

ACCION DE ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD BIOELECTRICA DEL EPITELIO DE PIEL DE SAPO

Action of ethanol on the bioelectric activity of the toad skin epithelium

JUAN CONCHA, LADISLAO QUEVEDO, GRACIELA CONTRERAS*

RESUMEN

Se ha demostrado que etanol produce inhibición de la ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ en algunos tejidos en concentraciones elevadas (0.4 M).

En el presente trabajo se presentan evidencias en piel aislada de sapo, de que a concentraciones más bajas (0.1 M) el etanol produce un efecto estimulante del transporte de sodio que determina un aumento de la corriente de corto-circuito (SCC) y aumento de la diferencia de potencial transepitelial (PD). Este efecto se observa en la mayor parte de los casos en que el etanol actúa en el lado vascular o serosal de la piel. Se postula que este efecto se debe a liberación de noradrenalina desde las terminaciones simpáticas de la piel ya que en sapos tratados previamente con reserpina y en pieles tratadas con propanolol, el efecto estimulante desaparece. Noradrenalina 10^{-7} M en el lado serosal remedia el efecto estimulante del etanol.

La acción del etanol en el lado mucosal o externo de la piel no presenta el efecto estimulante en la mayor parte de los casos y se caracteriza por una marcada disminución de PD y ligera caída de los valores de SCC, lo que corresponde a un notable aumento de la conductancia total debido a un considerable aumento de la conductancia pasiva.

ABSTRACT

It has been described that ethanol 0.4 M caused a significant decrease of the potential difference (PD) and in the short circuit current (SCC) due to inhibition of the ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$.

In this paper we show that ethanol 0.1 M in the serosal side of isolated toad skin produced stimulation of the SCC and transepithelial PD.

These effects are blocked in toads previously treated with reserpin and in skins treated with propanolol. The effect of ethanol is similar when noradrenalina 10^{-7} M is added in the serosal side of the skin.

Ethanol in the mucosal side caused a great decrease of the PD and a slight decrease of the SCC due to a remarkable increase of the total conductance of the skin, caused by the augmentation in the passive conductance.

KEYWORDS: Conductance. Toad skin. Ethanol. Bioelectric activity.

*Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

INTRODUCCION

En 1965 Israel, Kalant y Laufe señalaron que etanol producía inhibición de la ATPasa Na^+-K^+ . Este mismo efecto se producía en piel aislada de *Rana pipiens*. La corriente de corto circuito (CCC)*, que es equivalente al transporte neto de sodio, disminuyó en presencia de etanol según Israel y Kalant (1963). Norris y Concha (1982) demostraron que etanol produce aumento de la diferencia de potencial transepitelial (PD) y de la CCC cuando actúa por el lado serosal debido a que libera noradrenalina desde las terminaciones simpáticas. Este efecto no se presentó en sapos previamente tratados con reserpina ni en pieles en Ringer sin calcio y con EGTA.

La piel de batracio representa, en la investigación biológica, un modelo que ha servido para estudiar la acción de una multiplicidad de agentes químicos como mediadores (Rudolph et al., 1979), hormonas (Neumann et al., 1985) y drogas (Quevedo et al., 1984) que gravitan sobre los procesos biológicos, fundamentales en el aspecto de transporte a través de membranas. El transporte activo de sodio y potasio tiene una gran relevancia en el funcionamiento de todas las células animales debido a que mantiene un medio intracelular pobre en sodio y de alta concentración de potasio, lo que permite una óptima actividad enzimática y la mantención de gradientes iónicas que son aprovechadas para el funcionamiento de cotransporte de otros iones y sustancias no iónicas.

La actividad mencionada se traduce, en piel de sapo, como actividad bioeléctrica representada por los siguientes parámetros: Diferencia de potencial transepitelial (DP), Corriente de corto circuito (CCC) que mide el transporte activo de sodio, Potencial de la bomba de sodio (E_{Na}), conductancia activa o de sodio (G_{A}) y conductancia pasiva (G_{P}).

El objeto del presente trabajo es analizar el efecto que tiene el etanol sobre los diferentes parámetros bioeléctricos de la

piel de sapo y proponer un posible mecanismo de acción.

