



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“ASPECTOS FISIOLÓGICOS DEL TRANSPORTE ACTIVO DEL
ROJO DE CLOROFENOL EN TUBULOS RENALES DE CARPA
(Cyprinus carpio)”**

Tesis Profesional

**Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

p r e s e n t a

JUAN MANUEL PONS GUTIERREZ

Asesores:

M.V.Z. LUIS OCAMPO CAMBEROS

BIOL. NORA BARQUIN ALVAREZ

M.V.Z. ANA E. AURO ANGULO



México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNAM
1984
P6415
e.j.a
P-t-84-142a

IN REPLY TO LETTER DATED 11/11/83
FROM THE DIRECTOR, FBI
RE: [illegible]

On this date, [illegible] advised that [illegible]

UNIVERSITY OF

of the State of [illegible]

Department of [illegible]

at [illegible]

has advised that [illegible]

is currently [illegible]

MI SINCERO AGRADECIMIENTO A: •

MVZ LUIS OCAMPO CAMBEROS

BIOL. NORA BARQUIN ALVAREZ

MVZ ANA E. AURO ANGULO

MVZ LUIS MCNTAÑO RAMIREZ

DE IGUAL MANERA, DOY LAS GRACIAS A TODAS LAS PERSONAS
QUE DE ALGUNA MANERA ME AYUDARON PARA LA REALIZACION
DE ESTA TESIS Y EN ESPECIAL A LAURA MADRID CHILPA, -
POR EL TRABAJO DE MECANOGRAFIA.

A MIS PADRES :

JUAN PONS PONS

LEONOR GUTIERREZ DE PONS

A MIS HERMANOS:

JUAN ANTONIO

LEONOR

JUAN CARLOS

MARTIN LUIS

A MI TIA:

SOLEDAD LUCIO

" ASPECTOS FISIOLÓGICOS DEL TRANSPORTE ACTIVO
DEL ROJO DE CLOROFENOL EN TUBULOS RENALES -
DE CARPA (Cyprinus carpio) ".

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS	17
DISCUSION	27
CONCLUSIONES	30
LITERATURA CITADA	31

TITULO: "ASPECTOS FISIOLÓGICOS DEL TRANSPORTE ACTIVO DEL ROJO DE CLOROFENOL EN TUBULOS RENALES DE CARPA (Cyprinus carpio)".

AUTOR: PMVZ JUAN MANUEL PONS GUTIERREZ

ASESORES: MVZ LUIS OCAMPO CAMBEROS

BIOL. NORA BARQUIN ALVAREZ

MVZ ANA ESTELA AURO ANGULO

RESUMEN:

El transporte activo es un proceso fisiológico que se efectúa frecuentemente en los organismos vivos. A diferencia de la difusión, es necesaria la presencia de energía para la realización de este fenómeno, el cual puede actuar en contra de un gradiente de concentración, eléctrico - de presión o electroquímico. Por ser un mecanismo aeróbico, la presencia de oxígeno es esencial.

Con el fin de demostrar el transporte activo, se utilizó el colorante rojo de clorofenol, así como sustancias inhibitoras de dicho mecanismo, tales como, la azida de sodio y el 2-4 dinitrofenol, además de soluciones salinas básicas, carentes de sales de calcio y potasio, en las cuales fueron depositados túbulos renales de 20 carpas (Cyprinus carpio), mantenidos bajo una oxigenación adecuada.

Mediante esta experimentación, se demostró que el transporte activo se lleva a cabo solo cuando la oxigenación del medio es adecuada. La presencia de la azida de sodio y el 2-4 dinitrofenol inhibió el proceso, ya que actúan sobre la síntesis de energía, mientras que la ausencia de calcio y potasio, tuvo como consecuencia que el transporte activo no se efectuara, debido a que juegan un papel muy importante en la reabsorción y excreción tubular.

INTRODUCCION

Dentro de los fenómenos importantes que se presentan en la Fisiología se encuentran los mecanismos mediante los cuales, las sustancias (agua, - lípidos, aminoácidos, azúcares, iones etc), atraviesan la membrana celular. Estos mecanismos se pueden reducir a dos procesos principales, que son: La Difusión y el Transporte Activo.

La expresión transporte activo, se aplicó originalmente a los procesos que no podían ser explicados por la simple difusión.(16).

Actualmente se denomina transporte activo, al movimiento de una sustancia que atraviesa la membrana celular en contra de un gradiente de concentración, eléctrico, de presión o electroquímico. (6,15,21).

Es bien conocido que la energía es necesaria para que este mecanismo se lleve a cabo, comprobándose a menudo que la supresión del suministro de ella, suspende el proceso del transporte activo. (7,12,16,20).

El gasto de energía mencionado depende de las células, esta energía es producto de procesos metabólicos intracelulares, como lo es la glucólisis. (12,16).

Así, se han elaborado hipótesis que explican el mecanismo del transporte activo, con base en complejas reacciones bioquímicas, que involucran a una molécula transportadora y a la sustancia que va a ser transportada. (7,20).

Es una forma mas concreta se puede establecer que el transporte activo se efectúa, utilizando la energía proporcionada del interior de la membrana, por sustancias altamente energéticas, principalmente el ATP, que se haya dentro del citoplasma de la célula y se hidroliza a ADP y fosfato, existiendo una relación entre el número de moléculas hidrolizadas de ATP - y el número de moléculas transportadas. Posteriormente se requiere de un transportador o portador y la sustancia que va a ser transportada, los - cuales van a formar una combinación química en el límite celular. Este complejo se mueve a través de la membrana, penetrando a la célula por simple difusión (8,15,20,21).

