



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE :

	Pag.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
II.1 Anatomía.	10
II.2 Comportamiento Fisiológico.	18
III. METODOS	29
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSION Y CONCLUSIONES	34
VI. BIBLIOGRAFIA	39

I. RESUMEN

Entre los epitelios animales poco estudiados, actualmente se encuentran los conductos eferentes, tal estructura produce cambios osmóticos muy importantes en el líquido seminal, así como modifica la concentración de espermatozoides y su fertilidad. Los cambios osmóticos no han podido ser explicados aún por la carencia de datos directos e indirectos relacionados con el transporte de agua.

Un elemento necesario en la determinación rigurosa del grado de transporte de agua y solutos en cualquier epitelio (además de la cuantificación de flujos y la localización de las rutas de paso), es la medición de sus características eléctricas. El voltaje de epitelio y la corriente de corto circuito arrojan datos acerca de la conductancia de membrana epitelial a los solutos.

Dada la complejidad estructural del epitelio se requiere de las técnicas del análisis compartamental para determinar la cinética de los compartamentos de sodio, principal ión transportado activamente a través de la mayoría de los epitelios animales.

En este trabajo, mediante una trampa de silicona-sacarosa, se hicieron las determinaciones de voltaje transepitelial en condiciones *in vitro*.

En cuanto al análisis de compartamentos, se desarrolló un sistema de incorporación y lavado de Inulina-carbono 14 (^{14}C -Inulina) para rastrear las zonas de captación inespecífica de iones y su cinética

Los resultados evidencian un voltaje de epitelio de aproximadamente 35 mV, (región Serosa positiva respecto a región mucosa).

Los datos obtenidos con las técnicas de radio-isótopos indican que existen por lo menos dos compartamentos con captación inespecífica, uno de los cuales posee cinética semejante al más veloz de los compartamentos de sodio reportados anteriormente (Labiano Alucema 1981).

Los resultados obtenidos confirman la posibilidad de que el de los conductos eferentes sea un epitelio de tipo "Tight".

Es necesario un acopio de datos experimentales en lo que toca a las curvas intensidad de corriente contra voltaje de epitelio a la manera de los experimentos Koefoed-Johnsen y Ussing en diversas condiciones: pulsos largos, presencia de inhibidores y estimuladores metabólicos, etc..

Asímismo, deben compararse los resultados obtenidos, utilizando trazadores con los métodos directos de determinación de compartamentos tales como la histoquímica cuantitativa, la determinación de actividades iónicas por medio de microelectrodos selectivos, etc., para completar la caracterización cuantitativa del epitelio.

II. INTRODUCCION

La fisiología ha evolucionado enormemente desde el siglo anterior al actual; tal evolución resulta extremadamente compleja. El número de hechos conocidos y la multiplicidad de sus condiciones hacen difícil comprender la lógica de este desarrollo, -- *empero existen descubrimientos cruciales, podríase decir paradigmas, que marcan cambios indiscutibles en cuanto que modifican la interpretación de los hechos en muchos campos de la investigación, provocando una nueva comprensión de los fenómenos.

El avance de la fisiología, particularmente la de los epitelios, se ha visto también determinado por estos paradigmas; basten como ejemplos los siguientes:

En 1848 Dubois - Reymond detectó la existencia de potenciales eléctricos a través de la piel de la rana, Valores tan altos como 100 milivolts fueron reportados en sus experimentos. Años atrás, Luigi Galvani había hecho observaciones semejantes en los músculos de la pata de la rana y existían ya múltiples evidencias acerca de la actividad eléctrica en los seres vivos.

Los descubrimientos de Dubois-Reymond son los antecedentes primeros de esta actividad en los epitelios y llamaron la atención por su posible relación con características especiales de los seres vivos.

Hacia 1870 Calude Bernard explicó que las células de los animales metazoicos están rodeadas por un líquido extracelular (milieu interieur), que debe mantenerse relativamente constante en su -

*Aún cuando esta complejidad es presente, hay que recalcar que la metodología en fisiología ha avanzado actualmente gracias al desarrollo de la Física Básica y su aplicación.

composición a fin de que el organismo funcione apropiadamente.

La interpretación de Bernard permitió un acercamiento a la comprensión de las relaciones de intercambio que se establecen, por un lado, entre las células de un tejido y el medio interior que las rodea, y por otro lado, las interacciones de recambio de agua y solutos entre los seres vivos y su medio ambiente; relaciones que, hoy sabemos, están controladas por los mecanismos homeostáticos del metabolismo salino y acuoso.

Si bien los enfoques novedosos en la investigación son fruto del esfuerzo de los estudiosos, su aparición requiere de las condiciones adecuadas. Así por ejemplo, en los años posteriores a las teorías de Bernard, se generó una gran acumulación y divulgación de conocimientos y técnicas que dieron libre camino a la investigación biológica. Métodos antiguamente reservados al dominio de la física fueron aplicados con gran éxito en la Biología.

En la mitad inicial del siglo XX se emplearon por vez primera los equipos electrónicos para la determinación de potenciales eléctricos celulares; justo cuando se construían los primeros amplificadores electrónicos de válvulas, Adrian en 1925 hizo los primeros registros de señales nerviosas, utilizando sistemas amplificadores electrónicos. En los 40's se usaron moléculas marcadas con radioisótopos para descubrir los mecanismos del movimiento de sustancias en los seres vivos y se comenzaron a aplicar las técnicas de microscopía electrónica para la dilucidación de la estructura celular. Ambas técnicas tenían solo unos cuantos años de haber sido desarrolladas por los físicos.

En 1949 Levi y Ussing, valiéndose de sodio radiactivo (^{22}Na), determinaron por primera vez flujos unidireccionales y netos a través del epitelio de la piel de la rana y llegaron a la conclusión de que existía un transporte neto de iones a través del epitelio, aún en contra de gradientes electroquímicos. Este tipo de

transporte de sodio implica un acoplamiento directo o indirecto a reacciones metabólicas exergónicas.

En 1951 Koefoed-Johnsen y Ussing emplearon un montaje experimental con inyección de corriente a través del epitelio de la piel de la rana. La determinación de la corriente de corto circuito hizo posible la descripción y tratamiento cuantitativos de la translocación de sodio y otros iones. Su método de estudio, por la facilidad de implementación y la cantidad de información que arroja, fué generalizado prontamente.

Estos trabajos partían de la consideración de que el sistema de estudio se comportaba como una caja negra, en la cual el tejido era idealizado hasta considerarlo una barrera homogénea entre dos fases que contenían agua y solutos.

En 1958 Koefoed-Johnsen y Ussing hicieron una interpretación unificadora de los datos anteriormente existentes, postulando un modelo de tres compartamentos por dos barreras (las membranas celulares) con asimetría de polarización eléctrica.

Este modelo explica, con la intervención de bombeo activo, no electrogénico de sodio y potasio, el transporte epitelial de sodio para la piel aislada de la rana. De nueva cuenta, las experiencias de estos investigadores fueron cruciales en la interpretación de los sistemas de transporte en epitelios.

En 1962 Curran y McIntosh propusieron un nuevo modelo de doble membrana que explicaba ahora el transporte de agua - acoplado al movimiento de solutos. (Esta vez en el ileo del conejo).

En 1967 Diamond y Bossert, con apoyo en las técnicas de microscopía electrónica postularon que el acoplamiento osmótico del flujo de agua a solutos tiene efectos sobre la morfología de los epitelios, en particular en lo que toca a las dimensiones de

los espacios intercelulares.

Los estudios anteriores han llevado a una comprensión mayor de las propiedades funcionales de los epitelios.

Después de estos experimentos que constituyen un análisis relativamente detallado del comportamiento de los epitelios puede hacerse una síntesis, en varias características generales, de la forma en que hoy sabemos actúan los epitelios.

- 1.- Uno de los puntos de mayor acuerdo es que los epitelios son capaces de mover sustancias iónicas desde los espacios lumenales hacia las regiones laterobasales o a la inversa.
- 2.- Se sabe también que existen flujos de agua osmóticamente acoplados al movimiento de las sales, aún en contra de gradientes electroquímicos.
- 3.- Gran cantidad de datos sugieren que estos movimientos son posibles por mecanismos de transporte activo, principalmente de ión sodio.

Esta enumeración sintética puede resultar reduccionista si se toma como el final de las investigaciones y se olvidan las particularidades de cada tipo epitelial. Sin embargo, en la medida en que aumentan las capacidades para la investigación biológica (técnicas y conceptuales), se esclarecen las ideas generales y aumenta la complejidad requerida para el tratamiento de los detalles. En el caso de los modelos de transporte se vió la necesidad de explicar a profundidad los mecanismos de transporte de sodio y agua.

La tesis de Ussing y colaboradores tuvo su antítesis, y se admite actualmente que el modelo Koefoed-Johnsen y Ussing no

reproduce completamente los fenómenos que ocurren en la totalidad de los epitelios. Dada la evidente diversidad y variabilidad presente en las estructuras biológicas, era de esperarse que los modelos generales se vieran enfrentados a hechos que no podrían predecir sin las modificaciones correspondientes.

Hasta hace algunos años, se creía que los bajos potenciales de epitelio y las bajas resistencias eléctricas registradas en el plexo coroideo, el ileo, el túbulo contorneado proximal del riñón de los mamíferos, la vesícula biliar y otros, se debían a deficiencias en el montaje de los preprados que cortocircuitaban las fases acuosas, o a daños durante la disección y manipulación de la estructura. El propio Ussing en 1964, en el caso de la piel de la rana, o bien Diamond y Frömter en 1972 en el caso del túbulo contornado proximal del riñón comprendieron que la permeación pasiva de agua y solutos podía implicar rutas paracelulares a nivel de las uniones estrechas que enlazan a las células del epitelio. Por lo tanto, la resistencia a la difusión en esas zonas sería de bajo valor en el caso de un transporte considerable.

En la actualidad se ha comprendido que la presente diversidad funcional corresponde a diferencias estructurales de importancia en la zonula ocludens que dan integridad al epitelio.

En los epitelios de baja resistencia eléctrica las regiones de unión estrecha constituyen, al parecer, las rutas paracelulares (Shunts) que permiten el paso de iones y agua. La diferenciación de pasos paracelulares de importancia en ciertos epitelios, y de menor consideración en otros se refleja actualmente en una clasificación relativa de estas membranas en dos grandes grupos. El primero, integrado por epitelios herméticos (Tight) como el de la piel de la rana, en donde la resistencia eléctrica de la ruta paracelular es elevada y el comportamiento se explica según el modelo clásico de Koefoed-Johnsen y Ussing. El segundo grupo, integrado por epitelios laxos (leaky) en los cuales

la resistencia eléctrica paracelular no es alta, como es el caso de la vesícula biliar, y debe ser considerada cuando se postula el circuito eléctrico equivalente del epitelio.

Un detalle más:

El sodio contenido en las células epiteliales tiene una distribución heterogénea, una gran parte está ligada a las proteínas de las células y otros constituyentes celulares y no participa en el transporte. El sodio ubicado en un compartamento hipotético, conocido como compartamento de transporte debe ser considerado para ajustar correctamente los modelos tipo Ussing a los datos experimentales. Estos compartamentos pueden ser evaluados por varios métodos, entre los cuales están los históricos y cinéticos.

Con vías de comprender apropiadamente las relaciones evolutivas de los tejidos epiteliales, se han determinado los parámetros fisiológicos correspondientes a los distintos grupos. Al mismo tiempo se hacen trabajos de microscopía como base para la interpretación fisiológica.

Existen muchos epitelios que, por su dificultad de manejo y disección han sido estudiados parcialmente, como es el caso de los conductos eferentes. Para comprender a este epitelio, se hicieron las investigaciones que se presentan en este trabajo y pueden resultar de utilidad en el esclarecimiento de la funcionalidad epitelial desde un punto comparativo.

La estructura de los conductos eferentes semeja grandemente a la de los epitelios tipo tight; Su origen embriológico es el mismo que el del resto del sistema de conducción del aparato reproductor masculino, es decir en estrecha relación con las vías urinarias. Ambos derivan de las proximidades del borde superior

de la cavidad celómica, en zonas vecinas al mediastino.

Es interesante hacer notar, que mientras el túbulo renal proximal con características funcionales generales parecidas a las de los ductos eferentes, es un tejido epitelial laxo, estos últimos, según evidencias que se verán más adelante, son del tipo epitelial hermético. Esto indicará que estructuras embriológicamente afines poseen amplia diversidad estructural y funcional.

¿Cuáles son los mecanismos de evolución biológica que han llevado a la diferenciación y especialización funcional de células que son afines desde el punto de vista del desarrollo del ser?

Es natural para los biólogos tener presentes cuestiones de este tipo, pues el enfoque evolucionista forma parte de la concepción actual de la Biología, baste citar la siguiente observación de John D. Bernal:

"Las teorías mecanicistas derivadas de la época newtoniana no pueden explicar satisfactoriamente el aspecto histórico fundamental de la Biología. En Física generalmente es suficiente saber como funciona un sistema. Pero en Biología es igualmente importante saber como ha llegado a funcionar del modo en que lo hace. El drama entero de la evolución es un ejemplo de la producción seriada de formas novedosas, surgidas principalmente a causa de las contradicciones inevitables existentes dentro de los organismos y en las relaciones con su medio ambiente".

