



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**VÍAS DE ABSORCIÓN DEL VENENO PARALIZANTE DE  
MOLUSCOS EN EPITELIOS DE YEYUNO HUMANO**

**LUCIANO A. PIZARRO PIZARRO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

Profesor Guía: Dr. Gustavo A. Farías R.

Financiamiento: Fundación de estudios Biomédicos Avanzados.

Facultad de Medicina. Proyecto 265. Directores  
del Proyecto: Dr. Néstor Lagos y Dr. Rafael  
Torres.

**SANTIAGO-CHILE**

**2007**



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**VÍAS DE ABSORCIÓN DEL VENENO PARALIZANTE DE  
MOLUSCOS EN EPITELIOS DE YEYUNO HUMANO**

**LUCIANO A. PIZARRO PIZARRO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

NOTA FINAL:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: Dr. GUSTAVO FARÍAS	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: Dr. NESTOR LAGOS	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: Dr. RAFAEL TORRES	.....	.....

**SANTIAGO-CHILE  
2007**

## INDICE.

<b>RESUMEN</b>	2
<b>SUMMARY</b>	4
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</b>	8
Anatomía y función intestinal	17
<b>OBJETIVOS</b>	23
Objetivo General	23
Objetivos Específicos	23
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	24
Toxinas	24
• Extracción	24
• Cuantificación analítica por HPLC	26
Estudios de transporte en cámara Ussing	30
• Tejidos	30
• Soluciones	30
• Cámara Ussing	31
• Electroodos	32
• Viabilidad	33
• Montaje del tejido	33
• Resistencia Transepitelial	34
Protocolo experimental	37
Análisis de muestras	38

• Determinación de la masa de toxina de la muestra _____	38
• Algoritmo de cálculo _____	39
<b>RESULTADOS</b> _____	41
Purificación de las toxinas _____	41
Flujo de toxina a través del epitelio _____	43
• Coeficiente de permeabilidad _____	45
• Resistencia transepitelial _____	55
<b>DISCUSIÓN</b> _____	58
Purificación de las toxinas a partir de moluscos contaminados _____	58
Resistencia transepitelial _____	58
Desarrollo de un modelo para la resistencia transepitelial _____	61
<b>CONCLUSIONES</b> _____	71
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> _____	73
<b>ANEXOS</b> _____	78

## RESUMEN.

El veneno paralizante de los moluscos (VPM), esta formado por más de 26 ficotoxinas de naturaleza no proteica, las cuales presentan un núcleo común que se denomina 3,4,6-trialquil-tetrahidropurina. Dentro de este grupo se encuentran las gonyaulatoxinas que a pesar de no ser las más toxicas del grupo, representan el 75-80% del total de toxinas descritas en las muestras de moluscos de las regiones XI y XII de nuestro país.

El propósito de esta memoria fue purificar las toxinas necesarias para la realización de los experimentos y describir con ellas los mecanismos involucrados en la permeabilidad intestinal de las gonyaulatoxinas y. Para este propósito, las toxinas usadas en este estudio fueron extraídas de choritos (*Mytilus chilensis*) contaminados, provenientes de la XI Región. El grupo mayoritario de contaminantes está constituido por Gonyaulatoxinas. La permeabilidad de las gonyaulatoxinas a través del epitelio intestinal y su efecto sobre la resistencia transepitelial fueron investigados en segmentos extraídos de yeyuno humano. Los segmentos aislados de la mucosa fueron montados en una cámara Ussing y los experimentos fueron realizados bajo condiciones controladas de voltaje. Los cationes orgánicos de gonyaulatoxinas fueron aplicados en el lado apical y las muestras fueron extraídas del lado basolateral.

Los resultados demuestran que los epímeros de GTX 2/3 atraviesan el intestino por una vía paracelular y dentro de los límites de resolución de la técnica

usada, no se encontró evidencia de ningún otro mecanismo de transporte involucrado en el proceso. Se desarrollo un modelo, según el cual las uniones estrechas experimentan un cambio dependiente del tiempo y concentración de la toxina, mientras que la resistencia transepitelial demuestra una disminución modesta.

## SUMMARY.

The paralyzing shellfish poisoning (PSP), comprises more than 26 phycotoxins of non protein nature, which a chemical structure corresponding to a 3,4,6-trialquil-tetrahidropurina. Within this group are the gonyautoxins that although not being most toxic of them, represent the 75-80% of toxins described in mollusks sampled at XI<sup>th</sup> and XII<sup>th</sup> regions of Chile.

The aim of this thesis was to purify enough toxins to carry out the experiments and to typify the mechanisms of their permeation across the intestine. Toxins used in this study were extracted from contaminated Chilean mussels (*Mytilus chilensis*), harvested in the XI<sup>th</sup> Region. Permeability of the gonyaulatoxinas across intestinal epithelium and their effect on the transepithelial resistance were investigated in segments of humane jejunum. Isolated segments of the mucosa were mounted in a Ussing chamber and experiments were performed under voltage controlled conditions. Organic gonyautoxin cations were applied at the apical side and samples were collected at the basolateral side.

Results show that GTX 2/3 epimers permeate the intestine through a paracellular pathway and, to the resolution of the used technique, no evidence was found of any other transport mechanism involved in the process. A model was developed, according to which tight junctions undergo a toxin concentration and time dependent change, while transepithelial resistance shows only a modest decrease.

## INTRODUCCIÓN.

Las microalgas tóxicas o Floraciones Algales Nocivas (FANs), popularmente conocidas como “marea roja”, son las responsables principales de la producción de venenos que afectan significativamente la salud humana y la explotación de recursos marinos a nivel mundial (Hellegraeff, 1993; White, 1998).

El concepto de FANs incluye (Hellegraeff, 1993):

- Decoloraciones en el agua, por lo general inocuas, pero que pueden matar a peces e invertebrados en lugares con poca circulación de agua, debido a la altísima concentraciones de estas microalgas.
- Brotes tóxicos causados por microalgas que producen potentes toxinas que son consumidas por el humano.
- Microalgas que producen compuestos que no son tóxicos para el ser humano, pero que pueden matar a peces e invertebrados.

El aumento de estas microalgas coincide con el mayor número de descripciones de intoxicaciones en humanos y en la mortalidad de peces, aves y mamíferos marinos. (Lagos, 1998; Lagos, 2003). Como consecuencia de esto, se ha incrementado la investigación sobre toxinas producidas por microalgas en relación al desarrollo de procedimientos y tecnologías tendientes a aminorar los crecientes daños en los ámbitos de la Ecología, Salud Pública y Economía.

La proliferación descontrolada y explosiva de estas microalgas es facilitada por su ciclo de vida -que posee un estadio planctónico y un quiste de dormancia que facilita su florecimiento y dispersión - la sobreexplotación económica del litoral marino, el cambio en las condiciones climáticas mundiales (consecuencia del calentamiento global), cambios ecológicos (los pesticidas disminuyen al fitoplancton, los cuales regulan la población de microalgas) y la diseminación de quistes por las aguas lastre de los barcos.

Actualmente se describen 6 venenos asociados a microalgas y cianobacterias de agua dulce, que producen sintomatología clínica diferenciables (Yasumoto y Murata, 1993; Azevedo, 1996; Falconer, 1996; Lagos, 1998; Lagos, 2003). Los que corresponden a: El Veneno Paralizante de los Moluscos (VPM), el Veneno Diarreico de los Moluscos (VDM), el Veneno Amnésico de los Moluscos (VAM), el Veneno Neurotóxico de los Moluscos (VNM), el Veneno Ciguatera (VC) y los Venenos de las Cianobacterias.

Las vías de síntesis de estos venenos, no son parte de las rutas metabólicas básicas para la vida de estas microalgas, por esta razón, se los denomina genéricamente como metabolitos secundarios.

Por otra parte, en el último tiempo se han realizado estudios relativos al uso clínico de toxinas marinas, con resultados muy prometedores en el tratamiento de algunas patologías humanas asociadas a espasmos musculares. Estos resultados

sugieren que también es posible su utilización en el desarrollo de nuevos anestésicos para el uso en humanos y animales.

El propósito de este trabajo, fue estudiar los mecanismos involucrados en la absorción intestinal de toxinas del Veneno Paralizante de los Moluscos (VPM), con el objetivo futuro de evaluar la factibilidad de desarrollar algún antídoto de primera línea contra estas toxinas.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Los 6 venenos asociados a microalgas y cianobacterias de agua dulce que actualmente se describen corresponden a:

El Veneno Paralizante de los Moluscos (VPM): la toxina (compuesta por diferentes toxinas, con diferentes grados o poderes de toxicidad) se une a receptores neuronales (canales de sodio), bloqueando los potenciales propagados. Esto produce en el ser humano una parálisis progresiva en todo el cuerpo, que culmina con un paro cardiorrespiratorio, provocando la muerte del individuo si este no recibe asistencia médica rápida y oportuna.

Esta toxina es la más nociva entre las conocidas y el grado de toxicidad en los moluscos varía entre uno y otro. Se pueden encontrar mariscos contaminados con concentraciones mortales para el ser humano y otros con bajas concentraciones de toxina.

El Veneno Diarreico de los Moluscos (VDM): está también conformado por varios tipos de toxinas, de las cuales el ácido Okadaico (ácido graso), es el más potente. Esta toxina provoca una inhibición de proteínas fosfatasa de las células del epitelio intestinal, que se traduce en pérdida de agua con el consiguiente cuadro diarreico.

El Veneno Amnésico de los Moluscos (VAM): esta conformado por el Ácido Domoico (aminoácido). Es un compuesto de los llamados neuroexcitantes o excitotoxinas que interfieren con los mecanismos de neurotransmisión, dañando las células neuronales y provocando muerte celular. En el hombre, este daño está asociado con la pérdida de la memoria de corto plazo y -en algunos casos- con la muerte del individuo. En nuestro país, no hay registros de una Marea Roja que produzca este tipo de veneno.

El Veneno Neurotóxico de los Moluscos (VNM): estas toxinas pueden ser transportadas por los aerosoles que se producen por acción del oleaje, provocando síntomas de asma. No se han reportado casos fatales y la recuperación se consigue en días.

El Veneno Ciguatera (VC): produce daños gastrointestinales, neurológicos y cardiovasculares. Generalmente, diarrea, vómitos y dolores en el abdomen, seguidos de disfunciones neurológicas acompañadas de cambios de temperatura, dolores musculares, mareos y ansiedad. Dependiendo de la severidad del caso puede producir la muerte. La recuperación puede tardar de días a meses.

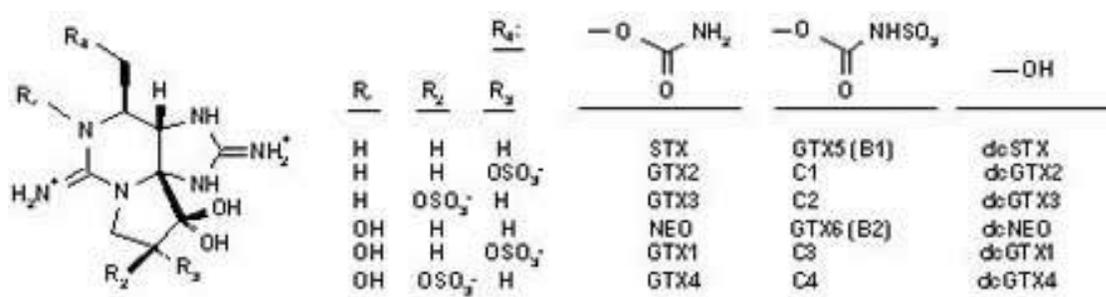
Los Venenos de las Cianobacterias: producen diferentes tipos de venenos, entre ellos se encuentra el Veneno Paralizante de los Moluscos.

Por décadas, el Veneno Paralizante de los Moluscos (VPM) ha sido reconocido como una entidad clínica. El primer registro de una intoxicación masiva en humanos por consumo de mariscos se remonta a 1908, en Ushuaia (Canal de Beagle) (Lagos, 1998). En la actualidad el VPM es el que presenta la más amplia distribución en Sudamérica, tanto en el Océano Pacífico como en el Atlántico (Lagos 1998; Lagos 2002; Lagos 2003)

El VPM está constituido por ficotoxinas de naturaleza no proteica y con una toxicidad sumamente alta. Este veneno se compone de más de 26 toxinas, que exhiben una estructura común denominada 3,4,6-trialquil-tetrahidropurina. Químicamente se dividen en tres grandes grupos de moléculas según la carga neta que presentan a pH neutro (Oshima, 1995; Onodera *et al.*, 1997):

- El grupo de las Saxitoxinas con carga neta +2.
- El grupo de las Gonyaulotoxinas con carga neta +1.
- El grupo de las Sulfocarbamil saxitoxina con carga neta 0.

En la figura 1 se muestra un resumen de las estructuras de las Gonyaulotoxinas.



**Figura 1.** Resumen de estructuras de Gonyaulotoxinas

Estas toxinas están presentes en dinoflagelados y cianobacterias, los que tienen una distribución mundial (Lagos, 1998; Lagos, 2003).

Los dinoflagelados involucrados en la producción de estas toxinas pertenecen a los géneros de:

- *Alexandrium sp.*
- *Piridynium sp.*
- *Gymnodinium sp.*

Se determinó -por la secuenciación de su huella molecular- que *Alexandrium catenella*, presente en la XI y XII regiones de Chile, es un organismo autóctono.

En agua dulce hay hasta ahora 4 especies de cianobacterias responsables (Lagos, 2003):

- *Aphanizamenon flos-aque*
- *Anabaena circinalis*
- *Lyngbya wollei*
- *Cylindrospermopsis raciborskii*

Estas cianobacterias tóxicas son un peligro adicional para la salud humana, por lo que las autoridades deben implementar medidas para controlar fuentes de agua potable para prevenir su contaminación.

Las microalgas sirven de alimento a mariscos filtradores tales como Cholgas (*Aulacomya ater*), Culenge (*Garisalida*) y Chorito (*Mytilus chilensis*), los que acumulan las toxinas transformándose en vectores de las intoxicaciones de mamíferos (Lagos *et al.*, 1996; Lagos, 1998; Lagos, 2003). Estos mariscos filtradores acumulan la toxina en una concentración que está en relación directa con la cantidad de dinoflagelados presentes. Las toxinas se acumulan principalmente en el tracto digestivo, gónadas, sifones branquiales y especialmente en el hepatopáncreas. Esta acumulación de toxinas, no produce ningún cambio en la calidad de las características organolépticas del producto consumido por el humano y -si se agrega que el calor no destruye ni altera estas toxinas- los riesgos de intoxicación por ingesta de moluscos contaminados se incrementan significativamente, sólo una alerta temprana por detección de estas microalgas tóxicas en los lugares de recolección de estos productos marinos, podrá prevenir intoxicaciones masivas en humanos.

Estas toxinas también son acumuladas por gastrópodos carnívoros tales como loco (*Concholepas concholepas*), caracol del sur (*Argabuccinum raneliformes*) y crustáceos como jaibas y langostas (Compagnon *et al.*, 1998; Andrinolo *et al.*, 1999).

Los mariscos contaminados, al ser consumidos por humanos, producen un cuadro de toxicidad aguda de intensidad proporcional a la cantidad de toxina ingerida. Los síntomas más comunes son:

- Parestesias peri bucales, faciales y de manos.
- Debilidad del músculo cervical.
- Disfagia y disfonía.
- Dificultad para deambular.
- Náuseas, vómitos y bronco aspiraciones.
- Parálisis respiratoria.

Además, si se compromete el sistema nervioso autónomo se produce:

- Retención urinaria.
- Psialorrea.
- Midriasis fina no fotoreactiva.
- Paro cardíaco en asistolia.

De los pacientes intoxicados, el 90% de las muertes se producen en las primeras horas posteriores al consumo, por lo tanto, si sus constantes fisiológicas pudieran permanecer estabilizadas durante las primeras 48-72 horas posteriores al consumo, lograrán recuperarse sin ningún tipo de secuela. No existe un tratamiento específico para revertir la acción del VPM. Los pacientes son tratados con medidas que permiten superar los síntomas. Se les conecta a un respirador artificial para prevenir la muerte por un paro respiratorio, se les realiza un limpieza gástrica para impedir que más toxina pueda pasar al intestino donde será absorbida, se le aplica suero y drogas vasoactivas con el fin de aumentar el volumen circulatorio y contrarrestar la hipotensión. Una vez que el paciente se

encuentra estabilizado, se le administran diuréticos con el fin de aumentar la excreción de toxina (Montebruno, 1993).

