

Algunos aspectos bioelectroquímicos de la fisiología y la farmacología

Transporte. Regulación del medio interno. Regulación del medio intracelular. Excitabilidad.

Dr. Francisco C. Herrera

Individuo de Número, Sillón XI

Breve resumen histórico

Algunas descripciones clásicas

Desde tiempos inmemoriales el hombre ha estado familiarizado con los fenómenos bioeléctricos más notables. Los antiguos egipcios conocían los extraños efectos que causaba el contacto con el siluro o bagre eléctrico del Nilo, *Malapterurus electricus*, el cual aparece ya en los murales y estatuas. Hipócrates, Platón y Aristóteles conocían de los impactantes choques o descargas impartidos por la raya mediterránea *Torpedo ocellata*.

Aristóteles describe la potente descarga de torpedo en el libro IX de su obra *Historia Animalium*.

Sólo después de la construcción de los primeros instrumentos de medición de la electricidad, fue cuando se descubrió la verdadera naturaleza bioeléctrica de estos efectos (1).

En su estadía en la ciudad de Calabozo durante el mes de marzo de 1800 (2), Alejandro Humboldt describe los efectos del gimnoto sobre los caballos que los llaneros introdujeron en un caño en El Rastro cerca de Calabozo con el fin de agotar la carga eléctrica de estos peces y poderlos capturar. Muy posteriormente, en una obra póstuma de 1881, Carl Sachs también menciona la abundancia de gimnotos en los caños de El Rastro (3). Ambos autores estudiaron las potentes descargas del *Electrophorus*

electricus o temblador, probablemente el pez capaz de producir las descargas más intensas, hasta 600 V (4).

Primeros estudios sistemáticos

Podría considerarse que el estudio sistemático de la bioelectricidad comienza con las observaciones que el médico italiano Luigi (Aloysio) Galvani (1738-1798) realizó sobre las contracciones que se observaban en ancas de rana colgadas de ganchos de hierro o cobre en un carril de hierro durante su preparación culinaria. Determinó que la aplicación de un arco metálico hecho con dos metales diferentes igualmente determinaba la contracción muscular.

Asimismo, Galvani estaba familiarizado con el hecho que el torpedo marino y la anguila eléctrica exhibían actividad eléctrica intrínseca. Concluyó que los tejidos animales tenían una electricidad propia.

Alessandro Comte Volta (1745-1827), quien desarrolló la pila eléctrica que lleva su nombre, observó que la electricidad generada por dicha pila podía provocar la contracción y tetanización de la preparación neuromuscular: había descubierto el fenómeno de la electroestimulación. Volta intentó explicar los experimentos de Galvani mediante corrientes bimetálicas. Consideraba que para producir electricidad se requerían tres sustancias, dos metales heterogéneos y un tercer material conductor para completar el circuito. Si este tercer material era un músculo, éste se contraía en virtud de su irritabilidad (5).

Para zanjar la controversia entre Galvani y Volta, Humboldt repitió los experimentos de ambos y concluyó que Galvani había descubierto dos fenómenos genuinos: la electricidad bimetálica y la electricidad animal intrínseca y que estos no eran mutuamente excluyentes. Humboldt demostró que ambos investigadores habían errado en sus interpretaciones. Estas investigaciones dieron origen a la ciencia de la electrofisiología por una parte y al desarrollo de la pila eléctrica por otra. Un ejemplo de cómo interpretaciones equivocadas bien analizadas pueden dar origen a importantes descubrimientos.

Inicio de la investigación cuantitativa

La investigación en electricidad animal fue facilitada por el descubrimiento del electromagnetismo por parte de Oersted quien, en 1820, demostró que el paso de corriente a través de un conductor eléctrico genera alrededor de él un campo magnético que interactúa con el de una aguja imantada en su vecindad, causando su desviación del meridiano magnético. Esta experiencia condujo al desarrollo por Nobili en 1825 del galvanómetro astático (5), posteriormente perfeccionado por du Bois-Reymond, en el cual el conductor estaba dispuesto como dos bobinas arrolladas en direcciones opuestas de modo de neutralizar el efecto del magnetismo terrestre (Figuras 1 y 2).



Figura 1. Galvanómetro de Nobili. Galvanómetro astático de bobina fija e imán móvil. Tomado de Gscheidlen, Richard. 1876. Physiologische Methodik. Ein Handbuch del Praktischen Physiologie. Braunschweig: Vieweg & Sohn. Cortesía de Max-Planck-Institute for the History of Science, Berlin <http://vlp.mpiwg-berlin.mpg.de/>

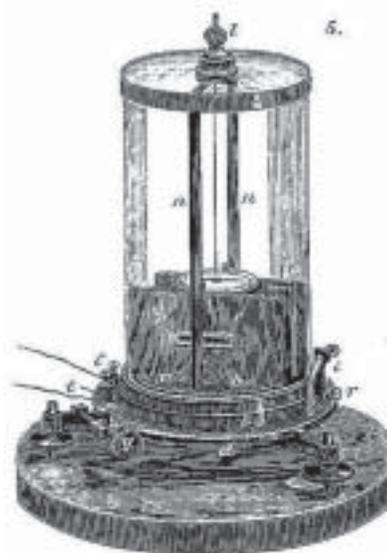


Figura 2. Galvanómetro de du Bois-Reymond. Galvanómetro astático de bobina fija e imán móvil. Tomado de Cyon, E. 1876. Atlas zur Methodik der physiologischen Experimente und Vivisectionen. Giessen, St. Petersburg: Ricker, Carl. Cortesía de Max-Planck-Institute for the History of Science, Berlin <http://vlp.mpiwg-berlin.mpg.de/>

Estos instrumentos, que pueden responder a corrientes de bajísima intensidad (6), (los más sensibles responden a corrientes de 10^{-11} a 10^{-12} amperios), sólo detectan el paso de la corriente eléctrica pero no dan indicación de su magnitud ni del valor de la fuerza que la impulsa. Es más, para esa época no se habían definido las unidades eléctricas. Además existía duda sobre el origen de estas corrientes detectadas: si era originada en el tejido mismo o en los conductores que se aplicaban a él.

Las experiencias de Carlo Matteucci (1811-1868) restablecieron las bases de la electrofisiología muscular. Matteucci se planteó investigar la localización de la electricidad en la preparación neuromuscular y supuso que el músculo por sí sólo podría producirla. Las contribuciones de Matteucci fueron fundamentales: a) detectó galvanométricamente un flujo de corriente entre la superficie cortada del músculo y su superficie indemne (corriente de lesión); b) observó la multiplicación de la corriente de lesión disponiendo en serie varios músculos

seccionados de modo que la sección transversal de uno tocaba la sección longitudinal del siguiente; c) la disminución de esta corriente mediante el tétanos inducido por la estrocnina (lo cual conduciría al descubrimiento de la corriente de acción); d) encontró que la contracción de un músculo generaba electricidad suficiente para estimular otra preparación neuromuscular en contacto con él (la rana reoscópica). Es así como descubrió el efecto polarizante de corrientes prolongadas aplicadas a la preparación y sentó las bases para el estudio de la polarización y el electrotono (modificación de la excitabilidad del músculo o nervio por acción del paso de corrientes de larga duración).

La obra de Matteucci sería continuada en forma magistral por Emil du Bois-Reymond (7). Este fisiólogo alemán, de ascendencia hugonote, consideraba que en el músculo indemne existía un potencial de reposo entre la porción central de la preparación, el músculo en sí, (positivo) y el tendón (negativo). Durante la actividad este potencial disminuía, fenómeno que describió como la variación negativa de las corrientes del músculo y del nervio, y que corresponde a lo que modernamente se denomina el potencial de acción. Fue discípulo de Johannes Müller, el fisiólogo más importante de la época. du Bois-Reymond se destaca por su destreza en el empleo de la instrumentación eléctrica de la época. El galvanómetro astático desarrollado por él permitía detectar corrientes eléctricas muy débiles; asimismo, diseñó electrodos impolarizables, inductores y estimuladores.

Impulsó el método de compensación o de Poggendorff (Figura 3): si se disponen dos fuentes de fuerza electromotriz de la misma magnitud en sentido opuesto y en serie con el galvanómetro, la aguja de este no se moverá porque no fluirá corriente: una fuerza electromotriz anula la otra. Si una de las fuerzas tiene un valor conocido, se puede deducir inmediatamente el valor de la otra. De modo que si se opone una fuerza electromotriz conocida a la preparación biológica se puede conocer la magnitud de la fuerza electromotriz de esta última. Para este fin empleó el potenciómetro de Poggendorff. En este instrumento se hace fluir una corriente eléctrica a través de una resistencia variable y se comparan las magnitudes de la fuerza motriz de la preparación con la obtenida en algún punto de la resistencia determinado por el desplazamiento de un cursor a lo largo de ella. El largo de la resistencia (que corresponderá con la magnitud de la resistencia del

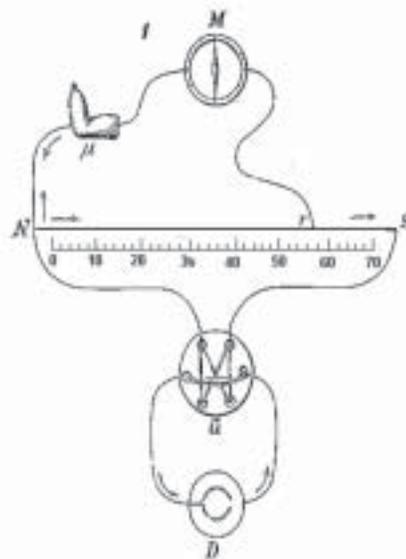


Figura 3. Potenciómetro de Poggendorff para medir por oposición una fuerza electromotriz desconocida. Redibujado de Cyon, E. 1876. Atlas zur Methodik der physiologischen Experimente und Vivisectionen. Giessen, St. Petersburg: Ricker, Carl. Cortesía de Max-Planck-Institute for the History of Science, Berlin <http://vlp.mpiwg-berlin.mpg.de/>

segmento entre el cursor y el origen) multiplicado por la corriente que fluye a través de ella dará la fuerza eléctrica del potenciómetro opuesta a la preparación. Cuando, mediante el desplazamiento del cursor, se anula la desviación de la aguja del galvanómetro, significa que no fluye corriente a través de él y la fuerza electromotriz del potenciómetro equivale a la de la preparación biológica. Visto de otra manera, de acuerdo a la ley de Ohm

$$R = V / I ,$$

donde R es la resistencia del circuito y V es el voltaje o fuerza electromotriz que impele la corriente I a través del circuito. Al no fluir corriente a través del circuito, R tiende a infinito. Esta situación la interpretaba du Bois-Reymond como eliminación del factor resistencia en las medidas. De esta manera comenzó la cuantificación de las propiedades bioeléctricas. Publicó sus experiencias en bioelectricidad en una monumental obra: *Untersuchungen über Thierische Electricität*.

du Bois-Reymond consideraba que existían

partículas eléctricas regularmente ordenadas a lo largo de la superficie del músculo y del nervio que explicarían sus propiedades bioeléctricas. Este concepto daría origen a las hipótesis de polarización de membrana desarrolladas por Bernstein (8) y que constituyen los fundamentos de la teoría moderna.

El próximo paso que se presentaba en la investigación electrofisiológica era determinar si la variación negativa del potencial del nervio, descrita por du Bois-Reymond, era idéntica al proceso excitatorio (el impulso nervioso). Por sugerencia de du Bois-Reymond, Bernstein decidió comparar la velocidad de propagación de ambos fenómenos. Johannes Müller consideraba que la conducción de un estímulo al cerebro y su regreso al músculo efector era instantánea. Helmholtz había determinado la diferencia del tiempo de respuesta de un músculo cuyo nervio era estimulado en dos puntos separados por una cierta distancia. La diferencia en el tiempo de respuesta constituía el tiempo que requería el impulso excitatorio para viajar entre los puntos de estimulación. Bernstein confirmó los resultados de Helmholtz. Empleando un instrumento diseñado por él, el reotomo y un galvanómetro, pudo determinar el intervalo entre la aplicación del estímulo y la respuesta del galvanómetro. Obtuvo una velocidad de propagación de la variación negativa de 29 m/s que correspondía exactamente con el tiempo de conducción del impulso excitatorio de Helmholtz, 27-30 m/s, de donde infirió la identidad del impulso excitatorio y la variación negativa. En 1882 describió asimismo el retardo sináptico: el retraso de aproximadamente 0,3 ms que sufre la conducción del impulso nervioso a nivel de la sinapsis neuronal.

Establecimiento de las bases fisicoquímicas de la electrofisiología moderna

Con los estudios de Bernstein se inicia la electrofisiología moderna. Este autor fijó las bases electroquímicas de los fenómenos bioeléctricos. Bernstein desarrolló su teoría para explicar los biopotenciales de membrana como consecuencia de la hipótesis de du Bois-Reymond quien postuló la existencia de partículas eléctricas regularmente ordenadas a lo largo de la superficie del músculo y del nervio. Desde los trabajos de este investigador se ha reconocido el papel fundamental de la concentración del potasio intracelular en la generación de los potenciales de reposo y de lesión en músculo y nervio.

Este autor desarrolló su teoría basándose en los trabajos de Ostwald (9) y Nernst (10,11) sobre la diferencia de potencial eléctrico entre dos soluciones del mismo electrolito a dos concentraciones diferentes separadas por una membrana selectivamente permeable. El electrolito de mayor movilidad tenderá a avanzar más rápidamente que los demás creando un frente eléctrico de su mismo signo que se manifiesta como una diferencia de potencial eléctrico entre las dos soluciones. La diferencia de potencial generada se puede calcular mediante la ecuación derivada por Nernst. Esta ecuación se ha popularizado enormemente y una versión simplificada aparece en casi todos los textos de fisiología médica (12):

$$E_K = (RT/F) \ln \left(\frac{[K^+]_e}{[K^+]_i} \right).$$

Donde E_K es el potencial eléctrico transmembrana, R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta, F la constante de Faraday, $[K^+]_e$, la concentración extracelular de potasio y $[K^+]_i$, la concentración intracelular de potasio.

Precisamente esta fue la ecuación que aplicó Bernstein al suponer que la membrana celular era impermeable a todos los iones con excepción del potasio, cuya difusión continua hacia el exterior, a causa de su alta concentración intracelular, generaría una negatividad eléctrica intracelular y un frente de cargas positivas del lado extracelular. Durante el paso del impulso nervioso la membrana perdía su selectividad para el potasio. Esto resultaría en una caída a cero del potencial transmembrana, la variación negativa descrita por du Bois-Reymond. Bernstein realizó un gran número de experimentos muy ingeniosos, considerando la instrumentación de la época y logró registrar el cambio de potencial transmembrana que acompaña el impulso nervioso.

En un interesante estudio histórico Grundfest (13) llama la atención en el hecho que Bernstein, en un trabajo publicado en 1868 en el volumen 1 del *Pflügers Archiv* había observado una inversión de la diferencia de potencial o sea que el interior del nervio se hacía positivo con respecto al exterior. Esto indicaría la entrada de un ion positivo al nervio durante el impulso nervioso lo cual implicaría que el nervio se hacía permeable a un catión distinto al potasio durante el impulso lo cual contradecía su teoría. Esta inversión de polaridad, como se ha

demostrado posteriormente, era correcta pero como no correspondía con su teoría Bernstein la desechó y no aparece en su obra *Elektrobiologie* (14), publicada en 1913, diez años después de sus observaciones de 1902. Así pues, una observación originalmente correcta es desechada, víctima de una teoría (15). Bernstein puede considerarse como el padre de la bioelectroquímica al incluir los métodos e ideas de la moderna electroquímica, la física molecular y la termodinámica en el estudio de los fenómenos fisiológicos.

Esta época corresponde con la electrofisiología clásica iniciada y desarrollada por du Bois-Reymond con el empleo de delicados instrumentos de estimulación y medición que atestiguan el alto nivel de artesanía que habían alcanzado los fabricantes de instrumentos para mediados del siglo XIX. Se puede mencionar entre ellos a Mechanik Zimmermann, Heidelberg; Siemens & Halske, Berlin; Carpentier, Paris; Officine Galileo, Firenze y Hartmann & Braun, Frankfurt.