II.1 Anatomía

II.1.1 Desarrollo embrionario.

Describiremos, por su mayor conocimiento, el desarrollo de los conductos eferentes y de las estructuras relacionadas con ellas en el embrión humano. La ontogenia de tales estructuras es similar en la mayoría de los mamíferos, aunque existen ligeras diferencias entre grupos.

Como mencionamos en la sección anterior, el aparato excretor y el reproductor tienen su origen cerca del borde de la cavidad celómica en zonas vecinas a las paredes del tronco fetal. Las dos unidades funcionales, el túbulo renal y el túbulo seminífero, se diferencian tempranamente, después de la séptima semana del inicio del embarazo. Anteriormente, solo se halla una evaginación indiferenciada de la cavidad celómica que es el antecedente del mesonefros, presente en los anfibios adultos. En estos organismos, la porción cranial del aparato mesonéfrico se desarrolla como la vía excretora del testículo, mientras que la porción caudal continúa funcionando como un riñón.

En los mamíferos, después de la séptima semana del desarrollo, el mesonefros se diferencia quedando la región caudal en la forma de metanefros y la región basal se conduce a la formación del sistema conductor genital.

El mesonefros embrionario se integra por un conjunto de túbulos que forman las crestas urogenitales, las cuales corren lateral y paralelamente al mesenterio.

Cada túbulo mesonéfrico se pone en estrecho contacto con

glomérulo vascular y se abre por el otro extremo en un excretorio, conocido como ducto mesonéfrico o Wolffiano. En la pared media de la cresta gonadal se ubica un primordio gonadal y otros ductos longitudinales, los ductos paramesonéfricos o Mullerianos. El primordio gonadal permanece indiferenciado de la 5a. a la 7a. semana de embarazo después los cordones sexuales se diferencian, en el caso del macho, hacia cordones seminíferos que en su parte distal se interconectan para integrar la rete testis que se ubica en estrecho contacto con los túbulos mesonéfricos contenidos en la cresta urogenital. Hacia el 3er. mes, la rete testis se fusiona con los túbulos mesonéfricos vecinos y en el sexto mes, los cordones de la rete testis adquieren un lúmen que entra en continuidad con la luz de los túbulos mesonéfricos. Estos túbulos mesonéfricos se convertirán después en conductos eferentes.

Ya para entonces, el metanefros reemplaza completamente al mesonefros en la función excretora y todos los túbulos mesonéfricos que no se conectan con la rete testis sufren atrofia. La porción del ducto Wolffiano que se sitúa cranealmente a la rete testis y se atrofia gradualmente, pero el resto persiste formando el epidídimo.

Es necesario indicar la importancia de la existencia de las crestas gonadales. En ratas castradas su extirpación implica la inhibición del desarrollo de estas estructuras, cosa que no sucede con los conductos genitales femeninos en ausencia del ovario. Los conductos Wolffianos cultivados "in vitro" solo pueden diferenciarse cuando los testículos fetales con cultivados en estrecha cercanía. Los esteroides androgénicos que se sintetizan en las células intersticiales del testículo, son, entre otros, agentes estimulantes de la diferenciación.

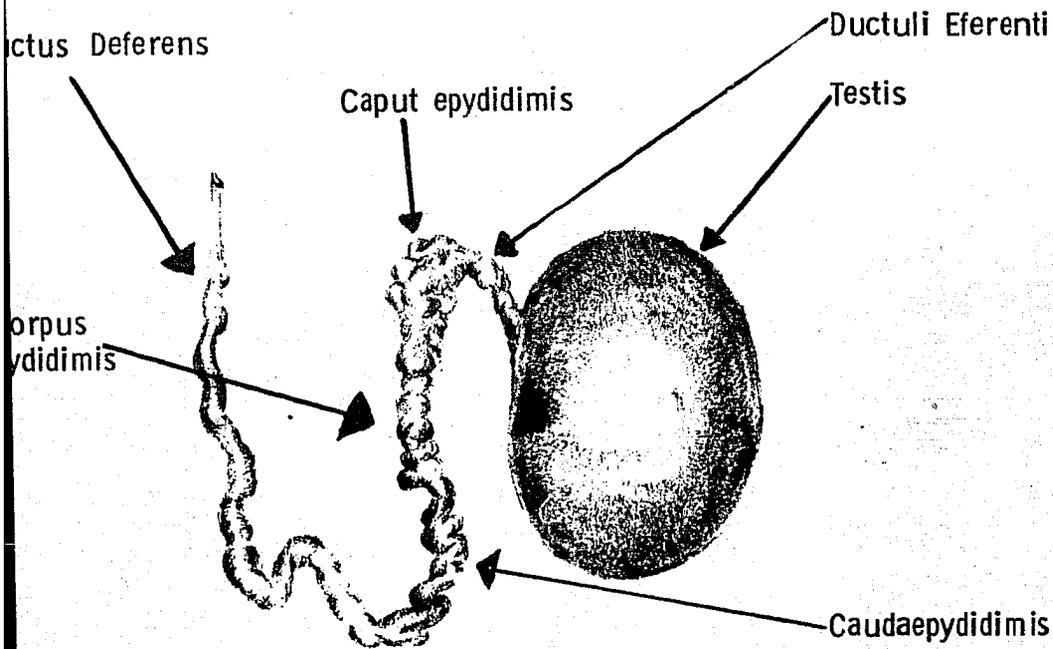
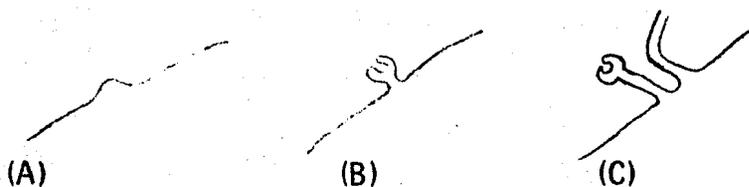


FIGURA # 1

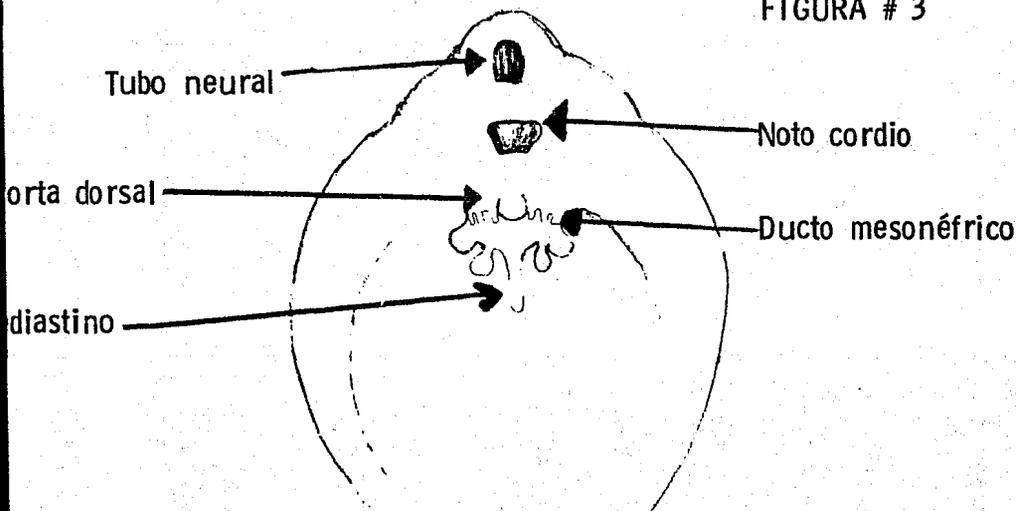
Esquema general de la ubicación de los conductos eferentes en el aparato genital masculino de la Rata. Testículo derecho. Las capas de grasa que rodean a los conductos fueron retiradas (del vivo).

FIGURA # 2



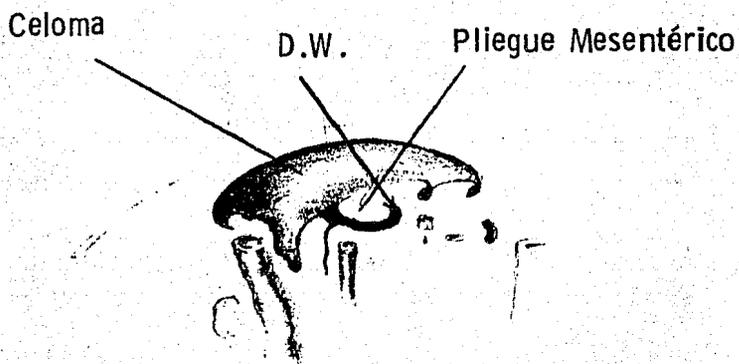
Desarrollo inicial del sistema urogenital en el mamífero. A) Evaginación inicial desde la cavidad celómica. B) Aparición del glomérulo. C) Diferenciación de regiones proximal y distal. (Conducto Wolffiano) tomado de Rommel 1978.

FIGURA # 3



Vista transversal esquemática de un embrión humano durante la semana séptima de la gestación* Modificado de Brandes, Male Accessory sex organs. *Se observa la disposición de los conductos mesonéfricos.

FIGURA # 4



Vista de proyección del tronco al tercer mes de evolución del embrión de cerdo, mostrando la disposición de los conductos Wolffianos. (D.W.).

FIGURA # 5

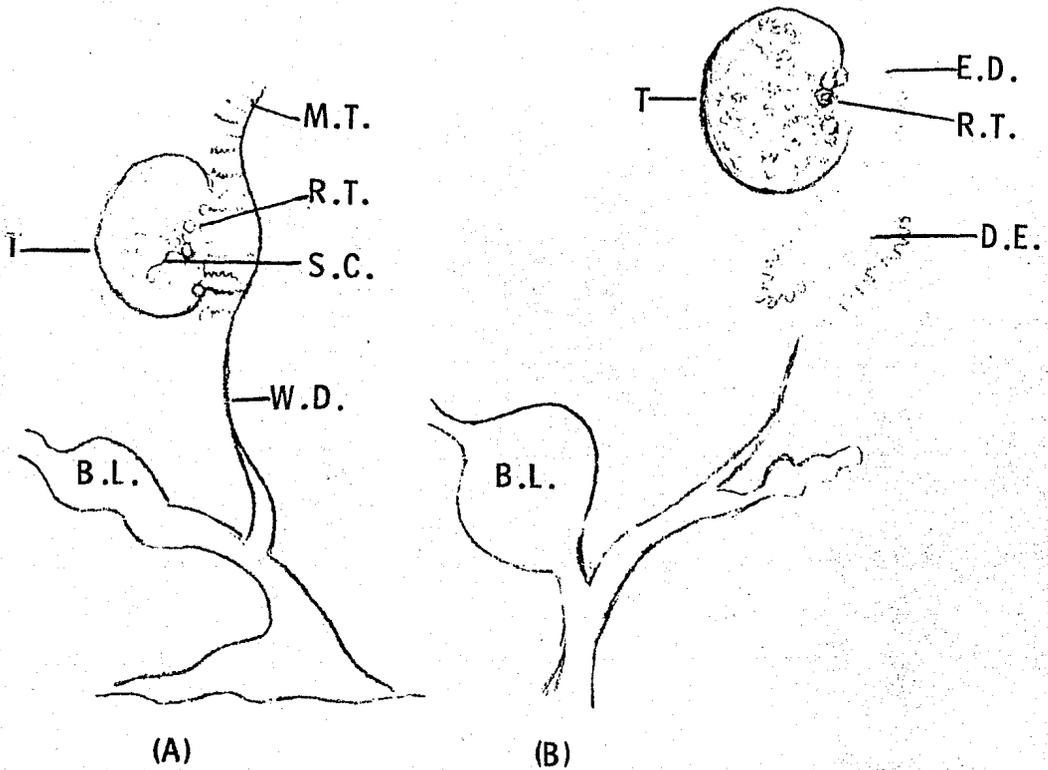


Ilustración esquemática de la evolución ontológica de los tejidos derivados del aparato mesonéfrico. A) Al inicio del tercer mes. B) Después del 4^o mes. B.L. Vejiga; D.E. Ducto epididímico; E.D. Ductos eferentes. M.T. Túbulo mesonéfrico; W.D. Conducto Wolffiano; T. Testículo; R.T. Rete Testis. S.C. Cordón Seminífero. Se trata del embrión humano, tomado de Brandes, idem Figura #2.

II.1.2 Histología

La luz de los conductos eferentes se delinea con una fina capa de tejido epitelial simple o pseudoestratificado. Existen dos tipos celulares, ciliado y nociliado, en la misma proporción aproximadamente. Cada célula se apoya en una fina membrana basal que es seguida por varias capas de tejido conectivo y algunas fibras musculares.

Las células ciliadas son probablemente las responsables de las propiedades de transporte. Dentro de cada una de ellas se distinguen varias regiones; La región de citoplasma apical con protusiones llamadas micro-vellosidades que aumentan varias veces la superficie de la membrana apical. Estas microvellosidades colindan con invaginaciones o canalículos sinuosos que atraviesan el citoplasma apical. En esta región, el retículo endoplásmico, liso y rugoso es escaso, en comparación con la misma zona en otros epitelios del tracto seminal.