En Julio del 2002, se produjo una intoxicación de 3 buzos mariscadores en el Canal San Blas, cerca de Puerto Natales. Dos de ellos murieron sólo 3 - 4 horas de haber consumido mariscos contaminados y solo uno logró sobrevivir (Lagos, 2003).

De las toxinas que componen el VPM, la Saxitoxina (STX) -con DL50 de 10 µg/kg- es la más conocida. Comparada con la estricnina, es 100 veces más potente.

Sin embargo, la presencia de la Saxitoxina es mínima en las muestras de moluscos y dinoflagelados. La toxicidad detectada se debe principalmente a las Gonyaulotoxinas, y -dentro de estas- al epímero GTX 2/3 que, a pesar de ser menos tóxico que STX, representa el 75-80% del total de toxinas descritas presentes en las muestras de moluscos de las regiones XI y XII de nuestro país, por esta razón, al consumir mariscos contaminados, la intoxicación se deberá principalmente a esta toxina (Lagos *et al.*, 1996; Andrinolo *et al.*, 1999).

Las Gonyaulotoxinas bloquean selectiva y reversiblemente la entrada del canal de sodio sensible a voltaje de las membranas de las neuronas, inhibiendo así la corriente de iones de sodio asociada a los potenciales de acción y -en

consecuencia- produce un bloqueo en la transmisión del impulso nervioso (Kao *et al.*, 1967, Strichartz, 1984, Lagos y Andrinolo, 2000).

En general, cada toxina tiene diferente afinidad por los canales de sodio, lo que se traduce en distintos grados de toxicidad para diferentes toxinas (Strichartz, 1984; Oshima, 1995).

Para determinar qué segmento del tubo digestivo es el lugar de absorción de la toxina, se realizó un estudio en gatos, a los cuales se les cerró el píloro y se les administro una dosis oral de toxina, al analizar muestras de plasma y orina no se encontraron rastros de toxinas. Se comprobó, por tanto, que no existe absorción estomacal de toxinas y que está sólo ocurre en el tracto intestinal (Andrinolo *et al.*, 2001).

Estudios experimentales realizados “in vitro”, han demostrado que la absorción de las toxinas del complejo GTX ocurre a nivel intestinal principalmente en yeyuno e íleon. Resultados similares se obtuvieron con líneas celulares (Andrinolo *et al.*, 2002), las cuáles presentan una mayor resistencia a la absorción debido a la reducción de espacio que existe entre las células afectando el paso de drogas y toxinas. Los experimentos fueron realizados a dos diferentes temperaturas, 37°C y 4°C, se concluyó que el transporte ocurría por las vías transcelular y paracelular, sin embargo, el análisis de las muestras se realizó mediante espectrofluorimetría, técnica que determina fluorescencia global de la muestra, sin discernir sus componentes. El protocolo experimental modificado

utilizado, determinó que un pigmento presente en las muestras es una intensa fuente de fluorescencia que contamina la producida por las toxinas, lo que conduce a concluir que los estudios por espectrofluorimetría, si bien son buenos indicadores, no presentan una resolución que permita establecer conclusiones certeras.

Lagos y Andrinolo en el año 2002 realizaron estudios dirigidos a reproducir los efectos de una intoxicación con VPM en animales de laboratorio, administrándoles dosis de STX intravenosa, se observaron los diferentes efectos a nivel cardiovascular y respiratorio.

Cardiovascular: la STX es un potente agente hipotensor y en dosis de 2-3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  produce una disminución de hasta 50% del valor normal en la presión arterial por bloqueo de nervios vasomotores, induciendo una vasodilatación periférica (Gessner *et al.*, 1997). A estas dosis, sin embargo, no se aprecian efectos significativos a nivel cardiaco.

El shock se produce a dosis altas de STX ( $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ) como consecuencia del efecto hipotensor y disminución del gasto cardiaco lo que produce un menor retorno venoso e hipoxemia generalizada.

A nivel cardiaco, dosis de 3- $10\mu\text{g}/\text{kg}$  administradas por vía intravenosa producen arritmias y bradicardias (a dosis de  $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Respiratorio: en los estudios realizados en gatos, a los que se les administro STX por vía endovenosa, se observó parálisis respiratoria a dosis de 3,3 $\mu$ g/kg.

Al administrar directamente la toxina en el fluido cerebroespinal se observó la secuencia: respiración lenta, apnea, pérdida de respiración espontánea y finalmente pérdida de la actividad eléctrica en el centro respiratorio.

Eliminación de la Toxina: la presencia de la toxina en la orina fue detectada hace más de 50 años en bioensayos realizados en ratones. Estudios realizados en gatos (Andrinolo *et al.*, 2002), determinaron que la toxina sólo se elimina por orina. Durante las 4 hrs. que duro el experimento, a mayores dosis inyectadas, menor era la cantidad de toxina eliminada, debido principalmente al shock hipovolémico producido por la inyección de toxina por vía endovenosa. Debido a que la toxina se elimina por orina, es necesario estimular la diuresis en las personas intoxicadas, sobre todo en las primeras horas posteriores al consumo de marisco contaminado.

Anatomía y función intestinal.

El intestino delgado mide más de 6 m de largo y se divide en tres segmentos anatómicos: Duodeno (25 cm), Yeyuno (2,5 m) e Íleon (3,5m).

A nivel histológico el intestino delgado presenta las siguientes zonas: serosa, muscular, sub-mucosa y mucosa. El Duodeno posee la característica de presentar gran cantidad de glándulas secretoras a nivel de la sub-mucosa, lo que dificulta el trabajo experimental, por esto los experimentos se realizarán con muestras tomadas de yeyuno humano.

La mucosa intestinal es un tejido especializado para la digestión y absorción, por lo que es imprescindible que posea una amplia superficie que esté en constante contacto con los nutrientes, para esto el intestino presenta: pliegues circulares, vellosidades intestinales (0,5 mm de altura y un núcleo de lámina propia), microvellosidades en las células epiteliales.

Por otra parte, el epitelio de la mucosa intestinal esta formado por diferentes células: las absorbentes o enterocitos, en las cuales la membrana plasmática presenta en su porción luminal múltiples microvellosidades que le dan el aspecto característico de “borde en cepillo”. Las caliciformes, que son las encargadas de secretar mucina. Las indiferenciadas que son las responsables de la constante renovación del epitelio. Células de Paneth que están presentes en las Criptas de Lieberkühn que se encuentran entre las vellosidades, secretan lisozimas que tienen una función antibacteriana.

Además, las microvellosidades presentan un quilífero central, que se puede apreciar en todo corte transversal cuando los nutrientes son absorbidos, las grasas van al quilífero central y todo lo demás a la sangre.

El tubo digestivo tiene como característica la presencia de MALT o tejido linfóide asociado a las mucosas. Este tejido se encuentra en la lámina propia de la mucosa, por lo general es un tejido difuso o nodular, en el íleon este tejido es muy notorio por su disposición en placas, denominadas placas de Peyer.

Los principales mecanismos por los cuales se realiza la absorción intestinal (Figura 2) corresponde a:

Transporte no mediado o difusión simple: el cual se caracteriza porque no existe la presencia de un mediador, así el paso de sustancias ocurre como respuesta a un gradiente de concentración o electroquímica del sustrato, por lo tanto como este proceso ocurre a favor de un gradiente no utiliza energía (Sernka y Jacobson, 1982; Lenhinger, 1987; Darnell *et al.*, 1988). El tamaño y la carga de los canales por donde ocurre la difusión determinan la velocidad con que ocurre este proceso. Así un canal que presente carga neta negativa será más permeable a los cationes por la atracción de cargas (Sernka y Jacobson, 1982), por esta razón y debido a que el grupo de toxina GTX presenta a pH fisiológico carga neta +1, estas toxinas se ubican dentro de la categoría de cationes orgánicos y por lo tanto, esta podría ser una de las vías de ingreso de las toxinas.

Otra ruta de ingreso de nutrientes por difusión simple son los espacios entre las células del tracto gastrointestinal, dado que el tejido intestinal está constituido por una monocapa de células columnares conectadas entre sí por *gap junctions*, desmosomas y *tight junctions*. Las *gap junctions* proveen comunicación

intercelular, los desmosomas son estructuras fibrilares que proveen anclaje intercelular e integridad estructural al epitelio y las *tight junctions* son uniones estrechas entre las células y constituyen una formidable barrera a la difusión de sustancias exógenas.

Los factores que determinarán el transporte por difusión simple son:

- 1) Tamaño y liposolubilidad de las partículas.
- 2) Gradientes electroquímicos transepiteliales.
- 3) Carga neta de la partícula.
- 4) Permeabilidad paracelular y trans-celular. Así, como las toxinas poseen un tamaño de 300 o 400 Daltons, carga neta +1 a pH 7.4 (se consideran cationes). Debido a estas características es posible que la toxina penetre por esta vía a la célula.

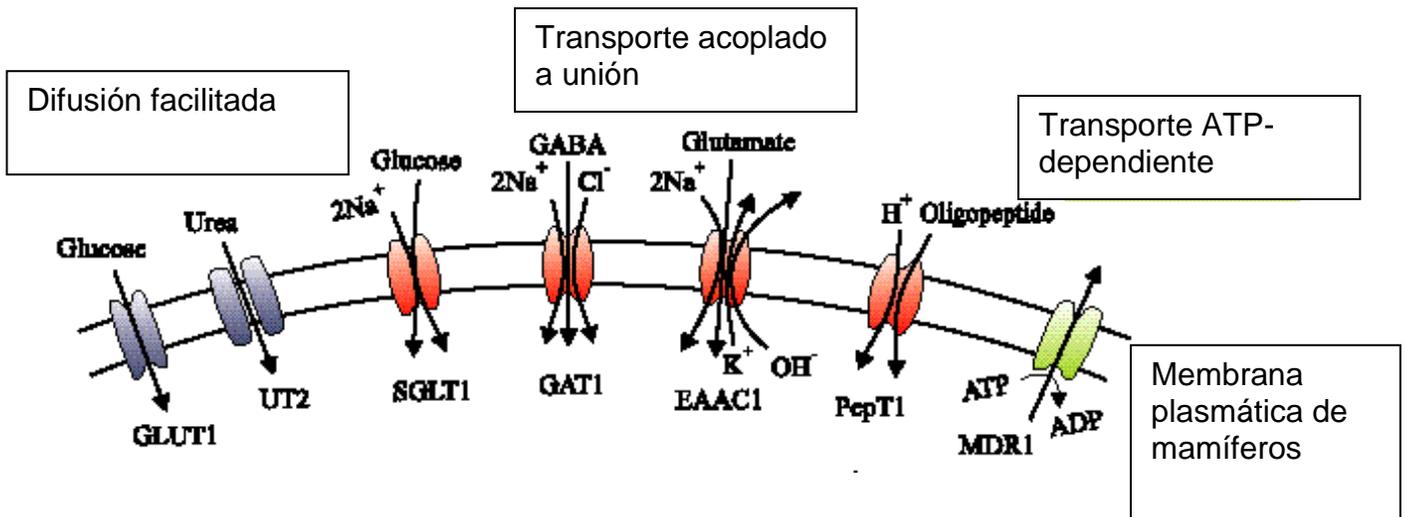


Figura 2. Modelos de transporte a través de la membrana plasmática de vertebrados superiores (Hediger,1994)

Transporte mediado: Este tipo de transporte puede ser activo o pasivo y dependerá si hay o no un gasto de energía en el proceso. Este tipo de transporte presenta características similares a las que existen entre sustrato y enzima (Lenhinger, 1987, Darnell *et al.*, 1988 Charlotte, 1991):

Saturación a altas concentraciones de sustrato o cinética de saturación.

- a) Competencia entre sustratos estructuralmente similares y/o que presentan un ruta similar de absorción.
- b) Se afecta por inhibidores metabólicos.
- c) Especificidad a esteroisómeros del sustrato.
- d) Disminuye a medida que la temperatura decae.

Las membranas biológicas poseen proteínas transportadoras encargadas de translocar moléculas hidrofílicas (es decir, lipofóbicas) –en general con gran especificidad- a través de la membrana celular.

Este tipo de transporte puede ser inhibido por sustancias estructuralmente parecidas al sustrato y que compiten con él por el sitio específico de unión o una inhibición no competitiva, en que hay moléculas capaces de bloquear o alterar ciertos grupos funcionales de las proteínas transportadoras (Lenhinger, 1987).

Este tipo de transporte se divide en:

- 1) Transporte activo: la energía deriva directamente de la ruptura de un enlace del trifosfato de adenosina (ATP) o de algún otro fosfato de alta energía.

2) Transporte pasivo: en el cual la energía requerida para el proceso, deriva secundariamente de la almacenada en forma de diferencias de concentración entre los dos lados de una membrana.

Las GTXs podrían ser reconocidas como sustrato por transportadores de cationes orgánicos de la familia OCT1, que participan en la excreción de iones en riñón e hígado, pero que también están descritos en la membrana apical (Martel *et al.*, 2000) y basolateral de enterocitos en intestino delgado (Negel *et al.*, 1997). Además, las GTXs poseen una gran semejanza química y estructural con ribonucleósidos y bases púricas (Wang y Giacomini, 1997), por lo que las proteínas transportadoras podrían reconocer estas toxinas como sustrato, constituyendo otra posible vía para el ingreso de estas toxinas.

Los objetivos de esta memoria de título, de acuerdo con los antecedentes antes descritos, se refieren al estudio del transporte de las gonayaulatoxinas en muestras de tejido provenientes de yeyuno humano.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Describir el mecanismo de permeación transepitelial de gonyaulatoxinas, en epitelio de yeyuno humano.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Purificar las toxinas del complejo Gonyaulatoxinas que se usarán para la realización de los experimentos con epitelios humanos.
- Describir las vías por las cuales las toxinas cruzan el epitelio (transcelular, paracelular o ambas) de yeyuno humano.
- Determinar las constantes cinéticas correspondientes de los procesos involucrados en el transporte transepitelial de los epímeros GTX-2/3, en epitelios de yeyuno humano.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

Los experimentos y el análisis de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica de Membranas de la Universidad de Chile.

### **Toxinas.**

Las toxinas usadas en este estudio fueron extraídas de choritos (*Mytilus chilensis*) contaminados, provenientes de la XI Región. El grupo mayoritario de contaminantes está constituido por Gonyaulatoxinas (Lagos *et al.*, 1996; Compagnon *et al.*, 1998).

### Extracción.

Para la extracción de la toxina a partir de 6 kg de hepatopáncreas provenientes de aproximadamente 100 kg de mariscos contaminados, se realiza el siguiente procedimiento:

A. Solubilización: Se pesaron 100 gr de hepatopáncreas de chorito (*Mytilus chilensis*), previamente lavados con agua fría, escurridos y secados con papel absorbente, se agregaron 100 ml de HCl 0,1N y se homogenizaron en una licuadora. Posteriormente, la mezcla fue llevada a un volumen final de 200 mL con HCl 1N, ajustando el pH a 3,5 con HCl 5N.

Se incubaron en baño María por 20 min. a 80°C, se dejó enfriar y se constato que el pH tubiera un valor 3,0. Finalmente se filtró en papel Whatman #1 por decantación en un embudo.

B. Tratamiento con carbón activado: el cual se utilizó en esta parte del proceso debido a su enorme área superficial, por la gran cantidad de poros que posee, lo que permite una gran adsorción de toxinas.

Se realizó una mezcla de 230 gr. de carbón activado y 100 ml de extracto obtenido en la etapa anterior, se dejó sedimentar por 12 hrs. a temperatura ambiente agitando 5 a 6 veces durante ese período. Posteriormente, se centrifugó a 8000 x g durante 20 min., se eliminó el sobrenadante y el carbón se lavó con agua destilada 2 veces, en cada lavado se tomó una muestra para analizarla mediante HPLC analítico para comprobar la ausencia de toxinas.

La toxina se extrajo del carbón, resuspendiéndolo en una solución de agua destilada-deionizada, etanol y ácido acético glacial (6:6:0,3 v/v), se dejó reposar por otras 12 hrs. y se centrifugo a 8000 x g por 20 min. Este procedimiento se realizó 2 veces. Los respectivos sobrenadantes se juntaron, se filtraron y se concentraron en un concentrador “Speed Vac plus” (modelo SC210-A SAVANT) a temperatura ambiente y presión de 0,5 torr, hasta unos 100 ml aproximadamente.

