

UCH-FC  
LIC-B  
T689

TRANSPORTE DE  $\text{Na}^+$  Y  $\text{Cl}^-$  A TRAVES DE PIEL AISLADA DE  
*Caudiverbera caudiverbera* (LINNEO 1758)

Tesis  
Entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Licenciado en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias  
Básicas y Farmacéuticas



por

RAFAEL TORRES MUÑOZ

Agosto, 1981

Profesor Guía: Dr. Daniel Wolff F.

T.  
Lic.  
Biología

A mis padres, Rafael Torres G.  
y María Muñoz E.

A aquella generación maldita que, dispersa por  
el mundo, no tuvo la fortuna que yo he tenido:  
terminar los estudios en el propio país.

## AGRADECIMIENTOS

Vayan mis agradecimientos a mis amigos en general. A Verónica Pino, Mario Luxoro, Daniel Wolff y Fernando Zambrano en particular. A Francisco Merino, sin cuyo compromiso con la justicia este trabajo no habría si do posible.

## INDICE

	pág.
ABSTRACT .....	1
RESUMEN .....	3
INTRODUCCION .....	5
MATERIALES Y METODOS .....	7
RESULTADOS .....	15
DISCUSION .....	38
REFERENCIAS .....	54

## ABSTRACT

In the literature there are no references concerning ion transport processes in isolated skin of *Caudiverbera caudiverbera*.

Due to this lack of information with respect to such an interesting species, from an evolutionary point of view, work on the electrophysiological characterization of ionic transport processes in isolated skin was done.

The results indicate that:

- a) The  $\text{Na}^+$  ions is the predominant actively transported ionic species.
- b) There exists a mechanism of active transport of  $\text{Cl}^-$  ion from very concentrated solutions.
- c) The slopes obtained from regression analysis of results from studies of the dependence of T.E.P. with external  $\text{Na}^+$  or internal  $\text{K}^+$  cover an ample range of values, very different from the 60 mV/dec  $\text{Na}^+$  one predicted by the Koefoed-Ussing model.
- d) The  $\text{Cl}^-$  ion has a drastic effect on the active transport of  $\text{Na}^+$ ; when absent the c.c.c. and the  $\text{Na}^+$  transepithelial potential fall to near zero values.

- e) Apparently the role of  $\text{Cl}^-$  on the active transport of  $\text{Na}^+$  is at an intracellular level.
- f) The activity of the  $\text{Na}^+$  pump is directly related to the transepithelial potential.

Finally the possibility of existence of a unique mechanism for the generation of transepithelial potential in different species and that the slopes referred to above are the result of the variation of some parameters of a unique model is discussed.

## RESUMEN

En la literatura no existen referencias, relativas a los procesos de transporte iónico en piel aislada de *Caudiverbera caudiverbera*. Debido a esta falta de información respecto a una especie tan interesante desde el punto de vista evolutivo, se realizó un trabajo de caracterización electrofisiológica de los procesos de transporte iónico en piel aislada. Los resultados indican que:

- a) El ión  $\text{Na}^+$  es la especie iónica transportada activamente en la mayor proporción.
- b) Existe un mecanismo de transporte activo de  $\text{Cl}^-$  desde soluciones muy concentradas.
- c) Las pendientes de las rectas de regresión de los resultados de experimentos en que se ha estudiado la dependencia del potencial transepitelial respecto de la concentración externa de  $\text{Na}^+$  o interna de  $\text{K}^+$ , cubren un amplio rango de valores muy distintos de  $60 \text{ mV/déc } [\text{Na}^+]_o$ ; valor predicho por el modelo de Koefoed-Ussing.
- d) El ión  $\text{Cl}^-$  tiene un drástico efecto sobre el transporte activo de  $\text{Na}^+$ . Si no está presente, la corriente de cortocircuito y el potencial de  $\text{Na}^+$  transepitelial caen

- hasta valores cercanos a cero.
- e) Aparentemente el rol del  $\text{Cl}^-$  sobre el transporte activo de  $\text{Na}^+$  es a nivel intracelular.
  - f) La actividad de la bomba de  $\text{Na}^+$  está estrechamente relacionada con el potencial transepitelial.

Se discute finalmente, la posibilidad que exista un único mecanismo para generar el potencial transepitelial en distintas especies y que las pendientes a que se hace referencia en el punto (c), sean producto de la variación de algunos parámetros en un modelo único.

## INTRODUCCION

La piel de los anfibios se comporta como un órgano altamente especializado, cuyas funciones de transporte iónico y regulación tanto osmótica como de pH del plasma no tiene igual en la piel de ningún otro vertebrado. Las funciones arriba mencionadas, son particularmente importantes en aquellos anfibios cuyo hábitat es el agua dulce, ya que es justamente en esa situación donde están más expuestos a la pérdida de iones por difusión y a la incorporación de agua por osmosis. El transporte iónico a través de la piel de rana, está ampliamente demostrado, encontrándose numerosos trabajos al respecto en la literatura especializada, en prácticamente todas las especies conocidas. Sin embargo, no es posible encontrar más de dos trabajos relativos a la llamada "rana chilena", *Caudiverbera caudiverbera* (García-Romeu *et al.* 1969 y Dale Benos, 1981), ambos referidos esencialmente al mismo aspecto: intercambio de  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$  endógeno y  $\text{Cl}^-$  por base; el primero *in vivo* y el segundo realizado en piel aislada. *Caudiverbera caudiverbera* es una especie particularmente atractiva, ya que -

de acuerdo a los trabajos de N. Díaz (11) y A. Veloso (38) - es una especie que se separó tempranamente del tronco ancestral. Criterios osteológicos sugieren un aislamiento evolutivo de esta especie.

El presente trabajo fue llevado a cabo con el fin de obtener una amplia caracterización electrofisiológica de los procesos de transporte en piel aislada de *Caudiverbera caudiverbera*, con un particular énfasis en el transporte activo de  $\text{Cl}^-$  desde soluciones muy concentradas, cuya existencia en esta especie no había sido demostrada. Se discuten además, las enormes discrepancias entre los resultados obtenidos y los resultados que debieran obtenerse de acuerdo al modelo propuesto por Koefoed-Ussing, que es el modelo para transporte en piel de rana que actualmente se enseña en las carreras de Biología de todos los centros de enseñanza superior en nuestro país.

## MATERIALES Y METODOS

Montaje de piel. Los experimentos fueron realizados en piel abdominal de la rana *Caudiverbera caudiverbera*, las que desde su llegada al laboratorio fueron mantenidas en cubetas. Posteriormente fue posible mantenerlas en un pequeño estanque con agua corriente. Los experimentos para determinar transporte activo de  $\text{Cl}^-$  se realizaron en una cámara de Ussing (27) de lucita, de  $7 \text{ cm}^2$  de sección transversal, el resto de los experimentos fueron efectuados en un sistema constituido por dos cámaras de Ussing independientes construídas en un sólo bloque de lucita (cámara doble), con una sección transversal de  $35 \text{ cm}^2$  cada una. Cuando se usó la cámara doble la piel se montó sobre ambas cámaras, separadas por un espacio de aire, y luego se cortó dejando una mitad en cada cámara, evitando así acoplamiento eléctrico entre ambas mitades. Al montar la piel, los bordes de las cámaras en contacto con aquella fueron cubiertos con una capa de vaselina para obtener un buen sellado - con poca presión - y evitar daño de borde. Las Figs. 1 y 2 muestran la cámara simple y la cámara doble, respectivamente.

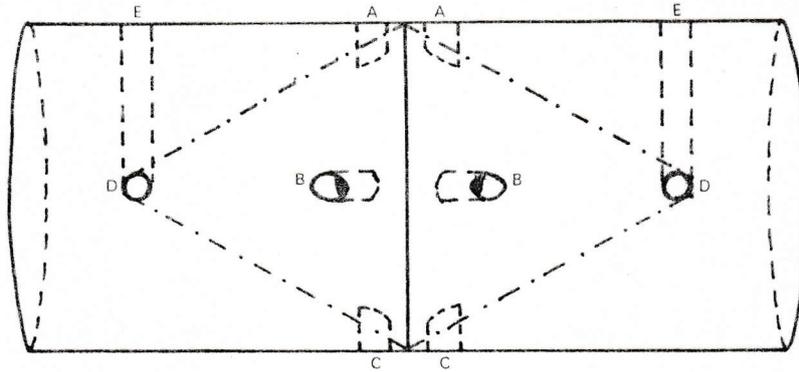


FIG. 1. Cámara de Ussing Simple

- A, E : Ductos para aireación y agitación
- B : Entradas para los puentes de Agar-KCl para medición de potencial
- C : Ductos para evacuar soluciones
- D : Entradas para los puentes de Agar-KCl para medición de corriente

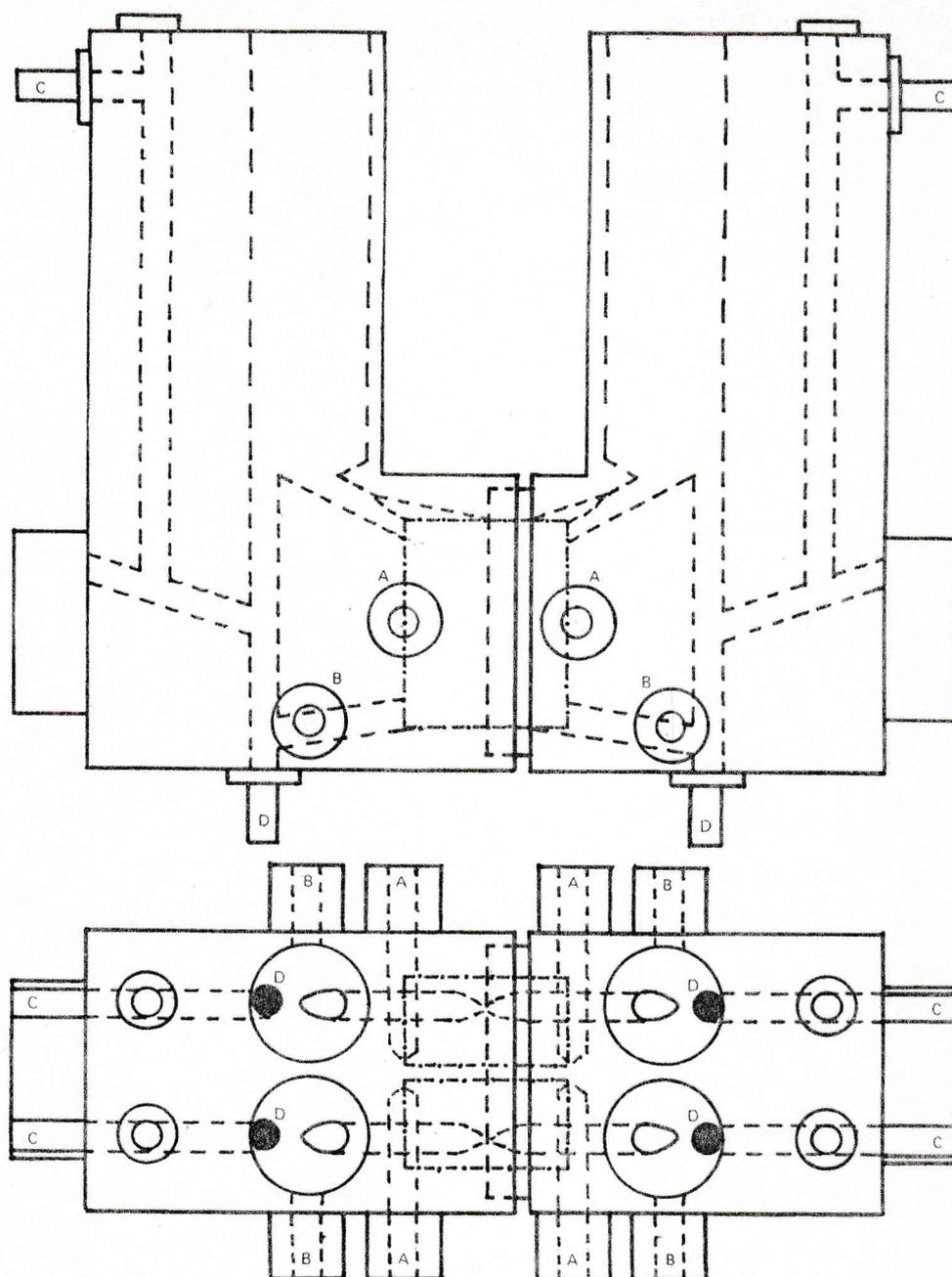


FIG. 2. Cámara de Ussing doble. Vista lateral (arriba) y vista superior (abajo).

