

Tesis de Posgrado

Mecanismos de transferencia de agua y solutos en barreras epiteliales

Capurro, Claudia Graciela

1992

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

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

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

Cita tipo APA:

Capurro, Claudia Graciela. (1992). Mecanismos de transferencia de agua y solutos en barreras epiteliales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2529_Capurro.pdf

Cita tipo Chicago:

Capurro, Claudia Graciela. "Mecanismos de transferencia de agua y solutos en barreras epiteliales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2529_Capurro.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas

Título del trabajo:

**MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE AGUA Y SOLUTOS
EN BARRERAS EPITELIALES**

Autora:

CLAUDIA GRACIELA CAPURRO

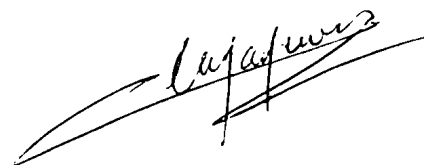
*Tesis.
2520,
p. 2.*

**Director de tesis:
Dr. Mario Parisi**

**Consejero de tesis:
Dr. Josué Núñez**



1992



*A mis padres, a quienes les debo la
cristalización de parte de mis sueños*

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada en el laboratorio de Biomembranas del Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina (UBA), bajo la dirección del Prof. Dr. Mario Parisi. Parte de ella se llevó a cabo en el Service de Biologie Cellulaire du Centre d'Etudes Nucleaires de Saclay (Francia), bajo la dirección del Dr. Pierre Ripoche.

Al Dr. Mario Parisi por su firme disposición en todo momento para la discusión de las ideas y el análisis de los resultados, sus sólidos conocimientos y su gran capacidad de transmitirlos. A él le debo el inicio de una apasionante carrera de investigación y por sobre todo, el aprendizaje de un riguroso desarrollo del conocimiento y de la metodología científica.

Al Dr. Pierre Ripoche por haberme permitido llevar a cabo parte de estos estudios en su laboratorio, brindándome todo lo disponible para su realización. Este agradecimiento abarca a mis colegas franceses quienes mostraron una enorme calidez y confianza.

A Margarita Porta por haberme enseñado los primeros pasos en el manejo de las técnicas de laboratorio, siendo esto posible gracias a su gran dedicación y comprensión en esos difíciles momentos.

A la Dra. Cristina Ibarra por haberme iniciado en el campo de la Biología Molecular, por su gran capacidad de trabajo, conocimientos, disponibilidad y amistad.

A Ricardo Dorr por haber realizado junto a mí parte de este proyecto, por su tenacidad, por su meticulosa forma de trabajar, por su calidez humana.

A mis compañeros de laboratorio: Elsa Escobar, Marito Borgnia y Eduardo Todisco con quienes compartimos parte de estos años, y con quienes discutimos y nos apoyamos constantemente.

Al personal no-docente por su aporte silencioso; muy especialmente a María Britos por su solidaridad y comprensión.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por las becas que me otorgaron permitiéndome iniciar mi carrera científica.

A la Universidad de Buenos Aires y al CONICET por los subsidios acordados a nuestro laboratorio los que hicieron posible la realización de nuestros proyectos.

En fin, a todos aquellos que de algún modo contribuyen a que la investigación en la Argentina aún sea posible.

INDICE

RESUMEN Y OBJETIVOS	1
CAPITULO I: INTRODUCCION GENERAL	3
1.1 Estudio de la permeabilidad al agua en células aisladas	4
1.2 Estudio de la permeabilidad al agua en barreras epiteliales	7
1.2.1 Las barreras epiteliales	7
1.2.2 Epitelios "abiertos" y "cerrados"	9
1.2.3 Características de la permeabilidad al agua en los epitelios	10
1.2.4 Efectos de las capas no-mezcladas sobre las mediciones de agua	13
CAPITULO II: MECANISMOS PASIVOS DE TRANSFERENCIA. MODELO EXPERIMENTAL: EL AMNIOS HUMANO	16
2.1 Introducción	16
2.2 Materiales y métodos	19
2.2.1 El material biológico	19
2.2.2 Montaje de la preparación	19
2.2.3 Dispositivo para la medición de los flujos netos de agua	20
2.2.4 Estudio de la permeabilidad hidrostática	22
2.2.5 Estudio de la permeabilidad osmótica	23
2.2.6 Estudio de la permeabilidad a la sacarosa	24
2.2.7 Estudios asociados al cambio de pH	25
2.3 Resultados	26
2.3.1 Medida de las permeabilidades hidrostáticas y osmóticas en el amnios humano	26
2.3.2 Efectos de la acidificación del medio	30
2.4 Discusión	34

CAPITULO III: COEXISTENCIA DE MECANISMOS ACTIVOS Y PASIVOS DE TRANSFERENCIA SIMULTANEA. MODELO EXPERIMENTAL: EL YEYUNO DE RATA	38
3.1 Introducción	38
3.1.1 Consideraciones anatómicas	38
3.1.2 Transferencia de agua en el yeyuno de rata	40
3.1.3 Transferencia de solutos en el yeyuno de rata	41
3.1.4 Estudios de "adaptación" sobre los procesos de transporte	42
3.2 Materiales y métodos	43
3.2.1 El material empleado	43
3.2.2 Metodología de trabajo	44
3.2.3 Medición de los flujos netos y unidireccionales de agua y manitol	45
3.2.4 Medición de parámetros eléctricos	46
3.2.5 Medición de las transferencias de D-glucosa, L-glucosa y ²² Na en tejido entero	46
3.2.6 Preparación de vesículas de membrana apical de yeyuno de rata	48
3.2.7 Mediciones de transporte	49
3.3. Resultados	52
I Transferencia de agua en el yeyuno de rata	52
3.3.1 Estudio de las permeabilidades hidrostáticas y osmóticas: Efectos de la remoción del sodio	52
3.3.2 Efectos de la acidificación sobre los flujos hidrostáticos	56
3.3.3 Efectos de la acidificación sobre los flujos osmóticos	57
3.3.4 Relación entre el efecto de pH y la presencia de bicarbonato	58
3.3.5 Efecto del pCMBS sobre el movimiento de agua	60
II Transferencia de glucosa y sodio en el yeyuno de rata	60
3.3.6 Flujos transepiteliales de D y L-glucosa	60
3.3.7 El rol del sodio en los fenómenos observados	63
3.3.8 Estudio de los parámetros eléctricos	65
3.3.9 Captación de glucosa en vesículas de ribete en cepillo	65
3.4 Discusión	69
I Movimiento de agua transepitelial	69
3.4.1 J_w dirigido por gradientes osmóticos e hidrostáticos en el yeyuno de rata	69
3.4.2 Efectos de la acidificación del medio sobre los movimientos netos de agua	70

II Movimiento transepitelial de solutos	72
3.4.3 El efecto del amiloride	73
3.4.4 ¿Un cotransportador de Na ⁺ /glucosa sensible al amiloride?	75
3.4.5 La transferencia de L-glucosa y sacarosa	76
CAPITULO IV: HACIA UN ENFOQUE MOLECULAR. MODELO EXPERIMENTAL: EL CANAL DE AGUA ESTIMULADO POR LA ADII	77
4.1 Introducción	77
4.2 Materiales y métodos	80
4.2.1 El material biológico	80
4.2.2 Preparación de los ovocitos	80
4.2.3 Medida de la permeabilidad osmótica al agua	83
4.2.4 Medida de la permeabilidad difusional	85
4.2.5 Preparación del ARNm	86
4.2.6 Traducción "in vitro"	89
4.2.7 Microinyección del ARNm en ovocitos de anfibio	89
4.3 Resultados	92
4.3.1 Estudio de la permeabilidad osmótica al agua	92
4.3.1.1 Efectos de la hipotonicidad	92
4.3.1.2 Efectos de la hipertonicidad	94
4.3.2 Efectos de los ionóforos sobre los volúmenes iniciales	96
4.3.3 Estudio de la permeabilidad difusional al agua	97
4.3.4 Expresión del ARNm de vejiga urinaria de anfibio	100
4.3.4.1 Traducción "in vitro" del ARNm	101
4.3.4.2 Expresión de las proteínas transportadoras de agua	101
4.4 Discusión	104
4.4.1 Caracterización biofísica de los ovocitos nativos	104
4.4.2 Microinyección de ovocitos con ARNm	106
CAPITULO V: DISCUSION GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	107
5.1 Permeabilidad al agua en barreras epiteliales	107
5.1.2 Caracterización biofísica de los epitelios estudiados	109
5.2 Permeabilidad al agua en ovocitos de anfibios	113
5.2.1 Caracterización biofísica de los ovocitos	113
5.2.2 Caracterización molecular	114

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 115

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS 125

TRABAJOS PUBLICADOS 128

OBJETIVOS

El objetivo central de este trabajo fue, en una primera etapa, el estudio de los mecanismos de transferencia de agua y solutos en diferentes epitelios, así como su regulación y farmacología. Este campo es de gran complejidad, ya que las propiedades de transporte varían de tejido en tejido y de especie en especie. Sin embargo existen mecanismos comunes que permiten entender las funciones básicas de estos sistemas.

En lo que respecta a la transferencia neta de agua podemos decir que las fuerzas impulsoras son básicamente tres: 1) el gradiente transepitelial de presión hidrostática; 2) el gradiente transepitelial de presión osmótica y 3) los movimientos de agua asociados al transporte de soluto.

Muchos puntos importantes no están, sin embargo, aún aclarados como ser: 1) ¿Cuál es el grado real de acople entre el movimiento de agua y solutos? 2) ¿Cuál es el rol de los gradientes osmóticos e hidrostáticos en los flujos observados? 3) ¿Cuál es la importancia relativa de las vías paracelular y transcelular en los movimientos de agua y soluto? y 4) ¿Existen o no canales específicos para el movimiento de agua?. El enfoque de los problemas antes expuestos permite diferentes aproximaciones metodológicas que implican distintos niveles de complejidad estructural. Al avanzar en la disección de los fenómenos en estudio pasaremos del nivel supracelular al celular, para llegar al subcelular y

por último al molecular.

Para dar una respuesta inicial a los problemas antes mencionados, utilizamos el estudio sistemático y paralelo de las propiedades de permeabilidad al agua y solutos en epitelios "in vitro", utilizando dos modelos experimentales: el amnios humano y el yeyuno de rata. Luego, comparamos los resultados obtenidos con los previamente informados por nuestro laboratorio para la vejiga urinaria de anfibio. Estos estudios se centraron en el análisis de los mecanismos que regulan el balance absorción-secreción y sobre el rol de las vías transcelular y paracelular en los movimientos de agua y solutos.

La metodología básica consistió en montar a los epitelios en estudio, entre dos cámaras de lucite, lo que permite la medición de los movimientos transepiteliales iónicos y moleculares, utilizando marcadores radiactivos, así como la medición de los parámetros eléctricos (diferencia de potencial, conductancia y corriente de corto-circuito). Utilizamos, además, una técnica que permite controlar, minuto a minuto, el flujo neto de agua transepitelial.

En una segunda etapa se procedió a la evaluación de las permeabilidades osmóticas y difusionales al agua en ovocitos de anfibios. El objetivo de estas mediciones fue utilizar a este sistema como modelo de expresión de las propiedades de permeabilidad. Esto se logra inyectando en el ovocito el ARNm preparado a partir de determinado tipo celular, que posea la propiedad de permeabilidad en estudio. Esta metodología, basada en técnicas de biología molecular, demostró ser una herramienta adecuada para la expresión del canal de agua inducido por la presencia de la hormona antidiurética.

CAPITULO I

INTRODUCCION GENERAL

El movimiento de agua a través de las membranas celulares y de las estructuras epiteliales es, desde hace mucho tiempo, un punto central en el estudio de la fisiología general.

Las investigaciones realizadas por Pfeffer (1877) sobre la ósmosis en plantas, estimularon al fisicoquímico Van't Hoff (1887) a postular una teoría física sobre el equilibrio osmótico, y desde entonces numerosos autores elaboraron teorías alternativas para la descripción del movimiento de agua impulsado por gradientes osmóticos, a través de membranas, las que continúan hasta el presente.

Con el advenimiento, a partir de 1940, de moléculas de agua marcadas isotópicamente, se hizo posible el estudio de una nueva medida del transporte de agua: el flujo difusional a través de membranas. Los formalismos de la termodinámica irreversible se agregaron al estudio del movimiento de agua y solutos (Kedem & Katchalsky, 1958), surgiendo a partir de ellos, la necesidad de responder a una serie de interrogantes respecto a: ¿Es la principal vía para el movimiento de agua, hacia y desde las células, la bicapa lipídica?, o ¿Existen poros específicos?; si ocurre a través de poros, ¿Cuál es su número y tamaño?; ¿Es el movimiento de agua a través de un epitelio primariamente paracelular o transcelular?. Para dar respuesta a estos

interrogantes se procedió al estudio de las permeabilidades al agua en membranas lipídicas artificiales como así también en sistemas biológicos simples (células aisladas) o complejos (barreras epiteliales).

1.1 Estudio de la permeabilidad al agua en células aisladas

La caracterización de la permeabilidad al agua de una membrana es aún muy empírica. Se estudian generalmente cuatro parámetros: las permeabilidades osmóticas (Pf) y difusionales (Pd) así como su sensibilidad a agentes sulfidrílicos, los coeficientes de reflexión de los distintos solutos y la energía de activación (Ea) del transporte de agua.

El flujo neto de agua (J_w) que atraviesa una membrana que separa dos compartimientos A y B conteniendo cada uno los solutos i, resulta del efecto conjugado de la presión osmótica ($\Delta\pi$) y de la presión hidrostática (ΔP):

$$J_w = Pf \cdot S \cdot V_w / R \cdot T \cdot (\Delta P - \sum \sigma_i \cdot \Delta\pi)$$

donde Pf: coeficiente de permeabilidad osmótica (en cm/s)
S: superficie de intercambio de la membrana (en cm²)
 V_w : volumen molar del agua (18 cm³/mol)
R: constante general de los gases (1,9872 Kcal/mol.°K)
T: temperatura absoluta (°K)

σ_i : coeficiente de reflexión del soluto i. Este coeficiente toma valores que oscilan entre 0 y 1 (Staverman, 1951), y permite cuantificar la semipermeabilidad de una membrana para un soluto dado. Para un soluto impermeable, $\sigma_i = 1$; si existe una interacción entre el agua y el soluto dentro de la misma vía de pasaje, entonces $0 < \sigma_i < 1$; y si la membrana es tan permeable al agua como al soluto, $\sigma_i = 0$.

En ausencia de un flujo neto de agua, es posible determinar la permeabilidad difusional de la membrana (P_d), resultante de la agitación térmica de las moléculas, mediante el agregado de agua tritiada a uno de los dos compartimientos. La difusión del agua obedece a la primer ley de Fick y el flujo de agua tritiada ($^3\text{H}_2\text{O}$) se describe según la siguiente ecuación:

$$J_d = P_d \cdot S \cdot ([^3\text{H}_2\text{O}]_A - [^3\text{H}_2\text{O}]_B)$$

Se ha demostrado que la relación P_f/P_d da información sobre la naturaleza de la vía de pasaje para el agua (Finkelstein, 1976; Solomon y col., 1983): una relación P_f/P_d de 1 es característica de un pasaje por difusión simple a través de una bicapa lipídica; por el contrario una relación mayor que uno indica la existencia de poros ya sea de gran tamaño, o bien estrechos pero con varias moléculas de agua en fila india (single-file channel).

La energía de activación (E_a) para el transporte osmótico y difusional está dada por la ecuación de Arrhenius:

$$\ln P_i = E_a / R.T + C$$

donde P_i es la permeabilidad hídrica considerada (P_f o P_d) y C es la constante de integración relacionada a la entropía.

Los conocimientos actuales sobre los canales hídricos provienen esencialmente de estudios hechos en eritrocitos humanos. Muchos autores han observado que la permeabilidad osmótica de los glóbulos rojos es muy importante ($200 \mu\text{m/s}$) (Macey & Farmer, 1970; Solomon y col., 1983), comparada con aquella de las membranas lipídicas artificiales. A modo de comparación, la permeabilidad osmótica de vesículas que contienen lecitina y colesterol en igual proporción (1:1) es de $20 \mu\text{m/s}$. Debe destacarse que la permeabilidad de las bicapas lipídicas es totalmente dependiente de la composición fosfolipídica y de los tenores de colesterol (Finkelstein, 1976).

Los eritrocitos humanos poseen una relación P_f/P_d del orden de 5 (Paganelli & Solomon, 1957; Solomon, 1986) mientras que en las membranas artificiales este valor es de 1 (Cass & Filkenstein, 1967); esta comparación sugiere que la vía de pasaje para el agua es diferente en estos dos tipos de membranas.

Dos argumentos suplementarios apoyan la idea de la existencia de canales responsables del transporte de agua a través de la membrana de los eritrocitos: 1) la permeabilidad hídrica de los eritrocitos es inhibida, en forma reversible, por los agentes sulfidrílicos que contienen mercurio, tales como el ácido paraclorobencenosulfonato (pCMBS) (Macey & Farmer, 1970; Ashley & Goldstein, 1981; Benga y col., 1982); 2) la energía de activación para el transporte de agua a través de la membrana del eritrocito ($4,5 \text{ Kcal/mol}$) es próxima a la energía de activación de la difusión del agua en agua (Macey y col., 1972; Benga y col., 1989), contrariamente a los liposomas para los cuales la E_a es próxima a 10 Kcal/mol (Fettiplace & Hydon, 1980).

No obstante, la identidad molecular de los transportadores de agua es aún desconocida. Su identificación y clonado es muy complejo debido a la falta de inhibidores específicos, a la relativa alta permeabilidad al agua de las membranas que no contienen canales específicos y a la baja densidad de los mismos en las membranas en estudio. La microinyección de ARNm obtenido a partir de sistemas que poseen transportadores para el agua (glóbulo rojo, vejiga urinaria de anfibios), en ovocitos de Xenopus laevis constituyen en la actualidad una buena herramienta para la caracterización de dichas proteínas (Takahashi y col., 1987; Hediger, 1988; Zhang y col, 1990). Nosotros utilizamos este sistema para estudiar: 1- las permeabilidades osmóticas (Pf) y difusionales (Pd) de los ovocitos nativos; 2- la variación de estos parámetros en función del agregado de ionóforos específicos (anfotericina B, gramicidina); 3- la energía de activación (Ea) de estos parámetros; 4- la inoculación de los ovocitos nativos con ARNm proveniente de la vejiga urinaria de anfibios; sistema conocido por la presencia de canales de agua (Parisi y col., 1981).

1.2 Estudio de la permeabilidad al agua en barreras epiteliales

1.2.1 Las barreras epiteliales

Los tejidos epiteliales juegan frecuentemente el rol de barreras separando el medio interno del medio ambiente (epitelios digestivos, renales, pulmonares y la piel) o dos compartimientos del interior del organismo (plexos coroideos, epitelios glandulares). Los estudios realizados en

los últimos años han hecho avanzar en profundidad nuestro conocimiento sobre la fisiología de estas estructuras y es así como la idea primitiva de "órganos filtro" ha sido reemplazada por el concepto que define a las barreras epiteliales como un sistema que regula, de manera compleja, las relaciones y transferencias entre los compartimientos que separa.

Los epitelios son conjuntos de células unidas entre sí por los llamados "complejos de unión" constituidos por tres tipos de elementos morfológicos: zónula ocludens (tight junction), gap junction y desmosomas (Farquhar & Palade, 1963)

Como estructuras polarizadas, las barreras epiteliales presentan una organización celular y tisular que permite el transporte vectorial de diferentes especies moleculares. Para ello, la membrana plasmática de cada célula epitelial es, en sí misma, asimétrica. La superficie en contacto con el interior del organismo, recibe el nombre de membrana basolateral, y es estructural y funcionalmente diferente de aquella en contacto con el medio externo, membrana apical. Del mismo modo, todas las funciones vectoriales de los epitelios están basadas en la distribución asimétrica de las proteínas de membrana que cumplen funciones de transportadores, activos o pasivos.

La interacción con los otros órganos de la economía se realiza por medio de diversos mensajeros químicos que llegan desde sitios más o menos alejados, vía la circulación general, o por mediación nerviosa. Los mensajeros producidos por el epitelio actúan, a su vez, sobre otros órganos u otras células del mismo tejido.

En lugar de examinar el movimiento de sustancias a través de una membrana plasmática, como ocurre al realizar estos estudios en células aisladas (glóbulo rojo, axón gigante de calamar); en un epitelio dicho transporte se efectúa a través de dos membranas celulares en

serie, una con la otra, y con barreras adicionales, como lo son el citoplasma celular y las membranas basales. Aún más, la heterogeneidad de los tipos celulares que conforman la capa epitelial y la presencia de rutas de transporte paracelular, hacen más difícil la interpretación de los datos experimentales.

1.2.2 Epitelios "abiertos" y "cerrados"

Frömter y Diamond (1972) clasificaron a las barreras epiteliales como "abiertas" (tight) o "cerradas" (leaky), tomando como criterio para ello la conductancia iónica transepitelial, la cual está ligada en gran medida a la naturaleza de las uniones estrechas. En base a ello los epitelios abiertos son aquellos que presentan una alta permeabilidad pasiva a los iones, la cual se manifiesta en una muy baja resistencia eléctrica transepitelial. Como consecuencia de ello estos epitelios poseen una baja diferencia de potencial eléctrico y poca capacidad de mantener gradientes por transporte activo. Ejemplos típicos de epitelios abiertos son el túbulo contorneado proximal renal, el intestino delgado y la vesícula biliar.

Contrariamente, los epitelios cerrados ofrecen alta resistencia al paso de solutos, siendo poco permeables y capaces de mantener gradientes transepiteliales (químicos, eléctricos y osmóticos). El túbulo colector renal es un epitelio "cerrado" por excelencia, en este caso la gran resistencia eléctrica de la vía paracelular permite el desarrollo de importantes diferencias de potencial transepitelial.

Entre estos dos extremos existe una variada gama de epitelios cuyas características eléctricas

los hacen más próximos a unos que a otros.

1.2.3 Características de la permeabilidad al agua en los epitelios

Los movimientos netos de agua observados en los epitelios pueden ser divididos, de acuerdo a sus orígenes, en dos grupos principales:

1) las llamadas "transferencias isotónicas", asociadas al transporte iónico en ausencia de un gradiente transepitelial (Sackim & Boulpaep, 1975; Diamond, 1979) y 2) el flujo neto de agua dirigido por gradientes osmóticos y de presión hidrostática. En general existen acuerdos en plantear que en los tejidos sensibles a la ADH el agua se mueve, impulsada por la presencia de gradientes osmóticos, principalmente por la vía transcelular, estando la regulación limitada por la barrera apical (Parisi & Bourguet, 1983; 1985). Mucho menos claro es el caso de las transferencias isotónicas, donde la importancia relativa de las vías paracelular y transcelular está aún en discusión (Fischbarg y col., 1985; Whittenbury y col., 1985).

Este último interrogante ha sido de particular interés en el estudio de los epitelios llamados "abiertos" (leaky). En combinación con una alta permeabilidad a iones (y no electrólitos) poseen a menudo, aunque existen excepciones, una alta permeabilidad al agua, haciendo al epitelio también "leaky" para el agua.

Numerosos autores han establecido que los flujos pasivos de solutos en este tipo de epitelios ocurren primariamente a través de las uniones intercelulares (Frömter, 1972; Wright & Pietras, 1974; Berry & Boulpaep, 1975) siendo esta, posiblemente, la principal vía de pasaje para el

agua. Esta propuesta ha sido revisada por Spring y col. (1983) quienes presentaron evidencias para proponer a la vía transcelular como principal sitio de pasaje del agua en epitelios "leaky". Los argumentos utilizados para esta propuesta fueron los siguientes: 1) la fracción del área total de mucosa ocupada por las "tight junctions" es pequeña, así como lo son los valores del Pf estimados para las mismas; 2) la medición de las permeabilidades de las membranas lumbinales y basales serían lo suficientemente importantes como para explicar el movimiento de agua transcelularmente (Spring, 1983). Debido a que las magnitudes de los valores de Pf son similares a aquellas obtenidas para bicapas lipídicas, no habría necesidad "a priori" de postular la presencia de canales de agua para estos epitelios. No obstante, Wittembury y col., (1984) describieron que el pCMBS causa una reducción importante en los valores de Pf de la membrana basolateral de los túbulos proximales de conejo, en simultaneo con un aumento en la Ea, lo que indicaría la presencia de poros específicos de membrana.

A pesar de estas propuestas, muchos puntos importantes no están aún aclarados: 1- ¿Cuál es el grado real de acople entre el movimiento de agua y solutos?, 2- ¿Cuál es el rol de los gradientes osmóticos e hidrostáticos en los flujos observados?, 3- ¿Cuál es la importancia relativa de las vías paracelular y transcelular en los movimientos de agua y solutos?. Nosotros utilizamos dos epitelios diferentes para dar una respuesta a estos interrogantes: El amnios humano como modelo de epitelio "muy abierto" (very leaky); y el yeyuno de rata como modelo de epitelio "abierto" (leaky).

La figura 1 representa esquemáticamente un epitelio ilustrando las posibles vías de pasaje para el agua.

En condiciones fisiológicas, el agua generalmente fluye, en forma absortiva, de la cara

espacio intercelular, pasando a la solución serosa sin haber atravesado a las membranas celulares.

1.2.4 Efectos de las capas no-mezcladas sobre las mediciones de agua

Debido a la complejidad de las estructuras epiteliales los resultados experimentales pueden ser difíciles de interpretar. Existe, además de la estructura antes descrita, un efecto adicional que lleva a la subestimación de los parámetros medidos: las capas de agua no-mezcladas propuesto por Dainty (1963). Se observa, en efecto, una capa de fluido perfectamente estática en contacto con la membrana donde la repartición del soluto (o del solvente) no es homogénea. La forma más sencilla de incorporar este hecho en los cálculos de las permeabilidades, es suponer que existe una distancia , a partir de la superficie de la membrana, donde el fluido es perfectamente homogéneo. La figura 2 muestra el efecto de las capas no-mezcladas sobre los flujos difusionales (A) y sobre los flujos osmóticos de agua (B). Puede observarse que existe un perfil de concentración para el agua tritiada, tanto en las capas no-mezcladas como dentro de la membrana.

Por consiguiente, la diferencia de concentración del agua marcada a través de la membrana es menor que la presente en ambas soluciones, dando como resultado una subestimación del valor del P_d calculado, respecto al esperado en ausencia de dichas capas.

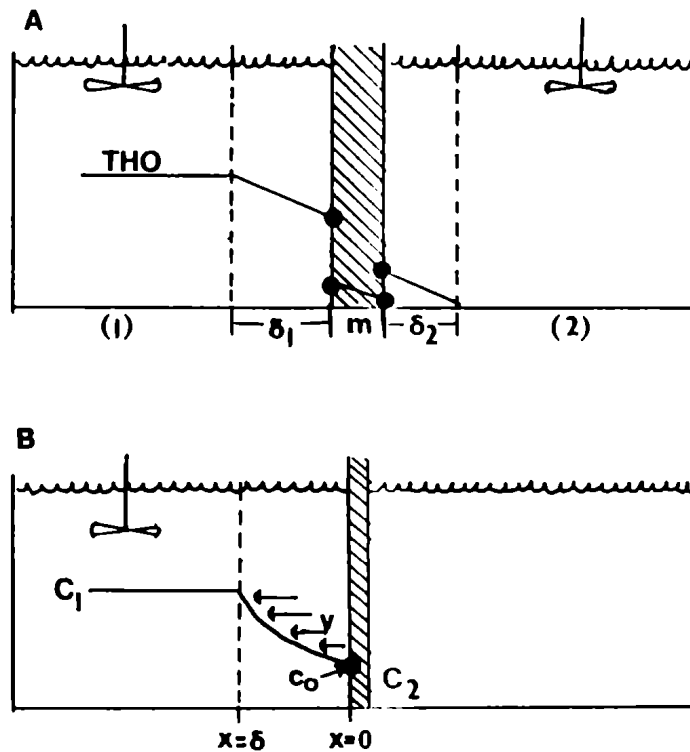


FIGURA 2: Representación esquemática de las capas no-mezcladas en la vecindad de una membrana o de un epitelio. (A) Flujo difusional y (B) flujo osmótico. El espesor de las capas no-mezcladas en ambos lados de la membrana está representado por δ_1 y δ_2 . A: Muestra el perfil de concentración para el THO en las capas no-mezcladas y dentro de la membrana. B: Una membrana separa dos compartimentos que contienen un soluto impermeable de tal modo que la concentración C_1 es mayor que C_2 . Pese a la agitación, existe una capa de fluido no mezclada en las vecindades de la membrana. El flujo de agua inducido por este soluto disminuye la concentración del soluto en la interfase membrana-compartimento. La presión osmótica que se ejerce realmente sobre el epitelio, o la membrana, es por consiguiente inferior a la diferencia de concentración $C_2 - C_1$.

El perfil de concentración de un soluto impermeable dentro de una capa no-mezclada se ilustra en la figura 2 (B). El soluto es arrastrado por el flujo osmótico de agua ("sweeping away effect") y su concentración es por consiguiente menor en la vecindad de la membrana que en los compartimentos que la bañan. La presión osmótica que se ejerce realmente sobre la membrana, está disminuida y por consiguiente también lo está el flujo de agua.

Se ha observado que los efectos de las capas no-mezcladas son más importantes sobre los valores del P_d que del P_f (Berry y Verkman, 1988), siendo esta última subestimación menor cuanto más débil es el gradiente osmótico utilizado.

CAPITULO II

MECANISMOS PASIVOS DE TRANSFERENCIA. MODELO EXPERIMENTAL: EL

AMNIOS HUMANO

2.1 INTRODUCCION

Desde hace tiempo se intenta dilucidar un aspecto básico, pero fundamental, del funcionamiento del sistema materno-fetal que se refiere al balance hidrosmótico del líquido amniótico.

La cavidad amniótica está totalmente rodeada por un epitelio de tipo cúbico simple, el amnios, que descansa sobre una membrana basal (0,5 μm de espesor); por debajo de ella se encuentra una estructura homogénea (10-60 μm) rica en colágeno y mucopolisacáridos. Le sigue una capa de tejido conectivo laxo (20 μm) que constituye el punto de conexión entre el amnios y el corion (plano de clivaje).

"In vivo", la presión hidrostática dentro de esta cavidad es de alrededor de 20 mmHg (26 cm de agua) (Krantz, 1962). Existe además, un gradiente osmótico que oscila en los 20 mOsm, siendo hipotónico el líquido amniótico respecto del plasma materno y fetal (isosmóticos, 280 mOsm).

Próximo al parto, el fluido amniótico proviene casi en su totalidad, de la excreción urinaria fetal;

la cual es cercana a los 700 cm³ diarios de un líquido muy hipotónico (100 mOsm). En 24 horas cerca de la mitad de ese volumen es deglutido por el feto en forma isotónica; por lo tanto la mitad remanente deberá intercambiarse, indefectiblemente, para que la osmolaridad del líquido amniótico se conserve (Seeds, 1980; Ross y col., 1983).

No existen evidencias que demuestren un transporte activo de agua, la misma se mueve impulsada por la presencia de gradientes osmóticos y/o hidrostáticos. Por consiguiente, la existencia de movimientos netos de agua, entre la cavidad amniótica y el compartimiento materno, obedece a mecanismos pasivos.

De todo lo expuesto surge la necesidad de hallar un sitio de intercambio. Algunos autores le dan preponderancia a la vía pulmonar y a la red de capilares cutáneos (Duenhoelter y Pritchard, 1976; Seeds, 1980), aunque su contribución es muy discutida. Otros muchos, sin embargo, consideran cada vez más la posibilidad de intercambio a través de las membranas placentarias (Page y col., 1974; Minh y col., 1981; Raabe & Mc Coshen, 1986). La figura 3 muestra las posibles vías de intercambios propuesta por Seeds (1980).

Estudios con microscopía electrónica sobre el amnios humano (King, 1983), han descrito la presencia de canales intercelulares entre las células epiteliales y la ausencia de uniones tight (zonula occludens). Como consecuencia de estos estudios comienza a tomar importancia la vía paracelular como posible sitio de intercambio de agua y pequeñas sustancias en el epitelio amniótico. No obstante, las evidencias citológicas no siempre se corresponden con los hallazgos fisiológicos; y no existen trabajos que estudien la permeabilidad al agua y sus posibles vías de pasaje, siendo este el punto central de nuestros estudios.

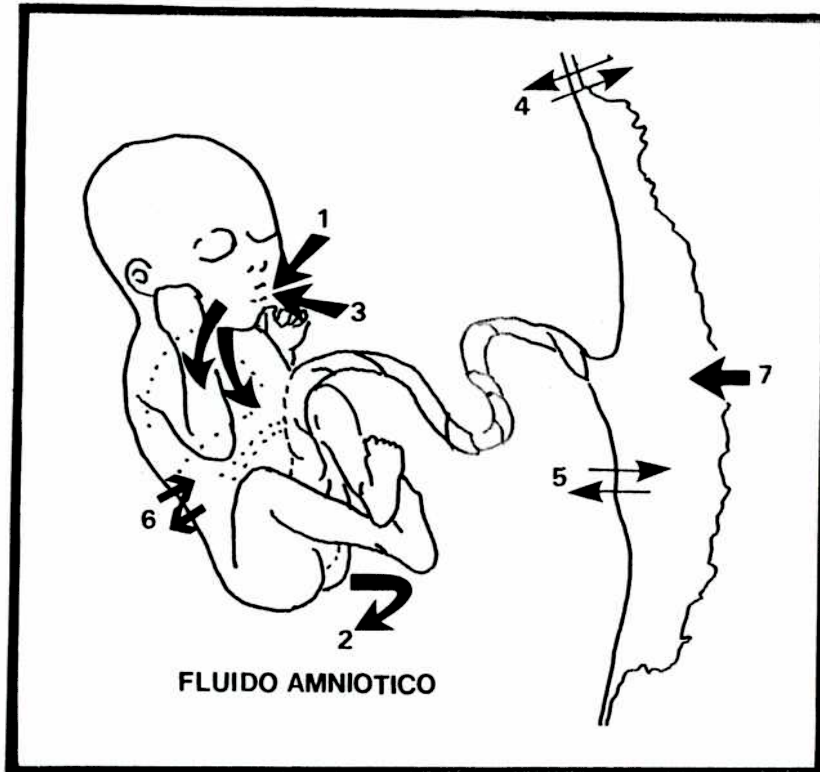


FIGURA 3: Esquema propuesto para las posibles vías de intercambio de agua y solutos entre el fluido amniótico y el plasma materno-fetal. 1) tracto respiratorio fetal; 2) orina fetal; 3) deglución fetal; 4) membranas placentarias; 5) plato coriónico; 6) piel fetal y 7) torta placentaria.