C. Separación de las toxinas: para la separación final de las toxinas se utilizó HPLC preparativo, que utiliza una columna de Bio Gel P-2 fino (Bio-Rad), una resina de exclusión por tamaño y de intercambio iónico. La columna de 50 cm. de largo con un diámetro interior de unos 2,5 cm, corresponde a un tubo de vidrio especial que soporta niveles de presión intermedio.

Para forzar el paso de la fase móvil por la columna se utilizó una bomba peristáltica con flujo continuo de 1 ml/min.

El contenido de la columna, fue recolectado en tubos de 5 ml por un colector de fracciones automático. Al analizar las alícuotas por HPLC se observaron 3 fracciones de purificación: Fracción I (STX), Fracción II (GTX, NEOSTX, STX) y Fracción III (GTX).

En esta memoria de título, sólo se trabajó con la fracción III, que corresponde exclusivamente al complejo de las Gonyaulatoxinas.

Cuantificación analítica por HPLC.

La detección y cuantificación de las toxinas que componen el VPM, se realizó utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con derivatización postcolumna y detección fluorescente en línea. Este método analítico tiene la resolución necesaria para cuantificar y separar las toxinas, en

mezclas provenientes de muestras de moluscos y/o dinoflagelados. Esta técnica se desarrolló en condiciones isocráticas, es decir, con una sola fase móvil.

Las muestras examinadas interactúan con dos fases: una fase móvil y una fase estacionaria. La fase móvil llamada solvente, transporta los componentes de la muestra a través de la fase estacionaria. La fase estacionaria está diseñada para retener algunos compuestos por afinidad, por lo que algunos de los componentes de la muestra son retenidos por más tiempo, retardando su paso a través de la columna. Las moléculas que tienen una menor o ninguna afinidad por la fase estacionaria, en cambio, permanecen en la fase móvil y fluyen primero a través del sistema. El resultado neto de este retardo diferencial es una salida seriada de las toxinas presentes en una mezcla.

En este trabajo, las Gonyaulatoxinas fueron separadas por pares iónicos en una columna C-8 (fase estacionaria), en presencia de una fase móvil con un anión orgánico, ácido 2-hepta sulfonato, porque un catión (como las toxinas del complejo GTX) puede ser eluido con solventes no polares como un par iónico neutro en presencia de un anión orgánico. La fase móvil pasa a través de una columna de Sílica C-8 fase reversa (15 cm x 4,6 mm ID SPLICOSIL™ LC-8 5μ), siguiendo un régimen isocrático con una velocidad de flujo de 0,7 ml/min.

El equipo de HPLC está compuesto por una bomba de pistón de alta presión (Shimadzu LC-10 A) que proporciona un flujo constante de solvente; un

inyector Rheodyne 7725i (bucle de 20 $\mu$ l) donde se introduce la muestra y la columna de sílica C-8 fase reversa. Una bomba de 2 cabezales para agregar el oxidante -con un flujo de 0,4 ml/min- y el ácido acético, a una concentración de 500 mM y un flujo de 0,3 ml/min, necesarios para la derivatización postcolumna.

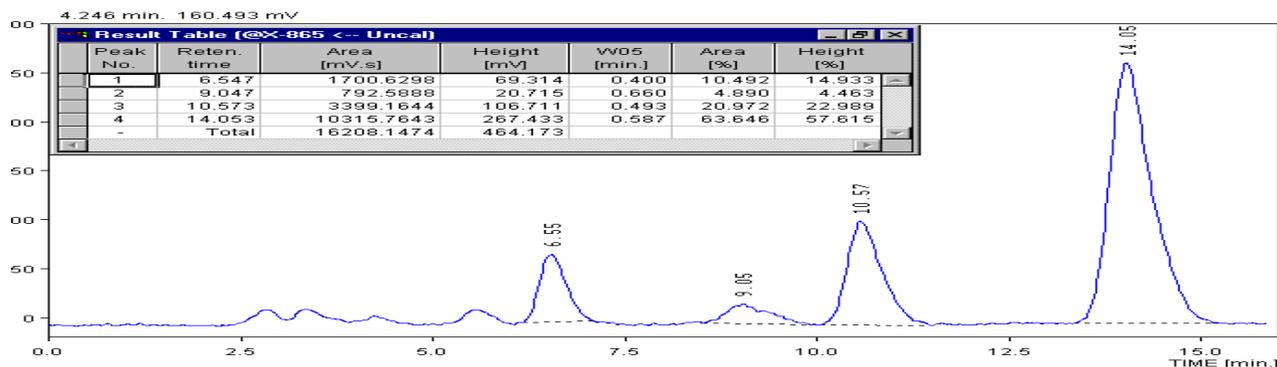
Una cámara de reacción postcolumna con un serpentín de 10 m (0,5 mm di) en baño de temperatura controlada (65°C) y un detector fluorescente (Shimadzu RF-551) programado con una longitud de onda de excitación de 330 nm y una emisión de 390 nm, que realiza una lectura continua de la fluorescencia emitida por el fluido que emerge de la columna.

Posterior a la separación de las toxinas en la columna y debido a que no absorben en el espectro visible y tampoco en el ultravioleta, se hace necesaria la derivatización de las toxinas para su transformación en compuestos fluorescentes y poder detectarlas.

La derivatización post-columna corresponde a una oxidación dirigida de las toxinas, esto ocurre dentro del serpentín inmerso en el baño a 65 °C.

Los parámetros característicos de la técnica del HPLC, son los tiempos de retención -característicos para cada toxina bajo condiciones cromatográficas conocidas para la fase móvil y con la misma columna (fase estacionaria)- y el área bajo la curva de fluorescencia, que es directamente proporcional a la masa de

cada toxina o compuesto. La información se registra directamente en un computador, usando una interfaz y un programa para sistema operativo Windows, que permite el registro de los cromatogramas, integración de las áreas bajo segmentos seleccionables por el usuario del registro de fluorescencia (figura 3) (generalmente los picos aislados correspondientes a las diferentes toxinas), representación gráfica y tratamiento de datos (Class-CR10, Shimadzu).



**Figura 3.** Cromatograma correspondiente a un standard de GTX. La tabla Excel exhibe las áreas para las toxinas GTX 4, GTX 1/5, GTX 3 y GTX 2 respectivamente

La concentración de las toxinas en las muestras, fue determinada mediante la comparación de las áreas bajo los picos detectados, comparados con las de los estándares analíticos de cada toxina, las cuales no se encuentran disponibles comercialmente y han sido preparados en el Laboratorio de Bioquímica de Membrana de la Universidad de Chile usando certificación de Espectroscopia de Masa y co-migración por HPLC con detección fluorescente en línea. El algoritmo de cálculo se especifica más adelante.

## **Estudios de transporte en cámara Ussing.**

### Tejidos.

El protocolo utilizado en este trabajo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de Universidad de Chile.

Se utilizaron muestras de tejido intestinal humano (yeyuno) de pacientes con obesidad mórbida y algunas de neoplasias gastrointestinales que fueron sometidos a gastrectomía total. Se tuvo especial cuidado en mantener las muestras el mínimo tiempo posible en isquemia. La resección se realizó inmediatamente después de ligar y la muestra fue mantenida en solución Ringer manitol y con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub>, para transportarla inmediatamente al laboratorio donde se procedió a la disección en placa Petri con la misma solución de transporte y posterior montaje en la cámara Ussing.

### Soluciones.

Para el desarrollo de los ensayos se utilizaron las siguientes soluciones:

1. Ringer Glucosa: NaCl 137 mM; KCl 4,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y Glucosa 10mM

2. Ringer Manitol: NaCl 137 mM; KCl 4,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y Manitol 10 mM.

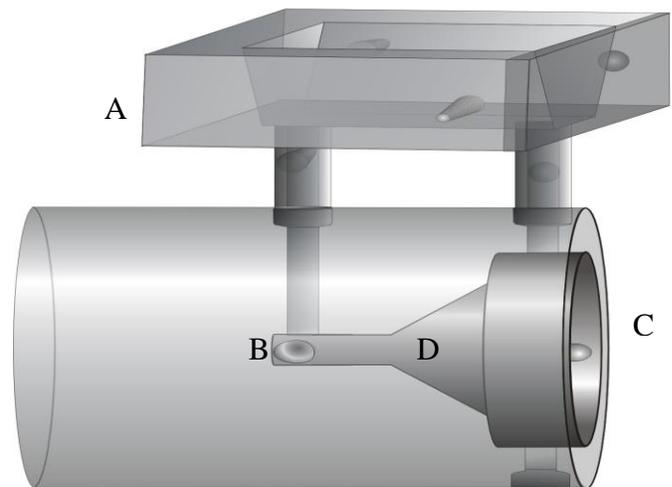
Los epitelios se montaron en una cámara Ussing (figura 4) especialmente diseñada, de pequeño volumen (6,8 ml/lado), con camisas de agua circulante con control de temperatura y dispositivos para evitar el transporte aéreo de toxinas, por los aerosoles producidos por la ruptura de burbujas del sistema de aireación/agitación. Así, posterior a la separación de la capa muscular de la serosa y subserosa, el tejido se montó cuidadosamente como una partición entre las dos hemicámaras de la cámara de Ussing. Las cuales, en todos los experimentos, contenían soluciones Ringer Manitol -en el lado basal- y Ringer Glucosa y toxinas en el lado apical.

#### Cámara de Ussing.

El diseño de la cámara Ussing utilizada en los experimentos está al servicio de un protocolo experimental que maximiza la concentración de toxinas en la cámara basolateral.

Esta cámara, fabricada en Plexiglas, cuenta –como es

habitual- con cuatro entradas para electrodos, dos para medir la diferencia de potencial transepitelial (DPT) y dos para proveer corriente, un par por hemicámara.



**Figura 4.** Esquema de una Cámara Ussing: A.- Camisa circulante de agua. B.- Sitio de inserción de los electrodos. C.- Lugar donde se montará la muestra en estudio. D.- Hemicámara.

Los electrodos de voltaje se ubican muy cerca de la preparación uno a cada lado de ella, para minimizar la caída de potencial debida a la resistencia finita de la solución y los de corriente en los extremos distales de cada hemicámara, para maximizar la homogeneidad de la densidad de corriente a través del epitelio. En la parte inferior se encuentran dos salidas para vaciar o recuperar las soluciones que contienen las hemicámaras. En la parte superior, las entradas y salidas de la camisa de agua de cada hemicámara, son conectadas a un baño termorregulado, que mantiene a temperatura constante las soluciones. La cámara también posee un par de entradas destinadas al suministro de una mezcla de aire 95% Oxígeno y 5% CO<sub>2</sub>, por medio de un burbujeo constante, para equilibrar el ión bicarbonato y establecer un pH fisiológico durante el período de tiempo que dure el experimento, mantener oxigenado el epitelio, promover la circulación y agitación para lograr la homogeneidad de las soluciones dentro de las hemicámaras.

#### Electrodos.

Los electrodos reversibles, usados en la cámara para proveer corriente y medir la DPT, están constituidos por un “pellet” de Ag/AgCl en un cartucho de plástico conteniendo un puente salino constituido por un gel de agar y electrolitos. Este puente salino tiene una doble función, garantizar una lenta difusión del ión Ag<sup>+</sup> del electrodo dentro de la cámara Ussing cuando la corriente está fluyendo y minimizar el riesgo de contaminación cruzada entre experimentos, es decir algún tipo de contaminación tóxica que puede difundir dentro de los electrodos, que se descarta junto con el gel del cartucho.

El gel para el puente salino es agar al 3% en una solución de 150 mM KCl y 150mM NaCl, estas bajas concentraciones permiten una tasa de difusión para los cuatro electrodos de alrededor de  $4 \times 10^{-5}$  moles/h a temperatura ambiente. Concentraciones más altas de KCl pueden incrementar significativamente la de electrolitos en la cámara e inducir a error en la resistencia y las mediciones de corriente/voltaje.

#### Viabilidad.

La viabilidad inicial de los tejidos se determinó midiendo  $V_{TEP}$ , rechazándose aquellos que exhibieran un  $V_{TEP}$  inicial menor que 4,5 mV. Por otra parte, se realizaron experimentos de control que demostraron que el tejido podía mantener su  $V_{TEP}$  y corriente de cortocircuito ( $I_{CC}$ ) y en algunos casos, aumentarlas por el tiempo que duraban los experimentos. También mostraron su capacidad para recuperarse luego de prolongadas exposiciones a  $1^{\circ}C$ .

#### Montaje del Tejido.

Previo al montaje del tejido, los electrodos se estabilizaron en una solución isotónica, por 60 min. Luego de montar el tejido en la cámara, se agregó solución Ringer Glucosa en el lado apical (6,8 ml) y Ringer Manitol en el lado basal (6.8 ml). Las soluciones fueron mantenidas a una Temperatura constante de  $37^{\circ}$  o  $1^{\circ}C$  según la fase del experimento, gaseadas con 95% de  $O_2$  y 5% de  $CO_2$ ,

manteniendo un pH 7,4. Los tejidos fueron equilibrados en esta solución en la cámara por 20 min antes de comenzar con los experimentos, siempre y cuando cumplieran con los criterios de potencial transepitelial y estabilidad establecidos. Se prestó especial atención a la eliminación de burbujas de aire en los electrodos y puentes salinos, para evitar introducción de altas impedancias en los circuitos externos de medición de potencial y circulación de corriente.

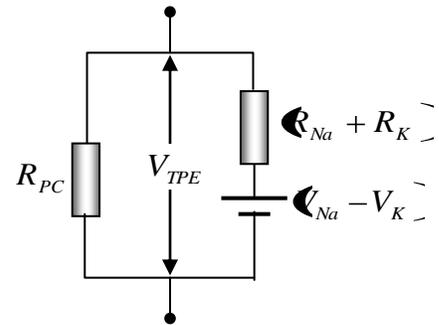
Resistencia Transepitelial.

Como se expuso en la Introducción, el  $V_{TEP}$  se origina en los potenciales de difusión para el Sodio y Potasio -en las membranas apical y basolateral respectivamente- y el divisor de tensión formado por las resistencias de membrana a ambos iones y la resistencia de la vía paracelular. La ecuación

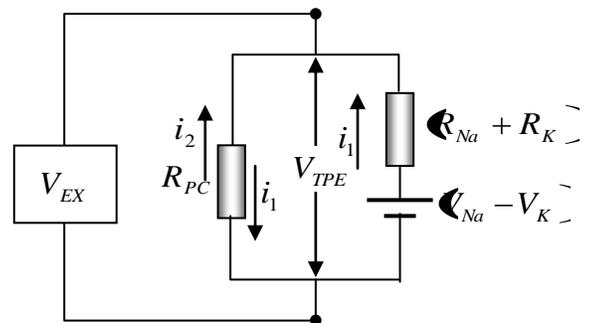
$$V_{PTE} = \frac{R_{PC}}{R_{PC} + R_{Na} + R_K} (V_{Na} - V_K) \text{ corresponde al}$$

circuito representado en la figura 5.

Es evidente que  $V_{TEP}$ , el potencial transepitelial, será cero cuando la corriente a través de la resistencia  $R_{PC}$  sea también cero. Esto se consigue con una fuente de poder externa que proporcione



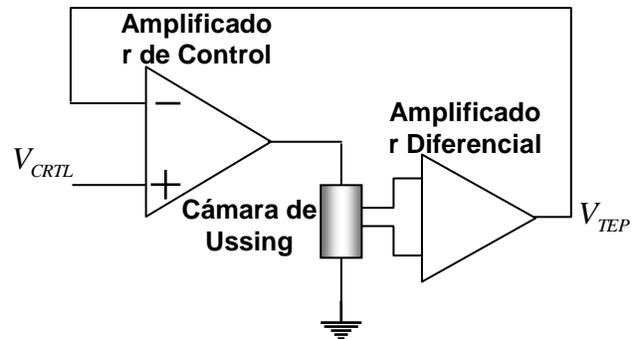
**Figura 5.** Circuito que esquematiza el origen del Voltaje Transepitelial dado por los potenciales de difusión para el Sodio y Potasio y el divisor de tensión formado por las Resistencias de membrana de ambos iones y la resistencia de la vía paracelular.



**Figura 6.** Circuito que esquematiza la fuente de poder externa ( $V_{EX}$ ) que proporciona una corriente igual y contraria a la que produce el potencial transepitelial.