MATERIAL Y METODO

Los experimentos se realizaron con pieles aisladas del sapo *Pleurodema thaul* montadas en cámara de lucita tipo Ussing (Ussing and Zerahn, 1954) provista de electrodos de calomelanos con puentes de agar-Ringer para el registro del potencial eléctrico transepitelial y electrodos de Ag-AgCl para el registro de la corriente de corto circuito. Ambos parámetros (DP y CCC) se registraron en un inscriptor Cole-Parmer de 2 canales. Para determinar los cambios de DP a CCC y viceversa se utilizó un fijador de voltaje automático, G. Metraux Electronique. El volumen de Ringer del lado serosal y mucosal de la piel fue de 4 ml y fue adecuadamente oxigenado con abundante burbujeo. El pH se ajustó a 7.4 y la temperatura de la solución osciló entre 18 y 20°C (temperatura ambiental).

Antes de iniciar las mediciones, la preparación se mantuvo durante 60 minutos en estabilización de su DP y CCC.

Una vez estabilizados DP y CCC que fueron considerados como controles, se colocaron 30 μl de etanol absoluto Merck en el lado serosal alcanzando una concentración de 0.1 M en la solución de dicho lado. En una segunda etapa se practicó igual maniobra en el lado mucosal.

Concluidos los registros de DP y CCC antes y después de la acción del etanol en el lado serosal y mucosal se inició la aplicación de la prueba de amilorida de acuerdo a la técnica de Isaacson (Isaacson, 1977) para determinar los valores del potencial de la bomba de sodio (E_{Na}), la conductancia activa o de sodio (G_{A}) y la conductancia pasiva (G_{P}).

Para realizar la prueba se miden los valores de DP y CCC antes de colocar amilorida 10^{-6}M en el lado mucosal y después de la acción de dicha sustancia. Con

* Referida también en el texto como (SCC).

estos valores se calcula G_p de acuerdo a la fórmula de Isaacson:

$$G_p = \frac{\frac{1}{D_{ps}} - \frac{1}{D_{pc}}}{\frac{1}{CCC_s} - \frac{1}{CCC_c}}$$

donde D_{pc} y CCC_c son valores controles
 D_{ps} y CCC_s son valores después de amilorida

La conductancia total del sistema es: $G_T = \frac{CCC_c}{D_{pc}}$

$$G_T = G_p + G_A; \quad G_A = G_T - G_p$$

$$E_{Na} = \frac{CCC_c}{G_A}$$

En este estudio se utilizaron las siguientes sustancias:

Amilorida, obsequio de Merck, Sharp and Dohme; noradrenalina, indometacina y propanolol de Sigma Chemical Co.; etanol absoluto Merck y Reserpina del Laboratorio Silesia. Los cálculos estadísticos se realizaron en base a muestras pareadas para el cálculo de "t" según D.E. Gray (1961).

RESULTADOS

El etanol en concentración 0.1 M en el lado serosal provoca un aumento de la CCC y DP predominando el primero sobre el segundo (Fig. 1). Este efecto puede reproducirse exactamente si se hace actuar noradrenalina en el lado serosal en concentración de 10^{-7} M. El efecto del etanol serosal no se produce en sapos inyectados 24 horas antes del experimento con reserpina en proporción de 10 mg/kg de peso en inyección subcutánea

(Fig. 2). El efecto del etanol serosal no se modifica por indometacina serosal en concentración de 10^{-5} M (Fig. 3). Noradrenalina en concentración de 10^{-7} M, produce un efecto semejante al etanol, modifica los diferentes parámetros bioeléctricos (DP, CCC, G_T , G_A , G_p y E_{Na}) según se aprecia en las figuras 4 y 5. El etanol en el lado mucosal de la piel en igual concentración que en los experimentos anteriores (0.1 M) provoca una significativa disminución de DP ($P < 0.001$), disminución de SCC o bien CCC ($P < 0.01$, y aumento de G_T ($P < 0.00001$, Fig. 6). G_A aumenta ligeramente, E_{Na} disminuye y G_p aumenta considerablemente (Fig. 7).