Los resultados presentados aquí muestran que la membrana amniótica puede ser el sitio posible para la disipación de los gradientes osmóticos existentes, entre las cavidades materno-fetal, siendo la fuerza directriz la presión hidrostática fisiológica (aproximadamente 20 cm de agua) y el gradiente osmótico presente (20 mOsm, lado amniótico hipotónico). El principal camino disipativo parece ser la vía paracelular, siendo además sensible a los cambios de pH de las células epiteliales amnióticas.

Estas observaciones pueden ser relevantes para comprender la regulación fisiológica y patofisiológica del volumen del fluido amniótico.

2.2 MATERIALES Y METODOS

2.2.1 El material biológico

Inmediatamente luego de partos normales a término, o de cesáreas, las membranas placentarias fueron introducidas en una solución salina (NaCl 0,9%) a 4°C. Todo el procedimiento se desarrolló en el menor tiempo posible (15 a 20 min) y una vez en el laboratorio, se procedió a la separación del epitelio amniótico del resto de las membranas placentarias, siguiendo su plano de clivaje.

2.2.2 Montaje de la preparación

El epitelio fue montado como un diafragma entre dos cámaras de lucite (tipo Ussing modificadas, figura 4); delimitándose de este modo dos compartimientos independientes: el compartimiento fetal y el materno. La superficie de intercambio entre ambos fue de 1,77 cm². Las partes de la cámara en contacto con el tejido han sido previamente untadas con grasa siliconada para evitar dañar la preparación. La fase materna del amnios reposa sobre una malla de nylon y es mantenida sobre ella por medio de una presión hidrostática aplicada sobre el lado fetal (> 5 cm de agua).

Ambos lados del amnios fueron inicialmente bañados con una solución salina standard, ligera modificación de la empleada por Schwartz y col. (1977), la cual contiene (mM): NaCl 125; CaCl₂ 1,2; NaHCO₃ 25; glucosa 5; K₂HPO₄ 2,5; KH₂PO₄ 1, (pH 7,4). El tejido fue constantemente

burbujeado con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ y la temperatura mantenida a 37°C mediante la introducción de la cámara en un baño termostatzado.

En algunos experimentos, el medio de incubación presentaba urea (6 mM) y albúmina bovina (2 g/l), pero no se observaron diferencias significativas con aquellos en los cuales estos compuestos no estaban presentes (solución salina standard)

En los experimentos en los cuales el bicarbonato fue reemplazado, se trabajó con soluciones de hidroximetilaminometano (10 mM Tris-HCl, pH 7,2) y el tejido fue burbujeado con 100% de O₂.

2.2.3 Dispositivo para la medición de los flujos netos de agua

El movimiento neto de agua (J_w) fue registrado minuto a minuto empleando la técnica de Bourguet y Jard, 1964 (figura 4). El principio del dispositivo experimental es el siguiente: El lado mucoso (fetal) está en contacto con una cámara cerrada, la cual se conecta a un detector, que posee un capilar enfrentado con un electrodo. Cuando se produce un movimiento neto de agua, a través del epitelio, el lado cerrado pierde volumen y desciende el nivel del capilar presente en el detector. Esto pone en marcha un dispositivo automático de reinyección que restablece el contacto. En este momento, el detector recibe la señal de cierre del circuito y cesa la reinyección. La cantidad inyectada (equivalente a lo que pasó por la membrana) es registrada automáticamente minuto a minuto. El método de medición descrito es muy preciso y la sensibilidad alcanza el orden de la décima de microlitro.

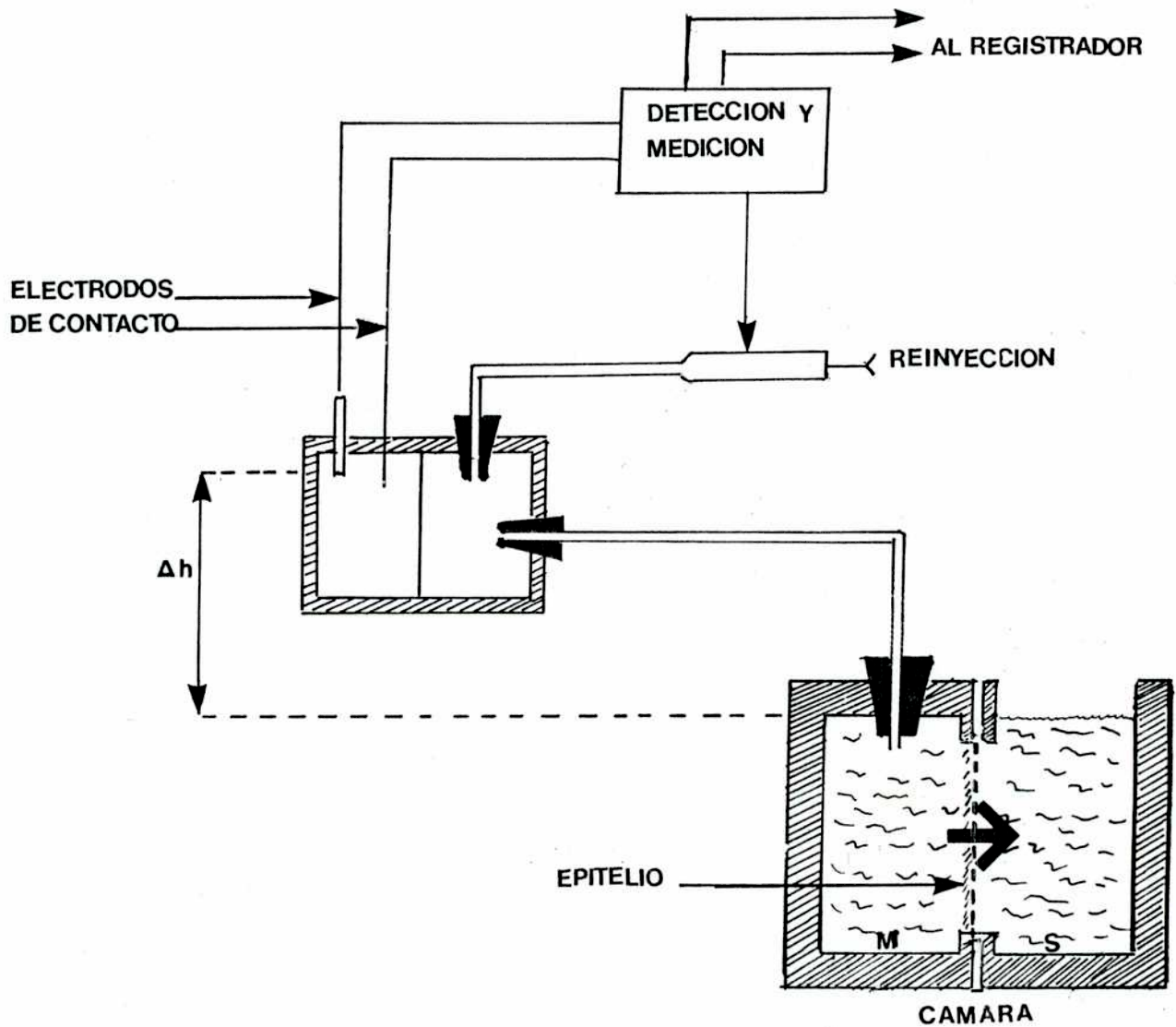


FIGURA 4: Sistema de medición del flujo neto de agua. El mismo consta de un sistema automático de detección unido a un sistema de reinyección. La preparación es colocada en cámara tipo Ussing y el movimiento neto de agua se registra minuto a minuto.

2.2.4 Estudio de la permeabilidad hidrostática

La preparación fue sometida a diferentes presiones hidrostáticas mediante la modificación de la diferencia de altura entre el detector y la cámara (Δh , figura 4). La presión fue aplicada sobre el lado fetal (fisiológico) y se registraron los flujos netos de agua (J_w) resultantes. Los mismos son descritos por la siguiente ecuación:

$$J_w = L_{phid} \times \Delta P$$

donde

J_w = flujo neto de agua ($\mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$)

L_{phid} = coeficiente de conductibilidad hidráulica ($\mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{cm}$ agua)

ΔP = diferencia de presión hidrostática aplicada (cm de agua)

Si por filtración solo se está moviendo agua, o una solución diluida, el J_w puede ser expresado en $\text{mol}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$, teniendo en cuenta el volumen parcial del agua ($V_w = 18 \text{ cm}^3/\text{mol}$). Se define entonces el coeficiente de permeabilidad hidrostática (P_{hid} , en cm/s) según la siguiente ecuación:

$$P_{hid} = L_{phid} \times R \times T / V_w$$

donde

R = constante general de los gases (0,083 l.at/mol.°K)

T = temperatura absoluta (°K)

De tal modo que P_{hid} puede ser calculado a partir de la pendiente de la línea de regresión obtenida al graficar el flujo neto de agua vs. ΔP .

2.2.5 Estudio de la permeabilidad osmótica

Los gradientes osmóticos transepiteliales fueron logrados por el agregado de distintas concentraciones de Polietilenglicol (PEG PM 4000) o sacarosa, del lado materno.

Se registraron los flujos netos de agua (J_w) en función de la diferencia de concentración aplicada (ΔOsm) los que son descriptos por la siguiente ecuación:

$$J_w = \sigma \times L_{posm} \times \Delta Osm$$

donde

σ = coeficiente de reflexión de Staverman

L_{posm} = coeficiente de conductibilidad osmótica ($\mu l/cm^2 \cdot min \cdot mOsm$)

ΔOsm = diferencia de osmolaridad (1 mOsm = 0,0224 atm)

De manera análoga a lo que se planteó en el punto 2.2.4, si el J_w es medido en $mol/cm^2 \cdot min$, el coeficiente de permeabilidad osmótica (P_{osm}) puede ser definido por la siguiente ecuación:

$$P_{osm} = \sigma \times L_{posm} \times R \times T / V_w$$

Este coeficiente está expresado en cm/seg, y se calculó a partir de la pendiente de la línea de regresión obtenida al graficar el flujo neto de agua vs. ΔOsm (figura 5).

Como las soluciones de PEG no tienen un compartimiento osmótico simple, su osmolaridad no puede ser fácilmente determinada, por ejemplo, con estudios crioscópicos. Para sobrellevar este problema se utilizó un "osmómetro biológico": la vejiga urinaria de anfibio estimulada con ADH (oxitocina 10^{-8} M) y fijada con glutaraldehído (2%). Está bien establecido que esta preparación se comporta como una membrana casi perfectamente osmótica (Parisi y col., 1985), donde el coeficiente de reflexión para la sacarosa y para el PEG son iguales a 1 (Pietras & Wright, 1975).

Se utilizaron soluciones de PEG y sacarosa con la misma concentración molar y se testearon en este sistema (experimentos pareados). El coeficiente osmótico (g) para el PEG fue obtenido a partir de la relación entre los flujos osmóticos observados cuando los gradientes fueron generados con la misma concentración (40 mM) de PEG y sacarosa: $g = J_w(PEG) / J_w(sac) = 2,6$.

2.2.6 Estudio de la permeabilidad a la Sacarosa (P_s)

Los flujos unidireccionales de sacarosa fueron medidos siguiendo la técnica previamente descrita por Parisi y col.(1979). Para llevar a cabo estas experiencias, se trabajó de manera habitual con la diferencia de que al lado fetal de la cámara (cerrado y mantenido a presión) se le agregó previamente $1 \mu C_i/ml$ de sacarosa marcada con [^{14}C]. El volumen del sector abierto de la cámara (lado materno) fue completamente removido y reemplazado por un volumen equivalente de solución salina fría, a

intervalos definidos. De cada fracción removida se tomó una alícuota para su posterior medición en un contador β de centelleo líquido. La actividad específica fue recalculada para cada período de un minuto, teniendo en cuenta la transferencia de radiactividad previa. El estado estacionario se alcanzó a los 10 minutos

En muchos experimentos se registraron en forma simultánea el J_w y la permeabilidad a la sacarosa (P_s).

2.2.7 Estudios asociados al cambio de pH del medio

En condiciones fisiológicas, o sea, manteniendo bajo presión hidrostática el lado fetal de la membrana amniótica, se estudió el efecto de disminuir el pH a valores entre 5,9 y 6,2 mediante el burbujeo con una mezcla apropiada de CO_2 y O_2 al lado seroso o mucoso de la preparación.

Se utilizaron dos tipos de buffer: Solución salina standard (con bicarbonato) y solución salina Tris (sin bicarbonato).

Los estudios fueron realizados siguiendo las técnicas descriptas anteriormente con el fin de evaluar el efecto de la acidificación tanto sobre los J_w (hidrostáticos y osmóticos) como sobre la P_s .

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Medida de las permeabilidades hidrostáticas y osmóticas en el amnios humano

La figura 5 muestra un registro de los J_w medidos minuto a minuto, bajo diferentes condiciones experimentales. Las presiones hidrostáticas (ΔP) fueron aplicadas del lado fetal y los gradientes osmóticos (ΔOsm) fueron creados del lado materno, siempre en presencia de una presión hidrostática de 13 cm de agua.

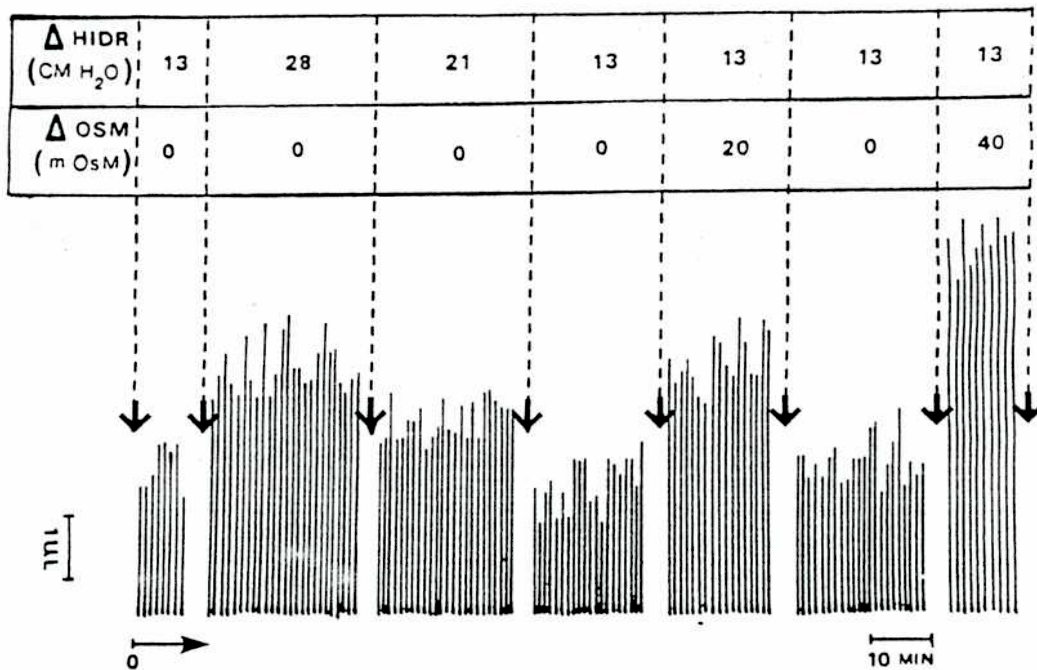


FIGURA 5: Registro minuto a minuto de los movimientos netos de agua (J_w) a través del amnios humano. Las presiones hidrostáticas ($\Delta hidr$, cm de agua) fueron aplicadas del lado fetal. Los gradientes osmóticos (ΔOsm , mOsm) fueron creados por el agregado de PEG poly(etilen-glicol) o sacarosa del lado materno, en presencia de una presión hidrostática de 13 cm de agua. La altura de cada barra es proporcional al J_w existente en un minuto. Las flechas superiores indican las distintas condiciones experimentales empleadas.

Debe destacarse que los valores de J_w no fueron diferentes cuando se utilizó la solución Hepes-Tris respecto a la que contiene bicarbonato (standard).

Cuando el J_w fue graficado en función de la presión hidrostática transepitelial aplicada (en ausencia de otro tipo de gradiente), se observó una relación lineal (figura 6) y el coeficiente de permeabilidad hidráulica (P_{hid}) se calculó a partir de la pendiente de la línea de regresión. El valor obtenido fue, en estas condiciones, $0,32 \pm 0,05$ cm/s ($n=10$).

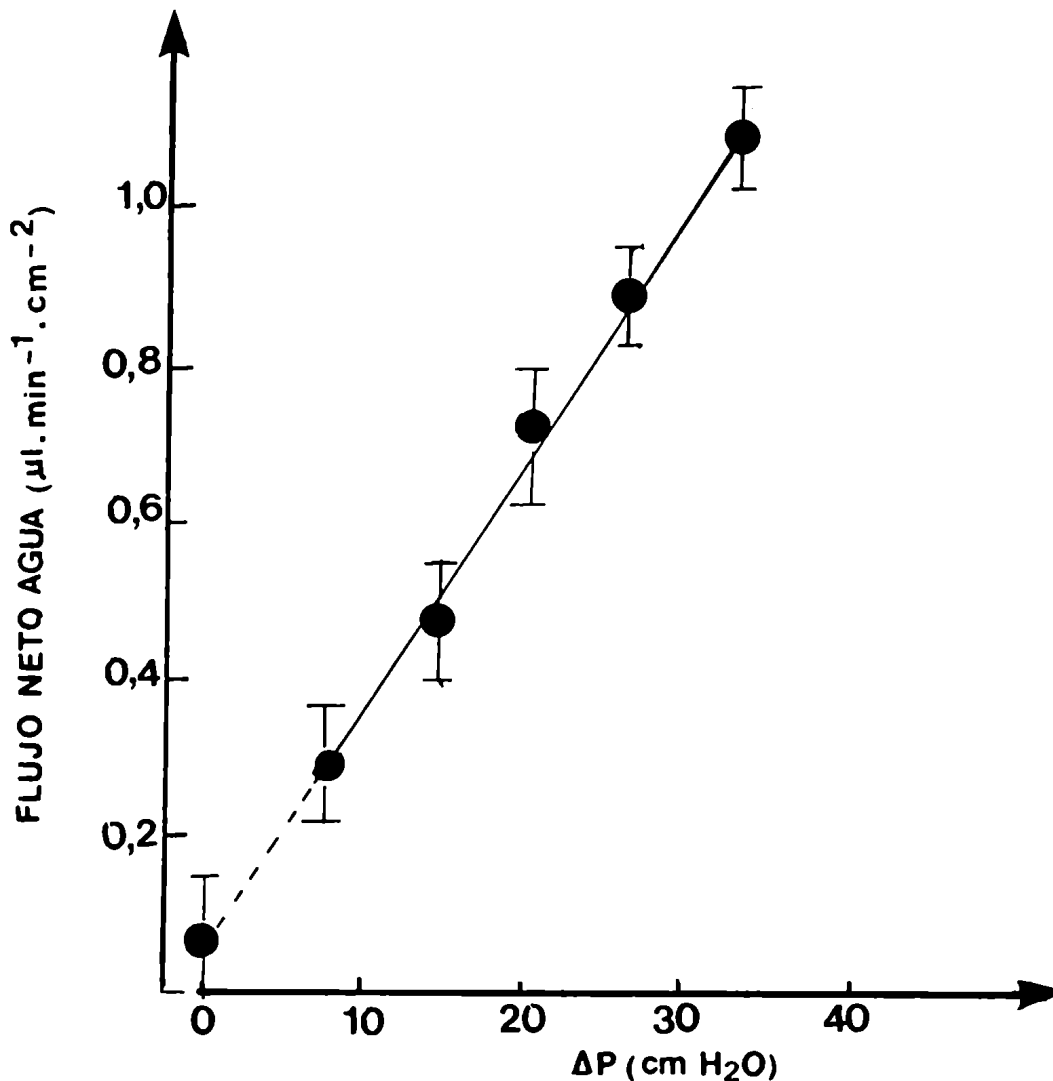


FIGURA 6: Relación entre el flujo neto de agua (J_w , $\mu\text{l}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$) y la diferencia de presión hidrostática aplicada (ΔP , cm de agua). A partir de la pendiente de la recta se obtuvo el valor de P_{hid} . Los puntos representan la media \pm SEM para un $n=10$. Nótese la ausencia de un flujo de agua asociado a transporte ($0,03 \pm 0,02 \mu\text{l}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$).

A partir de la extrapolación de la línea de regresión es posible calcular cuál es la fracción del flujo neto de agua que estaría asociado al transporte de sales (J_{wt}) (en ausencia de todo tipo de gradiente: químico, osmótico e hidrostático). El valor obtenido en este caso fue de $0,03 \pm 0,04 \mu\text{l}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$; siendo no significativamente diferente de cero, lo que indicaría la ausencia de este tipo de transporte.

Debido a que el amnios es considerado un epitelio muy abierto (very leaky) (King, 1989), los gradientes osmóticos fueron creados por el agregado de diferentes concentraciones de PEG (PM=4000), molécula impermeable ya que su coeficiente de reflexión (σ) es aproximadamente 1. Cuando el J_w se graficó en función del gradiente osmótico aplicado (lado materno hipertónico), se observó nuevamente una relación lineal (figura 7). El coeficiente de permeabilidad osmótica ($P_{\text{osm PEG}}$) fue calculado a partir de la pendiente de la línea de regresión y el valor obtenido, en estas condiciones, fue $0,015 \pm 0,002 \text{ cm/s}$, (n=10).

Cuando los gradientes osmóticos se crearon a través del amnios con concentraciones similares de PEG o sacarosa, la relación J_w (PEG) / J_w (sac) fue mayor que aquella observada en el caso de la vejiga urinaria de anfibio fijada (en promedio: 5,2 vs. 2,6, ver materiales y métodos). Esto sería lo esperado si el tejido tuviera una relativa alta permeabilidad a la sacarosa.

Para testear esta posibilidad, se midieron los flujos unidireccionales de sacarosa- ^{14}C] y la permeabilidad observada (P_s) fue de: $(6,3 \pm 1,2) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ (n=4). Este valor es 100 veces más alto que aquel informado para la vejiga urinaria de anfibio (Pietras y col., 1975).

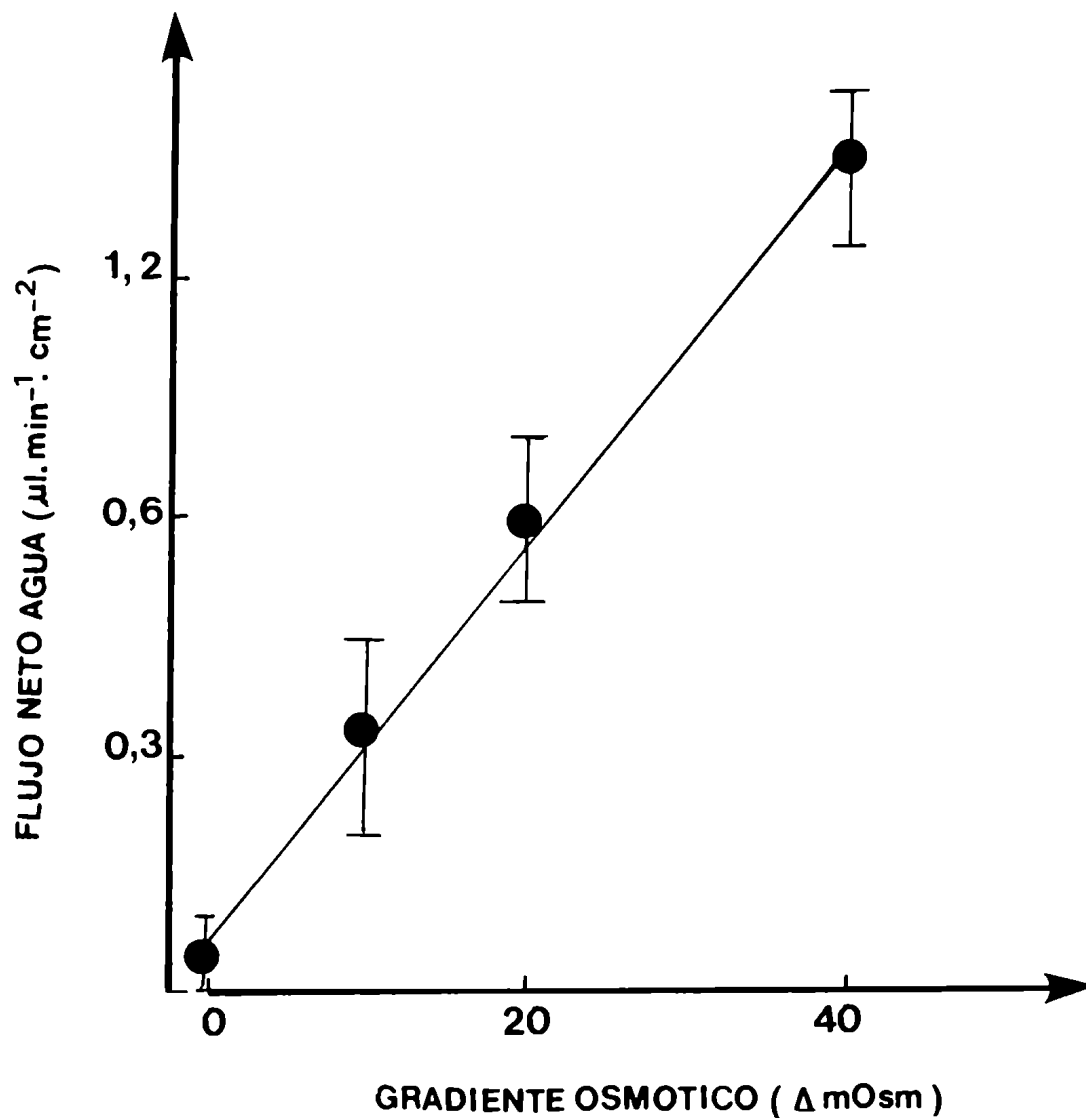


FIGURA 7: Relación entre el flujo neto de agua (J_w , $\mu l/cm^2 \cdot min$) y el gradiente osmótico aplicado ($\Delta mOsm$) del lado materno. Los mismos fueron creados con PEG^w (20 mM). A partir de la pendiente de la línea de regresión se obtuvo el valor del P_{osm} (cm/s). Los puntos representan la media \pm SEM de 10 experimentos.

2.3.2 Efectos de la acidificación del medio

Como se señaló en materiales y métodos, un gradiente hidrostático fue siempre aplicado en nuestras condiciones experimentales. La tabla I muestra que la acidificación del medio, en presencia de bicarbonato, reduce significativamente el J_w observado ya sea en presencia de un gradiente hidrostático (13 cm de agua) o bien de un gradiente osmótico más uno hidrostático (20 mM de PEG + 13 cm de agua).

GRADIENTE	n	FLUJO NETO DE AGUA ($\mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$)		
		CONTROL	BAJO pH	DIFERENCIA
Osmótico + hidrostático	10	2,73±0,12	2,10±0,10	0,63±0,17*
Hidrostático	8	1,72±0,14	1,37±0,04	0,35±0,14*

TABLA I: Efectos de la acidificación del medio sobre las permeabilidades osmóticas e hidrostáticas: Flujos netos de agua ($\mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$) en condiciones controles (pH 7,4) y en condiciones experimentales (bajo pH = 6,5), en presencia de bicarbonato. Los valores controles son la media de los flujos al estado estacionario medidos antes y después de la acidificación del medio. Los flujos a bajo pH son aquellos tomados 5 minutos luego del cambio de pH del medio. Gradiente hidrostático: 13 cm de agua. Gradiente osmótico: 20 mOsm. * $p < 0,05$ Test de Student para datos pareados.

La reducción observada fue proporcional al J_w control, independientemente de la presencia o no de un gradiente osmótico. El estado estacionario se alcanzó dentro de los 3 a 4 minutos y el efecto fue totalmente reversible (figura 8).

No se observaron diferencias significativas cuando se testearon los efectos de acidificación ya sea en el lado materno o fetal. La vuelta al pH control se obtuvo mediante el lavado con solución salina standard durante varias veces.

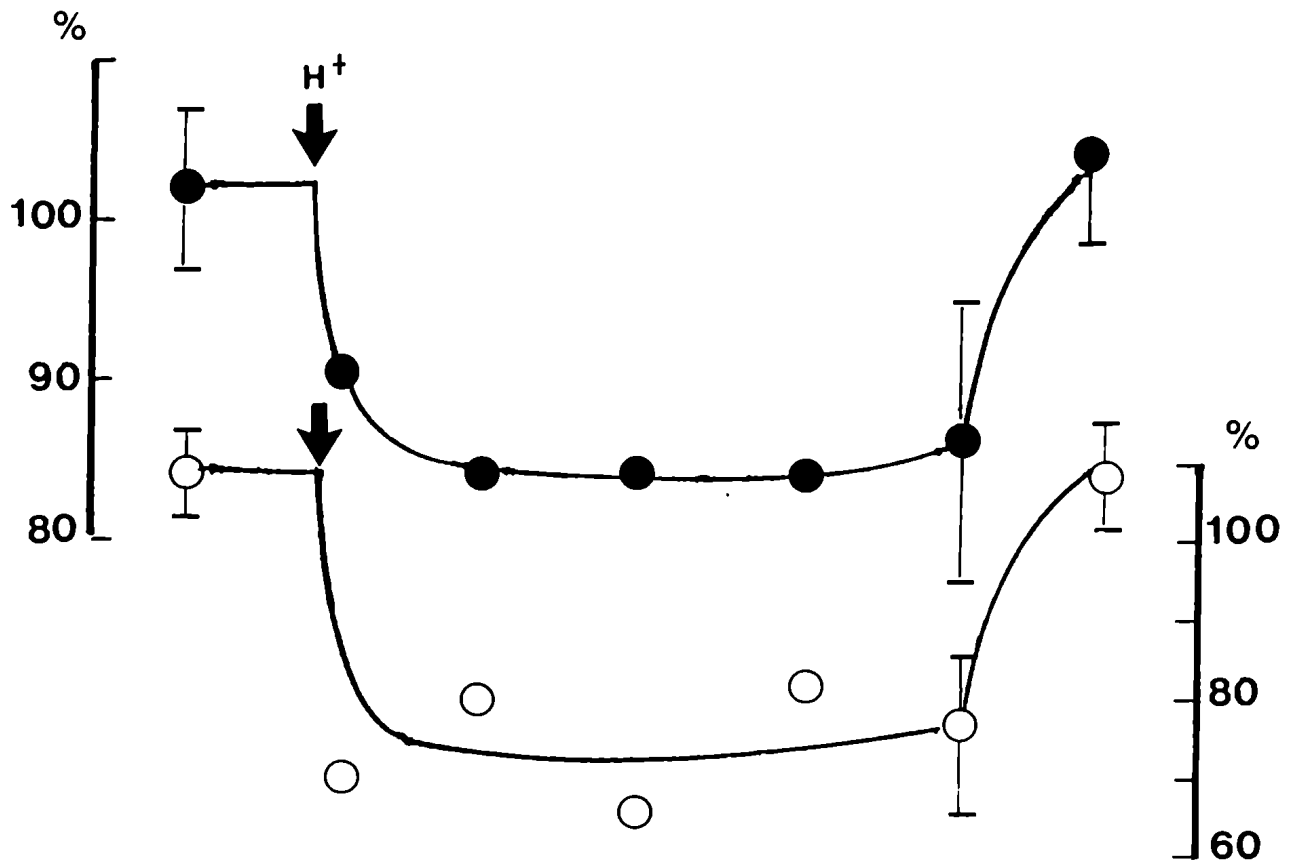


FIGURA 8: Efectos de la acidificación del medio sobre los flujos de agua. Los mismos fueron observados en presencia de gradientes hidrostáticos (círculos blancos) y osmóticos (círculos negros). Los valores fueron calculados como porcentaje de los controles. Los datos son la media de 4 experimentos en los cuales se poolearon los datos de 5 mediciones consecutivas.