Para que esto sea posible, es necesario que haya una afinidad natural entre la sustancia que va a ser transportada y el portador, de tal manera que en la superficie externa de la membrana, el portador y la sustancia - se lleguen a combinar fácilmente (8).

Cuando el complejo (portador-sustancia), ha difundido hacia la superficie interna de la membrana, su afinidad disminuye, por lo que se separan. Por lo tanto, la sustancia transportada se libera al interior de la membrana y no puede difundir hacia el exterior a través de la matriz lipídica de la membrana, por ser insoluble a ella.

Posteriormente, el portador difunde hacia la superficie externa para transportar nuevamente otra molécula de sustancia al interior.(8,10,20).

La temperatura es otro factor que interviene en el mecanismo del transporte activo (a diferencia de los procesos de difusión, en los que la temperatura no es un factor determinante entre cierto rango), de tal forma que al descender la temperatura del tejido, disminuye el transporte activo, hasta el punto que puede no llevarse a cabo; siendo un proceso reversible, demostrándose así la relación entre el metabolismo celular y este fenómeno. (15,22).

Un rasgo especial del transporte activo, es el hecho de que la sustancia transportada activamente, alcanza un valor máximo o de saturación. Esta saturación resulta de la limitación de la cantidad de portador, que además muestra competencia y especificidad. (8,15,16,25).

Con respecto al portador en el transporte activo, varios experimentos han demostrado que se encuentra en la membrana celular. Los experimentos que se han realizado, han sido principalmente para caracterizar a la enzima que transporta a los iones de sodio y potasio. En 1957, los experimentos de Skon, llevados a cabo en nervios de cangrejo, demostraron que esta enzima tenía una actividad de ATPasa. Se propuso entonces, que la enzima que se encargaba de transportar estos dos iones, era la responsable de la hidrólisis del ATP.

Otros experimentos que dieron luz sobre la naturaleza de esta enzima

fueron los realizados con eritrocitos de mamíferos, los cuales eran lisados con un choque hipotónico, de manera que todo el contenido citoplasmático era desechado, las vesículas reconstituidas, eran capaces, bajo condiciones iónicas apropiadas, de realizar el transporte activo. (14).

Recientemente se ha aislado esta ATPasa de células de mamíferos y ha sido caracterizada como una proteína, con dos diferentes cadenas polipeptídicas; alfa y beta, de pesos moleculares de 90,000 y 40,000 daltones respectivamente. (22).

Sin embargo se dice que el ATP no es el único energético usado en este mecanismo, pues en los procesos de transporte activo de algunos azúcares y aminoácidos, no se han encontrado ATPasas. (9,22).

Una forma de evaluar la importancia de la actividad de la ATPasa, es que del 20 al 30% del ATP generado por el metabolismo, se consume durante el transporte activo de los iones de sodio y potasio, mediante esta enzima. (9).

Un transportador puede ser específico para una sola sustancia, o bien para dos o mas sustancias que estén estrechamente relacionadas, con lo cual será posible que utilicen al mismo portador. (22,25).

Para casi todas las sustancias transportadas activamente, existe -

una cantidad máxima de resorción posible, que recibe el nombre de transporte máximo o máxima de transferencia (T_m), que está dado por la cantidad de portadores disponibles. En los túbulos proximales del riñón, el T_m está usualmente por arriba de las cantidades filtradas; en consecuencia los riñones protegen contra la pérdida de determinadas sustancias (glucosa, aminoácidos, metabolitos, algunas vitaminas hidrosolubles y otros más), pero no ayudan a regular sus concentraciones plasmáticas. (8,15,25).

En los túbulos proximales las sustancias deben transportarse a través del epitelio tubular. Las células de las paredes de los túbulos, son más anchas en sus bases, situadas sobre una membrana basal, en la que sus bordes libres están en contacto con la luz. Los límites entre células vecinas no pueden verse bien, porque los bordes de las células que tocan una con otra, están dentados, con las proyecciones del borde de una, adaptándose a los huecos del borde de la otra. Las superficies celulares que miran a la luz, están cubiertas de microvellosidades, esto explica la apariencia de borde estriado, teniendo también una matriz gelatinosa entre ellas. Además existen espacios intercelulares que han sido observados por medio del microscopio electrónico, los cuales miden de 20 a 40 Armstrongs. (9,11).

Los mecanismos que intervienen en el transporte activo tubular, se -

conocen casi con certeza, de tal forma que hay pruebas de que la reabsorción de glucosa en el túbulo proximal, se efectúa por procesos de fosforilación y desfosforilación sucesivos, en los que interviene la fosforilasa reduciendo con frecuencia la concentración intraluminal, virtualmente a cero. En cuanto a los procesos de secreción tubular, hay estudios sobre el transporte del paraamino hipurato, Diodrast* y rojo fenol, que parecen indicar que en la excreción de estas sustancias, intervienen procesos de fosforilación aeróbica. (12).

Actualmente se ha encontrado que el proceso secretorio completo para una sustancia dada comienza con su difusión simple hacia afuera de los capilares peritubulares en dirección al líquido intersticial y posteriormente hacia el interior del lumen del túbulo, por medio del transporte activo. Sin embargo en algunos casos estas sustancias pasan por medio de difusión simple.(25).

