

EFFECTO DEL DIMETIL SULFOXIDO SOBRE EL EPITELIO TRANSPORTADOR DE SODIO EN PIEL DE SAPO*

Effect of Dimethylsulfoxide on the sodium transporting epithelium in toad skin

JUAN CONCHA B. Y GRACIELA CONTRERAS M.**

RESUMEN

Dimetil sulfóxido (DMS) es un solvente orgánico usado para disolver drogas o sustancias insolubles en agua con el objeto de introducir las al organismo animal o estudiar su acción en preparaciones "in vitro".

Se estudió el efecto que DMS 0.3% y 1.5% tiene sobre los parámetros bioeléctricos del epitelio de piel de sapo. Se encontró que DMS 0.3% por vía serosal produce aumento de la diferencia de potencial transepitelial (DP) y de la corriente de cortocircuito (CCC). También se producen cambios en la conductancia pasiva (G_p) y en la conductancia activa (G_A). La G_A aumenta cuando DMS produce estimulación. La G_p aumenta cuando la concentración de DMS mucosal es de 1.5%. En concentración de 1.5% serosal se produce inhibición de DP y CCC. DMS 0.3 y 1.5% en el lado mucosal provoca disminución de DP y CCC.

La estimulación de DP y CCC producida por DMS 0.3% serosal se presenta en sapos de verano. Excepcionalmente aparece en sapos de invierno. Se interpreta la acción estimulante como resultado del efecto de noradrenalina liberada de las terminaciones nerviosas simpáticas por DMS.

ABSTRACT

Dimethylsulfoxide (DMS) is an organic solvent used for dissolving water insoluble substances (drugs) with the purpose of introducing them into the animal organism or to study its action on "in vitro" preparation.

The effect of DMS 0.3% and 1.5% on the bioelectric parameters of the toad skin epithelia was studied. DMS 0.3% serosal produces an increase of both transepithelial potential difference (DP) and short circuit current (SCC). Passive conductance (G_p) and active conductance (G_A) also were changed. DMS 1.5% serosal induces only inhibition of DP and SCC. The DMS 0.3% serosal stimulation of DP and SCC was observed in summer toads. In winter, this type of response was exceptionally observed. The stimulating response was interpreted as the result of the action of noradrenaline released from the sympathetic nerve endings by DMS.

KEYWORDS: Toad skin. Dimethylsulfoxide action. Bioelectric activity. Noradrenaline.

INTRODUCCION

Los estudios sobre transporte iónico realizados en piel de sapo han sido útiles para aclarar mecanismos de acción de drogas o sustancias químicas de origen biológico que son activas a ni-

* Proyecto de Investigación de la Dirección de Investigación, Universidad de Concepción, N° 20.33.30.

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

vel de epitelios como los de túbulos renales, intestino, glándulas y otros epitelios en los que los métodos de exploración son complicados y los resultados son distorsionados por la acción de fuerzas y agentes extra epiteliales. Referente a la acción de dimetilsulfóxido (DMS) existe abundante literatura sobre su uso como vehículo para la administración de drogas (Wiesmann y col. 1977), como elemento protector para reducir efectos de radicales libres (Lamb y col. 1984), como elemento crioprotector (Ashwood-Smith, 1967; Lorelock y col. 1959) y como agente terapéutico en algunas enfermedades de tipo inflamatorio y de otros orígenes (Matsumoto y col. 1967; Rosenbaum y col. 1964).

En piel de sapo sólo existe un trabajo realizado por Franz y col (1967) que encuentra que DMS en concentración de 2.5% en el Ringer del lado epidérmico o mucosal de la piel produce cambios bioeléctricos. La diferencia de potencial transepitelial (DP) disminuye hasta valores entre 50 y 75 por ciento del valor inicial. La corriente de cortocircuito (CCC), en cambio, a veces disminuye, otras no varía y la respuesta predominante es un ligero aumento considerando la misma condición experimental en diferentes animales.

Franz también señala que DMS produce un gran aumento de permeabilidad de la piel al paso pasivo de varias sustancias como Cl^- , Na^+ , urea, tiourea, manitol eritritol, sucrosa y rafinosa (Franz y col. 1967). El trabajo de este autor no presenta datos sobre cambios de DP y CCC producidos por la acción de DMS en el lado vascular (serosal) de la piel.

El presente trabajo tiene por objeto estudiar la acción que ejerce el DMS sobre parámetros bioeléctricos dependientes del transporte iónico, de la piel aislada de sapo, al actuar por las vías mucosal y serosal.

