

Efecto del isoproterenol sobre el potencial de membrana celular en epitelio aislado de la piel de rana

ANDRES GARCIA-MUÑOZ, MA. DEL CARMEN MARROQUIN* e IGNACIO GALAR*

Departamento de Biofísica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN
Prol. de Carpio y Plan de Ayala
Apartado Postal 42-186
11340 México, D.F.

GARCÍA-MUÑOZ, A., M. del C. MARROQUÍN e I. GALAR, 1991. Efecto del isoproterenol sobre el potencial de membrana celular en epitelio aislado de la piel de rana. *An. Esc. nac. Cienc. biol., Méx.* **34**: 9-14.

RESUMEN: Se midieron potenciales intracelulares en epitelio aislado de la piel de la *Rana pipiens*, usando microelectrodos de vidrio llenos con KC1-3M. El microelectrodo se avanzó hacia el epitelio por el lado basal, observándose consistentemente tres saltos de potencial negativo con respecto a la solución del lado apical. En el tercer salto el potencial fue más estable, por lo que éste fue elegido para hacer las pruebas con isoproterenol. Cuando solamente se agregó isoproterenol, no se observó ningún cambio significativo en el potencial de membrana; sin embargo, cuando el epitelio fue previamente tratado con amilorida y ouabaina, el potencial de membrana disminuyó aproximadamente en un 25%. La principal conclusión de este estudio es que probablemente esa despolarización fue causada por un incremento de la conductancia al sodio en la membrana apical, debido a la aparición de canales de sodio insensibles a la amilorida.

INTRODUCCIÓN

La membrana celular es la barrera a través de la cual tiene lugar el intercambio de sustancias entre el citoplasma y el medio que rodea a la célula, de ahí que desempeñe un papel de primera importancia en la homeostasis de los sistemas vivientes. La membrana plasmática es una estructura dinámica que, además de contener los mecanismos que garantizan una constancia del medio intracelular dentro de los límites compatibles con la vida, es el asiento de estructuras de reconocimiento y transmisión de señales que regulan el funcionamiento de la célula y, en consecuencia, de todo el organismo.

Las propiedades eléctricas de las células y los sistemas de transporte iónico están en íntima relación, pues la afectación de éstos repercute sobre aquellos y viceversa. Así por ejemplo, una sustancia que altere la permeabilidad, o algún mecanismo de transporte, de una especie iónica, puede modificar concomitantemente los parámetros eléctricos de la membrana.

* Becario de la COFAA-IPN

En la piel de la rana existe una diferencia de potencial eléctrico transepitelial, en el que el lado serosal es positivo con relación al mucosal. Este potencial es básicamente originado por un movimiento neto de sodio de mucosa a serosa. El sodio entra pasivamente a la célula por el lado apical y es expulsado activamente por la bomba de intercambio Na^+ / K^+ en la membrana basolateral (Ussing & Zerahn, 1951; Koefoed-Johnsen & Ussing, 1958). Este movimiento de sodio puede ser inhibido por bloqueadores de los canales de sodio en la membrana apical, como la amilorida (Salako & Smith, 1970) así como por inhibidores de la bomba de intercambio sodio/potasio, como la ouabaína. Se sabe además que el AMP cíclico y sustancias que incrementan la concentración intracelular de este nucleótido, estimulan la corriente de cortocircuito (Galar y Marroquín, 1985; Koefoed-Johnsen *et al.*, 1952; McAfee, 1970; Thomson & Mills, 1981; Tomlinson & Wood, 1976, 1978), la cual es una medida del flujo neto de sodio en la piel aislada de la rana. La estimulación de la corriente de cortocircuito por AMP cíclico resulta independiente de la presencia de amilorida en el medio, por lo que se ha sugerido que se debe a un aumento de la permeabilidad de la membrana apical al sodio, por la formación de canales de sodio insensibles a la amilorida. Pero también existen resultados que sugieren que el aumento de la corriente de cortocircuito, inducido por el isoproterenol, reside en las glándulas de secreción de cloruro (Thompson & Mills, 1981).

En este trabajo se midió el potencial intracelular en epitelio aislado de la piel de rana, con respecto a la solución que estuvo en contacto con la cara apical y se probó el efecto del isoproterenol sobre dicho potencial. Los resultados son compatibles con un aumento de la permeabilidad de la membrana apical al sodio, no sensible a la amilorida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y montaje del epitelio

El epitelio aislado de la piel de la rana se obtuvo preincubando una porción de la piel ventral de *Rana pipiens* en solución de Ringer con colagenasa, según el método usado por Aceves & Erlij (1971). El epitelio así obtenido fue montado en una cámara de lucita con la cara basolateral hacia arriba, ambos lados del epitelio estuvieron en contacto con solución de Ringer normal para rana, cuya composición (en mM) fue la siguiente: NaCl, 112; KCl, 2.0; CaSO_4 , 2.0; NaH_2PO_4 , 1.0. El pH fue ajustado a 7.4 con HCl o NaOH.

