

## MODIFICACION DE PARAMETROS BIOELECTRICOS EN PIEL DE SAPO POR EL PEROXIDO DE HIDROGENO

### Changes in bioelectric parameters in the toad skin caused by hydrogen peroxide

BERNARDO MORALES, GONZALO CARRASCO, IVÁN QUEVEDO Y LADISLAO QUEVEDO\*

#### RESUMEN

Se ha descrito el efecto injuriente del  $H_2O_2$  en diversos tejidos celulares. Entre sus mecanismos de acción es necesario considerar su poder oxidativo y un posible mecanismo de peroxidación. En este trabajo se describe el efecto de  $H_2O_2$  en los parámetros bioeléctricos de piel de *P. thaul*.

Se utilizó el modelo de Ussing que identifica el transporte de sodio con la corriente de corto circuito (CCC), lo que permite una determinación cuantitativa de los cambios en los parámetros eléctricos. Los experimentos se realizaron en piel abdominal aislada de sapo. Se montó la piel entre dos hemisferios de lucita exponiendo la piel a la solución Ringer rana, pH 7.5 que fue adicionada en cantidades iguales a ambos lados de la piel. Dosis molares crecientes de  $H_2O_2$  se aplicaron en el lado mucosal de la piel de sapo. La peroxidación lipídica se midió con la técnica del ácido tiobarbitúrico (TBA). Esta técnica permite cuantificar en forma indirecta la peroxidación lipídica.

El  $H_2O_2$  produce una inhibición dosis dependiente de la CCC en piel. Además los resultados muestran una producción dosis dependiente de malondialdehído.

Los resultados permiten postular que  $H_2O_2$  produce una inhibición en los parámetros bioeléctricos de la piel por un mecanismo de peroxidación lipídica.

#### ABSTRACT

It has been described the injury effect of  $H_2O_2$  on several biological tissues. Between the action mechanism it is necessary to consider its oxidative power and the possible peroxidative mechanism. The present paper describes the effect of  $H_2O_2$  on the bioelectric parameters across the skin of *P. thaul*.

Ussing's model which identified the Na-transport with the short circuited current (SCC) allows a quantitative determination of the changes of electrical parameters was used. The experiments were performed on the isolated abdominal skin of the toad. The skin was mounted between two lucite half cells exposing the skin to the bath solution. Ringer toad solution, pH 7.5 was added in equal amount at both sides of the skin. The effect of different molar dosis of  $H_2O_2$  were applied on the mucosal side of the toad skin. The lipid peroxidation was measured with the thiobarbiturate acid (TBA) assay. This technique allows an indirect quantification of the lipid peroxidation.

$H_2O_2$  elicited a dose-dependent inhibition of the SCC across the skin. Furthermore, the results show a dose-dependent production of malondialdehyde.

The results let us postulate that  $H_2O_2$  elicited the electrical skin inhibition by a lipid peroxidation mechanism.

KEYWORDS: Conductance. Toad skin. Hydrogen Peroxide. Bioelectric Activity.

---

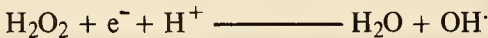
\* Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción, Casilla 2407, Apartado 10, Concepción, Chile.

## INTRODUCCION

El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se utiliza en clínica como antiséptico y en neurocirugía por sus propiedades hemostáticas. Sin embargo, se ha descrito al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como un agente injuriante en fibroblasto humano (Meneghini y Hoffman, 1980), fagocitos (Voetman y Roos, 1980), células tumorales (Bozzi y col., 1979) y eritrocitos (Fridovich, 1976). También es altamente tóxico a bacterias, hongos y algas (Berglin y col., 1982) (Florence, 1984). Esta toxicidad es mayor "in vivo" que "in vitro" (Fridovich, 1976).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tiene electrones desapareados, por lo tanto, su reactividad es limitada, pudiendo cruzar la membrana celular (Voetman y Roos, 1980). La magnitud del daño celular producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sugiere que este compuesto es el precursor de uno de mayor reactividad (Repine y col., 1981) (Cohen, 1978), que podría ser el radical OH<sup>·</sup>. El cual, por su extrema labilidad, debería reaccionar próximo al sitio de su formación (Anbar y Neta, 1967) (Bors y col., 1980) (Borg y col., 1983).

Otra posible explicación que ha sido postulada es una reacción intracelular del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como un agente reductor. La reacción sería del siguiente tipo:



(Florence, 1984)

Este trabajo describe los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el transporte iónico en piel de sapo, midiendo parámetros bioeléctricos y se postula un mecanismo de peroxidación lipídica como causa de la acción tóxica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre estos parámetros.