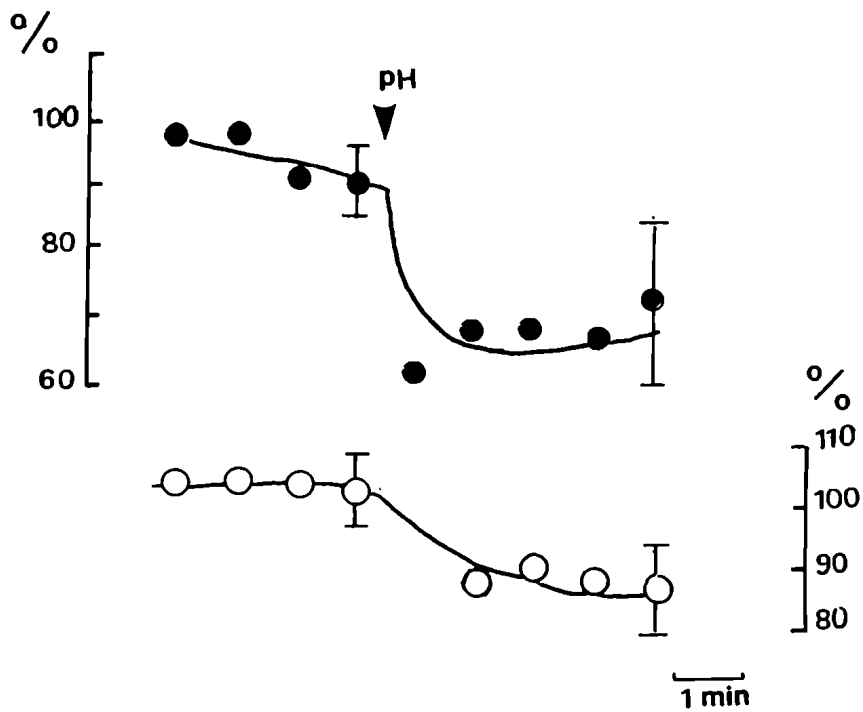
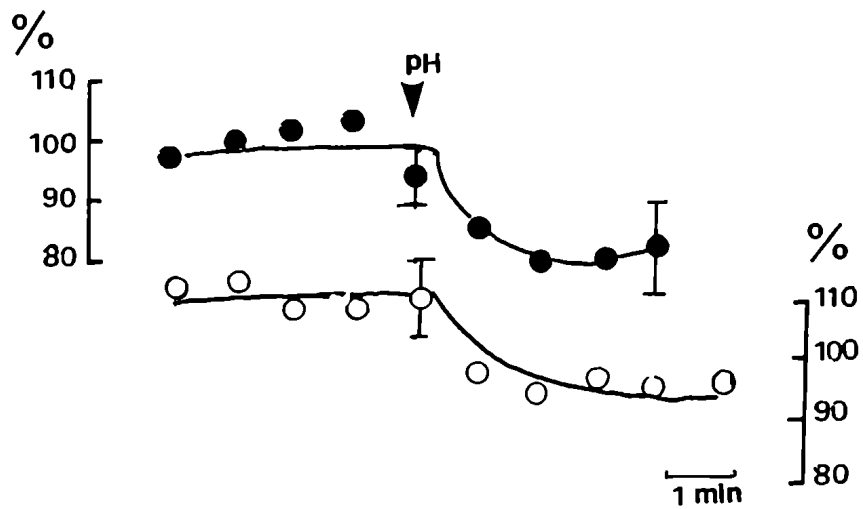
Es generalmente aceptado que la sacarosa no se mueve transcelularmente y que la presión hidrostática puede solamente mover agua paracelularmente (Fischbarg y col., 1987). Para probar los efectos comparativos del bajo pH sobre las vías paracelular y transcelular, se determinaron simultáneamente y minuto a minuto, el J_w y la sacarosa- ^{14}C , en presencia de un gradiente hidrostático u osmótico (figura 8 y tabla II).

GRADIENTE	n	ΔJ_w	ΔP_s
Hidrostático	4	15,8±5,9 (p<0,05)	12,2±2,3 (p<0,02)
Osmótico + hidrostático	4	18,2±8,2 (p<0,05)	16,6±5,6 (p<0,05)

TABLA II: Efectos del cambio de gradiente sobre las vías paracelular y transcelular: Porcentaje de variación del flujo neto de agua (ΔJ_w) y de los flujos unidireccionales de sacarosa (ΔP_s) inducidos por la acidificación del medio (pH 6,5) en presencia de bicarbonato. Gradiente hidrostático: 13 cm; gradiente osmótico: 20 mOsm.

Puede observarse que, en ambos casos, el porcentaje de reducción en el J_w y en la P_s inducidos por la acidificación del medio fueron similares.

Cuando el bicarbonato fue reemplazado por Tris, los efectos del pH no fueron significativos (J_w hidrostático luego de variación del pH: $93 \pm 8\%$ del valor control, $p > 0,5$, $n=5$; J_w osmótico luego de variación del pH: $95 \pm 3\%$ del control $p > 0,1$, $n=5$).



2.4 DISCUSION

Existen tres posibles vías para explicar el movimiento neto de agua observado en el amnios humano: 1) la transcelular; 2) la paracelular; 3) la eventual existencia de un daño celular o cualquier artificio debido a la manipulación de la preparación y el montaje (leaky).

Si aceptamos que ni el PEG ni la sacarosa entran a la célula ($\sigma=1$ para la vía transcelular) y que, por definición, el camino leaky no impide el paso de estas moléculas ($\sigma=0$ para la vía leaky); surge, de los resultados presentados aquí, que la permeabilidad para la sacarosa es significativamente diferente de cero en la vía paracelular. El coeficiente de reflexión experimental para esta molécula puede entonces ser calculado a partir de la siguiente relación:

$$\sigma_{\text{sac}} = \frac{(J_{(\text{sac})\text{amnios}}/J_{(\text{PEG})\text{amnios}})}{(J_{\text{w}(\text{sac})\text{vejiga}}/J_{\text{w}(\text{PEG})\text{vejiga}})} = \frac{0.38}{0.77} = 0.5$$

La magnitud relativa del J_w , a través de las tres vías previamente mencionadas, no deriva directamente de esta relación. No obstante, la manipulación del pH del medio, junto con los flujos unidireccionales de sacarosa- ^{14}C , fueron una herramienta importante para clarificar este punto crucial.

Si nosotros aceptamos que, por definición, la vía leaky es insensible al pH del medio, es obvio que las vías paracelular y/o transcelular son sensibles a la acidificación. La importancia de la vía leaky puede ser inicialmente estimada a partir de la fracción del flujo hidrostático insensible al pH, que fue variable de amnios en amnios y fue menor en membranas obtenidas de cesáreas (no obstante esta

variación fue menor que la obtenida en informes previos de Page y col., 1974). Nuestras aproximaciones, centradas en el análisis de la fracción sensible al pH, nos permitieron sobrellevar estos problemas experimentales.

Como se señaló previamente, es generalmente aceptado que la sacarosa no se mueve transcelularmente y que la presión hidrostática puede mover agua solo paracelularmente (Fischbarg y col., 1987). Nuestros resultados muestran reducciones proporcionales en el J_w y en la P_s medidas en presencia de gradientes hidrostáticos u osmóticos más hidrostáticos. Esto sugiere claramente que, el flujo de sacarosa (dirigido por arrastre de agua) y los efectos de pH tanto en los flujos hidrostáticos como osmóticos, están reflejando una modificación de la ruta paracelular. Apoyan esta hipótesis los datos presentados en la tabla III. De la misma surge que la relación entre el J_w calculado a partir de los flujos de sacarosa- $[^{14}\text{C}]$ (conducidos por arrastre isosmótico de agua) y el J_w medido en forma simultánea, fue $0,30 \pm 0,03$. Cuando se realiza una comparación similar con los flujos inducidos por la acidificación del medio, el resultado fue: $0,30 \pm 0,09$. Esto no está lejos del valor esperado ($\sigma_{\text{sac}} = 0,5$) si el agua y la sacarosa se mueven por la misma vía, sugiriendo que hay solamente una vía importante para el J_w sensible al pH y más probablemente localizada en la ruta paracelular. Aún más, cuando el porcentaje de variación en el J_w osmótico inducido por una reducción del pH del medio ($16,3 \pm 2,5\%$, $n=4$) se lo comparó con el porcentaje de variación en el J_w calculado a partir de los flujos de sacarosa- $[^{14}\text{C}]$ ($16,7 \pm 2,7\%$, $n=4$), no se observaron diferencias significativas ($p > 0,1$, $n=4$, tabla III).

	J _w osmótico (μl/min.cm ²)		
	Observado (1)	Calculado (2)	2/1
J _w pH 7,4	2,81±0,19	0,84±0,05	0,30±0,03
J _w pH 6,5	0,46±0,07	0,14±0,02	0,30±0,09
	(16,3±2,5)%	(16,7±2,7)%	

TABLA III: Efectos del pH sobre las mediciones teóricas y observadas del movimiento de agua transepitelial. El J_w observado fue registrado en presencia de un gradiente osmótico generado con PEG 20 mM (lado materno hipertónico). El J_w calculado fue obtenido a partir de los flujos unidireccionales de Sacarosa marcada, asumiendo una transferencia isosmótica. La segunda línea muestra la reducción en el J_w (observado y calculado) cuando el pH del medio fue llevado de 7,4 a 6,5 en presencia de bicarbonato (n=4).

Todas estas evidencias indican que entre las tres vías posibles a nivel transepitelial, la vía paracelular es la más importante para los movimientos hidrostáticos y osmóticos en el amnios humano, como fue previamente sugerido por estudios morfológicos (Hoang-Ngoc y col., 1981). Si aceptamos que la principal vía para el pasaje de agua es la paracelular, se debería concluir que esta ruta debe ser sensible a los cambios de pH solamente en presencia de bicarbonato. Una buena hipótesis sería proponer que la permeabilidad paracelular, es regulada por el pH intracelular, siendo la acidificación del medio efectiva solo en presencia de un buffer permeable, como se reportó previamente para la vejiga urinaria de anfibios (Parisi & Bourguet, 1984).

Los valores del P_{hidr} y P_{osm} indicarían que la presión hidrostática fue 20 veces más efectiva que el gradiente osmótico para mover agua a través del amnios. La razón de estas diferencias aún no está aclarada. No obstante, puede explicarse, al menos parcialmente, debido a que los valores de P_{osm}

están subestimados. Estas mediciones fueron hechas en condiciones de estado estacionario y fueron probablemente afectadas por los fenómenos derivados de la presencia de las capas no-mezcladas: "sweeping away" y "polarización del soluto" (Diamond, 1979) (ver página 14).

A pesar de ello nuestro análisis previo no se ve modificado, ya que el flujo osmótico total, así como la fracción sensible a pH, serían proporcionalmente reducidas, mientras que la variación relativa no se ve alterada.

Por último, podemos realizar una comparación entre los valores obtenidos para el flujo neto de agua y aquellos que ocurren en condiciones fisiológicas normales. Si asumimos que el saco amniótico presenta una forma esférica (aproximadamente 10 cm de radio) y usando los datos obtenidos para el $J_w \text{ osm}$ y el $J_w \text{ hidr.}$, uno puede fácilmente estimar el flujo neto de agua generado bajo gradientes osmóticos e hidrostáticos en condiciones fisiológicas en 24 hs.

El valor obtenido (900 ml) es compatible con aquel necesario para permitir la homeostasis osmótica, considerando especialmente que las barreras en serie (corion, decidua, etc.) reducen las fuerzas disipativas "in vivo". Podemos entonces concluir que el amnios sería el sitio donde ocurre la homeostasis osmótica. Trabajos previos (Page y col., 1974; Garby, 1957) no fueron concluyentes, probablemente debido a la metodología empleada para las mediciones del flujo de agua.

CAPITULO III

COEXISTENCIA DE MECANISMOS ACTIVOS Y PASIVOS DE TRANSFERENCIA SIMULTANEA. MODELO EXPERIMENTAL: EL YEYUNO DE RATA.

3.1 INTRODUCCION:

El tracto intestinal constituye el sitio donde se completa la digestión de los alimentos y se realiza la absorción de los productos finales que pasarán a la circulación, para ser posteriormente distribuidos en las células.

Las funciones mencionadas son posibles gracias a la complejidad estructural del intestino, que está conformado por numerosos tipos de tejidos y células, caracterizados por su heterogeneidad morfológica y funcional.

3.1.1 Consideraciones anatómicas

Una de las características morfológicas de mayor importancia para la absorción intestinal, es la gran superficie luminal del intestino delgado. La misma se debe, en parte, a la presencia de los pliegues

de Kerckring que aumentan aproximadamente tres veces el área luminal con respecto al área serosa. A ello debe agregarse la presencia de vellosidades luminales responsables de un aumento de casi 30 veces de la superficie de absorción. Los estudios ultraestructurales (Desmet, 1977) han revelado la existencia de proyecciones muy finas en la superficie luminal de las células epiteliales de la mucosa. Estas formaciones son las denominadas microvellosidades, las cuales aumentan el área absorptiva de la mucosa aproximadamente seiscientos veces respecto de la correspondería a un cilindro liso (figura 10).

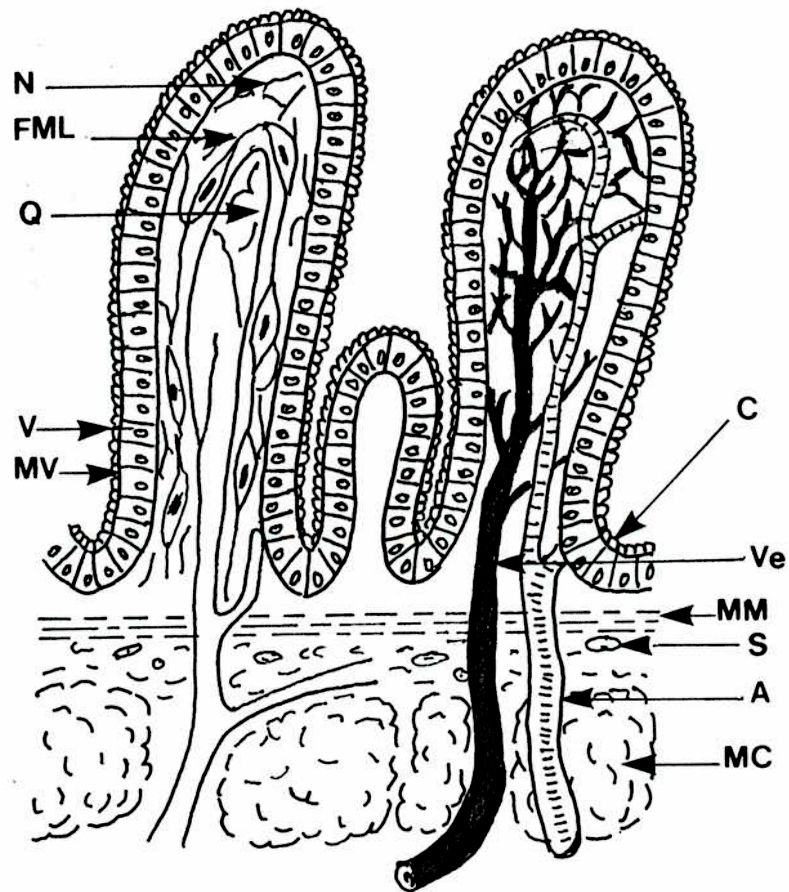


FIGURA 10: Representación esquemática de la mucosa intestinal de intestino delgado de rata. V, vellosidad; MV, microvellosidades; C, cripta; N, filetes nerviosos; FML, fibrillas musculares lisas; Q, quelífero; Ve, vena; MM, muscularis mucosae; S, submucosa; A, arteria; MC, músculo liso circular. (Adaptada de Ruch, T.C. y Patton, H.D. *Physiology and Biophys*, (1973) p. 67).

La mucosa intestinal está compuesta por una sola capa de células epiteliales cilíndricas. Estas células se forman en las criptas, invaginaciones dispuestas entre las vellosidades, para luego migrar hacia el extremo de las mismas y en pocos días descamar en la luz intestinal.

Las células epiteliales están separadas entre si por los espacios intercelulares. No obstante, las células vecinas se unen, a nivel del extremo apical, constituyendo las llamadas uniones estrechas, de tal modo que la absorción intestinal puede llevarse a cabo transcelularmente o bien paracelularmente.

Otra característica anatómica de gran importancia es la existencia de un sistema eficiente para el drenaje del material absorbido por las células intestinales. En tal sentido cada vellosidad intestinal contiene una red capilar que acarrea el material absorbido a la circulación portal, además de un quelífero central que recoge parte de este material, el cual es transportado por la circulación linfática al circuito venoso. Esto está favorecido por la presencia de fibrillas musculares y por la muscularis mucosae subyacente (figura 10).

3.1.2 Transferencia de agua en el yeyuno de rata

El intestino delgado de rata reabsorbe y secreta cantidades sustanciales de agua (Ewe y col., 1988). Estos movimientos se deben a una compleja interacción entre flujos de volúmenes, pasivos, dependientes de la presencia de gradientes hidrostáticos, osmóticos y de aquellos, activos, asociados al transporte de sales (Decker y col., 1981; Naftalin y col., 1985). Esta última fracción constituye solo una fracción del movimiento de agua total existente. La importancia relativa de las vías paracelular y transcelular, en el movimiento de agua, ha sido ampliamente discutida (Pappenheimer y col., 1987;

Fischbarg y col., 1985) así como la existencia o no, de canales específicos para el transporte de agua en el borde mucoso (Van Heeswijk y col., 1986).

En el capítulo anterior mostramos que la acidificación del medio modifica la transferencia de agua en el amnios humano. Este efecto también fue hallado en otros epitelios (Parisi & Bourguet, 1984; Parisi y col., 1986). La variación puede deberse al bloqueo específico de canales para agua (vejiga urinaria de anfibio) o bien, a la modificación de la permeabilidad al agua en la vía paracelular (amnios humano).

Nosotros presentamos aquí, evidencias experimentales que demuestran que la acidificación del medio también modifica, en presencia de bicarbonato, la permeabilidad al agua del yeyuno de rata "in vitro". Los resultados obtenidos parecen indicar que ambas rutas, paracelular y transcelular, están involucradas en los movimientos de agua transepiteliales en estos tejidos.

3.1.3 Transferencia de solutos en el yeyuno de rata

Existen distintos mecanismos por los cuales ocurre la absorción de Na^+ en las vellosidades del intestino delgado. Uno de ellos, y quizás el de mayor importancia, es el transporte electroneutro de sodio y cloruro. Estudios realizados en vesículas de ribete en cepillo intestinal, indican la existencia de un doble intercambio, con igualdad estequiométrica, de Na^+/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Liedke y Hopfer, 1982, I y II). Otro mecanismo importante de absorción de sodio en el intestino delgado, está relacionado con el transporte de azúcares y aminoácidos, a través de los transportadores de $\text{Na}^+/\text{glucosa}$ y $\text{Na}^+/\text{aminoácidos}$ (Gray, 1975; Crane, 1975; Cook, 1980).

La fuerza impulsora para que ocurran estos procesos es, la existencia de un gradiente electroquímico para el sodio entre el exterior y el interior celular. El mismo es mantenido por la presencia de las bombas Na^+/K^+ -ATPasa presentes en la membrana basolateral.

El aumento de la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos y /o Ca^{++} , inhibe la entrada de ClNa e "in vivo", aumenta la secreción de Cl^- y HCO_3^- (Guerrant, 1983; De Jonge, 1984). Los nucleótidos cíclicos pueden ser activados por proteín-quinasas específicas del tipo A o G. Pueden también liberar Ca^{++} de los depósitos intracelulares y modificar los mecanismos de transporte por medio del mismo Ca^{++} o de kinasas activadas por calmodulina.

El intestino delgado de la mayoría de los mamíferos también posee mecanismos secretorios (Field, 1981), los cuales funcionan normalmente en niveles basales muy bajos. Un ejemplo de ellos es la secreción de Cl^- que se realiza en las células de las criptas intestinales a través de canales específicos (Fondacaro, 1986).

3.1.4 Estudios de "adaptación" sobre los procesos de transporte

El término "adaptación" es ahora considerado como un prototipo para el estudio de las influencias externas sobre los procesos de transporte de membrana.

Los estudios sobre la "adaptación al potasio" han revelado una relación entre estructura y función celular que aumentaron nuestros conocimientos sobre como los mamíferos se adaptan a cambios en su dieta como también a aquellos que ocurren en el medio que los rodea. Estos estudios han descrito

también la influencia de una regulación hormonal (mineralocorticoides) sobre la función epitelial (Hayslett y col., 1980).

Contrariamente a lo que ocurre en el colon, el yeyuno absorbe potasio en el estado basal. La adaptación a una dieta rica en potasio no modifica el transporte de dicho ion en estos tejidos y además, no fueron detectados cambios en la diferencia de potencial transepitelial ni en la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasa como aquellos descritos para el intestino grueso (Hayslett & Binder, 1982). En animales adaptados a una dieta deficiente en Na^+ , donde se induce también el hiperaldosteronismo, se describió el desarrollo de una absorción de sal y fluido sensible al amiloride en intestino delgado de rata (Wright y col., 1971).

Nosotros estudiamos los efectos de una dieta rica en potasio sobre una función fundamental del intestino delgado (yeyuno) de rata: la transferencia transepitelial de glucosa. Los resultados muestran que existe un aumento en el transporte de la D-glucosa en las ratas sometidas a una dieta rica en K^+ y que este efecto es sensible a la acción del amiloride (10^{-5} M).

3.2 MATERIALES Y METODOS

3.2.1 El material empleado

Se utilizaron ratas Wistar macho cuyos pesos oscilaron entre 250-300 g. Las mismas, previamente a las experiencias, fueron mantenidas en bioterio a temperatura adecuada y con acceso a una dieta

standard "ad libitum".

En aquellos experimentos donde se testeó el efecto de una dieta rica en potasio (HKD), los animales fueron colocados en jaulas individuales y separados en dos grupos de acuerdo al tipo de dieta: GRUPO 1) animales controles, dieta standard que contiene, por análisis, 0,2 mg de potasio por gramo de alimento (promedio diario de ingesta de potasio 4 mEq); GRUPO 2) animales experimentales, dieta standard con el agregado de KCl hasta una concentración final de 1,72 mEq/gr (promedio diario de ingesta de potasio 39 mEq). El agua fue provista en forma continua a ambos grupos durante los siete días de adaptación.

3.2.2 Metodología de trabajo

Los animales fueron sacrificados con un golpe en la cabeza; se realizó luego una incisión en la pared abdominal para acceder a la remoción de la segunda porción del intestino delgado: el yeyuno. Se lavó luego el tejido con solución salina (NaCl 0,9%) para eliminar de este modo todo tipo de deshecho. El yeyuno fue abierto por su borde mesentérico y lavado con una solución salina standard (rata) que contiene (mM): NaCl 116; NaHCO₃ 25; MgCl₂ 1,2; CaCl₂ 1,2; K₂HPO₄ 2,4; KH₂PO₄ 0,4 y glucosa 25 (pH 7,4).

Cuando el sodio fue eliminado del medio, se empleó una solución salina cero sodio (ONa), la cual contiene (mM): Cloruro de colina 130; CaCl₂ 2,5; MgCl₂ 2,2; K₂HPO₄ 1,1; KH₂PO₄ 0,2; NaHCO₃ 2,5 y glucosa 25 (pH 7,6).

En algunos experimentos el Tris-Hepes reemplazó al bicarbonato, utilizándose, en este caso, una

solución salina Hepes-Tris que contiene (mM): NaCl 116; Tris 2,5; Hepes 12,5; MgCl₂ 1,2; CaCl₂ 1,2; K₂HPO₄ 2,4; KH₂PO₄ 0,4 y glucosa 25 (pH 7,4). En otros la solución Tris-citrato (20 mM, pH 5) se empleó en el baño mucoso.

Todas las soluciones fueron mantenidas a 37°C y burbujeadas constantemente con una mezcla de 95% O₂ - 5% CO₂ (solución salina standard rata), o 100% O₂ (solución salina Tris-Hepes).

En los experimentos realizados en presencia de gradientes osmóticos, las soluciones hipertónicas fueron creadas por el agregado de PEG (polietilenglicol) PM = 4000 (ver Materiales y Métodos 2.2).

Dos fragmentos consecutivos (5 cm cada uno) se montaron como un diafragma entre dos cámaras de lucite como se describió anteriormente (Superficie de intercambio 1,2 cm²).

3.2.3 Medición de los flujos netos y unidireccionales de agua y manitol

La metodología utilizada para la medición de los flujos netos de agua (J_w) fue idéntica a la descrita en el Capítulo II.

Para determinar las permeabilidades difusionales al manitol (P_s) y al agua (P_w), se midieron los flujos transepiteliales con Manitol-[¹⁴C] y ³H₂O a intervalos de 5 minutos. Las trazas radiactivas fueron agregadas del lado mucoso del yeyuno y el volumen del lado seroso se removió completamente y se contó en un contador β de radiactividad.

3.2.4 Medición de parámetros eléctricos

Los parámetros eléctricos medidos fueron: la diferencia de potencial (dP), la corriente de corto-circuito (CCC) y la resistencia (R) transepitelial.

Las diferencias de potencial transepitelial fueron medidas rutinariamente como fue previamente descrito por Escobar y col. (1990). Se utilizaron puentes de agar conectados a hemiceldas de calomel y ubicados adyacentes a la preparación. La composición de los puentes fue similar a la solución que baña al tejido (3% p/p)

La corriente de corto-circuito (CCC) fue medida utilizando un segundo par de electrodos de Ag-Ag₂Cl colocados en forma adyacente a la preparación, los cuales se unieron a una fuente de corriente continua. La corriente inyectada es proporcional al flujo de iones existente en la preparación (Ussing and Zerhan, 1957).

La resistencia del tejido se calculó a partir de los parámetros antes enunciados aplicando la ley de Ohm.

3.2.5 Medición de las transferencias de D-glucosa, L-glucosa y Na²² en tejido entero

La figura 11 muestra el dispositivo utilizado para las mediciones de los flujos unidireccionales en el intestino delgado de rata. Este sistema de vidrio sirvió como soporte, de tal manera que uno de los extremos del tejido fue cerrado con una ligadura y el otro quedaba abierto para permitir de este modo tener acceso a la luz intestinal.

Los sacos de yeyuno fueron llenados con 250 μ l de solución salina standard (rata), con trazas radiactivas, e incubados en tubos de ensayo que contenían la misma solución. Las preparaciones se mantuvieron a 37°C y se tomaron muestras del lado seroso cada 5 min. El burbujeo se realizó con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂.

Los sacos de yeyuno fueron transferidos cada 5 minutos a un nuevo tubo de vidrio que contenía la solución salina fría (sin trazas de radiactivo). Las actividades acumuladas en el baño seroso se determinaron por centelleo líquido para el [³H] y [¹⁴C] y por centelleo sólido para el caso de [²²Na], con las correcciones adecuadas por reinyección y quenching.

Para la medición de los flujos unidireccionales con moléculas radiactivas se utilizaron: D-glucosa[³H] y L-glucosa[¹⁴C] o D-glucosa[³H] y sacarosa[¹⁴C], las cuales se agregaron a la solución mucosa en una concentración final de 1 μ Ci/ml, al comenzar el experimento.

En otras series experimentales se midieron simultáneamente flujos unidireccionales de D-glucosa[³H] y [²²Na].

Debido a que la superficie real de la membrana no es fácil de estimar en el yeyuno, por la presencia de vellosidades y microvellosidades, las permeabilidades de la D-glucosa, L-glucosa, sacarosa y Na fueron expresadas por el coeficiente de transferencia K, que representa la fracción de las moléculas radiactivas totales, presentes en el baño mucoso, que se transfieren por minuto en cada fragmento de yeyuno. La actividad específica dentro de cada saco fue recalculada luego de cada período de 5 minutos, teniendo en cuenta la transferencia previa de radiactividad.

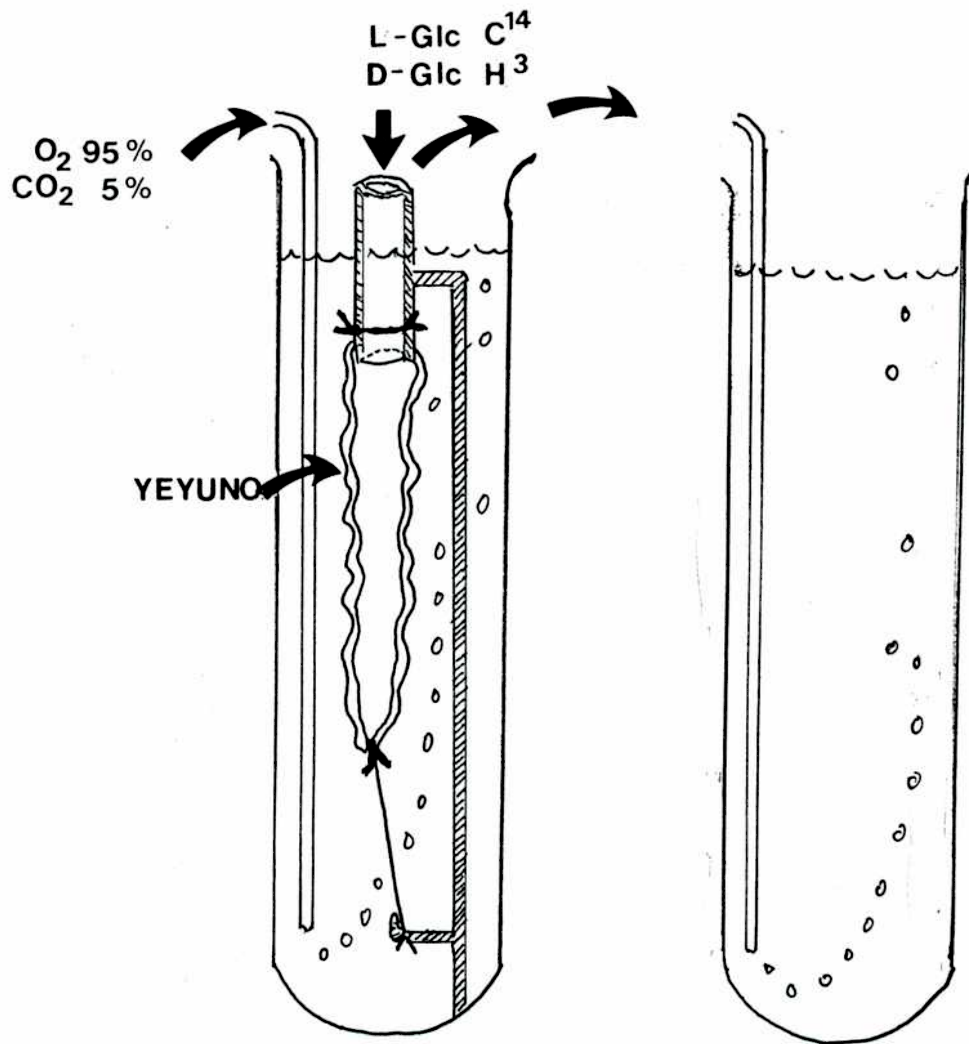


FIGURA 11: Esquema del dispositivo utilizado para la medición de los flujos unidireccionales en tejido entero.

3.2.6 Preparación de vesículas de membrana apical de yeyuno de rata

Las vesículas del ribete en cepillo fueron preparadas a partir de los enterocitos de rata, según la

técnica descrita por Kessler y col. (1978).

Tras el sacrificio del animal con un golpe en la cabeza, el yeyuno fue removido y lavado con solución salina (NaCl 0,9 %; Azida sódica (NaN_3) 0,01 %) y mantenido a 4°C. A continuación el tubo intestinal fue evertido con la ayuda de una varilla de 2,5 mm de diámetro. Se procedió luego, a la extracción de las células mucosas (scrapping), y se las colocó en una solución de homogenización (Manitol 50 mM; EGTA 5 mM; TRIS/HCl 2 mM; Azida sódica (NaN_3) 0,01 %; fenil-metilsulfonil-fluoride (PMSF) 0,1 mM en etanol; pH 7,1). Se homogeneizaron durante dos minutos a máxima velocidad (Waring Blendor) y, el homogenato celular fue incubado durante 20 minutos en presencia de MgCl_2 (10 mM) a 4°C. Esta etapa permite la agregación de las membranas de origen no apical (Kessler y col., 1978). Posteriormente se centrifugó el homogenato a 3000 x g durante 15 minutos, lo cual permitió eliminar los agregados de membrana y desechos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 27.000 x g durante 40 minutos. El precipitado fue resuspendido en un volumen definido de buffer experimental (Manitol 50 mM; TRIS/HEPES 10 mM; Azida sódica (NaN_3) 0,01 %; pH 7,5) y homogeneizado en un potter de teflón. Se centrifugó luego, a 800 g durante 15 minutos. Finalmente, se centrifugó el sobrenadante a 27.000 g durante 45 minutos.

El precipitado, que contiene a las vesículas, se resuspendió en 0,5 - 1,2 ml de solución de incubación (Manitol 50 mM; TRIS/HEPES 10 mM; glucosa 0,1 mM; glucosa ^3H 10 $\mu\text{Ci/ml}$; valinomicina 5 $\mu\text{g/ml}$; ClNa o ClK 100 mM). La concentración proteica utilizada fue de 20 ± 5 mg/ml. Las vesículas obtenidas en este tipo de preparación se cierran en el 97% de los casos. Además, el 89% de las vesículas conservan su orientación fisiológica, es decir, la fase apical de la membrana mira hacia el exterior de la vesícula (Vénien y col., 1988).

3.2.7 Mediciones de transporte

Para realizar las mediciones de transporte de glucosa se prepararon dos series de tubos Kahn con 180 μ l de la "solución de incubación". A tiempo "cero" se agrega a cada tubo, 20 μ l de la solución vesicular, previamente tratadas con valinomicina (1,5 μ M).

Transcurrido el tiempo de incubación, la suspensión de vesículas es colocada sobre un filtro Milipore conectado a una bomba de vacío, sobre los cuales son retenidas (Hopfer, 1973). La captación es detenida por el agregado de una solución de frenado (Manitol 50 mM; TRIS/HEPES 10 mM; NaCl o KCl 100 mM) a 4°C. El filtro es rápidamente removido e introducido en un frasco de contaje con líquido de centelleo. Cada tiempo de incubación se realiza por triplicado.

