencia de ouabaína, contamos con los datos suficientes para calcular las permeabilidades aparentes de  $K^+$  ( $P_K$ ) o  $Rb^+$  ( $P_{Rb}$ ) de acuerdo a la ecuación de Goldman, Hodgkin y Katz

$$P'_{I^+} = \frac{J_{in}}{|C_e|} \frac{RT}{F \times DP} \frac{1}{1 - e^{-\frac{F \times DP}{RT}}} \quad (4)$$

donde  $P'_{I^+}$  es la permeabilidad aparente del ión monovalente,  $J_{in}$  es el flujo de entrada del ión en cuestión,  $|C_e|$  es la concentración externa de acción y DP la diferencia de potencial medida. La  $P_K$  obtenida fue de  $6.1 \times 10^{-7} \text{ cm seg}^{-1}$  (Tabla 6). Este valor está en el rango hallado para otras membranas biológicas (músculo:  $1.1 \times 10^{-7} \text{ cm seg}^{-1}$ , Casteels, 1969;  $7 \times 10^{-7} \text{ cm seg}^{-1}$ , Hodgkin y Horowicz, 1959; hígado:  $0.8 \times 10^{-7} \text{ cm seg}^{-1}$ , Claret y Mazet, 1972). Por otra parte se observa que no existen diferencias significativas entre el  $P_K$  y  $P_{Rb}$ . Es decir que el  $Rb^+$  reemplazaría totalmente al  $K^+$  sin producir cambios en las propiedades de transporte del tegumento del PE (Skou, 1965).

- Efecto sobre la DP que produce la ausencia del  $\text{Cl}^-$  externo

Como se refirió anteriormente el reemplazo de  $\text{Cl}^-$  por gluconato no afecta el comportamiento de la barrera de DP al  $\text{K}^+$ . El estudio del posible efecto sobre la DP que ocasiona la ausencia de  $\text{Cl}^-$  en el baño externo mostró que la DP no parece afectarse. En experiencias en las que se reemplazó  $\text{Cl}^-$  por gluconato se observó que los registros de DP en un mismo PE fresco no se modificaron como consecuencia del cambio brusco de 162 a 0 mM de la concentración externa de  $\text{Cl}^-$  ( $|\text{Cl}^-|_o$ ) en observaciones de duraciones de por lo menos 25 minutos (Figura 22).

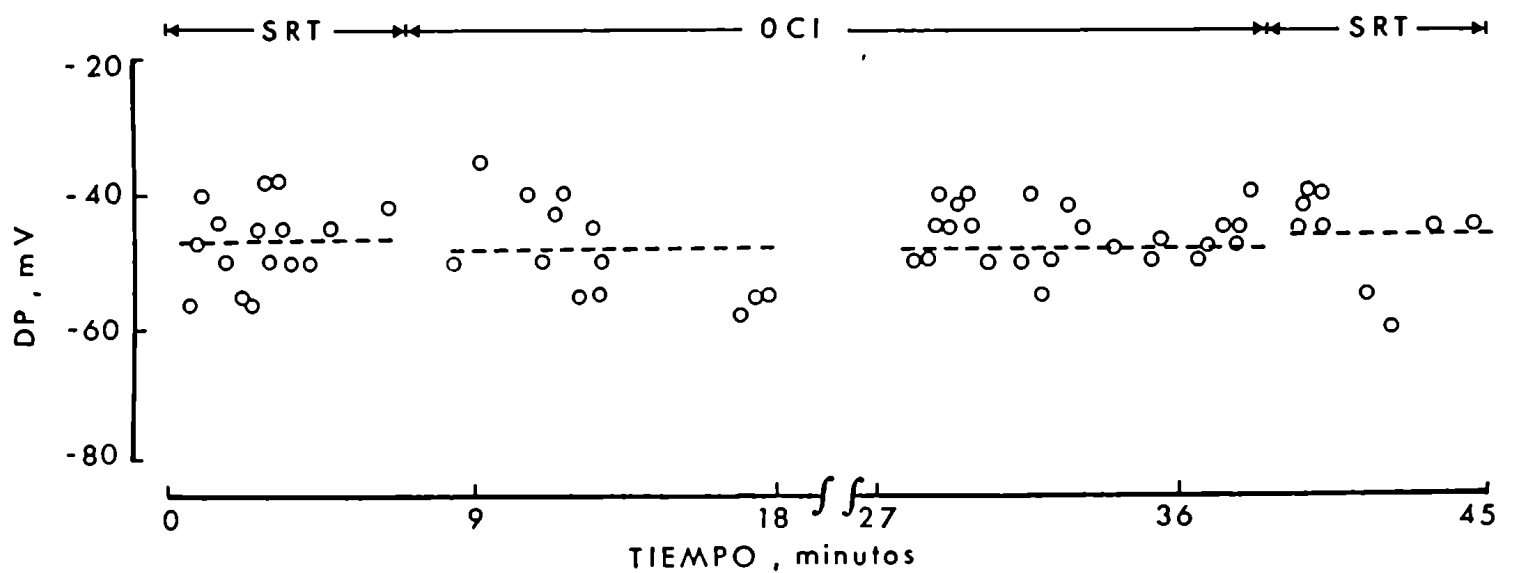


FIGURA 22: Efecto de la ausencia de  $\text{Cl}^-$  externo sobre las DP medidas en un PE control.

La Tabla 7 resume las experiencias en las cuales se midieron las DP a distintos PEs en presencia y ausencia de  $\text{Cl}^-$  externo. La interpretación de estos resultados se analizarán en la Discusión.

Medición en	DP mV
SRK o SRT	$-49 \pm 3$ (6)
SRK-OC1 o SRT-OC1	$-47 \pm 5$ (4)

TABLA 7

- Sensibilidad de la barrera de DP a las variaciones de la concentración de  $\text{Na}^+$  en el baño externo.

La barrera de DP es sensible a cambios en la concentración externa de  $\text{Na}^+$  ( $|\text{Na}^+|_o$ ). La ausencia de  $\text{Na}^+$  en el baño externo produce una marcada y reversible hiperpolarización de la DP (Figura 23).

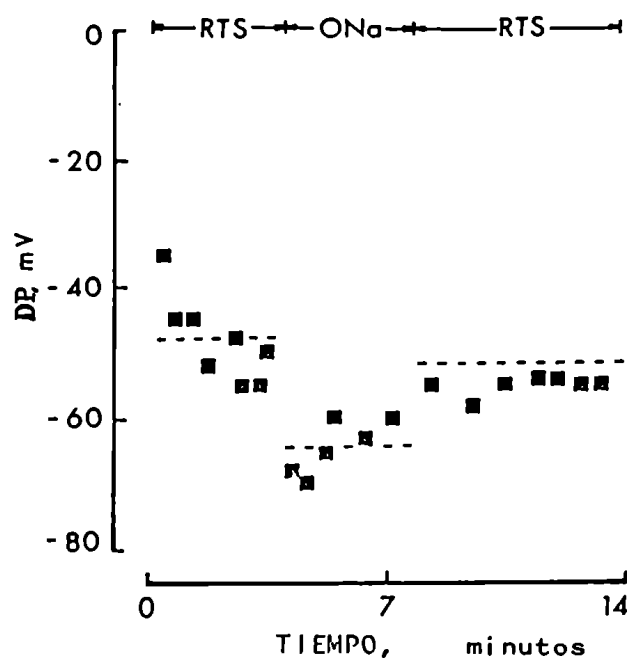
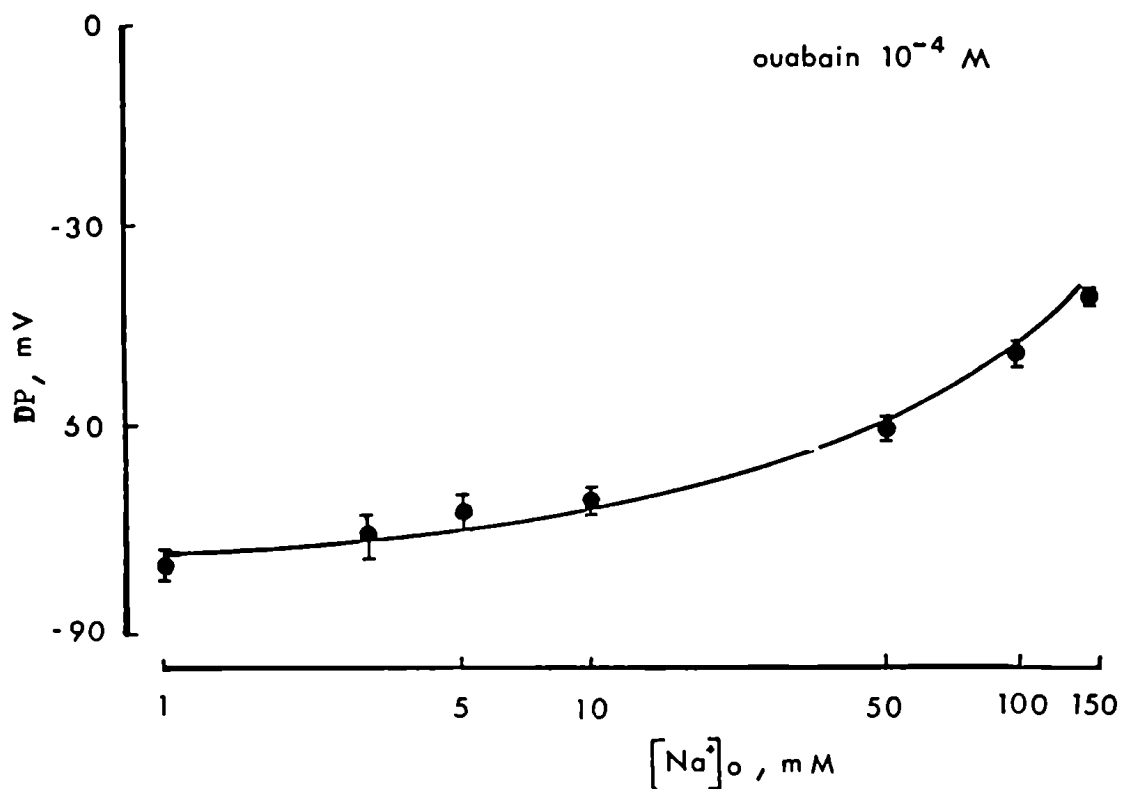


FIGURA 23: Efecto de la ausencia de  $\text{Na}^+$  externo sobre las DP de un PE fresco.

El estudio de la respuesta de las DP de PEs incubados en presencia de concentraciones variables de  $\text{Na}^+$  externo mostró que la disminución de la  $[\text{Na}^+]_o$  produce una progresiva hiperpolarización de PEs frescos o ricos en  $\text{Na}^+$ . Para el caso de PEs frescos tratados con ouabaína  $10^{-4}$  M, la curva teórica (Figura 24) se calculó de acuerdo a la ecuación 3 con los parámetros que se muestran en la Tabla 17. Estos resultados indican que la barrera de DP detectada es sensible al  $\text{Na}^+$  externo con una  $P'_{\text{Na}}$  de 0.32.



**FIGURA 24:** Efecto del  $\text{Na}^+$  externo sobre las DP en un PE tratado con ouabaína ( $10^{-4}$  M). Los parámetros de la curva calculada se muestran en Tabla 17.



- Efecto del 3.5 diamino N (amino-iminometil) -6 -cloropirazincarboxamida (amiloride) sobre la  $P_{Na}$ .

El componente de la DP sensible al  $Na^+$  descrito más arriba es en gran medida bloqueado por el amiloride. Esta droga es un inhibidor potente del transporte de Na en vejiga de sapo (Bentley, 1968; Cuthbert y Shum, 1974); túbulo cortical renal de conejo (O'Neil y Boulpaep, 1979), vesícula biliar de sapo (Balabán y col., 1979) y bloqueante específico de los canales de  $Na^+$  en piel de rana estudiado por análisis de fluctuaciones (Hillyard y col., 1982; Li y Lindemann, 1983). En un grupo de experiencias se observó que el amiloride en concentraciones de  $10^{-4}$  M es capaz de hiperpolarizar significativamente las DP con respecto a sus controles. En la Figura 25 se observa un PE en condiciones control. El agregado de ouabaína depolariza las DP debido al bloqueo del componente reogénico. La adición posterior de  $10^{-4}$  M de amiloride produce una notable y reversible depolarización de las DP

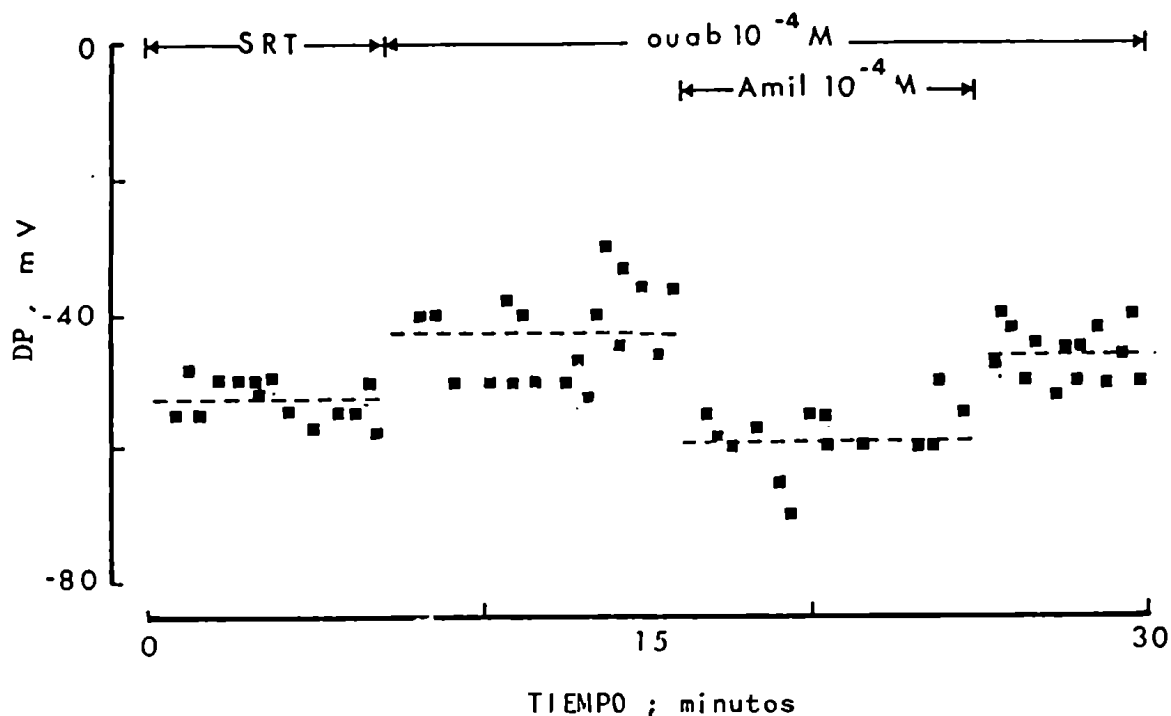


FIGURA 25: Registros de las DP en un PE incubado en ouabaína ( $10^{-4}$  M) en presencia y ausencia de amiloride ( $10^{-4}$  M).

La Tabla 8 resume los valores de DP obtenidos en PEs tratados con ouabaína suspendidos en  $10^{-5}$  M de amiloride en el baño externo.

Medición en	DP mV
SRT + ouab. $10^{-4}$ M	$-41 \pm 1$ (4)*
SRT + ouab. $10^{-4}$ M + amil. $10^{-5}$ M	$-57 \pm 1$ (4)*

\*  $P < 0.001$

TABLA 8

En otro grupo de experiencias se estableció que cambios importantes de la  $[Na^+]_o$  realizadas en PEs tratados previamente con amiloride no modifican significativamente las DP (Figura 26).

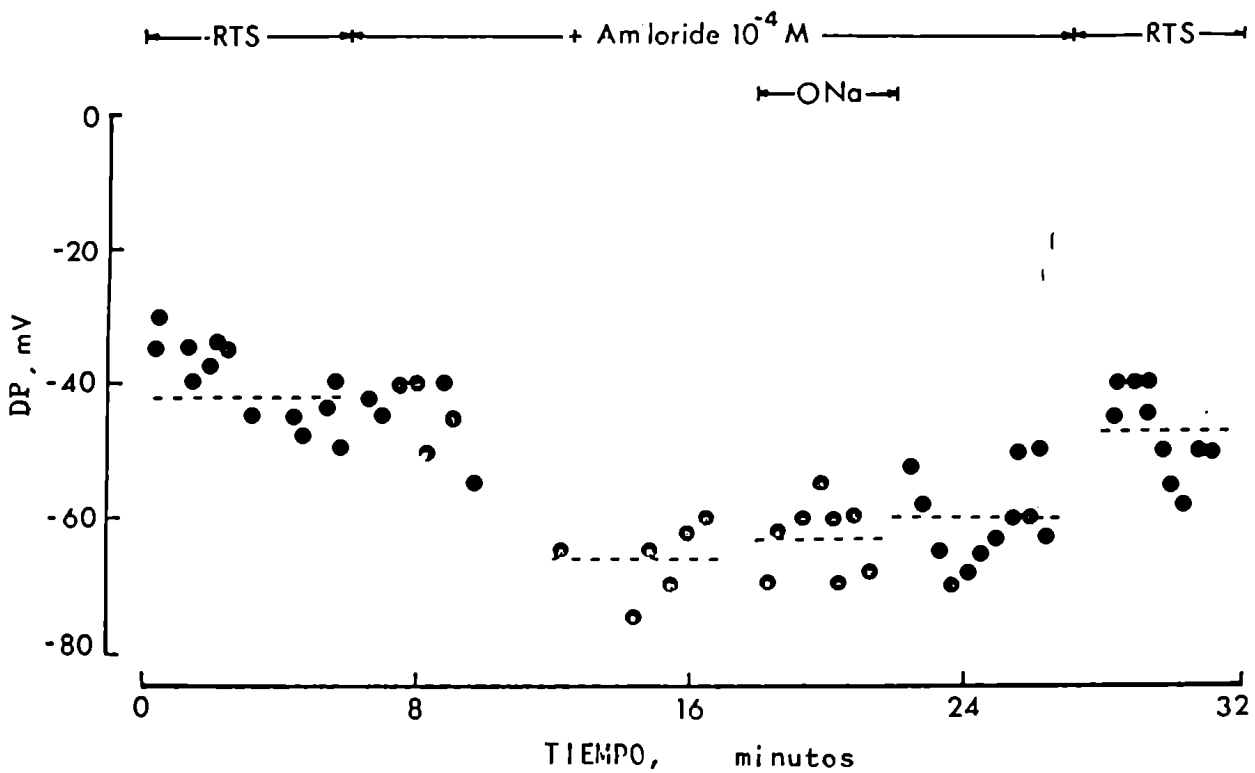


FIGURA 26: Efecto de la ausencia de  $Na^+$  externo sobre las DP en un PE tratado con amiloride ( $10^{-4}$  M).

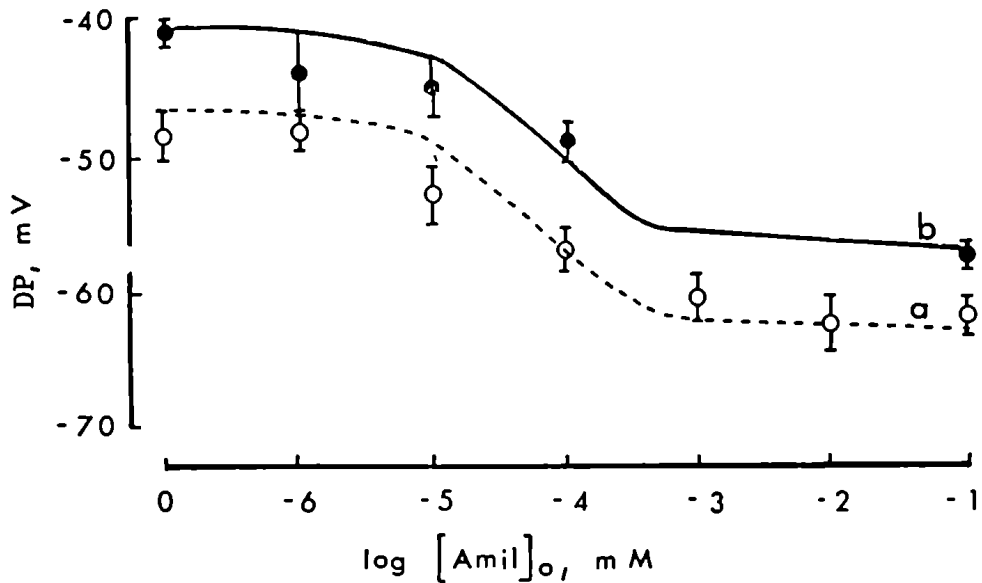
Las curvas en las que se relacionaron las DP con las concentraciones de amiloride en el baño externo ( $|Amil|_o$ ) mostraron que  $10^{-8}$  M de amiloride en el baño externo fue suficiente para producir una significativa hiperpolarización de las DP. Sin embargo, el máximo efecto de esta droga se observa a  $10^{-6}$  M. La curva teórica de un PE en presencia de ouabaína (Figura 27b) se calculó a partir de la ecuación 3 tomando como parámetros de ajuste constantes, las  $|Cl^-|_i$ ;  $|K^+|_i$  y  $P'_{Cl}$  (Tabla 17), mientras que la  $P'_{Na}$  se consideró variable con la concentración de amiloride en el baño externo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P'_{Na} = P'_{Na}{}^{ins} + P'_{Na}{}^{Amil} \left( 1 - \frac{|Amil|_o}{K_{0.5} + |Amil|_o} \right) \quad (5)$$

donde  $P'_{Na}{}^{ins}$  y  $P'_{Na}{}^{Amil}$  son las permeabilidades relativas de  $Na^+$  insensible y sensible al amiloride respectivamente y  $K_{0.5}$  es la constante de inhibición media o bien la concentración de amiloride capaz de producir la mitad del efecto máximo sobre la  $P'_{Na}$ .

La curva correspondiente a un PE control (Figura 27a) se calculó a partir de la ecuación 2 con un DP reogénico constante e igual a  $-6$  mV en todas las  $|Amil|_o$ . Los valores de los parámetros  $|Cl^-|_i$ ,  $|K^+|_i$ ,  $P'_{Cl}$  y  $P'_{Na}$  son similares a los explicados para la figura 27 b (Tabla 17).

El hecho que la  $P'_{Na}$  que ajusta las curvas depende del amiloride externo y en cambio la  $P'_{Cl}$  es independiente de esta droga sugiere que sólo la  $P'_{Na}$  es afectada por cambios en la  $|Amil|_o$ . Estos resultados indicarían que la  $P'_{Na}$  tendría por lo menos dos componentes: uno insensible y otro sensible a la acción del amiloride. El componente sensible representaría el 57% de la  $P'_{Na}$ . En otras palabras la hiperpolarización del DP observada en presencia de amiloride sería consecuencia de la disminución en un 57% de la permeabilidad de Na.



**FIGURA 27:** Efecto del amiloride sobre las DP en un PE control (o) y tratado con ouabaína (●). La curva continua se calculó con los parámetros dados en la Tabla 17 y considerando que una fracción de la  $P'_{Na}$  es inhibida por amiloride (ver texto). La curva discontinua se obtuvo a partir de la anterior a la que se les restó 6 mV atribuidos al componente electrogénico.

- Sensibilidad de la barrera de DP a los cationes divalentes

Los cationes divalentes, especialmente el  $Ca^{+2}$  son factores reguladores claves en muchos procesos biológicos a nivel de membrana. En eritrocitos humanos, el  $Ca^{+2}$  se enlaza fuertemente a la superficie interna y estimula la permeabilidad de  $K^{+}$  (Gardos, 1956; Lew y Ferreira, 1976; Lew y Ferreira, 1978; Sze y Solomón, 1979), mientras que en piel de rana el  $Ca^{+2}$  intracelular regula el transporte de  $Na^{+}$  (Grinstein y Erlj, 1978). Recientemente Van Driessche y Zeiske (1982) informan en esta preparación,

la existencia de canales catiónicos en paralelo con los selectivos a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que aparecen en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo. Con respecto a las membranas excitables, es bien conocido el importante papel que cumple el  $\text{Ca}^{+2}$  en la regulación y control de los potenciales de acción (Frankenhaeuser y Hodgkin, 1957; Gilbert, 1971; Hille y col., 1975). Finalmente, es preciso mencionar la acción bloqueante del  $\text{Ba}^{+2}$  sobre la conductividad del  $\text{K}^+$  en músculo (Nishi y Soeda, 1964; Speralakis y col., 1967); axón gigante (Eaton y Brodwick, 1980; Armstrong y Taylor, 1980; Armstrong y col., 1982) y membranas epiteliales (Van Driessche y Zeiske, 1980).

Nuestro propósito fue establecer de que manera los cationes divalentes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Sr}^{+2}$ ) regulan la permeabilidad de las membranas tegumentarias.

- Efecto del  $\text{Ba}^{+2}$  sobre las DP.

Los registros de DP medidos en PEs controles en presencia de 10 mM de  $\text{Ba}^{+2}$  en el baño externo, permitieron observar que este ión produce una notable depolarización de las DP que es parcialmente reversible (Figura 28)

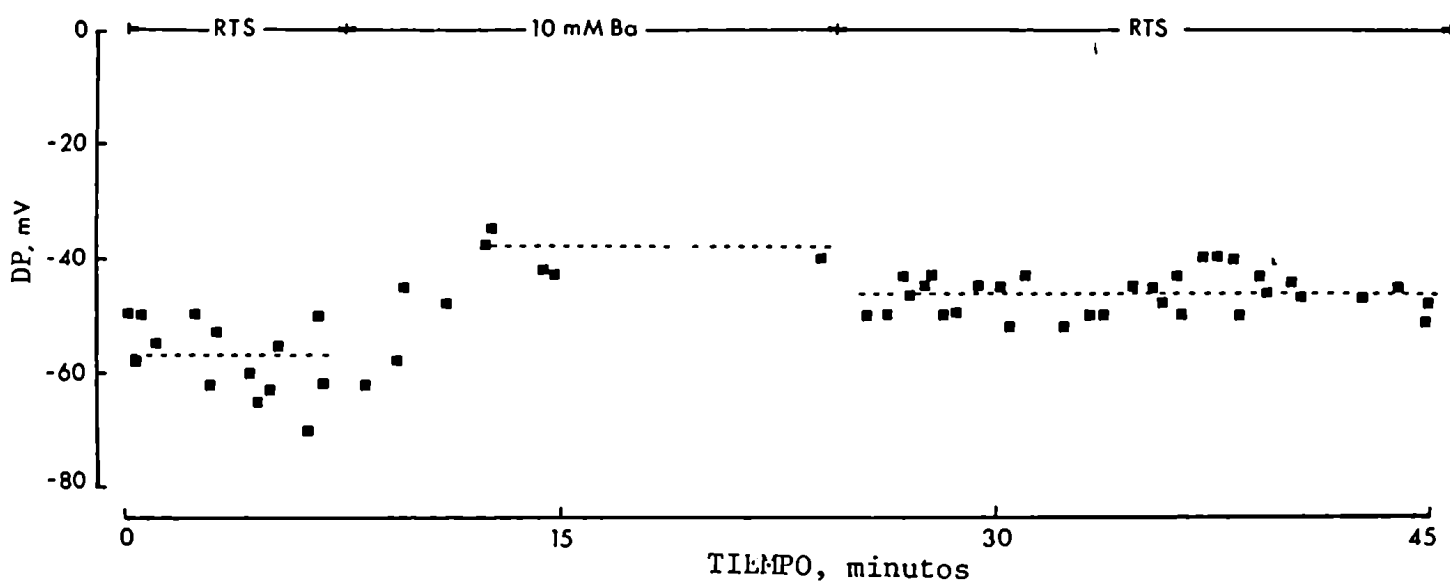


FIGURA 28: Efecto del  $\text{Ba}^{+2}$  (10 mM) sobre las DP en un PE fresco.