Estos efectos son similares a los que se producen por acción del etanol en el lado serosal en pieles de animales previamente tratados con reserpina, en los cuales el efecto que es similar al de noradrenalina ha desaparecido (Fig. 2). Cuando la concentración del etanol sero-

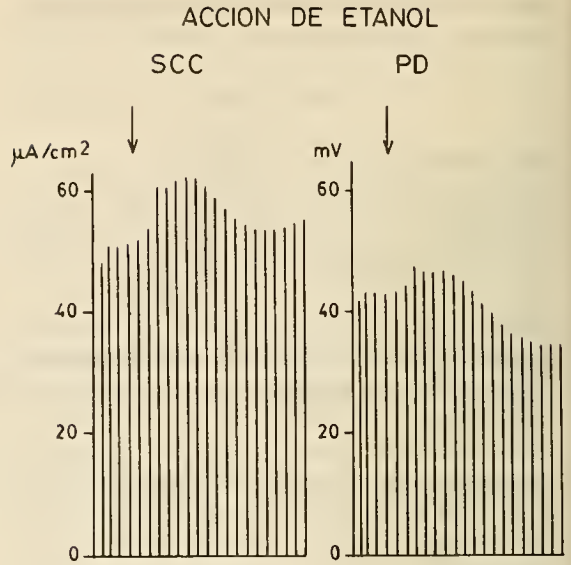
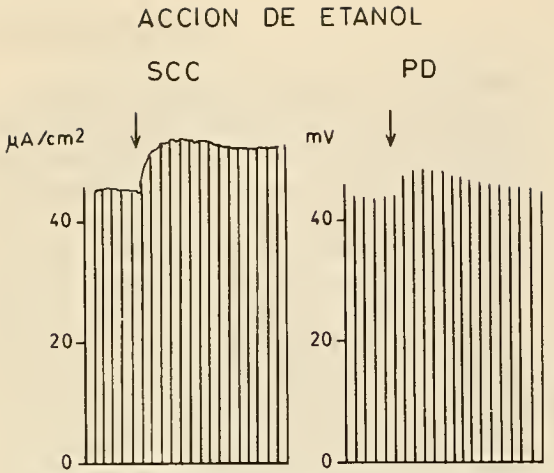


Fig. 1.—Registro de corriente de corto-circuito (SCC) y diferencia de potencial transepitelial (PD) en piel aislada de *Pleurodema thaul*. Efecto de etanol en concentración final de 0.1 M en el lado serosal. El fijador de voltaje registra PD durante 2 segundos, cada 2 minutos.

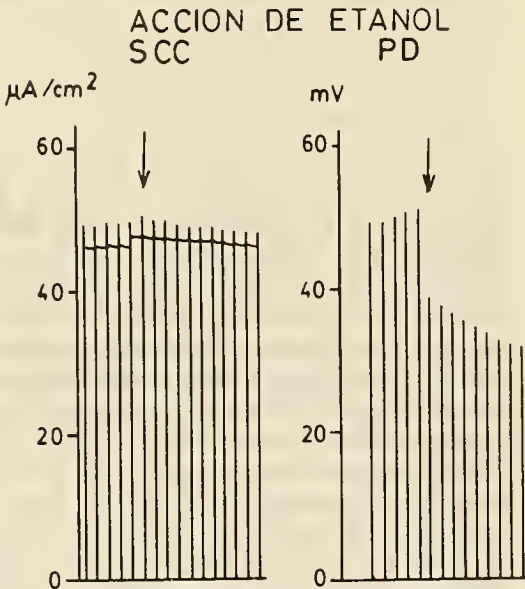


Fig. 2.— Registro de corriente de corto-circuito (SCC) y diferencia de potencial transepitelial (PD). Efecto de etanol en el lado mucosal de piel aislada de *Pleurodema thaul* en concentración 0.1 M. Registro de PD durante 2 segundos, cada 2 minutos.