## MATERIALES Y METODOS

Los experimentos fueron realizados en piel abdominal de sapo de la especie *Pleurodema thaul*, las cuales fueron expuestas 24 hrs. previo al experimento en suero fisiológico a 4°C. Las pieles se disecaron en trozos de 0,71 cm<sup>2</sup>, y fueron montados en dos cámaras de lucita conteniendo 3 ml de Ringer rana en cada lado de la piel. La solución estaba compuesta por lo siguiente

(mM): NaCl 112, KCl 1.9, CaCl<sub>2</sub> 1.0, NaHCO<sub>3</sub> 2.3 y glucosa 11, ajustado a un pH 7.45 con buffer fosfato. Ambos lados de la piel fueron permanentemente aireados. El circuito eléctrico para medir la corriente de corto circuito (CCC) y la diferencia de potencial (DP) fue similar al descrito por Ussing y Zerahn (Ussing y Zerahn, 1951). La DP fue cuantificada utilizando un registrador Cole Palmer y la CCC fue medida en un microamperímetro a intervalos de 10-30 minutos. Las mediciones del efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre DP y CCC se realizaban después de estabilizarse los parámetros bioeléctricos.

El peróxido de hidrógeno utilizado es de 10 volúmenes 8.8x10<sup>-1</sup> M, el cual es utilizado normalmente en la clínica hospitalaria.

### Análisis bioquímico y biofísico

Para cuantificar en forma indirecta la peroxidación lipídica se utilizó el test del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Halliwell and Gutteridge, 1985) que se basa en la reacción del malondialdehído (MDA) que se genera en los procesos de peroxidación y su reacción con TBA obteniéndose un producto coloreado, el cual absorbe luz a 532 nm. Para realizar el test se incubó la piel de Ringer rana por 2 hrs., luego se maceró y centrifugó a 3000 rpm y se midió el sobrenadante en un espectrofotómetro Beckman.

Además, se midió la tensión superficial de la solución fisiológica mediante el método oficial de farmacopea, descrito por du Nouy, y la osmolaridad, método descrito para osmómetro de Fiske.

### Análisis histológico

La observación de la magnitud del daño se hizo por microscopía óptica, fijando previamente la piel de sapo en formalina al 10%.

Se utilizó la tinción hematoxilina eosina para visualizar posible daño morfológico.

### Método estadístico

El análisis estadístico se realizó aplicando el test de la "t" de student y el test de la "t" de stu-

dent pareados. Considerándose P 0.05 como significativo.

## RESULTADOS

### Efectos electrofisiológicos del peróxido de hidrógeno sobre la corriente de cortocircuito (CCC) y la diferencia de potencial (DP) en piel aislada de sapo

Al agregar  $H_2O_2$  al baño mucosal de la preparación hubo un efecto bifásico, dosis dependiente sobre la CCC y DP transepitelial. El efecto inmediato es un aumento transiente y variable de ambos parámetros bioeléctricos, seguido de una disminución rápida y permanente de la CCC y la DP (Figs. 1 y 2). Esta inhibición es irreversible y altamente significativa, respecto a los valores controles. En cambio, al agregar  $H_2O_2$ , al baño serosal de la preparación, no hubo cambios significativos en los parámetros bioeléctricos.

La adición de  $H_2O_2$  al baño mucosal no produjo cambios significativos en la tensión superficial ni en la osmolaridad de la solución mucosal.

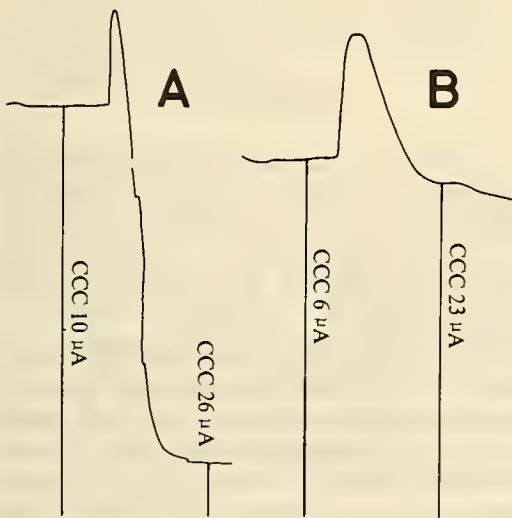


FIG. 1. Registro de un experimento tipo:  
A. Efecto sobre la corriente de corto circuito (CCC) y sobre la diferencia de potencial transepitelial (DP) al agregar  $8 \times 10^{-2}$  M de  $H_2O_2$  en el lado mucosal.  
B. Efecto sobre la CCC y DP al agregar  $8 \times 10^{-4}$  M de  $H_2O_2$  en la cara mucosal.