Este efecto del  $Ba^{+2}$  sobre las DP se produce también en PEs tratados con ouabaína (Figura 29), amiloride (Figura 30) o en presencia de ambas drogas conjuntamente (Figura 31).

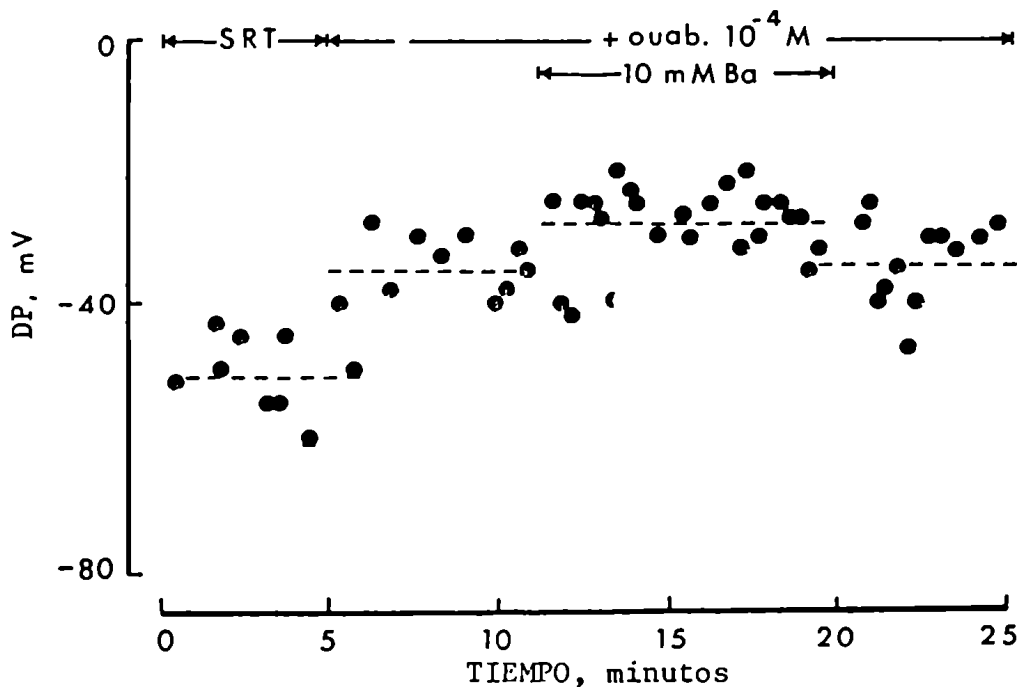


FIGURA 29: Efecto del  $Ba^{2+}$  (10 mM) sobre las DP en un PE tratado con ouabaína ( $10^{-4}$  M).

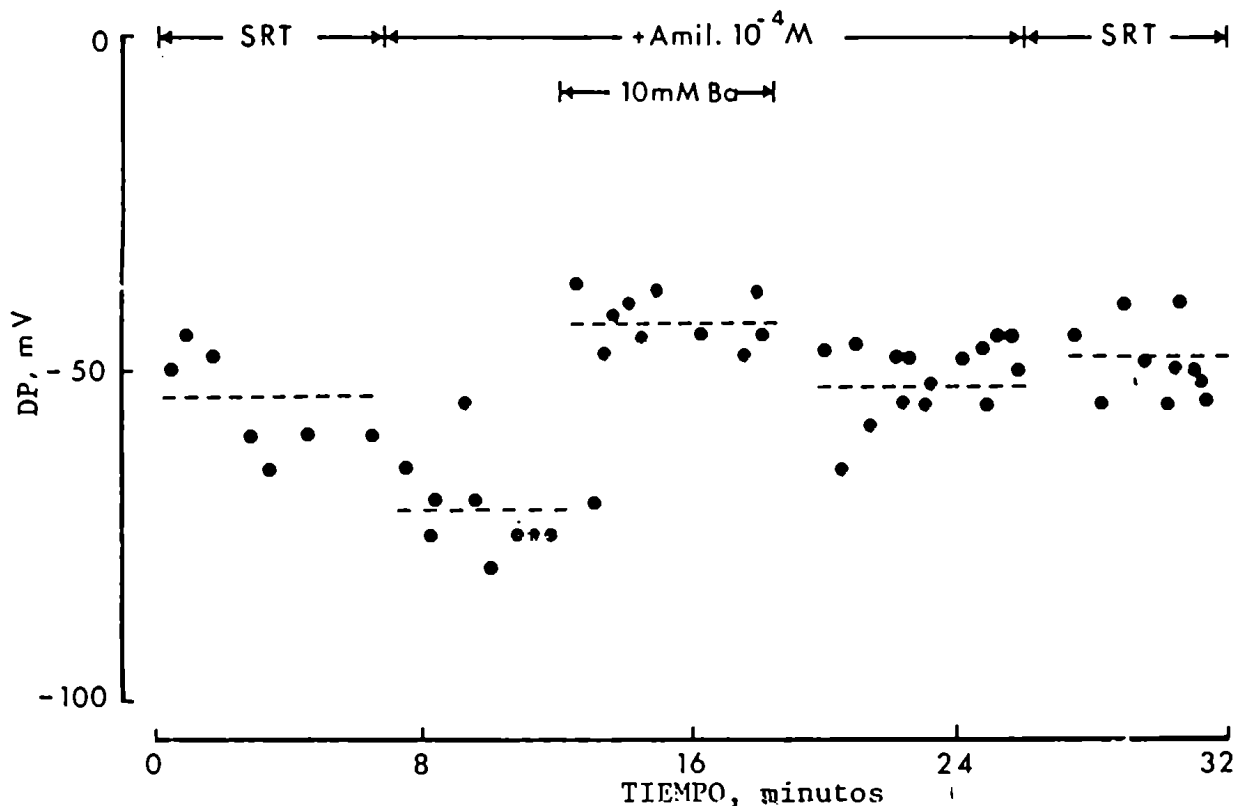


FIGURA 30: Efecto del  $Ba^{2+}$  (10 mM) sobre las DP en un PE tratado con amiloride ( $10^{-4}$  M).

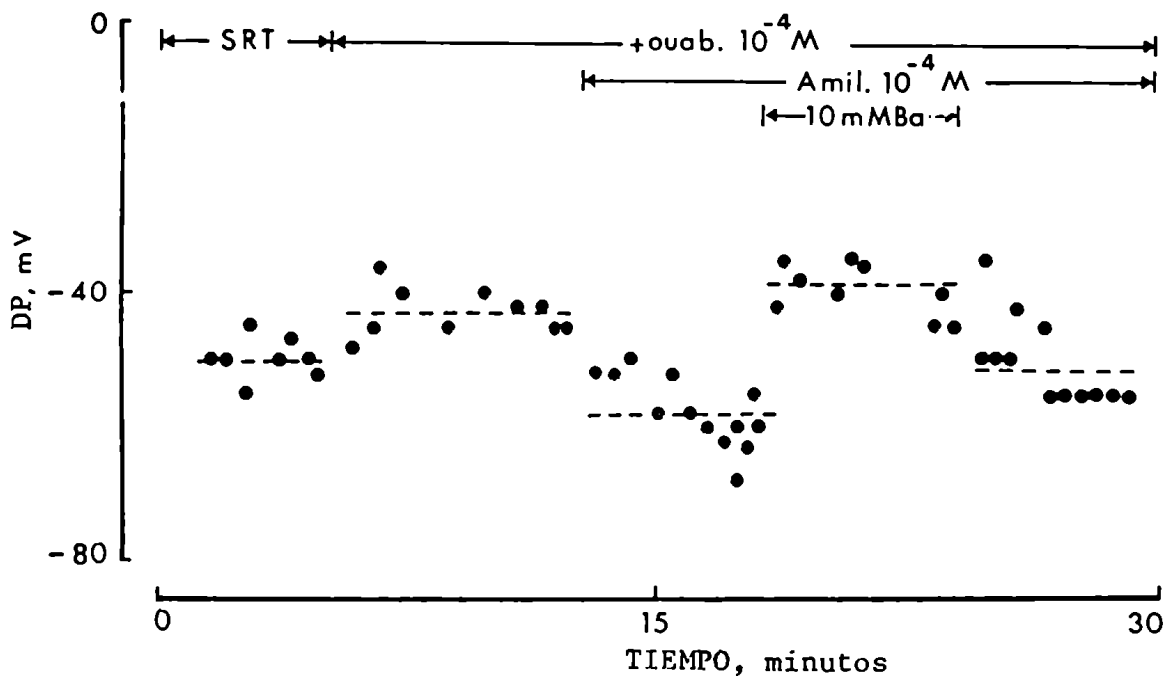


FIGURA 31: Efecto del Ba<sup>+2</sup> (10 mM) sobre las DP en un PE tratado sucesivamente con ouabaína (10<sup>-4</sup> M) y amiloride (10<sup>-4</sup> M).

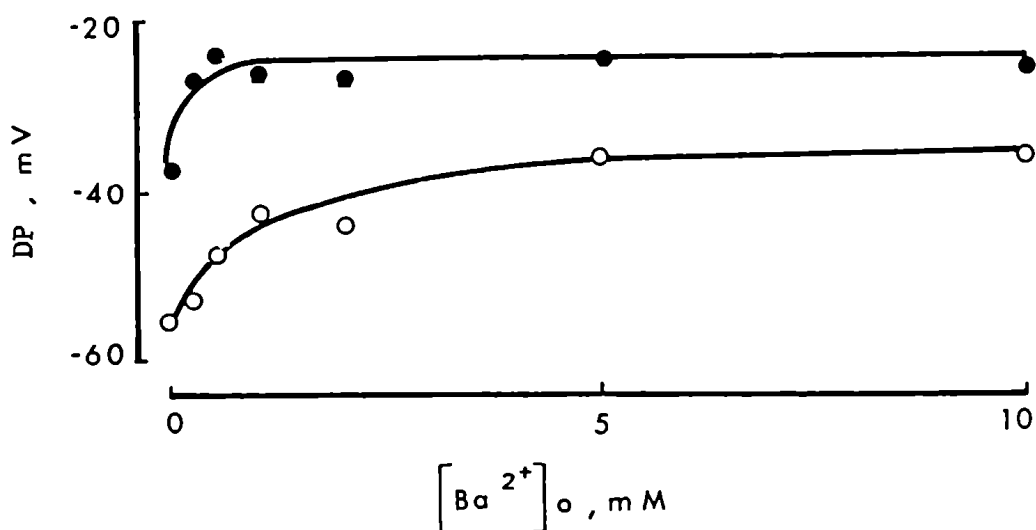
La Tabla 9 resume los valores promedios de DP obtenidos en PEs controles o tratados con ouabaína en presencia de Ba<sup>+2</sup> en concentraciones de 5 o 10 mM en el baño externo.

Medición en	DP
	mV
SRT	-49 <sub>-1</sub> (18) <sup>*</sup>
SRT + 5 mM Ba <sup>+2</sup>	-32 <sub>-3</sub> (4) <sup>*</sup>
SRT + 10 mM Ba <sup>+2</sup>	-35 <sub>-2</sub> (5)
SRT + ouab.10 <sup>-4</sup> M	-35 <sub>-1</sub> (4) <sup>**</sup>
SRT + ouab.10 <sup>-4</sup> M + 5 mM Ba <sup>+2</sup>	-29 <sub>-1</sub> (2)
SRT + ouab.10 <sup>-4</sup> M + 10 mM Ba <sup>+2</sup>	-26 <sub>-2</sub> (3) <sup>**</sup>

\* P < 0.01

\*\* P < 0.01

A continuación se midieron las DP en PEs frescos a distintas concentraciones de  $Ba^{+2}$  externo ( $[Ba^{+2}]_o$ ) desde 0.1 a 10 mM. Se observó tanto en un PE en condiciones control (Figura 32a) como en un PE tratado con ouabaína (Figura 32b) que las DP se depolarizan marcada y progresivamente a medida que aumenta la  $[Ba^{+2}]_o$ .



**FIGURA 32:** Efecto de la presencia de  $Ba^{+2}$  en el baño externo (10 mM) sobre las DP en un PE aislado e incubado en solución Ringer Tris (o) o solución Ringer-Tris + ouabaína ( $10^{-4}$  M) (●).

También se tomaron registros de DP en PEs ricos en  $Na^{+}$  tratados con ouabaína y suspendidos en 5 mM de  $Rb^{+}$  externo a distintas  $[Ba^{+2}]_o$ . Nuevamente se observó que este ión divalente produce una depolarización de las DP cuyo efecto máximo, en este caso se produjo a 2 mM de  $Ba^{+2}$  (Figura 33). La curva teórica de la Figura 33 se calculó a partir de la ecuación 3 considerando que la  $[Cl^{-}]_i$  y  $[K^{+}]_i$  es constante en todo

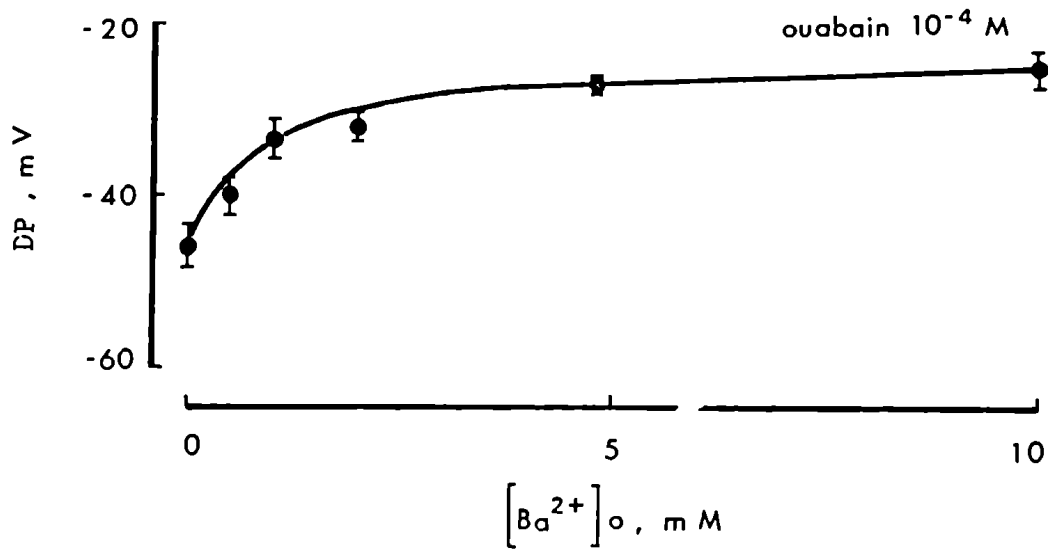


el rango de las  $|Ba^{+2}|_o$  usadas (Tabla 17), mientras que las  $P'_{Na}$  y  $P'_{Cl}$  se calcularon de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

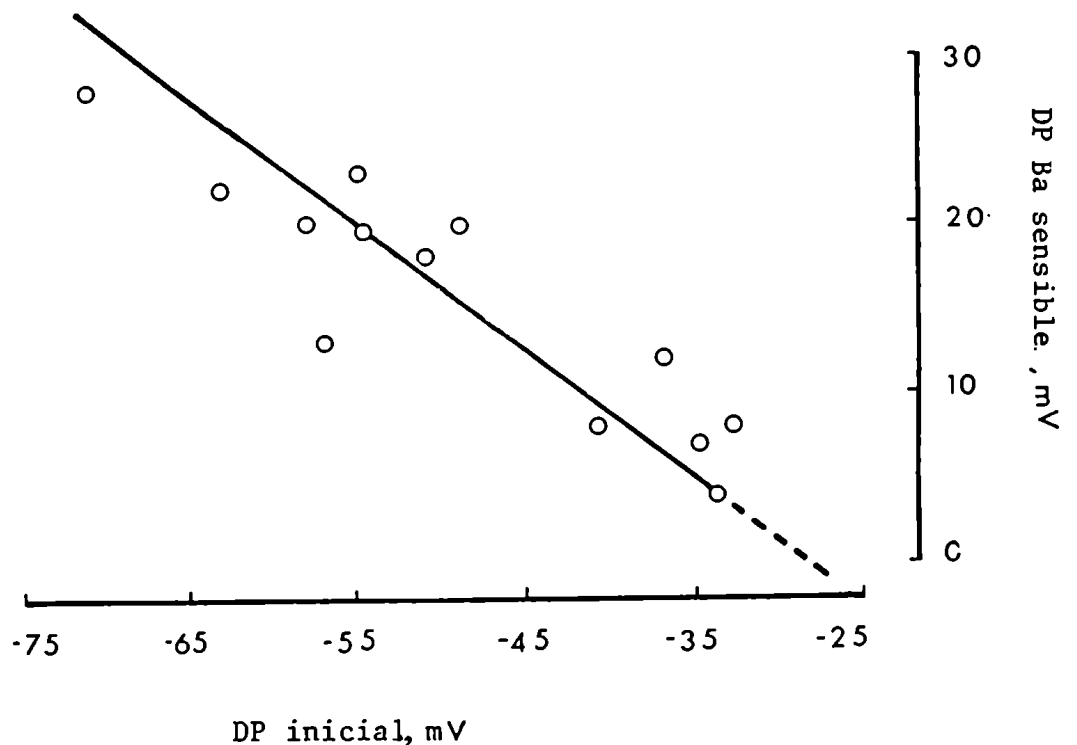
$$P'_{Na} = P'_{Na}{}^{ins} + P'_{Na}{}^{Ba} \frac{|Ba^{+2}|_o}{K_{0.5} + |Ba^{+2}|_o} \quad (6)$$

$$P'_{Cl} = P'_{Cl}{}^{ins} + P'_{Cl}{}^{Ba} \frac{|Ba^{+2}|_o}{K_{0.5} + |Ba^{+2}|_o} \quad (7)$$

donde  $P'_{Na}{}^{ins}$  y  $P'_{Cl}{}^{ins}$  son las permeabilidades relativas de  $Na^+$  y  $Cl^-$  respectivamente en ausencia de  $Ba^{+2}$  externo.  $P'_{Na}{}^{Ba}$  y  $P'_{Cl}{}^{Ba}$  son las permeabilidades relativas de  $Na^+$  y de  $Cl^-$  sensibles a la  $|Ba^{+2}|_o$  y  $K_{0.5}$  es la mitad del efecto máximo que produce el  $Ba^{+2}$  sobre la  $P'_{Na}$  y  $P'_{Cl}$ . Como las  $P'_{Na}$  y  $P'_{Cl}$  aumentan a medida que aumenta la  $|Ba^{+2}|_o$  hasta un valor máximo cuando la  $|Ba^{+2}|_o \gg K_{0.5}$ , se dedujo entonces que la depolarización sobre las DP observadas en presencia de  $Ba^{+2}$  estaría directamente asociado a un aumento de la  $P'_{Na}$  y  $P'_{Cl}$ . El aumento de  $P'_{Na}$  y  $P'_{Cl}$  puede ser consecuencia de un aumento de  $P_{Na}$  y  $P_{Cl}$  o bien una disminución de  $P_K$ . Por otra parte en la Figura 34 se muestra la correlación lineal que existe entre las DP medidas antes del agregado de  $Ba^{+2}$  en el baño externo (DP inicial) y la DP sensible al  $Ba^{+2}$ , independiente de las condiciones experimentales. La recta obtenida que extrapola a un valor de  $DP_{inicial}$  de -28 mV indica que: a) el  $Ba^{+2}$  actúa sobre un mecanismo que no es el que está relacionado con la ouabaína y amiloride, y b) el efecto que el  $Ba^{+2}$  produce es dependiente del voltaje de manera tal que a -28 mV el  $Ba^{+2}$  no ejercería ninguna acción sobre la DP. Estos resultados podrían explicarse si se considera que el  $Ba^{+2}$  depolariza la DP por bloqueo de la  $P_K$ .



**FIGURA 33:** Efecto del  $Ba^{+2}$  sobre las DP en un PE enriquecido en  $Na^+$  en presencia de  $10^{-4}$  M de ouabaína. La línea continua se obtuvo de acuerdo a la ecuación de G-H-K considerando que el  $Ba^{+2}$  afecta la  $P'_{Na}$  y  $P'_{Cl}$  (ver texto). Los parámetros de ajuste se muestran en Tabla 17.



**FIGURA 34:** Dependencia del efecto de  $Ba^{+2}$  externo (DP sensible a  $Ba^{+2}$ ) respecto de la DP inicial de PEs controles en presencia o ausencia de amiloride ( $10^{-4}$  M), en ausencia de  $Na^+$  y/o presencia de  $K^+$  (120 mM) en el baño externo.

En consecuencia, a medida que la DP inicial es menos negativa, el gradiente de  $K^+$  a través del tegumento del PE disminuye y el efecto que el  $Ba^{+2}$  ejerce sobre la  $P_K$  afectaría en menor medida a la DP. En Discusión se analizará más exhaustivamente el posible mecanismo de acción del ión  $Ba^{+2}$ .

- Efecto de la ausencia de  $Ca^{+2}$  externo sobre las DP

En un grupo de experiencias se midieron las DP a PEs controles y suspendidos en SRT libre de  $Ca^{+2}$ . Se observó que en ausencia de  $Ca^{+2}$  en el baño externo se produce una significativa depolarización de la DP con respecto a sus controles (Figura 35) y además se produce la aparición de deflexiones positivas, las cuales son analizadas más adelante.

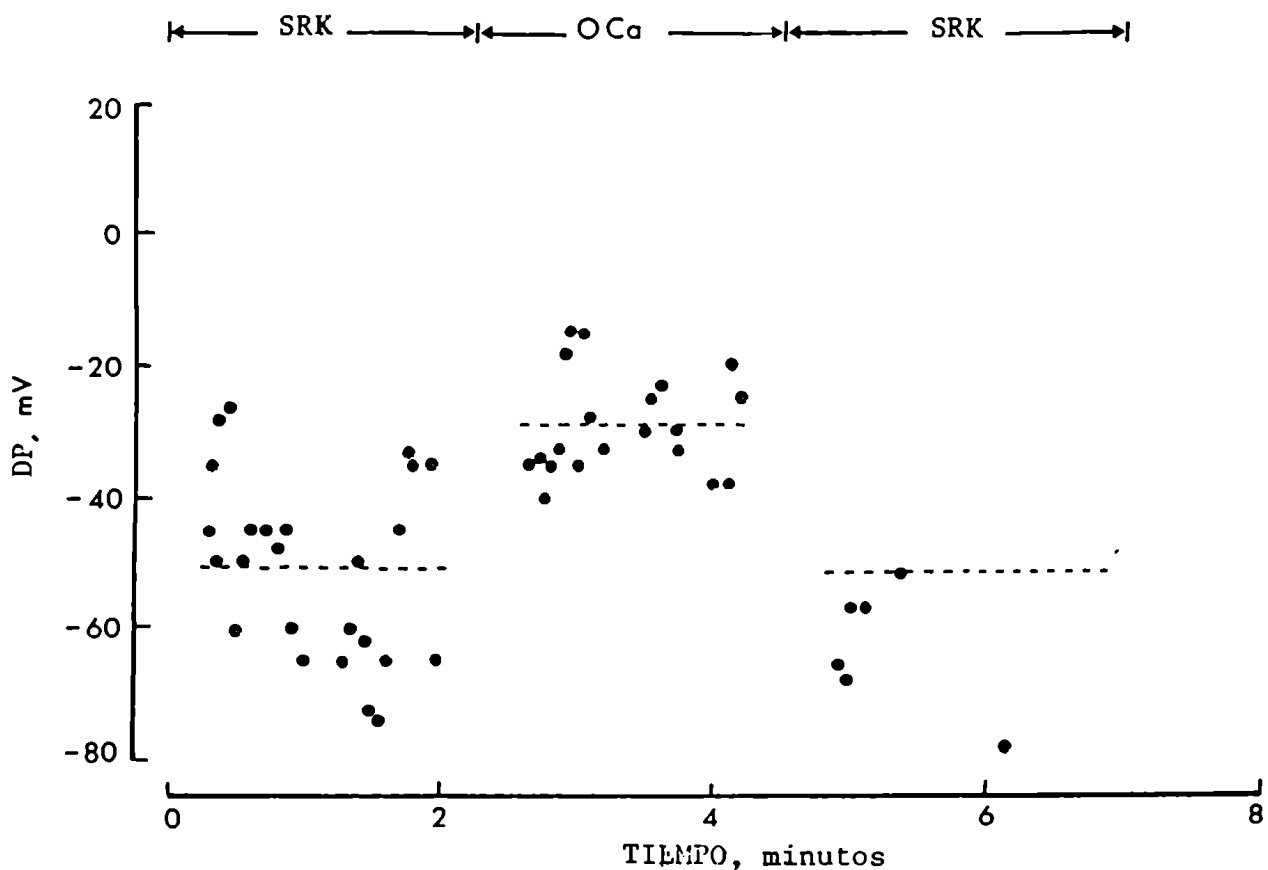
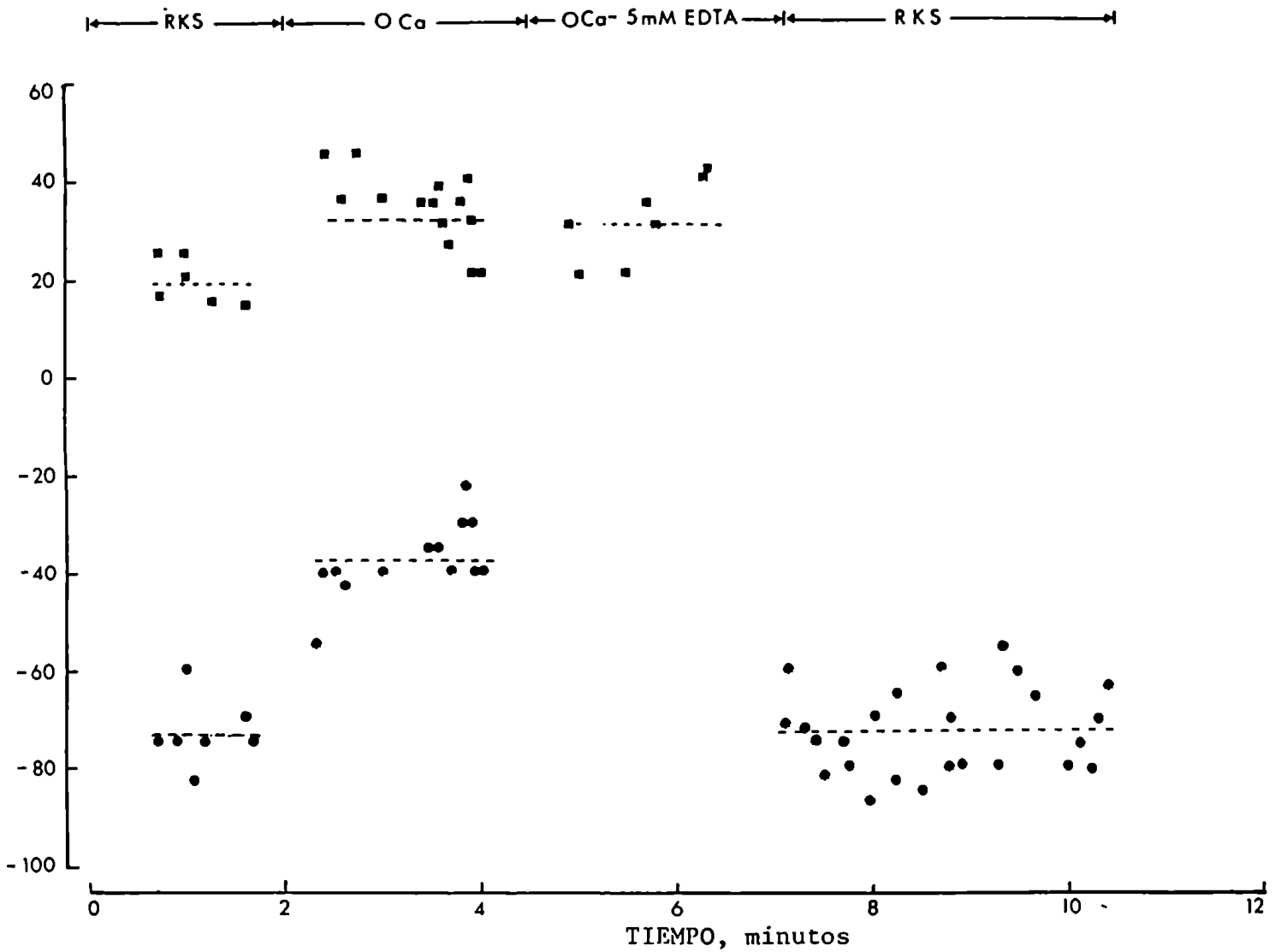