Las vesículas de formas esféricas, ovoides o elongadas, son abundantes en esta zona más que en cualquier otra de la célula. Las vacuolas son también abundantes. En la región supranuclear se acrecienta ligeramente la cantidad de retículo endoplásmico y aparato de golgi, aunque solo en cisternas aisladas; se presentan mitocondrias. El citoplasma de la región nuclear es pobre en vesículas y posee cierta cantidad de retículo endoplásmico rugoso. La región basal es abundante en mitocondrias. Con base en la estructura del citoplasma y la ocurrencia de vacuolas y granulos supranucleares, se han hecho distinciones entre las células nociliadas. Para el humano, Morita distinguió tres tipos celulares (1966); Goyal y Hurkuda diferencian hasta cinco tipos de células no ciliadas en los conductos eferentes del toro; Flickinger reporta células ciliadas con abundantes o escasas vacuolas en el caso del Hamster - (1978) y Jones y

Holt (1981) encuentran solo pequeñas diferencias en la estructura de las células del Elefante.

Las células ciliadas parecen tener una acción básicamente de arrastre longitudinal de células y sustancias en el líquido seminal. Las protusiones apicales pueden constituir cilios verdaderos, como lo indica Flickinger, (1981) o bien solo estereocilios (Brandes 1976). Los cilios verdaderos se concentran (a lo largo del tracto seminal) en el túbulo del conducto eferente. Desde los cuerpos basales de los cilios se extienden haces de filamentos hacia la base de la célula (Flickinger). Las vesículas y vacuolas tan prominentes en las células no ciliadas con tantas veces se hallan en las células ciliadas, aún en la región apical. El citoplasma supranuclear contiene lisosomas y el de la región nuclear algún retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi.

Existen evidencias de otros tipos celulares dentro de los conductos eferentes, como son las células secretoras reportadas por Brandes, o bien las células ovales reportadas por Flickinger y aún las células caliciformes; su presencia y morfología dependen del organismo estudiado y son pocos los elementos que se tienen respecto a su actividad.

Existen entre las células de los conductos eferentes uniones especializadas, ya sea entre células no ciliadas o bien entre células ciliadas y no ciliadas o exclusivamente ciliadas. Estas uniones se localizan en una delgada región cerca del lumen. Las membranas de las células en estas regiones se aproximan mucho y pueden fusionarse. En algunos casos, abajo de estas zonas de unión hay una región de aposición de las membranas y en algunas ocasiones un desmosoma.

Para determinar la naturaleza precisa de las uniones se requieren métodos de criofractura. Valiéndose de esta técnica, Suzuki y Nagano (1978), describieron las características de estas uniones para el caso de los conductos eferentes de la rata. Según estos autores, circundando a la capa apical del citoplasma entre las células no ciliadas se hallan uniones con hendidura en forma de cinturón, (Belt-Like Gap Junctions). En artículos posteriores, (1980) ellos estudiaron las uniones de las células de los conductos eferentes del cobayo, del ratón y del humano. Siempre se reportaron en estos trabajos los datos sobre las células no ciliadas. Las uniones estrechas se observaron circunferencialmente presentando las ramas de unión un arreglo paralelo entre sí. Las uniones con hendidura en forma de banda reportadas, eran abundantes. La zona luminal de estas uniones aparece como un sustituto de las uniones estrechas. En las uniones entre células ciliadas y no ciliadas se hallaron abundantes uniones estrechas mientras que disminuía el número de uniones con hendidura. Entre las uniones célula ciliada vs célula ciliada, las uniones estrechas son menos numerosas. De los estudios de Nagano puede decirse que las uniones con hendidura a modo de cinturón, se presentan en una cantidad de epitelios animales.

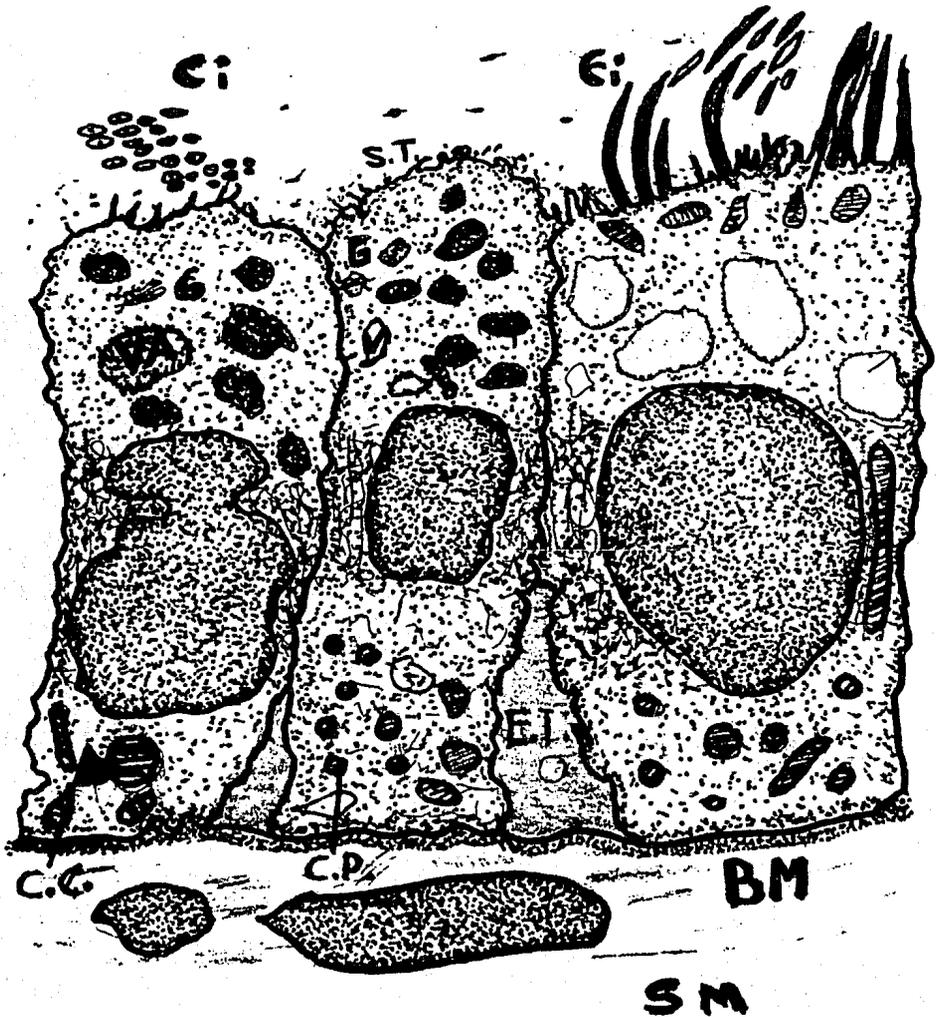
Los trabajos iniciales con microscopía de luz usando azul tripan y tinta china inyectados en la rete testis confirman las capacidades absortivas de los epitelios de los conductos eferentes y la porción proximal del epididimo. Hay también antecedentes de fijación de tales colorantes a las membranas celular y flujo transcelular de los mismos sobre las regiones basales de las células.

La absorción de material luminal por pinocitosis con ayuda del microscopio electrónico, fué reportada por Burgos y Montzori en 1960.

En el caso del Hamster (Flickinger 1960), encontró sustancias del lumen en las grandes vacuolas de las células no ciliadas presentes sobretodo en la región distal de los conductos.

Brands (1972) reportó una evidencia de actividad secretora en la región proximal aunque, la escaséz de retículo endoplásmico rugoso no está de acuerdo con tal suposición.

FIGURA # 6



Composición histológica de la pared del túbulo de los conductos eferentes de humano, mostrando las principales estructuras. C.P. Célula principal; C.C. Célula ciliada; M.B. Membrana basal; T.C. Tejido conectivo subadyacente; Ci. cilios; M.V. microvellosidades; Va. Vacuolas; E.I. espacio intercelular a partir de una fotografía 5500 x de Brandes, idem Figuras 2 y 3.

11.2 Comportamiento Fisiológico

En esta sección se explican brevemente algunas características de los conductos eferentes en relación al transporte de agua y solutos a su través. Se explican también, ciertos métodos de estudio empleados actualmente.

Se conocen con cierta precisión los cambios osmóticos y de algunos solutos en el líquido que circula, in vitro o in vivo, a lo largo de los conductos eferentes. Otros datos, como la compartimentalización de iones, se hallan en etapas iniciales de estudio. Acerca de las propiedades eléctricas de éste epitelio no se hallaron reportes en la literaruta revisada.

Para explicar las metodologías de determinación de parámetros eléctricos se mencionan los estudios y conocimientos sobre epitelios estrechos; ya que hay ciertas evidencias, como son las uniones intercelulares en hendedura a modo de banda (Nagano -- 1978), que son indicadoras de que el epitelio posiblemente posee una barrera al paso de sustancias de la fase mucosa a la serosa en esa zona, por ende es de esperarse una alta resistencia eléctrica paracelular. Se mencionan también las diferencias existentes con respecto a los epitelios laxos y se describen los experimentos recientes de compartimentalización de sodio.

11.2.1 Absorción de Agua y Solutos

Las células ciliadas de los conductos eferentes contribuyen al flujo de líquido seminal desde la rete testis, hacia el epidídimo, (Blake et al 1982). Las células principales o no ciliadas parecen tener como función principal la absorción.

El sistema de conductos tiene un área seccional cinco veces menor a nivel distal con respecto al proximal (Montorzi, Labiano -

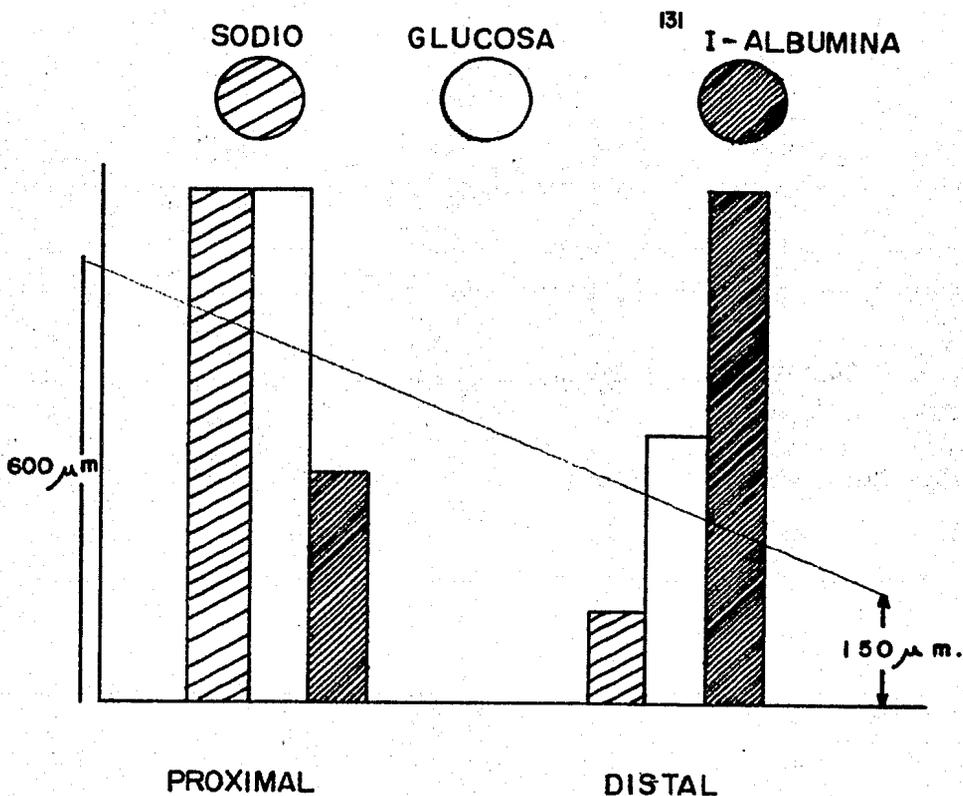
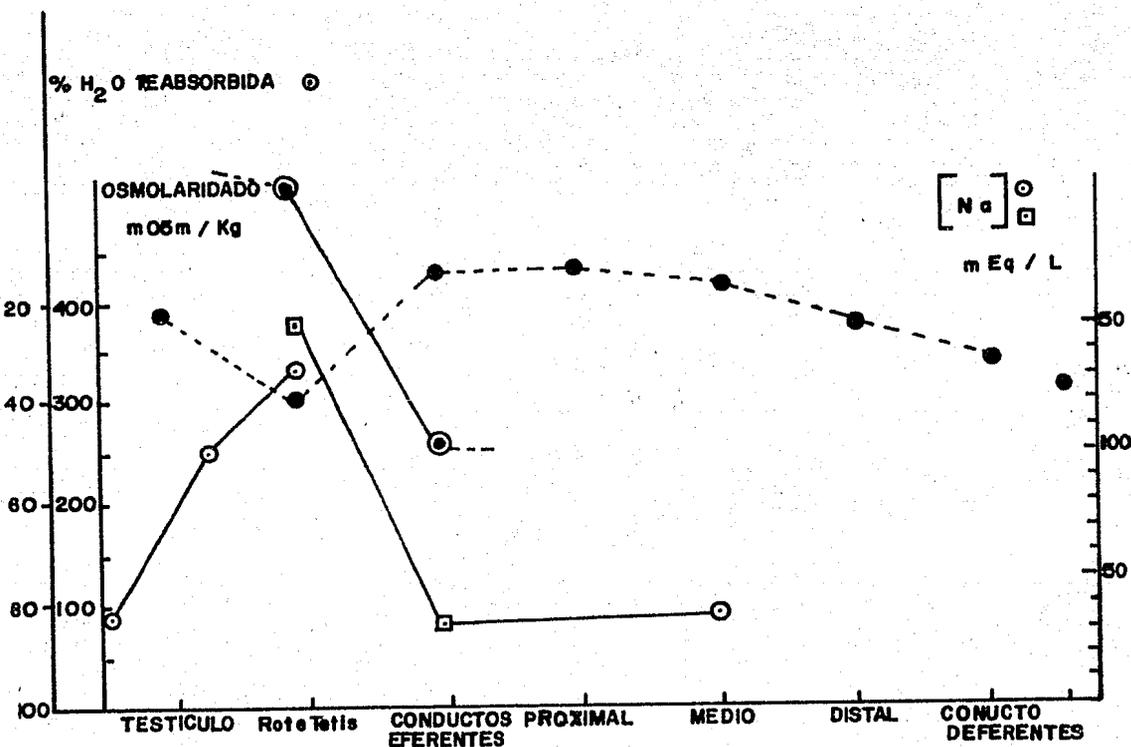