Hay sustancias que inhiben el transporte activo, como son el 2-4 - dinitrofenol y la azida de sodio. En el caso del primero, se cree que promueve la transferencia de protones del hidrógeno a través de la membrana de la mitocondria, utilizando de este modo la energía del transporte elec

*Colorante biológico a base de yoduro, utilizado para medir la excreción tubular.

trónico, desacoplando así, la fosforilación oxidativa. En presencia de este agente puede continuar la respiración de los tejidos y aún ser estimulada, pero la fosforilación acoplada del ADP al ATP no tiene lugar. (12,15,19,21).

Por otro lado la azida de sodio, actúa reaccionando con el sistema citocromo oxidasa, del cual se obtienen gran parte de los compuestos fosforados que proporcionan al organismo gran energía. (1,2,5,24).

El estudio del transporte activo se ha efectuado en diferentes preparaciones animales (3,4,13,18), principalmente en ranas, renacuajos y peces. Aparentemente, en los peces el mejor modelo es el desarrollado por Forster en el lenguado. (4).

Estas técnicas se han ido modificando hasta optimizarse, por ejemplo, se recomienda el uso del rojo de clorofenol, en lugar del rojo fenol, ya que el primero, tiene la ventaja de que su color permanezca estable en las variaciones de pH y no se modifica el transporte del colorante, sin embargo, cuando se usa el rojo fenol, se necesita que el pH del medio sea de 8 para que se pueda llevar a cabo el transporte.

Así mismo, se han hecho estudios del transporte de otros colorantes, como son: el verde de bromofenol, azul de bromofenol, colorantes básicos

como el rojo neutro, etc. y se ha encontrado que su entrada al lúmen, no depende de energía, ni se modifica con la temperatura, por lo tanto no puede decirse que sea un mecanismo de transporte activo el que esté involucrado.(4).

El transporte del rojo de clorofenol está bien caracterizado; se sabe que solo se lleva a cabo cuando hay una buena oxigenación de las preparaciones, indicando que este proceso depende principalmente del metabolismo aeróbico. Los efectos inhibitorios de la azida y el cianuro, sugieren que en el transporte activo interviene el sistema de la citocromo oxidasa. Por último, el efecto del 2-4 dinitrofenol, evidencia que los enlaces de energía de fosfatos están involucrados.(13).

Otro aspecto interesante en el transporte del rojo de clorofenol, es la presencia de potasio y calcio en el medio, ya que el transporte activo del colorante se incrementa al aumentar la cantidad de potasio y la excreción del colorante en la orina tubular, requiere calcio. (26).

HIPOTESIS

En los túbulos renales de los vertebrados, se produce la absorción y excreción de sustancias por medio del transporte activo. El rojo de clorofenol es una sustancia que penetra a los túbulos por medio de este proceso. Para demostrar este fenómeno, se utilizan preparaciones de riñones de carpa, en un medio salino básico y burbujeados con una mezcla de CO_2 al 5% y O_2 al 95%.

OBJETIVOS

1. Demostrar que existe el transporte activo en los túbulos renales de la carpa (Cyprinus carpio), utilizando el rojo clorofenol como indicador de este fenómeno.

2. Demostrar que hay diferencia en el transporte activo del colorante medida por graduación empírica en intensidad (-, X, XX, XXX, XXXX), debidas a:
 - a) Concentración del colorante
 - b) Tiempo de observación
 - c) Eliminación de sales y adición de venenos metabólicos en el medio

3. Establecer la posibilidad de introducir este trabajo como práctica de Fisiología General.

MATERIAL Y METODOS

1. Obtención, sacrificio y disección de los especímenes.

En este trabajo, se utilizaron dos lotes de carpas (Cyprinus carpio) un lote A de 15 especímenes, en el cual se variaron las concentraciones de rojo de clorofenol y otro lote B de 5 animales, donde fueron eliminadas sales y adicionados venenos metabólicos al medio.

Estos peces se adquirieron en el Mercado de "La Merced", de la ciudad de México, con un tamaño promedio de 15 cms. de largo por 5 cms. de ancho. Se trasladaron de inmediato al laboratorio de Fisiología de la FM-VZ de la U.N.A.M., en bolsas de polietileno, conteniendo agua debidamente oxigenada. Posteriormente se procedió al sacrificio por decapitación, mediante unas tijeras grandes, después se hizo una incisión longitudinal a partir de las branquias y hasta el poro urogenital, incidiendo transversalmente hasta la columna vertebral, se evisceró y con unas pinzas de disección fueron extraídos los riñones, los cuales estaban adosados a la parte dorsal del pez, entre la columna vertebral y la aorta, siendo de un color café-rojizo y de consistencia pulposa. (Fig. #1).