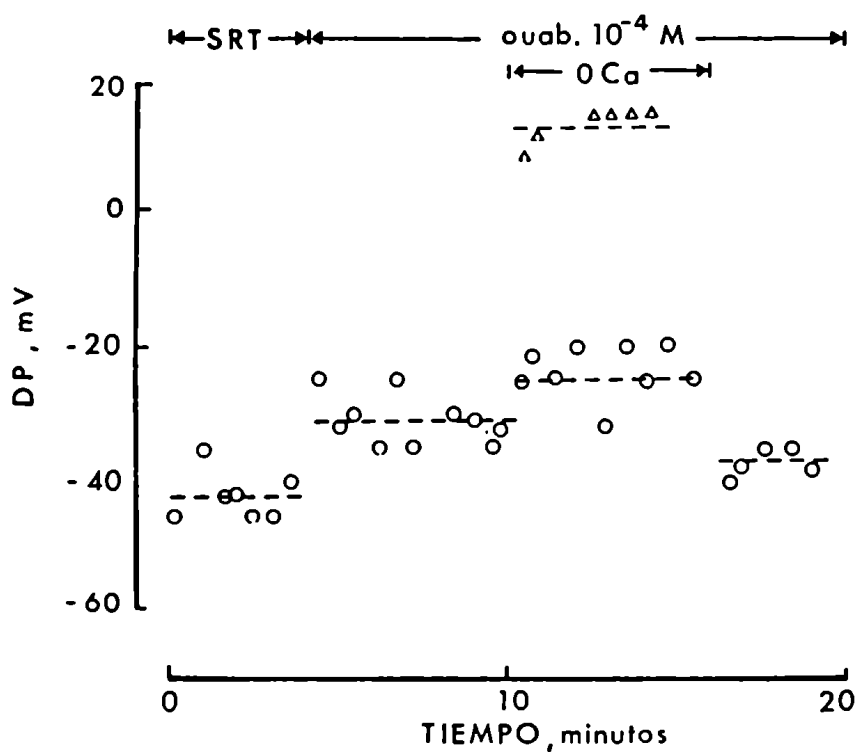
FIGURA 35: Registro de las DP en un PE aislado, suspendido en SRT en ausencia y presencia de  $Ca^{+2}$  en el baño externo.

La depolarización de las DP que llamaremos negativa para diferenciarla de las DP positivas, que origina la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  se mantuvo en presencia de EDTA (Figura 36) y fue reversible, ya que la reintroducción de  $\text{Ca}^{+2}$  rápidamente hiperpolariza las DP negativas y produce la desaparición de las DP positivas.

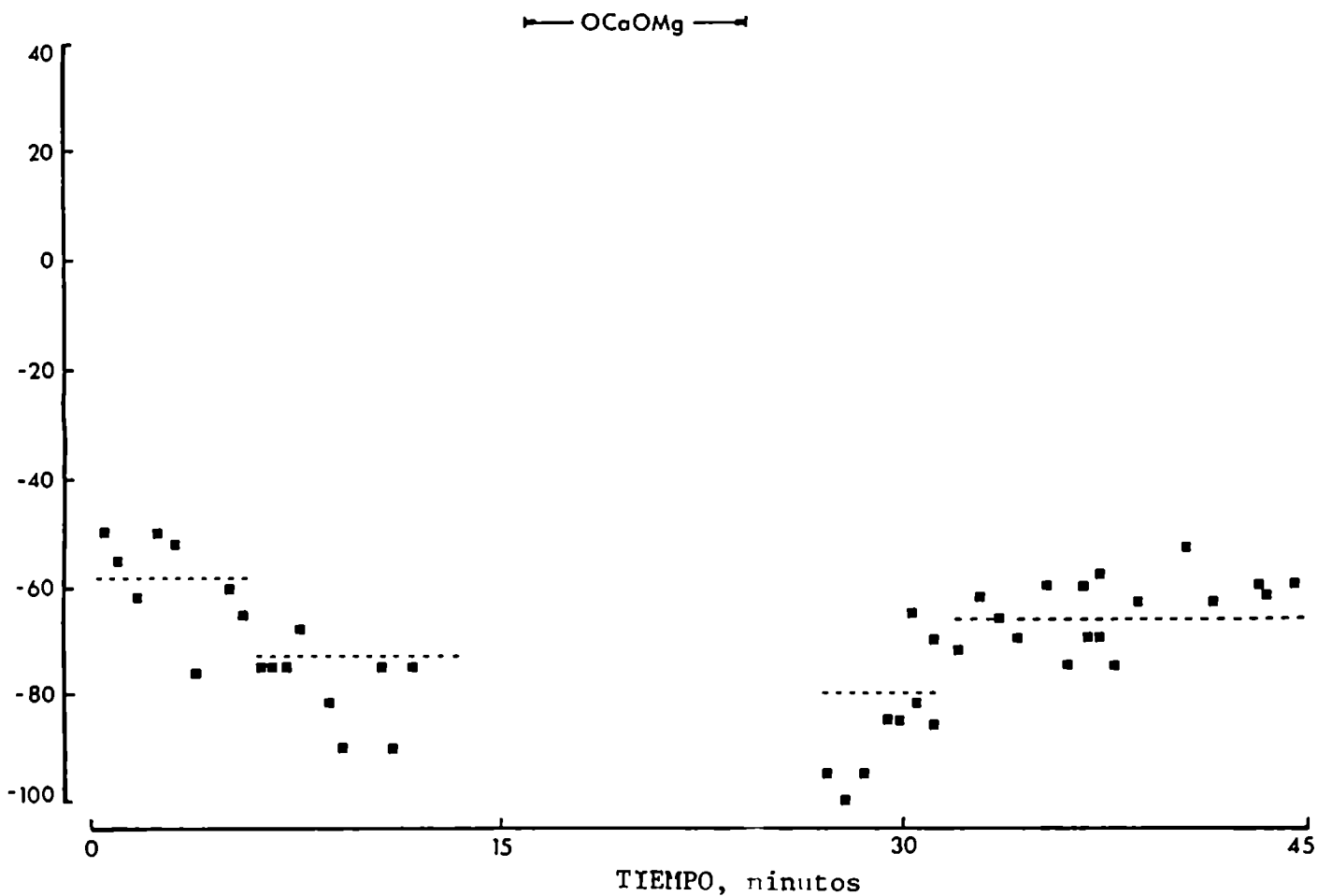


**FIGURA 36:** Efecto de la presencia de EDTA (5 mM) sobre las DP de un PE aislado suspendido en SRT en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el baño externo.

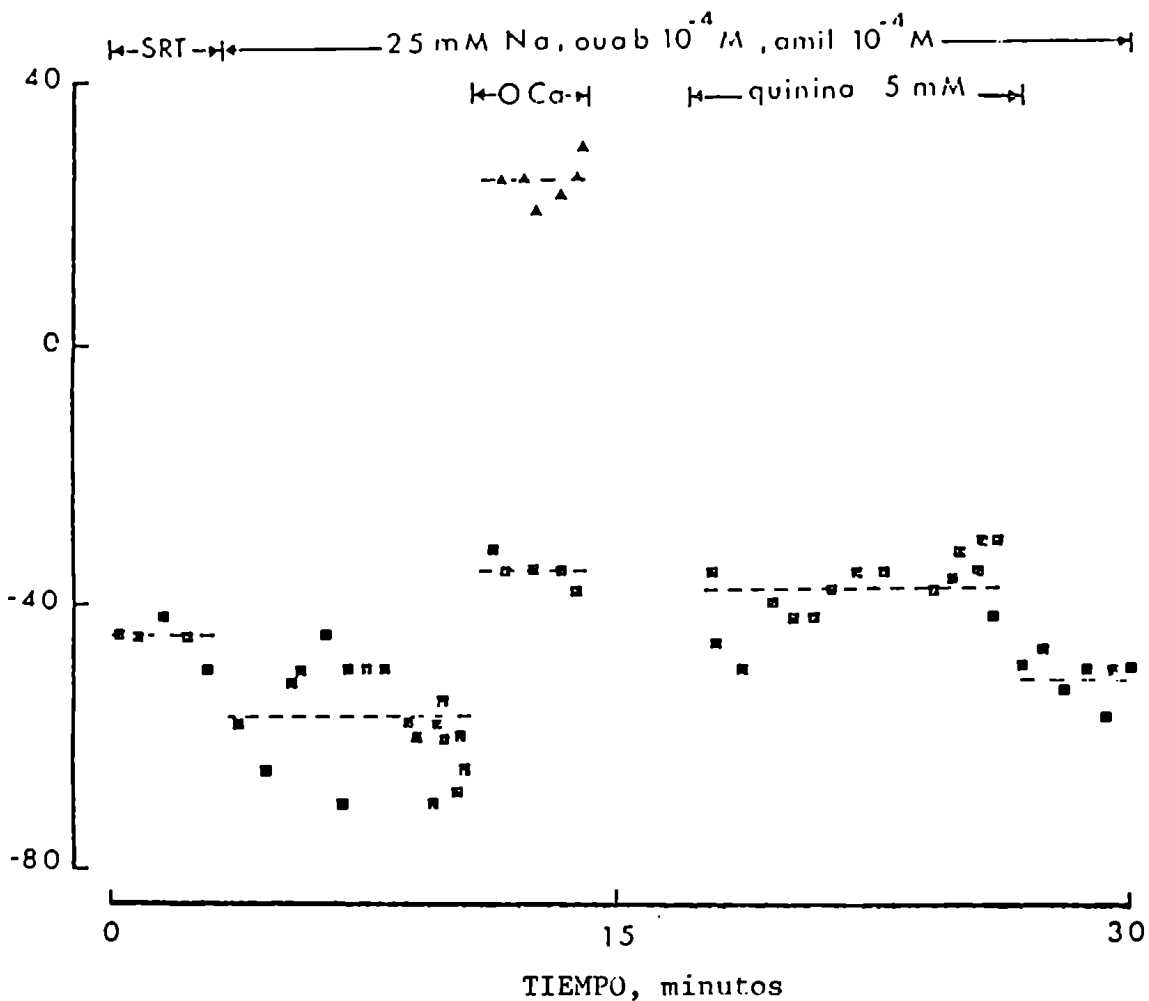
El fenómeno descrito también se manifestó en PEs tratados con  $10^{-4}$  M de ouabaína (Figura 37),  $10^{-4}$  M de amiloride (Figura 38), ambas drogas conjuntamente (Figura 39) o en presencia de  $Ba^{+2}$  (Figura 40).



**FIGURA 37:** Registros de las DP en un PE tratado con ouabaína ( $10^{-4}$  M), en ausencia y presencia de  $Ca^{+2}$  en el baño externo.



**FIGURA 38:** Efecto de la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el baño externo sobre las DP de PEs tratados con amiloride ( $10^{-4}$  M).



**FIGURA 39:** Efecto de la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o presencia de quinina (5 mM) en el baño externo sobre las DP de PEs tratados con ouabaína ( $10^{-4}$  M) y amiloride ( $10^{-4}$  M).

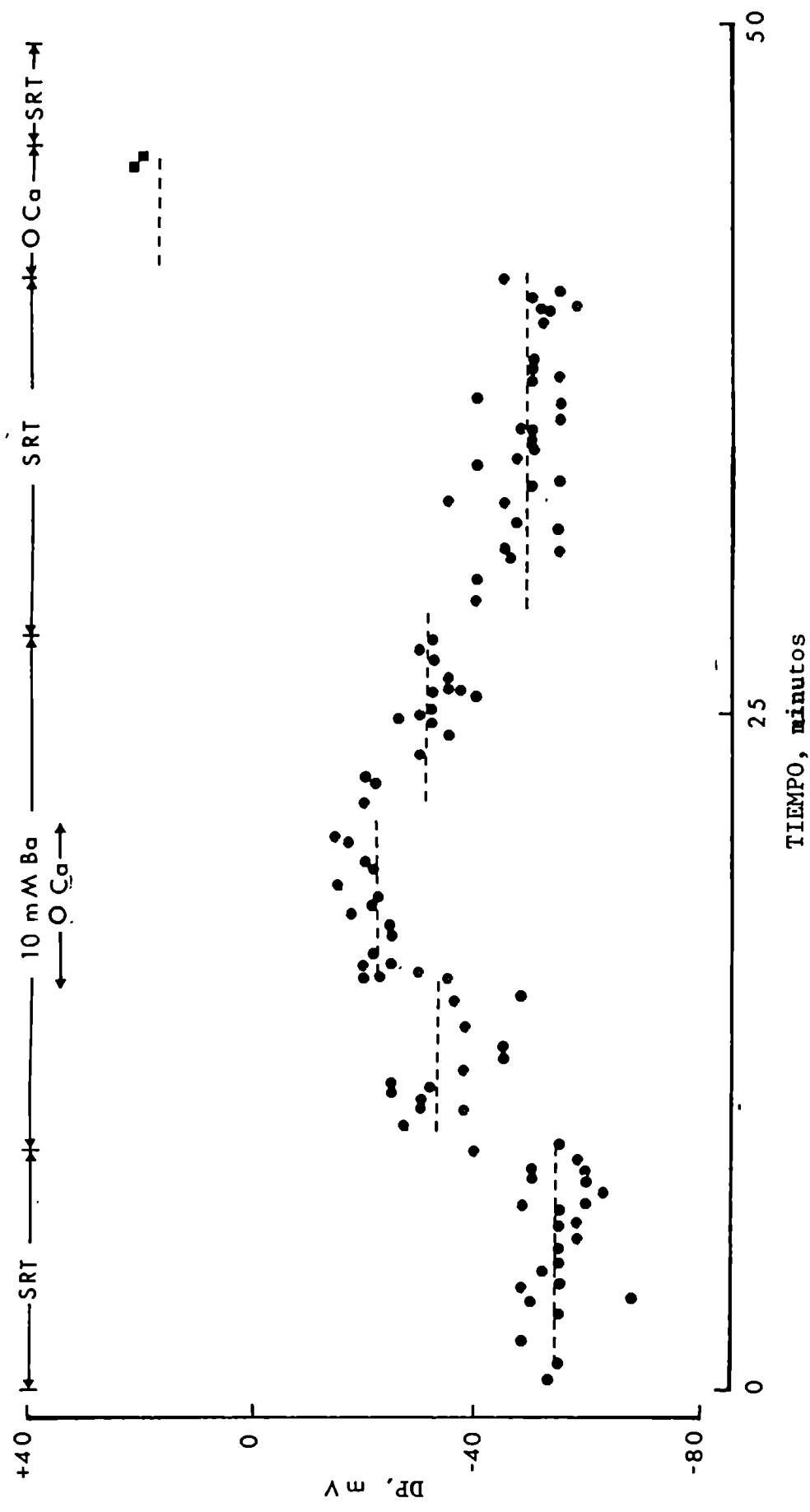


FIGURA 40: Efecto de la ausencia de  $Ca^{2+}$  en el baño externo sobre las DP de PEs tratados con  $Ba^{2+}$  (10 mM).

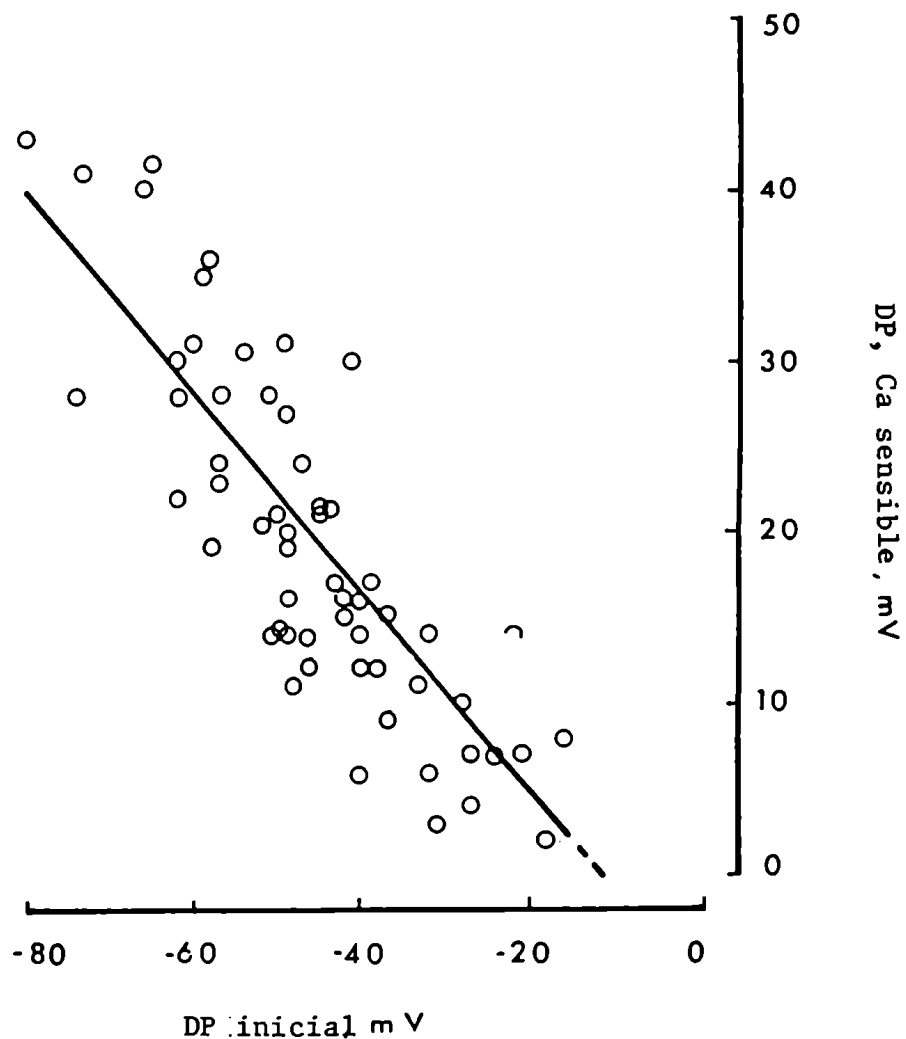
En la Tabla 10 se muestran las DP promedios obtenidas en las distintas experiencias.

Medición en	DPneg mV	DPpos mV
SRK o SRT	-52 <sub>±</sub> 1 (117)	
SRT-OCa	-33 <sub>±</sub> 1 (69)	+19 <sub>±</sub> 1 (63)
SRK o SRT + ouab.10 <sup>-4</sup> M	-41 <sub>±</sub> 3 (13)	
SRK-OCa o SRT-OCa + ouab.10 <sup>-4</sup> M	-24 <sub>±</sub> 3 (8)	+16 <sub>±</sub> 1 (7)
SRT + Amil 10 <sup>-5</sup> M	-58 <sub>±</sub> 2 (6)	
SRT-OCa + Amil 10 <sup>-5</sup> M	-42 <sub>±</sub> 5 (6)	+22 <sub>±</sub> 4 (6)
SRT + Amil 10 <sup>-5</sup> M + ouab.10 <sup>-4</sup> M	-57 <sub>±</sub> 1 (5)	
SRT-OCa + Amil 10 <sup>-5</sup> M + ouab.10 <sup>-4</sup> M	-26 <sub>±</sub> 1 (2)	+16 <sub>±</sub> 1 (2)

TABLA 10

Una característica importante es que la depolarización de la DP negativa medida en ausencia de Ca<sup>+2</sup> externo depende de la DP registrada en sus respectivos controles. Se pudo establecer que la DP negativa en ausencia de Ca<sup>+2</sup> está linealmente relacionada con el valor de la DP medida en presencia de Ca<sup>+2</sup> en el baño externo, independiente de otras condiciones experimentales. La recta de la Figura 41 obtenida, la cual extrapoló a una DP inicial de -8mV indica que el efecto que la ausencia de Ca<sup>+2</sup> produce sobre la DP es originado por un mecanismo no relacionado a la ouabaína, amiloride, Ba<sup>+2</sup>, etcétera y que es dependiente de voltaje.





**FIGURA 41:** Dependencia del efecto de la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (DP sensible al  $\text{Ca}^{+2}$ ) respecto de la DP inicial en PEs controles o tratados con ouabaína.

Por otra parte, la depolarización de la DP que se produce en una solución libre de  $\text{Ca}^{+2}$ , es específica de la falta de este catión divalente. En experiencias realizadas en un mismo PE en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  y en presencia de concentraciones variables de  $\text{Mg}^{+2}$  ( $|\text{Mg}^{+2}|_o$ ) se observó que este

catión no revierte el efecto que produjo la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la DP ya sea en presencia como en ausencia de ouabaína (Figura 42 a y b).

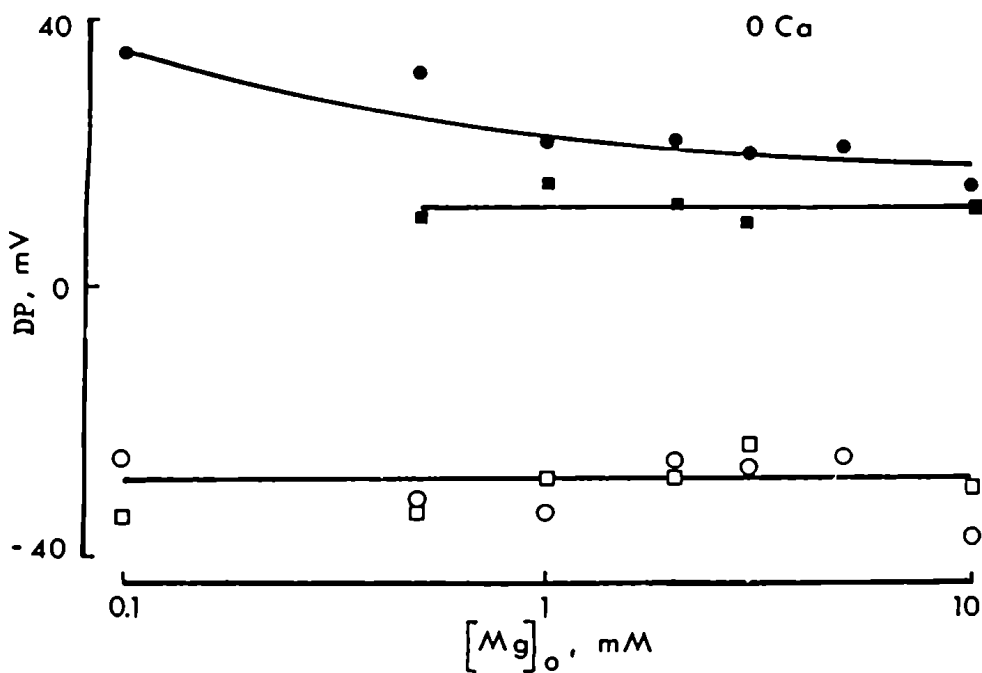
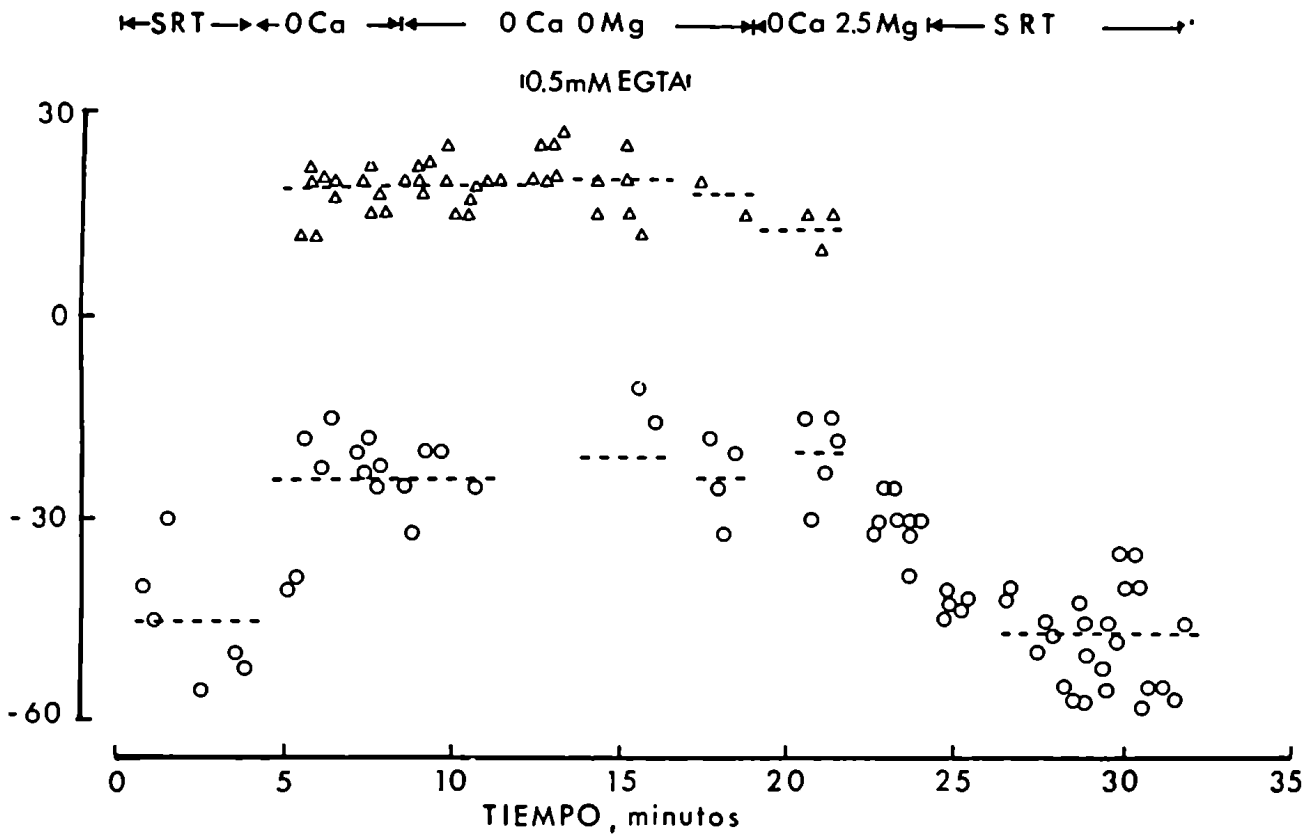


FIGURA 42 a y b: Efecto del  $\text{Mg}^{+2}$  en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo en PEs controles (O) o tratados con  $10^{-4}$  M de ouabaína (□).