Los galvanómetros, desde el primero desarrollado por Nobili hasta los empleados por du Bois-Reymond y Bernstein, eran instrumentos de respuesta muy lenta por la gran inercia de la aguja imantada que resultaba en una gran lentitud de su desplazamiento. Esto fue parcialmente resuelto por el desarrollo por Bernstein de ingeniosos instrumentos de investigación, entre otros el reotomo, que seccionaba el impulso eléctrico en cortos segmentos que luego sumaba reconstruyendo los segmentos de la curva de la rápida variación eléctrica.

Como se desprende de los trabajos de du Bois-Reymond y de Bernstein, la inercia de la aguja imantada constituía un serio problema para el estudio de fenómenos eléctricos relativamente rápidos. Para registrar estos fenómenos, entre otros la actividad eléctrica del corazón, electrocardiografía, o del cerebro, electroencefalografía, se desarrollaron instrumentos en los cuales se fijaba el imán y se dejaba libre el conductor. La inercia de este último se fue reduciendo progresivamente. El primero de estos instrumentos fue el galvanómetro de bobina libre de d'Arsonval (Figuras 4 y 5). Poco después Einthoven desarrolló su galvanómetro, cuyo conductor consistía en un finísimo filamento de cuarzo suspendido entre dos potentes imanes (16) (Figura 6). Finalmente Erlanger y Gasser emplearon el osciloscopio de rayos catódicos en el que el conductor está constituido por un haz de rayos catódicos de inercia mínima (17).

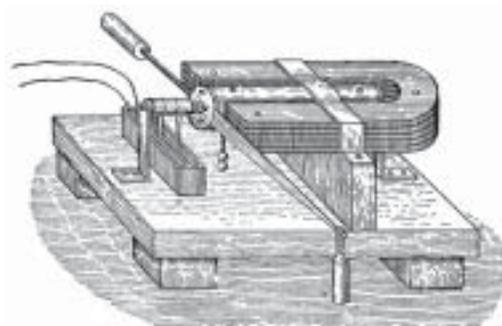


Figura 4. Galvanómetros de bobina móvil e imán fijo. a) primer galvanómetro de d'Arsonval.

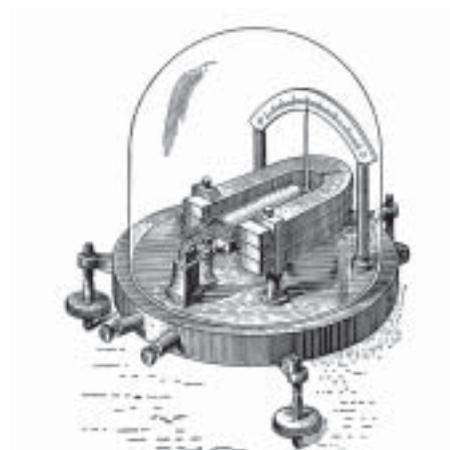


Figura 5. Segundo galvanómetro de d'Arsonval. Tomado de Lloyd W. Taylor. *Physics the pioneer science*. Volume 2. *Light – Electricity*. New York: Dover Publications, Inc.; 1959.

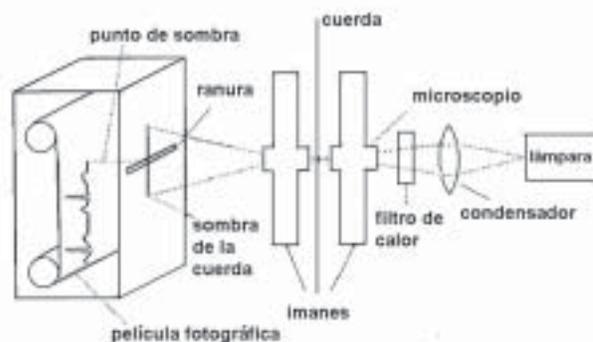


Figura 6. Esquema del galvanómetro de cuerda de Einthoven. Redibujado de (122).

Desde los trabajos de du Bois-Reymond y Bernstein hasta la década de los treinta del siglo XX, se produce un hiato en la investigación sobre los fenómenos iónicos asociados al impulso nervioso y la contracción muscular. Estas investigaciones serán retomadas inmediatamente antes de la segunda Guerra Mundial y continuadas al finalizar ésta por un grupo de investigadores ingleses: Adrian, Hodgkin, Huxley y Keynes en Cambridge y Fatt y Katz en Londres sin olvidar el peripatético australiano Eccles (18,19). Durante este hiato electrofisiológico se comenzaron a desarrollar, como consecuencia del perfeccionamiento de la instrumentación, los modernos métodos de exploración electrofisiológica: la electrocardiografía (ECG) y la electroencefalografía (EEG).

El desarrollo de la electrónica moderna abre la puerta a la investigación de los fenómenos de conducción en nervio, excitación conducción en músculo y los fenómenos de transducción, conversión de estímulos externos no-eléctricos en impulsos eléctricos propagados en los órganos de los sentidos.

Lee De Forest en 1907 inventa el tubo al vacío, mejor conocido como el tubo electrónico, que conducirá al transistor y los circuitos integrados actuales. Este nuevo salto cuántico en la instrumentación facilitará enormemente la investigación en electrofisiología.

Empleando estos nuevos métodos, Hodgkin, Huxley y Katz, en una brillante serie de experimentos, extendieron y desarrollaron magistralmente los trabajos de Bernstein.

Goldman (20) en 1944 y posteriormente Hodgkin y Katz en 1949 derivan la ecuación moderna del potencial transmembrana, basada en las concentraciones de los tres iones fisiológicos principales (21):

R, T y F ya han sido definidos; PK, PCl y PNa representan la permeabilidad de la membrana a los respectivos iones y los símbolos entre corchetes representan sus concentraciones extra- e intracelulares. Es la famosa ecuación de Goldman de potencial transmembrana de las células en general y del músculo y nervio en reposo de los textos de

fisiología. Cuando la membrana neuronal o muscular está en reposo predomina la permeabilidad al potasio y esta ecuación se equipara a la de Nernst.

Una vez establecido el mecanismo de generación del potencial de membrana en reposo, Hodgkin y Katz desarrollaron un método, la llamada pinza de voltaje o mejor, fijación de voltaje, que les permitió descomponer el impulso nervioso en sus dos componentes: una corriente inicial hacia el interior del nervio de iones sodio, que produce la despolarización e inversión del potencial transmembrana (observado y desechado por Bernstein) y una salida posterior de potasio que restituye el potencial de membrana a su valor de reposo (22-26).

En forma muy sucinta se puede describir la pinza de voltaje como un procedimiento mediante el cual se inyectan cantidades controladas de corriente a la preparación con el fin de mantener el potencial transmembrana a un valor constante a pesar de los cambios de permeabilidad que ocurran durante el pasaje del impulso nervioso. Si se mantiene el potencial en valores determinados se puede conocer que iones portan la corriente. Así se determinó que el sodio es responsable del período inicial de despolarización y el potasio de la repolarización posterior. Keynes y Aidley resumen magistralmente los hallazgos modernos (27).

Regulación anisomótica extracelular y el transporte transepitelial

En una corta autobiografía publicada en el *Annual Review of Physiology* de 1980 (28), el profesor Hans Ussing (Figura 16) hace el siguiente relato:

El 18° Congreso Internacional de Fisiología estaba programado para el año 1950. Entre las conferencias introductorias habían tres dedicadas a movimientos iónicos a través de membranas. Los conferencistas eran Conway, Hodgkin y yo mismo —cuenta Ussing—. Claro está que me sentía muy satisfecho por haber recibido esta distinción pero a la vez estaba preocupado. ... Pensé que necesitaría algún hallazgo notable que justificara mi lugar en el programa. Revisé mi lista de futuros proyectos y me

$$E = (RT/F) \ln \left(\frac{P_K [K^+] + P_{Cl} [Cl^-] + P_{Na} [Na^+]}{P_K [K^+] + P_{Cl} [Cl^-] + P_{Na} [Na^+]} \right)$$

decidí por el de la corriente de corto circuito. El tiempo apremiaba ... y tuve la fortuna de convencer al Dr. Karl Zerahn de la importancia de mi proyecto. En menos de una hora decidió incorporarse a él. Zerahn en una semana montó el circuito; yo me ocupé del soplado de vidrio...y diseñamos la cámara experimental. Al cabo de una semana obtuvimos los primeros resultados. Demostramos que la corriente eléctrica que fluye a través de una preparación de piel de rana equivale al flujo neto de sodio a través de ella. Demostramos que el transporte activo de sodio es responsable de la asimetría eléctrica de la piel. En dos semanas tuvimos resultados suficientes que justificaran una publicación.

El autor tuvo la suerte de conocer al Dr. Zerahn y los hechos ocurrieron de la siguiente manera: en el año 1966 asistimos por primera vez a un congreso internacional en Europa, el segundo Congreso Internacional de Biofísica en Viena. Estábamos sentados en un salón de clases en la Universidad de Viena, muy nervioso por nuestra poca destreza para las presentaciones públicas. Varios asientos más allá vemos a un señor de aspecto venerable, de profesor europeo, que también parecía muy nervioso. Le preguntamos que si él tenía temor de hablar en público y nos contestó que sí, mucho. Entonces le dijimos que su susto no podía ser mayor que el nuestro porque era nuestro primer congreso de esa magnitud y que además nos tocaba presentar mi trabajo, sobre un aspecto muy elemental de la corriente de corto circuito, inmediatamente después de la conferencia de uno de sus descubridores, el Profesor Zerahn. El venerable señor nos contestó:

–Precisamente yo soy Zerahn y sé como se siente, a mi siempre me ha dado terror hablar en público.-

El profesor Zerahn, gentilísima persona, nos invitó a cenar varias veces a su casa en Copenhague. Siempre nos acordamos de él cuando vemos el comportamiento engreído de individuos muy por debajo de su talla científica y humana. Vaya nuestro agradecimiento al profesor Zerahn.

Ussing y Zerahn fueron los iniciadores de todo un campo de investigación que ha revolucionado el estudio de la homeostasis y ha permitido dilucidar los mecanismos bioelectroquímicos de la absorción y secreción de electrolitos y agua. Es la base de la fisiología renal y gastrointestinal en el hombre, de la regulación del medio interno, de la conservación de la constancia de su composición a pesar del paso a través de él de diversos solutos y agua.

Regulación anisomótica extracelular

En muchas especies de hábitat acuático existe una diferencia de composición y osmolalidad entre el medio extracelular y el medio exterior. La composición y concentración de este último puede ser variable. El mantenimiento de la composición y concentración del medio extracelular dentro de límites más o menos estrechos, en estas circunstancias, se denomina regulación anisomótica extracelular.

El grado de control del medio extracelular (aproximadamente equivalente al medio interno de Claude Bernard) es variable. Puede ser muy estricto en los mamíferos. La osmolalidad plasmática está regulada a valores entre 280-295 mOsm/kg H₂O de agua en el humano a pesar de variaciones en la ingesta de agua y sales. Puede ser algo más laxo en peces estuarinos, normalmente expuestos a amplios cambios de salinidad, en los que la osmolalidad de los medios extracelulares puede variar pero entre límites relativamente estrechos. Estos son animales llamados homeosmóticos. Otros animales, como ciertos invertebrados estuarinos no regulan la osmolalidad de los medios extracelular e intracelular, sino que ajustan las osmolalidades de estos medios a la osmolalidad del medio externo. Son los animales poikilosmóticos.

Como ejemplo de un pez estuarino, que exhibe un grado importante de homeosmoticidad, hemos estudiado la mojarra de la Laguna de Tacarigua, el *Eugerres plumieri* (29). Este animal tolera cambios de salinidad desde 6 % hasta 85 % de la concentración del agua de mar. Como se observa en la figura (Figura 7), la osmolalidad del suero varió linealmente entre $323 \pm 2,78$ mOsm/kg H₂O (media \pm error estándar) en peces expuestos a agua de mar de 6% (60 mOsm/ kg H₂O) hasta $368 \pm 6,11$ mOsm/kg H₂O en agua de mar de 85 % (850 mOsm/ kg H₂O). Asimismo, la osmolalidad del humor acuoso aumentó desde $318 \pm 4,39$ mOsm/ kg H₂O hasta $346 \pm 6,27$ mOsm/ kg H₂O entre estas mismas concentraciones de agua de mar, un incremento de 14 % y 9 % en la osmolalidad del suero y humor acuoso, respectivamente, cuando el incremento de concentración del agua de mar ha sido de 1 400 %. De modo que aunque la osmolalidad de ambos medios no permaneció absolutamente invariable, su regulación en esta especie es bastante eficiente. La tasa de incremento del humor acuoso fue significativamente menor que la del suero ($F=179,58$, $P< 0,001$). Esto indica que el pez, mediante la acción del cuerpo

ciliar ejerce un control más estricto sobre la concentración del humor acuoso que sobre la del suero. Por tanto se puede concluir que la osmolalidad del suero sanguíneo y la del humor acuoso están bastante bien reguladas. Este es un buen ejemplo de la regulación anisomótica extracelular. El humor acuoso puede considerarse estrechamente relacionado al líquido cefalorraquídeo. La retina y sistema nervioso del pez, por estar encerrados en estructuras inextensibles tienen que ser protegidos de variaciones marcadas de la concentración del agua de mar para evitar variaciones importantes del volumen de su componente celular por hinchamiento osmótico de sus células constituyentes (29).

El tracto intestinal, riñón o los órganos que ejercen una función análoga como las branquias en peces, crustáceos y moluscos, y la piel y vejiga urinaria de anfibios representan importantes sistemas involucrados en la regulación anisomótica extracelular.

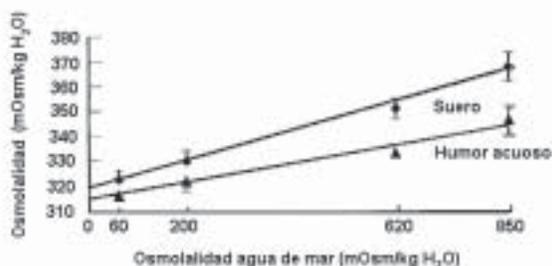


Figura 7. Variación de la osmolalidad del humor acuoso y suero del pez estuarino *Eugerres plumieri*. Redibujado de (29).

Características bioeléctricas de los epitelios polares

El método de Ussing y Zerahn (30) se ha aplicado al estudio experimental de innumerables epitelios involucrados en el transporte de electrolitos entre diferentes compartimientos del organismo animal y entre este y el exterior tales como los epitelios del tracto gastrointestinal, túbulo renal, piel y vejiga urinaria de anfibios, vesícula biliar y bronquial entre muchos más. Muchos de estos epitelios exhiben propiedades bioeléctricas: diferencia de potencial eléctrico y corriente eléctrica transepiteliales. Son de los llamados epitelios polares.

La piel de anfibios genera una diferencia de potencial de 50-100 mV entre sus dos caras, siendo

la interior positiva con respecto a la exterior. Para estudiar el origen y propiedades de este potencial, Ussing y Zerahn idearon la preparación en corto circuito. El procedimiento es muy similar al empleado por Huxley y Hodgkin, en el sentido de que mide un flujo iónico a un voltaje determinado lo cual permite medir su magnitud y las fuerzas que lo mueven y así determinar si requiere energía metabólica o es un fenómeno pasivo. La diferencia con la pinza de voltaje de Hodgkin y Huxley radica en que ésta estudia cambios de voltaje muy rápidos mientras que el procedimiento de corto circuito estudia corrientes cuyas variaciones son muy lentas y pueden seguirse con instrumentos muy sencillos: galvanómetro de d'Arsonval y potenciómetro de Poggendorff.

En nuestro laboratorio se han realizado muchas experiencias con este tipo de instrumentación, lo cual no quiere decir que el instrumental electrónico moderno no tenga su utilidad como en la medición de la conductancia instantánea de la preparación, en cuyo caso se requieren pulsos eléctricos de muy corta duración para no alterar la composición iónica de las células.

El procedimiento de corto circuito ha permitido determinar el origen electroquímico de la diferencia de potencial eléctrico que generan entre su superficie externa e interna un grupo de epitelios, los denominados epitelios polarizados o asimétricos. Estos epitelios no sólo manifiestan una polarización eléctrica sino anatómica, metabólica y funcional. La permeabilidad iónica de su cara externa difiere de la interna y los transportadores de iones y moléculas orgánicas son diferentes en las dos superficies. Otras células, como los leucocitos, fibras musculares y las células del tejido conjuntivo no muestran esta polaridad, las propiedades de su membrana son homogéneas en toda su superficie.