2. Preparación del tejido y oxigenación.

Los riñones así obtenidos, se trasladaron a una caja de Petri, conteniendo una solución salina básica (SSB) (cuadro #1). Con tijeras se corta

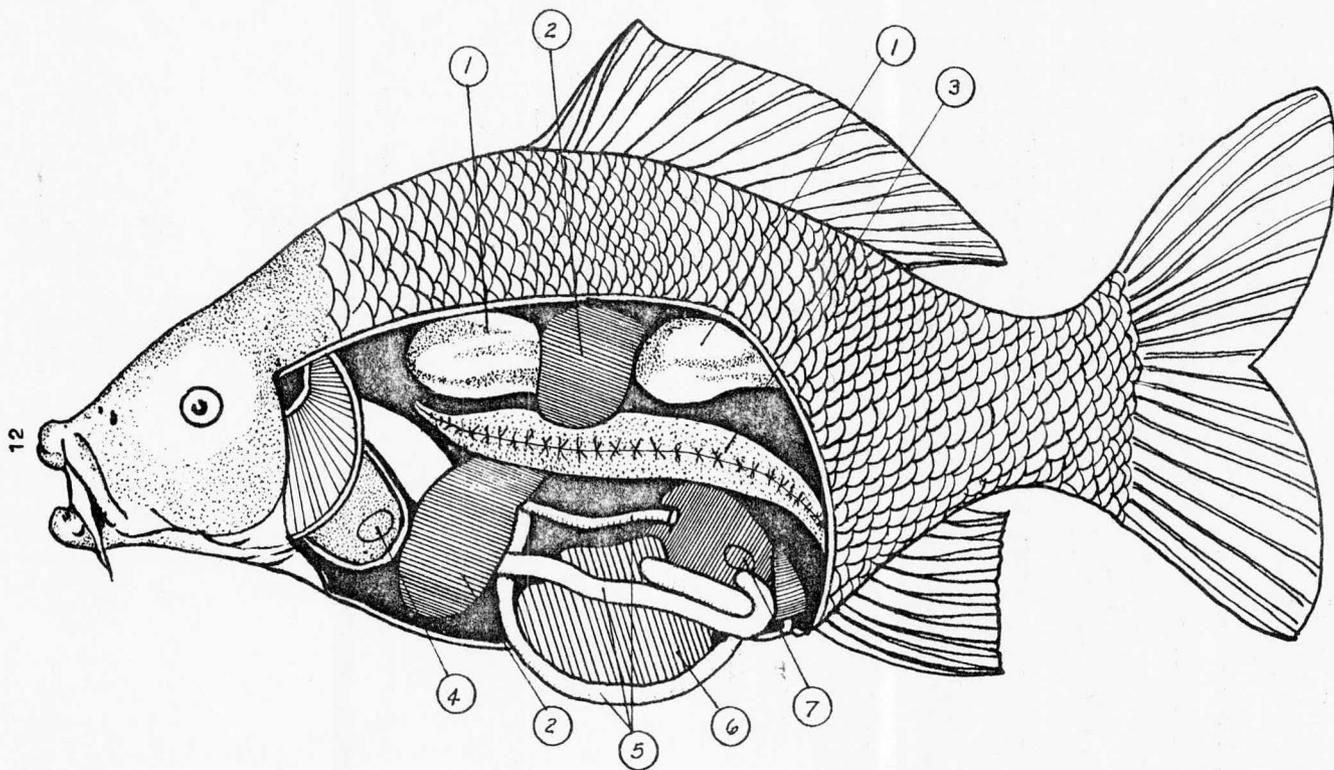


FIG. 1 ANATOMIA DE LA CARPA:

- | | |
|------------------------|---------------|
| 1. Vejiga natatoria, | 4. Corazón |
| 2. Riñón. | 5. Intestino. |
| 3. Ovario o Testículo. | 6. Bazo. |
| | 7. Hígado |

ron en pequeños trozos de 5 mm, los cuales son reducidos aproximadamente a 1 mm, al hacerlos pasar por una aguja, mediante la presión de una jeringa. Para oxigenar el medio, se usó un dispositivo que consiste en un frasco con tapón de hule horadado, del cual salen ocho mangueras de hule con diámetro aproximado de 5 mm, que tienen en su otro extremo agujas del número 22. El frasco va conectado a un tanque con oxígeno al 95% y bióxido de carbono al 5%, equipado con un manómetro, con lo que se asegura que haya una buena oxigenación, como es posible observarla en la Fig. #2 (10).

Quadro 1

Componentes de la solución salina básica (SSB)

COMPUESTO	g/l
NaCl	5.8
KCl	0.19
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.22
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.20
NaHCO ₃	1.26
NaHPO ₄ .H ₂ O	0.07

Fuente: _____(10)