MATERIAL Y METODO

Se trabajó con piel aislada del sapo chileno *Pleurodema thaul* montada en cámara de lucita tipo Ussing (Ussing y col. 1951). Los sapos se descerebraron y demedularon para después extraer la piel del abdomen. Después de lavar la piel con Ringer, se colocó entre las dos hemisferios de lucita presionando levemente mediante las tuer-

cas metálicas de compresión. Se colocaron 3 ml de Ringer a cada lado de la piel en los depósitos correspondientes. La superficie de piel expuesta a las soluciones fue de 0.70 cm^2 . El Ringer usado tenía la siguiente composición en mM: NaCl 112; KCl 1.9; CaCl_2 2.0; NaHCO_3 2.3; glucosa 11.0. El pH se ajustó a 7.4 con buffer fosfato. El Ringer fue oxigenado constantemente por ambos lados mediante burbujeo. Para registrar la diferencia de potencial (DP) se utilizaron electrodos de calomelano unidos a la solución Ringer por puentes de agar-Ringer al 3%.

Para el registro de corriente de cortocircuito (CCC) se usaron electrodos de Ag-AgCl. La CCC se registró en forma continua en un registrador "Cole Parmer" de dos canales. Se usó un fijador de voltaje "G. Metraux Electronique" para mantener la DP en cero.

Cada vez que fue necesario, se registró la DP en el 2º canal, desconectando el fijador de voltaje. En algunos registros el fijador de voltaje midió automáticamente el voltaje cada 2 minutos durante 4 segundos.

Con los valores de DP y CCC y aplicando el test de Isaacson (1977) se determinaron los valores del potencial de sodio (E_{Na}), la conductancia activa por transporte de sodio (G_A) y la conductancia pasiva por paso pasivo de iones (G_p). Para realizar este test se usó amilorida 10^{-6} M en el lado mucosal o externo de la piel. El dimetilsulfóxido (DMS) se usó en concentraciones de 0.3% en una serie de experimentos y en concentración de 1.5% en otra serie.

Los cálculos estadísticos se realizaron aplicando el "Student's test" para observaciones pareadas (Gray 1961).

RESULTADOS

1.- Acción de Dimetilsulfóxido (DMS) en la solución del lado serosal de la piel.

Como se muestra en la figura 1, DMS 0.3% produce un aumento considerable de la diferencia de potencial transepitelial (DP) y de la corriente de cortocircuito (CCC).

En la figura 2 se observa que DMS en dosis repetidas de 0.3% produce un efecto estimulante con la primera dosis y depresor con las siguientes.

En la figura 3 se presenta el resultado estadístico de la acción de DMS 0.3% en el lado serosal. La DP aumenta en un 36.8+3,6% y la CCC en un 26.5+2.2%.

Cuando la solución Ringer del lado serosal se priva de calcio, la DP y la CCC disminuyen por acción de DMS 0.3% en un 16.3+1% y en un 15.8+1.4%, respectivamente, como se aprecia en la figura 4.

En la figura 5 se observa el resultado de la prueba de amilorida para determinar la acción de DMS 0.3% serosal sobre los siguientes parámetros: Conductancia total (G_T), conductancia activa (G_A), conductancia pasiva (G_p) y potencial de la bomba de sodio-potasio (E_{Na}).

En la figura 6 se observan los cambios producidos en los mismos parámetros anteriores por acción de DMS en dosis mayor (1.5%).

En la figura 7 se observa la inhibición del

efecto estimulante de DMS 0.3% serosal producida por Propranolol 10^{-6} M.

2.- Acción de DMS en la solución del lado mucosal o externo de la piel.

En la figura 8 se aprecia el efecto de DMS 1.5% sobre DP y CCC.

En la figura 9 se observa que DMS 1.5% mucosal produce una disminución estadísticamente significativa de DP y CCC. La conductancia total (conductancia activa más conductancia pasiva) no presenta cambio estadísticamente significativo.

En la figura 10 se presentan los resultados correspondientes a los cambios en los valores de DP, CCC, G_T , G_p y E_{Na} después de la acción de DMS 1.5% mucosal.