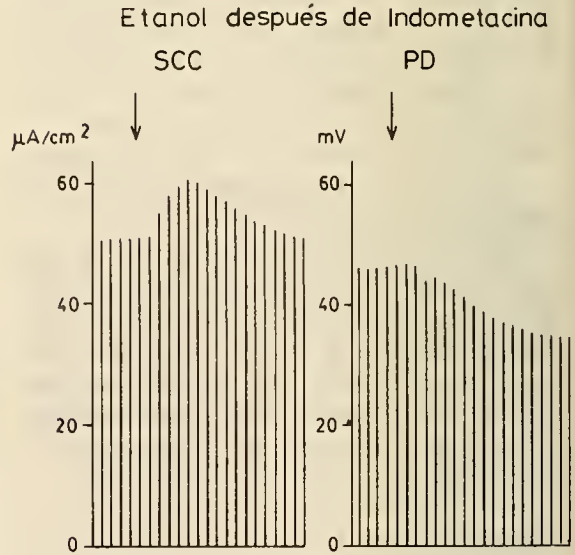


Fig. 3.—Registros de corriente de corto-circuito (SCC) y diferencia de potencial transepitelial (PD). Efecto de etanol 0.1 M antes y después de Indometacina 10^{-5} M en el lado serosal. Registro de potencial durante 2 segundos, cada 2 minutos.

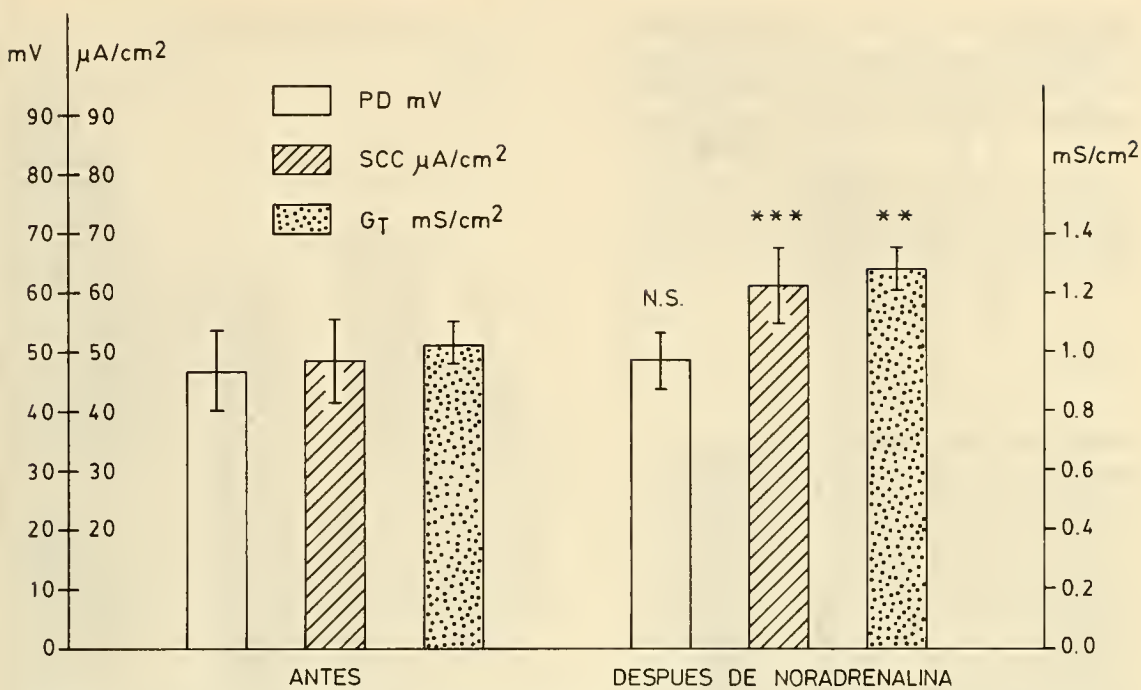


Fig. 4.— Efecto de noradrenalina serosal $10^{-7}M$ sobre piel aislada de *Pleurodema thaul*. Se observa un notable aumento de la corriente de corto-circuito (SCC) y de la conductancia total del sistema (G_T). ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.