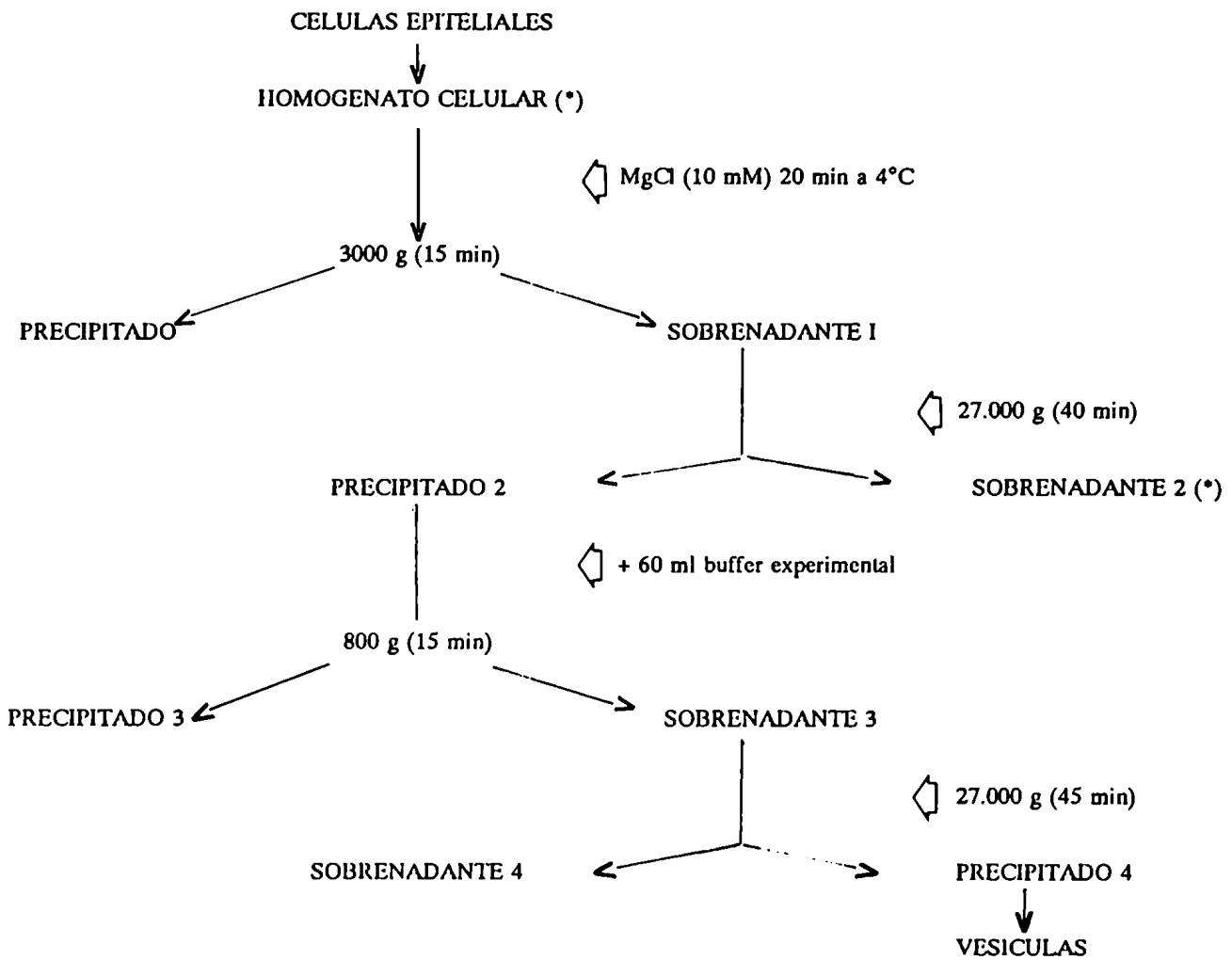


FIGURA 12: Resumen esquemático de la técnica de preparación de vesículas de ribete en cepillo de intestino de rata. Los asteriscos (*) indican los pasos en los cuales se procedió al dosaje proteico, según técnica empleada por Lowry (1951).

3.3 RESULTADOS

I. TRANSFERENCIA DE AGUA EN EL YEYUNO DE RATA

3.3.1. Estudio de las permeabilidades hidrostáticas y osmóticas: Efectos de la remoción del sodio

La figura 13 muestra el flujo neto absorbivo de agua (J_w) observado, al aplicar diferentes presiones hidrostáticas (ΔP en cm de agua) al lado mucoso de la preparación. Se estudió, simultáneamente, el efecto de la remoción del sodio tanto en el baño mucoso como en el seroso.

Como puede observarse, existe una relación lineal entre el fluido absorbido y la diferencia de presión en ambos casos. Los coeficientes de permeabilidad hidrostática (P_{hidr}) se estimaron a partir de la pendiente de la línea de regresión (Tabla IV). La ordenada al origen representa en este tipo de gráfico el flujo neto de agua asociado al transporte, en ausencia de todo tipo de gradiente: químico, eléctrico u osmótico (Escobar y col., 1990).

La tabla IV muestra que el P_{hidr} en ausencia de sodio, fue significativamente mayor que el obtenido en condiciones controles (con sodio). Simultáneamente, el flujo neto de agua (absortivo), que tiene un valor positivo en condiciones controles ($0,086 \pm 0,0024 \mu\text{l}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$), no es significativamente distinto de cero en ausencia de sodio ($-0,044 \pm 0,031 \mu\text{l}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$) $p < 0,05$.

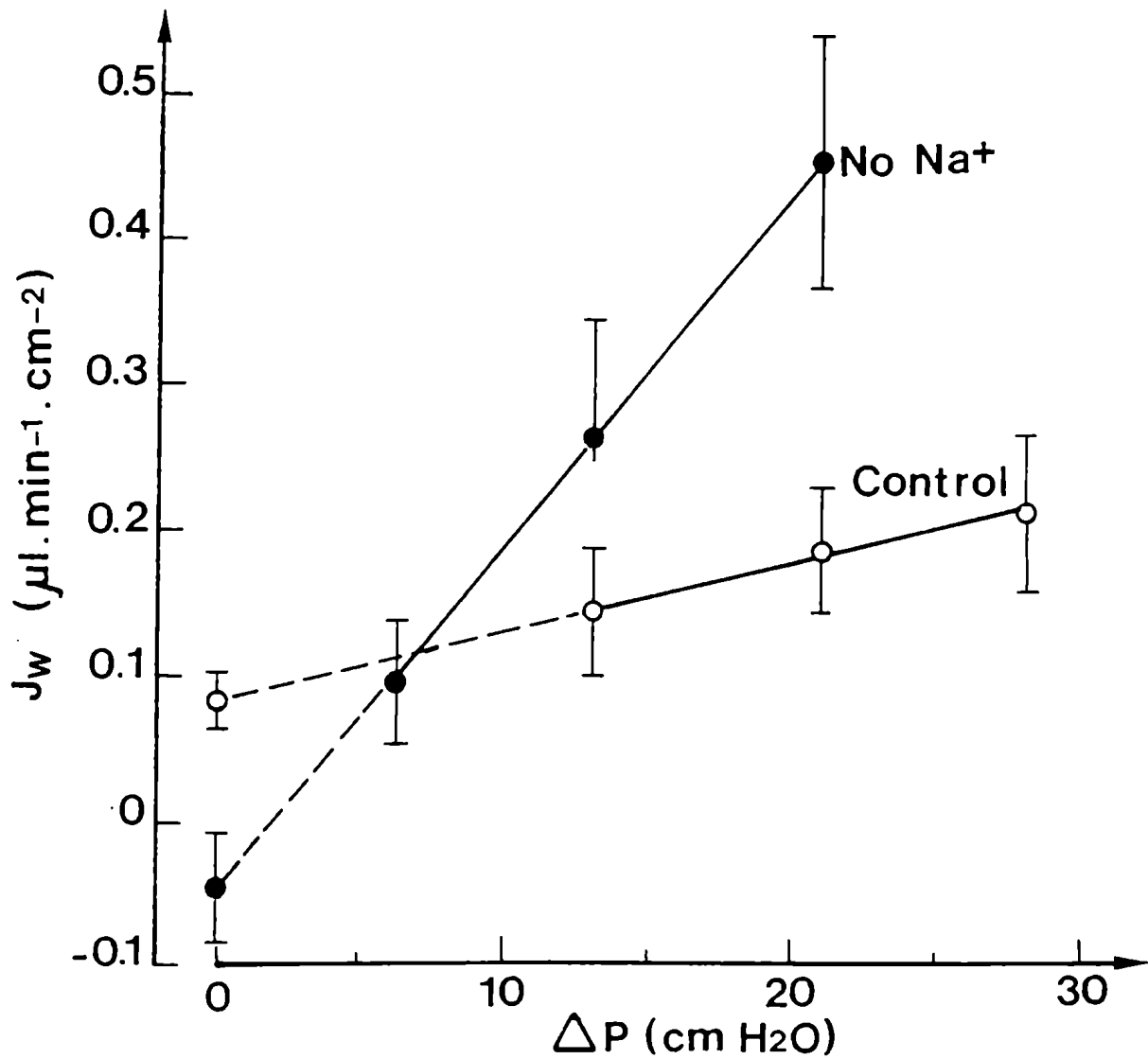


FIGURA 13: flujo neto de agua (J_w) en función del ΔP (cm de agua) en el yeyuno de rata. ● = sin sodio (n=5) (0 Na), ○ = control con sodio (n=8). Los valores del J_w en ausencia de gradiente ($\Delta P = 0$) se obtuvieron a partir de las correspondientes líneas de regresión.

CONDICION	P_{bidr}	J_w	P_{osm}	dp
CONTROL	0,052±0,011* (n=8)	0,086±0,024* (n=8)	0,0069±0,0014 (n=12)	1,7±0,4* (n=6)
0 Na ⁺	0,278±0,054 (n=5)	-0,044±0,031 (n=5)	0,0059±0,0012 (n=5)	0,3±0,5 (n=6)

TABLA IV: Permeabilidad hidrostática (P_{bidr} , cm/s); permeabilidad osmótica (P_{osm} , cm/s); flujo neto de agua asociado al transporte (J_w , $\mu\text{l}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$) y diferencia de potencial (dp, mV) medidos en el yeyuno de rata. La condición control responde a la presencia de solución salina standard rata en ambos lados de la preparación. En la condición 0 Na⁺ el ion sodio fue reemplazado por colina en ambos lados del tejido.

El * indica los valores significativamente diferentes con un $p < 0,05$ (Test de Student para datos pareados).

La figura 14 muestra el J_w observado en función del gradiente osmótico aplicado (ΔmOsm), tanto en presencia o ausencia de sodio. Los gradientes osmóticos se crearon por el agregado de diferentes concentraciones de PEG (0-40 mM), a la solución salina standard. A partir de la pendiente de la línea de regresión se calculó el coeficiente de permeabilidad osmótica (P_{osm}) cuyo valor se indica en la Tabla IV. En experimentos pareados se creó el mismo gradiente osmótico (40 mM) en presencia y en ausencia de sodio. No se observaron diferencias significativas entre ambos flujos netos de agua (J_w control: $0,318 \pm 0,026 \mu\text{l}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$; sin sodio: $0,323 \pm 0,034 \mu\text{l}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$; diferencia media: $0,005 \pm 0,043 \mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$)

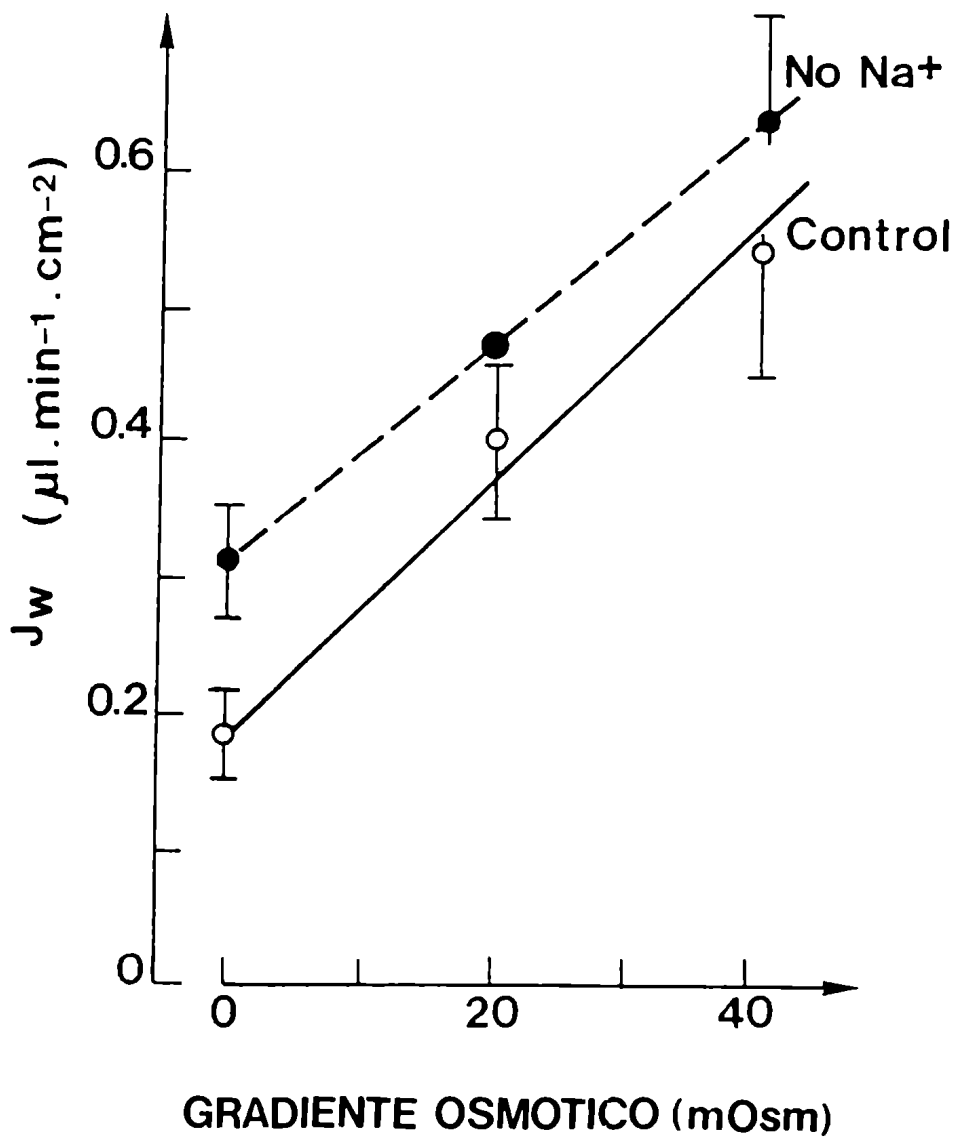


FIGURA 14: Flujo neto de agua (J_w) en función del gradiente osmótico aplicado. El gradiente se creó por el agregado de PEG (0-40 mM) al lado seroso de la preparación. ● = sin sodio (0Na), ○ = con sodio (con sodio).

3.3.2 Efectos de la acidificación sobre los flujos hidrostáticos

La figura 15 muestra otra serie experimental en la cual se midieron simultáneamente los flujos netos de agua (J_w) y la permeabilidad difusional (P_w). Este último parámetro fue medido mediante la utilización de agua tritiada como marcador. Los experimentos ($n=6$) se llevaron a cabo con soluciones standard de ambos lados del tejido y a una P de 13 cm de agua (lado mucoso positivo).

Cuando el pH seroso fue llevado a 6,2, por el burbujeo de una mezcla apropiada de $O_2 - CO_2$, se observó una disminución significativa en el P_w , simultánea con un aumento transitorio y significativo, en el J_w (Tabla V y figura 15).

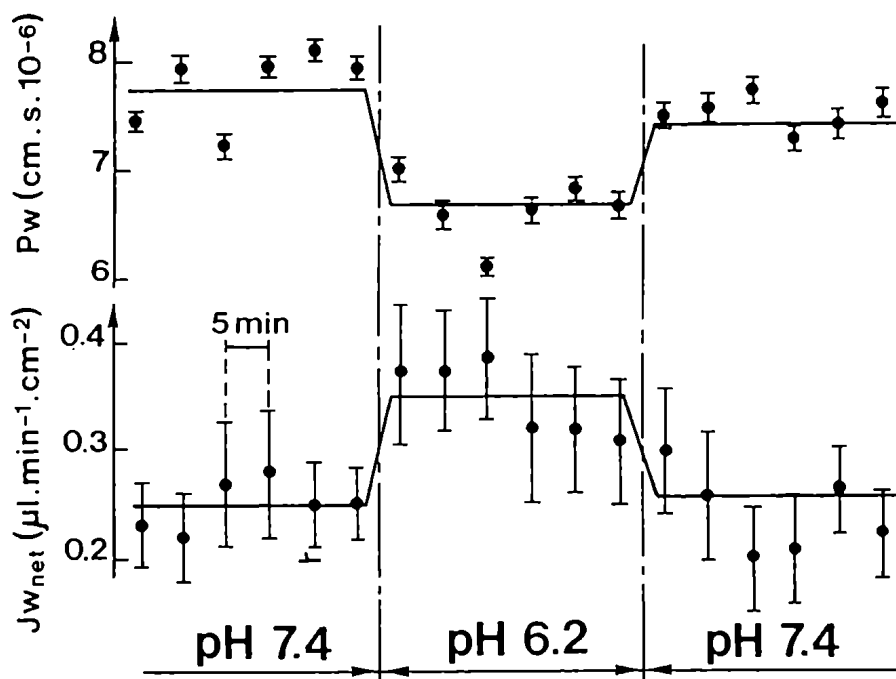


FIGURA 15: Flujo neto de agua (J_w) y permeabilidad difusional al agua (P_w) en función del tiempo y de la acidificación serosa. Los experimentos fueron realizados en presencia de bicarbonato en el medio de incubación.

3.3.3 Efectos de la acidificación sobre los flujos osmóticos

La figura 16 muestra otra serie experimental donde el J_w y la permeabilidad al manitol (P_s) fueron simultáneamente medidos ($n=8$; solución salina standard en ambos lados del tejido). En estas experiencias, y luego de un período control inicial ($\Delta P=13$ cm de agua, lado mucoso positivo), se creó un gradiente osmótico transepitelial (PEG 40 mM seroso). Esto conduce a un aumento importante en el J_w sin modificación de la permeabilidad al manitol. Cuando el pH fue llevado a 6,2, aparece una disminución neta y reversible en el J_w , paralela a un aumento, también reversible, en el P_s (valores medios en tabla V).

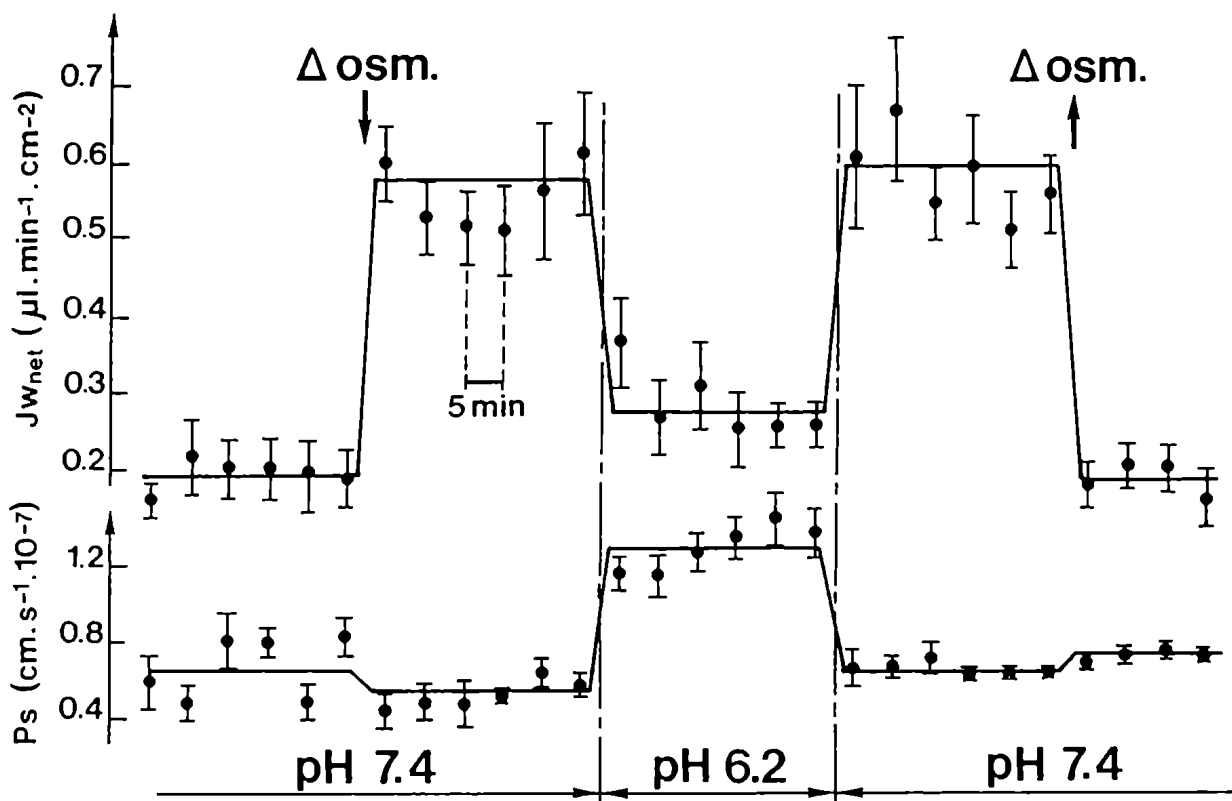


FIGURA 16: Flujo neto de agua (J_w) y permeabilidad al manitol (P_s) en función del tiempo. La acidificación se logró mediante el burbujeo de 95% CO_2 y 5% O_2 en el lado seroso del epitelio. Estos experimentos fueron realizados en presencia de un gradiente osmótico (PEG 40 mM).

Para testear el posible rol de la reducción de la tensión de oxígeno en los resultados observados, se utilizó una mezcla de 5% O₂ - 95% N₂ en experimentos controles durante 30 minutos. No se observaron cambios significativos ni en los flujos netos de agua ni en la permeabilidad al manitol (P > 0,5, n=4).

	n	pH 7,4 (1)	pH 6,2 (2)	pH 7,4 (3)	2-1	3-2
P _w (bic)	6	7,74±0,14	6,67±0,11	7,44±0,05	-1,07±0,16***	+0,77±0,12***
J _w hid (bic)	6	0,252±0,009	0,347±0,013	0,260±0,013	+0,09±0,015**	-0,087±0,018*
J _w osm (bic)	5	0,563±0,024	0,287±0,017	0,519±0,024	-0,28±0,03**	+0,23±0,03**
P _s (bic)	5	0,530±0,030	1,300±0,040	0,660±0,021	+0,77±0,05**	-0,64±0,05**
J _w osm (tris)	5	0,430±0,024	0,335±0,009	0,339±0,10	-0,095±0,093	+0,004±0,013

TABLA V: Efectos de la acidificación del medio. El efecto del pH fue medido sobre: la permeabilidad difusional al agua (P_w x 10⁻⁶, cm/s); el movimiento neto de agua en presencia de un gradiente hidrostático de 13 cm de agua (J_{w hid}); el movimiento neto de agua en presencia de un gradiente osmótico de PEG 40 mM (J_{w osm}) medidos en μl/cm².min; y la permeabilidad al manitol (P_s x 10⁻⁸ cm/s). bic= buffer con bicarbonato (25 mM); Tris= buffer HEPES/TRIS, sin bicarbonato.

* p < 0,05; ** p < 0,02; *** p < 0,001, test de Student para datos pareados.

3.3.4 Relación entre el efecto de pH y la presencia de bicarbonato

En una última serie experimental se estudió el rol de la solución buffer empleada sobre los efectos del pH (figura 17). Se registraron los J_w, en dos fragmentos del mismo tejido (n=6) uno en solución standard (con bicarbonato) y el otro en ringer Hepes/Tris. Es claro que el efecto de la acidificación sobre el J_w se observó únicamente en presencia de bicarbonato.

3.3.5 Efecto del pCMBS sobre el movimiento de agua

El para-cloro-mercuryl-benzoato (pCMBS) bloquea la permeabilidad al agua en diferentes barreras epiteliales (Ibarra y col., 1990; Whittembury y col, 1984). Para testear el efecto de este agente en el yeyuno de la rata, se utilizaron dos fragmentos del mismo intestino (datos pareados), uno en presencia de 5 mM de pCMBS en el baño mucoso y el otro en condiciones controles. Debido a que la acción del pCMBS se observa relativamente a bajos pH se utilizó el ringer Mes/Tris, no permeable (pH 5) para separar el efecto del pH del de pCMBS. Este medio se agregó del lado mucoso de la preparación, ya sea en ausencia (control) o en presencia de pCMBS.

Los resultados indican: 1) un aumento significativo del flujo hidrostático en presencia de pCMBS (control: $0,253 \pm 0,075$; pCMBS: $0,568 \pm 0,103$; diferencia media $0,315 \pm 0,127 \mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$, $p < 0,05$ $n=5$) y una reducción en la respuesta osmótica (control: $0,352 \pm 0,035$; pCMBS: $0,139 \pm 0,06$; diferencia media: $0,213 \pm 0,069 \mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$. $n=5$, $p < 0,05$,

II. TRANSFERENCIA DE GLUCOSA Y SODIO EN YEYUNO DE RATA

3.3.6 Flujos transepiteliales de D-glucosa y L-glucosa

Se estudiaron las transferencias de L y D-glucosa tanto en yeyuno de ratas controles, como de aquellas adaptadas a una dieta rica en potasio (HKD, high potassium diet). Como puede observarse

en la figura 18 existe un aumento en la captación de D-glucosa en las ratas HKD. Es evidente que la dieta alta en potasio no aumenta la transferencia de glucosa en todos los casos (Tabla VI). De ahora en adelante llamaremos "ratas adaptadas al K^+ " a aquellas en las cuales la transferencia de D-glucosa fue superior a $13,2 \times 10^{-5} S^{-1}$ (el valor medio observado para los animales controles más/menos dos veces el desvío standard es $(7,39 \pm (2,92 \times 2) = 13,2)$).

Teniendo en cuenta este criterio se dividieron a los datos obtenidos en ratas HKD en dos grupos: 1) aquellos sacos de yeyuno que muestran transferencia de D-glucosa al nivel de los animales controles ($X \pm S.D$) y; 2) aquellos de ratas "adaptadas al K^+ ".

Ya que el amiloride tiene un efecto específico sobre el transporte de sodio en ciego de ratas HKD, estudiamos el efecto de este diurético sobre la captación de sodio asociada a glucosa. Como era esperable, el agregado de amiloride ($10^{-4} M$) no modificó los movimientos de D-glucosa ni L-glucosa en los animales controles (figura 18a). En el caso de las ratas HKD, se observó una diferencia clara, con respecto a la acción del amiloride. El grupo cuyos valores de captación de glucosa estaban dentro del rango control (Figura 18b) no fue sensible a este diurético. El grupo de ratas "adaptadas" (figura 18c), mostró una reducción significativa (a los valores controles) en presencia de amiloride tanto para la D-glucosa como para la L-glucosa (Tabla VI). La inhibición fue también importante a concentraciones de $10^{-5} M$ ($-75 \pm 11\%$, $n=6$), pero no se observó a $10^{-6} M$ ($+20 \pm 12\%$, $n=6$).

En otra serie experimental se midieron simultáneamente las transferencias de d- glucosa y sacarosa en animales controles y en "ratas adaptadas al K^+ ". Los resultados obtenidos muestran que la transferencia de sacarosa es similar a la de L-glucosa (Tabla VI).

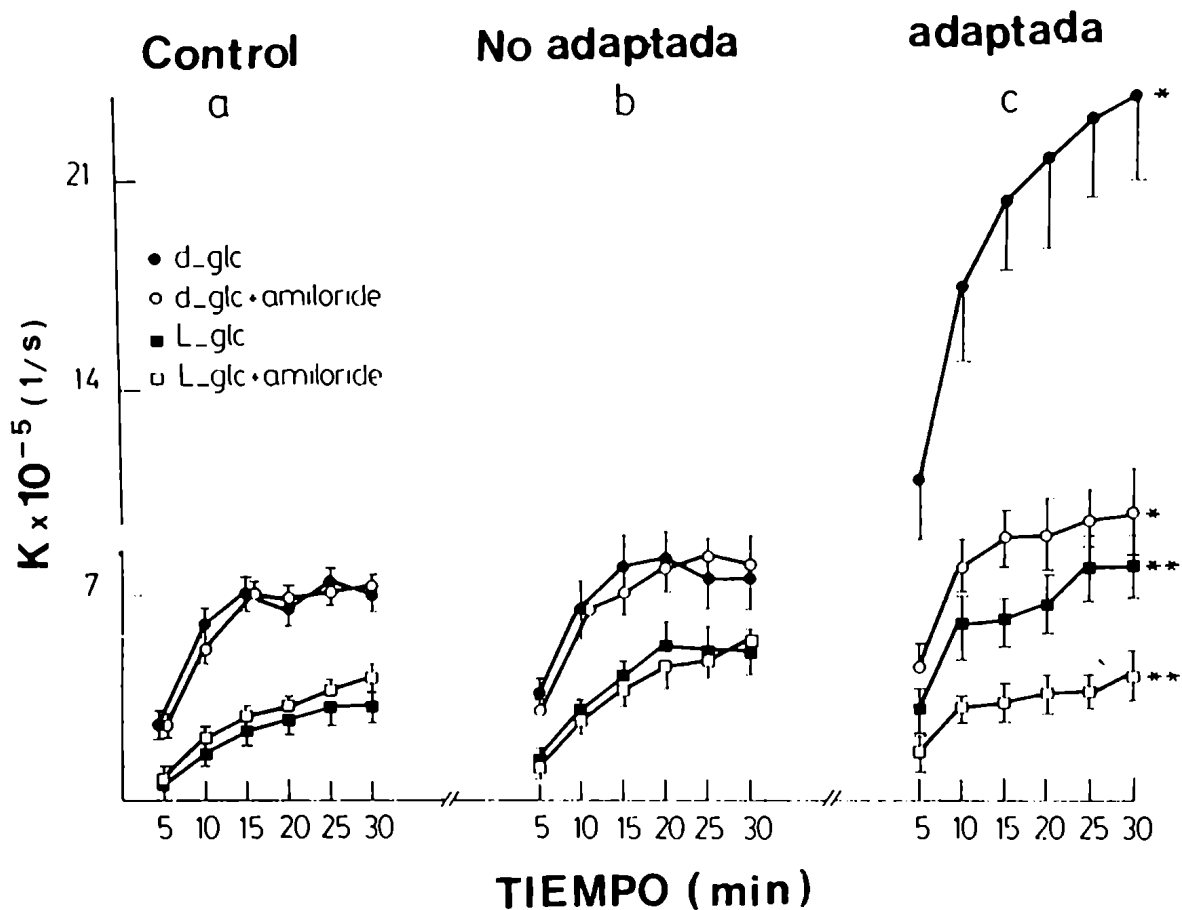


FIGURA 18: Coeficientes de transferencia (K) para la D-glucosa y L-glucosa en función del tiempo. a) ratas controles, b) ratas HKD "no adaptadas", c) ratas HKD "adaptadas". Se estudio el efecto del amiloride sobre estos parámetros (10-4 M). * p < 0,01 (Test de Student para datos pareados, t=5,36; n=15. ** p < 0,01 (t=4,73; n=15).

Las transferencias de L-glucosa y sacarosa probablemente muestren el movimiento paracelular (Parisi & Cansela, 1988), más el eventual "leak" debido a la muerte o daño celular. La diferencia entre D-glucosa y L-glucosa o sacarosa debería ser la transferencia transcelular a través de una vía específica. Para estimar la "vía leaky", se incubaron fragmentos de yeyuno a 4°C durante 3 hs. y se midieron las transferencias de L-glucosa en dos fragmentos del mismo yeyuno a 4°C y 37°C. El flujo remanente de L-glucosa, a baja temperatura, representa únicamente el 8,0 ± 3,1% (n=4) de la L-glucosa observada en ratas controles y el 6,1 ± 2,5% (n=4) en las ratas HKD.

3.3.7 El rol del sodio en los fenómenos observados

Se estudió el efecto de la remoción del Na^+ sobre la transferencia de la d y L-glucosa, en experimentos realizados en cámara de Ussing. En estas condiciones, los valores de K para la D-glucosa cayeron de $(13.0 \pm 1.1) \times 10^{-5}$ (con sodio) a $(4.7 \pm 0.7) \times 10^{-5}$ 1/s (en ausencia de sodio) y para la L-glucosa de $(2.7 \pm 0.7) \times 10^{-5}$ a $(2.0 \pm 0.7) \times 10^{-5}$ 1/s, respectivamente. Las diferencias fueron significativas de $p < 0,01$, $n=5$ para la D-glucosa pero no para la L-glucosa ($P > 0.5$).

