

ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE REGISTRO DE TRANSPORTE DE SODIO
TRANSEPITELIAL, EMPLEANDO COMO BIOMODELO LA PIEL DE *ELEUTHERODACTYLUS*
JOHNSTONEI

ELVER FELIPE DIAZ JIMENEZ

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACEUTICA
SANTIAGO DE CALI

2014

ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE REGISTRO DE TRANSPORTE DE SODIO
TRANSEPITELIAL, EMPLEANDO COMO BIOMODELO LA PIEL DE *ELEUTHERODACTYLUS*
JOHNSTONEI

ELVER FELIPE DIAZ JIMENEZ

TRABAJO DE GRADO

Director: SANTIAGO CASTAÑO PhD

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUIMICA FARMACEUTICA
SANTIAGO DE CALI

2014

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de grado fue un esfuerzo en el cual, de forma directa e indirectamente, participaron personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando fortaleza y animo tras momentos de adversidades y de triunfo.

Extiendo de manera fraternal mis más sinceros agradecimientos al Dr. Santiago Castaño por acompañarme en este arduo trabajo. A la Ing. Claudia L. Mosquera, por su apoyo, paciencia y enseñanzas antes y durante el desarrollo de este trabajo de grado. A Flavio Cerón por su atenta disposición para la orientación dentro del laboratorio de investigación. A la Dra. Alejandra Jerez por sus aportes en farmacología. Al Dr. Yoseth J. Ariza por sus valiosos aportes para entender y desarrollar la estadística de este trabajo de grado.

Gracias también a mi divertido y alocado grupo de investigación de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Salud de la universidad Icesi: Natalia Muriel, Camila Viteri, Aura Montenegro, Jaime Gutiérrez, entre otros.

A mis padres, hermana y mascotas, que me acompañaron durante esta travesía que significara la obtención de mi título profesional como Químico Farmacéutico, los cuales de forma incondicional soportaron mis malos momentos.

A todos mil gracias.

APROBADO POR:



Alejandra Jerez
Evaluador



Carlos A. Arango
Evaluador



Rafael Santiago Castaño
Director del Proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCION	11
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	12
2.1 PROBLEMA DE INVESTIGACION	12
2.2 MARCO TEORICO	13
2.2.1 Membrana plasmática. Estructura y función de las proteínas de membrana.	13
2.2.2 Movimiento de sustancias a través de la membrana	15
2.2.3 Bomba Na ⁺ ,K ⁺ ATPasa	18
2.2.4 Permeabilidad del agua a través de la membrana	19
2.2.5 Cámara de Ussing y epitelios polarizados.	21
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4. METODOLOGIA.....	25
4.1 Biomodelo.....	25
4.3 Plan de análisis estadístico.....	26
4.4 Lugar de investigación.....	26
4.5 Análisis bibliográfico.....	26
4.6 Soluciones y Reactivos	26
4.7 Aislamiento de piel <i>E. johnstonei</i>	27
4.8 Cámara de Ussing y sistema de registro	27
4.9 Cursos temporales control y fármaco en piel dorsal y ventral de <i>E. johnstonei</i>	27
4.10 Matriz lógica.....	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Sistema de registro y cámara de Ussing implementados	30
5.2 Metodología para aislamiento de piel de rana	32
5.3 Cursos temporales de corrientes de sodio	32
5.4 Análisis de los cursos temporales por prueba de rangos de Wilcoxon.	33

5.5	Análisis de cursos temporales por regresión lineal múltiple	34
6	DISCUSIÓN	36
7	CONCLUSIONES	38
8	RECOMENDACIONES.....	39
9	REFERENCIAS.....	40
10	Anexos.....	44
	Anexo 1 POE Disección y aislamiento de piel ventral y dorsal de <i>E. johnstonei</i>	44
	Anexo 2 POE Solución Ringer manitol pH 6,8	49
	Anexo 3 Cursos temporales de la CCC a nivel ventral y Dorsal con y sin Digoxina.	54

TABLA DE FIGURAS

FIG. 1 ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.	13
FIG. 2 PROTEÍNAS DE MEMBRANA.	14
FIG. 3 PROTEÍNAS TRANSMEMBRANAL.	14
FIG. 4 MECANISMOS BÁSICOS POR LOS CUALES SE DA LA MOVILIDAD DE SUSTANCIA.	15
FIG. 5 ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DEL CANAL DE SODIO (ENAC) IMAGEN DE: R.S. CASTAÑO.	17
FIG. 6 MECANISMOS DE TRANSPORTE ACTIVO. IMAGEN TOMADA DE: (ALBERTS, JOHNSON, LEWIS, RAFF , KEITH , & WALTER, 2004)	17
FIG. 7 BOMBA SODIO, POTASIO ATPASA.	18
FIG. 8 ÓSMOSIS.	20
FIG. 9 CÁMARA DE USSING BÁSICA, DIFERENCIA DE POTENCIAL Y TRANSPORTE DE IONES EN UN EPITELIO POLARIZADO.	21
FIG. 10 EJEMPLO DE CÁMARA DE USSING ACTUAL, ESQUEMA ELECTRÓNICO DE CCC Y CARACTERÍSTICAS DEL EPITELIO MODELO.	23
FIG. 11 <i>E. JOHNSTONEI</i> . IMAGEN TOMADA DE (KAISER, 1997)	25
FIG. 12 PIEL DORSAL DE <i>ELEUTHERODACTYLUS JOHNSTONEI</i>	25
FIG. 13 CÁMARA DE USSING ACOPLADA AL SISTEMA DE REGISTRO DE CORRIENTE DE CORTO CIRCUITO	30
FIG. 14 DETALLE DEL ESQUEMA DE CÁMARA DE USSING Y EL RECEPTÁCULO DE SOLUCIONES. DISEÑADOS PARA ESTE TRABAJO.	31
FIG. 15 FOTOGRAFÍAS DE DIFERENTES PLANOS DE LA CÁMARA DE USSING.	32
FIG. 16 PROMEDIO DE CURSOS TEMPORALES DEL FLUJO DE IONES DE Na ⁺ A NIVEL VENTRAL Y DORSAL CON Y SIN DIGOXINA EN (mA) Y ERRORES MEDIOS.	33

LISTA DE TABLAS

TABLA 1 FICHA TÉCNICA DE DIGOXINA GOTAS.	26
TABLA 2 MATRIZ LÓGICA	29
TABLA 3 PRUEBA DE WILCOXON PARA LOS CURSOS TEMPORALES A NIVEL DORSAL CON Y SIN DIGOXINA.	33
TABLA 4 PRUEBA DE WILCOXON PARA LOS CURSOS TEMPORALES A NIVEL VENTRAL CON Y SIN DIGOXINA.	34
TABLA 5 REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE DEL PROMEDIO DEL CURSO TEMPORAL A NIVEL DORSAL CON Y SIN DIGOXINA.	34
TABLA 6 REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE DEL PROMEDIO DEL CURSO TEMPORAL A NIVEL VENTRAL CON Y SIN DIGOXINA.	35
TABLA 7 CURSO TEMPORAL CONTROL DE EPITELIO DORSAL DE <i>E. JOHNSTONEI</i>	54
TABLA 8 CURSO TEMPORAL CON DIGOXINA DE EPITELIO DORSAL DE <i>E. JOHNSTONEI</i>	55
TABLA 9 CURSO TEMPORAL CONTROL DE EPITELIO VENTRAL DE <i>E. JOHNSTONEI</i>	56
TABLA 10 CURSO TEMPORAL CON DIGOXINA DE EPITELIO VENTRAL DE <i>E. JOHNSTONEI</i>	57
TABLA 11 PROMEDIOS DE LOS CURSOS TEMPORALES DEL FLUJO DE IONES DE Na^+ A NIVEL DE LOS EPITELIOS DE EVALUACIÓN CON Y SIN DIGOXINA.	58

RESUMEN

El integumento de anuros (ranas y sapos) solía ser el biomodelo clásico epitelial para la investigación preclínica de transporte de iones en el epitelio polarizado. Estos biomodelos epiteliales anuros permitieron estudiar los mecanismos moleculares y biofísicos para la absorción de sodio y agua. Tiempo después se encontró que en los vertebrados los epitelios gastrointestinales y el epitelio del túbulo renal, la absorción de sodio y agua tienen los mismos mecanismos que en el epitelio de rana.

Las técnicas utilizadas para estudiar el transporte en epitelios polarizados fueron desarrolladas por el zoólogo danés Hans Ussing, en la segunda mitad del siglo pasado. Hoy en día esta técnica permite registrar corrientes de iones, el efecto de las drogas en receptores diana implicados en el transporte de iones y la dosis efectiva de fármacos que modula el transporte de agua y de iones.

En Colombia no hay reportes de grupos de investigación, ni equipos y tecnología para el registro de corrientes iónicas a través de epitelios, y en la Universidad ICESI y la Universidad del Valle hay un interés científico en el establecimiento de una línea de estudios en el "transporte transepitelial". El objetivo principal de este trabajo consiste en el establecimiento de la técnica (clásicos) desarrollados por Ussing. Para probar la funcionalidad electrofisiológica de la piel de la rana *Eleutherodactylus johnstonei* para el desarrollo y el mejoramiento de la técnica antes mencionados.

Los experimentos con (ambos) piel dorsal y ventral de los epitelios *Eleutherodactylus johnstonei* mostraron que: Las corrientes registradas de los epitelios ventrales son 3 a 4 veces mayores que las corrientes de los epitelios dorsales. Se puede explicar por la adaptación que presentan las ranas para hidratarse mediante la exposición del tegumento ventral a fuentes de agua y el tegumento dorsal no tan permeable con el fin de evitar la pérdida de agua.

Ambos epitelios mostraron que cuando están expuestos a la digoxina, las corrientes netas disminuyeron. Los resultados con la digoxina son coherentes con el bloqueo de las bombas sodio, potasio de ATPasa epiteliales, como se informa en la literatura. Los resultados del experimento sugieren que el sistema experimental es un candidato para ser mejorado para los futuros estudios propuestos en la línea de los estudios en "transporte transepitelial".

Palabras claves: Bomba Na^+ , K^+ ATPasa - Solución Ringer - Cámara Ussing - Transporte de sodio.

ABSTRACT

The epithelial integument of Anurans (frogs and toads) used to be the classic epithelial biomodel for preclinical research of ion transport in polarized epithelia. These anuran epithelial biomodels allowed to study the biophysical and molecular mechanisms for the absorption of sodium and water. Time after was found that in vertebrates, the gastrointestinal epithelia and the epithelia of renal tubule, the sodium and water absorption have the same mechanisms as in frog epithelia.

The techniques used to study transport in polarized epithelia were developed by the Danish zoologist Hans Ussing, in the second half of the past Century. Today this technique allows to record ion currents and the effect of drugs on target proteins involved in ion transport and the effective dose of drugs that modulates water and ion transport.

Equipment and technology for recording ionic currents across epithelia are not being used or reported by research groups in Colombia. In Universidad ICESI and Universidad del Valle there is scientific interest in establishing a line of studies in "transepithelial transport". The main of this work is to stablish a classic set-up of the technique and a system developed by Ussing and to test the functionality of the system the skin of the frog *Eleutherodactylus johnstonei* for the further development and improvement of the technique.

The experiments with (both) dorsal and ventral epithelia of *Eleutherodactylus johnstonei* showed that:

The registered currents of the ventral epithelia are 3 to 4 folds higher than the dorsal epithelia currents. It can be explained by the adaptation in frogs to hidrate by exposing the ventral integument to water sources and the nonpermeable dorsal integument to avoid water loss.

Both epithelia showed that when are exposed to Digoxin, the net currents decreased. The results with Digoxin are coherent with the blocking of epithelial sodium potassium ATP pumps as is reported in the literature.

The experimental results suggest that the experimental system is a candidate to be improved for the future studies proposed in the line of studies in "transepithelial transport".

Keywords: Na⁺, K⁺ ATPasa - Ringer Solution – Ussing Chamber – Transport of sodium

1. INTRODUCCION

Muchos de los ensayos fisiológicos que se realizan asociados al transporte de agua transepitelial, son desarrollados mediante el uso de membranas celulares de epitelios intestinales y renales (Oltra Noguera, 2010), y en muchos casos en ensayos biofarmacéuticos en humanos (Rozebral, y otros, 2012). Debido a esto, que este proyecto busca establecer una metodología de aislamiento de piel ventral y dorsal de *E. johnstonei* (rana invasora), para la caracterización histológica del tejido que se empleara como biomodelo. Seguidamente, de acuerdo a las características morfológicas de la piel de *E. johnstonei*, se adaptará la piel a una cámara de Ussing que permita establecer un sistema de registro de las corrientes de sodio a través del epitelio.

Estudios anteriores sugieren que la piel de los anfibios se comporta de forma similar al epitelio del riñón en humanos en cuanto al flujo de sodio (Llinas & Pecht, 1976) (Oakley & Shafer, 1978). Ya que es sabido que los anfibios absorben y liberan agua a través del epitelio ventral y dorsal, mediante el uso de un conjunto de proteínas como: acuaporinas, la bomba Na^+ , K^+ ATPasa y canal de sodio (ENaC) (Alberts, Bruce; Bray, Dennis; Hopkin, Karen; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter, 2004). Manteniendo de esta forma el balance hidrostático del cuerpo, mediante procesos de difusión simple y osmosis a través del epitelio, riñones, vejiga y piel.

Debido a esto, las mediciones se realizaran con el fin de comparar los cursos temporales de corrientes de sodio a través del epitelio del biomodelo a nivel ventral y dorsal, mediante la utilización de soluciones equivalentes a las que se encuentran a nivel extracorpóreo e intracorpóreo del sistema biológico. Finalmente se evaluará la acción de Digoxina, que inhibe la Na^+ , K^+ ATPasa, produciendo un incremento de la concentración de Na^+ en el citoplasma, lo que origina una entrada extra de Ca^{2+} , por ende se da el efecto inotrópico positivo, pero también conduce a la disminución del paso de agua a través del epitelio (Mendoza Patiño, 2008).

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 PROBLEMA DE INVESTIGACION

Los centros de investigación especializados en el desarrollo de ensayos preclínicos para la evaluación de parámetros biofarmacéuticos de diferentes medicamentos asociados al transporte de agua transepitelial, han reportado metodologías en las que se utilizan biomodelos como matriz experimental. Estos protocolos hacen referencia a la utilización de epitelios renales e intestinales de diferentes especies animales, en las que se encuentran similitudes morfológicas y funcionales a las de los mamíferos (Guyton & Hall, 2001).