FIGURA: 7

Gráfica que muestra la perfusión de los ductos eferentes aislados del Hamster con una solución de sodio (160 meq./lt.), glucosa (1000 mg./lt.) y albúmina (0.6 mg./ml.). El fluido fue perfundido de la rete testis hacia el epidídimo. El fluido colectado contenía sodio (35 meq./lt.) glucosa (600 mg/lt.) y albúmina (1.2 mg/lt.). El experimento muestra que los ductos eferentes son capaces de absorber agua, sodio y pequeñas moléculas como glucosa. Tienen una baja capacidad para absorber el agua, incrementa su concentración. El diámetro total del lado proximal de los conductos eferentes es de 600 m, mientras que el lado distal posee un diámetro de 150 m. (Tomado de; Brandes)

FIGURA: 8



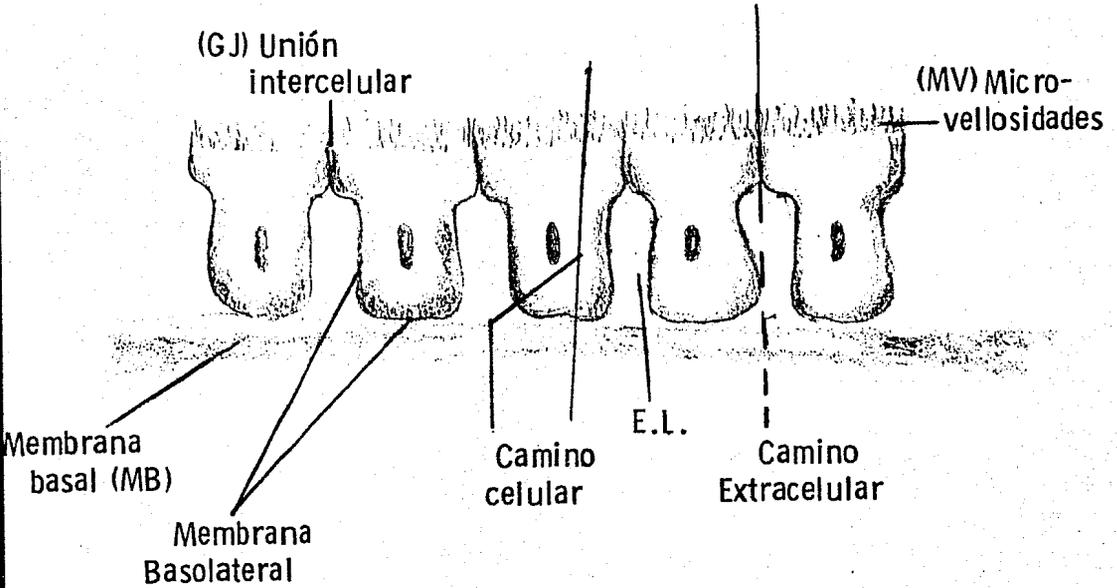
Cambios en la concentración de sodio y agua en las regiones del testículo: Rete testis, conductos eferentes, epidídimo con ductos deferentes y suero en la rata.
 Datos publicados en la siguiente referencia.

Es notable la absorción de sodio y agua en la región correspondiente a conductos eferentes.

1970). Los datos estructurales anteriores confirman las evidencias fisiológicas:

- 1.- Crabo (1955) en carnero y toro, reportó un cambio del 90% en volúmen de fluido presente a nivel de la rete testis y a nivel de la cabeza del epidídimo; Levine y Mash llegaron en 1971 a una conclusión similar en las ratas.
- 2.- Estudios sobre la velocidad del fluído en estudios de perfusión in vitro, confirman que estos epitelios son capaces de absorber una parte de la fase acuosa. Montorzi y Labiano (1970) perfundiendo los conductos eferentes con una solución de Ringer que contenía 160mM de sodio, 5.5 mM de glucosa y albúmina marcada con ^{131}I , encontraron un cambio en las concentraciones de estas sustancias al final de su paso por los conductos eferentes. (Ver figura 6). La concentración de albúmina se incrementó, mientras que las concentraciones de sodio y glucosa habían disminuído (la albúmina no es metabolizable en su tránsito por la estructura).
- 3.- Recientemente, Lechene en colaboración con Jenkins y Howards (1982), han usado los métodos de microanálisis por haz electrónico, para determinar los cambios de las concentraciones de sodio, cloro, y otros iones monoatómicos de bajo número atómico, entre las regiones proximal y distal de los conductos, encontrando una mucho mayor absorción de cloro (92%) que de sodio (26%) en los conductos eferentes.

FIGURA #9



Esquema de la organización del epitelio de los ductos eferentes de rata indicando posibles rutas de permeación, M.V. microvellosidades; G.J. Gap Junction; M.B. Membrana basal; E.L. espacio laterobasal extracelular.

Son variados los mecanismos que pueden explicar los movimientos de agua y pequeños solutos en el caso de los conductos eferentes. El transporte activo de sodio y cloro en sentido luminal-basal, puede producir los flujos acoplados de agua ya sea directamente, es decir que el ión arrastra al agua contenida dentro de su radio de hidratación, o indirectamente por los cambios osmóticos producidos entre las fases acuosas serosa y mucosa.

Ogilve, Mc, Intosh y Curran (1969) mostraron que era posible explicar la presencia de un flujo pasivo de agua en contra de diferencias de presión osmótica, si existían diferencias de presión hidrostática. Es posible que esto suceda en sistemas vivos y que estructuras tales como la piel de rana, la mucosa intestinal y los propios conductos eferentes, presenten estos mecanismos.

11.2.2 Mediciones Eléctricas

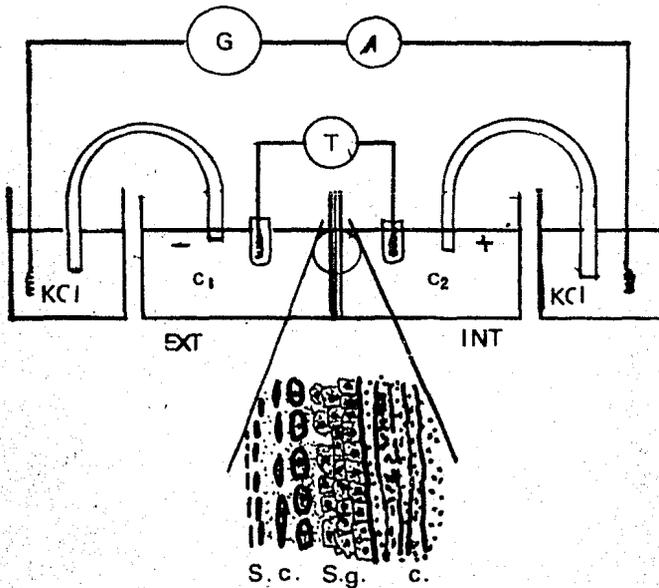
Ussing en 1951, logró medir los movimientos Na^+ y Cl^- en el epitelio de la piel de la rana, gracias a la determinación de la corriente de corto circuito (I.S.C.). Tal corriente, es la necesaria para bajar hasta cero el potencial del epitelio y es inyectada con diversos métodos. El primero fué una fuente inyectora de corriente directa, se usaron generadores de pulsos de distinta frecuencia y duración, o bien sistemas de fijación (Clamp) de voltaje. La construcción de gráficas de intensidad de corriente inyectada contra voltaje de epitelio, además de indicar la corriente de corto circuito, permitieron conocer la resistividad y por ende la conductividad del epitelio.

Ussing determinó que la corriente de corto circuito equivalía a los flujos netos de sodio y cloro a través del epitelio.

$$I \text{ (s.c.)} = \text{Flujo neto de } \text{Na}^+ + \text{flujo neto de } \text{Cl}^-$$

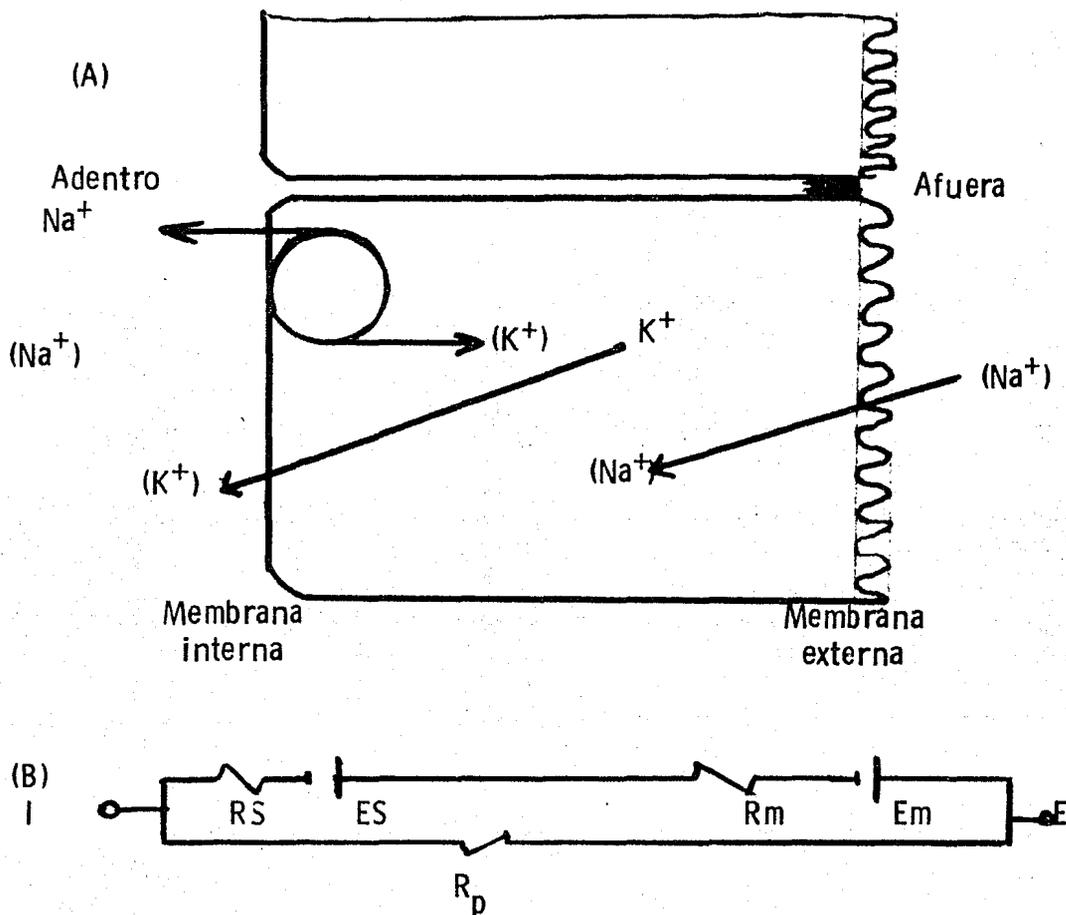
$$I \text{ (s.c.)} = M^+_{\text{Na}} + M^+_{\text{Cl}^-}$$

FIGURA #10



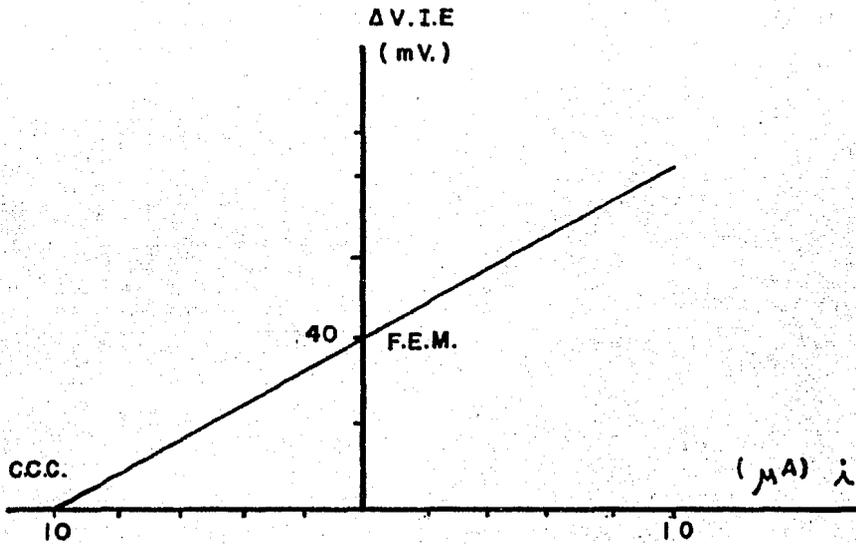
Esquema del montaje experimental utilizado para medir el potencial eléctrico y las curvas : Intensidad de corriente vs voltaje, a través del epitelio de la piel de rana. C1 y C2 Cámaras que contienen solución de Ringer a cada lado de la piel; V. electrodos de plata cloruro de plata, a cada lado de la piel conectados a un voltímetro (T) utilizado para medir los potenciales del epitelio, los electrodos de inyección (I) de corriente se enlazan con puentes de agar KCl y se conectan a un (G) generador que está en serie con un ampérímetro. (A) En el recuadro se ilustran las capas que forman la piel de la rana, una capa externa o córnea (S.c.) una capa germinativa (s.g.) y una capa interna, el corion (C). Modificado de H.H. Ussing y K. Zhe-ran. 1951.