	CONTROL (1)	HKD			2-1	3-1	4-1
		TOTAL (2)	NO-ADAPT (3)	ADAPT (4)			
D-GLUCOSA	7,39±0,91 (n=12)	13,75±2,50 (n=19)	7,38±0,83 (n=12)	23,31±2,50 (n=15)	6,36±2,66 (p<002)	0,01±1,23 (N.S)	15,92±2,66 (p<0,01)
D-GLUCOSA + AMIL	7,19±0,75 (n=12)	8,08±0,88 (n=12)	7,50±0,88 (n=12)	9,00±0,95 (n=15)	0,89±1,16 (N.S)	0,31±1,16 (N.S)	1,81±1,21 (N.S)
DIFERENCIA	0,20±1,20 (N.S)	5,67±2,65 (p<0,02)	0,12±1,21 (N.S)	14,31±2,67 (p<0,01)			
L-GLUCOSA	3,22±0,77 (n=12)	4,97±0,75 (n=19)	3,55±0,50 (n=12)	7,93±0,81 (n=15)	1,75±1,04 (N.S)	0,33±0,92 (N.S)	4,71±1,12 (p<0,01)
L-GLUCOSA + AMIL	4,18±0,92 (n=12)	3,77±0,58 (n=19)	4,08±0,47 (n=12)	3,72±0,39 (n=15)	0,41±1,09 (N.S)	0,10±1,03 (N.S)	0,46±0,99 (N.S)
DIFERENCIA	0,96±1,20 (N.S)	1,20±0,95 (N.S)	0,53±0,69 (N.S)	4,21±0,89 (p<0,01)			
SACAROSA	3,47±0,52 (n=4)	---	---	6,88±0,70 (n=4)	---	---	3,41±0,87 (p<0,02)
SACAROSA + AMIL	3,15±0,28 (n=4)			3,68±0,55 (n=4)			0,53±0,62 (N.S)
DIFERENCIA	0,32±0,59 (N.S)			3,20±0,89 (p<0,02)			

TABLA VI: Coeficientes de transferencias ($\text{K} \times 10^{-5}$ 1/s) para la D-glucosa, L-glucosa y sacarosa en ratas controles y HKD: Efecto del agregado de amiloride (10^{-4} M).

En otra serie experimental se midió la transferencia de ^{22}Na junto con la de D-glucosa, así como el efecto del amiloride sobre estos parámetros, en sacos de yeyuno provenientes de ratas HKD que mostraban valores de captación de D-glucosa superiores a $13,2 \times 10^{-5} \text{ 1/s}$. La figura 19 muestra los resultados obtenidos. Puede observarse que mientras que el amiloride reduce la captación de D-glucosa, este no modifica los movimientos de sodio en estas preparaciones.

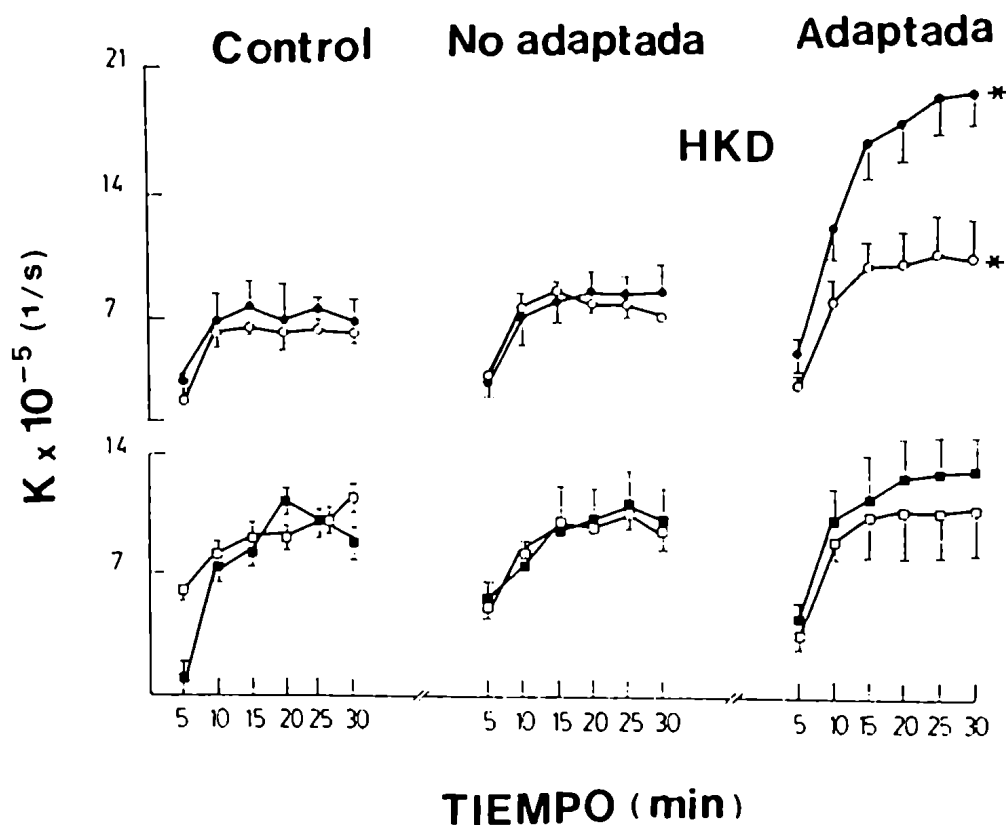


FIGURA 19: Coeficientes de transferencia para la D-glucosa[^3H] y el ^{22}Na en función del tiempo. a) Ratas controles, b) ratas HKD "no adaptadas", c) Ratas HKD "adaptadas". Las trazas radioactivas fueron agregadas a tiempo cero al lado mucoso del tejido. ● D-glucosa[^3H]; ○ D-glucosa[^3H] + amiloride (10^{-4}M); ■ ^{22}Na , □ ^{22}Na + amiloride. * $p < 0,01$, Test de Student para datos pareados, $t=3,26$, $n=7$.

3.3.8 Estudio de los parámetros eléctricos

La diferencia de potencial, la corriente de corto-circuito y la resistencia transepitelial observada en animales control y HKD se resumen en la tabla VII. No se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros eléctricos entre ratas controles y HKD.

Tampoco hubo variaciones por el agregado de amiloride sobre estos parámetros.

		CONTROL	HKD	DIFERENCIA
dp (mV)	SINAMILORIDE	1,7±0,4	1,2±0,2	0,5±0,4 (N.S)
	CON AMILORIDE	1,4±0,3	1,2±0,2	0,2±0,4 (n.s)
	DIFERENCIA	0,3±0,5 (N.S)	0,0±0,3 (N.S)	
CCC ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	SIN AMILORIDE	11,4±3,2	9,5±3,4	1,9±4,6 (N.S)
	CON AMILORIDE	10,1±2,0	9,4±3,2	0,7±3,7 (N.S)
	DIFERENCIA	1,3±3,8 (N.S)	0,1±4,8 (N.S)	
R ($\Omega.\text{cm}^2$)	SIN AMILORIDE	169±13	178±23	9±26 (N.S)
	CON AMILORIDE	169±11	188±38	19±39 (N.S)
	DIFERENCIA	0,0±17 (N.S)	10±44 (N.S)	

TABLA VII: Estudio de los parámetros eléctricos en el yeyuno de rata. Se estudió simultáneamente la diferencia de potencial (dP), la corriente de corto-circuito (CCC) y la resistencia (R) transepitelial. Los estudios fueron realizados en ratas controles y HKD, n=6.

3.3.9 Captación de D-glucosa en vesículas de ribete en cepillo

La figura 20 (A) muestra el clásico overshoot de la D-glucosa observado en ratas controles. El pico

máximo de captación de D-glucosa fue de $(41 \pm 11 \text{ pmol/mg de proteína})$, estereoespecífico, ya que, este no fue observado para la L-glucosa. Más aún, el overshoot se colapsa cuando el gradiente de sodio (la fuerza directriz para la entrada de glucosa) fue cortocircuitado por el agregado de canales de gramicidina (Sacktor, 1977). Para completar estas series experimentales controles se observó que la captación de D-glucosa no fue sensible a la acción del amiloride (10^{-4} M).

En vesículas del ribete en cepillo provenientes de animales adaptados a una dieta rica en potasio, la captación de D-glucosa se hizo sensible al amiloride (figura 20 B). Los puntos representan la media de 7 experimentos diferentes, siendo cada uno de ellos un pool de 4 a 6 animales. La inhibición media porcentual fue, en el pico del overshoot, $-37 \pm 11\%$, $t=3,36$, $p < 0,01$. La captación no específica (en ausencia de sodio) fue, en las ratas HKD, no significativamente diferente de aquella obtenida para animales controles.

En una serie experimental adicional con ratas HKD, la D-glucosa se estudió en fragmentos de yeyuno mientras que el resto de la mucosa del yeyuno fue conservada y congelada. Se utilizó luego el material derivado de aquellos animales que mostraron valores de transferencia de D-glucosa superiores a $13,2 \times 10^{-5} \text{ 1/s}$ (4 animales) y los mismos fueron procesados para la obtención de vesículas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21. Debemos destacar, que en este pool de vesículas, obtenidas de "ratas adaptadas a K^+ ", el efecto del amiloride se observa más marcadamente.

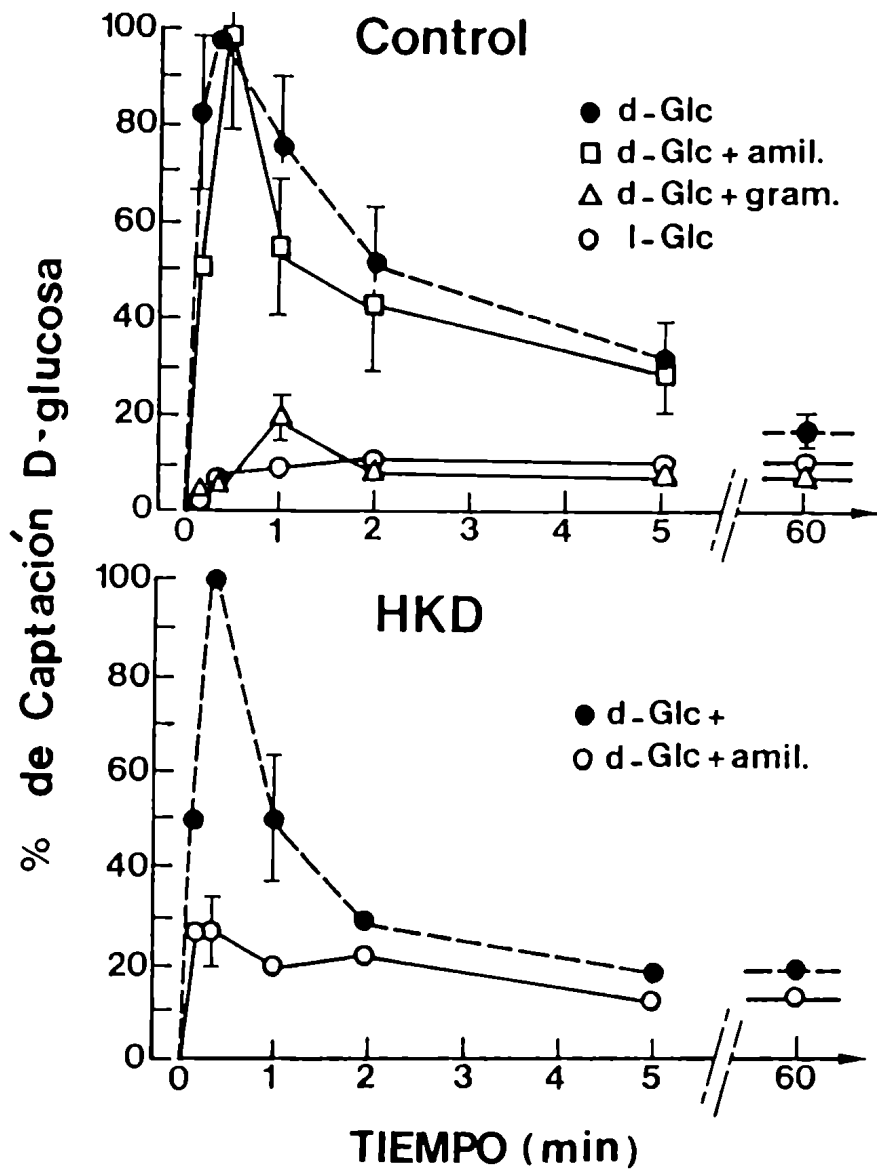


FIGURA 20: Captación de glucosa en vesículas de ribete en cepillo de yeyuno de rata. La figura superior (A) muestra el estudio de captación en vesículas de animales controles, la figura inferior (B) muestra la captación de D-glucosa en vesículas de ratas HKD. Se estudiaron los efectos del amiloride sobre ambas preparaciones.

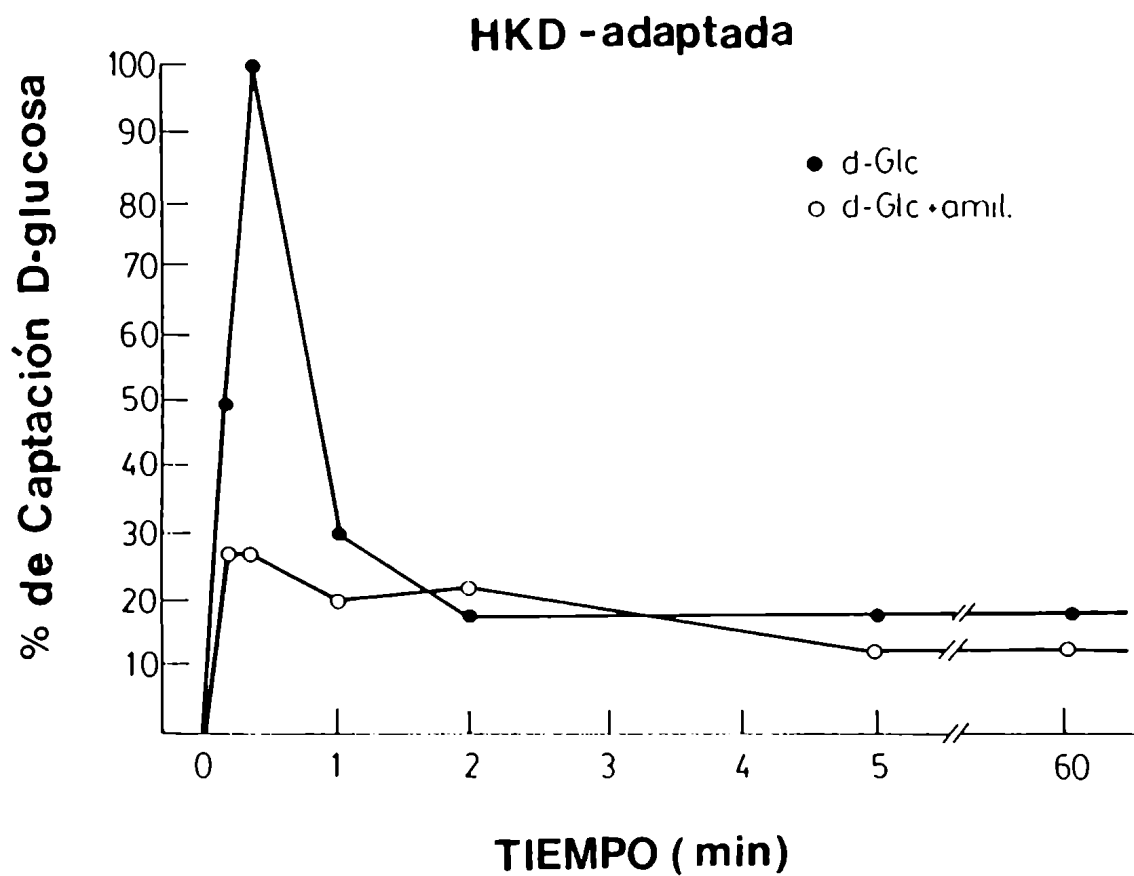


FIGURA 21: Captación de D-glucosa en vesículas obtenidas a partir de ratas HKD₄ que mostraron un coeficiente de transferencia mayor que $13,2 \times 10^{-5}$ 1/s: Efecto del agregado de amiloride (10^{-4} M).

3.4 DISCUSION

I. MOVIMIENTO DE AGUA TRANSEPITELIAL

3.4.1 J_w dirigido por gradientes osmóticos e hidrostáticos en el yeyuno de rata.

El flujo neto de agua (J_w) sigue, en el yeyuno de la rata, una relación lineal con los gradientes hidrostáticos y osmóticos aplicados transepitelialmente. Los resultados obtenidos pueden ser comparados con aquellos hallados en el ciego de rata (Escobar y col., 1990): Si bien los valores del P_{osm} fueron 5 veces mayores en el yeyuno que en el ciego ($0,0069 \pm 0,0014$ vs. $0,0014 \pm 0,0006$, cm/s), los valores del P_{hidr} fueron significativamente menores ($0,052 \pm 0,011$ vs. $0,164 \pm 0,018$ cm/s). Como ambas mediciones fueron realizadas exactamente en las mismas condiciones experimentales, las diferencias registradas pueden, por consiguiente, reflejar verdaderas diferencias en las propiedades de permeabilidad de estos tejidos. La relación P_{hidr}/P_{osm} varió de 7,54 en el yeyuno a 117,14 en el ciego. Estos resultados pueden ser tentativamente interpretados como índice de un epitelio "más cerrado al agua" para el caso del ciego.

Como era de esperar, el J_{wt} desaparece luego de la remoción del sodio en el yeyuno de rata, lo mismo que ocurrió en el ciego de rata y en el colon humano in vitro (Escobar y col., 1990). Los valores de J_{wt} observados en el yeyuno ($0,086 \pm 0,024 \mu\text{l}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$) pueden ser comparados con aquellos informados en el ileon de conejo in vitro: $0,133 \pm 0,016 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{cm}^2$.

Se acepta generalmente que la presión hidrostática empleada en este estudio (22,4 cm de agua =

1 mOsm) no provoca movimientos transcelulares de agua (Fischbarg y col., 1976). Para el caso de los movimientos de agua debidos a gradientes osmóticos o asociados a transporte de solutos, esta puede moverse, ya sea entre las células o a través de ellas (Carpi Medina y col., 1988; Pappenheimer, 1987). Naftalin y Tripathi en 1986, han estudiado los roles de las vías paracelular y transcelular en la absorción isotónica de agua en ileon de conejo. Ellos estiman que el flujo osmótico no está únicamente determinado por los movimientos de agua y solutos entre los espacios intercelulares y la solución mucosa, sino que el flujo de agua a través de la vía transcelular sería un determinante importante sobre todos los movimientos de agua transepiteliales. Ellos también llegan a la conclusión de que la superficie mucosa es una barrera heterogénea, respecto a los poros presentes en ella, con canales estrechos en paralelo con poros anchos, que admiten flujos grandes de presión (Naftalin y Tripathi, 1985). Estos dos pasajes para el agua se corresponden a lo que nosotros describimos como vías paracelulares y transcelulares.

El rol de la vía paracelular sobre los movimientos de fluido y soluto a través del intestino delgado han sido estudiados por Pappenheimer y Reiss, 1987, y se acepta, generalmente, que este es el paso para el J_w de agua bajo un gradiente de presión hidrostática (Porta y col., 1989; Fischbarg y col., 1985).

3.4.2 Efectos de la acidificación del medio sobre los movimientos netos de agua.

De igual modo que en el amnios humano (Capítulo II), la acidificación del medio, mostró ser una herramienta importante para evaluar la importancia relativa de las vías paracelular y transcelular en

los movimientos de agua.

Cuando se midieron los parámetros de permeabilidad al agua bajo un gradiente de presión hidrostática (figura 15), la acidificación del medio redujo significativamente el P_w y simultáneamente aumentó el flujo neto de agua. Estos resultados pueden ser interpretados como debidos a una disminución de la permeabilidad al agua transcelular (que es medida principalmente en P_w) y a un aumento simultaneo en el movimiento paracelular (medido por el J_{whidr}) (Fischbarg y col., 1976; Porta y col., 1989).

La imposición de un gradiente osmótico, provoca un aumento en el J_w . Si se reduce ahora el pH, ocurre una importante y reversible reducción del J_w , asociado a un aumento, también reversible e importante, en el P_s . Debido a que la permeabilidad al manitol es generalmente aceptada como un buen marcador de la vía paracelular (Porta y col., 1989), una buena interpretación de estos resultados sería aceptar que la acidificación del medio provoca dos efectos individuales: la reducción de la permeabilidad al agua transcelular y la apertura de la ruta paracelular. No obstante, existe una hipótesis alternativa: si la acidificación del medio abre las "uniones tight", esto podría inducir a la reducción del coeficiente de reflexión para el PEG, a través de la vía paracelular, con un colapso del flujo osmótico. Este efecto, solo, no da la suficiente información como para interpretar la reducción del P_w observada en la figura 15.

El efecto del pH del medio sobre el flujo osmótico de agua se observó en presencia de bicarbonato, pero no con de buffer Tris-Hepes o buffer Mes/Tris. Estas observaciones nos llevan a proponer que la permeabilidad al agua es regulada, en el yeyuno de la rata, por el pH intracelular, siendo la acidificación del medio solamente efectiva en presencia de un buffer permeable, como fue previamente reportado para canales de agua en vejiga urinaria de sapo (Parisi y col., 1984) o para la

ruta paracelular en el amnios humano (Capítulo II).

Pappenheimer en 1987 propuso un rol fisiológico importante para las variaciones en la permeabilidad de las uniones estrechas en el intestino delgado de rata. Si las modificaciones del pH del medio o celular tienen un significado fisiológico sobre las propiedades de permeabilidad en el yeyuno, es una pregunta abierta.

La sensibilidad al pCMBS ha sido informada como un argumento a favor de la presencia de canales de agua en barreras epiteliales. Nuestros resultados muestran que el pCMBS aumenta el P_{hidr} y disminuye el P_{osm} . Estos resultados pueden ser alternativamente interpretados como debidos a la apertura de las uniones estrechas junto con una reducción de la permeabilidad al agua transepitelial o simplemente a la acción sobre la vía paracelular, con una reducción secundaria en el coeficiente de permeabilidad para el PEG.

En resumen, nuestros resultados muestran que una acidificación moderada del medio, en presencia de bicarbonato, modificó tanto las permeabilidades hidrostáticas como osmóticas. Las evidencias experimentales indican que la concentración de protones aumentada, abre la vía paracelular. Hay aún argumentos buenos como para proponer un efecto bloqueante sobre canales de agua transcelulares.

II. MOVIMIENTO TRANSEPITELIAL DE SOLUTOS

Trabajos previos con animales adaptados a una dieta rica en potasio han demostrado importantes cambios adaptativos en la porción distal del nefrón y en el intestino grueso pero no fueron observados

en el túbulo proximal o yeyuno (Fisher y col., 1976; Hayslett y col., 1982). Nosotros presentamos aquí resultados que muestran un aumento de la transferencia de D-glucosa transepitelial en el yeyuno de rata HKD. Este aumento fue variable en los distintos animales y en muchos casos la transferencia de D-glucosa se mantuvo en el rango de los controles (figura 18). El aumento en la transferencia de la D-glucosa, fue acompañado de un aumento en los movimientos de L-glucosa y sacarosa (Tabla VI).

Si bien la entrada de D-glucosa a las células intestinales está acoplada a la transferencia de Na^+ (Hediger y col., 1987; Kessler & Semenza, 1983), no es esta la única vía de entrada para dicho ion (Powell y col., 1985). Aún más, la vía paracelular representa una fracción importante de la transferencia de Na^+ en los epitelios leaky (Pappenheimer & Reiss, 1987). Debido a ello, un importante aumento en la entrada de glucosa acoplada al sodio, no se ve necesariamente reflejado en la transferencia total de sodio.

Confirmando resultados previos (Fisher y col., 1976), no hemos observado cambios significativos en la corriente de corto-circuito, en el potencial de membrana o en la entrada de sodio en el yeyuno de ratas HKD.

3.4.3 El efecto del amiloride

Es evidente que los efectos del amiloride aquí presentados son resultados inesperados. Este diurético inhibe dos clases de mecanismos de transporte de sodio: 1) una entrada conductiva de sodio hallada en epitelios de alta resistencia; y 2) un sistema de intercambio Na^+/H^+ , electroneutro, presente en diferentes epitelios tales como el túbulo proximal del riñón y el intestino delgado. Las

concentraciones de amiloride necesarias para inhibir el transportador Na^+/H^+ , son muy superiores a aquellas requeridas para inhibir al canal (Sacktor, 1977).

Como ha sido previamente reportado, el hiperaldosteronismo está asociado a la adaptación al potasio así como a la depleción de sodio (Will y col., 1985). En esta última condición se describió el desarrollo de un mecanismo de absorción de sales y fluidos sensibles al amiloride, en el yeyuno de la rata. Nosotros aquí presentamos resultados que muestran que la transferencia de glucosa (asociada al sodio) se hace sensible al amiloride en ratas adaptadas a una dieta rica en potasio, mientras que no hemos observado disminución alguna en la corriente de corto-circuito ni en la transferencia de Na^{22} . Estos resultados indican una clara diferencia con la situación descrita para animales adaptados a una dieta baja en sodio. Los experimentos presentados en la figura 19 señalan que, aún en aquellos casos en los cuales el aumento en la transferencia de la D-glucosa fue de importancia, no se observó aumento en la transferencia de sodio.

Nuestros experimentos con vesículas fueron diseñados para darnos una primera aproximación a la localización subcelular de la acción del amiloride. La sensibilidad al amiloride en la transferencia de la D-glucosa en ratas HKD, pudo ser reproducida en esta preparación. Los resultados obtenidos parecen localizar, al menos en parte, los cambios adaptativos en el borde mucoso. Debemos destacar que la figura 20 muestra experimentos realizados con vesículas preparadas de material proveniente de 4 a 6 ratas HKD (probablemente incluyendo "ratas adaptadas" y "ratas no-adaptadas"). Cuando la transferencia de D-glucosa fue testeada previa a la realización de las vesículas, incluyendo solo a los animales adaptados, el efecto del amiloride se hace mucho más importante (figura 21).

3.4.4 ¿Un cotransportador de Na⁺/glucosa sensible al amiloride?

Dos hipótesis alternativas pueden explicar los resultados aquí presentados: 1) el ya conocido transportador de Na⁺/glucosa se hace sensible al amiloride en los animales adaptados a una dieta rica en potasio o 2) Los resultados observados son consecuencia indirecta de la acción del amiloride sobre otros sistemas de transporte presentes en el borde mucoso.

Cook y col.(1987), han reportado que el amiloride inhibe la entrada de Na⁺ dependiente de hexosas en una línea celular de riñón de cerdo (LLC-RK₁/CL4). Este efecto fue observado solo a altas concentraciones de amiloride (4,5 mM) y a bajos niveles de sodio en el medio (<15mM). Los autores dan sólidas evidencias que muestran que el amiloride interactúa con los sitios del Na⁺ en el transportador de hexosas, en forma competitiva. En nuestros experimentos la acción inhibitoria se observó a bajas concentraciones de amiloride (10⁻⁴ M) y a niveles normales de sodio (150 mEqv/l). Si aceptamos un efecto directo sobre el transportador de glucosa, la afinidad del amiloride por el mismo debería ser mayor que en el caso de la línea celular de cerdo.

Por consiguiente, nuestros resultados podrían ser una consecuencia secundaria de la acción del amiloride sobre el transportador Na⁺/H⁺, que representa una fracción menor de la entrada de sodio por el borde mucoso. Esto puede explicar el porqué no se observó un aumento significativo en la transferencia de Na⁺ en los animales adaptados. Estas hipótesis pueden dar una interpretación para la acción del amiloride sobre la transferencia de glucosa, basadas en efectos secundarios relacionadas al cambio de pH.

3.4.5 La transferencia de L-glucosa y sacarosa

Los experimentos realizados a baja temperatura mostraron que la "vía leaky" es muy poco importante. Por consiguiente, la mayor parte de la transferencia de L-glucosa y sacarosa representan los movimientos paracelulares. La importancia del "solvent drag" (arrastre por soluto) de moléculas no cargadas, derivadas del transporte activo del soluto, han sido recientemente señaladas (Pappenheimer & Reiss, 1987). De acuerdo con esta hipótesis, el aumento de la transferencia de D-glucosa, vía el transportador asociado al sodio, induciría el aumento secundario de la L-glucosa y de la sacarosa o manitol aquí presentado. Este mecanismo también explica el efecto del amiloride: una vez reducida la transferencia de D-glucosa específica y transcelular, los movimientos secundarios y paracelulares, de L-glucosa y sacarosa fueron también afectados. Los experimentos de vesículas confirman esta hipótesis. En estas preparaciones subcelulares, donde la vía paracelular desaparece, la transferencia de L-glucosa es muy baja e insensible a la acción del amiloride.

CAPITULO IV

HACIA UN ENFOQUE MOLECULAR. MODELO EXPERIMENTAL: EL CANAL DE AGUA ESTIMULADO POR ADH

4.1 INTRODUCCION

Como fue planteado en el capítulo I, el transporte de agua a través de las membranas plasmáticas celulares ha sido estudiado por numerosos autores. El mismo puede ocurrir por simple difusión a través de las bicapas lipídicas o bien por canales específicos. Ya que la bicapa lipídica presenta una permeabilidad intrínseca al agua relativamente alta, esto podría explicar los intercambios que ocurren en muchas células animales (Finkelstein, 1987). Otras células (ej., eritrocitos) presentan permeabilidades osmóticas al agua (P_f) mayores a las esperadas por simple pasaje a través de la bicapa, sugiriéndose la presencia de canales especializados para dicho transporte (ver página 5). Los transportadores de agua fueron descritos en los glóbulos rojos (Macey, 1984), en riñón (Mayer & Verkman, 1987), en vejiga urinaria de anfibio (Parisi y col., 1981; Handler, 1988; Shi y col., 1990) y posiblemente en otros tipos celulares (Fischbarg y col., 1989).

En glóbulos rojos humanos Solomon y col. (1984) propusieron que el transportador aniónico (banda

3) funcionaría como canal de agua. En los túbulos colectores de riñón y vejiga urinaria de anfibios, la permeabilidad al agua está estimulada por la acción de la vasopresina utilizando el AMPc como segundo mensajero. La permeabilidad al agua esta regulada por la incorporación y reciclaje de canales específicos en la membrana apical (Muller y col., 1980).

No obstante, es aún muy difícil obtener información sobre la identidad de los canales de agua (Macey, 1984; Verkman, 1989). Esto se debe principalmente a la ausencia de ligandos o inhibidores específicos, a la alta permeabilidad endógena de las bicapas lipídicas en ausencia de dichos canales y a su baja concentración respecto a las proteínas totales de membrana.

Actualmente se utilizan técnicas de biología molecular para la identificación y posterior clonado de las proteínas transportadoras. Una de ellas es la expresión del ARNm, aislado de células que posean dichas proteínas, en ovocitos de anfibios. La estrategia a seguir es la siguiente: si el flujo de agua es mediado por una proteína de membrana, es posible inducir la síntesis de dicha proteína a partir de su precursor directo, es decir el ARNm. Una vez obtenido, el mismo puede ser traducido en un sistema "in vivo" como lo es el ovocito de anfibio (figura 22). Para utilizar este sistema satisfactoriamente, es necesario que: 1) el movimiento de agua a través de la membrana plasmática del ovocito sea medible y reproducible; 2) la incorporación de canales artificiales, con propiedades biofísicas conocidas, produzca una variación de la permeabilidad al agua; 3) el ovocito presente la maquinaria celular adecuada para la expresión del ARNm testado; y 4) la membrana plasmática incorpore los transportadores sintetizados a partir del ARNm.

OVOCITO DE ANFIBIO

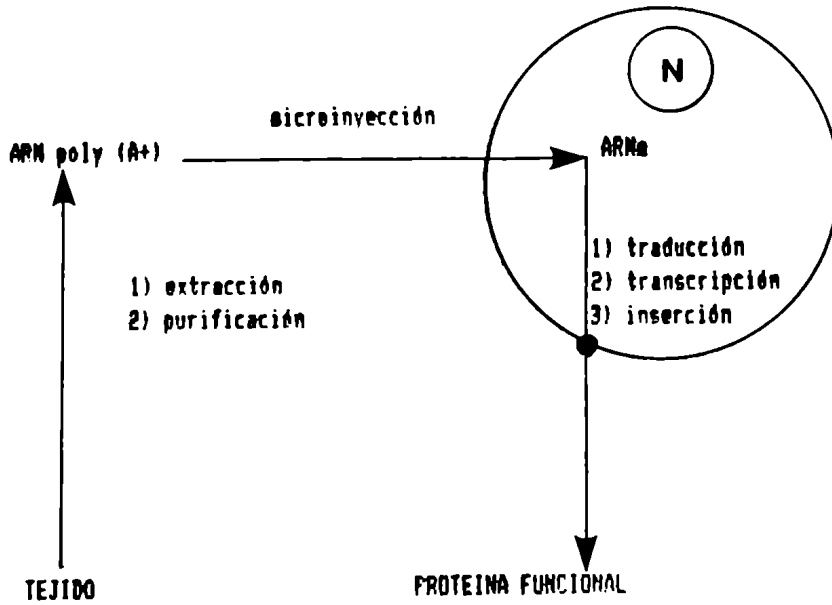


FIGURA 22: Esquema del sistema de traducción del ARNm exógeno en ovocitos de anfibios.

Nosotros hemos evaluado estos parámetros mediante la caracterización de las permeabilidades osmóticas (Pf) y difusionales (Pd) al agua en ovocitos nativos y en aquellos microinyectados con ARNm obtenido a partir de la vejiga urinaria de rana.

4.2 MATERIALES Y METODOS:

4.2.1 El material biológico

Parte de estas experiencias fueron realizadas en Francia en donde utilizamos Xenopus laevis, hembras, provenientes de Sudáfrica; animales acuáticos y de hábitos carnívoros. Los mismos fueron mantenidos en grandes acuarios con agua de clorada, a 20°C y se alimentaron dos veces por semana, con corazón de vaca cortado en pequeños trozos.