Por otro lado, estudios anteriores (Llinas & Pecht, 1976) sugieren que la piel de los anfibios se comporta de forma similar al epitelio del riñón en humanos en cuanto al transporte de agua. Debido a esto y teniendo en cuenta que Colombia es el primer país con mayor número de especies de anfibios en el mundo (Castro Herrera & Vargas Salinas, 2008), se propone como biomodelo para rescatar la técnica de Ussing la piel de *Eleutherodactylus johnstonei* (Urbina Cardona, 2011), especie que hasta la fecha ha mostrado un crecimiento exponencial en el país y el mundo.

Teniendo como base estos antecedentes y sabiendo que no se cuenta con un biomodelo de anfibio que permita la evaluación de la actividad de principios activos que actúan sobre procesos de transporte de iones en el riñón humano y conociendo de ante mano, la alta natalidad que tiene *E. johnstonei* presente en Santiago de Cali, este proyecto busca para el 2014 establecer un sistema de registro de corrientes de sodio transepitelial empleando como biomodelo la piel de *Eleutherodactylus johnstonei*. Un biomodelo de bajo costo con el cual científicos del área farmacéutica puedan medir la actividad de productos farmacéuticos cuyos principios activos estén asociados al transporte de agua transepitelial.

2.2 MARCO TEORICO

2.2.1 Membrana plasmática. Estructura y función de las proteínas de membrana.

Las células se encuentran rodeadas por una fina pero contundente barrera que regula la permeabilidad de las mismas conocida como membrana plasmática. Esta membrana separa el contenido celular de la solución diluida de sales en agua llamada liquido intersticial, o simplemente liquido tisular (Thibodeau & Patton, 2008).

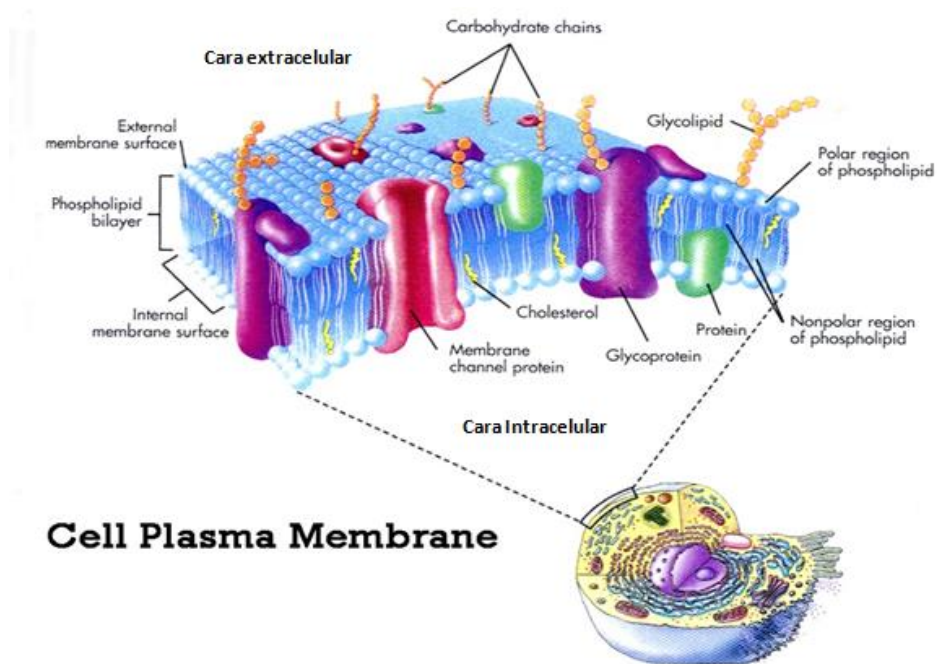


Fig. 1 Estructura de la membrana plasmática.

Esta es la versión actual que se presenta de la membrana plasmática que muestra la misma organización básica que propusieron Singer y Nicolson. Imagen tomada de: pulpbits.com

Como se puede observar en la **Fig. 1**, la bicapa lipídica es claramente el andamiaje de la membrana celular. Se trata de dos capas de moléculas de grasa con fosfato, llamadas fosfolípidos, las cuales forman el entramado fluido de la membrana plasmática. También cuenta con colesterol, el cual ayuda a estabilizar las moléculas de fosfolípidos, evitando de esta forma que se rompa la membrana.

La membrana plasmática no solo está constituida por lípidos, fosfolípidos y unas cuantas carbohidratos, sino también con proteínas a nivel transmembranal, periféricas y acopladas a lípidos por enlaces covalentes, las cuales varían dependiendo el tipo de célula **Fig. 2**. Cada

proteína de la membrana posee una orientación definida en relación con el citoplasma para que las propiedades de la superficie de la membrana sean muy distintas respecto de las de otras superficies que podemos encontrar en el organismo (Karp, 2009).

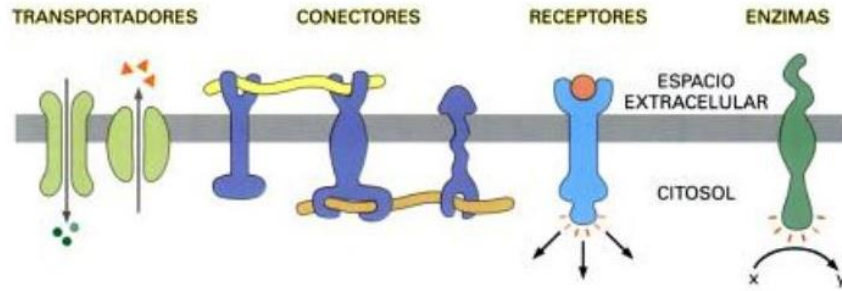


Fig. 2 Proteínas de membrana.

Proteínas de membrana asociadas funciones específicas del desarrollo vital celular (Alberts, Johnson, Lewis, Raff , Keith , & Walter, 2004).

Todas las proteínas cumplen funciones vitales para el desarrollo y funcionamiento de la célula, pero hay un selecto grupo como lo son las proteínas integrales de membrana, que se encarga de funciones como: ser receptores que se unen a sustancias específicas en la superficie de la membrana, como canales o transportadores implicados en el movimiento de iones y solutos a través de la membrana, o agentes que transfieren electrones durante los procesos de fotosíntesis y respiración. La **Fig. 3** muestra un esquema detallado de las formas en las cuales se pueden encontrar en la actualidad las proteínas que atraviesan la membrana.

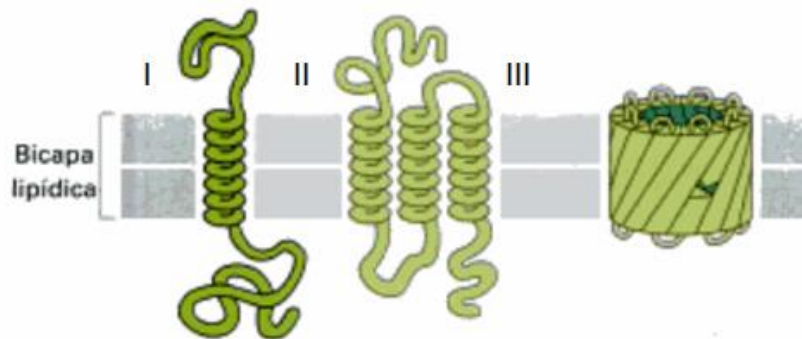


Fig. 3 Proteínas transmembranal.

La mayoría de las proteínas transmembranal atraviesan la bicapa como I) una hélice α única, II) múltiples hélices α o III) en forma de hebra β enrollada (un barril β) (Alberts, Johnson, Lewis, Raff , Keith , & Walter, 2004).

2.2.2 Movimiento de sustancias a través de la membrana

Como ya se mencionó, la membrana plasmática es la barrera que resguarda todas las organelas y sustancias que componen la célula. Esta a su vez, regula la comunicación entre la célula y el medio extracelular. Puesto que debe retener los materiales disueltos de la célula para que no escapen, mientras que por otro lado debe permitir el intercambio necesario de materiales entre el interior y exterior de la célula.

Existen dos formas descritas hasta el momento con relación al movimiento de sustancias a través de una membrana: dependientes e independientes de energía. **Las independientes de energía** obedecen procesos de difusión, mientras que las **dependientes de energía** necesitan de un mediador o una molécula de energía (ATP: Adenosín trifosfato) para cumplir a buen término con su función **Fig. 4**.

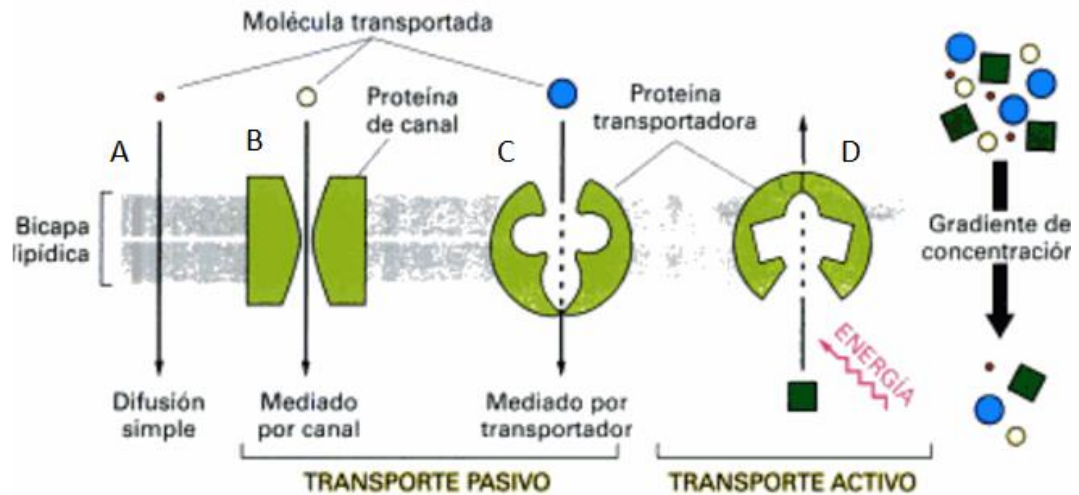


Fig. 4 Mecanismos básicos por los cuales se da la movilidad de sustancia.

- A) difusión simple a través de la bicapa, que siempre avanza de la mayor concentración a la menor. EJE: O_2 . B) Los canales iónicos son un ejemplo claro de difusión simple por un canal acuoso formado dentro de una proteína integral de membrana. Ejemplo: *Canal de sodio (ENaC)*. C) Es el caso de la difusión facilitada en la que las moléculas de soluto se unen de manera específica con un portador proteico en la membrana (transportador facilitador). Como en A y en B el flujo de un lado a otro se gracias a un gradiente. Ejemplo: *Glucosa*. D) Los procesos que son dependientes de energía toman el nombre de transporte activo, el cual se da mediante el uso de un transportador proteico con un sitio de unión específico que sufre un cambio en la afinidad y se impulsa con la energía que libera un proceso exotérmico, como lo es *la bomba Na-K ATPasa*. En el transporte activo ocurre una situación diferente comparado con el transporte pasivo, pues este va en contra de un gradiente de concentración. Imagen tomada de: (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Keith, & Walter, 2004)

La difusión es un proceso en el que una sustancia se mueve de una región de alta concentración a otra con baja concentración, lo que a la final elimina la diferencia de

concentración entre las dos regiones. El paso de sustancias a través de la membrana está asociado al movimiento térmico aleatorio de solutos y es un proceso exergónico, lo cual hace que el proceso tenga un cambio de entropía positiva (Vila, 2001).

En el caso de los electrolitos (especies con carga), se considera la diferencia de carga que se presenta en cada uno de los compartimentos de la membrana. Como resultado de la repulsión mutua entre iones con cargas no opuestas, el paso de un electrolito a través de la membrana de un compartimento a otro con carga neta del mismo signo es un cambio que no se ve favorecido termodinámicamente. Por otro lado, si la carga del electrolito es de signo contrario a la que tiene el compartimento hacia el cual se dirige, el proceso se ve favorecido termodinámicamente (Karp, 2009). Entre mayor sea la diferencia en la carga (diferencial de potencial o voltaje) entre ambos lados de la membrana, mayor es la diferencia de energía libre (Vila, 2001). En este orden de ideas, la tendencia de un electrolito para difundir entre dos compartimentos depende de dos gradientes: un gradiente químico determinado por la diferencia de concentración entre los dos compartimentos y un gradiente de potencial eléctrico, determinado por la diferencia en la carga (Karp, 2009).

Es por este motivo que la membrana plasmática se constituye como impermeable a las sustancias con carga, incluidos iones pequeños como Na^+ , K^+ , Ca^+ y Cl^- , flujo (**conductancia**) así el interior de la célula se ve alterado, lo que genera que múltiples procesos celulares se vean interrumpidos entre ellos: formación y propagación de un impulso nervioso, secreción de solutos hacia el espacio celular, entre otros (Karp, 2009). Debido a estas necesidades celulares se presentan los **canales iónicos**, los cuales son aberturas en la membrana que hace que estos iones puedan difundir hacia el interior de la célula. Los canales iónico son altamente selectivos y solo permiten el paso de un tipo particular de iones por el poro.

Uno de los canales iónicos dependientes de voltaje más importantes a nivel celular es el canal de sodio (**ENaC**) **Fig. 5**. Los ENaC son responsables de muchas funciones celulares, tales como el de permeabilizar membranas para el paso de iones con el fin de regular el transporte de agua. Los canales de sodio son una familia de 9 canales que se distribuyen en células diferentes dependiendo del órgano al cual hagan parte. El diámetro del poro de algunos canales ha sido medido a partir de la permeabilidad a iones de diferentes diámetros. El diámetro más estrecho del poro de una canal es llamado **filtro de selectividad**, y en el caso del canal de Na^+ es de aproximadamente $3,5 \text{ \AA}$, suficiente para dejar pasar un ion de Na^+ hidratado con una molécula de agua.