3. Optimización del tiempo y concentración del rojo de clorofenol

En el lote A de 15 peces se determinó la concentración ideal y el -

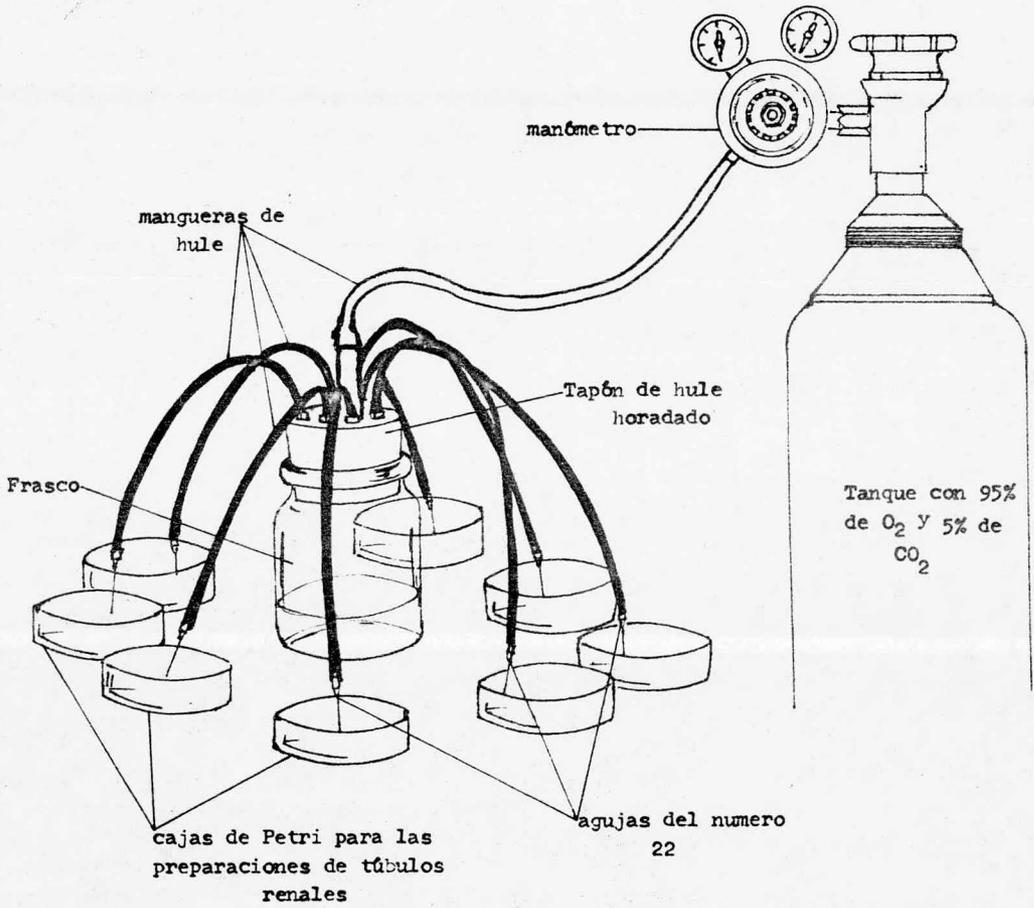


FIG. 2 Aparato para oxigenación.

tiempo óptimo de transporte activo del rojo de clorofenol. Las concentraciones utilizadas fueron: 1, 2.5, 5, 10 y 20 mg/100 ml. Los tiempos utilizados fueron: 5, 10, 20, 30 y 60 minutos.

4. Efectos sobre el transporte activo causados por la ausencia de calcio y potasio.

Después de haber obtenido el tiempo y la concentración óptimos, se prepararon soluciones sin calcio y sin potasio al eliminar el cloruro de calcio y el fosfato de sodio de la SSB y fueron mezcladas con la concentración ideal de rojo de clorofenol y colocados los trocitos de riñón en las cajas de Petri, se sometieron posteriormente a la observación microscópica.

5. Efectos de los venenos metabólicos sobre el transporte activo.

Esta parte del trabajo se realizó junto con el punto anterior, utilizando el lote B de 5 peces. Aquí se adicionó a la SSB además de la concentración óptima de rojo de clorofenol, azida de sodio a una concentración de 18 mg/100 ml en una caja de Petri y 18.4 mg/100 ml de 2-4 dinitrofenol en otra caja. También se ponen preparaciones de riñón en SSB con rojo de clorofenol como testigo, así como las preparaciones descritas en el punto 4 (cada preparación va en su respectiva caja de Petri), observando los túbulos renales al microscopio

6. Observación

A los 5, 10, 20, 30 y 60 minutos, se colocaron trocitos de ríñón de 1 mm. de diámetro, de las distintas cajas, entre un porta y un cubreobjetos, siendo llevados a un microscopio de luz simple y utilizando los objetivos de 10X y 40X, se localizaron los túbulos en donde penetró el colorante, anotándose la acumulación en base a una escala arbitraria, desde la mínima (X) a la máxima (XXXX), o bien (-) cuando no hubo presencia del colorante.

La escala tiene la siguiente equivalencia: (-) no se efectuó el transporte, (X) intensidad ligera, (XX) intensidad buena, (XXX) intensidad muy buena, (XXXX) y sobrecoloración o saturación. Posteriormente se utilizó la prueba W de Kendall o coeficiente de concordancia, con una población N igual a 25, para determinar el grado de semejanza, siendo estadísticamente significativa, siempre y cuando la diferencia sea mayor al 5%.

(17,23).

RESULTADOS

Con base en el método descrito, al ser observados los fragmentos renales, se apreció a los 5 minutos, la entrada del colorante a los túbulos de las preparaciones que contenían las concentraciones de 2.5 a 20 mg/100 ml, notándose una clara diferencia con la concentración de 1 mg/100 ml, - en donde la presencia del rojo de clorofenol no fue tan clara. La coloración dentro del lumen tubular dada por el colorante es rosa.

A los 10 y 20 minutos, la coloración se hizo mas evidente, incluyendo la concentración de 1 mg/100 ml, siendo posible ver el lumen coloreado con mayor facilidad, aunque no con la misma intensidad de las otras concentraciones.

Observando a los 30 minutos, el número de túbulos coloreados aumentó haciéndose mas sencilla la localización de los fragmentos tubulares en - donde el transporte activo se llevó a cabo.

Las muestras tomadas al transcurrir 60 minutos, mostraron una mayor cantidad de túbulos que indicaban la presencia del rojo de clorofenol, - así como un aumento en la intensidad del color. Esto se pudo observar en las concentraciones de 2.5 a 20 mg, mientras que en la de 1 mg, la respuesta fue similar a la que se observó en las otras concentraciones a - los 30 minutos. (Cuadro #2).