- A : Entradas para los puentes de Agar-KCl para medición de potencial
- B : Entradas para los puentes de Agar-KCl para medición de corriente
- C : Ductos para aireación y agitación
- D : Ductos para evacuar soluciones

Sistema de Registro y Control de Potencial. Para medir el potencial transepitelial se usaron electrodos de calomel y para suministrar corriente se usaron electrodos de Ag/AgCl; ambos pares de electrodos se conectaron a la cámara de Ussing por medio de tubos de polietileno llenos con Agar-KCl 3 M al 3%. En todos los experimentos se utilizaron sendos sistemas de control de potencial (voltage clamp) construidos en nuestro laboratorio (Fig. 3), con una impedancia de entrada de  $10^{11} \Omega$  y en un tiempo de respuesta de  $100 \mu\text{seg}$ , provistos, además, de sistemas para compensar tanto la asimetría de los electrodos como la cada de potencial a través de la resistencia en serie constituida por la solución. Las lecturas se hicieron con Electrómetros Keithley 610A y 610B conectados a cada sistema de control de potencial; los registros en papel se hicieron con registradores Varian 611A y 611A<sub>1</sub>. La Fig. 4 muestra un esquema de la disposición del sistema experimental completo. Las curvas I/V se obtuvieron variando el potencial transepitelial por saltos discretos, registrando la corriente hasta que se estabilizaba, para cada valor de potencial.

En los experimentos en que se midió la cantidad de sodio en el compartimiento del lado mucoso de la piel, las

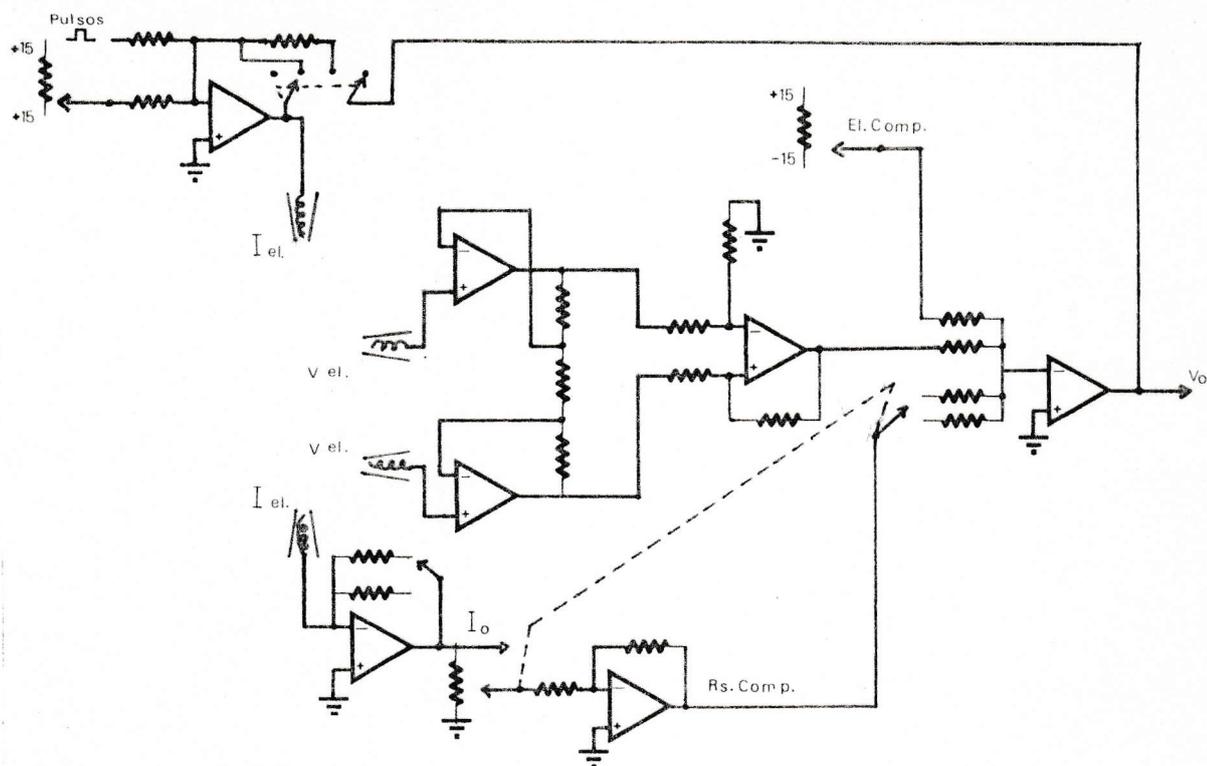


FIG. 3. Sistema de control de Potencial

En la parte superior se observa el amplificador de control; en la parte central está el amplificador de instrumentación y un sumador donde se realiza la compensación de la asimetría de electrodos y la realimentación positiva de una fracción del potencial generado por el transductor I/V situado en la parte inferior.

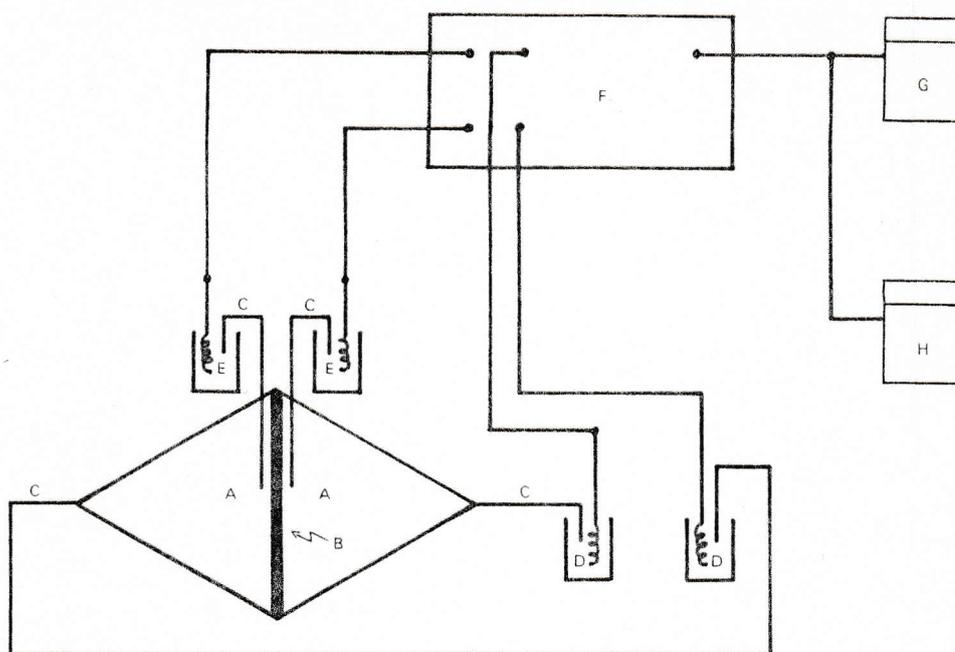


FIG. 4. Esquema de la disposición del sistema experimental

- A : Hemicámaras de la cámara de Ussing
- B : Preparación (piel de rana)
- C : Puentes de Agar-KCl
- D : Electrodo de Ag/AgCl para medición de corriente
- E : Electrodo de calomel para medición de potencial
- F : Sistema de control de potencial
- G, H : Instrumento de medición (Electrómetro Y/V osciloscopio) y registro en papel.

determinaciones de sodio se hicieron es un espectrómetro de absorción atómica Unicam.

Cada vez que se utilizó Amilorida (Bentley, 1968) para inhibir el flujo de sodio, se agregó el volumen necesario, de una solución madre con una concentración de  $10^{-2}$  M, para obtener una concentración final de  $10^{-4}$  M en el compartimiento del lado mucoso.

Soluciones: Las soluciones empleadas para los distintos experimentos, fueron las siguiente:

Ringer Normal: NaCl 115 mM; KCl 3 mM; CaCl<sub>2</sub> 1.1 mM; NaHCO<sub>3</sub> 2.4 mM.

Ringer sulfato: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 57.5 mM; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5 mM; NaHCO<sub>3</sub> 2.4 mM; sacarosa 59 mM.

Ringer colina : col-Cl 115 mM; KCl 3 mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM; Tris 5 mM.

Todas las soluciones a pH 7.5, a menos que se indique otro valor. Ocasionalmente se usó buffer Tris en lugar de NaHCO<sub>3</sub> a una concentración de 5 mM; no se observaron diferencias en las respuestas de la piel al usar uno u otro buffer.

En los experimentos que demandaban variación de la concentración de sodio o potasio, el sodio se reemplazó parcialmente por colina<sup>+</sup> y el potasio reemplazó parcialmente al



sodio respectivamente.

## RESULTADOS

Transporte activo de  $\text{Cl}^-$ .

En piel aislada de rana se ha determinado la existencia de un mecanismo de transporte activo de  $\text{Cl}^-$  desde soluciones con alta concentración de  $\text{Cl}^-$  (del orden de 100 mM) (28), (39), (42); en *Caudiverbera caudiverbera*, García-Romeu *et al.* (20), determinaron la existencia de un mecanismo de transporte activo de  $\text{Cl}^-$  desde soluciones muy diluídas (del orden de 1.5 mM) *in vivo*.

El objetivo de esta serie de experimentos fue determinar si el mecanismo de transporte activo de  $\text{Cl}^-$ , desde soluciones con altas concentraciones del  $\text{Cl}^-$  está también presente en *Caudiverbera caudiverbera*.

Las pieles se montaron en una cámara de Ussing doble con soluciones simétricas de Ringer colina, la mitad experimental, y la otra mitad de la piel en Ringer normal a modo de control. Se registró continuamente el potencial, hasta llegar a un estado estacionario y en ese instante las pieles fueron cortocircuitadas.

Los resultados están expuestos en la Tabla 1. Se observa una distribución bimodal de los resultados; pieles con

TABLA 1

Experimental		Control		
$\frac{\mu A}{cm^2}$	$\frac{\mu eq}{hr cm^2}$	$\frac{\mu A}{cm^2}$	$\frac{\mu eq}{cm^2}$	$\frac{c.c.c. exp.}{c.c.c. cont.}$
-2.86	0.11	15.71	0.59	0.18
0.00	0.00	5.71	0.21	0.00
-0.23	0.01	10.00	0.37	0.02
-0.52	0.02	11.43	0.43	0.05
-0.26	0.01	3.57	0.13	0.07
-0.29	0.01	6.23	0.23	0.05
-0.29	0.01	3.23	0.12	0.09
0.00	0.00	3.00	0.11	0.00
0.00	0.00	10.00	0.37	0.00
-0.42	0.02	8.00	0.30	0.05
0.00	0.00	3.25	0.12	0.00
0.00	0.00	16.00	0.60	0.00
-0.17	0.01	6.00	0.22	0.03
0.00	0.00	12.00	0.45	0.00
0.00	0.00	5.75	0.22	0.00
-1.00	0.04	15.00	0.57	0.07
0.00	0.00	4.25	0.16	0.00

Corrientes de cortocircuito registradas en 16 experimentos. En cada uno se utilizaron las dos mitades de una misma piel.

Experimental : Trozo de piel en soluciones simétricas Ringer colina

Control : Trozo de piel en soluciones simétricas Ringer normal

c.c.c. exp. : Corriente de cortocircuito registrada en el trozo de piel experimental

c.c.c. cont. : Corriente de cortocircuito registrada en el trozo de piel control

El sentido positivo de la corriente es en la dirección mucoso a seroso

$n = 9$

$\bar{x} = 0.67 \pm 0.25$

corriente de cortocircuito (c.c.c.) nula y pieles con c.c.c. negativa, pero en ningún caso pieles con c.c.c. positiva, siendo el promedio de la muestra total significativamente distinto de cero ( $\bar{x} = -0.35 \pm 0.23 \mu\text{A}/\text{cm}$ ,  $P < 0.05$ ). El cociente c.c.c. experimental/c.c.c. control, en que la c.c.c. control es aquella registrada en la otra mitad de la piel bañada por Ringer normal, es muy pequeño ( $\bar{x} = 0.035 \pm 0.048$ ,  $P < 0.05$ ) de manera que basados en estos datos podemos concluir que los portadores mayoritarios de la c.c.c. en Ringer normal serían los iones  $\text{Na}^+$ .

En las Figs. 5 y 6 se reproducen dos experimentos típicos en que se agrega  $\text{CuSO}_4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  a la solución del lado mucoso; se observa una inmediata caída de la corriente, la que en pocos minutos llega a cero. El ión  $\text{Cu}^{++}$  ha sido descrito como un inhibidor de la permeabilidad al  $\text{Cl}^-$ .