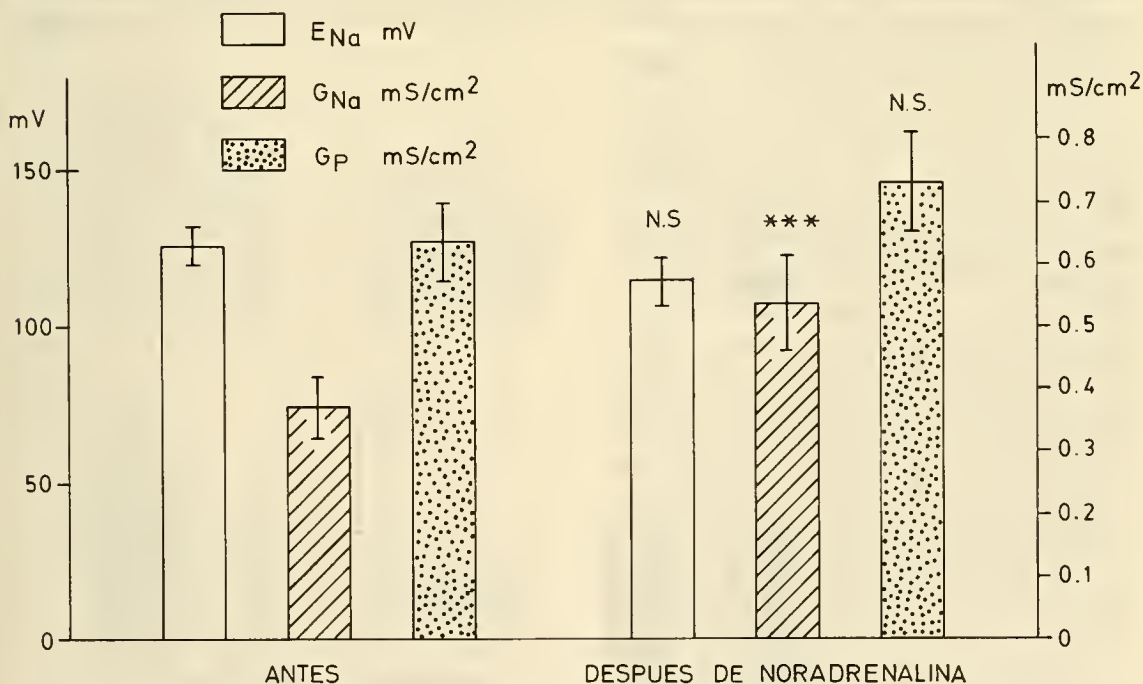


Fig. 5.— Efecto de noradrenalina serosal $10^{-7}M$ sobre piel aislada de *Pleurodema thaul*. Se observa un aumento significativo de la conductancia activa o conductancia de Na^+ (G_{Na}). El potencial de la bomba de sodio (E_{Na}) y la conductancia pasiva (G_p) no presentan diferencias significativas. *** $P < 0.001$.

