



Artículo original

**TRANSPORTE ELECTROGÉNICO
EN EL COLON DE RATAS PRIVADAS DE SODIO:
BLOQUEO DE CANALES EPITELIALES
VERSUS INHIBICIÓN DE LA NA,K-ATPASA**

Carra, Graciela E.; Galella, Flavia; Widenberg, Johan; Ibáñez, Jorge E.; Saraví,
Fernando D.

Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de
Cuyo, Mendoza, Argentina.

Autor correspondiente: Fernando D. Saraví

Correo electrónico de contacto: fernando.saravi@hotmail.es

RESUMEN

La privación dietaria de sodio estimula la secreción de aldosterona. En el colon de rata, la aldosterona elevada aumenta la absorción de Na^+ , pero además torna electrogénico el mecanismo de absorción (normalmente electroneutro). Dicho transporte electrogénico puede suprimirse mediante el bloqueo de los canales epiteliales de Na^+ en la membrana apical o la inhibición de la Na, K-ATPasa de la membrana basolateral. La absorción electrogénica de sodio está estrechamente acoplada al metabolismo aerobio, pero se desconoce si el bloqueo de los canales de Na^+ reduce el consumo de oxígeno en igual medida que la inhibición de la Na, K-ATPasa. Se obtuvieron preparados de mucosa aislada del colon distal de ratas alimentadas con una

dieta hiposódica por 10 días. Se determinó simultáneamente la corriente de cortocircuito y el consumo de oxígeno en condición basal y luego del bloqueo de canales de Na^+ con amilorida (n=12) o de la Na, K-ATPasa con uabaína (n=12). Ambos tratamientos redujeron la corriente de cortocircuito en igual medida (>80%), pero la reducción en el consumo de oxígeno fue mayor con uabaína que con amilorida ($p < 0.03$). Esto se debe probablemente a que la Na, K-ATPasa cumple otras funciones, además del transporte transepitelial de Na^+ , que son suprimidas por la uabaína pero no por la amilorida.

Palabras claves: Aldosterona, Canales epiteliales de sodio, Colon, Na, K-ATPasa, Transporte electrogénico.

ELECTROGENIC TRANSPORT IN SODIUM-DEPRIVED RAT COLON: EPITHELIAL SODIUM CHANNEL BLOCKADE VERSUS NA, K-ATPASE INHIBITION

ABSTRACT

Dietary sodium deprivation stimulates aldosterone secretion. In the rat colon, high aldosterone levels increases Na^+ absorption but also switches the mechanism of Na^+ absorption from electroneutral to electrogenic. Such electrogenic transport may be suppressed by either epithelial Na^+ channel blockade at the apical membrane or Na, K-ATPase inhibition at the basolateral membrane. Electrogenic

Na^+ absorption is tightly coupled to aerobic metabolism, but it is not known whether epithelial Na^+ channel blockade and Na, K-ATPase inhibition cause the same degree of reduction in epithelial oxygen consumption. Distal colon isolated mucosa preparations were obtained from rats fed with a low sodium diet for 10 days. Short-circuit current and oxygen consumption were simultaneously measured in

baseline condition and after either blocking epithelial Na⁺ channels with amiloride (n=12) or the Na, K-ATPase with ouabain (n=12). Both treatments reduced short-circuit current to the same degree, but the reduction in oxygen consumption was larger with ouabain (p<0.03).

Introducción

En el colon de ratas con aporte normal de sodio en la dieta, la absorción de sodio se produce por un mecanismo electroneutro de transporte transcelular acoplado de sodio y cloro.¹ En tal condición, la corriente de cortocircuito – medida del transporte electrogénico – se debe principalmente a secreción de cloruro.¹ La privación de sodio dietario induce un aumento de la secreción de aldosterona, que en el colon causa una supresión de la secreción de cloruro y la expresión de absorción electrogénica de sodio. Esta última se evidencia como una elevada corriente de cortocircuito.²

Dado que la absorción electrogénica de sodio sigue la vía transcelular, puede ser suprimida tanto por interferencia en el ingreso de sodio desde la luz intestinal al enterocito, como impidiendo el egreso del ión del enterocito al intersticio (Fig. 1). La inhibición del ingreso de sodio al enterocito puede lograrse mediante un bloqueante de canales epiteliales de sodio.³ La salida de sodio desde el enterocito al intersticio puede impedirse por inhibición de la Na, K-

The difference may be due to the fact that Na, K-ATPase has other functions besides transepithelial Na⁺ transport, which are suppressed by ouabain but not by amiloride.