De los resultados arriba expuestos, parece claro que las corrientes negativas registradas son portadas por iones  $\text{Cl}^-$ , ya que la inhibición de la permeabilidad al  $\text{Cl}^-$  por iones  $\text{Cu}^{++}$  las anula por completo. Por otra parte, el hecho de que estas corrientes se manifiesten en condiciones de diferencia de potencial electroquímico transepitelial nulo indicaría que estamos en presencia de un transporte activo de  $\text{Cl}^-$  desde

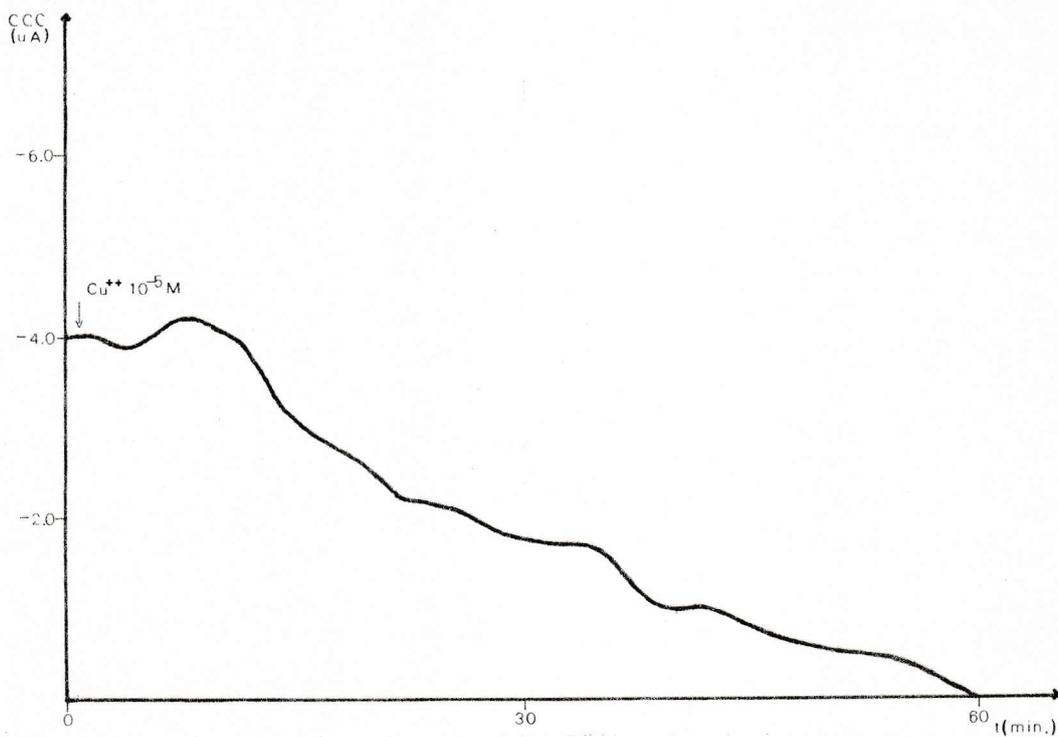


FIG. 5. Efecto del ión  $\text{Cu}^{++}$  sobre c.c.c. en soluciones Ringer sin  $\text{Na}^+$   
Abcisa: tiempo (min)  
Ordenada: c.c.c. (uA)  
Una vez estabilizada la c.c.c. se agregó  $\text{CuSO}_4$  a una concentración final de  $10^{-5}$  M en el lado mucoso de la piel.

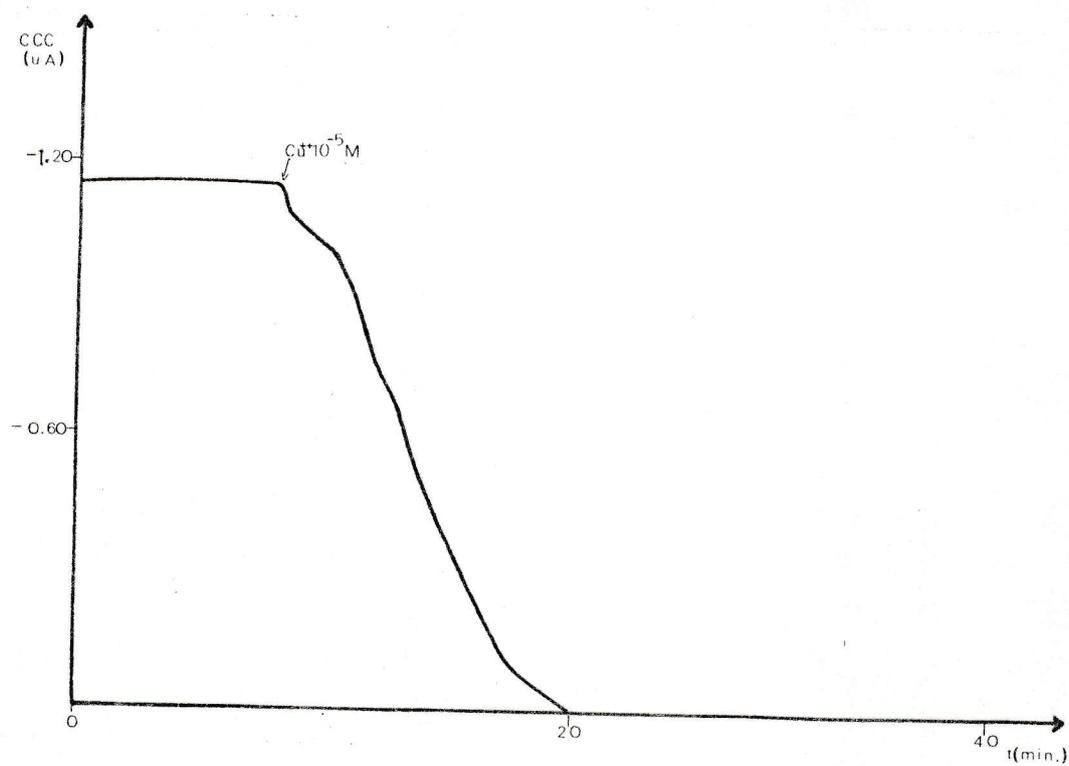


FIG. 6. Efecto del ión  $\text{Cu}^{++}$  sobre c.c.c. en soluciones Ringer sin  $\text{Na}^+$   
Abcisa: tiempo (min)  
Ordenada: c.c.c. (uA)  
Una vez estabilizada la c.c.c. se agregó  $\text{CuSO}_4$  a una concentración final de  $10^{-5}$  M en el lado mucoso de la piel.

soluciones con una alta concentración de  $\text{Cl}^-$ .

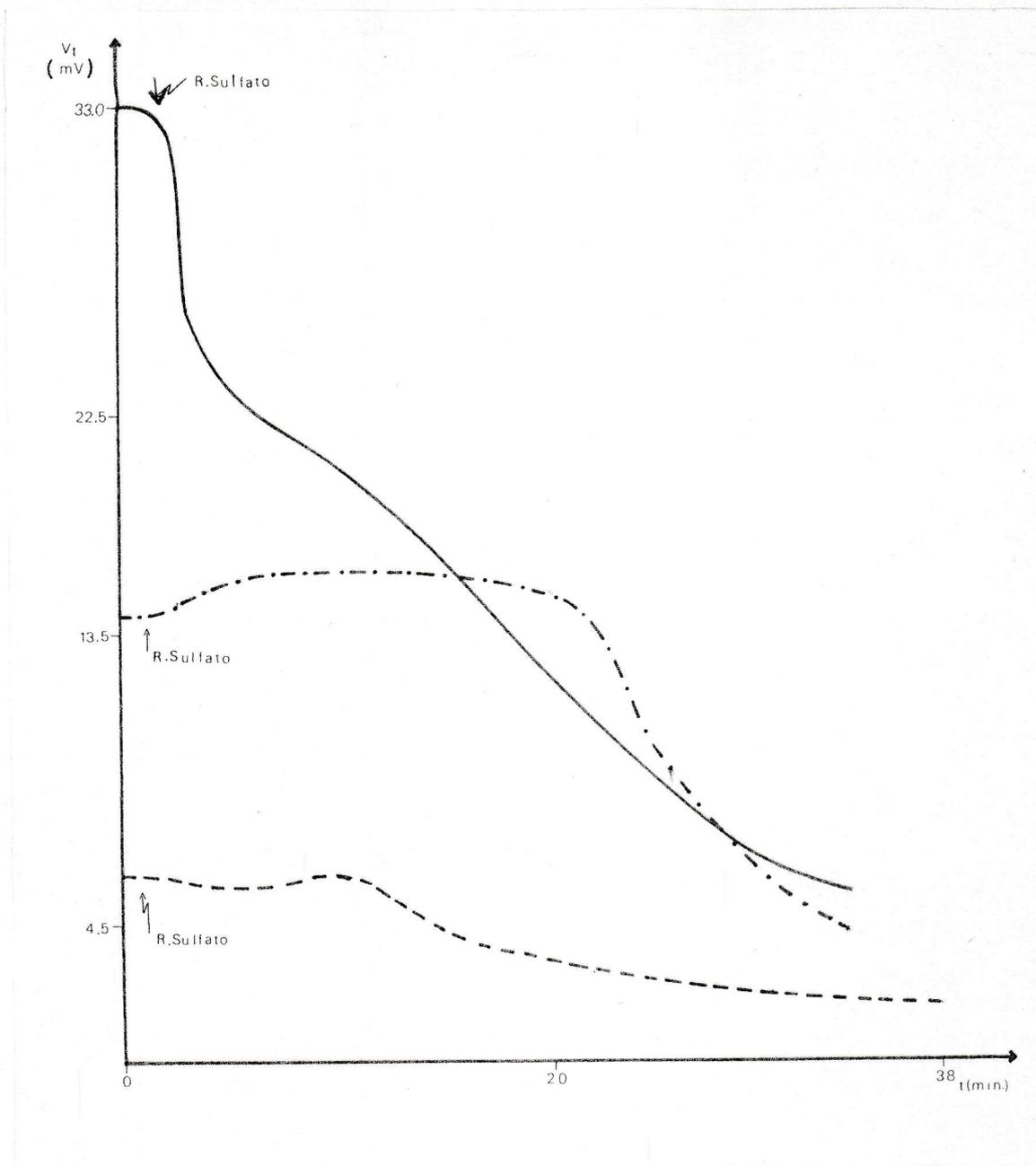
Efecto del ión  $\text{Cl}^-$  sobre la corriente de cortocircuito

En la literatura se encuentran descritos diversos efectos del ión  $\text{Cl}^-$  sobre el transporte activo de  $\text{Na}^+$  en pieles aisladas de rana; Koefoed-Ussing han comunicado un aumento sostenido del potencial en *Rana temporaria* (26) en ausencia del ión  $\text{Cl}^-$ ; Fischbarg *et al.* (15) señalan que en *Leptodactylus ocellatus* el transporte de  $\text{Na}^+$  decrece con la disminución de la concentración de  $\text{Cl}^-$  en el rango 118 a 20 mM y luego crece hasta alcanzar un máximo a una concentración de  $\text{Cl}^-$  0 mM; Huf (24), trabajando en *Rana pipiens*, ha observado una disminución del transporte de  $\text{Na}^+$  con la concentración de  $\text{Cl}^-$  en el lado mucoso; finalmente, García-Romeu *et al.* describen una drástica caída del flujo neto de  $\text{Na}^+$  en *Caudiverbera caudiverbera in vivo* (de  $7.2 \pm 1.6$  a  $2.5 \pm 1.1$  neq/h x 100 gr) (20), al reemplazar el  $\text{Cl}^-$  por  $\text{SO}_4^{=}$ . Los resultados expuestos a continuación, muestran la dependencia de la c.c.c. y el potencial respecto del ión  $\text{Cl}^-$  encontrada en piel aislada de *Caudiverbera caudiverbera*.

En la Fig. 7 se muestra el efecto del reemplazo del ión  $\text{Cl}^-$  por  $\text{SO}_4^{=}$  sobre la ~~c.c.c.~~ <sup>u. Δy</sup> en tres experimentos; se observa que, aunque la cinética de decaimiento es distinta en cada caso, el efecto neto es una caída del potencial en un tiempo de aproximadamente 30 min.

La Fig. 8 reproduce un experimento típico en que se reemplaza el Ringer normal por Ringer  $\text{SO}_4^{=}$ , se observa la subida del potencial, descrita por Koefoed-Ussing, pero a continuación una abrupta caída hasta un potencial mucho menor al cabo de 50 min, esta caída es completamente reversible por restitución de las soluciones de Ringer normal.

En la Fig. 9 se reproduce un experimento típico en el que se registra la c.c.c.. A la solución externa se le agrega  $\text{CuSO}_4$   $10^{-5}$  M, se observa - otra vez - un aumento de la c.c.c. y a continuación una fuerte caída que se estabiliza en aproximadamente una hora. Estos resultados demuestran que existe una drástica dependencia del potencial y la c.c.c. respecto del  $\text{Cl}^-$ . Es interesante observar que el experimento reproducido en la Fig. 9 sugiere que el rol del  $\text{Cl}^-$  sobre el transporte activo de sodio no es a nivel de membrana sino más bien a nivel intracelular, ya que no es la presencia del ión  $\text{Cl}^-$  en



**FIG. 7.** Efecto del reemplazo del ión  $\text{Cl}^-$  por  $\text{SO}_4^{=}$  sobre el potencial transepitelial en soluciones Ringer. En estos experimentos se ha reemplazado el Ringer normal por Ringer- $\text{SO}_4^{=}$  en ambas hemicámaras.



FIG. 8. Reversibilidad del efecto del reemplazo del ión  $\text{Cl}^-$  por  $\text{SO}_4^{=}$  sobre el potencial transepitelial en soluciones Ringer.