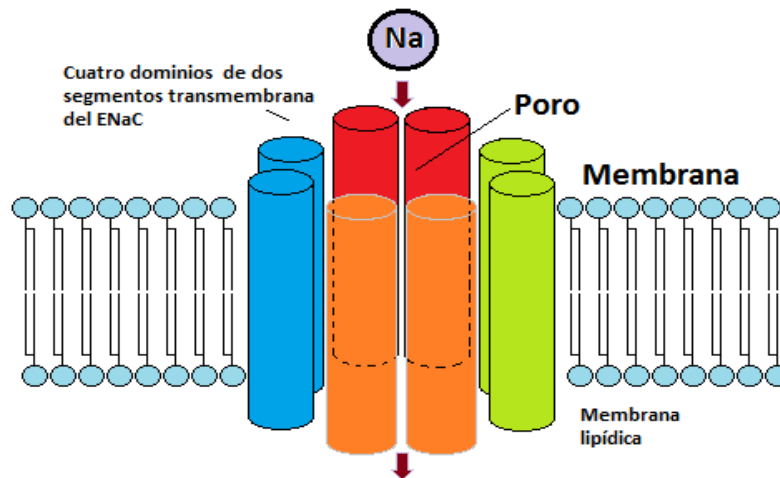


Fig. 5 Esquema de la estructura del canal de sodio (ENaC) Imagen de: R.S. Castaño.

Finalmente se tiene el transporte activo o transporte dependiente de energía. El transporte activo de solutos en contra del gradiente electroquímico es esencial para el mantenimiento de la composición iónica intracelular y para importar solutos que se encuentra en una menor concentración en el exterior que en el interior de las celular. Existen tres mecanismos principales de transporte activo a través de la membrana celular **Figura 6:** 1) los transportadores acoplados, 2) bombas impulsadas por ATP y 3) bombas impulsadas por la luz (Alberts, Johnson, Lewis, Raff , Keith , & Walter, 2004).

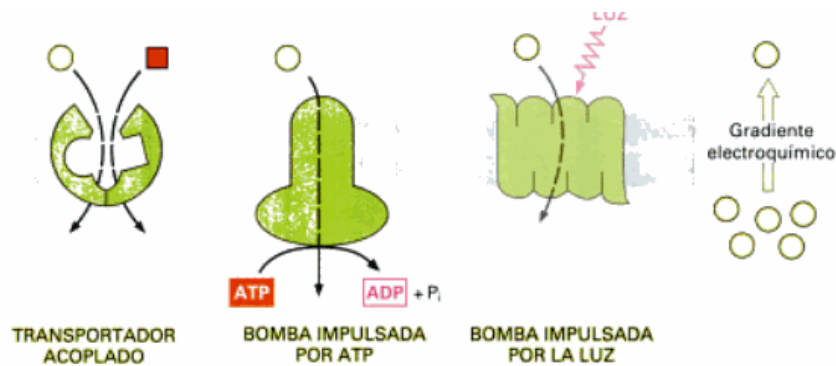


Fig. 6 Mecanismos de transporte activo. Imagen tomada de: (Alberts, Johnson, Lewis, Raff , Keith , & Walter, 2004)

El transporte activo requiere de la presencia de las denominadas “bombas” activadas por ATP o también conocidas como ATPasa, que usan la energía del ATP para mover iones y moléculas en contra de un gradiente electroquímico. Este transporte en especial permite la introducción de nutrientes al interior de la células, aunque estos se encuentren en una concentración más baja que en el citosol, también facilitan los procesos de secreción y de desecho hacia el medio y finalmente permite el mantenimiento de la concentración de iones de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Jiménez, 2006).

Las ATPasas más conocidas son las **bomba sodio y potasio** que se encuentran en casi todas las células animales y la H ATPasa que es responsable de la acidificación del jugo gástrico (Jiménez, 2006). En la membrana plasmática de una célula animal, una bomba impulsada por ATP transporta el Na^+ hacia el exterior de la célula en contra de su gradiente electroquímico y luego el Na^+ reingresa en la célula a favor de su gradiente. Dado que los iones Na^+ fluyen mediante transportadores acoplados al Na^+ , el ingreso de Na^+ en el interior de la célula impulsa el pasaje activo de muchas otras sustancias hacia el interior celular en contra de sus respectivos gradientes electroquímicos. De este modo, si la bomba de Na^+ dejara de funcionar, el gradiente de Na^+ desaparecería en un lapso breve y el transporte por transportadores acoplados al Na^+ se interrumpiría. En consecuencia, la bomba de Na^+ impulsada por ATP es vital para el transporte de membrana en las células animales.

2.2.3 Bomba Na^+, K^+ ATPasa

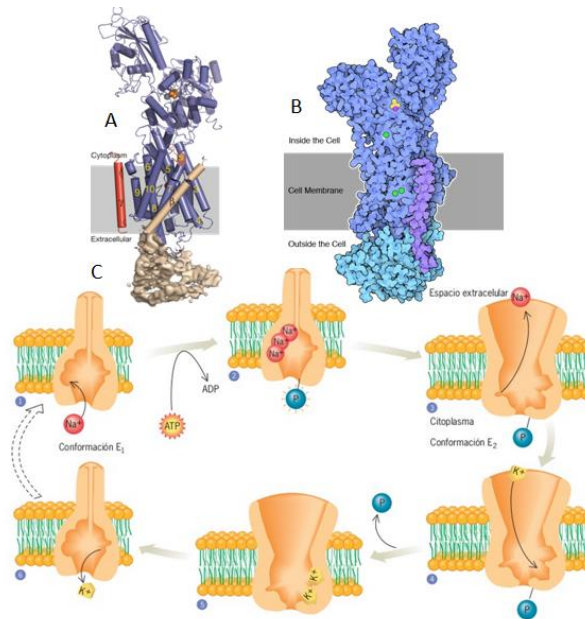


Fig. 7 Bomba sodio, potasio ATPasa.

A) En la figura a se puede ver la representación de la bomba Na-K ATPasa. Las subunidades α , β y γ son de color azul, el α donde las hélices están representadas por cilindros y las hebras β por flechas. Imagen tomada de: (Preben, y otros, 2007). B) Esquema de la bomba sodio y potasio a nivel intermembranal imagen tomada de: PDB 10.2210/rcsb_pdb/mom_2009_10. c) Modelo de funcionamiento de la bomba Na^+/K^+ ATPasa. Imagen tomada de (Karp, 2009).

El Na^+ y K^+ se mueven a través de la membrana plasmática de las células animales por medio de transporte activo, esto se efectúa mediante una estructura glicoproteína que se

encuentra inmersa en la matriz lipídica de la membrana celular **Fig. 7 A) y B)**. Descubierta por el fisiólogo danés Jens Skou en el año de 1957 en células nerviosas de cangrejo (Skou, 1998). Adicionalmente, tanto en glóbulos rojos humanos como en músculo esquelético de anfibio, se observó un incremento en la concentración de Na^+ intracelular cuando estas células se incubaban en soluciones libres de K^+ y una posterior recuperación de los niveles normales de sodio al incorporar potasio en el medio exterior (Latorre, Lopez, Bezanilla, & Linás, 1996).

El funcionamiento de la bomba básicamente se desarrolla en cinco pasos claves como se muestra en la **Fig. 7 c)** 1) el primer paso tiene que ver con la unión del sodio, 2) seguidamente, de cara al citoplasma se da la fosforilación del ATP, lo cual conlleva a un cambio conformacional de la glicoproteína, que 3) conlleva a que se transfiera el sodio a través de la membrana y lo libera en el exterior. 4) Posteriormente se da el acople del potasio a la cara extracelular y 5) la posterior desfosforilación devuelve la proteína a su conformación original, lo que 6) facilita la transferencia del potasio a través de la membrana y lo libera al citosol (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Keith, & Walter, 2004).

Hasta el momento muchos estudios han mostrado que la proporción entre Na^+/K^+ bombeados por la ATPasa no es 1:1, sino 3:2. En otras palabras, por cada ATP hidrolizado, se bombean tres iones de sodio hacia el exterior mientras se bombean dos iones de potasio al interior de la célula. Debido a esto, la Na^+/K^+ ATPasa es electrogénica, lo que significa que contribuye en forma directa a la separación de cargas a través de la membrana (Karp, 2009).

2.2.4 Permeabilidad del agua a través de la membrana

Las moléculas de agua se mueven con mucha rapidez a través de la membrana celular que los iones disueltos o los pequeños solutos orgánicos polares, que son incapaces de penetrar. Este proceso dependerá de varios factores: concentración de solutos de cada lado de la membrana, presencia de proteínas intermembranales, acuaporinas y ósmosis.

Los **canales de sodio** influyen notoriamente en el paso de agua, debido a que por cada ion de sodio que ingresa a la célula también ingresa una molécula de agua. Por otro lado tenemos las **acuaporinas**, las cuales son un grupo de canales que aparecen en la membrana de diferentes tipos de células, en especial células epiteliales. Las acuaporinas son primariamente monómeros pero siempre se asocian en tetrámeros. A través de estos pasan alrededor de 3×10^9 moléculas de agua por segundo.

Como se mencionó anteriormente, el agua se mueve con facilidad a través de una membrana semipermeable de una región con menor concentración de solutos. Este

proceso toma el nombre de *ósmosis*, el cual es fácil de entender con la **Figura 8** donde se utiliza una membrana sintética para explicar el fenómeno. Para entender cómo funciona este fenómeno se tendrá un tubo de ensayo en forma de U con una membrana selectiva permeable que separa dos soluciones de hidratos de carbono. Los poros de esa membrana son demasiado pequeños como para que pasen las moléculas de hidratos de carbono, pero no lo suficientemente pequeño para que una molécula de agua no pase. Es de esperarse que la solución con la mayor concentración de solutos tuviera la menor concentración de agua y que, por esta razón, el agua fluya hacia esta solución desde el otro lado. Sin embargo, en una solución diluida como la mayoría de las soluciones biológicas, los solutos no afectan de manera significativa a la concentración de agua. Por otro lado, el agrupamiento de las moléculas de agua alrededor de las moléculas de soluto hidrófilo determina que parte del agua no esté disponible para cruzar la membrana. Puesto que es la diferencia en la concentración de agua libre la que es importante. A la final, el agua se difunde a través de la membrana desde la región con menor concentración a la de mayor concentración (Campbell & Reece, 2007).

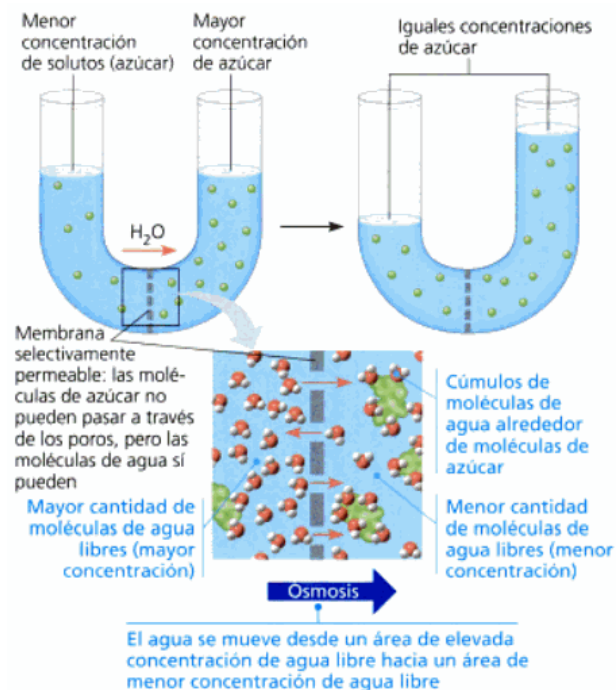


Fig. 8 Ósmosis.

Esquema que presenta dos soluciones de azúcar de diferentes concentraciones que se encuentra separadas por una membrana selectivamente permeable, a través de la cual puede pasar el solvente (agua) pero no el soluto (azúcar). Las moles de agua pueden difundir a través de la membrana con total facilidad desde la solución con menor concentración del soluto a la solución con mayor concentración de este. Con el tiempo, este proceso conlleva a que la concentración de un lado y del otro de la membrana sea equimolares. Imagen tomada de: (Campbell & Reece, 2007).

El movimiento del agua a través de las membranas celulares y el balance hídrico entre la célula y el ambiente son cruciales para los organismos, en especial de los anfibios, puesto que ellos regulan el balance hídrico del cuerpo a través del epitelio y bajo este mismo proceso fisiológico.

2.2.5 Cámara de Ussing y epitelios polarizados.

La membrana epitelial de los vertebrados es un arreglo estructural de células específicas que pueden hacer impermeable o semipermeable el paso de sustancias. Sustancias entre las que se pueden incluir, agua, electrolitos, pequeños azúcares y aminoácidos que selectivamente pueden cruzar el epitelio a través de proteínas selectivamente expresadas en un lado específico de las células de dicho epitelio. Esto se debe a la distribución selectiva de los sistemas de bombeo y transporte de sustancias, por la cual se le dio el nombre de “epitelios o membranas polarizadas”. El transporte de agua es un ejemplo de estos procesos mediante epitelios polarizados, que permiten absorber agua e iones mediante los epitelios dérmicos externos de los peces y anfibios, y los epitelios gastrointestinales y renales de los vertebrados.

Para estudiar el paso de iones, Hans H. Ussing en 1949 publica *Acta Physiol* 17:1 y en 1951 *Acta Physiol Scand* 23:110-127 en las que reporta el diseño de una cámara compuesta por dos compartimentos de plástico separados entre sí, los cuales permiten colocar entre ambos un epitelio aislado, como se muestra en la **Fig. 9 A)** donde se puede medir la diferencia de potencial entre ambas caras del epitelio, poniendo a prueba diferentes sustancias introducidas por A y B.

