

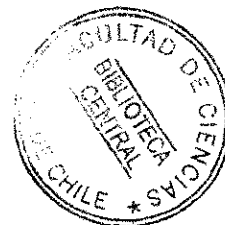
20H-FC  
70C-B  
3165  
C.2

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**SEDE SANTIAGO ORIENTE  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**TRANSPORTE DE CLORO Y SODIO A TRAVES DE LA PIEL  
IN SITU DE ANFIBIOS SUDAMERICANOS**

**ALFREDO SALIBIAN D.**



**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DOCTOR  
EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Santiago - Chile 1973**

Transporte de cloro y de sodio a través de la piel  
in situ de anfibios sudamericanos

**alfredo salibián d.**

Tesis para optar al Grado de  
Doctor en Ciencias con mención en Biología,  
Facultad de Ciencias,  
Universidad de Chile, Sede Santiago Oriente.  
1973

TRANSPORTE DE CLORO Y DE SODIO A TRAVES DE LA PIEL

IN SITU DE ANFIBIOS SUDAMERICANOS

Alfredo Salibián D.

Tesis para optar al Grado de  
Doctor en Ciencias con mención en Biología,  
Facultad de Ciencias,  
Universidad de Chile, Sede Santiago Oriente.

1973.

Tutores: Dr. Humberto Maturana  
Dr. Juan Concha,  
Dr. Fernando Vargas

ALFREDO SALIBIAN - Breve noticia biográfica.

Nació en Montevideo, República Oriental del Uruguay, el 24 de julio de 1937. A temprana edad pasó a Buenos Aires donde residió hasta noviembre de 1966. Durante su estadía en la República Argentina cursó sus estudios secundarios y universitarios; los primeros en el Colegio Nacional de San Isidro y los segundos en la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Obtuvo los títulos de Bachiller (1954), Farmacéutico (1959) y Bioquímico (1962), respectivamente.

En el Instituto de Química Orgánica de dicha Facultad inició sus actividades docentes universitarias, primero como ayudante alumno y después como Jefe de Trabajos Prácticos.

A comienzos de 1962 fué contratado por la Comisión Especial de Física Atómica y Radioisótopos de la Universidad Nacional de La Plata, desempeñándose en el Laboratorio de Ictiofisiología que dirigía el Prof. Dr. Federico García Romau; allí inició sus estudios sobre algunos aspectos de la osmoregulación de vertebrados acuáticos.

Su ingreso a la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, ocurre en diciembre de 1966. Se desempeña en el Laboratorio de Zoofisiología, donde continúa estudios referentes a la regulación hidro-electrolítica de anfibios chilenos, una parte de los cuales se presenta en esta Tesis.

En 1970, obtuvo, por revalidación, el grado de Licenciado en Ciencias con mención en Biología, Universidad de Chile.

Durante el período julio 1970 - junio 1972 se integró al grupo del Prof. Dr. Isidore S. Edelman, en el Medical Center de la Universidad de California, sede San Francisco; su estadía en los EE.UU. de N.A. fué auspiciada por un "Post-Doctoral Research Fellowship" de los National Institutes of Health de dicho país.

Actualmente es Investigador Independiente dedicación exclusiva del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Sede Santiago Oriente.



### AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS.

Escribir esta Tesis no fué tarea fácil; requirió sintetizar y concretar muchas ideas manejadas y maduradas por varios años, entre varios colegas, hubo que re-calcular decenas de experimentos, hubo que confeccionar tablas, gráficos, etc.

Una parte de los resultados ya vieron la luz; otro son inéditos o se darán a conocer en breve.

Deseo agradecer de manera especial a los que participaron en la elaboración de los innumerables experimentos que a continuación se resumen. La lista sería larga; nombraré de manera destacada, por orden alfabético, a quienes aportaron su inextinguible entusiasmo en esta tarea de empezar a entender algunos aspectos de la fisiología de los anfibios: Alicia Garrasco, Sonia Espina, Roberto Morano, Silvia Pezzani, Ana Preller, Luis Robres, Mireya Rojas y Berta Zamora.

Quiero también destacar a los Profesores Dres Juan Concha, Humberto Maturana y Fernando Vargas, quienes con su amistad, paciencia y experiencia hicieron que este trabajo fuese considerablemente diferente de la primera versión que llegó a sus manos...

Mi gratitud se extiende a las instituciones que financiaron la mayor parte de estos estudios: Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (Chile), y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Argentina).

A Federico García Romeu expreso mi profundo agradecimiento; gran amigo a quien debo mi iniciación en la disciplina científica. Su espíritu crítico e inquieto y su sólida preparación académica fueron un estímulo permanente aún después que el destino -llamémoslo así- nos separara en un triste día de febrero de 1969.

Un párrafo aparte merece Marisa, mi esposa, quien está, literalmente, detrás de cada letra o número de este trabajo.

A Federico y a Marisa dedico este esfuerzo.

Santiago de Chile, Noviembre de 1973.

RESUMEN

1. Se estudiaron las mecánicas de transporte de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in vitro de unos anfibios sudamericanos: Leptodactylus ocellatus, Bufo marinus y Colymbocophalella caudiverbera.
2. En las tres especies fué posible demostrar que ambos iones pueden ser captados desde la solución externa de manera independiente. Los animales son capaces, además, de ganar  $\text{Cl}^-$  o  $\text{Na}^+$  desde soluciones en las que el co-ión es impermeante (celina o  $\text{SO}_4$ ).
3. En C. caudiverbera es posible inhibir la captación de  $\text{Na}^+$  por adición de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  o procaína al baño externo; la adición de pentobarbital provoca la inhibición del transporte de  $\text{Cl}^-$ .
4. La captación de  $\text{Cl}^-$  a través de la piel de C. caudiverbera se hace por intercambio con  $\text{CO}_3\text{H}^-$  endógeno, el  $\text{Na}^+$  se capta por intercambio con  $\text{K}^+$ . En L. ocellatus, una parte del  $\text{Na}^+$  se intercambia por  $\text{NH}_4^+$  endógeno.
5. La inyección de hormonas neurohipofisarias a C. caudiverbera provoca la pérdida de aquella capacidad de absorber  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en forma independiente. Después de inyectar coitecina o vasotocina las ranas ganan dichos iones a la misma velocidad (flujos netos paralelos). La inyección de mesotocina provoca la pérdida neta de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$ , también a la misma velocidad.

## INDICE

	Página
<u>Primera Parte:</u> INTRODUCCION GENERAL	
1. Generalidades	1
2. Captación de iones por la piel de anfibios	3
<u>Segunda Parte:</u> TRANSPORTE DE $Cl^-$ Y DE $Na^+$ A TRAVES DE LA PIEL <u>IN SITU</u> DE <u>LEPTODACTYLUS OCELLA-</u> <u>TUS</u> , <u>BUFO ARUNCO</u> Y <u>CALYPTOCEPHALELLA</u> <u>CAUDIVERBERA</u>	
Capítulo I : Disociación e inhibición selectiva de los flujos iónicos netos	15
1. Introducción. Algunos antecedentes bibliográficos	16
2. Material y Métodos	18
3. Resultados	24
Capítulo II: Los iones intercambiados por $Cl^-$ y $Na^+$ del baño externo	43
1. Introducción	43
2. Material y Métodos	43
3. Resultados	44
<u>Tercera Parte:</u> EFECTO DE LAS HORMONAS NEUROHIPOFISARIAS SOBRE LOS FLUJOS NETOS DE $Cl^-$ Y DE $Na^+$ A TRAVES DE LA PIEL <u>IN SITU</u> Y SOBRE LA DIURESIS DE <u>CALYPTOCEPHALELLA CAUDIVER-</u> <u>BERA</u> .	
1. Introducción	57
2. Material y Métodos	57
3. Resultados	58

Cuarta parte: DISCUSION GENERAL

1. Efecto de las pre-adaptaciones sobre el medio interno	74
2. Independencia de los flujos netos de $\text{Cl}^-$ y de $\text{Na}^+$	77
3. Naturaleza de los iones endógenos intercambiados por $\text{Cl}^-$ y $\text{Na}^+$	82
4. Origen de los iones endógenos	86
5. Efecto de las hormonas neurohipofisarias sobre los flujos netos de $\text{Cl}^-$ y de $\text{Na}^+$	88
6. Algunas consideraciones finales	91
 Referencias bibliográficas	 93



Primera Parte.

INTRODUCCION GENERAL.

1. Generalidades.

La Clase Amphibia constituye un eslabón crítico en la colonización de la tierra<sup>1</sup>. De las dos mil especies de batracios actuales, las salamandras y tritones (Sub Clase Urodela o Caudata) se encuentran mayormente en las zonas templadas del Hemisferio Norte. Los sapos y ranas (Sub Clase Anura o Salientia) tienen una distribución mucho mayor, desde el Artico hasta las zonas desérticas de África, Australia y América. La tercera SubClase, Apoda, está confinada a zonas tropicales y es, posiblemente, la más pequeña y la menos conocida desde el punto de vista fisiológico. El continente Antártico no posee Anfibios vivientes<sup>2</sup>.

La Paleontología nos informa acerca de la estrecha relación que liga a los anfibios con los peces por un lado, y con los reptiles por otro. Se trata de un proceso que empezó en el Devónico (o posiblemente en el Silúrico) cuando los crosopterigios originaron a los antecesores de los anfibios actuales, los laberintodontes, y que se completa al final del Paleozoico, cuando una parte de ellos da lugar a los reptiles (Romer, 1972, 1973; Szarski, 1962).

---

<sup>1</sup>) El nombre de la Clase (del griego amphi, doble y bios, vida), acuñado por Linneo, apunta al hecho de que la mayor parte de las especies actuales habita en la tierra y pasa parte de su vida en el agua dulce. Sin embargo, dicho carácter "anfibio" no es exclusivo de los batracios.

<sup>2</sup>) Son interesantes los hallazgos recientes de numerosos restos fósiles de laberintodontes en el Triásico Inferior de Antártida (véase Pöfaur, 1972). Este importante descubrimiento es una valiosa evidencia en favor de la deriva continental y de la ligazón que hubo entre dicho continente y algún otro del Hemisferio Sur.

La transición de peces → anfibios, primera etapa de la transición vida acuática → vida terrestre, implica una serie de adaptaciones morfológicas (Carroll, 1970; Romer, 1972; Schaeffer, 1969; Schmalhausen, 1968) y fisiológicas (Bentley, 1966 a; Gans, 1970; Schmalhausen, op. cit.; Szarski, op. cit.; Thomson, 1971; Whitford, 1973). De éstas, quizás las más importantes están asociadas a la vida en un medio de sequía estacional que favoreció tanto la selección de adaptaciones a la respiración aérea como las modificaciones que permitieron mantener adecuadamente su equilibrio hidrosalino.

La branquia, y en mucho menor grado el intestino, es el lugar por el que los peces dulceacuícolas regulan su equilibrio hidro-electrolítico (Maetz, 1971); es en ella donde se hace el pasaje de agua y en donde se intercambian iones monovalentes del medio externo por otras especies endógenas (Maetz, 1970; Motais y García Romeu, 1972). Prácticamente en todos los peces de agua dulce la piel es una estructura inerte frente a los cambios del medio; en cambio, la de los anfibios adultos tiene un rol preponderante en este tipo de intercambio constituyendo la estructura que permite captar agua, iones, y es, además, el lugar por donde se hace gran parte del intercambio gaseoso. Asimismo, lo que en adelante llamaremos "sistema renal" (vejiga urinaria y riñón), pasa a ocupar un lugar destacado en la preservación del balance hidromineral (Bentley 1966 b, 1971).

Debido al gradiente osmótico que existe entre su medio interno y el externo, los peces de agua dulce deben desprenderse del agua que los invade constantemente. Dicho exceso de agua se elimina por el riñón que emite copiosas cantidades de orina hipotónica (Lahlou, 1970). Los batracios, por el contrario, debido a las características de su habitat, enfrentan el problema inverso: la desecación; en este sentido, su problemática es similar a la de los teleosteos marinos.

2. Captación de iones por la piel de anfibios.

- Estructura esquemática de la piel. La piel de los anfibios es una compleja estructura que es objeto de estudio desde hace varios años. La mayor parte de la información que sigue fue tomada de los estudios de Farquhar y Palade (1964, 1965, 1966) sobre material proveniente de diversos anuros y urodelos.

En la Figura 1 se representan, en forma esquemática, las capas que la constituyen.

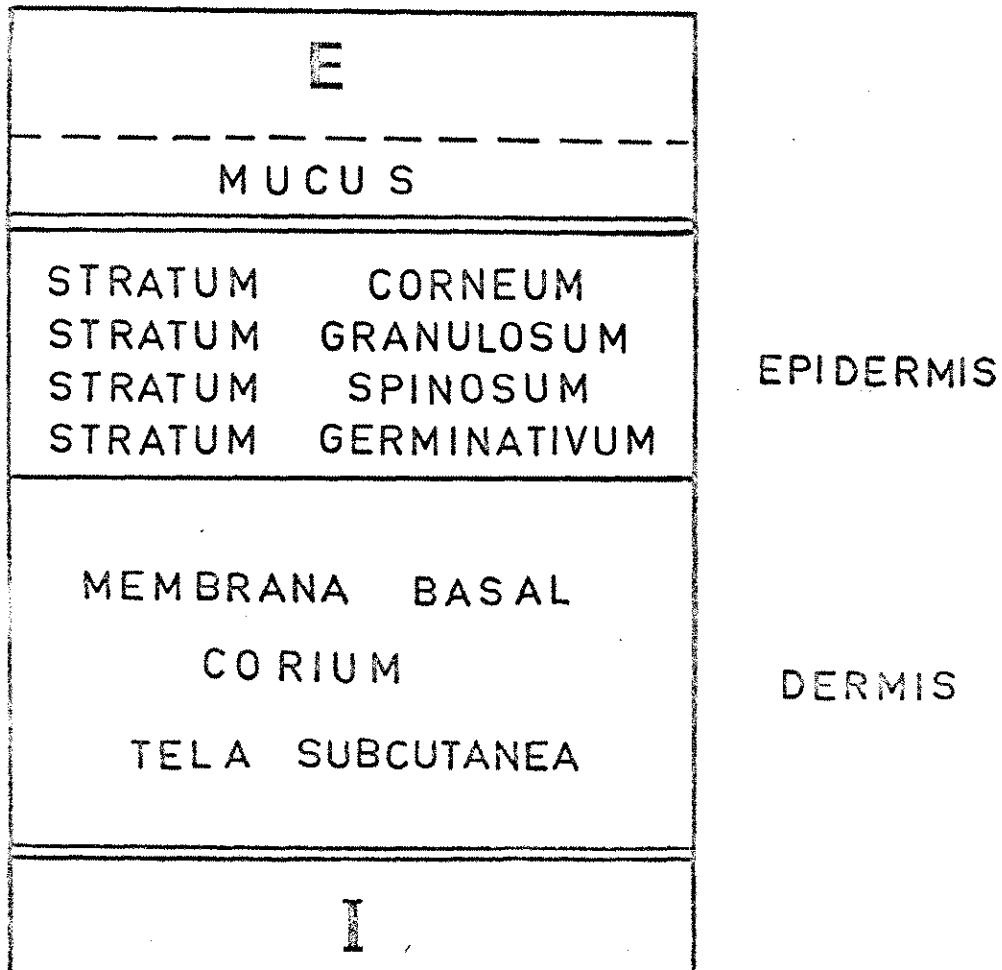


FIGURA 1. Capas celulares de la piel de anfibios; E: medio externo, I: medio interno.

Las células del stratum corneum son escamosas, parcialmente cornificadas, y están unidas entre sí por los zonula occludens y constituyen la única estructura continua de la piel. Las células de los otros stratum están en contacto por desmosomas. El s. granulosum y el s. spinosum están formados por células cúbicas o poliédricas; el s. germinativum está formado por células columnares o cúbicas. El corium (tejido conectivo) contiene glándulas, cromatóforos y fibras musculares.

El espesor total de la piel de los anfibios varía de una especie a otra, siendo el corium unas 4-5 veces más ancho que la epidermis (Czopek, 1962, 1967). Mediciones efectuadas por nosotros<sup>3</sup> indican que la dermis de Calyptocephalella caudiverbera recién capturada es 4.5 veces más ancha que la epidermis; el espesor total de la piel oscila alrededor de 0.9 mm .

En la Figura 2 se representan, también de manera simplificada, las inter-relaciones de los diferentes tipos celulares de la epidermis.

En un trabajo reciente histoquímico de van Lennepe y Komnick (1971) se sugiere que el mucus que generalmente cubre la epidermis de muchos anfibios, puede jugar un papel no despreciable en el transporte de iones absorbiendo  $Cl^-$  (y posiblemente  $Na^+$ ).

En la Figura 3 se muestra, por último, la imagen microscópica (óptica) de la piel de C. caudiverbera; sus características se corresponden, de manera general, con las descritas para otros anuros.

---

<sup>3</sup>) En colaboración con los Dres. A. Moreno y D. Crovari hemos iniciado un estudio sobre la morfología de la piel de la rana chilena; la Figura 3 es parte de dicho trabajo (en preparación).

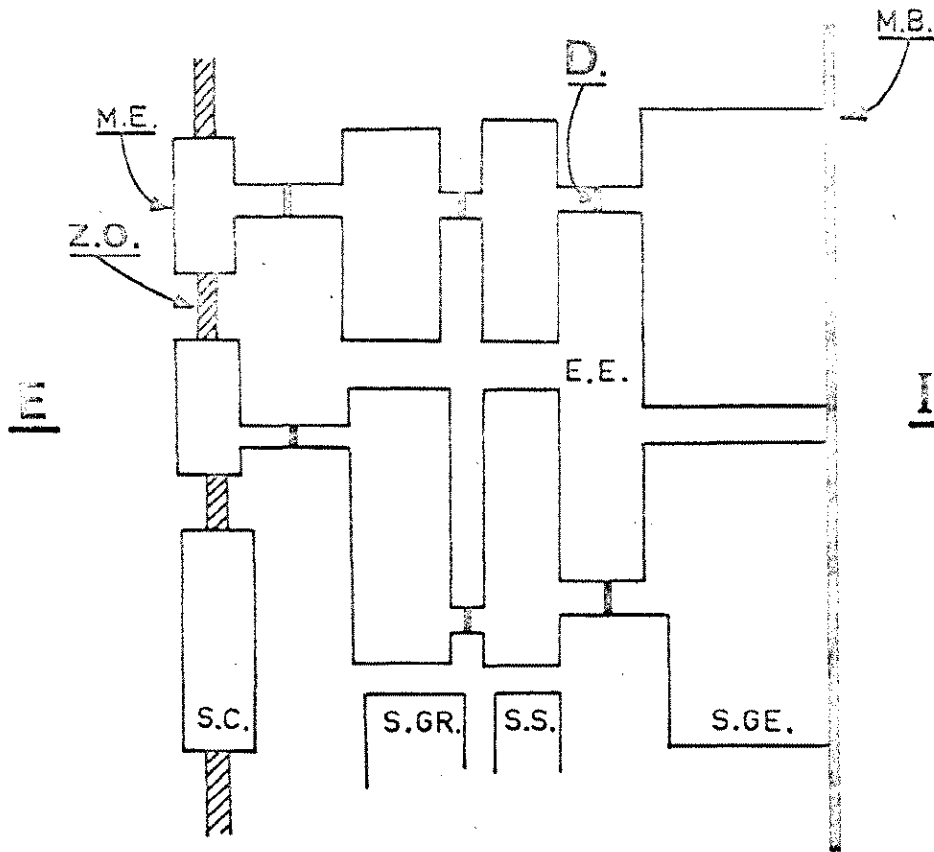


FIGURA 2. Representación esquemática de las capas celulares de la epidermis de anfibios. E: exterior; I: medio interno; ME: membrana externa; ZO: zonula occludens; D: desmosomas; SC: stratum corneum; S.GR: stratum granulosum; S.GE: stratum germinativum; MB: membrana basal; EE: espacio extracelular.

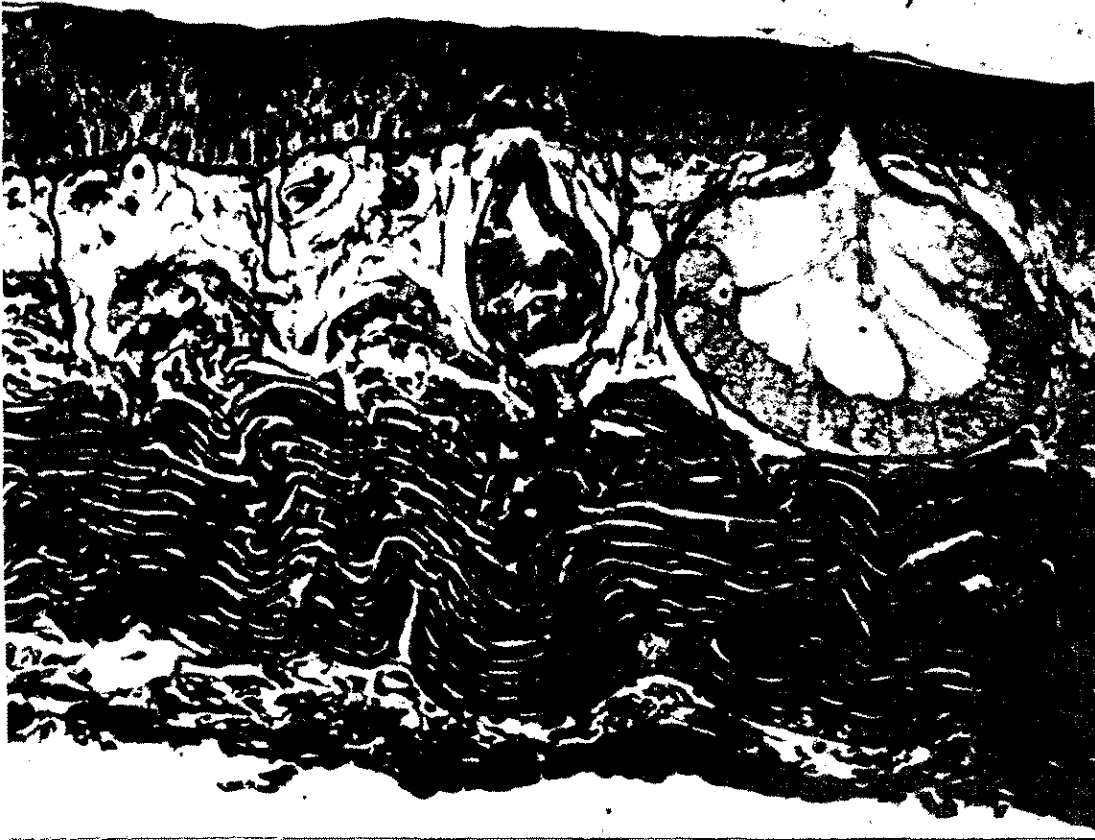
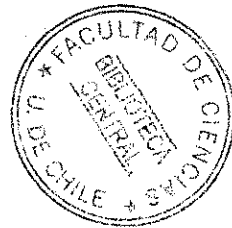


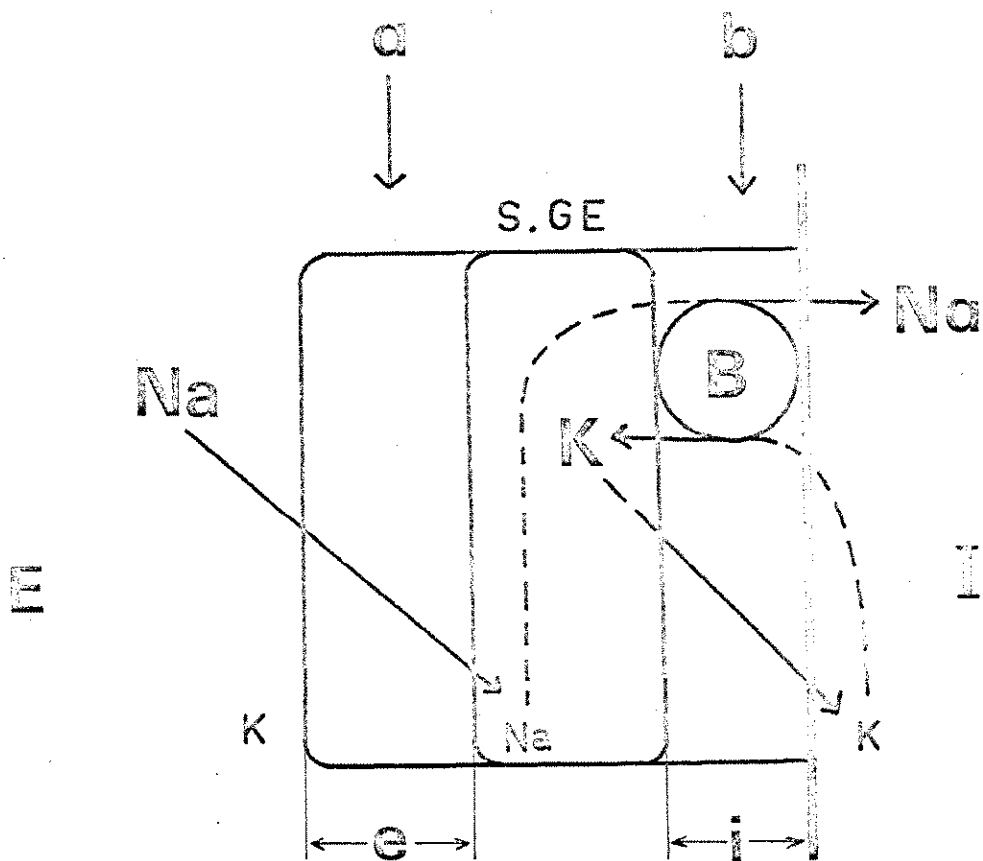
FIGURA 3. Imagen al microscopio óptico de la piel ventral de Calyptocephalella caudiverbera



- El modelo de Koefoed-Johnsen y Ussing. De 1935 data la primera comunicación (Huf) dando cuenta de la capacidad de la piel aislada de transportar activamente  $\text{Na}^+$ . Poco después, Krogh (1937) demostró que la piel in situ también era capaz de absorber iones desde soluciones muy diluidas. A partir de entonces, la bibliografía muestra una gran masa de información acerca de las propiedades "transportadoras" de la piel de anfibios. La mayor parte de la misma se obtuvo gracias a una preparación diseñada por Ussing y Zerahn (1951) la que con ligeras variantes sigue siendo utilizada no sólo para el estudio de los flujos iónicos a través de la piel sino también para el de otros epitelios.