Ussing y col. sugirieron la idea de que la diferencia de potencial eléctrico que se podía detectar entre las dos caras de la piel de los anfibios, la rana específicamente, era muy posiblemente la consecuencia del transporte, hacia el interior del animal, de cargas eléctricas positivas representadas por iones sodio. Esta diferencia de potencial alcanza un valor de 50-100 mV en la piel de rana de modo que si disponemos 6000 pieles de rana, una a continuación de la otra, podríamos teóricamente obtener una diferencia de potencial de 600 V, igual a la que genera el temblador.

En 1951 Ussing y Zerahn (30) demostraron,

mediante la técnica de corto circuito, que la magnitud de la corriente eléctrica que se debía inyectar a la preparación para abolir la diferencia de potencial eléctrico entre sus dos caras era equivalente al flujo neto de iones sodio o sea la cantidad de iones sodio transportados desde el exterior del animal hacia el interior por unidad de tiempo. Dichos iones sodio son transportados mediante un proceso que requiere consumo de energía metabólica ya que no existen fuerzas físicoquímicas tales como diferencia de concentración o potencial eléctrico que impulse los iones, ni diferencia de presión hidrostática que impulse solución fisiológica, a través de la piel. Ese transporte, que requiere energía metabólica para llevarse a cabo, se denomina transporte activo.

En el año de 1960, el Dr. Peter Curran, quien trabajó bajo la dirección del Profesor Ussing, regresó al laboratorio de Biofísica de la Universidad de Harvard donde realizábamos una pasantía como *Fellow* en Fisiología. El Dr. Curran introdujo el método de la corriente de corto circuito en el laboratorio. Era un método sencillo de fácil aplicación y gran ventaja para nosotros, se podía realizar con instrumental muy accesible en un país subdesarrollado.

La Figura 8 muestra el diagrama del dispositivo experimental para determinar la corriente de corto circuito. Se dispone la piel como un diafragma entre dos mitades de una cámara de plástico provista de electrodos reversibles apropiados. Ambas mitades de la cámara se llenan con solución fisiológica. Dos electrodos se conectan a un galvanómetro tipo d'Arsonval en serie con un potenciómetro de Poggendorff para determinar, por oposición y de acuerdo al método de du Bois-Reymond, el voltaje de la preparación. Otros dos electrodos conectan la piel a una fuente de corriente controlada mediante la cual se inyecta corriente a la preparación. La corriente requerida para anular la desviación del galvanómetro, la corriente de corto circuito, equivale, bajo estas condiciones, al transporte neto de sodio a través de la piel. Esta preparación ha sido muy fructífera y ha sido la base de muchos otros dispositivos mediante los cuales se ha medido el transporte iónico en el tracto intestinal, córnea y hasta los túbulos renales.

La Figura 9a muestra una analogía eléctrica de la piel. El mecanismo responsable del transporte activo de iones sodio, cargados positivamente, hacia el lado interno de la preparación está representado por una pila eléctrica, polo positivo dirigido hacia el

interior, cuya fuerza electromotriz se representa por E_{Na} . La resistencia que deben vencer los iones sodio en su paso a través del mecanismo de transporte activo se representa por la resistencia R_{Na} . En paralelo con esta rama activa, puede imaginarse una vía de baja resistencia, R_{an} , que constituye la vía de paso de los aniones, fundamentalmente cloruro, que acompañan al sodio, arrastrados pasivamente por las cargas positivas de éste.

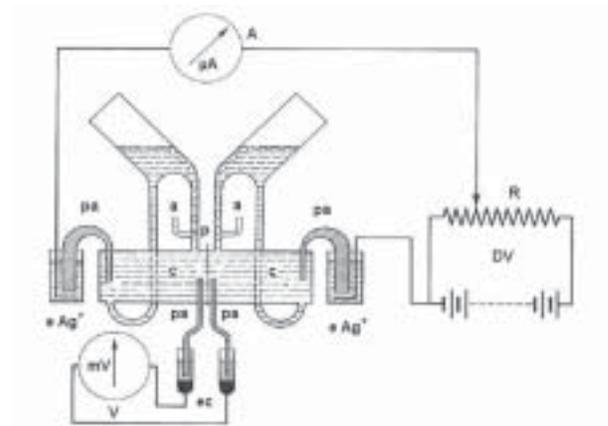


Figura 8. Dispositivo experimental de Ussing y Zerahn para estudiar la corriente de corto circuito en la piel de rana. La piel, p, separa dos cámaras c llenas de solución fisiológica. Dos puentes de agar, pa, conectan cámaras a electrodos de Ag^+-AgCl conectados a un amperímetro, A, y a un divisor de voltaje, DV. Otros dos puentes de agar, pa, conectan las cámaras a electrodos de calomel, ec, conectados a su vez a un voltímetro, V. La corriente requerida para anular el voltaje, de la preparación, leída en el amperímetro A, se denomina corriente de corto circuito y equivale al transporte activo neto de sodio a través del epitelio. Modificado de (30).

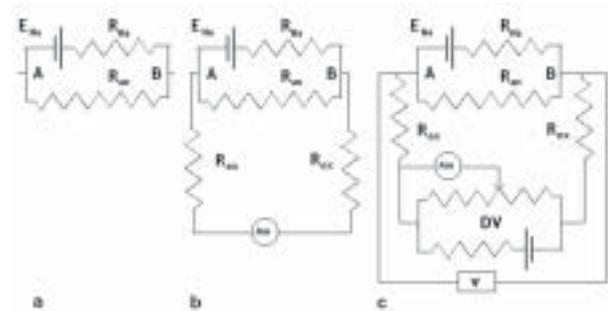


Figura 9. Analogías eléctricas del epitelio de la piel de rana. a) circuito abierto; b) conectado directamente a un amperímetro; c) en corto circuito. Modificado de (31).

La medición de la diferencia de potencial entre ambas caras de la piel se realiza aplicando electrodos apropiados a los puntos A y B, donde se unen las ramas activas (vía de sodio) y pasiva (vía de cloruro) de la preparación, de manera que el flujo activo de sodio hacia el interior se puede representar como una corriente positiva de izquierda a derecha en la rama superior del circuito. Éste es completado por un movimiento de cargas negativas, los aniones que acompañan al sodio, que constituirían una corriente eléctrica positiva de derecha a izquierda, cerrando el circuito.

Si, como se representa en la Figura 9b, se intenta medir la corriente que fluye a través de la rama activa, conectando, mediante electrodos apropiados, a los puntos A y B un amperímetro, que no es sino un galvanómetro que además de detectar el flujo de corriente está calibrado de modo de mostrar la magnitud de ésta en amperios, sólo una pequeña fracción de la corriente fluirá a través del circuito de medición (amperímetro y electrodos) por su resistencia relativamente alta, R_{ex} . La mayor parte de la corriente retornará, como corriente eléctrica de derecha a izquierda, representada por flujo de aniones que acompañan el movimiento de sodio de izquierda a derecha a través de la vía aniónica, cuya resistencia interna, R_{an} , es mucho menor que la del circuito externo. De manera que la corriente registrada por el amperímetro será una fracción muy pequeña y desconocida de la corriente de sodio que fluye por la vía activa ya que depende de las magnitudes desconocidas de R_{an} y R_{ex} .

La técnica del corto circuito elimina este problema. Si, como se muestra en la Figura 9c, se reduce a cero la diferencia de potencial entre los puntos A y B, medida en el voltímetro V, mediante la aplicación de un voltaje igual y contrario, obtenido de un circuito similar al potenciómetro de Pogendorff, DV, no fluirá corriente a través de la vía pasiva (por haberse abolido la diferencia de potencial que la impulsaba) de manera que toda la corriente que fluye por la vía activa fluye ahora por la vía externa, es registrada por el amperímetro, y será exactamente igual a la portada por los iones sodio transportados activamente a través de la preparación.

La persistencia del flujo de sodio a través de la preparación en estas condiciones, en las cuales se han abolido las fuerzas capaces de impulsar iones pasivamente: como son las diferencias de potencial eléctrico, de concentración y de presión hidrostática, indica que el ion sodio es transportado por un proceso

independiente de estas fuerzas y que es, por tanto, un proceso activo y como tal requiere energía derivada de la actividad metabólica celular como se ha demostrado por estudios bioquímicos (31).

Hoy en día se atribuye a una ATPasa Na^+/K^+ , que al hidrolizar el ATP, convierte la energía química almacenada en este compuesto en trabajo electroquímico, el transporte activo de sodio en contra de fuerzas eléctricas y de concentración. Esta ATPasa fue descrita por Skou (32,33) muy posteriormente a los trabajos de Ussing y Zerahn (30) quienes predijeron su existencia basándose en sus trabajos con la técnica de corto circuito.

Una vez establecido que la corriente de corto circuito de la piel de rana representaba el transporte neto activo de sodio, esta preparación comenzó a emplearse como método experimental en fisiología y farmacología.

Estudio fisiológico y farmacológico de los epitelios polares

Entre los primeros fenómenos estudiados estuvo la regulación del transporte iónico transepitelial ejercida por iones divalentes y la hormona antidiurética (34). Estos agentes ejercen acciones opuestas sobre el transporte transepitelial de sodio en la piel de rana (*Rana pipiens*): el calcio lo disminuye y la hormona antidiurética lo incrementa. A pesar de que ambos agentes ejercen acciones antagónicas sobre el transporte y que actúan a nivel de la misma barrera al movimiento de sodio en la piel de rana, parecen tener receptores diferentes en dicha barrera.

Experimentos posteriores (35) demostraron que el calcio disminuye y la hormona antidiurética incrementa la permeabilidad al sodio de las membranas de la superficie externa del epitelio sin afectar el mecanismo de transporte activo de sodio propiamente (Figura 10).

Se observó, asimismo, que la tasa de transporte de sodio a través de la preparación muestra cinética de saturación: su tasa de incremento va declinando a medida que se aumenta la concentración externa de sodio. En otras palabras, el proceso tiende a saturarse a medida que aumenta la concentración de este ion en la solución externa. Este efecto sugiere que el sodio no atraviesa esta barrera por difusión simple sino que existe una interacción del ion con la membrana (36) y exhibe una cinética tipo Michaelis y Menten (37). Estos experimentos indican que la

permeabilidad al sodio de las membranas de la superficie externa del epitelio regula el transporte de este ion. Estos experimentos sentaron las bases para estudios posteriores de la acción de la hormona antidiurética sobre la absorción de agua y iones en el túbulo renal.

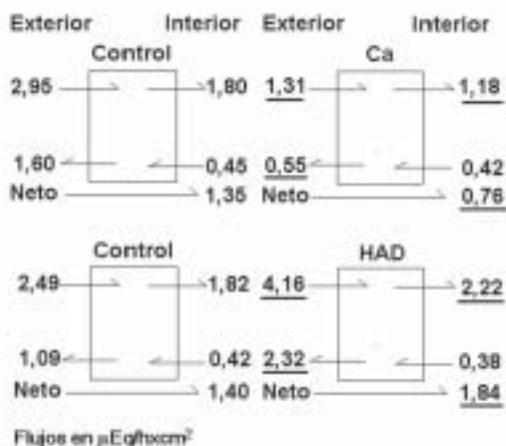


Figura 10. Inhibición por calcio y estimulación por hormona antidiurética del transporte de sodio en el epitelio cutáneo de *Rana pipiens*. Redibujado de (35).

Dada la complejidad del epitelio cutáneo de la rana, se ensayaron experimentos sobre el transporte de sodio en otros epitelios aparentemente más simples. El epitelio luminal o urinario de la vejiga urinaria del sapo (38) consiste esencialmente en una sola capa de células donde coexisten diversos tipos de células, de modo que no es tan sencillo como se suponía. No obstante, ha sido muy útil como preparación fisiológica y farmacológica. La vejiga urinaria es capaz de reabsorber agua y sodio a partir de la orina almacenada en la vejiga urinaria en casos de

escasez de agua y sales en el medio ambiente (39).

Dada la complejidad del epitelio cutáneo de la rana, se ensayaron experimentos sobre el transporte de sodio en otros epitelios que parecían más simples pero que posteriormente se ha encontrado que no lo son tanto. Uno de estos epitelios es el de la vejiga urinaria de anfibios (38). Estos animales son capaces de reabsorber agua y sodio a partir de la orina almacenada en la vejiga urinaria en casos de escasez de agua y sales en el medio ambiente (39).

Dado que la hormona antidiurética es un polipéptido relativamente complejo sugirió que otras hormonas polipeptídicas podrían ejercer algún efecto sobre el transporte transepitelial de sodio. Zierler en 1959 (40, 41) había observado que la insulina producía un incremento del potencial eléctrico transmembrana en músculo de rata en soluciones fisiológicas libres de glucosa. Se ensayó el efecto de la insulina sobre la corriente de corto circuito en la piel de la rana (*Rana pipiens*) y se observó que la hormona estimulaba la corriente en ausencia de glucosa en las soluciones fisiológicas (42). Esto sugiere que estos efectos de la insulina sobre las propiedades bioeléctricas y el transporte de sodio en estos tejidos son independientes de la incorporación de glucosa y sugerían que no dependían de un incremento del metabolismo glucosado sino que podrían representar un efecto directo de la hormona sobre el transporte de sodio.

En 1965 (43) realizamos experimentos en los que se determinaron los movimientos unidireccionales de sodio a través del epitelio de la vejiga urinaria de sapo. Los resultados indicaron que la hormona estimulaba directamente el transporte activo de sodio desde el citoplasma hacia el lado hemático del epitelio (Cuadro 1).

Cuadro 1

Efecto de la insulina sobre el sodio intercambiable intraepitelial y las tasas de recambio de sodio entre el epitelio y los medios urinario y seroso

	Sodio intercambiable intraepitelial $\text{mEq}/3,14 \text{ cm}^2$		k_{12} $\text{h}^{-1} \times 10^2$		k_{21} h^{-1}		k_{23} h^{-1}	
	CO	IN	CO	IN	CO	IN	CO	IN
Media	1,52	1,06	6,3	5,1	9,0	9,4	2,9	5,4
Efecto insulina \pm SEM	0,43 \pm 0,26		1,2 \pm 1,1		0,31 \pm 1,2		2,5 \pm 0,7	
P	>0,10		>0,30		>0,80		<0,01	

k_{12} : coeficiente de recambio entre lado urinario y célula

k_{21} : coeficiente de recambio entre célula y lado urinario

k_{23} : coeficiente de recambio entre célula y lado seroso

El movimiento de sodio a través del epitelio es de naturaleza activa ya que tiene lugar en contra de una diferencia de concentración (la concentración de sodio intracelular es menor que la concentración en la solución que baña el lado seroso de la preparación) y en contra de una diferencia de potencial (el potencial eléctrico intracelular es menos positivo que el del medio seroso). Estos resultados sugirieron que, como lo habían predicho Koefoed-Johnsen y Ussing en 1958 (44), basándose en razonamientos similares, el mecanismo que transportaba el sodio en contra del potencial electroquímico (diferencia de potencial y de concentración) y que por tanto era de naturaleza activa (consumía energía metabólica), residía en la membrana profunda, opuesta a la barrera superficial, del epitelio.

Estos autores han propuesto un modelo para explicar el transporte transepitelial de sodio, cloruro y agua a través de epitelios polares (Figura 11). El mecanismo de transporte activo de iones se supone localizado a nivel de la membrana interna de las células epiteliales. Esta bomba iónica expulsa sodio de las células hacia el lado hemático del epitelio e introduce potasio desde el lado hemático hacia las células y sería responsable de mantener invariables las concentraciones intracelulares de sodio y potasio a pesar de que la primera es mucho menor y la segunda mucho mayor que las correspondientes concentraciones extracelulares. El intercambio de sodio por potasio a nivel de la bomba es, según este modelo, 1:1; por tanto no generaría un transporte neto de carga y no contribuiría a la generación de diferencia de potencial transmembrana. Esto no es estrictamente cierto (45) ya que pueden haber transportes de $3\text{Na}^+ / 2\text{K}^+$ y, como veremos más adelante, $2\text{Na}^+ / 1\text{K}^+$ que sí pueden contribuir a la diferencia de potencial transepitelial. La superficie interna del epitelio es altamente permeable a potasio y prácticamente impermeable al sodio el cual atravesaría esta membrana exclusivamente a través del mecanismo de transporte activo. La superficie externa del epitelio es altamente permeable a sodio pero no lo es al potasio. La difusión de sodio hacia el interior celular genera una diferencia de potencial de modo que el interior de la membrana celular es positivo con respecto al exterior. La difusión de potasio a través de la barrera interna del epitelio igualmente genera una diferencia de potencial resultando en que el lado hemático de la membrana interna es positivo con respecto al citoplasma. La suma de los dos potenciales eléctricos resultan en la diferencia de potencial eléctrico transepitelial. Estos

potenciales se ajustan bastante bien a la ecuación de Nernst. El resultado final es el transporte de sodio desde el medio exterior hacia el interior en dos pasos, uno pasivo en la barrera externa y otro activo en la barrera externa, al mismo tiempo que la bomba mantiene constantes las concentraciones intracelulares de sodio y potasio.