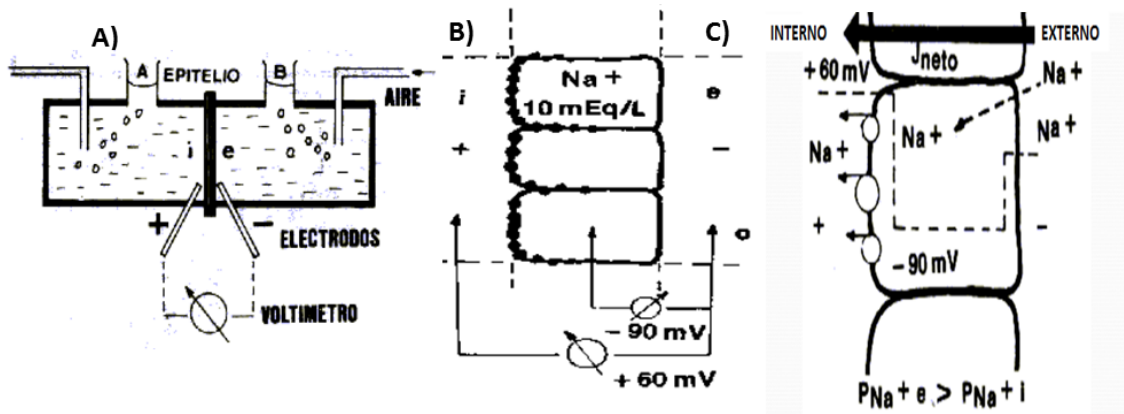


Fig. 9 Cámara de Ussing Básica, Diferencia de potencial y Transporte de iones en un epitelio polarizado

A) Cada una de las cámaras están sostenidas por un soporte. Los electrodos permiten conectar un voltímetro que permite medir la diferencia de potencial entre la cara interna (i) y la externa (e) del epitelio. El aire es para mantener el tejido oxigenado. **B)** Este esquema muestra en puntos negros la localización de la bomba

Na^+ , K^+ ATPasa en la cara (i) de la célula en el epitelio. La diferencia de potencial entre las dos caras del epitelio es diferente al potencial intercelular (ic). Esto se encuentra asociado al gradiente de iones que se encuentra del (i), (e) y (ie) de la célula. **C** Se esquematiza el flujo de Na^+ por medio de la línea punteada. El Na^+ entra por la cara externa a favor de su gradiente electroquímico, dada la alta permeabilidad de la membrana. Sale por la cara (i) por transporte activo por acción de la Na^+ , K^+ ATPasa. Imagen tomada de (Montoreano, 1995)

Los primeros experimentos mediante la aplicación de esta técnica, se realizó con epitelio aislado de anuros, tejido que por estudios anteriores se sabía que presentaba una diferencia de potencial (DP) eléctrico entre caras entre 50 y 100 mV, y que también transportaba Na^+ desde la cara externa a la interna. Los hallazgos iniciales reportaron: la diferencia de potencial es mayor a 60 mV, hay un flujo neto de Na^+ del lado externo al interno, aun en ausencia de gradiente de concentración y potencial eléctrico.

Estudios que trajeron como conclusión que en el lado intracorpórea se tenía un potencial de 60 mV, en el lado extracorpórea es cero y que el interior de la célula -90 mV **Fig. 9 B**). Estos resultados se sustentan en la concentración intracelular de Na^+ es 10 mEq/L, lo cual genera un gradiente electroquímico que hace que entre Na^+ a la célula y que por medio de la bomba de Na^+ , K^+ ATPasa expulse hacia el lado extracorpóreo 3 moléculas de Na^+ e introduzca al interior de la célula dos moléculas de K^+ **Fig. 9 C**).

Actualmente en el mercado es fácil encontrar compañías que venden dispositivos que cuentan con sistemas electrónicos integrados, que permiten el estudio de propiedades bioeléctricas como: diferencia de potencial y corrientes eléctricas transepiteliales, facilitando la evaluación de un sin número de epitelios **Fig. 10 A**). Aparte de la cámara de la **Fig. 10 B**), las nuevas cámaras de Ussing vienen con un sistema electrónico que vienen acoplado con una fuente de energía continua, la cual va conectada a las soluciones intra y extra corpórea por medio de unos electrodos (ec) de AgCl. Este sistema electrónico cuenta con un multímetro de resistencia variable que permite reducir a cero la diferencia de potencial entre ambas caras del epitelio, medida en el voltímetro, mediante la aplicación de un voltaje igual y contrario. De esta forma no fluye corriente a través de la vía pasiva, de manera que toda la corriente que fluye por la vía activa fluye ahora por la vía externa del epitelio, la cual es registrada por el amperímetro, y será exactamente igual a la aportada por los iones de sodio transportados activamente, la cual toma el nombre de **Corriente de Corto Circuito (CCC)**.

La persistencia del flujo de sodio a través de la preparación en estas condiciones, en las cuales se han abolido las fuerzas capaces de impulsar iones pasivamente: como son las diferencias de potencial eléctrico, de concentración y de presión hidrostática, indica que el ion sodio es transportado por un proceso independiente de estas fuerzas y que es, por tanto, un proceso activo y como tal requiere energía derivada de la actividad metabólica celular como se ha demostrado por estudios bioquímicos (Herrera, 2005).

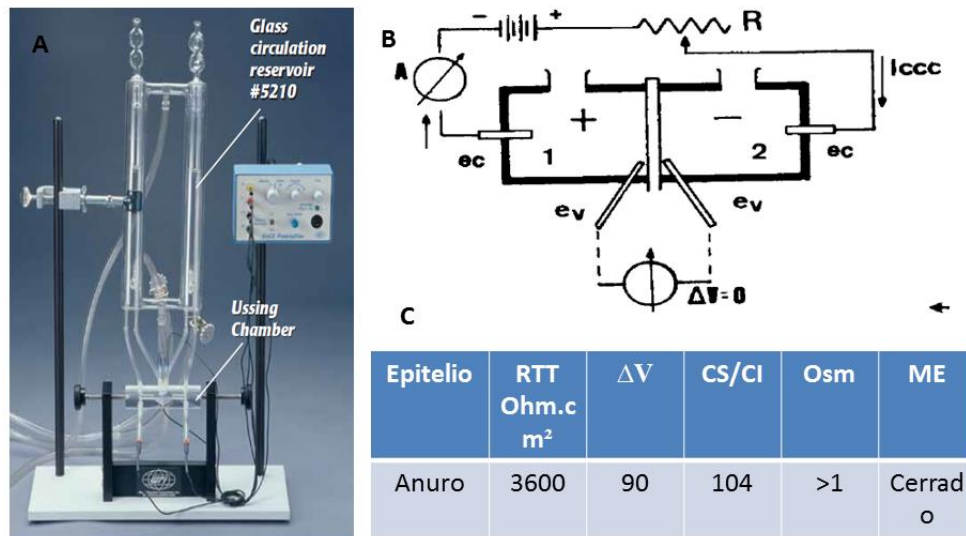


Fig. 10 Ejemplo de cámara de Ussing actual, esquema electrónico de CCC y características del epitelio modelo.

En la Fig. 10 se muestra un montaje de Ussing System: Esquema que cuenta con unos reservorios para soluciones, un sistema de electrónico con acople de fuente de energía continua y sistema de bombeo de gases. Imagen tomada de: World Precision Instruments. B) Esquema para la medición del flujo neto de iones de Na⁺ bajo la técnica de CCC. Imagen tomada de: (Montoreano, 1995) y C) Características del epitelio de rana: RTT: Resistencia total transepitelial; ΔV diferencia de potencial; CS/CI: Relación máxima de concentración compatible con transporte activo (Cs: lado seroso – CI: Lado luminal); Osm: Osmolaridad relativa del líquido transportado; 1ME: tipo de epitelio al microscopio.

¹ De acuerdo a las variaciones que se presentan en la DP en diferentes tipos de epitelios se estableció una clasificación de los mismos. **Abiertos**: Son los de baja resistencia, alta permeabilidad, bajo potencial y poca capacidad de mantener gradientes. También conocidos como **LEAKY** (Epitelios con pérdida). **Cerrados**: Son los que poseen alta resistencia, alta permeabilidad, alto potencial y con buena capacidad de mantener gradientes. Conocidos también **TIGHT** (estrecho y apretado).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Adaptar y establecer un sistema de registro que permita registrar corrientes de sodio a través del epitelio de la rana *Eleutherodactylus johnstonei*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Establecer una metodología para el aislamiento de la piel como órgano aislado fresco de *E. johnstonei* para ser empleada en experimentación.
- 3.2.2 Adaptar un sistema de registro y una cámara de Ussing para registrar corrientes sodio en piel de *E. johnstonei*.
- 3.2.3 Comparar los cursos temporales de corrientes de sodio, en piel dorsal y ventral de *E. johnstonei* con y sin un fármaco que module el transporte de sodio.

4. METODOLOGIA

4.1 Biomodelo

Para este proyecto de investigación desarrollado, se escogió como biomodelo *Eleutherodactylus johnstonei* Fig. 11, que es una rana que está invadiendo Colombia. Esta pertenece a la familia *Leptodactylidae*, más conocida como Co-qui, que hace referencia al canto que producen los machos para cortejar y aparearse. Esta rana es nativa de las Antillas menores y es la segunda especie de anuro más ampliamente distribuido en el mundo. Su introducción se dio de manera accidental al sur América y otras islas del caribe y el pacifico, debido al tráfico de flora para uso ornamental (Kaiser, 1997). La longitud de estos individuos adultos puede variar entre 2 y 5 cm en etapa adulta (Castillo Caicedo & Montes Diaz, 2012), y el área promedio de piel a nivel dorsal o ventral puede estar alrededor de 1,32 cm² ver Fig. 12.



Fig. 11 *E. johnstonei*. Imagen tomada de (Kaiser, 1997)



Fig. 12 Piel dorsal de *Eleutherodactylus johnstonei*.

4.3 Plan de análisis estadístico

Como ya se mencionó, para desarrollar este proyecto se propuso el epitelio dorsal y ventral de *E. johnstonei* de 4 individuos adultos. Con cada piel se hicieron los experimentos clásicos de Ussing como se exponen en los artículos (Oakley & Schafer, *Experiemntal Neurobiology*, 1978) (Herrera, 2005) donde se registraron los cursos temporales de las corrientes de corto circuito de ambos epitelios de estudio. Los registros de corriente se hicieron con una frecuencia de adquisición de 1 Hz durante 25 min. Para un total de datos (n) de 25 por cada piel, es decir 100 datos analizados en total. Finalmente, se realizó una regresión lineal múltiple mediante el método de mínimos cuadrados y una prueba no paramétrica para datos apareados en el tiempo llamada prueba de rangos de Wilcoxon, análisis estadístico que se llevó a cabo mediante la utilización del software STATA.

4.4 Lugar de investigación

El proyecto de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de investigación de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Icesi, ubicada en Santiago de Cali, Colombia.

4.5 Análisis bibliográfico

A lo largo de este proyecto se hizo un análisis bibliográfico, de las técnicas y procedimientos realizados hasta el momento con relación a la Cámara de Ussing.

4.6 Soluciones y Reactivos

Se utilizaron dos soluciones: Ringer manitol y una mezcla de digoxina, DMSO y Ringer de anfibio. Para la elaboración del Ringer manitol (NaCl 135 mM, KCl 10mM, Manitol 10mM), la fabricación de la solución se registró en el *POE Ringer de Manitol pH 6,8 (Ver Anexo 1)*.

Tabla 1 Ficha técnica de digoxina Gotas.

Nom. Genérico	β-metildigoxina
Nom. Comercial	Digoxina (Lanitop)
For. Farmacéutica	Gotas

Laboratorio	ROCHE
Dosis	0.6mg/mL
Lote	C123007
Reg. INVIMA	2008 M-010146 R-2
FV	Julio 2015

Para las pruebas con Digoxina se fabricó un vehículo a partir de dimetil sulfoxido (DMSO) 0,1 % y Ringer de manitol pH 6.8. c.s.p. La concentración de digoxina se calculó de acuerdo al peso de los especímenes, los cuales oscilaron entre 0,5023 y 1,8903 g, con base en esto se aplicó la siguiente ecuación para estipular la dosis; 1,35 mg/Kg/día (Svensson , Azarbayani, Backman, Matsumoto, & Christofferson, 2005).

4.7 Aislamiento de piel *E. johnstonei*

Para el aislamiento de la piel ventral y dorsal, se puso en práctica la metodología estructurada en el *POE Disección y aislamiento de piel ventral y dorsal de Eleutherodactylus johnstonei (Anura: Eleutherodactilidae (Llinas & Pecht, 1976))* (Diaz Cervera & Torres Escalante, 2012) **Anexo 2.**

4.8 Cámara de Ussing y sistema de registro

Basados en trabajos anteriores con cámara de Ussing, se diseñó un montaje de acuerdo al área y requerimientos de preservación del epitelio ventral y dorsal de *E. johnstonei* para su posterior experimentación.

4.9 Cursos temporales control y fármaco en piel dorsal y ventral de *E. johnstonei*.

El registro control de corrientes con epitelio ventral y dorsal de *E. johnstonei*, se efectuó llenando con el mismo volumen ambos compartimentos de la cámara de Ussing con Ringer manitol a pH 6,8. Una vez llenados cada uno de los compartimentos, tras verificar la diferencia de potencial transmembrana, este potencial era llevado a cero mediante la aplicación de un potencial de igual valor y con signo opuesto (la corriente de corto circuito).

Esto se logró mediante una fuente de voltaje variable que estaba conectada a dos electrodos en la cámara y que a su vez estaban conectados en serie con un Amperímetro.

Este amperímetro registraba la corriente de iones (desde el potencial ajustado a cero) y simultáneamente transformaba los datos digitales y los transfería a un computador para su almacenamiento y posterior análisis. El curso temporal de la corriente corresponde al transporte de sodio a través del epitelio desde el inicio del experimento a potencial transmembrana cero hasta completar aproximadamente 25 minutos de registro tomando datos a una frecuencia de muestreo de 1Hz (aproximadamente).

Para el registro con el fármaco de estudio, se realizó un ensayo inicial con Ringer manitol a pH 6,8, seguidamente es bañado el epitelio con la solución de Digoxina-DMSO por un minuto. Posteriormente es lavado el epitelio, cámara de Ussing, mangueras y electrodos con Ringer manitol a pH 6,8 tres veces. Finalmente, se repite el registro tal cual como se efectuó con el ensayo control.