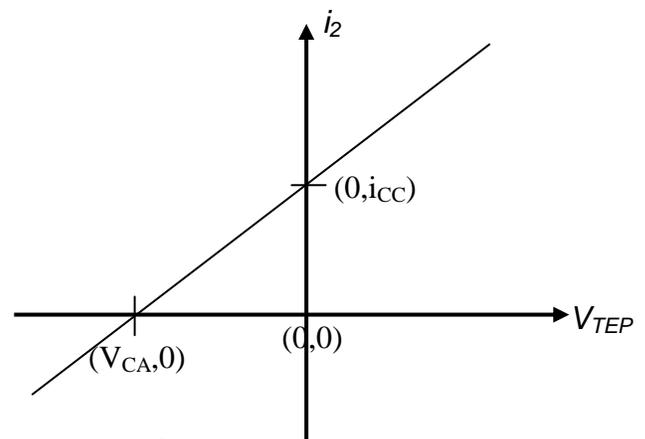
una corriente igual y contraria a la que produce el potencial transepitelial a través de dicha resistencia, como se muestra en la figura 6.

En la práctica, esto se consigue con un Sistema de Control de Potencial (SCP), conocido por su nombre en inglés, "Voltaje Clamp". La figura 7 muestra un esquema de bloques de un SCP. El amplificador de control



**Figura 7.** Esquema de bloques de un Sistema de Control de Potencial.

control entran dos señales de voltaje, el valor de referencia, al que se desea mantener el potencial transepitelial ( $V_{CTRL}$ ) y el valor del  $V_{TEP}$  medido por el amplificador diferencial. Si la diferencia de estos valores es distinta de cero, el amplificador de control produce un voltaje de salida que hará que el sistema se desplace en dirección contraria a la denunciada por la diferencia -en virtud de la retroalimentación negativa- lo que volverá la diferencia a cero, es decir llevará el potencial transepitelial al valor deseado.



**Figura 8.** Gráfico de la corriente aportada por el SCP en función del potencial transepitelial bajo control.

Al graficar el valor de  $i_2$  -la corriente aportada por el SCP- en función del potencial transepitelial bajo control, se obtiene el gráfico de la Figura 8. En él se observa que cuando la corriente aportada por el SCP es nula, el potencial transepitelial es el potencial naturalmente desarrollado en el epitelio, también

llamado potencial de circuito abierto ( $V_{CA}$ ). Por otra parte, la corriente producida por el SCP necesaria para llevar el  $V_{TEP}$  -a cero (“cortocircuito”)- tiene un valor no nulo, es llamada “corriente de cortocircuito” ( $I_{CC}$ ) y es igual a la corriente inducida a través del epitelio por el transporte activo de las Na/K ATPasas de la membrana basolateral, en condición de estado estable.

Cuando se inhiben las Na/K ATPasas, se producen –como lógicas consecuencias- las caídas de la corriente de cortocircuito y del potencial transepitelial, sin que necesariamente cambie la resistencia pasiva (óhmica) del epitelio, lo que origina un desplazamiento de la recta, paralela a sí misma, hacia el origen del sistema de coordenadas, el punto (0,0).

En virtud de lo anterior, la Resistencia Transepitelial (RTE), se determinó con dos puntos ( $i_{CC}, 0$ ) y ( $0, V_{TPE}$ ). Cuando la recta se desplaza hacia el origen, la conductancia  $\sigma = \frac{i_{CC} - 0}{V_{TPE} - 0}$  sufre grandes variaciones a medida que el denominador tiende a cero. Para evitar esas grandes variaciones, en las cercanías de cero se midió la corriente para potenciales de 5 mV y -5 mV respectivamente, lo que produce dos puntos que permitieron determinar  $\sigma$  con precisión y su reproducibilidad. La resistencia fue determinada como  $R = \sigma^{-1}$

El control de potencial fue provisto por un EVC4000 V/I Clamp de World Precision Instruments (International Trade Center, 175 Sarasota Center Boulevard,

Sarasota, FL 34240-9258 USA). La relación señal/ruido del sistema era del orden de 17 dB.

### **Protocolo Experimental.**

En cada experimento, alícuotas -cuyo volumen dependía de la concentración final deseada- de una solución *stock* concentrada de toxinas fueron agregadas por el lado apical del tejido y para luego recolectar 7 muestras de 500  $\mu$ l –sin reemplazo- del lado basal con intervalos de 20 min cada una (0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min). Cada vez que se tomó una muestra desde el lado basal, también se tomó una muestra de igual volumen desde el lado apical, para evitar asimetrías en la presión hidrostática. Además se tomaron dos muestras, una del lado apical a los 20 min y otra a los 200 min para confirmar la concentración de toxina. Los primeros 120 min de cada experimento, se realizaron a 37°C y los 80 minutos restantes, a 1°C. Todos los experimentos de transporte fueron realizados en condición de cortocircuito del epitelio ( $V_{TEP} = 0$  mV), para eliminar el gradiente de potencial eléctrico a través del epitelio y obtener así, resultados dependientes sólo del gradiente de concentración y de la permeabilidad de la toxina.

Al concluir el primer segmento experimental a 37 °C, se adicionaron 2 ml de la solución respectiva en cada sección, para reponer parte de los volúmenes extraídos en ambas cámaras y además una cantidad de la solución *stock* de toxina para mantener la concentración de la toxina en la sección apical y no cambiar la gradiente de concentración.

El segundo segmento de cada experimento se realizó a 1°C y se tomaron 4 muestras (a los 140, 160, 180 y 200 min de iniciado el experimento) del lado basal y 1 del lado apical (a los 200 min) como fue señalado anteriormente. Las muestras fueron congeladas a -20°C para realizar su posterior análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con derivatización post columna y detección por fluorescencia en línea.

### **Análisis de muestras.**

Las muestras de 500 µl fueron descongeladas filtradas a través cartuchos Ultrafree, de exclusión por tamaño con corte en 5.000 D, (Millipore) y concentradas por evaporación a baja presión, en un concentrador (SpeedVac) antes mencionado. El pellet fue resuspendido en ácido acético al 25%, del cual se tomaron alícuotas de 10 µl por medición los que fueron inyectados en el HPLC para su cuantificación.

Determinación de la masa de toxina en la muestra.

Para determinar la cantidad de masa de toxina presente en un volumen conocido de solución en la cámara basolateral, es necesario conocer primero su concentración, lo cual se realizó de acuerdo a lo indicado en el anexo A.

Una vez determinadas las concentraciones en la cámara basolateral para cada tiempo de muestreo, es posible determinar la masa que ha ingresado a ella

desde el comienzo del experimento, la que es –simplemente- la masa presente más la suma de las masas extraídas en todos los muestreos anteriores.

Algoritmo de cálculo.

El algoritmo se expresa como:

$$M_K = [x_K] [V_0 - (K-1) V_m] + V_m \sum_{i=2}^K [x_{i-1}] \quad (X)$$

con:

$$K \in [1, 6; ] \quad K \text{ entero}$$

$$j \in [1, 6; ] \quad j \text{ entero} \quad \text{y donde:}$$

$$i \in [1, 6; ] \quad i \text{ entero}$$

$M_K$ : Masa de toxina que ha cruzado hacia la cámara basolateral desde el inicio del experimento hasta el instante que se toma la muestra K

$[Tx]$ : Concentración de toxina en la cámara basolateral en el instante que se tomó la muestra K

$V_0$ : Volumen inicial en la cámara basolateral

$V_m$ : Volumen de la muestra

Los algoritmos para determinar: las pendientes de las rectas obtenidas de las mediciones con el HPLC; las concentraciones de las muestras y las masas correspondientes de las toxinas en la cámara basolateral, fueron implementadas en hojas de cálculo Excel.

Los resultados fueron graficados y una curva polinomial de segundo orden fue utilizada para ajustar los datos experimentales, los valores cercanos a 1 del coeficiente de bondad del ajuste, R, justifican esta elección.

Finalmente, obsérvese que el flujo a través de una partición con coeficiente de permeabilidad aparente  $k'$ , descrito por la ecuación  $J(t) = k' [C_0] e^{-k't}$ , es el producto de  $k'$  por el gradiente de concentración que se disipa en el tiempo ( $[C_0 e^{-k't}]$ ). Cuando esta gradiente es constante la ecuación se reduce a la forma lineal  $J = k' \Delta [C]$ . Considerando que las cantidades de masa que cruzan el epitelio son del orden de picomoles y la concentración en el lado apical es del orden de decenas o centenas de micromoles, es lícito suponer que el gradiente de concentración es constante durante todo el experimento y usar la forma lineal (primera Ley de Fick) para el análisis de resultados.

## **Resultados.**

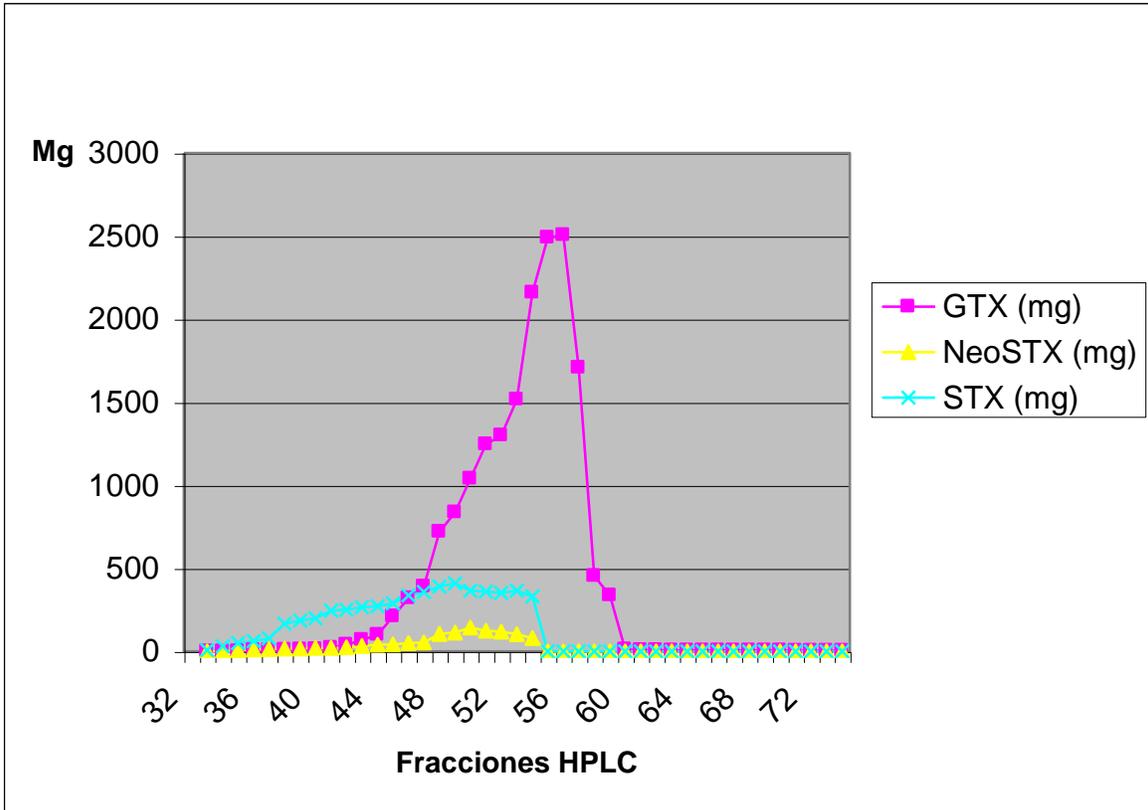
### **Purificación de las Toxinas.**

El primer objetivo de este trabajo fue la purificación de las toxinas a partir de moluscos contaminados. En esta sección explicaremos la purificación final de la toxina.

Para obtener las distintas fracciones y separar las toxinas por grupos, se utilizó cromatografía líquida preparativa con BioGel P-2 como fase estacionaria correspondiente a 300 ml de resina aproximadamente.

El eluido de la columna se recolectó en un colector de fracciones con un volumen de 5 ml cada una que fue analizada en el HPLC analítico para identificar y cuantificar las toxinas presentes y seleccionar las fracciones.

Al analizar todas las fracciones mediante HPLC se obtuvo el gráfico de la figura 9.



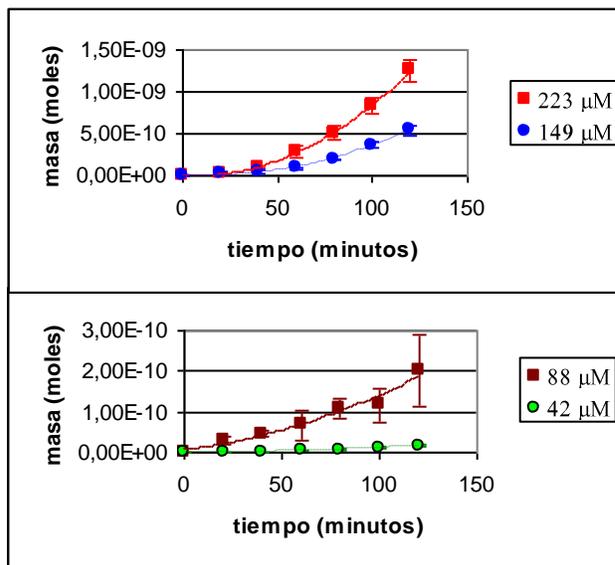
**Figura 9.** Gráfico que muestra las concentraciones de toxinas obtenidas en las distintas fracciones analizadas en el HPLC.

Mediante este método se agruparon las distintas fracciones, así las fracciones N° 32 y N° 33 que poseen STX pura se juntan y forman la Fracción I. Desde la fracción N° 34 a N° 53 hay presencia de GTX, NeoSTX y STX y forman la Fracción II. Desde la fracción N° 55 a N° 58 hay GTX puras y forman la Fracción III con la cual se trabajó en la presente memoria de título.

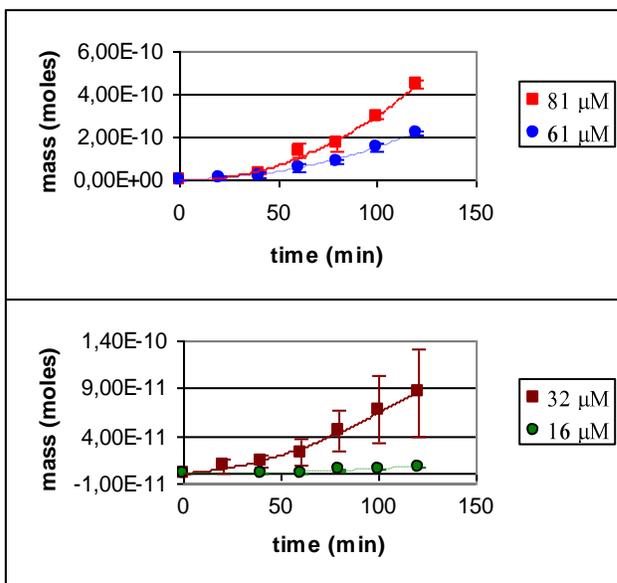
## Flujo de toxina a través del epitelio.

En la figura 10 se presentan gráficos de la masa de GTX-2 que ha cruzado el epitelio en función del tiempo de muestreo, para distintos gradientes de concentración, a 37°C.

Es evidente que la cantidad de GTX-2 en la cámara basolateral tiene una cinética superlineal en el tiempo, con importantes implicaciones sobre la permeabilidad de la especie molecular.



**Figura 10.** Masa de GTX-2 en la cámara basolateral en función del tiempo, a 37 °C y con distintos gradientes de concentración de toxina. n = 3 en cada gráfico. Las barras corresponden a  $\pm 1$  D.E.



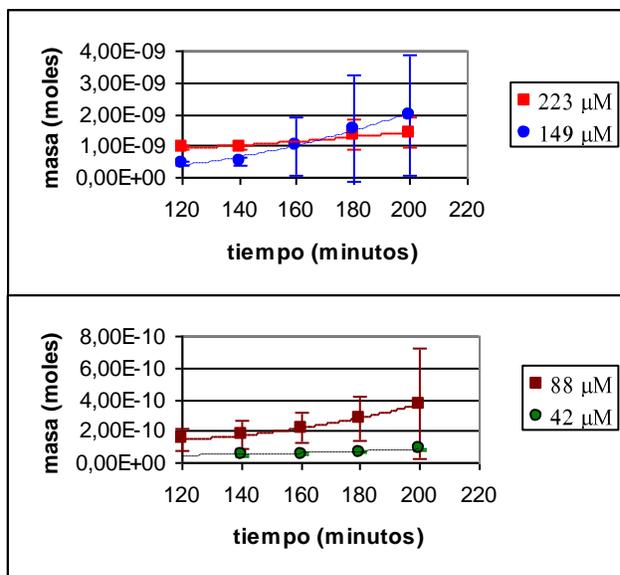
**Figura 11.** Masa de GTX-3 en la cámara basolateral en función del tiempo, a 37 °C y con distintos gradientes de concentración de toxina. n = 3 en cada gráfico. Las barras corresponden a  $\pm 1$  D.E.