Merece mencionarse que los registros de las DP en SRT libre de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  se mantiene también en presencia de 0.5 mM de EGTA agregado al baño externo. El ión  $\text{Ba}^{+2}$  tampoco reemplaza el  $\text{Ca}^{+2}$  externo. La Figura 43 a y b muestra que este catión divalente tampoco revierte el efecto que produce sobre la DP la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo.

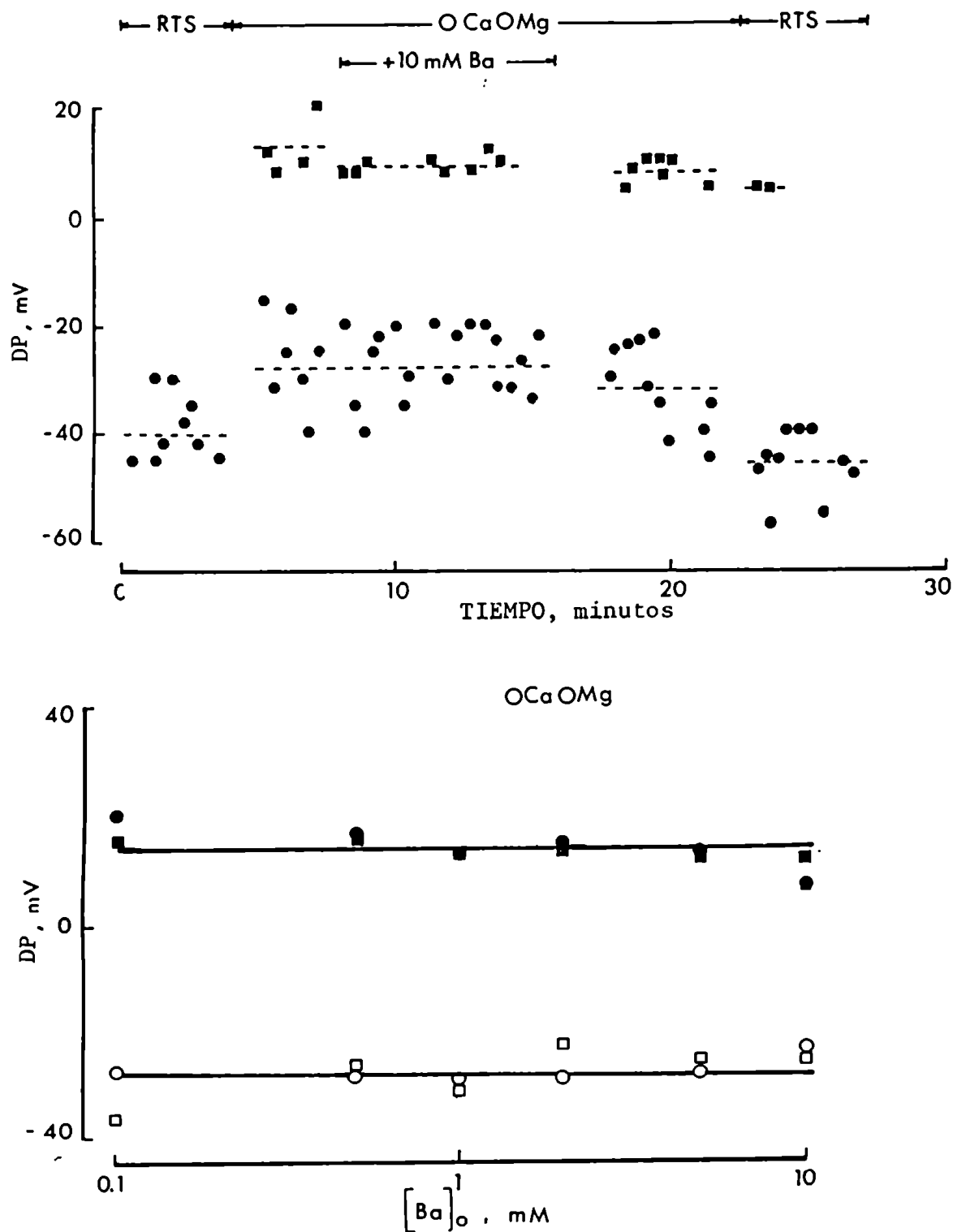


FIGURA 43a y b: Efecto del  $\text{Ba}^{+2}$  en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo sobre las DP de PEs controles (O) o tratados con  $10^{-4}$  de ouabaína (□). Los valores de las DP en OCaOMg son (mV). (O)  $-30 \pm 2$  (10) y (●)  $+17 \pm 1$  (8) y en OCaOMg en presencia de ouab. son: (□)  $-39 \pm 3$  (15) y (■)  $+16 \pm 1$  (8), respectivamente.

Resultados similares se observaron cuando el  $\text{Ca}^{+2}$  externo fue reemplazado por  $\text{Sr}^{+2}$  (hasta 10 mM), pudiéndose observar que este ión no sólo es incapaz de revertir el efecto sobre la DP producido por la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  sino que depolariza aún más las DP (Figura 44).

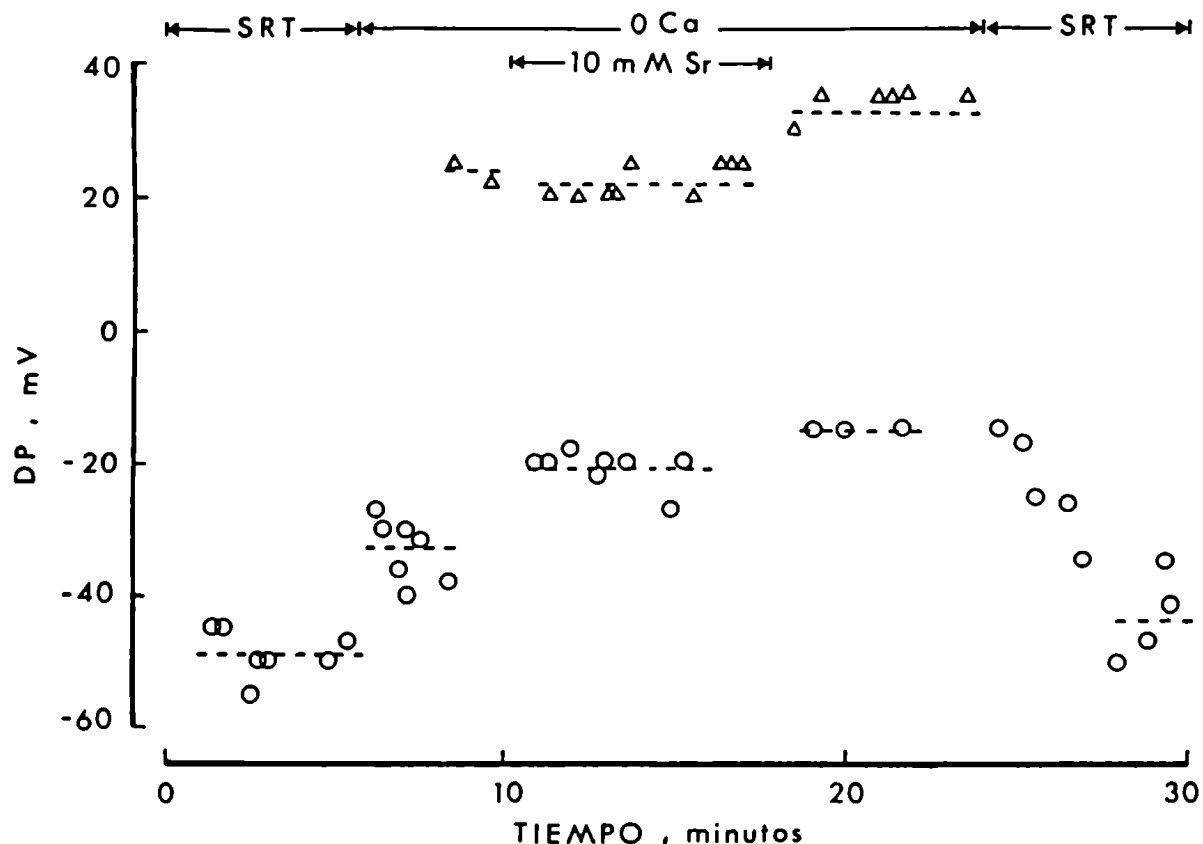
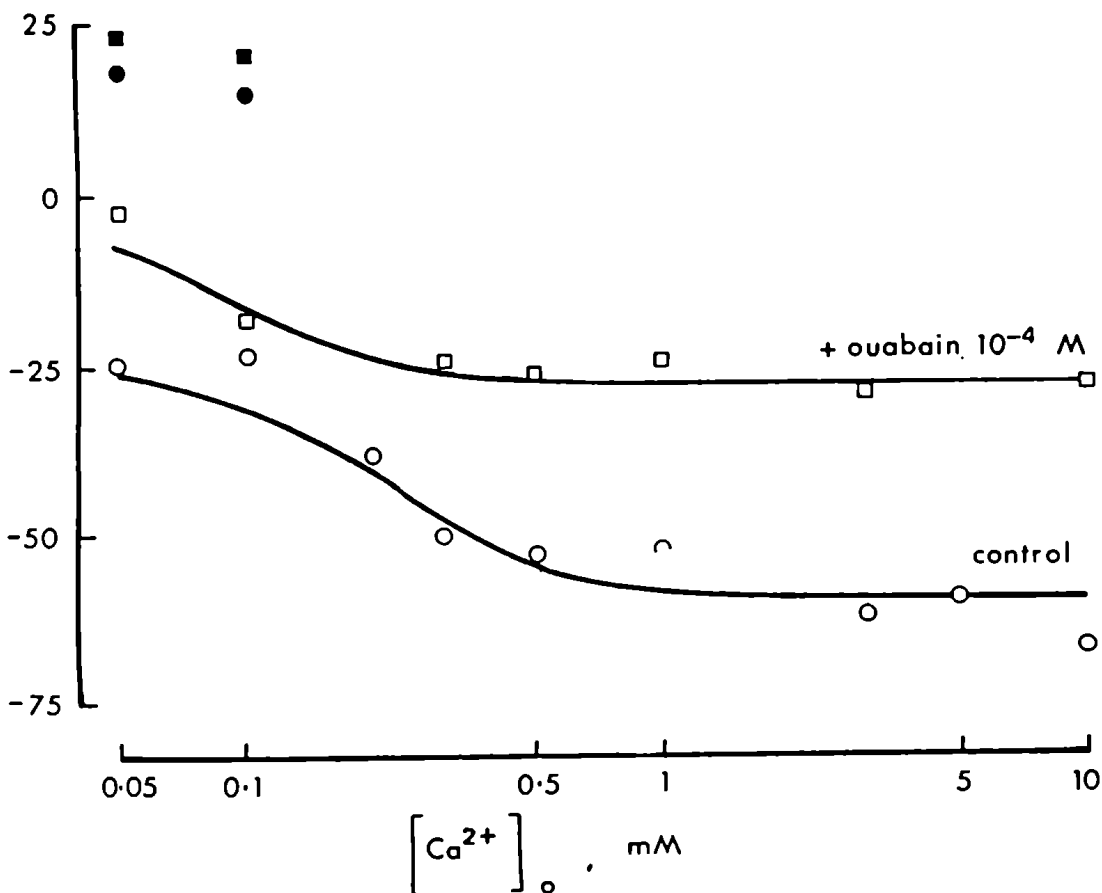
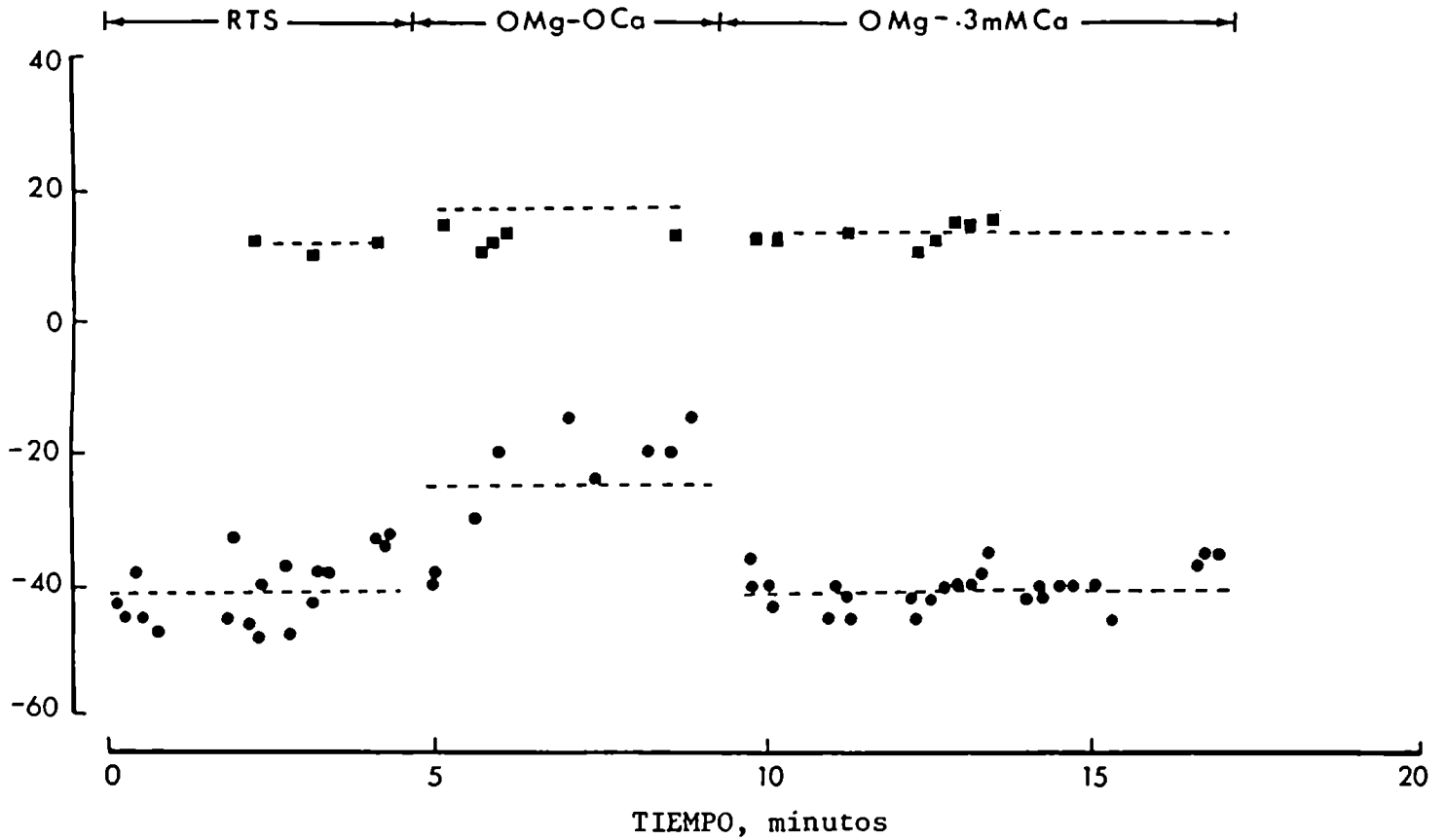


FIGURA 44: Efecto del  $\text{Sr}^{+2}$  en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el baño externo sobre las DP de PEs controles.

El próximo punto de interés fue establecer la sensibilidad de las DP negativas a la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  en el baño externo ( $|\text{Ca}^{+2}|_o$ ). En un primer tipo de experiencias se modificó la  $|\text{Ca}^{+2}|_o$  en un mismo PE suspendido en SRT en ausencia de  $\text{Mg}^{+2}$  y presencia de 2 mM de EDTA. Se observó que concentraciones tan pequeñas como 0.3 mM de  $\text{Ca}^{+2}$ , que corresponde a aproximadamente ocho veces menos que la  $|\text{Ca}^{+2}|_o$  en SRT, restablece los valores de

los controles (Figura 45a).



**FIGURA 45a y b:** Efecto del  $Ca^{2+}$  externo sobre las DP de PEs controles (O) o tratados con  $10^{-4}$  M de ouabaína (□). La curva continua se calculó con los parámetros dados en la Tabla 17 considerando que una fracción de la  $P'_{Na}$  y de la  $P'_{Cl}$  es sensible al  $Ca^{2+}$  externo.

Se realizaron entonces experiencias en las cuales se determinó las DP de PEs controles y tratados con ouabaína suspendidos en distintas  $|Ca^{+2}|_o$  en el rango de 0.05 a 10 mM (Figura 45b). La curva teórica correspondiente a un PE en presencia de ouabaína (Figura 45b), se ajustó a partir de la ecuación 3 tomando los parámetros  $|Cl^-|_i$  y  $|K^+|_i$  como constantes para todo el rango de la  $|Ca^{+2}|_o$  usadas (Tabla 17), mientras que las  $P'_{Na}$  y  $P'_{Cl}$  se consideraron funciones del  $|Ca^{+2}|_o$  de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$P'_{Na} = P'_{Na}{}^{ins} + P'_{Na}{}^{Ca^{+2}} (1 - \theta) \quad (8)$$

$$P'_{Cl} = P'_{Cl}{}^{ins} + P'_{Cl}{}^{Ca^{+2}} (\theta) \quad (9)$$

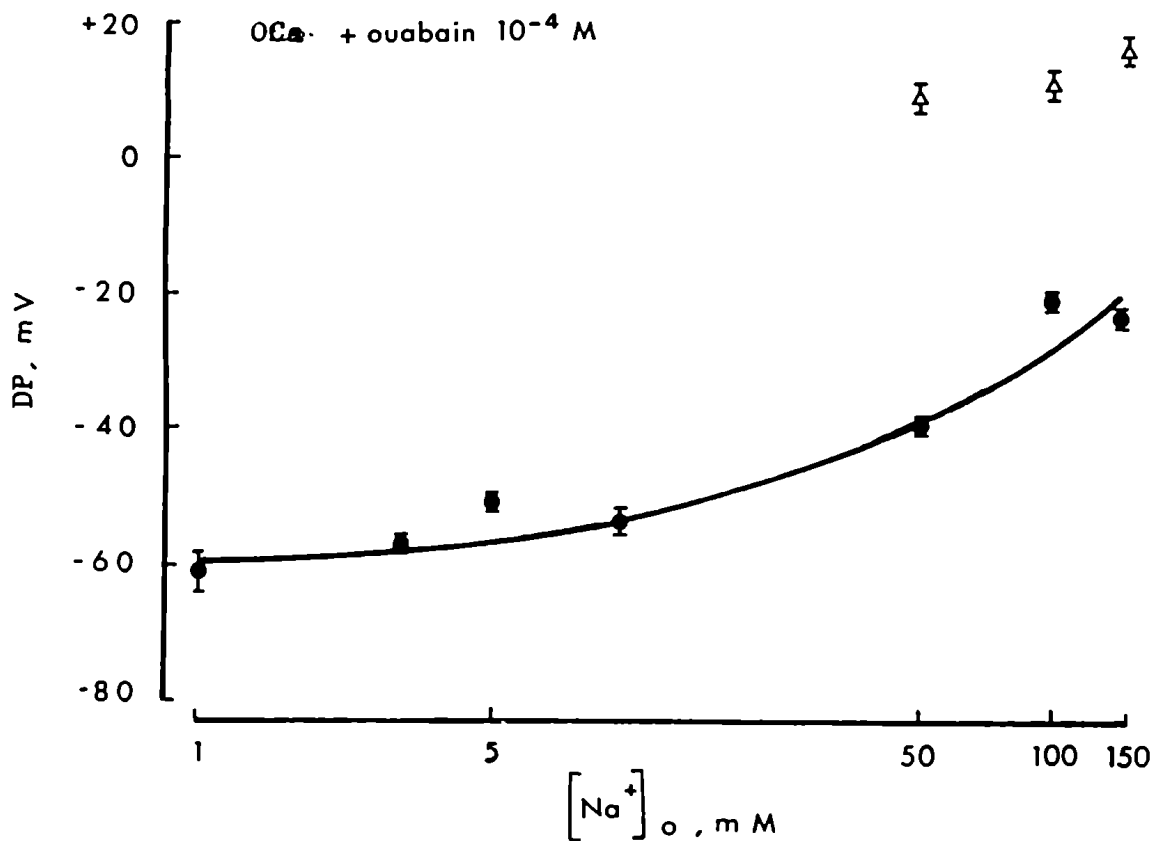
donde

$$\theta = \frac{1}{\frac{a}{|Ca^{+2}|_o^2} + \frac{b}{|Ca^{+2}|_o} + 1}$$

Las  $P'_{Na}{}^{ins}$  y  $P'_{Cl}{}^{ins}$  son las permeabilidades relativas de  $Na^+$  y de  $Cl^-$  respectivamente, insensible a la  $|Ca^{+2}|_o$ ;  $P'_{Na}{}^{Ca^{+2}}$  y  $P'_{Cl}{}^{Ca^{+2}}$  son las permeabilidades relativas de  $Na^+$  y de  $Cl^-$  sensibles al  $Ca^{+2}$  externo y por último a y b son constantes de disociación aparentes.

A partir del cálculo de la  $P'_{Na}$  y  $P'_{Cl}$  de acuerdo a las ecuaciones 8 y 9 se observó que en ausencia de  $Ca^{+2}$  en el baño externo, aumenta la permeabilidad relativa de  $Na^+$  pero disminuye la permeabilidad relativa de  $Cl^-$ , lo que sugeriría que en PEs suspendidos en soluciones libres de  $Ca^{+2}$ , aumentarían las permeabilidades aparentes de  $Na^+$  y de  $K^+$ . Una evidencia más en este aspecto lo constituye las mediciones de las DP realizadas en PEs tratados con ouabaína y suspendidos en concentraciones variables de  $Na^+$  externo, en ausencia de  $Ca^{+2}$  externo. Se observó que las DP negativas se

depolarizan a medida que aumenta la  $|\text{Na}^+|_o$  y que las DP positivas sólo están presentes a  $|\text{Na}^+|_o$  mayores de 10 mM (Figura 46).



**FIGURA 46:** Efecto de la ausencia de  $\text{Na}^{+2}$  externo sobre las DP en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo en un PE tratado con ouabaína ( $10^{-4}$  M).

La curva teórica de  $DP = f |\text{Na}^+|_o$  se calculó a partir de la ecuación 3 tomando las  $|\text{Cl}^-|_i$ ;  $|\text{K}^+|_i$ ,  $P'_{\text{Na}}$  y  $P'_{\text{Cl}}$  como parámetros de ajuste (Tabla 17). Si se comparan estos valores con los obtenidos en la Figura 24, se observa que mientras las  $|\text{K}^+|_i$  y  $|\text{Cl}^-|_i$  son similares en ambos casos, las  $P'_{\text{Na}}$  y  $P'_{\text{Cl}}$  son mayor y menor respectivamente en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  con respecto a la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el baño externo.

Hasta aquí se demostró que el efecto que ocasiona la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el baño externo es específico de este catión divalente y dado que ocurre

tanto en presencia como en ausencia de ouabaína, se trataría de un mecanismo independiente de la bomba Na/K.

Hay evidencias que sugerirían que la depolarización de las DP negativas observadas en soluciones libres de  $\text{Ca}^{+2}$  sería consecuencia de un aumento inespecífico de las permeabilidades aparentes de los cationes monovalentes como ocurre en piel de rana (Van Driessche y Zeiske, 1982). Sin embargo no puede descartarse la existencia de un posible mecanismo por el cual el  $\text{Ca}^{+2}$  externo activaría la  $P_K$ .

Ambas posibilidades: 1) una  $P_K$  activada por  $\text{Ca}^{+2}$  y 2) una permeabilidad catiónica puesta de manifiesto en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo, se analizarán en detalle en la Discusión.

- Efecto de la 6-metoxil- $\alpha$ -(5-vinil-2--quimidinil)-4-quinolinemetanol (quinina) sobre las DP.

La posible existencia de una permeabilidad de  $\text{K}^+$  activada por  $\text{Ca}^{+2}$  se investigó mediante el uso de un inhibidor específico como lo es la quinina que en glóbulo rojo bloquea la  $P_K$  activada por  $\text{Ca}^{+2}$  (Armando-Hardy y col., 1975; Lew y Ferreyra, 1978; Szasz y col., 1978; Reichstein y Rothstein, 1981). En PEs de Echinococcus granulosus esta droga produce una notable depolarización de las DP con respecto a sus controles. La Figura 39 muestra las DP de un PE aislado primeramente en condiciones control y luego en presencia de 2 mM de quinina. La depolarización observada es reversible y se manifestó tanto en PEs controles como en PEs tratados con ouabaína, amiloride o ambas drogas conjuntamente (Figura 47). También fue posible observar que la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  posterior al tratamiento de los PEs con quinina, depolariza aún más las DP negativas y aparecen las deflexiones positivas (Figura 47).