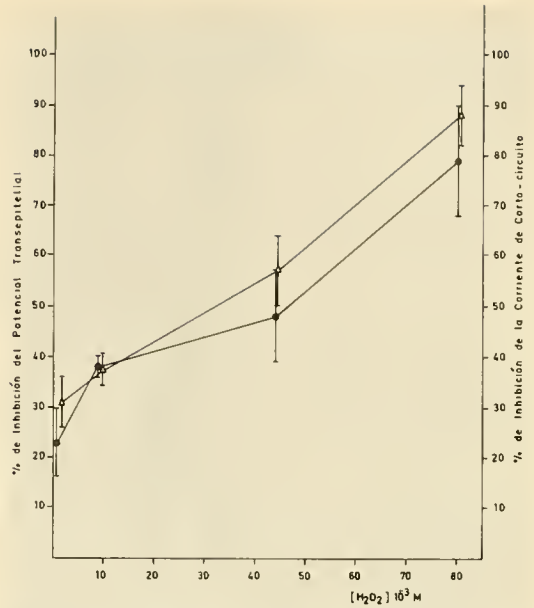


FIG. 2. Efecto inhibitorio del  $H_2O_2$  sobre el potencial transepitelial (DP) y corriente de corto circuito (CCC), al agregar dosis crecientes de  $H_2O_2$ .

- Representa el efecto inhibitorio del potencial transepitelial a una concentración  $0,4 \times 10^3$  M,  $8 \times 10^3$  M,  $40 \times 10^3$  M y  $80 \times 10^3$  M de  $H_2O_2$  (n = 6).
- ▲ Representa el efecto inhibitorio de la corriente de corto circuito a concentraciones de  $0,40 \times 10^3$  M,  $8 \times 10^3$  M,  $40 \times 10^3$  M y  $80 \times 10^3$  M (n = 6).

### Alteraciones histopatológicas en piel aislada de sapo

Con el objeto de estudiar las alteraciones histológicas del  $H_2O_2$  sobre las pieles de *P. thaul*, éstas fueron incubadas durante 90 min en solución Ringer- $H_2O_2$ . Para ello se agregaron dosis molares crecientes de  $H_2O_2$  ( $8 \cdot 8 \times 10^{-4}$ ;  $8 \cdot 8 \times 10^{-3}$ ;  $4 \cdot 4 \times 10^{-3}$  y  $8 \cdot 8 \times 10^{-2}$ ), como control se incubaron pieles, durante 90 min., en solución Ringer.

Los resultados de las alteraciones histológicas, producidas por  $H_2O_2$  a dosis crecientes, se pueden observar en las figuras 3 y 4.

### Determinación de la peroxidación lipídica por la técnica del TBA en piel aislada de sapo

Para determinar la peroxidación lipídica, co-



FIG. 3.- Piel control incubada durante 90 min en Ringer rana. Se fijó en formalina al 10% y la tinción es hematoxilina-eosina. (Aumento x 100).

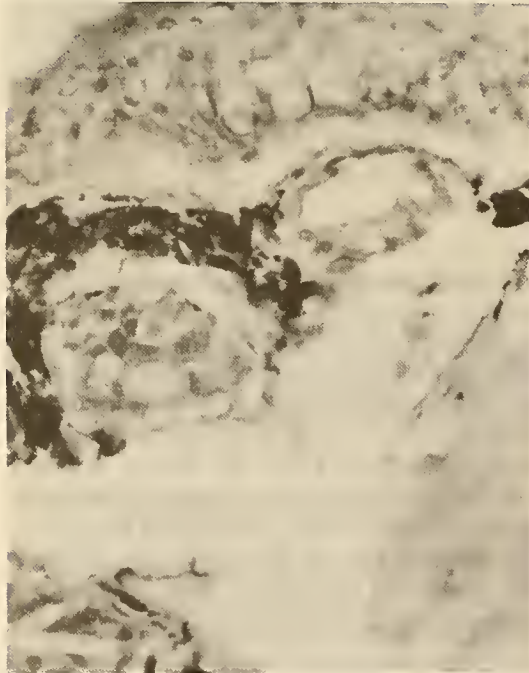


FIG. 4.- Piel incubada durante 90 min en Ringer rana  $H_2O_2$  a una concentración de  $8 \times 10^{-2}$  M. Se fijó en formalina al 10% y se tiñó con hematoxilina-eosina. Al examen histopatológico se observa edema de la piel. (Aumento x 100).