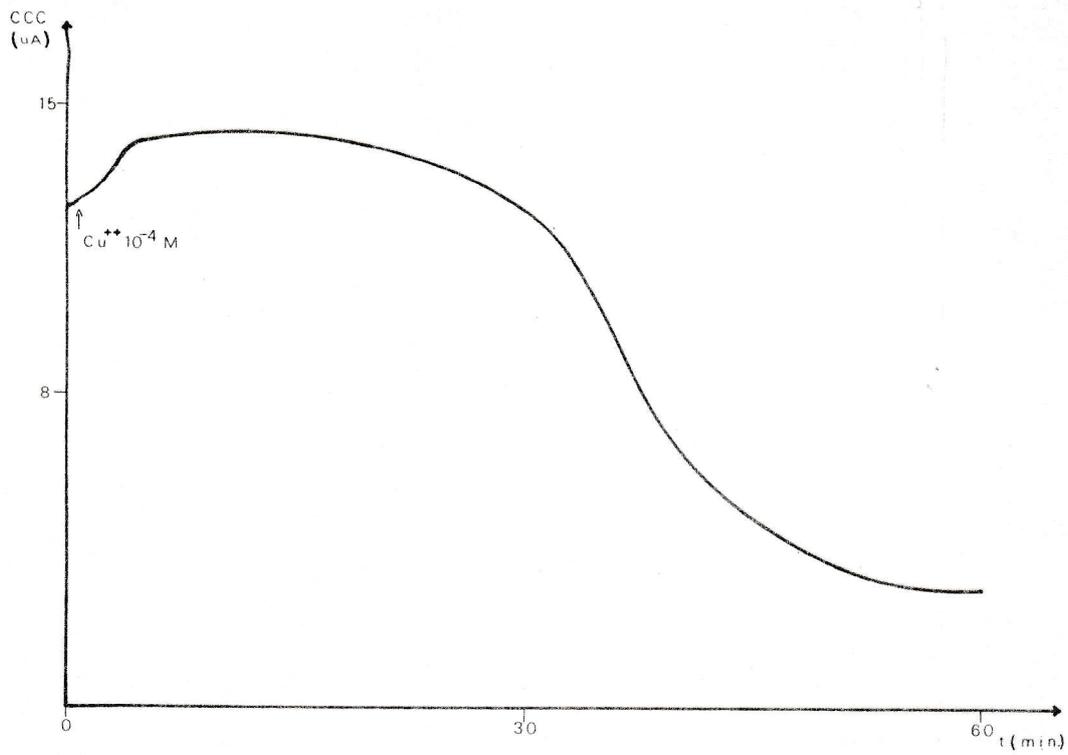


FIG. 9. Efecto del ión  $\text{Cu}^{++}$  sobre la c.c.c. en soluciones Ringer normal. Se agregó  $\text{CuSO}_4$  a una concentración final de  $10^{-5} \text{ M}$  en el lado mucoso de la piel.

la solución externa lo importante, sino más bien su paso a través de la membrana apical; en último término su presencia en el interior de la célula.

Dependencia del Potencial Transepitelial respecto de la Tasa de Transporte Activo de  $\text{Na}^+$ .

En la Fig. 10 se muestra un experimento en que se grafica  $V_t$  v/s moles de  $\text{Na}^+$  en la hemicámara del lado mucoso; nótese que esta última variable es la integral del flujo neto de  $\text{Na}^+$  por el tiempo, sobre toda el área de la piel ( $A \int \text{J}_{\text{Net}}^{\text{Na}^+} dt$ ), de manera que si existe una relación entre el potencial y  $\text{J}_{\text{Net}}^{\text{Na}^+}$  sólo se podrá visualizar claramente en el caso en que el potencial varíe de manera tal que no existan máximos o mínimos locales entre los máximos o mínimos extremos, ya que las determinaciones de la cantidad de  $\text{Na}^+$  se realizaron de un modo discreto, obteniendo un valor cada una hora. En el experimento expuesto se cumplió esta condición durante siete horas. En los demás, esta condición sólo se dio por tramos. Se observa una clara relación entre ambos parámetros, la que podría ser descrita como un desfase

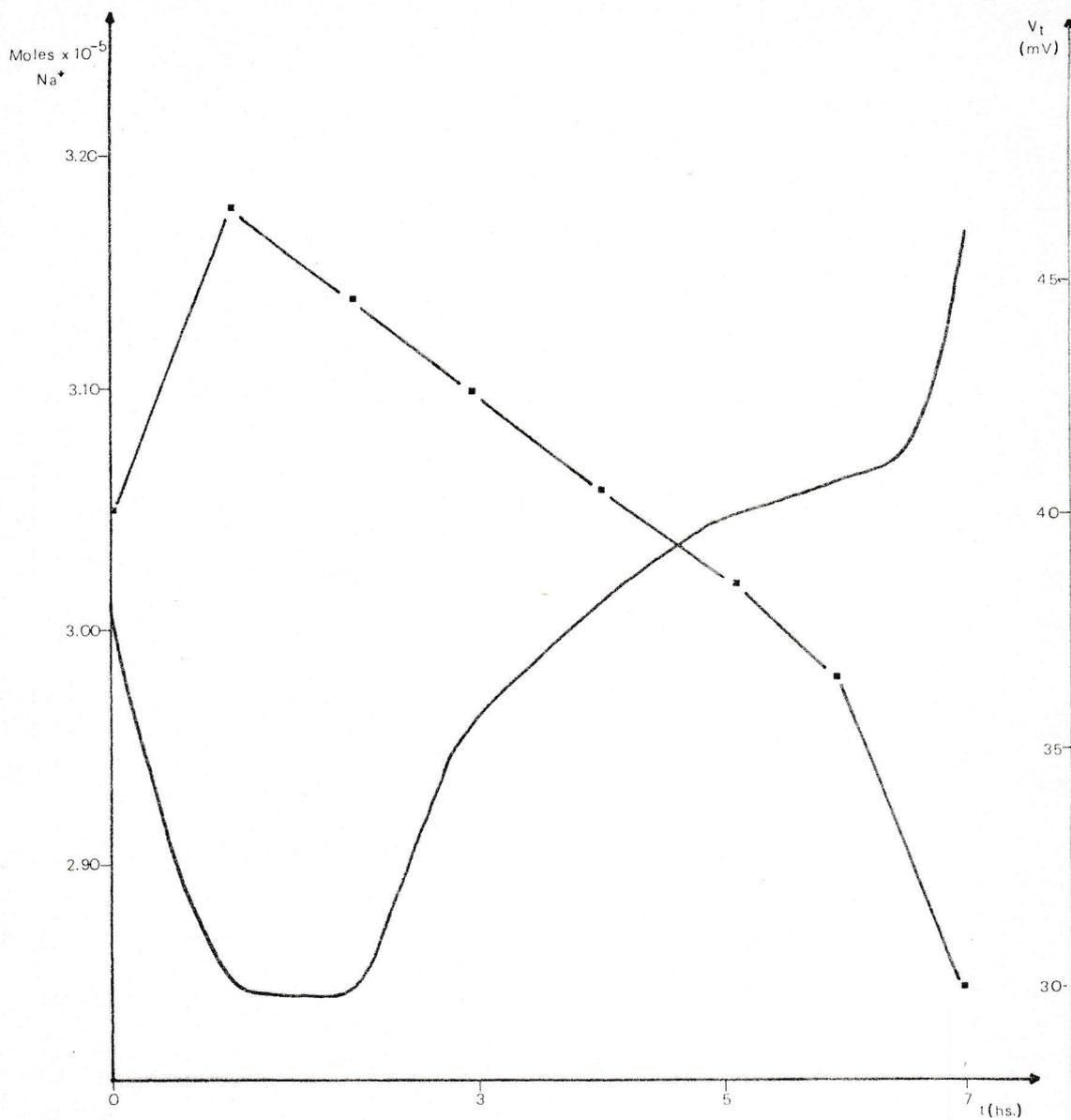


FIG. 10. Potencial transepitelial y moles de  $\text{Na}^+$  en la hemicámara del lado mucoso v/s tiempo  
 Lado mucoso:  $\text{NaCl}$  3.05 mM  
 Lado seroso: Ringer normal  
 La línea continua es una transcripción del registro de potencial transepitelial. La línea discontinua une los datos obtenidos a cada hora para la cantidad de  $\text{Na}^+$  en el lado mucoso.

en  $\Pi$  radiales. La Fig. 11 muestra la recta de regresión lineal obtenida con los pares de valores graficados para cada hora, obteniéndose un ajuste muy aceptable ( $r=0.91$ ). En estos experimentos las concentraciones iniciales usadas fueron las siguientes: lado mucoso: 3,05 mM  $\text{Na}^+$ ; lado seroso: Ringer normal (115 mM  $\text{Na}^+$ ), por lo tanto un aumento en la cantidad de  $\text{Na}^+$  en el lado mucoso corresponde a una declinación de la tasa de transporte de la bomba y vice-versa.

Dependencia del potencial transepitelial respecto de las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

La hipótesis de Koefoed-Ussing (1958) acerca del origen del potencial transepitelial, supone dos potenciales de difusión en serie, a través de las células que transportan  $\text{Na}^+$  activamente, uno debido a la alta permeabilidad al  $\text{Na}^+$  y muy baja permeabilidad al  $\text{K}^+$  en la membrana apical y lo contrario en la membrana basolateral, donde está ubicada la bomba que intercambia  $\text{Na}^+$  interno por  $\text{K}^+$  externo en una relación 1:1.

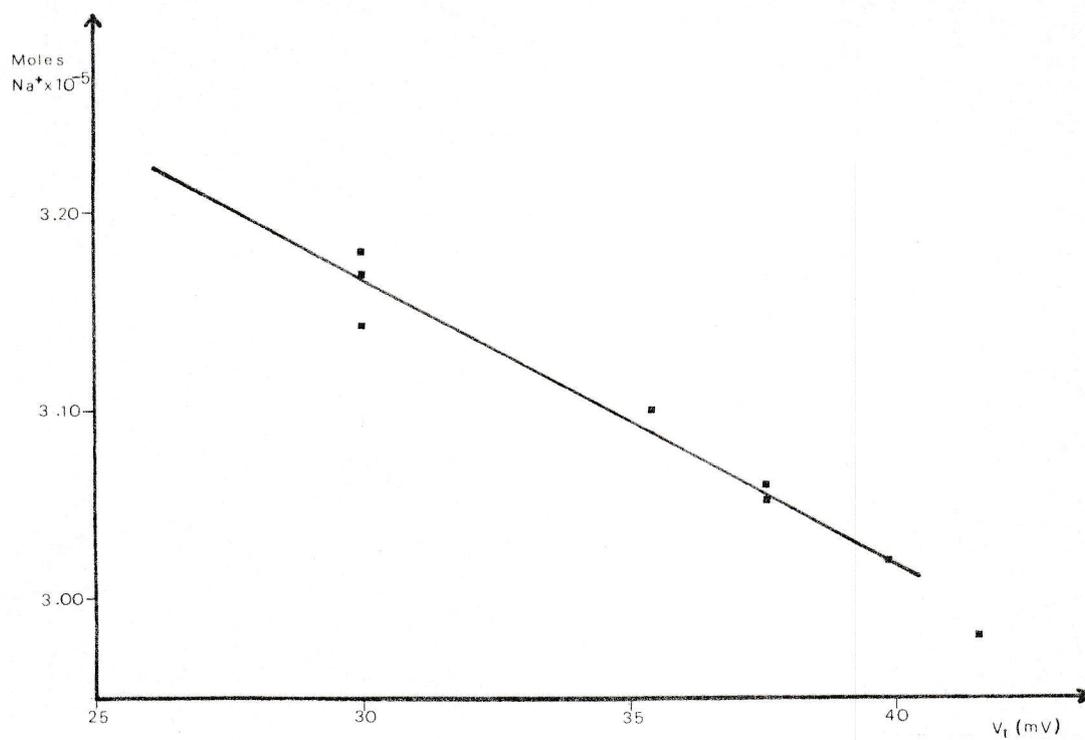


FIG. 11. Recta de regresión lineal para los pares de datos -  $V_t$ , moles de  $\text{Na}^+$  - obtenidos cada hora en la Fig. 16. ( $r = 0.91$ )

Dado que en *Caudiverbera caudiverbera* no existen referencias sobre la dependencia del potencial transepitelial respecto de las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en el lado mucoso y seroso respectivamente, se efectuaron experimentos con el fin de determinarla.

En la Fig. 12 se presentan los resultados obtenidos al variar la concentración de  $\text{Na}^+$  en el lado mucoso. Además, incluyen entre ellos dos experimentos en que se varió simultáneamente la concentración de  $\text{Na}^+$  en ambos compartimientos.