Para la obtención del material celular, a partir del cual se extraen los ácidos nucleicos, se utilizaron ranas hembras del tipo Rana esculenta, cuyos pesos oscilaron, entre 50 y 80 gramos, provenientes de Europa Central y de Egipto. Las mismas fueron mantenidas en agua corriente a 20°C durante varios días previos a las experiencias.

En las experiencias realizadas en Buenos Aires se utilizaron Bufo arenarum, tanto para la extracción de ácidos nucleicos como para la obtención de ovocitos. Los resultados obtenidos en ambas especies fueron idénticos y totalmente comparables.

4.2.2 Preparación de los ovocitos

El animal fue aletargado colocándolo durante 15 a 20 minutos dentro de un recipiente que contenía

hielo. Se realizó una pequeña incisión en la pared abdominal (algunos mm), lo que permitió el acceso a uno de los ovarios. Se obtuvo de este modo una parte del mismo y se lo colocó a 18°C en solución Barth (NaCl 88 mM, KCl 1 mM, Mg₂SO₄ 0,8 mM, Ca(NO₃)₂ 0,4 mM, Tris 7,5 mM, NaHCO₃ 2,4 mM; pH 7,6) que contenía además, antibióticos (penicilina 100 U.I./ml, estreptomicina 0,01 mg/ml).

Los ovocitos nativos (estadio V-VI de desarrollo, según Dumont (1972)) presentan la forma de esferas de aproximadamente 1-1,2 mm de diámetro. Estos son polarizados: el polo animal es oscuro y el polo vegetal claro, separados por una banda ecuatorial. Los ovocitos están rodeados, desde el interior hacia el exterior, por las siguientes capas: la membrana vitelina, que no es una membrana propiamente dicha, sino una estructura fibrosa que asegura el mantenimiento mecánico del ovocito; las células foliculares, en contacto estrecho con el ovocito, presentes en los estados precoces del desarrollo (Browne y Warner, 1986; Van den Hoef y col., 1984); la teca, que contiene a las células musculares y nerviosas, así como a los capilares y las células epiteliales.

Para nuestras experiencias, los ovocitos fueron incubados en una solución de colagenasa 2 mg/ml, durante 2 horas, a 25 °C. Este tratamiento permite la eliminación de las capas membranosas previamente descritas (en particular las células foliculares), con excepción de la membrana vitelina (no celular) y por consiguiente, se mantiene intacta la membrana plasmática del ovocito sobre la cual se realizarán las mediciones (figura 23). Los ovocitos, así tratados fueron manualmente aislados, con la ayuda de pinzas, y mantenidos en la solución Barth hasta la realización de la experiencia.

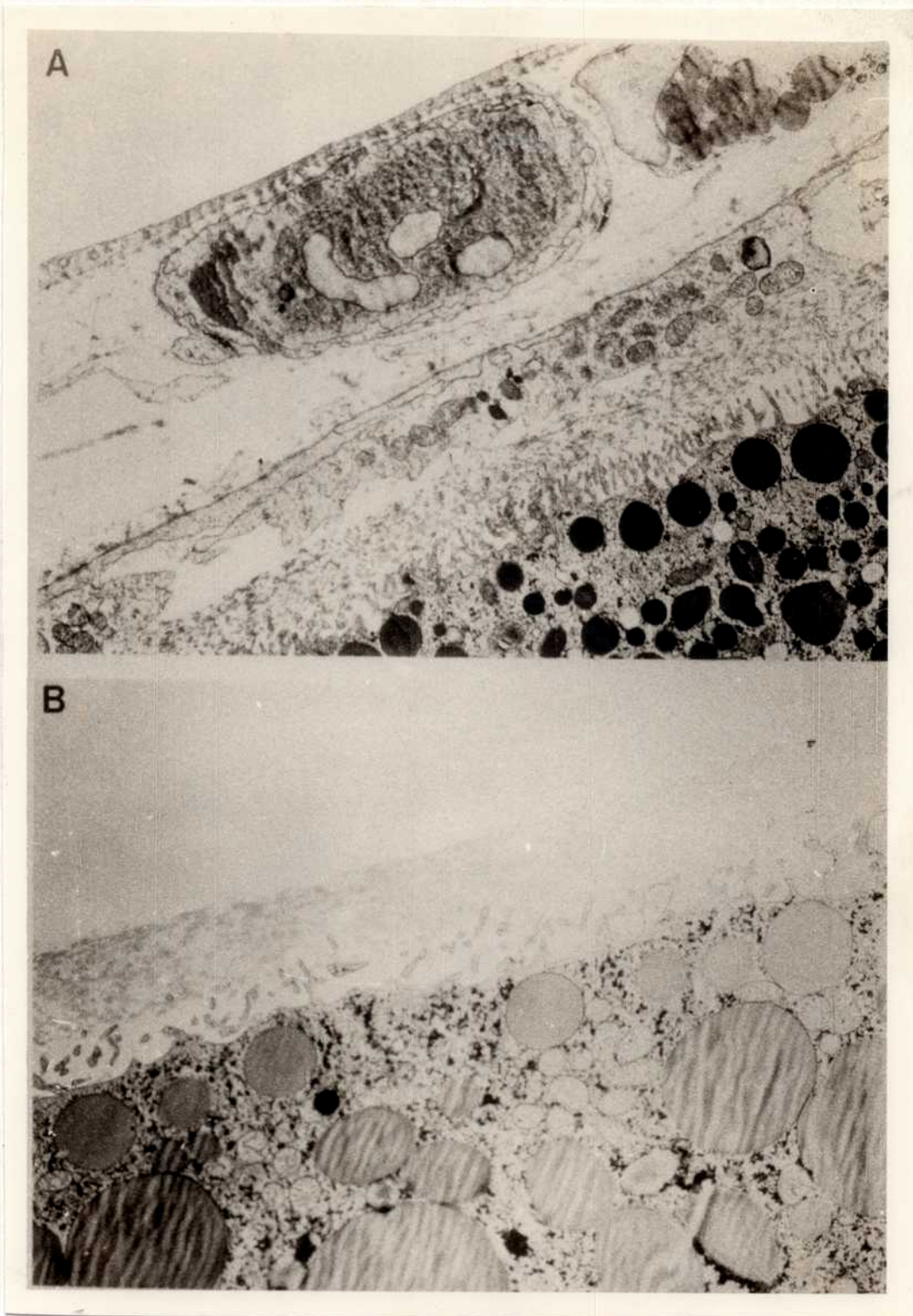


FIGURA 23: Efecto del tratamiento con colagenasa sobre la membrana de los ovocitos. (A) ovocito control, no tratado con colagenasa; (B) ovocito desfoliculado, tratado con 2 mg/ml de colagenasa.

El control morfológico de la acción de la colagenasa sobre la membrana de los ovocitos consistió en aislarlos (tratados y no tratados) y fijarlos con glutaraldeído (2,5%) preparado en un tampón Cacodilato 100 mM; pH 7,4. La fijación se realizó durante 1 hora a 18°C. Los ovocitos fueron lavados, incluidos y cortados en micrótomo. Finalmente, los cortes fueron visualizados en un microscopio electrónico.

4.2.3 Medida de la permeabilidad osmótica al agua

La medida de la permeabilidad osmótica se realizó a partir de los cambios de volumen de los ovocitos, en función del tiempo, en respuesta a distintos gradientes osmóticos. Las soluciones hipertónicas se lograron mediante el agregado de sacarosa hasta una concentración final de 400 mOsm y las hipotónicas mediante dilución de la solución Barth (20 mOsm).

Estos experimentos se realizaron en cámaras de lucite las que contenían en su interior una capa de agar 2%, con un pequeño hoyo central donde se situaba al ovocito

Los ovocitos incubados en la solución Barth (200 mOsm) fueron colocados en la cámara que contenía 1 ml de la solución hipotónica o hipertónica, según el caso. La temperatura, dentro de la misma, fue controlada mediante circulación de agua.

La medida de los cambios de volumen de los ovocitos, se realizó utilizando una técnica de microscopía invertida. Los ovocitos fueron visualizados al ser iluminados con un haz de luz monocromática de baja intensidad (500 nm) con el uso de una lámpara de tungsteno. La imagen del mismo era captada por una cámara de video, conectada a una computadora, y procesada de tal forma

que los pixeles dentro del ovocito fueron blancos (intensidad del pixel 255) mientras que los de afuera eran negros (intensidad del pixel 0). Se realizó una sumatoria rápida de los pixeles para determinar el área del ovocito. El programa de computación permitió obtener los valores de los diámetros y volúmenes reales de los ovocitos cada 10 o 20 segundos según lo requerido. El volumen relativo (V/V_0) fue calculado a partir del área a tiempo 0 (A_0) y a tiempo t (A) de la relación:

$$V/V_0 = (A/A_0)^{3/2}$$

El flujo de volumen a través de la membrana (J_v , cm^3/s) fue determinado a partir de la pendiente inicial de la curva de V/V_0 en función del tiempo

$$J_v = V_0 \, d(V/V_0) / dt$$

Donde V_0 se toma como el volumen de una esfera de 1 a 1,2 mm de diámetro. El coeficiente de permeabilidad osmótica (Pf, cm/s) se calculó a partir de la siguiente relación:

$$J_v = \text{Pf} \cdot S \cdot V_w \cdot (\text{Osm}_e - \text{Osm}_i)$$

donde V_w es el volumen molar parcial de agua ($18 \text{ cm}^3/\text{mol}$), Osm_e y Osm_i la osmolaridad externa e interna, respectivamente, y S la superficie del ovocito ($0,045 \text{ cm}^2$), asumiendo una superficie redonda. La energía de activación (E_a) fue calculada a partir de la relación de Arrhenius:

$$\ln P = E_a / R.T$$

donde $\ln P$, es el logaritmo natural de la permeabilidad, R es la constante general de los gases (1,9872 Kcal/mol.°K) y T la temperatura absoluta (°K).

4.2.4 Medida de la permeabilidad difusional

La permeabilidad difusional al agua se midió siguiendo la técnica de marcación radioisotópica. Los ovocitos se incubaron en solución Barth que contenía 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{H}_2\text{O}$ (CEA, Saclay, Francia), dos horas previas a la experiencia, a diferentes temperaturas. Se colocaron luego, individualmente en 5 ml de Barth (no radiactivo) con agitación continua. Se tomaron alícuotas de 100 μl a intervalos de tiempos definidos y se las disolvió en 4 ml de líquido de centelleo para ser contadas en un contador β de radiactividad. Las cuentas fueron corregidas mediante la substracción de la radioactividad externa, medida a tiempo cero, y expresadas como porcentaje del flujo de salida de $^3\text{H}_2\text{O}$. El coeficiente de permeabilidad difusional al agua (P_d , cm/s) se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$P_d = V_0 / (S \times t_{\text{exp}})$$

donde t_{exp} es la constante de tiempo para una exponencial simple.

4.2.5 Preparación del ARNm

El ARNm fue preparado a partir de células epiteliales provenientes de vejiga urinaria de rana o sapo (figura 24), aisladas siguiendo la técnica de Pisam y Ripoche (1976).

Luego de la decapitación y desmedulación de las ranas se realizó una incisión en la pared abdominal y se introdujo un catéter por la cloaca, para de este modo producir el llenado de las vejigas, con una solución sin calcio, cuya composición fue (mM): NaCl 100; KCl 5; NaHCO₃ 2,5; MgCl₂ 1; EGTA 1; pH 8,0. Una vez disecada la vejiga se realizó una ligadura superior y se cerraron en sacos con la parte mucosa hacia el interior. Se los colocó luego en un vaso de precipitado con solución salina sin calcio durante 20 minutos, a temperatura ambiente. Al finalizar este período, las vejigas fueron masajeadas para separar las células epiteliales, que se obtienen por incisión de las mismas. El resto de la preparación se efectuó a baja temperatura (4°C). Luego de una centrifugación de 10 minutos a 2000 X g, las células se homogeneizaron con la ayuda de un Polytrón (20.000 v/s, 2 X 15 s), en una solución que contenía (mM): NaCl 100; Tris 50; EDTA 10; SDS 5%; pH 9,0. Los ácidos nucleicos se extrajeron siguiendo la técnica descripta por Sambrook y col., 1989: al homogenato celular se le agregó idéntico volumen de la mezcla fenol (50%) - cloroformo (48%) - alcohol isoamílico (2%). La mezcla, fue nuevamente homogeneizada en un Polytrón (2 X 15 s), y luego centrifugada (15.000 x g, 30 min.). Se obtuvieron, dos fases separadas por una capa blanca de proteínas. Se procedió luego, a la extracción de la fase proteica y a la centrifugación (15.000 x g, 30 min.) de la fase acuosa (superior), previo agregado de igual volumen de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Esta etapa se realizó tantas veces como fuera necesario para eliminar completamente la fase proteica.

Los ácidos nucleicos, contenidos en la fase acuosa, fueron precipitados por el agregado de 0,1 volúmenes de acetato de potasio 3 M (pH 5,5) y 3 volúmenes de etanol puro, a 4°C. Se conservaron a -30°C hasta su posterior utilización.

Para la segunda parte de la purificación, los ácidos nucleicos se descongelaron a temperatura ambiente, y luego se centrifugaron durante 60 minutos a 4°C (15.000 x g). El precipitado fue secado al vacío (30 minutos), y disuelto en una solución Tris/HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 10 mM. Esta solución, fue calentada durante 4 minutos, a 65°C, y se le agregó cloruro de potasio hasta una concentración final de 500 mM. El ARNm, que porta un grupo poliadenilato en su extremo 3' terminal, se purificó por cromatografía de afinidad (Jacobson, 1987; Brown, 1991): se depositaron a los ácidos nucleicos, sobre una columna de cromatografía (oligo (dT⁺) celulosa) preparada en una solución de Tris 10 mM, EDTA 10 mM, KCl 500 mM; pH 7,4. Como el volumen depositado es muy superior al volumen de la columna, el exceso de solución, no retenido por la columna pero que contiene aún ARNm, fue pasado por segunda vez a través de la misma. El sistema fue mantenido luego, a temperatura ambiente durante una hora, para este momento los ARNm están ligados a los residuos tiamidinos de la celulosa. Se los lavó con una solución que contenía Tris 10 mM, EDTA 10 mM, KCl 500 mM, y luego, con una solución Tris 10 mM, KCl 150 mM; pH 7,4.

Finalmente el ARNm fue eluido con una solución libre de potasio, que contenía Tris 10 mM (pH 7,4) en fracciones de 500 μ l. El rendimiento medio, así como la pureza de la preparación se evaluaron por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}). En promedio, el rendimiento fue de $20 \pm 5 \mu$ g de ARNm cada 20 vejigas de rana.

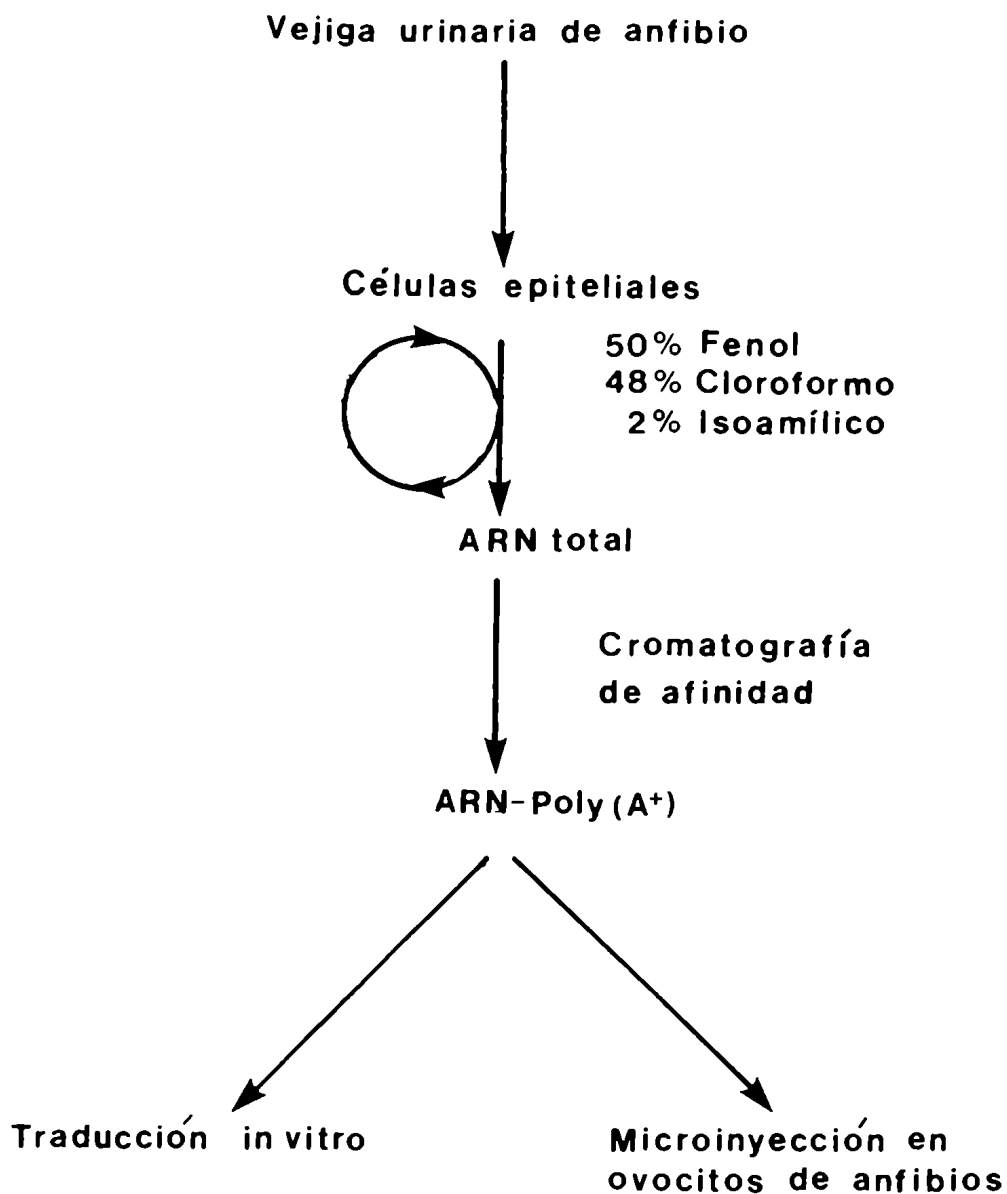


FIGURA 24: Preparación de ARNm a partir de células epiteliales de vejiga urinaria de anfibio.

El ARNm fue precipitado por el agregado de 0,1 volúmenes de acetato de potasio 2,5 M (pH 5,0) y 2,5 volúmenes de etanol puro (a 4°C). Finalmente, se congelaron a -30°C hasta su posterior utilización.

4.2.6 Traducción "in vitro"

Con el fin de controlar la eficiencia del ARNm que hemos purificado, se realizó una traducción en un sistema celular siguiendo la técnica de Promega Biotec. Se agregó el ARNm, en una concentración de 80 $\mu\text{g/ml}$, a un lisado de reticulocitos de conejo (Promega), que contenía las enzimas de traducción y los ARN de transferencia, esta mezcla carece de nucleasas (Pelham y Jackson, 1976). Completamos la mezcla por el agregado de aminoácidos 1 mM (sin metionina) y de 0,1 mCi/ml de metionina ^{35}S (actividad específica 1145 Ci/mmol). Se realizó una incubación de 45 minutos a 30°C; las proteínas sintetizadas durante este período se separaron sobre un gel de poliacrilamida en medio desnaturalizante (SDS 12%) y luego se las reveló con fluorografía, gracias a la metionina que ellos contienen: el gel fue colocado en una solución PPO 22,2% durante 3 horas, y luego lavado y secado. Posteriormente fue expuesto en un film Kodak y a -30°C varias horas antes de su revelación.

4.2.7 Microinyección de ARNm en ovocitos de anfibio

Los ovocitos nativos, tratados con colagenasa, fueron inoculados siguiendo la técnica de Colman (1984) (figura 25).

El ARNm total fue descongelado y centrifugado a 15.000 x g durante 30 minutos. Se lo lavó luego con etanol 70% y se lo centrifugó nuevamente. El precipitado de ARNm se secó al vacío y se lo disolvió en agua estéril en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se procedió luego a calentarlo durante 2 minutos a 65°C antes de la inoculación y se lo conservó en hielo durante toda la operación.

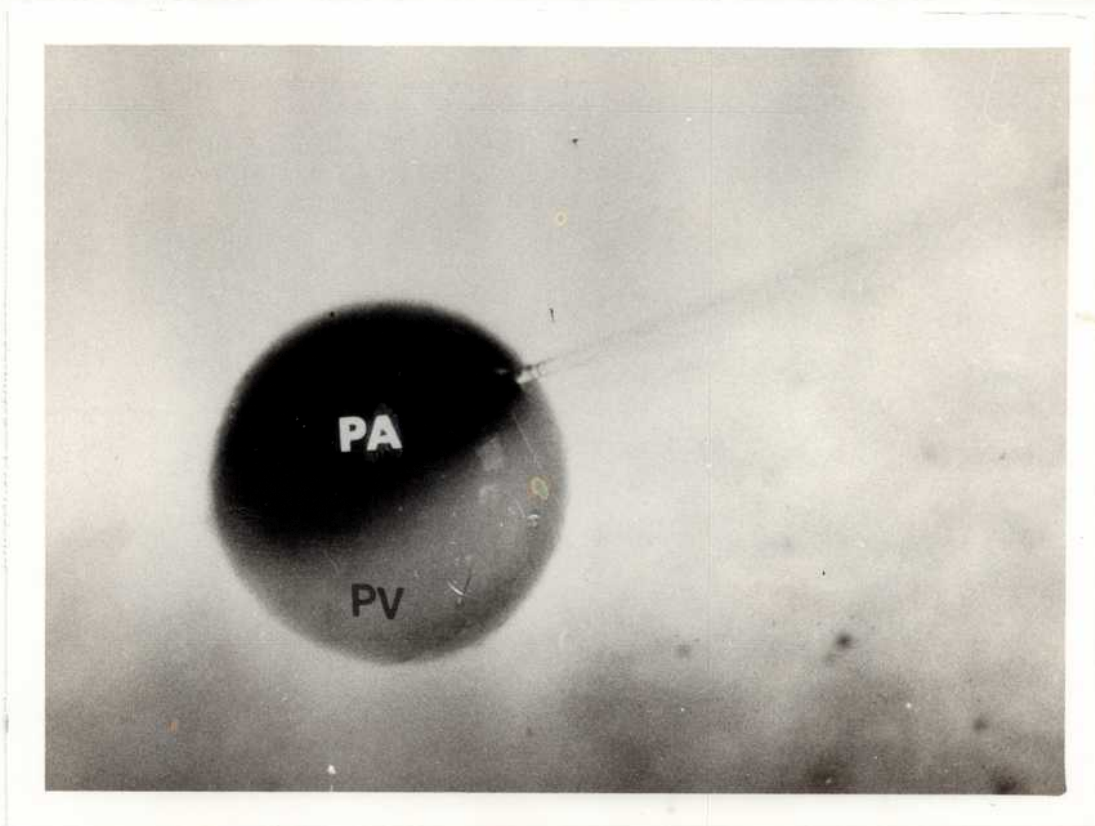


FIGURA 25: Inyección del ARNm en ovocitos de anfibios. El ARNm fue disuelto en agua estéril ($1 \mu\text{g/ml}$) e introducido en una micropipeta de vidrio con una punta cuyo diámetro oscilaba en los $15\text{-}20 \mu\text{m}$ y que contenía aceite estéril y coloreado. La inyección se realizó al insertar la pipeta en el polo animal del ovocito. PA: polo animal, PV: polo vegetal.

Para la inyección, el ARNm se introduce dentro de una micropipeta, que posee una extremidad de 15 a $20 \mu\text{m}$ de diámetro, la cual está montada a un micromanipulador finamente calibrado. Los ovocitos se colocan sobre un soporte fibroso humedecido con la solución Barth, y la punta de la pipeta se introduce, en el límite entre el polo animal y el vegetal. Se inyectan 50 nl de ARNm

(50 ng). Los ovocitos se colocan luego, sobre una caja de petri estéril que contiene en su interior la solución Barth. Se los almacena durante 3 días antes de las mediciones, a 18°C, cambiándose el medio diariamente.

Algunos ovocitos fueron inoculados con 50 nl de agua estéril o de ARNm de cerebro de rata (50 ng) para ser tomados como controles.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Estudio de la permeabilidad osmótica al agua

El estudio de la permeabilidad osmótica del ovocito, se realizó a partir de las mediciones del cambio de volumen inducido por un gradiente osmótico como se describió en métodos.

4.3.1.1 Efectos de la hipotonicidad del medio

La figura 26 muestra la variación del volumen relativo del ovocito (volumen a un tiempo dado (V) respecto al volumen inicial (V_0)), en función del tiempo. A tiempo cero, se estableció un gradiente hipotónico (180 mOsm) en el medio exterior, a 7°C. Como puede observarse, existe un aumento casi lineal del volumen relativo durante los primeros minutos, que se corresponde con la entrada osmótica de agua. Para calcular la permeabilidad osmótica al agua (P_f), utilizamos los primeros datos (a tiempos cortos), antes de que ocurra un 2% de variación del volumen. A tiempos más largos, el análisis de la cinética del volumen se complica debido a las restricciones mecánicas, a la disipación del gradiente osmótico y posiblemente debido a fenómenos reguladores del volumen.

Verkman y col. (1991) han informado que el P_f representa la permeabilidad al agua de la membrana plasmática del ovocito y no la permeabilidad de las capas no-mezcladas. Nosotros corroboramos estos resultados calculando la energía de activación (E_a) siendo su valor de $10,1 \pm 0,5$

Kcal/mol. Este valor está dentro del rango esperado para el movimiento de agua a través de una bicapa lipídica (10-14 Kcal/mol; Finkelstein, 1987; Verkman, 1989), pero es mucho más alto que el que se prevé para el movimiento de agua a través de un poro o canal especializado, o el que se obtiene cuando dicho movimiento está limitado por las capas de agua no-mezcladas (< 5 Kcal/mol).

Si la membrana plasmática del ovocito es la barrera limitante de la permeabilidad osmótica al agua, podemos predecir que la incorporación de canales artificiales (como la anfotericina B y gramicidina) en la membrana, modificará el valor del Pf. Si este parámetro estuviera limitado por la presencia de capas no-mezcladas, estos poros artificiales no influirían marcadamente sobre dicho valor. La figura 26 muestra el efecto de la anfotericina (100 $\mu\text{g/ml}$) sobre la relación V/V_0 . Ante la presencia de este ionóforo, incubado 10 minutos previos a las experiencias, el volumen relativo aumenta muy rápidamente, siendo los valores del Pf más de dos veces superior respecto al de los ovocitos controles (Tabla VIII).

En otra serie experimental se estudió el efecto del agregado de gramicidina (100 $\mu\text{g/l}$) al medio de incubación. Este ionóforo debe ser incubado durante varias horas (12 hs.) previo a la experimentación, para lograr su incorporación. Los resultados hallados muestran un valor de Pf significativamente menor respecto a los valores del Pf control (Tabla VIII).

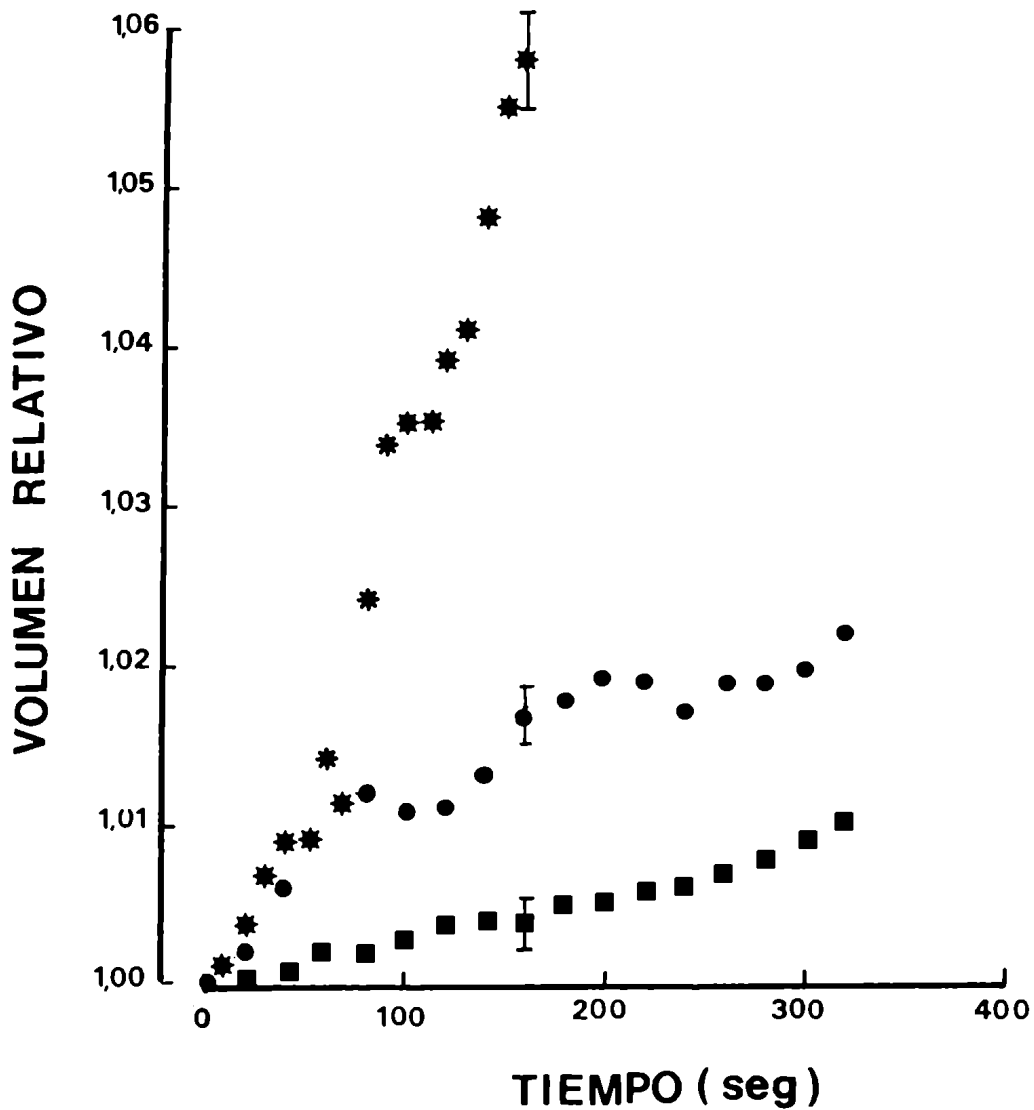


FIGURA 26: Representación de la variación relativa de volumen (V/V_0) en función del tiempo en presencia de un gradiente hipotónico. Los experimentos fueron realizados a 7°C y se estudió el efecto de la incorporación de canales artificiales sobre los movimientos de agua.

● control, ★ con anfotericina (100 µg/ml), ■ con gramicidina (100 µg/ml).

4.3.1.2 Efectos de la hipertonicidad del medio

En otra serie experimental se estudiaron las variaciones relativas del volumen en ovocitos sometidos a la presencia de un gradiente hipertónico (figura 27).

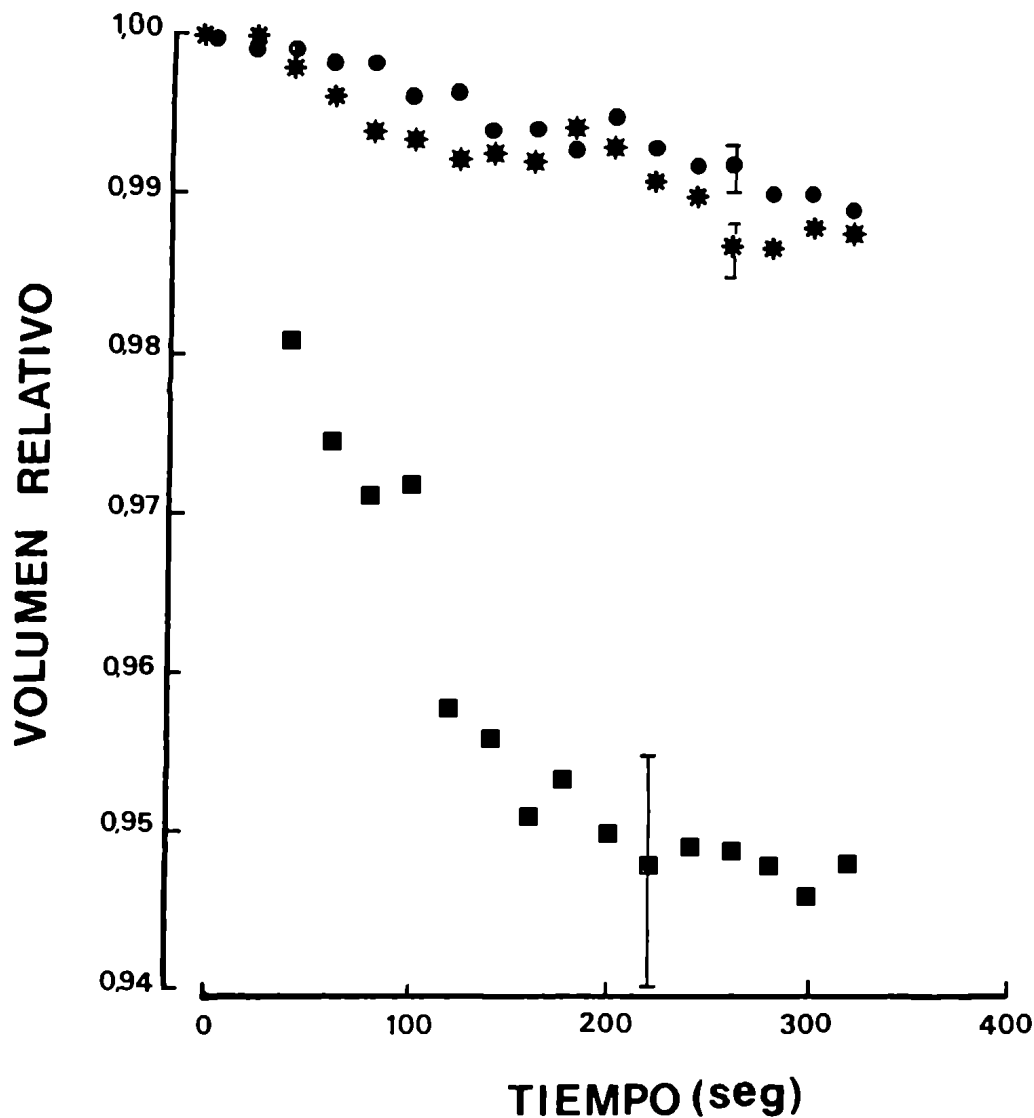


FIGURA 27: Representación de la variación relativa del volumen (V/V_0) en función del tiempo, en presencia de un gradiente hipertónico. Los experimentos fueron realizados a 7°C y se estudió el efecto de la incorporación de canales artificiales sobre los movimientos de agua.