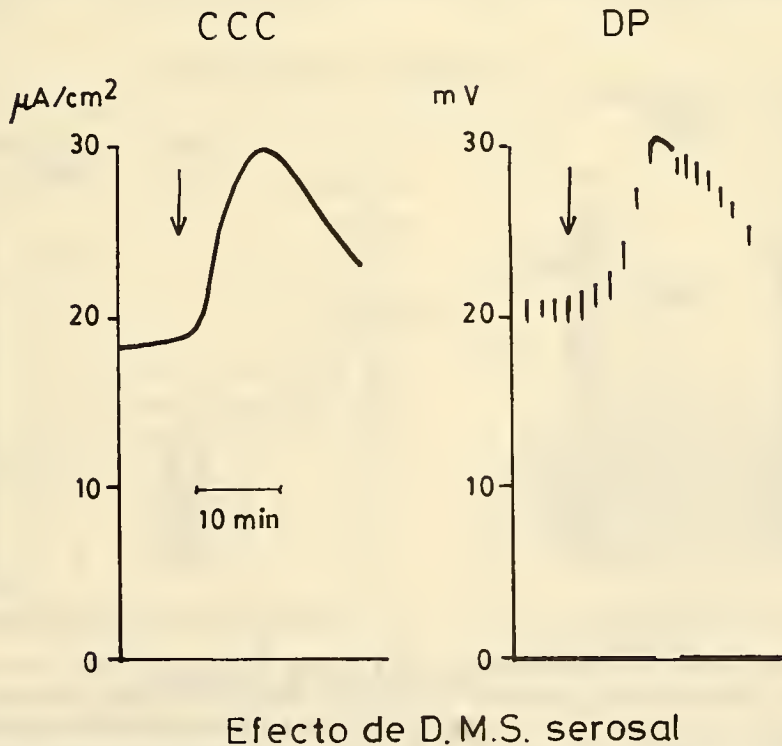
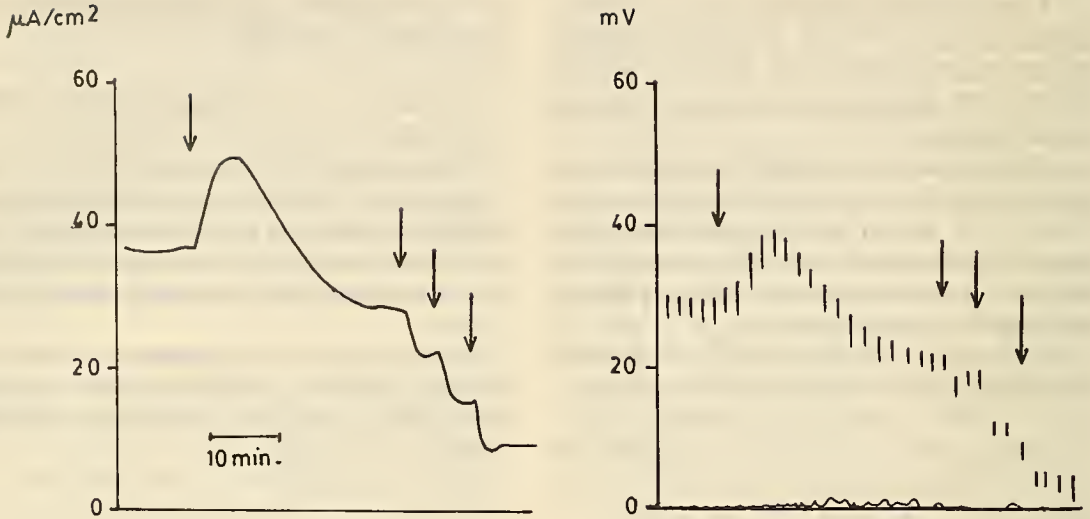


FIG. 1.- Efecto de dimetilsulfóxido (DMS) 0.3% en el lado serosal de la piel aislada de *Pleurodema thaul*.

CCC

DP



Efecto de DMS serosal en dosis progresiva

FIG. 2.- Efecto de dimetilsulfóxido (DMS) en concentraciones progresivas de 0,3, 0,6, 0,9, 1,2% en el lado interno o serosal de la piel aislada de *Pleurodema thaul*.

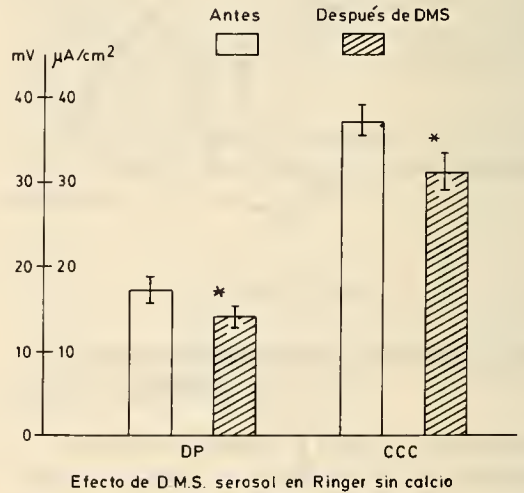
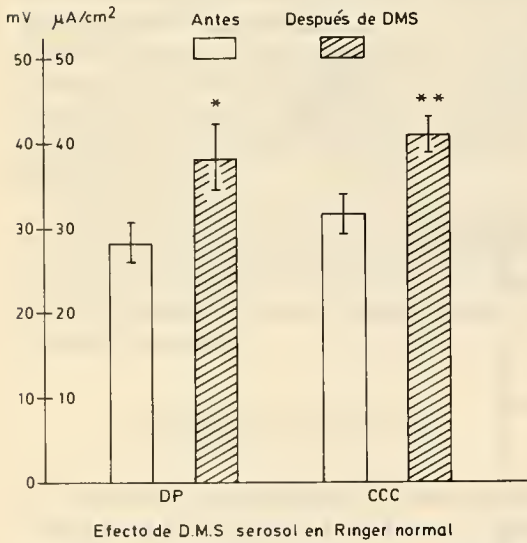