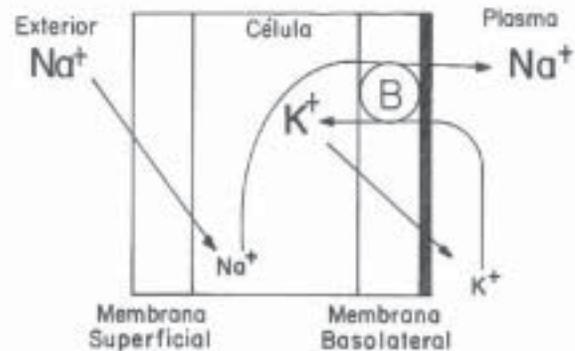


Figura 11. Modelo de célula epitelial de Koefoed-Johnsen y Ussing. Redibujado de (44).

El problema que quedaba por resolver era localizar experimentalmente el mecanismo de transporte activo de sodio en el epitelio y comprobar si, como propusieron Koefoed-Johnsen y Ussing, residía en la membrana basal de las células epiteliales.

Desde los trabajos de Schatzmann (46) y Glynn (47), se ha demostrado repetidamente que los digitálicos o glicósidos cardiactivos inhiben el transporte activo en muchos tipos de células animales (48-51). De acuerdo con el modelo de Koefoed-Johnsen y Ussing (44), esta inhibición acarrearía tanto una disminución del transporte iónico transepitelial como un incremento de la concentración de sodio y una caída de la del potasio en las células de los epitelios transportadores.

Como el epitelio luminal o urinario de la vejiga urinaria del sapo consiste esencialmente en una sola capa de células, el transporte de sodio a través de la pared vesical puede resolverse en dos componentes: la entrada de sodio desde la solución intravesical a las células epiteliales y la expulsión de sodio desde las células hacia la solución en contacto con el lado seroso. Al determinarse por separado los flujos unidireccionales a través de las superficies urinaria

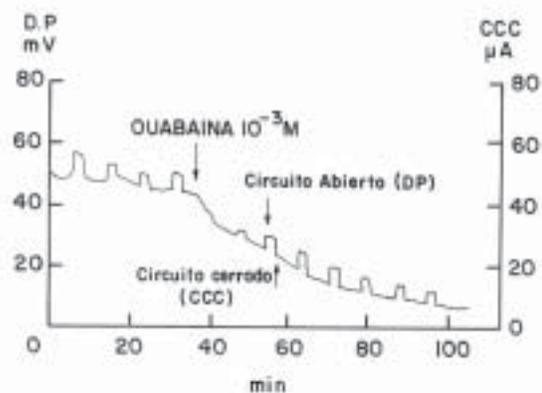
y hemática del epitelio, se demostró que la ouabaína, un glicósido cardiactivo, sólo inhibía el flujo de sodio desde las células hacia el medio seroso a través de la superficie hemática (Cuadro 2). De modo que el mecanismo de transporte activo de sodio quedaba localizado a nivel de la membrana profunda del epitelio vesical. Es interesante recalcar que la ouabaína no influía sobre los movimientos de cloruro que se consideraban pasivos (52).

La inhibición del transporte activo de sodio por la ouabaína se manifestó, como era de esperarse, como una reducción de la corriente de corto circuito y el voltaje transepitelial (Figura 12). Concomitantemente se observó que la inhibición del transporte de sodio está asociada a un incremento de la concentración de sodio y a una disminución de la de potasio de las células (53).

De esta manera se comprobó experimentalmente la predicción teórica de Koefoed-Johnsen y Ussing en 1958 (44) y corroboraba la sugerencia hecha por nosotros de que la insulina estimulaba el transporte de sodio incrementando directamente la actividad del mecanismo de transporte activo de sodio, denominado la bomba de sodio, que se presumía localizado a nivel de la membrana profunda del epitelio vesical (43).

El transporte activo de sodio desde el medio externo hacia el interior del animal a través del epitelio cutáneo y desde la luz de la vejiga urinaria hacia el lado hemático del epitelio vesical induce un movimiento de cloruro en el mismo sentido en virtud

de la positividad que se genera del lado interno del epitelio. En consecuencia ocurre un movimiento neto de cloruro de sodio hacia el medio interno del animal acompañado de un movimiento osmótico de agua. Este proceso repara las pérdidas hidrosalinas que ocurren en los anfibios en caso de escasez de agua y sales en el medio ambiente ya que carecen de asa de Henle y están obligados a excretar una orina cuya concentración no puede sobrepasar sensiblemente la del plasma sanguíneo.



Figuras 12. Efecto de la ouabaína sobre la corriente de corto circuito y la diferencia de potencial generadas por el epitelio de la vejiga urinaria de *Bufo marinus*. Modificado de (52).

Cuadro 2

Efecto de la ouabaína sobre los movimientos de sodio a través del epitelio de la vejiga urinaria
Flujo neto transepitelial y flujos unidireccionales a través de las barreras superficial y profunda del epitelio

	Flujo transepitelial				Flujos unidireccionales					
	φ_{neto}		φ_{12}		φ_{21}		φ_{23}			
	CO	OU	CO	OU	CO	OU	CO	OU	CO	OU
Media	16,7	5,9	40,3	49,9	23,8	43,8	21,5	10,0		
Efecto±ESM	10,8±1,5		9,6±6,0		20±6,5		11,5±1,2			
P	<0,001		> 0,10		0,015		<0,001			

φ neto: flujo de urinario a seroso
 φ_{12} : flujo de urinario a epitelio
 φ_{21} : flujo de epitelio a urinario
 φ_{23} : flujo de epitelio a seroso
 CO: control
 OU: ouabaína
 Flujos en mEq/hx100 mg peso seco

Para facilitar la acumulación de cloruro de sodio en el medio interno es necesario que la permeabilidad del epitelio al cloruro sea alta para los movimientos de fuera hacia adentro pero baja en el sentido opuesto, ya que de no ser así el cloruro acumulado se regresaría y tendería a atraer de nuevo al sodio hacia el exterior y disminuir la eficiencia del sistema de transporte. En efecto, hemos observado (54) que cuando existe una alta concentración de cloruro en el medio exterior, la permeabilidad de la membrana epitelial de la piel del sapo permite un elevado flujo de cloruro hacia el lado hemático. Pero cuando la concentración externa de cloruro es baja la permeabilidad al cloruro es baja, lo cual impide la pérdida de cloruro de sodio hacia el medio externo pobre en cloruro de sodio. Esta es la situación normal de anfibios como las ranas que pasan un tiempo prolongado en presencia de agua dulce, y de los sapos cuando tienen la oportunidad de reponer sus pérdidas hidrosalinas en algún charco transitorio generado por la lluvia.

Cade en 1949 (55) introdujo el empleo del litio como agente terapéutico en el tratamiento de la manía. La popularización de su empleo en la enfermedad bipolar condujo a la observación de fenómenos tóxicos, algunos de ellos relacionados con el metabolismo hidrosalino (diabetes insípida nefrogénica) (56,57) así como del metabolismo del calcio (58). En 1904 Galeotti (59) observó que este ion exhibía propiedades fisiológicas comunes con las del sodio: la piel de anfibios generaba una diferencia de potencial entre sus superficies externa e interna cuando era expuesta a soluciones que contenían litio. En 1955 Zerahn demostró que la piel de rana era capaz de transportar litio desde su lado exterior hacia el interior (60).

En 1971 decidimos explorar más en profundidad el problema del transporte de litio dado los problemas

farmacológicos que planteaba su empleo en psiquiatría (61). Se expusieron vejigas urinarias a soluciones fisiológicas en las cuales se había reemplazado el sodio por litio. Las vejigas podían mantener sólo temporalmente, unos 20-30 minutos, una diferencia de potencial y una corriente de corto circuito. Ambas propiedades bioeléctricas eran inhibidas por la ouabaína. No obstante su corta duración, el flujo de litio representaba más del 80 % de la corriente de corto circuito (Cuadro 3). Esto sugería cierta analogía con el transporte de sodio.

Con el fin de investigar si existían otras analogías entre el transporte de sodio y el de litio en este epitelio, se decidió ensayar el efecto de la amilorida, un diurético que bloquea el paso de sodio a través de la barrera superficial (sea externa en la piel o urinaria en el caso de los túbulos renales o la vejiga urinaria de sapo) de los epitelios e inhibe específicamente el transporte de dicho ion (62). Tal como lo hace con el transporte de sodio, la amilorida bloquea completamente el transporte de litio a través de este epitelio (Cuadro 4). Estos resultados sugieren que ambos iones comparten, al menos parcialmente, el mismo sistema de transporte. Esto parece ser corroborado porque se ha observado que, en la vejiga urinaria, la corriente de corto circuito es parcialmente inhibida por la previa exposición de la superficie externa del epitelio al litio. El ion parece acumularse dentro del epitelio. La inhibición es reversible y la recuperación del transporte activo parece ser acelerado por la hormona antidiurética y la anfotericina, agentes que facilitan la entrada del sodio al epitelio. El efecto deletéreo del litio sobre el transporte activo puede deberse a que este ion, una vez atrapado en el interior celular, cierra los canales de sodio de la membrana apical del epitelio (63).

Cuadro 3

Efecto de 10-3 molar ouabaína sobre el transporte neto de litio y corriente de corto circuito a través del epitelio vesical de Bufo marinus
Flujos en mEq/hxg peso seco

	Acumulación iónica neta medida como corriente de corto circuito		Acumulación neta de litio medida por fotometría de llama	
	Control	Ouabaína	Control	Ouabaína
Media	135±12	79±7	113±14	69±12
Efecto±ESM		59±9		44±13
P		<0,01		<0,01

ASPECTOS BIOELECTROQUÍMICOS DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

Cuadro 4

Efecto de $1,3 \times 10^{-5}$ molar amilorida sobre el transporte neto de litio a través del epitelio vesical
 Vejigas expuestas a Ringer-litio del lado urinario y Ringer-colina del lado seroso
 Flujos en mEq/hxg peso seco

	Acumulación iónica neta medida como corriente de corto circuito		Acumulación neta de litio medida por fotometría de llama	
	Control	Amilorida	Control	Amilorida
Media	191±13	21±13	98±20	21±7
Efecto±ESM		169±14		77±22
P		<0,001		<0,01

No obstante, la situación no es tan sencilla. En 1983 Kirk y Dawson (64) propusieron que los efectos de estos dos agentes sobre el transporte de litio se debían a que el movimiento de litio a través de la barrera interna del epitelio tenía lugar a través de un intercambio sodio/litio: la bomba de sodio que reside en esta membrana expulsa sodio y mantiene el sodio intracelular bajo; el sodio seroso, impulsado por su gradiente electroquímico, tiende a regresar hacia las células a través de la membrana basolateral y lo hace a través de un sistema que reside en esta membrana que lo intercambia por litio intracelular. Obviamente, para mantener este intercambio es necesario mantener un sodio intracelular bajo y así favorecer el regreso de sodio a las células el cual impulsa la excreción del litio de éstas. Si se inhibe la bomba sodio/potasio con oubaína, el sodio intracelular aumenta y el litio no puede intercambiarse con sodio entrante. Lo que si permanece claro es que el sodio y el litio comparten la misma vía de entrada, sensible a la amilorida, de la membrana superficial del epitelio. De modo que el litio

no es transportado directamente por la bomba sodio/potasio de la membrana basolateral sino que su transporte es secundario a la expulsión del sodio intracelular por esta bomba.

Este intercambio sodio/litio es sólo uno de los innumerables ejemplos de transporte acoplado de especies químicas sean ambas inorgánicas, como el transporte sodio/litio, sean una orgánica y otra iónica, como los transportes acoplados sodio-glucosa y sodio-aminoácido del intestino y túbulo renal (12). Si los movimientos son en sentido opuesto, como el transporte sodio/potasio, se denominan contra-transporte y si son en el mismo sentido, como los sodio-glucosa y sodio-aminoácido, se denominan cotransporte (Figura 13).

Entre los agentes diuréticos más potentes se hallan los llamados diuréticos de asa. Estos compuestos bloquean la reabsorción del ultrafiltrado que emerge del túbulo proximal (donde se ha reabsorbido el 70 % del ultrafiltrado glomerular) a nivel de la porción gruesa de la rama ascendente del asa de Henle.

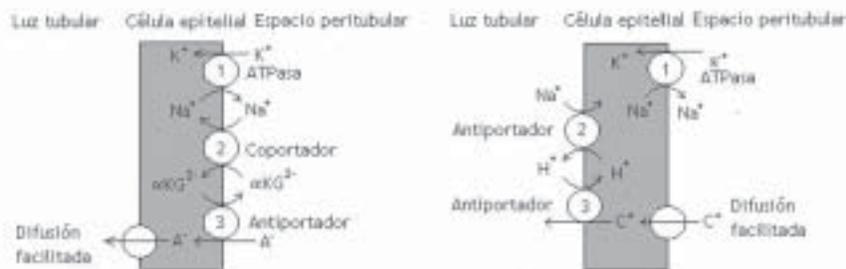


Figura 13. Transportador primario (1), ATPasa Na^+/K^+ impulsa los transportadores secundarios (2 y 3), de cationes y aniones orgánicos en el túbulo proximal. A la izquierda el transporte secundario de un anión orgánico y a la derecha el de un catión orgánico, hacia la luz del túbulo proximal. Redibujado de (65).

Entre los diuréticos de asa se encuentra el ácido etacrínico. El efecto diurético de este fármaco se atribuye a la inhibición del cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻ localizado en la membrana luminal de la porción gruesa de la rama ascendente del asa de Henle (65).

No obstante, este fármaco tiene efectos diferentes en tres preparaciones experimentales:

- a. En vejiga urinaria de *Bufo marinus* produce una inhibición del transporte activo de sodio concomitante con un aumento precoz de la resistencia eléctrica de la preparación (probablemente asociado al incremento de la resistencia de la rama activa del sistema de transporte de sodio por bloqueo de la bomba Na⁺/K⁺) seguido de un descenso marcado de la resistencia de la vía pasiva, pasados 90-120 minutos después de la acción del agente. Este descenso de la resistencia de la vía pasiva estaría asociado a un incremento del retorno pasivo del sodio hacia el lado urinario del epitelio. Los efectos sumados de la inhibición de la bomba y el incremento del retorno pasivo de sodio hacia el lado urinario, conducen a una marcada reducción de la eficiencia del proceso de reabsorción de sodio y resultan en un potente efecto diurético (66).
- b. En la piel de rana, a diferencia de la vejiga urinaria de *Bufo*, la inhibición de la corriente de corto circuito es precedida por una estimulación de una hora de duración (67).
- c. En la piel de sapo el ácido etacrínico causa un incremento de transporte activo de sodio. Se ha observado disminución de la resistencia total seguida de un incremento de la misma y un incremento de la permeabilidad a la vía pasiva para el sulfato (68) similar a la observada para el sodio en la vejiga urinaria de este animal (66); no obstante, el retorno pasivo de sodio no varía. La estimulación transitoria del transporte de sodio en estas condiciones resulta de un incremento de la captación de sodio a través de la membrana externa del epitelio similar al que produce la hormona antidiurética (35). No obstante, los dos agentes no parecen compartir los mismos receptores. La adición de ácido etacrínico a la solución externa produce un efecto instantáneo mientras la hormona antidiurética sólo actúa si se administra a la solución interna y exhibe una latencia de 20 minutos. Esto sugiere que deben ocurrir una serie de eventos intraepiteliales, iniciados en la barrera interna del epitelio, antes

de que se manifieste el incremento de la permeabilidad al sodio de la barrera externa. Este efecto del ácido etacrínico podría explicar su efecto antidiurético en la diabetes insípida nefrogénica (69,70), ya que posiblemente estimularía la reabsorción de sodio en segmentos del túbulo donde el transporte de sodio sea acompañado por reabsorción obligatoria de agua.