Al igual que para GTX-2, en la figura 11 se presentan gráficos de la masa de GTX-3 que ha cruzado el epitelio en función del tiempo de muestreo, para distintos gradientes de concentración, a 37°C. Las concentraciones de GTX-3 en cada experimento son proporcionales a los de GTX-2, proporcionalidad correspondiente a

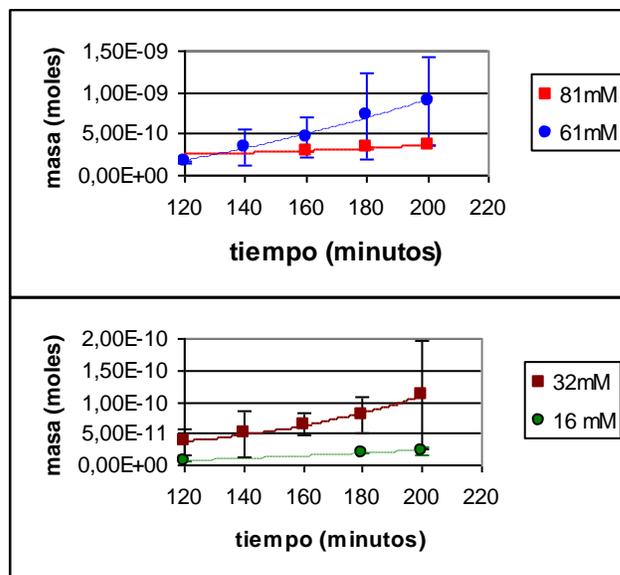
la observada en la solución stock de toxina.

Es evidente que, en términos generales, la cinética de difusión de GTX-3 a través del epitelio es muy similar a la de GTX-2, lo que sugiere vías y mecanismos comunes.

En todos los experimentos se realizó una segunda fase a 1 °C, los gráficos de las figuras 12 y 13 muestran las cinéticas de permeación de GTX-2 y GTX-3 respectivamente, a baja temperatura.



**Figura 12.** Masa de GTX-2 en la cámara basolateral en función del tiempo, a 1 °C y con distintos gradientes de concentración de toxina. N = 3 en cada gráfico. Las barras corresponden a  $\pm 1$  D.E.



**Figura 13.** Masa de GTX-3 en la cámara basolateral en función del tiempo, a 1 °C y con distintos gradientes de concentración de toxina. N = 3 en cada gráfico. Las barras corresponden a  $\pm 1$  D.E.

Del análisis de los gráficos se desprende que:

1. Aunque el gradiente de concentración es constante, el flujo de toxina a través del epitelio no lo es, aumenta con el tiempo, tanto a 37°C como a 1°C.
2. La única explicación coherente con los datos experimentales es que se está ocurriendo un proceso progresivo de degradación estructural del epitelio y - si es así- el coeficiente de permeabilidad debe estar aumentando progresivamente.

Coficiente de permeabilidad.

El flujo de materia (en moles) a través de una partición de permeabilidad P está dado por:

$$J = \frac{d}{dt} \left( \frac{M(t)}{A} \right)$$

En el caso de un flujo homogéneo a través del área A, la ecuación queda como:

$$J = \frac{1}{A} \frac{d}{dt} M(t) \quad \text{(I)}$$

Donde M(t) es el número de moles en el compartimiento trans en el instante t.

Por otra parte, la primera Ley de Fick establece que:

$$J = P\Delta C \quad \text{(II)}$$

donde P es la permeabilidad y  $\Delta C$  es la diferencia de concentraciones a través de la partición que separa los compartimientos cis y trans.

De (I) y (II) se obtiene que:

$$M(t) = AP\Delta C\Delta t \quad \text{(III)}$$

Ecuación que presupone flujo homogéneo a través de la superficie de la partición, gradiente de concentración constante y permeabilidad constante. En el caso que esta última no sea constante, la ecuación (III) debe expresarse como:

$$M(t) = A\Delta C \int_{t_1}^{t_2} P(t) dt \quad \text{(IV)}$$

En estos experimentos la diferencia de concentraciones puede considerarse constante, porque la cantidad de toxina en el lado trans es despreciable frente la concentración en el lado cis.

Los experimentos realizados proporcionan conjuntos de puntos experimentales que una vez graficados, se ajustan con notable precisión a una curva cuadrática, lo que significa que:

$$A\Delta C \int_{t_1}^{t_2} P(t)dt = ax^2 + bx + c \quad \text{luego...}$$

$$\frac{d}{dt} (ax^2 + bx + c) = A\Delta CP(t) \quad \text{por tanto:}$$

$$P(t) = \frac{1}{A\Delta C} \frac{d}{dt} (ax^2 + bx + c)$$

$$P(t) = \frac{1}{A\Delta C} (2ax + b)$$

**(V)**

Dado que A y  $\Delta C$  se conocen, es posible tener una función para la variación de la permeabilidad en el tiempo. Finalmente, la derivada temporal de P(t), proporciona la tasa de variación de la permeabilidad en el tiempo, por lo que es posible obtener los parámetros de la función  $P = f(t)$  que caracterizan la permeabilidad en función del tiempo para las diferentes concentraciones de toxina utilizadas y para las dos temperaturas en que se realizaron los experimentos. Las Tablas 1 y 2 muestran las ecuaciones empíricas de las permeabilidades para GTX-2 y GTX-3 respectivamente.

**Tabla 1. Ecuaciones de ajuste de la masa en función del tiempo para GTX-2 y GTX 3 a 37 °C**

	$\Delta C^1$ ( $\mu M$ )	$M(t)^2$ ecuación de ajuste (mol)	R
GTX 2	223	$M(t) = 1,000 \times 10^{-13} t^2 - 1,684 \times 10^{-12} t + 8,944 \times 10^{-12}$	1,000
	149	$M(t) = 4,942 \times 10^{-14} t^2 - 1,545 \times 10^{-12} t + 1,550 \times 10^{-11}$	0,997
	88	$M(t) = 7,806 \times 10^{-15} t^2 + 5,496 \times 10^{-13} t + 7,938 \times 10^{-12}$	0,983
	42	$M(t) = 1,039 \times 10^{-15} t^2 + 7,118 \times 10^{-15} t - 1,082 \times 10^{-13}$	0,999
GTX 3	81	$M(t) = 3,306 \times 10^{-14} t^2 - 2,810 \times 10^{-13} t + 3,586 \times 10^{-13}$	0,994
	61	$M(t) = 1,580 \times 10^{-14} t^2 - 1,017 \times 10^{-13} t + 2,469 \times 10^{-12}$	0,998
	32	$M(t) = 4,853 \times 10^{-15} t^2 + 1,457 \times 10^{-13} t + 8,091 \times 10^{-13}$	0,996
	16	$M(t) = 5,357 \times 10^{-16} t^2 + 3,539 \times 10^{-16} t - 1,569 \times 10^{-13}$	0,984

<sup>1</sup> Gradiente de concentración de toxina

<sup>2</sup> Masa total de toxina transferida al lado basolateral desde el momento que la toxina es agregada al lado apical (tiempo cero) hasta el tiempo "t".

**Tabla 2. Ecuaciones de ajuste de la masa en función del tiempo para GTX-2 y GTX 3 a 1 °C**

	$\Delta C$ ( $\mu M$ )	M(t) ecuación de ajuste (mol)	R
GTX 2	223	$M(t) = 2,162 \times 10^{-14} t^2 - 2,185 \times 10^{-13} t + 6,297 \times 10^{-10}$	0,969
	149	$M(t) = 1,296 \times 10^{-13} t^2 - 2,076 \times 10^{-11} t + 9,917 \times 10^{-10}$	0,994
	88	$M(t) = 2,532 \times 10^{-14} t^2 - 5,333 \times 10^{-12} t + 4,245 \times 10^{-10}$	0,999
	42	$M(t) = 3,888 \times 10^{-15} t^2 - 7,422 \times 10^{-13} t + 7,635 \times 10^{-11}$	1,000
GTX 3	81	$M(t) = 9,519 \times 10^{-15} t^2 - 1,690 \times 10^{-12} t + 3,250 \times 10^{-10}$	1,000
	61	$M(t) = 2,874 \times 10^{-14} t^2 + 3,141 \times 10^{-15} t - 2,449 \times 10^{-10}$	0,997
	32	$M(t) = 7,010 \times 10^{-15} t^2 - 1,363 \times 10^{-12} t + 1,012 \times 10^{-10}$	0,995
	16	$M(t) = 1,382 \times 10^{-15} t^2 - 2,164 \times 10^{-13} t + 1,221 \times 10^{-11}$	1,000

Obsérvese el coeficiente R (Tabla 3), muy cercano a la unidad en todas las curvas de ajuste, lo que es un buen indicador de la consistencia de la cinética de segundo orden supuesta en todos los experimentos. Por otra parte, la desviación estándar relativamente amplia se debe a que los valores de los flujos mostraban variaciones fáciles de entender en un estudio con tejidos humanos de muy diversa etiología. Sin embargo, es la consistencia de la cinética en un conjunto de muestras con valores particulares tan diversos lo que apunta a un proceso común en todas las muestras estudiadas.

De las Tablas 1 y 2 se obtienen –por los procedimientos antes señalados– las ecuaciones empíricas de las permeabilidades para GTX-2 y GTX-3 respectivamente para las dos temperaturas estudiadas. Estas ecuaciones son presentadas en la Tabla 3.

**Tabla 3. Permeabilidad en función del tiempo a 37 °C y a 1 °C**

	[Tox] (μM)	P(t) a 37°C (cm x seg <sup>-1</sup> )	P(t) a 1°C (cm x seg <sup>-1</sup> )
GTX 2	223	$P(t) = 1,495 \times 10^{-8} t - 1,259 \times 10^{-7}$	$P(t) = 3,231 \times 10^{-9} t - 1,633 \times 10^{-8}$
	149	$P(t) = 1,106 \times 10^{-8} t - 1,728 \times 10^{-7}$	$P(t) = 2,899 \times 10^{-8} t + 2,322 \times 10^{-6}$
	88	$P(t) = 3,135 \times 10^{-9} t - 1,104 \times 10^{-7}$	$P(t) = 9,591 \times 10^{-9} t - 1,010 \times 10^{-6}$
	42	$P(t) = 8,246 \times 10^{-10} t - 2,825 \times 10^{-9}$	$P(t) = 3,086 \times 10^{-9} t - 2,945 \times 10^{-7}$
GTX-3	81	$P(t) = 1,360 \times 10^{-8} t - 5,782 \times 10^{-8}$	$P(t) = 3,917 \times 10^{-9} t - 3,477 \times 10^{-7}$
	61	$P(t) = 8,634 \times 10^{-9} t - 2,779 \times 10^{-8}$	$P(t) = 1,570 \times 10^{-8} t + 8,582 \times 10^{-10}$
	32	$P(t) = 5,055 \times 10^{-9} t - 7,589 \times 10^{-8}$	$P(t) = 7,302 \times 10^{-9} t - 7,099 \times 10^{-7}$
	16	$P(t) = 1,116 \times 10^{-9} t - 3,686 \times 10^{-10}$	$P(t) = 2,879 \times 10^{-9} t + 2,254 \times 10^{-7}$

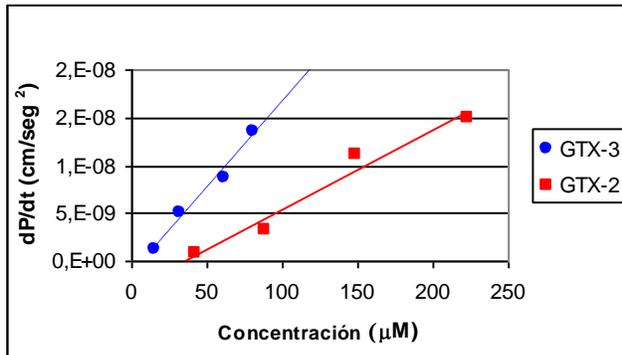
Se puede observar que la derivada temporal de la permeabilidad varía con la concentración, lo cual significa que la velocidad con que se producen las alteraciones estructurales del epitelio dependen de la concentración de toxina. Esto concuerda perfectamente con las observaciones clínicas, ya que a mayor consumo de moluscos infectados, más rápida es la aparición y más intensos los síntomas. La Tabla 4 muestra las pendientes (variación temporal de la

permeabilidad) de las ecuaciones de las dos tablas anteriores en relación a la concentración de toxina.

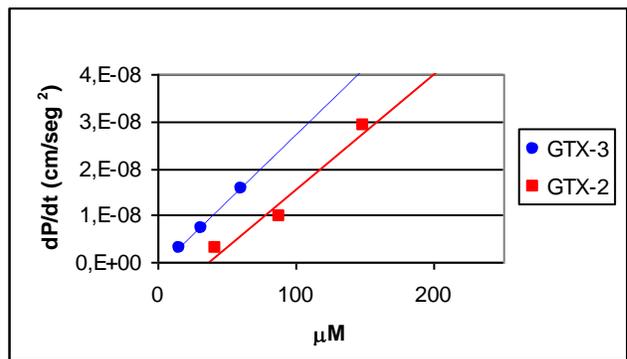
**Tabla 4. Tasa de variación temporal de la permeabilidad de la toxina a distintas concentraciones**

	<b>C (μM)</b>	<b>P (cm x seg<sup>-2</sup>) 37 °C</b>	<b>P (cm x seg<sup>-2</sup>) 1 °C</b>
<b>GTX 2</b>	223	$1,495 \times 10^{-8}$	$3,231 \times 10^{-9}$
	149	$1,106 \times 10^{-8}$	$2,899 \times 10^{-8}$
	88	$3,135 \times 10^{-9}$	$9,591 \times 10^{-9}$
	42	$8,246 \times 10^{-10}$	$3,086 \times 10^{-9}$
<b>GTX 3</b>	81	$1,360 \times 10^{-8}$	$3,917 \times 10^{-9}$
	61	$8,634 \times 10^{-9}$	$1,570 \times 10^{-8}$
	32	$5,055 \times 10^{-9}$	$7,302 \times 10^{-9}$
	16	$1,116 \times 10^{-9}$	$2,879 \times 10^{-9}$

La figura 14 corresponde a un gráfico de la tasa de variación de temporal de la permeabilidad ( $P'(t) = \frac{dP(t)}{dt}$ ) en función de la concentración para GTX-2 y GTX-3 a 37 °C. La figura 15 es para los respectivos experimentos a 1 °C. La Tabla 5 muestra las funciones correspondientes a las rectas ajustadas a cada gráfico, cada una exhibe un coeficiente R cercano a 1, mostrando así un alto grado de correlación entre las variables.