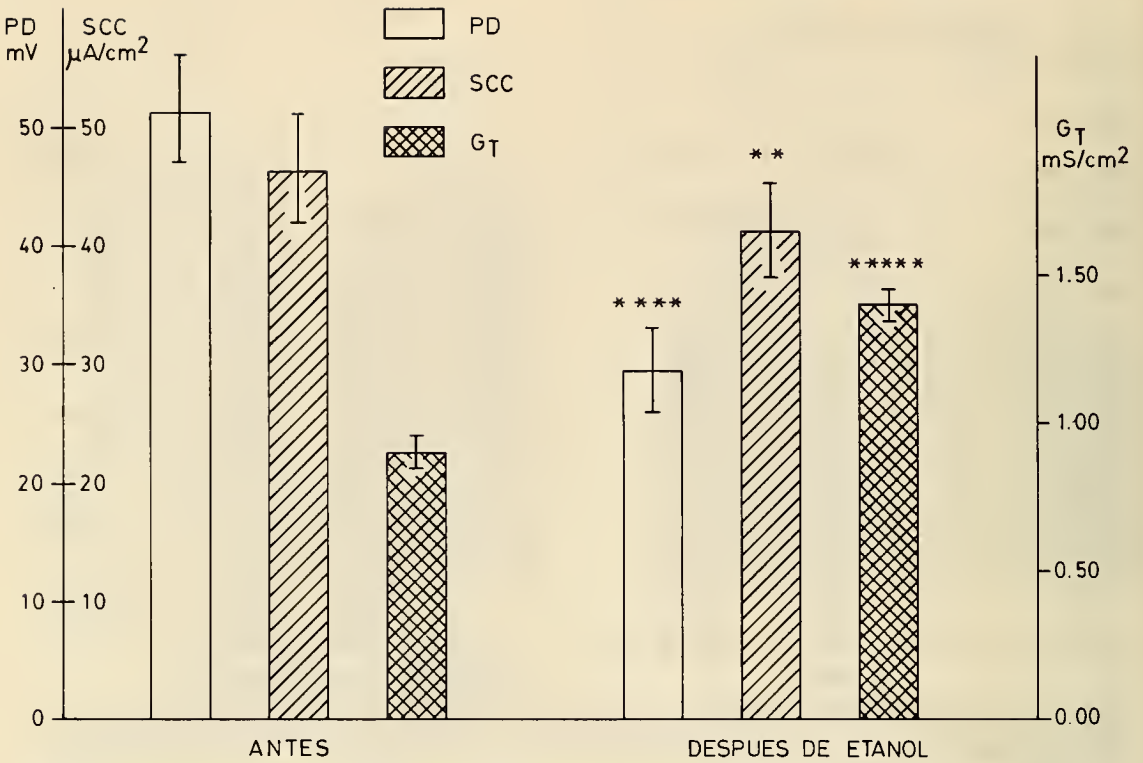


Fig. 6.— Efecto de etanol 0.1 M mucosal en piel aislada de *Pleurodema thaul*. Se observa disminución significativa de la corriente de corto-circuito (SCC) y del potencial transepitelial (PD). La conductancia total (G_T) presentó un gran aumento.

** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$; ***** $P < 0.00001$.

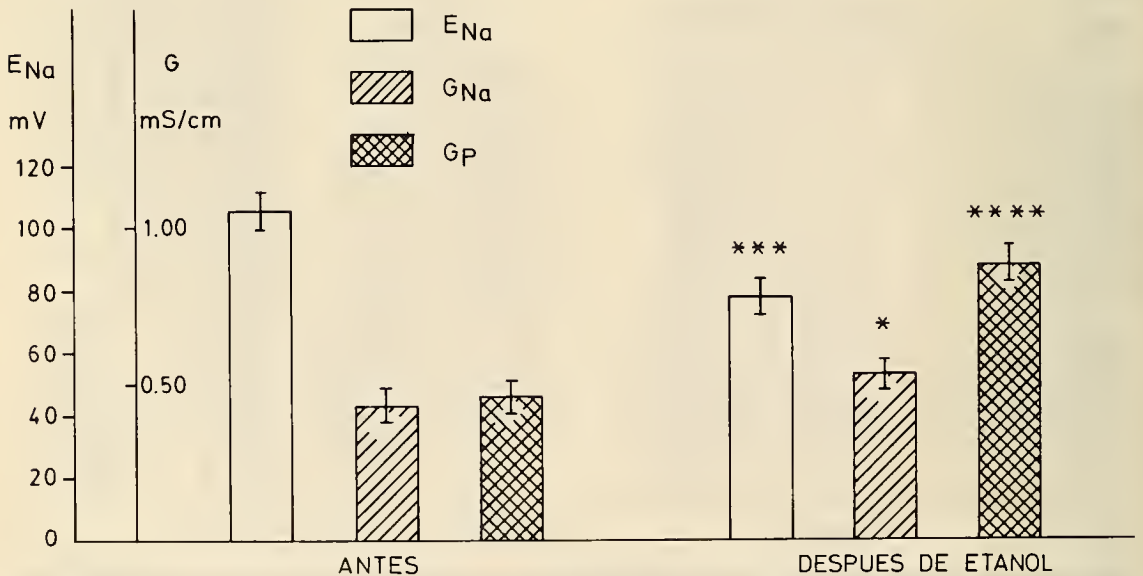


Fig. 7.— Efecto de etanol mucosal 0.1 M en piel aislada de *Pleurodema thaul*. Se observa disminución significativa del potencial de la bomba de sodio (E_{Na}) y ligero aumento de la conductancia activa o de Na^+ . La conductancia pasiva (G_P) aumenta considerablemente.