FIG. 3.- Estudio estadístico de la acción de dimetilsulfóxido (DMS) 0,3% serosal en piel abdominal aislada de *Pleurodema Thaul*.

*P < 0,01 **P < 0,001 n = 8

En ambos lados de la piel se colocó Ringer normal.

FIG. 4.- Estudio estadístico de la acción de dimetilsulfóxido (DMS) 0,3% serosal en piel aislada de *Pleurodema thaul*. En el lado interno o serosal se colocó solución Ringer sin calcio.

*P < 0,01 ; n = 7

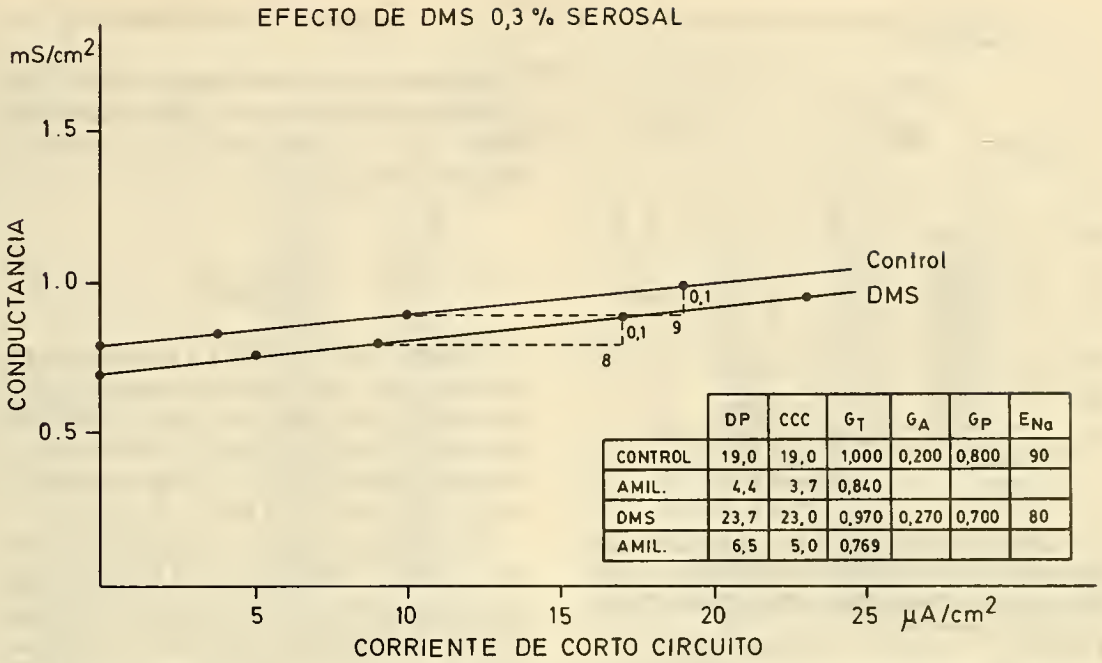


FIG. 5.- Prueba de Isaacson para determinar los valores de la conductancia total (G_T), conductancia activa (G_A), conductancia pasiva (G_P) y potencial eléctrico de la bomba de Na^+ y K^+ (E_{Na}) bajo la acción de dimetilsulfóxido 0.3% serosal en piel aislada de *Pleurodema thaul*. Se aprecia aumento de la conductancia activa (G_A) debido al mayor flujo de Na^+ producido por la acción de noradrenalina liberada de las terminaciones nerviosas. G_P disminuyó al igual que E_{Na} .