mo posible mecanismo de la injuria tisular, se incubó la piel durante 90 minutos en soluciones Ringer- $H_2O_2$  a pH 7.45 en las siguientes concentraciones:  $8.8 \times 10^{-4}$  M;  $8.8 \times 10^{-3}$  M;  $4.4 \times 10^{-3}$  M y  $8.8 \times 10^{-2}$  M. (Fig. 5)

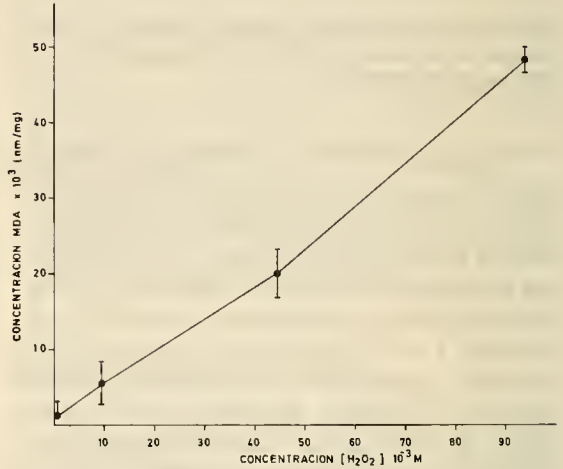


FIG. 5.- Concentración de MDA liberada (nmoles/ $\mu$ g de tejido incubado) versus dosis de  $H_2O_2$ . Tiempo de incubación 90 min en Ringer rana- $H_2O_2$ . Cada punto es el promedio de 6 determinaciones.

## DISCUSION

La DP y CCC son parámetros eléctricos que representan el transporte de iones a través de la piel, su modificación ha permitido cuantificar el efecto de drogas (Quevedo y col., 1988) y de hormonas (Neumann y col., 1986) sobre el transporte de  $Na^+$  y  $Cl^-$ .

Los resultados indican una disminución significativa de la DP y CCC cuando el  $H_2O_2$  es adicionado al lado mucosal de la piel de *P. thaul* (Fig. 1 y 2). En cambio este efecto no se observa al adicionar  $H_2O_2$  al lado serosal. Una posible explicación de esta diferencia de efectos podría deberse a que el  $H_2O_2$  por ser una molécula soluble en lípidos rápidamente actúa sobre las células transportadoras de iones de la piel cuando es adicionado al lado mucosal. En cambio, al agregarse al lado serosal, debe el  $H_2O_2$  atravesar una capa compleja y densa de capilares, fibrillas y

glándulas, antes de alcanzar a las células transportadoras de iones.

Los efectos inhibitorios son dosis dependiente cuando se miden los parámetros bioeléctricos (Fig. 2). Paralelamente, los estudios histopatológicos muestran una mayor alteración histológica con dosis creciente de  $H_2O_2$  (Figs. 3 y 4).

Los mecanismos de acción que permiten explicar la inhibición de la CCC y la DP transepitelial por acción de  $H_2O_2$  podrían resumirse en las siguientes posibilidades:

- 1.- Por "shock" osmótico, debido al cambio de osmolaridad generado por la adición del  $H_2O_2$ . Las mediciones de osmolaridad durante los experimentos no mostraron cambios significativos.
- 2.- Por modificación de la tensión superficial. Los valores de tensión superficial permanecieron constantes durante los experimentos, para las distintas soluciones utilizadas.
- 3.- Por el poder oxidante del  $H_2O_2$  y/o peroxidación lipídica. Debido a su alto potencial reductor un mecanismo posible es la acción oxidante del  $H_2O_2$  sobre los componentes del epitelio, tanto fosfolípidos como proteínas. Por su alta toxicidad "in vivo", T.M. Florence (1984) sugiere que el  $H_2O_2$  originaría una especie química de mayor reactividad, que sería el radical  $OH\cdot$ .

Florence postula que la reducción del  $H_2O_2$  por los componentes biológicos es fuente de la producción de radicales libres, con o sin participación de la reacción Haber-Weiss. (Florence, 1984).

Nuestros resultados concuerdan con esta hipótesis. En efecto, la Fig. 5 muestra gráficamente la producción dosis-dependiente de MDA, parámetros comúnmente usados para medir la peroxidación lipídica.