Cuando un trozo de piel ventral de anfibio es colocado separando dos soluciones de igual concentración, se genera una diferencia de potencial transepitelial de aproximadamente 100 mV, siendo el lado interno (o seroso) positivo. Se demostró que la corriente necesaria para anular dicho potencial espontáneo ("corriente de corto circuito") es una medida indirecta y proporcional del transporte de  $\text{Na}^+$  desde el lado externo (o mucoso) al interior (Ussing y Zerahn, op. cit.). Asimismo, bajo condiciones de corto circuito, es posible distinguir los flujos iónicos activos de los pasivos; en ausencia de gradientes de concentración, los flujos unidireccionales son iguales en el caso de los elementos transportados pasivamente (véase Lindley, 1970).

La Figura 4 (tomada de Ussing, 1960) ilustra esquemáticamente el modelo que estamos discutiendo.



**FIGURA 4.** Modelo de transporte de  $\text{Na}^+$  de Koefoed-Johnsen y Ussing;  
E: exterior; I: medio interno; S.GE: stratum germinativum ;  
e: cara externa del S.GE; i: cara interna del S.GE.; B: Bomba  
de sodio. La flecha a indica el sitio del primer potencial;  
la flecha b señala el lugar del segundo potencial de difusión.

Básicamente, el modelo que en lo sucesivo llamaremos "de Ussing"  
(Koefoed-Johnsen y Ussing, 1958) establece que:

a) la piel "normal" (no cortocircuitada o en circuito "abierto"  
transporta Na en contra de gradientes eléctricos y químicos (transporte  
activo); el Cl acompaña pasivamente al Na, por arrastre electrostático,



b) La piel en corto circuito transporta  $\text{Na}^+$  (también activamente) y su flujo neto es proporcional a la corriente necesaria para anular aquélla diferencia de potencial espontáneo, y

c) el potencial eléctrico transepitelial aumenta proporcionalmente con el aumento de la concentración de  $\text{Na}^+$  en contacto con la epidermis y cuando disminuye la de  $\text{K}^+$  en contacto con la cara interna de la piel. La diferencia de potencial y el pasaje de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Cl}^-$  quedan anulados cuando no hay potasio en el lado interno.

Fue sugerida la existencia de dos barreras selectivamente permeables al  $\text{Na}^+$  (la externa) y al  $\text{K}^+$  (la interna). El  $\text{Na}^+$  difunde pasivamente (por gradiente de concentración) desde el exterior al interior de la célula por la membrana externa del stratum corneum, la célula se hace positiva (con respecto al exterior) generando una diferencia de potencial. El pasaje de  $\text{Na}^+$  (ahora intracelular) al medio interno se haría en la membrana del s. germinativum en contacto con la membrana basal de la célula, por intercambio estequiométrico con  $\text{K}^+$  extracelular. En otras palabras, la bomba de  $\text{Na}^+$  propiamente tal no sería electrogénica. Los  $\text{K}^+$  difundirían libremente desde la célula al medio interno a favor de un gradiente de concentración generando otro potencial de difusión (el medio subepitelial se hace positivo con respecto al medio intracelular). Consecuentemente, los niveles intracelulares de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  quedarían constantes a pesar de haber transferencia neta de  $\text{ClNa}$ .

La asimetría eléctrica, manifiesta en la diferencia de potencial espontáneo, sería igual a la suma de aquéllos dos potenciales de difusión (de Nernst) en serie:

$$E = E_{\text{Na}} + E_{\text{K}} = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{\text{Na}_o}{\text{Na}_i} \cdot \frac{\text{K}_o}{\text{K}_i} \right)$$

donde: E: diferencia de potencial total,  $E_{\text{Na}}$ : diferencia de potencial en la cara externa,  $E_{\text{K}}$ : diferencia de potencial en la cara interna,

R, T y F: constantes,  $\text{Na}_o$ : concentración de  $\text{Na}^+$  en el medio externo,  $\text{Na}_i$ : concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}_o$ : concentración de  $\text{K}^+$  en el medio externo y  $\text{K}_i$ : concentración intracelular de  $\text{K}^+$ .

Recientemente, se han confirmado muchas de las propiedades anteriormente enumeradas en preparaciones de epidermis aislada de Rana pipiens (Erlj, 1971), Rana esculenta (Carasso, Favard, Jand y Rajerison, 1971) y de Bufo bufo (Rawlins, Mateu, Fragaohan y Whitttembury, 1970).

Este esquema de transporte "transcelular" de  $\text{Na}^+$  (y de  $\text{Cl}^-$ ) es, hasta hoy, el de mayor difusión a pesar de que el trabajo experimental basado o inspirado en el modelo ha sugerido, con el transcurso del tiempo, algunas modificaciones (Ussing, 1969). Más aún, su validez ha sido cuestionada y en su lugar se ha propuesto otro modelo de transporte "pericelular" (Cereijido y Rotunno, 1970). Alternativamente, Norris y colaboradores (1972) concluyeron, por su parte, que el transporte transepitelial de  $\text{Na}^+$  por la piel de Bufo spinulosus arunco implica la activa participación de las glándulas coriónicas.

No es nuestro propósito extendernos en la referencia específica a las objeciones que merece el modelo de Ussing; el lector interesado puede consultar, además de los trabajos del grupo del Dr. Cereijido, recientes artículos que se ocupan de presentarlas y discutir las extensamente (Herrera, 1971; Keynes, 1969; Motais y García Romeu, 1972).

- "In vitro" versus "in vivo". Breve análisis crítico. Con el tiempo se hizo evidente que la información cuali y cuantitativa obtenida por intermedio de preparaciones in vitro no era extrapolable a las propiedades de la piel in situ<sup>4</sup>.

En el caso de la piel aislada de Rana esculenta y R. temporaria, por ejemplo, sólo se ha podido detectar transporte activo de  $\text{Na}^+$  siendo

---

<sup>4</sup>) En las páginas que siguen utilizaremos las expresiones in situ e in vivo como sinónimos, esto es, la piel del animal intacto.

el de  $\text{Cl}^-$  un pasaje pasivo, tal como lo prevé el modelo de Ussing. Sin embargo, Jorgensen, Levi y Zerahn (1954) demostraron en dichas especies la existencia, in vivo, de transportes activos de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Cl}^-$ . En la piel aislada de R. pipiens también se observó pasaje activo de  $\text{Cl}^-$  cuando la concentración en el medio es adecuadamente modificada (Martin, 1964; Martin y Curran, 1966).

Discrepancias cualitativas como las mencionadas se entienden cuando se recuerda de que en condiciones de corto circuito es prácticamente imposible detectar transporte activo de aniones toda vez que sus electrones son utilizados para transportar la corriente necesaria para anular el potencial espontáneo de la piel aislada (Davson, 1970). Los diferentes "modelos" que se proponen son esquemas que justifican el pasaje de cationes "sobrentendiendo" la dificultad de un mecanismo activo de pasajes de aniones, específicamente de  $\text{Cl}^-$ .

Las diferencias también son cuantitativas; en la Tabla 1 se comparan los resultados obtenidos en la piel in vivo de dos especies que han sido estudiadas por nosotros con algunos de los datos in vitro; de los últimos, con el objeto de que las cifras sean comparables, hemos escogido aquéllos en los que el lado mucoso de la piel estuvo en contacto con bajas concentraciones de  $\text{Na}^+$  (1 - 10 mM).

Varias son las razones que podríamos argüir para justificar discrepancias como las que acabamos de comentar e ilustrar. En general, diremos que las condiciones in vitro constituyen un sistema en sí mismas, con sus propias variables, que no necesariamente corresponden a las situaciones de los animales intactos. Recordaremos que prácticamente todos los datos in vitro se obtuvieron poniendo el lado externo de la piel aislada en contacto con soluciones Ringer cuyas composiciones casi nunca corresponden a las que los animales están sometidos en su habitat natural. Dichas soluciones son isotónicas con respecto al medio interno; en cambio, los anfibios no están en contacto con

TABLA 1. Comparación de los flujos netos de  $\text{Na}^+$  ( $\text{fn Na}^+$ ) a través de la piel in vivo e in vitro de Leptodactylus ocellatus y Calyptocephalella caudiverbera. Datos en  $\mu\text{Eq}/\text{hr} \times \text{cm}^2 \pm \text{ESM}$ .

Especie	N	$\text{fn Na}^+$	Referencias bibliográficas.
<u>L. ocellatus:</u>			
<u>in vivo</u> *	8	$0.018 \pm 0.007$	Este trabajo, Tabla 5.
<u>in vitro</u>	9	$0.50 \pm 0.07$	Rotunno y Cereijido, 1966.
<u>C. caudiverbera:</u>			
<u>in vivo</u> *	7	$0.022 \pm 0.004$	Este trabajo, Tabla 8.
<u>in vitro</u>	-	0.09	Carlisky, 1970 <sup>a</sup> .

\* ) Re-calculados con el auxilio de las ecuaciones de la Tabla 4; N: número de experimentos; a: el autor no indica el número de mediciones ni su error standard.

soluciones cuya concentración de  $\text{Na}^+$ , por ejemplo, sea superior a los 5-10 mM, siempre hipo-osmóticas con respecto a su medio interno<sup>5</sup>. Más aún, confirmando el comentario anterior están algunas de las críticas al modelo de Ussing que surgen del hecho de que dicho esquema de transporte de  $\text{Na}^+$  a través de la piel aislada no se cumple cuando su concentración en el Ringer utilizado es menor de 10 mM (Cereijido, Herrera, Flanigan, y Curran, 1964). Otro tanto ocurre con el  $\text{Cl}^-$  (Martin, op. cit.; Martin y Curran, op. cit.). Cereijido, Reisin y Rotunno (1968) demos-

<sup>5</sup> Se conocen unas pocas excepciones (Rana cancrivora y Bufo viridis, por ejemplo) que viven en contacto con agua de mar.

traron que las modificaciones en la concentración de  $\text{Na}^+$  externo van acompañadas de cambios en la concentración de  $\text{Na}^+$  del epitelio de Leptodactylus ocellatus; en la misma especie, también se ha visto que la magnitud del flujo neto de  $\text{Cl}^-$  in vitro es dependiente de su concentración externa a partir de los 60 mM (Fischbarg, Zadunaisky y de Fisch, 1967).

Además, en 1966, Biber, Chez y Curran vieron que los influjos de  $\text{Na}^+$  a través de la piel aislada de Rana pipiens cuyo lado mucoso está bañado con solución de  $\text{ClNa}$  1 mM, varían significativamente según la condición bajo la cual se hacen las mediciones (0.40 y 0.08  $\mu\text{M/hr}$   $\times \text{cm}^2$  en "corto circuito" y en "circuito abierto", respectivamente).

Por otra parte, se ha llamado la atención acerca de los artefactos que se provocan en las preparaciones de piel de anfibios in vitro debido a daños mecánicos (Dobson y Kidder, 1968; Helman y Miller, 1971) o a la diferente velocidad de difusión de los isótopos radiactivos a través del corium (Hoshiko, Lindley y Edwards, 1964). Recientemente Vcôte y Ussing (1968) mostraron que la ultraestructura de la piel aislada de R. temporaria se modifica irreversiblemente según esté o no bajo condiciones de corto circuito.

Nutbourne (1968) mostró que el transporte de  $\text{Na}^+$  y las propiedades eléctricas de la piel son afectadas por pequeños gradientes de presión hidrostática que puedan existir a ambos lados del epitelio aislado de la misma R. temporaria o por el pandeo de la piel; sabemos que dichas variables son muy difíciles de controlar.

La piel aislada es una preparación en la cual el epitelio en estudio está denervado y carente de los aportes provenientes de su sistema circulatorio; se sabe que dichos factores no son despreciables y que afectan significativamente la permeabilidad iónica de la piel aislada de los anfibios (González, Sánchez y Concha, 1967, 1969; Salée y Vindrequin-Deliège, 1967; Schoffeniels y Salée, 1965).

No es justo ignorar aquéllos trabajos que a pesar de utilizar técnicas in vivo, someten a los animales a condiciones experimentales que son tanto o más "anti-fisiológicas" como las que separan la piel y la montan entre dos cámaras de plástico o vidrio y llenas de Ringer. En este sentido, debemos mencionar que excepción hecha de los clásicos experimentos de Krogh (ver Krogh, 1939) -y ahora los nuestros- los datos de flujos iónicos que provienen de experimentos con la piel in situ también merecen cierto reparo ya que se trata de animales demedulados (Torelli, Celentano, Cortili y Guella, 1968), anestesiados con pentobarbital (Brown, 1962), etc y sin haber controlado adecuadamente el efecto de estos tratamientos sobre las propiedades de transporte iónico del epitelio.

Todo lo que antecede no significa renegar definitivamente de las técnicas in vitro; mas bien implica una llamada de atención para subrayar la necesidad de estar comparando crítica y permanentemente sus resultados con aquéllos obtenidos sobre el animal entero.

Diremos, en resumen, que la información proveniente de las técnicas in vitro o in vivo debe a) ser integrada adecuadamente en el correcto contexto (físicoquímico, fisiológico, ecológico, etc) en el que la naturaleza abriga en la actualidad a los anfibios, y b) que toda extrapolación a situaciones experimentales más complejas debe ser cuidadosamente evaluada.

En las páginas que siguen nos ocuparemos, principalmente, de los mecanismos de captación de  $Cl^-$  y de  $Na^+$  a través de la piel in vivo de tres especies de anfibios sudamericanos: Leptodactylus ocellatus (L.) Calyptocephalella caudiverbera (L.) y Bufo arunco (Lesson). Adicionalmente, en el caso de C. caudiverbera, hemos incursionado en el estudio del efecto de las hormonas neurohipofisarias sobre esos mecanismos de transporte iónico. Trataremos de contestar algunas preguntas básicas:

¿cómo penetran el  $\text{Cl}^-$  y el  $\text{Na}^+$ ?, ¿cuáles son los iones endógenos intercambiados por los externos?, ¿de qué manera afectan los cambios externos a los mecanismos de pasaje de iones?, ¿cuál es la regulación endocrina de dichos mecanismos?. Cuando sea posible, compararemos nuestros resultados con la información disponible de experimentos realizados sobre los mismos epitelios in vitro.

El conocimiento de la regulación electrolítica de las especies arriba mencionadas ofrece un interés especial ya que su secuencia de hábito (acuático, semi-acuático y terrestre) permite conocer, comparativamente, algunos aspectos de la fisiología hidromineral de los anfibios y, por extensión, de los vertebrados acuáticos.

El estudio de los mecanismos de captación de iones a través de la piel de anfibios posee, además, un valor potencial para el entendimiento de procesos cualitativamente similares a los que se observan en otros epitelios como, por ejemplo, el del túbulo distal del nefrón de mamífero (Dicker, 1970); en este sentido, otras disciplinas, como la farmacología, pueden ser enriquecidas con la información brindada por estudios como el presente.

## Segunda Parte.

TRANSPORTE DE  $Cl^-$  Y DE  $Na^+$  A TRAVÉS DE LA PIEL IN SITU DE  
LEPTODACTYLUS OCELLATUS, BUFO ARUNCO Y CALYPTOCEPHALELLA  
CAUDIVERBERA.

Capítulo I. DISOCIACION E INMERSION SELECTIVA EN LOS FLUJOS  
IONICOS NETOS.

1. Introducción. Algunos antecedentes bibliográficos.

Largo sería enumerar los antecedentes bibliográficos que se ocupan específicamente de los mecanismos de transporte iónico a través de la piel del leptodactílido Leptodactylus ocellatus. Entre los aportes moderno quisieramos destacar los valiosos trabajos producidos en el laboratorio del Dr. Marcelino Cereijido, en Buenos Aires (Cereijido y Rotunno, 1970; Cereijido, Moreno, Reisin, Rodríguez, Rotunno y Zylber, 1973; Moreno, Reisin, Rodríguez, Rotunno y Cereijido, 1973), quien desde hace varios años está estudiando sus mecanismos de captación de  $Na^+$  in vitro. L. ocellatus es una especie de hábitos semi-aquáticos y una de las pocas en las que se ha descrito un transporte neto de  $Cl^-$  a través de la piel aislada (Zadunaisky, Candia y Chiaradoni, 1963).

Con referencia al bufónido Bufo arunco, debemos mencionar de manera especial los aportes del grupo de la Universidad de Concepción que se ha ocupado del efecto de diversos mediadores de la conducción nerviosa sobre las propiedades eléctricas de la piel en relación al transporte de  $Na^+$  in vitro (González, Sánchez y Concha, 1966, 1969; Norris, Concha, González y Sánchez, 1972; Sánchez, González y Concha, 1966).



Calyptocephalella caudiverbera es también un leptodactílido especie y género endémicos de Chile, que en estado adulto es de hábito acuático (Carlisky, Cereijido, Barrio y Migliora, 1970; Cei, 1962). Casamiquela (1963) ha comunicado el hallazgo de Gigantobatrachus parodii, anuro fósil del Mioceno de la Patagonia argentina, cuya morfología es, salvo la talla, casi idéntica a la de C. caudiverbera. La denominación sistemática de la "rana chilena" fué recientemente modificada por Donoso-Barros (1970)<sup>6</sup>; la nomenclatura anterior era Calyptocephalella ravi. La única información que pudimos conocer referente al transporte de iones a través de la piel de C. caudiverbera se encuentra en los trabajos de Carlisky (1970) y de Carlisky, Cereijido, Barrio y Migliora (*op. cit.*).

Los experimentos que se presentan a continuación procuran contestar uno de los interrogantes que nos planteamos en la Introducción General: ¿cómo penetran el  $\text{Cl}^-$  y el  $\text{Na}^+$  a través de la piel de estas especies? . Veremos que bajo ciertas condiciones experimentales es posible demostrar que los flujos iónicos netos de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  a través de la piel in vivo son independientes, dissociables.

Además, en el caso de C. caudiverbera se verá que la captación de dichos iones se hace por intercambio con  $\text{CO}_3\text{H}^-$  e  $\text{H}^+$  endógenos respectivamente.

En lo que sigue denominaremos, siguiendo la nomenclatura vulgar, como "ranas" a L. ocellatus y C. caudiverbera, a pesar de no pertenecer al género Rana; asimismo, nos referiremos a B. arunco como "sapo".

---

<sup>6</sup>) Poco después, Lynch (1971) publicó un extenso trabajo crítico acerca de los leptodactílidos en el cual discute, entre otras cosas, su ubicación sistemática.

## 2. Material y Métodos.

- Origen y mantenimiento de los animales. Leptodactylus ocellatus fué capturado en la provincia de Buenos Aires, Argentina, en los alrededores de la ciudad de La Plata. Los ejemplares de Calyptocephalella caudiverbera y de Bufo arunco provinieron de la zona central de Chile. En casi todos los casos, una vez llegados al laboratorio, los animales fueron colocados en recipientes con agua potable; en ciertos casos, fueron mantenidos en piscinas, al aire libre. La cantidad de agua a la que tenían acceso era regulada de acuerdo a sus hábitos.

Los animales permanecieron en estas condiciones por períodos variables (desde pocos días hasta 6 semanas, aproximadamente); eran alimentados por la fuerza con trozos de diversas vísceras de vacuno, porcino, u ovino. A veces fueron alimentados con renacuajos de C. caudiverbera o con pequeños Pleurodema; en este último caso la alimentación es espontánea.

En todos los experimentos se utilizaron ejemplares adultos, sin considerar su sexo. Los animales con heridas en la piel, con signos de alguna infección o que no aparentaban estar en buenas condiciones de salud, fueron, según el caso, aislados hasta su mejoría o sacrificados. Tampoco fueron utilizados aquéllos animales que al momento del experimento estaban mudando. El rango de peso de los animales usados, en gramos  $\pm$  error standard de la media (ESM), figura en las diferentes Tablas. "N" significa, en todos los casos, número de mediciones o experimentos.

- Pre-adaptación de los animales. Con anterioridad a la medida de los flujos iónicos, los animales fueron mantenidos en pequeños recipientes por períodos que oscilaron, según el protocolo experimental, en 2 y 4 semanas, en alguna de las soluciones cuyos detalles de concentración se dan en la Tabla 2; el pH de las soluciones osciló alrededor de 6.4 y el del agua potable fué de 7.7 - 7.9.

TABLA 2. Concentraciones de las soluciones de pre-adaptación.

Solución	Concentración (mEq/l)
ClNa	0.4
ClNa	1.7
ClNa	3.4
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	3.4
Cl-colina	3.4
ClNH <sub>4</sub>	0.4
Agua potable	2.0 - 4.0

TABLA 3. Concentraciones de Cl<sup>-</sup> y de Na<sup>+</sup> en el suero de Salvatorella caudiverbera, pre-adaptada en agua potable y en soluciones de ClNa . Datos en mEq/l  $\pm$  ESM.

Pre-adaptación	N	Cloremia	Natremia
Agua potable	6	69.9 $\pm$ 2.3	105.6 $\pm$ 2.4
ClNa 1.7 mEq/l	5	72.3 $\pm$ 0.6	106.3 $\pm$ 1.8
ClNa 3.4 mEq/l	6	72.1 $\pm$ 1.4	106.1 $\pm$ 1.9

Los animales pre-adaptados en soluciones de  $\text{ClNa}$  fueron considerados como controles; en la Tabla 3 se muestra que la cloremia y la natremia de *C. caudiverbera* no es diferente de la de las ranas mantenidas en agua potable; el hematocrito promedio de los animales pre-adaptados en agua potable fue 29.8 %, mientras que el de los mantenidos en  $\text{ClNa}$  3.4 mEq/l fue 26.0 %. La pre-adaptación en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  se hizo con el propósito de exaltar los mecanismos de transporte de  $\text{Cl}^-$ ; inversamente, la pre-adaptación en Cl-colina o en  $\text{ClNH}_4$  se hizo con el objeto de exaltar los mecanismos de transporte de  $\text{Na}^+$ .

En general se acepta que el  $\text{SO}_4^{--}$  no penetra la epidermis de anfibios (Alvarado y Moody, 1970; Dietz, Kirschner y Porter, 1967); en el caso particular de la piel in situ de *C. caudiverbera* ciertos experimentos preliminares (A. Salibián y C. Matamala, inédito) nos permiten afirmar que dicho ion no la penetra. Asimismo, la colina es un catión que también se considera impermeante en la piel de anfibios (Kirschner, 1960), aunque puede afectar el influjo de  $\text{Na}^+$  a través de la piel aislada de *Rana pipiens* (Macey y Kobliok, 1963)

La pre-adaptación en agua destilada y deionizada se efectuó con la intención de depletar los animales de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$ .

El periodo de pre-adaptación transcurrió siempre en el laboratorio; en verano a la temperatura ambiente y en invierno a 18 - 20 °C (estufas). La alimentación era generalmente suspendida una semana antes de los experimentos.

Todas las especies utilizadas soportaron fácilmente la pre-adaptación en las soluciones de  $\text{ClNa}$ , agua de llave, agua deionizada y  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ . El Cl-colina provocó una desusada mortalidad en las tres especies; *L. ocellatus* toleró bien la pre-adaptación en soluciones diluidas (0.4 mEq/l) de  $\text{ClNH}_4$ . La adaptación de *C. caudiverbera* al resto de las soluciones fue excelente; hemos tenido algunos ejemplares que estuvieron sumergidos en ellas por espacio de 60-75 días sin aparentes molestias.

- Canulación. 36-48 horas previas al experimento, los animales fueron pesados . Luego su cloaca fué canulada con un tubo de plástico que fué fijado por medio de una ligadura subepitelial concéntrica. De esa forma, la orina era recogida fuera del baño externo, con lo cual quedaba asegurado de que la piel era la única responsable de los cambios detectados; además, esta preparación permite evaluar el volumen de orina excretado durante los experimentos. Siendo que las soluciones externas casi siempre fueron mas diluidas que la orina, el analisis químico del baño externo permite también descubrir posibles pérdidas de orina por fisuras de la cánula o de la piel afectada por la sutura.

Una vez canulados los animales, fueron colocados en frascos individuales, en contacto con la misma solución de pre-adaptación. Así fueron mantenidos hasta el momento del experimento, renovando dos veces por día la solución en la que estaban sumergidos, por sifón, evitando toda perturbación de los animales. Todas las especies toleraron la cánula por espacio de 3-5 días; después de dicho lapso empezaba un proceso necrótico, casi siempre reversible. Después de la descantulación, la piel alrededor de la cloaca cicatriza rápidamente.

- Medida de los flujos iónicos netos. El día del experimento, se reemplazó la solución de pre-adaptación externa por la que sería utilizada en la medida de los parámetros que interesaban (pH, conductividad,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ , etc). El volumen de la nueva solución, que fué cuidadosamente medido, era generalmente el suficiente para cubrir la mayor parte del cuerpo; la relación peso corporal/volumen del baño externo era de aproximadamente 1/3 o 1/4.