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Las drogas usadas fueron: Amilorida, Ouabaína y L-isoproterenol de Sigma Chemical Co. La colagenasa fue del tipo IA de Sigma Chemical Co.

Mediciones eléctricas

Para medir el potencial intracelular, se usaron microelectrodos obtenidos por estiramiento de tubo capilar de vidrio, en un estirador vertical (*Vertical Pipette Puller*, Mod. 700C, David Kopf Instruments, Tijunga Cal.), los cuales fueron llenados con KCl-3M. La resistencia de los microelectrodos fue entre 20 y 40 megohms. Como electrodo de referencia se usó uno de Ag/AgCl. El registro de potencial se hizo simultáneamente con un multímetro digital (*FLUKE 8010A*) y un osciloscopio (*Hewlett-Packard, 1205A*). Este último sirvió como monitor de ruido. La señal fue llevada al medidor de voltaje a través

de un sistema con base en un amplificador operacional MC1546. El circuito básico para la medición del potencial de membrana y/o el potencial de microelectrodo, se esquematiza en la figura 1. Cuando el interruptor *S* está en la posición 1, *V* es el potencial de microelectrodo, más el de membrana en el caso de que el microelectrodo se encuentre dentro de la célula. Cuando el microelectrodo penetró a la célula se observó un cambio brusco en el potencial. La lectura final menos la obtenida antes de penetrar, se tomó como el potencial de membrana. La resistencia del microelectrodo se midió antes de entrar a la célula, conectando el interruptor en la posición 3. Los valores de E_1 y R_1 fueron ajustados de modo que la lectura en el medidor, milivoltios, resultara directamente igual a la resistencia del microelectrodo en megaohms. Previamente a la medición de la resistencia del microelectrodo, el potencial de éste fue compensado conectando el interruptor en la posición 2 y se varió E_2 hasta que el voltímetro marcara $V=0$.

RESULTADOS

Al ir avanzando el microelectrodo por el lado basal, se observaron consistentemente tres cambios bruscos, o saltos, de potencial negativo, los cuales deben corresponder a diferentes estratos del epitelio. En la tabla 1 se muestran los promedios y los correspondientes errores estándar de 25 mediciones de potencial (cinco animales) de cada uno de los saltos mencionados. El tercero de estos saltos fue en general más estable y duradero, por lo que fue seleccionado para hacer las pruebas con isoproterenol.

TABLA 1. Potencial intracelular con respecto a la solución mucosal en epitelio aislado de la piel de *Rana pipiens*. Los valores representan la media \pm error estándar de la media. *n* = número de mediciones.

Saltos	<i>n</i>	Potencial (Mv)
1o.	25	-48.1 \pm 1.9
2o.	25	-58.8 \pm 1.9
3o.	25	-64.8 \pm 3.9

Se probó el efecto del isoproterenol (0.01 mM) agregado a la solución que estuvo en contacto con la cara basolateral del epitelio, pero no se observó ningún cambio significativo en el potencial de la membrana apical, pues éste fue de -64.9 ± 5.2 mV en el control, mientras que con isoproterenol fue de -66.6 ± 4.2 mV.

De acuerdo con la hipótesis de trabajo, se esperaría una disminución del potencial de membrana, debido a una entrada más rápida de Na^+ a través de la membrana apical; sin embargo, esa entrada de sodio pudo haber sido compensada por la expulsión de este catión, vía la bomba de intercambio Na^+/K^+ en la membrana basolateral de las células, lo que a su vez evitaría que el cambio de permeabilidad se reflejara sobre el potencial intracelular. Por lo anterior, se procedió a cambiar el diseño experimental inhibiendo la bomba de sodio/potasio con ouabaína, previo bloqueo de los canales de sodio de la membrana apical, agregando amilorida a la solución de ese lado.