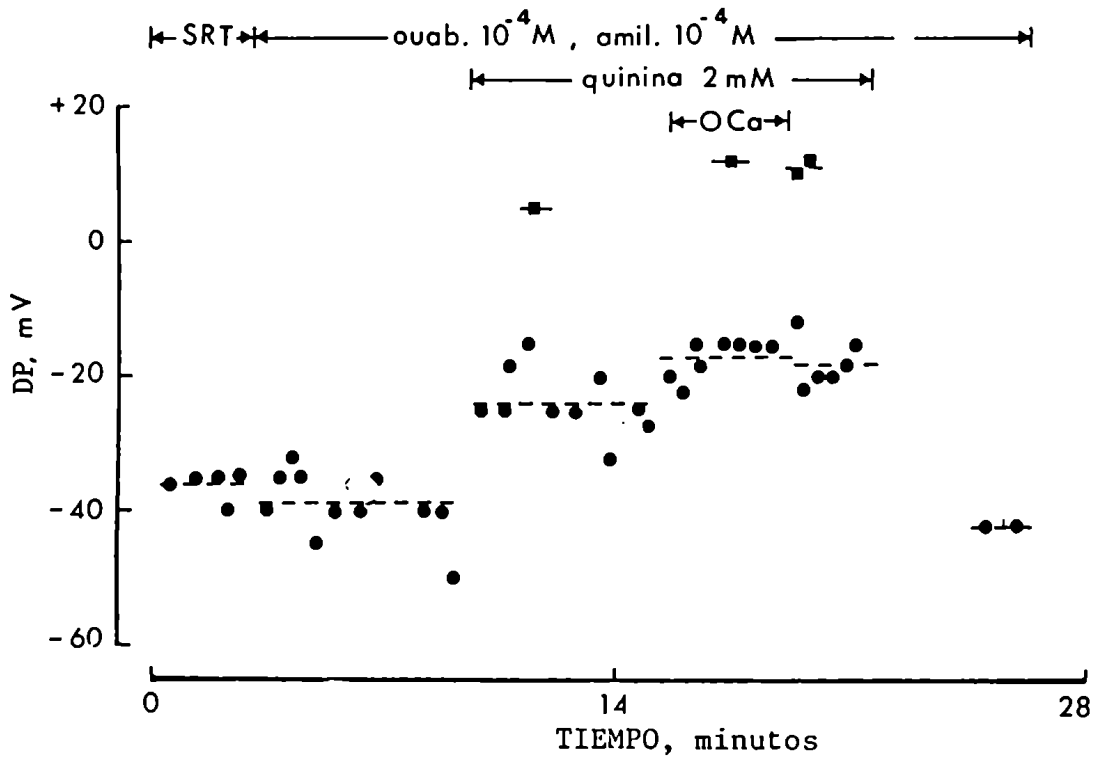


FIGURA 47: Efecto de la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el baño externo sobre las DP de PEs tratados con ouabaína ( $10^{-4}$  M), amiloride ( $10^{-4}$  M) y quinina (2 mM).

El estudio de las DP en función de la concentración externa de quinina ( $[\text{quinina}]_o$ ), mostró la depolarización progresiva a medida que aumenta la  $[\text{quinina}]_o$  hasta alcanzar un valor máximo para  $[\text{quinina}]_o$  de 2 mM (Figura 48).

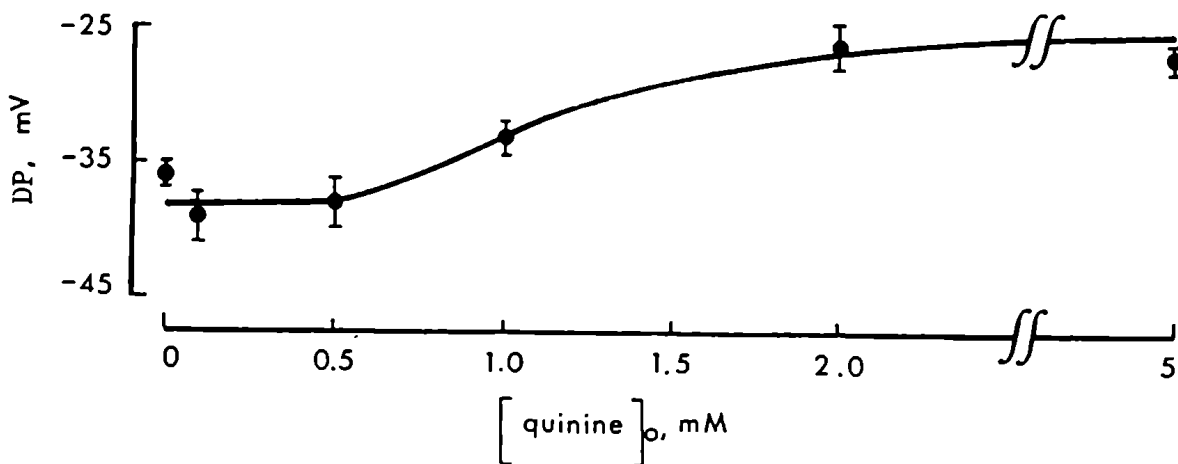


FIGURA 48: Efecto de la quinina sobre las DP de PEs controles.

El próximo aspecto que se quiso analizar fue establecer si el efecto producido sobre la DP sería debido a un bloqueo de la  $P_K$  dependiente de la  $[Ca^{+2}]_o$ . Se calcularon entonces la  $P_{Rb}$  ( $P_K$ ) a partir de la ecuación 4 con las DP medidas en presencia de 5 mM de quinina en ausencia y presencia de 2,5 mM de  $Ca^{+2}$  en el baño externo y los influjos de  $Rb^+$  medidos por Cybel y col. (1984a) en las mismas condiciones experimentales. La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos pudiéndose observar que en presencia de quinina, la  $P_{Rb}$  disminuye significativamente con respecto a sus controles, independiente de la ausencia o presencia de  $Ca^{+2}$  en el baño externo. En otras palabras, la quinina estaría bloqueando específicamente un posible mecanismo de  $P_K$  activado por  $Ca^{+2}$  interno el cual sería en principio independiente de la presencia o no de  $Ca^{+2}$  en el baño externo.

Medición en	JinRb	DP	$P_{Rb}$
	mol/g.s hora	mV	(cm seg <sup>-1</sup> ) x 10 <sup>7</sup>
SRK + ouab.10 <sup>-4</sup> M	23.3±2 (15)	-41±1 (13)	5.1±0.5 (15) * †
SRK + ouab.10 <sup>-4</sup> M + quinina 5 mM	12.1±0.6 (5)	-27±1 (2)	3.2±0.4 (5) †
SRK-OCa + ouab.10 <sup>-4</sup> M	28.5±0.6 (14)	-24±3 (8)	8.0±0.5 (14) *
SRK-OCa + ouab.10 <sup>-4</sup> M + quinina 5 mM	21,6±0.5 (8)	-24±2 (2)	6.1±0.4 (8)

\* P < 0.001

† P < 0.01

TABLA 11

- Significado de las DP positivas


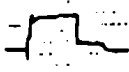




Se observó que PEs en determinadas condiciones experimentales tales como

el enriquecimiento en  $\text{Na}^+$  o la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo, se registraron deflexiones positivas independientes de las DP negativas (Tablas 1, 3 y 10). Con el propósito de estudiar si existe alguna relación entre la aparición de estas DP positivas y las DP negativas, se realizó un análisis de frecuencia de aparición de las citadas DP. Esto es, se observó los diversos perfiles de DP obtenidos en cada empalamento (Figura 49), analizándose las distintas secuencias de aparición de las deflexiones positivas. Para ello se definió las siguientes configuraciones de DP: negativo (n); positivo (p); negativo-positivo (np); positivo-negativo (pn); negativo positivo negativo (npn) y positivo negativo positivo (pnp). Se pudo observar que en PEs controles la frecuencia de aparición más probable es la configuración negativa (86.4%) y sigue a continuación la negativo-positivo (9.5%). En ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  que produce un marcado incremento de las DP positivas, la frecuencia más probable es negativo-positivo (39.7%) y la sigue la configuración negativo (33.3%). Estos resultados pueden interpretarse sobre la base de que las DP positivas y negativas se originan en distintas barreras. Las DP positivas corresponderían a una barrera más profundamente situada que la responsable de la DP negativa, posiblemente la membrana basal del regumento.

Es importante mencionar que si bien la aparición de las DP positivas ocurre en aproximadamente un 14% de los controles, el valor de estas DP no son significativamente diferentes de cero. En cambio, en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo no sólo aumenta la frecuencia de aparición de las DP positivas (Figura 49), sino también el valor de las mismas (Tabla 10). La Figura 50 muestra la relación existente entre las DP negativas y las DP positivas en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo pudiéndose observar:

- 1) la aparición de las DP positivas fundamentalmente en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  y presencia de  $\text{Na}^+$  independiente de otras condiciones experimentales

perfil del potencial

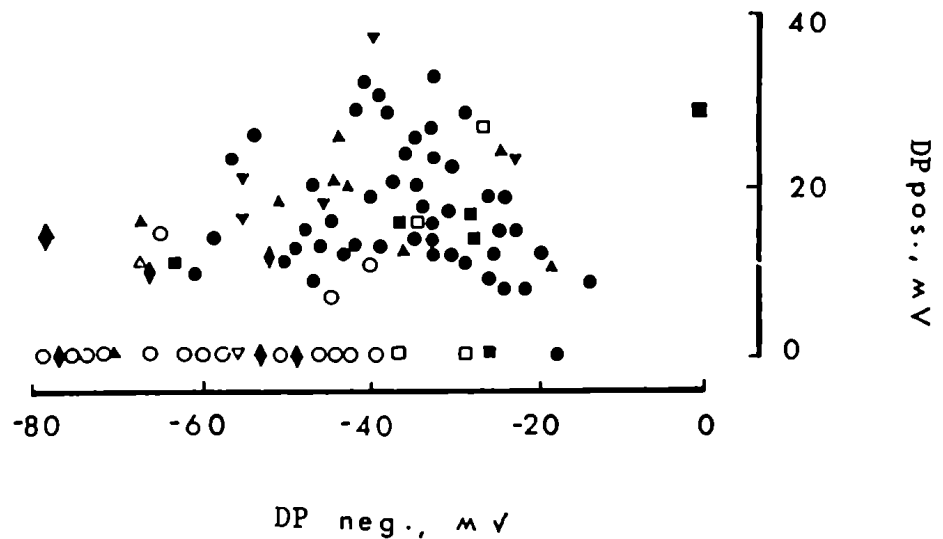
	RKS		RKS-0 Ca	
	n	%	n	%
	400	86.4	149	33.3
	10	2.2	48	10.7
	44	9.5	178	39.7
	6	1.3	51	11.4
	0	0.0	12	2.7
	3	0.6	10	2.2
	463	100	448	100

1  
 50mV  
 T  
 ←10 s→

57

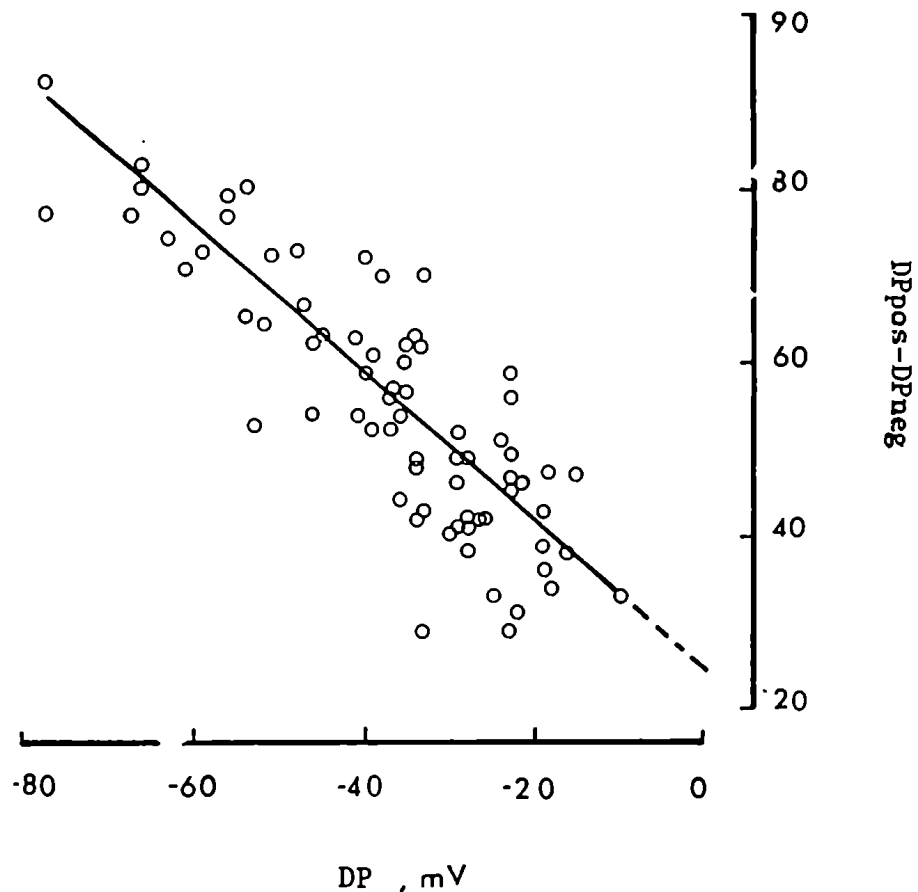
**FIGURA 49:** Frecuencia de aparición de las DP positivas y DP negativas de PEs controles e incubados en ausencia de  $Ca^{+2}$  en el baño externo.

como presencia de ouabaína y/o amiloride, etcétera y 2) que existe total independencia entre los valores de las DP positivas y las DP negativas medidas en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el baño externo.



**FIGURA 50:** Relación entre las DP positivas y DP negativas medidas en: a) PEs controles (O) o incubados en presencia de ouabaína (□), amiloride (▽) o 25 mM de  $\text{Na}^+$  (◆) en el baño externo y b) PEs suspendidos en SRT en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  (●) y presencia de ouabaína (■), amiloride (▼), 25 mM de  $\text{Na}^+$  (▲) o 0 mM de  $\text{Na}^+$  (△) en el baño externo.

Como se analizará más detalladamente en la Discusión, parecería que las DP negativas se originarían en la membrana apical y las DP positivas en la membrana basal del tegumento del PE, ambas DP medidas con respecto al baño externo. Si este fuera el caso, la diferencia de las DP positivas menos las DP negativas ( $\text{DP}_{\text{pos}} - \text{DP}_{\text{neg}}$ ) correspondería a la DP de la membrana basal pero con referencia al interior del sincicio (Figura 51).



**FIGURA 51:** Relación lineal obtenida entre las DP positivas- DP negativas y las DP negativas de PEs controles incubados en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  y presencia o ausencia de ouabaína ( $10^{-4}$  M), amiloride ( $10^{-4}$  M) o 25 mM de  $\text{Na}^{+}$  en el baño externo. La recta extrapola a un valor de -25 mV.

Se estudió entonces si existía alguna relación entre las DP negativas y las (DPpos- DPneg) en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el baño externo. La Figura 51 muestra que existe una relación lineal independiente de todas las otras condiciones experimentales. Dicho de otra manera, que a medida que se depolarizan las DPnegativas, se hiperpolarizan las (DPpos- DPneg). En resumen, la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo afectaría tanto la barrera apical como la basal del tegumento del PE.

- Modificaciones de las DP inducidas por el suero de un paciente afectado de hidatidosis.

Se sabe que los huéspedes intermediarios afectados por hidatidosis, entre

los cuales se incluye el hombre, posee inmunoglobulinas específicas circulantes detectables en el suero con la prueba de inmunoelectroforesis (Caprin y col., 1967) o de aglutinación de látex (Williams y Prezioso, 1970). Estas inmunoglobulinas al igual que otras macromoléculas del huésped atraviesan la membrana laminar situándose sobre la membrana germinal del quiste hidatídico (Coltorti y Varela Diaz, 1974).

Se estudió entonces si alguna de las inmunoproteínas contenidas en el suero de paciente hidatídico (SPH) reaccionaría con la superficie del PE y las modificaciones del sincicio que podría ocasionar. Se realizaron un conjunto de experiencias donde los PEs, extraídos de la forma habitual, se colocaron en presencia de suero humano normal y de paciente hidatídico (título test de látex 1:320) total e inactivado de acuerdo a la técnica de inmunofluorescencia indirecta (ver Materiales y Métodos). Luego se sometieron a un examen cualitativo y cuantitativo mediante microscopía óptica y de fluorescencia. Se observó fluorescencia distribuída más o menos homogéneamente sólo en aquellos PEs que fueron incubados en presencia de SPH (Figura 52).

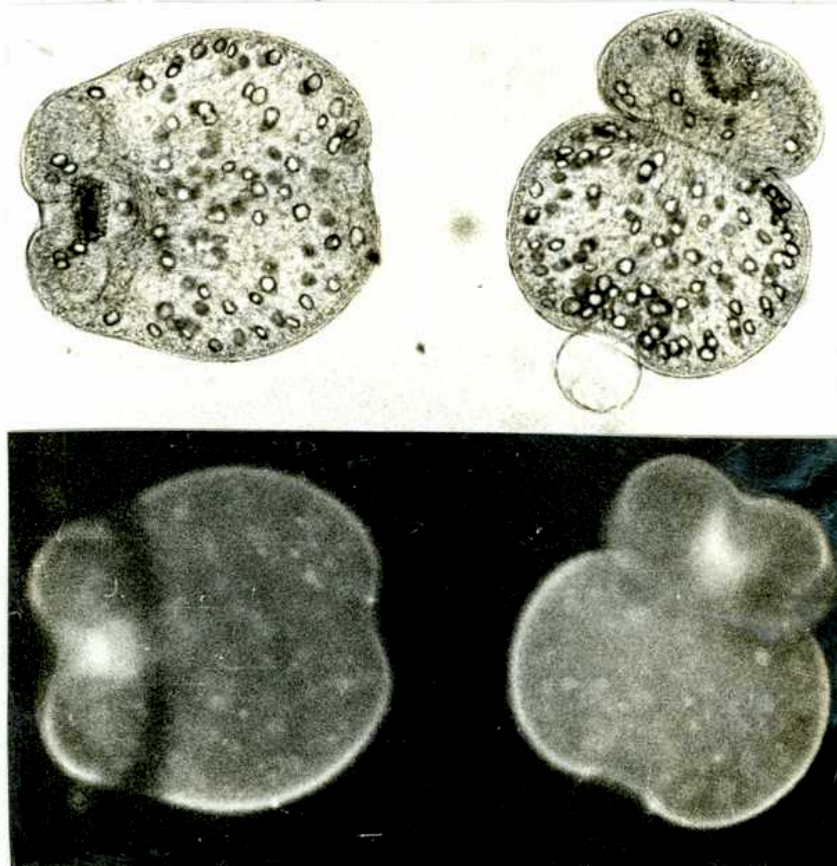


FIGURA 52: Imagen de un PE incubado en presencia de suero de paciente hidatídico y de antisuero humano de acuerdo a la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Se observa una fluorescencia homogénea sobre la superficie del PE.

Los PEs muertos al igual que ganchos y ventosas de PEs viables poseen autofluorescencia que pudo ser descartada por comparación con el estado de integridad de los mismos. El examen cuantitativo reveló un 4% de positividad sólo en aquellos PEs incubados con SPH total o inactivado a 56°C con una significancia menor del 5% respecto de sus controles (Tabla 12).

<u>Preincubación</u>	<u>Suero</u>	<u>% fluorescencia</u>
SRT		0 *
SRT + suero humano normal dil.1:10	total inactivado	0 0
SRT + suero de paciente hidatídico dil.1:10	total inactivado	4 4 *

\* P < 0.05

TABLA 12

Por otra parte se midieron las DP en un PE en presencia de SPH (dil.1:10) pudiéndose observar una notable e irreversible depolarización de las DP con respecto a su control que alcanza su máximo efecto 20 minutos después del agregado de SPH (Figura 53). La Tabla 13 muestra los valores de las DP obtenidos en PEs controles y PEs tratados con suero humano normal o de paciente hidatídico total o inactivado. Nuevamente se observa que sólo el SPH total produce una significativa depolarización de las DP de -52 a -27 mV.

Estos resultados sugerirían que existen en el suero del paciente hidatídico inmunoproteínas capaces de interactuar con antígenos de superficie del PE. La reacción inmunológica ocasionaría en presencia de complemento modificaciones significativas en las DP medidas a través del tegumento.



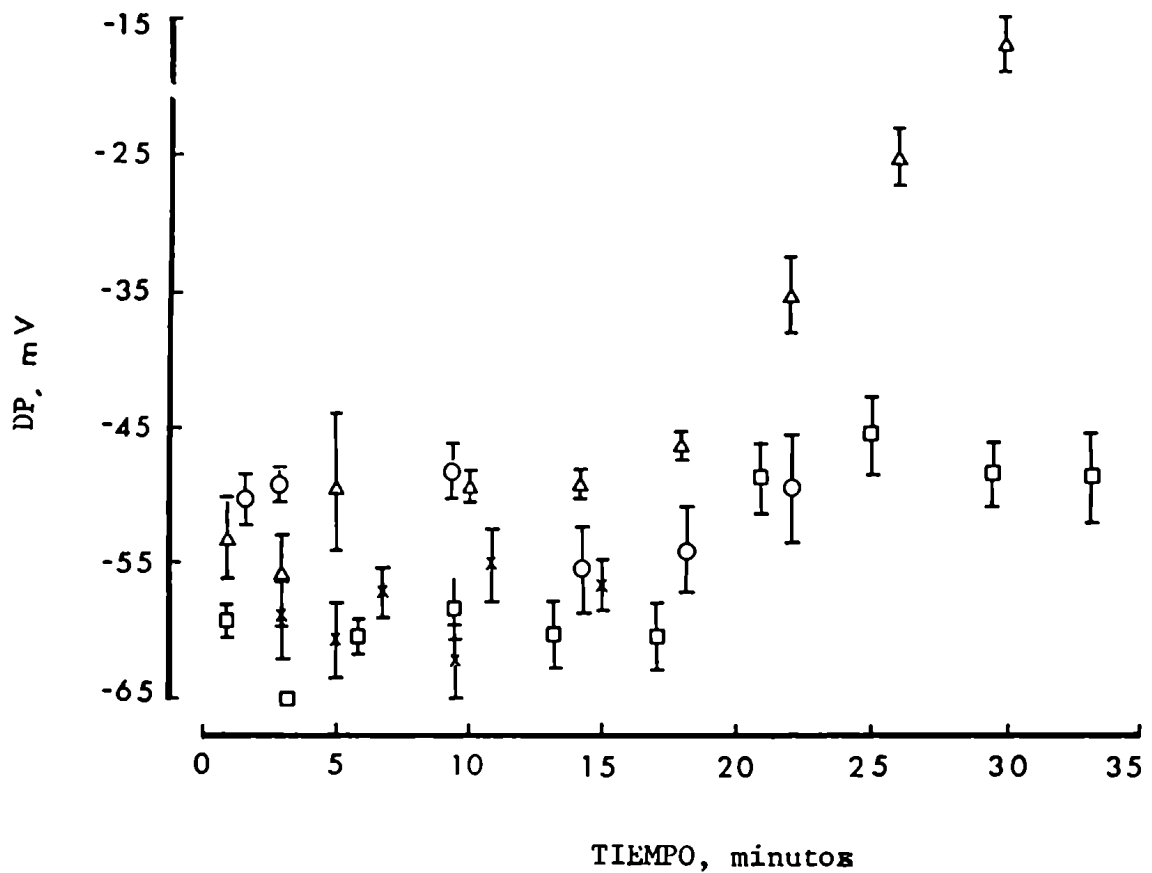


FIGURA 53: Efecto del suero total ( $\Delta$ ) o inactivado ( $\square$ ) de un paciente hidatídico (título 1:3200) sobre las DP de un PE control. Obsérvese que el suero total ( $\circ$ ) o inactivado ( $\times$ ) de un individuo normal diluido 1:10 no produce cambios significativos en las DP.

Medición en	DP mV
SRT	$-52 \pm 2$ (88) *
SRT + suero humano normal total dil.1:10	$-50 \pm 1$ (20)
SRT + suero humano normal inactivado dil.1:10	$-52 \pm 1$ (27)
SRT + suero paciente hidatídico total dil.1:10	$-27 \pm 3$ (21) *
SRT + suero pacient hidatídico inactivado dil.1:10	$-53 \pm 2$ (27)

\*  $P < 0.001$

A continuación se calcularon las  $P_{Rb}$  ( $P_K$ ) en presencia de SPH con los registros de DP mostrados en la Tabla 5 y los correspondientes flujos de  $Rb^+$  medidos por Reisin y Cybel en las mismas condiciones experimentales (Tabla 14).

Medición en	Jin Rb	DP	$P_{Rb}$
	$\mu\text{mol/g.s hora}$	mV	$(\text{cm seg}^{-1}) \times 10^7$
SRK + ouab. $10^{-4}$ M	$19.1 \pm 0.2$ (2)	$-42 \pm 2$ (4)	$4.1 \pm 0.2$ (4)
SRK + ouab. $10^{-4}$ M + suero paciente hidatídico total dil. 1:10	$37.5 \pm 1.3$ (2)	$-27 \pm 3$ (5)	$10.0 \pm 0.8$ (6)

TABLA 14

Se pudo observar que la  $P_{Rb}$  en presencia de SPH es significativamente mayor respecto a sus controles. La depolarización de la DP y el aumento de la  $P_{Rb}$  originada en PEs incubados con suero de paciente hidatídico a títulos 1/3200 serían consecuencia de alteraciones tempranas de las membranas del PE (Kassis y col., 1976; Yarzabal y col., 1976).

Curva en f. de	Condición	$ K^+ _i$	$ Cl^- _i$	$P_{Na}/P_K$	$P_{Cl}/P_K$
$ K^+ _o$	SRK + ouab. $10^{-4}M^*$	60.1	6	0.319	1.32
$ K^+ _o$	SRT + ouab. $10^{-4}M$ + amil. $10^{-4}M$	62.7	12	0.17	2.4
$ K^+ _o$	SRK + Val. $10^{-5}M$	40	15	0.20	0.90
$ Rb^+ _o$	SRT + ouab. $10^{-4}M^\dagger$	48.3	9.7	0.151	0.73
$ Na^+ _o$	SRT + ouab. $10^{-4}M$	47.1	7	0.29	1.41
$ Na^+ _o$	SRT-OCa + ouab. $10^{-4}M$	30.9	18	0.46	0.99
$ Ca^{+2} _o$	SRT + ouab. $10^{-4}M$	60	18	Var	Var
$ Ba^{+2} _o$	SRT + ouab. $10^{-4}M$	40	8	Var	Var
$ Amil _o$	SRT + ouab. $10^{-4}M$	60	7	Var	1.35

\* D.S.: 1.343

† D.S.: 0.1698

TABLA 17

## DISCUSION

### - Localización de las DP

Debido a las características del sincicio tegumentario, principalmente su delgado espesor (2-3  $\mu\text{m}$ ) es en principio difícil establecer con certeza el punto en el cual se encuentra el ME cuando se realizan las mediciones de las DP. Sin embargo, los registros obtenidos en PEs en presencia de DOCNa o suero de paciente hidatídico fueron útiles para determinar algunas evidencias respecto de la localización de la barrera de DP negativa. El DOCNa, debido a su acción detergente sobre las membranas celulares, produce una rápida e irreversible depolarización de la DP negativa en concentraciones de 1.0% y 0.1%, llegando en algunos casos a valores de 0 mV con DOCNa al 1% y ocasiona además, rotura y desprendimiento de vesículas segmentarias al cabo de 5 minutos de exposición del PE al detergente (Pappas, 1982). En consecuencia, si se considera que la barrera de la DP negativa se origina en el tegumento, las modificaciones en las DP observadas se podrían atribuir a alteraciones en la permeabilidad de las membranas tegumentarias producidas por el DOCNa. Esta sal

soluble ejerce sobre la superficie del PE un efecto similar al descrito por Connie y col. (1982) en Schistosoma mansoni donde el detergente Triton X-100 es capaz de remover el tegumento y producir la desaparición del potencial eléctrico correspondiente a ese compartimiento.