Key words: Aldosterone, Colon, Electrogenic transport, Epithelial sodium channels, Na, K-ATPase

ATPasa de la membrana basolateral mediante glucósidos cardiotónicos.⁴ El transporte iónico en el colon depende del metabolismo aerobio.⁵ Se ha desarrollado un método para la determinación del consumo epitelial de oxígeno en condiciones que preservan el transporte vectorial de iones⁶, que ha permitido la caracterización de las demandas energéticas del transporte de cloruro basal y estimulado.⁷ Actualmente se estudia la dependencia energética del transporte electrogénico de sodio. Dicho transporte es el proceso que determina gran parte del consumo epitelial de oxígeno en ratas privadas de sodio.⁴

Se desconoce si el mero bloqueo de los canales apicales de Na⁺ produce una reducción igual del consumo de oxígeno que el bloqueo de la Na,K-ATPasa de la membrana basolateral. Dado que la Na,K-ATPasa cumple múltiples funciones en la célula,⁸ la hipótesis del presente trabajo es que su bloqueo producirá una depresión del consumo de oxígeno mayor que la causada por bloqueo del ingreso apical de sodio.

Materiales y métodos

Ratas machos adultas, cepas Wistar-Hokkaido ($n = 24$) fueron obtenidas del ratario y mantenidas durante 10 días con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Se las alimentó *ad libitum* con una dieta pobre en sodio, (ICN 902902 de ICN Biomedicals, Inc.), con la cual se puede obtener, de manera consistente, una marcada elevación de la aldosterona sérica.⁵ Se les proporcionó agua bidestilada para beber.

Al cabo del período de privación de sodio, los animales fueron anestesiados con éter. Se practicó una incisión abdominal amplia, y se extrajo el colon, que fue perfundido con disolución Ringer para limpiarlo. Se disecó bajo lupa estereoscópica (Zeiss) un segmento de 2 a 3 cm del colon distal para obtener un preparado de mucosa aislada. Este último se montó como una lámina plana en una cámara de Ussing modificada, que permite la determinación simultánea del consumo de oxígeno y la corriente de cortocircuito (Fig. 2).⁶

Cada hemicámara tiene un surco en la abertura (ventana). Dicho surco se rellenó con grasa siliconada (Dow Corning), para sellar la lámina epitelial en los bordes. La cámara se cerró con tornillos provistos de arandelas de goma para evitar una presión que causara un daño excesivo de los bordes de la lámina epitelial.

El gas empleado fue una mezcla de 95 % O_2 y 5 % CO_2 de composición certificada (Air Liquide). La solución

Ringer empleada durante la disección y en la cámara tenía la siguiente composición (mmol/L): 107 NaCl, 24 $NaHCO_3$, 4.5 KCl, 1.25 $CaCl_2$, 1.0 $MgCl_2$, 0.8 Na_2HPO_4 , 0.2 NaH_2PO_4 , 10 D (+) glucosa. El pH fue 7.40 cuando se saturó la solución con la mezcla gaseosa.

Para evitar la proliferación bacteriana, se añadió gentamicina (Schering-Plough) a la solución Ringer con una concentración final de 91 mg/L. La amilorida y la uabaína fueron adquiridas de Sigma-Aldrich. La amilorida se disolvió en etanol absoluto antes de cada experimento (el etanol absoluto solo carece de efecto sobre el consumo de oxígeno o la corriente de cortocircuito a la concentración empleada). La uabaína se disolvió en NaCl isotónico.

La cámara poseía una ventana de 1 cm^2 y entradas para electrodos de registro de potencial (calomelanos conectados mediante puentes salinos con Agar 3 %) e inyección de corriente ($Ag/AgCl_2$), estos últimos sellados mediante roscas y grasa siliconada (Dow Corning). La cámara tenía un sistema de circulación interna de su contenido para cada hemicámara. Se determinó continuamente la corriente de cortocircuito (I_{sc}) y, cada 5 min, la diferencia de potencial transepitelial. La resistividad transepitelial se calculó mediante la ley de Ohm.