Cuadro 5

Concentración iónica intracelular en intestino y músculo de *Isostichopus badionotus*

	Sodio	Potasio	Cloruro
Intestino			
Proximal	246±37	240±22	223±48
Medio	296±50	252±24	302±48
Distal	565±89	121±26	231±57
Músculo			
	119±33	348±24	127±26

Concentración iónica en M/g de agua intracelular

Cada valor corresponde la media±ESM

Otro interesante fenómeno bioeléctrico explica la secreción de potasio por los diuréticos de asa. Estos últimos, al inhibir la reabsorción de sodio en los segmentos altos del nefrón, permiten el arribo de un líquido tubular rico en sodio a los túbulos colectores. La elevada concentración de sodio impulsa al ion hacia el interior celular lo cual resulta en un incremento de la negatividad eléctrica en la luz del túbulo colector. El potencial negativo luminal impulsa cloruro hacia el lado hemático del epitelio y atrae potasio hacia el lado luminal, la característica secreción de potasio que se observa en los diuréticos de asa. De modo que hay una importante relación entre el incremento del sodio luminal causado por los diuréticos de asa y la secreción de potasio que se observa durante la administración de estos fármacos (71).

La reabsorción de sodio y la secreción acoplada de potasio son reguladas por la aldosterona, un poderoso mineralocorticoide. Crabbé (72-75) estuvo entre los primeros investigadores que observó la acción de la aldosterona en el epitelio de la vejiga

urinaria de sapo. La hormona incrementa la reabsorción de sodio a través de este epitelio.

Tuvimos el gusto de conocer al Profesor Crabbé, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Louvain, en 1968. El se interesó por nuestros trabajos sobre el transporte de litio y las primeras palabras que nos dirigió cuando nos conoció fueron algo irónicas:

-¿Usted es de los que expresan el transporte iónico en mEq/h por 100 mg de peso seco?

Esto se debía a que en esa época habían quienes expresaban el transporte por unidad de área, cm² y otros por unidad de peso. Como era muy difícil determinar el área con precisión, por la variabilidad en el grado de distensión de la preparación, algunos preferimos el peso seco como referencia. De esta discusión nació una colaboración científica y una gran amistad que perduran hasta el presente.

El mecanismo de acción de la aldosterona fue muy controvertido al inicio de las investigaciones. El grupo de Edelman (76-78) consideraba que la hormona incrementaba el transporte de sodio por estimulación directa de la bomba de sodio. El grupo de Leaf consideraba que el incremento de transporte se debía primariamente a un incremento de la permeabilidad al sodio de la membrana apical de las células que resultaba en un aumento del sodio intracelular y un consecuente aumento de la oferta de sodio a la bomba (79-83).

El Profesor Leaf, de la Escuela de Medicina de Harvard, nos aconsejó y apoyó desinteresadamente en nuestros primeros trabajos de investigación.

Modernamente se considera que tanto el grupo de Edelman como el de Leaf tenían razón. Como consecuencia del aumento de transcripción genética, el esteroide aumenta la actividad tanto de los canales de la membrana apical como de la ATPasa sodio/potasio de la membrana basolateral (84,85).

Estos estudios electroquímico-farmacológicos condujeron al ingenuo concepto de que las especies químicas son movilizadas a través de la membrana sólo después de interactuar con receptores específicos. Así, la penetración de sodio a través de la membrana superficial del epitelio de la piel y la vejiga urinaria de anfibios, es interferida por agentes estimulantes como la hormona antidiurética o por agentes inhibitorios como el calcio, la amilorida, posiblemente el litio y el sodio mismo (34-36,61,63). Igualmente se observó que el transporte de sodio a través de la membrana profunda era afectada por

agentes inhibitorios específicos como la ouabaína (52).

El concepto de la existencia de receptores en la membrana no resultó tan ingenuo. Después de ser fertilizado por la genética y la biología molecular, este concepto ha dado origen a un enorme campo de investigación, el de los transportadores transmembrana específicos. En los últimos 20 años se han descrito centenares de familias de transportadores, en su mayoría de naturaleza proteica cuya estructura está determinada genéticamente, que empleando diversos mecanismos bioquímicos, físico-químicos y termodinámicos, como los gradientes electroquímicos y el metabolismo celular, son responsables del transporte de innumerables sustancias, sean fisiológicas o fármacos sintetizados artificialmente, a través de la membrana celular y de las membranas intracelulares (86).

Regulación del volumen celular. Regulación isosmótica intracelular

La distribución de Donnan y el volumen celular

A diferencia de las células epiteliales asimétricas que constituyen los epitelios polares responsables del transporte de especies químicas entre compartimientos del organismo o entre éste y el exterior, las células del organismo no involucradas en estos procesos son generalmente anatómica, funcional y eléctricamente simétricas.

Las células simétricas, así como lo hacen las asimétricas, deben regular su composición y volumen e isosmoticidad con el medio extracelular a pesar de la diferencia de composición entre éste y el citoplasma. En estas células también se generan fenómenos eléctricos consustanciales con el movimiento de electrolitos entre el interior y el exterior celular. El más evidente es el potencial eléctrico transmembrana, que se manifiesta entre las dos caras de la membrana celular que, como tiene la misma magnitud en toda la superficie celular, es indetectable en el medio extracelular. Aunque no tan perceptibles como las propiedades bioeléctricas de los epitelios, las manifestaciones bioeléctricas a nivel celular son determinantes para el movimiento de iones a través de la membrana celular y están íntimamente relacionadas con la regulación de la composición iónica del citoplasma.

Como consecuencia de la elevada permeabilidad de la membrana celular al agua, la osmolalidad o

concentración de partículas osmóticamente activas del líquido intracelular es igual a la del medio extracelular a pesar de la marcada diferencia en composición de ambos medios.

Las células contienen moléculas incapaces, por razones de tamaño o carga eléctrica, de franquear la membrana celular. Por otra parte, la actividad de la bomba iónica mantiene invariables las concentraciones intracelulares de sodio y potasio. Mediante el consumo de energía metabólica, la bomba transporta potasio al interior de las células, compensando su pérdida pasiva a través de la membrana. Al mismo tiempo expulsa el sodio que se tiende a acumular por su penetración pasiva desde el medio exterior. De esta manera la bomba sodio/potasio impide la pérdida neta de potasio y la acumulación de sodio en las células, a pesar de que la membrana celular es permeable a ambos. Estas propiedades de la membrana celular garantizan la constancia de la composición iónica del citoplasma mientras se mantenga activa la bomba sodio/potasio. Si ésta se detiene, la distribución de Donnan predice que agua y electrolitos extracelulares penetrarán a la célula a pesar de la isosmolalidad de los dos medios. El proceso involucrado en el mantenimiento de la isosmotividad a ambos lados de la membrana, aun en aquellos casos en que ocurran variaciones de la osmolalidad externa, ha sido denominado por Florkin regulación isosmótica intracelular (87).

Cuatro principios fundamentales determinan el volumen celular (88):

1. El equilibrio osmótico o termodinámico del agua a ambos lados de la membrana celular lo que implica ausencia de migración de agua a través de dicha membrana.
2. Los productos de las concentraciones de los cationes y aniones difusibles son iguales a ambos lados de la membrana celular. Esta igualdad de los productos es consecuencia de la existencia de iones indifusibles a uno o ambos lados de la membrana celular, distribución iónica descrita por el fisicoquímico inglés F. G. Donnan. Este concepto es sólo parcialmente aplicable a las células porque esta distribución genera un desequilibrio osmótico y es necesario realizar trabajo electroquímico para contrarrestar este desequilibrio.
3. Mantenimiento de idéntico número de cationes y aniones a cada lado de la membrana. Principio de electro-neutralidad.

4. La diferencia de presión hidrostática entre el interior y exterior de las células animales es despreciable debido a que sus membranas son fácilmente distensibles y no son capaces de resistir una diferencia de presión entre ambos medios.

Como se mencionó anteriormente, las condiciones 2 y 3 resultan en un desequilibrio osmótico que atrae iones difusibles y agua hacia el interior celular (Figura 14). Esta falta de equilibrio debe ser contrarrestada por la aplicación de una presión hidrostática al compartimiento donde residen los iones no difusibles o, como lo hacen las células, mediante el consumo de energía, mantienen constantes las concentraciones iónicas intracelulares

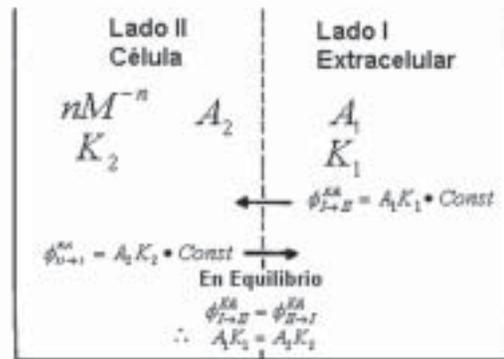


Figura 14. Generación del equilibrio de Donnan. En el compartimiento II existe un anión polivalente, M-n, incapaz de franquear la membrana que separa este compartimiento del compartimiento I. Concomitantemente existen aniones difusibles A y cationes difusibles K que por efecto de la carga eléctrica del anión indifusible y la condición de electroneutralidad se distribuyen de modo que la suma de carga eléctrica de aniones y cationes son iguales en ambos compartimientos y los productos de las concentraciones de aniones y cationes en el compartimiento II ($A_2 K_2$) es igual al producto de las concentraciones de aniones y cationes en el compartimiento I ($A_1 K_1$). Esta situación genera un desequilibrio osmótico, ya que se genera una distribución de solutos en la que la concentración final de solutos es mayor en el compartimiento II que en el compartimiento I. Por tanto para impedir la migración de solución de I hacia II es necesario aplicar una presión externa sobre la solución II, la presión osmótica.

al expeler el sodio que penetra a las células y reincorporar el potasio celular perdido, impulsados por sus gradientes electroquímicos. En todo caso, la presencia de iones indifusibles de uno o ambos lados de la membrana genera una distribución particular de los iones difusibles, la distribución de Donnan

La distribución de Donnan predice que la suma de las concentraciones intracelulares de sodio y potasio, $[Na^+]_i$ y $[K^+]_i$ respectivamente, multiplicada por la concentración intracelular de cloruro $[Cl^-]_i$ equivale al producto de la suma de concentraciones extracelulares de sodio y potasio, $[Na^+]_e$ y $[K^+]_e$ respectivamente, por la concentración extracelular de cloruro $[Cl^-]_e$:

$$([Na^+]_i + [K^+]_i)[Cl^-]_i = ([Na^+]_e + [K^+]_e)[Cl^-]_e$$

De esta expresión se puede deducir que la presión osmótica intracelular en términos de las concentraciones extracelulares:

$$\pi_i = RT \left([M^{-n}]_i + \sqrt{4([K^+]_e + [Na^+]_e)^2 + (n[M^{-n}]_e)^2} \right)$$

implica que la suma de las concentraciones de osmolitos (solutos que ejercen presión osmótica) intracelulares, y por tanto la presión osmótica intracelular, será más alta que la suma de osmolitos y, por tanto, la presión osmótica extracelulares, que en términos de las concentraciones extracelulares, vendrían dados por:

$$\pi_e = RT (2([K^+]_e + [Na^+]_e)).$$

Obviamente

$$RT \left([M^{-n}]_i + \sqrt{4([K^+]_e + [Na^+]_e)^2 + (n[M^{-n}]_e)^2} \right) > RT (2([K^+]_e + [Na^+]_e))$$

y al establecerse la distribución de Donnan, la presión osmótica intracelular, π_i , sería mayor que la presión osmótica extracelular, π_e . Esta situación conduciría al hinchamiento progresivo de las células hasta su destrucción. La célula lucha contra esta situación mediante la bomba iónica.

El doble Donnan parcial

Si la totalidad de los iones sodio y potasio pueden difundir libremente a través de la membrana celular, la distribución de Donnan predice que se producirá una migración continua de iones y agua hacia el interior de las células con el consecuente hinchamiento creciente. Obviamente la distribución de Donnan no explica el mantenimiento de la constancia del volumen celular. Es necesario introducir una modificación del modelo basado en esta distribución. Esta modificación propondría una inmovilización parcial de los iones sodio y potasio. Conceptualmente se pueden visualizar dos fracciones de sodio y de potasio: una operacionalmente inmovilizada por la bomba y la otra capaz de difundir libremente. La bomba iónica inmoviliza operacionalmente una fracción del potasio intracelular, en otras palabras regresa a las células la mayor parte del potasio que difunde de ellas hacia el medio extracelular. Algo similar sucede con el sodio extracelular: la bomba regresa al medio extracelular la mayor parte del sodio que ingresa a las células.. Este razonamiento conduce a dos expresiones, las cuales sugieren que no son los productos de las concentraciones iónicas totales, sino los productos de las concentraciones iónicas, corregidas mediante un factor que toma en cuenta la inmovilización parcial de los iones, inducida por la actividad de la bomba, los que rigen la distribución de iones en la célula viviente.

Se han desarrollado dos expresiones basadas en hipótesis diferentes pero que conducen a similares resultados.

La ecuación de Mullins y Noda (89) ha sido desarrollada basándose en consideraciones electroquímicas y termodinámicas (diferencia de potencial transmembrana, permeabilidad relativa, b , del sodio con respecto al potasio de la membrana celular, de concentraciones iónicas intra- y extracelulares y de la tasa de intercambio de sodio por potasio a nivel de la bomba, r):

$$(r[K^+]_i + b[Na]_i)[Cl^-]_i = (r[K^+]_e + b[Na^+]_e)[Cl^-]_e$$

Si r se hace cero, en otras palabras se detiene la bomba, las relaciones iónicas se hacen idénticas al Donnan para el cloruro de sodio intra- y extracelular:

$$[Na^+]_i [Cl^-]_i = [Na^+]_e [Cl^-]_e$$

y la célula se hinchará hasta reventar. En los trastornos metabólicos o cuando la bomba es inhibida por diversos fármacos, r tiende a cero con el consiguiente edema celular.

Otra expresión, basada en consideraciones probabilísticas (90), permite calcular la distribución iónica en células vivientes con sólo conocer las concentraciones iónicas y la relación de las concentraciones intra- y extracelular de algún ion que se distribuya pasivamente (sea cloruro o algún anión o catión no fisiológico), es el llamado doble Donnan parcial. Los iones sodio y potasio son atrapados de manera aleatoria por la bomba y sólo una fracción minoritaria puede difundir pasivamente través de la membrana. Sólo las fracciones difusibles se ajustan a la relación de Donnan:

$$([Na^+]_i + [K^+]_i) [Cl^-]_i = ([Na^+]_e + [K^+]_e) [Cl^-]_e$$

En esta expresión se incluyen sólo las fracciones difusibles de los iones, $[K^+]_i$ y $[Na^+]_i$. Representan las fracciones no atrapadas por la bomba y que pueden difundir libremente.

De acuerdo con este razonamiento la concentración total de osmolitos en la célula viviente pueden calcularse a partir de la siguiente expresión:

$$[Osmoles]^{ot} = [K^+]_i + 4([Na^+]_i + [K^+]_i) [Cl^-]_i + (n[M^{-n}]_i - [K^+]_i) + [M^{-n}]_i$$

Si la bomba es inhibida, las fracciones inmovilizadas de potasio, $[K^+]_i$, y de sodio, $[Na^+]_i$, caerán a cero y $[K^+]_i$ y $[Na^+]_i$ tenderán hacia $[K^+]_e$ y $[Na^+]_e$ respectivamente y los osmoles totales en la célula será dada por:

$$[Osmoles]^{ot} = [M^{-n}]_i + 4([K^+]_e + [Na^+]_e) [Cl^-]_e + (n[M^{-n}]_i)$$

mayor que la osmolalidad del medio externo

$$[Osmoles] = 2([K^+]_e + [Na^+]_e)$$

Esta situación conduciría al edema y destrucción de las células en las cuales se ha inhibido su metabolismo o transporte de sodio y potasio (91).

De manera que se puede considerar que el comportamiento osmótico de las células es consecuencia directa del grado de invariabilidad del contenido de partículas osmóticamente activas (osmolitos) de las células. Las células desprovistas de mecanismos de regulación de volumen, como la generalidad de aquellas expuestas a un medio interno constante y las células de invertebrados marinos estenohalinos, mantienen sus osmolitos citoplasmáticos constantes. La ley de van't Hoff regirá su respuesta a cambios de concentración osmótica del medio extracelular. De acuerdo a esta ley, la presión osmótica de una solución es función de la concentración de partículas osmóticamente activas, esto es partículas que no pueden dejar la solución porque no pueden atravesar una membrana impermeable que envuelve la solución o porque son mantenidas en la solución debido a la actividad de un proceso que consume energía y continuamente restaura la concentración de las partículas reintroduciendo nuevas para reemplazar aquellas perdidas por difusión a través de la membrana. Alternativamente las células pueden reemplazar partículas perdidas por catabolismo o difusión mediante su síntesis continua.