En la figura 2 puede verse que la amilorida 0.01 nM causó el efecto ya conocido, de incrementar el potencial de la membrana apical (Helman & Fisher, 1977). Las lecturas se tomaron 20 minutos después de haber agregado la amilorida a la solución del lado apical. En la misma figura se muestra que la ouabaína 0.01 mM, agregada a la solución serosal, disminuyó el potencial de membrana, lo cual también ya ha sido probado (Helman *et al.*, 1979). Las mediciones con amilorida más ouabaína se iniciaron 30 minutos después de haber administrado esta última droga. La toma de estas mediciones de potencial se realizó en un tiempo entre 45 y 60 minutos. Bajo estas condiciones se probó el efecto del isoproterenol 0.01 mM. En este caso las lecturas de voltaje se tomaron inmediatamente después de haber adicionado el isoproterenol, durante un tiempo de 45 a 60 minutos. Como puede verse en la figura 2, el potencial de membrana disminuyó significativamente, pasando de -70.1 ± 3.9 mV antes de aplicar el isoproterenol, a -53.3 ± 4.8 mV con isoproterenol. Estos valores son los promedios de 14 y 15 mediciones (cuatro experimentos) respectivamente.

DISCUSIÓN

La diferencia de potencial a través de la membrana celular, es el resultado del movimiento iónico en un estado estacionario, sostenido por mecanismos de transporte activo, especialmente por la bomba de sodio/potasio. Este potencial es negativo con relación al medio extracelular. Un cambio en la permeabilidad a alguna especie iónica, modifica ese estado hasta alcanzar otro en el que el potencial podría ser diferente. Así, la amilorida disminuye el ingreso de sodio a la célula a través de la membrana apical y, en consecuencia, el potencial se hace más negativo. Si por alguna causa aumentara la conductancia al sodio, entonces debería observarse un efecto inverso al producido por la amilorida. Los resultados obtenidos con isoproterenol sugieren entonces un aumento en la permeabilidad al sodio en la barrera apical. Si la bomba de Na^+/K^+ no se hubiera bloqueado con ouabaína, probablemente no se hubiera observado este efecto, pues el sodio podría haber sido sacado con la misma rapidez con que entra, como aparentemente ocurrió en los primeros experimentos. Por otra parte, si el efecto del isoproterenol sobre el potencial de membrana apical se debió a un aumento de permeabilidad al sodio y, dado que esto ocurrió en presencia de amilorida, es de suponer que ese aumento de permeabilidad se deba a la aparición de canales de sodio insensibles a esta droga, como ha sido sugerido por otros investigadores con base en el efecto del isoproterenol sobre la corriente de cortocircuito, la cual aumenta independientemente de la presencia de amilorida (Thompson & Mills, 1981).

En la piel aislada de la rana, pretratada con amilorida, la ouabaína produce una caída del potencial de membrana apical, la cual presenta una fase rápida que dura entre 5 y 10 minutos, seguida de una fase lenta durante la cual el voltaje permanece en valores altos por un tiempo prolongado (Helman *et al.*, 1979). En los resultados presentados aquí, se observa una caída de potencial después de haber administrado la ouabaína, lo cual está en concordancia con lo observado por Helman. Las mediciones de potencial, en presencia de isoproterenol, se hicieron después de más de una hora de haber agregado la ouabaína, lo cual corresponde a la fase lenta de la caída de potencial producida por esta droga, de modo que la disminución, relativamente rápida del potencial después de agregar el isoproterenol, no puede atribuirse a la ouabaína.

El isoproterenol es un agonista β -adrenérgico y, por lo tanto, estimula la síntesis del mensajero intracelular AMP cíclico, vía la enzima membranal adenilatociclase, por lo que puede suponerse que este nucleótido es, en última instancia, el responsable del efecto observado. Dado que algunas hormonas utilizan este mecanismo para hacer llegar su información a diversos sistemas efectores de las células, parece ser que ésta es una de las formas mediante las cuales se modula el movimiento de sodio a través de la membrana plasmática.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por la DEPI-IPN, Proyecto de Investigación clave 831328.

Los autores agradecen al M. en C. Ernesto Suaste la ayuda prestada en el diseño y construcción del sistema de medición de potenciales eléctricos.

SUMMARY

Intracellular electrical potential in isolated epithelium from the skin of *Rana pipiens* were measured using glass microelectrodes. The microelectrode was push forward from the solution to the epithelium basal side. Three steps of negative voltage were recorded consistently as microelectrode penetration. The third voltage step showed better stability and therefore it was chosen for isoproterenol testing. When only isoproterenol was added to the serosal solution, no any significant change of the intracellular potential was observed. However, when the epithelium was pretreated with amiloride and ouabaine, the isoproterenol elicited a membrane despolarization. The main conclusion of this study is that the isoproterenol caused an intracellular potential diminution probably by a sodium conductance increase, via amiloride-insensitive sodium channels formation at the apical membrana of the epithelial cells.