4.10 Matriz lógica

Tabla 2 Matriz Lógica

<p>Objetivo general</p>	<p>Adaptar y establecer un sistema de registro que permita registrar corrientes de sodio a través del epitelio de la rana <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>.</p>		
<p>Objetivo específico</p>	<p>Actividad</p>	<p>Indicador</p>	<p>Supuesto</p>
<p>Establecer una metodología para el aislamiento de la piel como órgano aislado fresco de <i>E. johnstonei</i> para ser empleada en experimentación.</p>	<p>Aislamiento de pieles de <i>E. johnstonei</i>.</p>	<p>Establecer un POE para la disección y aislamiento de piel ventral y dorsal de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>.</p>	<p>Terrario, estereoscopio, equipo de disección, batería para fijación e inclusión de tejidos, micrótomo.</p>
<p>Adaptar un sistema de registro y una cámara de Ussing para registrar corrientes sodio en piel de <i>E. johnstonei</i>.</p>	<p>Diseño y fabricación de una cámara de Ussing de acuerdo al epitelio del anfibio de estudio.</p>	<p>Cámara de Ussing para medir transporte de agua en piel de <i>E. johnstonei</i>.</p>	<p>Cámara de Ussing, software Mas-View 1.1, multímetros.</p>
<p>Comparar los cursos temporales de corrientes de sodio, en piel dorsal y ventral de <i>E. johnstonei</i> con y sin un fármaco que module el transporte de sodio.</p>	<p>Medir corrientes de sodio utilizando como solución de control Ringer manitol a pH 6,8 y</p>	<p>Registro comparativo de los cursos temporales con y sin Digoxina.</p>	<p>Cámara de Ussing adaptada al epitelio de <i>E. johnstonei</i></p>

5. RESULTADOS

5.1 Sistema de registro y cámara de Ussing implementados

La cámara de Ussing se diseñó de acuerdo al diámetro de la piel a nivel ventral y dorsal del *E. johnstonei* y los requerimientos del ensayo, la cual fue acoplada a un sistema de registro de corriente de corto circuito ver Fig. 13.

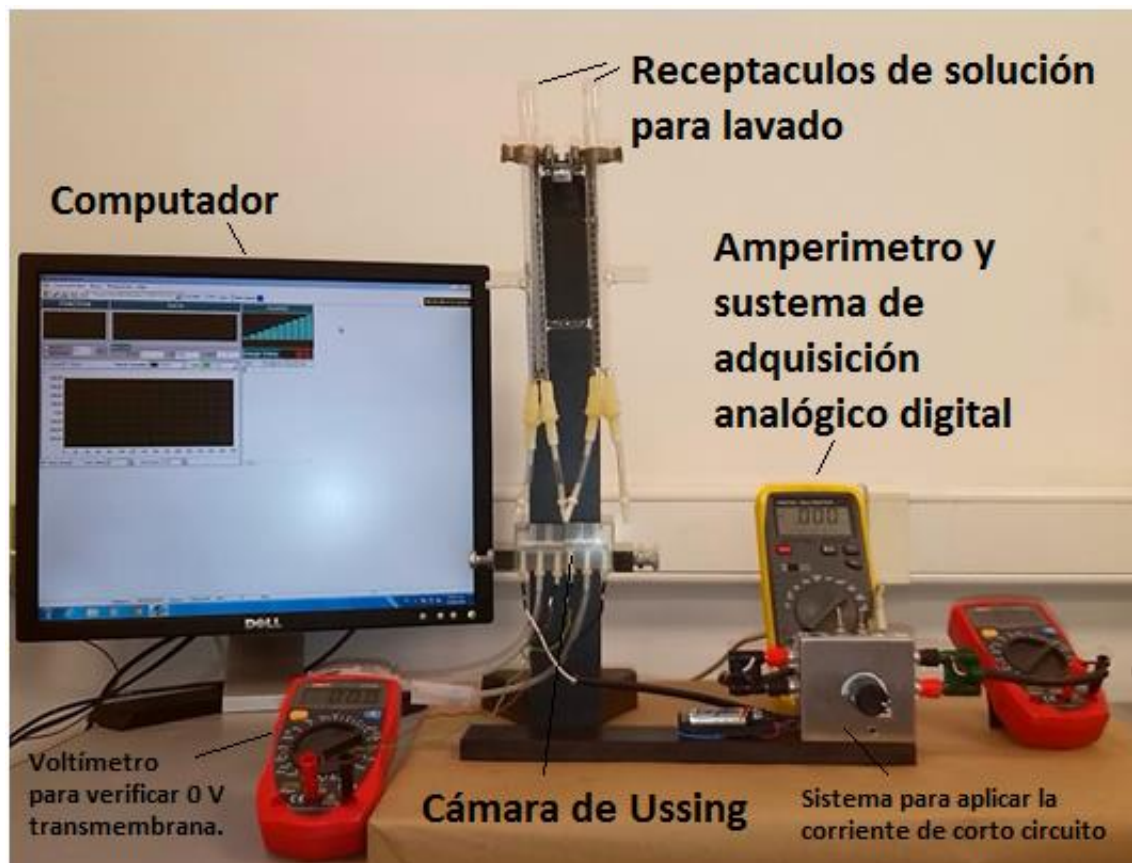


Fig. 13 Cámara de Ussing acoplada al sistema de registro de corriente de corto circuito

En la Fig. 13 se puede observar la cámara de Ussing diseñada y fabricada para este proyecto de grado.

Esta cámara cuenta con 6 aberturas por cada compartimento que tiene la cámara: Fig. 12 a) 1) Dos aberturas superiores, que permiten la conexión de dos líneas de flujo de soluciones que vienen desde un dispositivo volumétrico (Capacidad de 16 mL) en vidrio con forma de U, 2) Tres aberturas inferiores, que permiten conectar dos electrodos de AgCl y un sistema de vaciamiento de soluciones controlados por llaves, finalmente b) Una

abertura lateral de 0.79 cm de diámetro, la cual es el punto de comunicación entre los dos compartimentos de la cámara de Ussing por medio del epitelio espécimen de estudio. Cuenta con un **c)** sistema de sujeción por medio de tornillos, los cuales se encuentran anclados a un montaje de madera tal como se puede observar en la **Fig. 13**.

Finalmente, el sistema electrónico consta de: electrodos de AgCl, un suministro de corriente a partir de una batería AA de 1.6 voltios de manera independiente, tres multímetros (2 UNI-T UT33C y 1 Digital Multimeter; Erasmus EMS-90 con software Mas-View 1.1) que permiten medir: el estado energético de la batería en voltios, la diferencia de potencial del epitelio y el flujo de corriente en corto circuito en mA (ver **Fig. 13** y diagrama del circuito **Fig. 12 d)**).

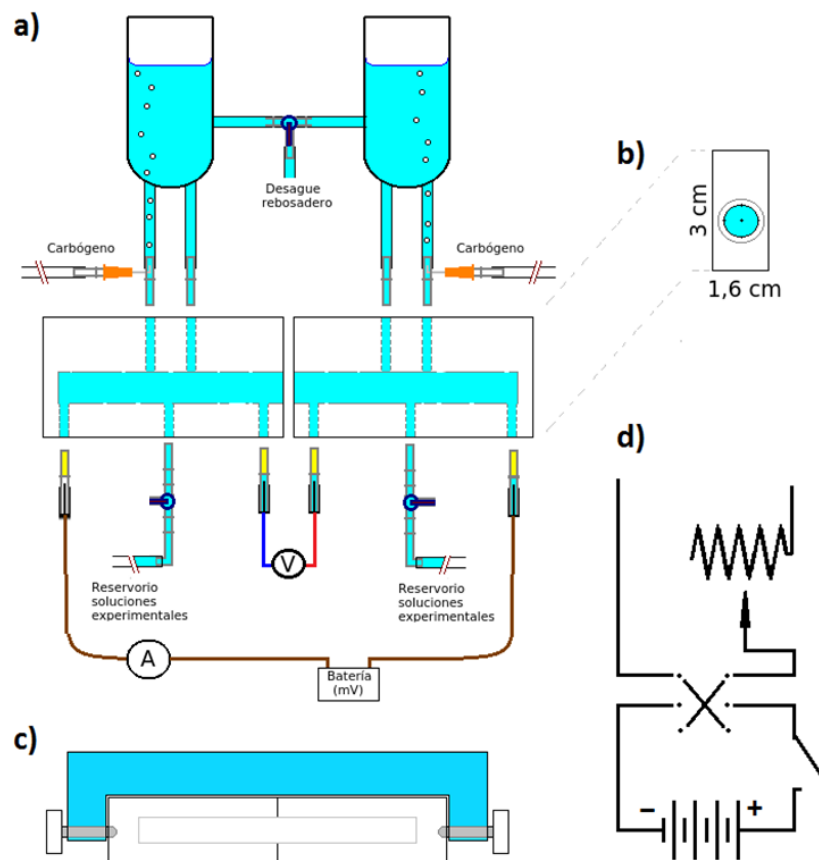


Fig. 14 Detalle del esquema de cámara de Ussing y el receptáculo de soluciones. Diseñados para este trabajo.

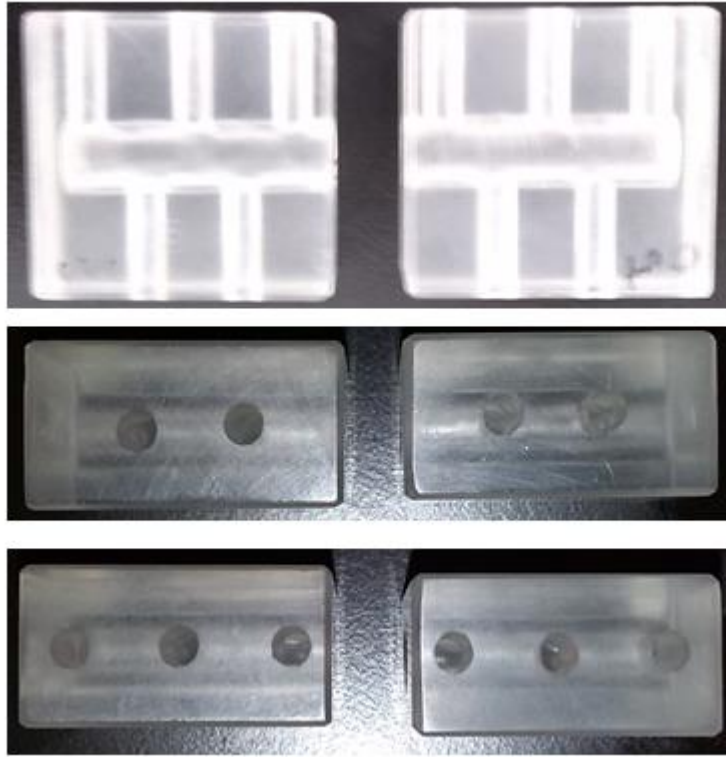


Fig. 15 Fotografías de diferentes planos de la cámara de Ussing.

Imagen del Centro Dos aberturas, que permiten la conexión de dos líneas de flujo de soluciones que vienen desde un dispositivo volumétrico en vidrio con forma de U, **Imagen Abajo** Tres aberturas inferiores, que permiten conectar dos electrodos de AgCl (Multímetros) y un sistema de vaciamiento de soluciones controlados por llaves (**Ver Fig. 14**)

5.2 Metodología para aislamiento de piel de rana

Para el aislamiento de la piel ventral y dorsal, se puso en práctica la metodología estructurada en el *POE Disección y aislamiento de piel ventral y dorsal de Eleutherodactylus johnstonei (Anura: Eleutherodactilidae)*. (Ver **Anexo 2**).

5.3 Cursos temporales de corrientes de sodio

Se registraron los cursos temporales sin y con Digoxina de cuatro individuos diferentes (ver **Anexo 3**). Con los datos obtenidos se sacaron los promedios (ver **Tabla 8.**) con los cuales se realizaron los análisis estadísticos.

A continuación se muestra de forma gráfica la diferencia de los flujos de iones de Na^+ a nivel dorsal y ventral con y sin digoxina (ver Fig. 16).

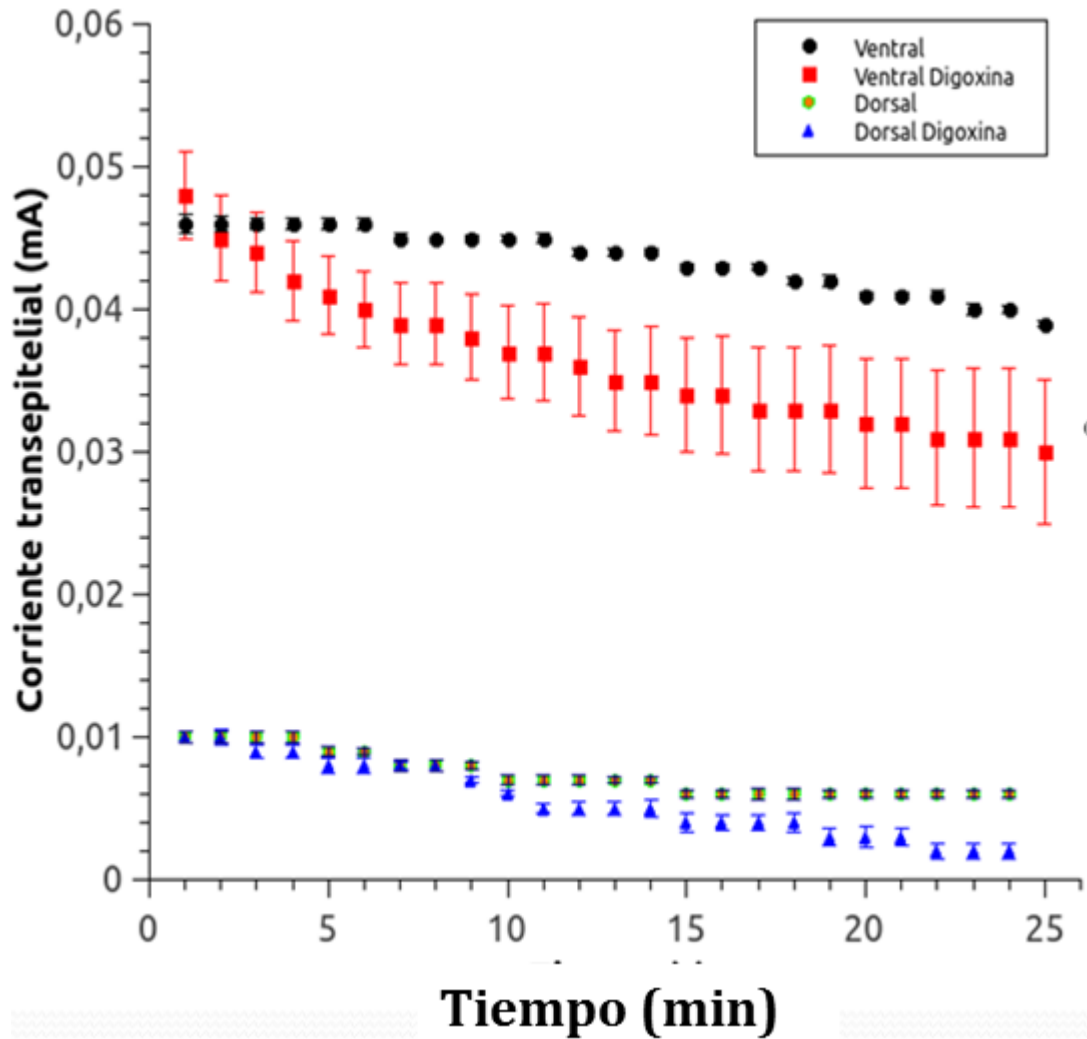


Fig. 16 Promedio de cursos temporales del flujo de iones de Na^+ a nivel ventral y dorsal con y sin Digoxina en (mA) y errores medios.