Efectos similares, generados por el  $H_2O_2$  en parámetros bioquímicos eléctricos y morfológicos hemos encontrado en músculo estriado (Morales y col., 1987) y cerebro (Carrasco y col., 1988).

Los resultados obtenidos permiten concluir que el  $H_2O_2$  tiene un efecto tóxico sobre piel de sapo, inhibiendo la CCC y DP transepitelial. En este efecto estaría presente un mecanismo de peroxidación lipídica, medido con la técnica del MDA.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración permanente del Técnico-Laborante del Sr. Julio Vargas. Este trabajo fue financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción, por Proy. DI. 20.33.41.

## BIBLIOGRAFIA

- Anbar, M. and Neta, P. 1967. "A compilation of specific bimolecular rate constants for the reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution". *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 18:495-523.
- Berglin, E.M., Edlund, M.K., Nyberg, G.K. and Carlson, J. 1982. "Potentiation by L-cysteine of the bactericidal effect of Hydrogen peroxide in *Escherichia Coli*". *J. Bacteriol.* 152(1):81-88.
- Borg, D.C., and Schaich, K.M. 1983. "Oxy Radicals and their Scavenger System". Vol. 1, Cohen, G. and Green Weld, R.A., Eds., Elsevier Biomedical, New York, 122-129.
- Bors, W., Seran, M. and Czapki, G. 1980. "Biological and Clinical Aspects and Superoxide Dismutase". Bannister, W.H. and Bannister, J.V. Eds., Elsevier, New York, 1-31.
- Bozzi, A., Mavelli, I., Modori, B., Strom, R. and Rotilio, G. 1979. "Differential sensitivity of tumor cells to externally generated hydrogen peroxide. Role of glutathione and related enzymes". *Cancer Biochem. Biophys.* 3:135-141.
- Carrasco, G., Morales, B., Quevedo, I., Oliver, M.I., Eiersen, M., Quevedo, L. 1988. "Peroxidación lipídica por  $H_2O_2$  en tejido nervioso". *Arch. de Biol. y Med. Exp.* Vol. 21(2) R285.
- Cohen, G. 1978. "The generation of hydroxyl radicals in biologic systems: toxicological aspects". *Photochem. Photobiol.*, 28:669-675.
- Florence, T.M. 1984. "The production of Hydroxyl radical from Hydrogen peroxide". *J. of Inorganic Biochem.* 22:221-230.
- Florence, T.M., Lumnsden, B.G. and Fardy, J.J. 1984. "Complexation of Metals in Natural Waters". Kramer,

- K. Ed., Junk Publishing Co-Amsterdam.
- Fridovich, J. 1976. "Free radicals in Biology". Vol. 1, W.A. Pryer, Ed., Academic Press, New York, 239-277.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1985. "The importance of free radicals and Catalytic Metals ions in Human Diseases". Baum. H., Gergely, J., Fanburg, Eds., Pergamon Press. Oxford.
- Meneghini, R., Hoffman, M.E. 1980. "The Damaging action of Hidrogen peroxide on DNA of human fibroblats is mediated by a nondialyzable Compound". *Biochim Biophys Acta* 608 (1):167-173.
- Morales, B., Quevedo, I., Einersen, M. 1987. "Acción Depolarizante del Peróxido de Hidrógeno sobre Músculo estriado". *Arch. de Biol. y Med. Exp.* Vol. 20(2).
- Neumann, V.K., Quevedo, L. and Concha J. 1986. "Effect of Progesterone on the Sodium transporting mechanism of Isolated toad skin". *Cell. Mol. Biol.* 32(6):685-690.
- Quevedo, L., Neumann, V., Schmidt. E. and Cárdenas, M. 1988. "Action of lycorine on Neuroadrenergic response of a nerve-skin preparation". *Cell and Mol. Biol.* 34 (3):295-302.
- Repine, J.E., Fox, R.B. and Berger, M.E. 1981. "Hydrogen-peroxide kills staphylocococcus aureus by reactive with staphylococcol iron to form hydroxyl radical". *J. Biol. Chem.* 256(14):7094-7096.
- Ussing, H.H. and Zerahn, K. 1953. "Active transport of sodium as the source of electrical current in the short-circuited isolated frog skin". *Acta Physiol. Scand.* 23: 110-127.
- Voetman, A.A. and Roos, D. 1980. "Endogenous catalase protects human blood phagocytes against oxidative damage by extracellularly generated Hydrogen peroxide". *Blood* 56(5):842-852.