La homogenización del contenido se aseguró mediante pequeños imanes que eran puestos en movimiento por un agitador magnético (Hanna HI 300 N). El contenido de la cámara podía ser removido sin ponerlo en contacto con el ambiente, mediante accesos apropiados. Ambas hemicámaras poseían entradas para sendos oxímetros polarimétricos (WTW 340 con sondas CellOx 325) y medidores de temperatura. Un circuito de circulación externa de agua permitía fijar la temperatura de la cámara, mediante agua a 37 °C provista por un baño termostático Radiometer VTS 13.

Luego de un período de 90 min con el preparado en la cámara de Ussing, necesario para la estabilización de la temperatura, el consumo de oxígeno y la corriente de cortocircuito,⁷ se determinó durante 30 min el consumo de oxígeno y la corriente de cortocircuito en condición basal. El consumo de oxígeno se calculó a partir de la suma de las diferencias de concentración del gas en cada hemicámara. El valor de la corriente de cortocircuito corresponde a la media registrada durante el mismo período.

A continuación de la determinación basal se añadió uabaína (1 mmol/L) del lado basolateral (n = 12) o amilorida (0.1 mmol/L) del lado

luminal (n = 12) y luego de que la corriente se estabilizara en su nuevo valor, se determinó el consumo de oxígeno y la corriente de cortocircuito durante un segundo período de 30 min.

La disminución del consumo de oxígeno con cada fármaco se evaluó según el cambio tras su adición, en comparación con el consumo basal. Del mismo modo, la reducción en la corriente de cortocircuito se obtuvo como la diferencia en el valor medio en el período basal y en el período luego de añadir uabaína o amilorida.

El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 3.0 para Windows (GraphPad, San Diego, EE.UU.). Los resultados se expresan como media \pm SEM. Se compararon los cambios mediante prueba *t* de Student para datos apareados (en cada grupo) y no apareados (entre grupos). La relación entre la variación del consumo de oxígeno y de la corriente de cortocircuito en ambas condiciones se analizó mediante regresión lineal [4, 6, 7]. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Los resultados se resumen en la Tabla 1.

En condición basal, ambos grupos mostraron elevados consumos de

oxígeno y corrientes de cortocircuito, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Ambos tratamientos redujeron significativamente el consumo de oxígeno y la corriente de cortocircuito. La disminución de la corriente de cortocircuito con uabaína o con amilorida no mostró diferencia estadísticamente significativa y el grado de inhibición fue en ambos casos mayor de 80 % del respectivo valor basal. No obstante, la reducción en el consumo de oxígeno fue mayor con uabaína (37%) que con amilorida (31%); $p < 0.03$.

Discusión

En condiciones de ingesta normal de sodio, la corriente de cortocircuito del colon distal de la rata se debe principalmente a secreción de cloruro.^{6,7} La absorción de sodio se realiza principalmente por absorción electroneutra acoplada con el transporte transcelular de cloruro.^{1, 2, 9} No obstante, el colon distal de rata es un blanco para la acción de la aldosterona cuando la concentración de ésta es elevada.^{3,9} La deficiencia de sodio dietario causa una elevación importante de la aldosterona sérica, suficiente para inducir absorción electrogénica de sodio,⁹ lo cual se considera un mecanismo de adaptación, que juntamente con las acciones de la aldosterona en la nefrona distal y otros epitelios (como glándulas)¹⁰ contribuye a

La correlación entre la reducción en el consumo de oxígeno y la disminución de la corriente de cortocircuito con ambos tratamientos se evaluó por regresión lineal (Fig. 3). Las respectivas líneas de regresión con uabaína y amilorida no difirieron en su pendiente, pero la elevación (altura) de la curva fue mayor con amilorida. Esto significa que, para igual grado de reducción de la corriente de cortocircuito, el consumo de oxígeno es reducido en menor medida por la amilorida que por la uabaína.

atenuar las consecuencias de la deficiencia de sodio en la dieta.