FIGURA # 11



Modelo que explica el movimiento de sodio a través de la piel de rana. Los aspectos de este modelo se especifican en el texto. A) Modificado de Koefoed - Johnsen y Ussing, 1958. B) Modelo eléctrico propuesto por Ussing y Sheran en 1958. 1.- R_{NaF} , resistencia de membrana al paso de Na; R_K , Resistencia al paso de potasio; V_K y V_N , potenciales de equilibrio electroquímico para el potasio y el sodio respectivamente; según las concentraciones presentes de ambos iones,

FIGURA: 12



Gráfica de intensidad de corriente vs voltaje de epitelio en las condiciones de la figura #10.

Ussing y Sheran (1951) reportaron que el influjo de sodio era ligeramente mayor que el calculado según los valores de corriente de corto circuito; en tal caso, debe existir un eflujo de sodio. El valor de la fuerza electromotriz del epitelio (F.E.M), -corresponde a la energía potencial química, empleada para sostener tales flujos. No habiendo diferencias de potencial químico ni de presión hidrostática entre las dos cámaras que contenían al epitelio, esta energía que producía los flujos debería tener un origen metabólico.

Ussing encontró que la relación de flujos unidireccionales de sodio, a presiones hidrostáticas iguales, podría calcularse según la ecuación:

$$\frac{M^+_{IN} (Na^+)}{M^+_{out} (Na^+)} = \frac{C_i}{C_o} e^{\frac{-ZF}{RT}} \quad (\Delta V)$$

En el caso de transporte de sodio por causas activas, la ecuación es:

$$R_{Na^+} = \frac{V_{Na^+}}{I_{s.c.}} = \frac{RT}{ZF} \ln \left[\frac{M^+_{in} (Na^+)}{M^+_{out} (Na^+)} \right]$$

En cada caso:

AV = Fuerza electromotriz del epitelio. (mV)

C_o = Concentración de sodio en la solución mucosa (mM l⁻¹)

C_i = Concentración de sodio en la solución serosa (mM l⁻¹)

e = 2.718...

R = Constante de los gases 8.02 (Joules mol⁻¹ °K⁻¹)

Z = + 1

T = Temperatura en escalas absolutas (°K)

F = Constante de Faraday 96480 (coul mol⁻¹)

M⁺ = Flujo neto de sodio

M⁺_{out(Na)} = Flujo unidireccional de sodio hacia la mucosa (mMcm⁻¹seg⁻¹)

$M^{+in}(Na)$ = Flujo unidireccional de sodio hacia la serosa ($mMcm^{-1}seg^{-1}$)
 $I.s.c.$ = Corriente de corto circuito ($\mu A cm^{-2}$)
 $V_{Na^{+}}$ = Voltaje de equilibrio electroquímico (serosa - mucosa) (m. V.)
 $R_{Na^{+}}$ = Resistencia de membrana (serosa-mucosa) ($k\Omega$)

En la práctica, si se miden los flujos, con ayuda de trazadores radioactivos, y la relación de flujos no corresponde a lo predicho por la primera ecuación, es de esperarse el cumplimiento de la segunda ecuación y puede postularse un posible sistema activo de transporte.

En este modelo de membranas que separan a tres compartimentos diferentes, Ussing planteaba los siguientes postulados:

- A) La piel de la rana debe su propiedad de transportar iones a la capacidad de la capa basal de células epiteliales. Las otras capas no intervienen por estar en proceso de degeneración.
- B) La membrana externa de dichas células tiene las propiedades de un electrodo sensible al sodio y es casi impermeable al potasio. No hay transporte activo de sodio en esa zona.
- C) La pared basolateral del epitelio actúa como un electrodo sensible al potasio y no permite la difusión pasiva de sodio.
- D) El sodio difundirá de la cara externa (luminal) al interior celular por gradiente de concentración.
- E) El paso de sodio desde el interior celular a la solución,

interna donde la concentración es mayor, requiere de un mecanismo de transporte activo que opera a nivel basolateral.

- F) Se supone que el potasio entra a la célula por un mecanismo de transporte activo y difunde de la célula a la solución externa por un gradiente de concentración.

Experimentos posteriores a los de Ussing en las capas del epitelio de piel de rana (Cereijido 1960), llevaron a la determinación del potencial celular de capas no basales.

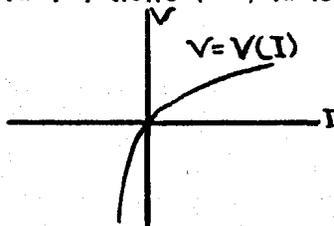
Ussing y Windhager (1964) llegaron a la conclusión de que las propiedades pasivas de transporte de agua y solutos están determinados por la magnitud de la resistencia paralela a la vía transcelular. Con la finalidad de medir la magnitud de esa resistencia derivada, se hicieron dos tipos de experimentos:

Uno de ellos, se basó en la suposición de que la bomba activa no puede conducir sodio en sentido contrario, y que el sodio que regresa lo hace por la vía paracelular. Por lo tanto, las resistencias paracelulares pueden determinarse por diferencia a partir de los flujos pasivos bajo condiciones en que el flujo de regreso es despreciable (voltaje del epitelio fijado más allá del voltaje de equilibrio electroquímico para el sodio). Bajo tales condiciones, los flujos salientes eran notablemente bajos.

En el otro experimento se supuso que una solución externa libre de sodio produce un difícil paso transcelular de este ión, hacía el interior y que la resistencia transcelular es

alta (∞) en comparación con la resistencia paracelular. La resistencia paracelular sería en estas condiciones, prácticamente igual a la resistencia membranal total. Los experimentos mostraron que la resistencia paracelular es muy alta en el epitelio de la piel de rana.

Shultz (1972) encontró que las derivaciones paracelulares eran de mayor importancia, por su bajo valor, en epitelios como el ileo de conejo. Usando microelectrodos, él encontró los pasos de cambio de voltaje de cada cara de la célula epitelial. Construyó así los perfiles de potencial, como los que se muestran en la figura #12. En la piel de rana, la F.E.M. del epitelio resulta de la suma de dos gradientes de voltaje (Mucoso/seroso) en el mismo sentido. En el ileo del conejo, la suma de voltajes (mucoso-seroso), es en sentido contrario, lo que hace que la F.E.M. del epitelio sea pequeña, la resistencia paracelular baja actúa como un cortocircuito para la fem total. A partir de esos datos se postuló un modelo con resistencia paracelular baja para el ileo del conejo. En la piel de la rana, la resistencia paracelular alta en comparación con las resistencias luminal y laterobasal, da por resultado que la suma de voltajes de estas dos membranas sea igual a la diferencia de potencial total. La baja resistencia paracelular actúa como un rectificador de voltajes dando por resultado un bajo voltaje transepitelial, la rectificación proviene de que la curva $V-I$ tiene () la forma:



de no existir una relación lineal voltaje-corriente.

El estudio de Sheran es consistente con los trabajos de Cereijido (1965) y de Richardson.

Este último dedujo las ecuaciones de las curvas I vs V para sistemas epiteliales de 2, 3 ó 4 membranas, partiendo de las ecuaciones de flujo de la termodinámica de procesos irreversibles. Estas ecuaciones indican que las bimembranas rectifican en una dirección, mientras que las membranas triples o cuádruples pueden rectificar dos veces. El análisis teórico que llevó a la relación V vs I se basó en la suposición de membranas altamente cargadas y se encontró que los iones no permeantes juegan un papel significativo en la desviación del potencial de reposo, respecto al predicho por la ecuación de Nernst. La dirección de la rectificación, más que por las concentraciones en las soluciones es una característica que surge de las asimetrías de cargas fijas de las membranas.

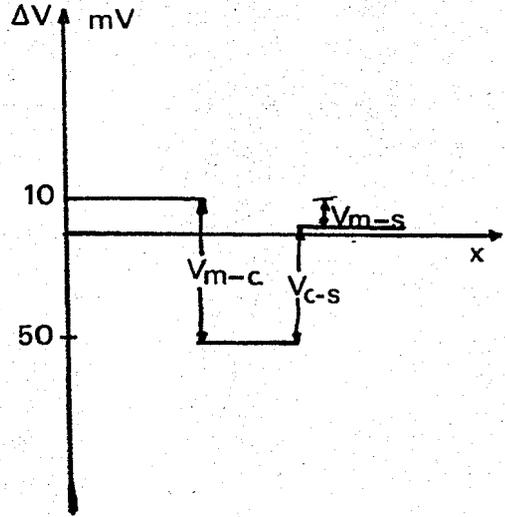
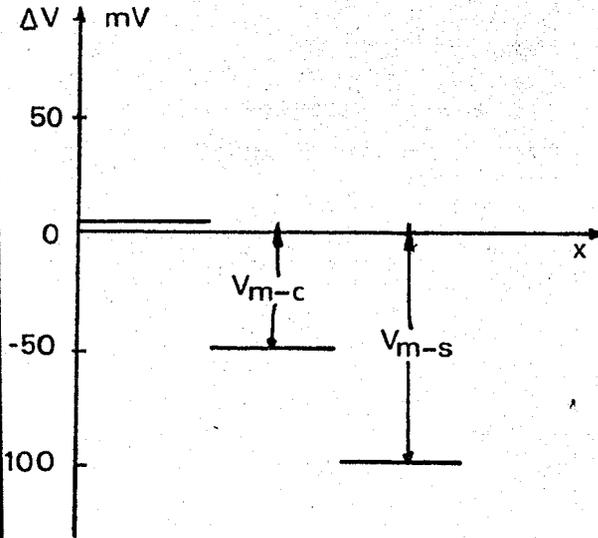
En la investigación sobre epitelios es conveniente analizar los cambios de la impedancia epitelial en función de la frecuencia y duración de los pulsos de corriente administrados. Un análisis detallado de los "Locí" de impedancia es conveniente para recabar datos detallados acerca de la capacidad eléctrica del epitelio y sus propiedades generales de cable. Además, haciendo cálculos teóricos de los valores de impedancia en epitelios cuyos parámetros son conocidos, es posible plantear hipótesis acerca del comportamiento de las membranas en diversas condiciones.

Se han estudiado también los mecanismos de acción de diversas sustancias que modifican los parámetros eléctricos de los epitelios, Ovabaina, D.N.P., Amiloride, etc. Cada una de estas sustancias puede actuar inhibiendo ya sea los transportes pasivos (amiloride) o activos (ovabaina y D.N.P.).

figura 13

Perfil Hermético
Piel de sapo

Perfil Laxo
Ileo de conejo



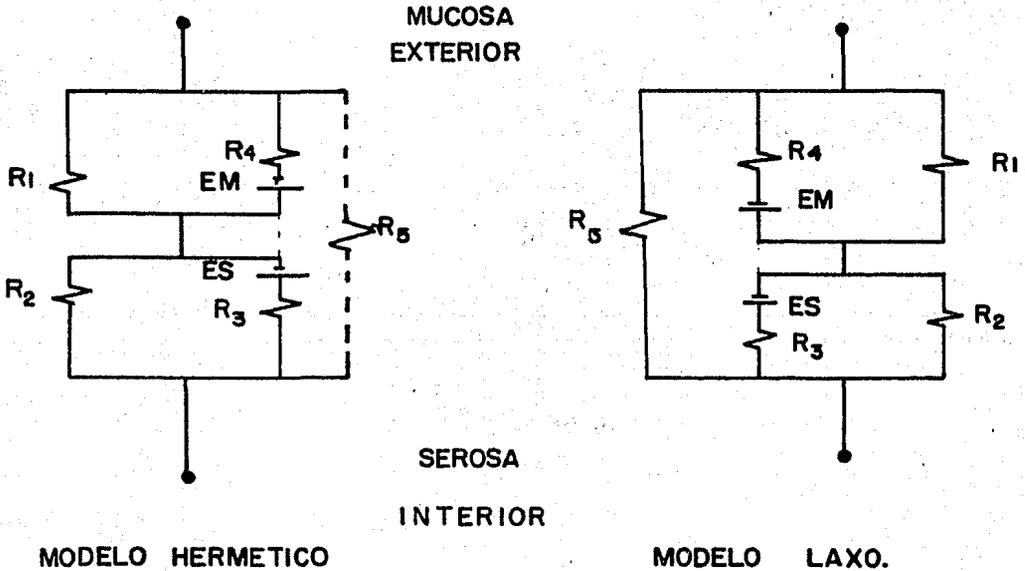
Representación esquemática de los perfiles de potencial eléctrico, hallados con microelectrodos.