El sistema (Figura 5) se dejaba estabilizar durante unos 20-30 minutos, momento en el que se tomaba la primera muestra del baño externo (5-12 ml), mediante una pipeta o jeringa. Posteriormente, se continuaba tomando muestras cada 30-60 minutos, durante lapsos que oscilaban entre 1.5 y 6 horas, aproximadamente.

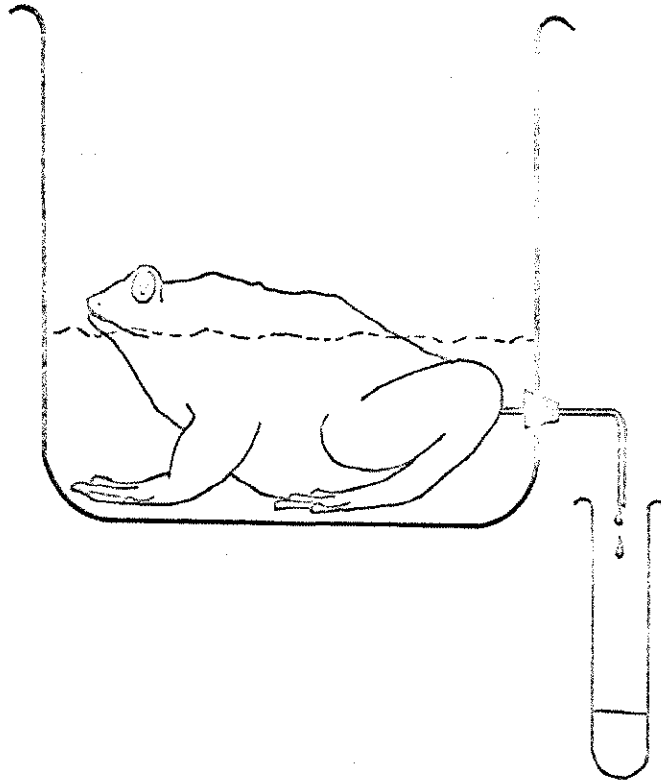


FIGURA 5. Diagrama esquemático del dispositivo experimental para medir flujos netos a través de la piel intacta.

En los pocos experimentos en los que interesaba conocer simultáneamente la evolución de la conductividad del medio, se introdujo la correspondiente celda a una costado del recipiente, de manera que se evitara cualquier perturbación del animal.

La concentración de los iones considerados en el baño externo (o de su conductividad) fué graficada contra el tiempo y los flujos (netos) fueron calculados a partir de las pendientes de las respectivas rectas de regresión. Para estos cálculos, se consideró como volumen del baño externo, un valor promedio durante el experimento (García Romeu y Maetz, 1964; Maetz, 1956). Sólo se tomaron en cuenta aquéllos experimentos en los cuales los flujos netos fueron positivos, esto es, en los cuales había entrada neta de iones. Por convención, los flujos son "positivos" y se expresan precedidos del signo "+" cuando la concentración del ion en la solución externa disminuye, absorbiéndolo

a través de su piel; inversamente, el aumento de la concentración de una especie química en la solución externa (flujo neto negativo) se indica con el signo "-".

Los datos de flujos iónicos siempre fueron expresados en  $\mu\text{Eq}/\text{hr} \times 100 \text{ gr}$  de peso corporal  $\pm$  error standard de la media (SEM); la conversión de dicha unidad en  $\mu\text{Eq}/\text{hr} \times \text{cm}^2$  puede hacerse recurriendo a las fórmulas de la Tabla 4. La conductividad se expresó en  $\mu\text{Eq}/\text{l}$  de  $\text{ClNa}$  multiplicando sus unidades ( $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) por un factor experimentalmente determinado (8.662).

TABLA 4. Ecuaciones exponenciales utilizadas para relacionar el peso (P) con el área (A) corporal.

Especie	Ecuación	Referencias bibliográficas
<u>L. ocellatus</u>	$A = 11.3 \cdot P^{0.58}$	Hutchison, Whitford y Kohl, 1968
<u>E. arunco</u>	$A = 12.7 \cdot P^{0.57}$	Espina y Rojas, 1972.
<u>C. caudiverbera</u>	$A = 10.8 \cdot P^{0.63}$	Espina y Rojas, 1972.

- Anestésicos locales. En los experimentos de inhibición selectiva utilizamos dos anestésicos locales: sulfato de procaína y pentobarbiturato de colina. El primero se preparó neutralizando la procaína base con  $\text{SO}_4\text{H}_2$ ; la base fué precipitada tratando el clorhidrato con  $\text{HOK}$ . El pentobarbiturato de colina se preparó neutralizando el ácido pentobarbitúrico con colina base; el ácido fué preparado tratando la sal sódica con  $\text{SO}_4\text{H}_2$ .

Estos anestésicos fueron añadidos al baño externo en cantidad suficiente para lograr una concentración final de 2 ml, el volumen necesario para ello fué despreciable con respecto al de la solución externa en la que los animales estaban sumergidos (0.8 - 1.2 ml).

- Métodos analíticos. Todas las mediciones se efectuaron por duplicado.

Sodio. Por fotometría de emisión (fotómetros Yobin-Ivon y Eppendorf) o por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer, modelo 290).

Cloro. Por potenciometría de acuerdo a la técnica de Sanderson (1952)

Conductividad. En un conductímetro Phillips PR 9500.

Estadística. Nuestro nivel de "diferencia significativa" fué  $p \leq 0.05$ ; la comparación entre grupos se hizo recurriendo al test de Student; dejamos constancia del valor de  $t$  sólo en los casos en que las diferencias detectadas eran significativas.

### 3. Resultados.

#### I. Discusión de los flujos iónicos netos.

A. Leptodactylus coellatus. Los experimentos se efectuaron sobre animales pre-adaptados en diferentes soluciones de 0.4 mEq/l; los flujos netos fueron medidos a partir de soluciones de  $\text{ClNa}$  0.9 mEq/l. En la Tabla 5 se presentan los resultados.



TABLA 5. Flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Leptodactylus ocellatus, pre-adaptado en diferentes soluciones y sumergido en solución de  $\text{ClNa}$  0.9 mEq/l ( $\mu\text{Eq}/\text{cm}^2 \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ )

lón de laptación	$\bar{x}$	Peso cor- poral (gr)	fn $\text{Cl}^-$	fn $\text{Na}^+$	Diferencias *
	8	74.9 $\pm$ 9.5	+ 5.9 $\pm$ 1.2	+ 2.5 $\pm$ 1.0	+ 3.4 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>
	6	58.0 $\pm$ 4.3	+ 9.5 $\pm$ 0.9	+ 1.9 $\pm$ 1.2	+ 7.6 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
lina	3	94.0 $\pm$ 26.2	+ 6.2 $\pm$ 1.6	+ 8.4 $\pm$ 2.2	- 2.2 $\pm$ 0.9
	7	78.5 $\pm$ 7.3	+ 5.9 $\pm$ 1.9	+ 6.2 $\pm$ 1.7	- 0.3 $\pm$ 0.5

\* ) Diferencias medias de datos pareados (fn  $\text{Cl}^-$  - fn  $\text{Na}^+$   $\pm$  ESM)

a:  $p < 0.025$  ( $t = 2.66$ ).

b:  $p < 0.005$  ( $t = 7.10$ ).

A-1. Animales pre-adaptados en  $\text{ClNa}$  (Grupo control). Los flujos netos resultan estadísticamente diferentes; la misma tendencia se verá en el caso de las otras dos especies.

A-2. Animales pre-adaptados en  $30 \frac{\text{Na}}{4} \text{Na}_2$ . La captación de  $\text{Cl}^-$  fue significativamente mayor (cinco veces) que la de  $\text{Na}^+$ . La Figura 5 ilustra un típico experimento en el que puede visualizarse la independencia de ambos flujos.

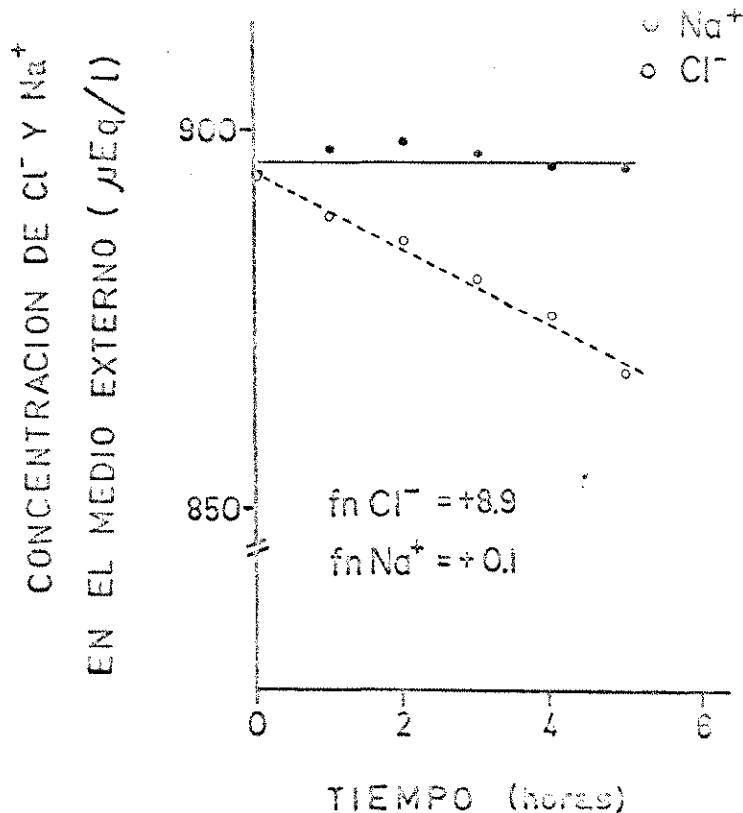


FIGURA 6. Captación de Cl<sup>-</sup> y de Na<sup>+</sup> a través de la piel in situ de Leptodaectylus ocellatus pre-adaptado en SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> y sumergido en solución de ClNa (Rana N° 12). Los flujos netos (fn) están expresados en µEq/hr x 100 gr.

A-3. Animales pre-adaptados en Cl-colina y en ClNE<sub>4</sub>. Como era de esperar, en las ranas pre-adaptadas en Cl-colina los flujos de Na<sup>+</sup> fueron mayores que los de Cl<sup>-</sup>. Las diferencias detectadas no fueron estadísticamente significativas posiblemente debido al escaso número de mediciones. Los flujos de Cl<sup>-</sup> y de Na<sup>+</sup> de animales pre-adaptados en ClNE<sub>4</sub> fueron prácticamente iguales y no se detectó aquella tendencia observada en el grupo Cl-colina (fn Na<sup>+</sup> > fn Cl<sup>-</sup>). Llama la atención que los fn Cl<sup>-</sup> tanto en las ranas del grupo control como en las de éstos

dos grupos sean prácticamente iguales.

A-4. Animales pre-adaptados en agua destilada (Tabla 6). En este grupo los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  fueron altos y sus diferencias resultaron estadísticamente significativas: el fn  $\text{Cl}^-$  fué mayor que el fn  $\text{Na}^+$ . Puede notarse que el flujo neto de  $\text{ClNa}$ , medido indirectamente, a través de la conductividad de la solución externa, está en estrecha relación con los flujos netos de  $\text{Na}^+$  pero no con los de  $\text{Cl}^-$ .

A-5. Experimentos varios. En solamente dos casos medimos los flujos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  en ranas pre-adaptadas en agua de llave y sumergidas en solución de  $\text{ClNa}$  0.8 mEq/l. Los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  fueron + 12.6 y +7.5, y los de  $\text{Na}^+$  fueron + 2.7 y + 0.8  $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr}$ , respectivamente. Asimismo, pudimos comprobar, en otros dos experimentos, que L. ocellatus pre-adaptado en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  0.8 mEq/l es capaz de absorber  $\text{Cl}^-$  cuando es sumergido en una solución en la que el catión es impermeante (Cl-colina 0.8 mEq/l). Los fn  $\text{Cl}^-$  fueron + 13.2 y + 5.2 y los de  $\text{Na}^+$  fueron +0.9 y + 0.2  $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr}$ , respectivamente. La Figura 7 ilustra uno de los casos mencionados.

TABLA 6. Flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y ClNa a través de la piel in situ de Leptodactylus ocellatus pre-adaptado en agua destilada y sumergido en solución de ClNa 0.8 mEq/l (uEq/hr x 100 gr  $\pm$  ESM).

---

N	4
Peso corporal (gr)	71.3 $\pm$ 4.0
fn $\text{Cl}^-$	+ 18.2 $\pm$ 7.3
fn $\text{Na}^+$	+ 12.2 $\pm$ 6.6
fn ClNa*	+ 12.9 $\pm$ 7.2
Diferencias** :	
fn $\text{Cl}^-$ - fn $\text{Na}^+$	+ 6.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
fn $\text{Cl}^-$ - fn ClNa	+ 5.3 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>
fn $\text{Na}^+$ - fn ClNa	- 0.7 $\pm$ 1.3

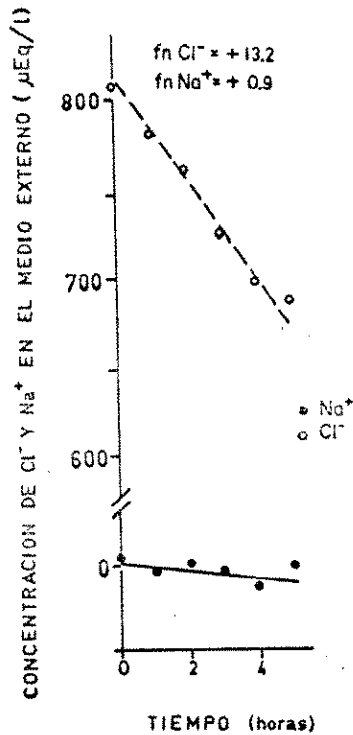
---

\* )Medido a partir de la conductividad de la solución externa

\*\* )Diferencias medias de datos pareados  $\pm$  ESM

a:  $p < 0.05$  (t = 4.08)

b:  $p < 0.005$  (t = 8.30)



**FIGURA 7.** Captación neta de  $Cl^-$  a través de la piel in situ de Leptodaectylus ocellatus pre-adaptado en  $SO_4Na_2$  y sumergida en solución de Cl-colina (Rana N° 40; 57.6 gr). Los flujos netos (fn) están expresados en  $\mu Eq/hr \times 100$  gr.

**B. Bufo arunco.** Los sapos fueron pre-adaptados en diferentes soluciones de 1.7 mEq/l y los flujos netos fueron medidos sumergiéndolos en soluciones de ClNa de la misma concentración. Los resultados están en la Tabla 7.

TABLA 7. Flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Bufo arunco pre-adaptado en diferentes soluciones y sumergido en solución de  $\text{ClNa}$  1.7 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Solución de pre adaptación		Peso corporal (gr)	fn $\text{Cl}^-$	fn $\text{Na}^+$	Diferencias <sup>**</sup>
$\text{ClNa}$	7	67.9 $\pm$ 7.7	+ 14.0 $\pm$ 3.0	+ 10.0 $\pm$ 1.6	+ 4.0 $\pm$ 2.0
Agua de llave	9	53.0 $\pm$ 7.2	+ 16.8 $\pm$ 2.9	+ 17.7 $\pm$ 2.1	- 0.9 $\pm$ 1.4
Agua destilada	7	88.9 $\pm$ 8.7	+ 11.5 $\pm$ 3.9	+ 12.2 $\pm$ 4.9	- 0.7 $\pm$ 1.2
Cl-colina	5	56.8 $\pm$ 1.6	+ 8.4 $\pm$ 3.1	+ 26.6 $\pm$ 5.1	-18.2 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>
$\text{SO}_4\text{Na}_2$	7	66.6 $\pm$ 6.3	+ 9.2 $\pm$ 1.3	- 1.1 $\pm$ 1.3	+10.3 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>

<sup>\*\*</sup> ) Diferencias medias de datos pareados (fn  $\text{Cl}^-$  - fn  $\text{Na}^+$   $\pm$  ESM).

a:  $p < 0.01$  ( $t = 5.54$ )

b:  $p < 0.001$  ( $t = 8.85$ )

B-1. Animales pre-adaptados en  $\text{ClNa}$ . Los flujos netos no fueron significativamente diferentes a pesar de que la tendencia fué, igual que en L. ocellatus, en el sentido de los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  mayores que los de  $\text{Na}^+$ .

B-2. Animales pre-adaptados en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  en en  $\text{Cl-colina}$ . Tal como en L. ocellatus, estos dos grupos demostraron una disociación significativa de sus flujos iónicos netos. En el caso de los sapos pre-adaptados en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  el flujo neto de  $\text{Na}^+$  fué unas 10 veces menor que el de  $\text{Cl}^-$ . Inversamente, los sapos pre-adaptados en  $\text{Cl-colina}$  tuvieron un fn  $\text{Cl}^-$

tres veces inferior con respecto al de  $\text{Na}^+$ .

B-3. Animales pre-adaptados en agua destilada. Los flujos no fueron tan altos como en el caso de *L. ocellatus* y la pequeña diferencia detectada en este caso no fué estadísticamente significativa.

B-4. Animales pre-adaptados en agua de llave. En este grupo experimental, pueden observarse flujos netos altos y estadísticamente indistinguibles.

B-5. Experimentos varios. Bufo arunco es también capaz de absorber a través de su piel in situ  $\text{Cl}^-$  o  $\text{Na}^+$  cuando está sumergido en soluciones en las que el catión o el anión acompañante es impermeante; tampoco hicimos un estudio sistemático de este comportamiento.

La Figura 8 ilustra un típico experimento en el que *B. arunco* pre-adaptado en agua de llave es capaz de captar  $\text{Na}^+$  cuando está sumergido en soluciones de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  de diferentes concentraciones. Nótese la dependencia de la magnitud del  $\text{fn Na}^+$  con su concentración en el baño externo.

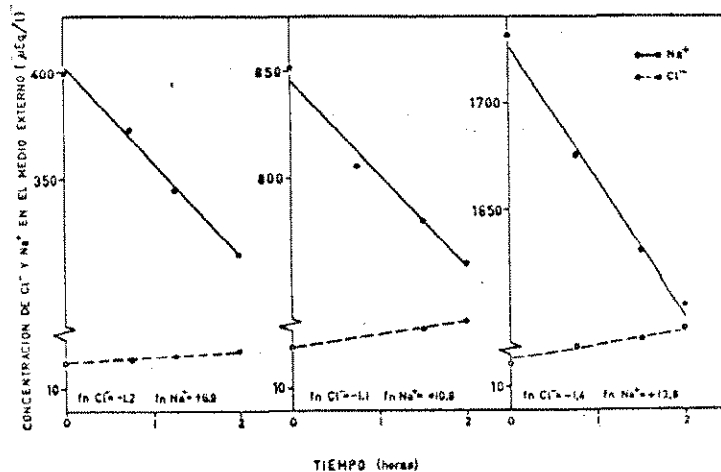


FIGURA 8. Captación de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de *Bufo arunco* pre-adaptado en agua de llave y sumergido sucesivamente en soluciones de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  de diferente concentración (Sapo N° 54; 81.0 gr). Los flujos netos ( $\text{fn}$ ) están expresados en  $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr}$ .

C. Calyptocephalella caudiverbera.

Esta es la especie en la cual efectuamos el estudio más extenso. Todas las ranas fueron pre-adaptadas en agua destilada o en diversas soluciones de 3.4 mEq/l. Los experimentos se efectuaron sumergiendo los animales en diversas soluciones de 1.7 mEq/l. Los resultados están alistados en la Tabla 8.

TABLA 8. Flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera pre-adaptada en diferentes soluciones y sumergida en solución de  $\text{ClNa}$  1.7 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Solución de pre- adaptación	N	Peso cor- poral (gr)	fn $\text{Cl}^-$	fn $\text{Na}^+$	Diferencias <sup>a</sup>
0.4 mEq/l	7	278.9 $\pm$ 41.1	+ 11.1 $\pm$ 2.1	+ 8.1 $\pm$ 1.4	+ 3.0 $\pm$ 2.4
3.4 mEq/l	40	205.9 $\pm$ 16.2	+ 7.8 $\pm$ 0.8	+ 5.5 $\pm$ 0.6	+ 2.3 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>
destilada	21	211.2 $\pm$ 13.1	+ 11.7 $\pm$ 1.3	+ 7.2 $\pm$ 1.1	+ 4.5 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>
solina	41	188.0 $\pm$ 14.0	+ 6.0 $\pm$ 0.8	+ 8.5 $\pm$ 0.8	- 2.5 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>
$\text{Na}_2$	24	231.5 $\pm$ 22.0	+ 19.7 $\pm$ 3.0	+ 6.5 $\pm$ 0.9	+ 13.2 $\pm$ 3.1 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>) Diferencias medias de datos pareados (fn  $\text{Cl}^-$  - fn  $\text{Na}^+$   $\pm$  ESM).

a:  $p < 0.025$  ( $t = 2.33$ )

b:  $p < 0.025$  ( $t = 2.68$ )

c:  $p < 0.05$  ( $t = 2.15$ )

d:  $p < 0.001$  ( $t = 4.20$ )



C-1. Animales pre-adaptados en ClNa. En el caso de C. caudivertebra también se observa una disociación de los flujos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  siendo el  $\text{fn Cl}^-$  significativamente mayor que el  $\text{fn Na}^+$ ; en este caso no cabe ninguna duda de que la diferencia es real debido al elevado número de mediciones efectuadas. Cuando los animales son pre-adaptados en soluciones más diluidas (0.4 mEq/l) los flujos son notoriamente mayores (primera línea de la Tabla 8).

C-2. Animales pre-adaptados en Cl-colina y en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ . La disociación de flujos netos observados en L. ocellatus y en B. arunco existe también en esta especie; las diferencias observadas entre ambos flujos netos también son mucho mayores en el caso de las ranas pre-adaptadas en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  3.4 mEq/l. En la Figura 9 se ilustran tres típicos experimentos.

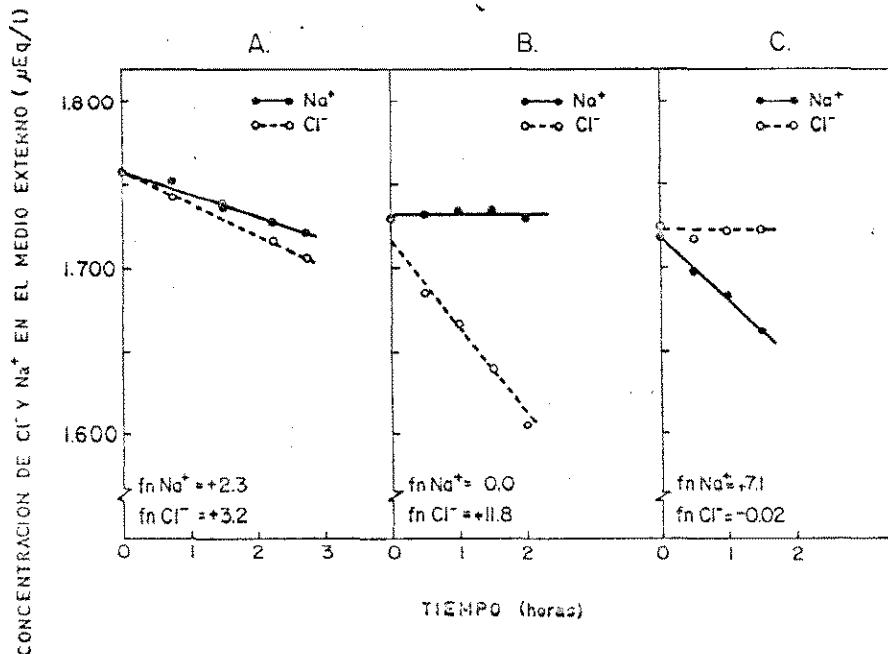


FIGURA 9. Captación de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in vitro de Calyptocephalella caudivertebra pre-adaptada en soluciones de ClNa (A),  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  (B) y Cl-colina (C) y sumergidas en soluciones de ClNa (Ranas Nos. 144, 21 y 93, de 204, 155 y 154 gr, respectivamente. Los flujos netos (fn) están expresados en  $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr}$ .

C-3. Animales pre-adaptados en agua destilada. Los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  fueron mayores que en el grupo control o pre-adaptado en  $\text{ClNa}$  3.4 mEq/l; sin embargo, la diferencia entre dichos flujos netos fue estadísticamente significativa. En otro grupo de ranas pre-adaptado por el mismo tiempo en agua destilada ( $N = 20$ ), pero cuyos flujos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  fueron medidos sumergiendo los animales (peso corporal =  $225.5 \pm 23.0$ ) en soluciones de 0.4 mEq/l los resultados fueron:  $\text{fn Cl}^- = + 11.2 \pm 1.0$  y  $\text{fn Na}^+ = + 7.6 \pm 0.6$   $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ g}$  y la diferencia ( $+ 3.6 \pm 1.4$ ) fue también significativa ( $p < 0.025$ ;  $t = 2.62$ ). Llana la atención muestra que los flujos iónicos netos son prácticamente idénticos a los del grupo incluido en la tercera línea de la Tabla 8.