Relaciones osmóticas y ley de van't Hoff

La ley de van't Hoff puede expresarse de acuerdo a la expresión:

$$\pi H_2O^c = RT \sum \phi_i Q_i$$

o alternativamente

$$\pi = RT \sum \phi_i Q_i / H_2O^c$$

donde π es la presión osmótica generada por la sumatoria de los productos de la cantidad de solutos Q_i (en moles) multiplicada por los respectivos coeficientes osmóticos, ϕ_i ; R y T son las constantes de los gases y la temperatura absoluta respectivamente y H_2O^c corresponde al agua celular.

Si $\Sigma\phi_i Q_i$ no varía cuando las células son expuestas a soluciones de diferentes osmolalidades, el miembro derecho de la ecuación (14) permanece constante y

$$\pi_i \times H_2O_i^c = \pi_a \times H_2O_a^c$$

o alternativamente

$$H_2O_i^c / H_2O_a^c = \pi_a / \pi_i$$

donde π_i y $H_2O_i^c$ serían la presión osmótica y agua celulares en condiciones isosmóticas y π_a y $H_2O_a^c$ serían los respectivos valores en condiciones anisomóticas una vez cambiada la concentración del medio exterior.

El mantenimiento de un volumen celular constante ante una concentración externa constante depende de la invariabilidad de $\Sigma\phi_i Q_i$.

En células provistas de regulación de volumen, el regreso al valor original, después de variación de concentración del medio externo, dependerá de variaciones en $\Sigma\phi_i Q_i$. Un ejemplo es la respuesta osmótica de las células del asa de Henle y túbulos colectores del nefrón ante las variaciones de concentración de la orina a que son sometidas entre los extremos de diuresis y anti-diuresis cuando la osmolalidad de la orina puede variar entre 50 y 1 200 mOsm/kg H₂O. En este caso las células pueden modificar, dentro de ciertos límites, su contenido de agua o solutos hasta ajustar su osmolaridad a la del medio exterior, mediante la incorporación o síntesis de osmolitos orgánicos compatibles con la estabilidad de las macromoléculas orgánicas (mioinositol, betaína, taurina, sorbitol y glicerofosforilcolina) o su liberación al medio extracelular, regulación isosmótica (92-94).

Así como las células de organismos superiores, provistos de un medio interno regulado, están expuestas a un medio de composición relativamente constante, resultado de la actividad de los transportes de especies químicas entre compartimientos del animal y entre este y el medio externo, hay animales cuyas células están expuestas a un medio externo ordinariamente constante que no requiere regulación fisiológica. Nos referimos a las células de muchos invertebrados marinos. Un ejemplo está representado

por los equinodermos: las holoturias o pepinos de mar, los erizos de mar y las estrellas de mar. En estas especies las células del organismo están expuestas a un medio interno no regulado o lo está muy débilmente y cuya composición difiere muy poco o nada de la del agua de mar. Otro grupo está integrado por invertebrados marinos cuyas células constitutivas están directamente expuestas al agua de mar. Entre estos se hayan los celenterados que incluyen medusas, anémonas y corales.

Las células tanto de animales provistos de medio interno regulado como las expuestas directamente al medio marino circundante son, con excepción de algunos invertebrados dulceacuícolas, isosmóticas con el medio que las rodea y están provistas de mecanismos que mantienen constante el volumen celular y los electrolitos intracelulares a pesar de la diferencia de composición entre ellas y el medio extracelular. Estos procesos son comunes a la mayoría de las células pero muchas entre ellas están también provistas de mecanismos que regulan su volumen ante cambios de la concentración y osmolalidad del medio extracelular, tales como las células del nefrón y las de diversos vertebrados e invertebrados estuarinos.

Podría considerarse que el mantenimiento de la constancia de la composición y volumen celular es el proceso más elemental y primitivo de homeostasis que exhiben las células. Son procesos relativamente rígidos posiblemente generales a la mayoría de las células. No obstante, como ya se ha mencionado, muchas células están provistas, además, de mecanismos que regulan su volumen ante cambios de osmolalidad del medio externo. Con el fin de estudiar el proceso primitivo responsable de la homeostasis del medio intracelular, hemos escogido especies marinas estenohalinas con restringida tolerancia a los cambios de concentración del medio externo.

Ante variaciones de concentración del medio, las células pueden exhibir dos tipos de respuesta: pueden alterar su volumen y concentraciones iónicas de modo de ajustar la concentración total de solutos del medio intracelular a la del medio o pueden mantener invariable su volumen ganando o perdiendo especies químicas osmoticamente activas y así mantener su volumen constante a pesar del cambio de osmolalidad del medio circundante.

De acuerdo con el principio enunciado por August Krogh, para cada problema fisiológico existen uno o más animales apropiados para su estudio (95).

La anémona de mar *Condylactis gigantea*, y las holoturias *Isostichopus badiotus* y *Holothuria glaberrima* parecían, entre los animales accesibles, los más apropiados para el estudio de las relaciones hidroelectrolíticas en células no reguladoras ya que estos son animales estenohalinos (su tolerancia a variaciones de salinidad es muy restringida) que no están provistos de mecanismos reguladores de las concentraciones de los medios extra- e intracelulares. No obstante, están provistos de mecanismos que mantienen constantes el volumen y la concentración de osmolitos celulares a pesar de la diferencia de composición de ambos medios y del efecto de la presencia de moléculas cargadas indifusibles en el medio intracelular que generan una distribución de electrolitos tipo Donnan, que si no es compensada, induciría la entrada continua de agua y electrolitos extracelulares.

Las holoturias están restringidas al medio marino. Exhiben una intolerancia a las variaciones de salinidad, son estenohalinas. La composición de su líquido perivisceral, el medio extracelular, es muy similar a la del medio marino y en caso de variación de la concentración de éste, la composición y presión osmótica del medio perivisceral se equilibrarán con las del medio exterior.

Con el fin de establecer los lineamientos fundamentales de los estudios a realizar sobre las interacciones iónicas y osmóticas de las células con el medio circundante, se estudió la distribución y movimiento de iones en la holoturia *Isostichopus badiotus* (96). En el Cuadro 5 se presentan las concentraciones iónicas intracelulares de este animal. Las concentraciones en el músculo y porciones proximales e intermedias del intestino son representativas de las concentraciones iónicas intracelulares en animales estenohalinos marinos (90). No obstante, la zona distal mostró concentraciones bastante más altas de sodio y más bajas de potasio que lo usual.

Este mismo equinodermo fue sometido a aguas de mar de 80 %, 100 % y 120 % de lo normal y se estudió la respuesta del líquido celómico o perivisceral y las concentraciones iónicas intracelulares. Las concentraciones iónicas del líquido celómico y de las células intestinales y musculares se equilibraron en pocas horas de exposición (4-6 horas) a las del agua de mar. No obstante, el contenido iónico de las células musculares permaneció invariable lo que indica que, en estas células, el sistema bomba/fuga puede mantener invariable el contenido

de osmolitos intracelulares. Estos resultados demuestran que aunque estos animales no tienen capacidad reguladora anisomótica extracelular ni isosmótica intracelular, y muestran una respuesta bastante simple desde el punto de vista de su relación con las variaciones de las concentraciones hidrosalinas (97), mantienen invariables los contenidos iónicos intracelulares a pesar de la existencia de gradientes electroquímicos que, de no ser compensados, conducirían a la degradación espontánea del sistema.

En estudios posteriores (98) se investigó la respuesta ionosmótica a la exposición a siete salinidades diferentes, 17,5 ‰ S (50 %), 20,0 ‰ S (57 %), 23,5 ‰ S (67 %), 29,0 ‰ S (83 %), 35,0 ‰ S (100 %), 41,7 ‰ S (119 %), 48,0 ‰ S (137 %) de células de árbol respiratorio de holoturias aclimatadas durante 9 horas a tres salinidades diferentes, 20 ‰ S (57 %), 35 ‰ S (100 %) y 48 ‰ S (137 %). Estos experimentos se realizaron con el fin de determinar si la aclimatación durante varias horas a tres concentraciones diferentes de agua de mar (57 %, 100 %, 137 %) alteraba la respuesta ionosmótica, fuera por cambios en el contenido de osmolitos de las células o por otros fenómenos como pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana o a la existencia de un esbozo de mecanismo de regulación isosmótica (99). En la Figura 15 se observa que las células de los animales preincubados en las tres salinidades respondieron como lo predice

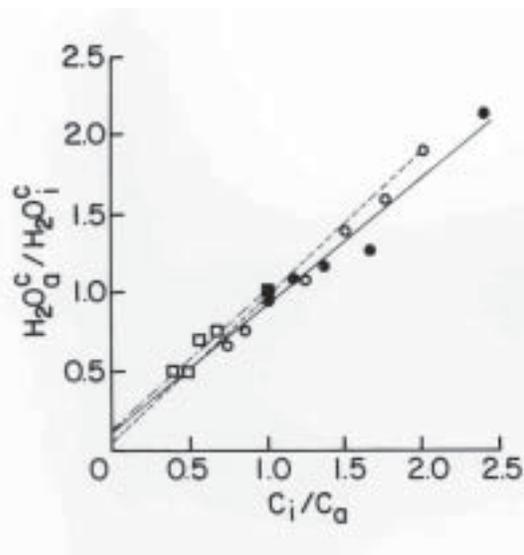


Figura 15. Respuesta osmótica de células del árbol respiratorio de *Isostichopus badiotus*. Redibujado de (99).

la ley de van't Hoff, la pendiente de la gráfica de las aguas celulares relativas contra la recíproca de la relación de las concentraciones no difiere de la unidad y la intersección con las ordenadas es cero. Esto lo corrobora la invariabilidad de la suma de los contenidos intracelulares de electrolitos en las diferentes condiciones de preincubación.

Se debe tener en cuenta que, a pesar de la isosmoticidad entre las células y el medio externo, el mantenimiento de la invariabilidad del contenido iónico intracelular es bastante costoso desde el punto de vista energético. En *Holothuria glaberrima* se requería un gasto energético mínimo de 840 cal/Eq para el transporte de sodio y 1150 cal/Eq para el de potasio (100).

Dado que los equinodermos son especies relativamente avanzadas evolutivamente y sus vísceras no están expuestas directamente al agua de mar, se consideró conveniente estudiar una especie menos evolucionada y cuyas células estuvieran expuestas directamente al agua de mar. Con este fin se escogió la anémona de mar *Condylactis gigantea* (101). Se expusieron los tentáculos a aguas de mar de 50 %, 67 %, 83 %, 100 %, y 125 %. Estas células también respondieron de acuerdo con la ley de van't Hoff como se observa en la expresión que describe la relación entre el agua relativa celular y la recíproca de las concentraciones relativas:

$$H_2O_a^c / H_2O_i^c = (1,06 \pm 0,02)(C_i / C_a) + (-0,05 \pm 0,03)$$

donde se observa que la pendiente no difiere significativamente de la unidad ni la intersección de cero (Figura 16).

Estos resultados sugieren que la respuesta osmótica de un animal está más íntimamente relacionada con el grado de variabilidad del medio al que está obligado a tolerar que con su nivel evolutivo.

La explicación del comportamiento ionosmótico de las células exige la caracterización del intercambio iónico entre las células y el medio, sus relaciones con los fenómenos bioelectroquímicos y el metabolismo celulares. Estos aspectos fueron explorados en la anémona *Condylactis gigantea* (102). En este trabajo se pudo determinar, que en condiciones normales la bomba expelle 1,8-2,0 iones sodio hacia el exterior celular por cada ion potasio introducido a las células. Las concentraciones intra- y extracelulares de cloruro, ion que se distribuye pasivamente a ambos lados de la membrana celular,

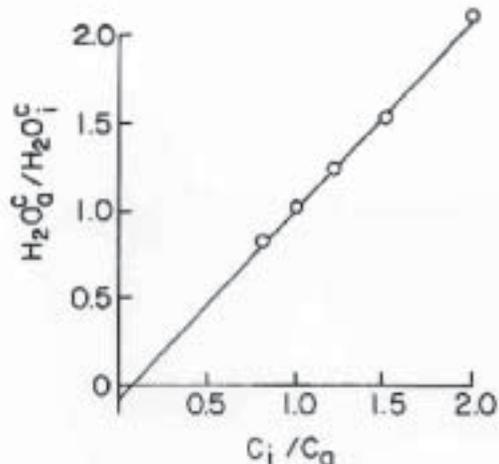


Figura 16. Respuesta osmótica de las células de tentáculos de la anémona *Condylactis gigantea*. Redibujado de (102).

son 128 mM y 442 mM, respectivamente y corresponden, de acuerdo a la ecuación de Nernst, a un potencial transmembrana de -22 mV (el potencial eléctrico intracelular es negativo con respecto del medio exterior). Las concentraciones intra- y extracelulares de potasio, 174 y 10,8 mM respectivamente y las concentraciones intra- y extracelulares de sodio, 128 y 442 mM respectivamente, son compatibles con un potencial intracelular de -23 mV de acuerdo con la ecuación de Mullins y Noda (89):

$$E = (RT / F) \ln \left[\frac{(rK_e + bNa_e)}{(rK_i + bNa_i)} \right],$$

en la cual K_i y Na_i representan las concentraciones intracelulares de potasio y sodio respectivamente, K_e y Na_e , las concentraciones extracelulares de estos iones, r la relación sodio/potasio de la bomba iónica y $b = P_{Na} / P_K$, el cociente de las permeabilidades iónicas, P_{Na} y P_K , al sodio y al potasio respectivamente. El valor a relación $b = P_{Na} / P_K$ que ajustaba mejor el potencial calculado con el medido mediante microelectrodos introducidos en las células gastrodérmicas del animal fue de 0,31. Este valor es considerablemente más alto que el obtenido en células excitables como la fibra muscular en las que el valor observado es de 0,01 (103) pero es compatible con valores observados

en células no excitables (104,105). La distribución de cloruro, por ajustarse a la ecuación de Nernst, es posiblemente absolutamente pasiva mientras que la distribución de potasio y sodio, por ajustarse a la ecuación de Mullins y Noda implica actividad de una bomba Na^+/K^+ para su mantenimiento, por tanto, la distribución de estos cationes no es pasiva.

La exposición al frío (2°C) resultaba en una caída importante del potasio y una acumulación de sodio intracelulares. El regreso a temperatura normal, 25°C revertía este efecto. La ouabaína, así como la baja concentración de potasio extracelular (2 mM) inhibía la reacumulación de potasio y la extrusión de sodio cuando se exponían los tentáculos a 25°C . Tanto la baja concentración (2 mM) de potasio en el medio como la presencia de ouabaína inhibían la reacumulación de potasio y expulsión del sodio acumulado.

La exposición al frío (2°C), la ouabaína y bajas concentraciones de potasio (2 mM) inhibían el transporte activo de la bomba resultando en una acumulación de sodio y caída de potasio en las células lo cual corrobora la naturaleza activa del transporte de estos últimos. Estos experimentos también confirmaron el conocido antagonismo entre la ouabaína y el potasio (106,107). El bloqueo del transporte iónico por la ouabaína era más marcado a bajas concentraciones de potasio (2 mM).

En conclusión, una bomba sensible a la ouabaína que realiza un intercambio 2:1 de sodio por potasio en conjunción con una permeabilidad moderadamente alta de la membrana celular al sodio parecen explicar las distribuciones iónicas y el potencial transmembrana.

Estos hechos están íntimamente relacionados con la fisiopatología de la isquemia y de procesos acidóticos así como con la homeostasis del calcio intracelular, entre otros muchos procesos celulares de interés clínico. En una revisión clásica (108), Macknight y Leaf resumieron una extensa literatura sobre los procesos isquémicos tisulares y su relación con los trastornos del volumen celular. La isquemia renal por compresión arterial conduce al hinchamiento de los elementos celulares como resultado de la falla de los mecanismos activos de transporte que mantienen constante el volumen celular (109).