BIBLIOGRAFÍA

- ACEVES, J., and D. ERLIJ. 1971. Sodium transport across the isolated epithelium of the frog skin. *J. Physiol.* **212**: 195-210.
- GALAR, I., y M. del C. MARROQUÍN, 1985. Efectos de la epinefrina y del 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) sobre el transporte de cloruro en la piel aislada de la rana. *Acta Mexicana de Ciencia y Tecnología*. Vol. III. No. 10: 23-29.
- HELMAN, S. I., and R. S. FISHER. 1977. Microelectrode studies of the active Na transport Pathway of frog skin. *J. Gen. Physiol.* **69**: 571-604.
- HELMAN, S. I., W. NAGEL, and R. S. FISHER. 1979. Ouabaine on active transepithelial sodium transport in frog skin. Studies with microelectrodes. *J. Gen. Physiol.* **74**: 105-127.
- KOEFOD-JOHNSEN, V., H. H. USSING, and K. ZERAHN. 1952. The origin of the short-circuit current in the adrenaline stimulated frog skin. *Act. Physiol. Scand.* **27**: 34-48.
- MCAFEE, R. D., 1970. The action of beta-adrenergic site stimulation catecholamines on isolated frog skin. *Biochim. Biophys. Acta.* **203**: 104-110.
- SALAKO, L.A., and A. J. SMITH. 1970. Effects of amiloride on active sodium transport by the isolated frog skin: Evidence concerning site of action. *Br. J. Pharmacol.* **38**: 702-718.
- THOMPSON, I. G. and J. W. MILLS, 1981. Isoproterenol-induced current changes in glands of frog skin. *Am. J. Physiol.* **241**: C250-C257.

TOMLINSON, R.W. S., and A. W. WOOD, 1976. Catecholamine-induced changes in ion transport in short-circuited frog skin and the beta-blockade. *J. Physiol.* **257**: 515-530.

_____ 1978. Effect of amiloride on catecholamine-induced changes in ion transport in short-circuited frog skin. *J. Membr. Biol.* **40**: 135-150.

USSING, H. H. and K. ZERAHN, 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* **27**: 34-48.

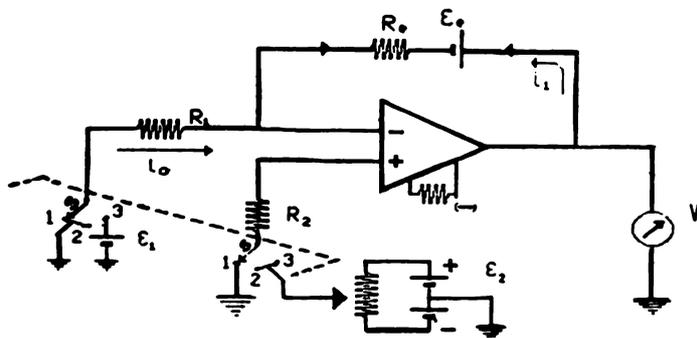


FIGURA 1. Sistema electrónico usado para la medición de potencial de membrana y resistencia de microelectrodo.

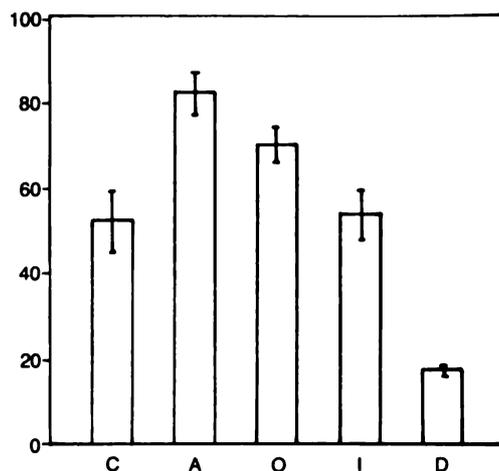


FIGURA 2. Efecto del isoproterenol sobre el potencial intracelular en epitelio aislado de la piel de rana pretratado con amilorida y ouabaína. C: control, -52.1 ± 6.5 mV. A: amilorida, -82.2 ± 4.4 mV. O: ouabaína, -70.1 ± 3.9 mV. I: isoproterenol, -53.3 ± 4.8 mV. D: diferencia entre el potencial con isoproterenol y el valor previo (amilorida + ouabaína), $P < 0.001$.

Artículo recibido para su publicación en febrero de 1989.