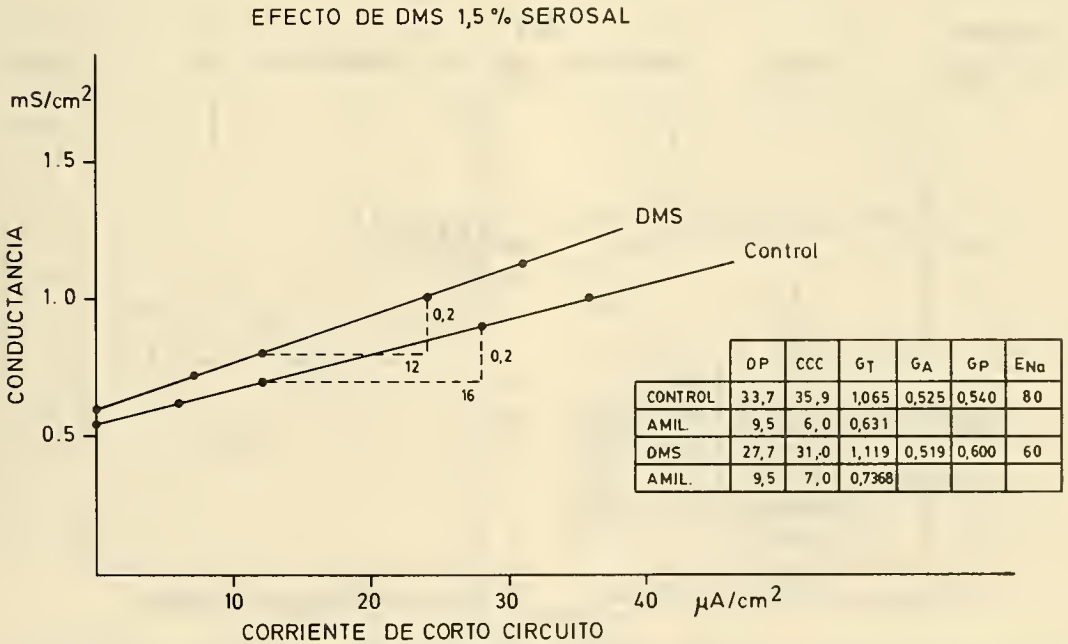


FIG. 6.- Prueba de Isaacson para determinar los valores de G_T , G_A , G_P y E_{Na} + en piel aislada de *Pleurodema thaul* bajo la acción de dimetilsulfóxido 1.5% serosal. Se aprecia una disminución de G_A , un aumento de G_P y disminución de E_{Na} . Debido al aumento de G_P aumentó G_T .

Efecto de propranolol sobre la respuesta al DMS 0,3 %

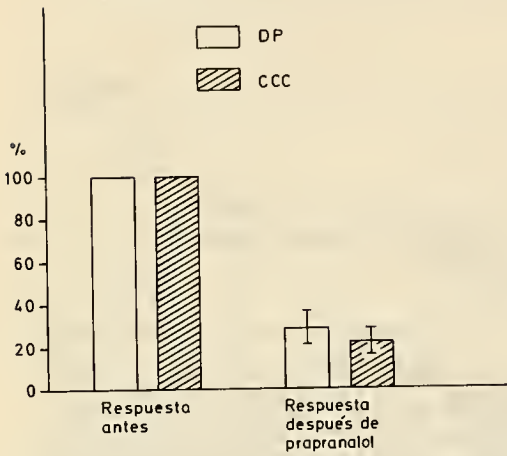


FIG. 7.- Inhibición de la respuesta estimulante de dimetilsulfóxido (DMS) 0.3% serosal producida por propranolol 10^{-6} M en el lado serosal. Las respuestas antes de la acción de propranolol se tomaron como 100%.

* $P < 0.001$ $n = 6$

En el registro se observa la acción inhibitoria intensa de propranolol 10^{-6} M sobre DP y CCC.

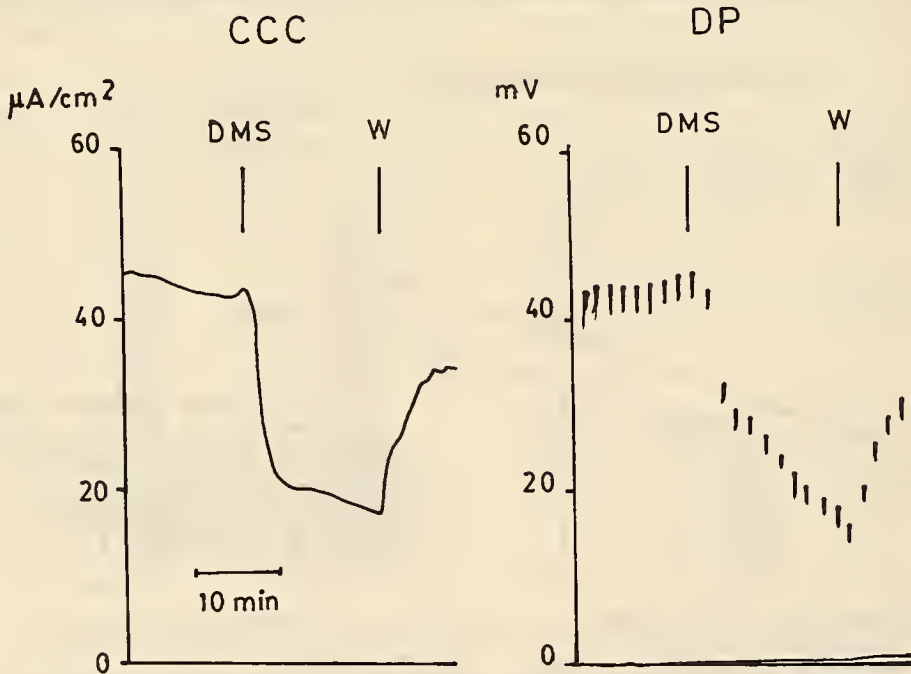
AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Srta. Nardita Albornoz por el cuidadoso tipeo del trabajo y al Sr. Roberto Sepúlveda por la confección de los gráficos y arreglo de los registros.