**Figura 14:** Tasa de variación temporal de la permeabilidad en función de la concentración de toxina a 37 °C.

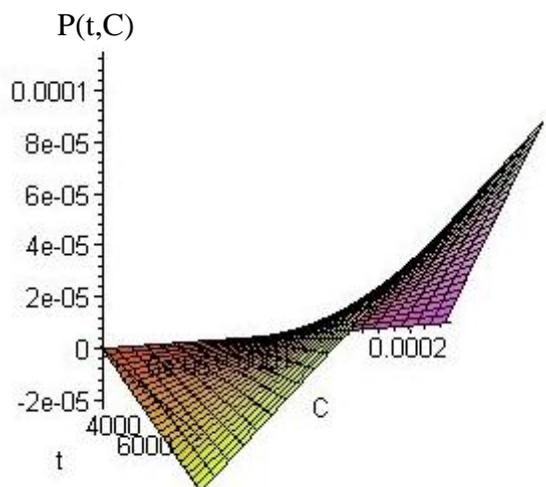


**Figura 15:** Tasa de variación temporal de la permeabilidad en función de la concentración de toxina a 1 °C.

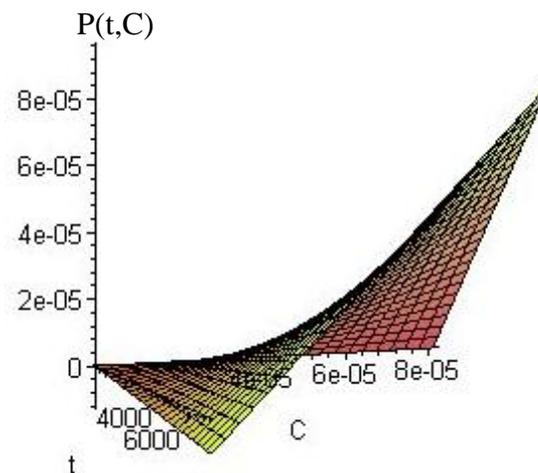
**Tabla 5. Funciones empíricas para la variación de la tasa temporal de cambio de la permeabilidad en función de la concentración de toxina a 37 °C y 1 °C**

Toxina	37 °C	R	1 °C	R
GTX-2	$P'(t)[C] = 8,305 \times 10^{-11} C - 2,930 \times 10^{-09}$	0,982	$P'(t)[C] = 2,461 \times 10^{-10} C - 8,999 \times 10^{-09}$	0,980
GTX-3	$P'(t)[C] = 1,808 \times 10^{-10} C - 1,486 \times 10^{-09}$	0,990	$P'(t)[C] = 2,855 \times 10^{-10} C - 1,745 \times 10^{-09}$	0,997

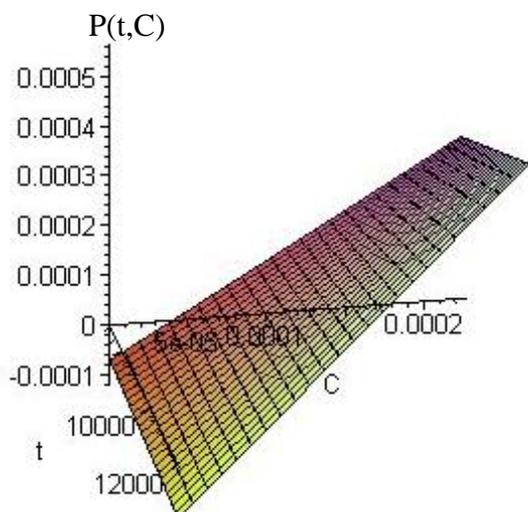
Las figuras 16 a 19 son las representaciones tridimensionales de la permeabilidad de ambas toxinas, en sus respectivos segmentos temporales, como funciones del tiempo y la concentración, a 37 °C y 1 °C.



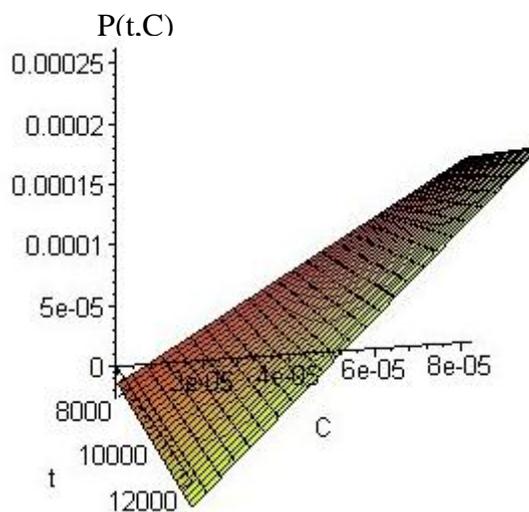
**Figura 16:** Gráfico 3D de la permeabilidad de GTX-2 a 37 °C en función del tiempo y la concentración de toxina.



**Figura 17:** Gráfico 3D de la permeabilidad de GTX-3 a 37 °C en función del tiempo y la concentración de toxina.



**Figura 18:** Gráfico 3D de la permeabilidad de GTX-2 a 1 °C en función del tiempo y la concentración de toxina.



**Figura 19:** Gráfico 3D de la permeabilidad de GTX-3 a 1 °C en función del tiempo y la concentración de toxina.

Es notorio el cambio de forma de la función permeabilidad con la temperatura. Sin embargo no debe atribuirse este notorio cambio al efecto sólo de la temperatura, pues debe considerarse que las mediciones a baja temperatura se realizaron dos horas después de haber agregado la toxina, por lo que el epitelio puede haber estado bastante deteriorado, lo que explicaría la linealidad de los cambios observados en ambos ejes.

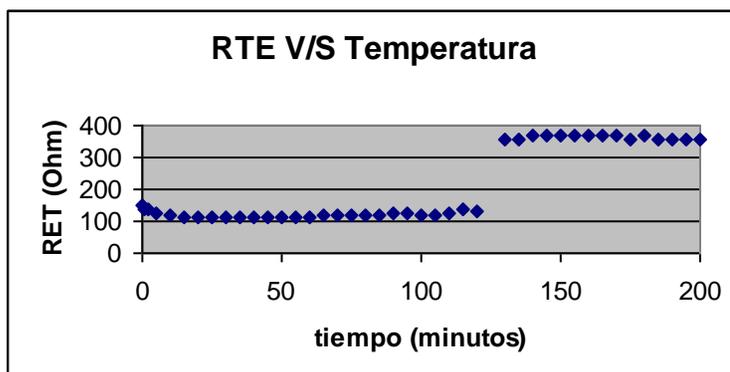
De las tablas y gráficos presentados, se desprende que:

1. El flujo de toxinas desde el compartimiento cis al trans, no es constante. Si lo fuera, la curva que describe la cantidad de toxina en el compartimiento trans sería lineal, los experimentos –en cambio- muestran una curva superlineal con un ajuste muy significativo por un polinomio de segundo grado.
2. Dado que, con un coeficiente de permeabilidad constante, la curva debe ser sublineal si el gradiente de concentración se disipa en el tiempo o lineal si el gradiente se mantiene constante –lo cual sería el caso en los experimentos realizados- es necesario suponer que las permeabilidades no son constantes, sino que aumentan en el tiempo.
3. Considerando que los coeficientes R de las curvas de ajuste son muy significativos, se puede considerar que las permeabilidades difieren sólo por un factor  $(\Delta C)^{-1}$  de la primera derivada de las curvas mencionadas

4. Las permeabilidades del epitelio a los epímeros GTX-2 y GTX-3 varían linealmente con el tiempo
5. La variación de la permeabilidad para ambos epímeros, es una función lineal de la concentración de toxina, para las dos temperaturas consideradas
6. Tanto la variación de permeabilidad en el tiempo, como en función de la concentración, es mayor para GTX-3 en ambas temperaturas
7. El aumento de la permeabilidad de los epímeros GTX-2/3 es consistente con una hipótesis de degradación de la integridad estructural del epitelio, sin embargo, la constancia de los valores de la resistencia transepitelial no lo es.

Resistencia transepitelial.

Un parámetro que se suele asociar a la integridad estructural del epitelio es la Resistencia Transepitelial (RTE). La figura 20 muestra un registro típico de resistencia durante un experimento, en tanto que la Tabla 6 muestra el promedio de las resistencias observadas en los experimentos y la desviación estándar, a 37°C y a 1°C.



**Figura 20.** Muestra de un registro típico de la resistencia durante un experimento.

**Tabla 6. Promedios de Resistencia Transepitelial observado**

Resistencia Transepitelial (Ohm)		
	37°C	1°C
Media	48	158
Desviación estandar	14,9	34,5

Es evidente que la resistencia se mantiene estable en sus respectivos valores a ambas temperaturas.

Los resultados anteriormente expuestos presentan una discrepancia con el modelo utilizado, que vincula la resistencia transepitelial con la permeabilidad a la toxina, ya que mientras la resistencia permanece constante en el tiempo a una temperatura dada, la permeabilidad presenta una considerable variación.

La variación de la resistencia ligada al cambio de temperatura merece una consideración especial. La Tabla 7 muestra el cuociente de las medias de las resistencias del epitelio, el de las resistencias de la solución –sin epitelio montado– y el cuociente entre las viscosidades del agua a 1°C y a 37°C.

**Tabla 7. Cuocientes de las Resistencias medias.**

Cuocientes	
Epitelio:	$\frac{\bar{R}_{1^{\circ}C}}{R_{37^{\circ}C}} = 3,3$
Solución:	$\frac{R_{1^{\circ}C}}{R_{37^{\circ}C}} = 2,2$
Viscosidad:	$\frac{\eta_{1^{\circ}C}}{\eta_{37^{\circ}C}} = 2,5$

Se observa que aún cuando los valores a 1°C son mayores que a 37°C, existe una significativa discrepancia entre el cociente del epitelio y el de la solución, lo que indica que hay un factor extra, más allá de la dependencia con la temperatura, que incrementa la resistencia del epitelio a 1°C.

## Discusión

Purificación de las toxinas a partir de moluscos contaminados.

La posibilidad de realizar los experimentos se debió a la capacidad del laboratorio de purificar las toxinas a partir de moluscos altamente contaminados, ya que los bivalvos filtradores son capaces de concentrar las toxinas presentes en los dinoflagelados tóxicos y permanecer contaminados por largo tiempo (Lagos, 1998). Gracias a la tecnología de punta del laboratorio se pudo extraer las toxinas usadas en esta memoria ya que no se encuentran disponibles en forma comercial.

El método empleado para extraer la toxina estaba previamente descrito y la disponibilidad del estándar analítico se debe a que el Laboratorio es uno de los 5 a nivel mundial en disponer de esta ventaja junto a Francia, España, Japón y Canadá (García *et al.*, 2003).

Resistencia transepitelial.

La consistencia de los resultados obtenidos en los experimentos anteriormente descritos, ofrece una clara evidencia de la variación de la permeabilidad de los epímeros GTX-2/3, además el valor muy cercano a 1 del coeficiente R de las curvas cuadráticas de ajuste, apunta a una variación lineal de la permeabilidad en el tiempo; propia de una reacción de primer orden.

Esta variación de la permeabilidad debe correlacionarse con cambios estructurales del tejido y una hipótesis plausible, es suponer que la integridad estructural del epitelio está siendo degradada por acción de la toxina. Los resultados obtenidos, sin embargo, no permiten precisar si el proceso es de carácter intracelular o extracelular. Una manera obvia de probar la hipótesis, la proporcionan los parámetros electrofisiológicos de corriente y voltaje a través del epitelio, de los que se obtiene el valor de la conductancia y su inverso, la resistencia transepitelial.

Contrariamente a lo esperado, la resistencia transepitelial es constante durante todo el experimento. La única variación de resistencia está relacionada con el cambio de temperatura, pero a ambas temperaturas la resistencia permanece constante en sus respectivos valores.

Este cambio de resistencia está relacionado –al menos parcialmente- con la dependencia del coeficiente de difusión con la temperatura y la relación entre aquél y la conductividad.

La ecuación de Einstein-Stokes establece que:

$$D = \frac{kT}{6\pi r\eta} \text{ donde:}$$

$D$ : es el coeficiente de difusión

$k$ : es la constante de Boltzman

$T$ : es la temperatura absoluta

$r$ : es el radio de la molécula

$\eta$ : es la viscosidad del medio (en este caso, el agua)

Por otra parte, la contribución de una especie iónica dada a la conductividad de una solución electrolítica está dada por:

$$\sigma = |z|FC\mu \text{ donde:}$$

$z$ : es la valencia de la especie iónica

$F$ : es la constante de Faraday

$C$ : es la concentración

$\mu$ : es la movilidad

y la ecuación de Einstein establece que:

$zFD = RT\mu$ , combinando estas tres ecuaciones se obtiene:

$$\sigma = \frac{z^2 F^2 C}{RT} D$$

$$\sigma = \frac{z^2 F^2 C}{RT} \frac{kT}{6\pi r\eta}$$

$$\sigma = \frac{z^2 F^2 C}{R} \frac{k}{6\pi r\eta}$$

$$\sigma = \frac{z^2 F^2 kC}{6\pi R r\eta}$$

Por lo tanto, a pesar que la temperatura desapareció de la ecuación, la dependencia de ella no ha desaparecido, puesto que el coeficiente  $\mu$  es función de

la temperatura. Luego, el cociente de conductividades a dos temperaturas distintas es:

$$\sigma(T_1) = \frac{z^2 F^2 k C}{6\pi R r \eta(T_1)}$$

$$\sigma(T_2) = \frac{z^2 F^2 k C}{6\pi R r \eta(T_2)}$$

$$\frac{\sigma(T_1)}{\sigma(T_2)} = \frac{\eta(T_2)}{\eta(T_1)}$$

Con esta expresión podemos estimar el cociente de conductividades a

$$T_1 = 37^\circ\text{C} \text{ y } T_2 = 1^\circ\text{C}: \frac{\sigma(37^\circ\text{C})}{\sigma(1^\circ\text{C})} = \frac{\eta(1^\circ\text{C})}{\eta(37^\circ\text{C})} = \frac{0,001731}{0,000692} = 2,50$$

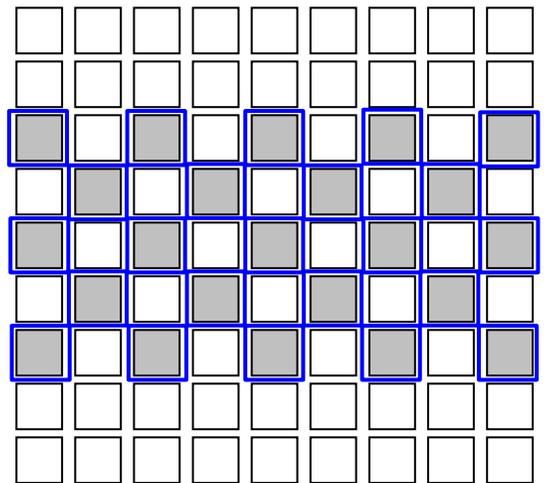
Mediciones de conductancia de la solución en la cámara de Ussing utilizada, a ambas temperaturas, arrojan resultados muy similares al valor calculado para el cociente de conductividades. El valor para el cociente de las resistencias del epitelio, sin embargo, arroja un valor aproximadamente un 50% mayor al observado en las soluciones.

Desarrollo de un modelo para la resistencia transepitelial.

Cualquier modelo que se proponga para la resistencia transepitelial, debe dar cuenta satisfactoriamente de la variación de resistencia con la temperatura y – por sobre todo- solventar la aparente paradoja planteada por una permeabilidad a la toxina en constante aumento y una resistencia transepitelial constante a una determinada temperatura.

El modelo se desarrolló sobre las siguientes premisas:

1. El lumen de las uniones estrechas actúa como un filtro por tamaño ante las moléculas de toxina, pero no ofrece dificultades al paso de los iones presentes en la solución. Hipótesis plausible dadas las enormes diferencias de tamaño entre los iones de sodio, potasio y cloruro (principales portadores de carga en la solución) y las moléculas de toxina.
2. Entre las células existe una vía de difusión inundada por la solución electrolítica, por lo que se comporta como la resistencia equivalente de un gran número de resistencias en paralelo.
3. Es plausible caracterizar la resistencia en torno a una célula por un valor promedio.
4. La resistencia en torno a una célula es la resistencia equivalente de un infinito número de resistencias de “ancho” infinitesimal constituidas por tres resistencias en serie: (a) la resistencia entre el lado mucoso de epitelio y el extremo apical de la unión estrecha, (b) la resistencia de la unión estrecha y (c) la



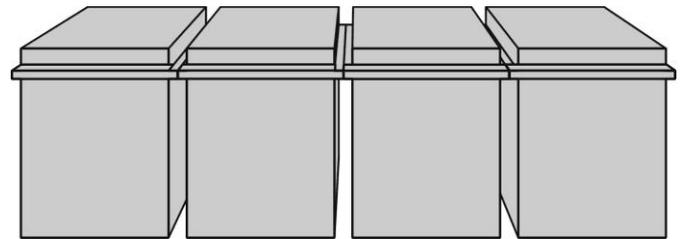
**Figura 21.** Esquema de una vista superior de un epitelio, como el intestinal.

resistencia entre el extremo distal de la unión estrecha y el lado basal del epitelio.