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ **** $P < 0.001$

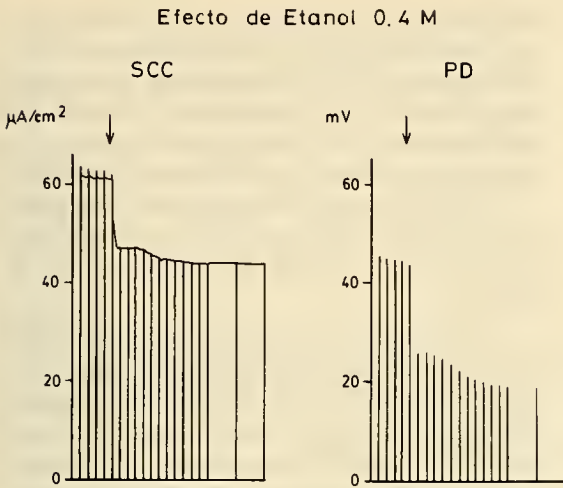


Fig. 8.— Registro de corriente de corto-circuito (SCC) y diferencia de potencial transepitelial (PD) en piel aislada de *Pleurodema thaul*. Efecto de etanol 0.4 M en el lado serosal. Registro de potencial durante 2 segundos, cada 2 minutos.

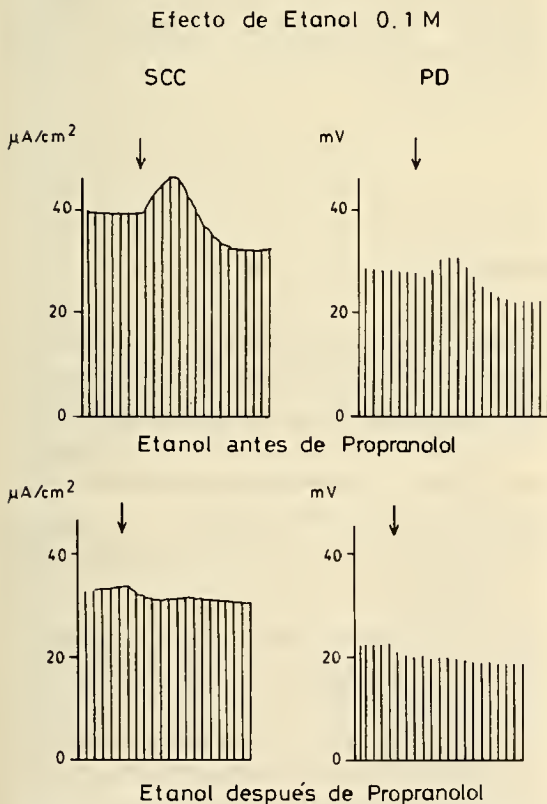


Fig. 9.— Registros de corriente de corto-circuito (SCC) y diferencia de potencial (PD). Efecto de etanol 0.1 M en el lado serosal antes y después de la acción de propranolol 10^{-6} M. Registro de PD durante 2 segundos, cada 2 minutos.

sal se aumenta de 0.1 M a 0.4 M se produjo una marcada disminución de DP y CCC que persistió después de varios lavados de la preparación, hecho que se aprecia en la figura 8.

Cuando la piel fue tratada con propranolol 2×10^{-6} M en el lado serosal, el etanol 0.1 M no produjo el efecto de estimulación de la DP y CCC como se aprecia en la figura 9.

DISCUSION

Los resultados obtenidos concuerdan en parte con trabajos anteriores (Norris y Concha, 1982) en los que se demuestra que el etanol afecta a las propiedades bioeléctricas de la piel de batracio. En la mayoría de nuestros experimentos concentraciones de alrededor de 0.1 M provocaron un aumento de DP y de CCC cuando el etanol actuó por el lado serosal (Fig. 1). Esto se interpreta como una acción de liberación de noradrenalina desde las terminaciones nerviosas simpáticas que rodean las glándulas mucosas (Whitear, 1974).

Este efecto del etanol desaparece cuando los animales son tratados previamente con reserpina en dosis suficiente para depletar las terminaciones nerviosas (Fig. 2). En pieles tratadas previamente con Indometacina 10^{-5} M no se modifica significativamente la respuesta a etanol, hecho que sugiere que este alcohol no provoca liberación de prostaglandinas como sucede con otras sustancias tales como Angiotensina II y el ionóforo de calcio A23 187 (Concha et al., 1982; Nielsen, 1978; Concha et al., 1985). El efecto de etanol 0.1 M se piensa que es debido a liberación de noradrenalina y puede remedarse al hacer actuar esta catecolamina por el lado serosal en concentración de 10^{-7} M produciendo notables cambios de los parámetros bioeléctricos (Figs. 4 y 5). Los cambios en los parámetros bioeléctricos producidos por etanol en animales tratados 24 horas antes con reserpina son totalmente diferentes a los anteriores producidos por no-