A). A través de un epitelio de alta resistencia como la piel de rana.

B). A través del epitelio de baja resistencia del ileo del conejo. Los electrodos de referencia se colocaron en la superficie interna de la piel y en el lado seroso del ileo.

El eje x representa la dirección interior y exterior (serosa \rightarrow mucosa). Los subíndices C, M. y S., representan respectivamente, celular mucoso y seroso. V es la fuerza electromotriz operando a través de las membranas mucosa y serosa. (Tomado de Brandes).

FIGURA:14



Modelos eléctricos de los dos tipos principales de epitelios.

A). Modelo del epitelio Tight o hermético.

B). Modelo del epitelio Leakey o Laxo.

R1 y R2 son las resistencias luminal y basolateral respectivamente. R2 y R4 son las resistencias derivadas a través de las membranas respectivas. R.5 es la resistencia derivada extracelular. El comportamiento de este circuito se describe como sigue:

$$V_{mc} = (R_3 B + R_5) V_{mA} - R.AV_s B / R \text{ total}$$

$$V_{ms} = R_5 (V_5 B + V_{mA}) / R \text{ total}$$

$$\text{Donde: } A = R_2 / R_1 + R_2 \text{ y } B = R_4 / R_3 + R_4$$

$$R \text{ total} = R.B. + R_3 A + R_5$$

Para interpretación, ver texto.

11.2.3 La distribución de Sodio

El planteamiento de Koefed-Johnsen y Ussing indica, a manera de corolario, que existe relación estrecha entre los transportes tanto paracelular como transcelular y la concentración de sodio en las distintas partes del epitelio. Se define al compartamento de sodio de transporte a aquella cantidad de sodio que ha entrado a las células transportadoras y que es accesible a la extrusión activa desde la célula hacia el medio seroso. Existen numerosas evidencias de que en los epitelios solo una pequeña parte del sodio total intracelular puede hallarse libre (iónico) en un compartamento de transporte.

El sodio se encuentra compartamentalizado en tantas unidades como tipos celulares lo intercambien; tantas regiones celulares lo retengan; o se combine con especies químicas distintas; de aquí la necesidad de hacer análisis multicompartamental. La heterogeneidad funcional presente es la causa de esta obligatoria diferenciación en el momento de considerar las actividades efectivas de sodio en los modelos. Para intentar conocer el número y cinética de los compartamentos fisiológicos de sodio y otros iones, se utilizan generalmente dos métodos:

1). Directos:

- A) Análisis químico que nos da a conocer el contenido promedio de sodio en una estructura particular.
- B) Determinación de sitios de acumulación y barreras al paso de sustancias por métodos histoquímicos cuantitativos.
- C) Potenciales de membrana y electrodos sensibles.

II) Indirectos:

Como son los análisis de las cinéticas de:

- A) Incorporación de sustancias.
- B) Lavado de sustancias.
- C) Cambios en volúmen.

Las sustancias pueden ser compuestos detectables por métodos químicos ó sustituidas por radioisótopos.

Es posible estudiar la conducta de los sistemas simulados por uno o varios compartamentos midiendo el aumento en la concentración de sustancia en cada compartamento, o bien, la disminución de su concentración en el tiempo. La velocidad con que se incorpora o lava un soluto nos informa de detalles acerca de la barrera que separa un compartamento de otro. Se puede estudiar la cinética de penetración o salida de sustancia en función de la concentración, temperatura. Se pueden agregar sustancias estimuladoras e inhibidoras del lado basal o luminal e ir conociendo con ellas las características de las barreras compartamentales (Amiloride, v.gr.). Una simplificación primaria util es suponer que en cada compartamento la distribución de sustancia es homogénea.

En las técnicas de incorporación y lavado, generalmente se emplean radio isótopos. Su uso supone condiciones especiales al trazador, las principales son:

- 1). El sistema no discrimina entre sustancias radioactivas y no radiactivas; ambas tienen igual posibilidad de fluir a través de la barrera.

2). El trazador, agregado en pequeñas cantidades, pueda seguirse con facilidad.

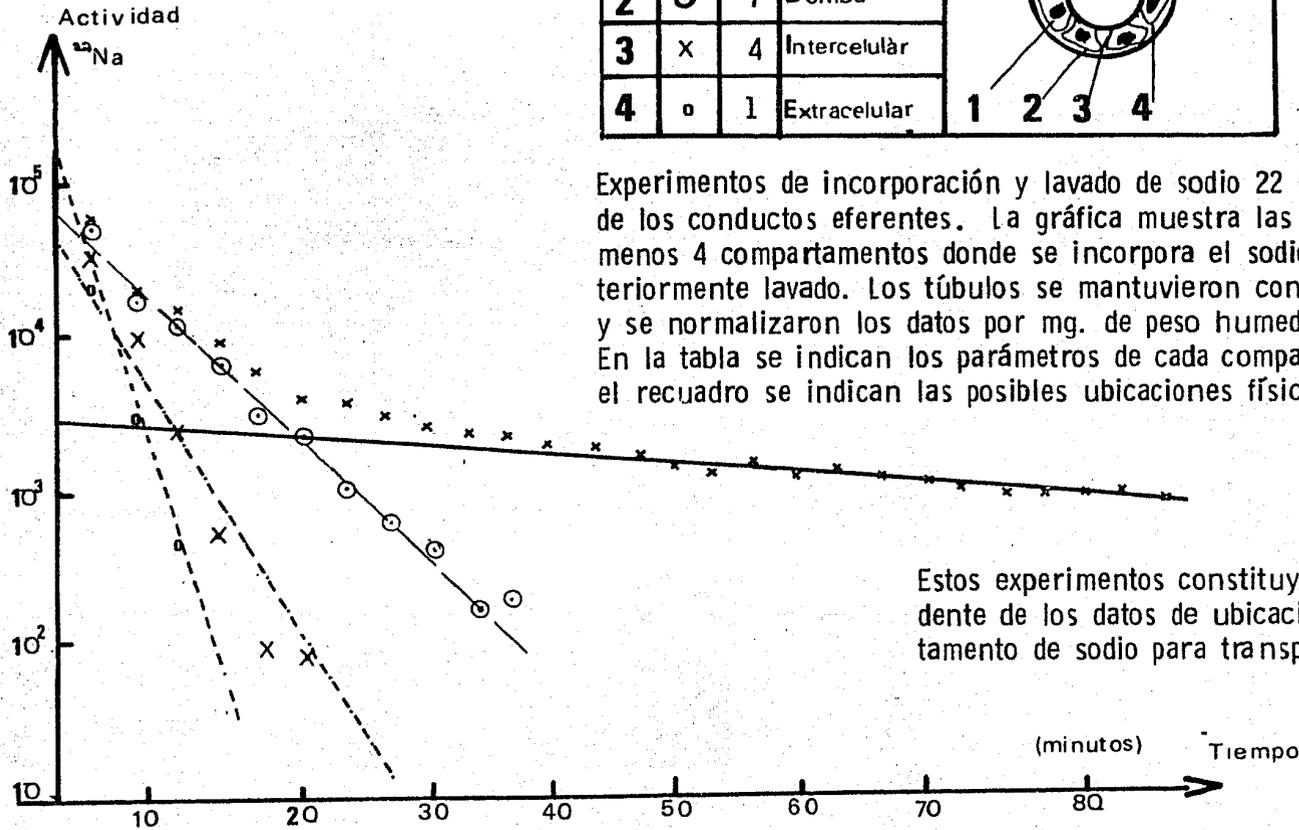
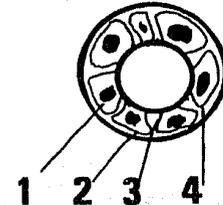
3). Los nucleídos resultantes de degradación radioactiva no deben ser tóxicos, etc.

En 1981, Labiano y Alucema, hicieron experimentos de lavado de sodio 22 (^{22}Na) en los conductos eferentes de la rata. Ellos incubaron los tejidos en cuestión, en una solución de Krebs que contenía sodio 22 durante una hora, (se supuso incorporación a saturación). Acto seguido, se les colocó en una solución de Krebs sin sodio radioactivo siempre a 36.5° y con oxigenación que perfundía con una velocidad de mil/min. y se tomaron muestras del tejido a tiempos regulares. Si la única causa de flujo era un gradiente de actividad específica de sodio 22, el proceso seguiría una cinética de primer orden, (tipo Fick). Si las causas de flujo eran varios gradientes de actividad específica, correspondientes a cada compartamento, el proceso implicaría una cinética compuesta de varias velocidades de salida de sodio 22.

Una vez obtenidos los datos, se construyó una gráfica de actividad específica contra tiempo. (Figura #14). En esta, se encontraron cuatro cinéticas de primer orden que contribuían a la cinética general de lavado de sodio en los conductos eferentes. Estos experimentos permiten asegurar que existen por lo menos 4 compartamentos de sodio en los conductos eferentes. Este es el número mínimo, ya que algunos compartamentos cuya cinética sea la misma o cuyas barreras se localizen en serie pueden quedar ocultos unos con otros.

FIGURA # 15

LUGAR	T _{1/2} (min)	ESTRUCTURA	
1	x	51	Citoplasma
2	⊙	7	Bomba
3	x	4	Intercelular
4	o	1	Extracelular



Experimentos de incorporación y lavado de sodio ²²Na a través de los conductos eferentes. La gráfica muestra las cinéticas de al menos 4 compartimentos donde se incorpora el sodio para ser posteriormente lavado. Los túbulos se mantuvieron con la luz abierta y se normalizaron los datos por mg. de peso humedo de conducto. En la tabla se indican los parámetros de cada compartimento y en el recuadro se indican las posibles ubicaciones físicas de los mismos.

Estos experimentos constituyen un antecedente de los datos de ubicación del compartimento de sodio para transporte.

III. METODOS

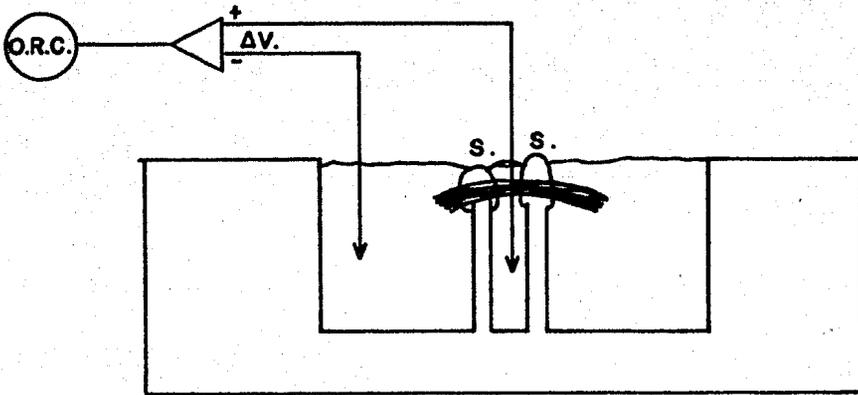
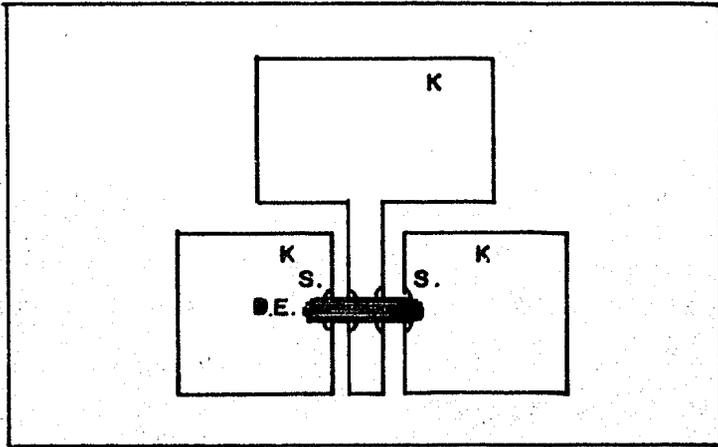
Ratas Wistar, macho de 3 meses de edad y peso variable entre 170-280 grs., eran sacrificadas por dislocación de la columna vertebral. Inmediatamente se disecan los testículos y vías anexas en una solución de Ringer: 119mM de Na Cl, 5mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 1mM Mg Cl₂, 2.5mM, NaHCO₃, y 0.5 mM Na H₂ PO₄, .5mM C₆H₁₂O; y oxigenación constante a 37°C ±, 0.5°C, Prosser 1976.

Se procede luego a la dirección de los conductos en un tiempo no mayor de 15 minutos, procurando retirar todo el tejido graso adyacente. Los conductos así preparados se manejan de distinta forma según el experimento era de determinación del espacio de inulina o bien de determinación del voltaje del epitelio.