C-4. Experimentos varios. C. caudiverbera es también capaz de absorber  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  desde soluciones en las cuales el co-ión es impermeante. El  $\text{Cl}^-$  es absorbido a una velocidad que es independiente del co-ión acompañante ( $\text{Na}^+$  o colina) (Tabla 9); la captación de  $\text{Na}^+$ , en cambio, parece depender del anión acompañante ya que cuando las ranas están sumergidas en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  los  $\text{fn}$  de  $\text{Na}^+$  son significativamente menores cuando son comparados con las mediciones efectuadas en animales sumergidos en  $\text{ClNa}$  (Tabla 10)

TABLA 9. Flujos netos ( $\text{fn}$ ) de  $\text{Cl}^-$  a través de la piel in situ de Calyptocephala caudiverbera pre-adaptada en agua destilada y sumergida in situ en diferentes soluciones ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Solución externa	N	$\text{fn Cl}^-$	Diferencia*
I. $\text{ClNa}$ 0.4 mEq/l	6	$+ 10.1 \pm 1.3$	
II. $\text{Cl-colina}$ 0.4 mEq/l	6	$+ 9.9 \pm 2.3$	$+ 0.2 \pm 0.9$

\* Diferencia media de datos pareados (I - II  $\pm$  ESM).

Peso corporal =  $162.3 \pm 9.5 \text{ gr}$ .

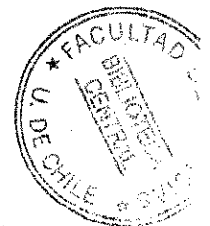


TABLA 10. Flujos netos ( $f_n$ ) de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calypotesoph-  
lella caudivertebra pre-adaptada en agua destilada y sumergida sucesiva-  
mente en diferentes soluciones ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Solución externa	N	$f_n \text{ Na}^+$	Diferencia*
I. $\text{ClNa}$ 0.4 mEq/l	6	+ 7.2 $\pm$ 1.6	+ 4.7 $\pm$ 1.1
II. $\text{SO}_4\text{Na}_2$ 0.4 mEq/l	6	+ 2.5 $\pm$ 1.1	

\* ) Diferencia media de datos pareados (I - II  $\pm$  ESM).

a:  $p < 0.005$  ( $t = 4.40$ )

Peso corporal = 162.3  $\pm$  9.5 gr.

Los flujos netos se hacen próximos cuando la concentración del  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  externo se eleva unas cuatro veces (Tabla 11)

TABLA 11. Flujos netos ( $f_n$ ) de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calypotesoph-  
lella caudivertebra pre-adaptada en agua destilada y sumergida sucesiva-  
mente en diferentes soluciones ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Solución externa	N	$f_n \text{ Na}^+$	Diferencia*
I. $\text{ClNa}$ 0.4 mEq/l	4	+ 6.2 $\pm$ 2.2	- 2.7 $\pm$ 1.1
II. $\text{SO}_4\text{Na}_2$ 1.7 mEq/l	4	+ 8.8 $\pm$ 3.4	

\* ) Diferencia media de datos pareados (I - II  $\pm$  ESM).

Peso corporal = 200.8  $\pm$  27.8 gr.

Esta dependencia de los  $fn Na^+$  con respecto a su concentración en el baño externo, también señalada para Bufo, se ilustra en la Figura 10; en la Figura 11 se ve ilustrado un caso de independencia de la captación neta de  $Cl^-$ .

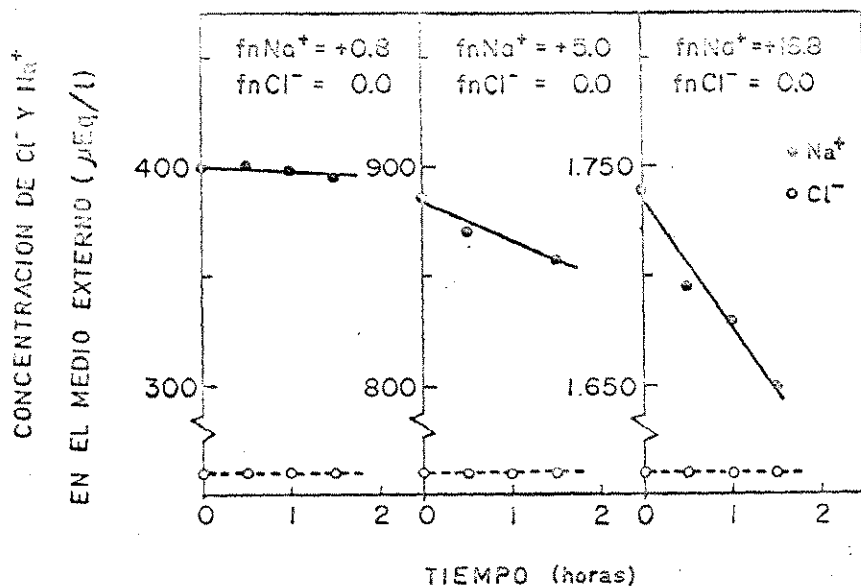


FIGURA 10. Captación neta de  $Na^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiventrata pre-adaptada en agua destilada y sumergida sucesivamente en soluciones de  $Na_2$  de diferente concentración (Rana N° 39; 146.0 gr). Los flujos netos ( $fn$ ) están expresados en  $\mu Eq/hr \times 100$  gr.

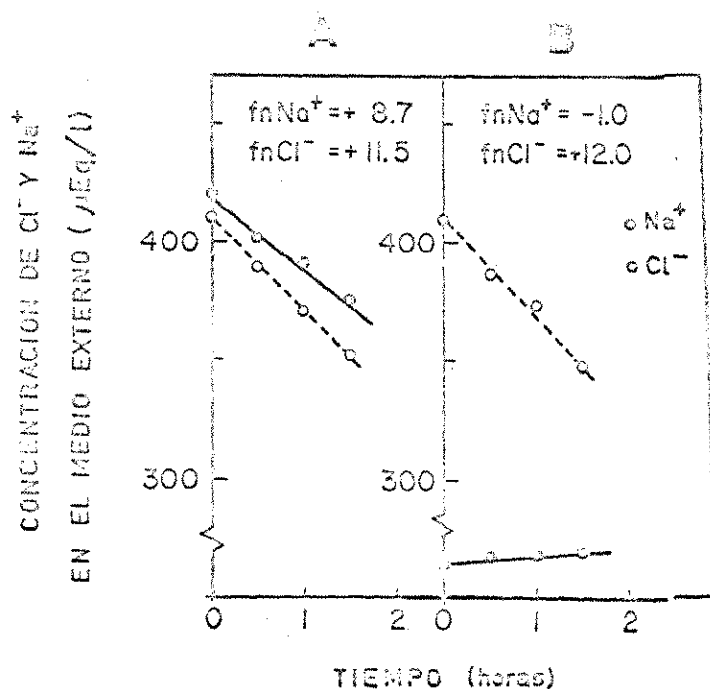


FIGURA 11. Captación neta de  $\text{Cl}^-$  a través de la piel in situ de *Galyptocephalella caudiverberna* pre-adaptada en agua destilada y sumergida sucesivamente en soluciones de  $\text{ClNa}$  (A) y  $\text{Cl-colina}$  (B) (Rana N° 39-B). Los flujos netos (fn) están expresados en  $\mu\text{Eq}/\text{hr} \times 100 \text{ gr}$ .

## II. Inhibición selectiva de los flujos iónicos netos.

Los experimentos que a continuación resumiremos, se realizaron solo sobre *G. caudiverberna* pre-adaptada en agua destilada y sumergida en soluciones de  $\text{ClNa}$ .

Inspirados en el trabajo de Blaustein y Goldman (1966) investigamos el efecto de un anestésico catiónico (procaína) y otro aniónico (pentobarbital) sobre los flujos netos in vivo de cloro y de sodio; la

adición de dichos anestésicos prácticamente no alteró la concentración de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  del baño externo ya que las sales utilizadas estaban desprovistas de dichos iones. Los resultados se presentan en las Tablas 12 y 13. La Figura 12 ilustra dos experimentos típicos de inhibición selectiva.

Tabla 12. Efecto del sulfato de procaína (2 mM) sobre los flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptrocephala caudiverrera pre-adaptada en agua destilada y sumergida en solución de  $\text{ClNa}$  0.4 mEq/l (pEq/hr x 100 gr  $\pm$  ESM)

Período	fn $\text{Cl}^-$	fn $\text{Na}^+$
I. Pre-procaína	+ 9.5 $\pm$ 1.9	+ 4.4 $\pm$ 1.4
II. Post-procaína	+ 8.4 $\pm$ 0.6	- 5.5 $\pm$ 1.3
Diferencias *	+ 1.1 $\pm$ 0.9	+ 9.9 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>

\* ) Diferencias medias de datos pareados (I - II  $\pm$  ESM).

a:  $p < 0.01$  (t = 7.50)

Peso corporal = 272.0  $\pm$  85.3 gr (N = 4)

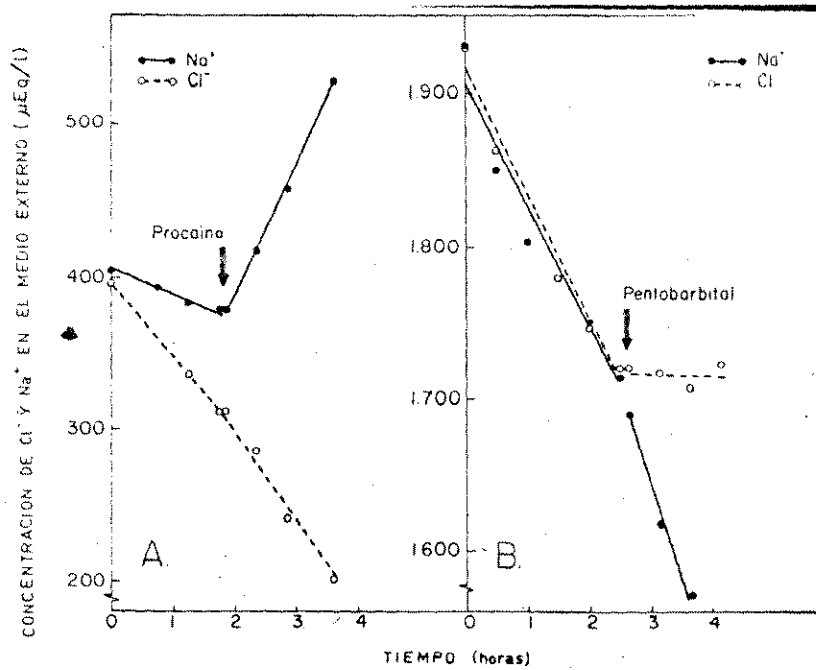
TABLA 13. Efecto del pentobarbiturato de colina (2 mM) sobre los flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera pre-adaptada en agua destilada y sumergida en solución de  $\text{ClNa}$  1.7 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Período	fn $\text{Cl}^-$	fn $\text{Na}^+$
I. Pre-pentobarbital	+ 9.2 $\pm$ 1.0	+ 8.0 $\pm$ 0.7
II. Post-pentobarbital	+ 1.4 $\pm$ 0.5	+ 8.9 $\pm$ 0.9
Diferencias*	+ 7.8 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	- 0.9 $\pm$ 1.0

\* ) Diferencias medias de datos pareados (I - II  $\pm$  ESM).

a:  $p < 0.001$  ( $t = 6.14$ )

Peso corporal = 185.8  $\pm$  24.1 (N = 8).

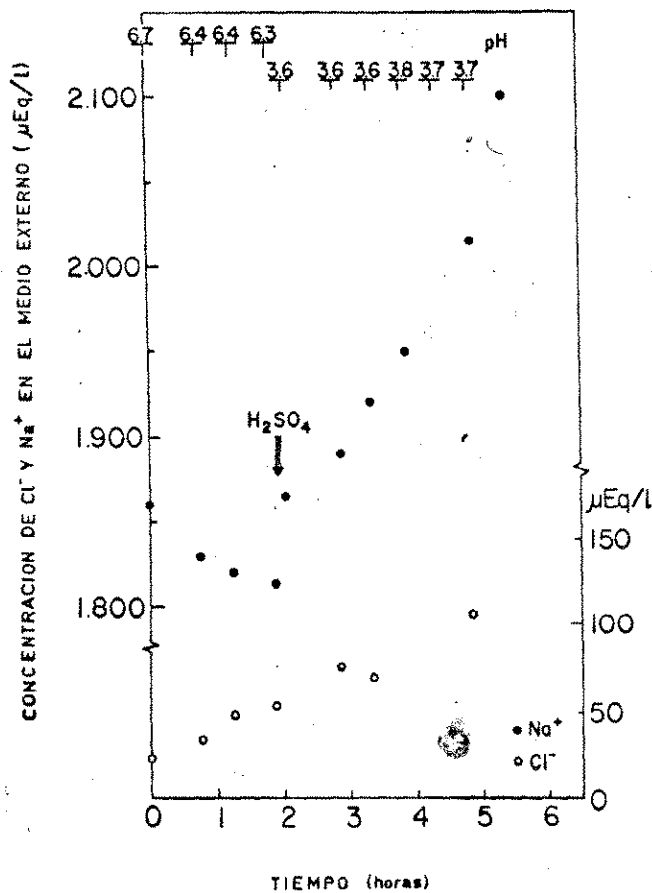


**FIGURA 12.** Efecto de la adición al baño externo de 2mM de sulfato de procaína (A) y de pentobarbiturato de colina (B) sobre los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera. Las ranas (Nos. 75 y 101, de 242.0 y 207.0 gr, respectivamente) fueron pre-adaptadas en agua destilada y sumergidas en solución de  $\text{ClNa}$ .



En ambos casos hubo rapidísima inhibición de uno de los flujos mientras que el otro permaneció prácticamente inalterado. El efecto de los anestésicos duró 3-4 horas.

El sulfato de procaína disminuye notoriamente el pH del baño externo; por ello, investigamos, aunque no de manera sistemática, el efecto del cambio de pH por adición de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  (aproximadamente 0.01 N) en cantidad suficiente para reducirlo a 3.9. Del mismo modo que con procaína, esta modificación produjo una inmediata y prolongada inhibición del flujo neto de  $\text{Na}^+$  (Figura 13).



**FIGURA 13.** Efecto de la acidificación del baño externo ( $\text{SO}_4\text{H}_2$ ) sobre el flujo neto de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera pre-adaptada en agua destilada y sumergida en solución de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  (Rana N° 243; 155.0 gr)

El pentobarbiturato de colina, por su parte, eleva el pH de la solución externa a valores entre 8.2 - 8.9; en este caso, la adición de colina base (hidróxido) en cantidad para provocar aquél cambio de pH no mostró afectar los flujos iónicos netos de la manera en que lo hace el pentobarbiturato.

Capítulo II. LOS IONES INTERCAMBIADOS POR  $\text{Cl}^-$  Y  $\text{Na}^+$   
DEL BAÑO EXTERNO.

1. Introducción.

Establecido el hecho de que los animales son capaces de captar  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  del medio externo, a) de manera independiente, y b) por intercambio contra iones endógenos, nos preocuparemos en lo que sigue de contestar otra de las preguntas que nos hicimos al comienzo: ¿cuáles son los iones endógenos intercambiados por los externos?. Demostraremos que dichos iones internos son  $\text{CO}_3\text{H}^-$  e  $\text{H}^+$ .

La mayor parte de los experimentos de este Capítulo fueron efectuados sobre Calyptocephalella caudiverbera. Mas incompleta es la información que poseemos al respecto sobre Leptodactylus ocellatus en la que una parte del  $\text{Na}^+$  externo se intercambia por  $\text{NH}_4^+$  interno.

2. Material y Métodos.

Las condiciones en que los animales fueron procesados y muchas de las técnicas analíticas utilizadas son prácticamente iguales a las señaladas en el Capítulo I. En este Capítulo hemos incorporado algunas mediciones adicionales cuyos detalles son los siguientes:

Amonio. Por la técnica de microdifusión modificada (Balinsky y Baldwin, 1961) sobre alícuotas del baño externo en el que los animales estaban sumergidos.

Acidez y alcalinidad totales. Se midieron a la temperatura ambiente, con OHNa (1.9 mEq/l) y ClH (3.5 mEq/l), en un equipo autotitulado Radiometer (T11), provisto de una bureta automática SBU-1 y un registrador SBR-2 Titrigraph. Se utilizó un equipo con electrodos de vidrio y referencia separados. Los puntos de equivalencia y los pK se determinaron gráficamente.

Valor amortiguador ( $\beta$ ). Se determinó por cálculo, de acuerdo a Davenport (1966) y se lo expresó en  $\mu\text{Eq}$  de ácido (o de base)/unidad de pH/hr.

### 3. Resultados.

#### I. El catión endógeno.

A. Amonio. Los experimentos efectuados en L. ocellatus están resumidos en la Tabla 14.

TABLA 14. Flujos netos (fn) de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{NH}_4^+$  a través de la piel in situ de Leptodactylus ocellatus pre-adaptado en agua potable y sumergido en solución de ClNa (0.5 - 1.3 mEq/l) ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

N	Peso corporal (gr)	fn $\text{Na}^+$	fn $\text{NH}_4^+$
9	53.2 $\pm$ 4.1	+ 3.7 $\pm$ 1.6	- 0.9 $\pm$ 0.4

El coeficiente de correlación entre ambos flujos es alto ( $r = -0.78$ ) y estadísticamente significativo ( $p < 0.025$ ;  $t = 3.31$ ) (Figura 14). La correspondiente recta de regresión se expresa por:  

$$fn Na^+ = -3.11 \times fn NH_4^+ + 0.87.$$

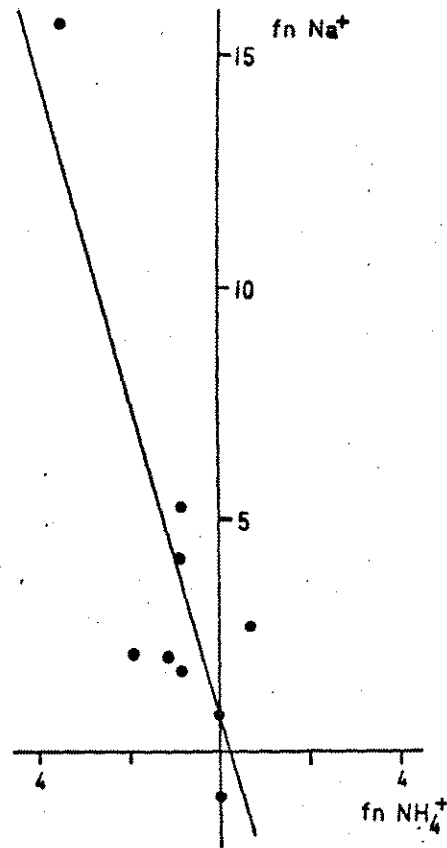


FIGURA 14. Correlación entre la captación de  $Na^+$  ( $fn Na^+$ ) y la excreción de  $NH_4^+$  ( $fn NH_4^+$ ) a través de la piel in situ de Leptodactylus ocellatus (experimentos de la Tabla 14).

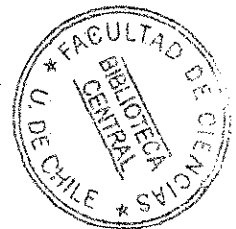
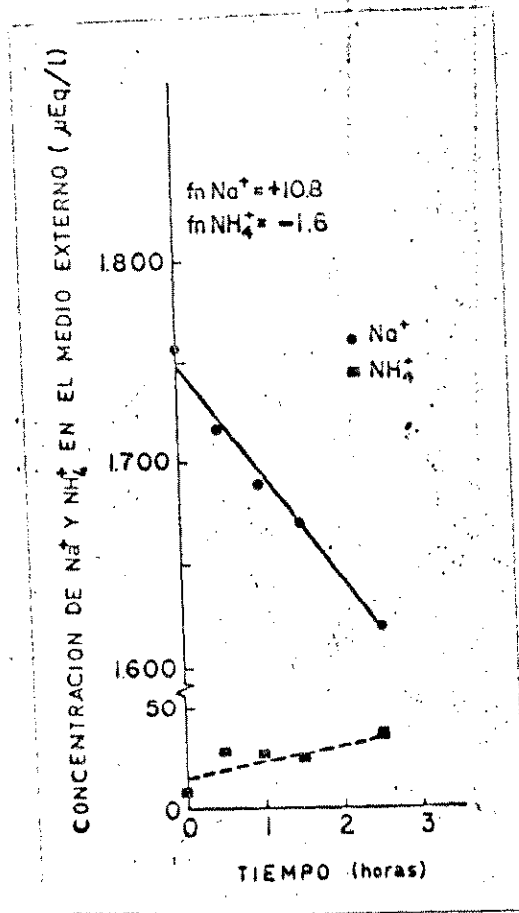
Se consideró la posibilidad de que en  $\text{NH}_4^+$  detectado en el medio externo proviniese de bacterias que habitualmente viven sobre la piel y/o del mucus habitual; para ello se incubaron raspados de la piel de estas ranas. En esas condiciones el  $\text{NH}_4^+$  del medio es bajo y permanece prácticamente constante indicando así que el origen del amonio detectado no es espúreo.

En el caso de C. caudiverbera no hicimos un estudio exhaustivo y sistemático de la excreción de  $\text{NH}_4^+$  por la piel. En este animal nos aseguramos de que sólo el intercambiador catiónico sea el funcional para lo cual los flujos de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{NH}_4^+$  fueron evaluados sumergiendo las ranas (pre-adaptadas en agua destilada) en solución de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  1.7 mEq/l. Los resultados se resumen en la Tabla 15.

TABLA 15. Flujos netos (fn) de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{NH}_4^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera pre-adaptada en agua destilada y sumergida en solución de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  1.7 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

N	Peso corporal (gr)	fn $\text{Na}^+$	fn $\text{NH}_4^+$
5	245.6 $\pm$ 45.1	+ 2.8 $\pm$ 2.1	- 0.4 $\pm$ 0.3

En estas condiciones, no existe correlación entre la cantidad de  $\text{Na}^+$  absorbido y la cantidad de  $\text{NH}_4^+$  excretado al medio ( $r = -0.66$ ;  $0.4 < p < 0.3$ ;  $t = 1.52$ ). La Figura 15 ilustra uno de los experimentos resumidos en la Tabla 15.



**FIGURA 15.** Captación de  $\text{Na}^+$  ( $fn \text{Na}^+$ ) y excreción de  $\text{NH}_4^+$  ( $fn \text{NH}_4^+$ ) a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera sumergida en solución de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  (Rana N° 72-B; 160.0 gr). Los flujos netos ( $fn$ ) están expresados en  $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr}$ .

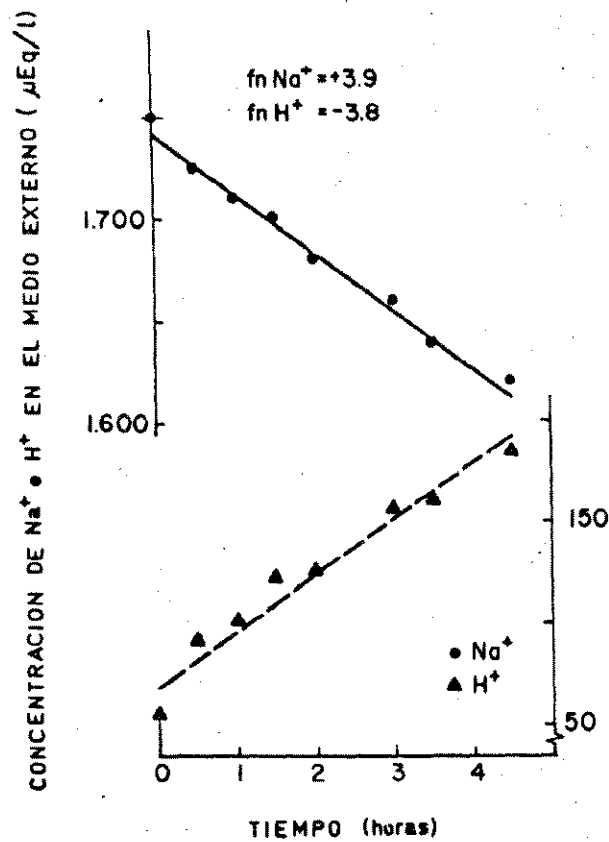
B. Hidrógeno . La medida del  $H^+$  excretado al medio externo se hizo titulando la acidez de alícuotas del medio externo ( $SO_4 Na_2$  1.7 mEq/l) en el que estaban sumergidas las ranas (C. caudiverbera). La Tabla 16 resume los resultados de estas mediciones.

TABLA 16. Flujos netos (fn) de  $Na^+$  e  $H^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera pre-adaptada en agua destilada y sumergida en soluciones de  $SO_4 Na_2$  1.7 mEq/l ( $\mu$ Eq/hr x 100 gr  $\pm$  ESM).

N	Peso corporal (gr)	fn $Na^+$	fn $H^+$
9	235.2 $\pm$ 18.3	+ 4.3 $\pm$ 1.2	- 4.3 $\pm$ 1.2

En la Figura 16 se ilustra, con un experimento típico, la correspondencia estequiométrica entre el  $Na^+$  captado y el  $H^+$  excretado. La misma correlación se ilustra de manera más elocuente en la Figura 17 donde se ve claramente que la interrupción de la captación de  $Na^+$  va acompañada de una evolución en la excreción de  $H^+$  que es prácticamente su imagen especular.