● control; ✱ anfotericina ($100 \mu\text{g/ml}$); ■ gramicidina ($100 \mu\text{g/ml}$).

Cuando los ovocitos, pre-equilibrados en una solución isosmótica (200 mOsm), se colocaron en un medio hipertónico (400 mOsm) hubo una disminución pequeña del volumen ($< 5\%$), posiblemente debido a restricciones mecánicas o a cambios en la superficie morfológica.

Los valores de P_f hallados en estas condiciones y a 7°C se resumen en la Tabla VIII. El agregado

de anfotericina B al medio de incubación produjo un cambio pequeño pero significativo en este parámetro ($p < 0,05$; $n=7$), mientras que la gramicidina disminuyó marcadamente la permeabilidad osmótica al agua ($P < 0,001$; $n=9$).

	CONTROL Pf x 10 ⁻⁴ (cm/s)	ANFOTERICINA Pf x 10 ⁻⁴ (cm/s)	GRAMICIDINA Pf x 10 ⁻⁴ (cm/s)
HIPOTONICO	6,68±1,74 (n=12)	13,70±0,91* (n=12)	1,49±0,19** (n=9)
HIPERTONICO	0,76±0,49 (n=12)	2,5±0,65* (n=7)	7,55±0,49*** (n=9)

TABLA VIII: Valores de la permeabilidad osmótica (Pf) obtenida en presencia de diferentes gradientes osmóticos. Efectos del agregado de anfotericina B (100 µg/ml) y gramicidina (100 µg/ml) al medio de incubación. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Test de Student para datos pareados).

4.3.2 Efectos de los ionóforos sobre los volúmenes iniciales

Debido a que los tiempos de incubación de ambos ionóforos son muy diferentes (10 minutos para anfotericina B; 12 horas, para gramicidina), se evaluaron los cambios de los volúmenes iniciales de los ovocitos respecto a los volúmenes finales, luego de la incubación (Tabla IX). Existe una diferencia significativa en los volúmenes de los ovocitos luego de 12 hs. de incubación con gramicidina. Estos cambios de volumen influyen directamente en la composición de los huevos como así también en los valores de permeabilidad, por lo que deben ser tenidos en cuenta para la interpretación de los resultados.

	CONTROL (1)	ANFOTERICINA (2)	GRAMICIDINA (3)
VOLUMEN INICIAL (cm ⁻³ x 10 ⁴)	8,59±0,20 (n=22)	9,04±0,18 (n=13)	10,50 ±0,10* (n=19)

(1) - (2) N.S

(1) - (3) P < 0.02 (Test de Student para datos pareados).

TABLA IX: Variación del volumen inicial de los ovocitos en función del agregado de canales artificiales. Se midió el volumen inicial (cm⁻³ x 10⁴) antes y después del agregado de anfotericina (100 µg/ml) y de gramicidina (100 µg/ml) al medio de incubación.

4.3.3 Estudio de la permeabilidad difusional al agua

La figura 28 muestra el flujo difusional de salida de agua tritiada (³H₂O) en función del tiempo a 18°C. La cinética de salida del agua en función del tiempo fue dependiente de la temperatura y de la presencia de anfotericina. La misma se correlacionó con una simple exponencial con una constante de tiempo de aproximadamente un minuto.

Los valores del Pd (cm/s x 10⁴) fueron: Pd control = 4,76 ± 0,69 n=12; y Pd + anfotericina = 10,90 ± 1,42, n=8; siendo las diferencias significativas con un P < 0,001.

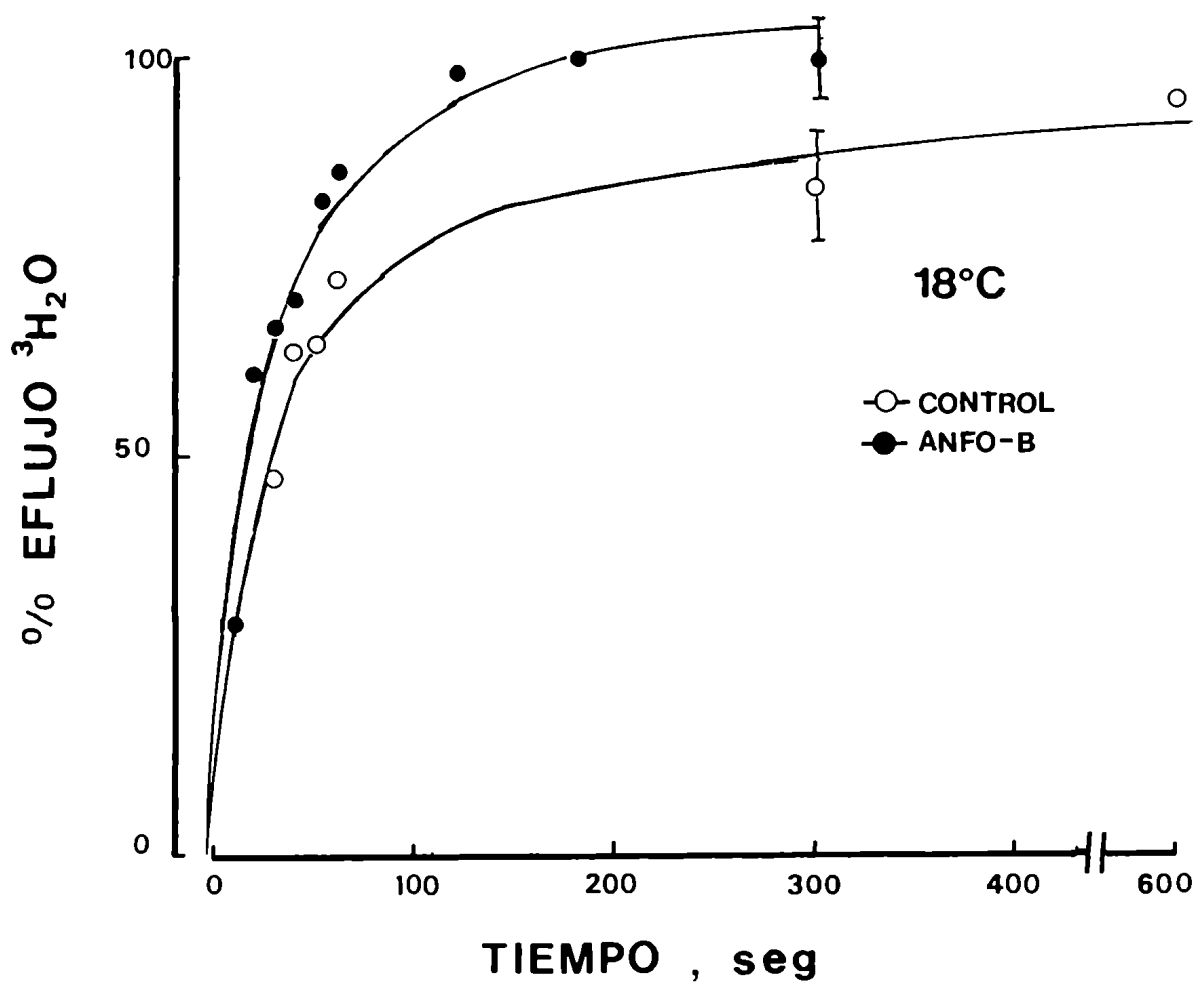


FIGURA 28: % del eflujo de agua tritiada en función del tiempo en experimentos realizados a 18°C. Se estudió también el efecto del agregado de anfotericina B (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) al medio de incubación. Los datos se correlacionaron con una exponencial simple, para obtener el correspondiente valor de Pd.

La figura 29 muestra otra serie experimental en donde las mediciones del Pd fueron realizadas a 4°C. Los valores obtenidos en este caso fueron ($\text{cm}/\text{s} \times 10^4$): Pd control = $2,73 \pm 0,44$, n=8; Pd + anfotericina = $6,18 \pm 1,42$, n=8; siendo ambas diferencias significativas ($P < 0,001$).

De la comparación de los valores de Pd a diferentes temperaturas se calculó la energía de activación (E_a) siendo de $6,44 \pm 0,05$ Kcal/mol.

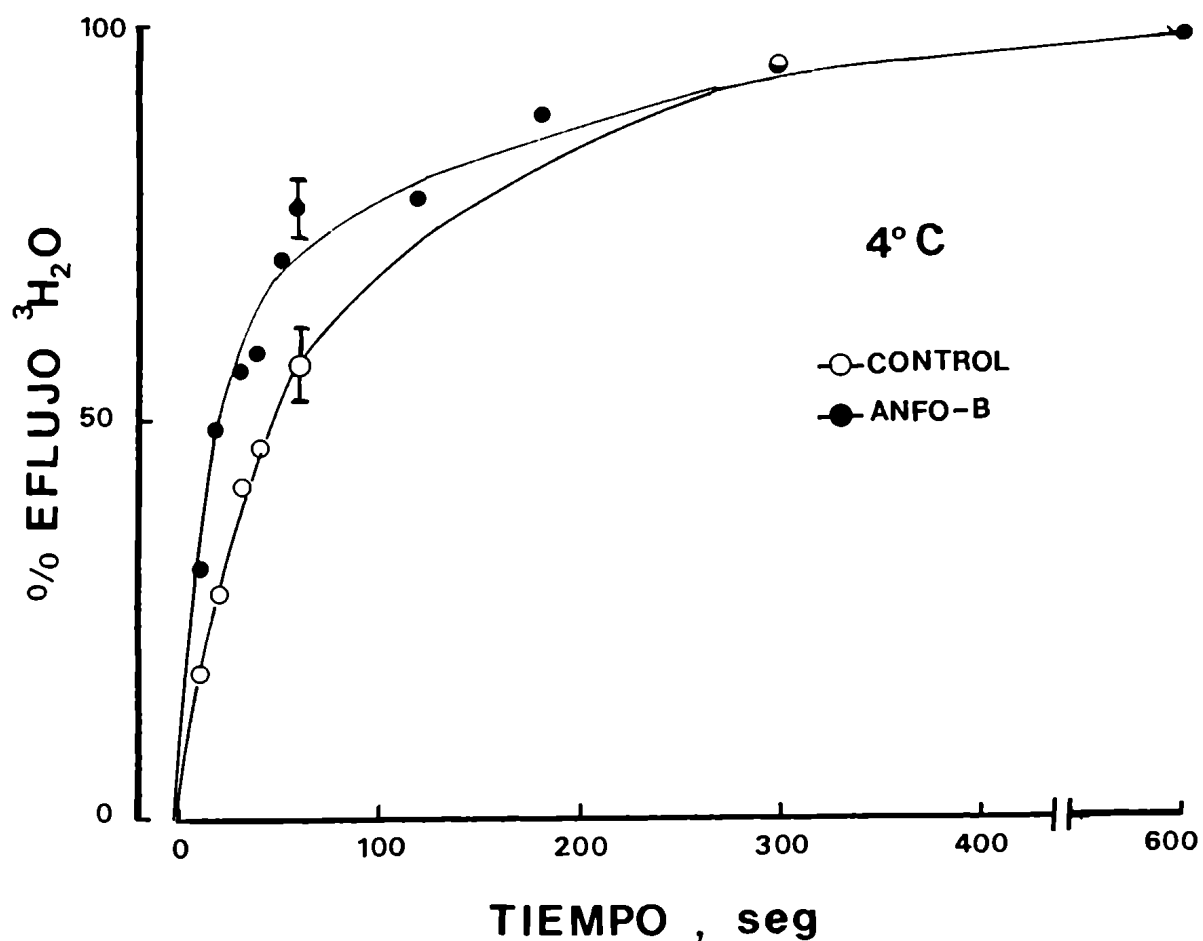


FIGURA 29: % del eflujo de agua tritiada en función del tiempo en experimentos realizados a 4°C. Se estudió también el efecto del agregado de anfotericina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ al medio de incubación 10 minutos previos a las experiencias).

La tabla X resume las mediciones de Pf y Pd en una serie de ovocitos en presencia o no de anfotericina (100 $\mu\text{g/ml}$). En ausencia del ionóforo, la relación $\Delta\text{Pf}/\text{Pd}$ no fue significativamente mayor que la unidad, lo cual indica la ausencia de una proteína específica de membrana para el transporte de agua en el ovocito nativo.

	CONTROL (1)	ANFOTERICINA (2)	(2) - (1)
Pf x 10 ⁴ (cm/s)	5,45±0,48 (n=10)	21,88±0,22 (n=7)	16,43±0,26
Pf x 10 ⁴ (cm/s)	4,76±0,69 (n=12)	10,90±1,42 (n=4)	6,14±0,63
$\Delta\text{Pf}/\text{Pd}$	1,18±0,21	----	2,68±0,04

TABLA X: Relación Pf/ Pd en experimentos con y sin anfotericina (100 $\mu\text{g/ml}$). Los valores expresan la $X \pm \text{SEM}$ a 18°C. El valor del Pf se midió utilizando un gradiente de 100 mOsm.

4.3.4 Expresión del ARNm de vejiga urinaria de anfibio

Los ovocitos fueron inyectados con ARNm proveniente de vejiga urinaria de anfibio, un tejido conocido por la presencia de canales de agua sensibles a la vasopresina; como control se procedió a la utilización de agua estéril y ARNm de cerebro de rata, tejido conocido por la ausencia de dicho transportador. La permeabilidad al agua se midió 72 hs. luego de la microinyección para permitir de este modo la traducción y expresión del ARNm.

4.3.4.1 Traducción "in vitro" del ARNm

La funcionalidad del ARNm preparado a partir de la vejiga urinaria de anfibio, fue en primer término determinada por su capacidad de síntesis proteica en un sistema acelular. Las proteínas neosintetizadas fueron separadas sobre un gel de poliacrilamida y visualizadas por fluorografía (Figura 30).

El gel reveló que el ARNm obtenido, fue traducido en varias proteínas de pesos moleculares comprendidos entre 14 y 200 kDa, las cinco proteínas mayoritarias se indican con flecha negra (Figura 30, c y d). Un análisis más detallado reveló la presencia de al menos 10 proteínas bien diferenciadas. Una vez que los ARNm obtenidos permiten una síntesis adecuada "in vitro", son inyectados en los ovocitos de anfibios para ser testeados "in vivo".

4.3.4.2 Expresión de las proteínas transportadoras de agua

Los ovocitos de Xenopus laevis o Bufo arenarum fueron inyectados con 50 ng de ARNm preparado a partir de las células epiteliales de la vejiga urinaria de anfibio, conocidas por la presencia de canales de agua. La permeabilidad osmótica de los mismos se midió 4 días luego de la inyección, debido a que la expresión de las nuevas proteínas, se desarrolla progresivamente durante 72 hs.

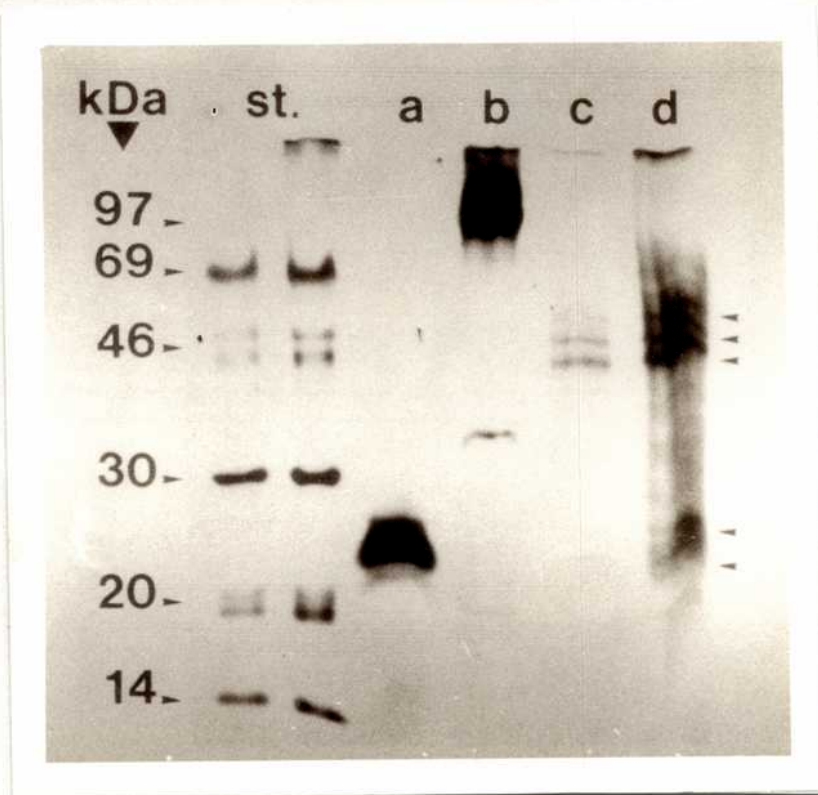


FIGURA 30: Análisis electroforético de los polipéptidos sintetizados "in vitro" a partir del ARNm de vejiga urinaria de anfibios. st: standards; a: ausencia de ARNm en el medio de incubación (control negativo); b: proteínas sintetizadas a partir de 0,5 μg del virus del mosaico del tabaco (control positivo); c: traducción de 4 μg de ARNm de vejiga de rana; d: traducción de 8 μg de ARNm de vejiga de rana.

Cuando se compara la permeabilidad osmótica al agua de los ovocitos inyectados con agua o con ARNm de cerebro de rata (controles), con aquellos inoculados con el ARNm de vejiga, se observa un aumento de 3,6 veces en estos valores (Figura 31).

Los valores de Pf expresados como $X \pm \text{SEM}$ en $\text{cm/s} \times 10^4$ fueron: Pf control inoculado con

agua= $5,26 \pm 0,33$, n=11; Pf ARNm cerebro de rata= $6,58 \pm 0,85$, n=8; Pf ARNm vejiga de anfibio = $17,76 \pm 2,92^*$, P < 0,05, n=12.

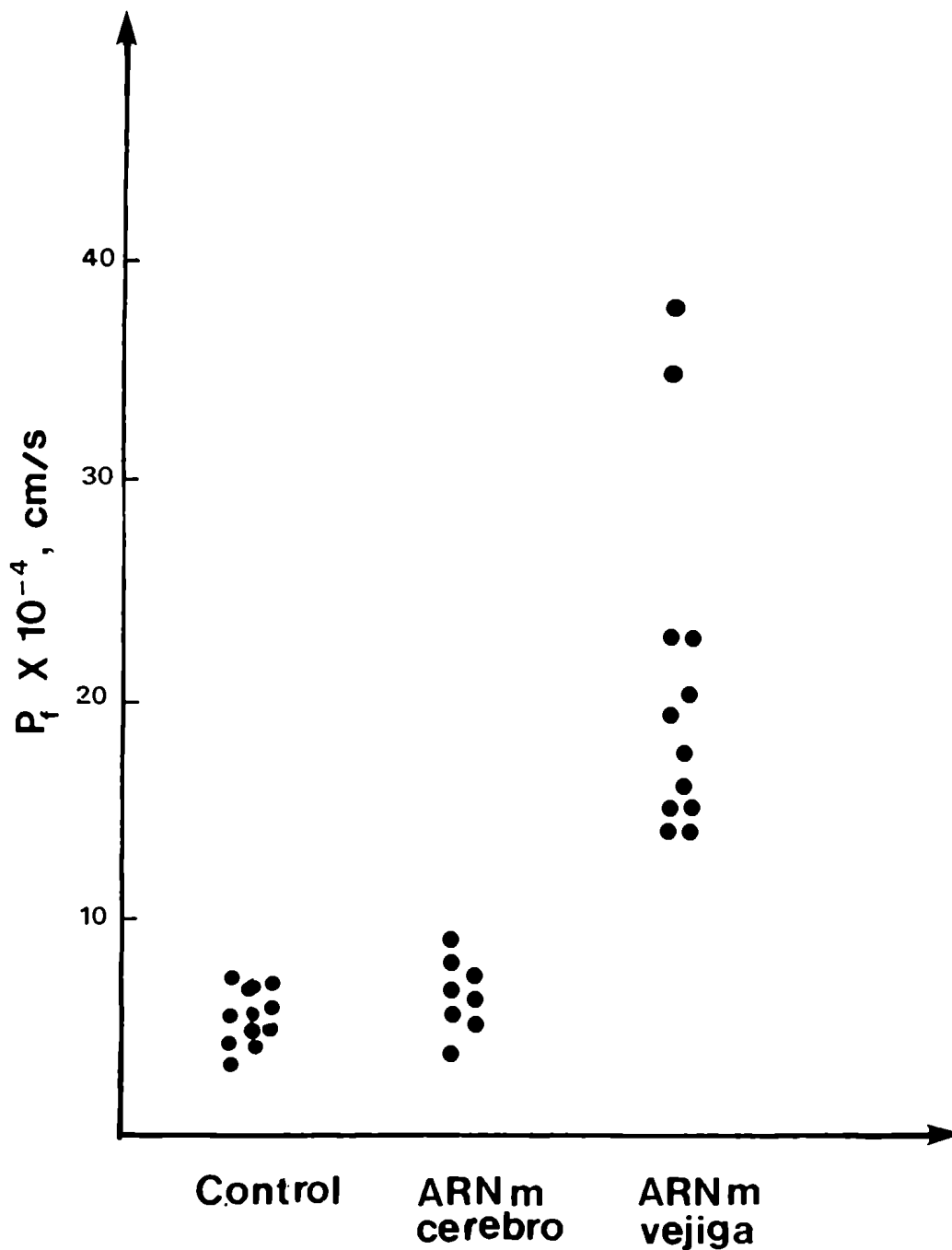


FIGURA 31: Expresión del ARNm que codifica para los canales de agua. Se representaron los valores individuales del P_f obtenidos a 7°C y en presencia de un gradiente hipotónico (190 mOsm). Control= inoculado con agua, n=11; ARNm cerebro= inoculado con ARNm de cerebro de rata, n=8; ARNm vejiga= inoculado con ARNm de vejiga urinaria de anfibio, n=12.

4.4 DISCUSION:

4.4.1 Caracterización biofísica de los ovocitos nativos

El propósito de este estudio fue caracterizar las propiedades de permeabilidad al agua en ovocitos provenientes de Xenopus laevis y de Bufo arenarum, para utilizarlos luego, como un sistema de expresión del ARNm. Para ello se midió la permeabilidad osmótica al agua (Pf), a partir de la variación del volumen del ovocito, en respuesta al gradiente osmótico aplicado. Para la medida de la permeabilidad difusional (Pd) se estudió el eflujo de agua tritiada en función del tiempo.

El coeficiente de permeabilidad osmótica endógeno del ovocito, fue bajo ($5,24 \times 10^{-4}$ cm/s a 18°C) pero mayor que el Pf reportado en la literatura utilizando técnicas gravimétricas (10^{-4} cm/s) (Muller y col., 1980). Estos valores se corresponden con los del Pf en una bicapa lipídica que no contiene canales para el agua ($\text{Pf} = 10^{-4}$ a 5×10^{-5} cm/s). Como el Pf se calculó asumiendo que la superficie del ovocito es homogénea, este valor presentado sería el límite superior del verdadero valor del Pf de la membrana plasmática (normalizado respecto a la superficie total). Los ovocitos de Xenopus presentan microvellosidades; si el factor de amplificación de la superficie es 9, como se observó en ovocitos de sapos (Dick y col., 1970), el verdadero valor del Pf del ovocito sería aproximadamente de 10^{-4} cm/s. La E_a para el Pf (10,4 Kcal/mol) está dentro del rango descrito para el movimiento de agua a través de una bicapa lipídica (10 - 14 Kcal/mol) pero mucho mayor que aquella medida para el movimiento de agua a través de un poro o canal (< 5 Kcal/mol) (ver introducción).

La permeabilidad osmótica fue medida en presencia de gradientes hipo o hipertónicos, los

resultados muestran que los valores del Pf son diferentes en ambos casos, indicándose que no existe una simetría en los mecanismos de entrada y salida de agua. La razón para esta aparente asimetría no es clara, pero podría deberse a diferencias estructurales en la superficie del ovocito debido a las microvellosidades.

El Pf fue fuertemente aumentado por la presencia del ionóforo anfotericina. Este aumento fue mucho más evidente en los experimentos de llenado que en los de vaciado, lo que estaría relacionado nuevamente con la asimetría de los procesos.

Con respecto a la gramicidina, la situación es inversa, los cambios en la permeabilidad fueron mucho más rápidos en los experimentos de vaciado que en los de llenado. Esto podría ser explicado debido a los cambios hallados en los volúmenes luego de 12 hs. de incubación con este ionóforo (Tabla IX). El mayor volumen inicial del ovocito y los canales incorporados a la membrana, explicarían el aumento importante del Pf en los experimentos realizados en presencia de gradientes hipertónicos.

Los cambios hallados por la incorporación de estos ionóforos darían evidencias de que la verdadera barrera limitante para el movimiento osmótico del agua fue la membrana plasmática, y no la presencia de capas de agua no-mezcladas que podrían estar asociadas con los espacios intervellosos o el citoplasma del ovocito.

El Pf no fue inhibido si se aumentaba hasta 5 veces la viscosidad de la solución externa ni tampoco si se utilizaba un bloqueador de los canales de agua como lo es el cloruro de magnesio (Verkman y col., 1990). Tomando en cuenta estos resultados, se puede sugerir, a priori, que los canales de agua están ausentes en la membrana plasmática del ovocito nativo de anfibio.

4.4.2 Microinyección de ovocitos con ARNm

La microinyección de ARNm proveniente de vejiga urinaria de anfibio en ovocitos, causó un aumento significativo en los valores de permeabilidad osmótica al agua, el cual no se observó en aquellos ovocitos inoculados con agua estéril o con ARNm de cerebro de rata (figura 31). Este aumento de la permeabilidad al agua es probablemente debido a la expresión de canales de agua sensibles a la vasopresina de células de vejiga de anfibio. No obstante, como sucede en la mayoría de los estudios de expresión en ovocitos, no es posible concluir que el ARNm codifique para la o las proteínas que conducen a la formación y/o activación de canales endógenos. La reconstitución funcional de las proteínas, traducidas a partir del ADN clonado, es necesaria para confirmar la identidad de los canales de agua.

En resumen, nuestros resultados confirman que:

- 1) El estudio de la permeabilidad al agua en ovocitos nativos indican la ausencia de canales específicos para esta molécula.
- 2) Las variaciones significativas en las permeabilidades detectadas en presencia de ionóforos específicos demuestran la incorporación de canales exógenos a las membranas de los ovocitos.
- 3) El aumento de las permeabilidades observadas en huevos inoculados con ARNm de vejiga, y no de cerebro, indican la expresión de proteínas específicas para el transporte de agua.
- 4) La expresión del ARNm de vejiga demuestra que el ovocito contiene la maquinaria celular adecuada para la expresión de los ácidos nucleicos.

CAPITULO V

DISCUSION GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Ya que los resultados presentados han sido ampliamente discutidos en los capítulos precedentes, realizaremos aquí una comparación e integración de los mismos.

El objetivo central de este trabajo fue abordar, bajo diferentes aspectos, el estudio del movimiento de agua y solutos en algunos epitelios, para luego utilizar la tecnología necesaria para la caracterización molecular del canal para agua.

5.1 Permeabilidad al agua en barreras epiteliales

Como se planteó previamente, las barreras epiteliales pueden ser clasificadas en abiertas o cerradas, teniendo en cuenta su conductancia transepitelial. Como consecuencia de ello, existe una muy variada

gama de epitelios más próximos a uno u otro de estos extremos. Estas diferencias, definidas desde un punto de vista eléctrico, no siempre se reflejan en los movimientos netos de agua; por consiguiente un epitelio abierto al pasaje de iones no necesariamente lo es, aunque existen excepciones, para el pasaje del agua.

La primer parte de este trabajo, se centró en la caracterización del movimiento neto de agua y solutos en diferentes epitelios, para contribuir de algún modo, a explicar los procesos fisiológicos que en ellos ocurren.

Los movimientos netos de agua son la resultante de una compleja interacción entre flujos de volúmenes pasivos, dependientes de la presencia de gradientes osmóticos e hidrostáticos, y de aquellos activos, asociados al transporte de sales. Existen aún muchos interrogantes acerca de cuál es el grado real de acople entre agua y solutos, como se mueve el agua en respuesta a la presencia de gradientes externos (osmótico e hidrostáticos) y si existen o no canales específicos para el agua.

Es de interés conocer cuáles son las principales vías de pasaje para el agua a través de un epitelio. Partimos estudiando a la membrana amniótica humana, como modelo de epitelio en donde existen mecanismos pasivos de transferencias para el agua y solutos; pasamos luego al yeyuno de rata, un epitelio donde coexisten mecanismos activos y pasivos de transferencias y por último presentamos aquí los datos previamente hallados en nuestro laboratorio para el epitelio de la vejiga urinaria de anfibios, en donde se describió una importante reabsorción de agua, estimulada por la hormona antidiurética, en presencia de un gradiente osmótico.

5.1.2 Caracterización biofísica de los epitelios estudiados

Para dar una respuesta inicial a los interrogantes antes planteados, estudiamos en estas preparaciones 4 parámetros en simultáneo: 1) la permeabilidad hidrostática (P_{hid}), 2) la permeabilidad osmótica (P_{osm}), 3) el flujo neto de agua asociado al transporte de sales (J_w) y la diferencia de potencial (dP).

La tabla XI resume los resultados hallados comparativamente en el amnios humano, en el yeyuno de rata y en la vejiga urinaria de anfibio. Como los mismos fueron medidos en idénticas condiciones experimentales, los valores obtenidos para los diferentes epitelios son totalmente comparables. Generalmente se acepta que la presión hidrostática en el rango empleado en nuestros estudios, no mueve agua transcelularmente; por consiguiente, el flujo neto de agua observado, en presencia de un gradiente de presión, sería la resultante de un movimiento neto de agua paracelular. Todos los epitelios mostraron una relación lineal entre los flujos netos de agua y el gradiente de presión aplicado. A partir de la pendiente de la línea de regresión se calculó el valor de la permeabilidad hidrostática (P_{hid}) para cada caso. Como puede observarse en la tabla XI, la permeabilidad hidrostática del amnios es significativamente mayor que aquella observada en los otros epitelios, indicando la importancia de la vía paracelular en esta preparación.

Se observó también una relación lineal entre los movimientos netos de agua y el gradiente osmótico aplicado. La permeabilidad osmótica observada fue significativamente mayor en amnios que en el resto, pero es de destacar que en vejiga urinaria control (sin acción hormonal) este valor fue significativamente menor que aquel obtenido cuando se indujo la respuesta osmótica por presencia de ADH. Es decir, la hormona antidiurética provoca un aumento neto en la reabsorción de agua,

haciendo que un epitelio cerrado para el agua, en su ausencia, se comporte como uno de tipo abierto cuando la misma es agregada al lado seroso de la preparación. Debe destacarse que la presión hidrostática fue más efectiva que la osmótica en el movimiento neto de agua en todos los epitelios, pero debemos considerar que los valores de P_{osm} (medidos en el estado estacionario) están probablemente subestimados debido a los fenómenos de "sweeping away" y "polarización de soluto" (ver Introducción) asociados a la presencia de capas no-mezcladas.

	P_{hidr} (cm/s)	P_{osm} (cm/s)	J_{wt} (μ l/min.cm ²)	dp (mV)
AMNIOS HUMANO (n=10)	0,32±0,05*	0,0390±0,0041*	0,03±0,04	0
YEUONO RATA (n=8)	0,05±0,01	0,0069±0,0014	0,09±0,02*	1,7±0,4
VEJIGA SAPO (n=8)	0,08±0,01	0,0004±0,0002*	0,17±0,02*	31±5
VEJIGA SAPO + ADH (n=8)	0,09±0,01	0,0065±0,0011	0,16±0,03*	52±8

TABLA XI: Comparación de los valores de permeabilidad osmótica e hidrostática, flujo neto de agua asociado al transporte y diferencia de potencial, en diferentes barreras epiteliales.

Los flujos netos de agua observados en ausencia de todo tipo de gradiente (J_{wt}) no fueron significativamente distintos de cero en el amnios, pero sí en el resto de los epitelios. Luego de la remoción del sodio (en ambos lados de la preparación) este flujo desaparece (yeyuno y vejiga), indicando la posible asociación de esta fracción del movimiento de agua con el transporte activo de iones.

Las diferencias de potencial obtenidas están en relativa concordancia con los resultados hallados para la permeabilidad hidrostática. Los epitelios abiertos tienen diferencias de potencial mucho menores (0 mV amnios, 1,7 mV yeyuno) que aquellos cerrados (31 mV vejiga control).