Se observa que la variación del potencial transepitelial es lineal con el logaritmo de la concentración de  $\text{Na}^+$  entre 1 y 60 mM, sin embargo, la respuesta a concentraciones mayores no es clara. Por otra parte, los dos experimentos en que se varió la concentración de  $\text{Na}^+$  también en el lado seroso exhiben los valores más bajos para la pendiente en el segmento lineal y un aumento desmesurado de la pendiente para valores de la concentración de  $\text{Na}^+$  mayores que 60 mM. Experimentos posteriores demostraron que la falta de  $\text{Na}^+$  - en el lado seroso provoca una aguda caída del potencial transepitelial y de la c.c.c., de manera que en estos dos

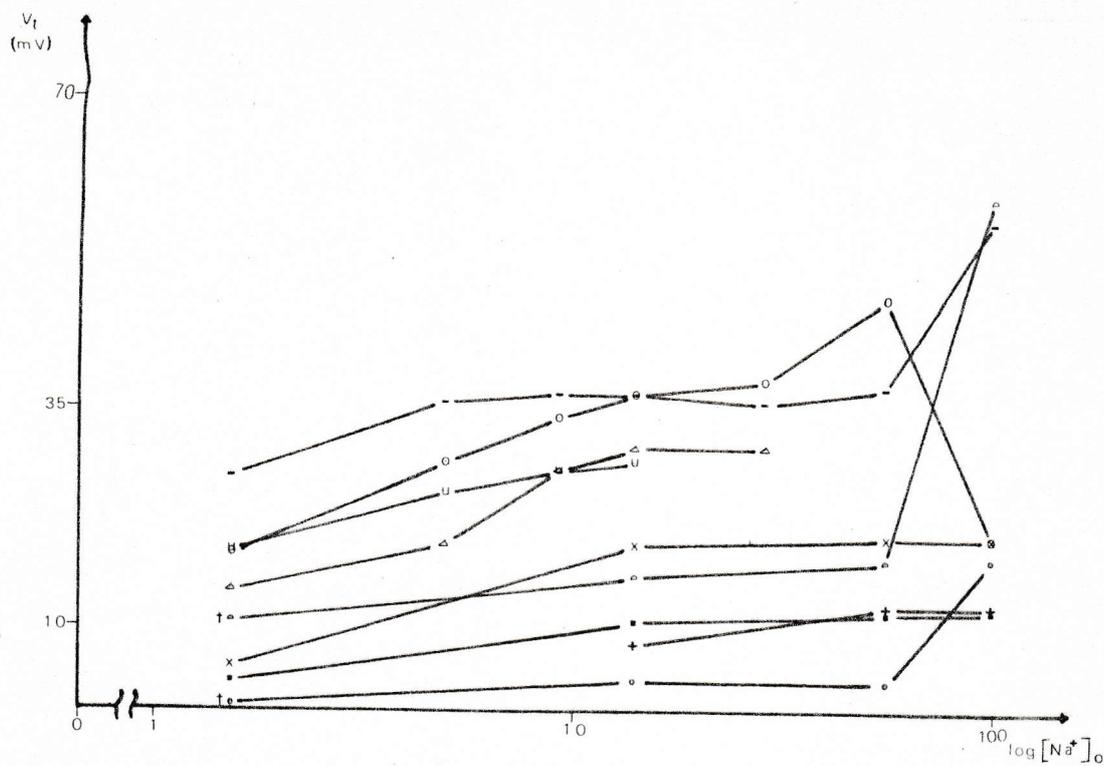


FIG. 12. Dependencia del potencial transepitelial respecto de la concentración de  $Na^+$  en el lado mucoso ( $[Na^+]_o$ ).

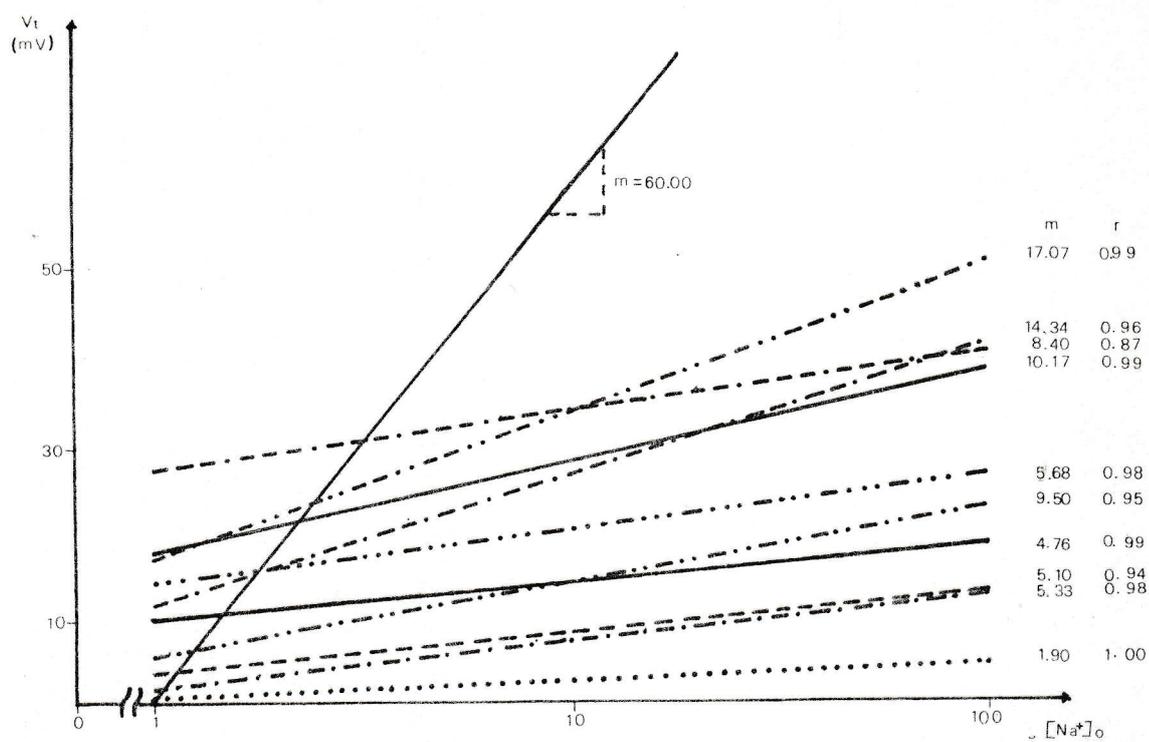
Las curvas señaladas con (+) corresponden a experimentos en que se varió la concentración de  $Na^+$  en ambas hemicámaras.

experimentos tendríamos superpuestos ambos efectos.

La Fig. 13 muestra las rectas de regresión obtenidas para cada experimento de la Fig. 12, con su correspondiente coeficiente de regresión lineal; en la Tabla 2 están las pendientes calculadas de tales rectas, se observa que si bien el ajuste a una recta es bastante aceptable, las pendientes están muy por debajo del valor esperado de  $60 \text{ mV/déc. } [\text{Na}^+]_o$ .

En la Fig. 14 están los resultados obtenidos al variar la concentración de  $\text{K}^+$  en el lado seroso, se observa una caída del potencial aproximadamente lineal con el logaritmo de la concentración de  $\text{K}^+$ , en el rango de 3 a 80 mM.

La Fig. 15 muestra las rectas de regresión lineal obtenidas para cada experimento de la Fig. 14, con sus respectivos coeficientes de regresión lineal y en la Tabla 3 la pendiente de cada una de estas rectas. Como en el caso anterior, las pendientes están lejos del valor esperado  $-60 \text{ mV/déc. } [\text{K}^+]_i$  lo que establece claramente que la hipótesis de Koefoed-Ussing no es aplicable a este epitelio.



**FIG. 13.** Rectas de regresión lineal para los experimentos de la Fig. 10. A la derecha de cada segmento se ha adjuntado la pendiente  $m$  (mV/déc.  $[Na^+]_o$ ) y el coeficiente de regresión lineal  $r$ . Se ha graficado además una curva teórica con una pendiente de 60 mV/déc.  $[Na^+]_o$ .

TABLA 2

m ( $\frac{\text{mV}}{\text{déc. } [\text{Na}^+]_o}$ )	r
17.07	0.99
14.34	0.96
8.40	0.87
10.17	0.99
5.68	0.98
9.50	0.95
4.76	0.99
5.10	0.94
5.33	0.98
1.90	1.00

Experimentos de dependencia del potencial trans epitelial respecto de la concentración de  $\text{Na}^+$  en el lado mucoso. Pendientes (m) y coeficientes (r) de las rectas de regresión lineal para cada experimento.

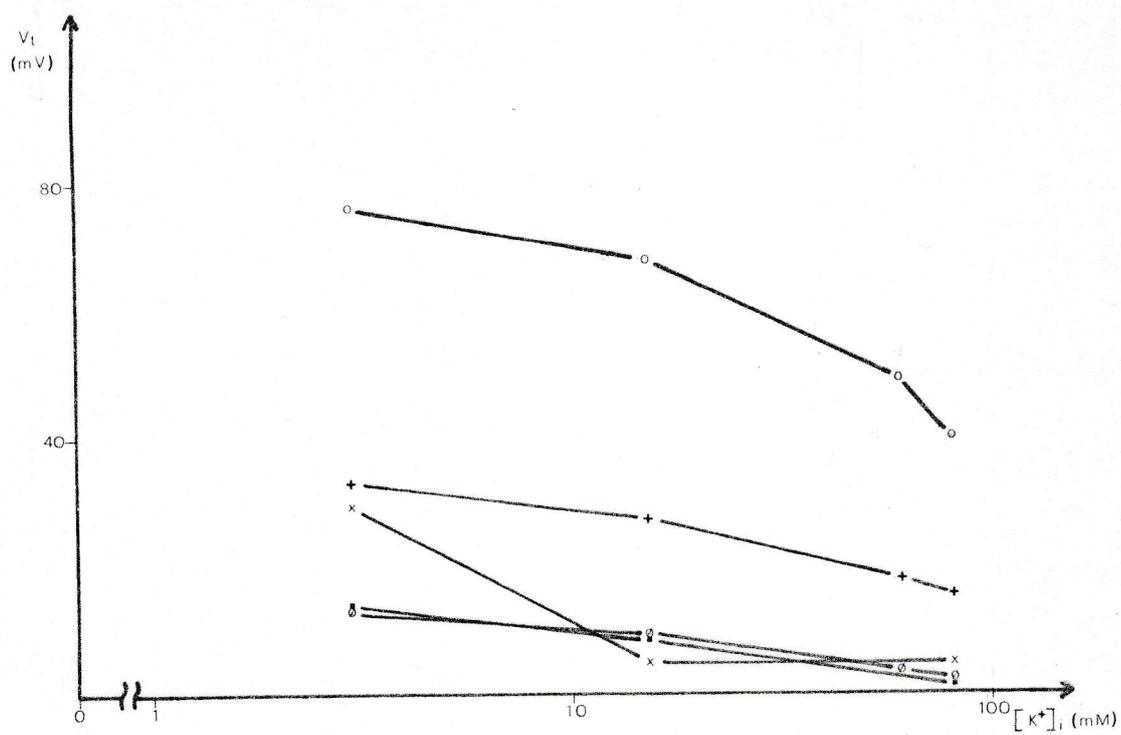


FIG. 14. Dependencia del potencial transepitelial respecto de la concentración de  $K^+$  en el lado seroso ( $[K^+]_i$ ).

TABLA 3

$m \left( \frac{\text{mV}}{\text{déc.} \cdot [\text{K}^+]_i} \right)$	r
- 25.1	0.96
- 12.6	0.99
- 8.8	1.00
- 7.0	0.98
- 18.0	0.86

$$\bar{x} = -14.28 \pm 3.68$$

Experimentos de dependencia del potencial transepitelial respecto de la concentración de  $\text{K}^+$  en el lado seroso. Pendientes (m) y coeficientes (r) de las rectas de regresión lineal para cada experimento.

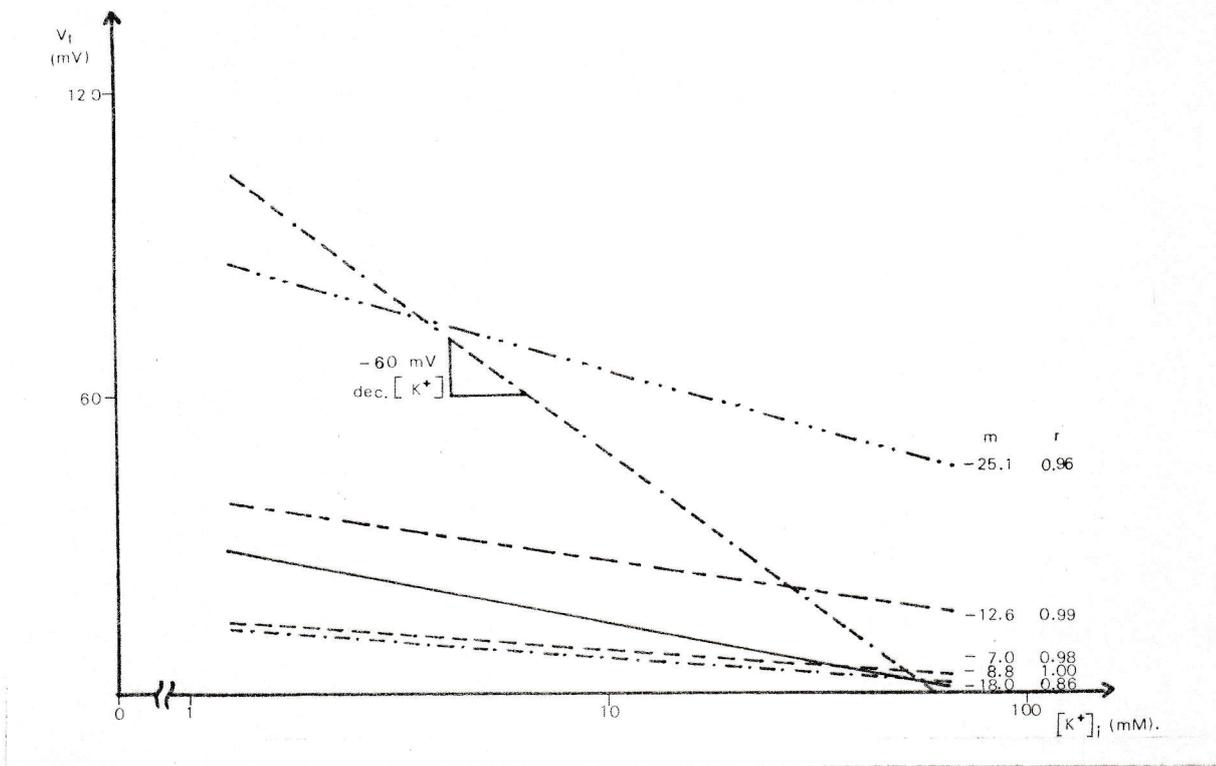


FIG. 15. Rectas de regresión lineal para los experimentos de la Fig. 10. A la derecha de cada segmento se ha adjuntado la pendiente  $m$  (mV/déc.  $[K^+]_i$ ) y el coeficiente de regresión lineal  $r$ . Se ha graficado además una curva teórica con una pendiente de  $-60$  mV/déc.  $[K^+]_i$ .