**FIGURA 16.** Captación de  $Na^+$  ( $fn Na^+$ ) y excreción de  $H^+$  ( $fn H^+$ ) a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera sumergida en solución de  $SO_4 Na_2$  (Rana N° 100-B; 224.0 gr). Los flujos netos ( $fn$ ) están expresados en  $\mu Eq/hr \times 100 gr.$

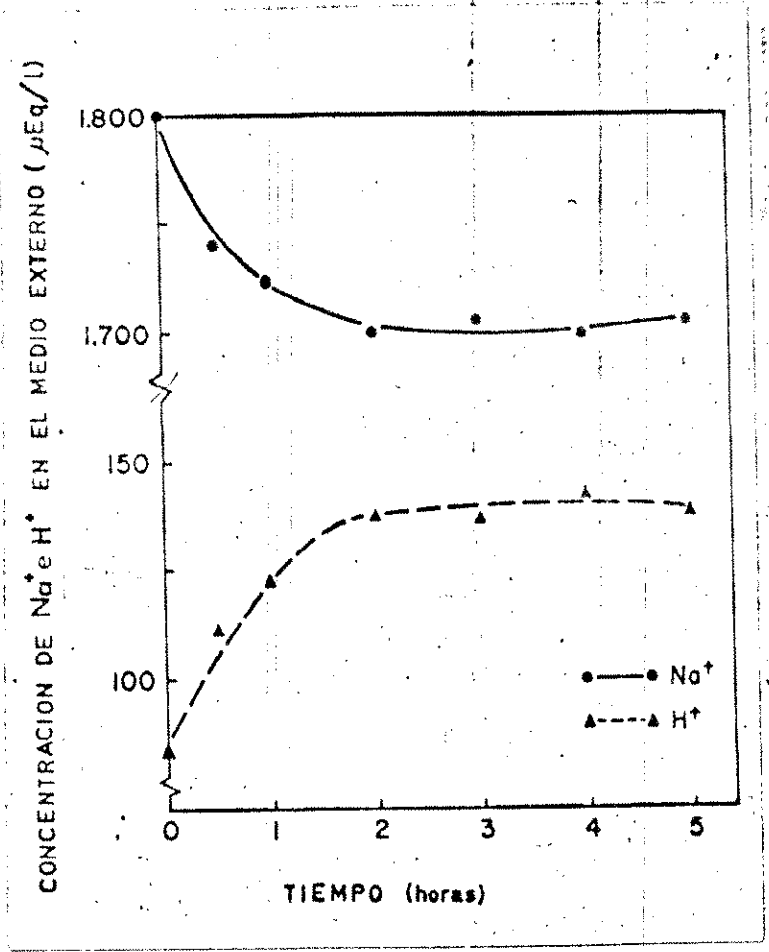


FIGURA 17. Captación de  $\text{Na}^+$  y excreción de  $\text{H}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudivorbera sumergida en solución de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  (Rana N° 103 A/B; 233.4 gr).

En la Figura 18 se ilustra la correlación entre los fn  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$ ; el coeficiente de correlación es alto ( $r = -0.99$  y estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ;  $t = 15.58$ ). La recta de regresión se expresa por la fórmula:  $\text{fn Na}^+ = -0.93 \times \text{fn H}^+ + 0.44$ .

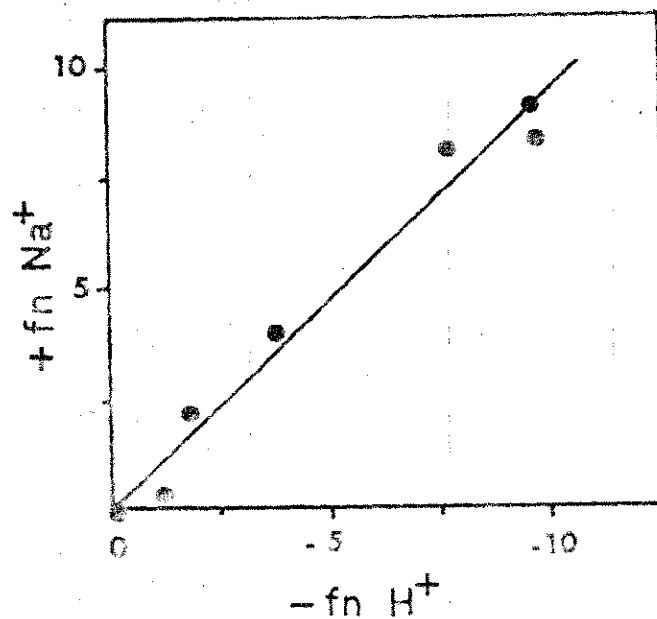


FIGURA 18. Correlación entre la captación de  $\text{Na}^+$  ( $\text{fn Na}^+$ ) y la excreción de  $\text{H}^+$  ( $\text{fn H}^+$ ) a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera (experimentos de la Tabla 16).

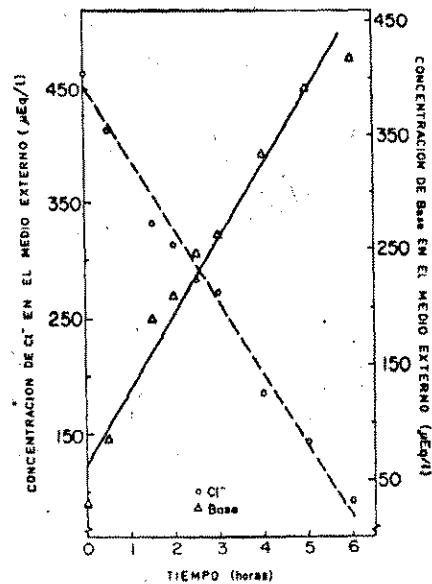
## II. El anión endógeno.

Para investigar la naturaleza del anión endógeno, las ranas fueron pre-adaptadas en agua destilada y sus flujos fueron medidos estando sumergidas en soluciones de Cl-colina 0.4 mEq/l. Alícuotas del baño externo fueron igualmente tituladas con OHNa. La Tabla 17 presenta los resultados de las respectivas mediciones.

**TABLA 17.** Flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y de Base a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera pre-adaptada en agua destilada y sumergida en solución de Cl-colina 0.4 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

N	Peso corporal (gr)	fn $\text{Cl}^-$	fn Base
6	216.9 $\pm$ 27.6	+ 8.6 $\pm$ 1.8	- 11.8 $\pm$ 2.5

En la Figura 19 se ilustra un experimento característico. Puede verse que la absorción de  $\text{Cl}^-$  es acompañada por la excreción de una Base; la imagen gráfica de la desaparición del  $\text{Cl}^-$  del baño externo va acompañada simétricamente con la de la aparición de dicha Base.



**FIGURA 19.** Captación de  $\text{Cl}^-$  y excreción de Base a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera sumergida en solución de Cl-colina (Rana N° 98-B; 201.5 gr).

El coeficiente de correlación (Figura 20) entre ambos flujos netos es alto ( $r = -0.96$ ) y estadísticamente significativo ( $p < 0.005$ ;  $t = 6.78$ ). La recta de regresión se expresa por la fórmula siguiente:  $\text{fn Cl}^- = -0.69 \times \text{fn B}^- + 0.40$ .

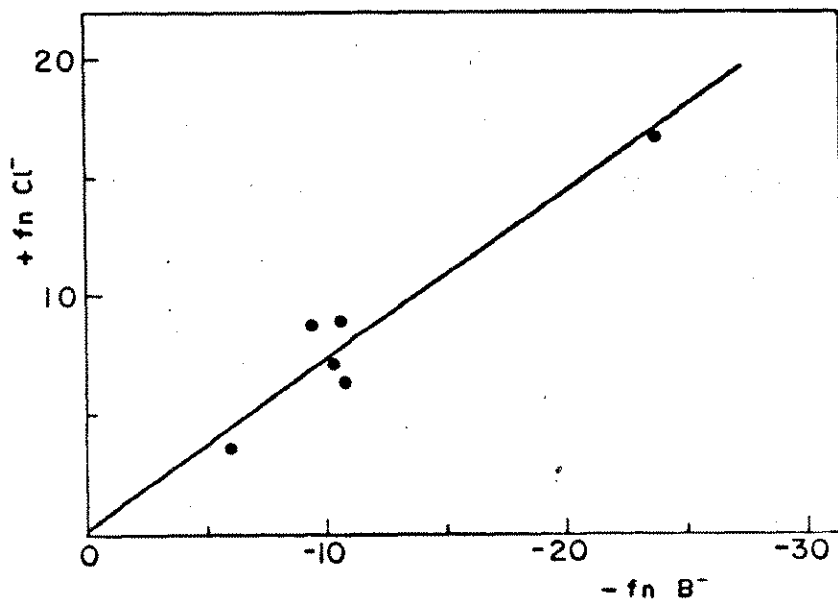


FIGURA 20. Correlación entre la captación de  $\text{Cl}^-$  ( $\text{fn Cl}^-$ ) y la excreción de Base ( $\text{fn B}^-$ ) a través de la piel in situ de Calypsocephalella caudiverbera (experimentos de la Tabla 17).

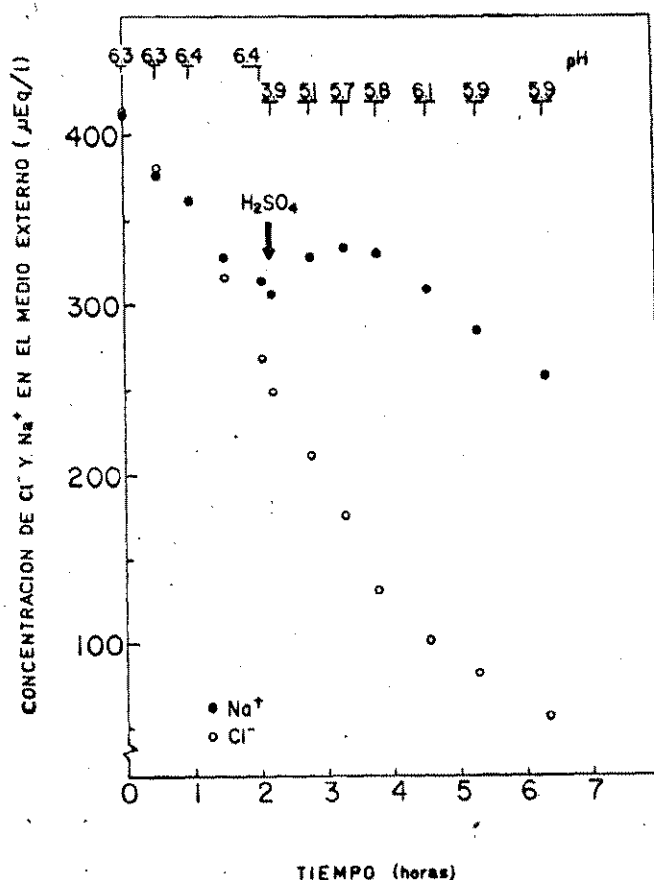
El pK de la Base excretada en los experimentos de la Tabla 17 fue  $5.91 \pm 0.03$ . Sospechando que la Base en cuestión era  $\text{CO}_3\text{H}^-$ , preparamos una serie de soluciones artificiales mezclando soluciones de bicarbonato de colina y de Cl-colina en cantidades equivalentes a las que por edículo se tendrían en las alícuotas de algunos experimentos. El pK de estas soluciones fue  $5.90 \pm 0.03$  ( $n = 11$ ). Concluimos, pues, que la Base excretada por intercambio con  $\text{Cl}^-$  externo era Bicarbonato.

### III. INTERCAMBIO IÓNICO Y CAMBIOS DE pH DEL MEDIO EXTERNO.

Cuando las ranas (*C. caudivertebra*) están sumergidas en  $\text{ClNa}$ , el pH del medio externo permanece prácticamente inalterado; interpretamos este hecho postulando que los  $\text{H}^+$  secretados por el intercambiador catiónico neutralizan los  $\text{CO}_3\text{H}^-$  que el intercambiador aniónico excreta simultáneamente. De allí, el pH del medio externo no resulta ser un indicador apropiado de la secreción de  $\text{H}^+$ .

Cuando el medio externo de una rana sumergida en  $\text{ClNa}$  es acidificado con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  hay una inhibición del flujo neto de  $\text{Na}^+$ ; dicha inhibición es temporaria y perdura sólo hasta que el pH de la solución externa alcanza valores próximos al del período previo a la adición del ácido. Este último caso se ilustra en la Figura 21; evidentemente, la base excretada por el intercambiador aniónico neutraliza el exceso de hidrogeniones y una vez restaurado el pH original se re-inicia la captación de  $\text{Na}^+$ .

Confirmando esta interpretación ya vimos (Figura 13) un caso en el que la rana estuvo sumergida en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  y su medio externo acidificado hasta pH 3.6; se observó la misma inhibición del  $\text{Na}^+$  que en la Figura 21, pero que perdura varias horas, prácticamente sin cambios en el pH.



**FIGURA 21.** Efecto transitorio (inhibitorio) de la acidificación del baño externo sobre la captación de  $\text{Na}^+$  a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergida en solución de  $\text{ClNa}$  (Rana N° 148; 198 gr).

Cuando *C. caudiverbera* estuvo sumergida en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  hubo una disminución del pH del medio externo de  $0.30 \pm 0.04$  unidades/hr (experimentos de la Tabla 16). Cuando las mismas ranas estuvieron sumergidas en Cl-colina, la modificación del pH del baño externo fué en el sentido de la alcalinización; el pH aumentó  $0.15 \pm 0.05$  unidades/hr (experimentos de la Tabla 17 (medias  $\pm$  ESM)).

IV. INTERCAMBIOS IONICOS Y CAMBIOS EN EL PODER AMORTIGUADOR DEL MEDIO.

A. Ranas sumergidas en Cl-colina. Otra evidencia en favor de la conclusión anterior de que la Base endógena excretada por intercambio con  $\text{Cl}^-$  exógeno es bicarbonato surge del cálculo del "valor amortiguador" ( $\beta$ ) del baño externo (Davenport, 1966) que es "la cantidad de ácido (o Base) que debe añadirse para provocar una modificación de una unidad de pH por unidad de tiempo".

Dicho cálculo indicó que cuando las ranas están sumergidas en Cl-colina el poder amortiguador alcanza  $76.3 \pm 16.3$   $\mu\text{Eq}/\text{unidad de pH/hr}$  ( $N = 6$ ). El coeficiente de correlación entre el fn  $\text{Cl}^-$  y el aumento de  $\beta$  de la solución externa fue alto y significativo ( $r = -0.86$ ;  $p < 0.025$ ;  $t = 3.34$ ). El coeficiente de correlación entre el fn Base y el aumento de  $\beta$  también fue alto y significativo ( $r = +0.95$ ;  $p < 0.005$ ;  $t = 6.03$ ).

B. Ranas sumergidas en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ . El poder amortiguador fue, en este caso de  $13.1 \pm 3.8$   $\mu\text{Eq}/\text{unidad de pH/hr}$  ( $N = 9$ ), esto es, casi seis veces menor que el de las ranas sumergidas en Cl-colina. El coeficiente de correlación entre el fn  $\text{Na}^+$  y la capacidad amortiguadora fue de  $-0.71$  y sin significación estadística.



Tercera parte.

EFEECTO DE LAS HORMONAS NEUROHIPOFISARIAS SOBRE LOS FLUJOS NETOS DE  $Cl^-$  Y DE  $Na^+$  A TRAVÉS DE LA PIEL IN SITU Y SOBRE LA DIURESIS DE CALYPTOCEPHALELLA CAUDIVERBERA.

1. Introducción.

Se sabe que la neurohipófisis de los anfibios produce dos, o probablemente tres, hormonas peptídicas: vasotocina, mesotocina y/u ocitocina (Heller y Pickering, 1970; Moens, 1972; Sawyer, 1968); los dos primeros suelen denominarse como derivados de la ocitocina: Arg-8-ocitocina e Ileu-8-ocitocina.

La bibliografía referente a la acción de estas hormonas cíclicas sobre el transporte de iones a través de ciertos epitelios in vitro así como sobre el equilibrio hidromineral de batracios in vivo es frondosa; sólo citaremos dos extensos trabajos modernos en los que se resume nuestro conocimiento: Follett, 1970 y Morel y Jard, 1968.

Cuando son aplicados al lado seroso, estos péptidos producen un "efecto natriférico", esto es, aumentan el pasaje neto de  $Na^+$  (por un aumento del influjo a través de diversos epitelios polares como la piel, vejiga urinaria y túbulo renal; el mecanismo celular de este efecto no es conocido en detalle (Maetz, 1968; Morel y Jard, op. cit.).

La inyección de péptidos neurohipofisarios también provoca, en los anfibios adultos in vivo un "efecto hidrosmótico"; los batracios ganan peso por retención de agua. Dicho efecto es la resultante de la respuesta combinada de tres efectores: piel, vejiga urinaria y riñón los que aumentan su permeabilidad osmótica al agua del lado mucoso al seroso. La piel y la vejiga in vitro responden cualitativamente de la misma manera. El riñón aumenta su reabsorción tubular al agua y/o dis-

minuye su velocidad de filtración glomerular. La magnitud de la respuesta hidrosmótica parece correlacionarse -dentro de ciertos límites- con el hábito de la especie considerada, siendo mayor en las terrestres y mínima en las acuáticas; el efecto natriférico no muestra, en general, aquélla correlación.

Siendo Calyptocephalella caudiverbera un leptodactílido perteneciente a un taxón terrestre y en estado adulto provisto de hábitos acuáticos, creímos de interés investigar el efecto de la ocitocina, vasotocina y mesotocina sobre sus mecanismos de captación de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de su piel in situ. La demostración de la existencia de dos mecanismos independientes de transporte de iones nos hizo pensar en la posibilidad de que la regulación endocrina de dichos mecanismos fuese igualmente independiente.

La hipótesis de trabajo fué simple: cada uno de los péptidos producidos por el hipotálamo podría ser el responsable de la regulación de los intercambios aniónicos y catiónicos respectivamente.

<sup>N</sup>o hemos sabido de otros estudios relativos al efecto de las hormonas neurohipofisarias sobre la captación de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel de C. caudiverbera.

## 2. Material y Métodos.

Tanto las condiciones de mantenimiento y pre-adaptación de las ranas, como el modus operandi de los experimentos fueron similares a las señaladas en el Capítulo I de la Segunda Parte.

En los animales de este grupo se implantó un catéter intraperitoneal de plástico el que fué fijado por medio de una ligadura concéntrica (Figura 22) cuyo espacio muerto fué previamente evaluado y generalmente osciló alrededor de 0.10 ml. Por este catéter se administraron las hormonas, a distancia, sin perturbar las ranas y con la certeza de que las dosis necesarias eran íntegramente suministradas.

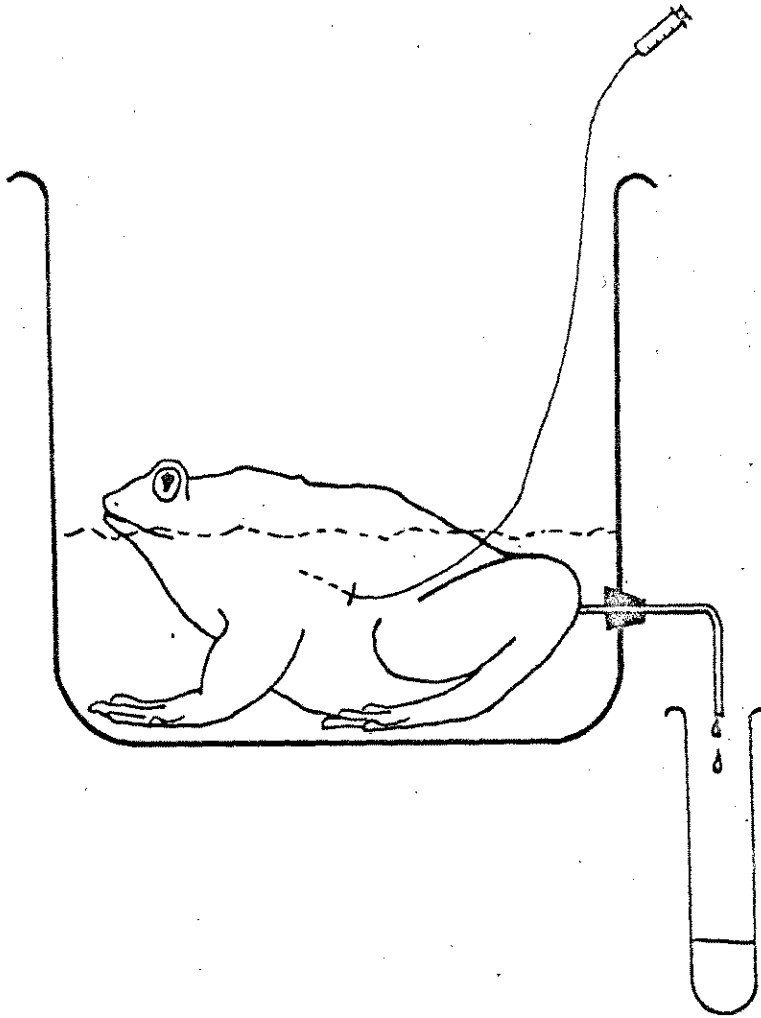


FIGURA 22. Diagrama esquemático del dispositivo experimental utilizado en los experimentos de esta Parte.

- Medida de los flujos iónicos netos. Casi todas las mediciones se efectuaron sumergiendo los animales en soluciones de  $\text{ClNa}$  1.7 mEq/l. En algunos experimentos, las ranas fueron sumergidas en  $\text{Cl-colina}$  o  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  de la misma concentración con el propósito de evaluar independientemente sus flujos netos de  $\text{Cl}^-$  o de  $\text{Na}^+$ . En todos los casos se efectuaron experimentos "control" inyectando el diluyente de las hormonas (Ringer anfibio).

Se siguió la evolución de los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y/o  $\text{Na}^+$  por el lapso de unas 2-3 horas en un período que llamamos "testigo"; después de la inyección de las hormonas (o del Ringer-anfibio) se continuó el control de los flujos de ambos iones en el baño externo por otras 2-3 horas (período "hormona"). Así, los animales fueron controles de sí mismos.

- Diuresis. En aquéllos casos en que la orina era desprovista de heces se evaluó la diuresis midiendo el débito urinario directamente en el tubo de centrifuga graduado o probeta en el que desembocaba la cámlula vesical.

- Hormonas. Los tres péptidos utilizados fueron sintéticos. La ocitocina "Syntocinon" fue donada por los Laboratorios Sandoz-Chile; la vasotocina fué obsequiada por el Dr. B. Berde (Sandoz-Suiza) y la mesotocina por los Profesores J. Maetz y J. Rudinger.

Las soluciones originales fueron diluidas en Ringer-anfibio y el volumen inyectado en cada caso osciló entre 0.1 y 0.2 ml/100 gr de peso corporal; en los experimentos "control" se inyectó ese mismo volumen de Ringer-anfibio. Las dosis administradas de hormona (en M/Kg de peso corporal) fueron las siguientes: Ocitocina =  $5.0 \times 10^{-7}$ ; Vasotocina =  $3.0 \times 10^{-8}$  y Mesotocina =  $3.4 \times 10^{-11}$ .

### 3. Resultados

#### I. Flujos netos de $\text{Cl}^-$ y de $\text{Na}^+$

A. Efecto de la ocitocina y de la vasotocina. Puede observarse (Tablas 18 y 19 y Figura 23) que en las ranas pre-adaptadas en  $\text{ClNa}$  estos dos péptidos provocan, básicamente, un mismo fenómeno: "paralelización positiva" de los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$ ; en ambos casos hay una importante inhibición del flujo neto de  $\text{Cl}^-$  hasta valores próximos al de  $\text{Na}^+$ .

TABLA 18. Efecto de la inyección intraperitoneal de ocitocina ( $5.0 \times 10^{-7}$  M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera pre-adaptada en  $\text{ClNa}$  3.4 mEq/l y sumergida en solución de  $\text{ClNa}$  1.7 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Período	fn $\text{Cl}^-$	fn $\text{Na}^+$	Diferencias*
Testigo	+ 9.8 $\pm$ 1.8	+ 7.5 $\pm$ 1.3	+ 2.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
Ocitocina	+ 7.5 $\pm$ 1.3	+ 7.3 $\pm$ 1.4	+ 0.2 $\pm$ 0.4
Diferencias*	+ 2.3 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	+ 0.2 $\pm$ 0.5	

\* ) Diferencias medias de datos pareados  $\pm$  ESM.

a:  $p < 0.02$  ( $t = 3.14$ )

b:  $0.1 < p < 0.05$  ( $t = 2.30$ )

Peso corporal = 305.8  $\pm$  54.1 gr (N = 7).