La absorción electrogénica de sodio en el colon tiene lugar por la vía transcelular e involucra el ingreso de Na^+ a favor de su gradiente electroquímico desde la luz intestinal al citosol del enterocito, y su egreso hacia el líquido intersticial, en contra del gradiente electroquímico.¹¹ Este segundo paso requiere transporte activo y es mediado por la Na, K-ATPasa . La diferencia de potencial creada por el transporte electrogénico de Na^+ impulsa la absorción de cloruro por la vía paracelular. A su vez, el gradiente osmótico creado por la absorción de sodio y cloruro promueve la absorción de agua por la misma vía.^{1,2}

El ingreso apical de Na^+ es bloqueado por la amilorida y fármacos afines,¹² mientras que los glucósidos cardiotónicos como la uabaína son inhibidores selectivos de la Na,K-ATPasa.¹³

En los experimentos informados aquí, la uabaína y la amilorida mostraron igual eficacia para reducir la corriente de cortocircuito, que en las presentes condiciones experimentales se debe en su mayor parte a la absorción electrogénica de sodio.⁹ Ambos fármacos redujeron significativamente el consumo epitelial de oxígeno y dichas reducciones mostraron correlaciones estadísticamente significativas con las respectivas disminuciones de la corriente de cortocircuito.

Las pendientes de ambas regresiones lineales fueron similares, pero la elevación fue mayor con amilorida, lo que significa que este fármaco causa menor reducción que la uabaína del consumo de oxígeno por cada unidad de disminución de la corriente de cortocircuito, lo cual es consistente con la hipótesis de trabajo antes formulada.

En efecto, la amilorida no interactúa con la Na,K-ATPasa, sino que reduce su actividad indirectamente, al interferir con el ingreso apical de Na^+ por canales epiteliales para dicho ión. Por tanto, presumiblemente no interfiere con otras funciones de la Na,K-ATPasa diferentes de las relacionadas con la absorción electrogénica de Na^+ , como el mantenimiento de la concentración intracelular de K^+ , entre otras.⁸

Por el contrario, al inhibir directamente la enzima, la uabaína suprime tanto su actividad vinculada con el transporte activo como la relacionada con tareas de mantenimiento de la homeostasis. Una menor tasa de hidrólisis de ATP reduce el consumo epitelial de oxígeno.¹⁴

Aunque la diferencia en el efecto de ambos fármacos sobre el consumo de oxígeno es estadísticamente significativa, su magnitud absoluta es relativamente pequeña. Esto puede atribuirse al hecho de que, en los epitelios donde existe transporte vectorial de iones, sólo una proporción menor del ATP hidrolizado por la Na, K-ATPasa se emplea para procesos diferentes del transporte iónico transepitelial.^{11,14}

No obstante, la diferencia puede contribuir a explicar las diferencias en la relación de acoplamiento entre transporte de sodio y consumo de oxígeno notado en diferentes epitelios, y explicar la dificultad en estimar una estequiometría válida entre moles de sodio transportado y de oxígeno consumido.^{14, 15}

En resumen, en el colon distal de ratas privadas de sodio, tanto el bloqueo de canales apicales con amilorida como de la Na,K-ATPasa de la membrana basolateral con uabaína causan reducciones en la corriente de cortocircuito que se correlacionan significativamente con la reducción en el consumo epitelial de oxígeno. Sin embargo, la reducción del consumo de oxígeno es mayor cuando se bloquea directamente la Na,K-ATPasa

.Agradecimientos

Trabajo subsidiado por la Secretaría de Ciencia, Técnica e Innovación Productiva de la Universidad Nacional de Cuyo. La participación de Flavia Galella (estudiante de Enfermería Universitaria) fue posible gracias a una beca para estudiantes de la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Médicas. Johan Widenberg fue estudiante de intercambio del Instituto Karolinska (Estocolmo, Suecia) durante la realización del estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

1. Binder HJ, Sandle GI. Electrolyte transport in the mammalian colon. En Johnson LR [Ed.], Physiology of the Gastrointestinal Tract, 2nd Ed., pp. 2133-2177. New York: Raven Press, 1994.
2. Halm DR, Frizzell RA. Ion transport across the large intestine. En Field M, Frizzell RA [Ed.], Handbook of Physiology, Section 6: The Gastrointestinal System, Vol. 4, Intestinal Absorption and Secretion, pp. 257-273. Bethesda: American Physiological Society, 1991.
3. Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. Control of electrogenic Na⁺ Absorption in rat late distal colon nanomolar aldosterone in vitro. Am J Physiol 1993; 264 (1): E68- E73.
4. Velázquez Fernández R. Consumo de oxígeno y transporte electrogénico en el colon distal de ratas normales y privadas de sodio. Tesis Doctoral. Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas (PROBIOL), Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, 2001.
5. Saraví FD, Saldeña TA, Tonn EF, Cincunegui LM, Carra GE, Ibáñez JE. Sodium-deprived rat distal colon epithelial response to acute hypoxia and reoxygenation. Acta Gastroenterol Latinoam 2001; 31 (3):123-130.
6. Saraví FD, Saldeña TA, Carrera CA, Ibáñez JE, Cincunegui LM, Carra GE. Oxygen consumption and chloride secretion in rat distal colon isolated mucosa. Digest Dis Sci 2003; 48 (9):1767-1773.
7. Saraví FD, Cincunegui LM, Saldeña TA, Carra GE, Ibáñez JE. Increased oxygen consumption caused by cAMP- and Ca²⁺-mediated chloride secretion in rat distal colon. Acta Gastroenterol Latinoam 2005; 35 (1):13-18.
8. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Introducción a la Biología Celular, 2^a Ed., pp. 389-425. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 2006.