Durante el período de isquemia subsiguiente a una obstrucción coronaria, el hinchamiento celular es poco marcado, presumiblemente debido a que el líquido intersticial del miocardio es escaso (110). La restauración de la circulación causa un marcado

hinchamiento del miocardio y de las células endoteliales que contribuirían a la extensión del daño celular al impedir el flujo sanguíneo colateral (111). Fragmentos de miocardio isquémico acumulan sodio y agua y pierden potasio *in vitro*, mientras que fragmentos de miocardio normal regulan su volumen y mantienen invariable su potasio intracelular (112). La acidosis intracelular debida a trauma o isquemia cerebral activa el intercambio Na^+/H^+ y el intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, lo que resulta en la penetración de NaCl y excreción de ácido carbónico, H_2CO_3 en las células. Este proceso tiende a corregir la acidosis intracelular pero exige el pago de un precio osmótico: la penetración de NaCl y agua a las células con su consecuente edema (113). Como ejemplo final podemos mencionar que la homeostasis del calcio intracelular depende de la baja concentración intracelular de sodio puesto que la penetración pasiva de sodio a las células está asociada a un contra-transporte de calcio que expelle calcio intracelular, intercambios $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ indispensables en la homeostasis del calcio intracelular (114-117).

Comparación de las células asimétricas y simétricas

A continuación se resumen las características bioelectroquímicas de los dos tipos de células descritos:

1. Los epitelios transportadores: constituidos por células asimétricas o polares. Poseen dos membranas de diferentes selectividades iónicas separadas desde el punto de vista espacial: una es selectivamente permeable a un ión, por ejemplo el sodio y la membrana opuesta lo es a otro ión, por ejemplo el potasio. El transporte activo de sodio y potasio mantiene los niveles intracelulares apropiados y constantes de estos iones de modo de mantener invariable el volumen celular, el potencial transepitelial y en el citoplasma una atmósfera iónica apropiada, alta concentración de potasio y baja concentración de sodio, para la estabilidad de las macromoléculas orgánicas que constituyen la maquinaria enzimática, genética y mecánica, substrato de los fenómenos biológicos intracelulares (118,119).
2. Las células simétricas: no realizan un transporte

transcelular en un sentido preferente pero, así como las células asimétricas, están obligadas a mantener en el citoplasma una atmósfera iónica apropiada para la estabilidad de las macromoléculas orgánicas responsables de los fenómenos biológicos intracelulares.

Culminada esta sintética revisión de los fenómenos bioelectroquímicos que caracterizan el transporte iónico transepitelial involucrados en el mantenimiento de la constancia del medio interno y los fenómenos bioelectroquímicos que caracterizan a los fenómenos involucrados en el mantenimiento de la constancia del medio intracelular, pasaremos a considerar un tipo de células que presentan propiedades de membrana comunes con los dos tipos antes mencionados, pero en las células que revisaremos a continuación, estas propiedades no están separadas espacialmente sino temporalmente, las células excitables.

Células excitables

Potenciales propagados

Hay células en las cuales las selectividades iónicas no están separadas espacialmente sino temporalmente. En el estado llamado de reposo, las membranas de estas células son predominantemente permeables al potasio: su permeabilidad a este ion puede ser de 25 a 100 veces mayor que al sodio y el potencial eléctrico intracelular estará a un valor de -70 a -100 mV por debajo del potencial del medio externo debido al frente iónico positivo que genera la difusión de potasio hacia el medio extracelular empujado por su alta concentración intracelular. Si la negatividad intracelular se va reduciendo, por aplicación de un estímulo representado por una corriente eléctrica, y se aproxima su potencial hacia el del medio exterior, al alcanzar un potencial dado, el potencial umbral, la membrana súbitamente incrementará su permeabilidad al sodio el cual entrará a torrentes a las células empujado por su alta concentración extracelular; el potencial intracelular se invierte y se hace positivo, entre $+20$ y $+50$ mV con respecto al exterior y se dice algo impropriadamente, que la célula está despolarizada. Esta positividad es en seguida neutralizada por un descenso inmediato de la permeabilidad al sodio y un incremento de la permeabilidad al potasio que regresa el potencial transmembrana a su valor inicial o de reposo, fase de re-polarización. El cambio de potencial que acompaña la violenta entrada de sodio a la célula es

lo que se denomina en fisiología el potencial de acción.

La Figura 17 muestra que el potencial de acción se propaga a lo largo de la membrana celular porque, la despolarización de la membrana actúa como un estímulo eléctrico sobre la zona adyacente y genera en ella un potencial de acción y así sucesivamente. El movimiento tiene lugar en un solo sentido porque una vez despolarizada una zona de la membrana, ésta se hace refractaria a la estimulación eléctrica durante un período determinado, el período refractario. Una vez completado el potencial de acción, la membrana regresa a su estado de reposo. Durante este período la bomba iónica re-expulsa al medio exterior los iones sodio acumulados y restaura a las células el potasio perdido, durante el potencial de acción (27).

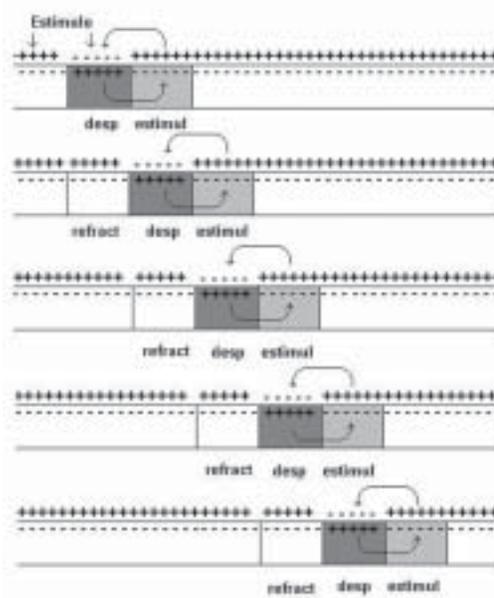


Figura 17. Propagación de la despolarización de una membrana excitable por la corriente local. Redibujado de (27).

Esta célula que se ha descrito aquí representa las llamadas células excitables. En algunas como las neuronas el fenómeno eléctrico propagado constituye el impulso nervioso y no genera otras respuestas de la neurona si exceptuamos los fenómenos químicos a nivel de la sinapsis o de la placa motora.

En otro tipo de células, representadas por las células musculares, el potencial de acción desencadenará una serie de procesos en el cual está involucrado el ion calcio que resultará en la contracción muscular debido al motor actina-miosina. Y en un subtipo de células musculares, las miocárdicas, por exhibir propiedades de sincicio eléctrico, el potencial de acción se propagará a gran número de miocitos resultando en su contracción sincronizada.

Registro extracelular, base del registro de actividad eléctrica cardíaca y neuronal en la superficie corporal

Durante la propagación del potencial de acción se demarcan dos zonas en las células excitables, la zona excitada, donde tiene lugar el potencial de acción y las zonas adyacentes en reposo.

Durante el potencial de acción el potencial del sector activado de la membrana se invierte, de modo que el exterior se hace negativo con respecto al interior, mientras que en el sector en reposo el potencial exterior permanece positivo con respecto al interior. En estas condiciones se genera una diferencia de potencial entre las dos zonas y fluye una corriente eléctrica entre ellas tanto en el medio exterior como en el citoplasma. La Figura 18 muestra que si se disponen dos electrodos, separados por una cierta distancia sobre la membrana celular, se detectará el paso del impulso debajo del primer electrodo por una desviación en un sentido del indicador del instrumento de detección, sea galvanómetro o mejor osciloscopio. Cuando el impulso alcanza el segundo electrodo, la desviación será en sentido contrario, es la conocida onda bifásica de los textos de fisiología (27).

Este sencillo procedimiento constituye la base de la detección de los fenómenos eléctricos que acompañan la contracción muscular (electromiografía), del miocardio (electrocardiografía), de la actividad encefálica (electroencefalografía). Debido a la íntima relación entre las células miocárdicas y nerviosas, que exhiben propiedades de un sincicio eléctrico, los potenciales eléctricos de las células individuales se suman vectorialmente para dar una resultante, llamado vector eléctrico, que se manifiesta como un cambio de potencial a nivel de la superficie corporal.

Los potenciales detectados sobre la superficie corporal son muy débiles debido a la difusión de la

corriente eléctrica en toda la extensión del conductor representado por el cuerpo animal. Eran prácticamente indetectables mediante los galvanómetros existentes para la época de du Bois-Reymond, Bernstein y Helmholtz.

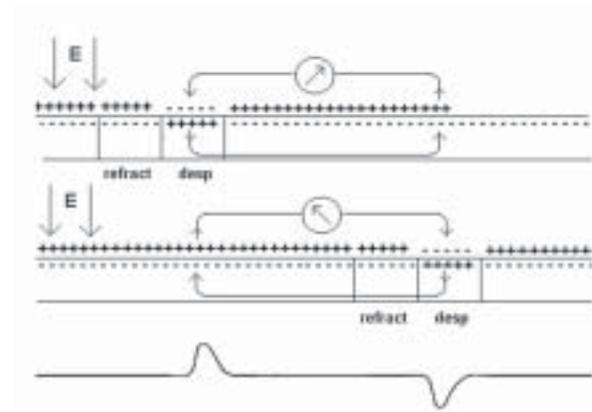


Figura 18. Onda bifásica. Registro extracelular de la propagación de la despolarización de una membrana excitable. Base de los registros de los potenciales electrocardiográficos y electroencefalográficos. Redibujado de (27).

A pesar de que Rudolph Albrecht von Kölliker y Johannes Müller descubren tempranamente en el siglo XIX que el corazón de rana produce una corriente eléctrica que precede cada contracción cardíaca, hubo que esperar hasta la introducción en 1872 del electrómetro capilar de Lippman, con el que Augustus Désiré Waller (1856-1922) realizó en 1887, el primer registro electrocardiográfico mediante electrodos que detectaban las fuerzas motrices de origen cardíaco en la superficie corporal humana (120).

Willem Einthoven (1860-1927), el padre de la moderna electrocardiografía, empleó originalmente el galvanómetro de d'Arsonval para el registro de los potenciales cardíacos pero pronto lo reemplazó por el galvanómetro llamado de cuerda de respuesta más rápida (121).

En 1903 Einthoven presenta el primer trazado electrocardiográfico, introdujo la nomenclatura uniforme y preconizó el uso de las letras P, Q, R, S, T, para denotar las ondas del electrocardiograma e introdujo las derivaciones y el triángulo que llevan su nombre.

Electrofisiología del temblador

Finalmente, después de este recorrido por la bioelectricidad clásica podemos dar una explicación al fenómeno observado por Humboldt y Sachs: el aturdimiento o electrocución de los caballos llaneros por el temblador. En la Figura 19 se muestran, uno al lado del otro, dos de los miles de elementos que se disponen en serie, como una pila de Volta, a lo largo del animal en los llamados órganos eléctricos. Cada elemento es una célula despolarizable especializada. En la parte superior se presentan dos elementos sucesivos en estado de reposo. Se observa que el interior celular es negativo con respecto al exterior, en ambas caras del elemento eléctrico o electroplaca, de modo que el descenso de potencial en la cara de la izquierda o cefálica es neutralizado por el incremento de la cara de la derecha, o caudal. En la parte inferior se observan las electroplacas despolarizadas por un impulso nervioso. Al arribar éste a la superficie caudal, invierte su potencial, se despolariza, como lo hace toda célula excitable y se genera una serie sucesiva de escalones de negatividad creciente debido a que el potencial de la cara caudal ya no neutraliza el de la cara cefálica sino que se suma a él (122). La suma de miles de estos escalones de un décimo de voltio pueden generar un voltaje apreciable, alrededor de 600 voltios.

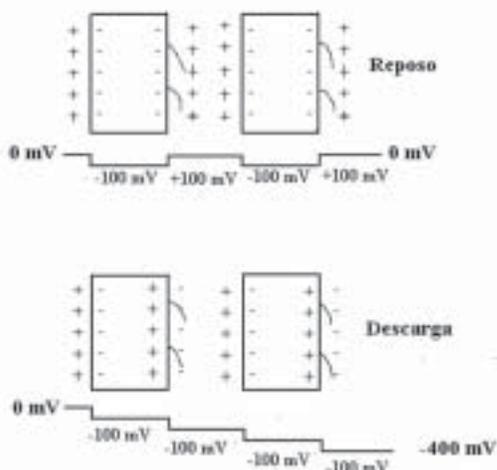


Figura 19. Generación de la descarga del *Electrophorus electricus*. Para detalles, ver texto. Redibujado de (123).

Hemos así seguido el hilo conductor bioelectroquímico a través de una serie de fenómenos y procesos sin relación aparente entre sí.

Partimos de los fenómenos bioeléctricos generados por los peces eléctricos y reconocidos desde la antigüedad por sus efectos dramáticos. Hemos pasado por los primeros esbozos de los estudios bioeléctricos instrumentales, el conocimiento de los fenómenos de las células excitables, los fenómenos bioeléctricos asociados al transporte de sustancias entre el ser vivo y el medio y entre sus compartimientos corporales. Hemos observado los fenómenos bioeléctricos asociados a la regulación del medio intracelular y finalmente las manifestaciones eléctricas de la actividad neuromuscular y cardíaca en la superficie del organismo. Finalmente hemos regresado, pero a un nuevo nivel de conocimiento a la comprensión de la descarga del *Electrophorus* o temblador y los peces eléctricos, fenómeno que ha intrigado a los investigadores desde la antigüedad.

REFERENCIAS

1. Wu CH. Electric fish and the discovery of animal electricity. *American Scientist*. 1984;72:598-607.
2. Humboldt A. A personal narrative of travels to the equinoctial regions of America during the years 1799-1804. Londres: George Routledge and Sons Limited, 1851.
3. Sachs C. Untersuchungen am Zitteraal *Gymnotus electricus*. Leipzig: Verlag von Veit & Comp.; 1881.
4. Keynes RD. The generation of electricity by fishes. *Endeavour*. 1956;15:215-222.
5. Brazier MAB. The historic development of neurophysiology. En: J Field, HW Magoun, VE Hall, editores. *Neurophysiology, Vol 1. Handbook of Physiology*. Washington: American Physiological Society; 1965.p.1-58.
6. Loeb LB. *Fundamentals of electricity and magnetism*. Nueva York: Dover Publications Inc.; 1947.
7. DuBois-Reymond E. Untersuchungen über thierische Elektrizität. Erster Band. Berlin: G. Reimer; 1848.
8. Bernstein J. Untersuchungen zur Thermodynamik der biologischen Ströme. *Plügers Arch Ges Physiol*. 1902;92:521-562.
9. Ostwald W. Elektrische Eigenschaften halbdurchlässiger Scheidewände. *Z physiol Chem*. 1890;6:71-82.