TABLA 19. Efecto de la inyección intraperitoneal de vasotocina ( $3.0 \times 10^{-8}$  M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera pre-adaptada en  $\text{ClNa}$  3.4 mEq/l y sumergida en solución de  $\text{ClNa}$  1.7 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

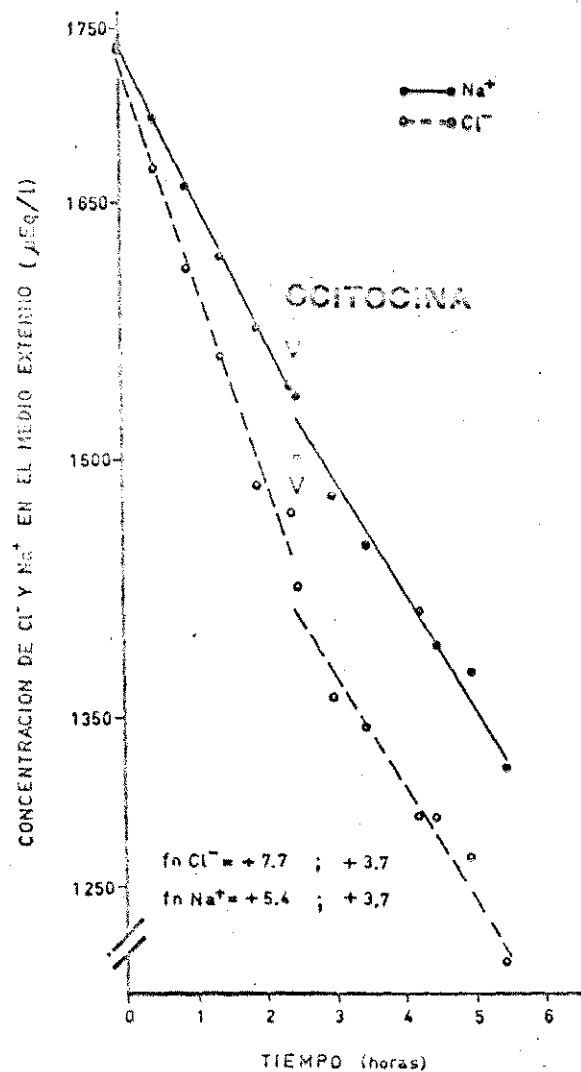
Periodo	fn $\text{Cl}^-$	fn $\text{Na}^+$	Diferencias*
Testigo	+ 9.1 $\pm$ 2.3	+ 5.3 $\pm$ 1.6	+ 3.8 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>
Vasotocina	+ 6.6 $\pm$ 2.3	+ 5.6 $\pm$ 1.7	+ 1.0 $\pm$ 0.6
Diferencias*	+ 2.5 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	- 0.3 $\pm$ 0.6	

\* ) Diferencias medias de datos pareados  $\pm$  ESM.

a:  $p < 0.05$  ( $t = 2.22$ )

b:  $p < 0.01$  ( $t = 3.56$ )

Peso corporal = 192.5  $\pm$  24.6 gr ( $N = 6$ ).



**FIGURA 23.** Efecto de la inyección intraperitoneal de ocitocina sobre los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in vitro de Calrotocophalalla audubertiana pre-adaptada en  $\text{ClNa}$  3.4 mEq/l (Rana N° 212; 533.0 gr). Los flujos netos están expresados en  $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr}$ .

En otro grupo de experimentos estudiamos el efecto de la administración de ocitocina y vasotocina a ranas pre-adaptadas en  $\text{Cl-colina}$  y  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ . En el primer caso se observó (Tablas 20 y 21) igual parale-

lización; sin embargo, en estas ranas dicho efecto se logró por una importante inhibición del fn Na<sup>+</sup> que se reduce hasta valores próximos a los de Cl<sup>-</sup>.

En el segundo caso (ranas pre-adaptadas en SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>) se notó (Tabla 22) después de la inyección de ocitocina una notoria aceleración del flujo neto de Na<sup>+</sup> mientras que el de Cl<sup>-</sup> permanece prácticamente inalterado; la tendencia a la paralelización es evidente toda vez que la diferencia entre los flujos de Cl<sup>-</sup> y de Na<sup>+</sup> se reduce, en el período hormona, a la mitad.

TABLA 20. Efecto de la inyección intraperitoneal de ocitocina ( $5.0 \times 10^{-7}$  M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de Cl<sup>-</sup> y de Na<sup>+</sup> a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera pre-adaptada en Cl-colina 3.4 mEq/l y sumergida en solución de ClNa 1.7 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Período	fn Cl <sup>-</sup>	fn Na <sup>+</sup>	Diferencias*
Testigo	+ 3.4 ± 1.0	+ 7.8 ± 1.2	- 4.4 ± 1.1 <sup>a</sup>
Ocitocina	+ 4.9 ± 1.2	+ 4.2 ± 0.6	+ 0.7 ± 0.8
Diferencias*	- 1.5 ± 0.9	+ 3.6 ± 0.8 <sup>b</sup>	

\* ) Diferencias medias de datos pareados ± ESM

a:  $p < 0.01$  ( $t = 3.95$ ); b:  $p = 0.001$  ( $t = 4.63$ )

Peso corporal =  $231.2 \pm 53.1$  (N = 6)



TABLA 21. Efecto de la inyección intraperitoneal de vasotocina ( $3.0 \times 10^{-8}$  M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera pre-adaptada en Cl-colina 3.4 mEq/l y sumergida en solución de ClNa 1.7 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Período	fn $\text{Cl}^-$	fn $\text{Na}^+$	Diferencias *
Testigo	+ 5.7 $\pm$ 2.1	+ 11.0 $\pm$ 1.3	- 5.3 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>
Vasotocina	+ 4.9 $\pm$ 1.5	+ 7.8 $\pm$ 1.3	- 2.9 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
Diferencias *	+ 0.8 $\pm$ 1.2	+ 3.2 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	

\* ) Diferencias medias de datos pareados  $\pm$  ESM.

a:  $p < 0.01$  ( $t = 4.21$ )

b:  $p < 0.001$  ( $t = 5.48$ )

c:  $p < 0.001$  ( $t = 5.28$ )

Peso corporal = 144.5  $\pm$  16.2 gr (N = 6)

TABLA 22. Efecto de la inyección intraperitoneal de ocitocina ( $5.0 \times 10^{-7}$  M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephala caudiverbera pre-adaptada en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  3.4 mEq/l y sumergida en solución de  $\text{ClNa}$  1.7 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ )

Periodo	fn $\text{Cl}^-$	fn $\text{Na}^+$	Diferencias <sup>*</sup>
Testigo	+ 20.6 $\pm$ 1.5	+ 7.4 $\pm$ 0.8	+ 13.2 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
Ocitocina	+ 19.0 $\pm$ 1.5	+11.9 $\pm$ 1.3	+ 7.1 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
Diferencias <sup>*</sup>	+ 1.6 $\pm$ 1.1	- 4.5 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>	

\* )Diferencias medias de datos pareados  $\pm$  ESM.

a:  $p < 0.001$  ( $t = 8.60$ )

b:  $p < 0.001$  ( $t = 6.87$ )

c:  $p < 0.01$  ( $t = 3.62$ )

Peso corporal = 243.3  $\pm$  22.5 (N = 6).

Queda claro entonces que lo general en el efecto de la ocitocina y de la vasotocina parece ser el fenómeno de la "paralelización" de los flujos netos. Dicha paralelización se logra por inhibición o aceleración de uno de los flujos dependiendo de la historia previa del animal. El efecto (inhibición o aceleración) se ejerce siempre sobre uno de los dos flujos.

B. Efecto de la mesotocina. Después de la inyección de mesotocina las ranas pre-adaptadas en ClNa responden con una "paralelización negativa" de los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  (Tabla 23 y Figura 24). En otras palabras, ambos flujos se hacen negativos y las ranas pierden  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en cantidades equivalentes.

TABLA 23. Efecto de la inyección intraperitoneal de mesotocina ( $3.4 \times 10^{-11}$  M/Eg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephallella caudiverbera pre-adaptada en ClNa 3.4 mEq/l y sumergida en solución de ClNa 1.7 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Periodo	fn $\text{Cl}^-$	fn $\text{Na}^+$	Diferencias*
Testigo	+ 7.8 $\pm$ 1.4	+ 5.5 $\pm$ 0.0	+ 2.3 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
Mesotocina	- 4.3 $\pm$ 2.4	- 3.8 $\pm$ 2.6	- 0.5 $\pm$ 0.9
Diferencias*	+ 12.1 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>	+ 9.3 $\pm$ 1.9 <sup>c</sup>	

\* ) Diferencias medias de datos pareados  $\pm$  ESM.

a:  $p = 0.20$ ; b:  $p < 0.01$  ( $t = 4.50$ ); c:  $p = 0.001$  ( $t = 4.85$ )

Peso corporal = 125.7  $\pm$  6.6 (N = 6).

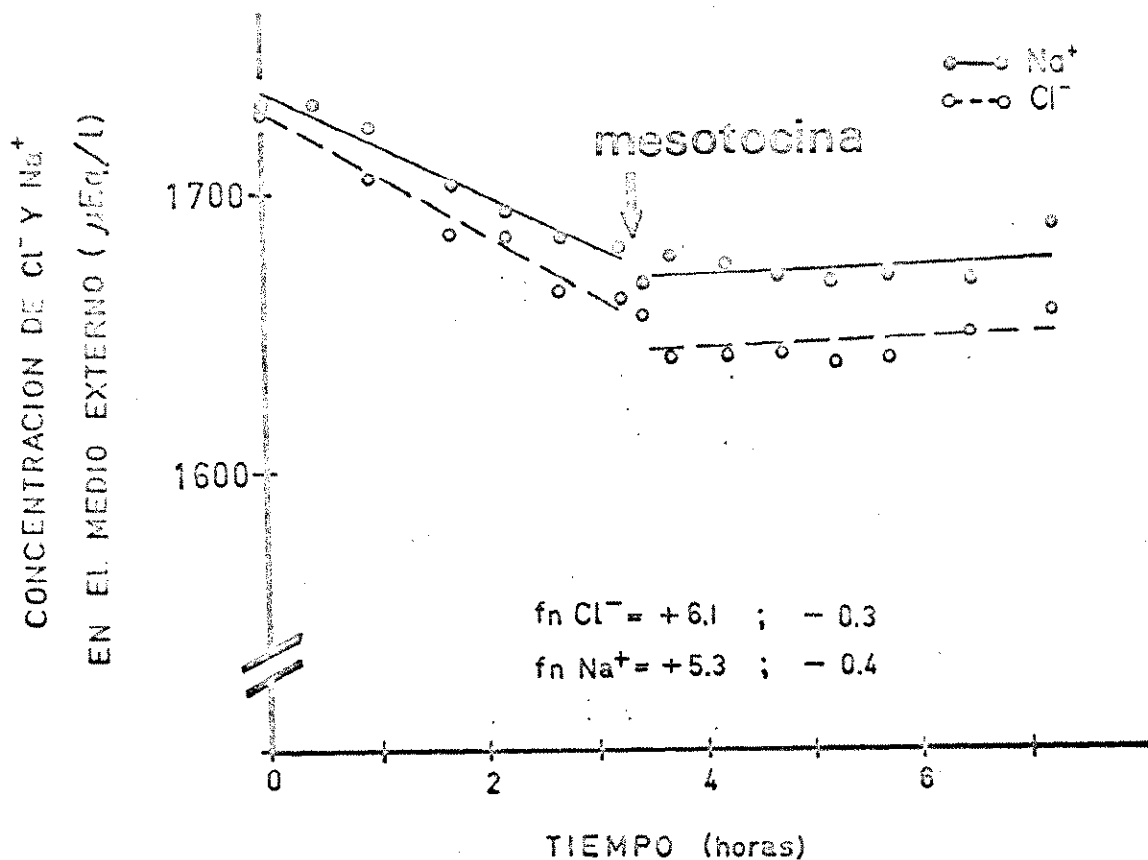


FIGURA 24. Efecto de la inyección intraperitoneal de mesotocina sobre los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera pre-adaptada en  $\text{ClNa}$  3.4  $\text{mEq}/\text{l}$  (Ran. N° 271; 105.8 gr). Los flujos netos ( $fn$ ) están expresados en  $\mu\text{Eq}/\text{hr} \pm 100$  gr.

Con el propósito de investigar su efecto independiente sobre los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$ , inyectamos la misma dosis de mesotocina a ranas pre-adaptadas en  $\text{ClNa}$  pero sumergidas en  $\text{Cl}$ -colina y  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , respectivamente (Tablas 24 y 25). Como se observará, el efecto antes mencionado (paralelización negativa) vuelve a registrarse con las mismas características.

TABLA 24. Efecto de la inyección intraperitoneal de mesotocina ( $3.4 \times 10^{-11}$  M/Kg de peso corporal) sobre el flujo neto (nl) de  $\text{Cl}^-$  a través de la piel in situ de Galyptoccephalella pusdiverbera pre-adaptada en  $\text{ClNa}$  3.4 mEq/l y sumergida en solución de  $\text{Cl-colina}$  1.7 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Período	fn $\text{Cl}^-$
Testigo	+ 6.8 $\pm$ 1.8
Mesotocina	- 1.4 $\pm$ 2.2
Diferencia*	+ 8.2 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>

\* )Diferencia media de datos pareados  $\pm$  ESM.

a:  $p < 0.001$  ( $t = 8.37$ )

Peso corporal = 146.0  $\pm$  30.9 gr (N = 5).

TABLA 25. Efecto de la inyección intraperitoneal de mesotocina ( $3.4 \times 10^{-11}$  M/Kg de peso corporal) sobre el flujo neto (fn) de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera pre-adaptada en ClNa 3.4 mM/l y sumergida en solución de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  1.7 mM/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Período	fn $\text{Na}^+$
Testigo	+ 2.4 $\pm$ 0.5
Mesotocina	- 1.6 $\pm$ 0.6
Diferencia *	+ 4.0 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>

\* ) Diferencia media de datos pareados  $\pm$  ESM.

a:  $p < 0.01$  ( $t = 3.97$ )

Peso corporal =  $159.9 \pm 21.3 \text{ gr}$  ( $N = 7$ ).

La misma inhibición de los flujos netos después de la inyección de mesotocina se observó en otro grupo de ranas pre-adaptadas en Cl-colina y puesta en ClNa (Tabla 26); en este caso no se observó la "paralelización" anterior.

TABLA 26. Efecto de la inyección intraperitoneal de mesotocina ( $3.4 \times 10^{-11}$  M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calvotocephalella caudiverbera pre-adaptada en Cl-colina 3.4 mEq/l y sumergida en solución de ClNa 1.7 mEq/l ( $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr} \pm \text{ESM}$ ).

Período	fn $\text{Cl}^-$	fn $\text{Na}^+$	Diferencias
Testigo	$+ 1.8 \pm 1.6$	$+ 5.7 \pm 0.8$	$- 3.9 \pm 1.1^a$
Mesotocina	$- 4.6 \pm 2.6$	$- 0.7 \pm 1.5$	$- 3.9 \pm 1.8^b$
Diferencias*	$+ 6.4 \pm 2.6^c$	$+ 6.4 \pm 1.7^d$	

\* ) Diferencias medias de datos pareados  $\pm$  ESM.

a:  $p < 0.005$  ( $t = 3.65$ )

b:  $0.05 < p < 0.10$  ( $t = 2.14$ )

c:  $p = 0.025$  ( $t = 2.60$ )

d:  $p < 0.005$  ( $t = 3.83$ )

Peso corporal =  $222.5 \pm 17.9 \text{ gr}$  ( $N = 6$ ).

C. Efecto de la inyección de Ringer-anfibio. Las respuestas de las ranas a la inyección de las hormonas neurohipofisarias mencionadas en A y B son específicas toda vez que en los experimentos "control" la sola administración de Ringer-anfibio no reprodujo ninguno de los efectos de dichas hormonas (Tabla 27). Además, debe decirse que las hormonas provocaron su efecto de manera inmediata (15 - 30 minutos), el que perduró varias horas.

Tabla 27. Efecto de la inyección intraperitoneal de Ringer-anfibio (1.0 ml/Kg de peso corporal) sobre los flujos zetos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de Calyptocephalella caudiverbera preadaptada en diferentes soluciones de 3.4 mEq/l y puesta en solución de  $\text{Cl}^-$  1.7 mEq/l (promedios en  $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr}$ ).

Pre-adaptación	N	Peso corporal (gr)	fn $\text{Cl}^-$		fn $\text{Na}^+$	
			pre	post	pre	post
ClNa	3	158.3	+ 7.2	+ 6.5	+ 1.4	+ 1.7
Cl-colina	4	141.3	+ 6.9	+ 6.8	+ 7.4	+ 8.0
$\text{SO}_4 \text{Na}_2$	4	159.0	+ 16.7	+ 14.7	+ 5.9	+ 5.4



### III. Diuresis.

En los animales pre-adaptados y sumergidos en ClNa la ocitocina y la vasotocina produjeron una inmediata y drástica oxididrosis. La mesotocina, en cambio, está desprovista de aquél efecto; por el contrario, produjo una considerable diuresis (Tabla 28). Ambos tipos de respuesta fueron visualizados inmediatamente después de la inyección y duraron varias horas.

TABLA 28. Efecto de la inyección intraperitoneal de ocitocina, vasotocina y mesotocina sobre la diuresis de Calyptracophalella caudiverbera pre-adaptada en ClNa 3.4 mEq/l y sumergida en solución de ClNa 1.7 mEq/l (ml/hr x 100  $\pm$  ESE).

Ítems de la Tabla N <sup>o</sup> , Hormona inyectada	n	Período testigo	Período hormonal	Diferencia	Cambio %
18 - Ocitocina	6	1.3 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.1	- 0.9 $\pm$ 0.4	- 69.2
19 - Vasotocina	5	0.7 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	- 0.4 $\pm$ 0.1	- 57.1
23 - Mesotocina	6	1.4 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.6	+ 0.4 $\pm$ 0.2	+ 28.6

Cuarta Parte.

DISCUSION GENERAL.

1. Efecto de las pre-adaptaciones sobre el medio interno.

En la Tabla 29 se alistan, comparativamente, las natremias y cloremias de batracios de diverso habitat. Como puede apreciarse, a pesar de su hábito (acuático) dichos valores de Calyptocephalella caudiverbera adulta mantenida en agua potable no son diferentes de la de otros anuros. Asimismo, la natremia de Bufo arunco es muy próxima a la de otros Bufo; tampoco se notan diferencias entre anuros y urodelos. El caso de Ambystoma mexicanum muestra que la transición larva (acuática) → adulto (terrestre) no va acompañada por cambios en las concentraciones séricas de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ .

Los resultados de la Tabla 3 indican que los ejemplares de la rana chilena pre-adaptados en diversas soluciones de  $\text{ClNa}$  pueden considerarse legítimamente como "controles" toda vez que, por lo menos, su natremia y cloremia no son diferentes de la de los animales mantenidos en agua potable.

Antes de ahora (Tablas 7 y 8) llamamos la atención al hecho de que los flujos iónicos de B. arunco y C. caudiverbera pre-adaptados en agua destilada resultaban ser muy próximos a los del grupo "control". Si bien este hallazgo merece mayor trabajo experimental, hemos de recordar que Crabbé (1963) mostró que la aldosteronemia de Bufo marinus mantenido en agua destilada es notoriamente superior a la de los controles. Por otra parte sabemos que C. caudiverbera pre-adaptada en agua destilada se deshidrata con respecto a los animales controles (Salibián, inédito); las primeras (N = 5) tienen  $75.3 \pm 0.8$  % de humedad, mientras que las controles (N = 8) tienen  $79.5 \pm 1.6$  % de humedad ( $p < 0.005$ ;  $t = 4.40$ ). Esta deshidratación (4.2 %) puede ser estímulo suficiente para aumentar significativamente los niveles circulantes de neuropéptidos (Bentley, 1969 b).

TABLA 29. Concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  en el suero de diversos anfibios. Datos en mEq/l.

Espece	Hábito	$\text{Cl}^-$	$\text{Na}^+$	Referencias bibliográficas
<u>I. Anuros:</u>				
<u>C. caudiverbera</u>	acuático	69.9	105.6	Este trabajo, Tabla 3.
<u>R. temporaria</u>	semi-acuático	75.4	103.8	Schoffeniels y Tercate, 1965/66.
<u>R. pipiens</u>	semi-acuático	77.0	104.8	Huf, Wills y Arrighi, 1955.
<u>B. marinus</u>	terrestre	100.4	116.2	Shoemaker, 1964.
<u>B. arunco</u>	terrestre	--	116.7	Preller y González, comunicación personal.
<u>II. Urodelos:</u>				
<u>A. mexicanum</u>				
larva	acuático	76.0	107.4	Aceves, Erij y Whittenbury, 1970.
adulto	terrestre	81.2	106.1	
<u>T. torosa</u>		--	103.9	Crim, 1972.

Los dos factores antes mencionados (aumento de aldosteronemia y de hormonas neurohipofisarias) pueden ser los responsables de una reabsorción aumentada de  $\text{Na}^+$  en la vejiga urinaria y el riñón, de manera que la "normalidad" de los flujos netos de  $\text{Na}^+$  no sería mas que el reflejo de una natremia "normal" obtenida, indirectamente, gracias a aquéllos mecanismos endocrinos que se desencadenarían al pre-adaptar

los animales en agua destilada.

Bentley (1973) ha mostrado la validez de esta posibilidad en tres anfibios de diverso hábito sumergidos en soluciones diluídas de amilorida; dicho diurético bloquea el influjo de  $\text{Na}^+$  de manera que ese tratamiento puede ser equivalente a nuestra pre-adaptación en agua destilada. Después de una inmersión de 15 días la natremia de los batracios en contacto con amilorida no fué diferente de la de los controles mantenidos en agua potable.

La hipótesis que estamos planteando, de ser válida, implica también una inhibición simultánea de la diuresis, una disminución notoria de los iones excretados por el sistema renal y, también, es probable un aumento de la osmolaridad plasmática. En efecto, en algunos experimentos preliminares (Salibián, Preller y Robres, inédito) pudimos comprobar que la pre-adaptación de B. arunco en agua destilada produce una disminución, aproximada, del 70 % de la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$ . Recientemente, A. Preller y T. González (comunicación personal) confirmaron aquéllos resultados previos sobre un número mayor de ejemplares; en el grupo control (N = 25) la concentración de sodio en la orina fué de  $4.4 \pm 0.4 \mu\text{Eq}/\text{l}$  mientras que en el pre-adaptado en agua destilada (N = 15) fué de  $1.2 \pm 0.2 \mu\text{Eq}/\text{l}$ . En otras observaciones, también inéditas hasta ahora, pudimos detectar una disminución del 60 % en la diuresis de sapos pre-adaptados en agua destilada comparados con los controles mantenidos en ClNa.

El reciente hallazgo de Alvarado (1972), quien mostró que en Ambystoma tigrinum deshidratado el Cl pasa de los tejidos al plasma, aporta otro elemento mas en favor de nuestra postulada "normalidad" de los elementos plasmáticos de animales pre-adaptados en agua destilada.

## 2. Independencia de los flujos netos de $\text{Cl}^-$ y de $\text{Na}^+$ .

Los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ son independientes. Tres son las evidencias experimentales que con diversa fuerza justifican esta conclusión:

- a) captación desigual de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  desde soluciones de  $\text{ClNa}$ ,
- b) captación de iones a partir de soluciones en las que el co-ion es impermeante , y
- c) inhibición selectiva e inmediata de uno de los flujos mientras el otro permanece inalterado.

En el caso de Leptodactylus ocellatus la coincidencia de las medidas de la conductividad del baño externo con las de los flujos netos de  $\text{Na}^+$  (pero no con los de  $\text{Cl}^-$ ) (Tabla 6) sugiere la posibilidad de que en esta especie una parte del  $\text{Cl}^-$  sea acompañado de  $\text{Na}^+$  y que el resto pueda ser intercambiado por algún otro ion endógeno. Posiblemente esta ligazón entre ambos flujos desaparezca cuando aumenten sus concentraciones en el medio externo.

Sin embargo, la disociación de los flujos netos que se observa en las tres especies estudiadas, después de pre-adaptaciones en soluciones de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , no deja lugar a dudas en cuanto a la posibilidad, por lo menos potencial, de que el  $\text{Cl}^-$  y el  $\text{Na}^+$  puedan ser captados de manera independiente. En el mismo sentido, la captación de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  desde diferentes soluciones de  $\text{Cl-colina}$  o de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  (en el caso de B. arunco y C. caudiverbera) es una clara y adicional indicación de la independencia que nos ocupa.

Por último, la inhibición instantánea de sólo uno de los flujos (en C. caudiverbera) es otra prueba en favor de la independencia de los mecanismos de captación de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$ .

A pesar de que las evidencias mencionadas pueden parecer conclusiva por si mismas, debemos señalar que nuestros resultados en B.

arunco y en C. caudiverbera parecen indicar que por debajo de ciertas concentraciones de ClNa, la presencia de Cl<sup>-</sup> condiciona, de una manera difícil de interpretar por ahora, la permeabilidad de la piel in situ al Na<sup>+</sup>. Cuando los flujos de Na<sup>+</sup> se miden en animales sumergidos en SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> es necesario aumentar varias veces la concentración del medio externo hasta lograr flujos netos que sean comparables con los obtenidos cuando están soluciones de ClNa. De todas maneras, es evidente que por encima de ciertas concentraciones la independencia es real y los animales son capaces de captar Na<sup>+</sup> desde soluciones de SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>.

Aquella interdependencia de los flujos de Cl<sup>-</sup> y de Na<sup>+</sup> in vivo por debajo de cierta concentración externa parece ser una característica común a diversos epitelios; también ocurre, por ejemplo, en Astacus (Shaw, 1959, 1960 a), en larvas de Aedes aegypti (Stobbart, 1965, 1967), en la piel in vitro de Rana ridibunda (Ferreira, 1968, 1973) y de Ambystoma mexicanus (Aceves, Erluj y Edwards, 1968) y en la de A. gracile in vivo (Alvarado y Stiffler, 1970).

Tanto en B. arunco como en C. caudiverbera hay una relación entre la concentración de Na<sup>+</sup> en el baño externo y su flujo neto in vivo (Figuras 8 y 10). Carlisky, Cereijido, Barrio y Migliora (1970) mostraron que la piel aislada de la rana chilena es también capaz de transportar Na<sup>+</sup> activamente desde soluciones muy diluidas de SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> y que cuando la concentración externa llega a los 115 mM el sistema se satura (0.29 ± 0.02 uEq/hr x cm<sup>2</sup>). Esta misma dependencia concentración/flujo neto fue señalada para el caso del transporte de Cl<sup>-</sup> y de Na<sup>+</sup> a través de la piel aislada de Leptodactylus ocellatus (Fischbarg, Zadunaisky y De Fisch, 1967; Rotunno y Cereijido, 1966). Sin embargo, nosotros no hemos podido detectar una dependencia similar en los flujos netos de Cl<sup>-</sup> in vivo de C. caudiverbera pre-adaptada en agua destilada y sumergida en soluciones diluidas de ClNa. Posiblemente, las concentraciones de ClNa en que las ranas fueron sumergidas

para las medidas de los flujos netos hayan sido muy bajas. La velocidad de penetración de  $\text{Cl}^-$  es, en nuestro caso, independiente del catión acompañante; esta es una de las diferencias cruciales con la mayor parte de los datos de flujos netos de  $\text{Cl}^-$  in vitro los que se describen acoplados al  $\text{Na}^+$ . Nos llama la atención que cuando se miden simultáneamente, los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  son siempre mayores que los de  $\text{Na}^+$ ; se trata de una característica que resultó ser común a las tres especies estudiadas.