9. Pácha, J, Pohlová, I. Relationship between dietary Na⁺ intake, aldosterone and colonic amiloride-sensitive Na⁺ transport. *Br J Nutr* 1995; 73 (4): 633-640.
10. Booth RE, Johnson JP, Stockhand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Educat* 2002; 26 (1): 8-20.
11. Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 2002; 82 (1): 245-289.
12. Alvarez de la Rosa M, Canessa CM, Fyfe CK, Zhang P. Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol* 2000; 62:573-594.
13. Therien AG, Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol* 2000; 279 (3): C541–C566.
14. Mandel LJ, Balaban RS. Stoichiometry and coupling of active transport to oxidative metabolism in epithelial tissues. *Am J Physiol* 1981; 240 (5); F357-F371.
15. Durand J, Durand-Arczynska W, Wankmiller D. Coupling of active sodium transport to oxidative metabolism in the rabbit distal colon. *J Physiol (London)* 1988; 396: 55-64.

Tabla 1: Efectos de la uabaína y la amilorida sobre el consumo de oxígeno y la corriente de cortocircuito del epitelio del colon de ratas con privación crónica de sodio.

	Consumo de oxígeno ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)			Corriente de cortocircuito ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)		
	Basal	Tratado	<i>p</i>	Basal	Tratado	<i>p</i>
Uabaína (n = 12)	3.358 ± 0.103	2.117 ± 0.049	< 0.0001	110.6 ± 8.4	16.2 ± 1.7	< 0.0001
Amilorida (n = 12)	3.335 ± 0.098	2.293 ± 0.059	< 0.0001	108.7 ± 9.2	12.5 ± 1.9	< 0.0001
<i>p</i>	NS	0.01		NS	NS	

Los valores tabulados son medias \pm SEM. Las comparaciones dentro de cada grupo se realizaron mediante prueba *t* de Student para datos apareados. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante prueba *t* de Student para datos no apareados.

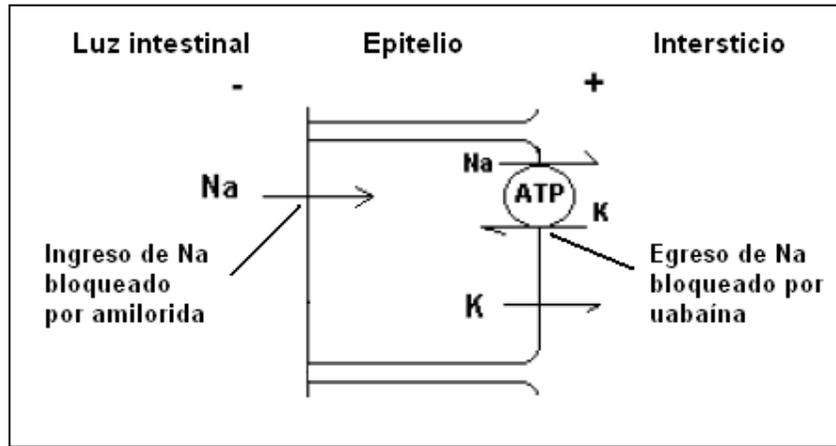


Figura 1: Modelo simplificado de absorción electrogénica de Na^+ en el colon de ratas con déficit dietario de sodio.