Los resultados anteriores, si bien no concuerdan con la hipótesis de un potencial de Nernst en las membranas apical y basolateral de las células de transporte, podrían corresponder a la presencia de un potencial de Goldman, por lo tanto se podría esperar que si se mantienen constantes las concentraciones intracelulares y las concentraciones en ambas hemicámaras un cambio en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  en la membrana apical, se reflejaría en un cambio instantáneo en el potencial transepitelial. Se hicieron experimentos en que se agregó simultáneamente amilorida, a una concentración final de  $10^{-4}$  M, en el lado mucoso de ambas mitades de la piel, una de ellas cortocircuitada y la otra en cortocircuito abierto; utilizando la medida de la corriente en una y del potencial en la otra, mediante un graficador X v/s Y, se hizo un gráfico Y v/s V. Dado que la c.c.c. se mide utilizando un circuito externo, la c.c.c. es una buena medida de la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  de la membrana apical.

La Fig. 16 reproduce un experimento típico, donde se observa un claro retardo del cambio de potencial transepitelial respecto del cambio de la c.c.c., retraso que corresponde a algunos segundos, que es

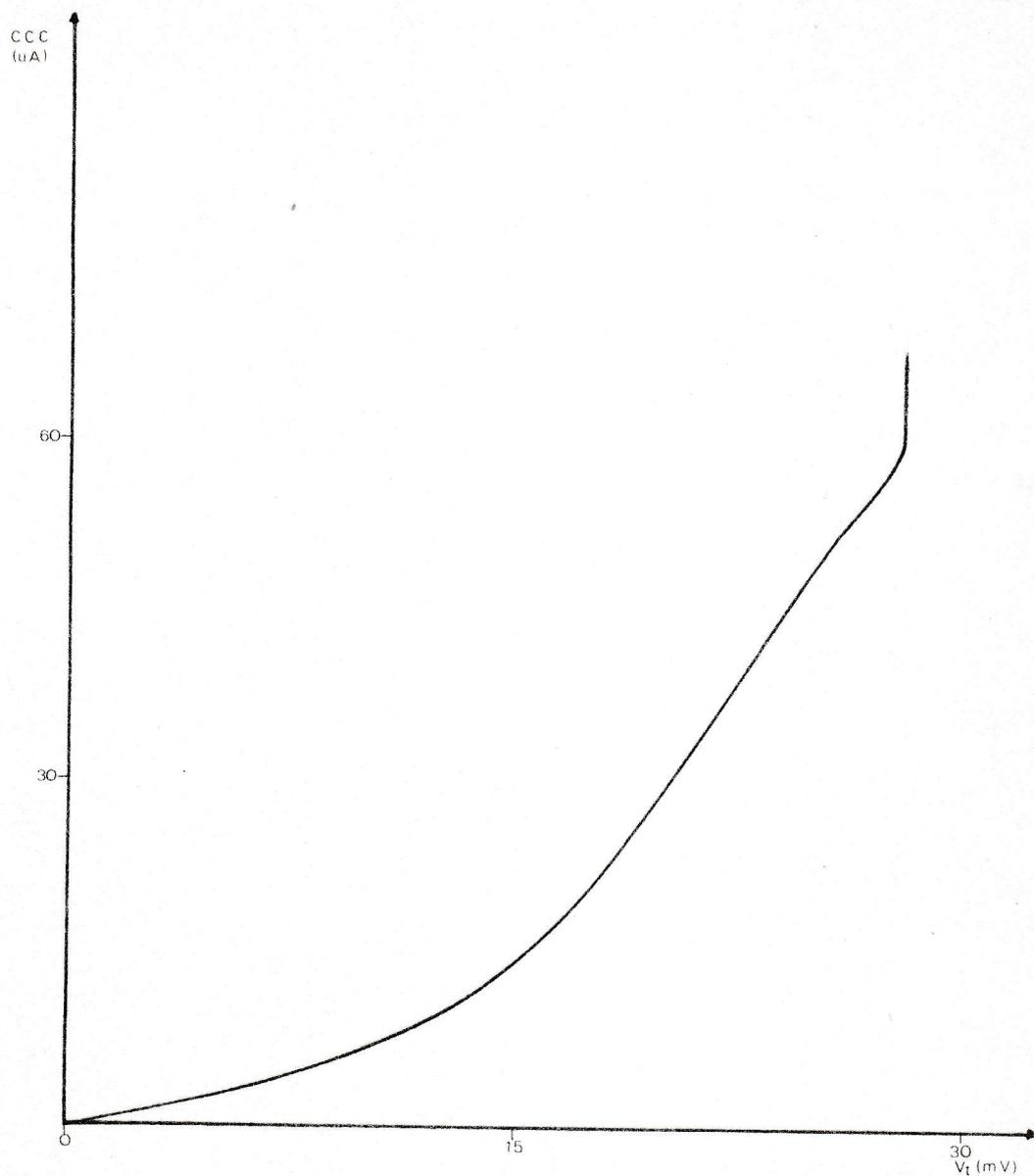


FIG. 16. Retardo de la caída del potencial del potencial respecto de la caída de la c.c.c.  
Se agregó Amilorida a una concentración final de  $10^{-4}$  M en el lado mucoso de las dos mitades de una piel simultáneamente. En uno se registró  $V_t$  y en el otro c.c.c. en un graficador X/Y.

justamente el tiempo en que se puede suponer que la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  no varía significativamente. Este tipo de resultado es el que se esperaría en un sistema en que opera un potencial de Nernst, ya que el potencial no varía hasta que comienza a variar la concentración intracelular, sin embargo, es contradictorio con los resultados anteriores y con un potencial de Goldman.

Es evidente entonces, que estos resultados no concuerdan con el modelo planteado por Koefoed-Ussing; la dificultad más importante surge a raíz de la dependencia del potencial transepitelial respecto de la concentración de  $\text{Na}^+$  en el lado mucoso de la piel, ya que si bien es lineal con el logaritmo de la concentración de  $\text{Na}^+$  externa, la pendiente es distinta de  $60 \text{ mV/déc.} [\text{Na}^+]_o$ , de hecho, el rango de valores encontrados para la pendiente es extremadamente amplio.

Más adelante, se discutirá la posibilidad de plantear un modelo suponiendo una bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  electrogénica.

## DISCUSION

Transporte activo de  $\text{Cl}^-$ 

En los últimos años ha sido aportada evidencia de transporte activo de  $\text{Cl}^-$  en piel aislada de varias especies: *Rana pipiens* (40), *Rana temporaria* (29), *Rana sculenta* (19) y *Leptodactylus ocellatus* (44). Se ha podido determinar que existen al menos dos mecanismos básicos: uno sensible a ouabaína y dependiente de cationes y otro sensible a acetazolamida e independiente de cationes. El primero se evidencia cuando la piel está bañada por soluciones con alta concentración de  $\text{Cl}^-$  (aproximadamente 100 mM) y el segundo, cuando la piel está bañada por soluciones muy diluídas (aproximadamente 1.5 mM). Aparentemente su detección es sólo función de la importancia relativa que tenga cada uno de ellos en determinadas condiciones experimentales, ya que García-Romeu y Ehrenfeld han demostrado (19), en *Rana sculenta*, que en solución Ringer normal ambos mecanismos están presentes.

García-Romeu *et al.* (20), trabajando en *Caudiverbera caudiverbera in vivo* en soluciones muy diluídas (1.7 mM  $\text{Cl}^-$ ), determinaron la presencia de sistemas independientes de intercambio de  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-$  por base, probablemente  $\text{HCO}_3^-$ . Este último ha sido identificado posteriormente (19) como aquel que transporte  $\text{Cl}^-$  activamente *in vitro* desde soluciones muy diluídas.

Los resultados que se informan en el presente trabajo, concuerdan plenamente con la hipótesis de un transporte activo de  $\text{Cl}^-$  desde soluciones muy concentradas. Por una parte la inversión de la c.c.c. y el  $V_t$  en ausencia de  $\text{Na}^+$ ; y por otra, la completa inhibición de la c.c.c. negativa en ausencia de  $\text{Cl}^-$  y por la inhibición de la permeabilidad al  $\text{Cl}^-$  con iones  $\text{Cu}^{++}$  constituyen una fuerte evidencia de que la c.c.c. <sup>parte</sup> <sup>negativa</sup> es portada por iones  $\text{Cl}^-$ . Además, el hecho de que exista este transporte neto en presencia de un gradiente electroquímico transepitelial nulo indica claramente que estamos en presencia de un transporte activo.

Las corrientes registradas son significativamente menores que los valores publicados por Zadunaisky *et al.* (43) en otro leptodactílido - *Leptodactylus ocellatus* - ya que representan entre un 1.8 y un 7% de éstas.

Esto sugiere que este mecanismo transporta solo una pequeña cantidad de  $\text{Cl}^-$  en *Caudiverbera caudiverbera* o que es fuertemente catión dependiente; esta última hipótesis es avalada por los datos aportados por otros autores que indican una gran dependencia catiónica para el flujo de entrada de  $\text{Cl}^-$ , en otras especies (30) (40) (43), en particular en *Leptodactylus ocellatus* donde en soluciones sin  $\text{Na}^+$  el flujo de  $\text{Cl}^-$  cae a un 18% de su valor original. Esta dependencia no parece ser producto de interacciones a nivel de membrana, ya que resultados publicados por Candia (8) señalan que, en presencia de  $\text{Na}^+$ , la adición de amilorida provoca una caída de un 55% en los flujos unidireccionales de  $\text{Cl}^-$  en *Rana pipiens*, observándose una caída similar por remoción del  $\text{Na}^+$ ; por otra parte, no es posible que - como sugirieran García-Romeu y Ehrenfeld (19) - se trata de la inhibición de un sitio de entrada común para el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$ , ya que hay considerable evidencia en pro de la existencia de sitios separados de entrada para estas iones (5) (7), de manera que la acción inhibitoria de la falta de  $\text{Na}^+$  podría estar situada a nivel de bomba de  $\text{Cl}^-$  ó bien - como propone Candia en el trabajo citado - ser producto de un acoplamiento de los flujos de

ambos iones a nivel intracelular.

Sin embargo, experimentos preliminares con isótopos, realizados por E. Bosh (comunicación personal), no arrojaron evidencias de un transporte activo de  $\text{Cl}^-$  en presencia de  $\text{Na}^+$  en nuestra preparación. Estos resultados más bien sugieren que el transporte activo de  $\text{Cl}^-$  es de pequeña magnitud.

Efecto del ión  $\text{Cl}^-$  sobre el transporte de  $\text{Na}^+$

En la literatura se encuentran abundantes referencias respecto al rol "activador" que tendría el ión  $\text{Cl}^-$  sobre el transporte de  $\text{Na}^+$ , de manera que - siendo un hecho establecido - la discusión se centra en torno al mecanismo involucrado en este fenómeno. Biber y Mullen (5) trabajando en piel aislada de *Rana pipiens* informa de resultados que sugieren la acción del  $\text{Cl}^-$  y otros aniones ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ) es a nivel de cargas superficiales de la membrana apical, las que actuarían como importantes barreras o filtros para el movimiento de iones a través de ella. Fishbarg y Zadunaisky (15), por otra parte, trabajando en piel aislada de *Leptodactyllus*

*ocellatus*, señalan que experimentos de "lavado" de  $\text{Na}^+$  indican que la permeabilidad de la barrera externa es independiente de la concentración de  $\text{Cl}^-$  o  $\text{Na}^+$ , concluyendo que es probable que la concentración de  $\text{Cl}^-$  actúe a nivel de bomba iónica. Esta posición es reforzada por los experimentos representados en la Fig. 8 y la Fig. 9, éstos indicarían que no es la concentración de  $\text{Cl}^-$  lo relevante en la inhibición del transporte de  $\text{Na}^+$  sino que lo es la permeabilidad al  $\text{Cl}^-$ , sugiriendo así que el nivel donde se produce la inhibición sería el interior de la célula - probablemente sobre la bomba de  $\text{Na}^+$  - y no la membrana apical. Es difícil pensar que el  $\text{Cu}^{++}$  interfiera con las cargas de superficie, ya que los experimentos realizados por Biber y Mullen para demostrar inhibición por cationes requieren concentraciones 2 y 4 órdenes de magnitud mayores que las utilizadas para el  $\text{Cu}^{++}$  en nuestros experimentos.