Una serie de experiencias realizadas con suero de un paciente hidatídico (SPH) sugerirían que la DP negativa se origina a través de la membrana tegumentaria externa del PE. En este sentido pudimos conocer los siguientes aspectos: la localización de inmunoproteínas del SPH (título 1:3200) sobre la superficie del PE y la significativa e irreversible depolarización que sufre la DP en menos de 8 minutos debido a la acción lítica que ejercen las inmunoproteínas sobre dicha superficie. Si bien la importancia de los resultados hallados se analizarán posteriormente, el hecho de observar la presencia de anticuerpos unidos a la superficie del PE, conjuntamente con la rápida e irreversible depolarización de la DP negativa, constituyen una evidencia en favor de que la barrera de la DP negativa se situaría en la membrana tegumentaria externa del PE.

Por otra parte, el promedio de las DP medidas en PEs aislados fue de  $-53 \pm 1$  mV con respecto al baño externo. Este valor no difiere significativamente del potencial eléctrico tegumentario informado en Schistosoma mansoni por Connie y col. (1982) que fue de  $-51.4 \pm 0.6$  mV a pesar de las diferencias existentes entre ambos parásitos. Mientras que estos últimos valores fueron obtenidos en machos de tenia adulta, los PEs son el estadio larval del Echinococcus granulosus donde el tegumento presenta características morfológicas distintas al del parásito adulto.

#### - Efecto de inhibidores metabólicos sobre las DP

El IA, conocido por su acción inhibitoria de la glucólisis, bloquea la síntesis de ATP e impide el almacenamiento de la energía necesaria para el

funcionamiento de la bomba Na/K en preparaciones biológicas tales como glóbulo rojo (Lew, 1971).

El estudio de los posibles efectos del IA sobre las DP en PEs de Echinococcus granulosus permitió relacionar las mismas con la actividad metabólica del parásito. En Resultados se muestra la significativa depolarización observada en PEs incubados en presencia de IA y teniendo en cuenta lo informado por Reisin y col. (1980) respecto a la alteración que se produce en el balance de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  como consecuencia del tratamiento de los PEs con IA, se pensaría que la degradación de glucógeno proporciona la energía requerida para el transporte activo en el PE. Si este fuese el caso, la depolarización de la DP sería consecuencia de la inhibición de la bomba Na/K debido al bloqueo que el IA ejerce sobre la glucólisis anaeróbica.

#### - Caracterización del componente de las DP ouabaína-sensible

El uso de la ouabaína, glicósido cardíaco que inhibe específicamente el transporte activo mediado por la ATPasa Na-K, Mg dependiente (Schatzman, 1953; Garrahan y Glynn, 1967) permitió observar que parte de la DP medida a través de la barrera tegumentaria del PE es sensible a la ouabaína. Es decir que en presencia de esta droga, la DP a través del tegumento del PE sufre una depolarización de características similares a lo informado por Fetterer y col. (1978) y Connie y col. (1982) en machos adultos de Schistosoma mansoni. Como este componente de la DP ouabaína-sensible se manifiesta tanto en PEs frescos como en aquellos ricos en  $\text{Na}^+$  (Tabla 1) se pensó en la existencia de una bomba Na/K que actuaría de manera electrogénica (Adrián y Slayman, 1966; Marmor y Gorman, 1969; Finn, 1973). Esto tiene máxima importancia cuando se trata de altas actividades de transporte activo y flujos pasivos asociados a compartimientos relativamente

pequeños, como lo es el tegumento del PE, ya que la inhibición de una bomba no electrogénica también ocasionaría una depolarización de la DP en presencia de ouabaína, directamente asociada a la alteración de las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Por consiguiente la depolarización en este caso sería secundaria a la caída relativamente rápida del  $\text{K}^+$  intracelular y se debería a una disminución del componente electrodifusivo del  $\text{K}^+$  y no a un fenómeno directamente relacionado a la actividad de la bomba Na-K. Sin embargo, las experiencias realizadas con PEs aislados enriquecidos con  $\text{Na}^+$  (Figura 13) permiten descartar esta posibilidad. Estas experiencias mostraron que si a PE incubados en ausencia de  $\text{K}^+$  externo se los transfiere a una solución que contiene 5 mM de  $\text{K}^+$ , se produce, en menos de 1 minuto, una notable hiperpolarización de la DP, la cual es bloqueada pocos segundos después de la introducción de la ouabaína. Cálculos realizados en base al volumen aparente del tegumento y flujos unidireccionales de  $\text{K}^+$  (Cantillo y col., 1980) permiten estimar que no sería factible explicar la hiperpolarización de las DP como resultado de cambios en los gradientes electroquímicos de  $\text{K}^+$ . Considerando un flujo de entrada de  $\text{K}^+$  al tegumento del PE de  $4.6 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \text{ min}$  y asumiendo una  $|\text{K}^+|_i$  de 60 mM, se esperaría que un minuto después de modificar de 0 a 5 mM la  $|\text{K}^+|_o$  que baña al PE, la  $|\text{K}^+|_i$  se incrementaría a 64.6 mM (ver Apéndice). Pero este aumento de las  $|\text{K}^+|_i$  y  $|\text{K}^+|_o$  puesto en la ecuación de G-H-K es insuficiente para explicar la hiperpolarización experimentalmente observada. En otras palabras, el componente de la DP sensible a la ouabaína revela la existencia de una bomba de Na-K de carácter electrogénica, la cual es activada por  $\text{K}^+$  externo. La misma puede ser también activada por  $\text{Rb}^+$  o  $\text{Cs}^+$  cuando estos iones reemplazan al  $\text{K}^+$  del baño externo (Skou, 1960, 1965; Hoffman, 1966). Sin embargo, el comportamiento de los iones es diferente. Mientras el  $\text{Rb}^+$  es capaz de reemplazar

casi totalmente la acción del  $K^+$  en el sistema de activación de la bomba, por lo menos en lo que respecta al comportamiento de las DP (Figura 20), el  $Cs^+$  sólo es capaz de reemplazar parcialmente este ión (Tabla 3).

Se estableció también que el efecto máximo que la ouabaína produce sobre las DP es mucho más rápido en PEs ricos en  $Na^+$  que en los PEs frescos (Figura 12 y 13). Esto podría explicarse suponiendo que el enriquecimiento con  $Na^+$  y posterior presencia de  $K^+$  externo activa un mayor número de bombas o bien aumenta el número de intercambio de iones  $Na^+$  y  $K^+$  por bomba, que en las condiciones de los frescos, las que luego son inhibidos por la ouabaína.

#### - Caracterización del componente de las DP ouabaína-insensible

##### a) Sensibilidad de las DP a los cationes monovalentes:

Nuestros estudios sobre el componente de las DP ouabaína-insensible demuestran que está asociado a los gradientes electroquímicos de  $K^+$  y  $Na^+$  externo. En particular, la hiperpolarización de las DP observada a medida que disminuye la  $|K^+|_o$  es del orden de las informadas para otras membranas epiteliales (Zeiske y Van Driessche, 1979) o tegumentarios (Fetterer y col., 1980). El valor de la  $P_K$  de  $6.1 \times 10^{-7}$  cm  $seg^{-1}$  estimado a partir de las mediciones del  $J_{inK}$  y las DP correspondientes se encuentra en el rango hallado para otras preparaciones tales como músculo ( $1.1 \times 10^{-7}$  cm. $seg^{-1}$ , Casteels, 1969;  $7 \times 10^{-7}$  cm  $seg^{-1}$ , Hodgkin y Horowick, 1959).

La disminución de la  $|Na^+|_o$  también produce una hiperpolarización de las DP. Si bien este efecto es común a la mayoría de los epitelios vertebrados (Okada y col., 1975) no lo es para otras membranas tegumentarias tales como Schistosoma mansoni donde en condiciones similares se produce la depolarización de las DP (Fetterer y col., 1980). El análisis



y ajuste de los parámetros de las distintas curvas de las DP en función de las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  (Figuras 17, 18 y 24) permitió estimar que la  $P'_{\text{Na}}$  sería de 0.17 a 0.32. Estos resultados indicarían que las DP respecto de los cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , son fundamentalmente sensibles al  $\text{K}^+$  externo y mucho menos al  $\text{Na}^+$  externo.

Se esperaría entonces que el tegumento del PE se comportara como un electrodo de  $\text{K}^+$  a  $|\text{K}^+|_o$  60 mM. Sin embargo, las pendientes obtenidas están en el rango de 17 a 50 mV/década (Figuras 17 y 18). En otras palabras, en las distintas condiciones experimentales probadas, nunca se logró una pendiente de 58 mV por un cambio de 10 veces en la  $|\text{K}^+|_o$ . Zeiske y Van Driessche (1979) informan una DP con respecto a la  $|\text{K}^+|_o$  de 15,5 a 36 mV/década en piel de rana. Fetterer y col. (1980) encuentran una pendiente de 30 mV/década en el tegumento de tenia adulta de Schistosoma mansoni.

Una posible explicación sería que la barrera que genera la DP no sólo es permeable al  $\text{K}^+$  y al  $\text{Na}^+$  sino también al  $\text{Cl}^-$  y que este ión se distribuye en estado estacionario de acuerdo al tratamiento de G-H-K (ecuación 3). Por consiguiente, la ecuación de Nerst, aún en altas concentraciones de  $\text{K}^+$  externo, no sería válida para los valores de DP hallados.

#### b) Sensibilidad de las DP al $\text{Cl}^-$ externo:

La ausencia de  $\text{Cl}^-$  en el baño externo no produce cambios significativos en los registros de las DP medidas durante 20 minutos. Esta insensibilidad de las DP observada cuando se altera la concentración de  $\text{Cl}^-$  externo, similar a lo que ocurre en tenia adulta de Schistosoma mansoni (Fetterer y col., 1980), podría ser debido a que las membranas tegumentarias del PE poseen a) una suficientemente alta  $P_{\text{Cl}}$  que permite la distribución en equilibrio de este ión en pocos segundos (Hodgkin y Horowick, 1959). o bien

b) una  $P_{Cl}$  baja que impide que la DP sea afectada por la reducción del  $Cl^-$  externo (Steffani y Steinbach, 1969).

Teniendo en cuenta los valores de los parámetros obtenidos por el ajuste de las distintas curvas de DP en función de la concentración de los cationes monovalentes, se observa que la  $|Cl^-|_i$  estimada está en el rango de 6 a 18 mM manteniéndose constante bajo distintas concentraciones de  $K^+$  y de  $Na^+$  externo. Este valor de la  $|Cl^-|_i$  es ligeramente menor al calculado si este ión se distribuyera en equilibrio (ver Apéndice). Por otra parte, la  $P'_{Cl}$  calculada está entre 1 y 1.4 (Tabla 17), lo cual sugeriría que la barrera donde se genera la DP negativa es muy permeable al  $Cl^-$ . Se plantea entonces el problema de explicar cual es la razón por la cual la  $|Cl^-|_i$  no está en equilibrio en la  $|Cl^-|_o$ . Si se considera el volumen del tegumento de  $0.217 \text{ cm}^3/\text{g.ps}$  (ver Apéndice) y la  $|Cl^-|_i$  máxima estimada de 18 mM, se puede calcular un contenido de  $Cl^-$  en el tegumento de  $5.4 \text{ } \mu\text{mol}$  por gramo de peso seco de PEs (ver Apéndice). Reisin y Rotunno (1981) midieron la salida neta de  $ClNa$  del PE en presencia de sacarosa durante 30 minutos e informaron una velocidad de flujo de  $0,67 \text{ } \mu\text{mol}/\text{g.ps min}$  en ese intervalo de tiempo. Si se supone que todo el  $Cl^-$  medido proviene del tegumento, sólo se necesitarían 8 minutos para lavar los  $5,4 \text{ mol}/\text{g.ps}$  calculados anteriormente. Como éste no es el caso, es evidente que el  $Cl^-$  proviene de un compartimiento más profundo del PE, muy posiblemente del espacio extracelular, y que las membranas tegumentarias son muy permeables a este anión. Reisin y Cantiello (1979) aportan evidencias de que la concentración de  $ClNa$  en el espacio extracelular del PE es similar a la del medio de incubación (SRK). De lo expuesto hasta aquí se podría concluir que la insensibilidad de la DP medida cuando se alteró la  $|Cl^-|_o$  sería consecuencia de una tendencia del compartimiento extracelular para alcanzar un estado estacionario con el baño externo, más que con el compar

tamiento tegumentario de manera que no se afectaría la concentración de  $\text{Cl}^-$  en este compartimiento. Esto implicaría que la permeabilidad aparente de  $\text{Cl}^-$  correspondiente a la barrera basal debía ser mayor que la correspondiente a la barrera apical. Si bien este punto no puede ser directamente demostrado, el modelo propuesto permite explicar los resultados experimentales obtenidos.

- Efectos de fármacos, drogas y cationes divalentes sobre el componente de las DP ouabaína insensible.

a) Acción del Amiloride

La membrana apical del tegumento del PE es permeable al  $\text{Na}^+$ , como se ha demostrado por la sensibilidad de las DP a los cambios de la  $|\text{Na}^+|_o$ . Se estudió entonces el efecto del amiloride sobre las DP medidas a través del tegumento del PE. Se sabe que esta droga es un potente inhibidor del transporte de  $\text{Na}^+$  en preparaciones biológicas tales como vejiga de sapo (Bentley, 1980), vesícula biliar de sapo (Balaban y col., 1979), epitelio renal (Sariban-Sohraby y col., 1983).

En nuestra preparación, el amiloride produjo una significativa hiperpolarización de las DP debido a la disminución de la  $P'_{\text{Na}}$ , la cual se calculó de acuerdo a la ecuación 5. Se consideró que en presencia de amiloride existen por lo menos dos componentes de la  $P'_{\text{Na}}$ , uno insensible y otro sensible a esta droga. Como en el ajuste de la curva (Figura 27b) se modificó la  $P'_{\text{Na}}$  y no la  $P'_{\text{Cl}}$  con respecto a sus controles (Tabla 17) es evidente que el amiloride estaría inhibiendo específicamente la  $P_{\text{Na}}$  a través del tegumento del PE. La inhibición de la  $P_{\text{Na}}$  respondería adecuadamente a una cinética no competitiva en una constante aparente de inhibición media de  $5 \times 10^{-8}$  M (ecuación 5). Este valor concuerda con la constante de afinidad del amiloride en piel de rana:  $1.02 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$  (Cuthbert y Shum, 1974)

y con la constante aparente de inhibición media en túbulo cortical aislado:  $7 \times 10^{-8}$  (O'Neil y Boulpaep, 1979) y epitelio renal:  $5 \times 10^{-8}$  (Sarıban-Sahraby y col., 1983).

En todos los experimentos en los cuales se midieron las DP en presencia de amiloride, la máxima concentración usada de este diurético fue de  $10^{-4}$  M. Soltoff y Mandel (1983) informan que el amiloride a concentraciones mayores de  $10^{-3}$  M produce además del efecto diurético por bloqueo de la  $P_{Na}$ , un bloqueo de la bomba de Na/K en túbulo proximal renal de conejo. Sin embargo esta posibilidad puede ser descartada pues las concentraciones de amiloride usadas habitualmente en nuestra preparación ocasionarían una disminución de menos del 5% en la actividad de la bomba de Na/K en túbulo renal (Figura 1c, Soltoff y Mandel, 1983).

En conclusión, el efecto que el amiloride produce sobre las DP sería consecuencia de la inhibición que esta droga ocasiona en la permeabilidad del  $Na^+$  a través del tegumento del PE.

Por otra parte se probó el TAP, bloqueante específico de la entrada de cationes en epitelios de "baja resistencia" (Moreno, 1975; Balaban y col., 1979) y se demostró que las DP no se afectan por la presencia de esta droga. Estos resultados sugerirían que: 1) el TAP, a diferencia del amiloride, es incapaz de bloquear la  $P_{Na}$  y 2) el tegumento del PE, a diferencia de las membranas epiteliales clásicas, no presentaría uniones estrechas como ya observó Morseth y col. (1967) estudiando la morfología del parásito.

#### b) Acción del $Ba^{2+}$

Los resultados experimentales presentados en Resultados demuestran que el  $Ba^{+2}$  tiene un importante efecto depolarizante sobre las DP de las membranas tegumentarias del PE. Este efecto puede ser atribuido a una

disminución de la  $P_K$ . Evidencias en este sentido aportan el ajuste de la curva de  $DP = f |Ba^{+2}|_o$  (Figura 33) donde los parámetros  $P'_{Na}$  y  $P'_{Cl}$  aumentan con la  $|Ba^{+2}|_o$  (ecuaciones 6 y 7). Este aumento puede ser consecuencia de un aumento tanto de la  $P'_{Na}$  como de la  $P'_{Cl}$  o bien una disminución de la  $P_K$ . Este punto pudo ser aclarado cuando se calcularon las  $P_{Rb}$  a partir de la ecuación 4 con los registros de las DP de PEs ricos en  $Na^+$  tratados con ouabaína en presencia y ausencia de 10 mM de  $Ba^{+2}$  en el baño externo y los correspondientes datos de influjos de  $Rb^+$  medidos por Cybel y col. (1984b) en las mismas condiciones experimentales. Se observó que la  $P_{Rb}$  disminuye significativamente en presencia de  $Ba^{+2}$  con respecto a sus controles (24%) (Tabla 15). Por consiguiente, el efecto depolarizante sobre las DP producido por el  $Ba^{+2}$  sería consecuencia directa de la disminución de la  $P_{Rb}$  ( $P_K$ ).

Medición en	$Jin_{Rb}$ μmol/g.s hora	DP mV	$P_{Rb}$ (cm seg <sup>-1</sup> ) x 10 <sup>7</sup>
SRK + ouab. 10 <sup>-4</sup> M	32.9±1.1 (27)	-45±1 (2)	6.8±0.3 (27) *
SRK - 10 mM Ba <sup>+2</sup> + ouab. 10 <sup>-4</sup> M	18.9±1.2 (4)	-24±1 (7)	5.2±0.5 (7) *

\* P < 0.01

TABLA 15

Estas conclusiones se corresponden con el efecto del  $Ba^{+2}$  descrito en músculo esquelético (Werman y col., 1961; Nishi y Soeda, 1964; Sperelakis y col., 1967), axón gigante de calamar (Eaton y Brodwick, 1980) y membranas epiteliales (Van Driessche y Zeiske, 1980; O'Neil, 1983), en las cuales este catión divalente produce la disminución de la conductividad de  $K^+$

por oclusión del canal de  $K^+$ . En las experiencias realizadas en presencia de  $Ba^{+2}$  se observó que el efecto que este ión produce sobre las DP es parcialmente reversible y se manifiesta en un tiempo no mayor de 2 minutos después del traslado del PE a la solución que contiene  $Ba^{+2}$ . Dado que en general la permeabilidad pasiva de las membranas celulares es mucho menor a los cationes divalentes que a los monovalentes, estos resultados sugerirían que en nuestras condiciones experimentales, la acción del  $Ba^{+2}$  sobre la  $P_K$  se ejerce desde la superficie tegumentaria externa. Estudios con microelectrodos, en piel de rana permeable a  $K^+$ , claramente muestran que los iones  $Ba^{+2}$  bloquean los canales de  $K^+$  desde el lado apical (Hirschmann y Nagel, 1978). También Nagel (1978) estableció que los canales de  $K^+$  de la membrana basolateral en piel de rana se bloquean por la presencia del  $Ba^{+2}$  cuando éste se encuentra en la solución serosa.

Por otra parte, si se comparan las  $P'_{Na}$  y  $P'_{Cl}$  obtenidas como parámetros de ajuste (ecuación 6 y 7), se observa que ambas estarían compuestas por lo menos por dos componentes: uno insensible y otro sensible al  $Ba^{+2}$ . Este último componente representaría la acción del  $Ba^{+2}$  sobre la  $P_K$ , la cual estaría de acuerdo con un tipo de inhibición no competitiva. Van Driessche y Zeiske (1980) cuando estudian el efecto de  $Ba^{+2}$  sobre los canales de  $K^+$  de la cara apical de piel de rana en un amplio rango de concentraciones encuentran que el bloqueo de los canales de  $K^+$  es aparentemente competitiva a más altas concentraciones de  $K^+$ . Más aún, estudios realizados en axón gigante de calamar (Armstrong y col., 1982) permitieron analizar la cinética de bloqueo y desbloqueo del mecanismo de depolarización retardada, fenómeno que es consecuencia de la activación y desactivación de canales de  $K^+$  que son inhibibles por el  $Ba^{+2}$ . En estos estudios se estableció que el bloqueo es claramente competitivo. De manera que el modelo de inhibición no competitivo que se postula para el efecto del  $Ba^{+2}$  sobre la

$P_K$  debe ser entendida como una aproximación macroscópica para bajas concentraciones de  $K^+$ . La constante aparente de inhibición media ( $K_{0.5}$ ) obtenida (ecuación 6 y 7) fue de 1 mM, la cual está en concordancia con la constante aparente de disociación Ba-sitio, informada por Cybel y col. (1984b) a partir de las mediciones de flujos de  $K^+$ .

El hecho de que el  $Ba^{+2}$  disminuya la  $P_K$  y en consecuencia depolarize las DP en presencia de  $Ca^{+2}$  externo (Tabla 15) y no produzca efecto alguno sobre la  $P_K$  y las DP (Figura 43a) en ausencia de  $Ca^{+2}$  en el baño externo (Tabla 16), podría explicarse de la siguiente manera, que el  $Ba^{+2}$  bloquee: 1) la  $P_K$  activada a través de un mecanismo muy específico por el  $Ca^{+2}$  interno como ocurre en células cromafines adrenales (Yellen y col., 1984); 2) la  $P_K$  activada por el  $Ca^{+2}$  externo o bien 3) la  $P_K$  pero que el efecto quede enmascarado debido al drástico aumento de la permeabilidad catiónica inespecífica que produce la ausencia de  $Ca^{+2}$  externo. Existen evidencias en favor de esta última posibilidad, es decir que el  $Ba^{+2}$  bloquee la  $P_K$  pero que el fenómeno no puede ser detectado en ausencia de  $Ca^{+2}$  externo.

Medición en	$J_{inRb}$	DP	$P_{Rb}$
	$\mu\text{mol/g.s hora}$	mV	$(\text{cm seg}^{-1}) \times 10^7$
SRK + ouab. $10^{-4}$ M	23.3 $\pm$ 2 (15)	-41 $\pm$ 1 (13)	5.1 $\pm$ 0.5 (15) *
SKR - OCa + ouab. $10^{-4}$ M	28.5 $\pm$ 0.6 (14)	-24 $\pm$ 3 (8)	8.0 $\pm$ 0.5 (14) *
SRK-OCa - 5 mM $Ba^{+2}$ + ouab. $10^{-4}$ M	26.6 $\pm$ 2 (2)	-22 $\pm$ 1 (2)	7.7 $\pm$ 0.7 (2)

\*  $P < 0.001$

TABLA 16

Teniendo en cuenta que el efecto del  $Ba^{+2}$  depende de la DP inicial (Figura 34), es posible sugerir que el  $Ba^{+2}$  afectaría en menor medida a las DP en ausencia de  $Ca^{+2}$  debido a la depolarización que este catión divalente produce sobre las DP. Los cálculos de la  $P_K$  realizados indicarían que el  $Ba^{+2}$  no modifica significativamente la  $P_K$  en ausencia de  $Ca^{+2}$  en el baño externo (Tabla 16). Una posible interpretación de este fenómeno podría ser que la ausencia de  $Ca^{+2}$  externo desenmascara una vía catiónica inespecífica que transportaría  $K^+$  independiente de los otros mecanismos preexistentes como describen Van Driessche y Zeiske (1982) en piel de rana. En consecuencia, la disminución de la  $P_K$  por acción del  $Ba^{+2}$  en ausencia de  $Ca^{+2}$  no podría detectarse por el aumento inespecífico de la permeabilidad tegumentaria. Sin embargo, los resultados obtenidos no descartan la posibilidad que el  $Ba^{+2}$  afecta una  $P_K$  activada por  $Ca^{+2}$  externo. La dilucidación de esta cuestión requerirá futuros estudios. Por otra parte, sí es posible descartar la hipótesis de que el  $Ba^{+2}$  actúe sobre una  $P_K$  activada por  $Ca^{+2}$  interno. En experiencias que se analizarán posteriormente se demuestra que la quinina bloquea la  $P_K$  independiente de la presencia de  $Ca^{+2}$  externo. En consecuencia, la quinina posiblemente estaría actuando sobre una  $P_K$  distinta de la bloqueable por  $Ba^{+2}$ . Como en otras preparaciones biológicas (Armando-Hardy y col, 1975; Lew y Ferreyra, 1978; Burgess, 1981), la quinina bloquea específicamente la  $P_K$  activada por  $Ca^{+2}$  interno, nuestros resultados sugerirían que el  $Ba^{+2}$  no estaría afectando este mecanismo. Hasta aquí entonces podemos considerar que la depolarización de las DP producida por el  $Ba^{+2}$  en presencia de  $Ca^{+2}$  en el baño externo, es específica de este catión divalente, se produce por un mecanismo independiente de la bomba Na/K y de la  $P_{Na}$ , lo cual sugiere que el  $Ba^{+2}$  actúa sobre un mecanismo específico de la  $P_K$ .

Respecto del mecanismo por el cual el  $Ba^{+2}$  bloquea la  $P_K$  ( $P_{Rb}$ ) se han



propuesto modelos para explicar su acción, teniendo en cuenta el efecto del  $Ba^{+2}$  sobre canales de  $K^+$  en otras preparaciones como axón gigante de calamar (Armstrong y col., 1982). La interpretación más plausible se basa en el hecho de que el  $Ba^{+2}$  posee un radio cristalino similar al  $K^+$  pero está doblemente cargado por lo que la energía de interacción entre el  $Ba^{+2}$  y los sitios electronegativos de los canales es más intensa que la correspondiente a la interacción  $K^+$ -sitio. En favor de este mecanismo están los experimentos de Armstrong y Taylor (1980). En las membranas tegumentarias del PE, el  $Ba^{+2}$  parecería actuar como un inhibidor no competitivo del movimiento de  $K^+$  y esto se puede explicar porque las experiencias se realizaron a bajas  $|K^+|_o$ , rango en el cual Van Driessche y Zeiske (1980), por ejemplo obtienen una cinética no competitiva.

### c) Acción de quinina

Los estudios realizados en PEs en presencia de quinina demostraron que la depolarización de las DP observadas serían consecuencia de la disminución de la  $P_K$ . La quinina en preparaciones como glóbulo rojo bloquea específicamente la conductancia del  $K^+$  activada por  $Ca^{+2}$  (Armando-Hardy y col., 1975; Reichstein y Rothstein, 1981). En células excitables, además de la corriente de  $K^+$  activada por  $Ca^{+2}$ , bloquea la corriente de rectificación retardada de  $K^+$  activada por voltaje y la corriente de entrada rápidas de  $Na^+$  y lenta de  $Ca^{+2}$  (Herman y Gorman, 1984; Yeh y Narahashi, 1976). En consecuencia, los resultados obtenidos en presencia de quinina en el tegumento del PE, el cual se comporta de manera similar a otros sincicios eléctricamente no excitables (Fetterer y col., 1980), sugieren que la fracción de la  $P_K$  sensible a esta droga tendría similares características que las descritas en glóbulo rojo. De esta manera existiría en

el PE una  $P_K$  activada por  $Ca^{+2}$ . El efecto de la quinina sobre una fracción de la  $P_K$  es independiente de la presencia de  $Ca^{+2}$  en el baño externo (Tabla 11). Por consiguiente, la quinina estaría actuando sobre un mecanismo que es activado por el  $Ca^{+2}$  interno y que intervendría en la regulación de la  $P_K$  como sucede en glóbulo rojo (Sze y Solomon, 1979).

d) Efecto del  $Ca^{+2}$  y otros cationes divalentes.