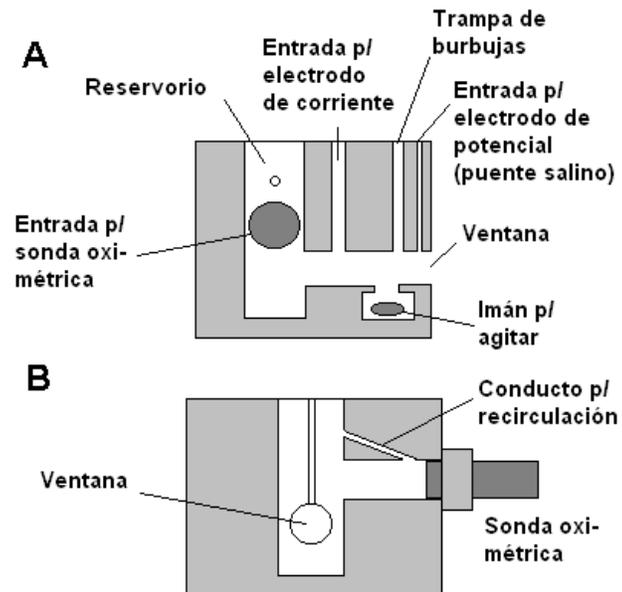


Figura 2: Cámara de Ussing modificada para determinación del consumo de oxígeno, empleada para los experimentos. A, vista de perfil; B, vista de frente.

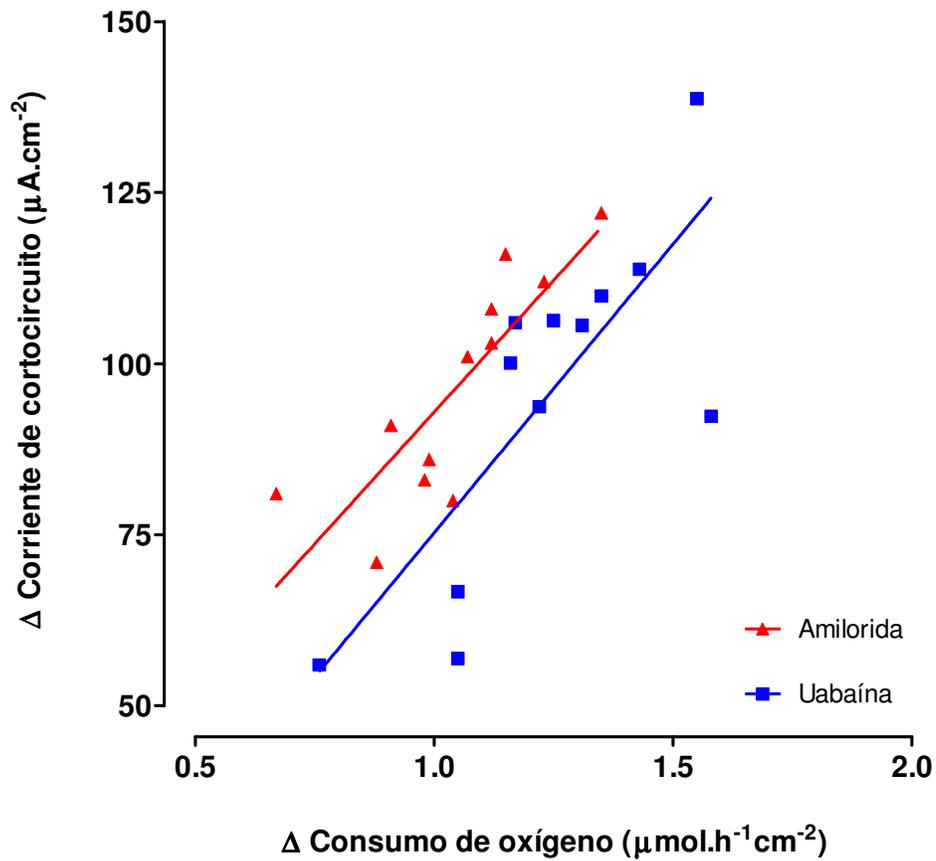


Figura 3: Regresión lineal entre la reducción del consumo de oxígeno (ΔQO_2) y de la corriente de cortocircuito (ΔI_{sc}) causados por uabaína (cuadrados) y amilorida (triángulos). La correlación es significativa en ambos casos. Las líneas de regresión difieren en su posición o altura ($p = 0.009$) pero no en su pendiente ($p = 0.796$).