DISCUSION

El Dimetil sulfóxido (DMS) ha sido utilizado principalmente como solvente orgánico con el objeto de servir de vehículo a drogas y sustancias no solubles en agua que deben introducirse en el organismo animal o actuar en preparaciones "in vitro" para el estudio de nuevos fármacos.

En todos esos casos es necesario saber si además de actuar como vehículo, el DMS provoca, de por sí, trastornos en las estructuras donde actúa. Hay escasos trabajos que se refieren al mecanismo de acción de DMS (Ward y col. 1967; Rammler, 1967; Davis, 1967) y en tejidos epite-



Efecto de DMS mucosal

FIG. 8.- Efecto de dimetilsulfóxido 1.5% mucosal sobre piel abdominal aislada de *Pleurodema thaul*. Se observa un intenso efecto inhibitor sobre DP y CCC.

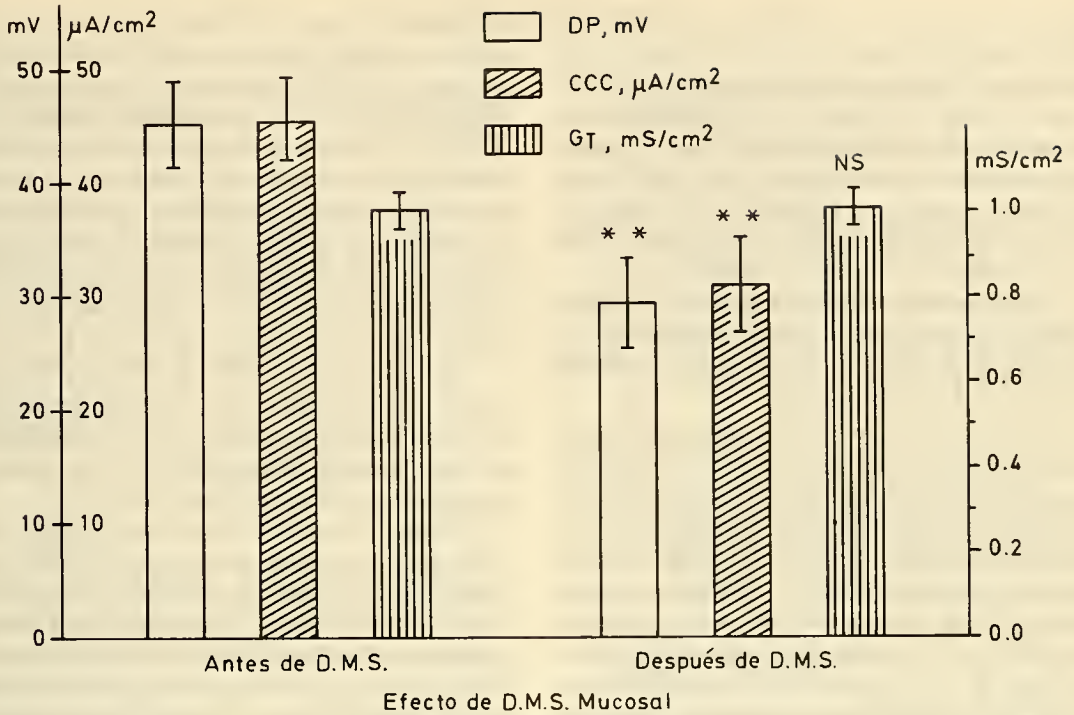


FIG. 9.- Estudio estadístico de la acción de dimetilsulfóxido (DMS) 1.5% mucosal sobre piel abdominal aislada de *Pleurodema thaul*.