En la observación de las concentraciones de 5, 10, y 20 mg/100 ml, - algunos fragmentos de tejido no pudieron ser vistos claramente, ya que la presencia de cristales del colorante, interfería con la preparación. También la intensidad del colorante en el medio en el que se encontraban oxigenando los túbulos renales, en las preparaciones mas altas, dificultó - la extracción de los fragmentos, ya que al ser tan concentrada la solu--ción, no se podía distinguir tan fácilmente el tejido.

Para obtener el tiempo y la concentración óptimos, se utilizó la - prueba de Kendall, dándoles rangos a los resultados representados por marcas, así, la menor cantidad estará representada por el valor 1 y se incrementará hasta la cifra mas alta (como se observa en el cuadro #3), esto se hizo después de haber obtenido un promedio de los resultados del lote A, con 5 concentraciones distintas y 5 tiempos de observación.

La fórmula utilizada para esta prueba estadística es la siguiente:

$$W = \frac{S}{1/12 (K^2) (N^3 - N)}$$

Donde:

W Coeficiente de concordancia

S Suma de cuadrados de las desviaciones observadas de la media

K Número de conjuntos de rangos

N Número de individuos ordenados

Cuadro 2

Resultado promedio representativo del lote A de 15 peces, donde se varió la concentración de rojo de clorofenol (dada en mg/100 ml) y el tiempo - (dado en minutos).

	TIEMPO				
	5	10	20	30	60
Concentración					
20	X	XX	XX	XXX	XXXX
10	X	XX	XX	XXX	XXXX
5	X	XX	XX	XXX	XXXX
2.5	X	XX	XX	XXX	XXXX
1	X	X	X	XX	XXX

Cuadro 3

Promedio del lote A de 15 peces, el tiempo está dado en minutos y la concentración en mg/100 ml, los números entre paréntesis, son los rangos -- asignados a cada valor, el Rj es la suma de los rangos.

	TIEMPO				
	5	10	20	30	60
Concentración					
20	15 (3)	23 (5)	32 (7)	42 (8)	58 (10)
10	15 (3)	23 (5)	32 (7)	42 (8)	58 (10)
5	15 (3)	23 (5)	32 (7)	42 (8)	58 (10)
2.5	15 (3)	23 (5)	32 (7)	42 (8)	58 (10)
1	5 (1)	13 (20)	18 (4)	30 (6)	43 (9)
Rj	(13)	(22)	(32)	(38)	(49)

Substituyendo los valores obtenidos, tenemos:

$$W = \frac{3839.06}{1/12 (5^2) (253 - 25)} = 0.118$$

El grado de concordancia o semejanza entre los grupos de observación a diferente tiempo, es de 11.8% por lo que es mayor al 5%.

Difieren un 88.2%, debido al tiempo en que fué efectuada la observación.

Esto significa que 60 minutos (ya que tiene el Rj mayor, igual a 49) es el tiempo óptimo de observación y es estadísticamente significativo.

Después se utilizó la prueba Kendall, para probar el coeficiente de concordancia entre las concentraciones del colorante utilizado, en los diferentes grupos. (Cuadro #4).

Cuadro 4

	20	10	5	2.5	1	mg/100 ml
Rj	33	33	33	33	22	

Rj Suma de rangos

Substituyendo los valores en la fórmula, tenemos:

$$W = \frac{3132.46}{32448} = 0.0965 \text{ mayor que } 0.05$$

El grado de concordancia es del 9%. Difieren en un 91% debido a la concentración y esta diferencia es estadísticamente significativa. Esto quiere decir que tanto a 20, 10, 5 y 2.5 mg/100 ml, la intensidad de coloración que mide el transporte activo, es óptima, pues su R_j fué el mayor, igual a 32.

Una vez obtenidos la concentración y el tiempo óptimos (2.5 mg y 60 minutos), se formó el lote B de 5 peces con las mismas características de tamaño, destinando sus riñones a los siguientes medios: SSB sin potasio, SSB sin calcio, SSS con 18 mg/100 ml de azida de sodio, SSB con 18.4 mg/100 ml de 2-4 dinitrofenol y SSB como testigo, todas las soluciones contenían además rojo de clorofenol a 2.5 mg/100 ml como indicador.

Transcurrido el tiempo fijado de 60 minutos y al ser observadas las muestras al microscopio, el resultado obtenido en los diferentes medios es el que sigue:

Los fragmentos con SSB más rojo de clorofenol, mostraron claramente la presencia del indicador, evaluándose con cuatro marcas. En las otras soluciones no se presentó el fenómeno, aunque en tres de las preparaciones que carecían de calcio, se observó, aunque no claramente, evidencia del proceso del transporte activo. (Cuadro #5).

Cuadro 5

Resultado promedio representativo del lote B de 5 peces, donde se utilizan distintas soluciones que son: rojo de clorofenol (RCF), sin potasio (S/K), sin calcio (S/Ca), con azida de sodio (C/Az) y con 2-4 dinitrofenol (C/DNP), en distintos tiempos (dado en minutos), la X es la mínima de transporte activo, la XXXX es la máxima y (-) no se realizó el transporte activo.

	TIEMPO				
	5	10	20	30	60
Solución					
RCF	X	XX	XX	XXX	XXXX
S/K	-	-	-	-	-
S/Ca	-	-	-	-	X?
C/Az	-	-	-	-	-
C/DNP	-	-	-	-	-

Se utilizó también el coeficiente de concordancia de Kendall, para probar el índice de divergencia del acuerdo efectivo mostrado, en los datos de máximo acuerdo posible (perfecto) entre los diferentes tiempos de observación, tomando en cuenta el promedio obtenido del lote B, con 5 diferentes soluciones y también 5 tiempos de observación, como se muestra en el cuadro #6.