La captación independiente de iones se sabe que ocurre in vivo a través de las branquias de crustáceos (Shaw, op. cit) y de peces eurihalinos o de agua de mar (Maetz, 1968; Motais, 1967; Motais y García Romeu, 1972), en larvas de artrópodos (Stobbert, 1965, 1967, 1971), salamandras (Dietz, Kirschner y Porter, 1967) y anuros (Alvarado y Moody, 1970), cutícula de anélidos (Dietz y Alvarado, 1970), plantas (Mac Robbie, 1970) y microorganismos (Slayman y Slayman, 1968). La información que poseemos referente a especies de anuros adultos confirma la independencia in vivo de los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  (Tabla 30).

TABLA 30. Flujos netos (fn) de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  a través de la piel in situ de diversos anfibios pre-adaptados en diferentes soluciones y sumergidos en soluciones de  $\text{ClNa}$  (0.9 - 3.0 mM). Medias en  $\mu\text{Eq/hr} \times 100 \text{ gr.}$

Especie	Solución de pre-adaptación	fn $\text{Cl}^-$	fn $\text{Na}^+$	Dife- rencias**	Referencias bibliográficas
<u>R. temporaria</u> (4)	$\text{CO}_3\text{HNa} - 120$ *	+ 20.3	- 7.2	+ 27.5	a
<u>R. temporaria</u> (4)	agua destilada	+ 15.8	+ 17.5	- 1.7	a
<u>R. esculenta</u> (6)	$\text{CO}_3\text{HNa} - 10$	+ 50.7	+ 25.4	+ 25.3	a
<u>R. esculenta</u> (6)	$\text{Cl}_2\text{Ca} - 2$	- 7.7	+ 25.4	- 33.1	a
<u>L. ocellatus</u> (6)	$\text{SO}_4\text{Na}_2 - 0.4$	+ 9.5	+ 1.9	+ 7.6	b
<u>B. arunco</u> (5)	$\text{Cl-colina} - 1.7$	+ 8.4	+ 26.6	- 18.2	c
<u>C. caudiverbera</u> (40)	$\text{ClNa} - 3.4$	+ 7.8	+ 5.5	+ 2.3	d

Entre paréntesis, número de mediciones.

\*) Concentración de las soluciones, en mM.

\*\*\*) Diferencia algebraica (fn  $\text{Cl}^-$  - fn  $\text{Na}^+$ )

a: Jorgensen, Levi y Zerahn, 1954

b: Este trabajo, Tabla 5.

c: Este trabajo, Tabla 7.

d: Este trabajo, Tabla 8.



Habiendo quedado demostrado que la piel in situ es capaz de captar un anión o un catión de manera independiente, debemos concluir que el mecanismo más probable que estaría involucrado en dichos procesos es el de intercambio estequiométrico de aquellos iones exógenos ( $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ ) por otros de origen endógeno. En otras palabras, debemos postular la existencia, por lo menos, de dos intercambiadores iónicos, uno aniónico y el otro catiónico. Es evidente que esta posibilidad es la única que permite mantener la electroneutralidad de las soluciones en las que los animales están sumergidos.

Motais y García Romeu (1972) avanzaron una interpretación general y simple de estos mecanismos de captación independiente de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  por la piel in vivo de los batracios la que consideramos pertinente y de la que nos permitimos adoptar algunas de sus consideraciones. Dicha interpretación postula, básicamente, la presencia de cargas fijas en la membrana lo que daría cuenta de: a) la independencia, concibiendo la existencia de poros provistos de cargas (positivas o negativas); los co-iones impermeantes no penetrarían por impedimentos estéricos mas que por efecto de carga, y b) del efecto del pH: los cambios de pH provocarían modificaciones en la ionización de los poros lo que a su vez sería responsable del comportamiento de la piel, por ejemplo, al ser acidificada. Los resultados de los experimentos de inhibición con anestésicos locales también sugieren la validez de la mediación de las cargas fijas de los fosfolípidos de las membranas (Blaustein y Goldman, 1966)

Aunque por ahora sin bases experimentales sólidas, proponemos un mecanismo final compuesto de los intercambiadores aquí estudiados, que regulen de alguna manera la calidad y cantidad de los iones que entran, acoplado a una bomba iónica capaz de realizar el trabajo necesario para el transporte de los iones en contra de su gradiente electroquímico (véase Kirschner, 1970).

La ubicación precisa de los intercambiadores así como su exacta naturaleza escapan a nuestro conocimiento actual

3. Naturaleza de los iones endógenos intercambiados por  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  externos.

- Amonio. Los datos cuantitativos referentes a la excreción de  $\text{NH}_4$  por la piel de anfibios son escasos. En la Tabla 31 se comparan las mediciones efectuadas sobre Leptodactylus ocellatus y Calyptocephalla caudiverbera con algunos datos correspondientes a otras especies.

TABLA 31. Excreción de  $\text{NH}_4^+$  (fn  $\text{NH}_4^+$ ) a través de la piel in situ de diferentes anfibios (medias, en uEq/hr x 100 gr).

Espece	Hábito	fn $\text{NH}_4^+$	Referencias bibliográficas
<u>I. Anuros:</u>			
<u>L. ocellatus</u>	semi-acuático	- 0.9	Este trabajo, Tabla 14.
<u>C. caudiverbera</u>	acuático	- 0.4	Este trabajo, Tabla 15.
<u>X. laevis</u>	acuático	- 4.0	Balinsky y Baldwin, 1961.
<u>II. Urodelos:</u>			
<u>A. tigrinum</u> (larvas)	acuático	- 7.1	Dietz, Kirschner y Porter, 1967.
<u>N. maculosus</u>	acuático	- 12.3	Fanelli y Goldstein, '64
<u>A. gracile</u> (larvas)	acuático	- 20.0	Alvarado y Stiffler, 1970.

Si bien la principal vía de excreción nitrogenada es, en los anfibios adultos, el sistema renal, la piel juega un rol no despreciable; Krogh (1939) fue el primero en sugerir, aunque sin pruebas experimentales, que el intercambio de cationes externos podría efectuarse a través de la piel, por  $\text{NH}_4^+$  endógeno.

En algunas especies de batracios, como en Necturus maculosus el 90 % de la excreción nitrogenada se hace (como  $\text{NH}_4^+$ ) a través de la piel (Fanelli y Goldstein, 1964). Por otra parte, hay casos en los que la piel juega un papel despreciable en la eliminación del  $\text{NH}_4^+$ ; tal es el caso de Xenopus laevis que elimina menos del 15 % de amonio por la piel (Balinsky, 1970). Coincidentemente, nuestros resultados en C. caudiverbera y en L. ocellatus sugieren, sin duda, que la piel de estas especies no es el lugar principal de excreción nitrogenada; la cantidad de  $\text{NH}_4^+$  excretada por la piel de la primera corresponde, aproximadamente, al 1% de la eliminada por la orina (Espina, Rojas y Sallibán, en preparación).

Los resultados en L. ocellatus (Tabla 14) sugieren un intercambio parcial de  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ . Sin embargo, si dicho intercambio fuese real, la inyección de sales de amonio debería producir un aumento substancial en el flujo neto de  $\text{Na}^+$  como ocurre en peces dulceacuícolas y marinos (Maetz y García Romeu, 1964; Payan y Maetz, 1973). No obstante, en algunos experimentos previos, la inyección intraperitoneal de sulfato de amonio (1 mEq/100 gr de peso corporal) a L. ocellatus no produjo, en ningún caso, modificaciones en los flujos de  $\text{Na}^+$ . Por eso creemos que la correlación observada entre la excreción de amonio y la captación de  $\text{Na}^+$  (Figura 14) debe ser fortuita y que su explicación resida simplemente en algún mecanismo de difusión pasiva de  $\text{NH}_3$ . En este mismo caso de L. ocellatus puede ser válida la explicación sugerida por Maetz (1972, 1973) en el sentido de que el intercambio  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$  no sea obligatorio

y que dependa, por ejemplo, de la magnitud de los  $\text{fn Na}^+$  la que establecería un "umbral" por encima del cual el  $\text{Na}^+$  se intercambia por  $\text{H}^+$  mientras que por debajo predominaría el proceso  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ .

En C. caudiverbera (Tabla 15) no parece existir correlación alguna entre el  $\text{Na}^+$  captado y el  $\text{NH}_4^+$  eliminado al medio externo.

- Hidrógeno y bicarbonato. Se sabe que la piel de los batracios in vivo e in vitro es capaz de crear a ambos lados de ella un gradiente de  $\text{H}^+$ ; el lado mucoso se acidifica y el seroso (o interno) se alcaliniza (Emilio, Machado y Menano, 1970; Fleming, 1957; Friedman, LaPrade, Aiyawar, y Huf, 1967; Friedman, Aiyawar, Hughes y Huf, 1967). Nuestros resultados confirman aquélla capacidad y estamos en condiciones de interpretarla como una consecuencia del intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ; Ussing (1949) había sugerido previamente esta alternativa.

Fleming (op. cit.) descartó la posibilidad de este mecanismo de intercambio catiónico al no poder detectar cambios en el pH de la solución externa. En efecto, es imposible correlacionar los cambios de pH en el medio externo con los cambios reales en la concentración de  $\text{H}^+$  ya que estando ambos intercambiadores funcionando, el medio externo se amortigua; así, los  $\text{H}^+$  secretados por el  $\text{Na}^+$  externo captado, son atrapados por la solución externa y el pH prácticamente no se modifica; por eso, la forma correcta de evaluar la excreción de hidrogeniones por la piel in vivo es titular alícuotas de la solución externa hasta neutralidad teniendo sumergidos los animales en soluciones en las que el anión sea impermeante (por ejemplo,  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ ).

Los resultados de Emilio y colaboradores (op. cit.) muestran también que en la piel aislada de Rana ridibunda no hay relación entre la corriente de corto-circuito y la excreción de  $\text{H}^+$ ; este hallazgo permite concluir que bajo condiciones in vitro el intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$

no es funcional y que el transporte de  $H^+$  hacia el lado mucoso no es, como lo señaló García Romeu (1971), condición para que exista transporte neto de  $Na^+$  hacia el lado seroso.

En el caso del intercambiador aniónico no parece haber dificultad en reconocer al bicarbonato como el anión endógeno excretado para compensar el  $Cl^-$  absorbido cuando C. caudiverbera está sumergido en Cl-colina o en ClNa. Los valores de pK de la Base excretada así como el significativo aumento de la capacidad amortiguadora de la solución externa, indican que el  $CO_3H^-$  debe ser el ion involucrado en el intercambio; este último argumento excluye la alternativa de que otros aniones,  $OH^-$  por ejemplo, puedan ser los intercambiados a través de la piel.

La inhibición del transporte neto de  $Na^+$  in vivo que hemos observado después de acidificar la solución externa es una propiedad también descrita en la piel in vitro de diversas especies (Funder, Ussing y Wieth, 1967; Snell y Mc Intyre, 1960).

Resultados similares a los nuestros fueron publicados recientemente por Kirschner, Greenwald y Kerstetter (1973) en la piel intacta de Rana pipiens; García Romeu (comunicación personal) ha extendido estos hallazgos a la piel de R. esculenta.

Aparte de los anfibios, la captación de iones por intercambio in vivo en epitelios ha sido postulada, como lo hemos señalado anteriormente, en numerosos casos. En las branquias de peces hay evidencias directas e indirectas de que los intercambios que ocurren en ellas son  $Na^+/NH_4^+$ ,  $Na^+/H^+$  y  $Cl^-/CO_3H^-$  (Kerstetter, Kirschner y Rafuse, 1970; Maetz, 1972; Motais y García Romeu, 1972; Payan y Maetz, 1973). Stobbart (1971) demostró que las larvas de Aedes aegypti son capaces de intercambiar parcialmente el  $Cl^-$  y el  $Na^+$  externos por  $CO_3H^-$  e  $H^+$ , respectivamente.

#### 4. Origen de los iones endógenos.

En la mayor parte de los anfibios, el  $\text{CO}_2$  se excreta principalmente a través de la piel mientras que el  $\text{O}_2$  se absorbe mayormente por los pulmones (Foxon, 1964; Hutchison, Whitford y Kohl, 1968; Whitford y Hutchison, 1965). Siendo que la piel de los batracios carece de anhidrasa carbónica (Maren, 1967), cabe preguntarse por el origen del bicarbonato intercambiado por cloro cuando los animales están sumergidos en diversas soluciones; en este contexto, también es lícito pensar en la posible relación entre el  $\text{CO}_2$  respiratorio y el  $\text{CO}_3\text{H}^-$  eliminado al medio (Robin, Bromberg y Cross, 1969).

A la luz de los datos de Friedman, LaPrade, Aiyawar y Huff (op. cit.) que muestran que la concentración de  $\text{CO}_3\text{H}^-$  de la piel de Rana pipiens es prácticamente igual a la de su plasma, es razonable postular que la sangre es el lugar de origen del bicarbonato detectado en las soluciones externas.

Las curvas de disociación del  $\text{CO}_2$  en el plasma de anfibios muestran que la sangre de este grupo lo retiene mucho más que la de otros vertebrados (Foxon, op. cit.; Prosser y Brown, 1965; Redfield, 1933) especialmente bajo forma de  $\text{CO}_3\text{H}^-$ ; efectivamente, la concentración de  $\text{CO}_3\text{H}^-$  del plasma de los batracios es superior a la de otros vertebrados acuáticos (Rahn, 1966 b).

El papel respiratorio de la piel de los anfibios ha de ser diferente según si el animal está dentro o fuera del agua. La captación de  $\text{O}_2$  por la piel será mucho menor en agua debido a la escasa solubilidad de aquel gas en agua; por eso es evidente que en C. caudiverruca sumergida en soluciones la efectividad de la piel como órgano respiratorio es muy limitada.

Esta aparente insuficiencia de la piel es compensada en los anfibios adultos por una mayor concentración de hemoglobina (respecto

a los peces) que permite un transporte de  $O_2$  aumentado (Lenfant y Johansen, 1972)<sup>7</sup>. Del mismo modo la afinidad de la Hb por el  $O_2$  decrece gradualmente cuando se compara esa propiedad en vertebrados de hábitos acuáticos con los de hábitos terrestres; en otras palabras, esta disminución de la afinidad de la Hb por  $O_2$  no es mas que un aumento de la presión parcial de oxígeno en la sangre y, por consiguiente, su mayor disponibilidad por parte de los tejidos (Johansen y Lenfant, 1972; Lenfant y Johansen, 1967, 1972).

En el aire, en cambio, la mayor captación de  $O_2$  ha de provocar una mayor conversión de la Hb en oxihemoglobina, lo que a su vez disminuye el pH (Just, Gatz y Crawford, 1973; Rahn, 1966 a) y la acidosis producida provocaría una disociación del  $CO_3H^-$  en  $CO_2$  y  $OH_2$  en una reacción catalizada por la anhidrasa carbónica de los glóbulos rojos.

Por lo anteriormente expuesto, cuando los animales están en el aire la piel asume un importante rol respiratorio y excreta principalmente  $CO_2$ ; en cambio al estar los animales sumergidos, aquella disociación no ha de ocurrir o ha de ocurrir en muy baja proporción, con lo que el ion predominante sería  $CO_3H^-$ , el que finalmente será excretado por intercambio con  $Cl^-$  externo. La inmersión debe significar un "shift" en la excreción de  $CO_2$  a  $CO_3H^-$  debido a la muy diferente disponibilidad de  $O_2$  ambiental.

Con respecto al  $H^+$  intercambiado por  $Na^+$  podemos postular un origen similar. Si el  $CO_3H^-$  es eliminado por la piel, el  $CO_3H_2$  debe disociarse como  $CO_3H^- + H^+$  para poder mantener el equilibrio  $CO_3H^-/CO_3H_2$ .

Así, los mecanismos de captación aquí discutidos están ligados íntimamente a los procesos respiratorios que residen en la piel y al

<sup>7</sup>) El lector podrá encontrar información adicional referente a la hematología de *G. caudiverbera* en el trabajo de González, Vallejos y Polgado (1969).

mantenimiento del equilibrio acido-base.

5. Efecto de las hormonas neurohipofisarias sobre los flujos netos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$ .

La ocitocina y la vasotocina produjeron, en Calyptocephalella caudiverbera básicamente el mismo tipo de respuesta que denominamos como "paralelización positiva" de los flujos; dicha paralelización se logra, en ambos casos, por la inhibición del flujo neto de  $\text{Cl}^-$  mientras que el de  $\text{Na}^+$  permanece prácticamente inalterado. El resultado final es que la piel de las ranas controles (o pre-adaptadas en  $\text{ClNa}$ ) pierde su conocida capacidad de discriminar independientemente la captación de iones del medio externo y los incorpora, inmediatamente después de la inyección, juntos, a la misma velocidad. Cuando ambos péptidos son administrados a ranas pre-adaptadas en  $\text{Cl-colina}$  se logra el mismo efecto final (paralelización) pero por un mecanismo diferente: el  $\text{fn Na}^+$  se inhibe mucho más que el de  $\text{Cl}^-$  (que permanece casi sin modificarse).

Por otra parte nos encontramos con que en los animales  $\text{Cl-deficientes}$  (mantenidos en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ ) e inyectados con ocitocina se ve la misma tendencia a la paralelización pero por un mecanismo diferente, esto es, por aceleración del flujo más lento ( $\text{fn Na}^+$ ). La respuesta no es, en este caso, tan clara como en el caso de las ranas controles y pre-adaptadas en  $\text{Cl-colina}$ , lo que podría deberse, posiblemente, a que la dosis inyectada fue insuficiente para lograr una paralelización real.

De manera más general diremos que después de la administración de ocitocina y de vasotocina, el flujo neto más alto es el que se inhibe o que la historia iónica previa del animal condiciona la respuesta que es en ambos casos la misma: paralelización positiva de los flujos.

Después de la inyección de mesotocina, en cambio, nos encontramos que tanto las ranas controles como las mantenidas en  $\text{Cl-colina}$



responden con una "paralelización negativa"; en otras palabras, las ranas empiezan a perder, de inmediato, ambos iones a la misma velocidad y su piel también pierde la capacidad de separar ambos flujos como ocurría en el período testigo de los experimentos. Más aún, cuando los flujos son medidos sobre ranas sumergidas en soluciones en las que el co-ion es impermeante, también se observa la misma inhibición.

La respuesta de C. caudiverbera a la inyección de ocitocina y vasotocina es cualitativamente semejante y es claro que la segunda fue igualmente activa en dosis 15 veces menores; esto habla en favor de una mayor sensibilidad de sus efectores a ella, confirmando hallazgos de otros autores (Bentley, 1969 a; Heller, 1965; Jard, 1966) quienes interpretan este comportamiento como prueba de que la hormona es la Arg-8-ocitocina.

En nuestros experimentos sobre animales controles, la ocitocina y la vasotocina provocaron inhibición del flujo de  $\text{Na}^+$  contrariamente a lo que clásicamente se describe como "efecto natriférico" en la piel in vitro de batracios (Bentley, 1971; Morel y Jard, 1968; Sawyer, 1968).

Esta es una de las pocas veces en la que se evaluó el efecto de las hormonas posterohipofisarias sobre el transporte in vivo de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  simultáneamente; siendo el animal testigo de si mismo es posible comparar con precisión los efectos de la inyección sobre cada rana.

La ocitocina y la vasotocina provocaron, además, una severa antidiuresis (Tabla 28); la mesotocina, por el contrario, produjo un ligero aumento del débito urinario coincidentemente con resultados de Jard (op. cit.). Lamentablemente nuestra preparación no permite definir el o los efectores del sistema renal que responden a estos péptidos.

Los efectos hasta aquí comentados a) son inmediatos, b) perduran varias horas y c) son específicos. No obstante, son difíciles de

interpretar y si debemos adelantar alguna explicación hemos de reconocer que la información brindada por nuestras experiencias hablan en favor de un sistema de hormonas de efecto antagónico; unas alteran la entrada de iones, mientras que la tercera modifica su salida por la piel. Otro tanto es válido para la diuresis.

El significado fisiológico de las "paralelizaciones" no es claro y la interpretación final y correcta evaluación de los efectos aquí comentados requiere de mayor información sobre el efecto simultáneo de estos péptidos sobre el pasaje de agua por la piel. En algunos experimentos inéditos aún (Salibián, Espina, García Romeu, Rojas y Zamorano, en preparación) medimos el efecto de estos péptidos sobre la captación de agua; encontramos que con dosis iguales a las utilizadas en los experimentos de flujo, la vasotocina y la ocitocina producen un ligero aumento de la captación de agua, mientras que la mesotocina produce un efecto contrario. De ser confirmados estos hallazgos preliminares, nuestra explicación adquiriría otra dimensión pues estaríamos en condiciones de afirmar que unas producen dilución del medio interno, mientras que la Ileu-8-ocitocina lo concentraría. Una interpretación muy próxima a esta fué sugerida por Sawyer (1972).

Es posible que la regulación endocrina de estos mecanismos de intercambio iónico que nos preocupaba al comienzo, sea mediada por otras hormonas (conocidas o no). Queda claro que el efecto de los péptidos neurohipofisarios sobre la captación de iones no es tan simple como generalmente se acepta; también queda ilustrado, una vez más, que el comportamiento de la piel in vitro no es extrapolable a las condiciones in vivo. En el mismo sentido, Bentley y Main (1972) mostraron que la magnitud del efecto natriférico de la vasotocina sobre la piel in vitro depende del área de la piel escogida para efectuar las mediciones.

## 6. Algunas consideraciones finales.

Durante la larga y compleja historia de la colonización de la tierra, la pérdida de las branquias ha debido ser un momento crucial; es allí donde la piel, hasta entonces posiblemente inerte frente a los cambios externos, reemplaza a la branquia y asume muchas de sus funciones. Así puede explicarse que el intercambio del  $\text{Na}^+$  externo por  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{H}^+$  sea un mecanismo común a los epitelios de peces y anfibios. La nueva función de la piel, además, llega a ser complementaria del sistema renal y se imbrica en los mecanismos respiratorios creando una nueva alternativa evolutiva. Mucho después, al aparecer los reptiles es cuando la respiración pulmonar se perfecciona y reemplaza definitivamente a la piel tanto en la función de absorber  $\text{O}_2$  como en la de eliminar el  $\text{CO}_2$ ; la instauración concomitante del ureotelismo también desplaza a la función de la piel como órgano de excreción de productos nitrogenados.

Sin embargo, la permeabilidad de los epitelios a los gases es indisociable de la permeabilidad al agua y los iones en ella disueltos; es por ello que si bien los anfibios fueron capaces de vivir en tierra firme nunca pudieron desligarse totalmente de su dependencia del agua. Probablemente, dicha dependencia sea, en realidad, sólo una limitación secundaria del desarrollo de su nuevo sistema respiratorio cutáneo.

Evidentemente la respiración aérea tiene la ventaja de un ambiente más rico en oxígeno que el agua; sin embargo, el peligro de la desecación es una desventaja que siempre acompaña a la ventaja anterior. Por eso, siendo que cada ambiente ofrece la paradójica situación de ventaja y desventaja simultánea, la evolución de los procesos respiratorios ha de haber seguido un curso muy especial en el intento de superar las desventajas y de desarrollar otras alternativas que permitan enfrentar las nuevas situaciones.

Esta función homeostática que la piel adquiere, tiene en los anfibios acuáticos como C. caudiverbera, una significación diferente ya que permite al animal respirar largos periodos de tiempo bajo el agua. Junto a esta adaptación llama la atención que la frecuencia cardíaca de la rana chilena cuando está sumergida es extremadamente baja (Aguirre y colaboradores, 1969) lo que habla en favor de una menor demanda metabólica (lo que había sido demostrado en 1954 por Gunther y Micco).

Referencias bibliográficas.

- ACEVES, J, ERLIJ, D y EDWARDS, C (1968) - Na<sup>+</sup> transport across the isolated skin of Ambystoma mexicanus.  
Biochim. Biophys. Acta 150: 744 - 746.
- ACEVES, J, ERLIJ, D y WHITTEMBURY, G (1970) - The role of the urinary bladder in water balance of Ambystoma mexicanum.  
Comp. Biochem. Physiol. 33: 39 - 42.
- AGUIRRE, M, CABELLO, R, LAZCANO, J, MANCILLA, A, HOLMGREN, B y VELOSO, A (1969) - Respuesta cardíaca a la inmersión en diferentes especies de anuros chilenos.  
Arch. Biol. Med. Exp. 6: R 1.
- ALVARADO, RH (1972) - The effects of dehydration on water and electrolytes in Ambystoma tigrinum.  
Physiol. Zoöl. 45: 43 - 53.
- ALVARADO, RH y MOODY, A (1970) - Sodium and chloride transport in tadpoles of the bullfrog Rana catesbeiana.  
Am. J. Physiol. 218: 1510 - 1516.
- ALVARADO, RH y STIFFLER, DF (1970) - The transepithelial potential difference in intact larval and adult salamanders.  
Comp. Biochem. Physiol. 33: 209 - 212.
- BALINSKY, JB (1970) - Nitrogen metabolism in amphibians. En: Comparative biochemistry of nitrogen metabolism, Vol. 2, The Vertebrates, Editor JW Campbell, Academic Press, New York. Páginas 519 - 637.
- BALINSKY, JB y BALDWIN, E (1961) - The mode of excretion of ammonia and urea in Xenopus laevis.  
J. exp. Biol. 38: 695 - 705.
- BENTLEY, PJ (1966 a) - Adaptations of Amphibia to arid environments.  
Science 152: 619 - 623.
- BENTLEY, PJ (1966 b) - The physiology of the urinary bladder of Amphibia.  
Biol. Rev. 41: 275 - 316.