** $P < 0.01$; NS = sin cambio significativo, $n = 8$

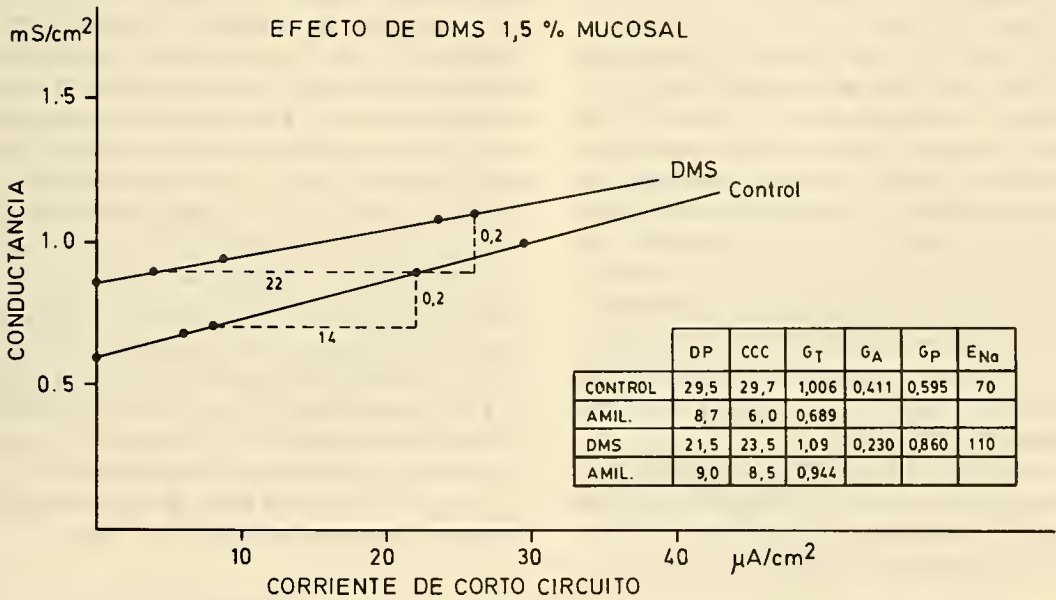


FIG. 10.- Prueba de Isaacson para determinar los valores de G_T , G_A , G_p y E_{Na} en piel abdominal aislada de *Pleurodema thaul* bajo la acción de dimetilsulfóxido (DMS) 1.5% mucosal. Se observa una notable disminución de G_A , un gran aumento de G_p por paso pasivo de iones por vía intercelular y un aumento de E_{Na} . G_T no tuvo gran variación.

liales sólo se conoce el estudio de Franz y col. (1967) en piel de rana. En dicho trabajo, se establece que DMS cuando actúa desde el lado mucosal o externo de la piel provoca alteraciones de los parámetros eléctricos como DP y CCC y, además, aumento de permeabilidad para una serie de sustancias inorgánicas y orgánicas. En dicho estudio no se llega a una explicación sobre el posible mecanismo de acción del DMS.

En el presente trabajo se demuestra que DMS altera los parámetros electrofisiológicos de la piel del sapo *Pleurodema thaul* al actuar por el lado serosal o por el lado mucosal.

Franz y col. observaron cambios de dichos parámetros cuando DMS 2.5% actúa por el lado mucosal, encontrándose en algunos casos aumento y en otros disminución de los parámetros. No se estudió la acción de DMS por el lado serosal. En nuestro estudio DMS en concentraciones de 0.3% y 1.5% produjeron siempre disminución de la DP y CCC cuando actuó por el lado mucosal (Figs. 8, 9 y 10). Por el lado serosal en concentración de 0.3% produjo aumento de los parámetros y a mayor concentración (1.5%) provocó una disminución (Figs. 1, 2, 3, 5 y 6).

Por el análisis de estos resultados se puede proponer que el mecanismo de acción de DMS estaría basado principalmente en aumento de la conductancia a iones ya sea por la vía activa cuando actúa por el lado serosal en concentración 0.3% o por la vía pasiva (intercelular) cuando actúa en concentración de 1.5% en el lado mucosal o serosal. El aumento de la conductancia activa (G_A) podría explicarse por liberación de noradrenalina (N.A.) de las terminaciones simpáticas de la piel. N.A. provoca aumento del AMP cíclico intracelular, hecho que produce aumento de la permeabilidad de la membrana apical y consiguiente aumento de la entrada de Na^+ a las células transportadoras estimulando la bomba de Na^+K^+ y conduciendo a un aumento de la DP y CCC.