Para la medición del potencial del epitelio se preparó una trampa doble de silicona que separaba 3 compartamentos como se indica en la figura No.15. Los conductos eferentes disecados se colocaban entre los tres compartamentos. En todo momento, las cámaras contenían solución de Ringer en las condiciones indicadas. Cada compartamento tenía un volúmen de dos c.c., y no existía un gradiente hidráulico entre ellos.

El voltaje transepitelial era medido entre el compartamento central de la trampa y cualquiera de los compartamentos laterales con ayuda de dos electrodos de Ag-AgCl, con puentes de agar KCl 3M, que eran colocados aproximadamente a 1cm., del preparado. Las determinaciones del voltaje se hacían con el electrodo positivo colocado en el compartamento central, el cual era una extensión de la región serosa de los conductos eferentes.

FIGURA: 16



Esquema Planta y Vista lateral de la doble trampa de silicona usada para el registro del potencial de epitelio de los conductos eferentes.

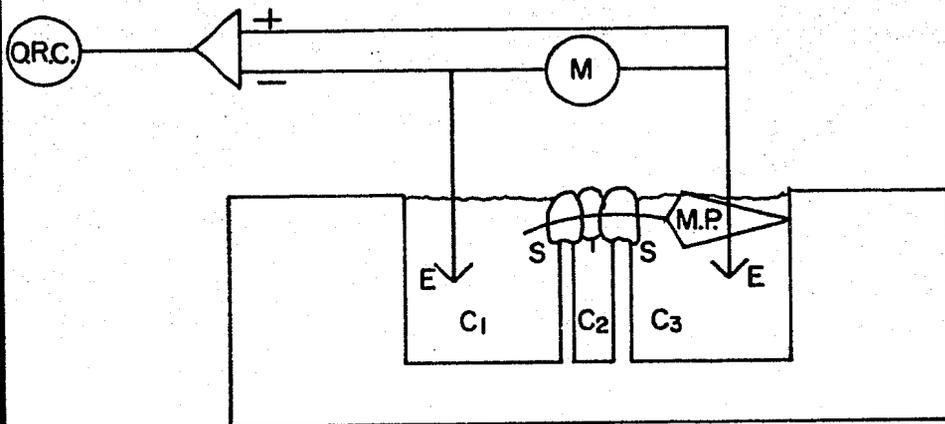


FIGURA 17

Dispositivo experimental para la determinación del potencial de un túbulo eferente. C1: Compartamento prologación de la luz tubular; C2: Compartamento de flujo de sacarosa; C3: Compartamento de prolongación de serosa; E.: Electrodo de registro; A.: Amplificador; O.C.C.: osciloscopio; P.: Micropinza; S.S.: Sellos de silicón. Puentes de agar-KCl. M.: Multímetro para determinación de resistencias de la trampa; M.P. Micropinza; T. Tubuloeferente.

Los electrodos estaban conectados por cortos cables blindados a un amplificador Grass, modelo P.18 y este a su vez conectado a un osciloscopio Hewlett Packard.

En virtud de que las capas de tejido conectivo que rodean los conductos eferentes permitían la difusión de agua y sales entre el compartamento central y los compartamentos laterales, los valores de voltaje registrados con esta trampa fueron bajos. Se decidió sustituir la doble trampa de sacarosa por una trampa mixta de silicona-sacarosa. El diseño de esta trampa se muestra en la figura #16. En esta trampa, el compartamento central de 1mm de ancho, servía para perfundir una solución de sacarosa 300 miliosmol pH7.2 y resistividad nunca menor de 500. K Ω

Las dimensiones de los compartamentos laterales fueron de 1c.c. En la trampa se colocaba 1 de los conductos eferentes de la rata disecada y se aislaban los tres compartamentos (Ringer-sacarosa-Ringer) por sellos de silicona.

La luz del extremo proximal de los conductos era obliterada con ayuda de una micropinza cuyos bordes habían sido recubiertos por parafina, y que sellaban al conducto al tocar la pinza con una fina aguja caliente.

La investigación acerca de las cinéticas de lavado de los compartamentos de captación inespecífica de sustancias, se utilizó la técnica de Inulina- ^{14}C . Esta técnica consistía en obliterar los conductos eferentes por sus dos extremos, distal y proximal con un hilo de nylon, cuyo peso húmedo había sido determinado previamente. Una vez obliterados, varios conductos eran colocados en una cámara con Ringer (condiciones antes mencionadas). Después de 1 hora en la cámara de estabilización, los conductos eran transferidos a una cámara de - -

incubación que contenía ringer con Inulina ^{14}C con una actividad de alrededor de $0.64 \mu\text{C}/\text{ml}$.

En esta cámara los tejidos permanecían incubándose durante una hora, tiempo suficiente para incorporar inulina a equilibrio en el medio extracelular. Después los paquetes de conductos eran pesados secando cuidadosamente el exceso de líquido de incubación y se trasladaban a cámaras de lavado donde restaban tiempos variables. La solución de lavado de las cámaras (de 2c.c. de volumen) eran sustituidas paulatinamente con una velocidad de recambio de 3 minutos. Cada 1.5, 2 ó 3 minutos un par de paquetes de conductos eferentes era separado, secado y colocado en una solución de Cocktail de centelleador líquido dentro de viales convencionales (5ml. de cocktail). Los trazos de tejido permanecían en digestión durante dos horas tras de las cuales se hacían las determinaciones de actividad relativa, en cuentas por minuto, en un contador de centelleo líquido nuclear Chicago. Se hicieron también determinaciones control de la actividad de los hilos de control; incubados y lavados de igual modo que los conductos eferentes. Se determinaron también las actividades del baño en cada tiempo requerido. Estos datos fueron descontados de la actividad del preparado de conductos eferentes.

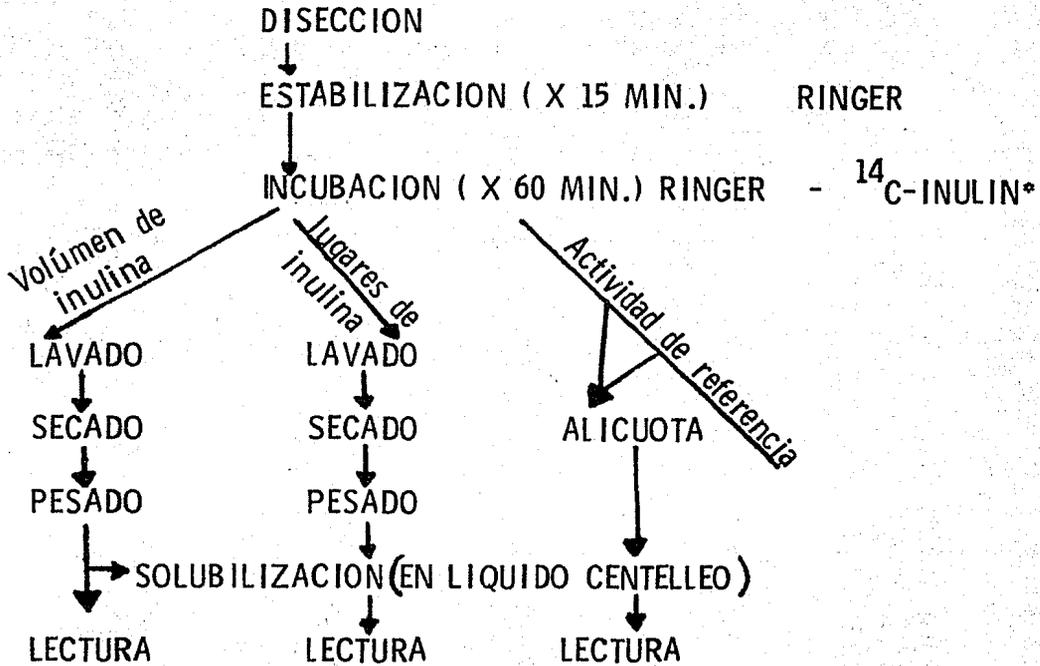
Como la digestión en el cocktail de centelleo de los conductos eferentes era total después de dos horas, no se hicieron las correcciones por auto absorción. La radiación de fondo y de los baños se descontaba automáticamente por el sistema de canal de guarda del equipo.

Los datos de actividad de cada conducto fueron normalizados a la unidad de peso de conductos eferentes, dentro de cada

experimento; y hechos relativos a la actividad máxima entre distintos experimentos.

FIGURA # 18

----- PROTOCOLO EXPERIMENTAL -----



*¹⁴C-INULIN - AMERSHAM 7.2 K. Bq./ml (.2 ci/ml.)

Diagrama de procedimientos seguidos durante la técnica de determinación de zonas de captación inespecífica con Inulina carbono 14.

IV. RESULTADOS

La determinación de los voltajes epiteliales con las técnicas antes mencionadas arrojó los datos de voltaje de epitelio de aproximadamente 36.25mV. (error estándar de la media 3.52; el rango de valores se encontró entre 25 y 50mV., en 8 experimentos). Los valores de voltaje disminuían cuando la velocidad de perfusión era menor de 1ml./min. y permanecían constantes a alto régimen (3ml./min.). Los valores de resistencia de la preparación se hallaban entre 300 y 500 $K\Omega$. Existe fuerte relación entre el potencial, la resistencia medida y la velocidad de perfusión. Para velocidades de perfusión mayores de 3ml./min., los parámetros de voltaje y resistencia eran independientes de la velocidad.

La estimación de la resistencia específica se hizo considerando el túbulo como un cilindro de 3mm. de largo y 0.1mm. de diámetro ($A \approx 0.09 \text{ cm}^2$).

Para un valor de resistencia promedio de 370 $K\Omega$, el valor calculado de la resistividad es de 33 $k\Omega \text{ cm}^2$.

Los resultados de las curvas de lavado de Inulina -¹⁴C, corresponden a la existencia de por lo menos dos compartamentos. Los parámetros de estos dos compartamentos son: Compartamento rápido con un tiempo medio de 2.25 minutos; Compartamento lento con un tiempo medio de 13.5 minutos.

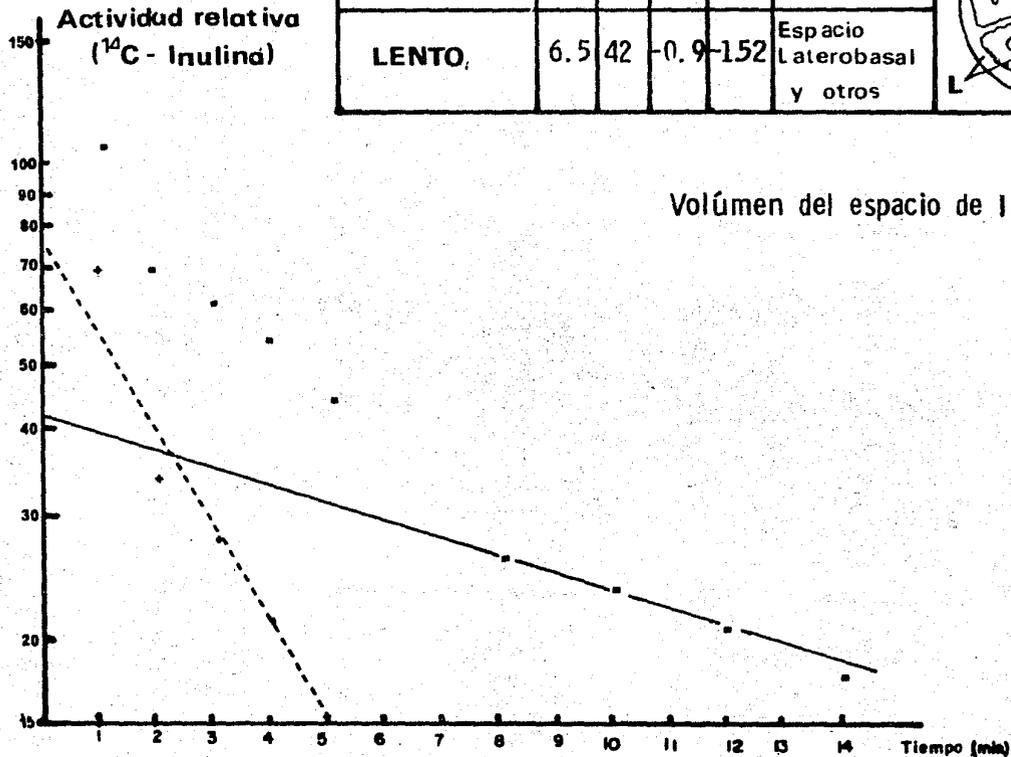
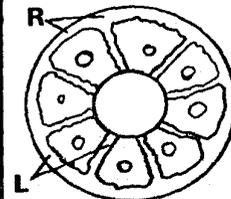
FIGURA # 19:

Gráfica de lavado de inulina ^{14}C . Se grafica el de la actividad específica (CPM) vs tiempo en minutos, los datos indican claramente la cinética de dos compartamentos.