5.4 Análisis de los cursos temporales por prueba de rangos de Wilcoxon.

Para probar la diferencia en las medias poblacionales que se presentan en los rangos evaluados a nivel ventral y dorsal con y sin digoxina, se corrió la prueba de Wilcoxon con el software STATA. (Ver **Tabla 3 y 4**).

Tabla 3 Prueba de Wilcoxon para los cursos temporales a nivel dorsal con y sin digoxina.

```

-> Loc_Anatomica = Dorsal
wilcoxon signed-rank test

      sign |      obs   sum ranks   expected
-----+-----
      positive |         1         4       150
      negative |        23       296       150
      zero     |         0         0         0
-----+-----
      all |         24       300       300

unadjusted variance    1225.00
adjustment for ties      0.00
adjustment for zeros      0.00
-----
adjusted variance      1225.00

Ho: Corriente_Control = Corriente_Digoxina
      z = -4.171
Prob > |z| = 0.0000

```

Tabla 4 Prueba de Wilcoxon para los cursos temporales a nivel ventral con y sin digoxina.

```

-> Loc_Anatomica = Ventral
wilcoxon signed-rank test

      sign |      obs   sum ranks   expected
-----+-----
      positive |         1         2       162.5
      negative |        24       323       162.5
      zero     |         0         0         0
-----+-----
      all |         25       325       325

unadjusted variance    1381.25
adjustment for ties      0.00
adjustment for zeros      0.00
-----
adjusted variance      1381.25

Ho: Corriente_Control = Corriente_Digoxina
      z = -4.319
Prob > |z| = 0.0000

```

5.5 Análisis de cursos temporales por regresión lineal múltiple

Por medio de una regresión lineal múltiple se describió el comportamiento de la CCC (variable dependiente) a nivel dorsal y ventral con y sin digoxina a través el tiempo en minutos (variable independiente). En las corridas con STATA se denominó el epitelio dorsal y ventral por `Loc_Anatomica==1` y `Loc_Anatomica==2` respectivamente. De igual forma a los ensayos control y con medicamento se denominó `Intervención==0` e `Intervención==1` respectivamente. (Ver **Tabla 5 y 6.**)

Tabla 5 Regresión lineal múltiple del promedio del curso temporal a nivel dorsal con y sin digoxina.

```
. regress Corriente_mA Tiempo if Loc_Anatomica==1 & Intervencion==0
```

Source	SS	df	MS	Number of obs =
Model	.000153109	1	.000153109	24
Residual	4.2629e-06	22	1.9377e-07	F(1, 22) = 790.17
Total	.000157372	23	6.8423e-06	Prob > F = 0.0000
				R-squared = 0.9729
				Adj R-squared = 0.9717
				Root MSE = .00044

Corriente_mA	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
Tiempo	-.0003649	.000013	-28.11	0.000	-.0003918 -.000338
_cons	.0101161	.0001855	54.54	0.000	.0097315 .0105008


```
. regress Corriente_mA Tiempo if Loc_Anatomica==1 & Intervencion==1
```

Source	SS	df	MS	Number of obs =
Model	.000052427	1	.000052427	24
Residual	3.7485e-06	22	1.7039e-07	F(1, 22) = 307.69
Total	.000056175	23	2.4424e-06	Prob > F = 0.0000
				R-squared = 0.9333
				Adj R-squared = 0.9302
				Root MSE = .00041

Corriente_mA	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
Tiempo	-.0002135	.0000122	-17.54	0.000	-.0002388 -.0001883
_cons	.0099907	.0001739	57.44	0.000	.00963 .0103513

Tabla 6 Regresión lineal múltiple del promedio del curso temporal a nivel ventral con y sin digoxina.

```
. regress Corriente_mA Tiempo if Loc_Anatomica==2 & Intervencion==0
```

Source	SS	df	MS	Number of obs =
Model	.000536495	1	.000536495	25
Residual	.000032533	23	1.4145e-06	F(1, 23) = 379.29
Total	.000569028	24	.00002371	Prob > F = 0.0000
				R-squared = 0.9428
				Adj R-squared = 0.9403
				Root MSE = .00119

Corriente_mA	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
Tiempo	-.0006424	.000033	-19.48	0.000	-.0007106 -.0005742
_cons	.0448139	.0004904	91.39	0.000	.0437995 .0458283


```
. regress Corriente_mA Tiempo if Loc_Anatomica==2 & Intervencion==1
```

Source	SS	df	MS	Number of obs =
Model	.000106861	1	.000106861	25
Residual	4.8802e-06	23	2.1218e-07	F(1, 23) = 503.62
Total	.000111741	24	4.6559e-06	Prob > F = 0.0000
				R-squared = 0.9563
				Adj R-squared = 0.9544
				Root MSE = .00046

Corriente_mA	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
Tiempo	-.0002867	.0000128	-22.44	0.000	-.0003131 -.0002603
_cons	.0471577	.0001899	248.30	0.000	.0467648 .0475506

6 DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que el estudio de la efectividad de medicamentos que actúan como reguladores del transporte de agua a nivel del tracto digestivo y renal, se ha logrado por la implementación de varios biomodelos epiteliales, se logró desarrollar una metodología (ver **Anexo 1**) para la disección y aislamiento del epitelio ventral y dorsal *E. johnstonei* (Llinas & Precht, 1976), procedimiento que hasta el momento no se reporta en ninguna literatura. Metodología que facilitó el estudio morfométrico del epitelio ventral y dorsal para el diseño y fabricación de la cámara de Ussing para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Dicha cámara (ver **Fig. 12**) cuenta con un sistema electrónico que viene acoplado con una fuente de energía continua (fuente de energía que se encuentra conectada en serie, el lado positivo de la fuente con el lado negativo del epitelio y el lado positivo del epitelio con el negativo de la fuente, estableciéndose un flujo de corriente eléctrica inversa al flujo), la cual va conectada a las soluciones intra y extra corpórea por medio de unos electrodos (ec) de AgCl. Este sistema electrónico cuenta con un potenciómetro de resistencia variable que permite modificar el voltaje que se aplica (Díaz Cervera & Torres Escalante, 2012) (Llinas & Precht, 1976).

De esta forma, una vez conseguido estructurar el montaje experimental, se logró registrar la alteración del transporte de iones de sodio mediante el registro de los cursos temporales de corrientes de sodio a nivel ventral y dorsal. Alteraciones que se pudieron evaluar mediante la modulación farmacológica con digoxina, mediante el bloqueo funcional de las bombas Na^+ , K^+ ATPasa (Oltra Noguera, 2010).

Por un lado, teniendo en cuenta el comportamiento que muestra la **Fig. 14**, la cual presenta una notable diferencia entre los flujos de sodio a nivel ventral y dorsal, debido a la alta permeabilidad que presenta el epitelio ventral comparado con el dorsal, asociado a que los anuros son los únicos entre los vertebrados que obtienen el agua principalmente por absorción osmótica a través de su piel ventral aún más que por la dorsal. Puesto que este último tipo de membranas sirve para el intercambio gaseoso tanto proveniente del aire, como del agua (Hillyard, 1976). La rápida absorción de agua está mediada por la presencia de acuaporinas, canales y transportadores de sodio, bombas Na^+ , K^+ ATP, asociados a un gradiente de concentración de electrolitos en el medio intra y extra corpóreo. Estas respuestas fisiológicas son activadas por estímulos intrínsecos relacionados con el estado de hidratación de los animales y los estímulos extrínsecos relativos a la detección de agua osmóticamente disponible (Hillyard & Willumsen, 2011) (Hillyard et al., 2007).

Por otro lado, teniendo como base la regresión lineal múltiple aplicada al promedio de los cursos temporales de corrientes de sodio a nivel dorsal sin y con digoxina se puede decir

con intervalo de confianza del 95% que el 97,29 y 93,33% de la variabilidad de la proporción de las corrientes de corto circuito a nivel dorsal sin y con digoxina respectivamente son explicados por el modelo lineal antes descrito. De igual forma, 94,28 y 95,63% de la variabilidad de la proporción de las corrientes de corto circuito a nivel ventral sin y con digoxina respectivamente son explicados por el modelo estadístico.

Seguidamente, se midió el cambio promedio de corriente por unidad de tiempo estimadas a partir de los cursos temporales de corrientes de sodio en mA a nivel dorsal sin y con digoxina a cada minuto es de $-3,65 \times 10^{-4}$ y $-2,14 \times 10^{-4}$ respectivamente. De igual forma para el epitelio ventral, se presenta un cambio promedio sin y con digoxina de los cursos temporales de corrientes de sodios en mA de $-6,42 \times 10^{-4}$ y $-2,87 \times 10^{-4}$ respectivamente. Las pendientes negativas permiten deducir el paso de sodio desde el espacio extracorporeo hacia el equivalente al espacio intracorporeo, situación coherente con la función de estos tipos de epitelios. Y la presencia de digoxina disminuye la pendiente de la corriente en el tiempo sugiriendo el bloqueo de este paso de iones como es de esperarse.

De acuerdo a esto podemos concluir, por un lado, que los flujos de corrientes de Na^+ evaluados para ambos epitelios con solución Ringer manitol pH 6,8 (control) se ven afectados dramáticamente por el bloqueo con Digoxina de las bombas Na^+ , K^+ ATPasa, en los cuales el flujo de sodio se ve notablemente disminuido. Por otro lado, que los cursos temporales de corrientes de sodio registrados a partir del epitelio ventral y dorsal presentan una diferencia significativa asociada a la alta permeabilidad que presenta el epitelio ventral comparado con el dorsal, siendo esta localidad anatómica la principal zona del cuerpo de las ranas utilizada para el mantenimiento y sostenimiento del balance hídrico corporal.

7 CONCLUSIONES

En el siguiente trabajo se logró implementar un sistema de cámara de Ussing y un sistema de registro de corrientes netas de iones adaptados a las dimensiones del epitelio externo de la rana *Eleutherodactylus johnstonei*. A diferencia de los montajes clásicos de Ussing este montaje permite tomar los datos de corriente en tiempo real y entregarlos a un ordenador para su análisis posterior. Y el sistema también permite hacer lavados con soluciones gracias al reservorio de soluciones adicionado al sistema.

La cámara de Ussing diseñada, permitió hacer el registro a pesar del tamaño tan pequeño del área de piel expuesta a experimentación. La rana tanto en la parte dorsal como en la ventral presenta áreas aproximadas de 10 mm^2 y de esta área se registraron experimentos con el acceso de tan solo $7,9 \text{ mm}^2$ de epitelio. Esta área fue suficiente para reproducir los experimentos clásicos de Ussing y obtener datos coherentes y similares a los reportados también por varios autores. Por la forma como se comportan los cursos temporales de las corrientes netas registradas, estas corrientes no pueden ser adjudicadas sino al flujo de los iones sodio dado que se comportan de la misma forma, magnitud y dirección (desde el equivalente lado extraepitelial hacia el lado intraepitelial) como se ha reportado para experimentos hechos con otros integumentos de rana.

De los resultados se pudo observar que el epitelio dorsal es menos permeable que el ventral por que la tasa de bombeo de iones se puede ver menos pendiente en la dorsal que en la ventral y sus flujo inicial al inicio del experimento es mayor en ventral que en la dorsal

Se lograron comparar los cursos temporales de corrientes de sodio, en piel dorsal y ventral de *E. Johnstonei* con y sin un fármaco que module el transporte de sodio. Dando como resultado que los flujos de corrientes de Na^+ en mA evaluados para ambos epitelios con solución Ringer manitol pH 6,8 (control), se ven afectados dramáticamente por el bloqueo con Digoxina de las bombas Na^+ , K^+ ATPasa.

En los experimentos en los que se añadió el fármaco Digoxina era de esperarse que las corrientes disminuyeran tanto para el epitelio dorsal como para el ventral dado que esta bloquea las bombas Na-K ATPasa y efectivamente esto se vio reflejado en las pendientes más negativas (que los controles sin el fármaco) y esto fue consistente tanto para el epitelio dorsal pero mucho mayor para el ventral y cuyas diferencias en valores fueron estadísticamente significativos.

8 RECOMENDACIONES

Se sugiere que el sistema pueda en un futuro contar con “clamp de voltaje” como el desarrollado para los experimentos electrofisiológicos clásicos, que permita mantener el potencial transmembrana en cero para poder registrar las corrientes netas sin cambios de potencial transepitelial.

Se sugiere que a la cámara diseñada, se pueda añadir una sistema de sujeción fijo del epitelio a la cámara con un sistema de pinzado para el epitelio, esto con el fin de asegurar que el epitelio no se mueva una vez cerrados los comportamientos.