5. La longitud de la vía paracelular (el espesor del epitelio) no cambia significativamente con la temperatura.

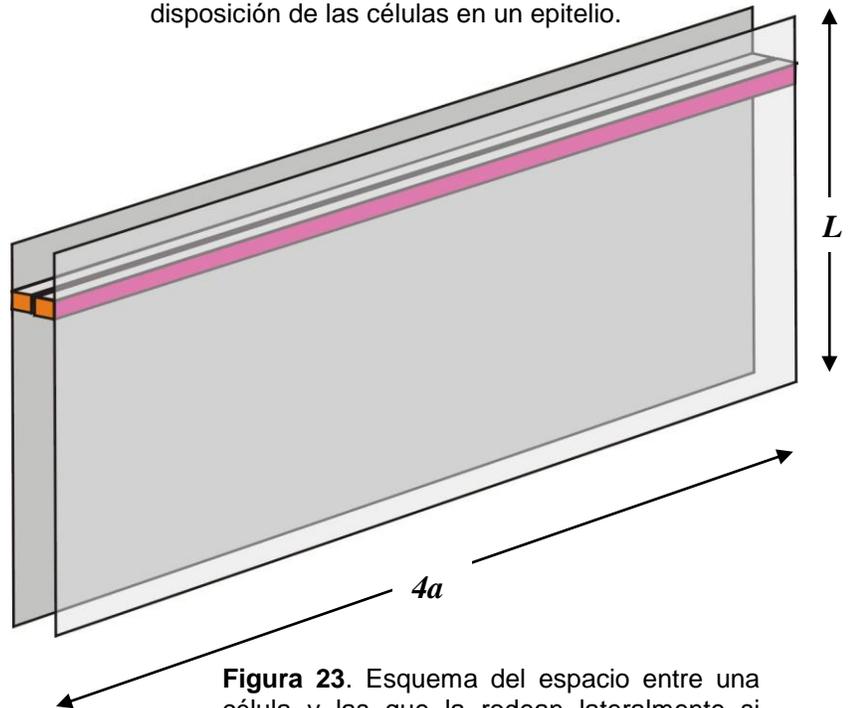
La figura 21 es una vista superior de la representación de un epitelio, como el intestinal. Se puede observar que, si se desea dar cuenta de la resistencia de la

vía paracelular, basta con obtener la resistencia en torno a una célula y luego considerar la mitad del total de células (cuadrados sombreados) para obtener la resistencia total, como lo señalan las líneas



**Figura 22.** Representación tridimensional de la disposición de las células en un epitelio.

azules. Supóngase además que las células tienen una base cuadrada de lado  $a$  (no es determinante para el modelo, pero introduce cierta comodidad en el trabajo).



**Figura 23.** Esquema del espacio entre una célula y las que la rodean lateralmente si fuese "desdoblado".

La figura 22 muestra una representación tridimensional de la disposición de las células en un

epitelio, con las restricciones espaciales impuestas por las zonas de estrecha aposición de las células: “tight junctions” o “uniones estrechas”.

Supóngase ahora que el espacio entre una célula y las que la rodean lateralmente, es “desdoblado” como se muestra en la figura

23.

Se adopta la siguiente nomenclatura que se describe en la figura 24:

$L$ : altura de la célula, distancia desde el lado mucoso al seroso del epitelio intestinal.

$l$ : longitud de la juntura estrecha.

$D_{10}$ : distancia entre las paredes de la juntura estrecha.

$D_0$ : distancia entre las paredes de las células contiguas

$\rho$ : resistividad de la solución en la vía paracelular



Para hacer un modelo de la resistencia total de esta vía paracelular, la supondremos compuesta por infinitas resistencias infinitesimales -como de la Figura 24- en paralelo. Cada una de ellas consta de tres resistencias en serie, aquella por encima de la juntura estrecha, la juntura estrecha y aquella por debajo de la juntura estrecha. La primera y la última, por tener igual conductividad y ancho, pueden ser

**Figura 24.** Vista frontal esquemática del espacio entre una célula y las que la rodean.

consideradas una sola, de altura  $(L-l)$ . La resistencia de un conductor de longitud  $l$ , sección transversal  $A$  y resistividad  $\rho$  se expresa como:

$$R = \rho \frac{l}{A}$$

Entonces, la resistencia de cada una de estas resistencias infinitesimales es

la suma de:

$$dR' = \rho \frac{L-l}{D_0 ds} + \frac{\rho l}{D_{10} ds}$$

$$dR' = \rho \left( \frac{L-l}{D_0} + \frac{l}{D_{10}} \right) \frac{1}{ds}$$

$$dR' = \frac{\rho [D_{10} + l D_0 - D_{10}]}{D_{10} D_0 ds}$$

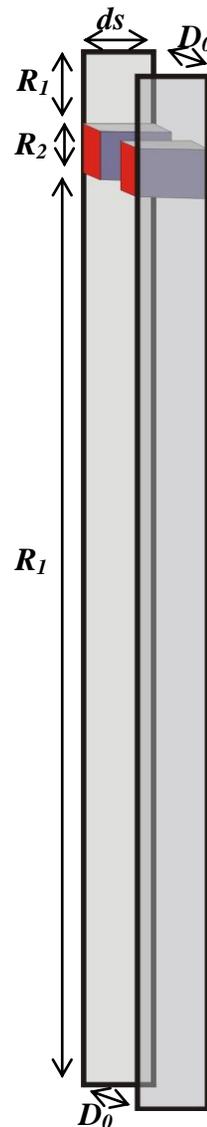
La resistencia laminar descrita en la figura 25 está formada por la suma de infinitas resistencias infinitesimales  $dR'$  en paralelo, entre 0 y  $4a$ , por lo que:

$$R' = \left\{ \frac{D_{10} D_0}{\rho [D_{10} + l D_0 - D_{10}]} \int_0^{4a} ds \right\}^{-1}$$

$$R' = \frac{\rho [D_{10} + l D_0 - D_{10}]}{4a D_{10} D_0}$$

Esta es la expresión para la resistencia parcelular promedio de una célula. Luego, la expresión correcta es:

$$\frac{R'}{\text{célula}} = \frac{\rho [D_{10} + l D_0 - D_{10}]}{4a D_{10} D_0}$$



**Figura 25.** Esquema de la resistencia laminar formada por la suma de infinitas resistencias infinitesimales.

Sean  $\eta$  la densidad superficial de células en el epitelio, es decir, el número de células por unidad de superficie y  $S_0$  el área del epitelio en la cámara de Ussing, es decir el área cuya resistencia se está midiendo. Dado que todas las vías paracelulares están en paralelo y se supone tienen la misma resistencia promedio, la resistencia total del epitelio bajo medición será:

$$R_{Total} = \frac{\rho \left[ D_{10} + l \left( \frac{D_0}{D_{10}} - 1 \right) \right]}{4aD_{10}D_0S_0 \frac{\eta}{2}}$$

$$R_{Total} = \frac{\rho \left[ D_{10} + l \left( \frac{D_0}{D_{10}} - 1 \right) \right]}{2aD_{10}D_0S_0\eta}$$

Esta ecuación puede ser reformulada como:

$$R_{Total} = \frac{\rho}{2aD_0S_0\eta} \left[ \left( \frac{l}{L} \right) \frac{D_0}{D_{10}} \right]$$

$$R_{Total} = \frac{\rho}{2aD_0S_0\eta} \left[ \left( L - \left( \frac{l}{L} L \right) \right) + \left( \frac{l}{L} L \right) \frac{D_0}{D_{10}} \right]$$

$$R_{Total} = \frac{\rho L}{2aD_0S_0\eta} \left[ \left( 1 - \frac{l}{L} \right) + \left( \frac{l}{L} \right) \frac{D_0}{D_{10}} \right]$$

Obsérvese que se han introducido los parámetros  $\frac{l}{L}$  -el cociente entre la longitud de la junta estrecha y la longitud de la vía paracelular- y  $\frac{D_0}{D_{10}}$  -el cociente entre el ancho de la vía paracelular y el ancho inicial de la junta estrecha.

Valores plausibles para  $D_{10}$  y para  $l$  son: 0,6 nm (Tang y Goodenough, 2003) y 400 nm (Claude y Goodenough, 1973) respectivamente. Por otra parte, valores aceptados para el ancho de la vía paracelular varían entre 20 y 30 nm (Goodenough, comunicación personal) y su longitud tiene un valor mínimo en torno a 30 - 40  $\mu\text{m}$  (la longitud de las células columnares del epitelio de yeyuno humano) pero el valor real es muy variable, debido a las complejas interdigitaciones con células adyacentes, por lo que un valor de 50  $\mu\text{m}$  es aún una estimación conservadora.

Tomando 25 nm como un valor representativo del ancho medio de la vía paracelular y reemplazando estos valores en la ecuación precedente se obtiene:

$$R_{Total} = \frac{\rho L}{2aD_0S_0\eta} \left[ \left(1 - \frac{1}{125}\right) + \left(\frac{1}{125}\right)42 \right]$$

Con estos valores, el valor inicial de la resistencia total es:

$$R_{Total} = 1.33 \frac{\rho L}{2aD_0S_0\eta} \text{ Ohm}$$

Dado que la permeabilidad es una función lineal del tiempo a cualquier gradiente de concentración, la permeabilidad a los 120 min después de iniciado el experimento es seis veces mayor que a los 20 min. Es plausible suponer que a los 20 min de iniciado el experimento, las junturas estrechas no han sufrido un daño significativo y el valor de la permeabilidad a este tiempo es una buena

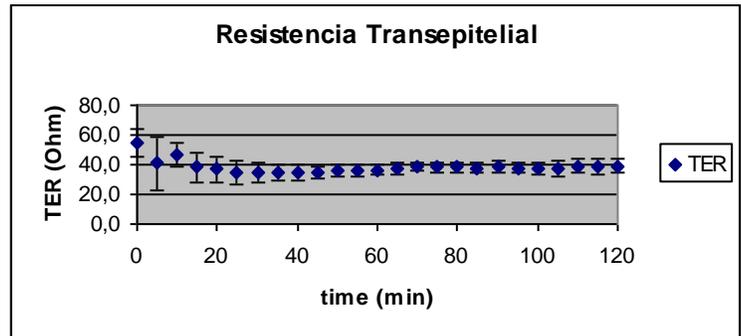
aproximación al valor inicial. El cociente  $\frac{D_0}{6D_{10}}$  reemplazado en la ecuación

anterior arroja el valor:

$$R_{Total} = \frac{\rho L}{2aD_0S_0\eta} \left[ \left( 1 - \frac{1}{125} \right) + \frac{1}{125} \frac{42}{6} \right]$$

$$R_{Total} = 1.05 \frac{\rho}{2aD_0S_0\eta} L$$

De esta forma, si el ancho de la junta estrecha aumenta por un factor de 6, la resistencia transepitelial disminuye sólo en un 21%. Este resultado es compatible con los resultados experimentales, ya que mientras la resistencia transepitelial exhibe pequeñas variaciones, la permeabilidad a la toxina aumenta constantemente.



**Figura 26.** TER en función del tiempo. n = 4. Las barras representan  $\pm 1$  DE.

Si se considera que al comienzo de cada experimento la junta estrecha tiene un lumen y una geometría que limitan severamente el paso de la toxina (sólo pueden pasar aquellas que llegan a la junta en una posición determinada, con muy pocos grados de libertad, por ejemplo) y que -por efectos de la toxina- la integridad estructural de las juntas se deteriora progresivamente, entonces aumentan los grados de libertad para el paso de las toxinas y la permeabilidad

puede aumentar progresivamente mientras la resistencia eléctrica experimenta sólo pequeñas variaciones (figura 26).

En resumen, se ha desarrollado un modelo que da cuenta de los resultados obtenidos, poniendo de manifiesto que un aumento sostenido de la permeabilidad para la toxina no es excluyente con una resistencia transepitelial constante o casi constante.

La discrepancia entre los valores de la resistencia transepitelial y los predichos por la variación de la viscosidad del agua con la temperatura, es explicable si se admite que el frío puede gatillar una respuesta que cambie la geometría de la vía paracelular, disminuyendo el lumen de ella vía contracción de las fibras de soporte intercelular. Suponiendo la situación menos favorable -las uniones estrechas con un lumen igual al resto de la vía paracelular- se encuentra que basta una contracción de un 20% de ésta, para que la resistencia transepitelial aumente hasta el valor observado.

En resumen, se ha desarrollado un modelo que da cuenta de un conjunto de resultados rigurosos y consistentes -a pesar del origen heterogéneo de los tejidos con que se trabajó- que describe analíticamente un proceso de degradación estructural del epitelio y sugiere que las toxinas actúan principalmente sobre las uniones estrechas, abriendo un camino para facilitar la difusión pasiva en avalancha, que inundará el organismo con neurotoxinas bloqueadoras del canal de sodio dependiente de voltaje.

Por otra parte, permite afirmar que no es posible determinar la existencia de transporte facilitado de toxinas, ya que la permeabilidad a las dos epimeros utilizados aumenta con el tiempo y con la concentración de las toxinas.

Finalmente, los resultados y el modelo desarrollado sugieren que, el desarrollo de un antídoto para estas toxinas puede enfocarse en:

1. Dilucidar el mecanismo de su ataque a las uniones estrechas e interferir en alguna parte del proceso.
2. Reducir su coeficiente de permeabilidad, ya sea disminuyendo su coeficiente de difusión o aumentando su área efectiva para incrementar la fuerza de arrastre (*dragging force*) sobre la molécula.
3. Desarrollar un mecanismo aglutinante que ligue las toxinas unas con otras, satisfaciendo así las condiciones del punto anterior u “ocultando” los sitios activos de ataque a las uniones estrechas.

## Conclusiones.

Las consecuencias del modelo empleado en la presente memoria de título son muy significativas tanto para la clínica como para orientar futuras líneas de investigación y se pueden resumir en:

1. Con los métodos utilizados fue posible obtener y purificar las toxinas del complejo Goyaulotoxinas e investigar el transporte transepitelial de los epimeros GTX 2 y 3.
2. No fue posible determinar la existencia de una vía de permeación por transporte facilitado utilizando el protocolo experimental de este trabajo, ya que una de las premisas del modelo propuesto para tal protocolo, era la constancia del coeficiente de permeabilidad para las toxinas, premisa que no se cumple.
3. Si se desea determinar la existencia de transporte facilitado para las toxinas, la mejor opción parece ser el trabajo con vesículas de membranas del borde en cepillo (*brush border*) del intestino.

4. La degradación de la integridad estructural del epitelio intestinal, es función lineal tanto del tiempo como de la concentración de toxinas, lo que está de acuerdo con las observaciones clínicas de los individuos intoxicados.
  
5. El modelo desarrollado sugiere que la degradación de la integridad estructural del epitelio se reduce a la acción –directa o indirecta- de las toxinas sobre el lumen de las uniones estrechas, incrementándolo en el tiempo con una velocidad dependiente de la concentración de toxina.
  
6. La linealidad de las funciones de permeabilidad en función de la concentración y el tiempo, sugieren cinéticas de primer orden para este proceso
  
7. El modelo establece una directa proporcionalidad entre la resistencia y la conductividad, por lo que el resultado es directamente aplicable al cociente de resistencias.
  
8. Los resultados experimentales y el modelo, son totalmente compatibles con las observaciones clínicas en los individuos intoxicados y se espera que sean un aporte al tratamiento de intoxicaciones agudas.

## Bibliografía

- **ANDRINOLO, D.; MICHEA, L.F.; LAGOS, N.** 1999. Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats. *Toxicon* 37: 447-464.
- **ANDRINOLO, D.; IGLESIAS, V.; GARCÍA, C.; LAGOS, N.** 2001. Toxicokinetic and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. *Toxicon* 40: 699-709.
- **ANDRINOLO, D.; GOMES, P.; FRAGA, S.; SOARES-DA-SILVA, P.; LAGOS, N.** 2002. Transport of the organic cations gonyautoxin 2/3 epimers, a paralytic shellfish poison toxin, through the human and rat intestinal epitheliums. *Toxicon* 40: 1389-1397.
- **AZEVEDO, S.** 1996. Current studies on toxic cyanobacteria (blue-green algae) of Brazilian water bodies. In: IV Congreso Latino-Americano de Ficología. Caxamby, Resúmenes:62.
- **CLAUDE, P.; GOODENOUGH, D.** 1973. Fracture faces of zonulae ocludentes from tight and leaky epithelium. *J. Cell Biol.* 58: 390-400.
- **COMPAGNON, D.; LEMBEYE, G.; MARCOS, N.; RUIZ-TAGLE, N.; LAGOS, N.** 1998. Bioaccumulation of PSP toxins in bivalve *Aulamomya ater* and the carnivorous gastropods *Concholepas concholepas* and *Argobuccinum ranelliformes* during *Alexandrium catenella* bloom in the southern Chile. *J. Shellfish Res.* 17: 67-73.