Todos estos hallazgos los podemos resumir en la tabla XII.

	PERMEABILIDAD ELECTRICA	PERMEABILIDAD OSMOTICA	PERMEABILIDAD HIDROSTATICA
AMNIOS HUMANO	+++	+++	+++
YEYUNO RATA	++	++	+
VEJIGA SAPO + ADH	+	++	+
VEJIGA SAPO	+	+	+

TABLA XII: Cuadro comparativo de los valores de permeabilidad eléctrica y al agua en los epitelios estudiados.

El otro punto central de nuestros estudios, fue determinar la importancia relativa de las vías paracelular y transcelular en el movimiento neto de agua. Para ello, se midieron en simultáneo y minuto a minuto, los flujos netos de agua (J_w) y las permeabilidades a la sacarosa (P_s , marcador extracelular), tanto en presencia de gradientes osmóticos como hidrostáticos.

Además, los estudios de variaciones de pH del medio, junto con las mediciones de los flujos unidireccionales de sacarosa, contribuyeron enormemente a dar una respuesta inicial a este interrogante.

Como se señaló previamente, la sacarosa no se mueve transcelularmente y la presión hidrostática solo mueve agua paracelularmente. Con respecto a la presión osmótica la situación es menos clara, ya que la vía de pasaje en respuesta a la misma puede variar de preparación en preparación.

En el amnios humano, la acidificación del medio en presencia de bicarbonato, redujo en idéntica proporción a las permeabilidades osmóticas e hidrostáticas. Este efecto fue totalmente reversible, pero no fue observado en presencia de un buffer impermeable (Tris).

En ambos casos, el porcentaje de reducción, inducidos por la acidificación del medio, fueron similares. Esto sugiere que los efectos de pH, observados sobre los movimientos osmóticos de agua, estarían reflejando una modificación de la ruta paracelular.

En el yeyuno de rata la variación del pH del medio produjo los siguientes efectos: 1) En presencia de un gradiente hidrostático (10 cm de agua) se observó un aumento del J_w y una reducción de la permeabilidad difusional al agua (P_w), en forma simultánea y reversible. 2) En presencia de un gradiente osmótico (20 mM PEG, seroso) se observó una reducción del J_w en paralelo con un aumento de la P_s . Ambos efectos no fueron logrados en presencia de buffers no permeables (Tris). Si aceptamos que la P_s es un buen marcador de los movimientos paracelulares, y que la P_w refleja principalmente los movimientos de agua transcelulares, podemos concluir que la acidificación del medio, en presencia de bicarbonato, modifica tanto la vía paracelular como la transcelular. Las evidencias experimentales indican que un aumento en las concentraciones de protones abre la ruta paracelular y probablemente induce un bloqueo específico en la ruta transcelular. No obstante, la presencia o no de canales específicos para el agua en estas preparaciones, queda aún abierta a la investigación.

Por último, en vejiga urinaria de anfibios, la acidificación del medio inhibió en forma reversible la respuesta hidrosmótica a la ADH, al AMPc y al 8-bromo-AMPc. Estos efectos inhibitorios fueron observados únicamente en presencia de un buffer permeable (Parisi y col., 1981). Estos resultados fueron explicados como debidos a la presencia de dos sitios de acción sensibles al pH del medio: a)

un sitio de membrana relacionado a la adenilato ciclasa, b) un sitio intracelular post-AMPC. El hecho de no haberse observado desaparición de los agregados proteicos asociados a la respuesta osmótica, en presencia de ADH, cuando el pH del medio fue modificado, sugiere que el segundo efecto estaría localizado a nivel del canal de agua. Por consiguiente, la principal vía de pasaje de agua en la vejiga urinaria de anfibio sería la transcelular.

5.2 Permeabilidad al agua en ovocitos de anfibios

De los epitelios estudiados la vejiga urinaria de anfibios es aquella que muestra claramente la presencia de proteínas de membrana específicas para el transporte de agua. Como es de nuestro interés llegar a identificar y aislar a dicha proteína, utilizamos una técnica de biología molecular para acercarnos al problema. La estrategia seguida fue la siguiente: si el flujo de agua es mediado por una proteína específica de membrana, es posible inducir la síntesis de dicha proteína a partir de su precursor directo, el ARNm. Una vez obtenido el mismo puede ser traducido en un sistema "in vivo" como lo es el ovocito de anfibio.

5.2.1 Caracterización biofísica de los ovocitos

Para realizar estos estudios satisfactoriamente llevamos a cabo, en primer instancia, una caracterización del movimiento de agua en ovocitos nativos. Medimos la permeabilidad osmótica (Pf),

la permeabilidad difusional (P_d) y la energía de activación de estos procesos (E_a), en condiciones controles y en presencia de canales artificiales para el agua. Los valores obtenidos, en ovocitos no tratados, están dentro del rango propuesto para bicapas lipídicas, los que indican la ausencia de canales de agua.

Estos resultados junto a los obtenidos con el agregado de canales exógenos, nos permiten concluir que el ovocito constituye un sistema adecuado para estos estudios ya que, es posible realizar en forma reproducible las mediciones de las permeabilidades osmóticas y difusionales al agua.

5.2.2 Caracterización molecular

Procedimos luego a la evaluación de los movimientos de agua inducidos por la presencia del ARNm. Las medidas de permeabilidad osmótica (P_f) en los huevos nativos (no inoculados) fue 3,6 veces incrementada cuando se inyectaba ARNm proveniente de vejiga urinaria de anfibio y no así con ARNm de cerebro de rata. Estos resultados indican que los ovocitos poseen la maquinaria celular adecuada para la síntesis de proteínas de membrana realizada a partir de material exógeno.

El paso siguiente será tratar de identificar cuál es la fracción del ARNm total que codifica para la síntesis de la proteína transportadora de agua, para su posterior aislación y secuenciación. El conocimiento de la misma nos permitirá utilizar esta estrategia para determinar, en los epitelios estudiados, si la vía de pasaje transcelular para el agua está asociada o no a canales específicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ashley, D.L. and Goldstein, J.H. (1981). Time dependence of the effect of p-chloromercuribenzoate on erythrocyte water permeability: a pulsed nuclear magnetic resonance study. *J. Membrane Biol.* 61: 199-207.
- Benga, G.; Pop, V.I.; Holmes, R.P. and Popescu, O. (1982). Irreversible inhibition of water transport in erythrocytes by fluoresceinmercuric acetate. *Cell Biol. Int. Rep.* 6: 775-781.
- Benga, G.; Popescu, O.; Borza, V.I.; Pop, V.I. and Hodarnau, A. (1989). Water exchange through erythrocyte membranes: biochemical and nuclear magnetic resonance studies reevaluating the effects of sulfhydryl reagents and of proteolytic enzymes on human membranes. *J. Membrane Biol.* 108: 105-113.
- Berry, G. and Boulpaep, E.L. (1975). Nonelectrolyte permeability of the paracellular pathway in *Necturus* proximal tubule. *Amer. J. Physiol.* 228: 581-595.
- Berry, C.A. (1983). Water permeability and pathways in the proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 245: F279-F294.
- Berry, P.H. and Verkman, A.S. (1988). Osmotic gradient dependence of osmotic water permeability in the rabbit proximal convoluted tubule. *J. Membrane Biol.* 105: 33-43.
- Bourguet, J. and Jard, S. (1964). Un dispositif automatique de mesure et déregitrement du flux net d'eau à travers la peau et la vessie des amphibiens. *Biochim. Biophys. Acta* 88: 442-444.
- Brown, D. (1991). Cell biology of the cycling of the vassopressin-sensitive water channel. In: "Vassopressin" (Jard, S. and Jamison, R., eds.), 1991. Volume 208, pp. 75-83.
- Browne, C.L. and Werner, W. (1986). Intercellular junctions between the follicle cells and oocytes of *Xenopus laevis*. *The Journal of Experimental Zoology* 230: 105-113.
- Carpi-Medina, P.; Leon, V.; Espidel, J. and Wittembury, G. (1988). Diffusive water permeability in isolated kidney proximal tubular cells. Nature of the cellular water pathways. *J. Membrane Biol.* 104: 35-44.

- Cass, A. and Finkelstein, A. (1967). Water permeability of thin lipid membranes. *J. Gen. Physiol.* 50: 1965-1984.
- Colman, A. (1984). Translation of eukariotic messenger RNA in *Xenopus* oocytes. In "Transcription and Translation. A practical Approach" (Hames, B.D. and Higgins, S.J. eds); IRL, Press LTD Oxford, England, pp. 271-302.
- Cook, J.S.; Shaffer, C. and Cragoe, E.J. (1987). Inhibition by amiloride of Na⁺-dependent hexose uptake in LLC-PK1/C14 cells. *Am. J. Physiol.* 253: C199-C204.
- Cook, J.S.; Amsler, K.; Weiss, E.R. and Shaffer, C. (1980). Development of Na⁺-dependent hexose transport in vitro. In: *Membranes of Growth and Development*, edited by Hoffman, J.F.; Giebisch, G.H. and Bolis, L. New York p, 551-567.
- Crane, R.F. (1975). The physiology of the intestinal absorption of sugars. In: Jeones, A. and Hodge, J.; Editors: *Physiological effects of food carbohydrate*, Washington, D.C. American Chemical Society.
- Dainty, J. (1963). Water relations of plants cells. *Ad. Botan. Res.* 1: 279-326.
- Decker, R.; Jackson, M.J. and Tai, Y.H. (1981). Cellular mechanism of ion transport associated with osmotic gradients in rat small intestine. *J. Physiol.* 318: 385-394.
- Desmet, V.J. (1977). *Anatomy I: Hepatocyte-canalculus* In: *Liver and bile*, Bianchi, L. Gerok, W. and Sickinger, K. (eds.). MTP Press Ltd, Lancaster.
- DeJonge, H.R. (1984). The mechanism of action of Escherichia coli heat-stable toxin. *Biochem. Soc. Trans.* 12: 180-184.
- Diamond J.M. (1979). Osmotic water flow in leaky epithelia. *J. Membrane Biol.* 51: 195-216.
- Dick, E.G.; Dick, D.A.T. and Bradbury, S. (1970). The effect of surface microvilli on the water permeability of single toad oocytes. *Journal of Cell Science* 6: 451-476.
- Duenhoelter, J.H. and Pritchard, J.A. (1976). Fetal respiration: Quantitative measurements of amniotic fluid inspired near term by human and Rhesus fetuses. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 125: 306-315.
- Dumont, J.N (1972). Oogenesis in Xenopus laevis. I stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *The Journal of Morphology* 136: 153-180.
- Escobar, E.; Ibarra, C.; Todisco, E. and Parisi, M. (1990). Water and ion handling in the rat cecum. *Am. J. Physiol.* 299: G786-G791.
- Ewe, K. (1988). Intestinal transport in constipation and diarrhea. *Pharmacology* 36: 73-84.

- Farquhar, M.G. and Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biology* 17:375-412.
- Fettiplace, R. and Hydon, D.A. (1980). Water permeability of lipid membranes. *Physiol. Rev.* 60: 510-550.
- Field, M. (1981). Secretion of electrolytes and water by mammalian small intestine. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, ed. by L.R. Johnson, New York; Raven, 1981, pp. 963-982.
- Fine, L.G.; Yamagawa, N.; Schultz, G.; Tuck, M. and Trizna, W. (1979). Functional profile of the isolated uremic nephron. *J. Clinical Invest.* 64: 1033-1043.
- Finkelstein, A. (1976). Nature of the water permeability increase induced by antidiuretic hormone (ADH) in toad urinary bladder and related tissues. *J. Gen. Physiol.* 68: 137-143.
- Finkelstein, A. and Cass, A. (1987). Water movement through lipid bilayers, pores and plasma membranes. Theory and reality. In: *Distinguished Lectures Series of the Society of General Physiologists*. New York; Wiley, vol. 4.
- Fischbarg, J.; Warshawsky, C.R. and Lim, J.J. (1976). Pathways for hydraulically and osmotically induced water pathways across epithelia. *Nature* 266: 71-73.
- Fischbarg, J.; Liebovitch, L.S and Kenizeck, J.P. (1985). Central role for cell osmolarity in isotonic fluid transport across epithelia. *Biol. of the Cell.* 55: 239-244.
- Fischbarg, J.; Warshawsky, C.R. and Lim, J.J. (1985). Pathways for hydraulically and osmotically induced water pathways across epithelia. *Nature, Lond.* 266: 71-73.
- Fischbarg, J.; Liebovitch, L.S. and Koniareck, J.P (1987). Inhibition of transepithelial osmotic water flow by blockers of the glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 898: 266-274.
- Fischbarg, J.; Kuang, K.; Hirsh, J.; Lecuona, S.; Rogozinsky, L.; Silverstein, S.C and Loike, J. (1989). Evidence that the glucose transporter serves as a water channel in J774 macrophages. *Proc. Nac. Acad. Sci. USA* 86: 8397-8401.
- Fisher, K.A.; Binder, H.J and Hayslett, J.P. (1976). Potassium secretion by colonic mucosal cells after potassium adaptation. *Am. J. Physiol.* 231: 987-994
- Fondacaro, J.D. (1986). Intestinal ion transport and diarrheal disease. *Am. J. Physiol.* 250 (Gastrointest. Liver Physiol. 13) G1-G8.
- Frömter, E. (1972). The route of passive ion movement through the epithelium of Necturus gallbladder. *J. Membrane Biol.* 8: 259-301.

- Frömter, E. and Diamond, J.M. (1972). Route of passive ion permeability in epithelia. *Nature (New Biol.)* 235: 9-13.
- Garby, L. (1957). Studies on transfer of water across membranes with special reference to the isolated human amniotic membrane and the exchange of amniotic fluid. *Acta Physiol. Scand.* 40, Suppl.137: 42-55.
- Gray, G.M. (1975). Carbohydrate digestion and absorption. *Englan J. Med.* 292: 1225-1230.
- Gurdon, J.B.(1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translations in living cells. *Nature* 233: 177-182.
- Guerrant, R.L. (1983). Pathophysiology of the enterotoxin and viral diarrheas. In: Chen, L.C Scrimshaw, N.Y (eds). *Diarrhea and malnutrition*. Plenum Press, New York p 23-43.
- Handler, J.S. (1988). Antidiuretic hormone moves membranes. *Am. J. Physiol.* 255: F375-F382.
- Hayslett, J.P.; and Binder, H.J. (1982). Mechanism of potassium adaptation. *Am. J. Physiol.* 243: F103-F112.
- Hayslett, J.P.; Mickety, H.J.; Binder, H.J. and Aronson, P.S. (1980). Mechanism of increased potassium secretion in potassium loading and sodium deprivation. *Am. J. Physiol.* 239: F378-F382.
- Hebert, S.C.; Schafer, J.A. and Andreoli, T.E. (1981). The effect of antidiuretic hormone (ADH) on solute and water transport in the mammalian nephron. *J. Membrane Biol.* 58: 1-19.
- Hediger, M.A.; Coady, J.M.; Ikeda, T.S. and Wright, E.M. (1987). Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330: 379-381.
- Hoang-Ngoc, M.; Smadja A.; De St Maur, P.P and Orcel, L. (1981). Electron microscopic study of intercellular canalicular systems in the parietal fetal membranes. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 88: 1104-1109.
- Holz, R. and Finkelstein, A. (1970). The water and non-electrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* 56: 125-145.
- Hopher, U.; Nelson, K.; Perrotto, J. and Isselbacher, K.J. (1973). Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine. *The Journal of Biological Chemistry* 248: 25-32.
- Ibarra, C.; Ripoche, P.; Parisi, M. and Bourguet, J. (1990). Effects of pCMBS on the water and small solute permeability in frog urinary bladder. *J. Membrane Biol.* 116: 57-64.
- Jacobson, A. (1987). Purification and fractionation of poly(A)⁺ RNA. *Methods in Enzymology* 152: 254-261.

- Jean, T.; Ripoche, P. and Poujeol, P. (1983). A sodium-independent mechanism for l-arginine uptake by rat renal brush border membrane vesicles. *Membrane Biochem.* 5: 1-17.
- Kashgarian, M.; Taylor, C.R.; Binder, H.J. and Hayslett, J.P. (1980). Amplification of cell membrane surface in potassium adaptation. *Lab.Invest.* 42: 581-588.
- Kedem, O. and Katchalsky, A. (1958). Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *Biochim. Biophys. Acta* 27: 229-246.
- Kessler, M.; Acuto, G.; Storelli, C.; Murer, H. and Semenza, G. (1978). A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestine brush border membranes. Their use in investigating some properties of d-glucose and choline transport systems. *Biochem. Biophys. Acta* 506: 136-154.
- Kessler, M. and Semenza, G. (1983). The small-intestinal Na^+ , d-glucose cotransport: an asymmetric gated channel (or pore) responsive to dV . *J. Membrane Biol.* 76: 27-56.
- King, B.F. (1982). Cell surface specializations and intercellular junctions in human amniotic epithelium: an electron microscopy and freeze-fracture study. *The Anatomical Record* 203: 73-82.
- King, B.F. (1983). The permeability of human amniotic epithelium: Studies using lanthanum as a tracer. *The Anatomical Record* 207: 557-561.
- Krantz, K.E.; Panos, T.C. and Evans, J. (1962). Physiology of maternal-fetal relationship through extracorporeal circulation of the human placenta. *Am. J. Obstet. and Gynecol.* 83: 1215-1218.
- Liedke, C.M. and Hopfer, U. (1982). Mechanism of Cl^- translocation across small intestine brush border membrane. I. Absence of Na^+-Cl^- cotransport. *Am. J. Physiol.* 242 (Gastrointest. Liver Physiol. 5): G263-G271.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.F. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Macey, R.I. and Farmer, R.E. (1970). Inhibition of water and solute permeability in human red cells. *Biochim. Biophys. Acta* 211: 104-106.
- Macey, R.I.; Karan, D.M. and Farmer, R.E.L. (1972). Properties of water channels in human red cells. In *Biomembranes, Vol. 3: Passive permeability of cell membranes*, Eds., F. Kreuzer and J.F.G. Slegers. Plenum Press, New York, pp. 331-340.
- Macey, R.I. (1984). Transport of water and urea in red blood cells. *The American Journal of Physiology* 246: C195-C203.

- Mayer, M.M. and Verkman, A.S. (1987). Evidence for water channels in proximal tubule cell membranes. *J. Membrane Biol.* 96: 107-119.
- Minh, H.N.; Doubin, D.; Smadja, A. and Orcel, L. (1978). La dynamique du liquide amniotique. *Annales d'Anatomie Pathologique* 23(4-5): 333-342.
- Minh, H.N.; Smadja, A.; De St. Maur, P.P. and Orcel, L. (1981). Electron microscopy study of intercellular canalicular systems in the parietal fetal membranes. *British J. of Obstet. and Gynecol.* 88: 1104-1109.
- Muller, J.; Kachadorian, W.A. and Discala, V.A. (1980). Evidence that ADH-stimulated intramembrane particle aggregates are transferred from cytoplasmic to luminal membranes in toad bladder epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 85: 83-93.
- Naftalin, R.J. and Tripathi, S. (1985). Passive water flows driven across the isolated rabbit ileum by osmotic, hydrostatic and electrical gradients. *J. Physiol.* 360: 27-50.
- Naftalin, R.J. and Tripathi, S. (1986). The roles of paracellular and transcellular pathways and submucosal space in the isotonic water absorption by rabbit ileum. *Am. J. Physiol.* 370: 409-432.
- Paganelli, C.V. and Solomon, A.K. (1957). The rate exchange of tritiated water across the human red cell membrane. *J. Gen. Physiol.* 41: 259-277.
- Page, K.R.; Abramovich, D.R. and Smith, M.R. (1974). The diffusion of tritiated water transport across isolated term human amnion. *J. Membrane Biol.* 18: 49-60.
- Pappenheimer, J.R. (1987). Physiological regulation of transepithelial impedance in the intestinal mucosa of rats and hamsters. *J. Membrane Biol.* 100: 137-148.
- Pappenheimer, J.R. and Reiss, K.Z. (1987). Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *J. Membrane Biol.* 100: 123-136.
- Parisi, M.; Bourguet, J.; Ripoche, P. and Chevalier, J. (1979). Simultaneous minute by minute determination of unidirectional and net water fluxes in frog urinary bladder: A reexamination of the two barriers in series hypothesis. *Biochim. Biophys. Acta* 648: 267-274.
- Parisi, M.; Montoreano, R.; Chevalier, J. and Bourguet, J. (1981). Cellular pH and water permeability control in frog urinary bladder: A possible action on the water pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 556: 509-523.
- Parisi, M. and Bourguet, J. (1983). The single file hypothesis and the water channels induced by antidiuretic hormone. *J. Membrane Biol.* 71: 189-193.

- Parisi, M. and Wietzerbin, J. (1984). Cellular pH and the ADH induced hydrosmotic response in different target epithelia. *Pflügers. Arch.* 402: 211-215.
- Parisi, M.; Merot, J. and Bourguet, J. (1985). Glutaraldehyde fixation preserves the permeability properties of the ADH-induced channels. *J. Membrane Biol.* 86: 239-245.
- Parisi, M.; Wietzerbin, J. and Bourguet, J. (1986). Intracellular pH, transepithelial pH gradients and the ADH induced water channels. *Am. J. Physiol.* 370: 409-432.
- Parisi, M. and Cansela, L. (1988). Time course on phosphate transfer in frog urinary bladder. *Kidney Int.* 33: 58-63.
- Pelham, H.R.B. and Jackson, R.J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *European Journal of Physiology*, 243: C27-C34.
- Pfeffer, W. (1887). *Osmotic investigations.* Van Nostrand Reinhold, New York.
- Pietras R.J. and Wright E.M. (1975). The membrane action of antidiuretic hormone (ADH) on toad urinary bladder. *J. Membrane Biol.* 22: 107-123.
- Pisam, M.; Ripoche, P. and Corman, B. (1976). Redistribution of surface macromolecules in dissociated epithelial cells. *The Journal of Cell Biology* 71: 907-920.
- Porta, M.; Capurro, C. and Parisi, M. (1989). Water permeability in the human amnion: pH regulation of the paracellular pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 980: 220-224.
- Powell, D.; Berschneider, H.; Lawson, L. and Martens, H. (1985). Regulation of water and ion movement in intestine. *Microbial toxins and Diarrhoeal disease, Ciba Foundation Symposium* 112: 14-33.
- Raabe, M.A. and Mc Coshen, J.A. (1986). Epithelial regulation of prolactin effect on amniotic permeability. *Am. J. Obstet. and Gynecol.* 134: 130-134.
- Ross, M.G.; Ervin, M.G.; Leake, R.D.; Oakes, G.; Hobel, C. and Fisher, D.A. (1983). Bulk flow of amniotic fluid water in response to maternal osmotic challenge. *Am. J. Obstet. and Gynecol.* 147: 697-701.
- Sackim, H. and Boupaep, E.L. (1975). Model for coupling of salt and water transport. Proximal tubular reabsorption in *Necturus* kidney. *J. Gen. Physiol.* 66: 671-734.
- Sacktor, B. (1977). Transport in membrane vesicles isolated from the mammalian kidney and intestine. *Current Topics in Bioenergetics* 6: 39-82.

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schwartz, A.L.; Forster, C.S.; Smith, P.A. and Liggins, G.C. (1977). Human amnion metabolism. *Am. J. Obstet. and Gynecol.* 127: 470-474.
- Seeds, A.E. (1980). Current concepts of amniotic fluid dynamics. *Am. J. Obstet. and Gynecol.* 138: 575-586.
- Shi, L.B.; Brown, D. and Verkman, A.S. (1990). Water, proton and urea transport in toad bladder endosomes that contain the vasopressin-sensitive water channel. *The Journal of General Physiology* 95: 941-960.
- Sigel, E. (1990). Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *The Journal of Membrane Biology* 117: 201-221.
- Solomon, A.K.; Chasan, B.; Dix, J.A.; Lukacovic, M.F.; Toon, M.R. and Verkman, A.S. (1983). The aqueous pore in the red cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 414: 97-124.
- Solomon, A.K.; Chasan, B.; Dix, J.A.; Lukacovic, M.F.; Toon, M.R. and Verkman, A.S. (1984). The aqueous pore in the red cell membrane. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 414: 97-124.
- Solomon, A.K. (1986). On the equivalent pore radius. *J. Membrane Biol.* 94: 227-232.
- Soreq, H. (1985). The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 18: 199-238.
- Spring, K.R. (1983). Fluid transport by gallbladder epithelium. *J. Exp. Biol.* 106: 181-194.
- Staverman, A.J. (1951). The theory of measurement of osmotic pressure. *Rec. Trav. Chim.* 70: 344-352.
- Takahashi, T.; Neher, E. and Sakmann, B. (1987). Rat brain serotonin receptors in *Xenopus* oocytes are coupled by intracellular calcium to endogenous channels. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84: 5063-5067.
- Ussing, H.H. and Zerhan, 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 den Hoef, M.H.F.; Diens, W.J.A.G.; Hage, W.J. and Bluemink, J.G. (1984). The ultrastructural organization of gap junctions between follicle cells and the oocyte in *Xenopus laevis*. *The European Journal of Cell Biology* 33: 242-247.

- Van Heeswijk, M.P.E and Van Os, C.H. (1986). Osmotic water permeability of brush border and basolateral membrane vesicles from rat cortex and small intestine. *J. Membrane Biol.* 92: 183-193.
- Van Herendael, B.J.; Oberti, C. and Brosens, I. (1978). Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic transmission and scanning electron microscopic study. *Am. J. Obstet. and Gynecol.* 131: 872-880.
- Van't Hoff, J.H. (1887). Die rolle des osmotischen druckets in der analogie zwischen losungen und gasen. *Z. Physik. Chemie.*, 1: 481-493. A translation of this paper is in *Benchmark Papers Human Physiology*, vol. 12: Cell membrane permeability and transport.
- Vénien, C.; Aubri, M.; Crine, P. and Le Grimellec, C. (1988). Determination of brush border membrane vesicle orientation using monoclonal antibodies recognizing extracytoplasmic and cytoplasmic domains of neutral endopeptidase-24. II. *Analytical Biochemistry*, 174: 325-330.
- Verkman, A.S.; Dix, J.A. and Seifter, J.L. (1985). Water and urea transport in renal microvillus membrane vesicles. *The American Journal of Physiology* 248: F650-F655.
- Verkman, A.S.; Dix, J.A.; Seifter, J.L.; Skorecki, K.L.; Jung, C.Y. and Ausiello, D.A. (1985). Radiation inactivation studies of renal brush-border water and urea transport. *The American Journal of Physiology* 249: F806-F812.
- Verkman, A.S.; Weyer, P.; Brown, D. and Ausiello, D.A. (1989). Functional water channels are present in clathrin coated vesicles from bovine kidney but not from brain. *The Journal of Biology Chemistry* 264: 20608-20613.
- Whittembury, G.; Carpi Medina, P.; Gonzalez, E. and Linares, E. (1984). Effect of parachloromercurybenzene sulfonic acid and temperature on cell water osmotic permeability of proximal straight tubules. *Biochim. Biophys. Acta.* 775: 365-373.
- Whittembury, G.; Paz-Aliaga, A.; Biondi, A.; Carpi-Medina, P. and Linares, H. (1985). Pathways for volume flow and volume regulation in leaky epithelia. *Pflügers Arch.* 405: 517-522.
- Will, F.C.; Cortright, R.N.; DeLisle, R.C.; Douglas, J.G. and Hopfer, U. (1985). Regulation of amiloride-sensitive electrogenic sodium transport in the rat colon by steroid hormones. *Am. J. Physiol.* 248 (Gatrontest. Liver Physiol. 11): G124-G132.
- Worman, M.J and Field, M. (1985). Osmotic water permeability of small intestinal brush-border membranes. *J. Membrane Biol.* 87: 233-239.
- Wright, E.M.; Barry, P.H.; and Diamond, J.M. (1971). The mechanism of cation permeation in rabbit gall bladder. *J. Membrane Biol.* 4: 331-340.

- Wright, E.M. and Pietras, R.J. (1974). Routes of nonelectrolyte permeation across epithelial membranes. *J. Membrane Biol.* 17: 293-312.
- Wynn, R.M. (1972). Cytotrophoblastic specialization: an ultrastructure study of the human placenta. *Am. J. Obstet. and Gynecol.* 114: 339-343
- Zhang, R. and Verkman, A.S. (1990). Urea transport in freshly isolated and cultured cells from rat inner medullary collecting duct. *J. Membrane. Biol.* 115: 253-261.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

<u>FIGURA 1:</u> Representación esquemática de un epitelio ilustrando las posibles vías de pasaje para el agua	12
<u>FIGURA 2:</u> Representación esquemática de las capas no-mezcladas en la vecindad de una membrana o de un epitelio	14
<u>FIGURA 3:</u> Esquema propuesto para las posibles vías de intercambio entre el fluido amniótico y el plasma materno-fetal	18
<u>FIGURA 4:</u> Sistema de medición del flujo neto de agua	21
<u>FIGURA 5:</u> Registro minuto a minuto de los movimientos netos de agua (J_w) a través del amnion humano	26
<u>FIGURA 6:</u> Relación entre el flujo neto de agua y la diferencia de presión hidrostática aplicada .	27
<u>FIGURA 7:</u> Relación entre el flujo neto de agua y el gradiente osmótico aplicado del lado materno	28
<u>TABLA I:</u> Efectos de la acidificación del medio sobre las permeabilidades osmóticas e hidrostáticas	30
<u>FIGURA 8:</u> Efectos de la acidificación sobre los flujos netos de agua	31
<u>TABLA II:</u> Efectos del cambio de gradiente sobre las vías paracelular y transcelular	32
<u>FIGURA 9:</u> Efectos de la acidificación del medio sobre el J_w y el P_s	33
<u>TABLA III:</u> Efectos del pH sobre las mediciones teóricas y observadas del movimiento de agua transepitelial	36
<u>FIGURA 10:</u> Representación esquemática de la mucosa intestinal del intestino delgado de rata .	39
<u>FIGURA 11:</u> Esquema del dispositivo utilizado para la medición de los flujos unidireccionales en tejido entero	48

<u>FIGURA 12:</u> Resumen esquemático de la técnica de preparación de vesículas del ribete en cepillo del intestino de rata	51
<u>FIGURA 13:</u> Flujo neto de agua en función de la diferencia de presión hidrostática en el yeyuno de rata	53
<u>TABLA IV:</u> Permeabilidad hidrostática, permeabilidad osmótica, flujo neto de agua asociado al transporte y diferencia de potencial en el yeyuno de rata	54
<u>FIGURA 14:</u> Flujo neto de agua en función del gradiente osmótico aplicado	55
<u>FIGURA 15:</u> Flujo neto de agua y permeabilidad difusional en función del tiempo y de la acidificación serosa	56
<u>FIGURA 16:</u> Flujo neto de agua y permeabilidad al manitol en función del tiempo	57
<u>TABLA V:</u> Efectos de la acidificación del medio en yeyuno de rata	58
<u>FIGURA 17:</u> Flujo neto de agua en función del tiempo: Efectos de la acidificación utilizando diferentes soluciones de incubación	59
<u>FIGURA 18:</u> Coeficientes de transferencias para la D y L-glucosa en función del tiempo	62
<u>TABLA VI:</u> Coeficientes de transferencias para la D y L-glucosa en ratas controles y HKD	63
<u>FIGURA 19:</u> Coeficientes de transferencias para la D-glucosa y el Na en función del tiempo	64
<u>TABLA VII:</u> Estudio de los parámetros eléctricos en el yeyuno de rata	65
<u>FIGURA 20:</u> Captación de glucosa en vesículas del ribete en cepillo del yeyuno de rata	67
<u>FIGURA 21:</u> Captación de D-glucosa en vesículas de ratas HKD	68
<u>FIGURA 22:</u> Esquema del sistema de traducción del ARNm exógeno en ovocitos de anfibios	79
<u>FIGURA 23:</u> Efecto del tratamiento con colagenasa sobre la membrana de los ovocitos	82
<u>FIGURA 24:</u> Preparación del ARNm a partir de células de vejiga urinaria de anfibio	88
<u>FIGURA 25:</u> Inyección del ARNm en ovocitos de anfibios	90
<u>FIGURA 26:</u> Representación de la variación relativa de volumen de los ovocitos en función del tiempo en presencia de un gradiente hipotónico	94

<u>FIGURA 27:</u> Representación de la variación relativa de volumen de los ovocitos en función del tiempo en presencia de un gradiente hipertónico	95
<u>TABLA VIII:</u> Permeabilidades osmóticas de los ovocitos nativos en función del gradiente aplicado y de la presencia de ionóforos	96
<u>TABLA IX:</u> Variación del volumen inicial de los ovocitos en función del agregado de canales artificiales	97
<u>FIGURA 28:</u> % del eflujo de agua tritiada en función del tiempo en ovocitos incubados a 18°C .	98
<u>FIGURA 29:</u> % del eflujo de agua tritiada en función del tiempo en ovocitos incubados a 4°C .	99
<u>TABLA X:</u> Relación Pf/ Pd en ovocitos en presencia o ausencia de anfotericina B	100
<u>FIGURA 30:</u> Análisis electroforético de los polipéptidos sintetizados in vitro a partir del ARNm de vejiga urinaria de anfibio	102
<u>FIGURA 31:</u> Expresión del ARNm que codifica para los canales de agua	103
<u>TABLA XI:</u> Comparación de los valores de permeabilidad osmótica e hidrostática, flujo neto de agua asociado al transporte y diferencia de potencial en diferentes epitelios	110
<u>TABLA XII:</u> Cuadro comparativo de los valores de permeabilidad eléctrica y al agua en los epitelios estudiados	111