9 REFERENCIAS

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Keith, R., & Walter, P. (2004). *Biología Molecular: LA CÉLULA*. Barcelona: Ediciones Omega.
2. Alberts, Bruce; Bray, Dennis; Hopkin, Karen; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. (2004). *Transporte de membrana*. Madrid: Panamerica.
3. Barry, E., Hall, W., & Martin, J. (1973). Prostaglandin E and the movement of salt and water in frog skin (*Rana temporaria*). *Gen Pharmac.*, 141-150.
4. Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2007). *Biología*. Madrid: Editorial Medica Panamerica.
5. Castillo Caicedo, C. P., & Montes Diaz, V. (2012). *Establecimiento de un sistema (sustentable) para la medición de la función excitable en músculo de la rana Eleutherodactylus johnstonei*. Santiago de Cali: Universidad Autónoma de Occidente.
6. Castro Herrera, F., & Vargas Salinas, F. (2008). Anfibios y reptiles en el departamento del Valle del Cauca, Colombia. *Biota Colombiana*, 251-277.
7. Castro, J. N.-C. (2011). Distribución del nicho ecológico actual y futuro de anfibios y reptiles exóticos: invasiones potenciales en las corporaciones autónomas regionales y de desarrollo sustentable en Colombia. *La Restauración Ecológica en la práctica: Memorias del I Congreso Colombiano de Restauración Ecológica*. 180-188.
8. Diaz Cervera, L., & Torres Escalante, J. L. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio del curso de ciencias fisiológicas*. Mérida: Universidad Autónoma de Yucatán: Facultad de Medicina.
9. Dom (Schmid & Underhill, 1964)inguez Reboiras, M. A. (2008). *Química: La ciencia básica*. Madrid: Thomson.
10. Fanjul, M. L., Hiriart, M., & Fernandez de Miguel, F. (1998). *Biología funcional de los animales*. Madrid: Siglo Veintiuno editores.
11. Gal Iglesias, B., Lopez Gallardo, M., Martin Velasco, A. I., & Prieto Montalvo, J. (2012). *Bases de la fisiología 2a edición*. Tebar.
12. Guyton, A., & Hall, J. (2001). *Tratado de fisiología médica*. Madrid: Mc Graw Hill.


13. Herrera, F. (2005). Algunos aspectos bioelectroquímicos de la fisiología y la farmacología. Transporte. Regulación del medio intracelular. Excitabilidad. *Gac Méd Caracas*, 204-234.
14. Hille, B. (1978). Ionic Channels In Excitable Membranes. *Biophysical Journal*, 283-294.
15. Hillyard, S. D., (1976), b v vbThe Movement of Soil Water across the Isolated Amphibian Skin: *Copeia*, v. 1976, p. 314-320.
16. Hillyard, S. D., K. Hoff, P. Sullivan, and T. Nagai, (1999), Chemosensory and osmoregulatory function of the amphibian skin: An integrated approach: Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 124, Supplement 1, p. S28.
17. Hillyard, S. D., A. Viborg, T. Nagai, and K. v. Hoff, (2007), Chemosensory function of salt and water transport by the amphibian skin: Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 148, p. 44-54.
18. Hillyard, S. D., and N. J. Willumsen, (2011), Chemosensory function of amphibian skin: integrating epithelial transport, capillary blood flow and behaviour: *Acta Physiologica*, v. 202, p. 533-548.
19. Jiménez, L. F. (2006). *Conocimientos fundamentales en biología*. Mexico: Pearson Educación.
20. Kaiser, H. (1997). Orgins and intrductions of the caribbean frog, *Eleutherodactylus johnstonei* (Leptodactylidae): Management and conservation concerns. *Biodiversity and Conservation* 6, 1391-1407.
21. Karp, G. (2009). *Biología Celular y Molecular: Conceptos y experimentos* . Mexico, D.F.: Mc Graw Hill.
22. Larsen, E., Mobjerg, N., & Nielsen, R. (2007). Application of the Na⁺ recirculation theory to ion coupled water transport in low-and high resistance osmoregulatory epitelia. *Comparative Biochemistry an physiology*, 101-116.
23. Latorre, R., Lopez, J., Bezanilla, F., & Linás, R. (1996). *Biofísica y Fisiología Celular*. Sevilla: Universidad de Sevilla.
24. Llinas , R., & Precht, W. (1976). *Frog Neurobiology a Handbook*. Heidelberg: Springer Verlag.

25. Maejima, S., N. Konno, K. Matsuda, and M. Uchiyama, (2010), Central angiotensin II stimulates cutaneous water intake behavior via an angiotensin II type-1 receptor pathway in the Japanese tree frog *Hyla japonica*: *Hormones and Behavior*, v. 58, p. 457-464.
26. Mendoza Patiño, N. (2008). *Farmacológica Médica*. Ciudad de Mexico: Editorial Médica Panamericana.
27. Ming Yao, H., & Chiou, W. L. (2006). The complexity of intestinal absorption and exsorption of digoxin in rats. *International journal of pharmaceutics*, 79-86.
28. Montoreano, R. (1995). *Manual de fisiología y biofísica para estudiantes de medicina Edición 3*. Aragua: Universidad de Carabobo.
29. Nielsen, R., and E. H. Larsen, (2007), Beta-adrenergic activation of solute coupled water uptake by toad skin epithelium results in near-isosmotic transport: *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 148, p. 64-71.
30. Oakley, B., & Shafer, R. (1978). *Experimental Neurobiology: A laboratory manual*. Michigan: Michigan Press.
31. Oltra Noguera, D. (2010). *Estudios de la variabilidad de la permeabilidad intestinal de fármacos. Estudio In Vitro e In Situ*. Valencia, España: Universidad de Valencia: Departamento de Farmacia I Tecnología.
32. Preben, J., Bjorn, Pedersen, B., Toustrup Jesen, M., Sorensen, T., Petersen, J., y otros. (2007). Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*, 1043-1049.
33. Rozehnal, V., Nakai, D., Fischer, T., Kamiyama, E., Takahashi, M., Yasuda, S., y otros. (2012). Human small intestinal and colonic tissue mounted in the ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 367-373.
34. Sánchez Blanco, J. (2013). *Módulo de Farmacología*. Bogotá: Universidad Nacional.
35. Skou, J. C. (1998). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Journal of the american society of nephrology*, 2170-2177.
36. Suzuki, M., T. Hasegawa, Y. Ogushi, and S. Tanaka, (2007), Amphibian aquaporins and adaptation to terrestrial environments: A review: *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 148, p. 72-81.

37. Svensson , A., Azarbayjani, F., Backman, U., Matsumoto, T., & Christofferson, R. (2005). Digoxin inhibits Neuroblastoma Tumor Growth in Mice. *Anticancer Research*, 207-212.
38. Tercafs, R. R., and E. Schoffeniels, (1961), Action of d-Tubocurarine Chloride on Net Flux of Water across Isolated Frog Skin: *Science*, v. 133, p. 1706.
39. Thibodeau, G. A., & Patton, K. T. (2008). *Estructura y función del cuerpo humano*. Madrid: Elsevier España.
40. Uchiyama, M., & Konno, N. (2006). Hormonal regulation of ion and water transport in anuran amphibians. *General and comparative endocrinology* , 54-61.
41. Urbina Cardona, J. (2011). Distribución del nicho ecológico actual y futuro de anfibios y reptiles exóticos: invasiones potenciales en las corporaciones autónomas regionales y de desarrollo sustentable en Colombia. *1 Congreso Colombiano de Restauración Ecológica*, 186-188.
42. Vila, J. J. (2001). *Tecnología Farmacéutica vol1: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Madrid: Editorial Síntesis.

10 Anexos

Anexo 1 POE Disección y aislamiento de piel ventral y dorsal de *E. johnstonei*

 <p>UNIVERSIDAD ICESI</p>	<p>POE Disección y aislamiento de piel ventral y dorsal de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> (Anura: Eleutherodactylidae)</p>																						
<p>UNIDAD Facultad de Ciencias de la salud Departamento de ciencias básicas medicas</p>																							
<p>OBJETO/PROPOSITO</p>	<p>Estandarizar el protocolo de disección para el aislamiento de piel ventral y dorsal para estudios fisiológicos, siguiendo los parámetros bioéticos establecidos.</p>																						
<p>ALCANCE/CAMPO APLICACION</p>	<p style="text-align: center;">Tabla 1 Materiales</p> <table border="1" data-bbox="849 919 1287 1136"> <thead> <tr> <th>ITEM</th> <th>CANTIDAD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Equipo de disección</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Agujas dérmicas</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Base de parafina con tinta negra</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Caja Petri</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Jeringas</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>beaker</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">Tabla 2 Reactivos</p> <table border="1" data-bbox="881 1209 1255 1276"> <thead> <tr> <th>ITEM</th> <th>CANTIDAD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Solución ringer de anfibio</td> <td>30 mL</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">Tabla 3 Equipos</p> <table border="1" data-bbox="938 1371 1198 1434"> <thead> <tr> <th>ITEM</th> <th>CANTIDAD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Refrigerador</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	ITEM	CANTIDAD	Equipo de disección	1	Agujas dérmicas	4	Base de parafina con tinta negra	1	Caja Petri	1	Jeringas	2	beaker	1	ITEM	CANTIDAD	Solución ringer de anfibio	30 mL	ITEM	CANTIDAD	Refrigerador	1
ITEM	CANTIDAD																						
Equipo de disección	1																						
Agujas dérmicas	4																						
Base de parafina con tinta negra	1																						
Caja Petri	1																						
Jeringas	2																						
beaker	1																						
ITEM	CANTIDAD																						
Solución ringer de anfibio	30 mL																						
ITEM	CANTIDAD																						
Refrigerador	1																						
<p>RESPONSABLES</p>	<p>Grupo de investigación de ciencias biomédicas de la facultad de ciencias de la salud de la universidad Icesi.</p>																						
<p>DEFINICIONES</p>	<p><i>Disección:</i> Práctica que consiste en separar tejidos orgánicos de una planta, un cadáver o el cuerpo de un animal para estudiarlas anatómicamente.</p>																						
<p>DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO</p>	<p>1. Gestionar el aporte de materiales y reactivos ante los respectivos almacenes de la institución a</p>																						

través de los correspondientes formatos de solicitud pre existentes en la plataforma institucional.

2. Colocarse la correspondiente bioseguridad antes de realizar cualquier procedimiento en el laboratorio de investigación.
3. Disponer la zona de trabajo con los respectivos equipos y materiales a utilizar (solución Ringer, equipo de disección, toallas absorbentes).



Fig. 1 Equipo de disección

4. Sacar el espécimen del terrario Fig. 1 donde se encuentra en cautiverio bajo todas las medidas de mantenimiento y cuidado, para el uso previo en proyectos de investigación. De no ser así, pasar al numeral 6.



Fig. 1 A) Formato de registro de especies y B) Terrario donde se mantienen los especímenes en cautiverio.

Figura 1 Terrario para el espécimen *Eleutherodactylus johnstonei*.

5. Extraer el espécimen del terrario y depositarlo en una caja de petri o frasco plástico con tapa. Una vez el espécimen en el recipiente, se introduce dentro de un refrigerador a una temperatura de 3-6°C durante 4 a 8 minutos Fig. 2.



Fig. 2 Sedación del espécimen por disminución de la temperatura

6. Retirar el espécimen del refrigerador y proceder inmediatamente a su descerebración mediante el empleo de un objeto punzante o aguja manganada Fig. 3. colocar el individuo con la cabeza inclinada boca abajo y entre la primera y segunda vértebra introducir la aguja hacia el cerebro, luego mediante movimientos laterales cortar las conexiones nerviosas entre la médula y el cerebro (Oakley & Rollie, 1978).

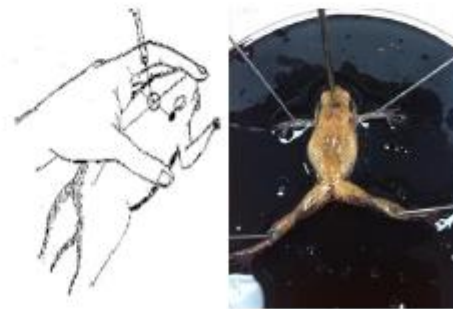
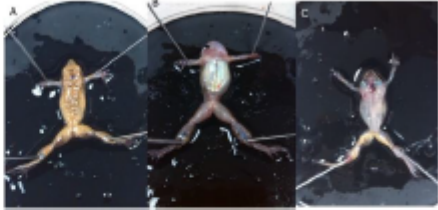




Fig. 3 Proceso de descerebración de *E. johnstonei*. (Díaz Cervera & Torres Escalante, 2012)

	<p>7. Se fija el espécimen a la base y se irriga ringer manitol a pH 6.8, con el fin de mantener el espécimen hidratado. Con ayuda de unas pinzas se sujeta la piel con el fin de separarla del musculo y poder hacer un corte frontal Fig. 4.</p>  <p>Fig. 4 A) Fijación del espécimen a la base de disección, B) Aislamiento de la piel ventral</p> <p>8. Una vez aislada la piel, se realizan de 2 a 3 baños con ringer manitol a pH 6.8 con el fin de retirar partículas contaminantes que puedan interferir con el montaje experimental de ussing u otros experimentos.</p> <p>9. Finalmente desechar residuos biológicos en un guardián previamente establecidos por el coordinador del laboratorio.</p> <p>15. Realizar la correspondiente limpieza de todo el material de laboratorio utilizado para el aislamiento de piel ventral y dorsal del espécimen en estudio.</p>
FORMULARIOS Y REGISTROS	NA
REFERENCIAS	<p>Diaz Cervera, L., & Torres Escalante, J. L. (2012). <i>Manual de practicas de labpratorio de fisiologia medica</i>. Merida: Universidad Autonoma de Yucatan.</p> <p>Oakley, B., & Rollie, S. (1978). <i>Experimental Neurobiology</i>. United States of America: The university of Michigan .</p>

	No hay ninguna fuente en el documento actual.	
ANEXOS	NA	
(LISTA DE DISTRIBUCIONE)	NA	
REDACTADO POR Elver Felipe Diaz Jimenez Estudiante de Química Farmacéutica	REVISADO POR Flavio Ceron	APROBADO POR
FECHA REDACCION 22-07-2014	FECHA REVISION 23-07-2014	FECHA APROBACION
VERSION ORIGINAL FECHA DE VIGENCIA	ACTUALIZACION No FECHA DE VIGENCIA	