Utilizando la fórmula y substituyendo los diferentes valores, tenemos:

$$W = \frac{396.02}{32500} = 0.012 \quad \text{menor a } 0.05$$

W igual a 12 expresa el grado de semejanza entre las observaciones, a los diferentes tiempos; esta semejanza es de 1% y difieren en un 99%.

El mejor tiempo de observación, fué el de 60 minutos, ya que su R_j fué de 14, es decir el mayor, además de que el tiempo óptimo del transporte activo del rojo de clorofenol ya se había establecido en el lote A. Aunque en este caso, la prueba estadística no es significativa, mediante la observación directa del proceso, se puede establecer, que la diferencia de resultados en los tiempos de observación, son variables y verdaderas.

También se utilizó el coeficiente de concordancia de Kendall entre las soluciones en donde se adicionaron venenos metabólicos y se eliminaron sales.

CUADRO 6

Promedio del lote B de 5 peces, el tiempo está dado en minutos, las soluciones empleadas son: (RCF) rojo de clorofenol, (S/K) sin potasio, (S/Ca) sin calcio, (C/Az) con azida de sodio y (C/DNP) con 2-4 dinitrofenol, los números entre parentesis, son los rangos asignados a cada valor, el Rj es la suma de los rangos.

	TIEMPO				
	5	10	20	30	60
Solución					
RCF	5 (4)	7 (5)	10 (6)	15 (7)	20 (8)
S/K	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
S/Ca	0 (1)	0 (1)	1 (2)	1 (2)	3 (3)
C/Az	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
C/DNP	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
Rj	(8)	(9)	(11)	(12)	(14)

Quadro 7

	RFC	S/K	S/Ca	C/Az	C/DNP
Rj	30	5	9	5	5

$$W = \frac{387.96}{32448} = 0,025 \text{ menor a } 0.05$$

El grado de semejanza entre grupos es de un 2.5% y difieren en un 97.5%, la solución en donde se llevó el transporte activo a efecto fué en la testigo, además su Rj fué el mayor, igual a 30. (Quadro #7).

Estadísticamente la diferencia entre grupos no es significativa, pero la observación indica que la eliminación de sales o la adición de venenos metabólicos, inhiben el transporte activo.

DISCUSION

Es importante mencionar cual fué el criterio para determinar que un túbulo estaba coloreado por la presencia del rojo de clorofenol en el lúmen. En primer lugar, el tono rosa dentro del túbulo, debe ser el mismo que tiene la SSB más el colorante en donde está sumergido, a pesar de que al observar la preparación en el microscopio, no se alcance a percibir el color rosa del medio. Este color se observa dentro del túbulo una vez que se ha acumulado el colorante suficiente para que se aprecie el tono rosa dentro del lúmen (aproximadamente 5 minutos después de haberlo sumergido en la SSB con el colorante).

La entrada del colorante es un proceso dinámico, por lo tanto, cuanto mas tiempo ha pasado el fragmento de tejido en el colorante, la intensidad con que se tiñan los túbulos será mayor.

Otro aspecto importante, es que al cambiar el objetivo de 10X a 40X, no se pierde la coloración en el lúmen . Tomando en cuenta lo anterior, - los túbulos que tenían las características antes mencionadas, se tomaron como positivos.

Considerando los resultados, se puede decir que la intensidad de tinción óptima se lleva a cabo a los 60 minutos mientras que el transporte - óptimo se obtiene con cualquiera de las siguientes concentraciones: 20, -

10, 5 ó 2.5 mg/100 ml, por lo que con finalidades prácticas (facilidad para extraer los fragmentos renales del medio y la no interferencia de cristales en la observación) y de ahorro, se deberá escoger la solución de 2.5 mg/100 ml.

En lo que respecta a la parte del trabajo donde son añadidos venenos metabólicos y eliminadas sales, el transporte activo solo se llevó a cabo en el medio compuesto por la SSB y el rojo de clorofenol, mientras que en las otras preparaciones, la falta de sales de calcio y potasio, hacen que el fenómeno no se lleve a efecto. Así mismo, los medios que contenían la azida de sodio y el 2-4 dinitrofenol, no presentaron transporte activo, ya que dichas sustancias interfieren con los procesos energéticos celulares.

Cuando se hizo la observación del tejido que se encontraba en la SSB sin calcio, al hacer el cambio de objetivo de 10X a 40X, el color del lumen del túbulo desaparecía, por lo que no se puede determinar con seguridad, si en esa preparación se efectuó el transporte activo, aunque lo más probable es que no se haya llevado a cabo, pues la presencia de calcio en el medio es necesaria para la realización de este fenómeno.

Para que los resultados fueran satisfactorios, el uso de una concentración adecuada de oxígeno es importante, ya que anteriormente se utili-

zó una bomba de aireación de las usadas en acuarios, obteniéndose resultados negativos, es decir, que el transporte activo no se llevo a efecto, - puesto que el colorante no penetró en los túbulos renales, por lo que se decidió realizar la oxigenación con un tanque que contenía una mezcla de 95% de oxígeno y 5% de bióxido de carbono.