En el recuadro se indican los valores de los parámetros de dos compartamentos.

figura 19

CINETICA DE CAPTACION DE INULINA C ¹⁴					
compameto	m _{min}	b _{act}	r	Z _{min}	LUGAR
RAPIDO	0.7	75	-0.9	-13.4	Espacio Extratubular
LENTO	6.5	42	-0.9	-152	Espacio Laterobasal y otros



V. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados de voltaje epitelial obtenidos con la trampa de silicona-sacarosa permiten confirmar la inclusión de este epitelio dentro de la clasificación hermética, el tipo de la piel de rana. Los resultados medidos y estimados de la resistencia y resistividad específica también confirman esta clasificación, aunque es preciso estimar el valor de la resistencia en serie producida por la zona de difusión restringida que se encuentra en la luz del epitelio.

Este trabajo es consistente con los trabajos de Labiano y Montorzi (1970) quienes postulan una vía de paso, principalmente transcelular a la difusión y transporte de sodio en los conductos eferentes.

Como se mencionó en la introducción el epitelio de los ductos eferentes, produce absorción de agua y solutos de la luz hacia el interior, los resultados aquí indicados sugieren que la vía de paso de iones posiblemente transcelular y por transporte activo, como lo evidencia el potencial registrado, en un artículo aparecido recientemente (English y Dym 1982), con trazadores y diversas sustancias la difusión de moléculas pequeñas simple o facilitada sedió abundantemente, mientras que las moléculas de alto peso molecular no difundían o lo hacían en cantidades mínimas.

Además del transporte activo de iones Na, se han pustulado sistemas de transporte activo de Cl (Lechene 1982). Este mismo autor no encontró absorción considerable de Na.

Considerando los grados de absorción de Na (Labiano) y de cloro (Lechene), se puede calcular un cambio de osmolaridad entre serosa y mucosa de 130mM de sodio y 140mM de cloro lo que induce una absorción neta de H₂O de 120mOS., la cual es consistente con lo reportado por Johnson y Howard. Esta es una posible explicación por bombeo activo, tanto de Na, como de Cl al flujo alto del agua, casi un 90% en el conducto eferente.

Aunque la descripción de Koefoed-Johnsen y Ussing sugería que el sodio entra primeramente al interior de la célula desde el lumen y es subsecuentemente transportado del interior celular a la solución serosa por un proceso de transporte activo a nivel de la membrana basolateral. El mecanismo exacto de la regulación de la velocidad de transporte tiene aspectos aún por aclararse. Se sabe que ciertas sustancias, como el amiloride, la ouabaina y las hormonas, como la aldosterona, afectan el transporte.

Una de las dificultades radica en el desconocimiento de las actividades iónicas en las varias condiciones de transporte.

Para la determinación de los compartamentos de captación inespecífica de sustancias se utilizó la técnica de inulina-¹⁴C. La inulina es un polifructósido de alto peso molecular que no es absorbido ni metabolizado por los conductos eferentes (Lechene 1982), pero que puede ocupar los espacios extracelulares correspondientes; a luz del túbulo, tejido conectivo y espacios intercelulares. Si se ha embebido a un tejido en inulina-¹⁴C se puede lavar el tejido y determinar su actividad a diferentes tiempos con ayuda del contador de centelleo líquido.

Esto nos permite conocer la cinética de pérdida de compartamentos inespecíficos del espacio extracelular del epitelio y el tamaño relativo de este respecto al total.

En cuanto a la interpretación de los resultados es factible que el compartamento más rápido de inulina corresponda al menos parcialmente, al compartamento 3 (zonas de transporte postulado por Labiano en 1980). Para afirmar esto con mayor certeza, se requieren los datos de actividades iónicas por métodos directos.

Los problemas técnicos que se hicieron presentes durante estos experimentos implican la modificación de las técnicas o la implementación de nuevas metodologías, tales problemas se discuten aquí someramente.

Los preparados de un solo túbulo eferente para la determinación de voltajes celulares exigían una manipulación cuidadosa, haciendo que el 50% de los túbulos tuvieran que desecharse, principalmente por el daño producido al obstruir su luz con la micropinza. Posiblemente pueda evitarse el uso de la micropinza, usando el sistema de sellado con silicona o hilo dental. Aún mejor, sería el uso de una doble trampa de sacarosa. Otra solución más sofisticada consiste en el uso de microelectrodos. Otro problema presente fué el de la incorrecta regulación del flujo de sacarosa, que contribuía a la corta duración del preparado, esto puede corregirse de modo simple rediseñando la cámara de tal modo que tanto la salida como la entrada de sacarosa sean controladas por cambios de presión hidrostática.

Dada la accesibilidad del sistema de trampa de sacarosa, -
su uso es recomendable en experimentos que requieren

condiciones más rigurosas, siempre y cuando se considere la existencia de una resistencia de trampa (formada al existir paso de iones entre los compartamentos). Esta resistencia, en nuestro caso aumentó al utilizar sacarosa y silicón y era aún mayor al hacer perfundir sacarosa a velocidades de 3cc./min. La determinación de esta resistencia de trampa puede hacerse diferenciando la corriente que pasa entre los compartamentos de registro en dos (Morad y Orskand 1972). La corriente que pasa por los espacios entre células y de tejido conectivo adyacente (corriente de pérdida) y la corriente que pasa a través del epitelio en cuestión.

Haciendo referencia al estudio hecho en condiciones semejantes por Morad y Orskand (1971) pueden compararse las relaciones de conductancia epitelial (RE) y de conductancia de interfase de trampa y preparado $R_{CE} / R (T.E.)$
 $GE/G (T-E).$

Ambas conductancias forman un divisor de voltaje que tiene el potencial de epitelio (VE) como entrada y el voltaje trans-trampa (VE) como salida:

$$i = \frac{VE}{RE + RET} \quad VET = i \cdot RE - T$$

$$VET = VE \frac{RE - T}{RE + RET} \quad VET = RE + VET \cdot RE = V$$

$$= RE \cdot RET$$

$$VT \cdot RE = VE \cdot RET - VET \cdot RET$$

$$VET \cdot RE = RET (VE - VET)$$

$$\frac{RE}{RET} = \frac{VE - VET}{VET} \quad \frac{GET}{GE} = \frac{VE - VET}{VET}$$

Donde VE es el voltaje del epitelio determinado con ayuda de un microelectrodo.

El principal problema encontrado en la técnica de determinación de la cinética de los espacios de inulina ^{14}C , se dió en el momento de hacer la determinación del peso humedo de los conductos, una posible solución es tomar las medidas de actividad con referencia a peso seco, lo que obviaría el error por excesivo arrastre de agua o deshidratación. Determinando una constante de relación entre peso humedo y peso seco pueden referirse los resultados a peso humedo con mayor propiedad.

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALFARO, F.B. Propiedades eléctricas de las uniones estrechas de la Vesícula biliar de anfibio. Tesis de Maestría, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, I.P.N., México 1981.
- 2.- BERNAL, J.D. La Ciencia en la Historia. Universidad Nacional Autónoma de México, Ed. Nueva Imagen, México 1980.
- 3.- BERNAL, J.D. La Ciencia en Nuestro Tiempo. Universidad Nacional Autónoma de México, Ed. Nueva Imagen, México 1980.
- 4.- BERNARD, C. Citado por Goldstein en Fisiología Comparada, Fondo Editorial, México 1980.
- 5.- BLAKE, J.R. y LIRON, N. y AIDIS. Flow Patterns around Ciliated Microorganisms and in ciliated ducts. Journal of Theoretical Biology. 98, 127-141/1982.
- 6.- BURGOS, M.H. Biochemical and functional properties related to sperm metabolism and fertility. Chapter Five of Sex male accessory organs.
- 7.- CEREIJIDO, M. y ROTUNNO, C. Introducción al estudio de las membranas biológicas. Edición preliminar de Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires 1966.
- 8.- CIVAN, M.M. The Sodium Transport pool of epithelial tissues en: Water Relations in Membrane Transport in Plants and Animals

- 9.- CUTHBERT, A.W. Sodium Entry Step in Transporting Epithelia. Results of ligand binding studies en: Water Relations in membrane transport in plants and animals.
- 10.- CURRAN, P.F.,
McINTOSH, JR. A model System for biological Water Transport. Nature, 193 (347), 1972.
- 11.- DIAMOND, J.M.
y BOSSERT, W.H. Journal of General Physiology, 50, (206), 1967.
- 12.- DU BOIS-REYMOND Untersuchungen iibertier ische. Elektrizitat Citado en BITTAR, Membrane and ion transport, Wiley Interscience pp 66, 1975.
- 13.- EATON, D.C. Intracelular sodium activity and sodium transport in rabbit urinay bladder. Journal of Physiology 316, (527-544), 1980.
- 14.- ENGLISH, H.F.
DYM, M.: The time required for materials inyected into the rete testis to reach points in the caput epydidymis of the rat. Ann. of the N.Y. Acad. of Science, Vol. 383.
- 15.- FLICKINGER, C.J. Howards, S.S. English H.F. Ultrastructural differences in efferentes ducts and several regions of Epydidymis of hamster. A M. J., A Nat, 152 (557-586), 1978.
- 16.- FROMTER, E.R. The Feldberg Lecture. Transport of Solutes across epithelia. What can we learn from the micropuncture studies in kidney tubules. Journal o f Physiology 288 (1-31), 1979.

- 17.- FROMTER, E., y
DIAMOND, J.M.: Route of pasive ion permeation in epithelia, Nature New Biology, 235 (9), 1972.
- 18.- GLADWELL, R.T.: The effect of temperature in the potential difference and input resistance of rat seminiferous tubules. J. Physiology 268 (111-121), 1977.
- 19.- GOYAL, H.O. y
FERGUSON, J.G.y
HRUDKA, F. : Histochemical activity of carbonic anhidrase in testicular and excurrent ducts of inmatu-
re, mature and androgenic deprived bulls. Biology of Reproduction, 22(991), 1980.
- 20.- GOYAL, H.O., y
HRUDKA, F.: Ductully efferents of the bull, a morphologi-
cal, developmental and experimental study. Andrology 12 (4):6, 1981.
- 21.- GOYAL, H.O.y
HRUDKA, F.: The resonptive activity in the bull efferent
ducts. A morphological and experimental
study. Andrología B (4):6, 1981.
- 22.- HOWARDS, S.S.,
JESSEE, S.J. y
JOHNSON, A.C.: Micropuncture studies of the blood-seminiferous
tubules barrier. Biology of reproduction 14
(264), 1976.
- 23.- JESSEE, S.J. y
HOWARDS S.S.: A survey of sperm potentials and sodium
concentrations in the tubular fluid of ham-
ster epydidymis, Biology of Reproduction (15),
1976.
- 24.- JONES R.C. y
HOLT, W.V.: Studies of the efferents ducts from the testis
of the african elephant *Loxodonta*, *Africana*
III Ultraestructural and cytochemistry of the
ductully eferents. J.Anat., 133 pp 247-255, 1981.

- 25.- JOHNSON, A., y HOWARDS, S. Hiperosmolality in intraluminal fluids from hamster testis and epididymis, a micropuncture study. Science, 195 (24), 1977.
- 26.- KOEFOED-JOHNSEN, V., y US-SING H.H. y SHERAN K. The origin of short circuit current in adrenaline stimulated frog skin, Acta Physiol scand, 28: 60-76, 1952.
- 27.- KOEFOED-JOHNSEN, V. y US-SING, H.H. y SHERAN, K. The nature of frog skin potential, Acta Physiol Scand, 42, 298, 1958.
- 28.- KUHN, T.S. Historia de las revoluciones científicas, Fondo de Cultura Económica, México 1975.
- 29.- LINDEMANN, B. The minimal information content of Ena. INSERM, 1979, Vol. 85, 241-252.
- 30.- LINDEMANN, B. Circuit Analysis of epithelial ion transport I, Derivation of Network Equations, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 4, (275-286)1977.
- 31.- LINDEMANN, B. Circuit Analysis of Epithelial ion transport II, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 4, 287 (1977).
- 32.- LINDEMANN, B. The beginning of Fluctuation Analysis of epithelial transport. Journal of Membrane Biology 54, 1-11 (1980).

- 33.- LABIANO, S.A.,
ALUCEMA, A.M. Boletín de la Sociedad Mexicana de Física #6,
1980.
- 34.- LECHENE, L. Ann. N.Y. Acad. SC.: 383, 1982.
- 35.- MONTORZY, M.
M. y LABIANO,
S.A. Acta Physiol. Lat. Amer. 20, 1970.
- 36.- MORAD, M. y
ORKAND, R.K. Excitation contraction in the frog ventricle.
J. Physiology, 219, 1971.
- 37.- NAGANO, T.,
SUSUKI, F. Belt - Like Gap Junctions, in the ductoli
efferentes of some mamalian testes. Archi-
vum Histologicum Japonicum, 43 (2), 1960.
- 38.- OGILVIE, J.T.,
Mc. INTOSH, J.R.
y CURRAN, P.F. Volumen flow in a series membranes system,
Biochem. Biophys Acta. 2 (105), 1963.
- 39.- PROSSER, L. (Ed.) Comparative Animal Physiology, W.B.
Saunders, CO., 1973.
- 40.- SCHANNE, O.F.
CERETTI, E.R.P. Impedance Measurements in Biological Cells,
Wiley Interscience, 1978.
- 41.- USSING, H.H. The active ion transport trough the isolated
frog skin in the light of tracer studies,
Acta Physiol Scand, 17, 1., 1949.
- 42.- USSING, H.H. The distribution By means of tracers between
active transport and difussion, Acta Physiol
Scand, 19, 43, 1949.