Anexo 2 POE Solución Ringer manitol pH 6,8

<p>NOMBRE DE LA INSTITUCION  UNIVERSIDAD ICESI</p> <p>UNIDAD Facultad de Ciencias de la salud Departamento de ciencias básicas medicas</p>	<p><i>POE SOLUCION RINGER MANITOL PH 6.8</i></p>																																		
<p>OBJETO/PROPOSITO</p>	<p>Crear una solución artificial que simule las condiciones de fuerza ionica y pH fisiológicos.</p>																																		
<p>ALCANCE/CAMPO APLICACION</p>	<p>Tabla 1 Materiales</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>ITEM</th> <th>CANTIDAD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Pesa sales</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Agitador Magnético</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Espátula</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Balón aforado de 1000 mL</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Beaker 500 mL</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Frasco Schott de 1000 mL</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table> <p>Tabla 2 Reactivos</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>ITEM</th> <th>CANTIDAD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NaCl Anhidro</td> <td>9.0 g</td> </tr> <tr> <td>KCl Anhidro</td> <td>2.0 g</td> </tr> <tr> <td>Manitol Anhidro</td> <td>3.0 g</td> </tr> <tr> <td>Agua destilada</td> <td>C.S.P.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Tabla 3 Equipos</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>ITEM</th> <th>CANTIDAD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Balanza Analítica</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Plancha de calentamiento</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Potenciómetro pH</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Osmómetro</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	ITEM	CANTIDAD	Pesa sales	3	Agitador Magnético	1	Espátula	3	Balón aforado de 1000 mL	1	Beaker 500 mL	1	Frasco Schott de 1000 mL	1	ITEM	CANTIDAD	NaCl Anhidro	9.0 g	KCl Anhidro	2.0 g	Manitol Anhidro	3.0 g	Agua destilada	C.S.P.	ITEM	CANTIDAD	Balanza Analítica	1	Plancha de calentamiento	1	Potenciómetro pH	1	Osmómetro	1
ITEM	CANTIDAD																																		
Pesa sales	3																																		
Agitador Magnético	1																																		
Espátula	3																																		
Balón aforado de 1000 mL	1																																		
Beaker 500 mL	1																																		
Frasco Schott de 1000 mL	1																																		
ITEM	CANTIDAD																																		
NaCl Anhidro	9.0 g																																		
KCl Anhidro	2.0 g																																		
Manitol Anhidro	3.0 g																																		
Agua destilada	C.S.P.																																		
ITEM	CANTIDAD																																		
Balanza Analítica	1																																		
Plancha de calentamiento	1																																		
Potenciómetro pH	1																																		
Osmómetro	1																																		

	 <p>Ilustración 1 Equipos: a) Balanza analítica RADWAG; b) Plancha de calentamiento con agitador magnético VWR; c) HI 2550 pH HANNA Instruments; d) Vapro Vapor pressure Osmometer WESCOR.</p>
RESPONSABLES	Grupo de Investigación de ciencias biomédicas de la facultad ciencias de la salud de la U. Icesi.
DEFINICIONES	<p>Osmolaridad: La osmolaridad se define como el número de partículas (iones o moléculas) por litro de solución. La osmolaridad se expresa en osmoles por litro (mOsm/L). (Gal Iglesias, Lopez Gallardo, Martin Velasco, & Prieto Montalvo, 2012).</p> <p>pH: El termino pH, propuesto por el bioquímico danés Søren Sørensen en el año de 1909, significa literalmente "<i>Potencial del ion hidrógeno</i>" y se define como el logaritmo en base 10, cambiado de signo, de la concentración molar de ion hidronio (Dominguez Reboiras, 2008):</p> $pH = -\log[H_3O^+] \quad [H_3O^+] = 10^{-pH}$
DESARROJO DEL PROCEDIMIENTO	<ol style="list-style-type: none"> 1. Gestionar el aporte de materiales y reactivos ante los respectivos almacenes de la institución a través de los correspondientes formatos de solicitud pre existentes en la plataforma institucional. 2. Colocarse la correspondiente bioseguridad antes de realizar cualquier procedimiento en el laboratorio de investigación. 3. Disponer la zona de trabajo con los respectivos equipos y materiales a utilizar. 4. De acuerdo con la bibliografía revisada, se seleccionó las

concentraciones de los reactivos de acuerdo a los iones fisiológicos presentes a nivel intra y extra celular en anfibios, con los cuales se desea tener una osmolaridad entre 250-300 mOsmoles/kg. Cálculos de osmolaridad Anexo 1.

5. Para la preparación de la solución ringer se tuvo en cuenta las siguientes concentraciones para un litro de solución.

Tabla 4 reactivos: concentraciones y osmolaridad (Oakley & Schafer, 1978) y (Linas & Precht, 1976)

COMPONENTE	CONCENTRACION	CANTIDADES	mOsm/L
NaCl	135 mM	7.88 g	270
KCl	10 mM	0.74 g	20
Manitol	10 mM	1.82 g	10

6. Seguidamente, de acuerdo a las concentraciones que se describen en la Tabla 4 se calcularon las cantidades necesarias para disolverlas en agua estéril. Cálculos Anexo 2.
7. Una vez pesadas las cantidades necesarias para la preparación de un litro de solución, se adicionan a un beaker de 500 mL junto con agua destilada para disolver las sales mediante agitación magnética en una plancha de calentamiento, manejando una temperatura de 40 °C.
8. Después de disueltas las sales, se pasan a un balón aforado de 1000 mL, seguidamente se adiciona agua destilada al beaker utilizado anteriormente y se adiciona el contenido de este en el balón aforado. Repetir al menos tres veces, con el fin de que no queden residuos en el vaso de precipitados.
9. Llevar el balón hasta el aforo con agua destilada.
10. Tomar una muestra de la solución antes preparada y evaluar el pH, el cual debe estar entre el rango de 6.5 - 7.0. Posteriormente, medir la osmolaridad mediante el uso de un osmómetro.

FORMULARIOS Y REGISTROS	NA
REFERENCIAS	<p data-bbox="802 384 902 405">Bibliografía</p> <p data-bbox="802 510 1341 558">Dominguez Reboiras, M. A. (2008). <i>Química: La ciencia básica</i>. Madrid: Thomson.</p> <p data-bbox="802 579 1365 653">Gal Iglesias, B., Lopez Gallardo, M., Martin Velasco, A. I., & Prieto Montalvo, J. (2012). <i>Bases de la fisiología 2a edición</i>. Tebar.</p> <p data-bbox="802 674 1349 726">Llinas, R., & Precht, W. (1976). <i>Frog Neurobiology a Handbook</i>. Heidelberg: Springer-Verlag.</p> <p data-bbox="802 747 1321 800">Oakley, B., & Schafer, R. (1978). <i>Experiemntal Neurobiology</i>. Rexdale: Ann Arbor.</p>
AMEXOS	<p data-bbox="802 947 883 968">Anexo 1.</p> <p data-bbox="802 999 1305 1052">El siguiente procedimiento matemático ejemplifica la determinación de la osmolaridad:</p> $Concentracion \left(\frac{m}{L}\right) \times 1L \times 1000 \times No. iones = mOsm/L$ $NaCl 0.135 M \times 1L \times 1000 \times 2 = 270 mOsm/L$ <p data-bbox="802 1178 1260 1209">De igual forma para el resto de los componentes.</p> <p data-bbox="802 1241 883 1262">Anexo 2.</p> <p data-bbox="802 1293 1373 1346">De acuerdo a las concentraciones de la Tabla 4. se realizaron los siguientes cálculos aritméticos:</p> $NaCl 135mM \times \frac{1 mol}{1000 mmol} \times \frac{58.44 g/mol}{1 mol} = 7.88 g$ <p data-bbox="802 1461 1373 1493">El procedimiento matemático se efectúa de igual forma para</p>

	el resto de los componentes.	
(LISTA DE DISTRIBUCIONES)	NA	
REDACTADO POR Elver Felipe Díaz Jiménez	REVISADO POR Flavio Ceron	APROBADO POR
FECHA REDACCION 17/07/2014	FECHA REVISION 21 07 2014	FECHA APROBACION
VERSION ORIGINAL FECHA DE VIGENCIA	ACTUALIZACION No FECHA DE VIGENCIA	

Anexo 3 Cursos temporales de la CCC a nivel ventral y Dorsal con y sin Digoxina.

A continuación se presenta los registros de la corriente de corto circuito (CCC) (mA) a nivel dorsal y ventral con y sin digoxina para cada uno de los individuos evaluados en este trabajo de grado.

Tabla 7 Curso temporal control de epitelio dorsal de *E. johnstonei*.

CURSO TEMPORAL DORSAL CONTROL (mA)				
TIEMPO (min)	R1	R2	R3	R4
1	0,010	0,010	0,011	0,011
2	0,009	0,009	0,011	0,011
3	0,008	0,008	0,010	0,010
4	0,008	0,008	0,009	0,010
5	0,008	0,007	0,009	0,009
6	0,008	0,007	0,009	0,009
7	0,008	0,007	0,008	0,008
8	0,008	0,006	0,008	0,008
9	0,007	0,006	0,007	0,007
10	0,005	0,006	0,006	0,006
11	0,005	0,006	0,006	0,005
12	0,005	0,006	0,005	0,004
13	0,005	0,006	0,004	0,004
14	0,005	0,006	0,004	0,004
15	0,005	0,006	0,003	0,003
16	0,005	0,005	0,003	0,003
17	0,004	0,005	0,003	0,003
18	0,004	0,005	0,002	0,003
19	0,004	0,005	0,002	0,003
20	0,004	0,005	0,002	0,002
21	0,003	0,004	0,002	0,002
22	0,003	0,003	0,002	0,001
23	0,003	0,003	0,001	0,001
24	0,003	0,003	0,001	0,001

Tabla 8 Curso temporal con digoxina de epitelio dorsal de *E. johnstonei*.

CURSO TEMPORAL DORSAL CON DIGOXINA (mA)				
TIEMPO (min)	R1	R2	R3	R4
1	0,009	0,010	0,011	0,010
2	0,009	0,010	0,011	0,010
3	0,009	0,010	0,011	0,010
4	0,009	0,009	0,011	0,010
5	0,009	0,009	0,010	0,010
6	0,008	0,009	0,009	0,009
7	0,008	0,008	0,009	0,009
8	0,008	0,008	0,009	0,009
9	0,008	0,008	0,009	0,008
10	0,007	0,007	0,008	0,008
11	0,007	0,007	0,008	0,008
12	0,007	0,007	0,008	0,008
13	0,007	0,006	0,007	0,007
14	0,007	0,006	0,007	0,007
15	0,007	0,006	0,007	0,007
16	0,007	0,006	0,007	0,007
17	0,006	0,006	0,007	0,007
18	0,006	0,005	0,007	0,006
19	0,006	0,005	0,006	0,006
20	0,006	0,005	0,006	0,006
21	0,006	0,005	0,006	0,006
22	0,006	0,005	0,006	0,006
23	0,006	0,005	0,006	0,006
24	0,006	0,005	0,006	0,006

Tabla 9 Curso temporal control de epitelio ventral de *E. johnstonei*.

CURSO TEMPORAL VENTRAL CONTROL (mA)				
TIEMPO (min)	R1	R2	R3	R4
1	0,057	0,045	0,045	0,044
2	0,054	0,043	0,044	0,041
3	0,052	0,043	0,040	0,039
4	0,050	0,041	0,040	0,038
5	0,049	0,040	0,039	0,037
6	0,048	0,039	0,037	0,036
7	0,048	0,037	0,036	0,036
8	0,047	0,036	0,036	0,036
9	0,047	0,035	0,035	0,035
10	0,047	0,034	0,034	0,034
11	0,047	0,033	0,034	0,034
12	0,046	0,031	0,034	0,033
13	0,046	0,030	0,033	0,033
14	0,046	0,029	0,032	0,033
15	0,046	0,028	0,032	0,032
16	0,046	0,027	0,031	0,032
17	0,046	0,025	0,031	0,032
18	0,045	0,025	0,031	0,031
19	0,045	0,024	0,030	0,031
20	0,045	0,024	0,029	0,031
21	0,045	0,024	0,028	0,030
22	0,045	0,024	0,028	0,028
23	0,045	0,023	0,027	0,028
24	0,045	0,023	0,027	0,028
25	0,045	0,022	0,026	0,028

Tabla 10 Curso temporal con digoxina de epitelio ventral de *E. johnstonei*.

CURSO TEMPORAL VENTRAL CON DIGOXINA (mA)				
Tiempo (min)	R1	R2	R3	R4
1	0,047	0,045	0,046	0,047
2	0,047	0,045	0,046	0,046
3	0,046	0,045	0,046	0,046
4	0,046	0,045	0,046	0,046
5	0,046	0,045	0,046	0,046
6	0,046	0,045	0,046	0,046
7	0,045	0,045	0,046	0,045
8	0,045	0,045	0,045	0,045
9	0,045	0,044	0,045	0,045
10	0,045	0,044	0,045	0,045
11	0,044	0,044	0,045	0,045
12	0,044	0,044	0,044	0,045
13	0,044	0,043	0,044	0,044
14	0,044	0,043	0,044	0,043
15	0,044	0,043	0,043	0,043
16	0,044	0,043	0,043	0,043
17	0,043	0,043	0,043	0,042
18	0,043	0,042	0,042	0,042
19	0,043	0,042	0,042	0,041
20	0,042	0,041	0,041	0,041
21	0,042	0,041	0,041	0,041
22	0,041	0,040	0,041	0,040
23	0,041	0,040	0,040	0,039
24	0,040	0,039	0,040	0,039
25	0,040	0,039	0,039	0,039

Tabla 11 Promedios de los cursos temporales del flujo de iones de Na⁺ a nivel de los epitelios de evaluación con y sin digoxina.

	Dorsal Control	Dorsal Digoxina	Ventral Control	Ventral Digoxina
Tiempo (min)	\bar{X} (mA)	\bar{X} (mA)	\bar{X} (mA)	\bar{X} (mA)
1	0,01040	0,00997	0,0478	0,0463
2	0,00991	0,00992	0,0455	0,0460
3	0,00910	0,00992	0,0436	0,0457
4	0,00861	0,00960	0,0423	0,0457
5	0,00825	0,00932	0,0413	0,0457
6	0,00825	0,00867	0,0400	0,0457
7	0,00791	0,00821	0,0393	0,0452
8	0,00754	0,00821	0,0388	0,0449
9	0,00667	0,00821	0,0380	0,0448
10	0,00586	0,00720	0,0373	0,0448
11	0,00543	0,00720	0,0369	0,0445
12	0,00500	0,00720	0,0360	0,0443
13	0,00475	0,00654	0,0355	0,0438
14	0,00460	0,00654	0,0350	0,0435
15	0,00416	0,00641	0,0344	0,0433
16	0,00390	0,00641	0,0340	0,0433
17	0,00375	0,00621	0,0334	0,0428
18	0,00347	0,00600	0,0329	0,0423
19	0,00350	0,00567	0,0325	0,0420
20	0,00314	0,00567	0,0324	0,0413
21	0,00282	0,00567	0,0318	0,0413
22	0,00230	0,00567	0,0313	0,0405
23	0,00200	0,00567	0,0308	0,0400
24	0,00200	0,00567	0,0307	0,0395
25			0,0303	0,0393