Las experiencias expuestas en Resultados demostraron que la depolarización de las DP negativas y aparición de las DP positivas producidas por la ausencia de  $Ca^{+2}$  en el baño externo es: a) específica de este catión divalente; b) sensible y c) tiene lugar tanto en ausencia como en presencia de ouabaína, amiloride,  $Ba^{+2}$  y quinina. De manera que el efecto de la ausencia de  $Ca^{+2}$  sobre las DP no se puede atribuir a modificaciones de la  $P_K$  bloqueable por  $Ba^{+2}$  o quinina o a cambios en la  $P_{Na}$  amiloride sensible. Una plausible interpretación para este fenómeno sería que este mecanismo es independiente de la bomba Na/K, de la  $P_{Na}$  amiloride sensible y de la  $P_K$   $Ba^{+2}$  sensible o quinina sensible. El ajuste de la curva experimental que se muestra en la Figura 45b sugeriría que la ausencia de  $Ca^{+2}$  externo produce un aumento de la permeabilidad catiónica inespecífica. Los datos obtenidos del ajuste de las ecuaciones 8 y 9 -en un rango de 0.05 a 2.5 mM de la  $|Ca^{+2}|_o$ - indicarían que mientras la  $P'_{Cl}$  disminuye con el aumento de la  $|Ca^{+2}|_o$ , la  $P'_{Na}$  aumenta, de manera inversa el cuadrado de la  $|Ca^{+2}|_o$ . Si bien el significado físico de esta relación no es claro, la forma como se modifican las permeabilidades relativas de  $Na^+$  y de  $Cl^-$  pueden explicarse sólo si se considera que las  $P_{Na}$  y  $P_K$  aumentan cuando disminuye la  $|Ca^{+2}|_o$ . Más aún, los cálculos de las  $P_{Rb}$  realizados a partir de las mediciones de flujos de  $Rb^+$  y las DP correspondientes en soluciones con y

sin  $\text{Ca}^{+2}$  (Tabla 11) demuestran que la  $P_K$  ( $P_{\text{Rb}}$ ) aumenta significativamente en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo respecto de los controles.

La existencia de una permeabilidad selectiva a cationes que sólo conducen en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el baño externo fue descrita por Van Driessche y Zeiske (1982) para la membrana apical de piel de rana donde estos autores establecieron, mediante la técnica de medición de corriente de cortocircuito y sus fluctuaciones, que si todo el  $\text{Ca}^{+2}$  es removido de la solución externa o mucosa o bien si la concentración de  $\text{H}^+$  intracelular es reducida se desenmascaran canales selectivos a cationes que conducen en paralelo con los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles al amiloride.

Las evidencias mencionadas respecto de que la depolarización de las DP negativas observadas en PEs suspendidos en soluciones libres de  $\text{Ca}^{+2}$  son debido a un aumento de la permeabilidad selectiva a cationes, no descarta la posibilidad de que el  $\text{Ca}^{+2}$  externo intervenga en otros mecanismos tales como la  $P_K$  inhibible por quinina o la  $P_K$  inhibible por  $\text{Ba}^{+2}$ . En ambos casos la disminución de la  $|\text{Ca}^{+2}|_o$  ocasionaría una reducción de la  $P_K$  la cual podría no ser detectada debido al aumento de la permeabilidad catiónica en general. Sin embargo, el hecho de que la quinina disminuye la  $P_K$  ya sea en presencia como en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo (Tabla 11) indicaría que este ión divalente no está directamente relacionado con la  $P_K$  quinina-sensible. Por otra parte en lo que concierne al  $\text{Ba}^{+2}$ , los cálculos de  $P_K$  demuestran que sólo en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el baño externo, el  $\text{Ba}^{+2}$  produce la disminución de la  $P_K$  (Tabla 15). Estos resultados pueden indicar que la  $P_K$  sensible al  $\text{Ba}^{+2}$  estaría afectada de alguna manera por el  $\text{Ca}^{+2}$  externo. Teniendo en cuenta lo expuesto hasta aquí es posible sugerir que en PEs suspendidos en soluciones libres de  $\text{Ca}^{+2}$ , el aumento de la permeabilidad catiónica correspondería a un desbloqueo de canales específicos para cationes monovalentes que conduciría  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$  indistintamente,

los cuales en condiciones control estarían inhibidos por el  $\text{Ca}^{+2}$  externo. Estos canales serían independientes de aquellos que transportan específicamente  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  y que se describieron más arriba.

El otro aspecto que establecimos al explicar las experiencias en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo es la mayor frecuencia de aparición de las DP positivas, que alcanzan en algunos casos valores de hasta +30 mV. Como ya se analizó en Resultados, existen evidencias en favor de que las DP positivas se originarían en la membrana basal del tegumento. Si esto fuese así, en soluciones libres de  $\text{Ca}^{+2}$ , se afectaría tanto la barrera apical como la basal del tegumento. Estos resultados podrían interpretarse que como consecuencia del aumento de la permeabilidad catiónica que produce la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en la membrana apical (57%), se alteran las concentraciones intrategumentarias de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Teniendo en cuenta que la DP negativa se depolariza en esta condición experimental, es evidente que la entrada de  $\text{Na}^+$  al tegumento es mayor que la salida de  $\text{K}^+$ , posiblemente por que los canales catiónicos descritos más arriba poseen una mayor selectividad para el  $\text{Na}^+$  que para el  $\text{K}^+$ . El aumento de la concentración interna de  $\text{Na}^+$  puede llevar a la activación de los mecanismos de transporte situados en la membrana basal, las que tenderían a reestablecer niveles de  $\text{Na}^+$  tegumentarios más bajos. Además, esta interpretación fue reforzada por la observación de que las DP positivas, medidas en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo, desaparecen a  $|\text{Na}^+|_o > 10 \text{ mM}$  (Figura 46), y que por otra parte se detectan con más frecuencia deflexiones positivas en PEs ricos en  $\text{Na}^+$ . Estas observaciones, si bien indirectas, pues no se puede establecer la concentración de  $\text{Na}^+$  intrategumentario, constituyen datos en favor de que el aumento de la concentración de  $\text{Na}^+$  tegumentario estaría involucrado en el potencial eléctrico de la barrera basal. Un mecanismo plausible sería la existencia de una bomba Na/K situada en la membrana basal tegumentaria, la cual sería

activada por el  $\text{Na}^+$  intrategumentario. Esta hipótesis concuerda con lo informado por Ussing y Zerahn (1951) respecto a la existencia de un transporte activo de  $\text{Na}^+$  a través de la cara interna de piel de rana. Establecieron de manera general las propiedades epiteliales de la membrana basal, la cual estaría asociada a la actividad de una ATPasa (Farquhan y Palade, 1964). Esta actividad fue relacionada al transporte activo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  por Skou (1960). Bonting y col. (1962) demostraron la presencia de una ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en homogenato de piel de rana.

Se puede resumir lo expuesto al decir que el mecanismo propuesto para explicar los fenómenos observados en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el baño externo es que se desenmascara un camino conductivo a cationes monovalente que ocasionaría un aumento de la concentración de  $\text{Na}^+$  tegumentaria. En consecuencia, se produciría una depolarización de las DP negativas y aparición de las DP positivas.

Para finalizar, de los resultados experimentales a los que se analizó el comportamiento de las DP respecto de la concentración de iones monovalentes, efecto de inhibidores y drogas, acción de cationes divalentes, nos permitió sugerir un mínimo circuito eléctrico análogo para representar las propiedades eléctricas pasivas del tegumento. Las DP negativas que corresponderían a la membrana apical y cuyo valor es de  $-51 \pm 1$  mV (168) tendría al menos dos componentes. Uno ouabaína-sensible que se atribuye al transporte activo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y otros ouabaína-insensible que representaría el movimiento pasivo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Figura 54a).

El transporte activo se debe a la existencia de una bomba Na/K de carácter electrogénica. El transporte pasivo (mecanismo electrodifusivo) estaría integrado por lo menos por los siguientes componentes de permeabilidades: permeabilidad pasiva de: a)  $\text{K}^+$ ; b)  $\text{Na}^+$ ; c)  $\text{Cl}^-$  y d) cationes

monovalentes (Figura 54a). El componente de permeabilidad de  $K^+$  sería en parte inhibida por el  $Ba^{+2}$ , otra inhibida por quinina y un tercer componente residual o de pérdida (leak de  $K^+$ ). El componente de permeabilidad de  $Na^+$  sería en parte bloqueado por amiloride y finalmente el componente sensible a cationes monovalentes sería inhibido por concentraciones mayor de 0.3 mM de  $Ca^{+2}$  externo.

La bomba Na/K se esquematizó eléctricamente mediante un generador y los componentes pasivos mediante la resistencia ( $R_I$ ) y fuerza electromotriz ( $E_I$ ) correspondiente a cada uno de los iones (I) involucrados (Figura 54b).

Por otra parte, las DP positivas medidas en ausencia de  $Ca^{+2}$  externo, se atribuyen a la membrana basal tegumentaria (segunda barrera) y serían independientes de las DP negativas. Los mecanismos que originan las DP positivas no lo establecimos aún. Sin embargo, evidencias indirectas sugerirían la existencia de una bomba Na/K activada por  $Na^+$  interno, ubicada en la membrana basal del tegumento (Figura 54a).

#### e) Efecto de inmunoglobulinas del suero de paciente hidatídico

Los sueros de los huéspedes intermediarios afectados de hidatidosis, entre los cuales se encuentra el hombre, poseen inmunoglobulinas (Igs) específicas circulantes (Caprón y col., 1967). Nos interesó entonces tratar de establecer posibles interacciones inmunológicas humorales de un suero de paciente hidatídico (SPH) con PEs cultivados "in vitro". Concretamente determinar que factor o factores inmunitarios plasmáticos presentan actividad escolicida (Kassis y col., 1976) y si el complemento "per se" o anticuerpos específicos individuales ya sea el termoestable o el termolábil (Yarzabal y col., 1977) es el responsable de este fenómeno.

La importancia de estos estudios radica en que sería posible determinar

si las Igs de SPH intervienen de alguna manera en los mecanismos de transporte involucrados en la evolución y formación del quiste hidatídico. Además se podría explicar un fenómeno conocido desde hace muchos años, el cual consiste en que ratones inoculados intraperitonealmente con 1000 o 2000 protoescólices, al cabo de nueve meses habitualmente desarrollan entre 20 y 40 quistes peritoneales.

En Resultados se muestran las experiencias realizadas en presencia de SPH. La incubación de las PEs con el SPH de acuerdo a la técnica de inmunofluorescencia indirecta mostró la localización de Igs distribuídas uniformemente sobre la superficie de los PEs. Las Igs serían: a) específicas ya que no se detectan en aquellos PEs incubados con suero de individuos normales, usados como control y b) termoestables pues estaban presentes también en los PEs en contacto con SPH inactivado a 56°C durante 30 minutos (Figura 52).

Las observaciones están en concordancia con lo informado por Ali-Khan (1974a), quien encuentra que, en ratones hidatídicos, se produce un aumento de anticuerpos específicos durante el curso de la infección. Ali-Khan y Siboo (1981) detectan anticuerpos de alta y baja afinidad como así también presencia de complemento sobre la superficie de los quistes de ratones inoculados con Echinococcus multilocularis. Por otra parte, mediciones de las DP realizadas en presencia de SPH (dil. 1:3200) mostraron una rápida e irreversible depolarización con respecto a sus controles (Figura 53), no detectándose alteraciones de las DP en PEs suspendidos en SPH inactivado o suero humano normal a la misma dilución. Más aún los cálculos de las  $P_{Rb}$  ( $P_K$ ) indicarían que los cambios de las DP observadas y el significativo aumento de la  $P_{Rb}$  en PEs incubados con SPH total (dil. 1:3200), serían consecuencia de alteraciones tempranas de la permeabilidad en general de las membranas tegumentarias del PE como ocurre en Taenia

Taeniaformis en su estadio larval (Murrell, 1971). En otras palabras, las Igs específicas en combinación con el complemento producirían modificaciones de los mecanismos de transporte del parásito. Los resultados encontrados descartan la posibilidad de que el complemento "per se" ocasionara alteraciones sobre el tegumento similares a las descritas por Kassis y col. (1976) en PEs de Echinococcus multilocularis. Si bien no se conoce con exactitud el rol antiparasitario asociado a estas Igs, se sabe que anticuerpos específicos IgG<sub>1</sub> sólo (Musoke y Williams, 1975) o IgG<sub>1</sub> en composición con IgG<sub>2a</sub> (Mitchell y col., 1980) confieren protección a ratones contra el estadio larval de la Taenia Taeniaeformis, pero también se ha postulado que la IgG<sub>1</sub> de ratón se une al Mesocestoides corti y bloquea los mecanismos de defensa del huésped (Mitchell y col., 1977). Sin embargo en PEs de Echinococcus granulosus mantenidos en cultivo fue posible demostrar que el SPH produce una notable acción escolicida en menos de tres horas (experiencias no mostradas en esta tesis) (Ibarra y col., 1984). En consecuencia, se concluye que existirían inmunoproteínas del SPH, capaces de producir alteraciones en la permeabilidad del tegumento del PE en presencia de complemento.



- CONCLUSIONES FINALES

El objetivo de mi tesis es el de establecer de qué manera, a través de qué mecanismos y a cuáles estructuras se asocian las DP medidas en el organismo larval del Echinococcus granulosus. La caracterización de estos sistemas de transporte es un aspecto fundamental para entender los mecanismos que intervienen en la evolución y formación del quiste hidatídico secundario. Este proceso es el resultado de una lenta, sostenida y progresiva acumulación de agua y ClNa en el interior de un saco derivado del tegumento del parásito (Devé, 1946; Smith y col., 1967; Reisin y Cantiello, 1979; Reisin y col., 1981). El análisis de los estudios de las DP realizados a partir de los empalmientos de los PEs de Echinococcus granulosus mediante microelectrodos sugeriría que las DP negativas se originarían por la presencia de la membrana apical tegumentaria (barrera más externa). Los sistemas de transporte que intervendrían en el mantenimiento de las DP negativas serían: a) el componente electrogénico del transporte activo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  sensible a la ouabaína; b) el mecanismo de difusión pasiva de  $\text{K}^+$  cuya permeabilidad puede ser inhibida en un 24% por la presencia de  $\text{Ba}^{+2}$  y en un 37% por la presencia de quinina. De esta manera, la barrera externa tiene una permeabilidad al K de  $(6.1 \pm 0.5) \times 10^{-7} \text{ cm seg}^{-1}$  parcialmente bloqueable por  $\text{Ba}^{+2}$  o por quinina. En este último caso, el mecanismo de inhibición actuaría sobre un componente de  $P_K$  activado por  $\text{Ca}^{+2}$  interno; c) un transporte pasivo de  $\text{Na}^+$  cuya permeabilidad relativa ( $P'_{\text{Na}}$ ) fue de 0.32. Esta  $P'_{\text{Na}}$  total sería en un 44% inhibido por la presencia del amiloride ( $10^{-4} \text{ M}$ ); d) el movimiento pasivo de  $\text{Cl}^-$ , ión altamente permeable cuya permeabilidad relativa respecto al  $\text{K}^+$  se estimó en 1.3; e) un transporte pasivo de cationes monovalentes que sólo se manifiesta en soluciones libres de  $\text{Ca}^{+2}$ , el cual no puede ser reemplazado por otros cationes

divalentes. En ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo, el aumento de la  $P_{\text{Rb}}$  ( $P_{\text{K}}$ ) es del 57%. Como paralelamente se observa una depolarización de las DP, es evidente que la permeabilidad de  $\text{Na}^{+}$  debería aumentar más que la del  $\text{K}^{+}$ . En consecuencia, la selectividad de esta vía sería mayor para el  $\text{Na}^{+}$  que para el  $\text{K}^{+}$ .

Respecto de las DP que se originan en una barrera más profunda, posiblemente la membrana basal del tegumento, sus propiedades y mecanismos nos son prácticamente desconocidos hasta el presente. Por lo analizado en la Discusión, el valor de aproximadamente +20 mV medidos en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo, podría interpretarse como consecuencia del componente electrogénico de bombas Na/K situadas en la membrana basal del tegumento del PE. Sin embargo, un análisis directo y detallado respecto de la segunda barrera de potencial eléctrico serían necesarios para dilucidar los sistemas de transporte de esta última membrana como la efectuada para caracterizar la barrera más externa.

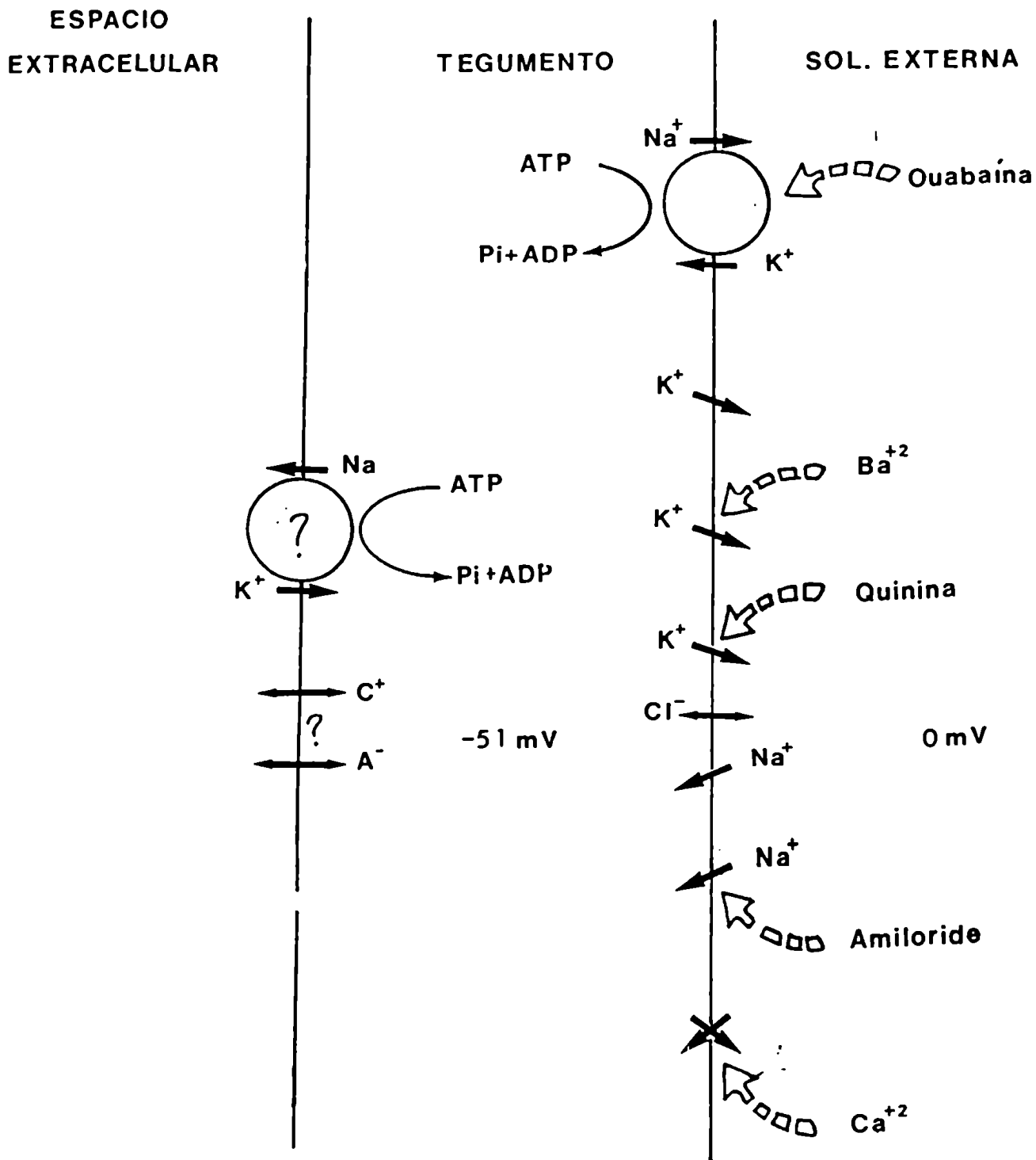
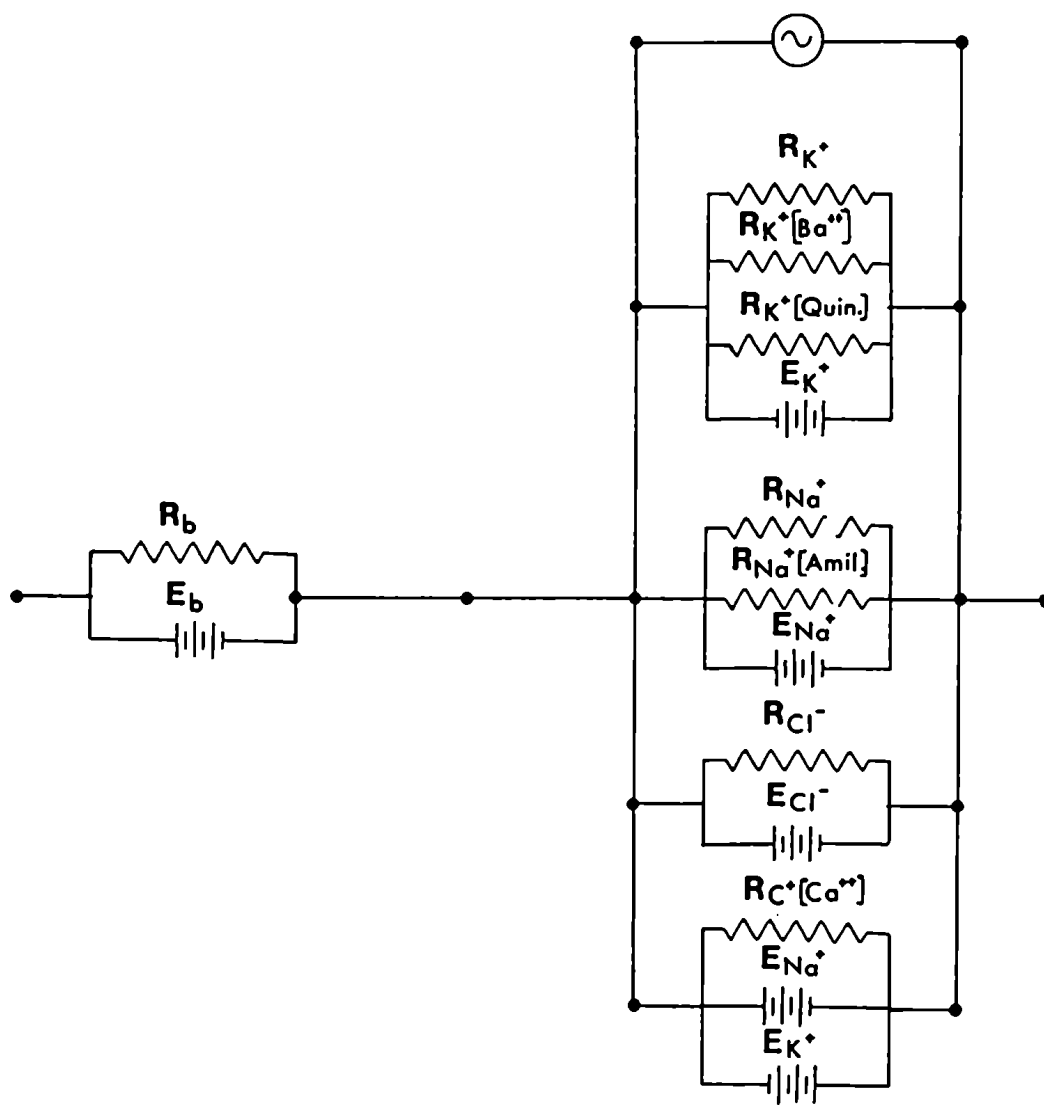


FIGURA 54a: Esquema de los flujos iónicos asociados a las DP de las membranas del tegumento sincicial.



**FIGURA 54b:** Modelo eléctrico de los distintos componentes que contribuirían a las DP originadas a través del tegumento del PE.

## APENDICE

### Volumen del tegumento del PE

Reisin y Cantiello (1979) de una serie de mediciones realizadas en PEs suspendidos en SRK, establecieron que en promedio un PE posee un diámetro mayor de  $170 \times 10^{-4}$  cm y un diámetro menor de  $113 \times 10^{-4}$  cm. Los autores asimilaron la forma de un PE invaginado a la de una elipse de revolución prolato y calcularon el volumen de un PE de la siguiente relación:

$$V_p = \frac{4}{3} a^2 b \quad \text{donde } a \text{ es el semieje menor y } b \text{ es el semieje mayor}$$

De esta manera informan que en promedio un PE tiene un volumen de  $1.137 \times 10^{-6} \text{ cm}^3$ .

En base a estos resultados es posible calcular el volumen del tegumento como la diferencia entre el volumen de un PE y el volumen hipotético que ocuparía el mismo PE sin la presencia del tegumento. Para calcular este último volumen se supuso un espesor de tegumento de  $3 \mu\text{m}$  y éste se restó a ambos diámetros del PE. Luego se aplicó la relación anterior obteniéndose un valor de  $0.983 \times 10^{-6} \text{ cm}^3$ . En consecuencia el

$$V_{\text{teg}} = (1.137 - 0.983) \times 10^{-6} \text{ cm}^3 = 0.154 \times 10^{-6} \text{ cm}^3$$

A continuación se obtuvo el volumen tegumentario por g.ps de la siguiente manera:

$$V_{\text{teg}} = 0.154 \times 10^{-6} \frac{\text{cm}^3}{\text{PE}} \times 879507 \frac{\text{PEs}}{\text{cm}^3} \times 1.602 \frac{\text{cm}^3}{\text{gps}} = 0.217 \frac{\text{cm}^3}{\text{gps}}$$

### Concentración tegumentaria de Cl<sup>-</sup>

Si se considera que el Cl<sup>-</sup> tegumentario se distribuye en equilibrio con respecto al baño externo, la concentración tegumentaria de Cl<sup>-</sup> se puede calcular a partir de la ecuación de Nerst donde:

$$DP = \frac{RT}{F} \ln \frac{|Cl^-|_i}{|Cl^-|_o} \quad \text{y} \quad |Cl^-|_i = |Cl^-|_o e^{\frac{DP \times F}{RT}}$$

Para una DP de -51 mV medida en PEs suspendidos en SRT que corresponde a una  $|Cl^-|_o$  de 162 mM, se calculó que la  $|Cl^-|_i$  sería de 24 mM si este ión se distribuyera en equilibrio con el medio externo.