Se ha visto que el transporte activo del rojo de clorofenol en los túbulos renales de la carpa, es dependiente del ATP, ya que cuando se pone en el medio un inhibidor de la fosforización, como es el 2-4 dinitrofenol, el transporte activo no se lleva a cabo, sin embargo no se pudo determinar si la enzima que interviene en el transporte del rojo de clorofenol sea una ATPasa del tipo de la que transporta sodio y potasio, debiéndose utilizar para su identificación un inhibidor específico de esta enzima, como es la ouabaina.

Por otro lado, aunque se determinó el tiempo óptimo del transporte activo, no se puede decir como es el resultado cuando se alarga el tiempo a mas de 60 minutos, que por motivos prácticos, fue el límite en lo que respecta a lapso de observación.

CONCLUSIONES

Por medio de este trabajo, se pudo demostrar objetivamente el transporte activo, utilizando los túbulos renales de la carpa (Cyprinus carpio) y el rojo clorofenol como indicador.

La presencia de oxígeno en el medio es necesaria, para que el transporte activo se lleve a cabo (ya que este es un proceso aeróbico) y la ausencia adecuada de este gas, imposibilita la realización del proceso. Así mismo, la ausencia de sales o la adición de venenos metabólicos al medio salino básico, demostraron que pueden afectar el proceso, ya que en los casos de adición de azida de sodio y 2-4 dinitrofenol, actúan inhibiendo la síntesis del ATP, por lo que la energía necesaria para la realización del transporte activo, no es suministrada. Cuando en el medio faltan sales de potasio o de calcio, el transporte del colorante no se efectúa, pues son necesarios estos elementos para la penetración de la sustancia que va a ser transportada, así como para su excreción.

Aunque las distintas concentraciones de colorante utilizadas, no mostraron diferencia en cuanto a efectividad (excepto la menor), por cuestiones prácticas se recomienda la concentración de 2.5 mg/100 ml, de igual manera se establece que el tiempo ideal de observación es a los 60 minutos .

LITERATURA CITADA

1. Casarett, L.J. and Doull, J: Toxicology, The Basic Science of Poisons Mc Millan Co, New York, 1975.
2. Dipalma. J.R.: Drill's Pharmacology in Medicine, 4th, ed., Mc Graw - Hill Book Company, New York, 1971.
3. Forster, R.P. Use of thin kidney slices and insolated renal tubules - for direct study of cellular transport Kinetics, Science, 108:65-67 - (1948).
4. Forster, R.P. and Hong, S.K. In vitro transport of dyes by insolated renal tubules of the flounder as disclosed by direct visualization. - Intracellular accumulation and transcellular movement, J. Cell. Comp. Physiol., 51: 259-272 (1956).
5. Gaddum, J.: Gaddum's Pharmacology, 2nd. ed., Oxford University Press, London, 1972 .
6. Gordon, S.M.: Animal Physiology, Principles and Adaptations, 2nd. ed, Mc Millan Co., New York, 1972.
7. Griffin, D.R. y Novick, A.: Estructura y Función Animal, Compañía Editorial Continental, México, DF. 1976.
8. Guyton, A.C.: Tratado de Fisiología Médica, 5a. ed., Interamericana, - México, D.F. 1977.
9. Ham, W.H.: Tratado de Histología, 6a. ed., Interamericana, México, D. F. 1970.
10. Hoar, W.S.: General and Comparative Physiology, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1966.

11. Holtzman, H. and Novikoff, A.D.: Cells and Organelles, 3rd. ed., -
Saunders College Publishing, U.S.A., 1984.
12. Houssay, A.B.: Fisiología Humana, 3a. ed. El Ateneo, Buenos Aires, -
1954.
13. Jaffee, O.C. Phenol red transport in the pronephros and mesonephros -
of the developing frog (Rana pipiens), J. Cell. Comp. Physiol., 44: -
347-361 (1954).
14. Karp, G.J.: Cell Biology, Mc Graw Hill, New York, 1979.
15. Kayser, Ch.: Physiologie, 2a. ed., Editions Médicales Flammarion, Pa-
ris, 1970.
16. Keidel, W.D. : Fisiología, Salvat Editores, Barcelona 1973.
17. Kendall, M.G.: Rank Correlation Methods, Griffin, London, Cap. 6, -
1948.
18. Kinter, W.B. Chlorophenol red influx and efflux: microspectrophotome-
try of flounder Kidney tubules, Am. J. Physiology, 41:1152-1164 (1966)
19. Laguna, J.: Bioquímica, 2a. ed., La Prensa Médica Mexicana, México, -
D.F., 1975.
20. Langley, L.L.: Elementos de Fisiología, 3a. ed., Editorial Acribia, -
Zaragoza, 1973.
21. Lehninger, A.L.: Curso Breve de Bioquímica, Editorial Omega, Barcelo-
na, 1981.
22. Mountcastle, V.B.: Medieval Physiology, 14th. ed., vol. I, C.U. Mosby
Co., St. Louis Missouri, 1980.
23. Siegel, S.: Estadística no Paramétrica, Editorial Trillas, México, -
D.F., 1978.

24. Sollman, T.: Farmacología y sus Aplicaciones, Salvat Editores, Barcelona, 1955.
25. Vander, A.J.: Fisiología Renal, 2a. ed., Mc Graw Hill, México, D.F. - 1980.
26. Wasserman, K., Becker, B.L. and Fishmen, A.P. Transport of phenol red in the flounder renal tubules, J. Cell. Comp. Physiol., 42:385-393 1953.