Por otra parte, García-Romeu *et al.* (20) informan de resultados similares en *Caudiverbera caudiverbera in vivo*: al reemplazar el ión  $\text{Cl}^-$  por  $\text{SO}_4^{=}$  en la solución externa, el flujo de  $\text{Na}^+$  decrece drásticamente (de  $7.2 \pm 1.6$  a  $2.5 \pm 1.1$  ueq/h x 100 gr).

Es conveniente señalar que se ha encontrado una considerable variación interespecífica respecto al grado de inhibición del transporte de  $\text{Na}^+$  en función del ión  $\text{Cl}^-$ . En todo caso, es muy sugerente que en dos especies de leptodactílidos se haya encontrado evidencia que apunta a un rol intracelular del  $\text{Cl}^-$  sobre el transporte de  $\text{Na}^+$ . Más adelante volveremos sobre este problema presentando evidencias que refuerzan esta posición en *Rana pipiens* y en *Rana temporaria*.

Dependencia del potencial transepitelial ( $V_t$ ) respecto de las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

Como se señaló en la sección Resultados, la dificultad más importante para aceptar el modelo de Koefoed-Ussing radica en que la pendiente de las curvas  $V_t$  v/s  $\log [\text{Na}^+]_o$  y de las curvas  $V_t$  v/s  $\log [\text{K}^+]_i$ , es distinta de aquella que predice el modelo (60 mV/dec [ ]); más aún, las pendientes obtenidas en distintos experimentos - bajo las mismas condiciones - cubren un amplio rango de valores, aún en una misma especie. Otro escollo casi insalvable para el modelo propuesto, está

constituido por el perfil de potenciales que se registra a través de las células de transporte. En la Fig. 17a se presenta el perfil esperado de acuerdo al modelo de Ussing y en la Fig. 17b el perfil registrado por Helman y Fisher (22). Se han propuesto numerosas modificaciones al modelo a fin de ofrecer una explicación adecuada a las anomalías observadas; sin embargo, el problema permanece irreductible.

Recientemente ha sido aportado un antecedente que sitúa el problema en otro plano, a la vez que refuta una importante suposición del modelo de Koefoed-Ussing. R. Nielsen en un par de elegantes trabajos (34) (35), demuestra que la bomba de  $\text{Na}^+$  presente en la piel de rana es electrogénica, con una relación de transporte  $\text{Na}^+/\text{K}^+ = 1.5$

Los resultados expuestos en las Figs. 10 y 11 están en perfecto acuerdo con la existencia de una bomba electrogénica.

Otro antecedente interesante está relacionado con las pendientes de las rectas de regresión de los experimentos en que se estudia la variación de  $V_t$  v/s  $\log [\text{Na}^+]_o$ . Ya hemos señalado que tanto en nuestro trabajo como en trabajos de otros autores las pendientes

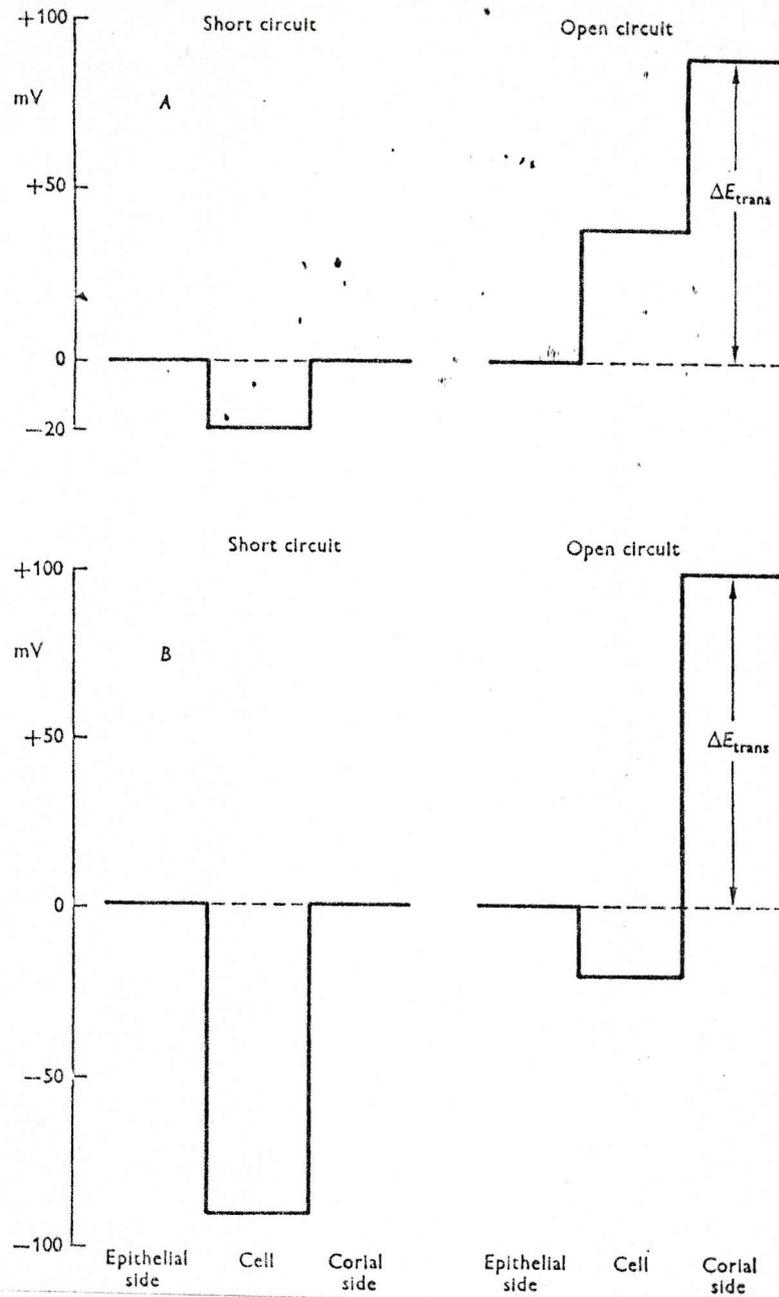


FIG. 17. a) Perfil de potenciales esperado - de acuerdo al modelo de Koefoed-Ussing - a través de una célula de la capa de transporte  
 b) Perfil de potenciales registrado por Nagel (1976) (Tomado de Nagel, 1977)

obtenidas no solo están lejos de  $60 \text{ mV/déc } [\text{Na}^+]_o$ , sino que cubren un amplio rango de valores. Sin embargo, si en todos los experimentos está actuando el mismo mecanismo para generar el potencial transepitelial, las rectas de regresión deben pertenecer a una misma familia de rectas. En nuestros experimentos observamos un hecho que, no obstante su carácter aparentemente trivial, es muy sugerente cuando se profundiza en él. Consiste en que mientras más alto es el potencial alcanzado a  $100 \text{ mM Na}^+$  (usamos esta concentración de referencia para minimizar el carácter aparentemente aleatorio de la constante aditiva de las rectas de regresión), mayor es la pendiente de la recta. La Fig. 18 muestra tres rectas de regresión de conjuntos de pares de datos tomados de las rectas de la Fig. 13 (recta A) y de las rectas de regresión de los experimentos realizados por W. Nagel en 1977 (32) en *Rana temporaria* y *Rana pipiens* (rectas B y C); los pares de datos graficados corresponden a la pendiente (m) y al potencial transepitelial a  $100 \text{ mM Na}^+$  ( $V_t(100)$ ) calculados de cada recta de regresión. Es muy sugerente que las rectas A y B correspondientes a experimentos realizados en Ringer normal

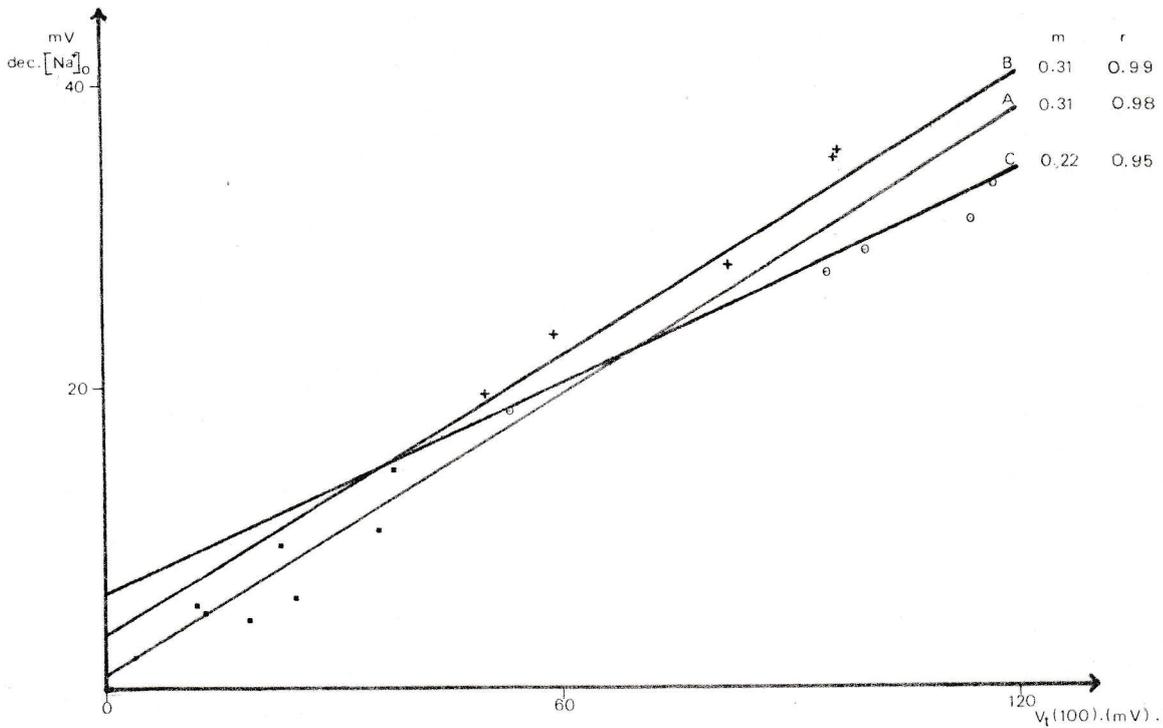


FIG. 18. Rectas de regresión lineal para los pares ordenados  $V(100)$ , m.

- A. Experimentos realizados en *Caudiverbera caudiverbera*. Lado mucoso: concentraciones variables de  $\text{Na}^+$ . Lado seroso: Ringer normal
- B. Experimentos realizados en *Rana pipiens* y *Rana temporaria*. Lado mucoso: concentraciones variables de  $\text{Na}^+$ . Lado seroso: Ringer normal
- C. Experimentos realizados en *Rana pipiens* y *Rana temporaria*. Lado mucoso: concentraciones variables de  $\text{Na}^+$  en soluciones sin  $\text{Cl}^-$ . Lado seroso: Ringer sulfato

exhiban la misma pendiente, aún cuando fueron realizados en especies, lugares y años diferentes; en cambio, la recta C exhibe una pendiente significativamente distinta de la anterior; la recta C corresponde a experimentos realizados en Ringer sulfato. Estos datos sugieren que en los experimentos correspondientes a las rectas A y B el mecanismo generador del potencial transepitelial es el mismo y en los experimentos considerados en la recta C, este mecanismo estaría alterado, lo que apunta - una vez más - a que la acción del ión  $\text{Cl}^-$  se efectuaría a nivel intracelular.

De todo lo anterior se desprende que un modelo que de cuenta de la generación del potencial transepitelial debe considerar - al menos - los siguientes aspectos:

- a) Presencia de una bomba de sodio electrogénica
- b) Perfil de potenciales observado
- c) Distintos valores, para las pendientes de las rectas de regresión de experimentos en que se estudia  $V_t$  v/s  $\log[\text{Na}^+]_o$ .
- d) Estrecha relación entre la actividad de la bomba de sodio y  $V_t$ .

- e) Efecto de la remoción del  $\text{Cl}^-$
- f) Transporte activo de  $\text{Cl}^-$
- g) Como último aspecto que debe ser considerado está la observación de que existe un evidente acoplamiento e léctrico entre la membrana apical y la membrana baso lateral (Finn, 1976) (14).

En el estado actual de conocimiento de este epite-  
lio no existe un modelo que de cuenta de toda la comple-  
ja fenomenología que ha sido observada en él. Son mu-  
chos los parámetros que intervienen en los procesos de  
transporte que presenta y cualquiera de los modelos has-  
ta ahora presentados, presupone muchas simplificaciones  
que atentan contra la validez de ellos. Sin embargo,  
los datos presentes en la literatura sugieren la presen-  
cia de una "bomba" de cloruro en la membrana apical, co-  
mo planteara Kristensen (45). De manera que nos parece  
que un modelo mínimo tendría la forma presentada en la  
Fig. 19. En este modelo es posible aplicar las ecuacio-  
nes desarrolladas por Frumento (16); esta vez para un mo-  
delo de tres compartimientos, sin embargo, nos parece a  
priori que no es capaz de dar cuenta de toda la fenome-  
nología observada.