### Contenido de Cl<sup>-</sup> en el tegumento

De los resultados obtenidos respecto a la concentración tegumentaria de Cl<sup>-</sup> ya sea que este ión se encuentre en estado estacionario (Tabla 17) o en equilibrio, se estima que como máximo la  $|Cl^-|_i$  alcanzaría un valor de 25 mM en PEs controles. Conociendo el volumen tegumentario es posible calcular el contenido de Cl<sup>-</sup> en este compartimiento de la siguiente manera:

$$Cl^-_{\text{teg}} = 25 \frac{\mu\text{mol}}{\text{cm}^3} \times 0.217 \frac{\text{cm}^3}{\text{g.p.s.}} = 5.4 \mu\text{mol/g.p.s.}$$

### Estimación de las DP como resultado de cambios en los gradientes electroquímicos de potasio

Reisin y Cantiello (1980) informan en PEs ricos en Na<sup>+</sup> en condiciones control un influjo de K<sup>+</sup> de 60 μmol/g.p.s. hora. Si se supone que el  $J_{inK}$  corresponde a la entrada neta de K<sup>+</sup> al PE, se puede calcular el aumento de la concentración tegumentaria de K<sup>+</sup> ( $\Delta |K^+|_i$ ) que se produce en un minuto como consecuencia del gradiente electroquímico de K<sup>+</sup>.

$$\Delta |K^+|_i = 60 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g.p.s. hora}} \frac{1 \text{ mmol}}{1000 \mu\text{mol}} \frac{1 \text{ hora}}{60 \text{ min}} \frac{1 \text{ gps}}{0.217 \text{ cm}^3} 1000 \frac{\text{cm}^3}{\text{lt}} = 4.6 \frac{\text{mM}}{\text{min}}$$

Si se considera que un PE rico en  $\text{Na}^+$  posee una  $|K^+|_i$  de 60 mM, un minuto después del traslado del mismo de una solución libre de  $K^+$  a otra que contiene 5 mM de  $K^+$  en el baño externo, la  $|K^+|_i$  incrementaría a 64.6 mM.

Estos datos puestos en la ecuación de G-H-K permitieron calcular las DP antes y después de un minuto de producido el cambio del PE de 0 a 5 mM de  $K^+$  externo obteniéndose como resultado que las DP no se modifican significativamente.

*Stanes*

*Stanes*

## BIBLIOGRAFIA

- Adrian, R.H. y Slayman, C.L. 1966 Membrane potential and conductance during transport of sodium, potassium and rubidium in frog muscle, J. Physiol. 184: 970-1014
- Agosin, M. y Repetto, Y. 1963 Studies on the metabolism of Echinococcus granulosus VIII. Reactions of the tricarboxylic acid cycle in Echinococcus granulosus scolices. Comparative Biochem. and Physiol. 8: 245-261
- Ali-Khan, Z. 1974 Host-parasite relationship in echinococcosis. I. Parasite biomass and antibody response in three strains of inbred mice against graded doses of Echinococcus multilocularis cysts. J. of Parasitol. 60: 231-235
- Ali-Khan, Z. y Siboo, R. 1981 Echinococcus multilocularis: distribution and persistence of specific host immunoglobulins cyst. Exp. Parasitol. 51: 159-168
- Armando-Hardy, M.; Ellory, J.C.; Ferreira, H.G.; Fleminger, S. y Lew, V.L. 1975 Inhibition of the calcium-induced increase in the potassium permeability of human red blood cells by quinine. J. Physiol. (London) 250: 32P



- Armstrong, C.M.; Swenson, R.P. y Taylor, S.R. 1982 Blocking of squid axon K channels by internally and externally applied barium ions. J. Gen. Physiol. 80: 664-681
- Armstrong, C.M. y Taylor, S.R. 1980 Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. Biophys. J. 30: 473-488
- Balaban, R.S.; Mandel, L.J. y Benos, D.J. 1979 On the cross-reactivity of amiloride and 2, 4, 6, triaminopyrimidine (TAP) for the cellular entry and tight junctional cation permeation pathways in epithelia. J. Mem. Biol. 49: 363-390
- Benos, D.J.; Simon, S.A.; Mandel, L.J.; Cala, P.M. 1976 Effect of amiloride and some of its analogues on cation transport in isolated frog skin and thin lipid membranes. J. Gen. Physiol. 68: 43
- Bentley, P.J. 1968 Amiloride: a potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. J. Physiol. 195: 317-330
- Bonting, S.L.; Caravaggio, L.L. y Hawkins, N.M. 1962 Studies on sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase. IV. Correlation with cation transport sensitive to cardiac glycosides. Arch. Biochem. Biophys. 98: 413-419
- Burgess, G.M.; Claret, M. y Jenkinson, D.H. 1981 Effects of quinine and apamin on the calcium-dependent potassium permeability of mammalian hepatocytes and red cells. J. Physiol. 317: 67-90
- Cantiello, H.F.; Ibarra, C.A. y Reisin, I.L. 1980 Flujos de  $K^+$  y potenciales eléctricos a través de las membranas del Echinococcus granulosus incubado "in vitro". IX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, Bermejo, Mendoza.
- Cantiello, H.F. y Reisin, I.L. 1982 Transporte activo de  $K^+$  y sitios de alta afinidad a la ouabaína en el tegumento del protoescólex (PE) de Echinococcus granulosus, su ausencia en el quiste hidatídico (Q.H.) XVIII Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y XI Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Biofísica, Córdoba, Argentina

- Caprón, A.; Vernes, A. y Biguet, J. 1967 Le diagnostic immunoelectrophoretique de l'hydatidose. Pages 27-40 in "Le kiste hydatique du foie" (Journées Lyonnaises d'Hydatidologie) SIMEP Ed. Lyon.
- Casteels, R. 1969 Calculation of the membrane potential in smooth muscle cells of the guinea-pig's Taenia coli by the Goldman equation. J. Physiol. 205: 193-208
- Civan, M.M.; Kedem, O. y Leaf, A. 1965 Effect of vasopressin on the electrical potential of the toad bladder under conditions of zero net Na transport. Fed. Proc. 24: 588
- Claret, M. y Mazet, J.L. 1972 Ionic fluxes and permeabilities of cell membranes in rat liver. J. Physiol. 223: 279-295
- Coltorti, E.A. y Varela Diaz, V.M. 1974 Echinococcus granulosus: penetration of macromolecules and their localization on the parasite membranes of cyts. Exp. Parasitol. 35: 225-231
- Connie, S.; Bricker, R.; Pax, A. y Bennett, J.L. 1982 Microelectrode studies of the tegument and sub-tegumental compartments of male Schistosoma mansoni: anatomical location of sources of electrical potentials. Parasitology 85: 149-161
- Cortelezzi, E. 1938 Parasitología animal. Los protozoarios y vermes parásitos. Ed. Olivieri y Dominguez. La Plata.
- Cuthbert, A.W. y Schum, W.K. 1974 Binding of amiloride to sodium channels in frog skin. Mol. Pharmacol. 10: 880-891
- Cybel, B.L.; Ibarra, C.A. y Reisin, I.L. 1984a Effect of  $Ca^{2+}$  on the electrical potentials of the syncytial tegument of the Echinococcus granulosus protoscolex (PE). IV Pan-American Biochemistry Congress, Buenos Aires, Argentina
- Cybel, B.L.; Ibarra, C.A. y Reisin, I.L. 1984b Effect of  $Ba^{2+}$  on the  $Rb^{+}$  o  $K^{+}$  permeability across the tegument of Echinococcus granulosus protoscolex (PE) IV Pan-American Biochemistry Congress, Buenos Aires, Argentina

- Chandler, A.C. y Read, C.P. 1965 Introducción a la Parasitología.  
Ed. Omega, Barcelona
- Devè, F. 1946 L'echinococcose secondaire. Masson et cie y Paul Deve,  
Paris.
- Eaton, D.C. y Brodwick, M.S. 1980 Effect of barium on the potassium  
conductance of squid axon. J. Gen. Physiol. 75: 727-750
- Farquhar, M.G. y Palade, G.E. 1964 Functional organization of amphibian  
skin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51: 569-577
- Fetterer, R.A.; Pax, R.A. y Bennett, J.L. 1980 Schistosoma mansoni:  
characterization of the electrical potential from the tegument of adult  
males. Exp. Parasitol. 49: 353-365
- Fetterer, R.H.; Pax, R.A.; Strand, S. y Bennett, J.L. 1978 Schistosoma  
mansoni: physical and chemical factors affecting the adult male musculature.  
Exp. Parasitol. 46: 59-71
- Finn, A.L. 1973 Ouabain-dependent potassium-potassium exchange in the  
toad bladder. J. Mem. Biol. 12: 301-315
- Frankenhaeuser, B. y Hodgkin, A.L. 1957 The action of calcium on the  
electrical properties of squid axons. J. Physiol. 137: 218-244
- Frömter, E. 1972 The route of passive ion movement through the epithelium  
of Necturus gall bladder. J. Mem. Biol. 8: 259-301
- Frömter, E. y Diamond, J. 1972 Route of passive ion permeation in  
epithelia. Nature New Biology 235: 9-13
- Gardos, G. 1956 The permeability of human erythrocytes to potassium.  
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 10: 185
- Garrahan, P.J. y Glynn, I.M. 1967 The behaviour of the sodium pump in  
red cells in the absence of external potassium. J. Physiol. 192: 159-174
- Giebisch, G.; Klose, R.M.; Malnic, G.; Sullivan, W.J. y Windhager, E.E.  
1964 Sodium movement across single perfused proximal tubules of rat  
kidneys. J. Gen. Physiol. 47: 1175-1194

- Gilbert, 1971 Biophysics and Physiology of excitable membrane. 339-378, W. Adelman Ed.
- Glinn, I.M. 1956 Sodium and potassium movements in human red cells. J. Physiol. 134: 278-310
- Goldman, D.E. 1943 Potential, impedance and rectification in membranes J. Gen. Physiol. 27: 37-60
- Greenway, D.F. 1952 Zooparásitos y Zooparasitosis humanas. Universidad de Córdoba, Octava Ed., Córdoba
- Grinstein, S. y Erlij, D. 1978 Intracellular calcium and the regulation of sodium transport in the frog skin. Proc. R. Soc. Lond.B 202: 353-360
- Harris, J.E. 1941 The influence of the metabolism of human erythrocytes on their potassium content. J. Biol. Chem. 141: 579-595
- Herman, A. y Gorman, L.F. 1984 Action of quinine on ionic currents of molluscan pacemaker neurons. J. Gen. Physiol. 83: 919-940
- Hille, B.; Wodhull, A.M. y Shapiro, B.I. 1975 Negative surface charge near sodium channels of nerve, divalent ions, monovalent ions, and pH. Phyllos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 270: 301-318
- Hillyard, S.D.; Zeiske, W. y Van Driessche, W. 1982 A fluctuation analysis study of the development of amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  transport in the skin of larval bullfrogs (*Rana Catesbeiana*). Biochim. Biophys. Acta 692: 455-461
- Hirschmann, W. y Nagel, W. 1978 The outer membrane of frog skin: impermeable to  $\text{K}^+$ ? Pfluegers Arch. 373: R48
- Hodgkin, A.L. y Horowitz, P. 1959 The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. J. Physiol. 148: 127-160
- Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. 1952 Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol. 116: 449-472

- Hodgkin, A.L. y Katz, B. 1949 The effect of sodium on the electrical activity of the giant axon of the squid. J. Physiol. 108: 37-77
- Hoffman, J.F. 1966 The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. Amer. J. Med. 41: 666
- Hoffman, J.F. 1969 Invited discussion: the interaction between tritiated ouabain and the Na-K pump in red blood cells. J. Gen. Physiol. 54: 343-353
- Ibarra, C.A.; Cybel, B.L.; Cantiello, H.F. y Reisin, I.L. 1984 Acción del Mebendazol sobre el estadio larval del Echinococcus granulosus estudiado "in vitro". XXIX Reunión Sociedad Argentina de Investigaciones Clínicas. Mar del Plata, Argentina.
- Kassis, A.I.; Gob, S.L. y Tanner, C.E. 1976 Lesion induced by complement "in vitro" on the protoscolex of Echinococcus multilocularis: a study by electron microscopy. Exp. J. Parasitol. 6: 199-211
- Kedem, O. 1960 Criteria of active transport. Membrane transport and metabolism. Proc. of a Symp. Praga, August 22-27, Ac. Press
- Kilejian, A. 1966 Permeation of L-proline in the cestode. Hymenolepis diminuta. J. of Parasitol. 52 N° 6: 1108-1115
- Lee, D. 1966 The structure and composition of the helminth cuticle. Parasitol. 4: 187-254
- Lew, V.L. 1971 On the ATP dependence of the  $Ca^{2+}$ -induced increase in  $K^+$  permeability observed in human red cells. Biochim. Biophys. Acta 233: 827-830
- Lew, V.L. y Ferreira, H.G. 1976 Variable Ca-sensitivity of a K selective channel in intact red cell membranes. Nature (London) 263: 336-338
- Lew, V.L. y Ferreira, H.G. 1978 Calcium transport and the properties of a calcium-activated potassium channels in red cell membrane. In: Current Topics Membranes and Transport 10: 217-277

- Li, J.H.Y. y Lindemann, B. 1983 Competitive blocking of epithelial sodium channels by organic cations: the relationship between macroscopic and microscopic inhibition constants. J. Mem. Biol. 76: 235-251
- Lineweaver, H. y Burk, D. 1934 J.A.C.S. 56: 658
- Lumsden, R.D.; Oaks, J.A. y Alworth, W.L. 1970 Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. IV. Localization and cytochemical properties of membrane-fixed cation binding sites. J. of Parasitol. 56: 736-747
- Lussier, P.E.; Podestá, R.B. y Mettrick, D.F. 1978a Effect of ATP on amino acid transport by Hymenolepis diminuta. J. of Parasitol. 64: 1139-1140
- Lussier, P.E.; Podestá, R.B. y Mettrick, D.F. 1978b Hymenolepis diminuta: amino acid transport and osmoregulation. J. of Parasitol. 64: 1140-1141
- Marmor, M.F. y Gorman, A.L.F. 1970 Membrane potential as the sum of ionic and metabolic components. Science 167: 65-67
- Mazzocco, P. 1923 Composition de liquide hydatique. Compt. Rend. Soc. Biol. Paris 88: 342
- Mc Manus, I.J. 1967 Comparative biology of red cells. Fed. Proc. 26: 1821-1826
- Michaelis, L. y Menten, M.L. 1913 Die kinetik der invertin wirkung. Biochem. Ztchu. 49: 333-369
- Mitchell, G.F.; Marchalonis, J.J.; Smith, P.M.; Nicholas, W.L. y Warner, N.L. 1977 Studies on immune responses to larval cestodes in mice. Immunoglobulins associated with the larvae of Mesocestoides corti. Australian J. of Exp. Biol. and Med. Sci. 55: 187-211
- Mitchell, G.F.; Rajasekariah, G.R. y Rickard, M.D. 1980 A mechanism to account for mouse strain variation in resistance to the larval cestode, Taenia taeniaformis. Immunology 39: 481-489

- Moreno, J.H. 1975 Blockage of gallbladder tight junction cation-selective channels by 2-4-6 triaminopyrimidinium (TAP). *J. Gen. Physiol.* 66: 97-115
- Morseth, D.J. 1966 The fine structure of the tegument of adult Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena and Taenia pisiformis. *J. of Parasitol.* 52: 1074-1085
- Morseth, D.J. 1967 Fine structure of the hydatid cyst and protoscolex of Echinococcus granulosus. *J. of Parasitol.* 53: 312-325
- Murrell, K.D. 1971 The effect of antibody on the permeability control of larval Taenia taeniaformis. *J. of Parasitol.* 57 N° 4: 875-880
- Musoke, A.J. y Williams, J.F. 1975 Immunoglobulins associated with passive transfer of resistance to Taenia taeniaformis in the mouse. *Immunology* 28: 97-101
- Nagel, W. 1976 The intracellular electrical potential profile of the frog skin epithelium. *Pfluegers Arch.* 365: 135
- Nagel, W. 1978  $Ba^{++}$  decreases gK in frog skin. *Fed. Proc.* 37: 569
- Nagel, W. y Hirschmann, W. 1980  $K^{+}$ -permeability of the outer border of the frog skin (*R. temporaria*). *J. Mem. Biol.* 52: 107-113
- Nishi, S. y Soeda, H. 1964 Hyperpolarization of a neurone membrane by barium. *Nature* 204: 761-764
- O'Neil, R. 1983 Voltage-dependent interaction of barium and cesium with the potassium conductance of the cortical collecting duct apical cell membrane. *J. Mem. Biol.* 74: 165-173
- O'Neil, R.G. y Boulpaep, E.L. 1979 Effect of amiloride on the apical cell membrane cation channels of a sodium-absorbing potassium secreting renal epithelium. *J. Mem. Biol.* 50: 365-387
- Okada, Y.; Soto, T. y Inouye, A. 1975 Effects of potassium ions and sodium ions on membrane potential of epithelial cells in rat duodenum. *Biochim. Biophys. Acta* 413: 104-105

- Pappas, P.W. 1982 Solubilization of the membrane-bound enzymes of the brush-border plasma membrane of Hymenolepis diminuta (cestoda) using nonionic detergents. J. of Parasitol. 68(4): 588-592
- Pappas, P.W. y Read, C.P. 1973 Permeability and membrane transport in the larva of Taenia crassiceps. Parasitology 66: 33-42
- Pappas, P.W. y Read, C.P. 1975 Parasitological review: membrane transport in helminth parasites: A review. Exp. Parasitol. 37: 469-530
- Read, C.P. 1978 Parasitismo Animal pp.111-122, Campaña Ed. Continental S.A. México.
- Read, C.P. y Simmons, J.E. 1963 The physiology and biochemistry of tapeworms. Physiol. Rev. 43: 263
- Read, C.P.; Simmons, J.E. y Rothman, A.H. 1960 Permeation and membrane transport in animal parasites: amino acid permeation into tapeworms from elasmobranchs. J. of Parasitol. 46: 33-51
- Reichstein, E. y Rothstein, A. 1981 Effects of quinine on Ca<sup>2+</sup>-induced K<sup>+</sup> eflux from human red blood cells. J. Mem. Biol. 59: 57-63
- Reisin, I.L.; Cantiello, H.F. 1979 Balance de agua y electrolitos durante el estadio precoz de vesiculización del protoescólex de Echinococcus granulosus. Rev. Arg. Parasitol. 1 N° 1: 29-40
- Reisin, I.L.; Cantiello, H.F. y Rotunno, C.A. 1977 Active transport of sodium and potassium in protoscolices of Echinococcus granulosus. Primer Simposio Intern. Parasitología, Santiago de Chile
- Reisin, I.L. e Ibarra, C.A. 1980 Existencia de una vía alternativa para el consumo de oxígeno en protoescólices de Echinococcus granulosus. Rev. Arg. Parasitol. 1: 15-22
- Reisin, I.L. y Pavisic de Falá, C.I. 1984 Membrane permeability of secondary hydatid cysts of Echinococcus granulosus. Determination of the water diffusional and osmotic permeability coefficients through a sincytial membrane. Mol. Biochem. Parasitol. 12(1): 101-116



- Reisin, I.L.; Rabito, C.A. y Cantiello, H.F. 1981 Water and electrolytic balance in protoscolices of Echinococcus granulosus incubated "in vitro": effect of metabolic inhibitors. Inter. J. for Parasitol. 11 N°5: 405-410
- Reisin, I.L.; Rabito, C.A.; Rotunno, C.A. y Cereijido, M. 1977 The permeability of the membranes of experimental secondary cysts of Echinococcus granulosus to (<sup>14</sup>C)mebendazole. Int. J. for Parasitol. 7: 189-194
- Reisin, I.L. y Rotunno, C.A. 1981 Water and electrolytic balance in protoscoleces of Echinococcus granulosus incubated "in vitro": general procedures for the determination of water, sodium, potassium and chloride in protoscoleces. Inter. J. for Parasitol. 11 N°5: 399-404
- Rossi, R.C. y Garrahan, P.J. 1984 A non-linear regression program for microcomputers. IV Pan-American Biochemistry Congress, Buenos Aires, Argentina
- Rotunno, C.A.; Kammerer, W.S.; Pérez Esandi, M.V. y Cereijido, M. 1974 Studies on the permeability to water, sodium, and chloride of the hydatid cyst of Echinococcus granulosus. J. of Parasitol. 60 N°4: 613-620
- Sariban-Sohraby, S.; Burg, M.B. y Turner, R.J. 1983 Apical sodium uptake in toad kidney epithelial cell line A6. Am. J. Physiol. 245: (Cell Physiol. 14): C<sub>167</sub>-C<sub>171</sub>
- Schanne, O.F.; Lavalley, M.; Laprade, R. y Gagué, S. 1968 Electrical properties of glass microelectrodes. Proc. of the I.E.E.E. 56: 1072-1082
- Schantz, P.M. 1978 Hidatidosis: magnitud del problema y perspectivas de control en América Latina. Contribución del Centro Panamericano de Zoonosis (OPS/MS).
- Schatzmann, I.J. 1953 Herzglykoside als hemmstoffe für den aktiven kalium-und natrium transport durch die erythrocyten membran. Helv. Physiol. Acta 11: 346-354

- Schwabe, C.W. 1959 Host-parasite relationship in echinococcosis I. Observations on the permeability of the hydatid cyst wall. Am. J. Trop. Med. Hyg. 8: 20-28
- Skou, J.C. 1960 Further investigations on a  $Mg^{++} + Na^{+}$ - activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of  $Na^{+}$  and  $K^{+}$  across the nerve membrane. Biochim. Biophys. Acta 42: 6-23
- Skou, J.C. 1965 Enzymatic basis for active transport of  $Na^{+}$  and  $K^{+}$  across cell membrane. Physiological Review 45: 596-617
- Smith, J.D. 1962 Studies on tape worm physiology V. Axemic cultivation of hydatid organism. Echinococcus granulosus, establishment of a basis technique. Parasitology 52: 441
- Smith, J.D. 1967 Studies on tape worm physiology XI. "In vitro" cultivation of Echinococcus granulosus from protoscoleces to strobilate stage. Parasitology 57: 111
- Smith, J.D. y Davies, Z. 1974 Occurrence of physiological strains of Echinococcus granulosus demonstrated by "in vitro" culture of protoscoleces from sheep and horse hydatid cysts. Inter. J. for Parasitol. 4: 443-445
- Smith, J.D.; Howkins, A.B. y Barton, M. 1966 Factors controlling the differentiation of the hydatid organism Echinococcus granulosus into cystic or strobilar stages "in vitro". Nature 211: 1374-1377
- Smith, J.D.; Miller, H.J. y Howkins, A.B. 1967 Further analysis of the factors controlling strobilization, differentiation and maturation of Echinococcus granulosus "in vitro". Exp. Parasitol. 21:31
- Soltoff, S.P. y Mandel, L.J. 1983 Amiloride directly inhibits the Na, K-ATPase activity of rabbit kidney proximal tubules. Science 220: 957-959
- Sperelakis, N.; Schneider, M.F. y Harris, E.J. 1967 Decreased  $K^{+}$  conductance produced by  $Ba^{++}$  in frog sartorium fibers. J. Gen. Physiol. 50: 1566-1583

- Stefani, E. y Steinbach, A.B. 1969 Resting potential and electrical properties of frog-slow muscle fibres. Effect of different external solutions. J. Physiol. 203: 383-401
- Szasz, I.; Sarkadi, B. y Gardos, G. 1978 Effect of drugs on the calcium-dependent rapid potassium transport in calcium-loaded intact red cells. Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 13:133
- Sze, H. y Solomon, A.K. 1979 Calcium-induced potassium pathway in sided erythrocyte membranes vesicles. Biochim. Biophys. Acta 554: 180-194
- Thompson, D.P.; Pax, R.A. y Bennett, J.L. 1982 Microelectrode studies of the tegument and sub-tegumental compartments of male Schistosoma mansoni: an analysis of electrophysiological properties. Parasitology 85: 163-178
- Thompson, D.P.; Pax, R.A. y Bennett, J.L. 1984 Schistosoma mansoni: a comparative study of schistosomula transformed mechanically and by skin penetration. Electrophysiological responses to a wide range of substance. Parasitology 88: 477-489
- Tosteson, D.C.; Cook, P.; Andreoli, T. Y Tieffenberg, M. 1967 The effect of Valinomycin on potassium and sodium permeability of HK and LK sheep red cells. J. Gen. Physiol. 50: 2513-2525
- Ussing, H.H. y Windhager, E.E. 1964 Nature of shunt path and active transport in the frog skin epithelium. Acta Physiol. Scand. 61: 484-504
- Ussing, H.H. y Zerahn, K. 1951 Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Acta Physiol. Scand. 23: 110-127
- Van Driessche, W. y Zeiske, W. 1980 Ba<sup>2+</sup>-induced conductance fluctuations of spontaneously fluctuating K<sup>+</sup> channels in the apical membrane of frog skin (*Rana temporaria*). J. Mem. Biol. 56: 31-42

- Van Driessche, W. y Zeiske, W. 1982 Cation-selective channels in the apical membrane of frog skin inmasked by decreasing external  $|\text{Ca}^{2+}|$  and intracellular  $|\text{H}^+|$ . Arch. Internat. de Physiologic et de Biochimie 90: 5-6
- Werman, R.; Mc Cann, F.V. y Grundfest, H. 1961 Graded and all-or-none electrogenesis in arthropod muscle. I. The effects of alkali-earth cations on the neuromuscular system of Romalea microptera. J. Gen. Physiol. 44: 979-1027
- Williams, J.F. y Prezioso, U. 1970 Latex agglutination test for hydatid disease using Boemer slides. J. Parasitol. 56: 1253-1255
- Windhager, E.E.; Boulpaep, E.L. y Giebisch, G. 1966 Electrophysiological studies on single nephrons. Proc. Third. Inter. Congr. Nephrol. 1: 35-47 (Karger, Basel/New York)
- Yarzabal, L.A.; Dupas, H.; Bout, D. y Caprón, A. 1966 Echinococcus granulosus: distribution of hydatid fluid antigens in tissues of the larval stage I. Localization of the specific antigen of hydatid fluid (Antigen 5). Exp. Parasitol. 40: 391-396
- Yarzabal, L.A.; Dupas, H.; Bout, D.; Nagueira, F. y Capron, A. 1977 Echinococcus granulosus: the distribution of hydatid fluid antigens in the tissues of the larval stage II. Localization of the thermostable lipoprotein of parasitic origin (Antigen  $\beta$ ) Exp. Parasitol. 42: 115-120
- Yeh, J.Z. y Narahashi, T. 1976 Mechanism of action of quinidine on squid axon membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 196: 67-70
- Yellen, G. 1984 Ionic permeation and blockade in  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channels of bovine chromaffin cells. J. Gen. Physiol. 84: 157-186
- Zeiske, W. y Van Driessche, W. 1979 Saturable  $\text{K}^+$  pathway across the outer border of frog skin (*Rana temporaria*): kinetics and inhibition by  $\text{Cs}^+$  and other cations. J. Mem. Biol. 47: 77-96