10. Nernst W. Elektromotorische Wirksamkeit der Ionen. *Z für phys Chem.* 1889;4:129-181.
11. Nernst W. *Theoretische Chemie.* Stuttgart: Enke; 1926.
12. Ganong WF. *Review of Medical Physiology.* 18ª edición. Stamford: Appleton & Lange; 1997.
13. Grundfest H. Julius Bernstein, Ludimar Hermann and the discovery of the overshoot of the axon spike. *Arch Ital Biol.* 1965;103:483-490.
14. Bernstein J. *Elektrobiologie – Die Lehre von den elektrischen Vorgängen im Organismus auf moderner Grundlage dargestellt.* Braunschweig: Vieweg & Sohn; 1912.
15. Rudolf G. Julius Bernstein. En: Boylan J, editor. *Founders of experimental physiology.* Munich: JF Lehmanns Verlag; 1995.p.249-299.
16. Einthoven W. Un nouveau galvanomètre. *Arch Neerland Sc Ex Nat.* 1901;6:625-633.
17. Gasser HS, Erlanger J. The cathode ray oscillograph as a means of recording nerve action currents and induction shocks. *Amer J Physiol.* 1921;59:473-474.
18. Eccles JC. *My Scientific Odyssey.* *Ann Rev Physiol.* 1977;39:1-18.
19. Hodgkin AL. Beginning: Some reminiscences of my early life (1914-1947). *Ann Rev Physiol.* 1983;45:1-16.
20. Goldman DE. Potential, impedance and rectification in membranes. *J Gen Physiol.* 1944;27:37-60.
21. Hodgkin AL, Katz B. Effect of sodium ions on electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol.* 1949;108:37-77.
22. Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Measurement of current-voltage relations in membrane of giant axon of *Loligo.* *J Physiol.* 1952;116:424-448.
23. Hodgkin AL, Huxley AF. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo.* *J Physiol.* 1952;116:449-472.
24. Hodgkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo.* *J Physiol.* 1952;116:473-496.
25. Hodgkin AL, Huxley AF. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo.* *J Physiol.* 1952;116:497-506.
26. Hodgkin AL, Huxley AF. Quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 1952;117:500-544.
27. Keynes RD, Aidley DJ. *Nerve and Muscle.* 3ª edición. Cambridge: Cambridge University Press; 2001.
28. Ussing HH. Life with tracers. *Ann Rev Physiol.* 1980;42:1-16.
29. Plaza-Iglesias M, López I, Herrera FC. Osmotic regulation in aqueous humor and blood in the euryhaline fish *Eugerres plumieri.* *Comp Biochem Physiol.* 1989;92A:195-196.
30. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand.* 1951;23:110-127.
31. Herrera FC. Frog skin and toad bladder. En: EE Bittar, editor. *Membranes and ion transport, Vol 3.* John Wiley and Sons Ltd., Londres; 1971.p.1-47.
32. Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta.* 1957;23:394-401.
33. Skou JC. Further investigations on Mg⁺⁺ + Na⁺-activated adenosine triphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na⁺ and K⁺ across the nerve membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1960;42:6-23.
34. Herrera FC, Curran PF. The effect of Ca and antidiuretic hormone on Na transport across frog skin. I. Examination of interrelationships between Ca and hormone. *J Gen Physiol.* 1963;46:999-1010.
35. Curran PF, Herrera FC, Flanigan WJ. The effect of Ca and antidiuretic hormone on Na transport across frog skin. II. Sites and mechanisms of action. *J Gen Physiol.* 1963;46:1011-1027.
36. Cerejido M, Herrera FC, Flanigan WJ, Curran PF. The influence of Na concentration on Na transport across frog skin. *J Gen Physiol.* 1964;47: 879-893.
37. Michaelis L, Menten ML. *Der Kinetik der Invertinwirkung.* *Biochem Zeitschr* 1913;49:333-369.
38. Leaf A, Anderson J, Page LB. Active sodium transport by the isolated toad bladder. *J Gen Physiol.* 1958;41:657-668.
39. Bentley PJ. The physiology of the urinary bladder of amphibia. *Biol Rev.* 1966;41:275-316.
40. Zierler KL. Effect of insulin on membrane potential and potassium content of rat muscle. *Am J Physiol.* 1959;197:515-523.
41. Zierler KL. Hyperpolarization of muscle by insulin in a glucose-free environment. *Am J Physiol.* 1959;197:524-526.
42. Herrera FC, Whittembury G, Planchart A. Effect of insulin on short-circuit current across isolated frog skin in the presence of calcium and magnesium. *Biochim Biophys Acta.* 1963;66:170-172.

43. Herrera FC. Effect of insulin on short-circuit current and sodium transport across toad urinary bladder. *Am J Physiol.* 1965;209:819-824.
44. Koefoed-Johnsen V, Ussing HH. The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand.* 1958;42:298-308.
45. Läuger P. *Electrogenic ion pumps.* Sunderland MA: Sinauer Associates Inc., 1991.
46. Schatzmann HJ. Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium und Natrium Transport durch die Erythrocytenmembran. *Helv Physiol Acta.* 1953;11:346-354.
47. Glynn IM. The action of cardiac glycoside on sodium and potassium movements in human red cells. *J Physiol.* 1957;136:148-173.
48. Bonting SL, Canady MR. Na-K activated adenosine triphosphatase and sodium transport in toad bladder. *Am J Physiol.* 1964;207:1005-1009.
49. Caldwell PC, Keynes RD. The effect of ouabain on the efflux of sodium from a squid giant axon. *J Physiol.* 1959;148:8.
50. Johnson JA Influence of ouabain, strophanthidin and dihydrostrophanthidin on sodium and potassium transport in frog sartorii. *Am J Physiol.* 1956;187:328-332.
51. Koefoed-Johnsen V, Ussing HH. The effect of g-strophanthin (ouabain) on the active transport of sodium through the isolated frog skin. *Acta Physiol Scand.* 1957;42(Suppl 145):87-88.
52. Herrera FC. Action of ouabain on sodium transport in the toad urinary bladder. *Am J Physiol.* 1966;210:980-986.
53. Herrera FC. Action of ouabain on bioelectric properties and ion content in toad urinary bladder. *Am J Physiol.* 1968;215:183-189.
54. Herrera FC, Arévalo J, López I. The toad skin NaCl check-valve. *Comp Biochem Physiol.* 1996;114A:65-70.
55. Cade JFJ. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med J Aust.* 1949;2:349-352.
56. Kosten TR, Forrest JN. Treatment of severe lithium-induced polyuria with amiloride. *Am J Psychiatry.* 1986;143:1563-1568.
57. Singer I, Rotenberg D, Preschett JB. Lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus: In vivo and in vitro studies. *J Clin Invest.* 1972;51:1081-1091.
58. Franks RD, Dubovsky SL, Lifshitz M, Coen P, Subryan V, Walker SH. Long-term lithium carbonate therapy causes hyperparathyroidism. *Arch Gen Psychiatry.* 1982;39:1074-1077.
59. Galeotti G. Concerning an EMF which is generated at the surface of animal membranes on contact with different electrolytes. *Z Phys Chem.* 1904;49:542-562.
60. Zerahn K. Studies on the active transport of lithium in the isolated frog skin. *Acta Physiol Scand.* 1955;33:347-358.
61. Herrera FC, Egea R, Herrera AM. Movement of lithium across toad urinary bladder. *Am J Physiol.* 1971;220:1501-1508.
62. Herrera FC. Inhibition of lithium transport across toad bladder by amiloride. *Am J Physiol.* 1972;222:499-502.
63. Herrera FC, Beauwens R, Crabbé J. Mechanism of inhibition by lithium of sodium transport in the toad bladder. *Biol Cell.* 1985;55:257-264.
64. Kirk KL, Dawson DC. Mechanism of epithelial lithium transport. Evidence for basolateral Na:Na and Na:Li exchange. *J Gen Physiol.* 1983;82:497-510.
65. Jackson EK. Diuretics. En: JG Hardman, LE Limbird, PB Molinoff, RW Ruddon, AG Gilman, editores. *Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics.* Nueva York: McGraw Hill; 1996.p.685-713.
66. Herrera FC. The role of the active and passive sodium pathways in the mechanism of action of ethacrynic acid. *Gen Pharmac.* 1975;66:201-207.
67. Baba WI, Smith AJ, Townshend MM. A comparison of the effects of ethacrynic acid and a mercurial diuretic (Mersalyl) on sodium transport across the isolated frog skin. *Br J Pharmac.* 1966;28:238-245.
68. Herrera FC, Esteve M. Paradoxical stimulation of sodium transport in toad skin by ethacrynic acid. *Gen Pharmacol.* 1977;8:189-196.
69. Steele TH, Shelp WD, Wen SF. The effect of ethacrynic acid in nephrogenic diabetes insipidus. *Clin Res.* 1965;13:314.
70. Brown DM, Reynolds JW, Michaels AF, Ulstrom RA. The use and mode of action of ethacrynic acid in nephrogenic diabetes insipidus. *Pediatrics.* 1966;37:447-455.
71. Ives HE. Diuretic Agents. En: BG Katzung, editor. *Basic and clinical pharmacology.* Appleton & Lange, Stamford; 1998.p.242-260.
72. Crabbé J. Stimulation of active sodium transport across the isolated toad bladder after injection of aldosterone to the animal. *Endocrinology.* 1961;69:673-682.
73. Crabbé J. Stimulation of active sodium transport by the isolated toad bladder with aldosterone in vitro. *J Clin Invest.* 1961;40:2103-2110.
74. Crabbé J. Site of action of aldosterone on the bladder

- of the toad. *Nature*. 1963;200:787-788.
75. Crabbé J. Stimulation of active sodium transport by the urinary bladder of Amphibia under the influence of aldosterone. En: J de Graeff, B Leijnse, editores. *Water and Electrolyte metabolism*, Vol. 2. Amsterdam: Elsevier; 1964.p.59-70.
 76. Edelman IS, Bogoroch R, Porter GA. On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport: the role of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci US*. 1963;50:1169-1177.
 77. Fanestil DD, Porter GA, Edelman IS. Aldosterone stimulation of sodium transport. *Biochim Biophys Acta*. 1967;135:74-88.
 78. Fimognari GM, Porter GA, Edelman IS. The role of the tricarboxylic acid cycle in the action of aldosterone on sodium transport. *Biochim Biophys Acta*. 1967;135: 89-99.
 79. Sharp GWG, Komack CL, Leaf A. Studies of the binding of aldosterone in the toad bladder. *J Clin Invest*. 1966;45:450-459.
 80. Sharp GWG, Leaf A. The central role of pyruvate in the stimulation of sodium transport by aldosterone. *Proc Natl Acad Sci US*. 1964;52:1114-1121.
 81. Sharp GWG, Leaf A. Biological action of aldosterone in vitro. *Nature*. 1964;202:1185-1188.
 82. Sharp GWG, Leaf A. Metabolic requirements for active sodium transport stimulated by aldosterone. *J Biol Chem*. 1965;240:4816-4821.
 83. Sharp GWG, Lichtenstein NS, Leaf A. Acetyl coenzyme A requirement for the stimulation of sodium transport by aldosterone. *Biochim Biophys Acta*. 1965;11:329-331.
 84. Horisberger JD, Rossier BC. Aldosterone regulation of gene transcription leading to control of ion transport. *Hypertension*. 1992;19:221-227.
 85. Horisberger JD, Giebisch G. Potassium sparing diuretics. *Renal Physiol*. 1987;10:198-220.
 86. Saier Jr. MH. Families of transporters and their classification. En: Quick MW, editor. *Transmembrane transporters*. Hoboken, Wiley-Liss, John Wiley & Sons, Inc.; 2002.p.1-17.
 87. Florkin M. La regulación isosmótica intracelular en los invertebrados marinos eurihalinos. *Bull Acad R Belg Cl Sci*. 1962;48:687-694.
 88. Hoffman EK. Control of cell volume. En: Gupta BL, Moreton RB, Ochsman JL, Wall BJ, editores. *Transport of ions and water in animals*. Londres: Academic Press; 1977.p.285-352.
 89. Mullins LJ, Noda K. The influence of sodium-free solutions on the membrane potential of muscle fibres. *J Gen Physiol*. 1963;47:117-132.
 90. Herrera FC. The partial double Donnan. A simple alternative interpretation of the transmembrane ionic distribution. *Comp Biochem Physiol*. 1992;103A:29-34.
 91. Herrera FC. El volumen celular. *Gac Méd Caracas*. 1997;105:202-215.
 92. Lohr JW, Grantham JJ. Inorganic ions and volume regulation in kidney tubules under anisotonic conditions. En: Gilles R, Hoffmann EK, Bolis L, editores. *Advances in comparative and environmental physiology 9. Volume and osmolality control in animal cells*. Berlin: Springer-Verlag; 1991.p.43-60.
 93. Law RO, Burg MB. The role of organic osmolytes in the regulation of mammalian cell volume. En: Gilles R, Hoffmann EK, Bolis L, editores. *Advances in comparative and environmental physiology 9. Volume and osmolality control in animal cells*. Berlin: Springer-Verlag; 1991.p.189-225.
 94. Handler JS, Moo Kwon H. Kidney cell survival in high tonicity. *Comp Biochem Physiol*. 1997;117A:301-306.
 95. Krogh A. The progress of physiology. *Am J Physiol*. 1929;90:243-251.
 96. Zanders IP, Herrera FC. Ionic distribution and fluxes in holothurian tissues. *Comp Biochem Physiol*. 1974;47:1153-1170.
 97. Madrid E, Zanders IP, Herrera FC. Changes in coelomic fluid and intracellular ionic composition in holothurians exposed to diverse sea water concentrations. *Comp Biochem Physiol*. 1976;54A:167-174.
 98. Foglietta LM, Herrera FC. Ionosmotic response of respiratory trees of the holothurian *Isostichopus badionotus* Selenka preincubated in hyper-, iso- and hypo-osmotic sea water. *J Exp Mar Biol Ecol*. 1996;202:151-164.
 99. Herrera FC. Steady-state partial double Donnan and the osmotic behavior of cells of stenohaline marine animals. En: Brittain T, Huddart H, Nässel DR, Takeuchi H, Taylor EW, editores. *Trends in comparative biochemistry and physiology Vol 6*. Trivandrum (India): Research Trends, 2000.p.35-45.
 100. Jurisic M, Roque S, López I, Herrera FC. Role of chloride in isosmotic intracellular regulation in *Holothuria glaberrima*. *Comp Biochem Physiol*. 1983;76A:831-837.
 101. Herrera FC, López I, Egea R, Zanders IP. Short-term osmotic responses of cells and tissues of the sea anemone, *Condylactis gigantea*. *Comp Biochem Physiol*. 1989;92A:377-384.

102. Herrera FC, Rodríguez A, López I, Weitzmann, Zanders IP. Characterization of cell ion exchange in the sea anemone *Condylactis gigantea*. *J Comp Physiol B*. 1986;156:591-597.
103. Hodgkin AL, Horowitz P. The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibers. *J Physiol*. 1959;148:127-160.
104. Williams JA. Origin of transmembrane potentials in non-excitabile cells. *J Theor Biol*. 1970;28:287-296.
105. Claret M, Mazet JL. Ionic fluxes and permeabilities of cell membranes in rat liver. *J Physiol*. 1972;223:279-295.
106. Robinson JD, Flashner MS. The ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) activated ATPase. Enzymatic and transport properties. *Biochim Biophys Acta* 1979;549:145-176.
107. Schwartz A, Lindenmayer, GE, Allen JC. The sodium-potassium adenosine triphosphatase: Pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol Rev*. 1975;27:3-134.
108. Macknight ADC, Leaf A. Regulation of cellular volume. *Physiol Rev*. 1975;57:510-573.
109. Frega NS, DiBona DR, Guertler B, Leaf A. Ischemic renal injury. *Kidney Intern*. 1976;10(Suppl):17-25.
110. Jennings RB, Ganote CE. Structural changes in myocardium during acute ischaemia. *Circulation Res*. 1974;34,35(Suppl III):156-168.
111. Whalen DA, Hamilton DG, Ganote CE, Jennings RF. Effect of a transient period of ischaemia on myocardial cells. I. Effect on volume regulation. *Am J Pathol*. 1974;74:381-398.
112. Yan CG, Chen J, Yamada KA, Kleber AG, Corr PB. The contribution of shrinkage of extracellular space to extracellular K^+ accumulation in myocardial ischaemia of the rabbit. *J Physiol*. 1996;490:215-228.
113. Staub F, Mackert B, Kempfski O, Haberstock J, Peters J, Baethmann A. Schwellung und Schädigung von Nerven- und Gliazellen durch Azidose. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 1994;29:203-209.
114. Sánchez-Amass S, Blaustein MP. Role of calcium-sodium exchange in regulation of intracellular calcium in nerve terminals. *Am J Physiol*. 1987;252:C595-C603.
115. Tatsumi H, Katayama Y. Regulation of the intracellular free calcium concentration in acutely dissociated neurons from rat nucleus basalis. *J Physiol*. 1993;464:165-181.
116. Cervetto L, Lagnado L, Perry RJ, Robinson DW, McNaughton PA. Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. *Nature*. 1989;337:740-743.
117. Kennedy HJ, Thomas RC. Intracellular calcium and its sodium independent regulation in voltage-clamped snail neurons. *J Physiol*. 1995;484:533-548.
118. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*. 1982;217:1214-1222.
119. Bowlus RD, Somero GN. Solute compatibility with enzyme function and structure: Rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. *J Exp Zool*. 1979;208:137-152.
120. Puigbó JJ. La fragua de la medicina clínica y de la cardiología. Caracas: Universidad Central de Venezuela y Fundación Polar; 2002.
121. Lamson PD. The heart rhythms. Baltimore: Williams and Wilkins and Co.; 1921.
122. Keynes RE, Bennet MVL, Grundfest H. Studies on the morphology and electrophysiology of electric organs. II. Electrophysiology of the electric organ of *Malapterurus electricus*. En: Chagas C, Paes de Carvalho A, editores. *Bioelectrogenesis*. Proceedings of the symposium on Comparative Bioelectrogenesis, Rio de Janeiro, August 1959. Amsterdam, Elsevier Publishing Co.; 1961.p.102-112.