Un efecto parecido hemos observado cuando el etanol actúa en dosis 0.1 M serosal. En dosis mayor 0.4 M provoca inhibición (Concha y col. 1987) por bloqueo de la Bomba de Na^+K^+ .

Cuando la solución del lado serosal se cambia por una solución Ringer sin calcio, el efecto estimulante del DMS desaparece y da paso a una acción depresora (Fig. 4). Es probable que debido a la falta del ion calcio extracelular las terminaciones simpáticas no liberen noradrenalina y por lo tanto no pueda producirse el efecto estimulante. Cuando en el medio serosal se hace actuar propanolol 10^{-6} M, sustancia que bloquea los receptores beta adrenérgicos, el DMS tampoco produce el efecto estimulante esperado (Fig. 7).

Un efecto parecido se observó cuando actúa etanol 0.192 M serosal. En este caso el reemplazo de la solución Ringer normal por solución Ringer sin calcio produce desaparición del efecto estimulante del etanol (Norris y col. 1982).

Es muy notorio el efecto estimulante del DMS 0.3% serosal en sapos durante los meses de verano. En los meses de invierno el efecto estimulante no se presenta. Esto conduciría a pensar que las terminaciones nerviosas contienen menos NA en los sapos de invierno así como también los sapos y ranas de invierno tienen menor cantidad de ATP y, en general, menor cantidad de moléculas ricas en energía.

En resumen: DMS es un solvente orgánico usado para disolver drogas o sustancias insolubles en agua que deben ser probadas en preparaciones biológicas "in vitro" o introducidas al organismo animal por vía externa (a través de la piel) o interna (vía oral o rectal). Este solvente, sin embargo, no es inocuo ya que ejerce acciones propias que deben tenerse en cuenta, como las descritas en este trabajo, para el caso de epitelios transportadores de alta resistencia. Dichas acciones se traducen en cambios electrofisiológicos que demuestran alteración de los flujos iónicos debido a los cambios de las conductancias pasiva (G_p) y activa (G_A) del epitelio. El cambio de G_p sería debido a la permeabilización de las uniones apretadas y espacios intercelulares y el aumento de G_A sería debido a la estimulación de la Bomba Na^+K^+ por la NA liberada desde las terminaciones nerviosas simpáticas por acción del DMS.

BIBLIOGRAFIA

- Ashwood-Smith, M.J. 1967. "Radioprotective and cryoprotective Properties of Dimethyl sulfoxide in Cellular systems". *Ann N. Y. Acad. Sci.* 141:45-62.
- Concha, J., Quevedo, L. y Contreras, G. 1987. "Acción de etanol sobre la actividad bioeléctrica del epitelio de piel de sapo". *Bol. Soc. Biol., Concepción* 58:31-38.
- Davis, H.L., Davis, N.L. and Clemons, A.L. 1967. "Procoagulant and nerve-blocking effects of DMSO". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141(1):310-325.
- Franz, T.J. and Van Bruggen, J.T. 1967. "A possible Mechanism of action of DMSO". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141:302-309.
- Gray, D.E. 1961. "Statistics for Medical Students. A practical Guide". Hong Kong University Press.
- 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.
- Lamb, F.S. and Webb, R.C. 1984. "Vascular effects of free radicals generated by electrical stimulation". *Am. J. Physiol* 247:H709-H714.
- Lovelock, J.E. and Bishop, M.W.H. 1959. "Prevention of freezing damage to living cells by Dimethyl sulfoxide". *Nature (London)* 183:1394-1395.
- Matsumoto, Jun. 1967. "Clinical trials of Dimethyl sulfoxide in Rheumatoid arthritis Patients in Japan". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141:560-568.
- Norris, B. y Concha, J. 1982. "Ethanol effects on the bioelectric activity of the toad skin". *Bol. Soc. Biol. Concepción* 53:87-105.
- Rammler, D.H. 1967. "The effects of DMSO on several enzyme systems". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141(1):291-299.
- Rosenbaum, E.E. and Jacob, S.W. 1964. "Dimethyl Sulfoxide in muscularkeletal disorders". *J.A.M.A.* 192:309-316.
- Ussing, H.H., Zerahn, K. 1951. "Active transport of sodium as the source of electric current in the shortcircuited isolated frog skin". *Acta Physiol. Scand* 23:110-127.
- Ward, J.R. Miller, M.L. and Marcus, S. 1967. "The effect of Dimethylsulfoxide on the local Schwartzman Phenomenon". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141(1):280-290.
- Wiesmann, W., Sinha, S. and Klahr, S. 1977. "Effects of Ionophore A 23187 on base-line and Vasopressin-stimulated sodium transport in the toad bladder". *J. Clin. Invest.* 59:418-425.