- **CHARLOTTE, J.** 1991 Avers. Biología Celular. In: Reguera, M & Ferreira, G (eds). Editorial Iberoamericana, Ciudad de México. México. pp: 136-152.
- **DARNELL, J.; HARVEY,L.; BALTIMORE, D.** 1988. Biología Celular y Molecular. Gessner, H & Montoya, D(eds). Editorial Labor, Barcelona. España. pp. 615-664.
- **FALCONER, I.R.** 1996. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. Phycologia 36: 6-11.
- **GARCÍA, C.; PEREIRA, P.; VALLE, L.; LAGOS, N.** 2003. Quantitation of diarrhetic shellfish poisoning toxins in Chilean mussel using pyrenyldiazomethase as fluorescent labeling reagent. Biol. Res. 36: 171-183.
- **GESSNER, B.; BELL, P.; DOUCETTE, G.; MOCZYDLOWSKI, E.; POLI, M.; DOLAH, F.** 1997. hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. Toxicon 35: 711-722.
- **HALLEGRAEFF, G.M.** 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. Phycologia 32: 79-99.
- **HEDIGER, M.** 1994 Structure function and evolution of solute transporters in prokaryotes and eukaryotes. J. Exp. Biol. 196: 15-49.
- **KAO, C.Y.; SUZIKI, C.Y.; KLEINAHUS, T.; SIEGMAN, M.J.** 1967. Vasomotor and Respiratory depressant actions of tetrodotxin and saxitoxin. Arch. Int. Pharm. 165: 438-450.

- **LAGOS, N.; COMPAGNON, D.; SEGUEL, M.; OSHIMA, Y.** 1996. Paralytic shellfish toxin composition: a quantitative analysis in Chilean mussels and dinoflagellate. Harmful and toxic algal blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. pp. 121-124.
- **LAGOS, N.** 1998. Microalgal blooms: a global issue with negative impact in Chile. Biol. Res. 31: 375-386.
- **LAGOS, N; ANDRINOLO, D.** 2000. Paralytic Shellfish Poisoning (SPS): Toxicology and Kinetics. In: "Seafood Toxicity: Mode of Action, Pharmacology and Physiology". Eds Luis M. Botana. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. pp: 203-126
- **LAGOS, N.** 2002. Principales toxinas de origen fitoplanctónico: Identificación y cuantificación mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). In: Floraciones Algales Nocivas en el cono sur americano, Sar, E.A., M.E.Ferrairo & B. Reguera (eds). Instituto Español de Oceanografía: 55-76.
- **LAGOS, N.** 2003. Paralytic shellfish poisoning phycotoxins: occurrence in South America. Comments Toxicol. 9: 1-19.
- **LEHNINGER, A.** 1987. Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular. Editorial Omega. Barcelona, España pp: 212-246.
- **MARTEL, F.; CALHAU, C.; AZEVEDO, I.** 2000. Characterization of the transport of the organic cation in human intestinal epithelial (caco-2) cell. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 361: 505-513.

- **MONTEBRUNO, D.** 1993. Intoxicación por ingesta de mariscos contaminados con VPM (aspectos médicos y forenses). Rev. Sanidad Def. Nac. 9: 127-132.
- **NEGEL, G.; VOLK, C; FRIEDERICH, T.; ULZHEIMER, J.; BAMBERG, E.; KOEPESELL, H.** 1997. A revaluation of substrate specificity of the rat cation transport rOCT1. J. Biol. Biochem. 272 : 471-485.
- **ONODERA, H.; SARAKE, M.; OSHIMA, Y.; YASUMOTO, T.; CARMICHAEL, W.W.** 1997. New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. Nat. Tox. 5 : 156-151.
- **OSHIMA, Y.** 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. J. AOAC Int. 78 : 528-532.
- **SERNKA, T.; JACOBSON, E.** 1982. Fundamentos de la Fisiología Gastrointestinal. Editorial Reverte. Barcelona, España 1982 pp. 9-18.
- **STRICHARTZ, G.** 1984. Structural determinants of the affinity of saxitoxin in sodium channel. J. Gen. Physiol. 84: 281-305.
- **TANG, V.; GOODENOUGH, D.** 2003. Paracellular Ion Channel at the Tight Junction. Biophys. J. 84(3): 1660 -1673.
- **WANG, J.; GIACOMINI, K.** 1997. Molecular determinants of substrate selectivity in Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporters. J. Biol. Biochem. 272 (46) : 28845-28848.
- **WHITE, A.W.** 1998. blooms of toxic algae worldwide: their effects on fish farming and shellfish resources. Proceeding of the International Conference

on the Impact of Toxic Algae on Mariculture, Aqua-Nor '87 Exhibition, Trondheim, Norway, 13-18 August. pp. 9-14.

- **YASUMOTO, T.;** MURATA, M. 1993. Marine toxins. Chem. Rev. 93: 1897-1909.

## ANEXOS

Anexo A.

Para conocer la concentración de la toxina se realizó lo siguiente:

Supóngase que se inyecta un volumen  $V_{ST}$  de un estándar conocido y se obtiene un área  $A_{ST}$ , por tanto se obtiene:

$$T_{ST} = kA_{ST} \quad (I)$$

pero  $k$  es aún desconocida. Por otra parte, de igual manera, si se inyecta un volumen  $V_m$  de una muestra desconocida, y se obtiene:

$$T_m = kA_m \quad (II)$$

pero se sabe que la cantidad total de soluto en un volumen  $V$  de una solución de concentración  $[T]$  es  $T = [T]V$ . Reemplazando en las ecuaciones (I) y (II) se obtiene:

$$\begin{aligned} [T]_{ST} V_{ST} &= kA_{ST} \\ [T]_m V_m &= kA_m \quad (III) \end{aligned}$$

Dividiendo la ecuación superior por la inferior:

$$\frac{A_{ST} \cdot V_{ST}}{A_m \cdot V_m} = \frac{A_{ST}}{A_m}, \text{ de donde --finalmente-- se puede obtener el valor de la}$$

concentración de la muestra desconocida:

$$A_m = \frac{V_{ST}}{V_m} \cdot \frac{A_m}{A_{ST}} \cdot A_{ST} \quad \text{(IV)}$$

Si los volúmenes inyectados son iguales, **(IV)** se reduce a:

$$A_m = \frac{A_m}{A_{ST}} \cdot A_{ST} \quad \text{(V)}$$

y si las áreas obtenidas son iguales **(V)** queda:

$$A_m = \frac{V_{ST}}{V_m} \cdot A_{ST} \quad \text{(VI)}$$

Corrigiendo por dilución/concentración.

Si se cambia el volumen de una solución cambiando sólo la cantidad de solvente, cambiará la concentración, aunque la cantidad de soluto permanecerá

constante e igual a  $T = [C]V$ . Por tanto, si se cambia la cantidad de solvente en una solución, desde un volumen inicial  $V_i$  a un volumen final  $V_f$  se tendrá:

$$[C]_i V_i = [C]_f V_f \quad \text{Entonces, si se conocen los volúmenes inicial y}$$

final y una de las concentraciones, es posible calcular la otra.

Supongamos que se conoce la concentración final, entonces la concentración inicial será:

$$[C]_i = \frac{V_f}{V_i} [C]_f \quad \text{(VII)}$$

Normalmente este es el caso cuando se hacen mediciones en el HPLC. La muestra inyectada es un concentrado o una dilución de la muestra que uno realmente quiere medir. Obsérvese que el cociente  $V_f/V_i$  es el factor de dilución/concentración, mayor que 1 si el volumen final es mayor que el inicial, es decir, en el caso de una dilución y menor que 1 en el caso de una concentración.

En la ecuación (IV),  $[T_m]$  corresponde a la concentración final de la ecuación (VII), por lo que despejando  $V_f$  de ésta y reemplazando en (IV) se obtiene:

$$[C]_m = [C]_M \frac{V_i}{V_f} = \frac{V_{ST}}{V_m} \frac{A_m}{A_{ST}} [C]_{ST}^{-}, \text{ donde } [T_m] \text{ es la concentración final (la}$$

concentración de la solución inyectada en el HPLC) y  $[T_M]$  la concentración de la solución inicial de la muestra.

Tomando la ecuación anterior y despejando  $[T_M]$  se tiene:

$$[T_M] = \frac{V_{ST}}{V_m} \frac{V_f}{V_i} \frac{A_m}{A_{ST}} [T_{ST}]$$

para evitar confusiones se adoptan las

siguientes convenciones:

$I_{ST}$  = Volumen inyectado del standard ( $V_{ST}$ )

$I_m$  = Volumen inyectado de la muestra ( $V_m$ )

$V_f$  = Volumen final de la dilución/concentración

$V_i$  = Volumen inicial de la dilución/concentración

$A_m$  = Area bajo el peak de la muestra

$A_{ST}$  = Area bajo el peak de la muestra

Por lo que la ecuación anterior se transforma en:

$$[T_M] = \frac{I_{ST}}{I_m} \frac{V_f}{V_i} \frac{A_m}{A_{ST}} [T_{ST}] \quad \text{(VIII)}$$

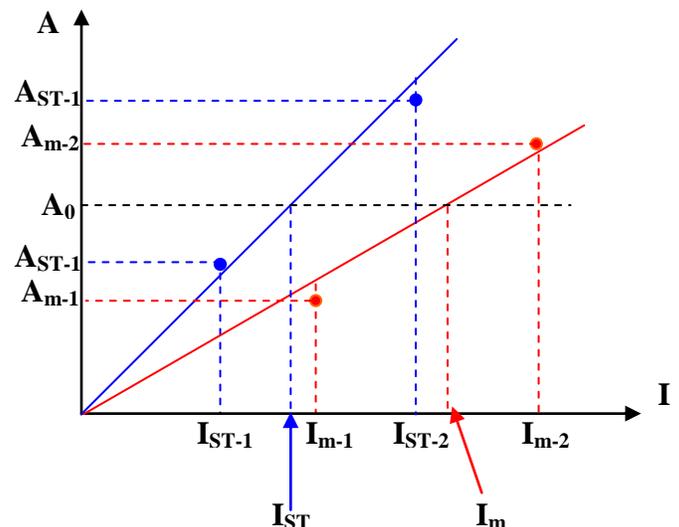
Optimizando las mediciones.

Hasta ahora se ha supuesto que la máquina se comporta siempre igual y que si se inyectan dos muestras iguales los resultados obtenidos serán iguales. Desafortunadamente, el HPLC -debido precisamente a su alta sensibilidad- es particularmente vulnerable aún a pequeños cambios, que hacen que dos mediciones consecutivas no produzcan necesariamente los mismos resultados.

A bajas concentraciones, el HPLC produce lecturas lineales con el volumen, es decir, para una concentración dada, el doble de volumen debe dar aproximadamente el doble de área bajo la curva (porque habrá el doble de soluto). Esto significa que si -para una muestra dada- se inyectan diferentes volúmenes, se debiera obtener una recta que pasa por el origen -porque a cero volumen inyectado, la lectura es plana y el área bajo la curva es cero- y entonces, se puede usar el siguiente protocolo:

- Inyectar al menos dos volúmenes diferentes del estándar en el HPLC
- Anotar los volúmenes inyectados y las áreas obtenidas
- Repetir los dos pasos anteriores para la muestra desconocida
- Graficar en Excel A v/s V para el estándar y para la muestra. Recuerde que en adición a los puntos obtenidos también tiene el punto (0,0)

- Instruir al programa para que ajuste una recta y despliegue la ecuación y el coeficiente de bondad de ajuste ( $R^2$ ) en pantalla para cada gráfico. Si  $R^2$  es inferior a 9,8 (más adelante se justifica este criterio) el ajuste no es bueno, es decir los resultados son muy dispares y se deben repetir las mediciones



**Figura 27.** Gráfico en Excel A v/s V para el estándar y para la muestra



por lo que la ecuación se simplifica a: 
$$\left[ \begin{matrix} I_M \\ \vdots \\ I_m \end{matrix} \right] = \frac{I_{ST}}{I_m} \frac{V_f}{V_i} \left[ \begin{matrix} - \\ - \\ - \\ - \\ - \end{matrix} \right]$$

Pero,  $A_0 = m_{ST} I_{ST} = m_m I_m$ , entonces

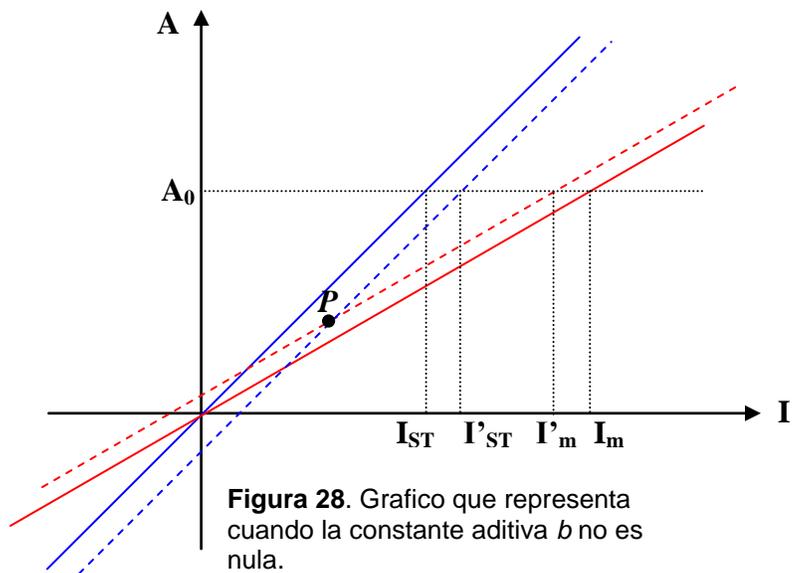
$$I_{ST} = \frac{A_0}{m_{ST}}, \text{ luego: } \frac{I_{ST}}{I_m} = \frac{A_0}{m_{ST}} \frac{m_m}{A_0} = \frac{m_m}{m_{ST}} \text{ y la ecuación anterior adopta la forma}$$

$$I_m = \frac{A_0}{m_m}$$

final: 
$$\left[ \begin{matrix} I_M \\ \vdots \\ I_m \end{matrix} \right] = \frac{m_m}{m_{ST}} \frac{V_f}{V_i} \left[ \begin{matrix} - \\ - \\ - \\ - \\ - \end{matrix} \right] \quad \text{(IX)}$$

Con esta ecuación se obtiene una buena estimación de la concentración de la solución madre (o muestra experimental, por ejemplo), ya que el proceso de ajustar la recta por el método de mínimos cuadrados que usa Excel, minimiza los errores individuales de medición y provee un estimador más confiable, las pendientes de las respectivas rectas de ajuste.

Cuando la constante aditiva  $b$  no es nula, se tiene la situación representada en la figura 28, o una variante de ella.



**Figura 28.** Grafico que representa cuando la constante aditiva  $b$  no es nula.

Las rectas correspondientes al estandar ( $A_{ST}$ ) y a la muestra ( $A_m$ ) en una situación ideal se intersectan en el origen (rectas continuas), en cambio, en muchas condiciones experimentales las rectas correspondientes se intersectan en un punto  $P$  distinto del origen. ¿Cómo afecta esta situación al cálculo de concentraciones?

De acuerdo a la ecuación (VIII), el factor más crítico es el que considera los volúmenes inyectados, es decir, el cociente  $I_{ST}/I_m$  y cada factor de este cociente es calculado de acuerdo a las ecuaciones de cada recta, es decir:

$$I_{ST} = \frac{A_0 - b_{ST}}{m_{ST}} \text{ y}$$

$$I_m = \frac{A_0 - b_m}{m_m}$$

por lo que el cociente que interesa es:  $\frac{I_{ST}}{I_m} = \frac{(A_0 - b_{ST}) m_m}{(A_0 - b_m) m_{ST}}$ , (IX) observe

$$\text{que: } \lim_{A_0 \rightarrow 0} \frac{(A_0 - b_{ST}) m_m}{(A_0 - b_m) m_{ST}} = \frac{b_{ST} m_m}{b_m m_{ST}} \quad \text{y} \quad \lim_{A_0 \rightarrow \infty} \frac{(A_0 - b_{ST}) m_m}{(A_0 - b_m) m_{ST}} = \frac{A_0 m_m}{A_0 m_{ST}} = \frac{m_m}{m_{ST}}$$

Por lo que nuevamente se obtiene la forma de la ecuación (IX):

$$I_M = \frac{m_m}{m_{ST}} \frac{V_f}{V_i} I_{ST}$$

Dado que las pendientes son constantes y la concentración de la muestra también lo es, este resultado resulta ser independiente del valor de  $A_0$ . Por último,

si bien los errores se minimizan usando las pendientes, es necesario asegurarse que las pendientes (que corresponden a la respectivas concentraciones) estén bien calculadas y no adolezcan de errores significativos. El ajuste a la recta proporcionado por Excel provee de un buen criterio de calidad: el coeficiente R, al cual se le exige  $R \geq 0,99$ . Excel calcula  $R^2$ , por lo que la exigencia será  $R^2 \geq 0,98$ .