radrenalina (Figs. 6 y 7). Estos corresponderían al efecto neto del etanol donde resalta el gran aumento de la conductancia total del sistema en base al gran aumento de la conductancia pasiva. En todos los experimentos la recuperación de la DP y CCC después de lavado es rápida, lo que hace pensar que etanol 0.1 M no altera la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. Sin embargo, la inhibición ocurre a concentraciones mayores (Israel y Kalant, 1963) provocando una notable disminución de DP y CCC que persiste después de abundante lavado (Fig. 8). El efecto de etanol 0.1 M por el lado mucosal carece, en la mayor parte de los experimentos, del efecto producido por la posible liberación de noradrenalina, hecho que ocurre en la mayoría de los experimentos en los que el etanol 0.1 M actúa en el lado serosal.

Nuestros datos tienden a favorecer la hipótesis sobre liberación de noradrenalina. la supresión del efecto estimulante en

animales depletados por tratamiento previo con reserpina y la disminución o eliminación de la estimulación producida por etanol cuando las pieles son tratadas previamente con propanolol serosal en concentración de 2×10^{-6} M así lo indican.

En un bajo porcentaje de preparaciones en piel aislada (10%) el etanol produjo evidente acción en concentración de 0.05 M.

De acuerdo a los resultados obtenidos es conveniente hacer presente que cuando el etanol sea usado como vehículo para disolver sustancias que tengan que ser estudiadas en preparaciones biológicas, debe controlarse previamente su acción, ya que a bajas concentraciones puede producir cambios que pueden atribuirse erróneamente a la sustancia disuelta cuyo efecto interesa estudiar.

Este trabajo fue financiado por el proyecto 20.33.18 y 20.33.23 de la Dirección de Investigación. Universidad de Concepción.

BIBLIOGRAFIA

- Israel, Y., Kalant, H. and Laufer, L., 1965. 'Effects of ethanol $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++}$ - stimulated microsomal ATPase'. *Biochem. Pharmacol.* 14: 1803-1814.
- Israel, Y. and Kalant, H., 1963. "Effect of ethanol on the transport of sodium in frog skin". *Nature* 200: 476-478.
- Norris, B. y Concha, J., 1982. "Ethanol effects on the bioelectric activity of the toad skin". *Bol. Soc. Biol. (Concepción)*. LIII: 87-105.
- Ussing, H.H. and Zerahn, K. 1951. "Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin". *Acta Physiol. Scand.* 23: 110-127.
- Isaacson, L. C., 1977. "Resolution of parameters in the equivalent electrical circuit of the sodium transport mechanism across toad skin". *J. Membrane Biol.* 30: 301-317.
- Gray, D.E., 1961. "Statistics for Medical Students". Hong Kong University Press.
- Whitear, M., 1974. "The nerves in frog skin". *J. Zool., London*, 172, 503-529.
- Concha, J. B., González, C.S. and Contreras, G.M., 1982. "Effects of Angiotensin II on Isolated toad skin". *IRCS Medical Science* 10: 584-585.
- Nielsen, R., 1978. "Effects of the Polyene Antibiotic Filipin and the Calcium Ionophore A23187 on sodium transport in Isolated Frog Skin (*Rana temporaria*)". *J. Membrane Biol.* 40 (special Issue): 331-345.
- Concha, J., Norris, B., González, C. 1985. "Rol de angiotensina II en el transporte de sodio en la piel aislada de sapo". *Arch. Biol. & Med. Exper.* 18 (2): R. 28.
- Quevedo, L., Melo, R., Sáez, J.C. and Cifuentes, F., 1984. "Blockade of electrophysiological properties of muscle fibres by lycorine". *Neuropharm.* 23 (3): 391-394.
- Neumann, V., Quevedo, L. and Concha, J. 1985. "Effects of progesterone on the sympathetic response of a frog nerve-skin preparation". *Cell. Mol. Biol.* 31 (5): 373-377.
- Rudolph, I., Norris, B., Concha, J., González, C. 1979. "Studies on the electrical responses of a toad nerve-skin preparation". *Cell. Mol. Biol.* 24: 17-27.