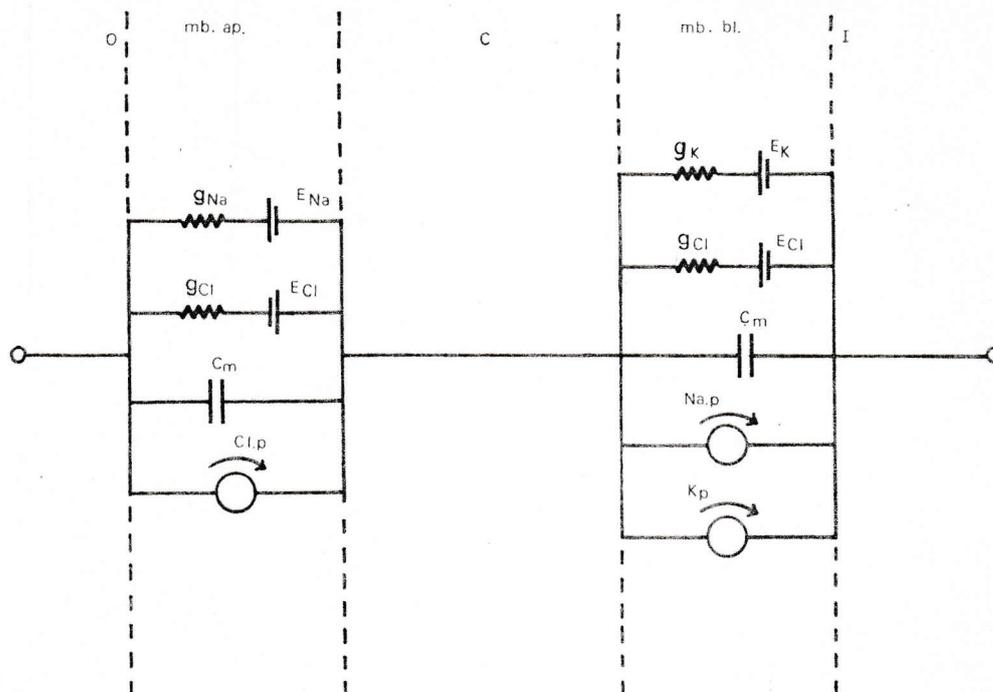


FIG. 19. Modelo para el mecanismo de transporte en la piel de rana.

O, C, I : compartimientos externo, intracelular e interno respectivamente

mb. ap. : membrana apical; mb. bl.: membrana basolateral

$g_{Na}$ ,  $g_{Cl}$ ,  $g_K$  : conductancias al  $Na^+$ ,  $Cl^-$  y  $K^+$  respectivamente

$C_m$  : capacidad de la membrana

$Cl,p$ ;  $Na,p$ ;  $K,p$ : Bombas de  $Cl^-$ ,  $Na^+$  y  $K$  respectivamente

$E_{Cl}$ ;  $E_{Na}$ ;  $E_K$  : Potenciales de equilibrio del  $Cl^-$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  respectivamente

Para concluir, debemos señalar que aunque la piel de rana se ha mostrado como un buen modelo para el estudio de transporte y regulación a través de epitelios, presenta serios problemas debido a su compleja estructura, que torna casi inaccesible la capa celular que realiza tales funciones; por otra parte, las técnicas hasta ahora usadas, parecen ser inadecuadas para estudiar los mecanismos moleculares en juego, de tal manera que se hace necesario el uso de otras técnicas más avanzadas, tales como medición de ruido de canales iónicos; trabajo con monocapas celulares cultivadas y fracciones celulares de éstas u otras técnicas *ad-hoc* a desarrollar; en todo caso, ésta parece ser un área de trabajo prácticamente virgen donde queda aún mucho que realizar.

## REFERENCIAS

- ✓ 1. Benos D.J. "Acidification and Na<sup>+</sup> entry in Isolated Frog Skin". Comunicación personal. 1981.  
 (2) Benos - Lotone - Reyes (1981) J. Physiol ~~321~~ 163-174 (1)
2. Benos D.J., Lázaro Mandel and Robert R. Balaba.  
 "On the Mechanism of the Amiloride-Sodium Entry Site Interaction in Anuran Skin Epithelia". J. Gen. Physiol. 73: 308 - 325, 1979.
3. Bentley P.J. "Amiloride a Potent Inhibitor of Sodium Transport across the Toad Bladder". J. Physiol. 195: 317 - 330, 1968.
4. Bentley P.J. and Yorio T. "The Passive Permeability of the Skin of Anuran Amphibis: a Comparison of Frogs (*Rana pipiens*) and Toads (*Bufo marinus*)". J. Physiol. 261: 603 - 615, 1976.

- ✓ 5. Biber T.V.L., Mullen T.L. "Effect of External Cation and Anion Substitution on Sodium Transport in Isolated Frog Skin". J. Memb. Biol. 52 (2): 121 - 132, 1980.
- No ✓ 6. Biber T.V.L., Mullen T.L., J.A. De Simone. "Effects of FeCl<sub>3</sub> in Ion Transport in Isolated Frog Skin". J. Memb. Biol. 52 (2) 133 - 140, 1980.
7. Biber T.V.L., Walker T.C., Mullen T.L. "Influence of Extracellular Cl concentration on Cl Transport across Isolated Skin of *Rana pipiens*". J. Memb. Biol. 54 (3): 191 - 202, 1980.
- ✓ 8. Candia O.A. "Reduction of Chloride Fluxes by Amiloride across the short-circuit Frog Skin". Am. J. Physiol. 234 (5): 437 - 445, 1978.
9. Canessa M., Labarca P., Oibona D.R., Leaf A. "Energetics of Sodium Transport in Toad Urinary Bladder". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 4591 - 4595, 1978.

10. Cuthbert A.W. and Shum W.K. "Amiloride and Sodium Channel". Arch. Pharmacol. 281: 261 - 269, 1974.
11. Díaz N., Veloso A. "Sistemática y Evolución de los Anfibios de Chile". Arch. Biol. Med. Exp. 12: 59 - 70, 1979.
12. Ehrenfeld J. and García-Romeu F. "Coupling Between Chloride Absorption and Base Excretion in Isolated Skin of *Rana sculentata*". Am. J. Physiol. 235 (1): F33 - F39, 1978.
13. Essig A., Frazier H. and Leaf A. "Evidence for Electrogenic Active Sodium Transport in an Epithelial Membrane". Nature 197 (4868): 701 only. 1963.
14. Finn A. "Changing Concepts of Transepithelial Sodium Transport". Physiol. Review 56 (2): 453 - 464, 1976.
- ✓ 15. Fishbarg J., Zadunaisky J.A. and de Fisch F.W. "Dependence of Sodium and Chloride Transports on Chloride Concentration in Isolated Frog Skin". Am. J. Physiol. 213: 963 - 968, 1967.

16. Frumento A.S. "The Electrical Effects of an Ionic Pump". J. Theoret. Biol. 9: 253 - 262, 1965.
17. García-Romeu F. and Salibián A. "Sodium Uptake and Ammonia Excretion through the *in vivo* Skin of the South American Frog *Leptodactylus ocellatus*". Life Sciences 7 part I: 465 - 470, 1968.
18. García-Romeu F. and Ehrenfeld J. "*In vivo* Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> Independent Transport across the skin of *Rana sculenta*". Am. J. Physiol. 228: 839 - 844, 1975.
- ✓ 19. García-Romeu F. and Ehrenfeld J. "Chloride Transport through the Non-short-circuited Isolated skin of *Rana sculenta*". Am. J. Physiol. 228 (3): 845 - 849, 1975.
- ✓ 20. García-Romeu F., Salibián A. and Pezzani S. "The Nature of the *in vivo* sodium and chloride uptake mechanisms through the epithelium of the Chilean frog *Calyptocephalella gayi* (Dum et Bibr. 1841). Exchanges of Hydrogen against sodium and of Bicarbonate against chloride". J. Gen. Physiol. 53: 816 - 835. 1969.

21. Binsburg B.Z. and Hogg J. "What does a short-circuit current measure in biological systems? J. Theor. Biol. 14: 316 - 322, 1967.
22. Helman S.I. and Fisher R.S. "Microelectrode studies of the Active Na Transport Pathway of Frog Skin". J. Gen. Physiol. 69 (5): 571 - 604, 1977.
23. Helman S.I., Nagel W. and Fisher R.S. "Ouabain on Active Transepithelial Transport in Frog Skin. Studies with Microelectrodes". J. Gen. Physiol. 74 (1): 105-128, 1979.
24. Huf E. "The Role of  $\text{Cl}^-$  and other Anions in Active  $\text{Na}^+$  Transport in Isolated Frog Skin". Acta Physiol. Scan. 84: 366 - 381, 1972
25. Kirschner, Greenwald, Koerstetter. "Effect of Amiloride on Sodium Transport across Body Surfaces of Fresh Water Animals". Am. J. Physiol. 244: 832 - 837, 1971.

- ✓ 26. Koefoed-Jøhnsen V. and Ussing H.H. "The Nature of the Frog Skin Potential". Acta Physiol. Scan. 42: 298 - 308, 1958.
- 27. Koefoed-Jøhnsen V., Ussing H.H. and Zerahn. "The Origin of the short-circuit Current in the Adrenaline Stimulated Frog Skin". Acta Physiol. Scan. 27: 38 - 48. 1952
- 28. Lahav J. and Michaeli I. "A Thermodynamic Analysis of the Correlation between Active Na<sup>+</sup> Transport and the rate of Oxygen Consumption in Epithelia". J. Memb. Biol. 42: 1 - 18, 1978.
- ✓x 29. Lote C.J. "Chloride Transport in Isolated Frog (*Rana temporaria*) Skin. Pflügers Arch. 362: 181 - 184, 1976.
- ✓ 30. Macey R.I. and Meyers S. "Dependence of Chloride Permeability on Sodium in the Isolated Frog Skin". Am. J. Physiol. 204: 1095 - 1099, 1963.

31. Motaïs R. and García-Romeu F. "Transport Mechanisms in the Teleostean Gill and Amphibian Skin". Annual Review of Physiology. Vol. 34: 141 - 175, 1972.
32. Nagel W. "The Dependence of the Electrical Potential across the Membranes of the Frog Skin upon the Concentration of Sodium in the Mucosal Solution". J. Physiol. 269 (3): 777 - 796, 1977.
33. Nagel W., Hirschmann W. " $K^+$  Permeability of the outerborder of the Frog Skin (*Rana temporaria*). J. Memb. Biol. 52 (2): 107 - 114, 1980.
34. Nielsen R. "Coupled Transepithelial Sodium and Potassium Transport across Isolated Frog Skin. Effect of Ouabain, Amiloride and Polyene Antibiotic Filipin". J. Memb. Biol. 51 (2): 161 - 184, 1979.
35. Nielsen R. "A 3 to 2 Coupling of the Na-K Pump Responsible for the Transepithelial Na Transport in Frog Skin Disclosed by the effect of Ba". Acta Physiol. Scand. 107: 189 - 191, 1979.

36. Nagel W. and Oörge A. "Effect of Amiloride on Sodium Transport of Frog Skin". *Pflügers Arch.* 317: 84-92, 1970.
37. O'Neil R. and Helman S.I. "Influence of Vasopressin and Amiloride on Shunt Pathways of Frog Skin". *Am. J. Physiol.* 231 (1): 164 - 173. 1976
38. Veloso A. "Aggressive Behavior and the Generic Relationships of *Caudiverbera caudiverbera*. (Amphibia: Leptodactylidae)". *Herpetologica* 33: 434. 1977.
- 39. Wattlington Ch.O., Campbell A.D. and Huf E. "Ion Transport in Skin Live Frogs". *J. Cell and Comp. Physiol.* 64: 389 - 408. 1964
- ✓~~✗~~ 40. Wattlington C.O. and Jessee Jr. F. "Net  $\text{Cl}^-$  flux in short circuited skin of *Rana pipiens*. Ouabain Sensitivity and  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$  Dependence". *Biochim. Biophys. Acta* 382: 204 - 212, 1975.

- ✓ 41. Wattlington C.D., Jessee S.D. and Baldwin G.  
"Ouabain, Acetazolamide and  $\text{Cl}^-$  Flux in Isolated Frog Skin: Evidence for Two distinct Active  $\text{Cl}^-$  Transport Mechanisms". Am. J. Physiol. 232 (6): F550- F558, 1977.
- ✓ 42. Zadunaisky, Candia and Chiarandini. "The Origin of the Short-circuit current in the Isolated Skin of the South American Frog *Leptodactylus ocellatus*". J. Gen. Physiol. 47: 393 - 402, 1963.
- ✓ 43. Zadunaisky J.A. and de Fish F.W. "Active and Passive Chloride Movements across Isolated Amphibian Skin". Am. J. Physiol. 207: 1010 - 1014, 1964.
44. Zylber E.A., Rotunno C.A., Cereijido M. "Ionic Fluxes in Isolated Epithelial Cells of the Abdominal Skin of the Frog *Leptodactylus ocellatus*". J. Memb. Biol. 22 (3/4): 265 - 284, 1975.

45. Kristensen, P. "Chloride Transport across Isolated Frog Skin".  
Acta physiol. scand. 84 338-346. 1972.