- BENTLEY, PJ (1969 a) - Comparison of actions of neurohypophysial hormones in Amphibia.  
Colloques intern. CNRS N°177, Paris: 57 - 62.
- BENTLEY, PJ (1969 b) - Neurohypophysial function in Amphibia: hormone activity in the plasma.  
J. endocrinol. 43: 359 -369.
- BENTLEY, PJ (1971). Endocrines and osmoregulation. A comparative account of the regulation of water and salt in vertebrates. Springer-Verlag, Berlin.
- BENTLEY, PJ (1973) - Role of the skin in Amphibian sodium metabolism.  
Science 181: 686 - 687.
- BENTLEY, PJ y MAIN, AR (1972) - Zonal differences in permeability of the skin of some anuran Amphibia.  
Am. J. Physiol. 223: 361 - 363.
- BIBER, TUL, CHEZ, RA y CURRAN, PF (1966) - Na transport across frog skin at low external Na concentration.  
J. gen. Physiol. 49: 1161 - 1176.
- BLAUSTEIN, MP y GOLDMAN, DE (1966) - Action of anionic and cationic nerve-blocking agents: experiment and interpretation.  
Science 153: 429 - 432.
- BROWN, AC (1962) - Current and potential of frog skin in vivo and in vitro.  
J. Cell. comp. Physiol. 60: 263 - 270.
- CARASSO, N, FAVARD, P, JARD, S y RAJERISON, RM (1971) - The isolated frog skin epithelium. I. Preparation and general structure in different physiological states.  
J. Microsc. 10: 315 - 330.
- CARLISKY, NJ, CERELJIDO, M, BARRIO, A y MIGLIORA, G (1970) - Studies on the relationship between sodium and water balance and renal mechanisms of excretion of urea in Amphibia.  
Comp. Biochem. Physiol. 36: 321 - 337.
- CARLISKY, NJ (1970) - Urea excretion and arginase in anuran kidney.  
En: Urea and the kidney, Editor B Schmidt-Nielsen, Excerpta Medica, International Congress Series N° 195, Páginas 263 - 271.

- CARROLL, RL (1970) - Quantitative aspects of the Amphibian-Reptilian transition.  
Forma et functio 3: 165 - 178.
- CASAMIQUELA, RM (1963) - Sobre un par de anuros del Mioceno de Río Negro (Patagonia) Wawelia gerholdi n.gen et sp (Ceratophrydidae) y Gigantobatrachus parodii (Leptodactylidae).  
Ameghiniana 3: 141 - 157.
- CEI, JM (1962) - Batracios de Chile. Ediciones de la Universidad de Chile, Santiago.
- CEREIJIDO, M, HERRERA, FC, FLANIGAN, WJ y CURRAN, PF (1964) - The influence of Na concentration on Na transport across frog skin.  
J. gen. Physiol. 47: 879 - 893.
- CEREIJIDO, M, MORENO, JH, REISIN, I, RODRIGUEZ, E, ROTUNNO, CA y ZYLBER, EA (1973) - On the mechanism of sodium movement across epithelia.  
Ann. N.Y. Acad. Sc. 204: 310 - 315.
- CEREIJIDO, M, REISIN, I y ROTUNNO, CA (1968) - The effect of sodium concentration on the content and distribution of sodium in the frog skin.  
J. Physiol., London 196: 237 - 253.
- CEREIJIDO, M y ROTUNNO, CA (1970) - Introduction to the study of biological membranes, Gordon and Breach Science Publishers, New York.
- CRABBE, J (1963) - The sodium-retaining action of aldosterone, Presses Academiques Europeens, Bruxelles.
- CRIM, JW (1972) - Studies on the possible regulation of plasma sodium by prolactin in Amphibia.  
Comp. Biochem. Physiol. 43 A: 349 - 357.
- CZOPEK, J (1962). - Vascularization of respiratory surfaces in some Caudata.  
Copeia N° 3 : 576 - 587.
- CZOPEK, J (1967) - Changes in the skin of Rana temporaria L produced by prolonged submersion.  
Acta anat. 68: 300 - 305.

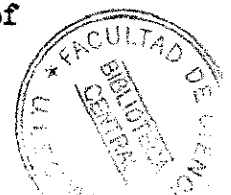
- DAVENPORT, HW (1966) - El ABC de la química acido-base, EUDEBA, Buenos Aires.
- DAVSON, H (1970) - A textbook of general physiology, Fourth Edition, Volumen I, The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- DICKER, SE (1970) - The skin and bladder of Amphibians as models for the mammalian nephron.  
Hormones 1: 352 - 363.
- DIETZ, TH y ALVARADO, RH (1970) - Osmotic and ionic regulation in Lumbricus terrestris.  
Biol. Bull. 138: 247 - 254.
- DIETZ, TH, KIRSCHNER, LB y PORTER, D (1967) - The roles of sodium transport and anion permeability in generating transepithelial potential differences in larval salamanders.  
J. exp. Biol. 46: 85 - 96.
- DOBSON, JG y KIDDER, GW (1968) - Edge damage effect in in vitro frog skin preparations.  
Am. J. Physiol. 214: 719 - 724.
- DONOSO-BARROS, R (1970). - Catálogo herpetológico chileno.  
Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Stgo. N° 31: 49 - 124.
- EMILIO, MG, MACHADO, MM y MENANO, HP (1970) - The production of a hydrogen ion gradient across the isolated frog skin. Quantitative aspects and the effect of acetazolamide.  
Biochim. Biophys. Acta 203: 394 - 409.
- ERLIJ, D (1971) - Salt transport across isolated frog skin.  
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B 262: 153 - 161.
- ESPINA, S y ROJAS, M (1972) - A comparison of the size of the urinary bladder of two South American anurans of different habitat.  
Comp. Biochem. Physiol. 41 A: 115 - 119.
- FANELLI, GM y GOLDSTEIN, L (1964) - Ammonia excretion in the neotenus newt, Necturus maculosus (Rafinesque).  
Comp. Biochem. Physiol. 13: 193 - 204 .
- FARQUHAR, MG y PALADE, GE (1964) - Functional organization of amphibian skin.  
Proc. Nat. Acad. Sc. (USA) 51: 569 - 577.



- FARQUHAR, MG y PALADE, GE (1965) - Cell junctions in amphibian skin.  
J. cell Biol. 26: 263 - 291.
- FARQUHAR, MG y PALADE, GE (1966) - Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis.  
J. cell Biol. 30: 359 - 379.
- FERREIRA, KTG (1968) - Anionic dependence of sodium transport in the frog skin.  
Biochim. Biophys. Acta 150: 587 - 598.
- FERREIRA, KTG (1973) - Kinetic characterization of the chloride dependence of sodium transport in the frog skin.  
Biochim. Biophys. Acta 291: 269 - 273.
- FISCHBARG, J, ZADUNAISKY, JA y DE FISCH, FW (1967) - Dependence of sodium and chloride transports on chloride concentration in isolated frog skin.  
Am. J. Physiol. 213: 963 - 969.
- FLEMING, WR (1957) - On the role of hydrogen ion and potassium ion in the active transport of sodium across the isolated frog skin.  
J. Cell comp. Physiol. 49: 129 - 136.
- FOLLETT, BK (1970) - Effects of neurohypophysial hormones and their synthetic analogues on lower vertebrates.  
Intern. Encyclop. Pharm. Therap. 1: 321 - 350.
- FOXON, GEH (1964) - Blood and respiration. En: Physiology of the Amphibia, Editor JA Moore, Academic Press, New York.
- FRIEDMAN, RT, AIYAWAR, RM, HUGHES, WD y HUF, EG (1967) - Effect of  $\text{NH}_4^+$  ions on acid-base properties and ion movements in isolated frog skin.  
Comp. Biochem. Physiol. 23: 847 - 869.
- FRIEDMAN, RT, LAPRADE, NS, AIYAWAR, RM y HUF, EG (1967) - Chemical basis for the H gradient across frog skin.  
Am. J. Physiol. 212: 962 - 972.
- FUNDER, J, USSING, HH y WIEPH, JO (1967) - The effects of  $\text{CO}_2$  and hydrogen ions on active Na transport in the isolated frog skin.  
Acta physiol. Scand. 71: 65 - 76.

- GANS, C (1970) - Strategy and sequence in the Evolution of the external gas exchangers of ectothermal vertebrates.  
Forma et Functio 3: 61 - 104.
- GARCIA ROMEU, F y MAETZ, J (1964) - The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a fresh-water fish, Carassius auratus. I. Evidence for an independent uptake of sodium and chloride ions.  
J. gen. Physiol. 47: 1195 - 1207.
- GARCIA ROMEU, F (1971) - Anionic and cationic exchange mechanisms in the skin of anurans, with special reference to Leptodactylidae in vivo.  
Phil. Trans. Roy. Soc. London B 262: 163 - 174.
- GONZALEZ, C, SANCHEZ, J y CONCHA, J (1966) - Changes in potential difference and short-circuit current produced by electrical stimulation in a nerve-skin preparation of the toad.  
Biochim. Biophys. Acta 120: 186 - 188.
- GONZALEZ, C, SANCHEZ, J y CONCHA, J (1967) - Further evidence for the release of noradrenaline under nerve stimulation and its effect on the potential difference in a toad nerve-skin preparation.  
Biochim. Biophys. Acta 135: 167 - 170.
- GONZALEZ, C, SANCHEZ, J y CONCHA, J (1969) - Influence of adrenergic or blocking drugs on the electrical potential profiles in the isolated toad skin.  
Arch. Biol. Med. Exp. 6: 60 - 62.
- GONZALEZ, D, VALLEJOS, R y DEIGADO, F (1969) - Hemograma periférico de invierno de Calyptocephalella Gayi (Dumeril y Bibron) (Amphibia, Salientia, Leptodactylidae).  
Acta cient. Venezol. 20: 58 - 60.
- GUNTHER, B y MICCO, E (1954) - Metabolismo de algunos anfibios en función del peso corporal.  
Bol. Soc. Biol. Concepción 29: 57 - 72.
- HELMAN, SI y MILLER, DA (1971) - In vitro techniques for avoiding edge damage in studies of frog skin.  
Science 173: 146 - 148.

- HELLER, H (1965) - Osmoregulation in Amphibia.  
Arch. Anat Microsc. 54: 471 - 490.
- HELLER, H y PICKERING, BT (1970) - The distribution of vertebrate neurohypophysial hormones and its relation to possible pathways for their evolution.  
Intern. Encyclop. Pharm. Therap. 1: 59 - 79.
- HERRERA, FC (1971) - Frog skin and toad bladder. En: Membranes and ion transport, Editor EE Bittar, Wiley-Interscience, Volumen 3, Páginas 1 - 47.
- HOSHIKO, T, LINDLEY, BD y EDWARDS, C (1964) - Diffusion delay in frog skin connective tissue: a source of error in tracer investigations.  
Nature 201: 932 - 933.
- HUF, E (1935) - Versuche über den Zusammenhang zwischen Stoffwechsel, Potentialbildung und Funktion der Froschhaut.  
Pflügers Arch. 235: 655 - 673.
- HUF, EG, WILLS, JP y ARRIGHI, MF (1955) - Electrolyte distribution and active salt uptake in frog skin.  
J. gen. Physiol. 38: 867 - 888.
- HUTCHISON, VH, WHITFORD, WC y KOHL, M (1968) - Relation of body size and surface area to gas exchange in Anurans.  
Physiol. Zoöl. 41: 65 - 85.
- JARD, S (1966) - Etude des effets de la vasotocine sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la grenouille Rana esculenta L.: Analyse à l'aide d'analogues artificiels de l'hormone naturelle des caractères structuraux requis pour son activité biologique.  
J. Physiol. Paris 58 Suppl. XV: 1 - 124.
- JOHANSEN, K y LENFANT, C (1972) - A comparative approach to the adaptability of O<sub>2</sub>-HB affinity. En: The 4 th. Alfred Benzon Symposium: O<sub>2</sub> affinity of hemoglobin and red cell and acid-base status, Editor P. Astrup
- JORGENSEN, CB, LEVI, H y ZERAHN, K (1954) - On active uptake of sodium and chloride ions in Anurans.  
Acta physiol. Scand. 30: 178 - 190.



- JUST, JJ, GATZ, RN y CRAWFORD, EC (1973) - Changes in respiratory functions during metamorphosis of the bullfrog, Rana catesbeiana.  
Resp. Physiol. 17: 276 - 282.
- KERSTETTER, TH, KIRSCHNER, LB y RAFUSE, D (1970) - On the mechanisms of sodium ion transport by the irrigated gills of rainbow trout (Salmo gairdneri).  
J. gen. Physiol. 56: 342 - 359.
- KEYNES, RD (1969) - From frog skin to sheep rumen: a survey of transport of salts and water across multicellular structures.  
Q. Rev. Biophys. 2: 177 - 281.
- KIRSCHNER, LB (1960) - Permeability of frog skin to choline.  
Science 132: 85 - 86.
- KIRSCHNER, LB (1970) - The study of NaCl transport in aquatic animals.  
Am. Zool. 10: 365 - 376.
- KIRSCHNER, LB, GREENWALD, L y KERSTETTER, TH (1973) - Effect of amiloride on sodium transport across body surfaces of freshwater animals.  
Am. J. Physiol. 224: 832 - 837.
- KOEFOED-JOHNSEN, V y USSING, HH (1958) - The nature of the frog skin potential.  
Acta physiol. Scand. 42: 298 - 308.
- KROGH, A (1937) - Osmotic regulation in the frog (R. esculenta) by active absorption of chloride ions.  
Skand. arch. Physiol. 76: 60 - 74.
- KROGH, A (1939) - Osmotic regulation in aquatic animals, Cambridge University Press (reimpreso por Dover Publications, New York).
- LAHLOU, B (1970) - La fonction rénale des téléostéens et son rôle dans l'osmorégulation.  
Bull. Inf. Scientif. Techn. Comm. Energie Atom. (France)  
N° 144 (Janvier): 17 - 52.
- LENFANT, C y JOHANSEN, K (1967) - Respiratory adaptations in selected amphibians.  
Resp. Physiol. 2: 247 - 260.

- LENFANT, C y JOHANSEN, K (1972) - Gas exchange in gill, skin, and lung breathing.  
Resp. Physiol. 14: 211 - 218.
- LINDLEY, BD (1970) - Fluxes across epithelia.  
Am. Zool. 10: 355 - 364.
- LYNCH, JD (1971) - Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of Leptodactyloid frogs.  
Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Misc. Publ. N° 53: 1 - 238.
- MACEY, RI y KOBLICK, DC (1963) - Effects of choline and other quaternary ammonium compounds on Na movements in frog skin.  
Am. J. Physiol. 205: 1063 - 1066.
- MACROBBIE, EAC (1970) - The active transport of ions in plant cells.  
Q.Rev. Biophys. 3: 251 - 294.
- MAETZ, J (1956) - Les échanges de sodium chez le poisson Carassius auratus L. Action d'un inhibiteur de l'anhydrase carbonique.  
J. Physiol. Paris 48: 1085 - 1099.
- MAETZ, J (1968) - Salt and water metabolism. En: Perspectives in endocrinology. Hormones in the lives of lower vertebrates. Editores EJW Barrington y C. Barker Jorgensen, Academic Press, London, Páginas 47 - 162.
- MAETZ, J (1970) - Mechanisms of salt and water transfer across membranes in teleosts in relation to the aquatic environment.  
Mem. Soc. Endocrinol. 18: 3 - 29.
- MAETZ, J (1971) - Fish gills: mechanisms of salt transfer in fresh water and sea water.  
Phil. Trans. Roy. Soc. London B 262 : 209 - 249.
- MAETZ, J (1972) - Branchial sodium exchange and ammonia excretion in the goldfish Carassius auratus. Effects of ammonia-loading and temperature changes.  
J. exp. Biol. 56: 601 - 620.
- MAETZ, J (1973) -  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanges and  $\text{NH}_3$  movement across the gill of Carassius auratus.  
J. exp. Biol. 58: 255 - 275.

- MAETZ, J y GARCIA ROMEU, F (1964) - The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a freshwater fish, Carassius auratus.  
II. Evidence for  $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$  and  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  exchanges.  
J. gen. Physiol. 47: 1209 - 1227.
- MAREN, TH (1967) - Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition.  
Physiol. Revs. 47: 595 - 781.
- MARTIN, DW (1964) - Reversed potentials of isolated frog skin.  
J. Cell comp. Physiol. 63: 245 - 251.
- MARTIN, DW y CURRAN, PF (1966) - Reversed potentials in isolated frog skin. II. Active transport of chloride.  
J. Cell comp. Physiol. 67: 367 - 374.
- MOENS, L (1972) - Isolation of neurohypophysial hormones of Rana temporaria.  
Nature 237: 268 - 269.
- MOREL, F y JARD, S (1968) - Actions and functions of the neurohypophysial hormones and related peptides in lower vertebrates.  
En: Neurohypophysial hormones and similar polypeptides,  
Editor B. Berde, Springer-Verlag, Berlin, Páginas 655 - 716.
- MORENO, JH, REISIN, IL, RODRIGUEZ, E, ROTUNNO, CA y CERREJIDO, M (1973) - Barriers to sodium movement across frog skin.  
J. Membrane Biol. 11: 99 - 115.
- MOTAIS, R (1967) - Les mécanismes d'échanges ioniques branquiaux chez les téléostéens.  
Ann. Inst. Océanogr. 45: 1 - 83.
- MOTAIS, R y GARCIA ROMEU, F (1972) - Transport mechanisms in the teleostean gill and amphibian skin.  
Ann. Rev. Physiol. 34: 141 - 176.
- NORRIS, B, CONCHA, J, GONZALEZ, C y SANCHEZ, J (1972) - Relation between the corium glands and the effects of catecholamines and acetylcholine on toad skin potential.  
Acta physiol. Latinoam. 22: 38 - 44.
- NUTBOURNE, DM (1968) - The effect of small hydrostatic pressure gradients on the rate of active sodium transport across

- isolated living frog-skin membranes.  
J. Physiol. London 195: 1 - 18.
- PAYAN, P y MAETZ, J (1973) - Branchial sodium transport in Scyliorhinus canicula: evidence for  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$  and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanges and for a role of carbonic anhydrase.  
J. exp. Biol. 58: 487 - 502.
- PEFAUR, J (1972) - Gondwana, deriva continental y fósiles antárticos.  
Boletín de Difusión INACH N° 7: 7 - 12 .
- PROSSER, CD y BROWN, FA (1965) - Comparative animal physiology.  
WB Saunders Co., Philadelphia.
- RAHN, H (1966 a) - Aquatic gas exchange: theory.  
Resp. Physiol. 1: 1 - 12.
- RAHN, H (1966 b) - Evolution of the gas transport system in vertebrates.  
Proc. Roy. Soc. Med. 59: 493 - 494.
- RAWLINS, F, MATEU, L, FRAGACHAN, F y WHITTEMBURY, G (1970) - Isolated toad skin epithelium: transport characteristics.  
Pflügers Arch. 316: 64 - 80.
- REDFIELD, AC (1933) - The evolution of respiratory function of the blood.  
Q. Rev. Biol. 8: 31 - 57.
- ROBIN, ED, BROMBERG, PA y CROSS, CE (1969) - Some aspects of the evolution of vertebrate acid-base regulation.  
Yale J. Biol. Med. 41: 448 - 467.
- ROMER, AS (1972) - Skin breathing - Primary or secondary ?  
Resp. Physiol. 14: 183 - 192.
- ROMER, AS (1973) - L'origine des classes de vertébrés.  
La Recherche 4: 347 - 361.
- ROTUNNO, CA y CERREIJO, M (1966) - Movimiento y distribución de sodio en membranas epiteliales.  
Acta physiol. Latinoam. 16 (Supl. N° 2): 270 - 276.
- SALEE, ML y VINDREQUIN-DELIEGE, M (1967) - Nervous control of the permeability characteristics on the isolated skin of

- the toad Bufo bufo L.  
Comp. Biochem. Physiol. 23: 583 - 597.
- SANCHEZ, J, GONZALEZ, C y CONCHA, J (1966) - Influencia de la estimulación nerviosa sobre la corriente de corto-circuito y diferencia de potencial en un trozo de piel aislada de sapo.  
Arch. Biol. Med. Exp. 3: 79 - 84.
- SANDERSON, PH (1952) - Potentiometric determination of chloride in biological fluids.  
Biochem. J. 52: 502 - 505.
- SAWYER, WH (1968) - Phylogenetic aspects of the neurohypophysial hormones. En: Neurohypophysial hormones and similar polypeptides. Editor B. Berde, Springer-Verlag, Berlin, Páginas 717 - 747.
- SAWYER, WH (1972) - Lungfishes and amphibians: endocrine adaptation and the transition from aquatic to terrestrial life.  
Fed. Proc. 31: 1609 - 1614.
- SCHAEFFER, B (1969) - Adaptive radiation of the fishes and the fish-amphibian transition.  
Ann. N.Y. Acad. Sc. 167: 5 - 17.
- SCHMALHAUSEN, II (1968) - The origin of terrestrial vertebrates. Academic Press, New York.
- SCHOFFENIELS, E y SALEE, ML (1965) - The effects of the electrical stimulation of the brachial plexus on the potential difference of frog skin.  
Comp. Biochem. Physiol. 14: 587 - 602.
- SCHOFFENIELS, E y TERCAFS, RR (1965/66) - L'osmorégulation chez les batraciens.  
Ann. Soc. Roy. Zool. Belgique 96: 23 - 29.
- SHAW, J (1959) - The absorption of sodium ions by the crayfish, Astacus pallipes Lereboullet. I. The effect of external and internal sodium concentrations.  
J. exp. Biol. 36: 126 - 144.
- SHAW, J (1960 a) - The absorption of sodium ions by the crayfish Astacus pallipes Lereboullet. II. The effect of the external anion.  
J. exp. Biol. 37: 534 - 547.



- SHAW, J (1960 b) - The absorption of chloride ions by the crayfish, Astacus pallipes Lereboullet.  
J. exp. Biol. 37: 557 - 572.
- SHOEMAKER, VH (1964) - The effects of dehydration on electrolyte concentrations in a toad, Bufo marinus.  
Comp. Biochem. Physiol. 13: 261 - 271.
- SLAYMAN, CL y SLAYMAN, CW (1968) - Net uptake of potassium in Neurospora: exchange for sodium and hydrogen ions.  
J. gen. Physiol. 52: 424 - 430.
- SNELL, FM y MC INTYRE, OR (1960) - The effects of carbon dioxide and hydrogen ion on sodium transport in isolated frog skin.  
Biochim. Biophys. Acta 41: 89 - 98.
- STOBBART, RH (1965) - The effect of some anions and cations upon the fluxes and net uptake of sodium in the larva of Aedes aegypti (L).  
J. exp. Biol. 42: 29 - 43.
- STOBBART, RH (1967) - The effect of some anions and cations upon the fluxes and net uptake of chloride in the larva of Aedes aegypti (L.), and the nature of the uptake mechanisms for sodium and chloride.  
J. exp. Biol. 47: 35 - 57.
- STOBBART, RH (1971) - Evidence for  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  and  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanges during independent sodium and chloride uptake by the larva of the mosquito Aedes aegypti (L.)  
J. exp. Biol. 54: 19 - 27.
- SZARSKI, H (1962) - The origin of the Amphibia.  
Q. Rev. Biol. 37: 189 - 241.
- THOMSON, KS (1971) - The adaptation and evolution of early fishes.  
Q. Rev. Biol. 46: 139 - 166.
- USSING, HH (1949) - The active transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies.  
Acta physiol. Scand. 17: 1 - 37
- USSING, HH (1960) - The frog skin potential.  
J. gen. Physiol. 43 (Suppl.): 135 - 147.

- USSING, HH (1969) - Summary address. En: The molecular basis of membrane function, Editor DC Testeson, Prentice Hall Inc, New Jersey.
- USSING, HH y ZERAHN, K (1951) - Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.  
Acta physiol. Scand. 23: 110 - 115.
- VAN LENNEP, EW y KOMNICK, H (1971) - Histochemical demonstration of sodium and chloride in the frog epidermis.  
Cytobiologie 3: 137 - 151.
- VOUTE, CL y USSING, HH (1968) - Some morphological aspects of active sodium transport. The epithelium of the frog skin.  
J. Cell Biol. 36: 625 - 638.
- WHITFORD, WG (1973) - The effects of temperature on respiration in the Amphibia.  
Am. Zool. 13: 505 - 512.
- WHITFORD, WG y HUTCHISON, VH (1965) - Gas exchange in salamanders.  
Physiol. Zool. 38: 228 - 242.
- ZADUNAISKY, JA, CANDIA, OA y CHIARANDINI, DJ (1963) - The origin of the short-circuit current in the isolated skin of the South American frog Leptodactylus ocellatus.  
J. gen. Physiol. 47: 393 - 402.